

알긴산 분해 미생물의 탐색 및 생육 특성

어명희¹ · 주동식² · 조순영^{3*}

¹강릉대학교 해양생물산업협동과정

²한중대학교 오리엔탈웰빙학부

³강릉대학교 동해안해양생물자원연구센터

Screening and Cultivation Characteristics of Alginate Degrading Bacteria

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

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

Abstract

For the purpose of oligosaccharide production from alginate, the main component in cell walls of brown algae, the alginate degrading bacteria have been screened from the seaweeds and soil. Among the isolated 69 strains, one strain showing the highest degrading activity was selected and identified as *Bacillus licheniformis* strain. The adequate sodium alginate concentration for growing the *Bacillus licheniformis* was 2.0%. The effective nitrogen source is nutrient broth (0.1%), and optimum initial pH, NaCl concentration, temperature and incubation time to produce the alginate degrading enzyme were 7.5, 2%, 30 ± 2°C, and 144 hrs, respectively.

Key words: alginate, oligosaccharide, *Bacillus licheniformis*, *Chaetomorpha moniligera*

서 론

알긴산(alginic acid)은 갈조류의 세포벽 구성다당류로 D-mannuronic acid와 L-guluronic acid가 α -1,4 결합 또는 β -1,4 결합으로 이루어진 다당류로 갈조류의 종류, 부위, 크기 등에 따라 다양한 구성비를 가져 여러 응용 범위 내에서 사용되고 있다(1-6). 또한 알긴산은 체내 중금속 흡수 제거 효과, 콜레스테롤 저하효과 등이 있는 것으로 알려져 기능성 식품소재로서도 활용될 수 있다.

올리고당의 항암 및 항균작용, 면역증강, 장내세균 군집 개선효과, 항콜레스테롤 효과, 기타 다양한 생체조절기능에 대한 연구 결과들이 발표됨에 따라 해조류 유래의 알긴산을 기반으로 한 올리고당 제조에 대한 관심이 높아지고 있다(7-9). 그런데 해조 다당류 즉 알긴산으로부터 올리고당화하기 위해서는 알긴산 분해활성을 가진 미생물로부터 알긴산 분해효소를 대량 배양 생산하는 것이 가능해져야 산업적 알긴산 올리고당 생산이 가능하다. 그래서 *Pseudomonas* 속을 포함한 알긴산 분해 효소 생산 해양미생물 몇 종이 탐색 보고되고 있고(10-19), 해조 다당류를 원료로한 올리고당의 제

조와 관련된 연구도 국내 외에서 알긴산과 한천에 대해 보고되기 시작하였다(8,20-23).

본 연구는 효소를 이용하여 알긴산을 분해하여 유용한 올리고당을 제조할 목적으로 알긴산을 특이적으로 그리고 효율적으로 분해하는 효소를 미생물로부터 획득하기 위해 자연계로부터 본 효소의 생산능이 우수한 세균 검색을 행하여, 그 중 알긴산 분해능이 높은 효소 생산 미생물을 동정함과 동시에 그 생육 특성을 구명하였다.

재료 및 방법

알긴산 분해 세균 분리원

알긴산 분해 균의 검색을 위한 시료는 2004년 3월부터 2004년 9월 사이에 강원도 동해시부터 고성군 사이의 동해안 바닷가에서 채취한 다양한 종류의 해조, 해수, 해양토양들로서 이들로부터 알긴산 분해가능 균주를 선별하였다.

세균 분리 및 배양 배지

균주 분리용 다층 평판 배지의 하층은 NaCl 2.0%(토양시

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

료 0.85%), KH₂PO₄ 0.05%, K₂HPO₄ 0.05%, FeSO₄ · 6H₂O 0.001%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%, KCl 0.05%, bacto-agar 2.0%, pH 7.5이었고, 상층배지로 sodium alginate 0.1%, bacto-agar 2.0%, pH 7.5로 하였다(8,9). 분리한 균주의 알긴산 분해능 측정은 상기 하층 배지에서 bacto agar를 제외한 배지를 이용하였고, 배양 조건을 위한 기본 배지는 peptone 0.1% bacto peptone, 0.5% sodium alginate, 1.0% NaCl, pH 7.5인 것을 이용하였다.

알긴산 분해 세균 분리

알긴산 분해 활성을 갖는 세균의 분리는 분리 배지중 하층 배지를 멸균한 후 petri dish에서 완전히 굳힌 후, 상층 배지를 멸균하여 다시 얇게 부어 굳힌 후 균질화시킨 샘플을 단계별 희석시킨 후 시료를 1 mL 취하고, conradi stick으로 도말하여 25±2°C에서 5~7일간 배양하여 형성된 독립 colony를 분리하고 다시 고체 배지상에서 streaking하여 분리된 독립 colony를 분해능 측정 시험 균주로 하였다.

분리 세균의 알긴산 분해능 측정

분리된 세균은 분해활성 측정배지에 접종하여 7일간 정치 배양(25°C±2)하였으며 배양 상층액의 환원당을 측정하여 알긴산 분해능으로 측정하였다. 환원당은 Somogyi-Nelson (24,25)법에 따라 시료 용액 1 mL와 CuSO₄(동) 시약 1 mL를 test tube에 각각 취하고, water bath에서 20분간 가열하여 산화제1동(Cu₂O)을 생성하였다. 여기에 폴리브덴 용액 1 mL을 가하여 발색시킨 다음 520 nm에서 흡광도를 측정하여, 표준당(mannuronic acid)을 사용, 작성한 표준 검량선으로부터 환원당을 정량하였다.

알긴산 분해효소 활성 측정

Peptone 배지를 기본배지로 하고 탄소원 및 질소원의 종류, 탄소원 및 질소원의 농도, NaCl 농도, 배양온도, 초기 pH 및 배양 시간을 달리하면서 7일 배양한 후 원심분리(12,000×g, 30 min)하여 상층액을 조효소액으로 하였다. 반응 기질은 0.3 M NaCl, 50 mM Tris-HCl buffer(pH7.0) 용액에 sodium alginate(Sigma Co., USA)를 0.4 또는 0.8% 농도로 제조하였다. 반응은 기질 1 mL와 조효소 1 mL을 항온수조(30°C)에서 60분간 반응시킨 다음 그 중 1 mL를 취하여 Somogyi-Nelson(24,25)법으로 정량하였다. 효소 1 unit는 1분에 1 μmole의 환원당을 생산하는 효소량으로 정의하였고, 상대 활성으로 나타내었다.

분리 균의 동정

분리된 균주의 동정은 각종 생리, 생화학적 특성을 실험하고, 추가로 ID 32 GN Automatic Identification 시스템(Biomérieux, St. Louis, MO)을 이용하여 당의 이용성 등을 조사하였고, Bergey's Manual Systematic Bacteriology(26), Gibbs와 Skinner(27)의 분류 방법에 따라 동정을 행하였다.

결과 및 고찰

알긴산 분해효소 생산 균의 탐색

해조류, 해수 및 해양토양 등 37종의 분리원으로부터 629 균주가 분리되었고(Table 1), 이 중에서 일부 균들은 알긴산 포함 평판 배지에서 투명화를 보였고, 몇몇은 고체 배지를 분해하여 액화시키는 한천 분해 특징도 나타내었다. 한편 육상토양에서는 알긴산 분해 활성 균주가 분리되지 않았고, 주로 해양에서 생육하는 해조류에서 많은 알긴산 분해능을 가진 균주들이 분리되었다.

분리 균주의 알긴산 분해능

분리된 균의 알긴산 분해능을 환원당 생성능으로부터 측정한 결과, 약 69종의 균주가 알긴산을 분해하는 활성이 있는 것으로 판단되었다. 환원당 생성능이 0.899 mg/mL로

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

No	Sample name		No. of isolated strain
	Common name	Scientific name	
1		<i>Chaetomorpha moniligera</i>	20
2	Green laver	<i>Enteromorpha prolifera</i>	18
3		<i>Enteromorpha linza</i>	8
4		<i>Monostroma nitidum</i>	8
5	Cribrous tangle	<i>Agarum cribrosum</i>	20
6		<i>Plocamium telfairiae</i>	23
7		<i>Cladophora densa</i>	9
8	Red eyelet silk	<i>Rhodomenia pertusa</i>	23
9	Buddhas-ear	<i>Pachymeniopsis elliptica</i>	56
10		<i>Dictyopteris divaricata</i>	6
11	Whip tube	<i>Scytosiphon lomentarius</i>	19
12		<i>Chaetomorpha spiralis</i>	5
13	Pocket thief	<i>Colpomenia sinuosa</i>	42
14	Silkworm tail	<i>Sargassum thunbergii</i>	23
15	Sea mustard	<i>Undaria pinnatifida</i>	26
16		<i>Coccolophora cangsdorfii</i>	8
17	Holey sea lettuce	<i>Ulva pertusa</i>	15
18		<i>Symphocladia linearis</i>	9
19	Green confertii	<i>Enteromorpha compressa</i>	21
20	Bootlace weed	<i>Chorda filum</i>	19
21	Agar-agar	<i>Pterocladia cappillacea</i>	62
22	Tabakogusa	<i>Desmarestia tabacoides</i>	4
23	Sea lentil	<i>Sargassum horneri</i>	5
24		<i>Spathoglossum pacificum</i>	21
25	Seersucker	<i>Costaria costata</i>	20
26		<i>Gymnogongrus flabelliformis</i>	4
27	Ceylon moss	<i>Gelidium amansii</i>	9
28		<i>Nemalion vermiculare</i>	3
29		<i>Sargassum hemiphyllum</i>	12
30	Typocus	<i>Grateloupia turuturu</i>	4
31	Sewing thread	<i>Gracilaria textorii</i>	3
32	Irishmoss	<i>Cladophora stimpsonii</i>	6
33	"	<i>Chondrus ocellatus</i>	15
34	Sea tangle	<i>Laminaria japonica</i>	25
35		<i>Endarachne binghamiae</i>	12
36	Typicus	<i>Grateloupia okamurae</i>	4
37	Soil		42
Total			629

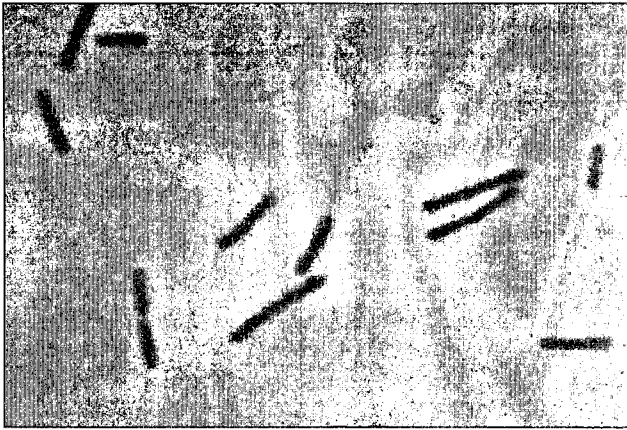


Fig. 1. Optical microscope photograph of the isolated strain grown on Marine agar solid medium at 30°C for 2 days.

가장 높았던 균주를 알긴산 분해 효소 생산균으로 최종 결정하였다. 이는 Joo 등(21)이 고활성 균이라 분리하였던 균주 0.355 mg/mL에 비하여 약 2.6배나 높아 상업적 활용 가능성을 나타내었으며 분리된 균주의 광학 현미경 사진은 Fig. 1과 같다.

분리균주의 생육 조건에 따른 조효소액의 활성

탄소원의 종류와 농도 : 알긴산 및 다른 종류의 탄소원이 균체의 성장이나 알긴산 분해 효소 생산에 미치는 영향을 실험한 결과는 Table 2와 같다. 알긴산 대신에 동일 농도로 첨가된 탄소원들은 분리균의 성장과 분해 효소 생산에 효과적이지 못한 것으로 확인되었고, 특히 알긴산 이외의 다당류는 분해 효소 생산을 위한 탄소원으로는 적당하지 못하다는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 알긴산 분해 효소 생산에 알긴산이 반드시 탄소원으로 첨가되어야 한다는 것을 의미하는 것이다. 한편, 알긴산 농도를 달리하면서 동일 실험을 행한 결과(Table 3), 알긴산 농도가 2%까지는 분해 활성이 증가하다가 그 이상의 농도에서는 분해 활성이 큰 차이를 나타내지 않았다. 이는 알긴산 농도가 높아짐에 따라 배지의 점도가 높아지고 일정 수준에 이르러서는 균의 성장을 오히려 저해하는 요소로 작용할 수 있다는 것을 의미한다.

Table 2. Effect of carbon source on bacterial growth and the activity of extracellular alginate degrading enzyme

Carbon source ¹⁾	Biomass ²⁾	Relative enzyme activity (%)
Alginate	0.971	100.0
CMC	0.064	6.5
Starch	0.072	8.0
Glucose	0.052	57.7
Fructose	0.561	54.5
Maltose	0.580	59.4
Galactose	0.579	50.7

¹⁾Carbon source concentration, 1.0%.
Base medium and growth condition: nutrient broth 0.5%, NaCl 2.0%, pH 7.5, temp 30±2°C, time 144 hr.

²⁾O.D. value at 620 nm.

Table 3. Effect of Na-alginate concentration on bacterial growth and the activity of extracellular alginate degrading enzyme

Sodium alginate conc. (%) ¹⁾	Biomass ²⁾	Relative enzyme activity (%)
0	0.058	4.5
0.2	0.820	65.7
0.5	0.934	73.7
0.7	1.005	79.0
1.0	1.114	86.1
1.5	1.163	89.4
2.0	1.220	100
2.5	1.194	98.0

¹⁾Base medium and growth condition: nutrient broth 0.5%, NaCl 2.0%, pH 7.5, temp 30±2°C, time 144 hr.

²⁾O.D value at 620 nm.

Yonemoto 등(28)도 알긴산 분해균은 배양 배지 중에 알긴산 농도가 1.0%까지는 성장 및 알긴산 분해 활성이 증가하다가 1.0% 이상의 농도에서는 균체 성장의 급격한 저하와 아울러 분해 활성도 저하한다고 보고한 바 있다. 본 연구에서도 탄소원으로서 알긴산의 농도를 1.0% 수준으로 결정하였는데, 이는 1.0% 이상의 알긴산이 첨가되면 정도의 증가로 효과적인 배양 및 효소생산이 어려운 점을 고려한 것이었다.

질소원의 종류와 농도 : 질소원을 달리 하면서 배양한 후 얻어진 조효소액의 환원당 생성능을 측정한 결과는 Table 4와 같다. 무기 질소원을 사용한 배지에서는 균체의 성장 및 효소 활성이 거의 나타나지 않았고, 유기 질소원의 경우 조금씩 차이를 보였으나 대부분 분해 활성이 있는 것으로 나타났다. 각 유기 질소원에 따라 농도를 달리하면서 배양한 결과(Table 5), peptone, yeast extract 및 nutrient broth가 질소원으로 이용될 수 있었지만 낮은 농도임에도 불구하고 성장과 분해능이 뛰어났던 nutrient broth가 가장 적절한 질소원으로 여겨졌다. 아울러 0.1% 농도 수준으로 첨가할 경우에 가장 높은 활성을 보였으며, 그 이상 질소원의 농도를 높일 경우 균체의 성장은 0.5% 농도까지는 증가하였으나, 분해 활성은 0.1% 이상의 농도에서는 오히려 낮아지는 경향이 있었다.

Table 4. Effect of nitrogen source on bacterial growth and the activity of extracellular alginate degrading enzyme

Nitrogen-source ¹⁾	Biomass ²⁾	Relative enzyme activity (%)
Peptone	0.601	60.2
Yeast extract	0.581	57.5
Nutrient broth	1.121	100.0
Urea	-	-
NH ₄ Cl	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-

¹⁾Base medium and growth condition: alginate conc. 1.0%, nitrogen source 0.5%, NaCl 2.0%, pH 7.5, temp 30±2°C, time 144 hr.

²⁾O.D. value at 620 nm.

Table 5. Effect of nitrogen source percentage on bacterial growth and the activity of extracellular alginate degrading enzyme

Nitrogen-source ¹⁾	%	Biomass ²⁾	Relative enzyme activity (%)
Peptone	0.1	0.601	60.1
	0.3	0.644	56.6
	0.6	0.683	58.1
	0.7	0.788	52.5
	1.0	0.792	49.6
Yeast extract	0.1	0.581	57.5
	0.3	0.659	65.7
	0.5	0.700	73.3
	0.7	0.860	79.8
	1.0	0.888	85.6
Nutrient broth	0.1	1.121	100.0
	0.3	1.102	95.1
	0.5	0.977	84.4
	0.7	0.981	76.2
	1.0	0.971	72.0

¹⁾Base medium and growth condition: alginate conc. 1.0%, NaCl 2.0%, pH 7.5, temp 30±2°C, time 144 hr.

²⁾O.D. value at 620 nm.

pH: 균체 성장과 분해 활성에 미치는 초기 배지 pH의 영향은 Table 6과 같다. 본 균주는 미알칼리성 영역인 pH 7.5에서 분해 활성이 최대였고, pH 5.0 이하의 조건에서는 균체의 성장과 분해 활성이 거의 나타나지 않았다. 마찬가지로 pH 9.0 이상의 알칼리성 영역에서도 분해 활성이 나타나지 않았다. 아울러 본 균주의 pH에 대한 민감도가 매우 큰 것으로 여겨졌는데, pH 7.5를 중심으로 pH 7.0과 8.0의 조건에서 알긴산 분해활성이 크게 낮아지는 특성을 확인할 수 있었다. 따라서 본 균주의 적절한 배양 배지 pH는 7.5로 결정하였다.

NaCl 농도: 해양에서 분리된 본 균주는 균체의 성장 및 효소 활성에 NaCl 농도가 영향을 줄 것으로 판단하고 NaCl 농도를 달리한 배지에서 균체의 성장과 알긴산 분해 활성을 살펴본 결과는 Table 7과 같다. NaCl이 첨가되지 않은 경우 균은 거의 생육하지 않음을 알 수 있었는데, 이는 해양에서 생육하는 미생물의 경우 성장 및 효소 생산에 적정 농도의

Table 6. Effect of initial pH on bacterial growth and the activity of extracellular alginate degrading enzyme

pH ¹⁾	Biomass ²⁾	Relative enzyme activity (%)
4.0	0.080	9.5
5.0	0.106	10.1
6.0	0.772	23.0
7.0	0.962	46.4
7.5	1.121	100.0
8.0	0.858	79.6
9.0	0.101	7.7

¹⁾Base medium and growth condition: alginate conc. 1.0%, nutrient broth 0.1%, NaCl 2.0%, temp 30±2°C, time 144 hr.

²⁾O.D. value at 620 nm.

Table 7. Effect of NaCl concentration bacterial growth and the activity of extracellular alginate degrading enzyme

NaCl conc. (%) ¹⁾	Biomass ²⁾	Relative enzyme activity (%)
0	0.127	10.7
0.5	0.331	30.4
1.0	0.653	67.9
2.0	1.122	100.0
2.5	0.741	70.2
3.0	0.085	55.2
4.0	0.060	5.3

¹⁾Base medium and growth condition: nutrition broth 0.1%, alginate conc. 1.0%, pH 7.5, temp 30±2°C, time 144 hr.

²⁾O.D. value at 620 nm.

1가 또는 2가 이온이 필요하다고 하였는데, 이는 미생물의 삼투 조절과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다(29). 본 실험에서도 NaCl 농도 2.0%까지는 균의 성장과 효소활성이 증대하였으나 그 이상의 농도에서는 효소활성이 급격히 저하하는 것을 확인하였고, 그 결과 본 균주의 경우 NaCl 2.0% 농도가 성장 및 효소 생산에 유리함을 알 수 있었다.

Table 8. Effect of temperature condition on bacterial growth and activity of the crude enzyme

Temp ¹⁾ (°C)	Biomass ²⁾	Relative enzyme activity (%)
5	0.080	9.5
10	0.114	10.1
15	0.365	23.0
20	0.586	46.4
25	0.843	87.2
30	1.126	100.0
37	0.651	65.7
45	0.120	11.8
50	0.116	11.0

¹⁾Base medium and growth condition: nutrition broth 0.1%, alginate conc. 1.0%, NaCl 2.0%, pH 7.5, time 144 hr.

²⁾O.D. value at 620 nm.

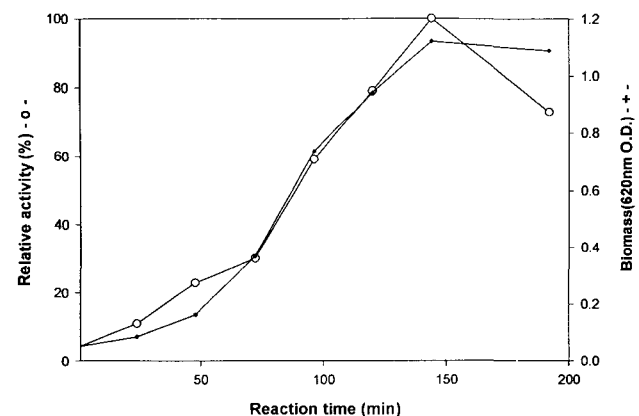


Fig. 2. Effect of incubation time on the activity of extracellular alginate degrading enzyme.

Base medium and growth condition: nutrition broth 0.1%, alginate conc. 1.0%, NaCl 2.0%, pH 7.5, temp 30±2°C.

Reaction condition: substrate 0.4% Na-alginate 1 mL (50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0), crude enzyme 1 mL, 37°C, 60 min.

Table 9. Characteristics of strain AL-577 isolated from a seaweed, *Chaetomorpha moniligera*

Properties		Properties	
Gram staining	+	Rhamnose	+
Motility	-	D-Sucrose	+
O/F test open	+	D-Melibiose	+
cover	+	N-Acetyl-Glucosamine	+
Oxidase	-	L-Fucose	+
Catalase	+	D-Sorbitol	+
NO ₃ ⁻ → N ₂ O ⁻	+	L-Arabinose	+
N ₂ O → N ₂	-	Acetate	+
Glucose acidification	+	Caprate	-
Indole production	-	Valerate	+
Arginine dihydrolase	+	Suberate	-
Urease	+	Mannitol	+
beta-glucosidase	+	2-Ketogluconate	-
beta-galactosidase	+	Glycogen	+
Hydrolysis of protein	+	Salicin	+
Hydrolysis of starch	+	DL-Lactate	+
Hydrolysis of lipid	-	D-Glucose	+
		D-Ribose	+
Malonate	-	5-Ketogluconate	-
Propionate	+	Utilization of citrate	+
3-Hydroxy-benzoate	-	Maltose	+
4-hydroxy-benzoate	-	Itaconate	+
3-Hydroxy-butyrate	-	L-Serine	-
L-Proline	+	Inositol	+
Histidine	+	3-Hydroxy-benzoate	-
L-Alanine	+		

배양 온도 : 배양 온도를 달리 하였을 때의 성장 및 알긴산 분해 활성은 Table 8과 같다. 일반적으로 해수세균의 경우에 20°C 부근에서 잘 성장하는 것으로 알려져 있는데, 본 균주는 30°C에서 균체 성장 및 분해 활성이 가장 높았다. 한편, 15°C 이하와 37°C 이상의 온도에서는 균체 성장 및 알긴산 분해 활성이 급격히 낮아지는 것을 확인하였다.

배양 시간 : 앞에서 결정한 적정 배양 조건에서 배양 시간을 달리하면서 균체의 성장과 분해 활성을 실험한 결과(Fig. 2), 배양 144~150 시간에서 균체 성장 및 조효소액의 알긴산 분해 활성이 최대에 달하였고, 그 이후에는 천천히 감소하였는데 이는 배지의 영양성분의 고갈 및 세포 성장에 따른 대사 산물의 축적으로 사료된다.

분리균의 동정

상기한 분리 균을 동정하기 위해 생리적, 생화학적 특성을 실험한 결과는 Table 9에 나타내었다. 그람 양성 간균으로 catalase를 생성하며 oxidase는 생성하지 않았다. MaConky agar에서 성장하는 특성과 각종 당류의 이용성 등을 고려해 볼 때, *Bacillus licheniformis*로 분류할 수 있었고, DNA 염기조성을 분석한 결과 99%이상 *Bacillus licheniformis*의 유전자와 일치함을 확인할 수 있었다. 이 균주를 AL-577이라고 명명하였다.

요 약

해양생물 및 토양으로부터 총 619주의 알긴산 분해능을

나타내는 균주를 분리하여 이중 분해능이 강력했던 균주의 배양 조건 및 효소 생산 조건을 실험한 결과, 탄소원으로는 Na-alginate 2%, 질소원으로 nutrition broth 0.1%, NaCl 농도 2%, pH 7.5, 배양 온도는 30°C, 배양 시간은 144~150 시간이 최적 배양 및 효소 생산 조건이었다. 아울러 균체의 생리, 생화학적 특성을 분석한 결과, 본 실험 균주가 *Bacillus licheniformis*로 동정되어 최종 *Bacillus licheniformis* AL-577로 명명하였다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지정 강릉대학교 동해안해양생물 자원연구센터 및 산업자원부 지역산업기술개발사업 중 중점기술 과제에 의한 것입니다. 아울러, 이 연구는 2001년도 강릉대학교 교수 연구년 연구지원에 의하여 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Fisher FG, Dorfel H. 1955. The polyuronic acids of brown algae. Part I. *Z Physiol Chem* 302: 186-203.
2. 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.
3. 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.
4. Haug A, Larsen B, Smidsrød O. 1966. A study of constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis *Acta Chemica Scand* 20: 183-190.
 5. Haug A, Larsen B, Smidsrød O. 1967. Studies on the sequence of uronic acid residues in alginic acid. *Acta Chemica Scand* 21: 691-704.
 6. Penman A, Sanderson GR. 1972. A method for the determination of uronic acid sequence in alginates. *Carbohydrate Research* 25: 273-282.
 7. Guven KC, Ozsoy Y, Ulutin ON. 1991. Anticoagulant, fibrinolytic and antiaggregant activity of carrageenans and alginic acid. *Biotanica Marina* 34: 429-435.
 8. 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.
 9. Joo DS, Lee JS, Park JJ, Cho SY, Ahn CB, Lee EH. 1995. Purification and characterization of the intracellular alginase from *Vibrio* sp. AL-145. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 23: 432-438.
 10. Waksman SA, Allen MC. 1934. Decomposition of polyuronides by fungi and bacteria. *J Bacteriol* 28: 213-220.
 11. Eller J, Payne WJ. 1960. Studies on bacterial utilization of uronic acid. IV. Alginolytic and uronic acid oxidizing isolates. *J Bacteriol* 80: 193-199.
 12. Ando Y, Inoue K. 1961. Decomposition of alginic acid by microorganism-IV. On the *Vibrio*-type bacteria newly isolated from the decaying *Laminaria*. *Bull Jap Soc Sic Fish* 27: 339-341.
 13. Kashiwabara Y, Hiroshi S, Nisizawa K. 1969. Alginase lyases of *Pseudomonas* sp. *J Biochem* 66: 503-512.
 14. Davidson IW, Sutherland IW, Lawson CJ. 1976. Purification and properties of an alginase from a marine bacterium. *Biochem J* 159: 707-713.
 15. Stevens RA, Levin RE. 1967. Viscometric assay of bacterial alginase. *Appl Environ Microbiol* 31: 896-899.
 16. Riesen VL. 1980. Digestion of algin by *Pseudomonas maltophilia* and *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol* 39: 92-96.
 17. Linker A, Evans LR. 1984. Isolation and characterization of an alginase from mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 159: 958-964.
 18. Hansen JB, Nakamura LK. 1985. Distribution of alginate lyase activity among strains of *Bacillus circulans*. *Appl Environ Microbiol* 49: 109-1021.
 19. Dunne WM, Buckmire FL. 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.
 20. Kim BJ, Ha SD, Lim DJ, Song C, Kong JY. 1998. Production of agarase from marine bacterium *Bacillus cereus* ASK202. *Korean H Biotechnol Bioeng* 13: 524-529.
 21. Joo DS, Cho SY, Lee EH. 1993. Isolation of alginate-degrading bacteria and production of alginate degrading activities by the bacteria. *Kor J Microbiol Biotechnol* 21: 207-211.
 22. Joo DS, Cho SY, Lee EH. 1998. Preparation of agar hydrolysates by agarase and functionality of the hydrolysates. *Korean J Biotechnol Bioeng* 13: 378-382.
 23. Yang ST, Joo DS, Park JJ, Lee JS, Kim MS, Lee EH. 1996. Isolation and identification of carrageenan degrading bacteria and optimization of enzyme production. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 24: 652-656.
 24. Nelson NJ. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J Biol Chem* 153: 375-380.
 25. Somogyi M. 1952. Notes on sugar determination. *J Biol Chem* 195: 19-23.
 26. Baumann P, Furniss AL, Lee JV. 1984. Genus I. *Vibrio*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Krieg NR, ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MD. Vol 1, p 518-538.
 27. Gibbs BM, Skinner FA. 1966. *Identification methods for microbiologist*. Academic press, New York.
 28. Yonemoto Y, Mutata K, Kimura A, Yamaguchi H, Okayama K. 1991. Bacterial alginate lyase; characterization of alginate lyase-producing bacteria and purification of the enzyme. *J Ferm Bioeng* 72: 152-157.
 29. Baxter RM. 1959. An interpretation of the effect of salts on the lactic dehydrogenase of *Halobacterium salinarium*. *Can J Microbiol* 5: 47-57.

(2005년 10월 31일 접수; 2006년 1월 4일 채택)