

## Alginate Lyase 생산 균주 *Pseudomonas* sp. N7151-6의 분리 및 특성

이재형<sup>1</sup> · 배민지<sup>2</sup> · 김양춘<sup>3</sup> · 남수완<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>동의대학교 바이오물질제어학과, <sup>2</sup>동의대학교 생명공학과, <sup>3</sup>기장물산(주)

**Identification and Characterization of Alginate Lyase Producing *Pseudomonas* sp. N7151-6. Lee, Jae Hyung<sup>1</sup>, Min Ji Bae<sup>2</sup>, Yang-Choon Kim<sup>3</sup>, and Soo-Wan Nam<sup>1,2\*</sup>.** <sup>1</sup>Department of Biomaterial Control, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, <sup>2</sup>Department of Biotechnology & Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, <sup>3</sup>Gijang Local Products Co., Ltd., Busan 619-906, Korea - A Gram-negative, alginate lyase-producing bacterium was isolated from the Haeundae Coast, Korea. The isolated strain N7151-6 produced alginate lyase. The optimal temperature and pH for growth were found to be 30°C and pH 8.0, respectively. This strain can be grown at the NaCl concentration of 0-7% (w/v). Analysis of 16S rDNA sequence and physiological profiling indicated that the strain N7151-6 belonged to *Pseudomonas* sp. The enzyme alginate lyase produced by *Pseudomonas* sp. N7151-6 was partially purified by ultrafiltration (MWCO= 30 kDa). The optimum pH and temperature for the activity of the purified enzyme were found to be 7.0 and 30°C, respectively. The enzyme was stable at the pH range of 5.0-9.0 and temperature range of 23-37°C. The total activity of alginate lyase produced was reached about 110 unit/L.

**Key words:** Alginate lyase, *Pseudomonas* sp., 16S rDNA, physiological reaction profiling

### 서 론

알긴산(alginic acid)은 갈조류의 세포벽 구성다당류로 건조 중량의 약 40%에 달하는 것도 있다고 알려져 있다. 알긴산은 조류의 주요 구성성분으로 주로 갈조류에 존재하고 생산용 갈조류에는 고펜(Ecklonia stolonifera)와 감태속(Ecklonia) 미역속(Undaria) 등이 있다. 알긴산은 해초산이라고도 하며, 만뉴론산(D-mannuronic acid)과 글루론산(L-gluluronic acid)이  $\beta$ -1, 4결합으로 이루어진 이형 다당류이다[2, 7-9, 21]. 알긴산은 혈청 및 간장 지질의 콜레스테롤 농도를 감소시키고, 지방세포 분화억제 효과와 세포 내 지방세포 유전인자 단백질인 렙틴(leptin)의 함량을 감소시키며, 체내 중금속 흡수 제거효과, 젤형성능, 상처봉합제 등의 의약품 소재 및 기능성 식품소재로 응용되는 등, 알긴산의 약학적, 식품적 효능 또한 우수한 것으로 알려져 있다[11, 15, 19]. 만뉴론산과 글루론산의 중합으로 되어 있는 거대분자인 알긴산을 폴리만뉴론산(polymannuronate)과 폴리글루론산(polyguluronate)으로 저분자화하면, 항암 및 항균작용, 면역증강, 장내세균 군집 개선 효과, 항콜레스테롤 효과, 기타 다양한 생체조절기능성이 월등히 높게 나타나고 있음이 보고되고 있다[2, 5, 12, 15]. 하지만 다당류인 알긴산의 분해의 어려움 및 기존의 분해 방법은 산 또는 염기 가수분해 방법을 쓰기 때문에 정제에 어

려움이 있었다. 알긴산 분해효소를 이용한 방법으로 최근 신규 미생물과 효소를 이용한 방법 등이 국내외적으로 보고되어 *Alginovibrio aquatilis*, *Alteromonas* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio* sp. 등이 있으나[1, 3, 4, 6, 10, 13, 15, 16, 17, 20, 22, 24], 알긴산 분해효소를 고효율로 생산하는 미생물을 분리하는 연구 보고는 거의 없는 실정이거나 미생물에서의 알긴산 분해효소 활성이 상대적으로 낮은 편이다.

이에 본 연구에서는 알긴산 분해효소를 생산하는 미생물을 분리하기 위해 부산 연안에서 알긴산이 풍부한 미역에서 식하는 알긴산 분해능이 우수한 세균을 검색하고자 하였으며, 분리한 알긴산 분해 세균의 분류학적 위치와 생육 및 알긴산 분해 효소의 생산 최적조건 등을 조사하여 산업적 응용의 가능성을 검토하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 세균 분리 및 배양 배지

부산 해운대 해안에서 채취기 통에 미역 고형물을 바닷물 속에 정치 후 채취한 샘플을 1/1000으로 희석한 후, 1차 선별 배지(Alginate-Na 1.00%, Yeast extract 0.20%, NaCl 0.20%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.20%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.10%, KCl 0.10%, CaCl<sub>2</sub> 0.05%)로 분리한 후, 2차 선별 배지(상층 배지-Alginate-Na 1.00%, Bacto-Agar 2.00%, pH 7.5; 하층 배지-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05%, NaCl 2.00%, FeSO<sub>4</sub> 0.01%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, KCl 0.05%, Bacto-Agar 2.00% pH 7.5)에 도말하여, 30°C에서 3일간 배양하여 알긴산 분해

\*Corresponding author

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

E-mail: swnam@deu.ac.kr

미생물을 분리하였다.

#### 표현형적 특성(phenotypic characteristics) 조사

미생물 균주를 배양 배지에서 30°C, 2일 동안 배양한 후, 주사전자현미경(Scanning Electron Microscope)을 통해 크기와 길이를 조사하였다. 현적법(hanging-drop technique)[23]으로 광학 현미경 하에서 균주의 운동성(motility)을 조사하였다. 영양 배지(Difco, U.S.A.)에서 각 온도별(4, 15, 23, 25, 28, 30, 37, 42 및 48°C)로 3일간 배양하여 성장 온도 범위를 조사하였다. NaCl 농도에 따른 성장 효과를 조사하기 위해 0-10%(w/v)의 NaCl을 포함하는 trypticase soy broth(Difco, U.S.A.)에서 30°C로 3일간 배양하였다. 또한 각 pH(4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0)의 배양 배지에서 3일간 배양하여 성장 pH 범위를 조사하였다. 탄소원의 이용 능력 테스트는 Table 1에 기재된 총 17개의 기질을 포함하는 API 50CH 시스템을 이용하여 수행하였다. 우레아제(urease) 활성은 Lanyi의 방법[14]에 따라 측정하였다.

#### DNA 염기 조성 및 16S rDNA 서열 결정 및 계통수 분석

미생물 균주의 게놈 DNA의 염기 조성은 Tamaoka 등의 방법[25]에 따라 결정하였다. 16S rDNA 염기 서열 분석은 균주로부터 게놈 DNA를 추출한 후, 16S rDNA sequencing을 통하여 균주를 동정하였다. 계통수(phylogenetic tree) 분석은 CLUSTAL W 프로그램을 이용하여 각 16S rDNA 염기서열을 배열하고, bootstrap analysis를 통해 분석한 후, TREEVIEW 프로그램으로 계통수를 조사하였다.

#### 균주로부터 알긴산 분해효소 활성 측정

균주의 알긴산 분해능을 확인하기 위한 고체배지(Alginate-Na 0.50%, Yeast extract 0.50%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.20%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.10%, KCl 0.10%, CaCl<sub>2</sub> 0.05%, Agar 1.50%)에서 대조균으로 *E. coli*를 CPC(cetylpyridinium chloride) 10%로 알긴산 분해능을 확인하였다. 세포성장은 흡광도가 0.5 이하가 되도록 배양액을 희석한 후 분광광도계를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 3일간 배양한 배양액으로부터 한외여과(ultrafiltration; MWCO=30 kDa)을 통해 부분 정제하여 알긴산 분해효소 활성을 측정하였다. 알긴산 분해효소 활성은 기질로써 0.25% alginate-Na 0.9 mL에 배양 상등액 0.1 mL를 첨가하여, 37°C에서 1시간 반응시킨 후 DNS법[18]에 의해 흡광도(550 nm)를 측정하여 우론산으로 D-글루코론산 생성량을 측정하였다. 효소 1 unit는 1분에 1 μmole의 환원당을 생산하는 효소량으로 정의하였다.

### 결과 및 고찰

#### 균주의 분리 및 최적 생장 온도, pH, NaCl 농도

부산 해운대 해안에서 미역 고형분을 일주일 동안 정지

후, 채취한 샘플들로부터 분리한 균주로부터 알긴산 분해효소 활성이 가장 좋은 균주를 선택하여 조사하였다. 선택 균주는 광학현미경과 그람염색에 의해 막대형(rod)의 그람-음성균이었으며, 배지 상에 자라난 콜로니는 평평하고 밝은 노란색이었다. 전자현미경을 통해 확인한 크기는 직경이 0.3-0.7 μm이고, 길이는 0.8-2.5 μm이었다. 또한 비운동성(non-motility)이었고, 포자(spore)를 형성하지 않았다. 균주의 최적 생장 온도는 영양 배지에서 30°C이었으며, 10°C 이하 또는 42°C 이상에서는 전혀 성장하지 않았다(Fig. 1). 해양 세균의 경우 일반적으로 NaCl 3% 내외에서 최적 생육조건이나, 분리한 균주의 성장을 위한 최적 NaCl의 농도는 0.5%(w/w)인 것으로 조사되어 해양에서 분리하였지만 전형적인 해양 세균은 아니었으며, 8%까지도 생장은 가능하나 그 이상의 농도에서는 성장하지 않았다(Fig. 2). 최적 생장 pH는 8인 것으로 조사되었으며, pH 4 이하와 pH 10 이상에서는 생장이 억제되었다(Fig. 3).

#### 표현형적 특성(phenotypic characteristics)

분리한 균주는 성장을 위한 탄소 및 에너지원으로 조사한 기질에서 Table 1과 같은 결과를 얻었다. 또한, 아르기닌 가수분해(arginine hydrolase) 반응에 양성 반응을, 노비바이신(novobiocin), 페니실린에는 내성을 가지며, 우레아제(urease) 반응에서는 음성으로 나타났다. 분리한 균주의 대사는 호기성으로 조사되었다.

#### 16S rDNA 서열 분석 및 DNA 염기 조성

분리한 균주의 16S rDNA 염기서열을 확보하기 위하여 PCR에 의한 16S rDNA의 1530 bp 염기서열을 NCBI GenBank 데이터베이스의 BLASTN을 이용하여 분석하였다(Fig. 4). 그 결과, 다양한 *Pseudomonas* 속 미생물 중에서도

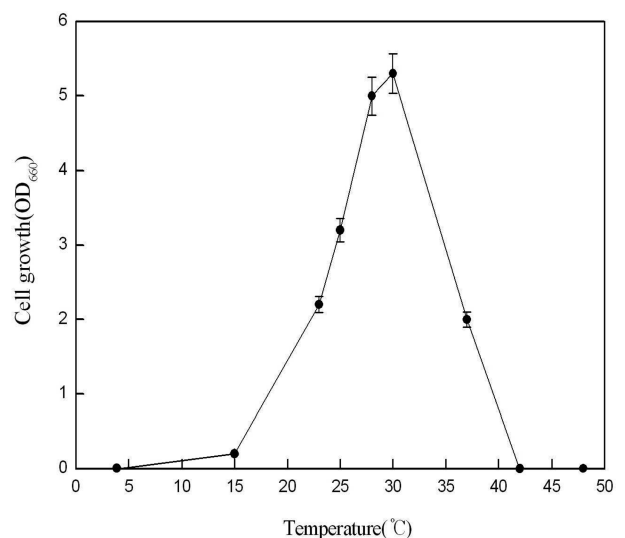
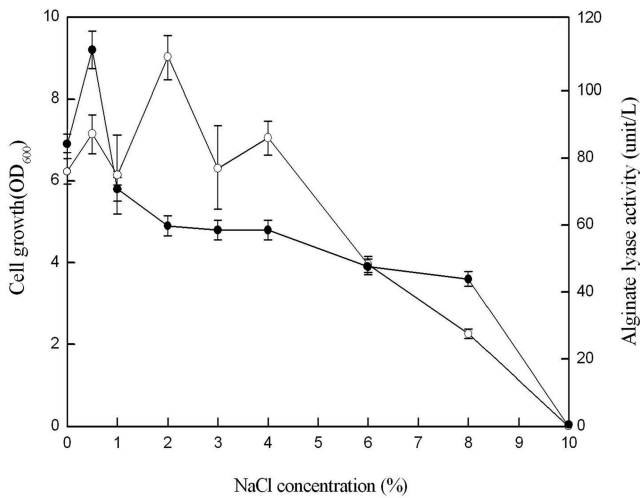
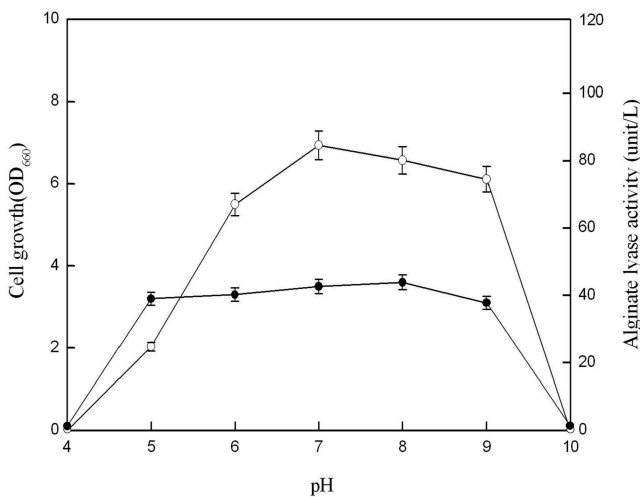


Fig. 1. Effect of temperature on the growth of *Pseudomonas* sp. N7151-6 in growth medium.



**Fig. 2.** Effect of NaCl concentration (%) on cell growth and alginate lyase activity of *Pseudomonas* sp. N7151-6 in growth medium at 30°C and pH 7 (cell growth, alginate lyase activity [unit/L]).



**Fig. 3.** Effect of various pH on cell growth and alginate lyase activity of *Pseudomonas* sp. N7151-6 in growth medium at 30°C and 2% NaCl (cell growth, alginate lyase activity [unit/L]).

*Pseudomonas flavescens* B62<sup>T</sup>, *Pseudomonas straminea* IAM 1598<sup>T</sup>와 각각 97.3%와 96.9%의 높은 상동성을 나타내어, 분리된 균주의 16S rDNA의 염기서열은 *Pseudomonas* 속으로 조사되었다. 이에 분리된 균주를 *Pseudomonas* sp. N7151-6라 명명하였다. 또한 계통수를 통해 *Pseudomonas* 속내 속한 종들과 비교하였다(Fig. 5). 현재 *Pseudomonas* 속에서는 학명으로 인정된 종으로는 *Pseudomonas aeruginosa*에서 알긴산 분해효소가 생성된다는 것이 보고되어 있는데 [3, 4, 16], *Pseudomonas aeruginosa*는 병원성 균주로 인식되어 있어 알긴산 분해효소를 산업적으로 생산하기에는 가능성이 떨어지며, 분리된 *Pseudomonas* sp. N7151-6 균주와 *Pseudomonas aeruginosa*의 16S rDNA 염기서열의 상동성

**Table 1.** Biochemical reaction profiles of *Pseudomonas* sp. N7151-6 by using API 50CH systems.

Substract	<i>Pseudomonas</i> sp. N7151-6	Substract	<i>Pseudomonas</i> sp. N7151-6
D-Glucose	+	Arabinose	-
Pyruvate	+	Raffinose	+
Pullulan	+	Ribose	+
Sucrose	+	Salicin	+
Mannitol	+	Melibiose	+
Cellobiose	+	Melezitose	+
Trehalose	+	Sorbitol	+
Xylose	+	Lactose	-
Inulin	+		

+, Positive reaction; -, negative reaction.

은 95.6%로 조사되었다. 또한 생화학적 특성을 비교시에도 분리한 균주는 *Pseudomonas aeruginosa* 종이 아닌 알긴산 분해효소를 생산하는 신균주로 조사되었다. 그 외 DNA G+C 조성은 63.5%로 조사 되었다.

**알긴산 분해효소의 생산 조건**

*Pseudomonas* sp. N7151-6에서 알긴산 분해효소 생성의 최적 조건을 조사한 결과, 균주의 배양시 pH 8일 때 균주의 성장이 가장 좋으나, pH 7일 때 가장 높은 알긴산 분해효소의 활성을 보여, 알긴산 분해효소의 최적 발현 pH의 값은 7로 조사되었다(Fig. 3). *Pseudomonas* sp. N7151-6 균주의 성장은 NaCl 농도가 0.5%일 때 가장 높으나, 알긴산 분해효소의 생산은 2%가 가장 높은 활성을 보였다(Fig. 2). 이는 해양 환경 조건하의 갈조류에서 분리되어 최적 성장 조건과 알긴산 분해효소의 활성 정도가 차이가 있는 것으로 사료된다. 알긴산 분해효소의 활성이 가장 좋았던 pH와 NaCl의 조건인 pH 7, NaCl 2%의 농도에서 배양시 110 unit/L로 알긴산 분해효소 활성을 나타내었다. 이는 앞서 보고된 *Alginovibrio aquatilis* 균주[24]로부터 알긴산 분해효소의 최대 활성인 2,360 unit/L와 비교시 본 연구에서 분리된 효소의 활성은 다소 낮은 편이었으나, 본 연구에서는 3일간 배양한 배지로부터 알긴산 분해효소를 부분 정제한 효소의 활성이다. *Alginovibrio aquatilis* 균주의 경우 배양 후 5일(120 시간)의 배양액에 대한 활성이다. 따라서 앞으로 질소원과 탄소원, 온도에 따른 알긴산 분해효소에 대한 연구가 뒷받침되고, 분리 정제에 대한 연구가 진행되어, 순도 높은 알긴산 분해효소를 추출할 경우 활성은 더 개선될 것으로 본다. 또한 본 균주에서 분리된 알긴산 분해효소에 의한 만뉴론산과 글루론산의 생성 비율에 대한 연구를 수행하여 polyG 또는 polyM 특이성 효소인지에 대한 효소 동정에 대한 연구를 수행할 예정이며, 더 나아가 알긴산 분해 유전자를 클로닝하여 대장균과 같은 숙주에 적용할 경우 대량 생산하여 알긴산의 저분자화에 응용 가능할 것으로 사료된다.

```

1   CAACTTGAGA GTTTGATCCT GGCTCAGATT GAACGCTGGC GGCAGGCCTA
51  ACACATGCAA GTCGAGCGGA TGACGGGAGC TTGCTCCTTG ATTCAGCGGC
101 GGACGGGTGA GTAATGCCTA GGAATCTGCC TGGTAGTGGG GGGCAACGTT
151 TCGAAAGGAA CGCTAATACC GCATACGTCC TACGGGAGAA AGCAGGGGAC
201 CTTCCGGGCT TGCGCTATCA GATGAGCCTA GGTTCGGATTA GCTAGTTGGT
251 GGGGTAATGG CTCACCAAGG CGACGATCCG TAACTGGTCT GAGAGGATGA
301 TCAGTCACAC TGGAACTGAG ACACGGTCCA GACTCCTACG GGAGGCAGCA
351 GTGGGAATA TTGGACAATG GCGGAAAGCC TGATCCAGCC ATGCCCGGTG
401 TGTGAAGAAG GTCTTCGGAT TGTAAAGCAC TTTAAGTTGG GAGGAAGGGC
451 AGTAAGTTAA TACCTTGCTG TTTTGACGTT ACCGACAGAA TAAGCACCGG
501 CTAACTCTGT GCCAGCAGCC GCGGTAATAC AGAGGGTGCA AGCGTTAATC
551 GGAATTACTG GCGGTAAGC GCGCGTAGGT GGTTTGTGTTA GTTGGATGTG
601 AAAGCCCGG GCTCAACCTG GGAAGTGCAT CAAAACCTGG CAAGCTAGAG
651 TACGGTAGAG GGTGGTGGAA TTTCCCTGTGT AGCGGTGAAA TGCCTAGATA
701 TAGGAAGGAA CACCAGTGGC GAAGGCGACC ACCTGGACTG ATACTGACAC
751 TGAGGTGCGA AAGCGTGGGG AGCAAACAGG ATTAGATACC CTTGTAGCCC
801 ACGCCGTAAC CGATGTCAAC TAGCCGTTGG AATCCTTGAG ATTTTAGTGG
851 CGCAGCTAAC GCATTAAGTT GACCGCCTGG GGAGTACGGC CGCAAGGTTA
901 AAACCTCAAT GAATTGACGG GGGCCCGCAC AAGCGGTGGA GCATGTGGTT
951 TAAATCGAAG CAACGCGAAG AACCTTACCA GGCCTTGACA TGCAGAGAAC
1001 TTTCCAGAGA TGGATTGGTG CCTTCGGGAA CTCTGACACA GGTGCTGCAT
1051 GGTGTCGTC AGCTCGTGTG GTGAGATGTT GGGTTAAGTC CCGTAACGAG
1101 CGCAACCCTT GTCCTTAGTT ACCAGCACGT AATGGTGGGC ACTCTAAGGA
1151 GACTGCCGGT GACAAACCGG AGGAAGGTGG GGATGACGTC AAGTCATCAT
1201 GGCCCTTACG GCCTGGGCTA CACACGTGCT ACAATGGTCG GTACAGAGGG
1251 TTGCCAAGCC GCGAGGTGGA GCTAATCTCA CAAAACCGAT CGTAGTCCGG
1301 ATCGCAGTCT GCAACTCGAC TCGGTGAAGT CGGAATCGCT AGTAATCGCG
1351 AATCAGAATG TCGCGGTGAA TACGTTCCCG GGCCTTGAC ACACCGCCCG
1401 TCACACCATG GGAGTGGGTT GCACCAGAAG TAGCTAGTCT AACCTTCGGG
1451 AGGACGGTTA CCACGGTGTG ATTCATGACT GGGGTGAAGT CGTAACAAGG
1501 TAGCCGTAGG GGAACCTGCG GCTGGATCAC

```

Fig. 4. 16S rDNA nucleotide sequence of *Pseudomonas* sp. N7151-6.

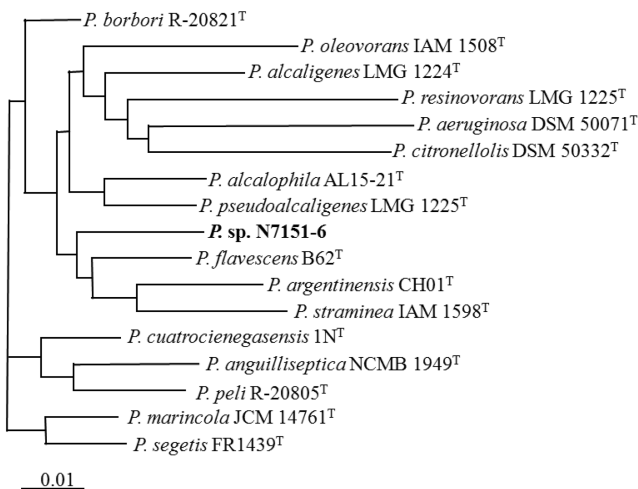


Fig. 5. Phylogenetic tree analysis of the strain N7151-6 based on 16S rRNA sequence with other members of *Pseudomonas* sp.

알긴산 분해효소를 생산하는 세균은 해양 생태계에서 영양 재순환에 있어서 중요한 역할을 한다. 그러나 몇몇 종에서만 알긴산 분해효소를 생산하는 해양 세균에 대한 정보가 있음으로 인해 알긴산 분해효소를 이용한 식품학적, 약학적, 미용학적 등의 용도의 적용이 적은 편이다. 본 연구에 의해 동정된 균주를 이용하면 해조류에 포함된 다당류인 알긴산을 효소적으로 가수분해함으로써 알긴산의 저분자화를 통해 응용을 할 수 있을 것으로 사료된다.

## 요 약

해운대 연안에서 그람 음성균이면서 알긴산 분해효소를 생산하는 세균을 분리하였다. 분리된 N7151-6 균주의 성장을 위한 최적 온도는 30°C, 최적 pH는 8.0으로 조사되었다. 또한 0-7%(w/v) NaCl 농도에서도 성장 가능하다. 16S rDNA 염기 서열 분석과 생화학적 분석에 의해 이 균주는 *Pseudomonas* 속

으로 동정되어 *Pseudomonas* sp. N7151-6으로 명명하였다. *Pseudomonas* sp. N7151-6에서 생산하는 알긴산 분해효소를 한외여과(ultrafiltration; MWCO=30 kDa) 방법에 의해 부분 정제하였다. 분리된 효소의 최적 pH는 7.0으로 최적 온도는 30°C로 조사 되었다. pH 5.0에서 9.0까지 이 효소는 안정하였으며, 23°C에서 37°C까지의 범위에서도 안정성을 보여주었다. 알긴산 분해효소의 전체 활성은 110 unit/L이었다.

### 감사의 글

본 연구는 2007년 중소기업청 산학연 공동기술개발컨소시엄 사업의 지원을 받아 수행되었습니다.

### REFERENCES

- 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.
- 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.
- Dunne, W. M. and F. L. 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.
- Franklin, M. J., C. E. Chitnis, P. Gacesa, A. Sonesson, D. C. White, and D. E. Ohman. 2007. *Pseudomonas aeruginosa* AlgG is a polymer level alginate C5-mannuronan epimerase. *J. Bacteriol.*, **186**: 4759-4773.
- Guyen, K. C., Y. Ozsoy, and O. N. Ulutin. 1991. Anticoagulant, fibrinolytic and antiaggregant activity of carrageenans and alginic acid. *Biotanica Marina*. **34**: 429-435.
- Hansen, J. B. and L. K. Nakamura. 1985. Distribution of alginate lyase activity among strains of *Bacillus circulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 1019-1021.
- 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.
- 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.
- Iwamoto, Y., R. Araki, K. Iriyam, T. Oda, H. Fukuda, S. Hayashida, and T. Muramatsu. 2001. Purification and characterization of bifunctional alginate lyase from *Alteromonas* sp. strain no. 272 and its action on saturated oligomeric substrates. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**: 133-142.
- Jeong, H. J., S. A. Lee, P. D. Moon, H. J. Na, R. K. Park, J. Y. Um, H. M. Kim, and S. H. Hong. Alginic acid has anti-anaphylactic effects and inhibits inflammatory cytokine expression via suppression of nuclear factor-kappaB activation. 2006. *Clin. Exp. Allergy*. **36**: 785-794.
- Joo, D. S., J. S. Lee, J. J. Park, S. Y. Cho, C. B. Ahn, and E. H. Lee. 1995. Purification and characterization of the intracellular alginate from *Vibrio* sp. AL-145. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 432-438.
- Joo, D. S., S. Y. Cho, and E. H. Lee. 1993. Isolation of alginate-degrading bacteria and production of alginate-degrading activities by the bacteria. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 207-213.
- Lanyi, B. 1987. Classical and rapid identification methods for medically important bacteria. pp. 1-67. In Colwell, R.R and R. Grigorova (ed.), *Methods in Microbiology*, vol. 19, Academic Press Ltd., London.
- Lee, J. H. and E. Y. Lee. 2003. Isolation of alginate-degrading marine bacteria and characterization of alginate. *J. Life Science*. **13**: 718-722.
- Linker, A. and L. R. Evans. 1984. Isolation and characterization of an alginate from mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **159**: 958-964.
- Nakagawa A., T. Ozaki, K. Chubachi, T. Hosoyama, T. Okubo, S. Iyobe, and T. Suzuki. 1998. An effective method for isolating alginate lyase-producing *Bacillus* sp. ATB-1015 strain and purification and characterization of the lyase. *J. Appl. Microbiol.* **84**: 328-335.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- Paxman, J. R., J. C. Richardson, P. W. Dettmar, and B. M. Corfe. Alginic acid reduces the increased uptake of cholesterol and glucose in overweight male subjects: a pilot study. 2008. *Nutr. Res.* **28**: 501-505.
- Pecina, A., A. Pascual, and A. Paneque. 1999. Cloning and expression of the *algL* gene, encoding the *Azotobacter chroococcum* alginate lyase: purification and characterization of the enzyme. *J. Bacteriol.* **181**: 1409-1414.
- Penman, A. and G. R. Sanderson. 1972. A method for the determination of uronic acid sequence in alginates. *Carbohydrate Res.* **25**: 273-282.
- Sawabe, T., H. Takahashi, Y. Ezura, and P. Gacesa. 2001. Cloning, sequence analysis and expression of *Pseudoalteromonas elyakovii* IAM 14594 gene (*alyPEEC*) encoding the extracellular alginate lyase. *Carbohydr. Res.* **335**: 11-21.
- Skerman, V. B. D. 1967. *A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria*, 2nd edn. Batimore: Williams & Wilkins.
- Stevens, R. A. and R. E. Levin. 1977. Purification and characteristics of an alginate from *Alginovibrio aquatilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **3**: 1156-1161.
- Tamaoka, J. and K. Komagata. 1984. Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.* **25**: 125-128.