

Alginate lyase 생산 균주의 분리 및 특성: *Sanguibacter keddieii* NC9

김근협, 이성목, 최수정, 이재화*

Isolation and Characteristics of Alginate lyase Producing Microorganism: *Sanguibacter keddieii* NC9

Geun Hyub Kim, Sung-Mok Lee, Soo-Jeong Choi, and Jae-Hwa Lee*

접수: 2011년 11월 14일 / 게재승인: 2011년 11월 29일
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: The research was purposed production of oligosaccharide from alginate hydrolysis the main composition in cell walls of sea weed. We was isolated 252 strains from sea water and mud flat, the highest alginate lyase activity was selected, and identified as *Sanguibacter keddieii* NC9 by 16S rDNA sequence analysis. In this study was select the sodium alginate concentration, pH, temperature for the production of alginate lyase activity. Alginate lyase activity was confirmed from plate assay with 10% cetylpyridinium chloride. The optimum culture conditions for the production of alginate lyase were sodium alginate 10 g/L, peptone 5 g/L, 40°C, pH 9 and 36 hours incubation time. *Sanguibacter keddieii* NC9, its alginate lyase would be useful for the production of bioenergy and biofunctional oligosaccharides from sea weed.

Keywords: Alginate lyase, sea water, enzymatic activity, brown algae

1. 서론

해조류는 전 세계적으로 약 200 여종이 식용 및 산업적 활용을 위해 이용되고 있으며 연간생산량은 약 1,500만 톤에 달한다. FAO에 따르면 전 세계 해조류 생산량은 중국이 약

71.2%로 1위를 차지하고 있으며 우리나라는 세계 3위의 생산국으로 전체 생산량의 4.06%를 생산하고 있다. 2008년 농림수산식품부의 어업생산량 통계에 따르면 국내에서 생산되는 해조류는 갈조류에 속하는 미역이 가장 많은 양을 차지하는 것으로 나타났으며, 다시마와 김이 그 다음으로 많이 생산되는 것으로 나타났다. 다시마와 미역과 같은 갈조류는 성장속도가 빠르며 탄수화물을 건조중량의 최대 67%까지 함유하고 있다. 이러한 당 성분에는 alginate, laminaran 및 mannitol 등이 존재하며, 이 중 alginate가 가장 많은 것으로 알려져 있다 [1].

Alginate는 D-Mannuronic acid와 L-guluronic acid가 α -1,4결합 또는 β -1,4결합으로 이루어진 hetero형 다당류이며, 주로 갈조류의 세포벽을 구성한다 [2,3]. 계절적 변화에 따라 성분의 함량이 달라지기는 하나 건조중량의 약 40%에 달하는 것도 있다고 알려져 있으며, 갈조류의 크기, 종류, 부위 등 따라 다양한 성분비를 가진다 [4-6]. 또한 alginate는 생체 내에서 다양한 생리활성을 유발하고 콜레스테롤 억제하며, 체내 중금속 흡수 제거, 상처봉합제 등의 의약품 소재 및 기능성 식품소재로 응용되거나 의약품 소재로도 응용될 수 있다 [7,8].

Alginate lyase [EC 4.2.2.3]는 4, 5 unsaturated nonreducing 말단의 연쇄반응에 의해 uronic acid 중합체의 β -1,4-glycosidic 결합을 분해한다. 이 효소는 여러 가지의 미생물에 의해 알려져 있다. Alginate lyase로는 L-guluronan lyase와 D-mannuronan lyase가 있다. 올리고당은 항균 및 항암작용, 면역증강, 항콜레스테롤 효과, 항응고 작용 등 다양한 생체 조절 기능에 대한 연구가 보고되고 있어 해조류 유래의 alginate 올리고당 제조에 관심이 높아지고 있다 [9]. 그러나 alginate의 다당류에서 만들어지는 올리고당은 alginate lyase

신라대학교 의생명과학대 생명공학과
Department of Bioscience and Biotechnology, College of Medical and Life Science, Silla University, Busan 617-736, Korea
Tel: +82-51-999-5831, Fax: +82-51-999-5636
e-mail: jhalee@silla.ac.kr

를 지니는 미생물로부터 alginate lyase를 대량 배양 생산하는 것이 가능해져야 산업적으로 이용이 가능하다. 이 alginate의 유효성분을 분리하는 화학적 분해방법은 고압, 고온 또는 방사선으로 연화 시킨 뒤 분리하는 방법과 산과 알칼리 가수분해를 이용하는 방법이 보고되고 있다 [10-12]. 그러나 해조류 유래의 탄수화물 대부분이 산과 알칼리에 비교적 안정하여 유효성분 분리에 어려움이 있다. 따라서 alginate 올리고당 생산에 화학적 분해보다는 효소적 분해에 대한 연구가 보고되고 있다 [13].

한편 최근 화석연료의 과도한 사용과 환경오염으로 인한 지구 온난화와 자원 고갈 문제가 대두되고 있어 재생에너지에 대한 관심이 높아지고 있으며, 자연계에서 지속적으로 생산되는 바이오매스를 이용한 바이오 에너지 생산 연구들이 진행되고 있다 [14]. 특히 전분계와 목질계를 이용한 바이오 에너지 생산으로 식량자원의 무기화와 삼림파괴 등의 문제점을 극복하기 위한 대안으로 해조류가 주목받고 있으며 [15], 해조류 중에서도 alginate 함량이 높은 갈조류를 이용한 바이오 에너지 생산을 위해 뛰어난 alginate lyase가 필요한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 갈조류의 주요 성분인 alginate를 이용한 바이오 에너지 개발과 식의약 소재, 의약품 소재로 활용 가능한 alginate 올리고당을 효소적으로 제조하기 위한 연구로서 해수에서 분리한 *Sanguibacter keddieii* NC9를 이용하여 alginate lyase의 특성을 알아보고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. Alginate lyase 활성 균주 분리

Alginate lyase 활성을 지닌 균주를 탐색하기 위해 남해 냉천 갯벌 (경도 128 : 1 : 38, 위도 34 : 53 : 57)과 통영 바닷가 (경도 28 : 26 : 30, 위도 34 : 48 : 56)에서 해수를 sampling 하였다. 채취한 해수 시료는 단계별로 희석하여 alginate 배지 (sodium alginate 8.0 g/L, peptone 5.0 g/L, agar 15.0 g/L)에 100 μ L씩 도말하여 순수 분리하였다. 도말한 배지는 30°C 배양기에서 3~4일간 배양하였다. 배양된 균주는 멸균된 velvet 천을 이용하여 replication한 후 복제된 배지를 다시 3~4일 동안 배양하여 plate assay를 거쳐 alginate lyase 활성 균주를 선별하였다.

2.2. 분리된 균주의 alginate lyase 활성 확인

순수 분리한 균주들의 alginate lyase 활성을 확인하기 위해 plate assay를 이용하였다. 즉, sodium alginate 10.0 g/L, peptone 5.0 g/L, agar 15.0 g/L를 포함한 고체배지에 분리된 균주들을 각각 도말하여 48 h 동안 30°C 항온배양기에서 배양하였다. 배양 후 배지에 10% cetylpyridinium chloride (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo.)를 처리하고, 10 min 동안 반응 후 증류수로 배지에 첨가한 cetylpyridinium chloride를 제거한 후 clear zone 생성 여부에 따라 alginate lyase 효소 활성을 확인하였다.

2.3. Alginate 농도에 따른 효소활성 및 세포성장 측정

Plate assay를 통해 alginate lyase 활성이 높은 것으로 확인

된 *Sanguibacter keddieii* NC9의 alginate lyase 활성 및 세포 성장을 확인하기 위해 alginate 배지 (sodium alginate 10.0 g/L, peptone 5.0 g/L)에 균주를 접종하여 30°C, 150 rpm으로 진탕 배양하였다. 배양 시간에 따른 alginate lyase 효소 활성은 12 h 간격으로 측정하였으며, 조효소는 배양액을 4°C, 14000 rpm에서 5 min 동안 원심분리한 후 상층액을 이용하였다. 조효소는 alginate 5 g/L 용액과 1 : 2로 혼합하여 30°C 항온조에서 30 min 동안 반응한 후 DNS법을 이용하여 생성된 환원당을 측정하였다. DNS는 효소 반응한 상층액 500 μ L에 DNS용액 2 mL를 가한 후 10 min 동안 가열하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.4. 배양조건별 균주의 성장 및 alginate lyase 활성 측정

Alginate 농도별 실험에서 최대 효소활성을 보인 alginate 배지를 이용하여 효소 반응 pH 및 온도에 따른 활성의 변화를 확인하였다. 효소 활성에 미치는 pH 영향은 pH 5~9 범위에서 확인하였으며, pH는 GTA buffer (3,3-dimethylglutaric acid 16.02 g/L, Tris (hydroxymethyl) aminomethane 12.11 g/L, 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol 10.51 g/L)을 이용하여 조절하였으며 각각의 buffer에 alginate를 5 g/L 농도로 첨가하여 효소 반응 실험에 사용하였다. 온도에 따른 효소활성은 조효소와 alginate 5 g/L를 포함한 pH 9의 GTA buffer를 1 : 2로 혼합하여 20~60°C의 항온조에서 30 min 동안 반응시켜 DNS법으로 측정하였다. 효소활성이 가장 높은 온도와 pH에서 효소의 안정성을 확인하기 위해 40°C, pH 9에서 시간에 따른 효소활성을 DNS법을 이용하여 30 min 간격으로 측정하여 효소활성의 변화를 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Alginate lyase 생산 균주 분리 및 동정

남해 냉천 갯벌과 통영 바닷가에서 해수를 채취하여 alginate 배지에서 분리하였다. 그 결과 남해 냉천 갯벌에서 200 여종, 통영 해수에서 52 여종의 균주가 분리되었다. 분리된 균주는 plate assay를 이용하여 alginate lyase 효소 활성을 측정하였다. Alginate lyase 효소 활성의 확인은 cetylpyridinium chloride 10%를 처리하였을 때 colony 주위에 clear zone 생성 여부를 확인하여 판별하였다 (Fig. 1). 그 결과 10 여종의 균주가 alginate lyase 활성이 높은 것으로 확인되었다 (Table. 1). 16S rDNA 염기서열을 분석한 결과 8종의 균주가 *Pseudomonas stutzeri*인 것으로 확인되었으며, NC8과 9에서 *Flavobacteria bacterium*과 *Sanguibacter keddieii*가 각각 1종씩 포함되어 있는 것으로 확인되었다. 확인된 결과를 바탕으로 해양유래의 alginate lyase 생산균주는 주로 *Pseudomonas* sp.로 확인되었으며, 이는 이미 다른 논문들에서도 효소 활성이 보고되어 있다 [16,17]. Alginate lyase 효소활성 측정은 선별된 10종의 균주 중 plate assay에서 colony 주위의 clear zone의 범위가 특히 넓은 NC9 균주를 이용하였다. NC9 균주의 16S rDNA 분석결과 염기서열 1445개를 결정하였고 (Fig. 2) blast search를 분석한 결과

Sanguibacter sp.에 속하는 *Sanguibacter keddieii* DSM 10542와 99%의 유사성을 나타내었다. Fig. 3은 순수 분리된 NC9 균주의 16S rDNA 염기서열을 Neighbor-joining Method로 나타낸 계통수 (phylogenetic tree)로 분리된 균주는 *Sanguibacter* sp. 속 균주들과 아주 높은 연관관계를 보이는 것을 알 수 있어 분리한 NC9 균주가 *Sanguibacter* sp. 속인 것을 확인할 수 있었다. 일반적으로 16S rDNA의 유사성이 97% 이상이면 동일한 종으로 분류하므로 [13] 분리한 균주를 최종적으로 *Sanguibacter keddieii* NC9로 명명하였다.

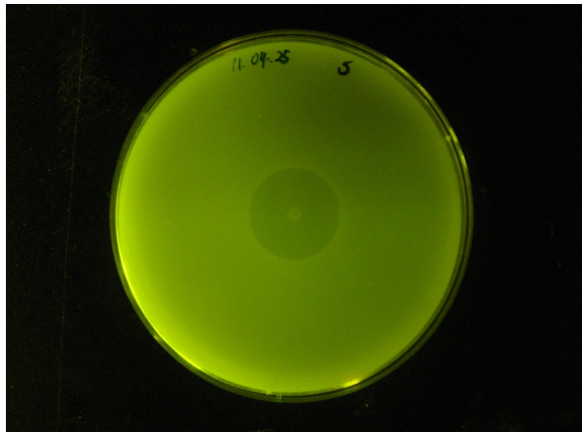


Fig. 1. Plate assay for the identification of alginate lyase activity. Cells were isolated from sea water on the alginate medium and enzyme activity was confirmed in the plate containing 8 g/L alginate.

```

1 CAGGACGAAC GCTGGCGGCG TGCTTAACAC ATGCAAGTCG AACGGTGATC
51 TCAGAGCTTG CTCTGGGTGA TCAGTGGCGA ACGGGTGAGT AACACGTGAG
101 TAACCTGCCC TTGACTCTGG GATAACTCCG GGAAACCGGG GCTAATACTG
151 GATACGAGAT GCGACCGCAT GGTCTGTGTC TGGAAAAGTT TTCGGTCAAG
201 GATGGACTCG CGGCCTATCA GCTTGTGGT GGGGTAATGG CCCACCAAGG
251 CGTCGACGGG TAGCCGGCCT GAGAGGGCGA CCGGCCACAC TGGGACTGAG
301 ACACGGCCCA GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTGGGAATA TTGCACAATG
351 GGCGAAAGCC TGATGCAGCG ACGCCGCGTG AGGGATGAAG GCCTTCGGGT
401 TGTAACCTC TTTCACTAGG GAAGAAGCGA AAGTGACGGT ACCTGCAGAA
451 GAAGCGCCGG CTAACCTACG GCCAGCAGCC GCGGTAATAC GTAGGGCGCA
501 AGCGTGTGCC GGAATTATG GGCCTAAAGA GCTCCTAGGC GGTTCGTCCG
551 GTCTGGTGTG AAATCTCAAG GCTCAACCTT GAGCTTGCAT CGGGTACGGG
601 CAGACTAGAG TCGCGTAGGG GTGACTGGAA TTCTGGTGT AGCGGTGGAA
651 TGCGCAGATA TCAGGAGGAA CACCGATGGC GAAGGCAGGT CACTGGGCCG
701 CAACTGACGC TGAGGAGCGA AAGCATGGGT AGCGAACAGG ATTAGATACC
751 CTGGTAGTCC ATGCCGTAAG CTTGGGCAC TAGGTGTGGG GCTCAITCCA
801 CGAGTCCCGT GCCGCAGCAA ACGCATTAAG TGCCCCGCCT GGGGAGTACG
851 GCCGCAAGGC TAAAACCTCA AGGAATTGAC GGGGGCCCGC ACAAGCGCGG
901 GAGCATGCGG ATTAATTCGA TGCAACCGCA AGAACCTTAC CAAGGCTTGA
951 CATAACCCGG AATCGGCCAG AGATGGTCCG GTCTTCGGAC TGGTGTACAG
1001 GTGGTGCATG GTTGTCTCA GCTCGTGTCC TGAGATGTTG GGTTAAGTCC
1051 CGCAACGAGC GCAACCTCG TCCTATGTTG CCAGCACGTT ATGGTGGGGA
1101 CTCATAGGAG ACTGCCGGGG TCAACTCGGA GGAAGGTGGG GATGACGTCA
1151 AATCATCATG CCCCTTATGT CTGGGCTTC ACGCATGCTA CAATGGCCGG
1201 TACAAAGGGC TGCGATACCG TAAGGTGGAG CGAATCCCAA AAAGCCGGTC
1251 TCAGTTCGGA TTGGGGTCTG CAATCGACC CCATGAAGTC GGAGTCGCTA
1301 GTAATCGCAG ATCAGCAACG CTGGCGTGAA TACGTTCCCG GGCCTTGTAC
1351 ACACCCCGCG TCAAGTCACG AAAGTCGGTA ACACCCGAAG CCCGTGGCCT
1401 AACCCCTTGT GGGATGGAGC CGTCAAGTGT GATTGCGATN GATAT
    
```

Fig. 2. 16S rDNA nucleotide sequence of *Sanguibacter keddieii* NC9.

Table 1. Isolation of microorganism from sea water and independent 16S rDNA analysis

Number	Closest species in GenBank
NC1	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
NC2	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
NC3	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
NC4	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
NC5	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
NC6	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
NC7	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
NC8	<i>Flavobacteria bacterium</i>
NC9	<i>Sanguibacter keddieii</i>
NC10	<i>Pseudomonas stutzeri</i>

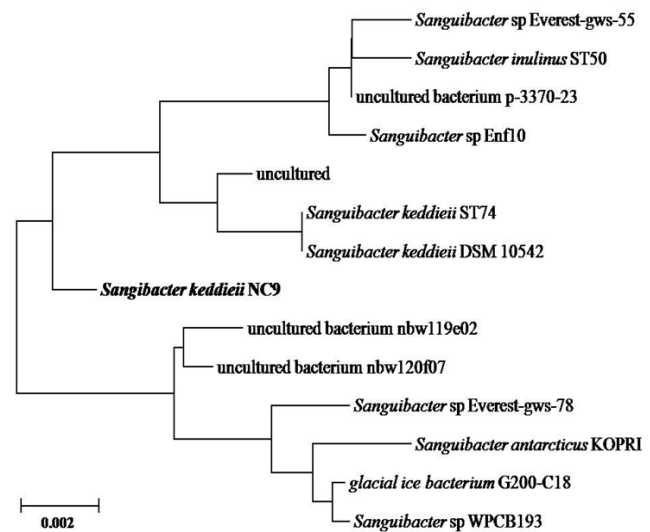


Fig. 3. Phylogenetic tree generated via the neighbor-joining method showing the phylogenetic relationships of the isolated *Sanguibacter keddieii* NC9 strain based on the analysis of ca. 1445 bases of aligned 16S rDNA sequences. Bootstrap values generated from 1000 replicates are shown at each node. *Sanguibacter keddieii* in the Domain Archaea was utilized as the outgroup.

3.2. Alginate 농도에 따른 균주 성장과 alginate lyase 활성

Fig. 4는 *Sanguibacter keddieii* NC9 균주가 서로 다른 alginate 농도에서 보이는 세포성장을 나타내는 결과이다. 세포성장은 alginate 농도가 10 g/L인 배지에서 48 h 배양 했을 때 가장 높았다. 8 g/L 이하의 alginate 농도에서는 48 h 까지 세포 성장이 미미 하다가 48 h 이후부터 증가 하기는 했으나, 성장량이 10 g/L 농도에서와 비교하였을 때의 약 10%로 매우 낮았다. 이러한 결과는 *B. licheniformis*가 20 g/L의 alginate에서 세포성장이 최대였고 [7] Yonemoto 등이 10 g/L 까지 만 균주의 성장이 증가한 보고와는 차이를 보였다. 이러한 alginate 농도에 따른 세포성장의 차이는 alginate의 농도가 높아짐에 따라 배지의 점도가 높아지고 일정 수준에 이르러서는 균체의 성장을 저해하기 때문인 것으로 보고되어 있다 [19]. 따라서, 본 연구는 최적 alginate 농도를 10 g/L로 결정하여 실험을 진행하였다. Fig. 5는 *Sanguibacter keddieii* NC9 균주가 서로 다른 alginate 농도에서 보이는 효소 활성을 상대적으로 나타낸 결과이다. 효소활성은 10 g/L의 alginate

에서 36 h에서 가장 높은 활성을 나타내었고, 8 g/L 이하의 alginate 농도에서 보다 2배 이상의 효소활성을 보였다. 이러한 결과는 144~150 h 사이에 alginate lyase 활성이 최대를 보이는 *B. licheniformis* AL-577 균주의 결과와 [18], 72 h에서 효소활성이 최대라는 보고된 *Streptomyces* sp. MET 0515의 결과와 [20] 비교해 볼 때 *Sanguibacter keddieii* NC9 균주는 최대효소활성이 빠른 시간 내에 나타나므로 산업적 응용가능성이 높다고 판단된다.

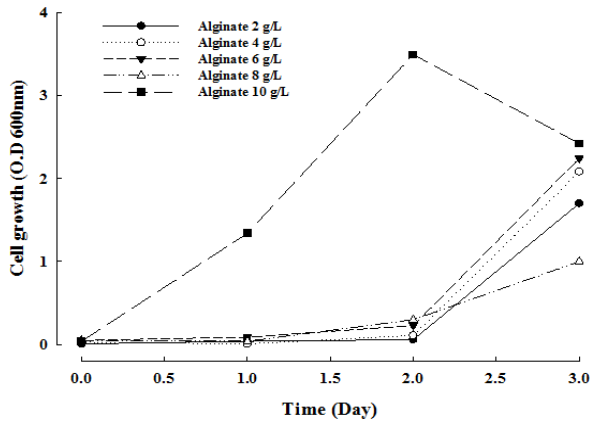


Fig. 4. The effect of alginate concentration on cell growth of *Sanguibacter keddieii* NC9. Culture conditions were 30°C and 150 rpm. Relative activity are shown as percentages of the enzyme activity observed at 30°C.

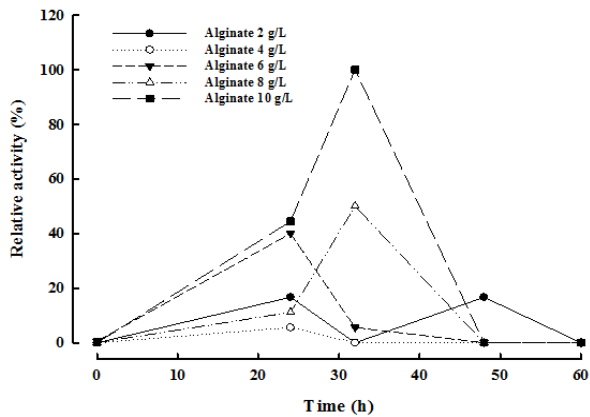


Fig. 5. The effect of alginate concentration on enzyme activity of *Sanguibacter keddieii* NC9. Cell were cultured in sodium alginate 10 g/L, peptone 5 g/L and cultured at 30°C and 150 rpm. Relative activity are shown as percentages of the enzyme activity observed at 30°C.

3.3. pH 및 온도에 따른 alginate lyase 활성

Fig. 6는 alginate lyase 활성에 영향을 미치는 pH의 결과를 나타낸 것이다. 완충용액은 GTA buffer (3,3-dimethylglutaric acid, Tris (hydroxymethyl) aminomethane, 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol, pH 3~10)을 사용하였다. 효소활성은 pH 8까지는 큰 차이를 보이지 않다가 pH 9에서 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 pH에 따른 alginate lyase의 활성은 *Methylobacterium* sp. HJM27와 *B. licheniformis* AL-755

균주가 pH 9에서 효소활성이 가장 높은 것으로 보고되어 있으며 [13,18], 이 보다 좀 더 낮은 pH에서 높은 활성을 나타내는 *Streptomyces* sp. MET0515 균주는 pH 7.5에서 가장 높은 alginate lyase 활성을 나타내는 것으로 보고되어있다 [20]. Alginate lyase의 최대 효소활성은 각각의 균주마다 다르지만 주로 알칼리 영역에서 최대인 것으로 나타난다. 이는 pH 3 이하에서 alginate가 침전되는 것과 관련 있는 것으로 보인다. Fig 7은 중온에서의 alginate lyase의 활성에 안정성을 확인하기 위해 40°C에서 시간에 따른 효소활성의 변화를 확인하였다. GTA buffer를 이용하여 pH를 9로 유지하고 조효소와 alginate를 혼합하여 30 min 간격으로 반응액을 DNS법을 이용하여 효소활성의 변화를 확인하였다. 효소의 활성은 반응 60 min까지는 거의 변화가 없었으나 그 이후 급격히 감소하는 것으로 나타났다. 90 min 동안 반응했을 때 초기 조효소의 활성의 78%까지 활성이 감소하였으며, 120 min에서는 효소활성이 없는 것을 확인할 수 있다. 이전에 보고된 alginate lyase 활성은 주로 저온인 25~30°C에서 가장 높은 것

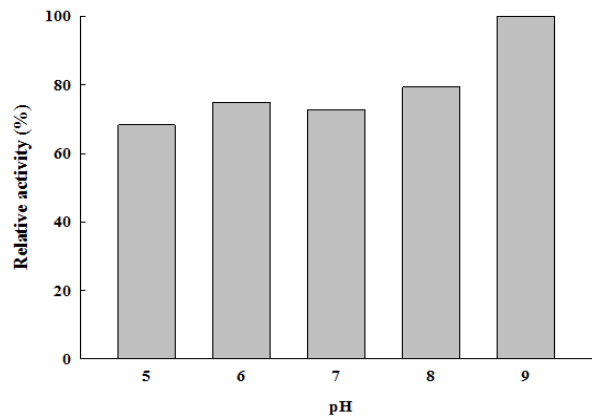


Fig. 6. The effect of pH on the activity of extracellular alginate-degrading enzyme of *Sanguibacter keddieii* NC9. Used buffer was GTA buffer (pH 3~10). Relative activity are shown as percentages of the enzyme activity observed at 30°C.

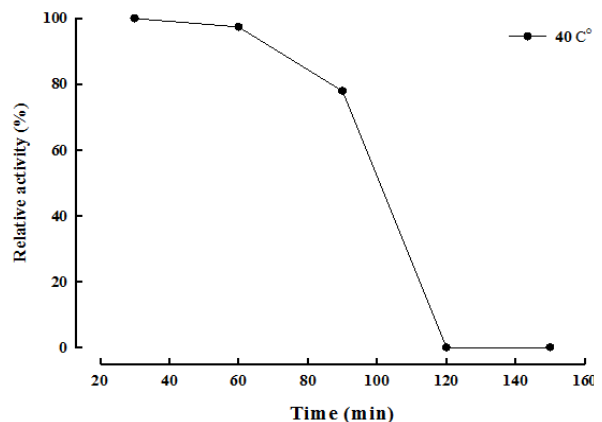


Fig. 7. The effect of reaction temperature on the activity of extracellular alginate-degrading enzyme of *Sanguibacter keddieii* NC9. Culture condition were 30°C and 150 rpm. Relative activity are shown as percentages of the enzyme activity observed at 40°C for 30 minutes.

으로 알려져 있다 [7,13]. 대부분의 alginate lyase 효소 활성이 저온에서 최대인 것은 주로 해수에서 유래한 균주이기 때문에 해수의 온도와 비슷한 영역에서 활성이 최대 활성이 나타나는 것으로 생각된다. 그러나 해수가 아닌 토양에서 분리한 균주 중에서는 70°C 의 고온에서도 효소활성이 가장 높다고 알려진 균주도 있다 [20]. 효소의 활성이 70°C 정도의 고온은 아니지만 단백질 변성이 시작되는 온도인 40°C에서도 90 min 동안 반응하는 것으로 보아 온도에 대한 안정성이 다른 alginate lyase 보다는 높은 것으로 보인다.

4. 결론

본 연구는 alginate lyase 활성이 높은 균주를 확보하고 선정된 균주의 효소생산과 활성에 영향을 미치는 alginate의 농도, 온도, pH 등을 파악하고자 하였다. 남해 냉천 갯벌과 통영 바닷가의 해수에서 유래한 252 여종의 균주에서 alginate lyase 활성이 우수한 10 여종의 균주를 분리하였고 최종적으로 *Sanguibacter keddieii* 유래의 균주를 선정하였다. 16S rDNA 염기서열 분석으로 선정된 균주를 *Sanguibacter keddieii* NC9으로 명명하였다. Alginate lyase 활성은 sodium alginate 10 g/L, peptone 5 g/L의 배지에서 가장 높았으며, 36 h 배양했을 때 효소활성이 최대에 도달하는 것으로 확인 되었다. 물리적 조건에 따른 효소활성은 알칼리영역인 pH 9 최적인 것으로 나타났으며, 온도는 균주를 분리한 해수의 온도보다 높은 40°C에서 최대인 것으로 나타났다. 분리된 균주와 이 균주의 alginate lyase를 이용하여 해조류를 바이오 디젤, 바이오 에탄올 등의 바이오 연료로 활용할 수 있을 것으로 보이며, 산업적 소재로 활용 할 수 있을 것으로 판단된다.

감사

본 연구는 지식경제부 신재생에너지기술개발사업의 일환 (No. 20093020090020)으로 수행되었습니다.

References

- Lee, S.-M. and J.-H. Lee (2010) Influence of acid and salt content on the ethanol production from *Laminaria japonica*. *Appl. Chem. Eng.* 21 :154-161.
- Fisher, F. G. and H. Dorfel (1955) The polyuronic acids of brown algae. *Part I. Z. Physiol. Chem.* 302: 186-203.
- Haug, A., B. Larsen, and O. Smidsrød (1966) A study of constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis. *Acta. Chemica. Scand.* 20: 183-190.
- Lee, J. H., M. J. Hae, Y.-C. Kim, and S.-W. Nam (2009) Identification and characterization of alginate lyase producing *Pseudomonas* sp. N 7151-6. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 37: 350-354.
- Lee, S.-M., J.-H. Kim, H.-Y. Cho, H. Joo, and J.-H. Lee. (2009) Production of Bio-ethanol from brown algae by physicochemical hydrolysis. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* 20: 517-521.
- Lee, D.-S., H.-R. Kim, D.-M. Cho, T.-J. Nam, and J.-H. Pyeon (1998) Uronate compositions of alginates from the edible brown algae. *J. Korean Fish. Soc.* 31: 1-7.
- Uo, M.-H., D.-S. Joo, and S.-Y. Cho (2006) Screening and cultivation characteristics of alginate degrading bacteria. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 35: 109-114.
- Lee, J.-H. and E. Y. Lee (2003) Isolation of alginate-degrading marine bacteria and characterization of alginase. *Korean Journal of Life Science* 13: 718-722.
- Guven, K. C., Y. Ozsoy, and O. N. Ulutin (1991) Anticoagulant, fibrinolytic and antiaggregant activity of carrageenans and alginic acid. *Botan. Marin* 34: 429-435.
- Yang, J. S. and S. R. Lee (1997) Effect of ionizing radiation on the extraction yield and viscosity of alginate. *Korean J. Food Sci Technol.* 9: 194-198.
- Cho, H. O. and S. R. Lee (1974) Effectiveness of gamma irradiation of the extraction of algal polysaccharides. *Korean J. Food Sci. Technol* 6: 36-41.
- Lee, S. R., H. O. Cho, and S. K. Park (1975) Extraction yield and quality attributes of agar from domestic seaweeds according to various pretreatment. *Korean J. Food Sci. Technol.* 7: 109-114.
- Kim, O. J., D.-G. Lee, S.-M. Lee, S. J. Lee, H. J. Do, H. J. Park, A. Kim, J.-H. Lee, and J.-M. Ha (2010) Isolation and characteristics of alginate-degrading *Methylobacterium* sp. HJM27. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 38: 144-150.
- Lee, S.-M., I.-S. Choi, S.-K. Kim, and J.-H. Lee (2009) Production of bio-ethanol from brown algae by enzymic hydrolysis. *KSBB Journal.* 24: 483-488.
- Park, J. I., I. C. Woo, and J. H. Lee (2008) Production of bio-energy from marine algae: status and perspectives. *Korean Chem. Eng. Res.* 46: 833-844.
- Boyd, A. and A. M. Chakrabarty (1994) Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2355-2359.
- Kim, Y.-O., G.-T. Kim, H.-K. Kim, D.-K. Kim, S.-H. Huh, and I.-S. Kong (1996) Characteristics of recombinant alginate lyase of a marine bacterium, *Pseudomonas* sp. *J. Korean Fish. Soc.* 29: 637-642.
- Uo, M.-H., D.-S. Joo, S.-Y. Cho, and T.-S. Min (2006) Purification and characterization of the extracellular alginase produced by *Bacillus licheniformis* AL-577. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 35: 231-237.
- Yonemoto, Y., K. Mututa, A. Kimura, H. Yamaguchi, and K. Okayama (1991) Bacterial alginate lyase: characterization of alginate lyase-producing bacteria and purification of the enzyme. *J. Ferm. Bioeng.* 72: 152-157.
- Kim, H. K., J. C. Lee, N. H. Kang, S. H. Kim, J. G. Kim, and K. C. Chung (2007) Purification and characterization of the extracellular alginate lyase from *Streptomyces* sp. MET 0515. *J. Life Sci.* 17: 625-633.