

보 문

알긴산 분해능을 갖는 *Pseudoalteromonas* 및 *Vibrio* 속 해양세균들의 분리 및 특성분석

윤영준 · 김정완*

인천대학교 생명공학부

Isolation and characterization of marine bacteria with alginate degrading activity

Young-Jun Yoon and Jung-Wan Kim*

Division of Bioengineering, Incheon National University, Incheon 22012, Republic of Korea

(Received August 10, 2015; Accepted December 4, 2015)

ABSTRACT: As an effort to utilize alginate, 103 bacterial isolates that were positive for the alginate lyase activity were isolated from various clams and seawater samples collected in Incheon coastal area. Among them, 3 strains (M1-2-1, M6-1, and C8-15) were finally selected for further analysis based on their activities at higher levels than others. These isolates were all Gram-negative and rod shaped halophilic bacteria with motility. According to their physiological and biochemical properties as well as DNA sequence of their 16S rRNA genes, M1-2-1 and M6-1 were identified as a member of genus *Pseudoalteromonas* and C8-15 belonged to genus *Vibrio*. They exhibited the alginate degrading activity at the maximal level when they were cultured in APY broth for 6-8 h at 25°C. Both their growth and the enzyme activity were greatly enhanced when NaCl was added to the growth medium. The crude alginate lyases from the supernatants of the bacterial cultures showed the highest activity at 45°C and pH 7.0-8.0. M1-2-1 and M6-1 produced 2.723 and 1.976 g/L of reducing sugar from alginate, respectively, suggesting that they have potential for commercial application.

Key words: *Pseudoalteromonas* sp., *Vibrio* sp., alginate, alginate lyase, brown algae

알긴산은 갈조류 세포벽의 40% 정도를 차지하는 주성분으로 β -D-mannuronic acid (MA)와 α -L-guluronic acid (GA)가 α -1,4 또는 β -1,4 공유결합으로 연결된 점액질의 이형 다당류이다(Gacesa, 1988). 알긴산의 MA와 GA의 비율은 해조류의 종류, 계절 및 해조 부위 등에 따라 다른데(Fisher and Dorfel, 1955), 현재 상용되는 알긴산은 대부분 *Macrocystis periferia*, *Laminaria hyperborean*, 그리고 *Ascophyllum nodosum*으로부터 생산되고 있다.

알긴산은 비만억제, 장의 연동운동 촉진을 통한 변비 치료, 콜레스테롤 억제, 항응고, 중금속 흡수 및 제거, 유해물질의 독성 억제(Güven *et al.*, 1991) 등의 유용 생리활성을 보이고 겔/필름 형성능이 있어 다양한 형태의 기능성 식품소재로의 활용

이 가능할 뿐만 아니라, 상처를 보호하는 창상피복제 및 지혈(Lee *et al.*, 2009a) 등의 효과가 있어 의약품 소재로도 응용될 수 있다(Kim *et al.*, 2011). 알긴산으로 제조되는 올리고당 또한 생장촉진, 항암 및 항균작용, 면역증강, 장내균총 개선, 고혈압개선 등 부가적인 생체조절 기능이 있는 것으로 보고된 바 있으며(Yokose *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2011; Terakado *et al.*, 2012; Ueno *et al.*, 2012; Powell *et al.*, 2013), 국내에서도 오래 전부터 해조류의 알긴산 올리고당 제조에 대한 연구가 진행되어 왔다(Joo *et al.*, 1993, 1996; Kim *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2009).

한편 기존의 전분질계(1세대) 및 목질계(2세대) 자원을 이용한 바이오 에너지 생산이(Lee *et al.*, 2008) 각각 곡물가의 급등과 고비용 및 비효율적인 전처리 등의 단점으로 인해 한계에 도달함에 따라, 이를 극복할 수 있는 제 3세대 신재생 에너지 자원으로 해조류를 이용하여 다양한 바이오 연료를 생산하

*For correspondence. E-mail: kjw5864@inu.ac.kr;
Tel.: +82-32-835-8244; Fax: +82-32-835-0804

는 연구가 활발히 수행되고 있다(Park *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011). 특히 해양생물 자원이 풍부한 우리나라의 경우 해조류를 이용한 바이오 에너지 생산은 가장 현실적인 대체 에너지 인 동시에 청정 에너지로서의 가능성이 높아 적극적으로 활용 될 수 있을 것으로 기대되고 있다.

그러나 올리고당을 비롯한 기능성 식품, 화장품 및 의약품 업, 그리고 바이오 에너지 생산 등에 알긴산을 비롯한 해조 다당류를 이용하기 위해서는 이들을 분해하여 저분자화하는 과정이 매우 중요하다. 특히 알긴산은 수용성이 낮아 상온에서 용해되는 시간이 길고, 알코올에도 잘 녹지 않으며, 농도가 증가되면 점도가 높아지는 등의 특성을 갖고 있어 이를 보완할 필요가 있다. 알긴산의 분리 및 분해를 위해 고온고압, 방사선 조사 등의 물리적 방법이나 산이나 알칼리로 처리하는 화학적 방법이 보고된 바 있으나(Uo *et al.*, 2006b), 최근 화학적 가수 분해법 보다 알긴산을 선택적으로 분해할 수 있는 효소를 사용하는 방법이 더 효과적이라고 알려지면서, 알긴산 분해효소를 분비하는 미생물 탐색과 해당 유전자 분리 및 효소 특성 분석 등에 관심을 갖게 되었다(Kim *et al.*, 2009).

알긴산 분해효소(alginate lyase; EC 4.2.2.4)는 uronic acid 중합체의 1,4 glycosidic 결합을 β -제거반응으로 분해하여 불포화 비환원성 말단을 발생시키는 효소로(Wong *et al.*, 2000; Zhu and Yin, 2015), 해조류 섭식동물(Jung *et al.*, 1999)과 이들의 분변, 그리고 해수, 해토 등에서 분리된 *Vibrio* sp. (Joo *et al.*, 1995), *Pseudomonas* sp. (Lee *et al.*, 2009b; Li *et al.*, 2011), *Azotobacter vinelandii* (Cote and Krull, 1988), *Pseudoalteromonas* sp. (Tomoo *et al.*, 2001) 등의 다양한 세균들에서 많이 관찰된다(Li *et al.*, 2015).

이에 본 연구에서는 여러 종류의 패류 및 해수로부터 가장 자연적인 조건 하에서 알긴산 유래 올리고당 생산 및 바이오 에너지 생산에 응용할 수 있도록 알긴산 분해능이 우수한 해양세균들을 분리, 동정하며 그 균주들의 생장특성을 파악하고 그들이 분비하는 알긴산 분해효소의 특성을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

알긴산 분해세균 분리 시료 및 전처리

알긴산 분해능을 갖고 있는 세균을 분리하기 위하여 2013년 5월부터 8월 사이에 인천광역시 소재 수산시장과 대형마트 등에서 키조개, 맛조개, 소라, 바지락, 전복, 홍합을 구입하였고, 연안부두에서 해수를 채수하였다. 패류 시료들은 내장을 취하여 잘게 다져 멸균된 희석액(NaCl 2.5%, pH 7.5)을 가한

다음 vortex하여 잘 혼합한 후, 상등액을 연속 희석하였다.

알긴산 분해세균의 분리 및 배양배지

알긴산 분해 세균들을 분리하기 위하여 두 층으로 나뉘어진 다층평판배지를 사용하였다(Kitamikado *et al.*, 1990). 하층배지는 2.0% (w/v) NaCl, 0.1% (w/v) KH_2PO_4 , 0.05% (w/v) $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.002% (w/v) $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.05% (w/v) KCl, 2.0% (w/v) agar (pH 7.0), 상층배지는 1.0% (w/v) sodium alginate, 2.0% agar (pH 7.0)를 사용하여 제조하였다. 시료 희석액과 해수 0.1 ml를 각각 분리용 배지 위에 도말 한 다음 30°C에서 3-4일간 배양하였다. 다층평판배지 위에 형성된 균 집락의 지름이 2-3 mm 이상인 균주들을 알긴산 분해 양성균으로 분리하였다. 알긴산 분해능이 확인된 균주는 PYA 배지 [2.0% (w/v) NaCl, 0.5% (w/v) peptone, 0.2% (w/v) yeast extract, 0.5% (w/v) $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.1% (w/v) CaCl_2 , 0.05% KCl, 1.5% (w/v) agar, pH 7.2]를 이용하여 순수 분리하였다.

평판배지 상의 알긴산 분해능 분석

분리된 균주들의 알긴산 분해능을 확인하기 위해 PSA 배지 [0.5% (w/v) peptone, 0.8% (w/v) sodium alginate, 2.0% (w/v) NaCl, 1.5% (w/v) agar, pH 7.2]에 접종하고 30°C에서 36-48시간 배양하였다. 배양 후 10% cetylpyridinium chloride monohydrate (CPC; w/v)를 균집락이 형성된 배지에 배지가 잠길 정도로 분주하고, 10분 후 투명한 형성을 육안으로 관찰하여 알긴산 분해효소의 활성 유무를 판정하였다(Gacesa and Wusteman, 1990).

알긴산 분해능의 정량분석

알긴산 분해 균주들을 APY 액체배지 [0.8% (w/v) sodium alginate, 0.5% (w/v) peptone, 0.2% (w/v) yeast extract, 0.1% (w/v) $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.1% (w/v) KH_2PO_4 , 2.0% (w/v) NaCl, pH 7.2]에 접종한 다음 30°C에서 적정 시간 진탕배양(230 rpm) 하였다. 배양액은 원심분리(4°C, 12,000 rpm, 10 min)하여 상등액(균체 외 효소)을 취하여 조효소액으로 사용하였다. 생성되는 환원당은 DNS 정량법으로 측정하였다(Miller, 1959). 기질용액 [0.8% (w/v) sodium alginate, 0.3 M NaCl, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0] 500 μl 와 조효소액 500 μl 를 혼합하여 항온수조(25 혹은 30°C)에서 1시간 반응시킨 다음, 반응액을 원심분리(4°C, 12,000 rpm, 5분)하여 상등액 200 μl 와 DNS 용액 [0.63% (w/v) 3,5-dinitrosalicylic acid, 2.14% (w/v) NaOH, 18.25% (w/v) Rochell salt (potassium sodium tartrate), 0.54%

(v/v) phenol (p=1.071 g/ml) 5.375 ml, 5 g Na₂S₂O₅ (Sigma-Aldrich)] 800 μ l을 혼합하여 10분간 가열한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Maltose를 표준당으로 사용하여 작성한 표준 검량선에 흡광도 값을 대입하여 환원당량을 결정함으로써 활성도를 분석하였다. 효소활성 1 unit는 1분에 1 μ mole의 환원당을 생산하는 효소의 양으로 정의하였다. 알긴산 분해능에 미치는 물리화학적 인자들의 영향은 배양온도(15–37°C), 반응온도(10–80°C), NaCl 농도(0–8.0%), 산도(2.0–10.0) 등에 관해 분석하였고 APY 액체배지에 균주들을 접종하여 25°C에서 230 rpm으로 교반하면서 1–2시간 간격으로 시료를 취하여 활성을 측정하거나 동일조건 하에서 10시간 진탕배양 후 동일한 방법으로 효소 활성을 정량적으로 분석하였다.

분리균주의 동정

분리된 균주들은 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994)의 분류방법에 따라 그람 염색, 형태, 생리·생화학적 특성을 분석하여 동정하였다. 알긴산 분해 효소를 분비하는 균주의 형태는 투시전자현미경(H-7600, Hitachi; 을지대학교 전자현미경실)으로 관찰하였다. 또한 당을 이용한 산 생성 실험 등과 같은 생리·생화학적 특성은 API 20E Kit (bioMérieux Co.)로 분석하였다.

선별된 분리균주들의 유전학적인 동정과 계통학적 유연관계의 분석을 위해 염색체 DNA를 분리하여 16S rRNA 유전자에 대한 Universal primer [fYU2, 5'-TAACACATGCAAGT CGAGCG-3'; rYU2, 5'-TACGGCTACCTT GTTACGAC-3']로 Yoon 등(2003)의 방법을 변형하여 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 증폭된 16S rRNA 유전자 단편의 염기서열을 결정 한 후(Solgent Co.) National Center for Biotechnology Institute (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) search를 통하여 동정하였다. 계통분류학적 유연관계는 EzTaxon-e (Kim *et al.*, 2012)와 MEGA6 (Tamura *et al.*, 2011)를 사용하여, neighbor joining method에 따라 evolutionary distance matrix를 얻고 계통수를 작성하여 분석하였다(Saitou and Nei, 1987).

결과 및 고찰

알긴산 분해효소 생산균주의 선별 및 동정

Table 1에 보인 바와 같이 다양한 패류의 내장과 해수 시료를 다층평판배지에 배양한 결과 1차적으로 687개의 균집락이 분리되었는데, 이들은 모두 알긴산을 분해하여 성장할 수 있

Table 1. Alginate-degrading bacteria isolated from various marine samples

Sample		Number of colonies obtained	Number of positive isolates
Common name	Scientific name		
Comb pen shell	<i>Atrina pectinata japonica</i>	166	37
Manila clam	<i>Ruditapes philippinarum</i>	89	15
Razor clam	<i>Solen corneus Lamarck</i>	33	0
Mussel	<i>Mytilus coruscus GOULC</i>	119	28
Abalone	<i>Haliotis gigantea</i>	94	12
Spiny top shell	<i>Batillus cornutus</i>	73	8
Small ark shell	<i>Barbatia stearnsii</i>	66	3
Sea water		15	0
Total		687	103

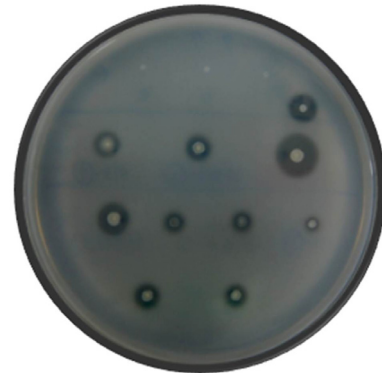


Fig. 1. Agar plate assay of the alginate degrading activity of the isolates. Clear zone around each colony represents degradation of alginate in the PSA medium.

는 균들이었다. 이들의 알긴산 분해능을 확정하기 위해 이들을 PSA 배지에 배양한 후 10% CPC 용액을 가하여 투명환이 형성되는지 여부를 확인한 결과, 278개의 균주들이 2차로 선별되었다. 이들을 PYA 배지에 계대 배양하여 순수 분리한 다음 다시 PSA 배지와 CPC 용액으로 알긴산 분해능을 재확인하여 103개 균주를 알긴산 분해 양성 균주로 선별하였다(Fig. 1 and Table 1).

이들 가운데 PSA 평판배지 상에서 가장 뚜렷한 알긴산 분해능을 보인 9개 분리균주를 대상으로 알긴산 분해로 생성되는 환원당을 정량 분석하였다. 그 결과 바지락에서 분리된 4개의 M 균주들이 알긴산 분해 활성을 가장 많이 나타냈는데(Fig. 2), 특히 M1-2-1 균주는 환원당 생성능이 2.723 mg/ml로 가장 높았고, 그 다음으로 M6-1이 1.976 mg/ml로 높았다. 이는 Joo 등(1993)이 분리했던 균주들이나(0.09–0.738 mg/ml), Uo 등(2006b)이 분리하여 보고한 *Bacillus licheniformis* AL-577 (0.9 mg/ml) 보다 알긴산을 분해하여 훨씬 더 많은 환원당을 생성시킬 수 있는 것을 알 수 있었다. 키조개에서 분리된

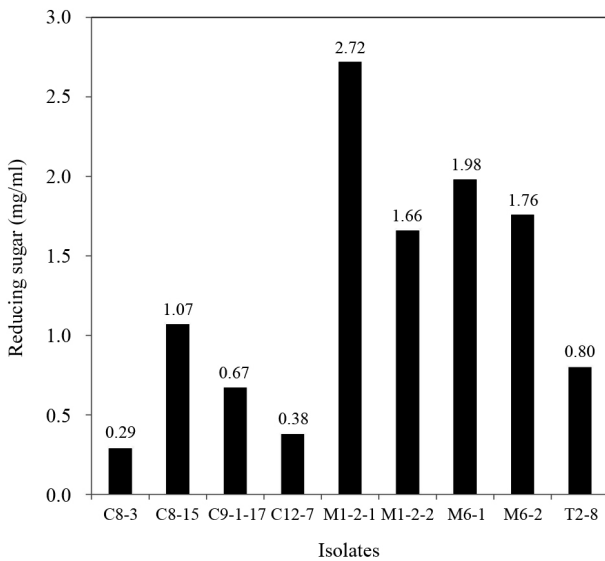


Fig. 2. The amount of reducing sugars released from alginate by the isolates.

C8-15, C9-1-17, C12-7 균주들과 소라에서 분리된 T2-8 균주는 M 균주들에 비해 알긴산 분해능이 상대적으로 낮았으나 (0.29-1.06 mg/ml), 위의 보고된 사례들보다 대체로 높았다. 이들은 균집락의 형태 면에서도 바지락에서 분리된 M 균주들과는 확실하게 구별되어 다른 종류의 균주들이므로 사료되었다.

알긴산 분해능이 우수한 9개 균주들을 동정하기 위하여 16S rRNA 유전자를 PCR로 증폭하여 그 염기서열을 분석하였다. 그 결과, 바지락에서 분리한 M1-2-1, M1-2-2, M6-1 및 M6-2 균주는 *Pseudoalteromonas* 속 균주들과 98-99%의 유사성을 보여 연관관계가 매우 높았으므로 *Pseudoalteromonas*

속 균주로 동정하였다. 키조개에서 분리한 C8-15와 C9-1-17 균주들은 *Vibrio* 속 균주와 99%의 높은 유연성 관계를 보여 이들은 *Vibrio* 속 균주로 동정하였다. 그러나, C12-7과 T2-8은 북극에서 분리된 해양세균과의 유사성이 각각 98%와 65%인 것으로 나타나 정확한 동정이 불가능하였으며, 특히 T2-8은 새로운 종일 가능성이 높은 것으로 판정하였다. 이들의 16S rRNA 유전자 염기서열을 neighbor joining method로 계통분류학적 유연관계를 분석한 결과는 Fig. 3에 보인 바와 같았다. *Pseudoalteromonas* 속 균주로 동정된 M 균주들은 *P. atlantica*와 연관성이 높았고, C12-7 균주는 *P. prydzensis*와 계통분류학적 연관성이 높았으며, T2-8 균주는 변이가 더 큰 것으로 나타났다. C9-1-17과 C8-15 및 C8-3 균주들은 *Vibrio* 속 세균들과의 연관성이 높은 것으로 나타났다.

이러한 계통분류학적 동정결과를 확인하기 위하여 형태적, 생리 및 생화학적 특성을 분석했을 때, M1-2-1과 M1-2-2, 그리고 M6-1과 M6-2는 각각 시험한 범위 내에서 특성이 거의 같았으며 *Vibrio* C8-15와 C9-1-17도 특성이 서로 거의 같았다(Table 2). 이들은 모두 그람 음성 간균으로 크기는 $1.9-2.7 \times 0.9-1.3 \mu\text{m}$ 이었으며(Fig. 4), 운동성이 관찰되었다. 생리적으로 M1-2-1과 M6-1 균주는 $5-37^\circ\text{C}$ 범위에서 성장하고, 40°C 이상에서는 성장하지 못하는 반면, C8-15 균주는 40°C 에서도 생장이 가능하였다. 이들의 최적 생장온도는 25°C 로 저온균임을 알 수 있었다. 또한 3 균주 모두 1-13% NaCl 농도 범위에서 생장이 가능한 호염성 세균으로 *O*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside 분해능과 oxidase 양성반응을 보였고, polymyxin B와 gentamicin에 대해 감수성을 보였다. 또한 M1-2-1과 M6-1은 섬유질과 젤라틴 분해능은 없었으나 지질, 단백질 및 전분 분해능을 갖고 있는 등 *Pseudoalteromonas* 속

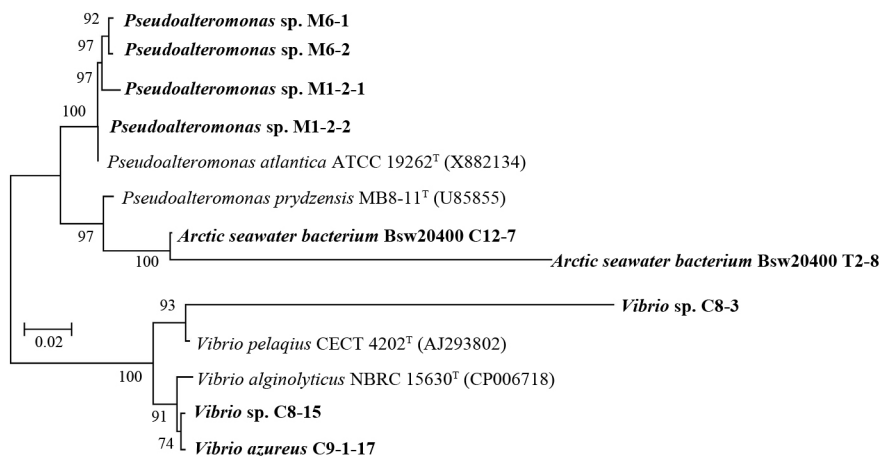


Fig. 3. Phylogenetic relationship among the isolates and type strains of closely related taxa on the basis of the DNA sequence of the 16S rRNA gene. The dendrogram was established by the neighbor-joining method. The bar stands for 0.02 accumulated changes per nucleotide.

Table 2. Characteristics of the isolates

Characteristics	M1-2-1	M6-1	C8-15	Characteristics	M1-2-1	M6-1	C8-15
Cell shape	Rod	Rod	Rod	Susceptibility to			
Gram staining	-	-	-	ampicillin (10 µg)	-	-	-
Motility	+	+	+	gentamycin (10 µg)	+	+	+
OX	+	+	+	polymyxin B (300 U)	+	+	+
ONPG	+	+	+	streptomycin (10 µg)	-	-	+
ADH	-	-	-	tetracycline (30 µg)	-	-	-
LDC	-	-	-	Growth at			
ODC	-	-	-	5°C	+	+	+
H ₂ S	-	-	-	37°C	+	+	+
URE	-	-	-	40°C	-	-	+
IND	-	-	-	Growth in NaCl			
VP	V	V	ND	0%	-	-	+
Hydrolysis of				1-12%	+	+	+
Cellulose	-	-	-	13%	±	±	+
Gelatin	-	-	-	Growth at alginate			
Lipid	+	+	+	0%	-	±	+
Protein	+	+	-	0.5-2.0%	+	+	+
Starch	+	+	-	Growth with			
GLU	-	-	+	1% Fructose	-	-	±
MAN	-	-	-	Galactose	-	-	±
INO	-	-	+	Glucose	-	-	+
SOR	-	-	-	Starch	+	+	-
RHA	-	-	+	Sucrose	-	-	+
SAC	-	-	+	Growth with			
MEL	-	-	-	1% Peptone	+	+	+
AMY	-	-	+	Urea	±	-	±
ARA	-	-	+	(NH ₄) ₂ SO ₄	±	±	±
CIT	±	±	V	NH ₄ Cl	±	±	±

±, negative or positive reaction; ND, no data; V, variable; N, negative

Abbreviations: OX, oxidase; GLU, glucose; ONPG, *O*-nitrophenyl-β-D-galacto-pyranoside; MAN, mannitol; ADH, arginine dihydrolase; INO, inositol; LDC, lysine decarboxylase; SOR, sorbitol; ODC, ornithine decarboxylase; RHA, rhamnose; H₂S, H₂S production; SAC, sucrose; URE, urease; MEL, melibiose; IND, indole production; AMY, amygdalin; VP, Voges-Proskauer; ARA, arabinose; GEL, gelatinase; CIT, citrate

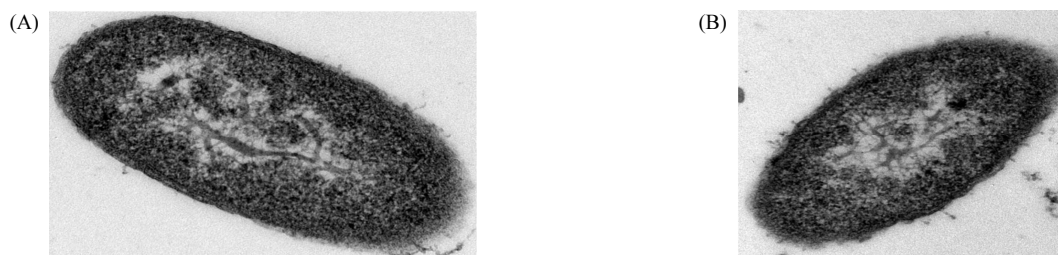


Fig. 4. Transmission electron microscopy of *Pseudoalteromonas* sp. M1-2-1 (20,000X, left) and M6-1 (20,000X, right).

세균들과 유사한 특성을 나타냈다(Nam *et al.*, 2007). 그러나 이들은 당 분해 및 이에 따른 산 생성시험에서는 대부분 음성

반응을 보여 기존에 알려진 *Pseudoalteromonas* 속 세균들과는 다소 차이가 있었다. C8-15는 단백질 및 전분 분해능이 없

는 반면 포도당과 저당 분해능이 있는 점에서 *Pseudoalteromonas* 속 M1-2-1과 M6-1 균주와 구별되었다. M1-2-1, M6-1 및 C8-15 균주들은 0.5-2.0%의 알긴산이 포함된 배지에서 성장력이 좋을 뿐만 아니라, 알긴산 분해능이 우수함을 재확인할 수 있었다. 따라서 이들을 알긴산 분해능이 가장 우수한 분리 균주들로 최종 선발하였으며, 이 3 균주들이 생산하는 알긴산 분해능과 관련된 특성에 대해 다양한 배양 및 반응 조건 하에서 분석하였다.

배양 시간에 따른 균주 성장과 알긴산 분해효소 활성

Pseudoalteromonas sp. M1-2-1과 M6-1 균주 및 *Vibrio* sp. C8-15 균주의 배양 시간에 따른 성장도 및 알긴산 분해능 발현 양상을 파악하기 위하여 이들을 APY 액체배지에 접종하여 30°C에서 120시간 배양하면서 24시간 간격으로 배양액을 취하여 분석하였다. 그 결과, 24시간이 경과하면 M1-2-1과 M6-1 균주들의 경우 알긴산 분해 활성이 감소하기 시작하였고, C8-15 균주는 활성에 큰 차이가 없었다(결과 미제시). 따라서 이들을 동일 조건하에서 20시간 배양하면서 2시간 마다 배양액을 취하여 다시 분석하였다(Fig. 5). 그 결과, 3균주 모두 배양 시작 10시간 후 정체기에 이르렀는데, M1-2-1과 M6-1 균주는 대수기 말기인 8시간 후에 알긴산 분해능을 가장 많이 나타낸 반면, C8-15 균주는 이른 대수기인 6시간만에 가장

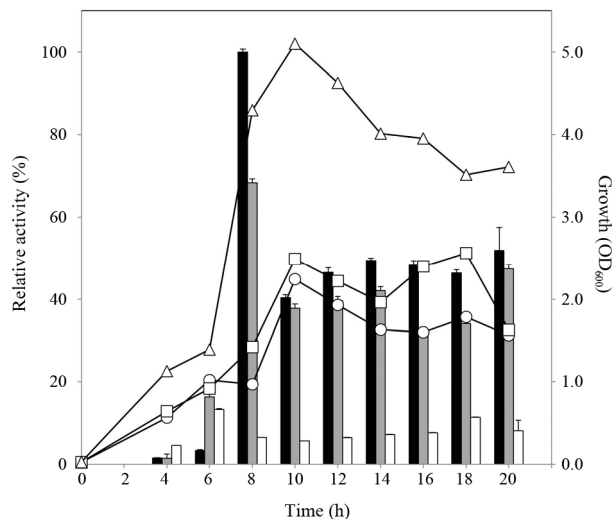


Fig. 5. Effect of culture time on growth and alginate degrading activity of the isolates. The isolates were cultured in APY medium at 30°C for 20 h with shaking at 230 rpm. Relative enzyme activity is shown in percentages, taking the highest activity of M1-2-1 as 100%. The black bars represent the relative enzyme activity produced by M1-2-1; grey bars, M6-1; white bars, C8-15. The graph marked with circles represents the growth of M1-2-1; squares, M6-1; triangles, C8-15.

높은 활성을 보였다. 이 때 C8-15 균주는 M 균주들에 비해 생장은 매우 빠르고 많이 증식했으나, 최대 알긴산 분해 활성은 M1-2-1 균주의 활성의 15% 정도 밖에 되지 않았다. *B. licheniformis* AL-577 균주는 144-150시간 배양했을 때, 생장 및 알긴산 분해 활성이 최대로 나타났다고 보고되었으며(Uo *et al.*, 2006b), *Streptomyces* sp. MET 0515의 경우 72시간 배양 후 알긴산 분해 활성이 최고점에 이르렀다는 보고(Kim *et al.*, 2007)와 비교했을 때, 본 연구에서 분리된 균주들은 생장과 알긴산 분해활성이 10시간 이내에 최대로 나타났으므로 산업적으로 응용하는데 효율성이 높을 것으로 기대되었다.

배양온도에 따른 분리균주들의 성장과 알긴산 분해활성

Pseudoalteromonas sp. M1-2-1과 M6-1 균주 및 *Vibrio* sp. C8-15 균주의 배양온도에 따른 성장력과 알긴산 분해활성을 15-37°C 범위에서 APY 액체배지에 접종하여 8시간 동안 230 rpm으로 진탕배양하면서 분석하였다(Fig. 6). 3균주 모두 25°C가 최적성장 온도로 확인되었는데, M1-2-1과 M6-1은 20-30°C에서 성장하였고, *Vibrio* sp. C8-15 균주는 20-37°C의 비교적 넓은 범위에서 생장이 가능하였으며, 다른 두 균주에 비해서 훨씬 많이 성장하였다. 또한, 위의 온도 구간에서 동일한 조건으로 배양하면서 상등액을 취하여 30°C에서 알긴산 분해 활성을 측정하였는데 C8-15 균주는 25°C에서 배양했을 때 가

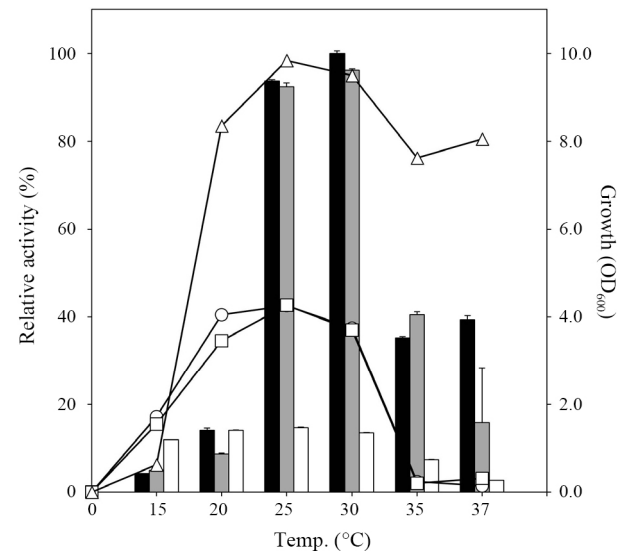


Fig. 6. Effect of culture temperature on growth and alginate degrading activity of the isolates. The isolates were cultured in APY medium at 30°C for 8 h with shaking at 230 rpm. Relative enzyme activity is shown in percentages, taking the highest activity of M1-2-1 as 100%. The black bars represent the relative enzyme activity produced by M1-2-1; grey bars, M6-1; white bars, C8-15. The graph marked with circles represents the growth of M1-2-1; squares, M6-1; triangles, C8-15.

장 많은 활성을 생산하였고, M1-2-1과 M6-1은 30°C에서 배양했을 때 가장 많은 활성을 생산하였는데, 25°C에서도 최대 활성의 90% 정도를 생산하였다. 이 두 균주들은 그 외의 온도 범위에서는 알긴산 분해효소 활성이 매우 낮았던 반면에, *Vibrio* sp. C8-15 균주는 15–30°C 범위 내에서는 최대활성의 약 80%, 35°C에서는 약 48% 정도의 활성을 보였다. 따라서, *Vibrio* 속 세균인 C8-15 균주는 *Pseudoalteromonas* 속 균주들에 비해 알긴산 분해활성 생산력은 낮았지만, *Pseudoalteromonas* 균주들보다 넓은 범위의 온도에서 성장하며, 알긴산 분해능을 거의 일정하게 발현하는 것으로 나타났다.

NaCl이 분리균주의 성장과 효소활성에 미치는 영향

본 연구에서 분리된 균주들은 패류에서 유래한 해양세균들이기 때문에 염 농도가 높은 환경에서도 활성이 있을 것으로 사료되어 염 농도가 분리균주들의 성장 및 알긴산 분해활성 생산에 미치는 영향을 분석하였다(Fig. 7). 본 연구에서 선발된 3균주들은 NaCl이 포함되지 않는 배지에서는 거의 성장하지 않았고, 1.0–12.0% (w/v)의 NaCl 농도범위에서 성장할 수 있어 호염성 균주로 판정된 바 있다(Table 2). 특히 2.0–5.0% (w/v) 범위에서 잘 성장하였다. C8-15 균주는 2% (w/v) NaCl이 가해졌을 때 가장 성장도가 높았고, 농도가 증가함에 따라 성장도가 점차 감소하였다. 반면에, M1-2-1과 M6-1 균주들의

성장도는 NaCl 농도가 5% (w/v)로 증가될 때까지 증가하다가 그 이상이 되면 급격히 저하되었으며, 특히 M6-1의 생장은 M1-2-1에 비해 3–5% (w/v) 농도의 NaCl에 의해 현저하게 증가되었다. 해양 미생물들은 생장 및 효소 생산에 적정 농도의 1가 또는 2가 이온이 필요하다고 알려져 있는데, 이는 삼투조절과 밀접한 관련이 있다(Baxter, 1959).

Pseudoalteromonas sp. M1-2-1과 M6-1 균주의 알긴산 분해효소 활성은 배지에 6.0% (w/v) NaCl을 가했을 때 각각 199.91 unit/ml와 180.61 unit/ml로 가장 많이 생산되었다(Fig. 7). M1-2-1 균주는 1.0–5.0% 범위 내에서 비슷한 양의 효소활성을 생산한 반면, M6-1 균주는 생장이 많이 일어나는 조건에서는 효소활성을 적게 생산하였다. *Vibrio* sp. C8-15 균주는 1.0% (w/v) NaCl를 가했을 때 효소활성이 가장 높게 나타났고 (34.54 unit/ml), 2.0–4.0% 범위 내에서는 큰 차이가 관찰되지 않았다. 그러나 NaCl 농도가 5.0% (w/v) 이상이 되면 성장도와 효소활성이 급격하게 감소하는 것으로 나타났다. 이는 *B. licheniformis*의 성장과 환원당 생성의 최적 NaCl 농도가 2.0% (w/v)라는 보고(Uo *et al.*, 2006b)와 *Vibrio* sp. AL-145의 경우 0.5 M NaCl(약 2.9% w/v)에서 효소 활성이 가장 높았다는 보고(Joo *et al.*, 1995)와 비교할 때, *Pseudoalteromonas* sp. M1-2-1과 M6-1 균주는 이들과 매우 다른 양상을 보인 반면에 *Vibrio* sp. C8-15 균주는 비슷한 양상을 보이는 것으로 판명되었다. 또한, 이러한 결과를 토대로 본 연구에서 분리된 3균주들은 염 농도와 관련해서 성장도나 알긴산 분해활성 발현 양상이 서로 다르다는 것을 알 수 있었다.

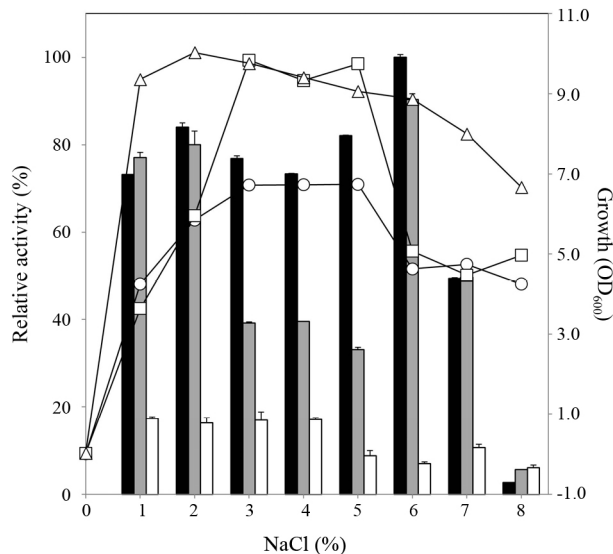


Fig. 7. Effect of NaCl on growth and alginate degrading activity of the isolates. The isolates were cultured as in Fig. 6. Relative enzyme activity is shown in percentages, taking the highest activity of M1-2-1 as 100%. The black bars represent the relative enzyme activity produced by M1-2-1; grey bars, M6-1; white bars, C8-15. The graph marked with circles represents the growth of M1-2-1; squares, M6-1; triangles, C8-15.

반응온도 및 산도가 알긴산 분해효소 활성에 미치는 영향

본 연구에서 분리된 균주들의 알긴산 분해능을 보다 자세히 분석하기 위하여, 이들을 APY 액체배지에 접종하여 25°C에서 230 rpm으로 8시간 진탕배양 한 후 원심분리(7,000 rpm, 5 min, 4°C)하고 그 상등액을 취하여 조효소액을 준비하였다. 그 조효소액을 0.8% 알긴산 용액과 혼합하여 다양한 반응 온도(10–80°C)에서 그 분해활성을 분석하였다. 그 결과 3균주 모두 45°C에서 알긴산 분해효소 활성이 가장 높았다(Fig. 8A). 특히 *Pseudoalteromonas* 속 균주들은 25–60°C의 범위 내에서 최대 활성의 90% 이상의 활성을 보였고 10°C에서 최대 활성의 80% 이상 그리고 80°C에서도 65–70% 정도 유지되어, 활성 온도범위가 상당히 넓은 것을 알 수 있었다. *Vibrio* 속 C8-15 균주는 10–45°C 온도 구간에서 비교적 고르게 높은 활성을 보인 반면 50°C에서는 최대 활성의 55%, 그 이상의 온도에서는 단지 10% 미만으로 나타났다. 따라서, *Pseudoalteromonas* 속 균주들이 생산하는 알긴산 분해효소가 열에 더 안정하였고,

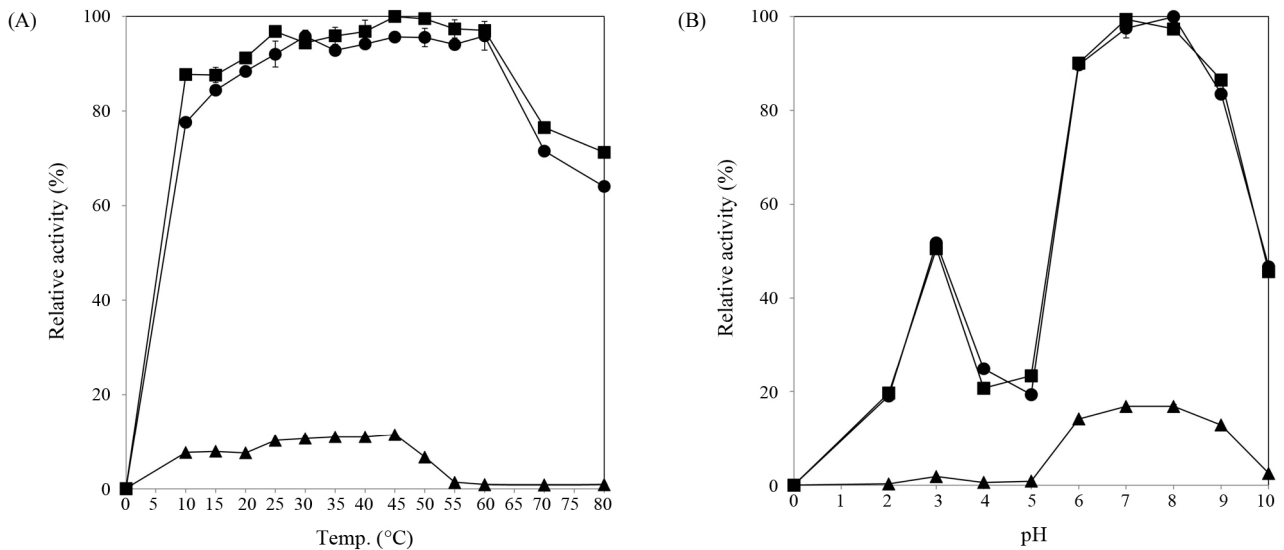


Fig. 8. Effect of reaction temperature (A) and pH on the crude alginate degrading enzymes from the isolates. Relative enzyme activity is shown in percentages, taking the highest activity of M6-1 (A) or M1-2-1 (B) as 100%. The graph marked with circles represents the growth of M1-2-1; squares, M6-1; triangles, C8-15.

이는 산업적 응용에 매우 유리한 특성인 것으로 사료되었다. 이전에 보고된 알긴산 분해효소들의 최적 반응온도와 비교해 보면 *Vibrio*와 *Enterobacter* 속 세균 유래 알긴산 분해효소들의 경우는 최적온도가 25°C 혹은 30°C였으며(Joo *et al.*, 1993), *B. licheniformis*는 35°C(Uo *et al.*, 2006a), *Pseudomonas fluorescens* HZJ216 균주는 35°C였고(Li *et al.*, 2011), *Streptomyces* sp. MET 0515의 경우 최적온도가 70°C였다(Kim *et al.*, 2007). 이 효소들은 모두 본 연구에서 분리된 균주들의 효소들보다 좁은 온도 범위 내에서 활성을 보였다. 최근에 유전자 분리를 통해서 특성이 분석된 해양세균 *Agarivorans* sp. L11의 alginate lyase는 최적 pH가 8.6, 최적온도가 40°C였으며, 15°C와 20°C 같은 저온에서도 각각 최대 활성의 54.5%와 72.1%를 유지되는 점에서 본 연구에서 분리된 균주들의 효소와 매우 유사하다고 사료되었다.

Pseudoalteromonas sp. M1-2-1과 M6-1 그리고 *Vibrio* sp. C8-15 균주들이 생산하는 알긴산 분해효소 활성에 산도가 미치는 영향을 pH 2.0-10.0의 범위에서 분석하였다(Fig. 8B). 이들의 알긴산 분해 활성은 중성 및 약알칼리성(pH 7.0과 8.0) 조건에서 가장 높았으며, 약산성(pH 6.0) 조건에서 최대 활성의 90% 이상의 활성이 유지되었고, 염기성 조건인 pH 9.0에서도 중성 조건 하에서 보다는 약하지만 어느 정도 활성이 높았다(70-85%). 그러나 산성(pH 5.0 이하) 조건에서는 효소 활성이 매우 낮았다. 또한, 특히 M1-2-1과 M6-1의 경우 pH 3.0에서 최대 활성의 50% 정도되는 활성이 관찰되었는데, 이는 중성에서 활성을 보이는 알긴산 분해효소와는 또 다른 효소가 조효

소 내에 존재하는 것으로 사료되었다. *Streptomyces* sp. MET 0515 균주의 알긴산 분해효소는 최적 pH가 7.5이었고, pH 8.0에서 가장 높은 활성을 나타냈으며(Kim *et al.*, 2007), *B. licheniformis*의 AL-755 균주의 알긴산 분해효소 활성은 pH 6.0에서 가장 높았으며 pH 8.0까지 최대활성의 80%가 유지되었다고 보고된 바 있다(Uo *et al.*, 2006b). *P. fluorescens* HZJ216 균주는 3개의 알긴산 분해효소들을 갖고 있고 그들의 최적 pH는 7.0이나, 그 중 2개는 pH 5.0-9.0, 다른 하나는 5.0-7.0 범위에서 활성이 유지되었다고 보고된 바 있다(Li *et al.*, 2011). 따라서, 본 연구에서 분리된 균주들은 활성 온도 및 pH 범위가 넓은 알긴산 분해효소를 생산하거나 Li 등(2011)이 보고한 바와 같이 여러 알긴산 분해효소를 생산하는 것으로 사료되며, 따라서 바이오 에너지 생산을 위해서 사용되기 에 적절한 것으로 기대되었다.

Joo 등(1993)이 분리한 균주의 환원당 생성능은 0.355 g/L 이었고, Uo 등(2006a)이 분리한 *B. licheniformis*의 환원당 생성능은 0.899 g/L이었으며 또한 Kim 등(2010)이 분리한 *Methyobacterium* sp.는 1.217 g/L에 환원당 생성능을 보여 상업적인 가치가 있다고 보고된 바 있다. 본 연구에서 분리한 *Pseudoalteromonas* sp. M 1-2-1과 M 6-1의 환원당 생성능은 각각 2.723 g/L와 1.976 g/L로 분석되어(Fig. 2) 이들의 산업적 활용 가능성도 높을 것으로 기대되었다. 알긴산은 매년 산업적으로 3만여 톤이 생산되는데 염료고정제, 제제첨가제, 응집제 등 일반 상용화 제품의 판매 가격은 50-20 달러/kg이지만 면역촉진제나 세포고정화용 등의 의약품용 고순도 알긴산의

경우는 40,000 달러/kg이 되는 고부가 가치를 지니고 있다 (Kim *et al.*, 2011). 또한 화학연료의 고갈과 환경오염문제에 따른 친환경 바이오 연료의 공급이 시급해짐에 따라 바이오 에너지 생산을 위한 새로운 생물량으로서 해조류 유래 다당류의 이용에도 관심이 집중되고 있다(John *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011). 향후 해조 다당류를 보다 효율적으로 가수분해 할 수 있도록 *Pseudoalteromonas* sp. M1-2-1이나 M6-1 균주가 분비하는 알긴산 분해효소 생산 조건을 최적화시키거나, 이들의 알긴산 분해 효소(들)의 유전자 분리를 통해 해당 효소를 대량 생산할 수 있다면 해조 다당류를 이용한 화장품, 의학 및 바이오 에너지 개발 산업에 이들을 유용하게 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

알긴산의 응용을 위하여 인천지역에서 수집한 다양한 패류와 해수로부터 알긴산 분해효소 활성이 우수한 103개의 균주를 분리하고 그 중 M1-2-1, M6-1, C8-15 등 분해능이 가장 우수한 3균주를 선발하여 그 특성을 분석하였다. 이들은 모두 그람 음성 간균이었고, 운동성이 있는 호염성 세균이었다. 또한 생리·생화학적 특성 분석과 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석으로 M1-2-1과 M6-1은 *Pseudoalteromonas* 속, C8-15은 *Vibrio* 속에 속하는 세균으로 동정되었다. 이들의 알긴산 분해 효소 활성은 알긴산이 유일한 탄소원인 APY 배지에 접종하여 25°C에서 6-8시간 배양했을 때 최대로 나타났고, NaCl을 가했을 때 성장 및 효소 활성 모두 증진되었다. 이 분리 균주들의 알긴산 분해 조효소들은 45°C와 pH 7.0-8.0에서 가장 높은 활성을 나타냈으며, *Pseudoalteromonas* sp. M1-2-1과 M6-1 균주는 각각 2.7232 g/L와 1.976 g/L의 환원당 생성능을 보여, 산업적으로 활용 가능성이 높은 것으로 사료되었다.

감사의 말

본 연구는 인천대학교 2013년도 자체연구비 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

- Baxter, R.M. 1959. An interpretation of the effect of salts on the lactic dehydrogenase of *Halobacterium salinarium*. *Can. J. Microbiol.* **5**, 47-57.
- Choi, D., Piao, Y.L., Shin, W.S., and Cho, H. 2009. Production of oligosaccharide from alginate using *Pseudomonas agarovorans*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **159**, 438-452.
- Cote, G.L. and Krull, L.H. 1988. Characterization of the extracellular polysaccharide from *Azotobacter chroococcum*. *Carbohydr. Res.* **181**, 143-152.
- Fisher, F.G. and Dorfel, H. 1955. The polyuronic acids of brown algae. Part I. *Z. Physiol. Chem.* **302**, 186-203.
- Gacesa, P. 1988. Alginates. *Carbohydr. Polym.* **8**, 161-182.
- Gacesa, P. and Wusteman, F.S. 1990. Plate assay for simultaneous detection of alginate lyase and determination of substrate specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2265-2267.
- Güven, K.C., Özsoy, Y., and Ulufin, O.N. 1991. Anticoagulant, fibrinolytic and antiaggregant activity of carrageenans and alginic acid. *Botan. Marin.* **34**, 429-435.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneadt, P.H.A., Staley, J.T., and Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th, Williams Wilkins, USA.
- John, R.P., Anisha, G.S., Nampoothiri, K.M., and Pandey, A. 2011. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresour. Technol.* **102**, 186-193.
- Joo, D.S., Cho, S.Y., and Lee, E.H. 1993. Isolation of alginate-degrading bacteria and production of alginate degrading activities by the bacteria. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 207-213.
- Joo, D.S., Lee, J.S., Park, J.J., Cho, S.Y., Ahn, C.B., and Lee, E.H. 1995. Purification and characterization of the intracellular alginate from *Vibrio* sp. AL-145. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 432-438.
- Joo, D.S., Lee, J.S., Park, J.J., Cho, S.Y., Kim, H.K., and Lee, E.H. 1996. Preparation of oligosaccharides from alginic acid enzymatic hydrolysis. *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**, 146-151.
- Jung, J.Y., Hur, S.S., and Choi, Y.H. 1999. Studies on the efficient extraction process of alginic acid in sea tangle. *Food Eng. Prog.* **3**, 90-97.
- Kim, O.S., Cho, Y.J., Lee, K., Yoon, S.H., Kim, M., Na, H., Park, S.C., Jeon, Y.S., Lee, J.H., Yi, H., Won, S., and Chun, J. 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**, 716-721.
- Kim, B.J., Ha, S.D., Lim, D.J., Song, C., and Kong, J.Y. 1998. Production of agarase from marine bacterium *Bacillus cereus* ASK202. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **13**, 524-529.
- Kim, J., Kim, Y., Kim, S., Kim, B., and Nam, S. 2011. Properties and industrial applications of seaweed polysaccharides-degrading enzymes from the marine microorganisms. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 189-199.
- Kim, H.K., Lee, J.C., Kang, N.H., Kim, S.H., Kim, J.G., and Chung, K.C. 2007. Purification and characterization of the extracellular alginate lyase from *Streptomyces* sp. MET 0515. *J. Life Sci.* **17**,

- 625–633.
- Kim, D.E., Lee, E.Y., and Kim, H.S.** 2009. Cloning and characterization of alginate lyase from a marine bacterium *Streptomyces* sp. ALG-5. *Mar. Biotechnol.* **11**, 10–16.
- Kim, O.J., Lee, D., Lee, S., Lee, S.J., Do, H.J., Park, H.J., Kim, A., Lee, J., and Ha, J.** 2010. Isolation and characterization of alginate-degrading *Methyobacterium* sp. HJM27. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 144–150.
- Kitamikado, M., Yamaguchi, K., Tseng, C., and Koabe, B.** 1990. Method designed to detect alginate-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2339–2940.
- Lee, B.H., Lee, S.B., and Kim, W.K.** 2009a. Alginate fiber. *Fiber Technol. Ind.* **13**, 21–24.
- Lee, J.H., Bae, M.J., Kim, Y., and Nam, S.** 2009b. Identification and characterization of alginate lyase producing *Pseudomonas* sp. N7151-6. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 350–354.
- Lee, K.E., Lee, J.Y., and Kim, K.** 2008. Effect of content of crop component on the bioethanol production. *Korean J. Crop Sci.* **53**, 339–346.
- Lee, S., Oh, Y., Kim, D., Kwon, D., Lee, C., and Lee, J.** 2011. Converting carbohydrates extracted from marine algae into ethanol using various ethanolic *Escherichia coli* strains. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **164**, 878–888.
- Li, L., Jiang, X., Guan, H., Wang, P., and Guo, H.** 2011. Three alginate lyases from marine bacterium *Pseudomonas fluorescens* HZJ216: Purification and characterization. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **164**, 305–317.
- Li, S., Yang, X., Zhang, L., Yu, W., and Han, F.** 2015. Cloning, expression, and characterization of a cold-adapted and surfactant-stable alginate lyase from marine bacterium *Agarivorans* sp. L11. *J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 681–686.
- Miller, G.L.** 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination by reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426–428.
- Nam, Y.D., Chang, H.W., Park, J.R., Kwon, H.Y., Quan, Z.X., Park, Z.X., Lee, J.S., Yoon, J.H., and Bae, J.W.** 2007. *Pseudoalteromonas marina* sp. nov., a marine bacterium isolated from tidal flats of the Yellow Sea, and reclassification of *Pseudoalteromonas sagamiensis* as *Algicola sagamiensis* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 12–18.
- Park, J.L., Woo, H.C., and Lee, J.H.** 2008. Production of bio-energy from marine algae : status and perspectives. *Korean Chem. Eng. Res.* **46**, 833–844.
- Powell, L.C., Sowedan, A., Khan, S., Wright, C.J., Hawkins, K., Onsoyen, E., Myrovold, R., Hill, K.E., and Thomas, D.W.** 2013. The effect of alginate oligosaccharides on the mechanical properties of Gram-negative biofilms. *Biofouling* **29**, 413–421.
- Saitou, N. and Nei, M.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylo-genetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–425.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S.** 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 2731–2739.
- Terakado, S., Ueno, M., Tamura, Y., Tada, N., Yoshinaga, M., Otsuka, K., Numabe, A., Kawabata, Y., Murota, I., Sato, N., and Uehara, Y.** 2012. Sodium alginate oligosaccharides attenuate hypertension and associated kidney damage in Dahl salt-sensitive rats fed a high-salt diet. *Clin. Exp. Hypertens.* **34**, 99–106.
- Tomoo, S., Hiromasa, T., Yoshio, E., and Gacesab, P.** 2001. Cloning, sequence analysis and expression of *Pseudoalteromonas elyakovii* IAM 14594 gene (*alyPEEC*) encoding the extracellular alginate lyase. *Carbohydr. Res.* **335**, 11–21.
- Ueno, M., Tamura, Y., Toda, N., Yoshinaga, M., Terakado, S., Otsuka, K., Numabe, A., Kawabata, Y., Murota, I., Sato, N., et al.** 2012. Sodium alginate oligosaccharides attenuate hypertension in spontaneously hypertensive rats fed a low-salt diet. *Clin. Exp. Hypertens.* **34**, 305–310.
- Uo, M.H., Joo, D.S., and Cho, S.Y.** 2006a. Screening and cultivation characterization of alginate degrading bacteria. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **35**, 109–114.
- Uo, M.H., Joo, D.S., Cho, S.Y., and Min, T.S.** 2006b. Purification and characterization of extracellular alginase produced by *Bacillus licheniformis* AL-577. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **35**, 231–237.
- Wong, T.Y., Preston, L.A., and Schiller, N.L.** 2000. Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 289–340.
- Yan, G.L., Guo, Y.M., Yuan, J.M., Liu, D., and Zhang, B.K.** 2011. Sodium alginate oligosaccharides from brown algae inhibit *Salmonella enteritidis* colonization in broiler chickens. *Poult. Sci.* **90**, 1441–1448.
- Yokose, T., Nishikawa, T., Yamamoto, Y., Yamasake, Y., Yamaguchi, K., and Oda, T.** 2009. Growth-promoting effect of alginate oligosaccharides on a unicellular marine microalga, *Nannochloropsis oculata*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 450–453.
- Yoon, Y.J., Im, K.H., Koh, Y.H., Kim, S.K., and Kim, J.W.** 2003. Genotyping of six pathogenic *Vibrio* species based RFLP of 16S rDNAs for rapid identification. *J. Microbiol.* **41**, 312–319.
- Zhu, B. and Yin, H.** 2015. Alginate lyase: review of major sources and classification, properties, structure-function analysis and applications. *Bioengineered* **6**, 125–131.