

논물의 미생물군으로부터 해조분해능을 갖는 균주의 분리

김해섭 · 최옥수¹ · 강동수 · 박옥민 · 백승한¹ · 배태진*

여수대학교 식품공 · 영양학부, ¹순천제일대학 식생활학부

Received October 1, 2003 / Accepted December 5, 2003

Isolation of a Seaweed Hydrolytic Strain from the Microflora in Water of a Paddy Field. Hae-Sub Kim, Ok-Soo Choi¹, Dong-Soo Kang, Uk-Min Park, Seung-Han Baek¹ and Tae-Jin Bae*. *Division of Food Technology and Nutrition, Yosu National University, ¹Division of Food Science, Suncheon First College* – Various bacterial strains were isolated from water in a paddy field, and their seaweed degrading activities were investigated. As the result, 16 strains were obtained from the microflora sample. They were incubated in a liquid medium of sea tangle powder for 3 weeks. Ratios of reduced sugar to total sugar of the liquid medium were measured once a week during the incubation period. Ratio of reduced sugar to total sugar of 30A412 strain was highest. Accordingly, 30A412 strain was incubated in three different liquid media of sodium alginate, sea tangle powder, and sea mustard powder for 3 or 4 weeks. The ratios of reduced sugar to total sugar and cell growth were measured once a week during the incubation period. Ratios of reduced sugar to total sugar and cell growth were increased with the incubation period. Cell growth and degrading ratio were highest in the liquid medium with sea mustard powder.

Key words – Seaweed, Hydrolysis, Microflora, Sea tangle, Sea mustard

우리나라 연안은 해류의 교류가 좋아서 다양한 종류의 해조가 풍부하게 서식하고 있는데, 현재 밝혀져 있는 해조류로는 남조류 48종, 녹조류 80종, 갈조류 135종 및 홍조류 355종 등 모두 87과 618종으로 자원량도 매우 풍부하다[18]. 그리고 예로부터 해조를 식용, 약용, 사료 또는 해조공업의 원료로 많이 이용하여 왔고, 최근에는 건강식품으로 인정을 받으면서 본격적인 식량자원으로 활용하려는 움직임이 많이 일고 있다. 한편에서는 바다의 채소(sea vegetable)라는 표현을 사용할 정도로 우리의 식생활과 밀접한 관계가 있다.

현재까지 밝혀진 해조 성분의 가수분해 미생물로는 *Pseudomonas algino liquefaciens* [32-34], *Alginomonas alginica* [8], *Vibrio* sp. [1,2,17,28,29], *Pseudomonas* sp. [7,14,20-22], *Klebsiella aerogenes* [4,5], *Flavobacterium*, *Alcaligenes* 및 *Bacillus* sp. [12, 13] 등의 보고가 있으며, 이외에도 해수와 해양 토양[30], 분변 및 토양[31] 등으로부터도 알긴산 분해능이 우수한 균주를 분리하였다는 보고도 찾아볼 수 있다. 한편 미생물뿐만 아니라 해조류를 섭취하는 성게[10], 전복[24,25,28,29], 불가사리[9] 및 소라[23] 내장추출물로부터 알긴산 분해 효소를 분리하고 특성을 밝힌 보고도 있다.

본 연구에서는 예비실험을 통해 해조의 조직과파괴, 즉 다시마, 미역, 돌가사리, 툫 및 가시과래에 접종하여 환원당, 전당, 추출물 및 분해율을 검토한 결과에서 그 가수분해가 인정되었던[15,16] 논물에서 채취한 미생물군 시료를 사용하여, 몇 단계의 순수배양과 성분분석을 통하여 해조분해능을 갖

는 단일 미생물을 분리하고자 하였다.

재료 및 방법

해조류

실험에 사용한 재료 중 다시마(*Laminaria japonica*)는 전남 완도연안에서, 미역(*Undaria pinnatifida*)은 전남 여수연안에서 각각 생산되어 건제품으로 판매되는 것을 구입하여 건조시켜 -40℃ 동결고에 보관하여두고, 실험 직전에 고속분쇄기를 이용하여 100 mesh 이하로 분쇄한 것을 사용하였다.

미생물 채취 시료

미생물군 시료를 다시마, 미역, 돌가사리, 툫 및 가시과래 등의 건조분말에 접종하여 환원당, 전당, 추출물 및 분해율을 검토한 결과에서 그 가수분해가 인정되었던[15,16] 논물에서 채취한 미생물군 시료를 사용하였다.

알긴산 배지 제조

알긴산 분해능을 관찰하기 위한 알긴산 배지는 Kitamiko et al. [17]이 보고한 peptone 배지 조성 중 일부를 변형하여 만든 배지로서 Table 1에 나타내었다. 우선 액체배지 A에 분리 균주를 접종하여 72시간 전배양하였다. 이 배양액을 100 ml의 액체배지 B에 2 ml씩 접종하고 30±1℃의 배양에서 7일간 배양한 액으로 알긴산 분해능 측정에 사용하였다.

다시마와 미역 배지 제조

다시마 배지는 알긴산 분해 균주의 분리와 분해능 측정에

*Corresponding author

Tel : +82-61-659-3216, Fax : +82-61-653-6313

E-mail : bae5658@yosu.ac.kr

Table 1. Compositions of alginic acid media

Medium A		Medium B	
Bacto-peptone	5.0 g	KH ₂ PO ₄	1.0 g
Sodium alginate	5.0 g	NaCl	8.5 g
NaCl	8.5 g	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01 g
Distilled water	1,000 ml	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g
pH	7.6	KCl	0.5 g
		Sodium alginate	10 g
		Distilled water	1,000 ml
		pH	7.6

사용한 배지를 응용하여 조제하였다. 즉 다시마 분해능이 있는 균주의 분리에 사용한 배지는 KH₂PO₄, NaCl, FeSO₄ · 7H₂O, MgSO₄ · 7H₂O, KCl 및 bacto-agar를 함유하는 pH 7.6의 하층배지와 다시마분말과 bacto-agar를 함유하는 pH 7.6의 상층배지를 사용하였다[11]. 한편 다시마의 분해능과 균체의 성장률을 측정하기 위한 배지는 Table 1의 알긴산배지에서 sodium alginate 대신에 다시마 또는 미역분말을 첨가하여 조제한 액체배지들을 사용하였다.

전당 측정

전당은 phenol-sulfuric acid법으로 측정하였다. 시료용액 1 ml (10~100 µg/ml)를 시험관에 취하여, 5% phenol 용액 1 ml를 가한 후 혼합하고, 여기에 진한 황산 5 ml를 가하여 발열시키며 잘 혼합하였다. 이 반응액을 실온에서 30분 방치한 후 470 nm에서 흡광도를 측정하여 검량선을 작성하고, 환원당 함량을 구하였다.

환원당 측정

환원당 함량 측정은 Somogyi-Nelson법으로 측정하였다. 먼저 조제한 시료용액 1 ml와 구리시약 1 ml를 시험관에 각각 취하고, water bath에서 20분간 가열하여 산화제1구리(Cu₂O)를 생성시켰다. 여기에 폴리브덴용액 1 ml를 가하여

발색시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하고, 환원당 표준시약에 의한 검량선으로부터 환원당을 정량하였다

추출율과 분해율

환원당과 전당의 추출율은 원료 해조의 전당에 대한 환원당과 전당의 비율로 각각 나타내어 원료 해조에서 어느 정도로 가수분해되면서 당이 용출되어 나왔는가를 나타내었고, 분해율은 추출액 중의 전당에 대한 환원당의 비율로 나타내었다.

균체 성장율

각각의 배양조건에서 배양한 액을 충분히 교반한 다음, 620 nm에서 흡광도를 측정하고, 균을 접종하지 않은 액체배지의 흡광도 값으로 보정한 것을 균체 성장의 지표로 하였다.

결과 및 고찰

단일 균주 분리와 분해능

논물에서 채취한 시료에서 분해 미생물을 분리하기 위해 다시마분말 첨가 고체배지를 이용하여 순수배양을 실시하였다. 그 결과 16 해조분해균주를 분리하였으며, 이들 균주를 다시마분말 첨가 액체배지에서 3주간 배양하며, 1주 간격으로 전당과 환원당의 함량을 측정하고, 그 결과로 이들 균주의 다시마 추출율로 계산하여 Table 2에 나타내었다. 순수 분리한 16균주는 모두 대조구에 비해 배양 전 기간에서 높은 추출율을 나타내었다. 배양 1주에 대조구의 0.82%에 비해 논물에서 채취한 미생물군에서 순수 분리한 균주들을 접종한 실험구에서는 1.42~14.00%로, 배양 2주에서는 대조구 1.03에 비해 5.37~15.23%로, 배양 3주에서는 대조구 1.26에 비해 5.90~15.76%로 각각 배양기간이 길어짐에 따라 대조구와 실험구와의 차이는 더욱 크게 나타났다. 실험구들 중에서는 배양 전 기간에서 30A412균주가 높은 추출율을 나타내었는데,

Table 2. Ratios (%) of reducing sugar to total sugar in medium added by sea tangle powder

No. ¹⁾	1 week	2 weeks	3 weeks	No.	1 week	2 weeks	3 weeks
Control	0.8152	1.0284	1.2635	30B121	6.0972	7.4482	7.9853
30A111	2.9966	6.0485	7.0706	30B131	4.6063	6.8847	7.3453
30A121	2.1803	5.5994	7.4831	30B211	4.3676	7.3575	8.1543
30A211	2.5123	5.9909	6.5487	30B221	3.5507	6.2275	7.2862
30A311	1.4201	5.3858	6.5613	30B311	5.7305	5.8041	5.9007
30A411	3.4216	6.0487	6.7811	30B321	6.7838	7.6898	8.2347
30A412	14.0007	15.2281	15.7562	30C111	4.3748	5.6738	6.1897
30A511	2.7603	6.0445	6.7291	30C121	3.5497	5.3774	6.7071
30B111	4.6203	6.0004	6.4837				

¹⁾30 is sample number obtained from the water in a rice field, third alphabet got codes from first pure culture, fourth numbers got codes from second pure culture, fifth numbers got codes from third pure culture, sixth numbers got codes from fourth pure culture.

배양 1주까지 급속히 증가하여 14.00% 나타내었고, 그 이후에서 서서히 증가하여 배양 3주후 15.77%를 나타내었다. 30A412균주를 제외한 나머지 15균주는 3주간의 배양으로도 그 추출율이 10%이하를 나타내었다.

알긴산 분해능

균의 성장율

논물에서 채취한 미생물군 시료에서 순수분리 배양과 분해율의 측정에 의해 선택된 30A412균주에 대하여 sodium alginate가 첨가된 액체배지에서 3주간 배양하며 균의 성장율을 620 nm에서 흡광도를 측정하고 대조구와 비교하여 Fig. 1에 나타내었다. 전배양 기간 동안 대조구에 비해 실험구가 높은 성장률을 보였는데, 30A412균주의 배양 1, 2 및 3주에서의 성장률은 각각 0.075, 0.106 및 0.124로 배양 1주일 후부터 서서히 증가한 것으로 보인다.

알긴산 분해율

Fig. 2에는 논물에서 채취한 미생물군 시료에서 순수분리 배양과 분해율의 측정에 의해 선택된 30A412균주에 대하여 sodium alginate가 첨가된 액체배지에서 3주간 배양하며 전당과 환원당을 측정하고, 분해율로 나타내었다. 30A412균주의 알긴산 분해율은 배양기간이 경과함에 따라 증가하였는데, 특히 배양2주에 1.13%, 배양3주에 1.50%로 급격히 증가하는 경향을 Fig. 2에서 볼 수 있으나 그 값은 아주 적었다. 따라서 30A412균주는 알긴산 배지에서 어느 정도 성장과 분해를 일으키지만 그 정도는 아주 미미한 정도라 생각된다. Yonemoto et al. [31]은 토양에서 알긴산 분해 활성이 강한 균주를 분리하였고, 알긴산 함량이 높은 배지일수록 효소의 생산과 효소 활성은 높았다고 하였다. 일반적으로 알긴산을 분해하는 효소는 알긴산을 분해하여 점도를 저하시키는 경우와 환원당을 생성하는 경우로 크게 두 가지로 대별되는데, 이러한 차이는 효소가 알긴산 구조 중 어느 부위에 작용했는

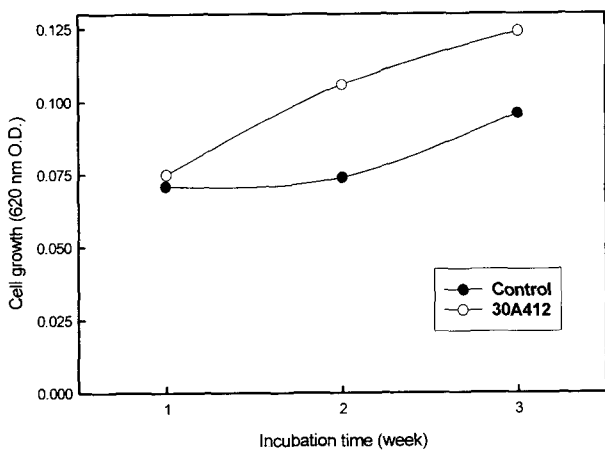


Fig. 1. Cell growth of 30A412 strain in liquid medium added by sodium alginate.

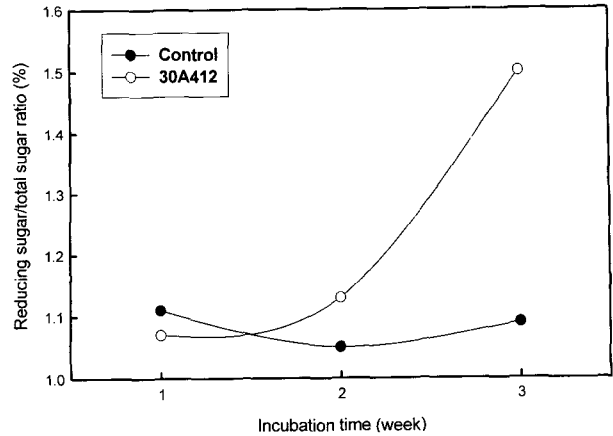


Fig. 2. Ratios of reducing sugar to total sugar of 30A412 strain in liquid medium added by sodium alginate.

나에 따라 달라진다. 일반적으로 mannuronic acid 결합에 작용할 경우 환원당 생성을 증가시키고, guluronic acid 결합에 작용할 경우는 점도를 저하시킨다[3-5,7,17]

다시마 분해능

균의 성장율

다시마는 종류와 용도가 다양하지만 김과 미역의 조직과 비교하여 매우 강인함으로 현재는 삶고, 찌고, 자르는 과정을 거친 후 식용으로 이용하는 경우가 많은데, 이는 다시마는 다른 식용해조에 비해서 복잡성을 가지고 있기 때문이다. 논물에서 채취한 미생물군 시료에서 순수분리 배양과 분해율의 측정에 의해 선택된 30A412균주를 다시마 분말이 첨가된 액체배지에 4주간 배양하면서, 1주 간격으로 균체성장율을 측정하고 Fig. 3에 나타내었다. 전체적으로 알긴산배지에서 보다는 성장율이 높았는데, 대조구의 0.27~0.32의 범위에 비해 30A412균주는 배양 1주에 0.35에서 배양 4주에 0.70으로 비교적 많은 성장을 보였다. 대체로 배양 3주까지 급격히 증가

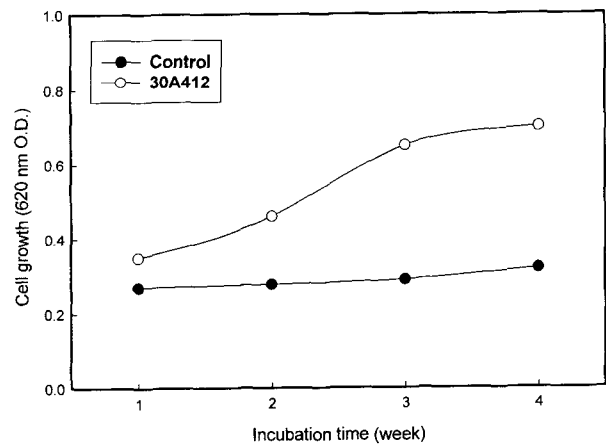


Fig. 3. Cell growth of 30A412 strain in liquid medium added by sea tangle powder.

하고 그 후에는 완만한 증가를 보였다.

다시마 분해율

Fig. 4에는 논물에서 채취한 미생물군 시료에서 순수분리 배양과 분해율의 측정에 의해 선택된 30A412균주에 대하여 다시마 분말이 첨가된 액체배지에서 3주간 배양하며 전당과 환원당을 측정하고, 분해율로 계산하여 나타내었다. 그 경향은 Fig. 3의 성장율과 아주 유사하였는데, 배양 전기간에서 대조구 보다 2.5~3.5배의 높은 분해율을 보였다. 대조구는 2.22~3.11%로 그 증가의 정도가 미미하였으나, 30A412균주 경우는 배양 1주에 이미 5.88%에 이르렀으며, 배양 3주에는 10%를 넘어 10.99%, 그리고 배양 4주에는 13.30%로 계속해서 증가하는 경향을 보였다. 다시마배지에서의 성장율과 분해율은 알긴산배지에서 보다 모두 높은 값을 나타내었는데, 이는 30A412균주가 알긴산 분해능 보다 해조 조체를 구성하는 다른 구조물을 분해시킴으로 해조 내부에 존재하는 당이 쉽게 흘러나온 것으로 생각된다. 한편 Lee et al. [19]은 60℃에서 1시간 추출로 추출율은 평형에 도달하여 고형분 수율은 24.1%, 단백질 수율은 13.8%로 비교적 낮은 수율을 보여 다시마 고형분들은 대부분 불용성임을 알 수 있다.

미역 분해능

균의 성장율

다시마 분말 첨가 액체배지와 같은 방법으로 미역분말을 첨가한 액체배지에 선택된 30A412균주를 접종하고, 4주간 배양하면서 620 nm에서 흡광도를 측정함으로써 균체성장율을 관찰하여 Fig. 5에 나타내었다. 배양기간동안 대조구 0.22~0.28에 비해 30A412균주는 0.52~0.60로 높은 성장률을 보였다. 그림에서 보듯이 30A412균주의 성장은 배양 1주 이내에서의 종결이 되고 그 이후에는 큰 변화를 보이지 않는 것으로 생각된다. 한편 모든 값은 알긴산 배지에 비해서는 높았으나, 다시마 배지에 비해서는 낮은 값을 보였다.

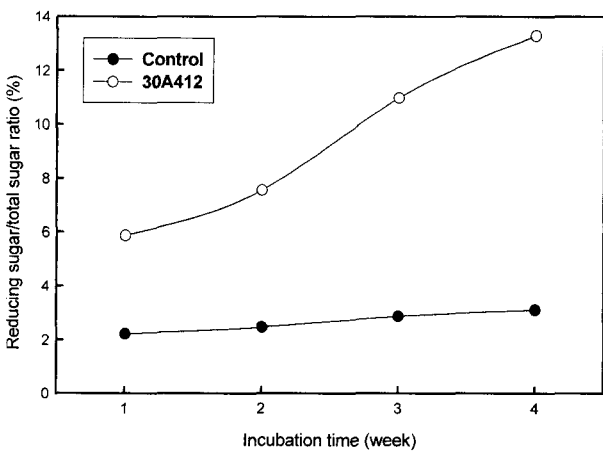


Fig. 4. Ratios of reducing sugar to total sugar of 30A412 strain in liquid medium added by sea tangle powder.

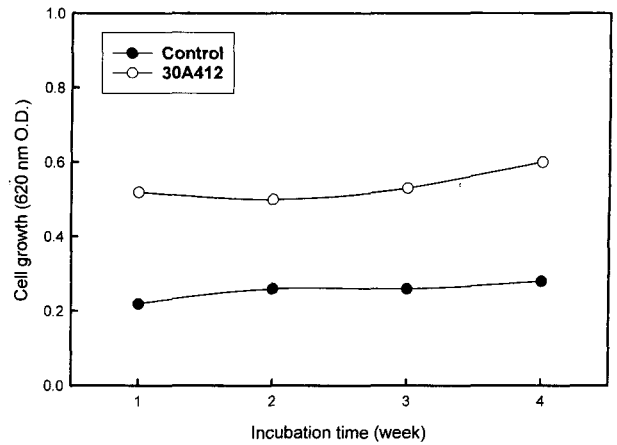


Fig. 5. Cell growths of 30A412 strain in liquid medium added by sea mustard powder.

미역 분해율

논물에서 채취한 미생물군 시료에서 순수분리 배양과 분해율의 측정에 의해 선택된 30A412균주에 대하여 미역 분말이 첨가된 액체배지에서 3주간 배양하며 전당과 환원당을 측정하고, 분해율로 계산하여 Fig. 6에 나타내었다. Fig. 4의 다시마분말 배지에서의 결과 및 미역배지에서의 성장률 결과 (Fig. 5)와 유사한 경향을 나타내었다. 즉, 30A412균주를 접종한 경우가 배양 1주부터 4주까지 전 기간에 걸쳐 대조구에 비해 높은 분해율을 보여 7.00~10.97%를 나타내었다. Cho와 Lee [6]는 해조 다당류의 추출에서 0.3~1.5Mrad의 감마선을 조사하여 6~10%의 수율 증가를 이루었다. 한편 30A412균주의 미역 분해 경향은 배양 2주까지 급격히 분해를 일으켜 분해율 9.00%를 보였으며, 그 이후에는 완만히 증가하는 경향을 나타내었다. 그리고 이들 모든 값은 알긴산 분해율보다는 상당히 높았으며, 다시마 분해율보다는 낮은 값이었다.

이상에서 살펴본 논물에서 채취한 미생물군 시료에서 순수분리 배양과 분해율의 측정에 의해 선택된 30A412균주의

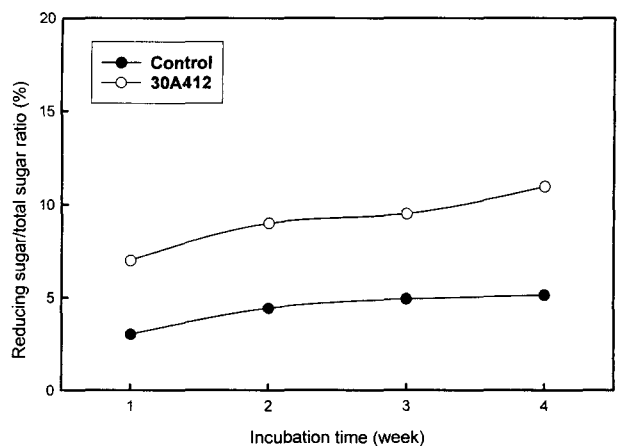


Fig. 6. Ratios of reducing sugar to total sugar of 30A412 strain in liquid medium added by sea mustard powder.

분해능을 검토한 결과 알긴산, 다시마 및 미역 분말을 첨가한 액체배지에서 균체성장율과 분해율이 높은 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 균주에 해조의 다당 또는 다른 성분을 가수분해시키는 효소가 존재 할 것으로 추측된다.

요 약

해조 또는 해조성분을 가수분해시키는 효소를 생산하는 미생물이 존재할 것으로 추정되는 논물에서 채취한 미생물 균 시료에서 다시마분말 첨가 고체배지를 이용하여 순수배양을 실시하여 16균주를 분리하였으며, 이들 균주를 다시마 분말 첨가 액체배지에서 3주간 배양하며, 1주 간격으로 전당과 환원당의 함량을 측정하여 추출율을 비교한 결과 배양 전 기간에서 30A412균주가 높은 추출율을 나타내었다. 30A412균주를 제외한 나머지 15균주는 3주간의 배양으로도 그 추출율이 10%이하를 나타내었다. 30A412균주의 알긴산, 미역 및 다시마 분말 첨가 배지에서의 성장율은 배양 1주일 후부터 서서히 증가하였으며, 대조구보다 높은 성장율을 보였다. 알긴산, 다시마 및 미역 분해율은 배양기간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 보였다. 균체 성장율과 분해율 모두 다시마 배지에서 가장 높은 값을 나타내었으며, 다음으로 미역배지, 알긴산 배지의 순이었다.

참 고 문 헌

- Ando Y. and K. Inoue. 1961. Decomposition of alginic acid by microorganisms-IV. On the *Vibrio*-type bacteria, newly isolated from the decaying *Laminaria*. *Bull. of Jap. Soc. Sci. Fish.* **27**, 339-341.
- Ando Y. and K. Inoue. 1961. Decomposition of alginic acid by microorganisms-V. On the alginase of *Vibrio* sp. SO-20 strain. *Bull. of Jap. Soc. Sci. Fish.* **27**, 342-347.
- Ando Y. and K. Inoue. 1965. Decomposition of alginic acid by microorganisms-V. On the modes of action of two alginases. *Bull. of Jap. Soc. Sci. Fish.* **31**, 552-557.
- Boyd J. and J. R. Turvey. 1977. Isolation of a poly- α -L-gulonate lyase from *Klebsiella aerogenes*. *Carbohydrate Research* **57**, 163-171.
- Boyd J. and J. R. Turvey. 1978. Structural studies of alginic acid, using a bacterial poly- α -L-gulonate lyase. *Carbohydrate Research* **66**, 187-194.
- 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.
- Davidson I. W., I. W. Sutherland and C. J. Lawson. 1976. Purification and properties of an alginase from a marine bacterium. *Biochem. J.* **159**, 707-713.
- Eller J. and W. J. Payne. 1960. Studies on bacterial utilization of uronic acid. IV. Alginolytic and mannuronic acid oxidizing isolates. *J. of Bacteriology* **80**, 193-199.
- Elyakova L. A. and V. V. Favorov. 1974. Isolation and certain properties of alginase VI from the Mollusk *Littorina* sp. *Biochimica et Biophysica Acta.* **358**, 341-354.
- Eppley R. W. and R. Lasker. 1959. Alginase in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science* **129**, 214-215.
- Groleau D. and W. Yaphe. 1977. Enzymatic hydrolysis of agar; purification and characterization of β -neoagarotetraose hydrolase from *Pseudomonas atlantica*. *Can. J. Microbiol.* **23**, 672-679.
- Kaneko Y., Y. Yonemoto, K. Okayama, A. Kimura and K. Murata. 1990. Symbiotic formation of alginase in mixed culture of bacteria isolated from soil. *J. Fer. and Bioen.* **69**, 192-194.
- Kaneko, Y., Y. Yonemoto, K. Okayama, A. Kimura and K. Murata. 1990b. Bacterial alginase properties of the enzyme formed in a mixed culture bacteria isolated from soil. *J. of Fermentation & Bioengineering* **70**, 147-149.
- Kashiwabara Y., S. Hiroshi and K. Nisizawa. 1969. Alginase lyases of *Pseudomonas* sp. *J. Biochem.* **66**, 503-512.
- Kim H. S. and T. J. Bae. 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 sea mustard (*Undaria pinnatifida*). *J. Korean Fish. Soc.* **35**, 438-444.
- Kim H. S. and T. J. Bae. 2002. Studies on the hydrolysis of seaweed using microorganisms and its application, II. Screening of microfloras involved in hydrolysis of seaweed *tenella*, seaweed *fusiforme* and green laver. *Korean J. Food & Nutr.* **15**, 257-266.
- Kitamikado, M., C. H. Tseng, T. Aoki, K. Yamaguchi and T. Araki. 1989. Isolation of bacteria capable of producing alginase-degrading enzyme from natural environment. *Nippon Suisan Gakkaishi* **55**, 709-713.
- Lea I. K. and J. W. Kang. 1986. A check list of marine algae in Korea. *Korean J. Phycol.* **1**, 311-325.
- Lee, J. K. H. S. Choi, S. K. Yoon and W. J. Kim. 1993. Effect of extraction temperature on some quality of sea tangle extract. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **22**, 771-776.
- Min K. H., S. F. Sasaki, Y. Kashiwabara and K. Nisizawa. 1977. Substrate specificity of endo-polyguluronide lyases from *Pseudomonas* sp. on the basis of their kinetic properties. *J. of Biochemistry* **81**, 547-554.
- Min K. H., S. F. Sasaki, Y. Kashiwabara, M. Umekawa and K. Nisizawa. 1977. Multiple components of endo-polyguluronide lyase of *Pseudomonas* sp. *J. of Biochemistry* **81**, 539-546.
- Min K. H., S. F. Sasaki, Y. Kashiwabara, M. Umekawa and K. Nisizawa. 1977. Fine structure of SMG alginase fragment in the light of its degradation by alginase lyases. *J. of Biochemistry* **81**, 555-562.
- Muramatsu T., S. Hirose and M. Katayose. 1977. Isolation and properties of alginase from the mid-gut gland of wreath shell *Turbo cornutus*. *Agric. Biol. Chem.* **41**, 1939-1946.
- Nakada H. I. and P. C. Sweeny. 1967. Alginic acid degradation by eliminases from abalone hepatopancreas. *J. of Bio. Chem.* **242**, 845-851.

25. Nisizawa K., S. Fujibayashi and Y. Kashiwabara. 1968. Alginate lyases in the hepatopancreas of a marine mollusc, *Dolabella auricula* Solander. *J. of Biochemistry* **64**, 25-37.
26. Tseng C. H., K. Yamaguchi and M. Kitamikado. 1992. Isolation and some properties of alginate lyase from a marine bacterium *Vibrio* sp. AL-128. *Nippon Suisan Gakkaishi* **58**, 533-538.
27. Tseng C. H., K. Yamaguchi and M. Kitamikado. 1992. Two types of alginate lyase from a marine bacterium *Vibrio* sp. AL-9. *Nippon Suisan Gakkaishi* **58**, 743-749.
28. Tsujino, I. and T. Saito. 1961. A new unsaturated uronide isolated from alginase hydrolysate. *Nature* **192**, 970-971.
29. Tsujino, I. and T. Saito. 1962. Studies on alginase. Part II. A new unsaturated uronide isolated from alginase hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.* **26**, 115-118.
30. Waksman, S. A. and M. C. Allen. 1934. Decomposition of polyuronides by fungi and bacteria. *J. Bacteriol.* **28**, 213-220.
31. Yonemoto, Y., K. Murata, A. Kimura, H. Yamaguchi and K. Okayama. 1991. Bacterial alginate lyase; characterization of alginate lyase-producing bacteria and purification of the enzyme. *J. of Ferm. & Bioengineering* **72**, 152-157.
32. Yoshikawa M. 1954. On the Alginic Acid Hydrolyzing-Enzyme of *Pseudomonas alginoliquefaciens* I. *Kobe University.* **1**, 53-56.
33. Yoshikawa M. 1955. Studies on the Mechanism of Alginase Production by Bacteria (I). *Kobe University.* **2**, 8-10.
34. Yoshikawa, M. and K. Watanabe. 1956. Studies on the Mechanism of Alginase Production by Bacteria (Part II). *Kobe University.* **2**, 118-120.