

## Vibrio sp. AL-145가 생산하는 균체의 효소의 정제 ( I )

주동식 · 이응호<sup>†</sup>

부산수산대학교 식품공학과

### Purification of Extracellular Enzyme Produced by *Vibrio* sp. AL-145

Dong-Sik Joo and Eung-Ho Lee<sup>†</sup>

Dept. of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

#### Abstract

The alginate degrading bacteria have been screened from the marine environment. Sodium alginate and NaCl were required for cell growth and enzyme production of 145-C strain and the adequate concentrations were 0.7 and 2.5%, respectively. The effective nitrogen source was peptone and adequate temperature was  $28 \pm 2^\circ \text{C}$ . The 145-C strain was identified as *Vibrio* sp. from biochemical and biological experiment. The extracellular enzyme produced by *Vibrio* sp. was purified and the molecular weight was estimated to be 27,000.

**Key words** : alginate, carbon source, nitrogen source, extracellular enzyme

#### 서 론

알긴산 (alginic acid)은 갈조류의 세포벽 구성다당류로 D-mannuronic acid 와 L-guluronic acid가  $\beta$ -1,4 결합으로 이루어진 hetero형 다당류로 갈조류의 종류, 부위, 크기 등에 따라 다양한 구성비를 가진다<sup>1-6)</sup>.

한편, 다당류인 알긴산의 구조해석 또는 조성분석을 위해 알긴산을 특정한 효소로 분해하여 그 산물을 측정하는 방법을 이용할 수 있다<sup>9,10)</sup>. 이 알긴산 분해 효소는 전복, 성게 및 고등과 같은 해산 연체동물 또는 극피동물이나<sup>11-16)</sup>, *Pseudomonas alginoliquefaciens*<sup>17,18)</sup>, *Aerobacter aerogenes*<sup>19)</sup>, *Alginomonas alginica*<sup>20)</sup>, *Alginovibrio aquatilis*<sup>21)</sup>, *Pseudomonas maltophilia*, *Pseudomonas putida*<sup>22,23)</sup>, *Alteromonas* sp.<sup>24)</sup> 등과 같은 미생물에 의해서도 생산된다고 보고되어 있다.

최근에는 올리고당에 대한 관심이 높아지면서<sup>25)</sup>, 해조 다당류도 올리고당 제조원으로 주목을 받고 있다. 본 연구는 알긴산을 적절한 효소로 분해하여 올리고당을 제조하는데 목적을 두고 자연으로부터 알긴산을 강하게 분해하는 미생물을 검색하여 이 균주가 분비하는 균체의 효소 (alginase)를 정제하여 그 결과를 보고하고

자 한다.

#### 재료 및 방법

##### 사용 균주

균주는 본 연구실에서 미역으로부터 분리하여 알긴산 분해능 (점도저하율과 환원당 생성)을 측정하여 분해능이 강력하다고 판단되었던 *Vibrio* sp. AL-145를 실험 균주로 하였다.

##### 조효소액의 제조

효소최적 생성 조건을 결정하기 위해 Na-alginate 0.5%, peptone 0.5%, NaCl 3%를 기본 배지로 하고<sup>26)</sup>, 탄소원은 Na-alginate 대신 0.5%의 starch, CMC, glucose 등을, 질소원은 peptone 대신 0.5% yeast extract, malt extract 등(단, casamino acid는 1.0%)을 첨가하여 생산된 조효소액의 활성을 측정하여 최적 탄소원 및 질소원을 결정하였다. 결정된 탄소원 및 질소원은 농도를 달리하여 최종 최적 농도를 결정하였고, 같은 방법으로 최적 NaCl농도와 배양온도를 결정하였다. 조효소액 제조는 실험으로부터 결정된 최적 배양 조건 즉, sodium alginate 0.7%, peptone 0.7%, NaCl 2.5%,

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

pH 7.5에 균주를 접종하고 28±2°C에서 약 60시간 정지배양하였다. 이 배양액을 원심분리 (12,000×g, 30-min)하여 얻어진 상층액을 조효소액으로 하였다.

단백질 농도 측정

효소 정제 과정중의 단백질 희분의 검색은 분광광도계(UV/V-spectrophotometer, Shimadzu UV-140-02)로써 280nm에서 흡광도를 측정하였고, 단백질 농도는 Lowry 등<sup>27)</sup>의 비색법에 의해 bovine serum albumin (Sigma Co., USA)을 표준단백질로하여 구한 검량 곡선으로부터 구하였다.

Cell culture (27° C, 60hr)

- Centrifuge (12,000 × g, 30min, 5° C)
- Cell pellet : intracellular enzyme test

Supernatant

- Filtration with 0.45µm membrane filter
- Fractionate with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 55~85% saturation range
- Centrifuge (12,000 × g, 30min, 5° C)

Precipitate

- Resuspend in 30mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)
- Dialysis for 12hr against 30mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)
- Centrifuge (12,000 × g, 30min, 5° C)

Supernatant

- Apply the supernatant to a Sephadex G-25 column (φ2.6 × 100cm) equilibrated with the 30mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)
- Elute the column using 30mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)
- Pool the Na-alginate positive fraction
- Concentrate with ultrafilter (PM 10 : M.W. 10,000)
- Apply the concentrate to a Sephadex G-100 column(φ2.6 × 100cm) equilibrated with the above buffer
- Elute the column with the same buffer
- Pool the Na-alginate positive fraction
- Concentration with ultrafilter
- Apply the concentrate to a DEAE-Cellulose column (φ3.0 × 30cm) by a gradient elution (0~1.0M) in 30mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)
- Pool the Na-alginate positive fraction
- Concentration with ultrafilter
- Apply the concentrate to a Sephadex G-100 column (φ2.6 × 100cm) equilibrated with the 30mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)
- Elute the column with the same buffer
- Pool the Na-alginate positive fraction
- Apply the concentrate to Q-Sepharose column (φ1.5 × 25 cm) by a gradient elution (0~1.0M) in 30mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)

Purified enzyme

효소 활성 측정

기질로써 0.4% 또는 0.8% Na-alginate (50mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 0.3M NaCl)를 사용하였고, 반응은 기질액 4ml와 효소액 1ml를 37° C에서 50분간 반응시킨 후 Somogyi-Nelson법<sup>28)</sup>에 의해 흡광도를 측정하여 표준당 (mannuronic acid)으로 작성한 표준 검량선으로부터 환원당을 측정하였다. 효소 1unit (단위)는 1분간에 1µ-mole의 환원당을 생산하는 효소량으로 하였다.

효소 정제

균체 배양액을 원심분리하여 얻어진 조효소액을 이용하여 Fig. 1과 같은 과정을 거쳐 정제하였다.

분자량 측정

순도검정을 위한 분석은 Davis<sup>29)</sup>의 Disc-PAGE (7.5% polyacrylamide gel electrophoresis)에 의하였으며, 분자량 측정은 Laemmli의 방법<sup>30)</sup>에 따라 SDS-분자량 표준단백질에 대하여 10% SDS-PAGE를 행한 후 SDS-분자량 표준단백질의 전기영동 이동도를 대조로 하여 SDS화 한 효소의 전기영동 이동도를 비교하여 효소의 구성 subunit의 분자량을 측정하였다.

결과 및 고찰

알긴산 분해효소 (alginate)생산 균주의 동정

부산 소재의 송정 미역양식장 주변에서 자연산 미역을 시료로 하여 알긴산 분해균 분리배지<sup>31)</sup>를 이용하여

Table 1. Characteristics of 145-C strain isolated from seam-ustard

Properties		Properties	
Gram staining	-	Tetrathioeductase	+
Shape	rod	Colistin	+
Motility	+	Utilization of sugars	
Catalase	+	Arabinose	-
Oxidase	+	Cellobiose	-
Urease	-	Galactose	+
Indole formation	+	Glucose	+
V-P test	-	Maltose	+
Citrate utility	+	Mannitol	+
Methyl red test	-	Mannose	+
0% NaCl growth	-	Melibiose	-
Lysine utility	-	Raffinose	-
Esculin hydrolysis	+	Rhamnose	-
TCBS	+	Sucrose	+
Palatinose	+	Xylose	+
MacConkey agar growth	+		

Fig. 1. Procedure for purifying the extracellular enzyme.

균주를 분리하고, 동정을 행한 결과 (Table 1), *Vibrio* sp.로 동정되었다.

탄소원, 질소원, NaCl 농도 및 배양온도에 따른 알긴산 분해효소의 생산

*Vibrio* sp. AL-145의 효소 생성을 Na-alginate, bacto-peptone을 기본 배지로하여 배지조성 및 배양조건을 변화시켜 측정한 결과 Table 2에서 보논바와 같이 탄소원 (0.5% 농도)은 alginate 외의 다당류나 이당류가 첨가 될 경우는 효소 활성이 거의 나타나지 않았으며, 질소원

**Table 2. Effect of carbon and nitrogen sources on the activity of extracellular enzyme (alginase)\***

Carbon source**	Relative activity(%)
Na-Alginate	100.0
CMC**	5.0
Starch	2.2
Glucose	1.3
Fructose	1.3
Maltose	2.8
Sucrose	3.7
Nitrogen source**	Relative activity(%)
Peptone	100.0
Yeast extract	36.3
Casamino acid***	52.2
Malt extract	-
Urea	-
NH <sub>4</sub> Cl	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-

\*The basal medium contained 0.5% Na-alginate, 0.5% peptone and 3.0% NaCl. 0.5% of different carbon or nitrogen sources were used to determine the optimal sources.

\*\*Carboxymethyl cellulose

\*\*\*1.0% was used instead of 0.5%

은 peptone이 가장 높은 활성을 나타내었고, casamino acid와 yeast extract의 경우 peptone에 대해 각각 52%와 36%정도의 활성을 나타내었고, 무기질소원 등에 의해서는 효소의 활성이 거의 나타나지 않았다. 이는 Yonemoto 등<sup>30</sup>이 alginate의 영향에 대한 내용과는 일치하지 만, 질소원의 경우는 다소 차이가 있었다. 그리고 Na-alginate 및 peptone의 첨가 농도를 달리하여 활성을 측정한 결과 모두 0.7%농도가 최적 조건이었다<sup>26</sup>.

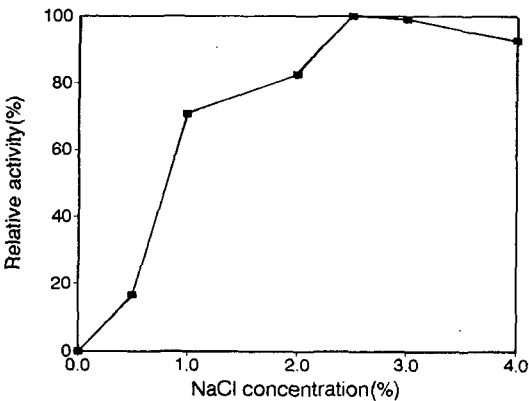
균주가 미역으로부터 분리되어 NaCl의 영향이 있을 것으로 판단되어 NaCl농도를 4.0%까지 변화시키면서 활성을 측정한 결과 (Fig. 2) 2.5% 농도에서 최대 활성을 보였으며, NaCl이 첨가되지 않을 경우 전혀 균체가 성장하지 않았다. 安藤과 井上<sup>30</sup>이 분리한 *Vibrio* sp. SO-20의 경우 NaCl 1.0%에서 최대 성장 및 분해활성을 나타내었다고 보고하였다.

일반적으로 해양세균은 20°C 부근에서 잘 성장하는 것으로 알려져 있는데, 분리한 균주는 25~30°C에서 균체성장 및 분해활성이 가장 높은 것으로 나타났다 (Fig. 3). 吉川<sup>30</sup>이 분리한 균도 23~30°C의 범위에서 분해활성이 높았다고 하였다. 한편, pH 및 배양 시간을 달리하면서 활성을 측정한 결과, pH는 7.5, 배양시간은 60시간 일때 가장 높은 활성을 보였다<sup>26</sup>.

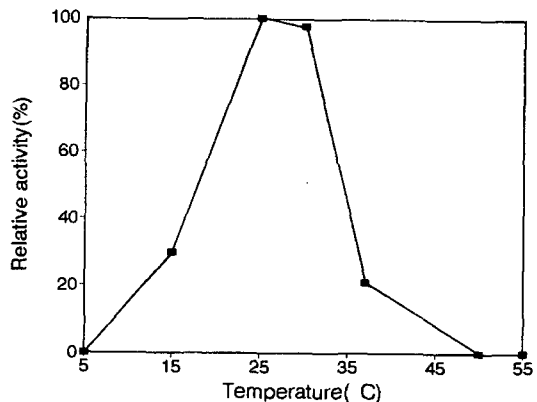
효소의 정제

염석

균 배양액을 원심분리(12,000×g, 30min)하여 얻은 조효소액을 55%~85% 포화암모늄으로 효소를 침전시켜 원심분리하여 완충액 (30mM Tris-HCl buffer, pH 7.0)녹여 동일 완충액에서 12시간 투석을 행한 후 다시 원심분리하고 농축하여 효소 단백질 농도 및 활성을 측



**Fig. 2. Effect of NaCl concentration on the extracellular enzyme activity.** Base medium and growth condition ; Na-alginate 0.7%, peptone 0.7%, pH 7.5, temperature 28±2°C, incubation time 48hr.



**Fig. 3. Effect of incubation temperature on the extracellular enzyme activity.** Base medium and growth condition ; Na-alginate 0.7%, peptone 0.7%, NaCl 3.0%, pH 7.5, incubation time 48hr.

정한 결과 조효소에 대해 정제도는 2.6배, 수율은 28.4%, 비활성도 0.57unit/mg으로 효소를 정제하였다.

Sephadex G-100 gel filtration

염석, 투석 후에 잔존할 peptide나 염을 제거할 목적으로 Sephadex G-25로 겔 여과한 후, 다시 Sephadex G-100으로 겔 여과를 행하였다(Fig. 4). 활성획분을 모아 농축한 후 활성을 측정한 결과 조효소에 대해 정제도는 10.8배, 수율은 9.4%, 비활성도는 2.38unit/mg으로 정제되었다.

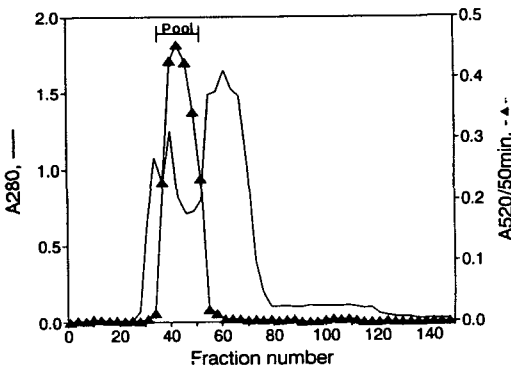


Fig. 4. Sephadex G-100 chromatogram ( $\phi 2.6 \times 100\text{cm}$ ) of the Na-alginate positive fraction obtained by the sephadex G-25 chromatography for purifying the extracellular enzyme.

The enzymes were eluted with 30mM Tris-HCl buffer, pH 7.0. The flow rate and fraction volume were 40ml/hr and 5ml, respectively.

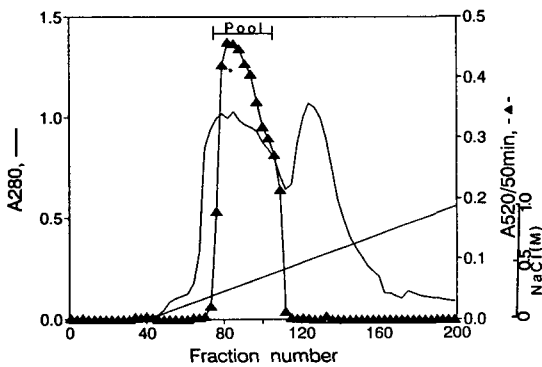


Fig. 5. DEAE-Cellulose chromatogram ( $\phi 3.0 \times 30\text{cm}$ ) of the Na-alginate positive fraction obtained by the Sephadex G-100 chromatography for purifying the extracellular enzyme.

The enzymes were eluted with a gradient of 0~1.0M NaCl in 30mM Tris-HCl buffer, pH 7.0. The flow rate and fraction volume were 30ml/hr and 4ml, respectively.

DEAE-Cellulose 및 Q-Sepharose chromatography

겔 여과한 후 농축한 단백질을 DEAE-Cellulose chromatography(30mM Tris-HCl buffer, pH 7.0, 0~1.0M NaCl gradient) (Fig. 5)한 결과 정제도는 24.0배, 수율은 8.2%, 비활성도는 5.28unit/mg으로 정제가 상당히 되었을 것으로 판단되어 전기영동하여 본 결과 5개의 band가 확인되어 Sephadex G-100으로 재크로마토그래피를 한후 Q-Sepharose chromatography(30mM Tris-HCl buffer, pH 7.0, 0~1.0M NaCl gradient)를 행하였다 (Fig. 6). 그 결과 정제도는 53.7배, 수율은 2.1%, 비활성도는 11.81unit/mg였고, 전기영동으로 band를 확인한 결과 (Fig. 7) 단일 band가 확인되어 이 효소를 정제 효소로 하였다.

한편, Tseng 등<sup>35,36)</sup>은 분리한 *Vibrio* sp.가 생산하는 alginate lyase의 정제를 위해 주로 Sepharose CL-4B 또는 Sepharose CL-6B 계열의 여러 수지를 사용하였는데, 본 효소의 정제과정과는 차이를 보였다.

이상의 정제과정의 정제도, 수율, 비활성도를 측정한 결과를 Table 3에 나타내었다.

효소의 분자량

정제과정을 거쳐 얻어진 균체의 효소를 SDS-전기영동한 결과 단일 band로 나타나 subunit를 갖지 않는 단량체인 것으로 생각되었으나, 동일한 subunit로 구성되어 있는 homopolymer일 가능성에 대해서는 좀 더 실험과 고찰을 행하여야 될 것으로 생각되었다. SDS-전기영동 분석에서 표준단백질과 대조하여 분자량을

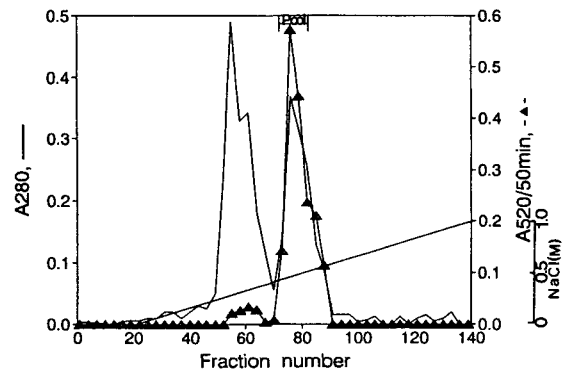


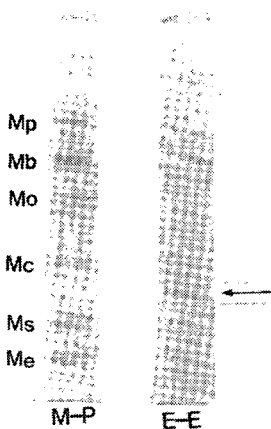
Fig. 6. Q-Sepharose chromatogram ( $\phi 1.5 \times 25\text{cm}$ ) of the Na-alginate positive fraction obtained by the Sephadex G-100 chromatography for purifying the extracellular enzyme.

The enzymes were eluted with a gradient of 0~1.0M NaCl in 30mM Tris-HCl buffer, pH 7.5. The flow rate and fraction volume were 30ml/hr and 4ml, respectively.

**Table 3. Purification of the extracellular enzyme(alginase) produced by *Vibrio* sp. AL-145**

Fraction	Protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity*	Yield (%)	Purification (fold)
Crude enzyme	5,400	1,202.1	0.22	100	1.0
Ammonium sulfate fraction (55~85%)	599.5	341.8	0.57	28.4	2.6
Sephadex G-25 chromatography	179.5	118.8	0.66	9.9	3.0
Sephadex G-100 chromatography	47.3	112.6	2.38	9.4	10.8
DEAE-cellulose chromatography	18.6	98.1	5.28	8.2	24.0
Sephadex G-100 rechromatography	7.7	65.2	8.47	5.4	38.5
Q-Sepharose chromatography	2.1	24.8	11.81	2.1	53.7

\* Total unit/mg-protein

**Fig. 7. SDS-Polyacrylamide gel electrophoretogram of the purified extracellular enzyme.**

M-P ; molecular weight marker proteins

E-E ; extracellular enzyme

Mp ; rabbit muscle phosphorylase b, 97,400 Da

Mb ; bovine serum albumin, 66,200 Da

Mo ; ovalbumin, 45,000 Da

Mc ; bovine carbonic anhydrase, 31,000 Da

Ms ; soybean trypsin inhibitor, 21,500 Da

Me ; lysozyme, 14,400 Da

측정한 결과, 약 27,000 정도의 분자량을 갖는 효소인 것으로 판단되었다. Tseng 등<sup>37)</sup>이 분리한 *Vibrio* sp. AL-9 가 생산하는 alginate lyase는 분자량이 약 25,000인 단량체로 확인한 바 있다.

## 요 약

알긴산 분해능이 강한 균주를 자연산 미역으로부터 분리하여 동정한 결과 *Vibrio* sp.로 밝혀졌고, 이 균은 탄소원으로 alginate, 질소원으로 peptone, NaCl 농도 2.5%, 28±2°C에서 최대의 효소활성을 보였다. 겔 여과 및 이온크로마토그래피 방법으로 정제하여 정제도가 53.7배, 비활성이 11.84U/mg의 정제효소를 얻었

다. 이 정제효소를 SDS-전기영동하여 분자량을 측정 한 결과 약 27,000 정도로 추정되었다.

## 감사의 글

본 연구는 1991년 한국과학재단 연구비 지원(과제 번호 ; 91-07-00-14)으로 수행된 연구결과의 일부이며, 이를 깊이 감사드립니다.

## 문 헌

1. Fisher, F. G. and Dorfel, H. : The polyuronic acids of brown algae. Part I. *Z. Physiol. Chem.*, **302**, 186 (1955)
2. Hirst, E. L., Percival, E. and Wold, J. K. : The structure of alginic acid. Part IV. Partial hydrolysis of the reduced polysaccharide. *J. Chem. Society*, **8**, 1493(1964)
3. Hirst, E. L. and Rees, D. A. : The structure of alginic acid. Part V. Isolation and unambiguous characterization of some hydrolysis products of the methylated polysaccharide. *J. Chem. Society*, **7**, 1182 (1965)
4. Haug, A., Larsen, B. and Smidsrød, O. : A study of constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis. *Acta Chemica Scandinavica*, **20**, 183(1966)
5. Haug, A., Larsen, B. and Smidsrød, O. : Studies on the sequence of uronic acid residues in alginic acid. *Acta Chemica Scandinavica*, **21**, 691 (1967)
6. Haug, A., Larsen, B. and Smidsrød, O. : Uronic acid sequence in alginate from different sources. *Carbohydrate Research*, **32**, 217 (1974)
7. Penman, A. and Sanderson, G. R. : A method for the determination of uronic acid sequence in alginates. *Carbohydrate Research*, **25**, 273 (1972)
8. 金東洙, 朴榮浩 : 알긴산의 化學的 組成 및 그 物性에 關한 研究. (1) 감태 알긴산의 우론산 組成. *韓國水產學會誌*, **17**(5), 391 (1984)
9. 吉川三吉 : アルギン酸の酵素に的分解でえられるオリゴウロナイドについて(I). *生化學*, **33**(11), 794 (1961)
10. Boyd, J. and Turvey, J. R. : Structural studies of alginic

- acid, using a bacterial poly- $\alpha$ -L-gulonate lyase. *Carbohydrate Research*, **66**, 187 (1978)
11. Anzai, H., Asada, H., Koshiba, A., Yoshida, S., Kobayashi, H., Uchida, N. and Nishide, E. : Distribution of polysaccharide digestive enzymes in a marine gastropod *Dolabella auricularia*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57** (11), 2077 (1991)
  12. Onishi, T., Suzuki, M. and Kikuchi, R. : The distribution of polysaccharide hydrolase activity in gastropods and bivalves. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **51** (2), 301 (1985)
  13. Suzuki, M., Kikuchi, R. and Ohnishi, T. : The polysaccharide degradation activity in digestive tract of sea urchin *Strongylocentrotus mudus*. *Bull. Jap. Sci. Fish.*, **50** (7), 1255 (1984)
  14. Muramatsu, T., Hirose, S. and Katayose, M. : Isolation and properties of alginate lyase from the mid-gut gland of wreath shell *Turbo cornutus*. *Agric. Biol. Chem.*, **41** (10), 1939 (1977)
  15. Nisizawa, K., Fujibayashi, S. and Kashiwabara, Y. : Alginate lyases in the hepatopancreas of a marine mollusc, *Dolabella auricula* Solander. *J. Biochemistry*, **64** (1), 25 (1968)
  16. Eppley, R. W. and Lasker, R. : Alginate in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science*, **129**, 214 (1959)
  17. Yoshikawa, M. : Two kinds of enzymes, capable of hydrolyzing alginic acid, produced by bacteria. *Sc. Rep. of Hyogo Univ. of Agr.*, **1**(2), 50 (1954)
  18. 吉川三吉 : *Pseudomonas alginolyticus* [의 알기닌산분해효소]에 대하여. 兵庫農科大學研究報告, **1** (2), 53 (1954)
  19. 井上勝弘, 安藤芳明 : 微生物による알기닌산의 분해(第1報). *Aerobacter aerogenes*型 Y-11 菌による알기닌산분해와 알기닌산의適應的生成. 日本農藝化學會誌, **30** (11), 742 (1955)
  20. Eller, J. and Payne, W. J. : Studies on bacterial utilization of uronic acid. IV. Alginolytic and mannuronic acid oxidizing isolates. *J. Bacteriology*, **80**, 193 (1960)
  21. Stevens, R. A. and Levin, R. E. : Purification and characterization of an alginate from *Alginovibrio aquatilis*. *Appl. Environ. Micro.*, **30** (5), 1156 (1977)
  22. Riesen, V. L. : Digestion of algin by *Pseudomonas maltophilia* and *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Micro.*, **39** (1), 92 (1980)
  23. Hansen, J. B., Doubet, R. S. and Ram, J. : Alginate enzyme production by *Bacillus circulans*. *Appl. Environ. Micro.*, **47**, 704 (1984)
  24. Sawabe, T., Ezura, Y. and Kimura, T. : Purification and characterization of an alginate lyase from marine *Altermonas* sp. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58** (3), 521 (1992)
  25. 富田勇男, 横田 篤 : 微生物による天然多糖からの有用オリゴ糖の生産. 化學と生物, **30**(3), 170 (1992)
  26. 朱동식 : *Vibrio* sp. AL-145가 생산하는 Alginase의 특성 및 그 이용. 부산수산대학교 대학원 박사학위논문 (1993)
  27. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
  28. 日本食品工業學會 : 食品分析法. 光琳, p.170 (1984)
  29. Davis, B. J. : Disc-electrophoresis II. Method and application to human serum protein. *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964)
  30. Laemmli, U. K. : Cleavage of structure proteins during the assembly of the Bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680 (1970)
  31. 門田元, 多賀信夫 : 海洋微生物研究法. 學會出版センター, p.69 (1985)
  32. Yonemoto, Y., Murata, K., Kimura, A., Yamaguchi, H. and Okayama, K. : Bacterial alginate lyase ; characterization of alginate lyase-producing bacteria and purification of the enzyme. *J. Fermentation Bioengineering*, **72** (33), 1552 (1991)
  33. 安藤芳明, 井上勝弘 : 微生物による알기닌산의 분해-V. *Vibrio* sp. SO-20 のアギナーゼについて. 日本水産學會誌, **27** (4), 342 (1961)
  34. 吉川三吉 : 細菌알기닌산분해효소(alginase)의生産條件について(その一). 兵庫農科大學研究報告, **2** (1), 8 (1955)
  35. Tseng, C. H., Yamaguchi, K. and Kitamikado, M. : Isolation and some properties of alginate lyase from a marine bacterium *Vibrio* sp. AL-128. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58** (3), 533 (1992)
  36. Tseng, C. H., Yamaguchi, K., Nishimura, M. and Kitamikado, M. : Alginate lyase from *Vibrio alginolyticus* ATCC 17749. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58** (11), 2063 (1992)
  37. Tseng, C. H., Yamaguchi, K. and Kitamikado, M. : Two types of alginate lyase from a marine bacterium *Vibrio* sp. AL-9. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58** (4), 743 (1992)

(1993년 2월 27일 접수)