

Vibrio crassostreae PKA 1002의 알긴산 분해 조효소 생산 최적 조건과 조효소의 특성

선우찬¹ · 김꽃봉우리¹ · 김동현¹ · 정슬아¹ · 김현지¹ · 정다현¹ ·
정희예¹ · 임성미² · 홍용기³ · 안동현^{1*}

¹부경대학교 식품공학과/식품연구소, ²동명대학교 식품공학과, ³부경대학교 생물공학과

Received : July 2, 2012 / Revised : August 22, 2012 / Accepted : August 28, 2012

Optimization of Conditions for the Production of Alginate-degrading Crude Enzyme from *Vibrio crassostreae* PKA 1002. Sunwoo, Chan¹, Koth-Bong-Woo-Ri Kim¹, Dong-Hyun Kim¹, Seul-A Jung¹, Hyun-Jee Kim¹, Da-Hyun Jeong¹, Hee-Ye Jung¹, Sung-Mee Lim², Yong-Ki Hong³, and Dong-Hyun Ahn^{1*}. ¹Department of Food Science & Technology/Institute, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea, ²Department of Food Science & Technology Tongmyong University, Busan 608-735, Korea, ³Department of Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea – This study was conducted to screen an alginate-degrading microorganism and to investigate the characteristics of the alginate-degrading activity of its crude enzyme. A marine bacterium which produces extracellular alginate-degrading enzymes was isolated from the brown alga *Sargassum thunbergii*. 16S rRNA sequence analysis and physiological profiling resulted in the bacterium's identification as a *Vibrio crassostreae* strain, named *Vibrio crassostreae* PKA 1002. Its optimal culture conditions for growth were pH 9, 2% NaCl, 30°C and a 24 hr incubation time. The optimal conditions for the alginate degrading ability of the crude enzyme produced by *V. crassostreae* PKA 1002 were pH 9, 30°C, a 48 hr incubation time and 8% alginic acid. The alginate degrading crude enzyme produced 3.035 g of reducing sugar per liter in 4% (w/v) alginate over 1 hr.

Keywords: Alginate-degrading crude enzyme, *Vibrio crassostreae* PKA 1002.

서 론

해조 다당인 알긴산은 미역, 다시마 및 모자반과 같은 갈조류에 약 15-35% 함유되어 있는 산성 점질 다당류로 갈조류의 세포벽 구성 물질이다[1]. 알긴산은 2종류의 uronic acid 인 D-mannuronic acid(M)와 L-guluronic acid(G)가 1, 4 glycoside 결합으로 이루어져 있다[2]. 알긴산은 결합구조와 분자량 크기에 따라 다양한 물성을 가지며, 식품, 화장품, 의학 산업과 공업용으로 이용되고 있으며, 특히 식품에서는 아이스크림, 가공유, 젤리 및 레토르트 제품의 증점제, 안정제, 유화제로 이용되고 있다[12]. 혈청 및 간장 지질의 콜레스테롤의 농도를 감소[13]시키는 등의 기능이 보고되고 있으며, 난소화성 다당류로서 장의 연동 운동 촉진을 통한 비만 치유[2], 다이어트 및 성인병 예방 식재료로 주목 받고 있다[3]. 하지만 고농도의 알긴산은 강한 점성을 나타내어 산업적 이용이 어려운 단점이 있어 기존의 기능을 유지하면서 광범위한 알긴산의 이용을 위해 알긴산 저분자화에 관한 연

구가 이루어지고 있다. 또한 다당류를 저분자화한 올리고당이 항암[8], 항균[14], 면역 증진[22]과 같은 기능이 보고되면서 해조 다당류인 알긴산이 올리고당 제조원으로 기대되고 있다.

현재 알긴산의 효율적인 저분자화를 위해 산[9], 열[15], 라디칼[26], 효소[30] 및 감마선 조사[4] 방법이 제시되고 있으며, 특히, 알긴산이 산이나 염기에 비교적 안정하며, 기존의 산 또는 염기 가수분해 방법으로 저분자화시 중화과정을 거치는 등 제조 공정에서 산업적 효율성이 떨어지는 단점을 지니고 있어, 효율적인 알긴산 저분자화 방법으로 효소처리법에 대한 연구가 많이 진행되고 있는 실정이다.

알긴산 분해 효소는 해조류를 이용하는 균소(*Dolabella auricularia*)[1], 소라(*Turbo cornutus*)[23], 성게(*Strongylocentrotus purpuratus*)[5] 등과 같은 해양 동물이나 해저 토양 및 해수 유래 미생물로부터 발견되고 있으며, 그 중 대량 배양을 통하여 효소의 대량 생산이 가능한 알긴산 분해 미생물에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다. 현재 국내외적으로 알긴산 분해능이 있는 것으로 밝혀진 미생물로는 *Streptomyces* sp.[16], *Sphingomonas* sp.[32], *Alginovibrio aquatilis*[27], *Alteromonas* sp.[34], *Pseudomonas fluorescens*[19] 및 *Vibrio*

*Corresponding author

Tel: +82-51-629-5831, Fax: +82-51-629-5824

E-mail: dhahn@pknu.ac.kr

sp.[10] 등이 알려져 있지만 알긴산 분해 효소를 고효율로 생산하는 미생물에 관한 보고는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 알긴산 올리고당을 효소적으로 제조하기 위한 기초연구로서 해수 및 해조류로부터 알긴산 분해 활성이 우수한 새로운 미생물을 탐색하고, 미생물 유래 알긴산 분해 조효소의 분해 특성을 알아보하고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용한 알긴산은 alginic acid sodium salt from brown algae(Aldrich Chemical Co, USA)를 사용하였으며, 배지는 marine broth(MB, Difco, USA) 및 marine agar(MA, Difco, USA)를 사용하였다.

알긴산 분해 미생물의 분리 및 동정

알긴산 분해 미생물의 분리를 위해 부산의 송정 연안에서 분해중인 해조류 *Sargassum thunbergii*를 채집하였다. 멸균된 2% NaCl phosphate buffer(pH 7.4)을 이용하여 해조류를 희석하였으며, 희석액을 MA 배지에 분주·도말 후, 30°C에서 24 hr 배양한 후, 생성된 colony를 확인하고 형태적으로 다른 colony를 선택하였다. 선택된 colony의 알긴산 분해능을 확인하기 위해, 4% 알긴산과 10^6 cfu/mL 농도의 균 배양액을 1:1 혼합하여 30°C에서 24 hr 반응 후, 점도 및 환원당 함량을 측정하였다. 이중 알긴산 분해능이 높은 colony는 (주)마크로젠에서 16S rRNA sequence analysis로 분석하여 16S rDNA 염기서열을 구하였고, NCBI blast를 통해 동정하였다.

분리·동정된 알긴산 분해 미생물 생육 특성 확인

분리동정된 알긴산 분해 미생물의 최적 pH, NaCl, 배양 온도 및 시간 조건을 생육 조건을 확인하기 위해, 각 조건에서 균을 배양 한 후, 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. MB 배지를 기본 배지로 사용하였으며, 균은 10^6 cfu/mL 농도로 접종하였다. pH 확인을 위해 MB 배지를 0.1 N 및 1 N HCl과 0.1 N 및 1 N NaOH로 pH 5-10으로 조정하였으며 균을 접종 후, 30°C에서 24 hr 배양하였다. 최적 pH인 pH 9로 조정된 MB 배지의 NaCl 농도를 2-8%로 조정된 후, 30°C에서 24 hr 배양하여 NaCl 농도 조건을 확인하였고, 또한 최적 pH 및 NaCl 농도인 pH 9 및 2% NaCl로 조정된 MB 배지에 균을 접종 후, 배양 온도를 10-50°C로 달리하고 24 hr 배양하여 최적 온도 조건을 확인하였고, pH 9, 2% NaCl 및 30°C 조건에서 균을 24 hr까지 배양하며 최적 배양 시간 조건을 확인 하였다.

알긴산 분해 조효소액 제조

분리동정된 알긴산 분해균을 최적 생육 조건인 pH 9, 2%

NaCl, 30°C 및 배양 24 hr 조건으로 대량 배양 후, 원심분리기(SUPRA 22K, Hanil science co., Korea)로 4°C에서 12,000xg, 30 min 조건으로 원심 분리하여 상층액을 조효소액으로 하였다.

알긴산 분해 조효소액의 특성 확인

분리동정된 알긴산 분해균으로 부터 얻은 알긴산 분해 조효소액의 pH, 온도, 알긴산 농도, 반응 시간 특성을 확인하였으며, 알긴산 분해능은 점도 및 환원당 함량을 측정하였다. 점도 측정은 점도계(LVLTDV-II, Brookfield Co., USA)를 이용하여 Richard 등[25]의 방법을 참고하여 25°C, 52 cP 및 0.5 rpm 조건으로 최적 pH 및 온도 조건을 확인하였고, 25°C, 40 cP 및 0.5 rpm 조건으로 반응 시간 조건을 확인하였다. 환원당은 Somogyi-Nelson법[24]으로 520 nm에서 표준당(glucose)으로 작성한 검량곡선으로 환원당 함량을 정량하였다. 효소 1 unit는 1분에 1 μ mole의 환원당을 생산하는 효소양으로 정의하였고, 각 실험조건에서 최대 활성을 보인 것을 100%로 간주 하고 상대 활성으로 나타내었다. 최적 pH 조건을 확인하기 위해, 0.1 N 및 1 N HCl과 0.1 N 및 1 N NaOH를 이용하여 pH 2-10까지 조정하였으며, 알긴산과 조효소액을 1:1 혼합 후, 30°C에서 24 hr 반응 시켰다. pH 9 조건에서 온도를 10-50°C로 달리하여 알긴산과 조효소액 1:1 혼합물을 24 hr 반응 시킨 후, 최적 온도 조건을 확인하였으며, 최적 알긴산 농도를 확인하기위해 2-10% 농도의 알긴산을 조효소와 1:1 혼합 한 후, pH 9 및 30°C 조건에서 24 hr 반응 시켰다. 또한 반응 시간 조건에 따른 조효소액의 알긴산 분해능을 확인하기 위해 pH 9, 30°C 조건에서 8% 알긴산과 조효소 1:1 혼합액을 72 hr까지 반응 시켰다.

결과 및 고찰

알긴산 분해균의 분리 및 동정

부산 송정연안에서 채취한 분해중인 *Sargassum thunbergii*와 그 주변 해수로부터 형태적으로 다른 colony를 분리하였으며, Colony의 알긴산 분해능을 측정한 결과(Fig. 1), 환원당 생성량이 312 μ g/mL이고, 96% 점도 감소율을 보인 알긴산 분해능이 높은 하나의 colony를 분리하였다. 분리한 colony의 16S rDNA 염기서열 1518개를 확인하였고(Fig. 2), *Vibrio crassostreae* strain CAIM 1405(NCBI accession #; EF094887)와 99% 유사성을 보였으며, 본 연구에서 분리한 알긴산 분해균은 *Vibrio crassostreae* strain으로 동정되어 *Vibrio crassostreae* PKA 1002으로 명명하였다.

알긴산 분해균의 생육 특성 확인

최적 pH 조건을 확인한 결과(Fig. 3), pH 5, 6, 7, 8, 9 및 10에서 흡광도값은 0.076, 0.413, 0.413, 0.482, 0.659 및 0.418으로 측정되어, pH 9에서 균체의 생성량이 가장 높

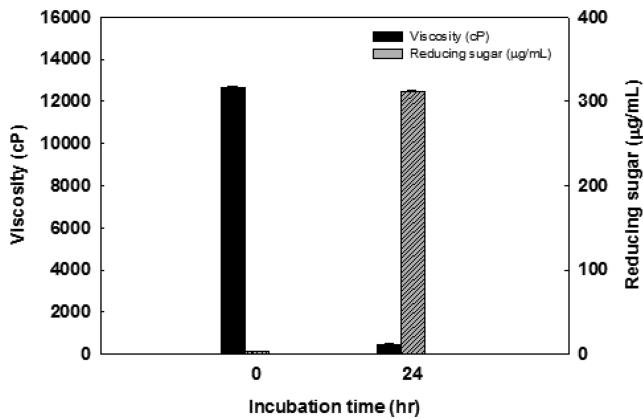


Fig. 1. The alginate degrading ability of isolated marine bacteria measured by viscometry and reducing sugar assay.

```

1 AGATTGAACG CTGGCGGCAG GCCTAACACA TGCAAGTCGA GCGGAAACGA
51 CACTAACAA CTTCGGGGT CGTTAATGGG CGTCGAGCGG CGGACGGGTG
101 AGTAATGCCT AGGAAATGTC CTTGATGTGG GGGATAACCA TTGGAACGA
151 TGGCTAATAC CGCATAATGC CTACGGGCCA AAGAGGGGGA CCTTCGGGCC
201 TCTCGCGTCA AGATATGCCT AGGTGGGATT AGCTAGTTGG TGAGGTAATG
251 GCTCACCAAG GCGACGATCC CTAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA
301 CTGGAAGTGA GACACGGTCC AGACTCCTAC GGGAGGCAGC AGTGGGGAAT
351 ATTGCACAAT GGGCGAAAGC CTGATGCAGC CATGCCCGCT GTATGAAGAA
401 GGCCTTCGGG TTGTAAGTA CTTTCAGTTG TGAGGAAGGG GGTGTCGTTA
451 ATAGCGGTAT CTCTTGACGT TAGCAACAGA AGAAGCACCG GCTAACTCCG
501 TGCCAGCAGC CGCGGTAATA CGGAGGGTGC GAGCGTTAAT CGGAATTAAT
551 GGGCGTAAAG CGCATGCAGG TGGTTCATTA AGTCAGATGT GAAAGCCCGG
601 GGCTCAACCT CGGAACTGCA TTTGAAACTG GTGAACTAGA GTACTGTAGA
651 GGGGGGTAGA ATTTCAAGTG TAGCGGTGAA ATGCGTAGAG ATCTGAAGGA
701 ATACCAAGTG CGAAGGCCGC CCCCTGGACA GATACTGACA CTCAGATGCG
751 AAAGCGTGGG GAGCAAACAG GATTAGATAC CCTGGTAGTC CACGCCGTAA
801 ACGATGTCTA CTTGGAGGTT GTGGCCTTGA GCCGTGGCTT TCGGAGCTAA
851 CGCGTTAAGT AGACCGCCTG GGGAGTACGG TCGCAAGATT AAAACTCAAA
901 TGAATTGACG GGGGCCCGCA CAAGCGGTGG AGCATGTGGT TTAATTCGAT
951 GCAACGCGAA GAACCTTACC TACTCTTGAC ATCCAGAGAA GCCAGCGGAG
1001 ACGCAGGTGT GCCTTCGGGA GCTCTGAGAC AGGTGCTGCA TGGGTGTCGT
1051 CAGCTCGTGT TGTGAAATGT TGGGTTAAGT CCCGCAACGA GCGCAACCCCT
1101 TATCCTTGTT TGCCAGCGAG TAATGTCGGG AACTCCAGGG AGACTGCCGG
1151 TGATAAACCG GAGGAAGGTG GGGACGACGT CAAGTCATCA TGGCCCTTAC
1201 GAGTAGGGCT ACACACGTGC TACAATGGCG CATAACAGAG GCAGCAAGCT
1251 AGCGATAGTG AGCGAATCCC AAAAAGTGGC TCGTAGTCCG GATTGGAGTC
1301 TGCAACTCGA CTCCATGAAG TCGGAATCGC TAGTAATCGT AGATCAGAAT
1351 GCTACGGTGA ATACGTTCCC GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT
1401 GGGAGTGGGC TGCAAAAGAA GTGGGTAGTT TAACCTTTCG GGGAGGACGC
1501 TCACCACTTT GTGGTCAT
    
```

Fig. 2. 16S rDNA nucleotide sequence of *Vibrio crassostreae* PKA 1002.

은 것으로 나타났고 *V. crassostreae* PKA 1002은 pH 9의 알칼리 영역에서 생육 활성이 가장 높은 것으로 확인되었다.

해양 유래 미생물인 *V. crassostreae* PKA 1002의 NaCl 농도와 생육관계를 알아본 결과(Fig. 4) 2%와 3% 농도에서

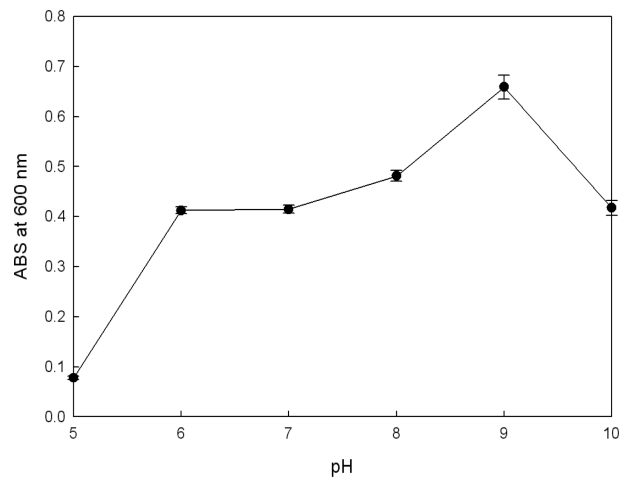


Fig. 3. Effect of pH on growth of *Vibrio crassostreae* PKA 1002.

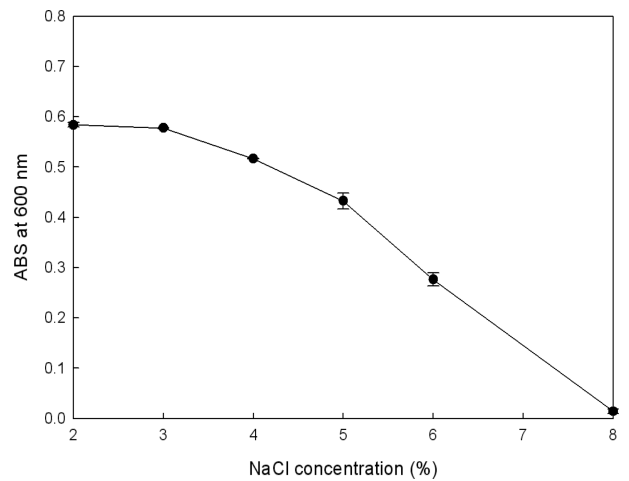


Fig. 4. Effect of NaCl concentration on growth of *Vibrio crassostreae* PKA 1002.

흡광도값이 각각 0.584, 0.558로 나타났고, 그 이상의 농도에서는 흡광도 값이 점차 낮아져 2% NaCl이 최적 조건으로 나타났다. 이러한 알긴산 분해 효소를 생산하는 *Vibrio* sp. AL-145가 2-4% NaCl 농도 조건에서 생육이 좋으며, 생산하는 효소 역시 2-4% NaCl 농도 조건에서 효소활성이 가장 좋은 것으로 나타난 결과와 유사한 것으로 나타났다. 또한 알긴산 분해균 뿐만 아니라 protease를 생산하는 *Vibrio vulnificus* [11]의 경우, 2% NaCl 농도 조건에서 균의 생육 및 효소활성이 가장 높고 그 이하의 농도에서는 생육 및 효소 활성이 낮아지는 것으로 나타났다. *Vibrio rumoidensis* sp.[35]의 경우 0%에서는 균의 생육이 어려우며, 3-4% NaCl 농도에서 생육이 높은 것으로 나타나 해양 미생물인 *Vibrio* sp.의 경우 2% 이하의 NaCl 농도 조건에서는 생육이 억제되는 것으로 사료되어 진다.

최적 온도 조건을 확인한 결과(Fig. 5), 15°C에서 흡광도 값이 0.599으로 30°C까지는 0.757로 증가하였고 40°C에서

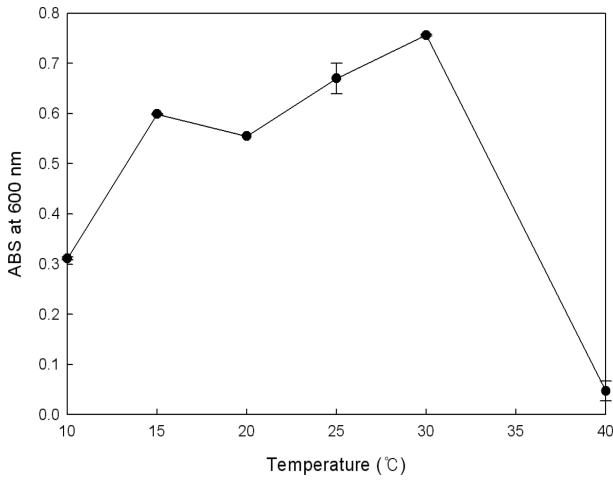


Fig. 5. Effect of temperature on growth of *Vibrio crassostreae* PKA 1002.

는 0.047으로 낮아져 30°C가 *V. crassostreae* PKA 1002의 최적 생육 온도인 것으로 측정되어 해수 유래 균이 20-30°C 부근에서 생육 활성이 높은 것과 유사한 것으로 확인되었다.

pH 9, 2% NaCl 농도 및 30°C 조건에서 *V. crassostreae* PKA 1002의 시간별 생육정도를 확인한 결과(Fig. 6), 9 hr 까지 균수가 급격히 증가하는 대수증식기로 나타났고, 12 hr 이후 24 hr까지는 완만하게 증가하는 정지기로 나타나 본 실험에서는 24 hr을 *V. crassostreae* PKA 1002의 최적 시간 조건으로 하였다.

V. crassostreae PKA 1002의 최적 생육 조건은 pH 9, 2% NaCl, 30°C 및 24 hr의 배양 조건인 것으로 나타났으며, 최적 생육 조건에서 7% 알긴산과 1:1 배양시 환원당 생성량이 818 µg/mL로 가장 높은 것으로 나타났다(Fig. 7). 이상의 결과를 종합해 볼 때, 이미 알려진 해양 유래의 알긴산 분해 균들의 최적 생육 조건이 *Pseudomonas* sp. N7151-6[20]가

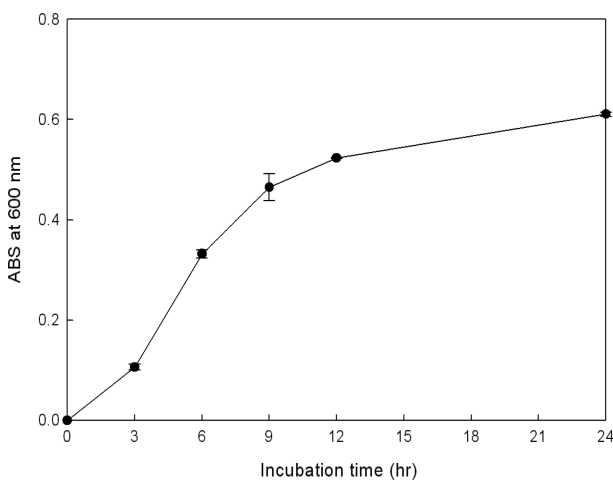


Fig. 6. Effect of incubation time on growth of *Vibrio crassostreae* PKA 1002.

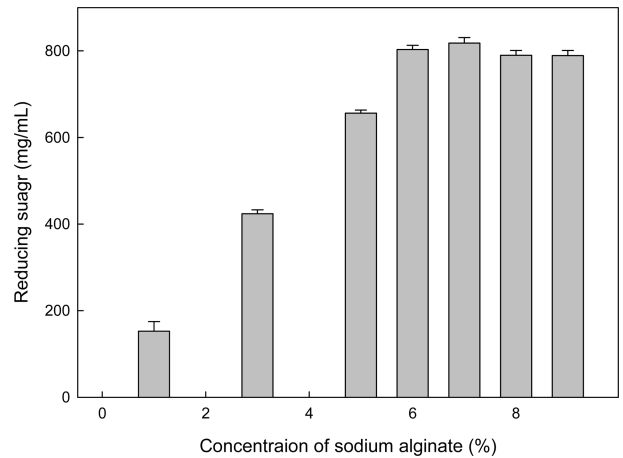


Fig. 7. Effect of alginate concentration on alginate degrading activity of the *Vibrio crassostreae* PKA 1002 measured by reducing sugar assay. The mixture of alginate and cell culture fluid were incubated at 30°C for 24 hr.

pH 8, 30°C, *Vibrio* sp. YKW-34[33]가 pH 8, 25°C 및 배양 48 hr 그리고 *Bacillus licheniformis* AL-577[31]가 2% NaCl, pH 7.5 및 30°C인 결과와 유사한 것을 확인할 수 있었으며, *V. crassostreae* PKA 1002는 알칼리(pH 9) 및 중온(30°C) 영역에서 대량 배양하여 균체의 효소를 획득할 수 있을 것으로 사료되어진다.

알긴산 분해 조효소의 특성 확인

V. crassostreae PKA 1002이 생성한 알긴산 분해 조효소액의 pH, 온도, 알긴산 농도 및 시간 특성을 점도 및 환원당 함량을 측정하여 확인하였다.

최적 pH를 확인한 결과(Fig. 8), pH 7-10 영역에서 알긴산 분해능 활성이 높으며 특히, pH 9에서 가장 높은 것으로

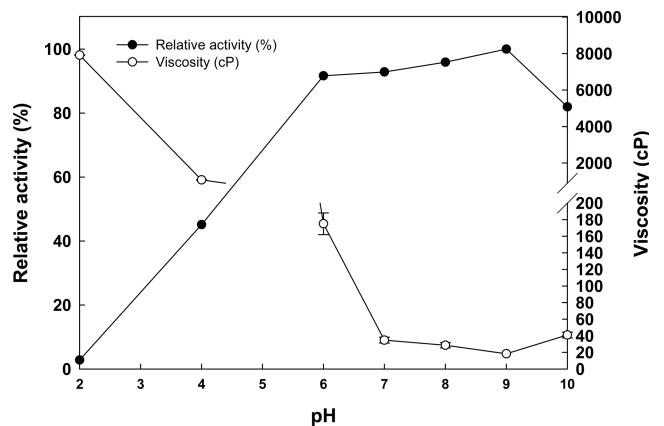


Fig. 8. Effect of pH on alginate degrading activity of crude enzyme measured by viscometry and reducing sugar assay. The mixture of alginate and crude enzyme were incubated for 24 hr and viscosity was measured at 25°C, 52 cP and 0.5 rpm. The relative activity was shown as percentages of the enzyme activity (100%, 304 U).

나타났다. 이 결과는 최적 알긴산 분해 pH 조건이 각각 pH 8.5, pH 8.1-8.4 및 9인 *Pseudomonas* sp. SM0524[21], *Vibrio* sp.[30] 및 *Agarivorans* sp.[17]와 유사한 알카리 영역인 것으로 나타났다.

조효소액의 알긴산 분해 활성과 온도와의 관계를 확인하기 위해 pH 9의 반응 조건에서 알긴산과 조효소액을 1:1 혼합한 후, 10-50°C로 배양 온도를 달리하여 24 hr 배양하였다. 그 결과(Fig. 9), 10°C에서는 분해 활성을 보이지 않았으며, 20°C부터 30°C까지 분해 활성이 증가하다가, 30°C 이후에는 활성이 감소하는 것으로 나타났고, 30°C에서 점도 측정값이 18.43 cP로 가장 낮게 나타났으며, 조효소의 활성도 가장 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 *Azotobacter vinelandii* [18] 및 *Pseudomonas maltophilia*[28] 유래 알긴산 분해효소의 최적 온도 조건이 30°C인 결과와 일치하였고, 본 연구에서 분리한 균주의 최적 생육 및 조효소 활성 온도가 일치하는 것은 미생물의 서식 환경이 기인하는 것으로 사료되어진다.

pH 9 및 30°C 조건에서 2-10%로 알긴산 농도를 달리하여 조효소액과 1:1 혼합 후, 30°C에서 24 hr 반응 시킨 후, 효소활성을 측정하였다(Fig. 10). 7% 알긴산 농도까지 알긴산 효소활성은 증가하였고 그 이상의 농도에서는 활성이 다소 감소한 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 Uo 등 [31]의 연구에서 일정 알긴산 농도 이상의 경우 점도의 증가로 균체의 성장 및 효소의 활성이 다소 감소 할 수 있다는 결과와 유사하며 본 연구의 8% 이상의 알긴산 농도에서 알긴산 분해활성이 감소한 것은 알긴산 농도가 높아졌기 때문인 것으로 사료되어진다. 또한 pH 9, 30°C 조건에서 8% 알긴산과 조효소를 1:1 혼합시 48 hr 배양 한 결과(Fig. 11), 환원당 생성량이 1595 µg/mL로 가장 많고, 점도 측정값은 5.80 cP로 가장 낮은 것으로 나타나 다당류인 알긴산을 가

장 많이 저분자화된 것으로 사료되어진다.

이상의 결과를 종합해볼 때, 해양에서 분리한 *V. crassostreae* PKA 1002 유래 알긴산 분해 조효소는 해양 미생물 유래 알긴산 분해효소의 최적 조건이 pH 7-9, 25-40°C인[30] 결과와 유사한 것을 확인할 수 있었다. 또한 Joo 등[10]의 *Vibrio* sp. AL-145 및 Uo 등[31]의 *Bacillus licheniformis* AL-577, Kim 등의 각각 환원당 생성능이 반응 50 min에 0.355 및 0.899 g/L로 산업적 이용가능성이 있다고 보고하여, 본 연구에서 분리동정한 *V. crassostreae* PKA 1002의 환원당 생성능은 반응 1시간 동안 3.035 g/L로 확인되어 높게 나타났다, 따라서 추후 *V. crassostreae* PKA 1002가 생산하는 알긴산 분해 효소를 정제하여 알긴산 올리고당 제조에 이용 가능할 것으로 사료되어진다.

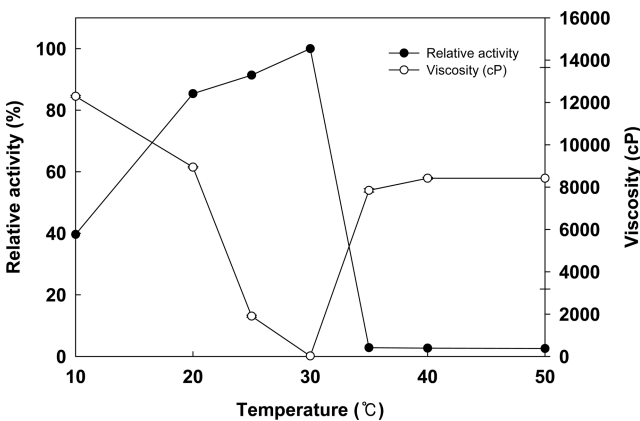


Fig. 9. Effect of temperature on alginate degrading activity of crude enzyme measured by viscometry and reducing sugar assay. The mixture of alginate and crude enzyme were incubated for 24 hr and viscosity was measured at 25°C, 52 cP and 0.5 rpm. The relative activity was shown as percentages of the enzyme activity.

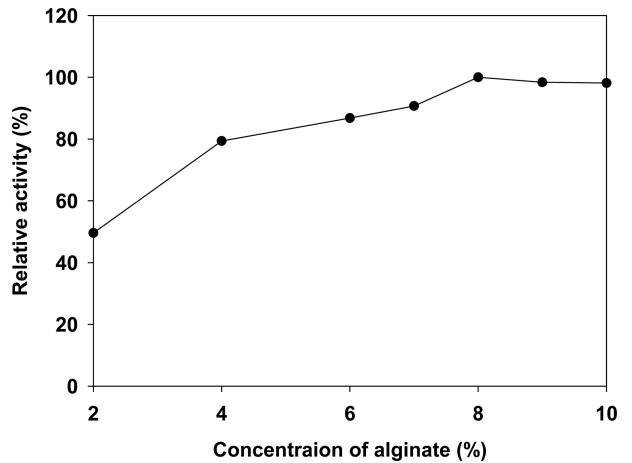


Fig. 10. Effect of alginate concentration on alginate degrading activity of crude enzyme measured by reducing sugar assay. The mixture of alginate and crude enzyme were incubated at 30°C for 24 hr. The relative activity was shown as percentages of the enzyme activity (100%, 304 U).

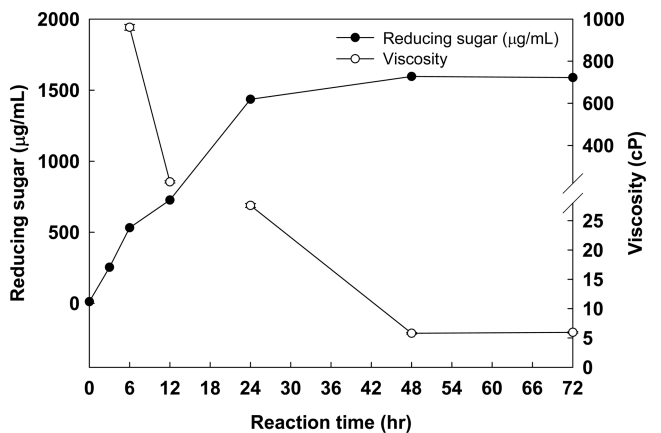


Fig. 11. Effect of reaction time on alginate degrading activity of crude enzyme measured by reducing sugar assay. The mixture of alginate and crude enzyme were incubated at 30°C for 72 hr. The viscosity was measured at 25°C, 40 cP and 0.5 rpm.

요약

부산 송정 연안에서 해조류 및 해수로부터 알긴산 분해 미생물을 분리동정하고 미생물의 생육 조건 및 조효소액의 알긴산 분해 특성을 확인하였다. *Sargassum thunbergii*로부터 분리한 알긴산 분해균을 동정한 결과, *Vibrio crassostreae* strain로 확인 되었으며, *V. crassostreae* PKA 1002로 명명 하였다. *V. crassostreae* PKA 1002 최적 생육 조건을 확인한 결과, pH 9, 2% NaCl, 30°C 및 배양 24 hr인 것으로 나타났으며, 최적 생육 조건에서 7% 알긴산과 1:1 배양시 환원당이 가장 많이 생성되는 것으로 나타났다. *V. crassostreae* PKA 1002를 최적 생육 조건으로 대량배양 후, 원심분리하여 얻은 상층액을 조효소액으로 하였으며, *V. crassostreae* PKA 1002 유래 알긴산 분해 조효소액은 pH 9, 30°C에서 분해 활성이 최대이며, 4% 알긴산 용액에서 1 hr 반응시 3.035 g/L의 환원당을 생성하는 것으로 나타나 추후 효소를 정제하고 알긴산 분해 특성을 구명하여 알긴산 올리고당 제조에 이용할 수 있을 것으로 사료되어 진다.

REFERENCES

- Anzai, H., H. Asada, A. Koshihara, S. Yoshida, H. Kobayashi, N. Uchida and E. Nishide. 1991. Distribution of polysaccharide digestive enzymes in a marine gastropod *Dolabella auricularia*. *Nippon Suisan Gakk.* **57**: 2077-2081.
- Choi, J. H. and D. W. Kim. 1997. Effect of alginic acid-added functional drink (HAETOMINI) brown algae (*Undaria pinnatifida*) on obesity and biological activity of SD rats. *Kor. J. Life Sci.* **7**: 361-370.
- Choi, J. H., C. H. Rhim, J. Y. Kim, J. S. Yang, J. S. Choi, and D. S. Byun. 1986. Basic studies on the development of diet for the treatment of obesity: the inhibitory effect of alginic acid as a dietary fiber on obesity. *J. Kor. Fish. Soc.* **19**: 303-311.
- Cho, M., B.Y. Kim, and J. H. Rhim. 2003. Degradation of alginate solution by using γ -irradiation and organic acid. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **35**: 67-71.
- Eppley, R. W. and R. Lasker. 1959. Alginase in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science* **129**: 214-215.
- Fisher, F. G. and H. Dorfel. 1955. The polyuronic acids of brown algae. *Physiol. Chem.* **302**: 186-203.
- Gacesa, P. 1988. Alginates. *Carbohydr. Polym.* **8**: 161-182.
- Huamao Y., J. Song, L. Xuegang, L. Ning, and D. Jicui. 2006. Immunomodulation and antitumor activity of κ -carrageenan oligosaccharides. *Cancer Lett.* **243**: 228-234.
- Joo, D. S., Y. S. Choi, and S. Y. Cho. 2003. Preparation of the depolymerized alginates by physical treatment processing with organic acids. *J. Kor. Fish. Soc.* **36**: 1-5.
- 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 alginase from *Vibrio* sp. AL-145. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 432-438.
- Kang, S. I., Y. M. Kim, Y. B. Jang, D. J. Lim, and J. Y. Kong. 2004. The optimal culture condition for the collagenolytic protease production from *Vibrio vulnificus* CYK279H. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **19**: 295-300.
- Kim, J. H., Y. H. Kim, S. K. Kim, B. W. Kim, and S. W. Nam. 2011. Properites and industrial applications of seaweed polysaccharides degrading enzymes from the marine microorganisms. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 189-199.
- Kim, I. H. and T. J. Nam. 2005. Effect of polymannuronate on cholesterol contents of liver tissue and feces in rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **34**: 1553-1558.
- Kim, J. Y., K. N. Kim, J. G. Kim, S. C. Kim, W. J. Lee, and C. G. Hyun. 2009. In vitro antimicrobial and antioxidant activities of chitosan oligosaccharides. *J. Appl. Biol. Chem.* **52**: 84-87.
- 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.
- Kim, H. K., J. C. Lee, N. H. Kang, S. H. Kim, J. G. Kim, and K. C. Shung. 2007. Purification and characterization of the extracellular alginate lyase from *Streptomyces* sp. MET 0515. *J. Life Sci.* **17**: 625-633.
- Kobayashi, T., K. Uchimura, M. Miyazaki, Y. Nogi, and K. Horikoshi. 2009. A new high-alkaline alginate lyase from a deep-sea bacterium *Agarivorans* sp.. *Extremophiles* **13**: 121-129.
- Kennedy, L., K. Mcdowell, and I. W. Sutherland. 1992. Alginases from *Azotobacter* species. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 2465-2471.
- Liyang, L., J. Xialu, G. Huashi, W. Peng, and G. Hong. 2011. Three alginate lyases from marine bacterium *Pseudomonas fluorescens*. HZJ216: purification and characterization. *Appl. Biochem. Biotech.* **164**: 305-317.
- Lee, J. H., M. J. Bae, Y. C. Kim, and S. W. Nam. 2009. Identification and characterization of alginate lyase producing *Pseudomonas* sp. N7141-6. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 350-354.
- Li, J. W., S. Dong, J. Song, C. B. Li, X. L. Shen, B. B. Xie, and Y. Z. Zhang. 2011. Purification and characterization of bifunctional alginate lyase from *Pseudoalteromonas* sp. SM0524. *Marine Drugs* **9**: 109-123.
- Mulligan, M. S., J. B. Lowe, R. D. Larsen, J. Paulson and Z. L. Zheng, S. Defress, K. Maemura, and M. Fukuda, P. A. Ward. 1993. Protective effects of sialyated oligosaccharides in immun complex induced acute lung injury. *J. Exp. Med.* **178**: 623-631.
- Muramatsu, T., S. Hirose, and M. Katayose. 1977. Isolation and properties of alginate lyase from the mid gut gland of wreath shell *Turbo cornutus*. *Agric. Biol. Chem.* **41**: 1939-1946.
- Nelson, A. 1944. A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**: 375-380.

25. Richard, A. S. and R. E. Levein. 1976. Viscometric assay of bacterial alginase. *Appl. Eviro. Microbiol.* **31**: 896-899.
26. Smidsrod, O., A. Haug, and B. Larsen. 1963. Degrading of alginate in the presence of reducing compounds. *Acta. Chem Scand.* **17**: 2628-2637.
27. Stevens, R. A. and R. E. Levin. 1977. Purification and characteristics of an alginase from *Alginovibrio aquatilis*. *Appl. Environ. Microb.* **3**: 1156-1161.
28. Suntherland, I. W. and G. A. Kenn. 1981. Alginaese from *Beneckea pelagia* and *Pseudomonas* spp. *J. Appl. Biochem.* **3**: 48-57.
29. Takeshita, S, N. Sato, M. Igarashi, and T. Muramatsu. 1993. A highly denaturant durable alginate lyase from a marine bacterium: purification and proterties. *Biosci. Biotech. Bioch.* **57**: 1125-1128.
30. Thiang, Y. W., L. A. Preston, and N. L. Schiller. 2000. Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics structure-function analysis, biological roles and applications *Annu. Rev. Microbial.* **54**: 289-340.
31. Uo, M. H., D. S. Joo, and S. Y. Joo. 2006. Screening and cultivation characteristics of alginate degrading bacteria. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **35**: 109-114.
32. Wataru, H., O. Masako, H. Tomohiro, M. Keiko, and M. Kousaku. 1998. *Sphingomonas* sp. Al lyase active on both poly- β -D-mannuronate and heteropolymeric regions alginate. *J. Ferment. Bioeng.* **86**: 236-238.
33. Xiating, F., H. Lin, and S. M. Kim. 2008. Optimization of culturing condition and medium composition for the production of alginate lyase by a marine *Vibrio* sp. YKW-34. *J. Ocean Univ. China* **7**: 97-102.
34. Yoshiko, I., A. Ryoko, I. Kenichi, O. Tatsuya, F. Hisataka, H. Shinziro, and M. Tsuyoshi. 2001. Purification and characterization of bifunctional alginate lyase from *Alteromonas* sp. strain No. 272 and its action on saturated oligomeric substrates. *BioSci. Biotech. Bioch.* **65**: 133-142.
35. Yumoto, I., H. Iwata, T. Sawabe, K. Ueno, N. Ichise, H. Matsuyama, H. Okuyama, and K. Kawasaki. 1999. Chracterization of a facultatively psychoropholic bacterium, *Vibrio rumoiensis* sp. nov., that exhibits high catalase activity. *Appl. Environ. Microb.* **65**: 67-72.