

Vibrio sp. PKA 1003의 알긴산 분해 조효소 생산 최적 조건과 조효소의 특성

김현지¹ · 김꽃봉우리² · 김동현¹ · 선우찬¹ · 정슬아¹ · 정다현¹ · 정희예¹ · 임성미³ · 안동현^{1*}

¹부경대학교 식품공학과/식품연구소

²부경대학교 수산과학연구소

³동명대학교 식품영양학과

The Optimal Production and Characteristics of an Alginate-degrading Enzyme from *Vibrio* sp. PKA 1003

Hyun-Jee Kim¹, Koth-Bong-Woo-Ri Kim², Dong-Hyun Kim¹, Chan Sunwoo¹, Seul-A Jung¹,
Da-Hyun Jeong¹, Hee-Ye Jung¹, Sung-Mee Lim³, and Dong-Hyun Ahn^{1*}

¹Dept. of Food Science & Technology/Institute of Food Science, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

²Institute of Fisheries Sciences, Pukyong National University, Busan 619-911, Korea

³Dept. of Food Nutrition and Science, Tongmyong University, Busan 608-711, Korea

Abstract

This study was conducted to screen the characteristics and alginate-degrading activity of marine bacterium isolated from brown seaweed (*Sargassum thunbergii*). The results of 16S ribosomal RNA sequence analysis the strain the genus *Vibrio* and the strain was subsequently named *Vibrio* sp. PKA 1003. The optimum culture conditions for the growth of *Vibrio* sp. PKA 1003 were at pH 7, 3% NaCl, 25°C, and 6% alginic acid, with a 48-hour incubation time. A crude enzyme preparation from *Vibrio* sp. PKA 1003, showed its highest levels of alginate-degradation activity when cultured at pH 9, 30°C, and 6% alginic acid, with a 63-hour incubation time. Thin layer chromatography analyses confirmed that the crude enzyme released monomers or oligomers from sodium alginate, and results from trypsin treatment showed that the alginate degrading activity depends on this enzyme produced by *Vibrio* sp. PKA 1003. These results suggest that *Vibrio* sp. PKA 1003 and its alginate-degrading crude enzyme is useful for the production of alginate oligosaccharides.

Key words: alginate-degrading enzyme, alginate oligosaccharide, *Vibrio* sp., marine bacteria

서 론

알긴산(alginic acid)은 갈조류의 세포막 또는 세포간 물질을 구성하는 주성분으로 β -D-mannuronic acid(M)와 α -L-guluronic acid(G)가 α -1,4 또는 β -1,4 결합으로 이루어진 hetero형 산성 다당류이다(1,2). 알긴산은 단당류들의 결합 방법에 따라 M-M, G-M, M-G, G-G와 같이 4가지 타입의 다당류가 만들어질 수 있는데(3), 원료의 성상, 즉 해조의 부위별, 크기 및 생육 장소에 따라 알긴산의 구성 형태가 다른 원인이 된다(1). 알긴산은 젤형성능, 고점성, 필름형성능 등의 특성이 있어(4) 식품의 점성도를 높이거나 젤 형태를 만들어 주는 역할로 식품첨가물로 많이 사용되고 있으며(3), 장의 연동운동 촉진을 통한 체내의 중금속 흡수와 제거(5), 콜레스테롤 저하(6), 비만 억제효과(7) 등의 다양한 생리활성으로 기능성식품 소재로 활용이 가능하다. 뿐만 아니라 상처를 보호하는 창상피복제 및 지혈 등의 생리활성효과를 가지고 있어 의약품 소재로도 응용될 수 있다(8).

최근 알긴산 유래 올리고당의 항균 및 항암 작용(9), 면역증강(10), 장내세균 군집 개선 효과(11), 항콜레스테롤 효과(4) 등 다양한 생체조절 기능에 대한 보고들이 있어 알긴산을 이용한 올리고당 제조에 대한 연구가 활발히 진행 중이다. 또한 식품 첨가물로 이용시 알긴산 농도가 높아짐에 따라 필요 이상의 강한 점성을 갖게 되며, 특히 액상 식품의 경우 0.5% 이상의 농도로 첨가 시 식품 고유의 특성을 잃게 하는 약점 등으로 인해 사용에 제한을 받고 있다(12,13). 따라서 알긴산이 갖는 특성을 유지하면서 단점을 보완하여 그 이용범위를 확대시키기 위한 방안으로 알긴산 저분자화에 대한 관심이 높아지고 있는 추세이다(14).

알긴산을 저분자화하기 위한 방법으로는 고온 고압(15) 혹은 방사선(16)을 이용하여 연화시키는 물리적 방법, 산과 알칼리 처리(17)를 이용한 화학적 방법 및 해조를 섭식하는 생물 및 미생물이 생산하는 효소를 이용한 생물학적 방법(3) 등이 보고되고 있다. 하지만 해조류 유래 탄수화물 대부분이 비소화성 복합 다당류로서 산이나 알칼리에 비교적 안정한

*Corresponding author. E-mail: dhahn@pknu.ac.kr
Phone: 82-51-629-5831, Fax: 82-51-629-5824

특성으로 인하여 알긴산의 저분자화 및 정제에 어려움을 겪고 있으며(18), 산업적 이용이 가능한 알긴산 올리고당의 생산을 위해서는 알긴산 분해효소가 필요하다(19). 따라서 최근에는 기능성 해조 올리고당 생산에 해조 다당의 화학적 분해보다는 효소를 이용한 생물학적 분해에 대한 연구가 진행되고 있다(1,20). 알긴산의 분해효소인 alginate lyase(EC 4.2.2.3)는 알긴산의 glycosidic bond를 β -elimination 반응을 통해 C-4와 C-5에 이중결합을 형성하여 결과적으로 비환원성 말단이 4-deoxy-L-erythro-hex-4-enopyranosyl-uronate인 알긴산 올리고머를 만들면서 알긴산을 분해시킨다(21-23). 알긴산 분해효소는 자르는 부위에 따라 알긴산 중합체의 중간을 자르는 endo-type, 끝 부분을 자르는 exo-type으로 나눌 수 있으며, 중간을 자르는 endo-type의 알긴산 분해효소는 기질특이성에 따라 poly G-block을 자르는 poly-G 특이성(24,25), poly M-block을 자르는 poly-M 특이성(26) 및 poly MG로 나눌 수 있다(3).

현재 해조를 섭취하는 전복(27,28), 성게(29), 불가사리(30), 소라(31) 및 고둥(32)과 같은 해산 연체동물 또는 극피동물로부터 알긴산 분해효소를 분리하고 특성을 밝힌 보고가 있으며, 최근 미생물 유래 효소를 이용한 방법 또한 국내외적으로 보고되고 있다(18). 알긴산 분해 미생물로는 *Algino-monas alginica*(33), *Vibrio* sp.(2), *Pseudomonas* sp.(9), *Alteromonas* sp.(26) 및 *Bacillus* sp.(34) 등을 분리 동정해 내었으며, 이외에도 해수와 해양 토양, 분변 및 토양 등으로부터 알긴산 분해능이 우수한 균주들을 찾아내고 있다(20). 하지만 알긴산 분해효소를 고효율로 생산하는 미생물을 분리하는 연구 보고는 거의 없는 실정이거나 미생물에서의 알긴산 분해효소 활성이 상대적으로 낮은 편이며, 아직까지 실용화된 방법은 찾기 힘든 실정이다(18,35).

본 연구에서는 산업적으로 응용가능한 알긴산 올리고당을 효소적 분해를 이용하여 제조하기 위한 기초 연구로서 해조류로부터 알긴산 분해 활성이 우수한 미생물을 탐색하고 분리하여 알긴산 분해 효소를 생산하는 미생물의 최적 생육 조건 및 그 조효소액의 알긴산 분해 특성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

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

알긴산 분해 미생물의 분리 및 동정

알긴산 분해 미생물은 부산의 송정 연안에서 분해중인 해조류 및 그 주변 해수를 채집하였으며, 멸균된 2% NaCl phosphate buffer(pH 7.4)를 이용하여 해수 및 해조류를 희

석하였다. 희석액은 MA 배지에 분주·도말 후, 30°C에서 48 시간 배양하였으며, 생성된 colony를 확인하고 형태적으로 다른 colony를 선택하였다. 선택된 균주는 알긴산 분해 활성 측정을 위해 균체 배양액과 알긴산을 1:1로 혼합하여 30°C에서 24시간 배양 후, 환원당 생성량 및 점도 측정으로 알긴산 분해능을 확인하였다. 이 중 알긴산 분해능이 우수한 단일 colony는 염기서열을 결정하기 위해 (주)마크로젠(Seoul, Korea)에 의뢰하여 16S rRNA sequence analysis로 분석하였고, 이후 확인된 16S rDNA 염기서열에 대하여 NCBI blast를 통해 동정하였다.

분리·동정된 알긴산 분해 미생물 생육조건 확인

분리·동정된 알긴산 분해 미생물의 생육 조건을 확인하기 위해 초기 pH, NaCl 농도, 배양 온도, 배양 시간 조건을 달리 하며 균의 생육 정도를 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. pH 조건을 확인하기 위해 0.1 N 및 1 N HCl과 0.1 N 및 1 N NaOH를 이용하여 MB 배지의 pH를 2~10으로 조정 후, 배지 5 mL당 100 μ L씩 균을 접종하여 24시간 배양하였고, 최적 NaCl 농도 조건을 확인하기 위해 MB 배지의 최적 pH 조건에서 NaCl 농도를 2~6%로 조정 후, 배지 5 mL에 균 100 μ L를 접종하여 24시간 배양하였다. 또한 최적 온도 조건을 확인하기 위해 최적 pH 및 NaCl 농도 조건으로 조정된 MB배지에 균을 접종하여 10~40°C에서 24시간 균을 배양 후 생육 정도를 확인하였고, 최적 pH, NaCl 농도 및 온도 조건에서 균을 96시간까지 배양하며 최적 생육 조건을 확인하였다.

알긴산 분해 조효소액 제조

분리·동정된 알긴산 분해균을 최적 생육 조건으로 대량 배양 후, 원심분리기(SUPRA 22K, Hanil Science Co., Seoul, Korea)로 4°C에서 12,000 \times g, 30 min 조건으로 원심분리 하여 상층액을 조효소액으로 하였다.

알긴산 분해 조효소액의 특성 확인

분리·동정된 알긴산 분해균으로부터 얻은 알긴산 분해 조효소액의 초기 pH, 온도, 알긴산 농도 및 배양 시간 특성을 확인하였으며, 알긴산 분해능은 점도 및 환원당 함량을 측정하였다. 점도 측정은 점도계(LVLTDV-II, Brookfield Co., Middleboro, MA, USA)를 이용하여 Stevens와 Levin(36)의 방법을 참고하여 25°C에서 각 조건별로 측정하였다. 환원당은 Somogyi-Nelson법(37)으로 520 nm에서 표준당(glucose)으로 작성한 검량곡선으로부터 환원당 함량을 측정하였다. 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 25°C에서 48시간 배양하여 실험하였다. 최적 pH 조건에서 온도를 10~40°C로 달리하여 알긴산과 조효소액 1:1 혼합물을 48시간 배양한 후 최적 온도 조건을 확인하였으며, 최적 알긴산 농도를 확인하기 위해 1~9% 농도의 알긴산을 pH 9 및 30°C 조건에서

48시간 배양하여 실험하였다. 또한 최적 시간 조건을 확인하기 위해 최적 pH, 온도 및 알긴산 농도 조건으로 72시간까지 배양하며 실험하였다.

알긴산 분해산물의 thin-layer chromatography(TLC) 분석

분리·동정된 알긴산 분해균으로부터 얻은 알긴산 분해 조효소액을 이용하여 시간에 따른 알긴산 분해 정도를 알아보기 위하여 TLC를 이용하여 분석하였다. 조효소액과 알긴산을 1:1로 혼합하여 30°C에서 각각 3, 6, 12, 15, 18, 21, 24, 31, 42 및 63시간 반응시킨 후, 100°C에서 5분간 가열 및 10,000×g, 4°C, 10분 동안 원심분리 하여 단백질을 제거한 다음 상층액을 4배 희석하여 TLC Silica gel 60 F254, 25 glass plates 20×20 cm(Merck, Darmstadt, Germany)로 분석을 행하였다(38). TLC 분석은 TLC plate에 시료 3 µL를 spotting한 다음, 1-butanol/acetic acid/H₂O(2:1:1, by volume)를 이용하여 전개시켰으며, 10%(v/v) H₂SO₄ in ethanol 용액을 분무한 후, 110°C에서 약 40분간 그늘리는 방법으로 가시화시켰다.

알긴산 분해 조효소액에 대한 trypsin의 영향

분리·동정된 알긴산 분해균으로부터 얻은 알긴산 분해 조효소액에 대한 단백질 가수분해 효소의 영향을 알아보기 위하여 조효소액에 trypsin을 처리하였다. 효소와 기질이 1:300의 비율로 반응하도록 트립신(Trypsin, Sigma Chemical Co.)을 첨가하고 water bath에서 37°C, 1시간 반응시켰다. Trypsin 처리된 조효소액과 알긴산은 1:1 비율로 혼합 및 24시간 배양 후 환원당을 실시하였다.

결과 및 고찰

알긴산 분해균의 분리 및 동정

부산 송정 연안에서 채취한 분해중인 *Sargassum thunbergii*와 그 주변 해수로부터 형태적으로 다른 colony를 분리하였으며, 알긴산 분해능이 우수한 단일 colony는 (주)마크로젠에서 16S rRNA sequence analysis로 16S rDNA 염기서열을 확인한 후(Fig. 1), NCBI blast를 통해 동정하였다. 그 결과 *Vibrio* sp. V140(GenBank: DQ146978.1), *Vibrio crassostreae* strain CAIM 1405(GenBank: EF094887.1) 및 *Vibrio pomeroyi* strain DHQ25(GenBank: GU198497.1)와 모두 99%의 높은 상동성을 나타내었으며, 이로부터 *Vibrio* sp. 세균들과 아주 높은 연관관계를 보이는 것을 알 수 있었다. 일반적으로 16S rDNA의 유사성이 97% 이상이면 동일한 종(species)으로 분류하므로 분리한 균주를 최종적으로 *Vibrio* sp. PKA 1003으로 명명하였다.

알긴산 분해균의 생육 특성 확인

초기 pH를 2에서 10까지 변화시키면서 배양한 균주의 생육 특성을 측정된 결과(Fig. 2) pH 7에서 0.460으로 가장 높

```

1 GCTCAGATTG AACGCTGGCG GCAGGCCTAA CACATGCAAG TCGAGCGGAA
51 ACGACACTAA CAATCCTTCG GGTGCGTTAA TGGGCGTCSA GCGGCGGAGC
101 GGTGAGTAAT GCCTAGGAAA TTGCCTTGAT GTGGGGGATA ACCATTGGAA
151 ACGATGGCTA ATACCGCATA ATGCCACGGG GCCAAAGAGG GGGACCTTCG
201 GGCTCTCGC GTCAGATAT GCCTAGGTGG GATTAGCTAG TTGGTAGGGT
251 AATGGCTCAC CAAGGCGACG ATCCCTAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC
301 CACACTGGAA CTGAGACACG GTCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG
351 GAATATTGCA CAATGGGCGA AAGCCTGATG CAGCCATGCC GCGTGTATGA
401 AGAAGGCCTT CCGGTTGTAA AGTACTTTCA GTTGTGAGGA AGGGGGTGTG
451 GTTAATAGCG GCATCTCTTG ACGTTAGCAA CAGAAGAAGC ACCGGCTAAC
501 TCCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGGAGG GTGCGAGCGT TAATCGGAAT
551 TACTGGGCGT AAAGCGCATG CAGGTGGTTC ATTAAGTCAG ATGTGAAAGC
601 CCGGGGCTCA ACCTCGGAAC TGCATTGAA ACTGTGTAAC TAGAGTACTG
651 TAGAGGGGGG TAGAATTTCA GGTGTAGCGG TGAATGCGT AGAGATCTGA
701 AGGAATACCA GTGGCGAAGG CCGCCCTGCT GACAGATACT GACACTCAGA
751 TCGGAAAGCG TGGGGAGCAA ACAGGATTAG ATACCTGGT AGTCCACGCC
801 GTAACGATG TCTACTTGGG GGTGTGGCC TTAGCCGCTG GCTTTCCGGG
851 CTAACGCGTT AAGTAGACCG CCTGGGGAGT ACGGTCGCAA GATTAATAACT
901 CAAATGAATT GACGGGGGCC CGCACAAAGC GTGGAGCATG TGGTTTAATT
951 CGATGCAACG CGAAGAACCT TACCTACTCT TGACATCCAG AGAAGCCAGC
1001 GGAGAGCGAG GTGTGCCTTC GGGAGCTCTG AGACAGGTGC TGCATGGCTG
1051 TCGTCAGCTC GTGTTGTGAA ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA ACGAGCGCAA
1101 CCCTTATCCT TGTTTGCCAG CAGAGTAATGT CCGGAATCC AGGGAGACTG
1151 CCGGTGATAA ACCGGAGGAA GGTGGGGACG ACGTCAAGTC ATCATGGCCC
1201 TTACGAGTAG GGCTACACAC GTGCTACAAT GCGCATACA GAGGGCAGCA
1251 AGCTAGCGAT GGTGAGCGAA TCCCAAAAAG TCGCTGCTAG TCCGGATTGG
1301 AGTCTGCAAC TCGACTCCAT GAAGTCGGAA TCGTAGTAA TCGTAGATCA
1351 GAATGCTACG GTGAATACGT TCCCGGGCCT TGTACACACC GCCCGTCACA
1401 CCATGGGAGT GGGCTGCAAA AAGAAGTGGT AGTTTAACT TTCGGGGAGG
1451 ACCTCACCA CTTTGTGGTT CATGACTGGG

```

Fig. 1. 16S rDNA nucleotide sequence of *Vibrio* sp. PKA 1003. The isolated bacteria was identified *Vibrio* sp. V140 and 99% matched to NCBI accession#; DQ146978.1.

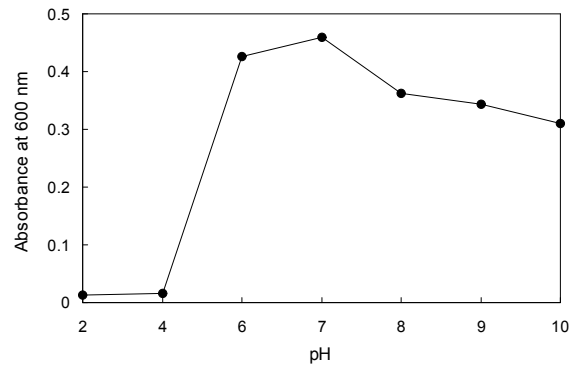


Fig. 2. Effect of pH on growth of *Vibrio* sp. PKA 1003.

은 활성을 보였으며, pH 4 이하에서는 생육이 정지되는 것을 확인할 수 있었다.

Vibrio sp. PKA 1003 균주가 해양환경으로 분리되었기에 일정농도의 NaCl이 요구될 것으로 판단되어(39), NaCl 농도를 변화시키면서 *Vibrio* sp. PKA 1003의 성장을 관찰하였다. 그 결과(Fig. 3) *Vibrio* sp. PKA 1003 균주의 경우 2 및 3% NaCl 농도에서 0.464 및 0.481로 높은 생육 활성을 보였으며, 그중에서도 3% NaCl 농도에서 균주의 성장이 가장 활발한 것으로 나타났다. 또한 4% 이상의 농도에서는 활성이 급격히 저하되는 것을 알 수 있었으며, 따라서 3% NaCl을 최적 조건으로 하였다.

배양온도가 *Vibrio* sp. PKA 1003 균주의 생육에 미치는

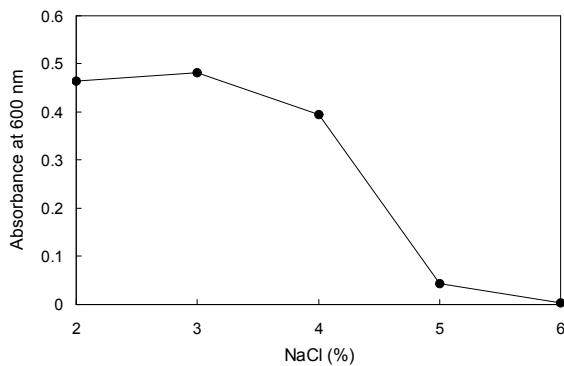


Fig. 3. Effect of NaCl concentration on growth of *Vibrio* sp. PKA 1003.

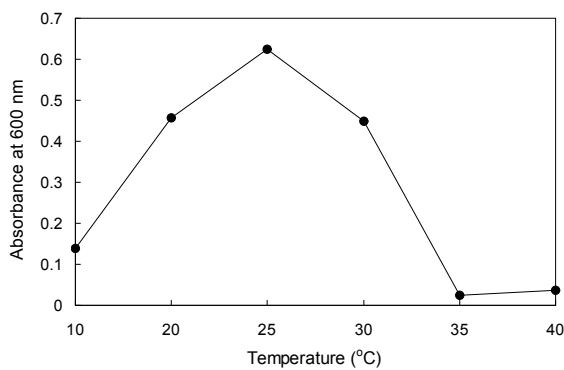


Fig. 4. Effect of temperature on growth of *Vibrio* sp. PKA 1003.

영향을 실험한 결과(Fig. 4) 25°C에서 0.626으로 가장 생육이 활발하였으며, 그 이외의 온도에서는 활성이 급격히 저하되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 해수세균의 경우 20°C 부근에서 잘 성장하는 것으로 알려져 있는데 이와 일치하는 결과이다(40).

앞서 결정한 최적 배양 조건에서 배양시간을 달리하며 균체의 성장을 실험한 결과(Fig. 5), 배양 12시간까지 균의 성장이 급격히 증가하였고 이후 균의 성장속도가 급격히 줄어들었으며 48시간 이후에는 균체의 성장이 거의 없었다. 따라서 48시간을 최적 배양 시간으로 하였으며, 12시간 이후 균주의 성장속도가 급격히 줄어든 것은 배지의 영양성분의 고갈 및

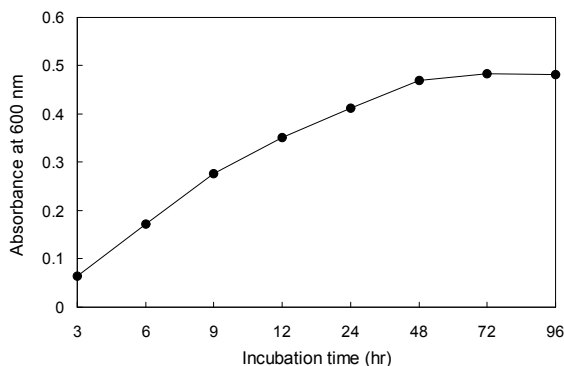


Fig. 5. Effect of incubation time on growth of *Vibrio* sp. PKA 1003.

Table 1. Effect of alginate concentration on alginate degrading activity of the *Vibrio* sp. PKA 1003 measured by reducing sugar assay (Unit: $\mu\text{g/mL}$)

Alginate concentration (%)	Reducing sugar
1	95.69 \pm 1.11 ^{e1)}
3	539.09 \pm 7.52 ^d
5	738.59 \pm 1.33 ^a
6	740.31 \pm 3.32 ^a
7	603.97 \pm 2.87 ^c
9	607.26 \pm 2.65 ^c

¹⁾Means in the same column (a-e) bearing different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

세포 성장에 따른 대사산물의 축적으로 사료되어진다(40).

pH 7, 3% NaCl, 25°C 및 48시간 배양의 최적 배양 조건에서 알긴산의 농도를 달리하며 *Vibrio* sp. PKA 1003 균주의 알긴산 분해능을 실험한 결과(Table 1), 알긴산 농도가 6%까지는 분해활성이 증가하다가 그 이상의 농도에서는 분해활성이 급격히 저하되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 알긴산 농도가 높아짐에 따라 배지의 점도가 높아지고 일정 수준에 이르러서는 균의 성장을 오히려 저해하는 요소로 작용할 수 있다는 것을 의미한다(40). 이러한 결과는 Yonemoto 등(41)이 알긴산 분해균은 배양 배지 중에 알긴산 농도가 1.0%까지는 성장 및 알긴산 분해 활성이 증가하다가 1.0% 이상의 농도에서는 균체 성장의 급격한 저하와 아울러 분해 활성도 저하한다고 보고한 바와 유사한 결과이다.

또한 *Bacillus licheniformis* Al-577 및 *Vibrio* sp. AL145가 최적 조건에서 환원당 생성량이 각각 0.899 mg/mL 및 0.355 mg/mL로 고효성 균주들로서 산업적 활용 가능성이 있다고 Joo 등(32)과 Uo 등(40)이 보고하였으며, 본 균주의 경우 환원당 생성량이 0.740 mg/mL로 추후 산업적으로 이용할 가능성이 충분하다고 사료된다.

이상의 결과들로부터, *Vibrio* sp. PKA 1003의 최적 생육 조건은 pH 7, 3% NaCl, 25°C 및 48시간임을 확인하였으며, 6% 알긴산 농도에서 알긴산 분해 활성이 최대인 것을 알 수 있었다. 따라서 *Vibrio* sp. PKA 1003 균주를 최적 조건에서 배양 시 알긴산 분해 효소를 효율적으로 획득할 수 있을 것으로 사료되어진다.

알긴산 분해 조효소의 특성 확인

Vibrio sp. PKA 1003 균주가 생산하는 조효소액의 알긴산 분해 활성을 확인하기 위해 pH, 온도, 알긴산 농도 및 배양 시간을 달리하며 알긴산 분해 활성을 측정하였다.

조효소액의 pH 특성을 확인하기 위해 0.1 N HCl 및 0.1 N NaOH를 이용하여 초기 pH를 조정하여 알긴산 분해 활성을 실험한 결과(Table 2), pH 9에서 환원당 함량이 733.87 $\mu\text{g/mL}$ 로 가장 높았고 점도가 27.64 cP로 가장 낮았으며, 이로부터 pH 9에서 *Vibrio* sp. PKA 1003이 생산하는 조효소액의 알긴산 분해 활성이 가장 뛰어난 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 Takeshita 등(42)이 도미의 장으로부터

Table 2. Effect of pH on alginate degrading activity of crude enzyme measured by viscometry and reducing sugar assay

	Viscometry (cP)		Reducing sugar ($\mu\text{g/mL}$)	
	Untreated ¹⁾	Treated ²⁾	Untreated	Treated
pH 2	12,156 \pm 29.69 ^{Ac3)}	8,486 \pm 12.73 ^{Ba}	13.42 \pm 1.85 ^{Ba}	24.76 \pm 1.27 ^{Af}
pH 4	12,362 \pm 27.27 ^{Ab}	1,059 \pm 12.02 ^{Bb}	5.35 \pm 1.94 ^{Bb}	113.46 \pm 1.22 ^{Ae}
pH 6	12,475 \pm 23.56 ^{Aa}	193.50 \pm 10.62 ^{Bc}	6.20 \pm 1.59 ^{Bb}	371.80 \pm 1.37 ^{Ad}
pH 8	12,457 \pm 29.25 ^{Aa}	36.85 \pm 15.04 ^{Bd}	6.20 \pm 1.74 ^{Bb}	546.41 \pm 1.36 ^{Ac}
pH 9	11,821 \pm 12.73 ^{Ad}	27.64 \pm 13.02 ^{Bd}	5.87 \pm 1.54 ^{Bb}	733.87 \pm 6.57 ^{Aa}
pH 10	5,749 \pm 18.50 ^{Ae}	27.64 \pm 13.02 ^{Bd}	5.01 \pm 0.83 ^{Bb}	693.25 \pm 1.57 ^{Ab}

¹⁾Mixture of alginate and MB broth.

²⁾Mixture of alginate and crude enzyme was adjusted to pH 9.

³⁾Means in the same row (A,B) and the same column (a-f) bearing different superscripts are significantly different ($p < 0.05$). The untreated and treated samples were incubated at 25°C for 48 hr and the viscosity was measured at 25°C, 52 cP and 0.5 rpm.

Table 3. Effect of temperature on alginate degrading activity of crude enzyme measured by viscometry and reducing sugar assay

	Viscometry (cP)		Reducing sugar ($\mu\text{g/mL}$)	
	Untreated ¹⁾	Treated ²⁾	Untreated	Treated
10°C	12,448 \pm 34.42 ^{Aa3)}	672.60 \pm 13.01 ^{Bc}	14.93 \pm 2.30 ^{Ba}	259.72 \pm 2.82 ^{Ad}
20°C	7,472 \pm 23.63 ^{Ab}	73.71 \pm 18.43 ^{Bd}	14.07 \pm 0.61 ^{Ba}	408.07 \pm 2.84 ^{Ac}
25°C	6,634 \pm 29.25 ^{Ac}	36.85 \pm 18.43 ^{Be}	8.91 \pm 0.97 ^{Bb}	599.86 \pm 1.08 ^{Ab}
30°C	6,063 \pm 18.50 ^{Ad}	9.22 \pm 13.03 ^{Be}	7.74 \pm 0.44 ^{Bb}	727.10 \pm 6.78 ^{Aa}
35°C	4,616 \pm 12.73 ^{Af}	1,760 \pm 12.73 ^{Bb}	9.70 \pm 1.42 ^{Bb}	14.54 \pm 3.23 ^{Ae}
40°C	5,998 \pm 12.73 ^{Ae}	1,834 \pm 13.44 ^{Ba}	9.66 \pm 2.05 ^{Ab}	5.63 \pm 0.63 ^{Bf}

¹⁾Mixture of alginate and MB broth.

²⁾Mixture of alginate and crude enzyme was adjusted to pH 9.

³⁾Means in the same row (A,B) and the same column (a-f) bearing different superscripts are significantly different ($p < 0.05$). The untreated and treated samples were incubated for 48 hr and the viscosity was measured at 25°C, 52 cP and 0.5 rpm.

분리한 *Vibrio* sp.의 조효소가 알칼리성 영역인 pH 8.5에서 최대 분해 활성을 나타내었다는 것과 일치하는 결과이다.

조효소의 온도 특성을 확인하기 위해 pH 9에서 10~40°C로 온도를 달리하여 실험한 결과(Table 3), 30°C에서 환원당 함량이 727.10 $\mu\text{g/mL}$ 로 가장 높았고 점도가 9.22 cP로 가장 낮아 가장 높은 분해활성을 나타내는 것을 확인하였으며, 35°C 이상의 온도에서는 알긴산 분해 활성이 급격히 낮아지는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 Joo 등(32)이 해양 생물로부터 분리한 균주들의 알긴산 분해 활성이 25~30°C로 토양으로부터 분리한 균주들에 비해 다소 저온에서 활발하다는 보고와 일치하는 결과였다.

조효소의 분해 최적 알긴산 농도를 확인하기 위하여 pH 9 및 30°C 조건에서 알긴산 농도를 달리하여 실험한 결과(Table 4), 6%에서 808.06 $\mu\text{g/mL}$ 로 가장 높은 알긴산 분해 활성을 나타내는 것을 확인하였으며, 6% 이상의 농도에서는 알긴산 분해능이 급격히 떨어지는 것을 확인하였다. 6% 이상의 농도에서 알긴산 분해능이 저하되는 것은 앞서 설명하였듯이 알긴산 농도가 높아짐에 따라 배지의 점도가 높아지고 일정 수준에 이르러서는 균의 성장 및 알긴산 분해 활성을 오히려 저해하는 요소로 작용하였기 때문인 것으로 사료되어진다(40).

최적 시간을 확인하기 위해 앞서 결정된 최적 활성 조건에서 시간을 달리하여 실험한 결과(Table 5), 63시간에서 환원당 함량이 1,034.71 $\mu\text{g/mL}$ 및 점도가 23.03 cP로 최대 분해

Table 4. Effect of alginate concentration on alginate degrading activity of crude enzyme measured by reducing sugar assay (Unit: $\mu\text{g/mL}$)

Alginate concentration (%)	Untreated ¹⁾	Treated ²⁾
1	0.50 \pm 0.33 ^{Bd3)}	195.44 \pm 1.36 ^{Ae}
3	2.48 \pm 2.00 ^{Bd}	625.86 \pm 2.20 ^{Ac}
5	26.23 \pm 1.09 ^{Bc}	634.10 \pm 2.62 ^{Ab}
6	32.56 \pm 1.95 ^{Bb}	808.06 \pm 2.62 ^{Aa}
7	31.00 \pm 1.14 ^{Bb}	622.42 \pm 3.17 ^{Ac}
9	41.94 \pm 2.53 ^{Ba}	539.87 \pm 5.98 ^{Ad}

¹⁾Mixture of alginate and MB broth.

²⁾Mixture of alginate and crude enzyme was adjusted to pH 9.

³⁾Means in the same row (A,B) and the same column (a-e) bearing different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

The untreated and treated samples were incubated at 30°C for 48 hr and the viscosity was measured at 25°C, 52 cP and 0.5 rpm.

활성을 나타내었으며, 그 이후에는 큰 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 63시간을 최적 활성 조건으로 하였다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, *Vibrio* sp. PKA 1003이 생산하는 조효소의 최적 알긴산분해 조건은 pH 9, 30°C, 6% 알긴산 및 배양시간 63시간임을 확인하였으며, 최적 조건에서 알긴산을 효율적으로 저분산화 하여 알긴산 올리고당 제조에 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

알긴산 분해산물의 TLC 분석

Vibrio sp. PKA 1003 균주가 생산하는 조효소를 이용

Table 5. Effect of incubation time on alginate degrading activity of crude enzyme measured by viscometry and reducing sugar assay

Incubation time (hr)	Viscometry (cP)	Reducing sugar (µg/mL)
0	16,427.90 ± 55.84 ^{a1)}	21.42 ± 1.36 ⁱ
3	10,070.50 ± 13.44 ^b	28.76 ± 1.38 ^j
6	5,740.00 ± 12.73 ^c	49.67 ± 1.91 ^b
12	740.78 ± 15.39 ^d	335.92 ± 0.55 ^g
24	52.21 ± 13.87 ^e	671.36 ± 1.77 ^f
36	46.07 ± 23.79 ^e	724.21 ± 0.88 ^e
48	40.54 ± 15.42 ^e	821.30 ± 0.66 ^d
55	32.76 ± 22.15 ^e	853.87 ± 5.05 ^c
63	23.03 ± 17.64 ^e	1,034.71 ± 5.75 ^a
72	18.43 ± 18.43 ^e	1,019.08 ± 4.86 ^b

¹⁾Means in the same column (a-j) bearing different superscripts are significantly different (p<0.05).

The samples were incubated at 30°C for 72 hr and the viscosity was measured at 25°C, 52 cP and 0.5 rpm.

Table 6. Effects of trypsin treatment on alginate-degrading activity of crude enzyme by reducing sugar assay

	Reducing sugar (µg/mL)
Untreated	13.29 ± 0.88 ^{c1)}
Crude enzyme + Trypsin	70.91 ± 2.10 ^b
Crude enzyme	538.62 ± 0.66 ^a

¹⁾Means bearing different superscripts are significantly different (p<0.05).

으로 나타났다. 이러한 결과는 단백질 분해효소인 trypsin에 의하여 알긴산 분해 효소가 분해되어 그 기능을 상실하기 때문인 것으로 사료되어지며, 이러한 결과로부터 알긴산 분해는 *Vibrio* sp. PKA 1003 균주가 생산하는 효소에 의한 것임을 확인할 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 산업적으로 응용가능한 알긴산 올리고당을 효소적 분해를 이용하여 제조하기 위한 기초 연구로서 해조류로부터 알긴산 분해 활성이 우수한 미생물을 탐색하고, 분리하여 알긴산 분해 효소를 생산하는 미생물의 최적 생육 조건 및 그 조효소액의 알긴산 분해 특성을 알아보려고 하였다. 갈조류인 지층이로부터 균주를 분리하였고 16S rRNA 염기서열을 분석한 결과, *Vibrio* sp. V140으로 동정되었으며 PKA 1003으로 명명하였다. *Vibrio* sp. PKA 1003 균주의 최적 생육 특성을 알아본 결과, pH 7, 3% NaCl, 25°C 및 48시간이었으며, 6% 알긴산과 1:1 배양 시 분해 효율이 가장 좋은 것으로 나타났다. *Vibrio* sp. PKA 1003 균주가 생산하는 조효소의 알긴산 분해 최적 조건은 pH 9, 30°C, 6% 알긴산 및 63시간으로 나타났으며, 배양 시간에 따라 TLC를 실시한 결과, 배양 12시간부터 서서히 분해되어 2개의 spot을 형성하는 것을 확인하였으며, 조효소액에 의해 알긴산이 여러 가지 단당 또는 올리고당으로 저분자화되는 것을 확인하였다. 또한 조효소액에 trypsin을 처리하여 실험한 결과, trypsin 처리구 및 조효소액 처리구의 환원당 생성량이 각각 70.91 및 538.62 µg/mL로써 알긴산 분해 활성이 효소에 의한 것임을 확인하였다. 이상의 결과들을 종합해 볼 때, *Vibrio* sp. PKA 1003의 최적 생육 조건 및 알긴산 분해 최적 조건에서 알긴산 분해 효소 및 알긴산 올리고당을 효율적으로 획득할 수 있을 것으로 사료된다.

문 헌

- Joo DS, Lee JS, Park JJ, Cho SY, Kim HK, Lee EH. 1996. Preparation of oligosaccharides from alginic acid by enzymic hydrolysis. *Korean J Food Sci Technol* 28: 146-151.
- Joo DS, Lee EH. 1993. Purification of extracellular enzyme produced by *Vibrio* sp. AL-145. *J Korean Soc Food Nutr* 22: 234-239.
- Shin JW. 2012. Cloning and characterization of oligomeric alginate lyase from *Stenotrophomonas* sp. KJ-2. *MS Thesis*.

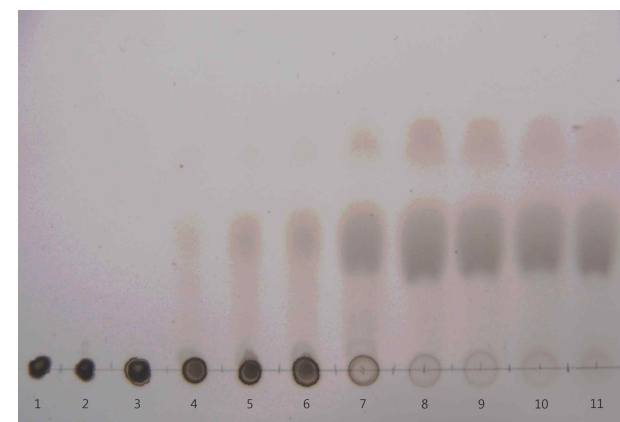


Fig. 6. TLC analyses of reaction products from sodium alginate. Reaction time: lane 1, 0 hr; lane 2, 3 hr; lane 3, 6 hr; lane 4, 12 hr; lane 5, 15 hr; lane 6, 18 hr; lane 7, 21 hr; lane 8, 24 hr; lane 9, 31 hr; lane 10, 42 hr; lane 11, 63 hr.

한 알긴산 분해산물을 TLC를 이용하여 분석하였다. 그 결과 (Fig. 6) 배양 6시간까지는 전개용매에 의한 이동이 나타나지 않았으나 배양 12시간부터 알긴산이 서서히 분해되어 2개의 spot이 생성되기 시작하였으며, 24시간까지 농도가 서서히 짙어지는 것을 관찰할 수 있었다. 배양 24시간 이후부터 최적 분해 시간까지는 TLC 상으로 큰 차이가 나타나지 않았으며, 이상으로부터 알긴산 분해 효소에 의해 알긴산이 단당 또는 올리고당으로 사료되어지는 여러 가지 저분자 물질로 분해되는 것을 확인할 수 있었으며, *Vibrio* sp. PKA 1003 균주가 생산하는 효소가 해조다당인 알긴산을 저분자화 하기 위해 유용하게 이용될 것으로 사료된다.

알긴산 분해 조효소액에 대한 trypsin의 영향

Vibrio sp. PKA 1003 균주가 생산하는 조효소액에 trypsin을 처리한 결과 (Table 6), trypsin 처리구 및 조효소액 처리구의 환원당 함량이 각각 70.91 및 538.62 µg/mL로 조효소액에 trypsin을 처리할 시 그 활성이 현저하게 감소되는 것

- Kyung Hee University, Gyeonggi-do, Korea.
4. Lee JH, Lee EY. 2003. Isolation of alginate-degrading marine bacteria and characterization of alginase. *J Life Sci* 13: 718-722.
 5. Jung DY, Son CW, Kim SK, Kim YJ, Chung CH, Lee JW. 2009. Biosorption of metal ions by seaweed alginate, polygluronate and polymannuronate. *J Life Sci* 19: 553-560.
 6. Lange III LG, Spilburg CA. 1989. Use of sulfated polysaccharides to decrease cholesterol and fatty acid absorption. *US Patent* 5,063,210.
 7. Choi JH, Kim DW. 1997. Effect of alginic acid-added functional drink (HAEJOMIN) in brown algae (*Undaria pinnatifida*) on obesity and biological activity of SD rats. *Korean J Life Sci* 7: 361-370.
 8. Lee BH, Lee SB, Kim WK. 2009. Alginate fiber. *Fiber Tech Ind* 13: 21-24.
 9. Davidson IW, Sutherland IW, Lawson CJ. 1976. Purification and properties of an alginate lyase from a marine bacterium. *Biochem J* 159: 707-713.
 10. Güven KC, Özsoy Y, Ulutin ON. 1991. Anticoagulant, fibrinolytic and antiaggregant activity of carrageenans and alginic acid. *Botanica Marina* 34: 429-432.
 11. Joo DS, Lee JS, Park JJ, Cho SY, Ahn CB, Lee EH. 1995. Purification and characterization of the intracellular alginase from *Vibrio* sp. AL-145. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 23: 432-438.
 12. Kaneko Y, Yonemoto Y, Okayama K, Kimura A, Murata K. 1990. Symbiotic formation of alginate lyase in mixed culture of bacteria isolated from soil. *J Ferment Bioeng* 69: 192-194.
 13. Takeuchi T, Murata K, Kusakabe I. 1994. A method for depolymerization of alginate using the enzyme system of *Flavobacterium multivolum*. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 41: 505-511.
 14. Joo DS, Lee JS, Cho SY, Shin SJ, Lee EH. 1995. Changes in functional properties of alginic acid by enzymatic degradation. *Korean J Food Sci Technol* 27: 86-91.
 15. Kim OJ, Lee DG, Lee SM, Lee SJ, Do HJ, Park HJ, Kim A, Lee JH, Ha JM. 2010. Isolation and characteristics of alginate-degrading *Methylobacterium* sp. HJM27. *Kor J Microbiol Biotechnol* 38: 144-150.
 16. Wasikiewicz JM, Yoshii F, Nagasawa N, Wach RA, Mitomo H. 2005. Degradation of chitosan and sodium alginate by gamma radiation, sonochemical and ultraviolet methods. *Radiat Phys Chem* 73: 287-295.
 17. Lee DS, Kim HR, Pyeun JH. 1998. Effect of low-molecularization on rheological properties of alginate. *J Korean Fish Soc* 31: 82-89.
 18. Lee JH, Bae MJ, Kim YC, Nam SW. 2009. Identification and characterization of alginate lyase producing *Pseudomonas* sp. N7151-6. *Kor J Microbiol Biotechnol* 37: 350-354.
 19. Kim OJ. 2011. Isolation and characterization of alginate degrading bacteria separated from brown seaweed. *MS Thesis*. Silla University, Busan, Korea.
 20. Uo MH, Joo DS, Cho SY, Min TS. 2006. Purification and characterization of the extracellular alginase produced by *Bacillus licheniformis* AL-577. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 231-237.
 21. Gacesa P. 1987. Alginate modifying enzymes: a proposed unified mechanism of action for the lyases and epimerases. *FEBS Lett* 212: 199-202.
 22. Michaud P, Da Costa A, Courtois B, Courtois J. 2003. Polysaccharide lyases: recent developments as biotechnological tools. *Crit Rev Biotechnol* 23: 233-266.
 23. Wong TY, Preston LA, Schiller NL. 2000. Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and application. *Annu Rev Microbiol* 54: 289-340.
 24. Hu X, Jiang X, Hwang HM. 2006. Purification and characterization of an alginate lyase from marine bacterium *Vibrio* sp. mutant strain 510-64. *Curr Microbiol* 53: 135-140.
 25. Kim DE, Lee EY, Kim HS. 2009. Cloning and characterization of alginate lyase from a marine bacterium *Streptomyces* sp. ALG-5. *Mar Biotechnol (NY)* 11: 10-16.
 26. Iwamoto Y, Araki R, Iriyama K, Oda T, Fukuda H, Haya-shida S, Muramatsu T. 2001. Purification and characterization of bifunctional alginate lyase from *Alteromonas* sp. strain no. 272 and its action on saturated oligomeric substrates. *Biosci Biotechnol Biochem* 65: 133-142.
 27. Nakada HI, Sweeny PC. 1967. Alginic acid degradation by eliminases from abalone hepatopancreas. *J Biol Chem* 242: 845-851.
 28. Nisizawa K, Fujibayashi S, Kashiwabara Y. 1968. Alginate lyases in the hepatopancreas of a marine mollusc, *Dolabella auricula* Solander. *J Biochem* 64: 25-37.
 29. Eppley RW, Lasker R. 1959. Alginase in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science* 129: 214-215.
 30. Elyakova LA, Favorov VV. 1974. Isolation and certain properties of alginate lyase VI from the mollusk *Littorina* sp. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology* 358: 341-354.
 31. Muramatsu T, Hirose S, Kayose M. 1977. Isolation and properties of alginate lyase from the mid-gut gland of wreath shell *Turbo cornutus*. *Agric Biol Chem* 41: 1939-1946.
 32. Joo DS, Cho SY, Lee EH. 1993. Isolation of alginate-degrading bacteria and production of alginate-degrading activities by the bacteria. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 21: 207-213.
 33. Eller J, Payne WJ. 1960. Studies on bacterial utilization of uronic acids IV. *J Bacteriol* 80: 193-199.
 34. Nakagawa A, Ozaki T, Chubachi K, Hosoyama T, Okubo T, Iyobe S, Suzuki T. 1998. An effective method for isolating alginate lyase-producing *Bacillus* sp. ATB-1015 strain and purification and characterization of the lyase. *J Appl Microbiol* 84: 328-335.
 35. Kim HS, Bae TJ. 2002. Studies on the hydrolysis of seaweed using microorganisms and its application. *J Korean Fish Soc* 35: 438-444.
 36. Stevens RA, Levin RE. 1976. Viscometric assay of bacterial alginase. *Appl Environ Microbiol* 31: 896-899.
 37. Nelson N. 1994. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J Biol Chem* 153: 375-380.
 38. Li JW, Dong S, Song J, Li CB, Chen XL, Xie BB, Zhang YZ. 2011. Purification and characterization of a bifunctional alginate lyase from *Pseudoalteromonas* sp. SM0524. *Mar Drugs* 9: 109-123.
 39. Baxter RM. 1959. An interpretation of the effects of salts on the lactic dehydrogenase of *Halobacterium salinarum*. *Can J Microbiol* 5: 47-57.
 40. Uo MH, Joo DS, Cho SY. 2006. Screening and cultivation characteristics of alginate degrading bacteria. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 109-114.
 41. Yonemoto Y, Mutata K, Kimura A, Yamaguchi H, Okayama K. 1991. Bacterial alginate lyase: characterization of alginate lyase-producing bacteria and purification of the enzyme. *J Ferment Bioeng* 72: 152-157.
 42. Takeshita S, Sato N, Igarashi M, Muramatsu T. 1993. A highly denaturant-durable alginate lyase from a marine bacterium: purification and properties. *Biosci Biotech Biochem* 57: 1125-1128.