

## Enzymatic Production and Adipocyte Differentiation Inhibition of Low-Molecular-Weight-Alginate

Mi-Ji Park<sup>1</sup>, Yeon-Hee Kim<sup>1,2</sup>, Gun-Do Kim<sup>3</sup> and Soo-Wan Nam<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Smart Bio-Health, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

<sup>2</sup>Department of Biotechnology and Bioengineering, College of Engineering, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

<sup>3</sup>Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Received August 21, 2015 / Revised October 10, 2015 / Accepted October 13, 2015

In this study, we investigated the extraction condition of alginate from *Laminaria japonica*, the enzymatic degradation of the extracted alginate, and the inhibitory activity of the degraded alginate on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. The optimal conditions for the efficient extraction, precipitation, and recovery of alginate from the brown seaweed *L. japonica* were 1% for Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> concentration, 80°C for extraction temperature, and ethanol for precipitation solvent. In the enzymatic reaction for the production of low-molecular-weight alginate (LMWA) by using alginate lyase from *Flavobacterium* sp., the initial concentration of *Laminaria* alginate was 3%. The low-molecular-weight degree from alginate was independent with the enzyme concentration, and the optimal concentration of alginate lyase was found to be 5 unit/ml. Through the enzymatic reaction with 5 unit/ml of alginate lyase at 37°C for 3 hr, the viscosity and molecular weight of LMWA were 4.5 cp and 307 kDa, respectively. Treatment with LMWA significantly suppressed the accumulation of lipid droplet and triglyceride in 3T3-L1 preadipocytes with a dose-dependent manner. Therefore, it seems that LMWA treatment could inhibit the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. These results indicate that LMWA or the degraded alginate produced by alginate lyase enzyme can be useful for the development of anti-obesity biosubstances.

**Key words** : 3T3-L1 preadipocyte, adipocyte differentiation, alginate lyase, *Laminaria japonica*, low-molecular-weight alginate

### 서론

알긴산(alginic acid)은 갈조류의 세포벽 구성 다당류로 건 조중량의 약 40%에 달한다고 알려져 있다. 알긴산은 갈조류(곰피(*Ecklonia stolonifera*), 감태속(*Ecklonia*), 미역속(*Undaria*), 다시마속(*Laminaria*) 등)의 주요 세포벽 구성성분으로 해초산이라고도 하며, 만뉴론산(D-mannuronic acid)과 글루론산(L-gluluronic acid)이 β-1, 4 결합으로 이루어진 이형 다당류이다[3, 5, 6]. 알긴산은 혈청 및 간장 지질의 콜레스테롤 농도를 감소시키고, 지방세포 분화억제 효과와 세포 내 지방세포 유전자 단백질인 렙틴(leptin)의 함량을 감소시키며, 체내 중금속 흡수 제거효과, 젤형성능, 상처봉합제 등의 의약품 소재 및 기능성 식품소재로 응용되는 등, 알긴산의 약학적, 식품적 효능 또한 우수한 것으로 알려져 있다[9, 19, 21, 23].

만뉴론산과 글루론산의 중합으로 되어 있는 거대분자인 알긴산을 폴리만뉴론산(polymannuronate)과 폴리글루론산(polyguluronate)으로 저분자화하면, 항암 및 항균작용, 면역증강, 장내세균 군집 개선효과, 항콜레스테롤 효과, 기타 다양한 생체조절기능성이 월등히 높게 나타나고 있음이 보고되고 있다[4, 20, 23].

하지만 다당류인 알긴산 분해의 어려움 및 기존의 산 또는 염기 가수분해 방법은 저분자 알긴산의 분자량 조절 및 정제 등에 어려움이 있었다. 알긴산 분해효소(alginate lyase)를 이용한 방법으로 최근 신규 미생물로 *Vibrio crassostreae* [1], *Shewanella oneidensis* [2], *Flavobacterium* sp. [8], *Microbacterium oxydans* [11], *Pseudomonas aeruginosa* [12], *Zobellia galactanivorans* [22] 등 다양한 미생물이 보고되었으나, 효소 생산에 관한 연구는 archaea chaperonin과의 공발현 생산[14] 외에는 보고된 바 없다. 따라서, 알긴산 분해효소를 이용한 알긴산의 저분자화 공정 관련 연구 보고도 거의 없는 실정이며 저분자 알긴산의 생리학적 기능(효능)에 대한 연구도 상대적으로 낮은 편이다.

이에 본 연구에서는 다시마 알긴산의 추출공정과 알긴산 분해효소 alginate lyase를 이용한 다시마 알긴산의 저분자화 공정을 최적화하고, 이렇게 생산된 저분자 알긴산의 지방세포

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-890-2276, Fax : +82-51-890-2632

E-mail : swnam@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

(3T3-L1) 분화 억제 활성을 검토하여 항비만 또는 다이어트 식품 소재 개발에 활용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 사용 다시마

부산 기장군 일광면에서 2011년도에 생산한 다시마 중 제품화 과정 중 발생한 건조 다시마 잔여물을 이용하였다. 다시마 잔여물은 정수로 표면을 세척한 후 열풍건조기에서 80℃, 8시간 건조한 후 분쇄기로 분말화(60 mesh)하여 사용하였다.

### 다시마로부터 알긴산의 추출 및 침전 회수

알긴산 추출법 중 추출 수율이 뛰어난 알칼리( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 가수분해 추출법을 사용하여 알긴산을 추출하였다[24]. 알칼리 농도와 추출 온도를 변화시키면서 얻어진 추출 상등액에 초산을 이용하여 pH 2로 조절한 후 교반 정치하였다. 이후 gel을 형성한 알긴산을 회수하였고 동량의 에탄올을 첨가하고 염산(HCl)으로 pH 7로 중화한 후 부유한 알긴산을 회수하였다. 회수한 알긴산은 수세 후 4시간 건조하였다.

### 알긴산의 추출 수율, 분자량 및 점도 측정

다시마로부터 추출한 알긴산의 추출 수율은 사용한 다시마의 원료중량에서 추출 후 얻어진 알긴산의 건조중량으로 계산하였다.

알긴산 추출 수율(%) = 알긴산 건조중량(g) / 시료량(g) × 100

알긴산의 분자량은 GPC (Gel permeation chromatography) 분석을 통하여 측정하였으며 Waters GPC system (Waters, USA)과 검출기 Waters 410 Differential Refractometer 와 TSKgel G6000PW (7.8×300 mm) column을 이용하였다. 분석할 알긴산은 pH 7의 증류수에 녹인 후 35℃와 1.0 ml/min의 유속 조건으로 100  $\mu\text{l}$  시료를 주입하여 분석하고, 분자량 계산을 위하여 표준시료는 polyethylene glycol (PEG)와 polyethylene oxide (PEO)를 사용하였다.

알긴산의 점도는 회전점도계인 Digital Viscometer DV-1 Prime (Brookfield, USA)를 사용하여 3회 반복 측정하였다. 알긴산 시료를 1~3% 농도로 증류수에 녹여서 25℃ 조건으로 알긴산 및 저분자화 알긴산의 점도를 측정하였다.

### 알긴산 분해효소에 의한 알긴산의 저분자화

알긴산의 저분자화 분해를 위해 *Flavobacterium* sp. 유래 알긴산 분해효소(alginate lyase, SIGMA)를 이용하였다. 반응조건은 조건에 맞는 농도로 알긴산을 증류수에 녹인 후, 알긴산 분해효소를 1 unit/ml, 5 unit/ml, 10 unit/ml로 첨가하여 pH 6.3에서 37℃로 3시간 처리하였고, 10분간 boiling으로 효소 반응을 종료시킨 후 알긴산의 분해 양상을 TLC로 분석하였다. 저분자화 정도를 표준물질(disaccharide, trisaccharide, tetra-

saccharide) (11)과 비교하여 확인하였다. 전개용매는 butanol : acetic acid : water (2 : 1 : 1)를 이용하였고, 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  용액으로 110℃에서 15분 발색하여 알긴산의 분해 양상을 분석하였다.

저분자 알긴산은 에탄올을 이용하여 침전시켰다. 침전물을 회수하여 50℃에서 10시간 건조하여 분쇄기로 분말(100 mesh)을 제조하여 저분자 알긴산을 제조하고 지방세포 분화 억제 실험에 사용하였다.

### 저분자화 알긴산의 지방세포 분화 억제 효과

다시마 유래 저분자화 알긴산(저분자 폴리만)의 지방세포 분화억제 효과를 확인하기 위해 murine 3T3-L1 지방세포를 이용하였다. 먼저 3T3-L1 지방전구세포를 35mm culture dish에 배양한 뒤 confluent 상태가 되게 37℃, 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 배양하였다. Confluent 상태일 때, 10% FBS, 0.1% gentamycin 이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 2일간 더 배양하였다. 그 후 분화배지(10% FBS, 0.1% gentamycin, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  insulin, 0.5  $\mu\text{M}$  dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (MDI))로 교환할 때 저분자 폴리만을 같이 처리하였다. 2일 배양 후에도 역시 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  insulin 이 포함된 DMEM 배지에 저분자 알긴산을 처리하여 3~5일간 배양하였고, 저분자 알긴산을 처리하지 않은 지방세포와 비교하여 Oil Red O staining 을 실시하였다.

## 결과 및 고찰

### 다시마로부터 알긴산의 추출, 침전 및 회수

다시마 잔여물로부터 알긴산을 황산·알칼리 가수분해법과 알칼리 가수분해법으로 추출하여 추출수율을 비교하였다. 그 결과 22.4%와 21.7%의 알긴산 추출 수율을 보여 두 추출법에서 큰 차이가 나타나지 않았다. 추출의 경제성을 고려하여 공정 단계가 적은 알칼리 가수분해법을 사용하고 이때 추출 온도와  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 의 농도에 따른 추출 수율을 측정하였다. 추출 온도에 따라 알긴산 추출 수율은 증가하였지만, 비례적으로 증가하지 않았고, 80℃에서부터 수율(23.3%)은 거의 일정하여 추출 온도는 80℃로 결정하였다.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 의 농도 1% 이상에서는 추출 수율(약 23%)에 유의적인 증가가 없었으므로 최적  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 의 농도를 1%로 결정하였다. 알긴산을 침전, 회수하는 방법에는 산, 염화칼슘( $\text{CaCl}_2$ ), 및 에탄올이 이용되는데 이들 침전 방법에 따른 추출 수율을 비교하였다. 에탄올과 산의 순차 침전에서는 28.5%의 추출 수율을, 에탄올 침전이 27.8%로 그 다음 높은 추출 수율을 보였고, 산 침전은 가장 낮은 추출 수율을 보였다(19.6%). 침전 방법을 조금 개선하여 에탄올 침전 후 잔여액에 다시 pH를 2로 낮추어 정치시키면 알긴산을 추가로 회수할 수 있어서 추출 수율을 조금 더 높일 수 있었다. 또한, 위 침전 방법에 따라 추출한 알긴산의 알긴산

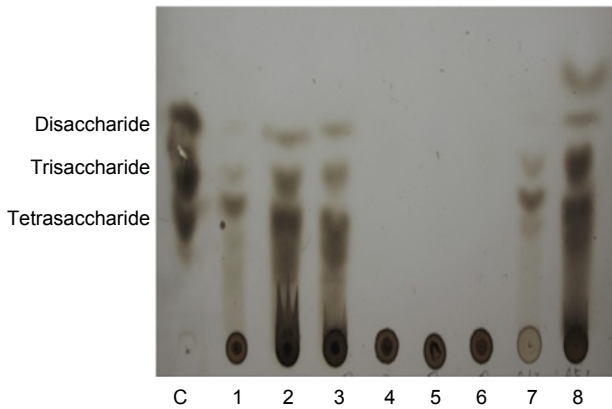


Fig. 1. TLC analysis of alginate obtained by different sedimentation methods in which alginate was treated with or without alginate lyase. C, control(alginate oligosaccharides); lane 1, enzyme-treated alginate by CaCl<sub>2</sub> sedimentation; lane 2, enzyme-treated alginate by acid sedimentation; lane 3, enzyme-treated alginate by ethanol sedimentation; lane 4, alginate by CaCl<sub>2</sub> sedimentation; lane 5, alginate by acid sedimentation; lane 6, alginate by ethanol sedimentation; lane 7, enzyme-treated alginate (15 cp, 0.1%); lane 8, enzyme-treated alginate (15 cp, 0.5%).

분해효소(*Flavobacterium* sp. 유래 alginate lyase) 처리에 의한 저분자화 정도를 TLC로 확인한 결과에서(Fig. 1) 염화칼슘으로 침전한 알긴산의 분해도가 가장 낮게 나타났고, 에탄올 침전과 산 침전 시 알긴산의 분해정도가 높게 나타나 추출 수율이 높고 저분자화 반응에도 문제가 없는 에탄올 침전 방법을 최종 선택하였다.

**추출 침전 방법에 따른 알긴산의 저분자화 정도**

에탄올 침전과 산 침전, 염화칼슘 침전법으로 추출한 알긴산을 알긴산 분해효소(*Flavobacterium* sp. 유래 alginate lyase, 1 unit/ml)로 분해한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 염화칼슘

침전법으로 회수한 알긴산의 저분자화 반응 정도가 가장 낮게 나타났으며, 에탄올 침전법과 산 침전법의 알긴산이 disaccharide와 trisaccharide의 저분자화 정도가 가장 많이 나타나 저분자화 반응 정도가 높았지만, 두 침전방법으로 얻은 알긴산에 대한 각각의 저분자화 반응 정도는 크게 차이가 나타나지 않았다.

**다시마 알긴산의 저분자화를 위한 alginate lyase의 최적 반응 조건**

다시마 추출 알긴산의 농도를 3%와 5%로 준비하여 alginate lyase 1 unit/ml 과 효소 반응시킨 후, 저분자화 정도를 TLC로 분석하였다(Fig. 2). 5% 알긴산 농도로 반응한 경우 점도가 높고 반응액의 유동성이 낮아 반응하기에 부적합하였고, 3% 농도에 비해 저분자화 정도에 차이가 나타나지 않는 것으로 확인되어, 다시마 유래 알긴산의 저분자화 효소 반응시 초기 알긴산 농도는 3%로 결정하였다.

저분자화 효소 반응 조건을 좀 더 확립하기 위하여 효소 농도와 반응 시간에 따른 저분자화 정도를 분석하였다(Fig. 3). TLC 분석 결과 알긴산 분해효소의 농도가 높을수록 저분자화 정도도 증가하는 것을 확인하였다. 하지만 알긴산 분해효소를 5 unit/ml로 반응한 것과 10 unit/ml로 반응한 결과를 비교하였을 경우 저분자화 되는 정도에는 큰 차이가 없고, 경제적인 생산 비용을 고려하여 알긴산 분해효소를 5 unit/ml로 처리하는 것이 가장 적당한 것으로 결정하였다.

**알긴산의 분자량 및 점도 측정**

다시마 유래 알긴산의 저분자 반응 후 점도 변화를 측정하였다. 측정 결과 저분자 효소 반응 전 다시마 유래 알긴산의 점도는 40,000 cp 이상이었지만, 5 unit/ml 의 알긴산 분해효소 농도로 37°C에서 3시간 반응하여 저분자화한 알긴산의 점도는 45 cp 로 물과 비슷한 정도의 점도로 매우 낮아지는 것을 확인하였다.

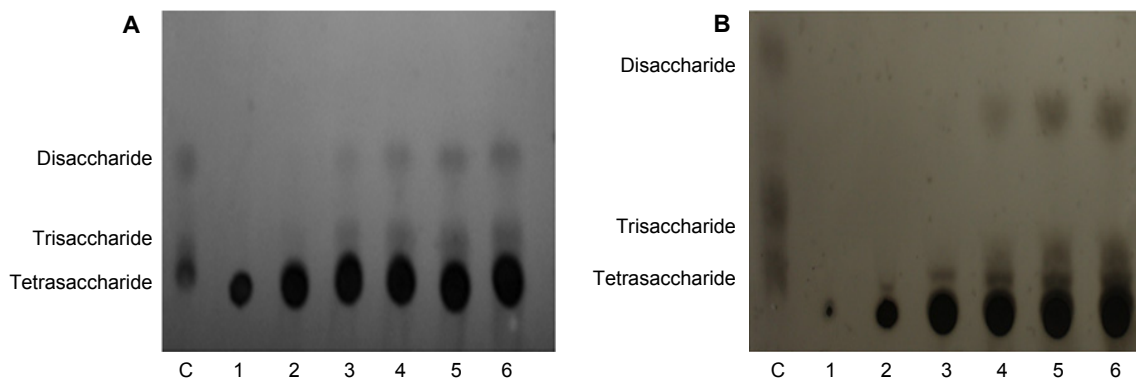


Fig. 2. TLC analysis of alginate degradation by 1 unit/ml alginate lyase with 3% (A) and 5% (B) alginate concentration. C, control (alginate oligosaccharides); Reaction time : lane 1, 0 min; lane 2, 10 min; lane 3, 30 min; lane 4, 1 hr; lane 5, 2 hr; lane 6, 3 hr.

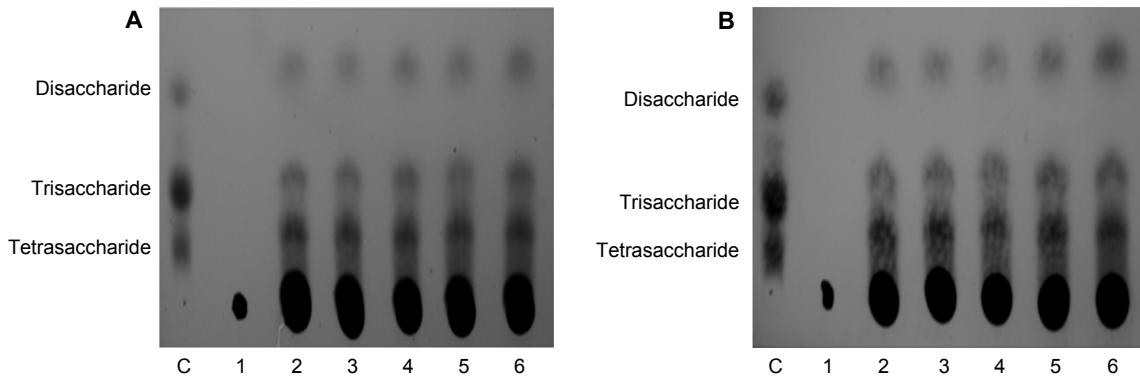


Fig. 3. TLC analysis of alginate degradation by alginate lyase with 5 unit/ml (A) and 10 unit/ml (B) in which the alginate concentration was 3%. C, control (alginate oligosaccharides); Reaction time : lane 1, 0 min; lane 2, 10 min; lane 3, 30 min; lane 4, 1 hr; lane 5, 2 hr; lane 6, 3 hr.

알긴산의 분자량 변화는 알긴산 추출 가수분해의 온도가 높아짐에 따라 점차적으로 감소하고, 가수분해의 pH가 저하됨에 따라 급격히 감소한다. pH 0.5~2.5의 경우 50,000 Da이하의 분자량 분포는 pH가 저하됨에 따라 증가하였지만 분자량은 큰 변화가 나타나지 않았다[17, 18]. 저분자화 반응에 의한 알긴산의 분자량 변화는 알긴산 추출 침전 방법에 따라 분자량의 분포는 약간의 차이를 보여서 알칼리(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 추출법에서의 분자량(1,307,415 Da)과[15], 에탄올 침전법으로 얻은 알긴산의 분자량이 크게 나타났지만(1,970,000 Da), 식품첨가물로 시판(제주화학, 한국) 중인 알긴산 나트륨의 분자량(4,184,238 Da)보다는 낮게 나타났다. 산(염산 또는 구연산, pH 4.5) 또는 열(121 °C, 30분) 가수분해법에 의한 저분자 알긴산의 분자량은 383~728 kDa, 점도는 3,940 cp 임에 비해[15, 17, 18], 본 연구에서의 알긴산 분해효소로 저분자화한 알긴산의 분자량은 307 kDa, 점도는 4.5 cp로 매우 낮아서 지방세포로의 흡수 등이 크게 향상되어 지방과립 형성과 중성지방 생성 억제 등에 효과적으로 작용할 것으로 추정된다.

### 저분자화 알긴산의 지방세포 분화 억제 효과

알긴산은 농도 의존적으로 3T3-L1 세포의 분화를 억제하고, triglyceride의 함량을 감소시키며, 3T3-L1 세포의 분화를 촉진시키는 인자로 밝혀진 insulin과 IGF-I (insulin-like growth factor-I)의 작용을 특이적으로 억제한다는 것이 알려져 있으나[7], alginate lyase 효소에 의해 생성된 저분자 알긴산의 3T3-L1 세포의 분화 억제에 대한 연구는 미흡하다. 따라서 본 실험에서는 다시마 알긴산의 저분자화물의 지방 세포 분화억제 효과를 확인하기 위해 3T3-L1 지방전구세포가 지방세포로 분화할 때 저분자화 알긴산을 첨가하여 분화억제 정도를 확인하였다. 또한, 저분자화 알긴산을 농도별(125 µg/ml, 250 µg/ml)로 처리하여 배양한 지방세포와 저분자화 알긴산을 처리하지 않은 지방세포에서 생성된 지방 과립과 triglyceride의 함량을 측정된 결과는 Fig. 4와 같다.

Fig. 4A에서 볼 수 있듯이 다시마 유래 저분자화 된 알긴산을 처리하지 않았을 경우에는 세포질 내 중성지방의 형성이 관찰되었지만, 저분자화 알긴산을 처리하였을 경우에는 중성지방의 형성이 억제되는 것을 볼 수 있었다. 또한, 저분자화

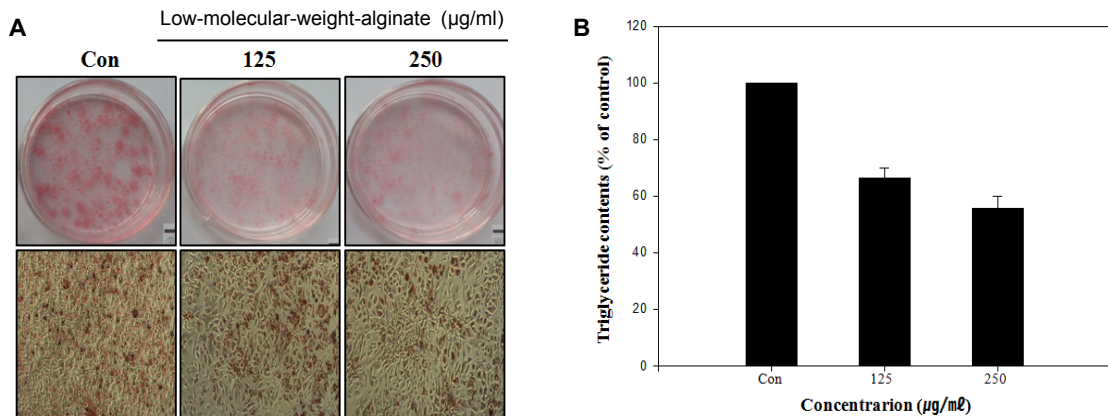


Fig. 4. Inhibitory effects of low-molecular-weight-alginate on the accumulation of lipid droplet (A) and triglyceride (B) in differentiated 3T3-L1 mouse preadipocytes.

알긴산 125 µg/ml 및 250 µg/ml 농도에서 대조군(무처리)과 비교하여 각각 33.7%와 44.4% 정도로 triglyceride 중성지방 축적이 감소됨을 확인하였다(Fig. 4B). 따라서, 저분자화 알긴산에서 지방세포 분화억제 효과가 있음을 확인하였다. 0.5% 알긴산에 의한 지방세포 내 triglyceride 축적 감소된 보고[7]와 비교하면, 본 연구에서는 약 2,000배 정도 낮은 저분자 알긴산 농도(250 µg/ml)에서 지방과립 생성과 triglyceride 축적 감소를 확인한 바, 저분자 알긴산의 지방세포 분화 억제 효과가 훨씬 우수함을 알 수 있었다. 또한, 산가수분해에 의해 얻은 저분자 알긴산인 폴리만뉴로네이트(분자량 40 kDa)도 혈청내 triglyceride, 인지질, 총 콜레스테롤 등의 수치와 지방세포 및 쥐 혈청 내 leptin 발현량을 감소시키는 농도가 0.5%로 알려져 [10,13], 본 연구에서의 저분자 알긴산(307 kDa, 4.5 cp)이 훨씬 낮은 농도(250 µg/ml)에서 효과적으로 지방세포의 분화를 억제시킴을 알 수 있었다. 결론적으로, 본 연구에서의 효소에 의한 저분자화 알긴산(polymannuronate)은 지방세포로의 흡수 등이 크게 향상되어 지방과립 형성과 중성지방(triglyceride 등) 생성 억제 등에 효과적으로 작용함으로써 지방세포의 분화 억제 효능을 발휘한 것으로 판단된다.

## 결론

기장 지역 다시마로부터 알긴산의 효율적인 추출, 침전, 회수조건은 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 80°C, 에탄올 침전 회수법이었고, 알긴산 분해효소(*Flavobacterium* sp. 유래 alginate lyase)를 이용한 저분자화 효소 반응 시 최적 초기 알긴산 농도는 3%였다. 알긴산 분해효소 농도에 따른 알긴산의 저분자화 정도에는 큰 차이가 없고, 경제적인 생산 비용을 고려하면 최적의 알긴산 분해효소 농도는 5 unit/ml 였으며, 5 unit/ml의 알긴산 분해효소 농도로 37°C에서 3시간 반응하여 저분자화한 알긴산의 점도는 4.5 cp, 분자량은 307,008 Da 였다. 3T3-L1 지방전구세포에 저분자화 알긴산을 125 µg/ml, 250 µg/ml 농도로 처리하였을 때 지방과립 형성과 triglyceride 중성지방 축적이 감소됨을 확인하였다. 따라서, alginate lyase로 저분자화된 알긴산은 지방세포 분화억제 효과가 있음을 확인하였다.

## 감사의 글

본 연구는 2015학년도 동의대학교 교내연구비(2015AA128)와 산업통상자원부·부산광역시 지원 지역혁신센터사업(RIC 08-06-07) 동의대학교 블루바이오 소재개발 및 실용화 지원센터의 지원으로 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

## References

- Chan, S. W., Kim, K. B. W. R., Kim, D. H., Jung, S. A., Kim, H. J., Jeong, D. H., Jung, H. Y., Lim, S. M., Hong, Y. K. and Ahn, D. H. 2012. Optimization of conditions for the production of aginate-degrading crude enzyme from *Vibrio crassostreae* PKA 1002. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 243-249.
- Chan, S. W., Kim, K. B. W. R., Kim, D. H., Jung, S. A., Kim, H. J., Jeong, D. H., Jung, H. Y., Kang, B. K., Bark, S. W., Lim, S. M., Hong, Y. K. and Ahn, D. H. 2013. Optimization of conditions for the production and properties of alginate-degrading crude enzyme from *Shewanella oneidensis* PKA 1008. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 372-378.
- Davidson, I. W., Sutherland, I. W. and Lawson, C. J. 1976. Purification and properties of an alginate lyase from a marine bacterium. *Biochem. J.* **159**, 707-713.
- Guven, K. C., Ozsoy, Y. and Ulutin, O. N. 1991. Anticoagulant, fibrinolytic and antiaggregant activity of carrageenans and alginic acid. *Biotan. Marina* **34**, 429-435.
- Haug, A., Larsen, B. and Smidsrod, O. 1967. Studies on the sequence of uronic acid residues in alginic acid. *Acta. Chemica. Scandinavia* **21**, 691-704.
- Hirst, E. L. and Rees, D. A. 1965. The structure of alginic acid. Part V. isolation and unambiguous characterization of some hydrolysis products of the methylated polysaccharide. *J. Chem. Soc.* **7**, 1182-1187.
- Hwang, H. J., Pyeun, J. H. and Nam, T. J. 2000. The effects of alginic acid on 3T3-L1 cell's differentiation. *J. Kor. Fish. Soc.* **33**, 541-545.
- Inoue, A., Takadono, K., Nishiyama, R., Tajima, K., Kobayashi, T. and Ojima, T. 2014. Characterization of an alginate lyase, FlAlyA, from *Flavobacterium* sp. strain UMI-01 and its expression in *Escherichia coli*. *Mar. Drugs* **12**, 4693-4712.
- Jeong, H. J., Lee, S. A., Moon, P. D., Na, H. J., Park, R. K., Um, J.Y., Kim, H. M. and Hong, S. H. 2006. Alginic acid has anti-anaphylactic effects and inhibits inflammatory cytokine expression via suppression of nuclear factor-kappaB activation. *Clin. Exp. Allergy* **36**, 785-794.
- Kim, I. H. and Nam, T. J. 2004. The effects of polymannuronates on leptin in 3T3-L1 adipocytes. *J. Kor. Fish. Soc.* **37**, 372-379.
- Kim, E. J., Fathoni, A., Jeong, G. T., Jeong, H. D., Nam, T. J., Kong, I. S. and Kim, J. K. 2013. A novel alginate-and laminarin-degrading bacterium for the reutilization of brown-seaweed waste. *J. Environ. Manage.* **30**, 153-159.
- Kim, H. S. 2013. Synergistic effect of acetylalginase and alginate lyase on the degradation of acetylalginase from *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 39324. *J. Life Sci.* **23**, 1420-1427.
- Joh, I. S., Kim, I. H., Kwon, M. J. and Nam, T. J. 2015. Dietary effects of polymannuronate added to hamburger buns on lipid metabolism in rats. *Kor. J. Fish. Aquat. Sci.* **48**, 187-192.
- Kim, S. W., Kim, G. D. and Nam, S. W. 2015. Coexpression of alginate lyase with hyperthermophilic archaea chaperonin in *E. coli*. *J. Life Sci.* **25**, 130-135.
- Kim, Y. Y. and Cho, Y. J. 2000. Studies on physicochemical and biological properties of depolymerized alginate from sea tangle, *Laminaria japonicas* by thermal decomposition. *J.*

1. Chan, S. W., Kim, K. B. W. R., Kim, D. H., Jung, S. A., Kim,

- Kor. Fish. Soc. **33**, 325-330.
16. Lee, J. H., Bae, M. J., Kim, Y. C. and Nam, S. W. 2009. Identification and characterization of alginate lyase producing *Pseudomonas* sp. N7151-6. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 350-354.
  17. Lim, Y. S. and You, B. J. 2006. Effects of hydrolysis pH on distribution of molecular weights of alginate of sea tangle *Laminaria japonica*. *J. Kor. Fish. Soc.* **39**, 313-317.
  18. Lim, Y. S. and You, B. J. 2007. Effects of hydrolysis temperature on the distribution of the molecular weights of alginates prepared from sea tangle, *Laminaria japonica*. *Kor. Fish. Soc.* **40**, 187-192.
  19. Paxman, J. R., Richardson, J. C., Dettmar, P. W. and Corfe, B. M. 2008. Alginate reduces the increased uptake of cholesterol and glucose in overweight male subjects: a pilot study. *Nutr. Res.* **28**, 501-505.
  20. Sellimi, S., Younes, I., Ayed, H. B., Maalehj, H., Montero, V., Rinaudo, M., Dahia, M., Mechicho, T., Hajji, M. and Nasri, M. 2015. Structural, physicochemical and antioxidant properties of sodium alginate isolated from a tunisian brown seaweed. *Int. J. Biol. Macromol.* **72**, 1358-1367.
  21. Syad, A. N., Shunmugiah, K. P. and Kasi, P. D.. 2013. Antioxidant and anti-cholinesterase activity of *Sargassum wightii*. *Pharm. Biol.* **51**, 1401-1410.
  22. Thomas, F., Lundqvist, L. C., Jam, M., Jeudy, A., Barbeyron, T., Sandstrom, C., Michel, G. and Czizek, M. 2013. Comparative characterization of two marine alginate lyases from *Zobellia galactanivorans* reveals distinct modes of action and exquisite adaptation to their natural substrate. *J. Biol. Chem.* **288**, 23021-23037.
  23. Ueno, M. and Oda, T. 2014. Biological activities of alginate. *Adv. Food Nutr. Res.* **72**, 95-112.
  24. Yoon, M. O., Lee, S. C., Rhim, J. W. and Kim, J. M. 2004. Comparison of alginic acid yields and viscosity by different extraction conditions from various seaweeds (*Laminaria religiosa*, *Hizikia fusiforme*, and *Undaria pinnatifida*). *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.* **33**, 747-752.

---

### 초록 : 저분자 알긴산의 효소적 생산과 지방세포 분화 억제 효과

박미지<sup>1</sup> · 김연희<sup>1,2</sup> · 김군도<sup>3</sup> · 남수원<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>동의대학교 스마트바이오헬스학과, <sup>2</sup>동의대학교 공과대학 생명공학과, <sup>3</sup>부경대학교 미생물학과)

다시마로부터 알긴산의 효율적인 추출, 침전, 회수조건은 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 80°C, 에탄올 침전 회수법이었고, 알긴산 분해효소(*Flavobacterium* sp. 유래 alginate lyase)를 이용한 저분자화 효소 반응 시 최적 초기 알긴산 농도는 3%였다. 알긴산 분해효소 농도에 따른 알긴산의 저분자화 정도에는 큰 차이가 없고, 경제적인 생산 비용을 고려하면 최적의 알긴산 분해효소 농도는 5 unit/ml였으며, 5 unit/ml의 알긴산 분해효소 농도로 37°C에서 3시간 반응하여 저분자화한 알긴산의 점도는 4.5 cp, 분자량은 307,008 Da였다. 3T3-L1 지방전구세포에 저분자화 알긴산을 125 µg/ml, 250 µg/ml 농도로 처리하였을 때 지방과립 형성과 triglyceride 중성지방 축적이 감소됨을 확인하였다. 따라서, alginate lyase로 저분자화된 알긴산은 지방세포 분화억제 효과가 있음을 확인하였다.