



## 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

工學碩士 學位論文

*Shewanella oneidensis* PKA 1008

유래 알긴산 분해효소의  
분리 및 산업적 이용가능성



2016年 2月

釜慶大學校 大學院

食 品 工 學 科

朴 時 佑

工學碩士 學位論文

*Shewanella oneidensis* PKA 1008

유래 알긴산 분해 효소의  
분리 및 산업적 이용가능성

指導教授 安 東 賢

이 論文을 工學碩士 學位論文으로 提出함

2016年 2月

釜慶大學校 大學院

食 品 工 學 科

朴 時 佑

# 朴 時 佑의 工學碩士 學位論文으로 認准함

2016年 2月



주 심 수산학박사 조 영 제



위 원 공학박사 전 병 수



위 원 농학박사 안 동 현



# 목 차

Abstract .....	V
----------------	---

서 론 .....	1
-----------	---

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

1-1. 시험균주 .....	4
1-2. 시약 .....	4
1-3. 실험동물 .....	4

### 2. 방 법

2-1. 조효소액 제조 .....	5
2-2. 조효소액의 특성 .....	5
2-2-1. pH .....	5
2-2-2. 온도 .....	5
2-2-3. 기질농도 .....	6
2-2-4. 반응시간 .....	6
2-3. 효소 정제 .....	6
2-3-1. Ammonium sulfate 염석 .....	6
2-3-2. 투석 .....	7

2-3-3. Ion exchange chromatography .....	7
2-3-4. Gel filtration chromatography .....	7
2-3-5. 단백질 농도 측정 .....	8
2-3-6. 환원당 정량 .....	8
2-4. 정제효소의 특성 .....	9
2-4-1. pH .....	9
2-4-2. 온도 .....	9
2-4-3. NaCl 농도 .....	9
2-4-4. 금속이온 영향 .....	9
2-5. 산업적 이용 가능성 .....	10
2-5-1. 알긴산기질 저분자화 .....	10
2-5-2. 저분자 알긴산 항산화효과 .....	11
2-5-3. 저분자 알긴산 항염증효과 .....	11
2-6. 통계처리 .....	16

## 결과 및 고찰

1. 조효소액의 특성 .....	19
1-1. pH .....	19
1-2. 온도 .....	21
1-3. 기질농도 .....	23
1-4. 반응시간 .....	25
2. 효소정제 .....	27
2-1. Ammonium sulfate 염석 및 투석 .....	27
2-2 Ion exchange chromatography .....	29

2-3 Gel filtration chromatography .....	29
2-4 2nd Ion exchange chromatography .....	30
3. 정제효소 특성 .....	35
3-1. pH .....	35
3-2. 온도 .....	35
3-3. NaCl 농도 .....	38
3-4. 금속이온 영향 .....	38
4. 산업적 이용 가능성 .....	42
4-1. 알긴산 저분자화 TLC .....	42
4-2. 저분자 알긴산 항산화효과 .....	44
4-3. 저분자 알긴산 항염증효과 .....	46
요 약 .....	61
참 고 문 헌 .....	64

# Separation of Alginate Lyase from *Shewanella oneidensis* PKA 1008 and Its Potential Industrial Applications

Si Woo Bark

*Department of Food Science and Technology,  
Graduate School, Pukyong National University*

## Abstract

Alginate is a linear polysaccharide composed of  $\beta$ -D-mannuronate and  $\alpha$ -L-guluronate, arranged in three different ways: poly- $\beta$ -D-mannuronate, poly- $\alpha$ -L-guluronate, and hetero-polymeric region in which there is random arrangement of the monomer. Alginate oligosaccharide has many biological functions including antioxidant, anti-inflammatory, and anticholesterol activities. So, numerous studies are going on to improve the use of alginate, and one of them is lowering the molecular weight through alginate degradation. Thus, alginate lyases have attracted much attention as biocatalysts for preparation of functional oligosaccharide from alginate. This study was conducted to separate alginate degrading enzyme from *Shewanella oneidensis* PKA 1008 and investigate its biological activity. The optimal conditions of crude enzyme for



alginate degrading activity were pH 9, 30°C, concentration of alginate 7% concentration and 48 h reaction time. Alginate degrading enzyme was purified by ammonium sulfate salting out, DEAE-sephadex, sephadex G-100, and 2<sup>nd</sup> DEAE-sephadex column chromatography. The total activity and specific activity of purified alginate degrading enzyme were 1.06 U and 25.238 U/mg, respectively. The optimal conditions for the purification of enzyme were pH 9.0, 30°C, and 0.05 M NaCl concentration. The activity of enzyme was inhibited by  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ , and  $\text{Fe}^{2+}$ . To measure biological activity of alginate hydrolysate by crude enzyme from *S. oneidensis* PKA 1008, alginate and crude enzyme was incubated for 0-60 h and antimicrobial, antioxidant, and antiinflammatory activities were investigated. The degraded alginate was identified by thin layer chromatography. DPPH radical scavenging activity of alginate hydrolysate at 36-60 h was higher than that of alginate. In particular, the alginate hydrolysate at 60 h showed the highest DPPH radical scavenging activity of 82.10% at 5 mg/mL. The alginate hydrolysate showed significant anti-inflammatory effects. The production of NO and pro-inflammatory cytokines (IL-6, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ ) was significantly decreased without cytotoxicity. In particular, NO level of alginate hydrolysate at 36 h were reduced by 55% at 100  $\mu\text{g/mL}$  and the IL-6 and IL 1 $\beta$  production was decreased to 40% and 55% by alginate hydroysate at 60 h of 100  $\mu$

g/mL. The edema formation in the ICR mouse ear was also reduced compared to that in control. These results indicated that alginate lyase from *Shewanella oneidensis* PKA 1008 can be useful for the production of alginate oligosaccharide and the alginate hydrolysate by alginate lyase has significant antioxidant and anti-inflammatory effects.



## 서 론

해조류는 저온, 고압, 저산소, 고염 등의 독특한 서식환경 조건에 의하여 육상식물과는 다른 특이적인 2차 대사 산물을 생산하며(Fenical, 1983), 이런 2차 대사산물은 항균(Kim et al., 2012), 항산화(Yoon et al., 2010) 및 항염증(Lee et al., 2011) 등 다양한 기능성을 가지는 것으로 알려져 있다. 이러한 해조류의 대표적인 기능성 물질로는 해조류의 세포벽의 골격 구성 및 점질성 물질인 점질다당류가 있다. 대표적으로 갈조류의 알긴산 및 푸코이단, 홍조류의 한천 및 카라기난 등이 있으며, 그 중 알긴산은 독특한 물리적 성질을 지니고 있는 점질다당류로서 식품산업에서 안정제 및 증점제로 사용되고 있으며, 중금속 및 방사능 물질의 체외 배출, 콜레스테롤 저하(Kim et al., 1984), 비만 및 변비 방지 효능(Sato et al., 2002), 혈압 및 당뇨 예방 효과(Suetsuna et al., 2004)가 있는 것으로 알려져 있다.

알긴산은  $\beta$ -1,4-D-mannuronic acid와  $\alpha$ -1,4-L-guluronic acid가 연결된 사슬구조로 이루어져 있고, 단일 중합체 형태로 polymannuronate (M) 또는 polyguluronate (G)형태로 존재하거나, 이종중합체 (MG) 형태로 존재한다. 해조류의 종류, 계절 및 조체의 부위에 따라 M과 G의 구성 비율이 달라지고, 결합 순서 및 결합 구조에 따라 겔 형성능, 흡착능, 점도 및 수분 흡수능력 등의 물리적 특징이 변하는 것으로 알려져 있다(Horn et al., 1999; Moen et al., 1999; Zvyagintseva et al., 2005).

이와 같은 다양한 기능성이 알려지면서 알긴산의 이용을 확대하기 위

해 식품, 화장품 및 의료용 소재 측면에서 많은 연구가 진행되고 있지만, 상온에서 용해시간이 길고, 알코올류 함유 용매에는 난용이며, 농도가 높아짐에 따라 고점도 특성을 보여 산업적으로 이용하는데 제한이 따르고 있다(Cho et al., 2003). 이에 알긴산의 고점도 단점을 보완하고 생리활성을 높이려 알긴산을 저분자화 시켜 올리고당으로 제조하는 연구가 활발히 진행되고 있다(Lee et al., 1993; Lee et al., 1996). 알긴산을 저분자화 하는 방법으로 물리화학적 또는 효소적 가수분해 방법이 있다. 물리화학적 가수 분해는 고온고압(Kim et al., 2010), 방사선 처리(Wasikiewica et al., 2005), 산 및 알칼리 처리(Lee et al., 2006) 방법 등이 있으나, 처리시간이 짧고 간단하지만, 산 또는 열처리를 통해 생성되는 독성 부산물의 작용 및 중화 시 발생하는 염 등에 의해 영향을 받을 수 있으며 정제가 어렵다는 단점이 있다. 반면 효소적 가수분해(Uo et al., 2006) 방법은 물리화학적 방법에 비하여 비용이 많이 들고 열에 대한 안정성 및 활성이 약하며 생산 속도가 느리다는 단점이 있으나, 목적으로 하는 올리고당 생산에 유리하고 반응조건이 온화하며 다른 부산물의 생성을 줄일 수 있어 최근 산업적 이용이 가능한 알긴산 분해 효소에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다(Kim et al., 2012).

알긴산 분해 효소는 알긴산의 glycosidic bond를  $\beta$ -elimination 반응을 통해 C-4와 C-5 사이에 이중결합을 형성하여 결과적으로 비환원성 말단이 4-deoxy-L-erythro-hex-4-enepyranosyluronate인 알긴산 올리고머를 만들면서 알긴산이 분해된다. 이 효소는 대부분의 갈조류나 해양 연체동물, 클로렐라, 해양박테리아에서 발견할 수 있다. 알긴산 분

해효소는 자르는 부위에 따라 알긴산의 중합체의 중간을 자르는 endo-type, 끝 부분을 자르는 exp-type으로 나눌 수 있다. 또한 중간을 자르는 endo-type의 알긴산 분해효소는 기질 특이성에 따라 poly-G-알긴산 분해효소, poly-M-알긴산 분해효소, poly-MG-알긴산 분해효소로 나눌 수 있다(Gacesa, 1987; Wong et al., 2000; Michaud et al., 2003).

현재까지 미생물로부터 유래된 알긴산 분해효소는 *Pseudomonas* sp.(Lee et al., 2009), *Bacillus licheniformis* (Uo et al., 2006), *Streptomyces* sp. (Kim et al., 2007), *Erwinia tasmaniensis* (Kim et al., 2012), *Vibrio* sp. (Joo et al., 1995) 등이 알려져 있으며 해양미생물 유래 알긴산 분해효소는 최적 pH 6-9, 최적 온도 30-50℃, 분자량 20-90 kDa인 것으로 나타났다(Kim et al., 2011).

이에 본 연구에서는 *Shewanella oneidensis* PKA 1008이 생산하는 알긴산 분해효소를 정제 및 효소의 특성을 확인하고 알긴산을 올리고당으로 저분자화 시켜 항산화, 항염증 등 생리활성을 측정하여 산업적 이용가능성에 대하여 제시하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1-1. 시험 균주

본 실험에서 사용한 균주는 부산 연안 송정 앞바다에서 분해가 진행 중인 녹조류 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)로부터 획득한 *Shewanella oneidensis* PKA 1008 (Sunwoo et al., 2013) 균주를 이용하였다.

#### 1-2. 시약

Marine broth (MB)는 Difco사 제품이며, alginic acid sodium salt는 Sigma aldrich사의 제품을 사용하였다. 또한 염석에 사용한 ammonium sulfate ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)는 Junsei사의 제품이며, 투석막(M.W. 12-14 kDa)은 Spectrum Laboratories사의 것을 사용하였다. Chromatography에서 사용한 충전제인 sephadex G-100은 GE healthcare life science사의 것을 사용하였으며, DEAE-sephadex는 Sigma aldrich사의 것을 사용하였다.

#### 1-3. 실험 동물

마우스 귀 조직 관찰 실험에서 생후 8주령의 수컷, ICR 마우스를 오리엔트바이오(Seongnam, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 마우스는 온도 20±2℃, 습도 50±10%, 12시간 명암주기가 유지되는 동물 사

육실에서 1주일간 예비 사육한 후 실험에 사용하였다. 본 실험은 부경대학교 동물실험 윤리위원회로부터 동물실험 승인을 받아 수행하였다 (승인번호 2014-01).

## 2. 방법

### 2-1. 조효소액 제조

*Shewanella oneidensis* PKA 1008를 최적 pH, NaCl 농도, 온도 및 시간 조건으로 대량 배양 후, 원심분리기(Supra 30K, Hanil Sciecn Co., Korea)를 이용하여 4℃에서 10,000×g로 30분간 원심 분리하여 상층액을 조효소액으로 하였다.

### 2-2. 조효소 특성

#### 2-2-1. 최적 pH

2.5% NaCl phosphate buffer (pH 7.0)을 이용하여 알긴산을 수화 하였으며, 0.1 N 및 1 N의 HCl과 NaOH를 이용하여 조효소 및 알긴산의 pH를 2, 4, 6, 7, 8, 9 및 10으로 조정하였다. 조효소 및 알긴산을 1:1로 혼합 후 30℃에서 24 h 배양한 후 점도 및 환원당 함량을 측정하였다.

#### 2-2-2. 최적 온도

0.1 N 및 1N의 HCl과 NaOH를 이용하여 조효소 및 알긴산을 최적 pH로 조정하였다. 조효소와 알긴산을 1:1로 혼합하여 10, 20, 25, 30,



35, 40 및 50℃ 조건에서 24 h 배양한 후, 점도 및 환원당 함량을 측정하였다.

### 2-2-3. 최적 기질 농도

1-9% 농도의 알긴산을 제조 하여 실험에 사용하였으며, 0.1 N 및 1N 의 HCl과 NaOH를 이용하여 조효소 및 알긴산을 최적 pH로 조정하였다, 1-9% 농도의 알긴산과 조효소를 1:1로 혼합하여, 최적 온도에서 24 hr 배양한 후 환원당 함량을 측정하였다.

### 2-2-4. 반응시간

최적 pH, 온도 및 기질 농도 조건을 바탕으로 0-60 h 까지 각 반응 시간별로 점도 및 환원당 함량을 측정하였다.

## 2-3. 효소 정제

*Shewanella oneidensis* PKA 1008의 최적 생육 조건에서 배양한 후, 원심분리(10,000×g, 30 min, 4℃)하여 균체를 분리하고, 상층액을 조효소로 하였다. 조효소는 ammonium sulfate salting out, 투석, ion-exchange 및 gel filtration chromatography과정을 거치며 정제하였으며(Fig. 1), 또한 각 분획별 활성 측정을 위해 4% alginic acid(0.5 mL), 분획(0.5 mL)을 1:1로 혼합하여, 30℃에서 24 h 배양 후, 환원당을 측정하였다.

### 2-3-1. Ammonium sulfate 염석



조효소를 60% 및 80% 포화 ammonium sulfate 용액으로 순차적으로 염석을 행하였으며, 10,000×g로 30분간 원심 분리하여 상층액과 침전물로 분리하였다. 80% 포화 ammonium sulfate 용액으로 염석한 분획에서 침전물을 획득하여, 이를 30 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)로 용해시켰다.

### 2-3-2. 투석

80% 포화 ammonium sulfate 염석 침전물을 30 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)로 용해시켰으며, 4℃에서 6, 12, 24 간격으로 동일 buffer를 교체하면서 투석을 실시하였다. 투석 완료 후 10,000×g, 10 min, 4℃에서 원심분리하여 침전물을 제거하고 상층액을 사용하였다.

### 2-3-3. Ion-exchange chromatography

DEAE-sephadex (Ø1.6 cm×16.5 cm)는 30 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)으로 평형화시켰으며, 0-1.0 M NaCl의 농도구배로 단계적으로 용출하였다. 모든 정제과정은 4℃에서 실시하였다.

### 2-3-4. Gel filtration chromatography

Sephadex G-100은 30 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)로 팽화시켜 사용하였으며, DEAE 분획 중 활성이 강한 분획을 농축하여 팽화된 sephadex G-100 (Ø1.4 cm×55.0 cm)에 용출 및 분획하였다. 또한 sephadex G-100의 활성 분획은 2차 DEAE-sephadex chromatography를 실시하였으며, 모든 정제과정은 4℃에서 실시하였다.

### 2-3-5. BCA 단백질 농도 측정

각 분획별 단백질 농도는 BCA 단백질 농도 측정법을 이용하였으며, 시료 20  $\mu$ L에 BCA용액 (Copper II sulfate : Bicinchoninic acid = 1 : 50) 160  $\mu$ L를 가하여 37°C에서 1시간 방치 후 ELISA (Anthos Labtec Instruments GmbH, Salzburg, Austria)를 이용하여 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 bovine serum albumin (BSA, Sigma aldrich Co., USA)를 이용하여 검량곡선을 작성한 후 함량 계산에 활용하였다.

### 2-3-6. 환원당의 정량

환원당의 정량은 Nelson(1944)의 Somogyi-Nelson법으로 측정하였다. 시료 0.5 mL와 구리시약 0.5 mL을 test tube에 각각 취하고, water bath에서 20분간 가열하여  $\text{Cu}_2\text{O}$ 을 생성시키고, 산성조건하에서 몰리브덴산 용액 1 mL를 가하여 발색시킨 다음, 520 nm에서 흡광도를 측정하여, glucose를 표준물질로 하여 얻은 검량곡선(Fig. 2)을 이용하여 환원당을 정량 하였다.

### 2-3-7. SDS-PAGE

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, 5~12% gradient gel)는 Laemmli(1970)의 방법에 따라 각 정제단계별 분획물의 밴드를 확인하였다. 표준분자량 marker는 Bio-Rad사의 prestained molecular weight marker (250, 150, 100, 75,

50, 37, 25, 15 및 10 kDa)를 사용하였다.

## 2-4. 정제효소 특성

### 2-4-1. 최적 pH

정제효소 0.25 mL에 대하여 2.0% 알긴산 0.25 mL과 각 pH별 완충용액 (pH 4.0-6.0 ; 0.1 M sodium acetic-acetate buffer, pH 6.0-8.0 ; 0.1 M phosphate buffer, pH 8.0-10.0 ; 0.1 M tris-HCl buffer) 0.5 mL을 혼합하여 30℃에서 24 h 반응시킨 후 환원당을 측정하여, 최적 pH 조건을 확인하였다.

### 2-4-2. 최적 온도

정제효소 0.25 mL에 2.0% 알긴산 0.25 mL, 최적 pH 완충용액 0.5 mL을 혼합하여 반응 온도를 10-40℃로 달리하여 24 h 반응 시킨 후 환원당을 측정하여 효소활성 최적온도를 확인하였다.

### 2-4-3. 최적 NaCl 농도

효소, 기질 및 완충용액 혼합물의 최종 NaCl 농도를 0-1 M로 달리하여 2.0% 알긴산 0.25 mL과 정제효소 0.25 mL, 최적 pH완충용액 0.5 mL을 혼합한 후 최적 온도에서 24 h 반응 후 효소활성을 측정하였다.

### 2-4-4. 금속이온 영향

Uo 등(2006)의 방법을 참고하여, 염화물(Cl)형의 1, 2가 이온과 최적

NaCl농도를 기질인 2.0% 알긴산과 혼합하여 효소와 반응시켰을 때 활성에 미치는 영향을 측정하였다. 정제효소 0.25 mL에 금속이온 농도를 10 mM농도로 조정한 최적 pH완충용액과 혼합하여 30 °C에서 1 h 정치시킨 후, 2.0% 알긴산 기질 용액 0.25 mL을 가하여 최적온도에서 24 h 반응시켜 활성을 측정하였다.

## 2-5. 산업적 이용 가능성

### 2-5-1. 알긴산기질 저분자화

3.5% 알긴산기질과 조효소액을 1:1로 반응시킨 후 0-60 h 동안 12 h 간격으로 반응시켰다. 각 시간별로 반응이 끝난 분해액은 끓는 물에서 10분간 반응시켜 효소를 불활성화 시킨 후 10,000×g, 10 min, 4°C에서 원심분리하여 단백질을 침전시켜 제거한 후 상층액을 알긴산 올리고당으로 이용하였으며, 동결건조 후 -20°C에서 보관하며 사용하였다.

알긴산기질의 저분자화 측정은 thin-layer chromatography를 이용하여 확인하였으며, Silica gel F<sub>254</sub> plate를 이용하여 각각 저분자화된 sample 3 µL씩을 spotting 한 후 1-butanol : acetic acid : water(2 : 1 : 1 v/v/v) 전개액을 이용하여 전개한 후 silica gel plate에 10% 황산첨가 에탄올 용액을 분무한 후 110°C, 20분간 가열하였다. Standard mixture는 cellooligosaccharide를 사용하였으며, cellobiose, cellotriose, cellotetraose, cellopentaose, cellohexaose는 Megazyme (Megazyme Co., Wicklow, Ireland) 및 glucose는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

## 2-5-2. 저분자 알긴산 항산화효과

DPPH radical scavenging effect 소거효과는 Blois(1958)의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료 0.5 mL에 0.2 mM DPPH 용액 0.5 mL을 넣고 진탕하여 실온에서 30분간 방치시킨 후 UV/visible spectrophotometer로 517 nm의 흡광도에서 측정하였다. 대조구(Control)는 시료 대신 용매를 가하여 radical 고유의 보라색을 측정하였고, 시료 자체의 색을 측정하기 위한 공시험(Blank)에는 0.2 mM DPPH 용액 대신 증류수를 가하여 측정하였다.

## 2-5-3. 저분자 알긴산 항염증효과

### 세포배양

Murine의 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB 40071)에서 분양받아 사용하였으며, DMEM에 10% Inactivated fetal bovine serum과 1% Penicillin-streptomycin을 첨가한 배지를 배양액으로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 실험과정의 모든 세포는 80~90% 정도의 밀도로 자랐을 때 계대 배양하였고, 20 Passages를 넘기지 않은 세포만 사용하였다.

### 세포 독성 측정

시료의 세포독성을 평가하기 위해 Park 등(2006)의 방법을 약간 변형하여 MTT assay를 실시하였다. RAW 264.7 cell  $1 \times 10^6$  cells/mL를

well plate에 분주하고 20시간 전 배양 후, 1  $\mu\text{g/mL}$ 의 LPS와 알긴산 시간별 저분자화 시료(10, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ )로 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator (MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 24시간 배양하였다. 배양 후, 5 mg/mL 농도의 MTT 시약을 첨가하여 2시간 동안 재 배양하고 이를 4°C, 2,000 rpm에서 10분간 원심분리 (UNION 32R, Hanil Co., Incheon, Korea)하여 상층액을 제거하였다. 그 후, 각 well에 DMSO를 첨가하고 이를 microplate reader(Model 550, Bio-rad, Richmond, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도(optical density (O.D.))를 측정하였다. 세포증식능은 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Proliferation Index(\%)} = (\text{sample O.D.} / \text{control O.D.}) \times 100$$

### **Nitric Oxides 생성량 측정**

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 griess 반응(Lee et al., 2000)을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 cell은 DMEM 배지를 이용하여  $2.5 \times 10^5$  cells/mL로 조절한 후 24 well plate에 접종하고 5% CO<sub>2</sub> incubator (MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 20시간 전 배양하였다. 세포에 1  $\mu\text{g/mL}$ 의 LPS와 10, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 알긴산 시간별 저분자화 시료를 각각 처리하여 24시간 재 배양하였다. 배양액의 상층액을 얻은 후, 동량의 griess 시약(1% sulfanilamide + 0.1% naphthylendiamine dihydrochloride, 1:1)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시키고, microplate reader (Model 550, Bio-rad, Richmond, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 배양액 내 NO의

농도는 sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ )의 농도별 표준곡선과 비교하여 산출하였다.

### 염증 관련 cytokines 분비량 측정

염증 관련 cytokine의 분비량을 측정하기 위해 RAW 264.7 cell을 DMEM 배지를 이용하여  $2.5 \times 10^5$  cells/mL로 조절한 후 24 well plate에 접종하고 5%  $\text{CO}_2$  incubator (MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 18시간 전 배양하였다. 세포에 1  $\mu\text{g/mL}$ 의 LPS와 10, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 알긴산 시간별 저분자화 시료를 처리하여 12시간 재 배양하였다. 세포배양액 내의  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-6 및 IL-1 $\beta$  cytokine의 분비량을 ELISA kit (Mouse ELISA set, BD Bioscience, San Diego, USA)를 이용하여 측정하였다. 이를 위해 ELISA microplate에 capture antibody로 anti-mouse  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-6 및 IL-1 $\beta$ 를 분주하여 4°C에서 하룻밤 동안 coating시켰다. 이를 0.05% Tween 20이 포함된 PBST로 세척하고 10% FBS 용액으로 blocking 하였다. PBST로 세척한 뒤, 각 microplate에 배양 상층액을 분주하고 실온에서 2시간 반응시켰다. 다시 PBST로 세척한 뒤 희석한 biotinylated anti-mouse  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-6 detection antibody와 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시켰다. IL-1 $\beta$ 의 경우, biotinylated anti-mouse IL-1 $\beta$  detection antibody를 첨가하고 1시간 반응 후, streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 30분 반응시켰다. 그 후, 이를 다시 PBST로 세척한 다음, OPD 용액을 첨가하여 실온에서 30분 동안 암반응 시켰다. 2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 로 반응을 종료시킨 후,



microplate reader (Model 550, Bio-rad, Richmond, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### **iNOS, COX-2 및 NF- $\kappa$ B 발현량 측정**

세포질 내 생성되는 iNOS, COX-2 및 NF- $\kappa$ B의 발현량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 RAW 264.7 세포를 배양하였다. 배양이 끝난 세포를 수집하여 3회 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척한 후, Sheeba와 Asha(2009)의 방법에 따라 iNOS 및 COX-2의 경우 cytosol lysis buffer 50 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% deoxycholate, 5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1  $\mu$ g/mL aprotinin, 1% Triton X-100, 0.1% NP-40을 이용하였으며, NF- $\kappa$ B의 경우 nucleus lysis buffer (10 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM dithiothreitol)를 첨가하여 30분간 4°C에서 lysis 시킨 후 15,520 $\times$ g에서 20분간 원심분리 하여 세포막 성분 등을 제거하였다. BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)을 사용하여 단백질을 정량하였으며, 30  $\mu$ L의 lysate를 Laemmli(1970)의 방법을 사용하여 10% SDS-PAGE로 분리하였다. 분리된 단백질은 Towbin et al. (1979)의 방법을 참고하여 polyvinylidene difluoride membrane (Bio-Rad)에 1시간 동안 전사시켜 5% skim milk가 포함된 tris buffered saline (TBSS, pH 7.5) 용액으로 상온에서 2시간 동안 blocking 하였다. iNOS, COX-2 및 NF- $\kappa$ B의 발현량을 검토히기 위한 항체로는 anti-mouse iNOS, COX-2 및 NF- $\kappa$ B를 사용하여 1:500으로 희석하고 상온에서 2시간 반응시킨 후 TBSS로 3회 세정하였다. 2차



항체로 horseradish peroxidase가 결합된 anti-mouse IgG 및 anti-rabbit IgG를 1:2,000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 다음 TBSS로 3회 세정하여 ECL 기질과 1-3분간 반응 후 각각의 단백질 밴드는 Gene tool (GeneGnome5, Syngene, Cambridge, UK)을 이용하여 가시화하였다.

### 귀부종 측정 및 조직 관찰

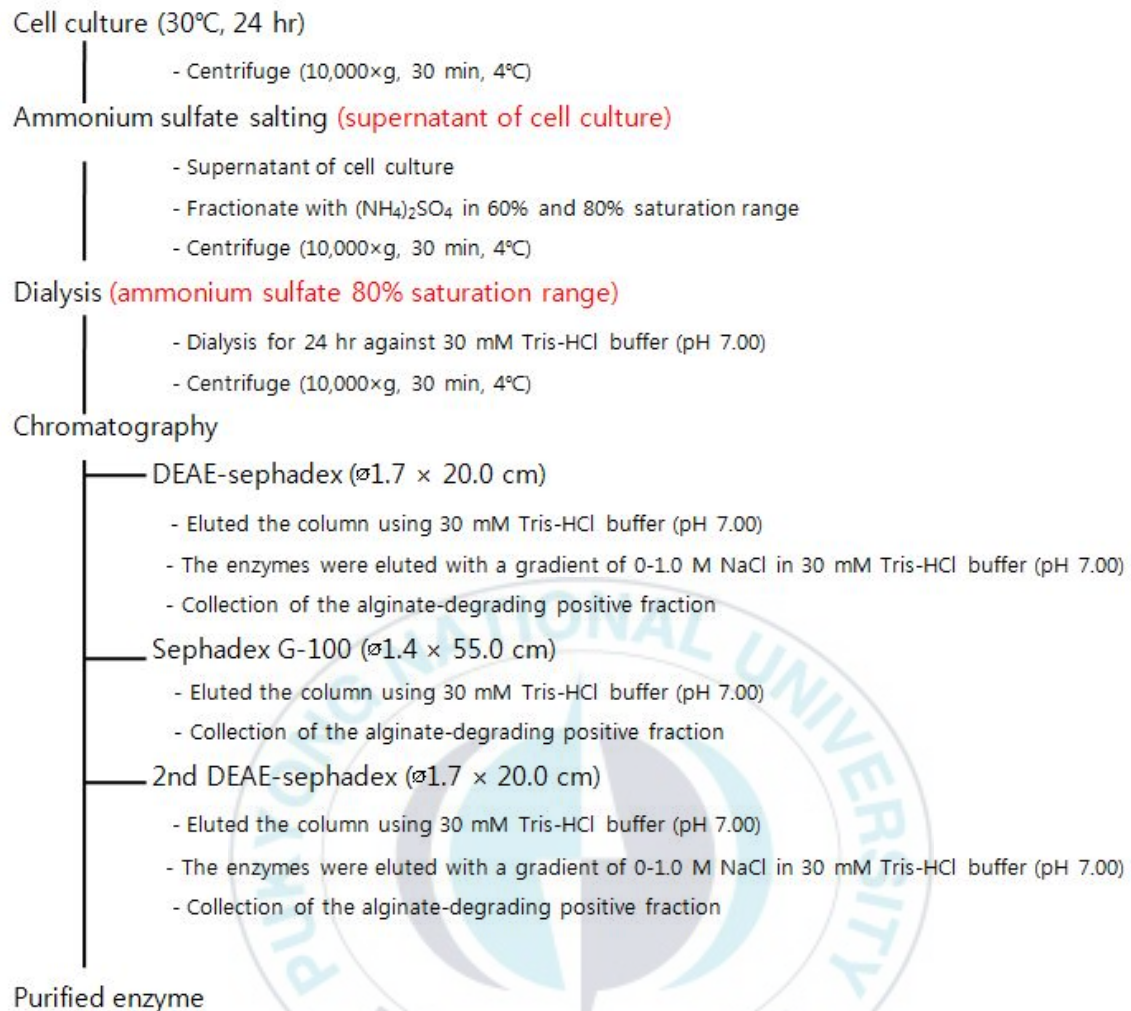
생후 8주령의 수컷, ICR 마우스에 알긴산 0시간, 36시간 저분자화 시료를 10, 50, 100 mg/kg body weight 농도로 200 µL씩 경구투여하고 한 시간 후 오른쪽 귀에 2.5% croton oil을 20 µL/ear 농도로 도포하였다. 도포 5시간 후 귀 두께를 측정하였고 croton oil의 처리로 귀 두께가 증가한 것을 부종의 형성으로 간주하였다. 귀 조직 관찰은 ICR 마우스의 오른쪽 귀에 알긴산 저분자화 시료를 100 mg/mL 농도로 20 µL씩 도포하고 15분 뒤, 5% croton oil을 20 µL씩 도포하였다. 6시간 뒤, diethylether로 마취사 시키고, 귀 조직을 절제하여 10% formaldehyde에 72시간 고정하였다. 고정 후 파라핀 블록을 만들어 박편을 제조하고 hematoxlin-eosin 및 toluidine-blue 염색을 하여 조직을 관찰하였다.

Edema formation(%) = Sample의 귀 두께 / Control의 귀 두께 × 100

## 2-6. 통계 처리

실험결과에 대한 통계처리는 SAS software (Statistical analytical system V8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 분산분석을 하였으며, 조사 항목들 간의 유의적 검정은  $p<0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test 법에 따라 분석하였다.





**Fig. 1. Procedure for purifying the alginate-degrading enzyme produced by *Shewanella oneidensis* PKA 1008.**

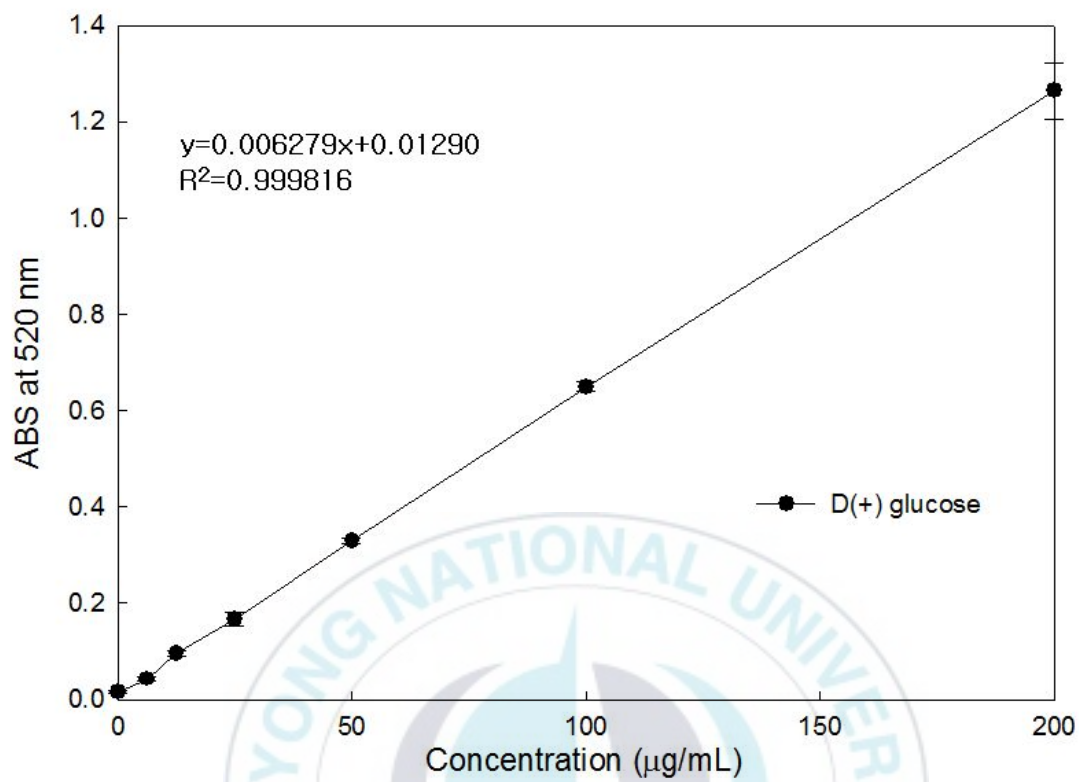


Fig. 2. Standard curve for determination of reducing sugar.

## 결과 및 고찰

### 1. *Shewanella oneidensis* PKA 1008이 생산하는 알긴산 분해 조효소의 특성

#### 1-1. pH

*Shewanella oneidensis* PKA 1008 균배양액을 원심분리(10,000×g, 30 min, 4℃)를 통하여 분리하여, 상층의 조효소액을 얻었다. 이 조효소액의 알긴산 분해 최적 pH를 확인하기 위하여, 조효소액 및 기질을 0.1 N 및 1N HCl과 NaOH를 이용하여 pH를 2, 4, 6, 7, 8, 9 및 10으로 조정 한 후, 조효소액과 알긴산을 1:1로 혼합하여 30℃, 24 hr 배양한 후 점도 및 환원당 함량을 측정한 결과 (Fig. 3), 알긴산 조효소액과 기질 혼합액은 pH가 염기성일 때 활성이 높았으며, 특히 pH 9에서 점도가 288.7 cP로 가장 낮았으며, 환원당 함량 역시 가장 높게 나타나 pH 9가 최적 조건임을 확인하였다. 이는 Tohru 등(2009) 및 Li 등(2011)의 연구에서 *Agarivorans* sp. 및 *Pseudoalteromonas* sp. SM0524가 생산하는 알긴산 분해효소가 최적 pH 조건이 각각 pH 9.0 및 8.5로 알칼리 영역에서 활성이 좋았다는 결과와 유사한 것으로 나타났다.

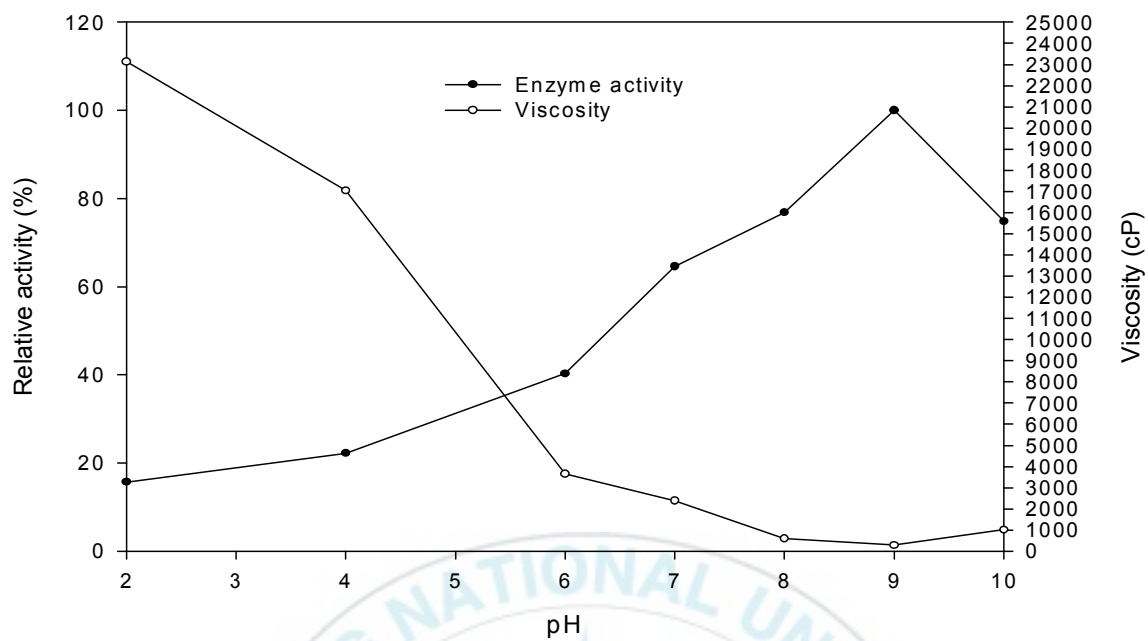
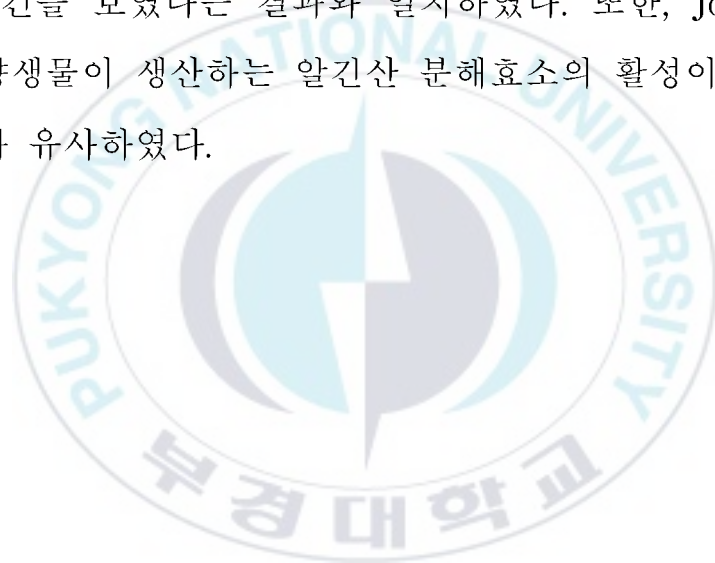


Fig. 3. Effect of pH on alginate degrading activity of crude enzyme measured by viscometry and reducing sugar assay.

## 1-2. 온도

최적pH 조건으로 맞춘 조효소액과 알긴산을 1:1로 혼합하여, 10, 20, 25, 30, 35, 40 및 50℃에서 24 h 배양하였다. 배양된 시료의 환원당 함량 및 점도를 측정한 결과 (Fig. 4), 반응온도 30℃에서 점도가 408.6 cP로 가장 낮았으며, 환원당 함량 역시 가장 높게 나타남을 확인하여 최적 온도 조건이 30℃임을 확인하였으며, 20-25℃ 및 35-40℃의 온도에서는 효소활성이 감소하였다. 이 결과는 Nibu 등(1995)의 연구에서 *Enterobacter cloacae* M-1이 생산하는 알긴산 분해효소가 30℃에서 최적 온도 조건을 보였다는 결과와 일치하였다. 또한, Joo 등(1993)의 보고에서 해양생물이 생산하는 알긴산 분해효소의 활성이 20-30℃에서 좋다는 내용과 유사하였다.



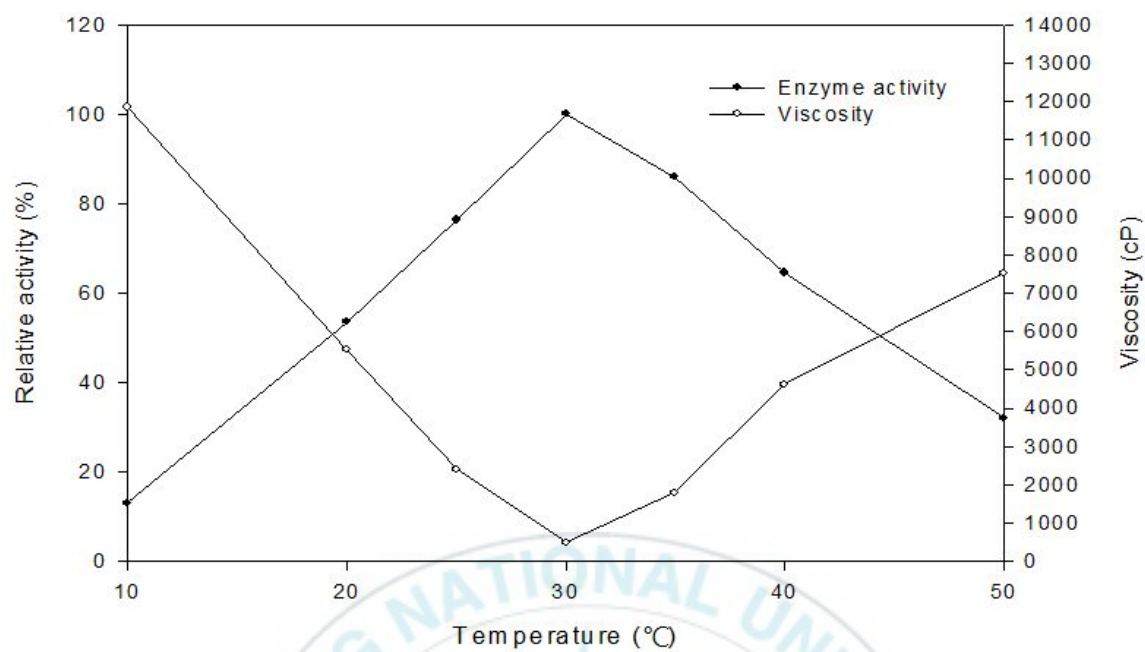


Fig. 4. Effect of temperature on alginate degrading activity of crude enzyme measured by viscometry and reducing sugar assay.



### 1-3. 기질농도

알긴산 기질의 농도를 1-9%로 달리하여 조효소액과 반응시켜 조효소액의 최적기질 농도를 확인하였다. 조효소액과 1-9% 알긴산 기질을 1:1로 혼합하여 pH 9 및 30℃ 조건에서 24 h 반응시킨 후 환원당 함량을 측정하였다(Fig. 5). 조효소액과 반응한 알긴산기질은 기질의 농도가 증가할수록 환원당의 생성량이 증가하다가 알긴산 농도 7%에서 최대함량을 나타낸 후 8-9% 농도에서는 감소하는 경향을 보였다.

이는 알긴산 기질 7%에서 조효소와의 반응이 기질-효소 반응 최대포화 상태로 사료되며, 7% 이상의 농도에서 효소 활성이 감소하는 것은 Reed 등(2010)은 기질이 일정농도 이상으로 과다하게 존재할 때 효소의 활성을 저해시키는 ‘기질 저해’ 효과가 발생한다고 보고하였는데 이러한 이유로 알긴산 기질의 농도가 높아졌을 때 효소 활성이 감소한 것으로 사료된다.

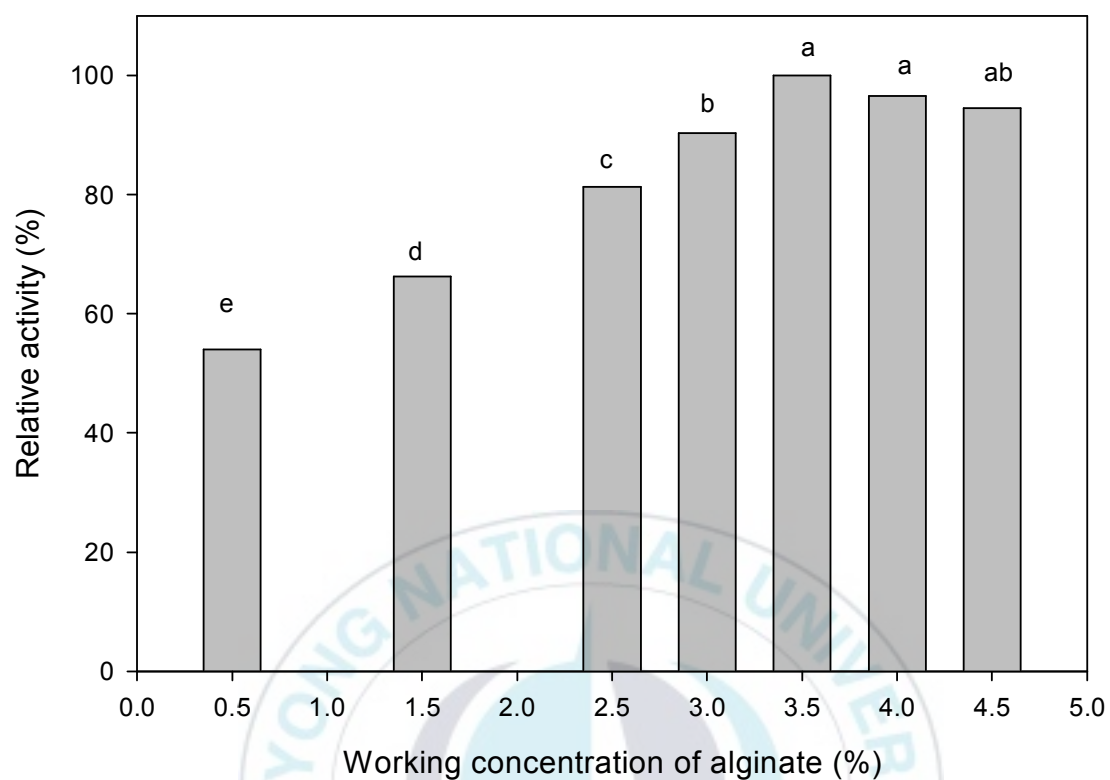


Fig. 5. Effect of alginate concentration on alginate degrading activity of crude enzyme measured by viscometry and reducing sugar assay.

<sup>a-e</sup> Means with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

#### 1-4. 반응시간

최적반응 시간을 알아보기 위하여 최적 pH, 온도 및 기질농도 조건으로 알긴산과 조효소액을 혼합하여, 0-60시간 까지 반응시켰다. 시간별로 반응시킨 시료의 점도 및 환원당 함량을 측정한 결과 (Fig. 6), 반응시간이 증가할수록 알긴산의 점도는 감소하였고 환원당 함량은 증가하였다. 특히, 반응 48시간과 60시간에서 점도가 각각 211.9 cP 및 230.4 cP를 나타내었으며, 환원당 함량은 998.82  $\mu\text{g/mL}$  및 1016.98  $\mu\text{g/mL}$ 을 나타내어 반응 48시간에서 최적 분해 효율을 보이는 것으로 나타났다.

이상의 결과를 종합해볼 때, *Shewanella oneidensis* PKA 1008이 생산하는 알긴산 분해 조효소액의 최적 알긴산 분해 조건은 pH 9, 30℃, 기질농도 7% 및 반응 48시간에서 최대효소활성을 보이는 것으로 사료된다.

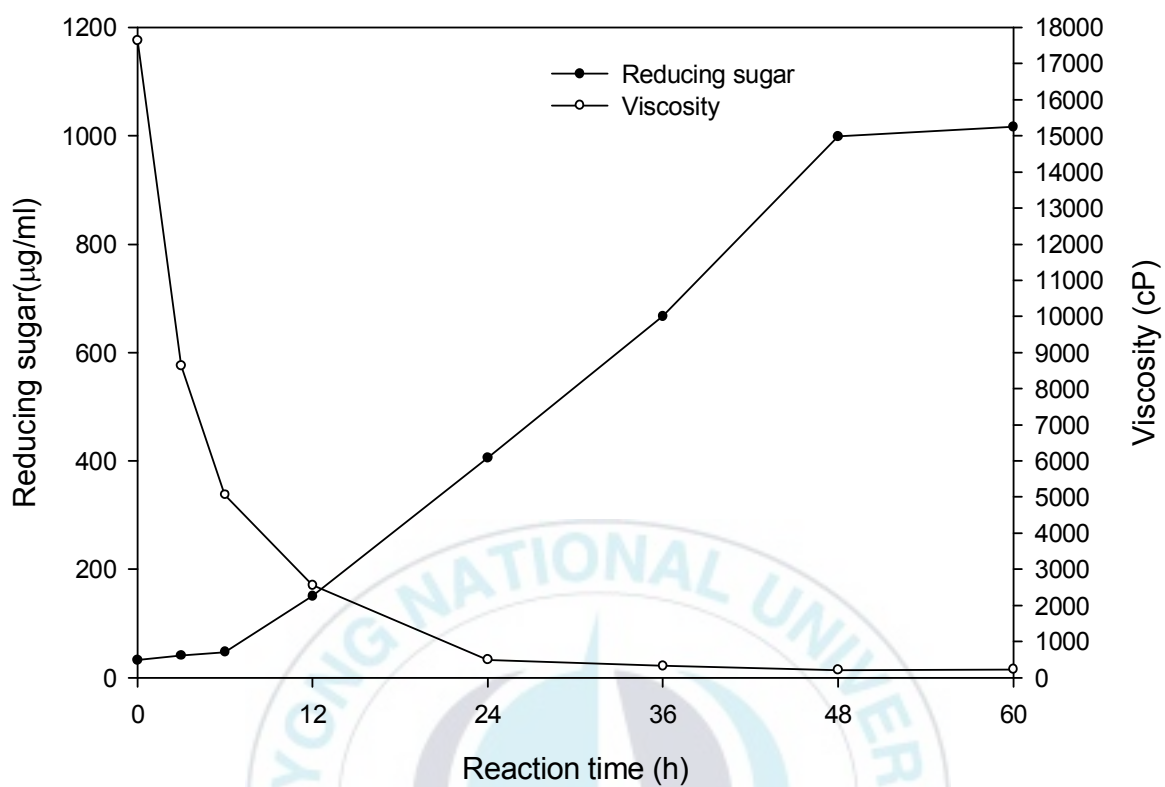


Fig. 6. Effect of reaction time on alginate degrading activity of crude enzyme measured by viscometry and reducing sugar assay.

## 2. *Shewanella oneidensis* PKA 1008이 생산하는 알긴산 분해효소 정제

### 2-1. Ammonium sulfate 염석

*Shewanella oneidensis* PKA 1008 균주가 생산한 조효소액을 ammonium sulfate를 이용하여 염석을 진행하였다. Ammonium sulfate를 60% 농도로 포화시킨 후 원심분리(10,000×g, 30 min, 4℃)하였으며, 상층액은 다시 80% 농도로 포화시킨 후 원심분리 하여 침전물과 상층액을 분리하여 최종적으로 ammonium sulfate 포화농도 0-60% 상층, 침전 및 60-80% 상층, 침전 시료를 얻었다. 이 시료들을 30 mM Tris-HCl buffer (pH7.0)를 이용하여 용해시킨 후 투석막(MW 12-14 kDa)에 담은 후 동일 buffer를 이용하여 6, 12, 24 시간 간격으로 투석 과정을 거쳐 탈염하였다. 투석이 완료된 용액을 4% 알긴산 기질과 반응시켜 분해 활성을 환원당을 통하여 측정한 결과 (Fig. 7), 최종적으로 60-80% 침전물에서 알긴산 분해 활성을 확인하였으며, 60-80% 침전 투석액을 농축하여 이온교환 크로마토그래피 시료로 사용하였다.

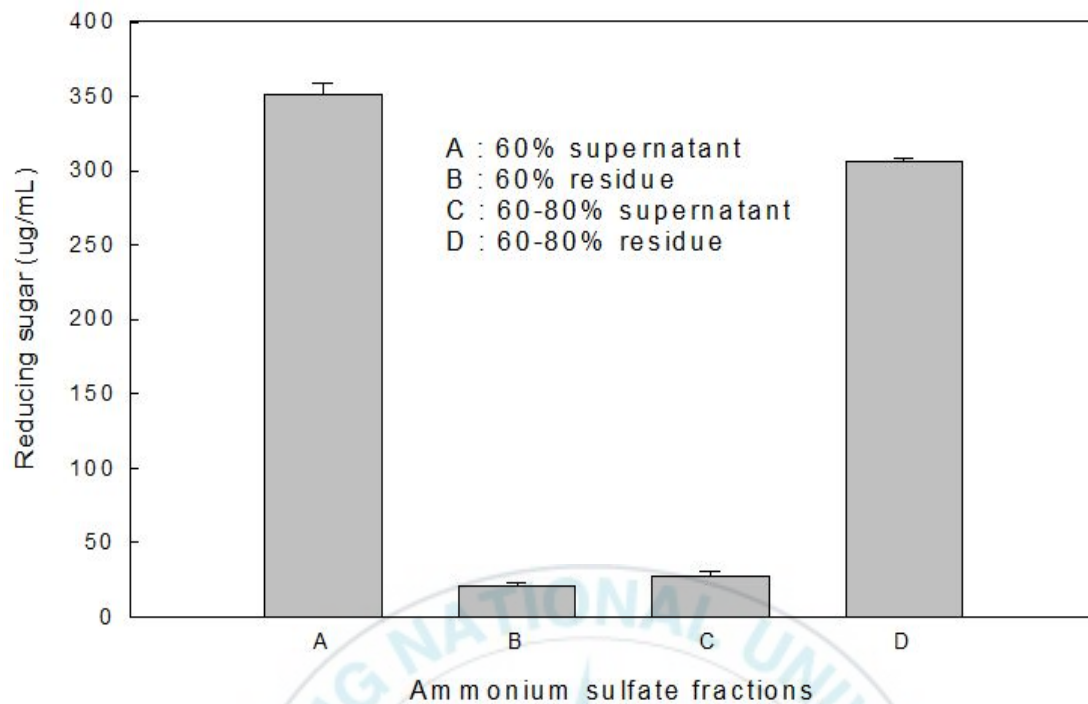


Fig. 7. Alginate-degrading activity of 60–80% ammonium sulfate salting out fractions for purifying the extracellular enzyme produced by *S. oneidensis* PKA 1008 measured by reducing sugar assay.

## 2-2. Ion exchange chromatography

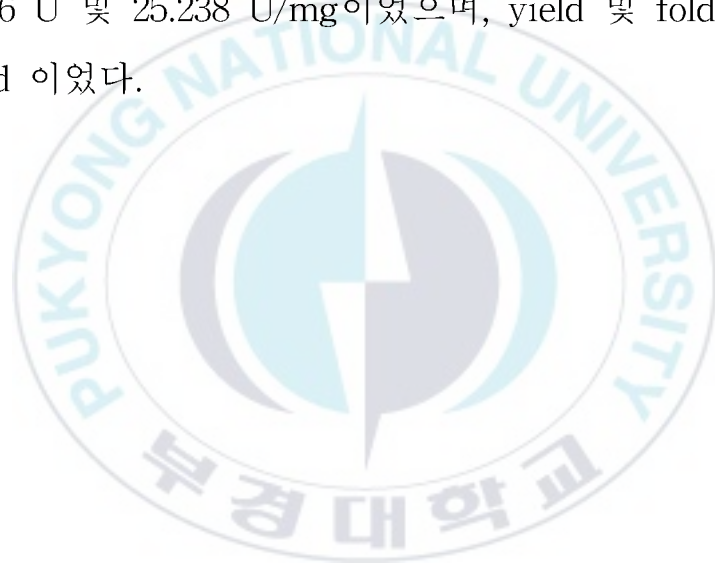
Ammonium sulfate 60-80 침전 투석액을 DEAE sephadex anion exchange chromatography를 이용하여 분획하였다 (Fig. 8). 0-1.0 M NaCl 농도로 단계적 용출법을 이용하여 총 55개의 fraction을 획득하였으며, NaCl 0.4 M 농도의 24번 fraction에서 알긴산 분해활성이 뛰어나 이 fraction을 모아 농축하여 다음 단계의 chromatography 시료로 사용하였다.

## 2-3. Gel filtration chromatography

DEAE sephadex chromatography의 활성 fraction을 모아 농축하여 sephadex G100 gel filtration chromatography를 실시하였다 (Fig. 9). 30 mM Tris-HCl buffer를 이용하여 총 100개의 fraction을 얻었으며, 이 중 가장 높은 알긴산 분해활성을 보인 35번 fraction을 농축하여 2<sup>nd</sup> DEAE sephadex chromatography를 실시하였다.

#### 2-4. 2nd Ion exchange chromatography

Sephadex G100 35번 fraction을 농축하여 2<sup>nd</sup> DEAE sephadex anion exchange chromatography를 진행하였다 (Fig. 10). 0-1.0 M NaCl농도로 단계적 용출법을 이용하여 총 55개의 fraction을 획득하였으며, NaCl 0.3 M 농도의 19번 fraction에서 알긴산 분해활성이 뛰어나 이 분획물을 이용하여 SDS-PAGE를 실시하였다. 정제과정 동안의 정제도표를 작성한 결과 (Table 1), 최종 2차 DEAE sephadex chromatography시료에서 total activity 및 specific activity가 1.06 U 및 25.238 U/mg이었으며, yield 및 fold가 각각 1.1% 및 995.24-fold 이었다.





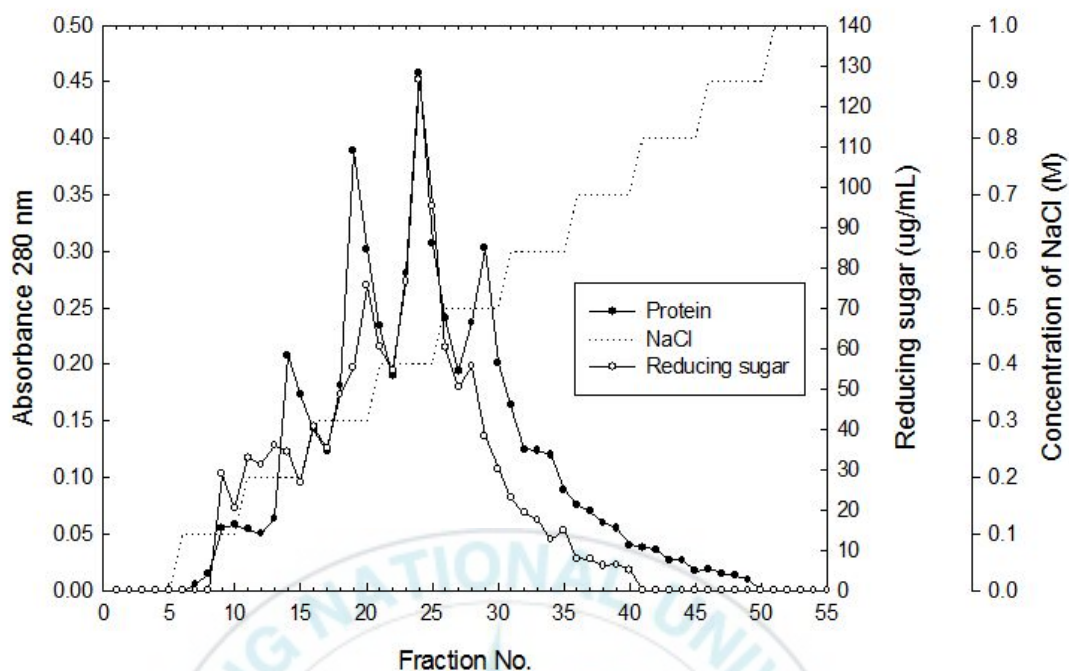


Fig. 8. DEAE-sephadex chromatography of the saturated ammonium sulfate solution in the range of 80% for purifying the extracellular enzyme produced by *S. oneidensis* PKA 1008. The enzymes were eluted with a gradient of 0.0–1.0 M NaCl in 30 mM Tris-HCl buffer, pH 7.00

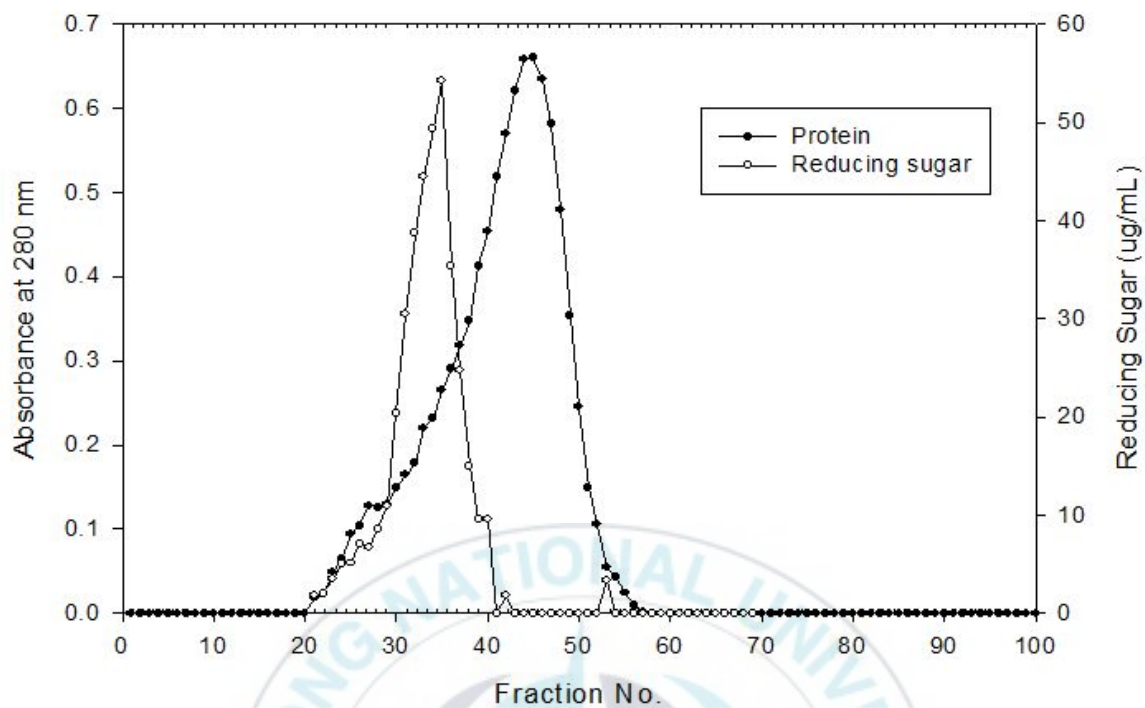


Fig. 9. Sephadex G-100 chromatography of purified fractions by DEAE-sephadex fractions purifying the extracellular enzyme *S. oneidensis* PKA 1008.

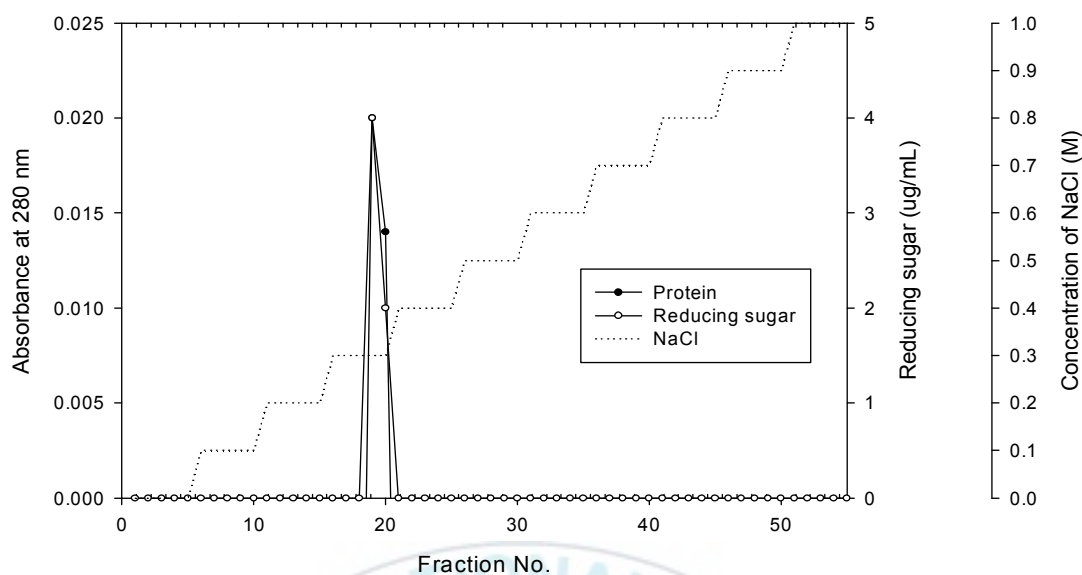


Fig. 10. 2<sup>nd</sup> DEAE-sephadex chromatography of the saturated ammonium sulfate solution in the range of 80% for purifying the extracellular enzyme produced by *S. oneidensis* PKA 1008. The enzymes were eluted with a gradient of 0.0–1.0 M NaCl in 30 mM Tris-HCl buffer, pH 7.00

**Table 1. Summary of alginate-degrading purified enzyme production by *Shewanella oneidensis* PKA 1008**

Purification step	Total protein (mg)	Total activity <sup>1)</sup> (U)	Specific activity (U/mg)	Fold	Yield (%)
Crude enzyme	3800	96.36	0.025	1	100
Ammonium sulfate precipitation (60–80%)	70	57.82	0.826	32.57	60
DEAE sephadex	5.58	19.27	3.453	136.15	20
Sephadex G100	0.164	3.85	23.504	926.83	4
2nd DEAE sephadex	0.042	1.06	25.238	995.24	1.1

<sup>1)</sup>One unit of the enzyme activity is defined as that amount required to yield 1  $\mu$ mol of reducing sugar per min under the defined conditions of assay.

### 3. 정제효소 특성

#### 3-1. 최적 pH

크로마토그래피를 통하여 정제된 효소의 최적 pH를 알아보기 위하여 알긴산 기질과 정제효소를 1:1로 반응시킨 후 acetate buffer (pH 4.0-6.0), phosphate buffer (pH 6.0-8.0), Tris-HCl buffer (pH 8.0-10.0)을 첨가하여 정제효소의 최적 pH를 확인한 결과 (Fig. 11), 정제된 알긴산 분해효소는 알칼리영역에서 효소 활성이 뛰어났으며, Tris-HCl pH 9.0 buffer에서 최대 효소 활성을 나타내었고 산성으로 갈수록 효소활성이 감소하는 것을 확인하였다. 이 결과는 Kim 등 (2007)의 연구에서 *Streptomyces* sp. MET 0515가 생산하는 균체의 알긴산 분해효소가 pH 8.0에서 최적 효소활성을 보였다는 연구와 유사하였으며, 현재 보고된 알긴산 분해효소의 경우 미알칼리성 영역에서 최적 효소활성을 보이는 것으로 알려져 있다 (Tseng et al., 1992).

#### 3-2. 최적 온도

최적 pH 조건으로 조절 후 알긴산 기질과 정제효소를 1:1로 혼합한 후 온도조건에 따른 활성을 측정하기 위해서 10-40℃에서 반응시켰다. 온도에 따른 효소의 활성 (Fig. 12)은 30℃에서 최대 효소활성을 나타내었다. 이는 조효소액의 최적온도 30℃와 일치하였으며, Wong 등 (2000)의 연구에서 보고된 해양유래 미생물이 분비하는 알긴산 분해효소의 최적온도가 25-35℃에서 최적온도 조건을 보인다는 결과와 유사하였다. 또한, 미생물이 생육하는 해양환경의 온도와 효소의 최적 활성온도가 관련이 있을 것으로 사료된다.

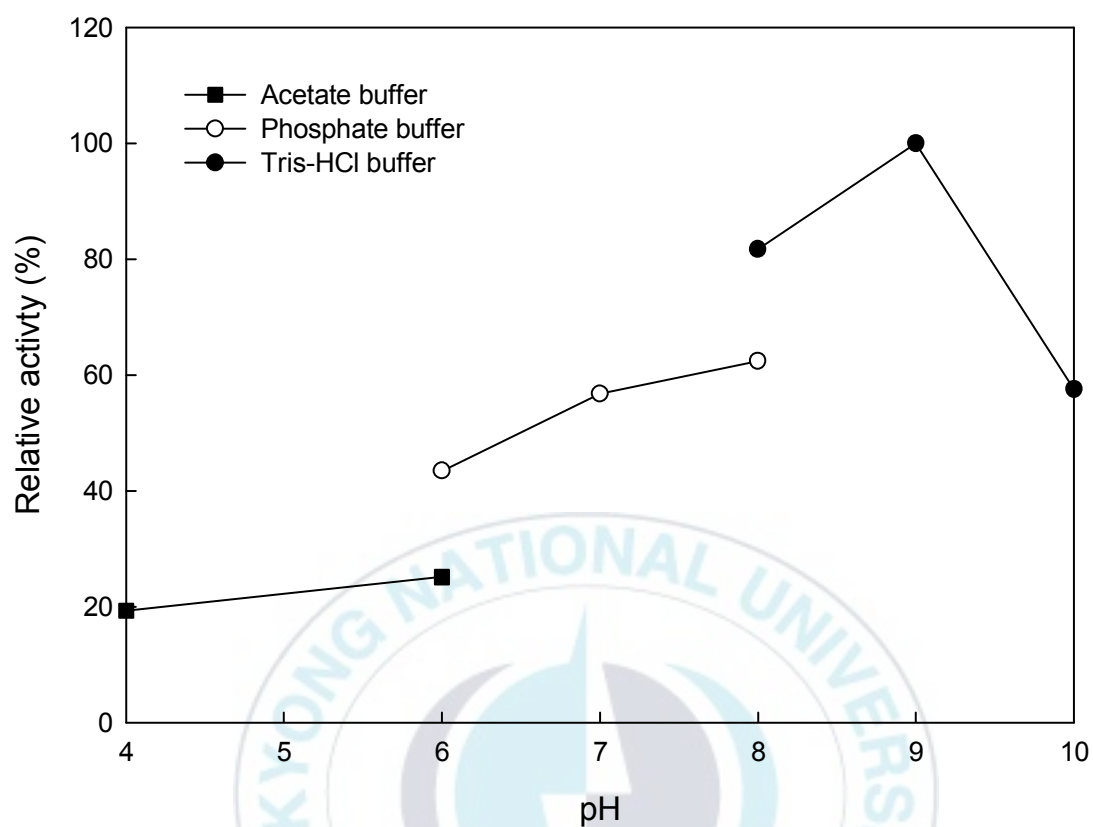


Fig. 11. Effect of pH on alginate-degrading activity of purified enzyme measured by reducing sugar assay.

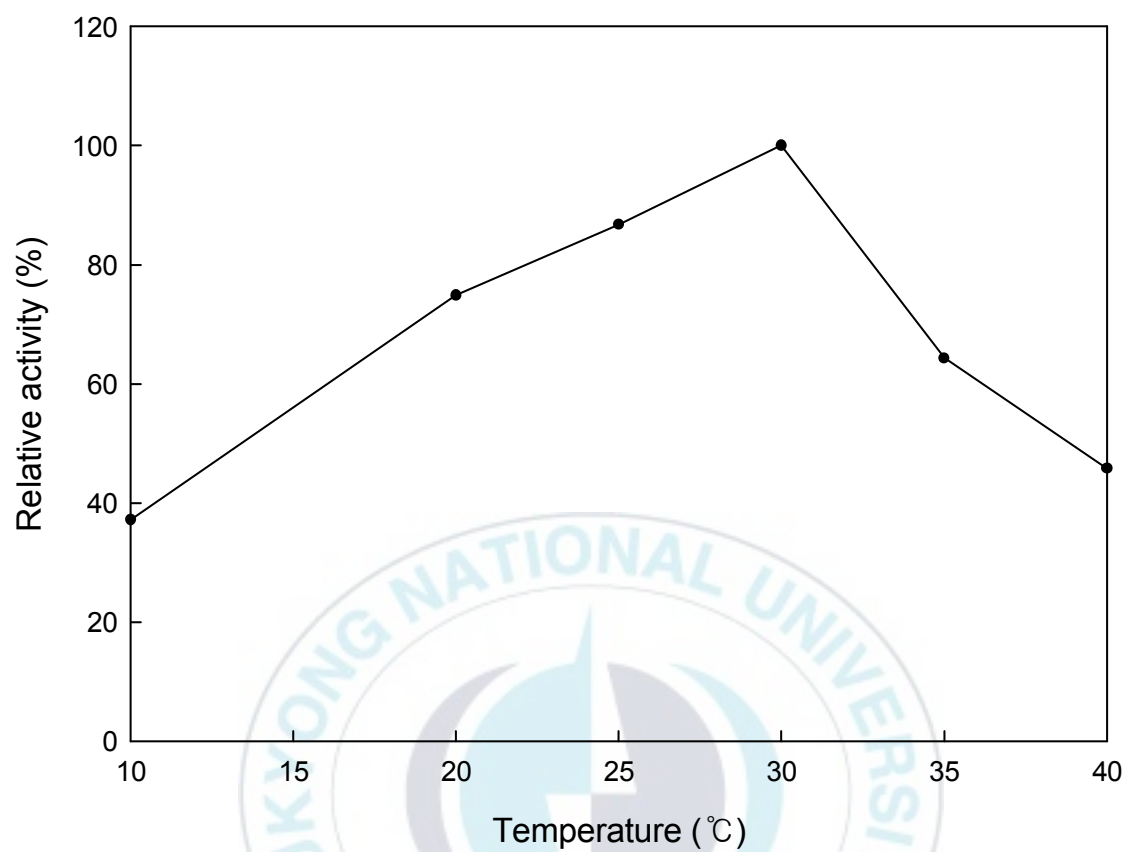


Fig. 12. Effect of temperature on alginate-degrading activity of purified enzyme measured by reducing sugar assay.

### 3-3. 최적 NaCl 농도

NaCl의 농도에 따른 효소 활성을 알아보기 위하여 최적 pH 조건으로 조절한 알긴산 기질과 정제효소를 1:1로 혼합하여 NaCl의 농도를 0.0-1.0 M으로 조절한 후 최적 온도에서 반응시켰다. 그 결과 (Fig. 13), NaCl 0.05 M 농도에서 효소 활성이 가장 높게 측정되었으며, NaCl 농도 0.2 M 이상에서 효소 활성이 급격히 감소하는 것을 확인하였다. Boyen 등(1990)의 연구에서 *Pseudomonas alginovora* strain X017의 경우 0.06 M NaCl이 요구된다고 보고하고 있어 본 실험의 결과와 유사하였다. 또한, 일반적으로 해양에서 분리된 알긴산 분해효소의 경우 일정 농도의 NaCl이 요구된다고 보고되고 있으며(Tseng et al., 1992), 이는 호염효소의 활성화에 1가 양이온이 효소 분자내의 정전기적 반발력을 감소시키는 역할을 하기 때문인 것으로 알려져 있다 (Baxter et al., 1959).

### 3-4. 금속이온 영향

금속이온에 따른 영향을 알아보기 위하여 최적 pH 및 NaCl 농도로 조절한 알긴산 기질과 정제효소를 1:1로 혼합하여 10 mM의 금속이온을 첨가한 후 최적 온도에서 반응시켰다. 그 결과(Fig. 14),  $Zn^{2+}$ 이온에서 효소 활성이 증가하였으며,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ , 및  $Fe^{2+}$  이온 등에서는 효소 활성이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 *Agarivorans* sp. (Tohru et al., 2009)가 생산하는 알긴산 분해효소가  $Zn^{2+}$ 이온하에서 활성이 증가한다는 보고와 유사하였으며, Uo 등(2006)의 *Bacillus licheniformis* AL-577이 생산하는 알긴산 분해효소가  $Ba^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$



이온하에서 활성이 감소한다는 보고와 유사하였다. 일반적으로 2가 금속이온에 의하여 thiol 및 serine계 효소가 효소활성을 잃게된다고 알려져 있는데, 이는 효소 활성 부위에 있는 SH 및 OH기에 금속이온이 높은 친화성을 가져 기질과의 반응을 억제할 수 있다고 보고되고 있다 (Joo et al., 1993). 따라서 본 실험에 정제된 효소는 thiol 및 serine계 효소일 것으로 사료된다.



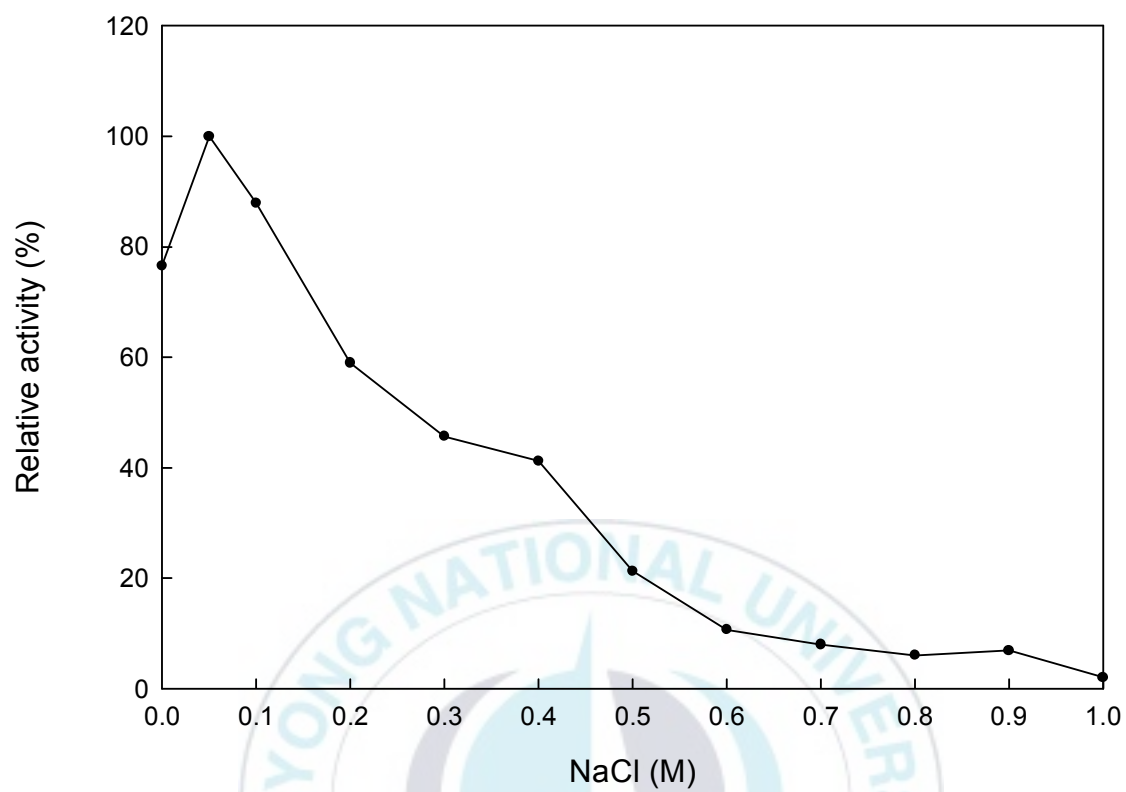


Fig. 13. Effect of NaCl concentration on alginate-degrading activity of purified enzyme measured by reducing sugar assay.

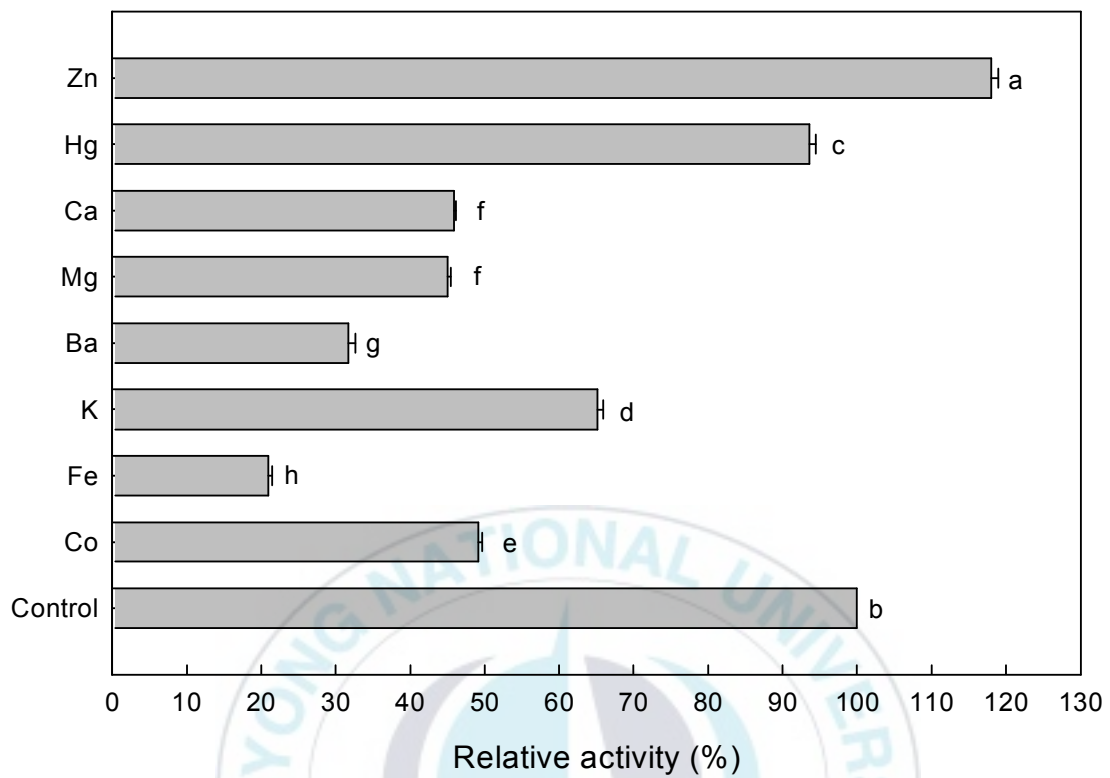


Fig. 14. Effect of metal ions on alginate-degrading activity of purified enzyme measured by reducing sugar assay.

<sup>a-h</sup>Means with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

## 4. 산업적 이용가능성

### 4-1. 저분자 알긴산 Thin layer chromatography (TLC)

*Shewanella oneidensis* PKA 1008 균주가 생산하는 조효소액을 알긴산에 처리하였을 시 알긴산이 분해되어 올리고당이 생성되는지를 확인하기 위하여 thin layer chromatography (TLC) 분석을 실시하였다. 그 결과(Fig. 15), 알긴산과 조효소액 반응 12시간 까지는 알긴산이 분해되지 않았으나 반응 24시간부터 분해가 진행되어 36시간 까지는 tri-saccharide와 pentasaccharide로 분해되었으며, 반응 48시간 이후부터는 monosaccharide까지 분해됨을 확인하였다. 이 결과는 Falkeborg 등 (2014)의 연구에서 *Sphingobacterium*이 생산하는 효소를 이용하여 분해한 알긴산의 시간별 TLC결과 0시간에서는 알긴산이 분해되지 않았으나 반응시간이 지날수록 고분자의 알긴산이 저분자의 알긴산 올리고머로 분해되었으며, 23시간이후 반응물이 최종적으로 dimer, trimer, tetramer 분해되었다고 보고하고 본 실험의 결과와는 최종분해산물의 결과는 상이하였다. 그러나 이는 알긴산 분해효소의 분해방식에 따른 차이인 것으로 사료된다. 따라서 *S. oneidensis* PKA 1008이 생산하는 조효소액은 알긴산을 단당 및 올리고당으로 분해시키는 것을 확인하였으며, 각 시간별 저분자화 시료들을 이용하여 생리활성 측정 및 산업적 이용가능성에 대하여 실험하였다.

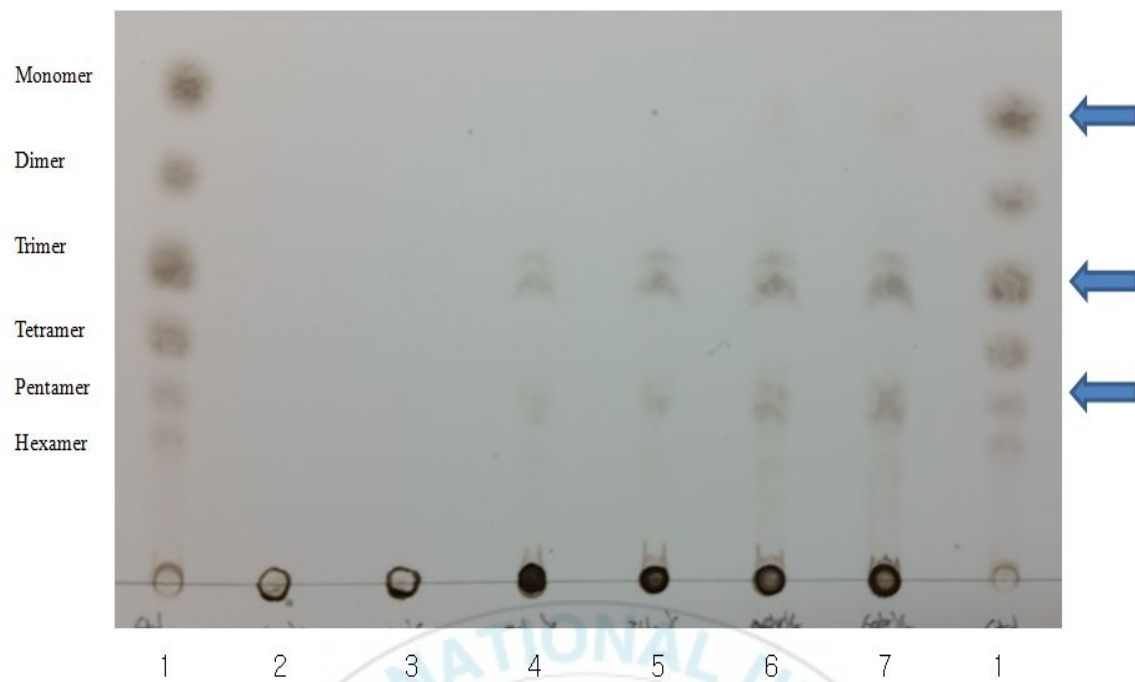


Fig. 15. TLC analysis of alginate hydorlysate by crude alginate degrading enzyme with various incubation time. Reaction time : lane 1, standard; lane 2, 0 h; lane 3, 12 h; lane 4, 24 h; lane 5, 36 h; lane 6, 48 h; lane 7, 60h.

#### 4-2. 저분자 알긴산 항산화효과

항산화 활성 측정법은 항산화 물질인 phenolic compound와 aromatic amine 화합물 등에 의해서 free radical이 환원되는 성질을 이용하여 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있으며, 그 중 DPPH는 수소를 공여 받아 환원되어 짙은 자색이 노란색으로 탈색되는 원리를 이용하여 흡광도를 측정하여 간단히 항산화 활성을 측정할 수 있어 항산화능 측정에 가장 많이 쓰이는 방법이다 (Matsukawa et al., 1997; Kim et al., 2004).

0-60시간 동안 분해시킨 알긴산 저분자 시료를 DPPH 라디칼 소거능 측정을 통하여 항산화 활성을 측정하였다(Table 2). 그 결과, 분해 0시간에서 34.18%의 DPPH 라디칼 소거능을 보인 후 12-24시간 분해 산물에서는 5% 이하 및 18.03%로 낮은 활성을 보였다. 그러나 36시간 분해 이후 항산화 활성이 증가하기 시작하였으며, 48-60시간 분해산물이 각각 79.73% 및 82.10%의 DPPH 라디칼 소거능을 보였으나, 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이 결과는 Falkeborg 등(2014)의 연구에서 알긴산 올리고당이 알긴산보다 radical소거능, ferrous ion chelating 등 항산화 효과가 증진했다는 보고와 유사한 결과를 보여주었다. TLC 결과와 비교하여 살펴보았을 때, 알긴산 분해물이 monosaccharide까지 저분자화 될 경우, 항산화 활성이 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 그러나, 반응 0시간 보다 12-24시간 분해 산물이 더 낮은 DPPH 라디칼 소거능을 보였는데, 이는 분해가 진행되는 도중 생성된 저분자화 물질이 오히려 DPPH 라디칼 소거능을 억제한 것으로 사료된다.

Table 2. DPPH radical scavenging effect of alginate hydorlysate by crude alginate degrading enzyme with various incubation time

hr	DPPH radical scavenging effect (%)
0	34.18±0.70 <sup>c1)</sup>
12	— <sup>2)</sup>
24	18.03±4.56 <sup>d</sup>
36	48.23±2.09 <sup>b</sup>
48	79.73±0.82 <sup>a</sup>
60	82.10±2.40 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Means in the same column (a–d) bearing different superscript in samples are significantly different (P<0.05).

— : Less than 5%.

Sample concentration : 5 mg/mL

### 4-3. 저분자 알긴산 항염증 효과

#### 세포독성 실험

0-60시간 동안 분해시킨 알긴산 저분자 시료를 대식세포에 대한 세포 독성을 알아보고 항염증 효과 실험을 위한 농도 조건 설정을 위하여 RAW 264.7 세포에 대해 MTT assay를 실시하였다. 시간별 저분자화 시료를 10, 50 및 100  $\mu\text{g/mL}$  농도로 첨가하여 실험한 결과(Fig. 16), RAW 264.7 세포의 증식능이 모든 처리 농도에서 PBS 처리구와 유의적인 차이를 보이지 않아 세포 독성을 가지지 않음을 확인하였다. 따라서 이후의 RAW 264.7 세포를 이용한 항염증 효과 실험은 0-60시간 별 알긴산 저분자화 시료를 10, 50 및 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하여 실험을 진행하였다.

#### Nitric Oxides 생성 억제 효과

0-60 h 동안 분해시킨 알긴산 올리고당 처리에 의한 NO 생성 억제 효과를 살펴보기 위하여 RAW 264.7 세포를 LPS로 활성화 시켰다. 그 후 알긴산 올리고당 시료를 10, 50 및 100  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리하여 생성된 NO를 griess 시약을 이용하여 측정하였다(Fig. 17). PBS 처리구에서는  $5.88 \pm 0.13 \mu\text{M}$ 로 낮은 분비를 보였으나, LPS 자극에 의해  $55.31 \pm 1.22 \mu\text{M}$ 로 분비량이 약 10배 증가하였다. 반응 시간별 NO 분비량은 24 h 처리 이후에, 50-100  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 알긴산 (0 h) 시료와 비교 시 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. 특히, 36 h 반응시킨 알긴산 올리고당 시료가 100  $\mu\text{g/mL}$  농도에서  $30.93 \pm 0.88 \mu\text{M}$ 의



분비량을 보이며 LPS 단독 처리구에 비해 44% 억제율을 나타내 가장 높은 NO 분비 억제 효과를 가지는 것을 확인하였다. 이는 24 h 이후 알긴산이 trisaccharide와 pentasaccharide로, 48시간 이후부터 monosaccharide로 알긴산올리고당화에 따른 NO 생성억제효과로 사료된다. 이와 유사한 결과로 Yang의 연구 (2010)에서 키토산 유래 올리고당이 분자량이 더 작을 때 NO 분비 억제효과가 뛰어나다고 보고하여 본 연구와 유사한 결과를 보였다.



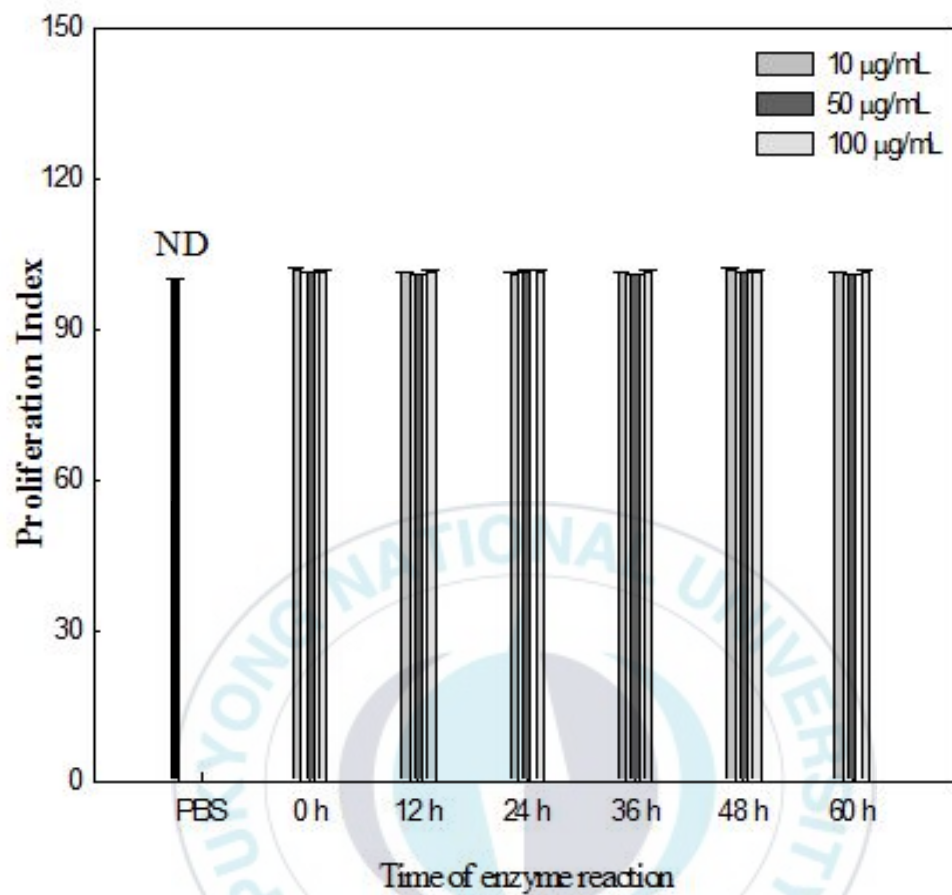


Fig. 16. Effects of sample on the proliferation of RAW 264.7 cells.

\*Proliferation index (%) = (sample O.D/control O.D )\*100

ND ; Not significantly different

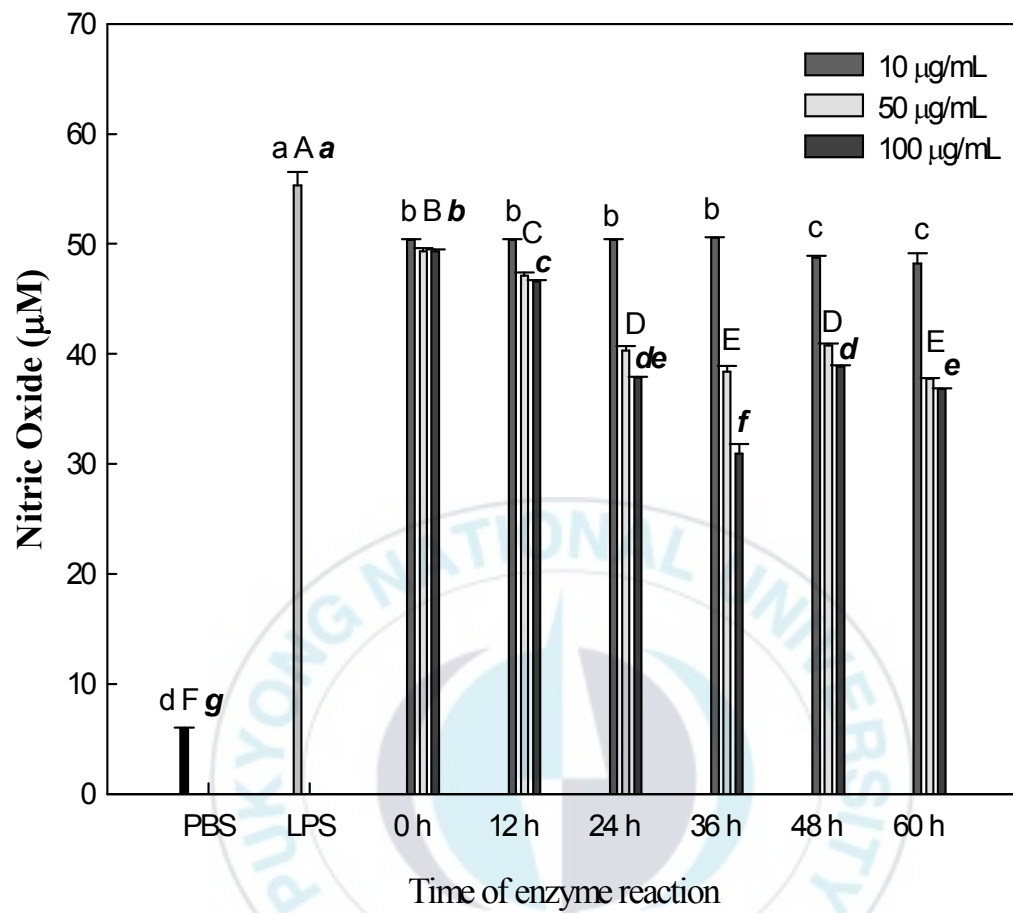


Fig. 17. Inhibitory effect of samples on the production of nitric oxides in RAW 264.7 cells.

Words mean with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

## 염증 관련 cytokines 생성 억제 효과

0-60시간 동안 분해시킨 알긴산 저분자화 시료의 항염증 효과에 대하여 알아보기 위하여 염증 반응의 주요 매개체로 작용하는 cytokine의 분비에 대한 억제효과를 살펴보았다. TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL-1 $\beta$ 의 분비량을 측정한 결과(Fig. 18-20), 알긴산 저분자화 시료를 10, 50 및 100  $\mu$ g/mL 농도로 처리시 농도의존적으로 각각의 cytokine의 분비가 유의적으로 억제됨을 확인하였다.

TNF- $\alpha$ 의 경우 0-60 h 샘플이 10-50  $\mu$ g/mL 농도에서는 분비 억제에 큰 효과가 없었으나, 12-36 h 시료가 100  $\mu$ g/mL 농도에서 LPS 단독 처리구와 비교 시 약 30% 정도로 분비 억제 효과가 가장 크게 나타났다.

IL-6의 경우 LPS 단독 처리시 557.52 $\pm$ 18.48 pg/mL으로 분비량이 증가하였고, 모든 시료 처리에 의해 분비 감소 효과를 나타내었지만, 24-60 h 처리 시 분비량 억제에 더 효과를 나타내었으며, 특히, 48-60 h 시료가 100  $\mu$ g/mL 농도에서 약 60% 정도의 감소 효과를 나타내었다.

IL-1 $\beta$ 의 경우에는 0 및 12 h 시료에서는 분비 억제 효과가 크지 않았으나, 24 h 이후부터 분비 감소에 효과를 보이는 것으로 나타났다. 100  $\mu$ g/mL 농도에서는 24-60 h 샘플이 유의적인 차이가 없었으나, 36 h 시료가 10 및 50 $\mu$ g/mL 농도에서 다른 시료에 비해 분비 억제 효과가 가장 좋았으며, 약 30% 및 40% 정도의 분비 감소 효과를 나타냈다. 키토산올리고당의 항염증 활성 연구 결과(Yang et al., 2010)에서도 IL-1 $\beta$ 분비량 감소에 효과가 있었지만, 분비량 감소 효과가 분자량 감

소 정도에 비례하여 나타나지는 않았다고 보고하여 본 연구 결과와 유사하였다. 이상의 결과, 조효소와 알긴산을 시간별로 반응시킨 결과, 36 h 시료에서 가장 좋은 항염증 효과를 나타냄을 확인하였다.



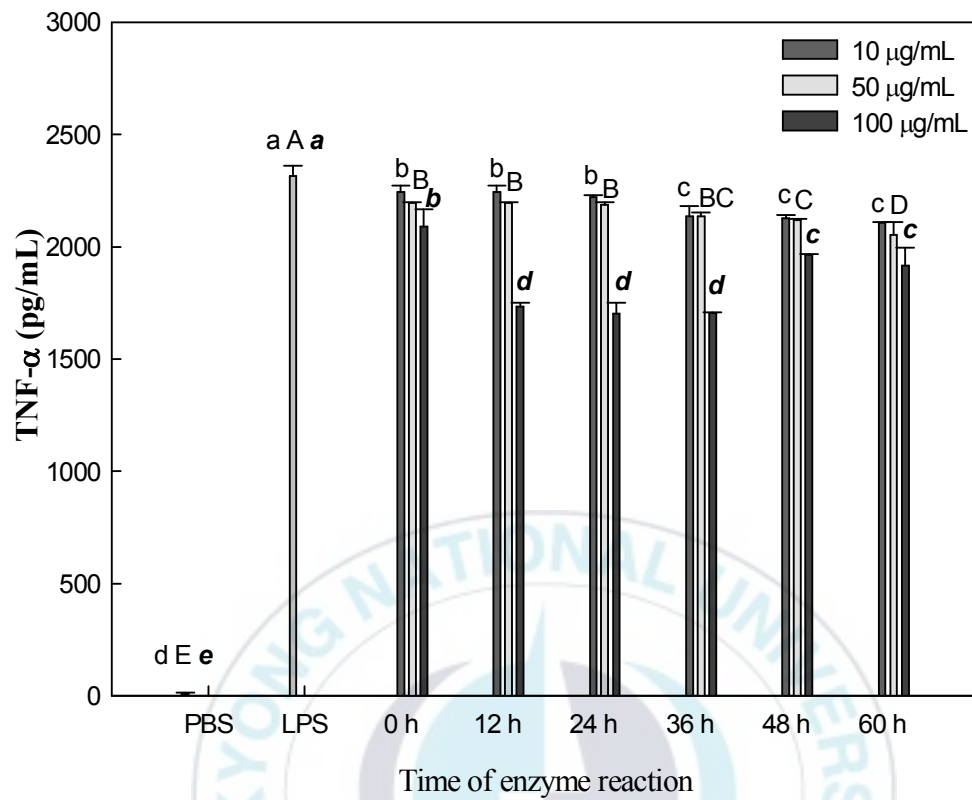


Fig. 18. Inhibitory effect of samples on the production of TNF- $\alpha$  in RAW 264.7 cells.

Words mean with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

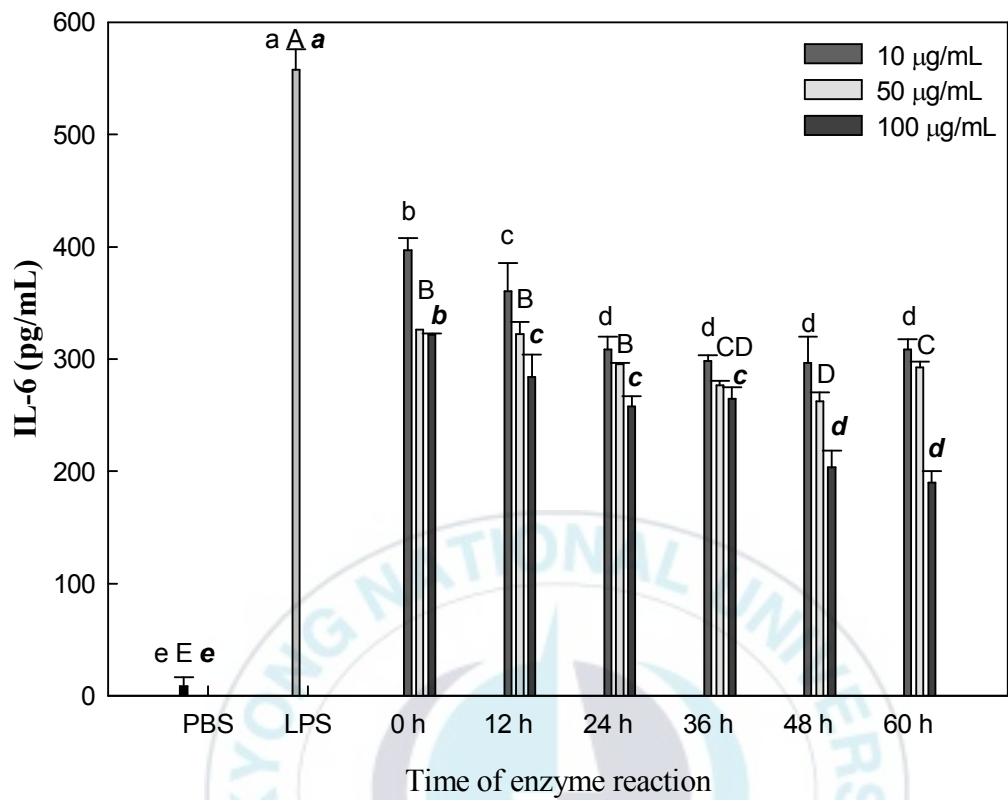


Fig. 19. Inhibitory effect of samples on the production of IL-6 in RAW 264.7 cells.

Words mean with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

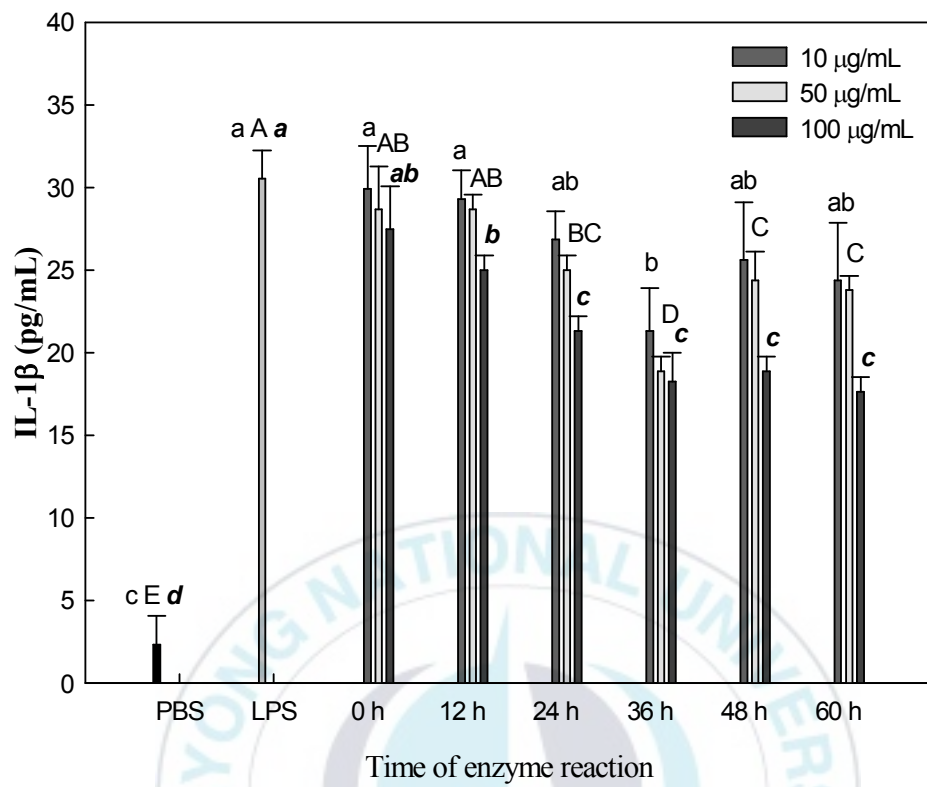


Fig. 20. Inhibitory effect of samples on the production of IL-1 $\beta$  in RAW 264.7 cells.

Words mean with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).



## **iNOS, COX-2 발현에 미치는 영향**

알긴산 올리고당화 시료가 세포질 내에서의 iNOS 및 COX-2 단백질 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 western blot 방법을 시행하였다 (Fig. 21). 앞선 NO 와 pro-inflammatory cytokine의 분비 억제 결과에서 36 h 시료가 가장 좋은 항염증 효과를 나타내어 iNOS 및 COX-2의 발현 변화를 알아보았다. 그 결과, RAW 264.7 세포에 LPS(1 $\mu$ g/mL) 처리하였을 경우 iNOS 및 COX-2의 단백질 발현이 증가하였고 알긴산 올리고당화 시료 10  $\mu$ g/mL에서는 발현의 변화가 거의 없었지만, 50  $\mu$ g/mL 및 100  $\mu$ g/mL에서 억제되는 것을 확인 하였다. 이는 36 h 시료에 의한 NO 분비 억제가 iNOS 활성 저해에 의한 것임을 확인하였고, 또한 COX-2의 발현도 저해됨을 확인하여 COX-2에 의한 염증 조절에도 효과를 나타낼 것으로 사료된다.

## **NF- $\kappa$ B p65 활성화에 미치는 영향**

본 연구에서는 항염증 효과가 가장 뛰어난 36 h 처리 알긴산 올리고당 시료가 NF- $\kappa$ B p65 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 western blot을 통해 단백질 발현량을 확인하였다. 그 결과(Fig. 21), 처리 농도에 따라 NF- $\kappa$ B p65의 단백질 발현량이 감소함을 나타내었으며, 50  $\mu$ g/mL 농도 이상에서는 40% 이상으로 감소하였다. 이를 통해 핵 내로 NF- $\kappa$ B p65의 이동이 억제되었음을 확인할 수 있었다. 위의 결과로 미루어보아, 알긴산 올리고당 시료가 LPS로 유도된 대식세포에서 활성화된 NF- $\kappa$ B signaling을 저해하고 전사인자로부터 증가되는 다양한 염증매개물들의 단백질 발현을 억제함으로써 항염증 효과를

보인 것으로 생각된다.



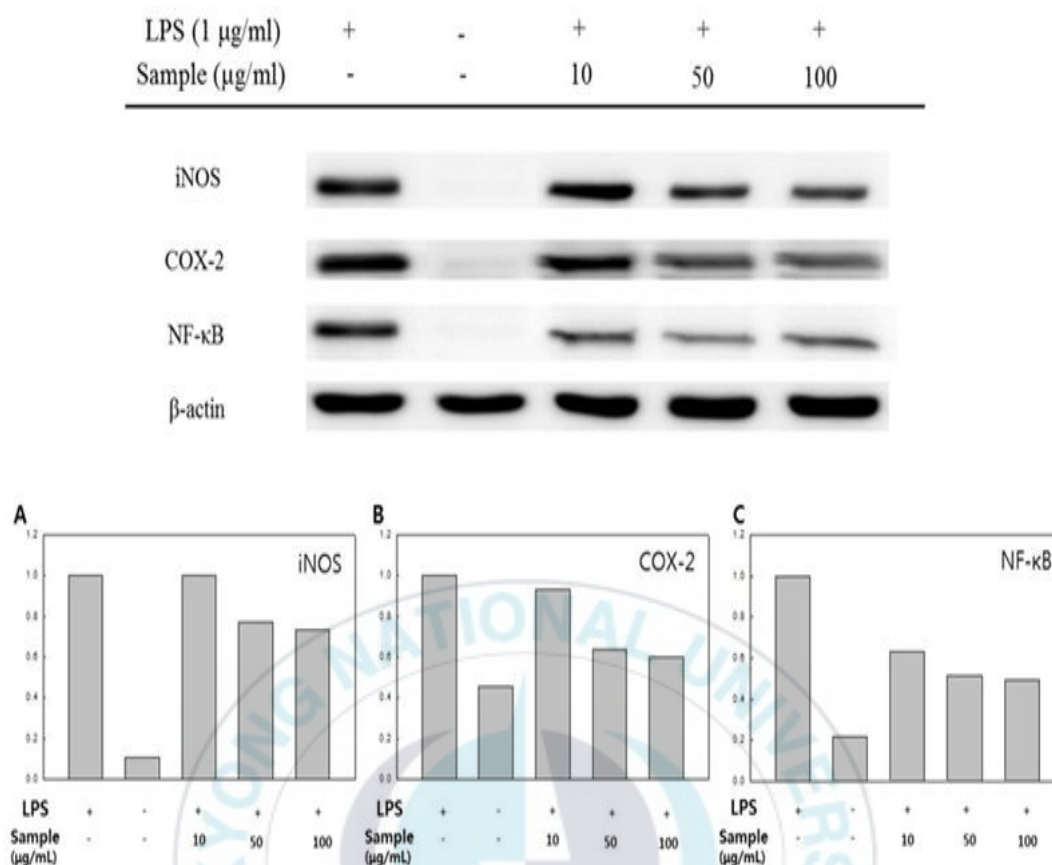


Fig. 21. Effect of alginate oligosaccharide (36 h) on LPS-induced iNOS, COX-2, and NF- $\kappa$ B p65 expression in RAW 246.7 cells. The levels of iNOS, COX-2 in the cytosolic protein and the p65 subunit of NF- $\kappa$ B in nuclear protein were determined by a western blot analysis. RAW 264.7 cells were treated with the indicated concentrations of alginate oligosaccharide (10, 50, and 100  $\mu\text{g/ml}$ ) and LPS (1 $\mu\text{g/ml}$ ) for 18 h or 30 min and the proteins were detected using specific antibodies.

## 귀 부종 억제 효과 및 조직 관찰

마우스 모델에서의 염증 억제효과를 알아보기 위하여 0, 36시간 저분자화 시료를 10, 50 및 100 mg/kg 농도로 200  $\mu$ L씩 경구 투여한 후 croton oil로 염증을 유발하였다. croton oil을 도포한 오른쪽 귀의 두께 차이를 비교하여 염증 유발의 억제 활성을 확인한 결과(Fig. 22) 0 h 및 36 h 시료는 농도 의존적으로 감소효과를 보였으며, 10 mg/kg bw 농도에서는 유의적인 차이가 없었으나 50 및 100 mg/kg bw 농도에서는 36 h이 0 h보다 부종 억제에 효과가 더 좋았다. 특히, 36 h 올리고당 시료를 250 mg/kg body weight로 처리 시 positive control 50 mg/kg 농도로 경구 투여했을 때와 유사한 정도의 귀 부종 억제 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 조직 관찰 결과와 비교해 보았을 때 (Fig. 23), croton oil로 부종을 유발한 마우스 귀 조직에 0 h 및 36 h 시료를 처리하였을 시 36 h 시료에서 prednisolone 처리구와 유사한 정도로 진피 두께가 감소 하였으며, 진피에서의 침윤된 mast cell의 수도 가장 적은 것으로 나타났다. 이상으로, trisaccharide와 pentasaccharide로 저분자화된 알긴산 올리고당 시료가 고분자량인 알긴산에 비해 항염증 효과가 더 뛰어남을 확인하여, *S. oneidensis* PKA1008 유래 알긴산 분해효소는 알긴산의 고점도 문제 해결과 함께 알긴산 올리고당의 항염증 활성도 증진시켜 산업적으로 활용 가능성이 높을 것으로 사료된다.

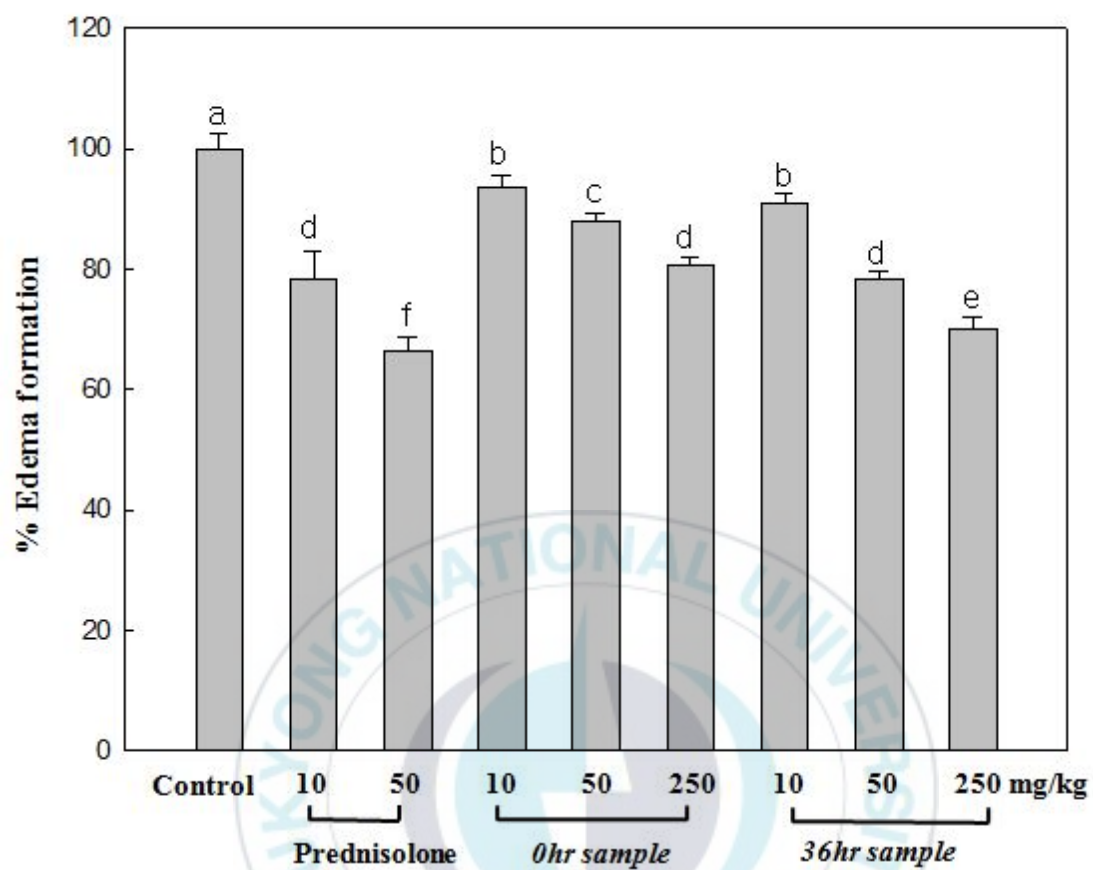


Fig. 22. Inhibition of alginate (0 h) and alginate oligosaccharide(36 h) against croton oil-induced mouse ear edema.

Means with different letters above the bars are significantly different ( $P < 0.05$ ).

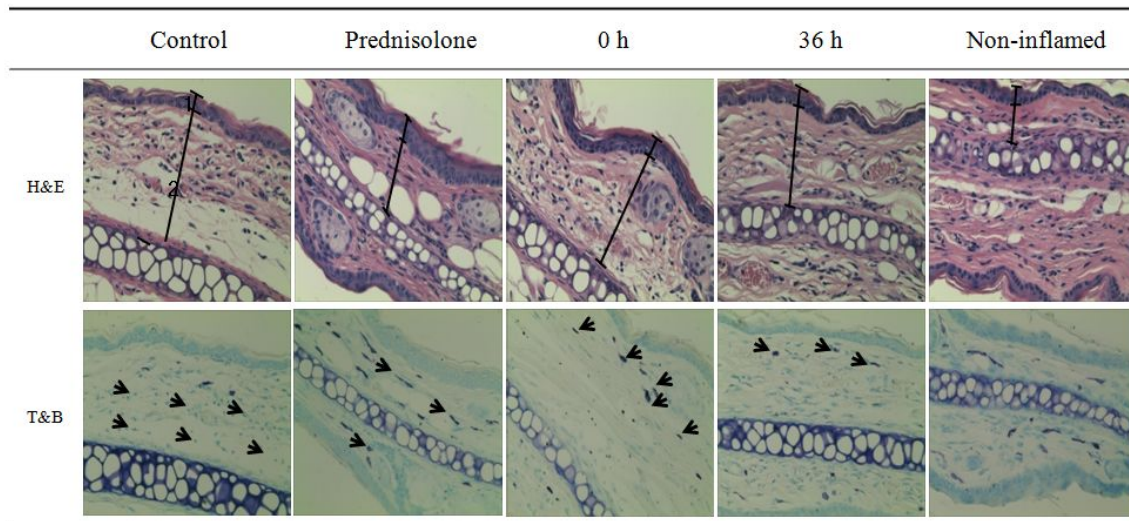


Fig. 23. Photomicrograph of transverse sections of mice ears sensitized with topical application of croton oil 5% (v/v) in acetone or vehicle acetone stained with hematoxylin-eosin and toluidine-blue examined under light microscopy (magnification:  $\times 200$ ). Treatments: vehicle 2% Tween 80, prednisolone 0.08 mg/ear, 0h sample 20  $\mu$ L/ear, and 36h sample 20  $\mu$ L/ear. The numbers 1 and 2 indicate dermis and epidermis, respectively. The arrow indicates mast cell.



## 요 약

*Shewanella oneidensis* PKA 1008이 생산하는 알긴산 분해효소를 정제하고 정제한 효소의 특성을 알아보았다. 또한 조효소의 알긴산 분해 시간별 시료를 이용하여 항산화, 항염증 효과를 살펴보고 산업적 이용 가능성에 대하여 실험하였다.

### 1. *Shewanella oneidensis* PKA 1008의 조효소 특성

*Shewanella oneidensis* PKA 1008이 생산한 조효소액의 특성을 알아보기 위하여 pH, 온도, 기질농도 및 반응시간에 대하여 최적조건들을 확인해보았다. 그 결과, *Shewanella oneidensis* PKA 1008이 생성하는 조효소액은 최적 pH 9, 30℃, 알긴산 농도 7% 및 반응시간 48시간에서 최적의 알긴산 분해 활성을 보이는 것으로 확인되었다.

### 2. *Shewanella oneidensis* PKA 1008의 효소 정제

알긴산 분해 효소를 정제하기 위해 ammonium sulfate 염석, DEAE sephadex chromatography, sephadex G-100 chromatography, 2nd DEAE chromatography를 실시하여 효소를 정제하였다.

### 3. 정제 효소 특성

Chromatography를 통하여 정제된 효소의 특성을 확인한 결과, 최적 pH 9.0 Tris-HCl buffer, 30℃, NaCl 0.05 M에서 최적 효소 활성을 보

였으며,  $Zn^{2+}$  이온하에서 효소활성이 증가하였고  $Ba^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  이온하에서 효소활성이 감소하였다.

#### 4. 산업적 이용가능성

*Shewanella oneidensis* PKA 1008이 생성한 조효소를 알긴산과 반응시켜 0-60시간 동안 분해시킨 후 분해산물의 TLC 결과, 분해 24시간 이후는 pentasaccharide, trisaccharide로 분해되며, 분해 48시간 이후 monosaccharide로 분해되었다. 또한 저분자화 된 알긴산 올리고당 시료를 항산화, 항염증 실험을 진행한 결과, 항산화 효과는 0시간 저분자화 시료보다 12-24시간 저분자화 시료에서 항산화 효과가 감소하였으나, 36시간 저분자화 이후 항산화 효과가 증가하여 60시간에서  $82.10 \pm 2.40$ 으로 가장 높은 항산화 효과를 보였다.

항염증 효과는 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL-1 $\beta$ 의 분비량을 측정한 결과, 알긴산 저분자화 시료를 60시간, 100  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리시 30%, 60%, 45%의 염증 cytokine 분비량 억제효과를 확인하였다.

36 시간 시료의 iNOS, COX-2의 단백질 발현을 억제하는 것을 확인하였으며 NF- $\kappa$ B 단백질 역시 50  $\mu\text{g/mL}$  농도 이상에서는 40% 이상으로 감소하는 것을 확인하였다.

귀부종 실험에서도 0 h 시료에 비하여 36 h 시료가 prednisolone 처리구와 유사한 정도로 진피 두께가 감소하였으며, 진피에서의 침윤된 mast cell의 수도 가장 적은 것으로 나타났다.

이상의 결과를 종합하였을 때, 저분자화 시킨 알긴산 올리고당 시료가 고분자량의 알긴산에 비하여 항산화, 항염증 효과가 뛰어남을 확인



할 수 있었다. 따라서, *Shewanella oneidensis* PKA 1008이 생산하는 알긴산 분해효소를 이용하여 알긴산의 고점도 문제를 해결하고 생리활성을 증진시켜 산업적 이용가능성이 높을 것으로 사료된다.



## 참고 문헌

Baxter, R. M. 1959. An interpretation of the effect of salts in the lactic dehydrogenase of *Halobacterium salinarium*. Can. J. Microbial. 5, 47-57.

Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature. 181, 1990-2100.

Boyen, C., Bertheau, Y., Barbeyron, T., Kloareg, B. 1990. Preparation of guluronate lyase from *Pseudomonas alginovora* for protoplast isolation in *Laminaria*. Enzyme. Microb. Tech. 12, 885-890.

Cho, M., Kim, B. Y., Rhim, J. H. 2003. Degradation of alginate solution by using  $\gamma$ -irradiation and organic acid. Korean. J. Food. Sci. Technol. 35, 67-71.

Falkeborg, M., Cheong, L. Z., Gianfico, C., Sztukiel, K. M., Kristensen, K., Glasius, M., Xu, X., Guo, Z. 2014. Alginate

oilgosaccharide : Enzymatic preparation and antioxidant property evaluation. Food Chemistry. 164, 185-194.

Fenical, W. 1983. Marine plants: a unique and unexplored resource. In Plants: The potentials for extracting protein, medicines, and other useful chemicals (workshop proceedings). pp147-153. DIANE publisher, Washington DC, USA.

Gacesa, P. 1987. Alginate-modifying enzymes: a proposed unified mechanism of action for the lyases and epimerases. FEBS Lett. 212, 199-202.

Horn, S. J., Moen, E., Østgard, K. 1999. Direct determination of alginate content in brown algae by near infra-red (NIR) spectroscopy. Journal of Applied Phycology. 11, 9-13.

Joo, D. S., Cho, S. Y., Lee, E. H. 1993. Isolation of alginate-degrading bacteria and production of alginate-degrading activities by the bacteria. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21, 207-213.

Joo, D. S., Lee, J. S., Park, J. J., Cho, S. Y., Ahn, C. B., Lee, E. H. 1995. Purification and Characterization of the Intracellular Alginase from *Vibrio* sp. AL-145. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23, 432-438.

Kim, E. Y., Baik, I. H., Kim, J. H., Kim, S. R., Rhyu, M. R. 2004. Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean. J. Food. Sci. Technol.* 36, 333-338.

Kim, H. J., Lee, S. M., Kim, S. K., Lee, J. H. 2012. Characterization of *Erwinia tasmaniensis* isolated from Nuruk producing alginate lyase. *Appl. Chem. Eng.* 23, 100-104.

Kim, H. K., Lee, J. C., Kang, N. H., Kim, S. H., Kim, J. G., Chung, K. C. 2007. Purification and characterization of the extracellular alginate lyase from *Streptomyces* sp. MET 0515. *J. Life Sci.* 17, 625-633.

Kim, J. H., Kim, Y. H., Kim, S. K., Kim, B. W., Nam, S. W. 2011. Properties and industrial applicaions of seaweed

polysaccharides-degrading enzymes from the marine microorganisms. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 39, 189-199.

Kim, K. H., Cheong, J. J. 1984. Optimum conditions for extracting alginic acid from and amino acid composition of its extraction residue. Korean. J. Food. Sci. Technol. 16, 336-340.

Kim, M. S., Kwon, K. J., Lee, M. J., Ahn, S. M., Sohn, H. Y. 2012. Evaluation of the antimicrobial activities of 35 seaweed extracts against pathogenic bacteria and *Candida sp.*, Korean. J. Microbiol. Biotechnol. 40, 144-151.

Kim, O. J., Lee, D. G., Lee, S. M., Lee, S. J., Do, H. J., Park, H. J., Kim, A., Lee, J. H., Ha, J. M. 2010. Isolation and Characteristics of Alginate-Degrading *Methylobacterium sp.* HJM27. J. Micorobiol. Biotechnol. 38, 144-150.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

Lee, C. J., Song, E. J., Kim, K. B. W. R., Jung, J. Y., Kwak, J. H., Choi, M. K., Kim, M. J., Kim, D. H., Sunwoo, C., Park, J. G., Kim, J. H., Choi, J. I., Lee, J. W., Byun, M. W., Ahn, D. H. 2011. Effect of gamma irradiation on immune activity and physicochemical properties of *Myagropsis myagroides* water extract. Korean. J. Fish. Aquat. Sci. 44, 50-57.

Lee, D. S., Kim, H. R., Pyeun, J. H. 1998. Effect of low-molecularization on rheological properties of alginate. J . Korean. Fish. Soc. 31, 82-89.

Lee, H. S., Choi, M. S., Lee, Y. K., Park, S. H., Kim, Y. J. 1996. A study on the development of high-fiber supplements for the diabetic patients- Effect of seaweed supplementation on the lipid and glucose metabolism in streptozotocin induced diabetic rats. Korean J. Nutr. 29, 296-306.

Lee, J. H., Bae, M. J., Kim, Y. C., Nam, S. W. 2009. Identification and Characterization of Alginate Lyase Producing *Pseudomonas* sp. N7151-6. Kor. J . Microbiol. Biotechnol. 37, 350-354.

Lee, J. K., Choi, H. S., Yoon, S. K., Kim, W. J. 1993. Effect of extraction temperature on some quality of sea tangle extract. J. Korean Soc. Food Nutr. 22, 771~776.

Lee, S. T., Jeong, Y. R., Ha, M. H., Kim, S. H., Byun, M. W., Jo, S. K. 2000. Induction of nitric oxide and TNF- $\alpha$  by herbal plant extracts in mouse macrophages. J Korean Soc Food Sci Nutr. 29, 342-348.

Li, J. W., Dong, S., Song, J., Li, C. B., Chen, X. L., Xie, B. B., Zhang, Y. Z. 2011. Purification and characterization of bifunctional alginate lyase from *Pseudoalteromonas* sp. SM0524. Mar. Drugs. 9, 109-123.

Matsukawa, R., Dubinsky, Z., Kishimoto, E., Masaki, K., Masuda, Y., Takeuchi, T. 1997. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. J. Appl. Phycol. 9, 29-35.

Michaud, P., Costa, A. Courtois, B. Courtois, J. 2003. Polysaccharide lyases : recent developments as biotechnological tools. Crit. Rev. Biotechnol. 23, 233-266.

Moen, E., Larsen, B., Ostgard, K., Jensen, A. 1999. Alginate stability during high salt preservation of *Ascohyllum nodosum*. Journal of Applied Phycology. 11, 21-25.

Nelson, A. 1944. A photometric adaptation of the somogyi method for the determinatio of glucose. J. Biol. Chem. 153, 375-380.

Nibu, Y., Satoh, T., Nishi, Y., Takeuchi, T., Murata, K., Kusakabe, I. 1995. Purification and characterization of extracellular alginate lyase from *Enterobacter cloacae* M-1. Biosci. Biotechnol. Biochem. 59, 623-637.

Park, Y. M., Won, J. H., Yun, K. J., Ryu, J. H., Han, Y. N., Choi, S. K., Lee, K. T. 2006. Preventive effect of Ginkgo biloba extract (GBB) on the lipopolysaccharide-induced expressions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 via



suppression of nuclear factor- $\kappa$ B in RAW 264.7 cells. Biol Pharm Bull 29, 985-990.

Reed, M. C., Lieb, A., Nijhout, H. F. 2010. The biological significance of substrate inhibition : A mechanism with diverse functions. Bioessays. 32, 422-429.

Sato, M., Hosokawa, T., Yamaguchi, T., Nakano, T., Muramoto, K., Kahara, T. 2002. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from wakame (*Undaria pinnatifida*) and their antihypertensive effect in spontaneously hypersensitive rats. J. Agric. Food. Chem. 50, 6245-6252.

Sheeba, M. S., and Asha, V. V. 2009. *Cardiospermum halicacabum* ethanol extract inhibits LPS induced COX-2, TNF- $\alpha$  and iNOS expression, which is mediated by NF- $\kappa$ B regulation, in RAW 264.7 cells. J. Ethno. pharmacol. 124, 39-44.

Suetsuna, K., Kaekawa, K., Chen, J. R. 2004. Antihypertensive effects of *Undaria pinnatifida* wakame peptide on blood pressure in spontaneously hypersensitive rats. J. Nutr. Biochem. 15, 267-272.

Sunwoo, C., Kim, K. B. W. R., Kim, D. H., Hung, S. A., Kim, H. J., Jeong, D. H., Jung, H. Y., Kang, B. K., Bark, S. W., Lim, S. M., Hong, Y. K., Ahn, D. H. 2013. Optimization of conditions for the production and properties of alginate degrading crude enzyme from *Shewanella oneidensis* PKA 1008. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 41, 372-378.

Tohru, K., Kohsuke, U., Masayuki, M., Yuichi, N., Koki, H. 2009. A new high alkaline alginate lyase from a deep sea bacterium *Agarivorans* sp. Extremophiles. 13, 121-129.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354.

Tseng, C. H., Yamaguchi, K., Kitamikado, M. 1992. Two types of alginate lyase from a marine bacterium *Vibrio* sp. AL-9.

Nippon. Suisan. Gakkaishi. 58, 743-749.

Uo, M. H., Joo, D. S., Cho, S. Y., Min, T. S. 2006. Purification and Characterization of the Extracellular Alginase Produced by *Bacillus licheniformis* AL-577. J . Korean. Soc. Food. Sci. Nutr. 35, 231-237.

Wasikiewica, J. M., Yoshii, M., Nagasawa, N., Wach, R. A., Mitomo, H. 2005. Degradation of chitosan and ultraviolet methods. Radiat. Phys. Chem. 73, 287-295.

Wong, T. Y., Preston, L. A., Schiller, N. L. 2000. Alginate lyase : Review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and application. Annu. Rev. Microbiol. 54, 289-340.

Yang, E. J., Kim, J. G., Kim, J. Y., Kim, S. C., Lee, N. H., Hyun, C. G. 2010. Anti-inflammatory effect of chitosan oligosaccharides in RAW 264.7 cells. Cent. Eur. J. Biol. 5, 95-102.

Yoon, S. Y., Lee, S.Y., Kim, K. B. W. R., Song, E. J., Lee, S.J., Lee, C. J., Park, N. B., Jung, J. Y., Kwak, J. H., Nam, K. W., Ahn, D. H. 2010. Antimicrobial activity of the *Sargassum fulvellum* ethanol extract and the effect of temperature and pH on their activity. Korean. J. Food. Sci. Technol. 42, 155-159.

Zvyagintseva, T. N., Shevchenko, N. M., Nazarenko, E. L., Gorbach, V. I., Urvantseva, A. M., Kiseleva, M. I., Isakov V. V. 2005. Water-soluble polysaccharides of some brown algae of the Russian Far-East. Structure and biological action of low-molecular mass polyuronans. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 320, 123-131.