



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
1008의 조효소를 이용한
경단구슬모자반 (*Sargassum*
muticum) 및 쌍발이모자반
(*Sargassum patens* C. Agardh)
추출 분해물의 특성 및 항염증 효과

2021年 2月

釜慶大學校 大學院

食 品 工 學 科

李 智 恩

工學碩士 學位論文

Shewanella oneidensis PKA
1008의 조효소를 이용한
경단구슬모자반 (*Sargassum*
muticum) 및 쌍발이모자반
(*Sargassum patens* C. Agardh)
추출 분해물의 특성 및 항염증 효과

指導教授 安東賢

이 論文을 工學碩士 學位論文으로 提出함

2021年 2月

釜慶大學校 大學院

食 品 工 學 科

李 智 恩

李 智 恩 의 工學碩士 學位論文을 認准함

2021年 2月 19日



주 심

공학박사

전 병 수



위 원

공학박사

심 길 보



위 원

농학박사

안 동 현



목 차

Abstract	iii
서 론	1
재료 및 방법	5
1. 실험 재료	5
1-1. 시험균주	5
1-2. 실험 재료 및 시약	5
2. 실험 방법	6
2-1. 원료의 일반성분과 알긴산 함량 분석	6
2-2. 조효소액의 제조	7
2-3. 추출 분해물의 제조	7
2-4. 추출 분해물의 특성	7
2-4-1. pH	7
2-4-2. 색도	8
2-4-3. 환원당 및 점도	8
2-5. 추출 분해물의 항염증 효과	11
2-5-1. 추출 분해물의 저분자화	11
2-5-2. 항염증 효과	11

2-5-2-1. 세포배양	11
2-5-2-2. 세포 독성 측정	12
2-5-2-3. 염증 관련 cytokine 분비량 측정	13
2-6. 통계처리	13
 결과 및 고찰	 15
 1. 원료의 일반성분과 알긴산 함량	 15
2. 추출 분해물의 특성 및 항염증 효과	19
2-1. 추출 분해물의 특성	19
2-1-1. pH	19
2-1-2. 색도	23
2-1-3. 환원당 및 점도	27
2-2. 추출 분해물의 항염증 효과	31
2-2-1. 추출 분해물의 저분자화	31
2-2-2. 항염증 효과	35
2-2-2-1. 세포 독성 측정	35
2-2-2-2. 염증 관련 cytokine 분비량 측정	38
 요 약	 47
참 고 문 헌	51

Effect of Properties and Anti-inflammatory of
Sargassum muticum and *Sargassum patens* C.
Agardh Extracts Using Crude Enzyme from
Shewanella oneidensis PKA 1008

Ji-Eun Lee

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

Abstract

Brown algae, such as *Sargassum muticum* (SM) and *Sargassum patens* C. Agardh (SP), contain 30 to 60% carbohydrates and polysaccharides such as alginate, fucoidan, laminararan and mannitol, etc.

Moisture, ash, crude lipid, crude protein, total sugar and alginate contents of SM were 12.30%, 19.01%, 1.65%, 12.20%, 53.35% and 26.46%, and SP were 8.29%, 21.64%, 0.60%, 18.10%, 51.37% and 32.37%, respectively. This study was conducted to investigate the physicochemical properties and anti-inflammatory effect of the enzymatic extracts of SM and SP using crude enzyme from *Shewanella oneidensis* PKA 1008. *S. oneidensis* PKA 1008 strain, producing an alginate-degrading enzyme, was isolated from *Ulva pertusa*. To obtain the optimal degrading

conditions for the SM and SP, the SM and SP were prepared in a ratio of 1:1 (v/v) with crude enzyme from *S. oneidensis* PKA 1008, respectively. The mixtures were reacted at 30°C for 0 to 60 h. Changes in pH, color value, reducing sugar, viscosity and thin-layer chromatography (TLC) of SM and SP degrading extracts were measured. The reducing sugar of SM increased significantly as the incubation time increased, and showed the highest reducing sugar is 474.35 µg/mL at 48 h. SP showed the highest reducing sugar is 571.91 µg/mL at 24 h. The pH and viscosity were significantly reduced at 60 h compared to 0 h. The degraded alginate oligosaccharides were visualized by TLC developed with a solvent system of n-butanol:methanol:water, 4:1:2 (v/v). Alginate were degraded into dimmers at 60 h. In the LPS-stimulated macrophage RAW 264.7 cells, the secretion of cytokines such as TNF- α , IL-6, IL-1 β was inhibited by the treatment of SM and SP enzymatic extracts.

These results indicate that crude enzyme from *S. oneidensis* PKA 1008 can be used to improve the polysaccharide degradation of SM and SP.

서 론

해조류는 인간이 식용이나 산업용으로 다양하게 이용해 온 해양 자원으로 육상 생물과는 다른 환경에서 서식하는 특성상 새로운 생리활성 물질이 함유되어 있을것으로 기대되고 있다(Kim et al., 2011). 해조류는 의약품과 화장품 및 식품 산업 등 다양한 분야의 원료로 이용되고 있으며(Gacesa, 1988), 면역력 증진(Cho et al., 1990), 항암(Lee et al., 1992; Lee and Sung, 2003; Cumashi et al., 2007), 항바이러스(Nakashima et al., 1987), 항혈전 효과(Scot et al., 1987; Lee et al., 1999; Ciancia et al., 2010), 고지혈증 개선(Bocanegra et al., 2009) 및 당뇨발생 위험 감소(Lee et al., 2010) 등 해조류의 특성으로부터 기인한 기능성 물질에 관한 다양한 연구가 알려져 있다. 해조류는 서식하는 바다의 깊이와 색소의 구성에 따라 갈조류(brown algae), 녹조류(green algae) 및 홍조류(red algae)로 나뉜다. 해조류 유래의 기능성 성분은 각각의 구성, 골격 및 저장 다당류에서 많이 찾을 수 있으며, 다시마, 감태, 미역, 모자반과 같은 갈조류에 포함되어 있는 알긴산과 푸코이단, 홍조류의 세포벽 다당류인 한천과 카라기난 등이 대표적이다.

이 중 미역, 다시마 및 모자반과 같은 갈조류의 세포벽 구성 다당류인 알긴산은 β -D-mannuronic acid (M)와 α -L-guluronic acid (G)의 β -1,4 결합 또는 α -1,4 결합으로 이루어진 복합다당류이며(Joo et al., 1995; Mori et al., 1981), mannuronate block (M-block), guluronate block (G-block) 및 MG-block의 상대적인 비율과 분자량의 차이에 의하여 점도, 용해도, 유화능 및 양이온 교환능 등의 물성이 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 현재 알긴산은 안정제, 증점제, 보습제 등의 형태로 식품, 의약품, 화장품 및 제지 등 여러 분야에서 이용되고 있으며(Kennedy et al., 1984), 식품에서는 가공 우유, 빙과, 시럽, 아이스크림, 어육 가공품,

잼, 젤리, 푸딩, pet food의 안정제와 증점제로 다양하게 이용되고 있다. 최근에는 알긴산의 난소화성 특성을 이용해 변비 치료, 비만 억제 등 식이섬유로서 성인병 예방 식품으로의 이용이 기대되고 있으며, 항암 작용, 인체 내 독성 억제, 중금속 배출 및 콜레스테롤 배출 등의 여러 효능이 보고되고 있다(Park et al., 1994). 이와 같이 다양한 기능성이 밝혀지면서 알긴산의 이용을 확대하기 위하여 의료, 식품 및 화장품 소재로써의 기능성에 대해 연구되고 있지만, 상온에서 용해 시간이 길고, 농도가 높아짐에 따라 점도가 증가하며, 알코올 함유 용매에는 잘 용해되지 않는 특성으로 인해 산업적으로 이용하는데 한계가 있는 실정이다(Cho et al., 2003).

산업적 이용의 한계를 해결하기 위한 방법으로 알긴산의 저분자화에 대한 연구가 시도되고 있으며, 알긴산의 저분자화는 고농도 및 고점도 알긴산의 단점을 보완하기 위한 수단임과 동시에 다양한 생체조절기능이 밝혀진 올리고당의 제조원으로서도 이용이 가능하다. 또한, 해조 다당류인 알긴산을 기반으로한 올리고당 제조에 대한 관심이 높아져 알긴산 저분자화에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 산업적 이용이 가능한 알긴산 저분자화 방법으로는 고온, 고압(Kim et al., 2010) 혹은 방사선 조사(Cho et al., 2003) 등의 물리적인 방법이나 산과 알칼리를 처리하는 화학적인 방법(Uo et al., 2006) 등이 보고되고 있다. 그러나 해조류 유래의 다당류 대부분이 산이나 알칼리에 비교적 안정하기 때문에 저분자화에 어려움이 있어, 알긴산 올리고당 생산을 위한 효소적 가수분해 방법에 관한 연구가 많이 진행되고 있다(Uo et al., 2006).

알긴산 분해효소에 관한 연구는 해양 환경, 해양 동·식물 및 미생물 유래의 알긴산 분해효소의 탐색 등 생화학 및 분자생물학적 연구가 활발히 진행되고 있다(Miyaka et al., 2003). 해조류 섭식 동물인 성게

(*Strongylocentrotus purpuratus*)(Eppley et al., 1959), 소라(*Turbo Corntus*)(Muramatsu et al., 1977), 전복(*Haliotis tuberculata*)(Boyen et al., 1990), 군소(*Dolabella auriculria*)(Anzai et al., 1991) 등에서 분리한 알긴산 분해 효소가 알려져 있으며, 현재 해수와 해저 토양 유래의 분변계 미생물인 *Pseudomonas aeruginosa* (Linker et al., 1984), *Azotobacter vinelandii* (Kennedy et al., 1992), *Vibio* sp. (Joo et al., 1995), *Sphigomoas* sp. (Wataru et al., 1998), *Alteromonas* sp. (Iwanoto et al., 2001), *Streptomyces* sp. (Kim et al., 2007) 등에서 알긴산 분해 활성이 확인되었다.

이러한 해양 미생물 유래 알긴산 분해 효소가 활성을 나타내는 최적 pH 범위는 6-9이고, 최적 온도는 30-40℃이며, 정제된 효소의 분자량은 20-90 kDa인 것으로 확인된 바 있다(Kim et al., 2011). 또한 미생물 유래 알긴산 분해효소 유전자를 cloning 함으로써 효소의 대량 생산이 가능해져 현재 알긴산 분해 미생물들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 알긴산 분해효소는 β -제거반응으로 uronic acid 중합체의 1, 4 glycosidic 결합을 분해하여 불포화성 비환원성 말단을 발생시킨다고 알려져 있다(Wong et al., 2000; Zhu and Yin, 2015).

이전 연구(Sunwoo et al., 2013)에서는 녹조류인 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)에서 분리한 균주를 16S rRNA 염기서열 분석 방법으로 동정한 결과, *Shewanella oneidensis* 계통임을 확인하였고, 이를 *Shewanella oneidensis* PKA 1008라 명명하였다. 현재까지 보고되어 있는 *S. oneidensis* PKA 1008 유래의 효소 분해물을 이용한 연구에는 알긴산 분해 조효소 생산 최적조건과 특징(Sunwoo et al., 2013), 알긴산 분해 효소에 의해 제조된 알긴산 올리고당의 항염증 효과(Kim et al., 2015), *S. oneidensis* PKA 1008 조효소액을 이용한 큰잎모자반(*Sargassum*

coreanum) 추출 분해물의 면역증진 효과(Park et al., 2017) 및 미역뿌리 (*Undaria pinnatifida* Root) 효소 분해물의 특성 및 항염증 효과(Xu et al., 2020) 등이 있다.

모자반속(*Sargassum*)은 모자반과(*Sargassaceae*)에 속하는 대형 갈조류로서 주로 온대역의 태평양, 인도양 및 호주연안에 널리 분포하며, 전 세계 400여종을 포함하는 매우 큰 분류군으로 알려져 있다(Kim et al., 2007). 경단구슬모자반(*Sargassum muticum*)은 한국산 모자반속 식물로 최근 다른 모자반속 식물과 나뉘어 새로 명명된 종(Oak and Lee, 2005)으로 생리활성 연구에는 유기용매를 이용한 항산화 및 항염증 효과(Kim et al., 2007), 항증식 및 항혈관 형성 효과(Namvar et al., 2013)에 관한 연구가 보고되어 있다. 쌍발이모자반의 생리활성 연구에는 유기용매를 이용한 항염증 효과(Kim et al., 2017)에 관한 연구가 보고되어 있으나 경단구슬모자반과 쌍발이모자반의 미생물 유래의 효소 처리를 통한 생리활성 연구는 부족한 실정이다.

이에 본 연구에서는 갈조류인 모자반속 중 경단구슬모자반과 쌍발이모자반에 알긴산 분해 효소를 생산하는 *Shewanella oneidensis* PKA 1008 유래의 조효소를 혼합하여 이들에 함유되어 있는 다당류를 알긴산 올리고당으로 저분자화 하고, 저분자화된 알긴산 올리고당의 특성과 기능성 및 산업적 이용 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

1-1. 실험 균주

부산시 해운대구 송정동 인근 해역에서 사멸기에 접어들어 분해가 진행 중인 녹조류 구멍갈파래(*U. pertusa*)로부터 분리한 *Shewanella oneidensis* PKA 1008 균주(Sunwoo et al., 2013)를 본 실험에 사용하였다.

1-2. 실험 재료 및 시약

본 실험에서 사용한 경단구슬모자반(*Sargassum muticum*)과 쌍발이모자반(*Sargassum patens* C. Agardh)은 각각 2016년과 2015년에 부산시 기장군 연화리에서 채취하여 담수로 깨끗하게 수세하였다. 이후 하루 동안 자연 건조하고, 동결 건조한 후, 분말 형태로 진공 포장하여 -20℃에서 보관하며 사용하였다.

Marine broth (MB)는 Difco사(BD Difco, New Jersey, USA)의 제품을, sodium azide는 Junsei사(Junsei Chemical, Tokyo, Japan) 제품을 사용하였다. 구리시약 A는 sodium carbonate anhydrous, potassium sodium tartrate tetrahydrate, sodium bicarbonate 및 sodium sulfate로 제조하였고, 구리시약 B는 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 로 제조하여 사용하였다. Sodium bicarbonate는 Sigma사(Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)의 제품을, sodium carbonate anhydrous, potassium sodium tartrate tetrahydrate 및 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 는 Yakuri사(Yakuri Pure Chemicals CO., LTD., Japan)에서 구입하여 실험에 이용하였다. 구리시약 D는 구리시약 A와 구리시약 B를 25:1의 비율(v/v)로

제조하여 사용하였다. 또한, Standard mixture는 cello-oligosaccharide를 사용하였으며, cellobiose, cellotriose, cellotetraose 및 cellohexaose는 Megazyme (Megazyme Co., Wicklow, Ireland)에서, glucose는 Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 실험 방법

2-1. 원료의 일반성분 및 알긴산 함량 분석

경단구슬모자반과 쌍발이모자반의 일반성분은 AOAC(1990)법에 따라 분석하였다. 각각의 수분 함량은 상압가열건조법, 조지방은 Soxhelt 추출법, 조단백질은 Semi-micro Kjeldahl법, 조회분은 건식회화법으로 측정하였고, 총당은 phenol-sulfate acid법(Saha et al., 1994)으로 측정하였다. 건조시킨 해조류 분말에 20배 양의 dH₂O를 가하여 90℃ 수욕상에서 3시간 동안 열수 추출한 다음 여과지(Whatman No. 5)로 여과하였다. 이 여액에 5% phenol 용액과 진한 황산을 가하여 30분 동안 방치한 후, 490 nm에서 흡광도를 측정하였고, glucose 표준곡선을 이용하여 총당 함량을 산출하였다.

알긴산 함량은 산·알칼리 가수분해 추출법(Haug et al., 1974)을 이용하여 구하였다. 산성 용액인 0.2 N H₂SO₄ 용액과 Na₂CO₃ 알칼리 용액을 이용하여 알긴산을 추출하였고, 30℃ 건조기에서 24시간 건조하였다. 각 시료의 알긴산 추출 수율은 사용한 시료의 양에서 추출 후 얻어진 알긴산의 건조중량으로 계산하였다.

$$\text{알긴산 추출 수율 (\%)} = \frac{\text{알긴산 건조 중량 (g)}}{\text{시료량 (g)}} \times 100$$

2-2. 조효소액의 제조

S. oneidensis PKA 1008은 최적 배양 조건인 2% NaCl을 첨가한 MB 배지(pH 9)에서 30℃ 조건으로 24시간 배양하였다(Sunwoo et al., 2013). 이후 4℃ 에서 10,000×g로 30분간 원심 분리(Supra 30K, Hanil Science Co., Korea)하였고, 상층액을 조효소액으로 사용하였다. 이 때 사용한 조효소액의 활성을 확인하기 위하여, 해수 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.40)로 제조된 4% 알긴산과 조효소액을 1:1(v/v)로 혼합하고, 30℃에서 24시간 반응시켰다. 반응시킨 알긴산 분해물의 환원당 함량을 측정하여 조효소액의 활성을 확인한 결과, 430 U/mL로 확인되었다.

2-3. 추출 분해물의 제조

10 mM phosphate buffer (pH 9)를 이용하여 경단구슬모자반과 쌍발이모자반 시료를 20 mg/mL 농도로 제조하였고, *S. oneidensis* PKA 1008 조효소액의 최적 활성 pH는 1 N NaOH를 이용하여 pH 9로 맞추었다. 20 mg/mL의 농도로 제조된 경단구슬모자반과 쌍발이모자반 시료를 *Shewanella oneidensis* PKA 1008 조효소액과 1:1의 비율(v/v)로 각각 혼합하였다. 이때 다른 미생물에 의한 오염을 방지하기 위하여 0.02% sodium azide를 첨가하였고, 각 시료는 30℃에서 0, 3, 6, 12, 24, 48 및 60시간 동안 교반하며 반응시켰다.

2-4. 추출 분해물의 특성

2-4-1. pH

경단구슬모자반과 쌍발이모자반 추출 분해물의 pH는 pH meter

(HM-30V, TOA, Kobe, Japan)를 사용하여 측정하였다. 모든 시료는 3번 반복 측정한 후, 평균값으로 나타내었다.

2-4-2. 색도

경단구슬모자반과 쌍발이모자반 추출 분해물의 색도 측정은 액체시료용 cell에 각 샘플의 시간별 분해물을 취한 후, 색차계(JC801, Color Technosystem Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 명도(lightness, L^* -value), 적색도(redness, a^* -value), 및 황색도(yellowness, b^* -value)를 측정하였다. 측정은 최소 5회 이상 반복하여 평균값을 구하였으며, 이때 사용된 표준색판의 값은 $L^*=98.75$, $a^*=0.22$, $b^*=-0.52$ 이었다.

2-4-3. 환원당 및 점도

경단구슬모자반과 쌍발이모자반 추출 분해물의 환원당 함량은 Somogyi-Nelson법을 이용하여 측정하였다(Nelson, 1994). 각 시료 0.15 mL와 구리시약 D 0.15 mL를 각각 시험관에 넣은 후, 100℃에서 20분간 가열하여 Cu_2O 를 생성시키고, 몰리브덴산용액 0.3 mL를 산성 조건하에서 첨가하였다. 이 후, UV 분광 광도계(Genesys 10SUV, Thermo Spectronic Rochester, NY, USA)를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였고, glucose 검량 곡선(Fig. 1)을 이용하여 환원당을 정량하였다. 환원당 standard curve는 1 mg/mL glucose를 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 희석한 후, 측정한 환원당 함량으로 도출하였다.

각 해조류 추출 분해물의 점도는 점도계(LVLTDV-II, Brookfield Co., Middleboro, MA, USA)를 사용하여 반응 시간별 점도 변화를

측정하였다. 측정 시, Stevens와 Levin (Steven et al., 1976)의 방법을 참고하여 25℃, 30 rpm의 조건에서 40 cP spindle을 사용하여 측정하였다.



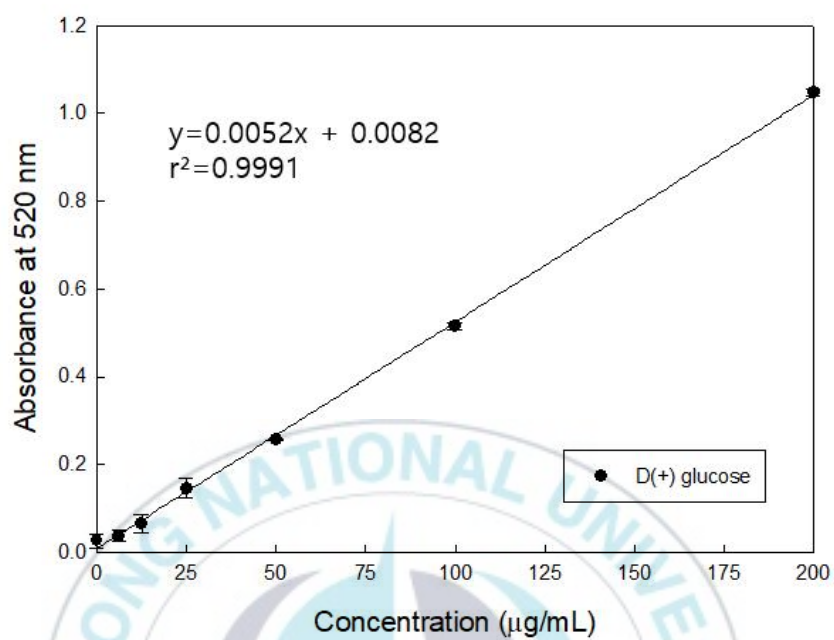


Fig. 1. Standard curve for determination of reducing sugar.

2-5. 추출 분해물의 항염증 효과

2-5-1. 추출 분해물의 저분자화

10 mM phosphate buffer를 이용하여 20 mg/mL 농도의 경단구슬모자반과 쌍말이모자반 시료를 각각 제조하고, 조효소액을 1:1 비율(v/v)로 첨가하여 30℃에서 0, 3, 6, 12, 24, 48 및 60시간 동안 반응시켰다. 각 시간별 효소 분해물을 불활성화 하기 위하여 100℃ 끓는 물에 10분간 가열하였으며, 10,000×g, 4℃에서 10분간 원심 분리한 후, 상층액을 -70℃에서 동결 건조하였다. 동결 건조된 시료와 99.5% ethanol을 1:4.1(v/v)의 비율이 되도록 제조하여 12시간 동안 조당을 추출하였다. 또한, 6220×g, 4℃에서 30분간 원심 분리하여 상층액을 제거한 후, 상온에서 완전 건조하여 실험에 사용하였다.

경단구슬모자반과 쌍말이모자반 추출 분해물의 저분자화를 확인하기 위하여 시료를 각각 20 mg/mL로 용해시킨 후, thin-layer chromatography (TLC)를 이용하여 분석하였다. Silica gel F₂₅₄ plate에 시간별로 용해된 시료를 각 5 µL씩 spotting 하였고, 1-butanol : methanol : water (4 : 1 : 2 v/v/v)로 전개 용매를 제조하여 전개하였다. 또한, 10% H₂SO₄를 첨가한 ethanol 용액을 분무하여 건조시킨 다음, 110℃에서 20분간 회화하였다.

2-5-2. 항염증 효과

2-5-2-1. 세포배양

한국세포주은행(KCLB40071)으로부터 마우스의 대식세포인 RAW 264.7 세포를 분양받아 사용하였으며, DMEM (GIBCO, Grand Island, NY, USA)에 10% inactivated fetal bovine serum (FBS)와 1%

pebicillin-streptomycin (PS)을 첨가한 배지를 배양액으로 하여 5% CO₂ incubator (MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 37°C 조건으로 배양하였다. 또한, 실험과정의 모든 세포는 80-90% 정도의 밀도로 자랐을 때 계대 배양하였고, 20 passages를 넘기지 않은 세포만을 사용하였다.

2-5-2-2. 세포 독성 측정

RAW 264.7 cell에 대한 경단구슬모자반과 쌍발이모자반 분해물의 각 시간별 반응 시료의 세포 독성을 확인하기 위하여 Park 등(2006)의 방법을 약간 변형하여 MTT assay를 실시하였다. RAW 264.7 cell을 96 well plate에 1×10^6 cells/mL 농도로 분주하고 20시간 전배양하였다. 배양 후, 1 µg/mL의 LPS와 경단구슬모자반과 쌍발이모자반 분해물을 농도별로(0.1, 1, 10, 50 및 100 µg/mL) 각각 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator (MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 22시간 배양하였다. 배양 후, 5 mg/mL MTT (thiazol blue tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich Chemical Co.) 용액을 첨가하고 4시간 반응시켰다. 이를 4°C, 879×g에서 10분 간 원심분리(UNION 32R, Hanil Co., Incheon, Korea)하여 상층액을 제거하고, 각 well에 DMSO를 첨가하여 microplate reader (Model 550, Bio-rad, Richmond, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도 [optical density (O.D.)]를 측정하였다. 세포증식능은 다음 식에 의해 계산하였다.

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

2-5-2-3. 염증 관련 cytokine 분비량 측정

경단구슬모자반과 쌍발이모자반 분해물의 항염증 효과를 측정하기 위하여 염증 관련 cytokine인 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 의 분비량을 ELISA-kit (Mouse ELISA set, BD Bioscience, San Diego, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 cell을 2.5×10^5 cells/mL 농도로 48 well plate에 접종하고, 5% CO₂ incubator (MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 18시간 전배양하였다. 이 후, 1 μ g/mL의 LPS 와 0.1, 1, 10, 50 및 100 μ g/mL 농도의 경단구슬모자반과 쌍발이모자반 분해물을 각각 처리하여 12시간 배양하였다. ELISA microplate에 capture antibody로 anti-mouse TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 를 각각 분주하여 4°C에서 하룻밤 동안 coating시켰다. 이를 0.05% Tween 20이 포함된 phosphate buffered saline (PBST)으로 세척하고, 10% FBS 용액으로 blocking 한 후, 다시 PBST로 세척하였다. 각 배양 상층액을 blocking된 microplate에 분주하고, 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후, PBST로 세척하였다. 희석한 biotinylated anti-mouse TNF- α , IL-6 detection antibody와 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시켰다. IL-1 β 의 경우, biotinylated anti-mouse IL-1 β detection antibody를 첨가하여 1시간 반응시킨 후, streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 30분간 반응시켰다. 이 후, 이를 다시 PBST로 세척한 다음, OPD 용액을 첨가하여 실온에서 30분 동안 암반응시켰다. 2 N H₂SO₄로 반응을 종료시킨 후, microplate reader (Model 550, Bio-rad)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2-6. 통계처리

모든 실험 결과에 대한 통계처리는 SAS software (SAS Institute, Inc.,

Cary, NC, USA)를 사용하여 평균값을 분산분석한 후, $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test법에 따라 항목들 간의 유의적 차이를 검정하였다.



결과 및 고찰

1. 원료의 일반성분과 알긴산 함량

경단구슬모자반과 쌍발이모자반의 일반성분을 분석한 결과, 경단구슬모자반(Table 1)의 수분은 12.30%, 조회분은 19.01%, 조지방은 1.65%, 조단백질은 12.20%, 총당 함량은 53.53%이었다. 쌍발이모자반의 일반성분을 분석한 결과(Table 2), 수분은 8.29%, 조회분은 21.64%, 조지방은 0.60%, 조단백질은 18.10%, 총당 함량은 51.37%이었다.

산·알칼리 가수분해 추출법을 이용하여 알긴산 함량을 측정한 결과, 경단구슬모자반은 26.46%, 쌍발이모자반은 32.37%였다.

해조류는 탄수화물의 함량이 높고, 특히 갈조류의 탄수화물 함량은 건물기준으로 약 30-67% 정도로 알려져 있다(Park et al., 2007). 갈조류가 함유하는 다당류의 대부분은 알긴산과 laminaran 및 fucoidan 등으로 해조류의 종류와 수확기에 따라 알긴산 함량의 차이가 많이 나는 것으로 보고되고 있다(Cho et al., 1995).

알긴산은 갈조류의 세포막 또는 세포간의 물질을 구성하는 주성분으로 β -D-mannuronic acid (M)와 α -L-guluronic acid (G)가 α -1, 4결합 또는 β -1, 4 결합한 hetero형 다당류로 알려져 있다. Acid alkali soluble alginate (AASA), Alkali soluble alginate (ASA), Hot-water extractable material (HWEM), Water soluble alginate (WSA)의 네 가지 알긴산 추출방법을 이용하여 전남지역에서 대량 생산되는 다시마, 미역, 톳의 3가지 시료로부터 알긴산을 추출하여 수율을 알아본 결과, 사용된 시료 중에서 AASA 추출방법에 의한 미역의 알긴산 함량이 39.6%로 가장 우수하였고, HWEM 추출법에 의한 수율은 10.2-18.6%로

AASA방법으로 얻은 수율의 절반 수준이었다. 톳에서 추출한 알긴산의 점도는 상업용에 비해 훨씬 낮았으며, ASA 추출에 의한 알긴산의 점도가 WSA 추출법보다 높은 점성 결과를 보였다(Yoon et al., 2004). 이와 같이 해조류의 종류, 시료의 처리 조건, 채취시기 및 추출 방법 등에 따라 알긴산의 함량이 달라지며, 다시마, 미역, 톳 이외에도 제주도산 감태, 모자반의 계절 변화에 따른 알긴산 함량 변화와 곤피줄기, 모자반, 지충이 등의 부위별 알긴산 함량이 보고(Park et al., 1969; Kim and Park., 1975)된 바 있다.



Table 1. Proximate compositions and alginate contents of
Sargassum muticum

Component	Contents (%)
Moisture	12.30±0.26
Ash	19.01±0.08
Crude lipid	1.65±0.27
Crude protein	12.20±1.00
Total sugar (Alginate)	53.35±0.05 (26.46±0.10)

Table 2. Proximate compositions and alginate contents of
Sargassum patens C. Agardh

Component	Contents (%)
Moisture	8.29±8.57
Ash	21.64±0.19
Crude lipid	0.60±0.42
Crude protein	18.10±0.37
Total sugar (Alginate)	51.37±0.05 (32.37±0.10)

2. 추출 분해물의 특성 및 항염증 효과

2-1. 추출 분해물의 특성

2-1-1. pH

10 mM phosphate buffer (pH 9)를 경단구슬모자반과 쌍말이모자반 분말에 각각 혼합하여 각 시료의 농도가 20 mg/ml이 되도록 제조하였다. *Shewanella oneidensis* PKA 1008 조효소액과 20 mg/ml 농도의 각 시료를 1:1 비율(v/v)로 혼합하여, 효소 분해 최적 온도인 30°C에서 배양하였다. 경단구슬모자반 시료의 경우 0-60시간 동안, 쌍말이모자반 시료의 경우 0-48시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 각 시간별로 제조한 분해물의 pH 측정 결과를 Table 3과 Table 4에 나타내었다.

경단구슬모자반 분해물의 pH 측정 결과, 0시간에 pH 7.88에서부터 반응 시간이 길어질수록 pH 값이 유의적으로 감소하였고, 60시간에서 pH 7.26으로 가장 낮은 값을 나타내었다(Table 3).

쌍말이모자반 분해물의 pH 측정 결과, 0시간에 pH 7.97에서부터 반응 시간이 길어질수록 pH 값이 유의적으로 감소하였고, 48시간에서 pH 5.67로 가장 낮은 pH 값을 나타내었다(Table 4).

이러한 결과는 큰잎모자반(*Sargassum coreanum*)과 미역뿌리 및 참모자반 분말에 *Shewanella oneidensis* PKA 1008 조효소액을 첨가하여 반응 시간이 증가할수록 pH가 점점 감소한 결과(Park, 2017; Xu, 2019)와 일치하였다. 알긴산의 polymannuronate는 알긴산 분해효소(alginate lyase)에 의해 β -1,4-glycosidic 결합이 분해되어 생성되는데(Kim et al., 2011), pH가 점점 감소하는 것은 반응 시간이 증가됨에 따라 분해되는 alginate 분해물이 증가하기 때문이라 사료된다.

이에 따라, 알긴산 분해 효소인 *Shewanella oneidensis* PKA 1008 조효소의 혼합으로 인한 경단구슬모자반과 쌍말이모자반 분해물의 pH가 반

응시간에 의존적으로 감소하는 것은 각 시료가 함유한 알긴산의 저분자화에 의한 것이라고 판단된다.

한편, pH 감소 원인으로 반응 시간이 증가됨에 따른 미생물의 오염 및 성장으로 볼 수 있지만 효소분해물 제조 시 미생물의 오염을 방지하기 위하여 0.02% sodium azide를 첨가하였으므로 미생물 오염으로 인한 pH의 감소는 미미하다고 사료된다.



Table 3. Changes in pH of *Sargassum muticum* enzymatic extracts with incubation time

Time (h)	pH
0	7.88±0.79 ^{a1)}
3	7.60±0.01 ^b
6	7.42±0.01 ^c
12	7.38±0.00 ^d
24	7.32±0.01 ^e
48	7.26±0.01 ^f
60	7.18±0.01 ^g

¹⁾Means in the same column (a-g) bearing different superscript in samples are significantly different ($P<0.05$).

Table 4. Changes in pH of *Sargassum patens* C. Agardh enzymatic extracts with incubation time

Time (h)	pH
0	8.01±0.01 ^{a1)}
3	7.94±0.01 ^b
6	7.89±0.02 ^c
12	7.83±0.01 ^d
24	7.57±0.02 ^e
48	7.17±0.02 ^{ef}

¹⁾Means in the same column (a-f) bearing different superscript in samples are significantly different ($P<0.05$).

2-1-2. 색도

경단구슬모자반과 쌍발이모자반 분말을 각각 *Shewanella oneidensis* PKA 1008 조효소액과 1:1(v/v)의 비율로 혼합하여 반응시킨 후, 각 분해물의 시간별 색도를 측정한 결과는 Table 5와 Table 6과 같다.

경단구슬모자반 분해물의 색도 측정 결과, 반응 0시간에서 시료의 명도(L*), 적색도(a*) 및 황색도(b*)는 각각 29.77, 4.91, 46.66으로 가장 높았으며, 반응 시간이 증가할수록 그 값이 감소하는 경향을 보였고, 반응 48시간에서 명도(L*), 적색도(a*) 및 황색도(b*)가 각각 10.24, 4.72, 21.92로 가장 낮은 값을 나타내었다(Table 5).

쌍발이모자반 분해물의 색도 측정 결과, 반응 0시간에서 명도(L*)와 황색도(b*)가 각각 49.23와 55.77로 측정되었고, 적색도(a*)는 5.87로 확인되었다(Table 6). 반응 시간이 증가할수록 명도(L*)와 황색도(b*)는 감소하는 경향을 보였는데, 반응 48시간에서 각각 33.50과 51.19로 확인되었다. 적색도(a*)는 반응 48시간에 7.13으로 반응 0시간에 비해 증가하는 경향을 나타냈다.

갈조류의 세포는 광합성 색소인 chlorophyll a와 c를 가지고 있으며, xanthophyll과 β -carotene을 함유하고 있지만, phycobilin 단백질은 존재하지 않는다. 탄수화물인 laminaran, mannitol 및 fucosan 등은 광합성을 통해 만들어지는 동화 산물이며, 세포막은 셀룰로오스 및 펙틴성의 알긴산으로 구성되어 있다. 조체는 carotenoid계 색소인 푸코잔틴(fucoxanthin)을 함유하여 갈색 계통의 몸 빛깔을 띠게 된다(Gerster, 1993; Kim et al., 2004; Kim et al., 2004; Mohamed et al., 2011). chlorophyll은 금속이온, 빛, 산, 알칼리, 온도 및 효소 등에 불안정하여 분자의 중심에 있는 마그네슘이 수소원자와 치환되어 추출이나 가공에 의해 쉽게 탈락되며, 이는 탁한 황색이나 갈색을 나타내는 페오피틴 성

분으로 변한다(Ahmed et al., 2002; Canjura et al., 1991). 또한, carotenoids는 일반적으로 지용성이며, 공액 이중결합 수가 많을수록 황색에서 적색으로 변하는 것으로 알려져 있다. 더불어 300-500 nm 파장에서 특정의 흡수대를 가지며, 불포화도가 매우 높기 때문에 과산화물, 광조사, 금속이온, 산, 열, 화학약품 및 peroxidase 등에 의해 쉽게 산화되어 파괴되는 특성이 있다(Mascio et al., 1989).

해조류에 함유되어 있는 색은 주로 엽록소와 카로티노이드계 색소로 특히 갈조류에서는 엽록소 및 푸코잔틴 색소가 많이 함유되어 있어 이들 색소에 의하여 독특한 색을 나타낸다. 이러한 해조류는 일반적으로 붉은색, 녹색, 갈색으로 가공 전에 색이 뚜렷하게 나타나게 된다(Lee et al., 2007). 그러나 건조 또는 가공과정 중에 갈변현상 등을 일으켜 전반적으로 어두운 색을 띠며(Shin et al., 1998), 가공 또는 저장조건 등의 물리적 요인이 해조류의 색에 크게 영향을 미친다고 보고된 바 있다(Han et al., 1984). Kim 등(2012)의 연구에 따르면 해조류의 분말 제조 시 건조과정 중의 온도는 해조 분말의 갈변 현상을 일으켜 분말의 색도에 영향을 미친다고 보고한 바 있다. 또한, 다시마 추출액을 이용한 발효 음료 개발을 위하여 tea fungus로부터 분리한 *Gluconacetobacter* 속을 접종하여 발효한 다시마 발효액의 색도 분석 결과, 명도는 92.17-99.17로 투명도가 매우 높았고, 적색도는 연한 쪽에 유의적으로 더 가까웠다고 보고하였다(Kim et al., 2008). Jeon과 Choi(2012)의 연구에서는 해조류를 첨가한 돈육 패티의 명도(L*) 값은 톳, 파래, 미역 해조분말 첨가에 따라 감소하였다고 보고하였다.

따라서, 반응이 끝난 분해물의 색도 변화는 경단구슬모자반과 쌍발이모자반 분말 자체에서 유래되는 색소 성분에 의한 영향이 크게 작용했을 것이라고 사료된다.

Table 5. Changes in color value of *Sargassum muticum* enzymatic extracts with incubation time

Time (h)	L*	a*	b*
0	29.77±0.03 ^{a1)}	4.91±1.25 ^a	46.66±0.05 ^a
3	17.61±0.08 ^b	5.12±0.17 ^a	39.49±0.13 ^b
6	17.07±0.00 ^c	5.22±0.40 ^a	33.98±1.50 ^c
12	10.69±0.00 ^e	2.73±0.00 ^b	27.56±0.00 ^d
24	10.09±0.00 ^f	4.87±0.65 ^a	26.53±0.00 ^d
48	10.24±0.00 ^f	4.72±0.31 ^a	21.92±1.88 ^f
60	13.55±0.34 ^d	3.05±0.33 ^b	24.94±0.00 ^e

¹⁾Means in the same column (a-f) bearing different superscript in samples are significantly different ($P<0.05$).

Table 6. Changes in color value of *Sargassum patens* C.
Agardh enzymatic extracts with incubation time

Time (h)	L*	a*	b*
0	49.23±0.03 ^a	5.87±0.04 ^e	55.77±0.29 ^b
3	41.05±0.01 ^b	6.95± 0.08 ^d	55.72± 0.02 ^b
6	39.48±0.00 ^c	7.46± 0.00 ^b	56.72± 0.75 ^a
12	32.98±0.02 ^e	7.87±0.10 ^a	53.76±0.30 ^c
24	31.99±0.04 ^f	7.88± 0.17 ^a	52.05± 0.63 ^d
48	33.50±0.02 ^d	7.13± 0.17 ^c	51.19± 0.05 ^e

¹⁾Means in the same column (a-f) bearing different superscript in samples are significantly different ($P<0.05$).

2-1-3. 환원당 및 점도

S. oneidensis PKA 1008 균주로부터 제조된 조효소액을 경단구슬모자반과 쌍발이모자반 분말에 각각 혼합한 후, 각 시료를 30℃에서 0-60시간 또는 0-48시간 동안 반응시켰고, 각 분해물의 환원당 및 점도를 측정하였다(Table 7, Table 8).

경단구슬모자반 시료의 환원당 측정 결과(Table 7), 반응 0시간에서 200.87 µg/mL로 측정되었고, 반응 시간이 길어질수록 그 함량이 유의적으로 증가하여 반응 48시간에서 환원당 함량이 470.54 µg/mL로 가장 높게 나타났다. 경단구슬모자반 분해물의 점도 변화는 초기 0시간에서 1.61 cP였으며, 반응 시간이 증가할수록 유의적으로 감소하여 반응 60시간에 1.32 cP로 낮은 점도를 나타내었다.

쌍발이모자반 분해물의 환원당 및 점도를 측정한 결과(Table 8), 반응 0시간에서 환원당 함량이 184.86 µg/mL로 비교적 낮았고, 반응 시간이 길어질수록 그 함량이 유의적으로 증가하여 반응 24시간에서 쌍발이모자반 분해물의 환원당 함량은 571.91 µg/mL로 가장 높게 나타났다. 또한, 쌍발이모자반 분해물의 점도 변화는 초기 0시간에서 2.63 cP로 측정되었고, 반응 시간이 증가할수록 유의적으로 감소하여 반응 48시간에서 2.14 cP로 비교적 낮은 점도를 보였다.

이러한 결과는 앞선 연구(Xu, 2019)에서 *Shewanella oneidensis* PKA 1008의 조효소액이 반응 48시간 이후 큰잎모자반에 함유되어 있는 다당류를 가장 효율적으로 분해할 수 있다고 보고한 결과(Park, 2017)와 미역뿌리(미역귀) 및 참모자반의 경우 24시간의 반응시간이 최적 분해 시간이었다고 보고한 결과와 일치하였다. 또한 *Shewanella oneidensis* PKA 1008 조효소액을 alginate 기질에 첨가하여 0-60시간 배양하였을 때, 반응시간이 증가할수록 환원당 함량이 증가하고, 점도가 감소한다고

보고한 Sunwoo 등 (2013)의 연구 결과와 일치함을 확인할 수 있었다. 한편, Kim 등(2000)의 연구에서는 가열하여 저분자화시킨 alginate는 가열시간이 길어질수록 점도와 평균 분자량이 급격하게 감소한다고 보고한 바 있다.

이러한 결과에 따라 *Shewanella oneidensis* PKA 1008의 조효소액이 경단구슬모자반과 쌍발이모자반 시료에 함유되어있는 다당류를 저분자화시킬 수 있는 가장 효율적인 반응시간은 각각 48시간과 24시간임을 확인할 수 있었다. 또한, 각 시료의 가장 효율적인 반응시간에서 단당과 올리고당이 가장 많이 분해될 것이라고 추측할 수 있었다.

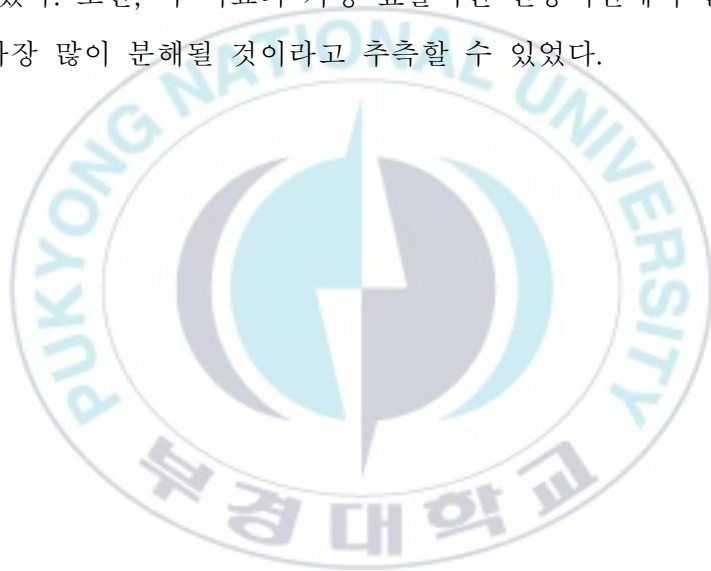


Table 7. Changes in reducing sugar and viscosity of *Sargassum muticum* enzymatic extracts with incubation time

Time (h)	Reducing sugar ($\mu\text{g/mL}$)	Viscosity (cP)
0	200.87 $\pm$ 3.24 ^{f1)}	1.61 $\pm$ 0.02 ^{a1)}
3	340.19 $\pm$ 2.23 ^f	1.55 $\pm$ 0.02 ^b
6	373.31 $\pm$ 8.47 ^e	1.50 $\pm$ 0.02 ^c
12	429.35 $\pm$ 3.24 ^d	1.49 $\pm$ 0.01 ^c
24	462.47 $\pm$ 2.29 ^c	1.44 $\pm$ 0.02 ^d
48	470.54 $\pm$ 2.32 ^a	1.37 $\pm$ 0.01 ^e
60	451.05 $\pm$ 3.10 ^b	1.32 $\pm$ 0.01 ^f

¹⁾Means in the same column (a-f) bearing different superscript in samples are significantly different ($P<0.05$).

Table 8. Changes in reducing sugar and viscosity of *Sargassum patens* C. Agardh enzymatic extracts with incubation time

Time (h)	Reducing sugar ($\mu\text{g/mL}$)	Viscosity (cP)
0	184.86 $\pm$ 1.14 ^{f1)}	2.63 $\pm$ 0.01 ^{a1)}
3	365.57 $\pm$ 2.32 ^e	2.44 $\pm$ 0.04 ^b
6	444.14 $\pm$ 7.81 ^d	2.34 $\pm$ 0.03 ^c
12	552.60 $\pm$ 3.25 ^b	2.31 $\pm$ 0.02 ^d
24	571.91 $\pm$ 4.62 ^a	2.24 $\pm$ 0.02 ^e
48	532.85 $\pm$ 7.26 ^c	2.14 $\pm$ 0.02 ^f

¹⁾Means in the same column (a-f) bearing different superscript in samples are significantly different ($P<0.05$).

2-2. 추출 분해물의 항염증 효과

2-2-1. 추출 분해물의 저분자화

경단구슬모자반과 쌍발이모자반 분말에 *Shewanella oneidensis* PKA 1008 조효소액을 각각 혼합하여 반응시킨 분해물의 저분자화를 확인하기 위하여 thin layer chromatography (TLC) 분석을 하였으며, 그 결과는 Fig. 2와 Fig. 3에 나타내었다.

경단구슬모자반의 TLC 분석 결과(Fig. 2), 반응 0시간에서부터 dimer로 분해되었으며, 반응 24시간에 monosaccharide로 저분자화 됨을 확인하였다. 또한, 쌍발이모자반의 TLC 분석 결과(Fig. 3), 반응 3시간 이후부터 저분자화 되어, 반응 12시간 이후, monomer로 분해됨을 확인하였다.

앞선 연구에서는 *Shewanella oneidensis* PKA 1008이 생성하는 분해효소가 알긴산을 올리고당 및 단당으로 분해시키고, 반응 48시간 이후부터 monosaccharide로 분해됨을 보고하였다(Kim et al., 2015). Zhu 등 (2016)의 연구에서는 *Cellulphaga* sp. NJ-1이 생산하는 알긴산 분해효소를 이용하여 알긴산 시료의 분해 시간 별 TLC 분석을 실시한 결과, 반응 3시간 이후부터 분해되기 시작하여 최종 60시간에서 tetramer, trimer 및 dimer로 분해됨을 보고한 바 있다. 또한, 알긴산 분해 미생물인 *Vibrio* sp. PKA 1003의 조효소액을 사용하여 알긴산을 분해하고, 각 반응 시간별 분해물을 TLC 분석한 결과, 배양 12시간부터 서서히 분해되어 알긴산이 조효소액에 의해 여러 가지 단당 또는 올리고당으로 저분자화 되는 것을 확인할 수 있었다(Kim et al., 2013). 이들 결과는 분해산물에 있어 본 연구 결과와 비슷한 경향을 보이지만 약간의 차이가 있는데, 이는 알긴산을 분해하는 방식의 차이에 따른 결과인 것으로 사료된다.

따라서, *Shewanella oneidensis* PKA 1008 조효소액 처리에 따른 경단

구슬모자반과 쌍발이모자반 각 시료의 저분자화를 확인한 결과, 각 시료에 함유되어있는 다당류가 *Shewanella oneidensis* PKA 1008 조효소액에 의해 단당 및 올리고당과 같은 저분자 물질로 분해되는 것을 확인할 수 있었으며, 각 시간별 저분자화된 분해물을 이용하여 항염증 실험을 실시하였다.



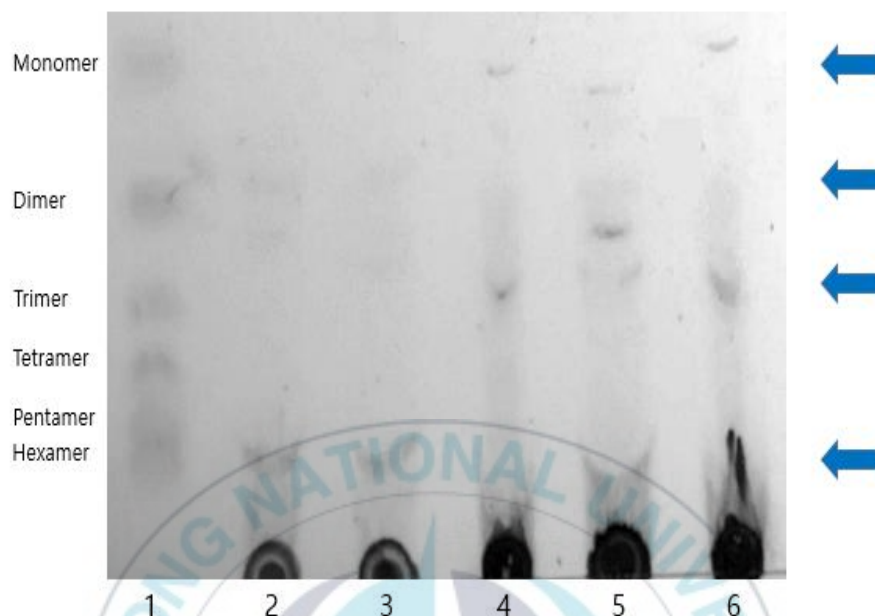


Fig. 2. TLC analysis of *Sargassum muticum* enzymatic extracts by alginate degrading crude enzyme with various incubation time.

Reaction time: lane 1, standard; lane 2, 0 h; lane 3, 3 h; lane 4, 24 h; lane 5, 48 h; lane 6; 60 h.

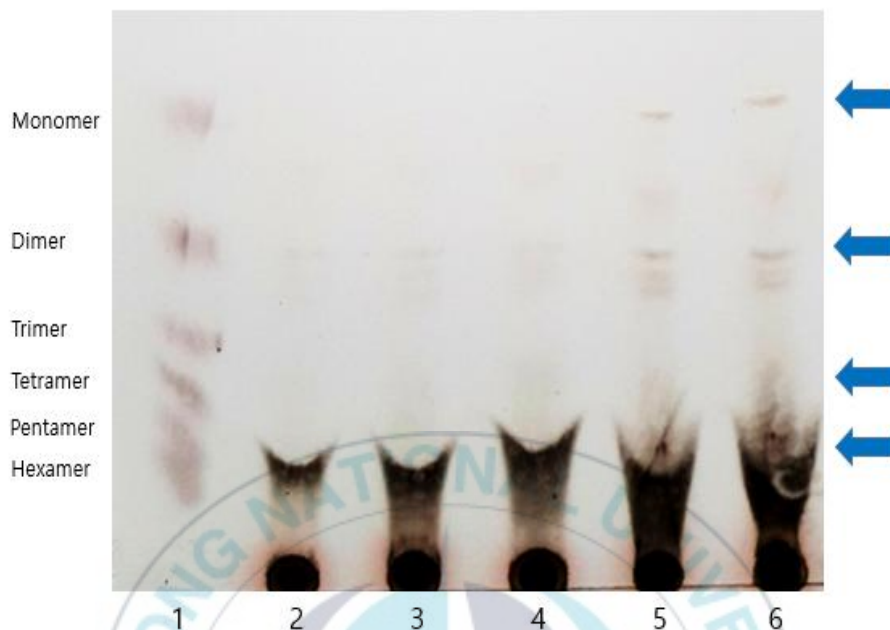


Fig. 3. TLC analysis of *Sargassum patens* C. Agardh enzymatic extracts by alginate degrading crude enzyme according to various incubation time.

Reaction time: lane 1, standard; lane 2, 0 h; lane 3, 3 h; lane 4, 12 h; lane 5, 24 h; lane 6, 48 h.

2-2-2. 항염증 효과

2-2-2-1. 세포 독성 측정

대식세포에 대한 세포독성을 확인하기 위하여 *Shewanella oneidensis* PKA 1008 조효소액으로 분해시킨 경단구슬모자반과 쌍발이모자반 각 분해물의 RAW 264.7 세포에 대한 MTT assay를 실시하였다.

경단구슬모자반과 쌍발이모자반 분해물 시료를 0.1, 1, 10, 50 및 100 µg/mL 농도로 RAW 264.7 세포에 각각 처리하고, 세포 독성을 확인한 결과, 두 시료 모두 0.1-100 µg/mL 농도 범위에서 RAW 264.7 세포의 증식능이 PBS 처리구와 유의적인 차이를 보이지 않아 세포 독성이 없는 것으로 판단하였다(Fig. 4, 5). 따라서 이후의 RAW 264.7 세포를 이용한 경단구슬모자반과 쌍발이모자반 분해물의 항염증 효과 실험은 각각 0.1, 1, 10, 50 및 100 µg/mL의 농도 범위로 진행하였다.

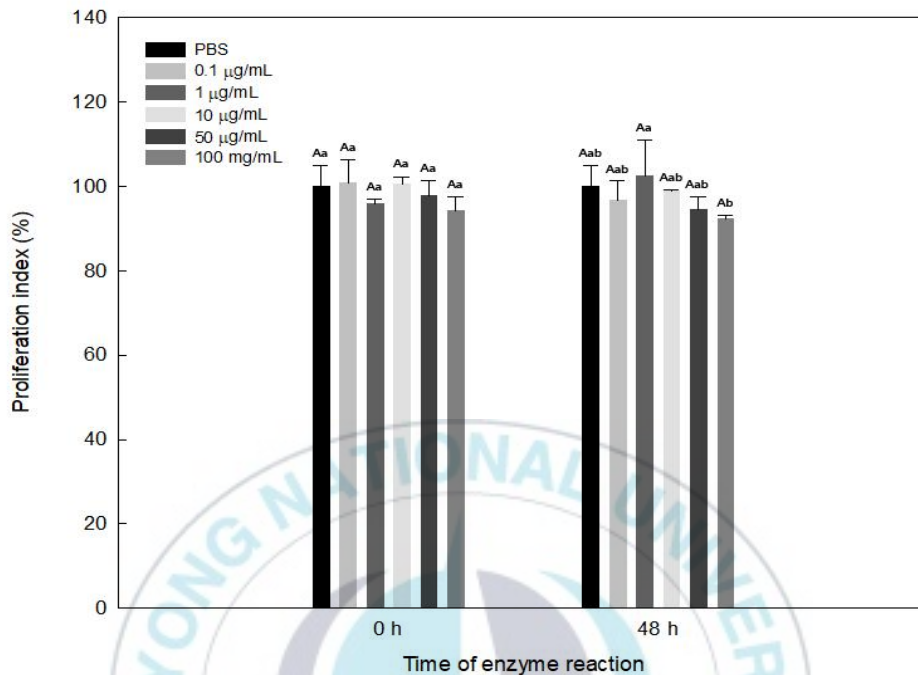


Fig. 4. Effect of *Sargassum muticum* enzymatic extracts (0 and 48 h) on the proliferation of RAW 264.7 cells.

Cells were incubated in the presence of samples (0.1, 1, 10, 50, and 100 µg/mL) for 48 h. Cell proliferation was determined by MTT assay. Proliferation index (%) = (sample O.D./ control O.D.) × 100. Means with different letters (A) and (a-b) above the bars are significantly different ($P < 0.05$).

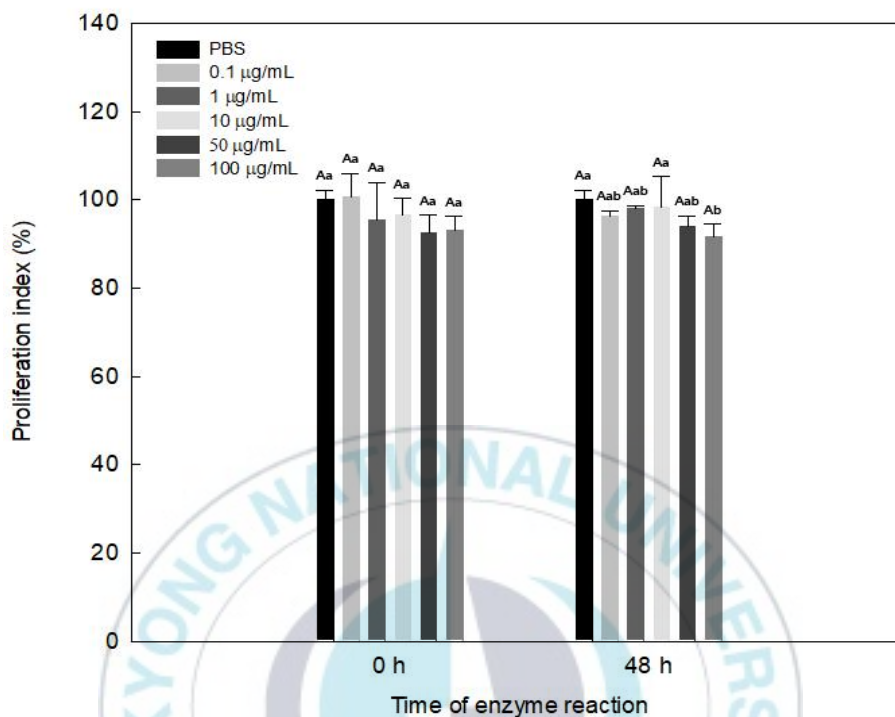


Fig. 5. Effect of *Sargassum patens* C. Agardh enzymatic extracts (0 and 48 h) on the proliferation of RAW 264.7 cells.

Cells were incubated in the presence of samples (0.1, 1, 10, 50, and 100 µg/mL) for 48 h. Cell proliferation was determined by MTT assay. Proliferation index (%) = (sample O.D./ control O.D.) × 100. Means with different letters (A) and (a-b) above the bars are significantly different ($P < 0.05$).

2-2-2-2. 염증 관련 cytokine 분비량 측정

대식세포는 LPS와 같은 항원의 자극을 받아 활성화되면 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 등의 분비를 촉진하여 면역반응을 조절한다. IL-1 β 는 국소 염증반응을 매개하며, 종양괴사인자인 TNF- α 는 종양세포를 파괴시키는 물질로 잘 알려져 있다(Dinarelo et al., 1990; Stankiewicz et al., 2002). 또한, IL-6는 T세포의 활성화 및 염증매개물질의 발현을 통해 후천성 면역을 개시하는 물질이다(Liu et al., 1998).

본 연구에서는 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에 0.1, 1, 10, 50 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 경단구슬모자반과 쌍발이모자반 분해물 시료를 각각 처리하고, TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 등 염증성 cytokine 분비 억제효과를 확인하였다.

경단구슬모자반 분해물 시료를 각 농도별로 LPS 자극된 RAW 264.7 세포에 처리하고, TNF- α 의 분비량을 확인한 결과는 Fig. 6과 같다. LPS 단독 처리 시, TNF- α 의 분비량이 $1989.39 \pm 27.67 \text{ pg/mL}$ 로 증가하였고, 0시간과 48시간 분해물 시료 모두 처리 농도가 증가함에 따라 TNF- α 분비가 유의하게 감소하여 48시간 분해물에서는 약 62% 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 6). 또한, 50과 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 48시간 분해물 시료는 반응 0시간의 같은 농도의 시료에 비해 TNF- α 의 분비를 각각 15%와 28% 정도 더 억제하였다.

쌍발이모자반 분해물 시료를 각 농도별로 LPS 자극된 RAW 264.7 세포에 처리하고, TNF- α 의 분비량을 확인한 결과는 Fig. 7과 같다. 0시간과 48시간 분해물 시료 모두 LPS 단독 처리구와 비교하였을 때, 농도가 증가함에 따라 TNF- α 의 분비량이 유의하게 감소하였으며, 48시간 분해물 시료는 약 63% 정도 억제효과를 보였다(Fig. 7). 또한, 10, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 경우, 0시간에 비하여 48시간 분해물 시료가 각각

15%와 19% 정도 TNF- α 의 분비가 억제되는 것을 확인하였다.

경단구슬모자반과 쌍발이모자반 분해물 시료를 각각 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에 처리 시, IL-6의 분비량을 확인한 결과는 Fig. 8, 9와 같다. 경단구슬모자반 분해물 시료를 처리한 경우, 0시간과 48시간 분해물 시료 모두 농도가 증가함에 따라 IL-6 분비량이 유의하게 억제되었으며, 48시간 분해물에서 약 83%의 억제효과를 보였다(Fig. 8). 또한, 모든 농도에서 0시간에 비하여 48시간 분해물이 IL-6 분비량을 유의하게 감소시켰고, 특히, 10, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 각각 21%와 48% 정도의 유의한 억제효과를 보였다.

쌍발이모자반 분해물 시료를 처리한 경우, 0시간과 48시간 분해물 시료 모두 IL-6의 분비량이 농도 의존적으로 유의하게 감소되었으며, 그 중 48시간 분해물 처리 시, IL-6 분비량을 약 84% 억제하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 9). 또한, 0.1, 10, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 0시간에 비하여 48시간 동안 분해시킨 시료가 IL-6 분비를 각각 10%, 36%, 44% 정도 유의하게 억제하는 것으로 나타났다.

경단구슬모자반과 쌍발이모자반 분해물 시료를 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에 처리 시, IL-1 β 의 분비량을 확인한 결과는 Fig. 10, 11과 같다. 경단구슬모자반 분해물 시료를 처리한 경우, 0시간과 48시간 분해물 시료 모두 농도가 증가함에 따라 LPS 단독 처리구에 비하여 IL-1 β 분비량이 유의하게 억제됨을 확인하였으며, 48시간 분해물에서 약 98%의 억제효과를 보였다(Fig. 10). 또한, 0시간과 48시간 분해물 시료의 경우, 1-100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 IL-1 β 의 분비 억제 효과가 크지 않았으나, 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 농도 처리 시에는 0시간에 비하여 48시간 분해물 시료가 40% 정도 더 IL-1 β 의 분비를 억제하는 것으로 확인되었다.

쌍발이모자반 분해물 시료를 처리한 경우, 0시간과 48시간 분해물 시료 모

두 농도가 증가함에 따라 LPS 단독 처리구에 비하여 IL-1 β 분비량을 유의하게 억제하는 것으로 나타났으며, 48시간 분해물 처리 시, IL-1 β 의 분비를 약 95% 억제하는 것으로 확인하였다(Fig. 11). 또한, 모든 농도에서 0시간에 비하여 48시간 분해물 시료가 IL-1 β 분비량을 유의하게 감소시켰고, 100 μ g/mL 농도의 48시간 분해물은 70% 정도의 IL-1 β 분비 억제효과를 보였다.

이러한 결과는 키토산 올리고당이 TNF- α 와 IL-6의 분비량을 효과적으로 감소시켰다고 보고한 결과(Yoon et al., 2007)와 유사하며, 키토산 올리고당의 분자량에 따른 항염증 효과를 확인한 연구에서, 키토산 올리고당이 IL-1 β 분비량에 억제 효과가 있으나, 분자량이 작은 경우(1-3 kDa)에는 그 억제 효과가 미미하다고 보고한 결과(Yang et al., 2010)와 유사하였다. 또한, 본 연구 결과는 쌍발이모자반의 에탄올 추출물이 염증성 cytokine인 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 분비를 감소시켜 항염증 효과를 가진다는 연구결과(Kim et al., 2017)와 일치하였다.

따라서, 이러한 결과는 *Shewanella oneidensis* PKA 1008 조효소액에 의한 경단구슬모자반과 쌍발이모자반 분해물이 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 와 같은 염증성 cytokine의 분비를 억제하여 항염증 효과를 증대시키는 물질로 작용할 수 있음을 뒷받침한다. 또한, 친환경적인 해조류에 조효소를 이용한 저분자화를 통해 항염증성 소재로 개발한다면 산업적으로 다양하게 활용할 수 있을 것이라 사료된다.

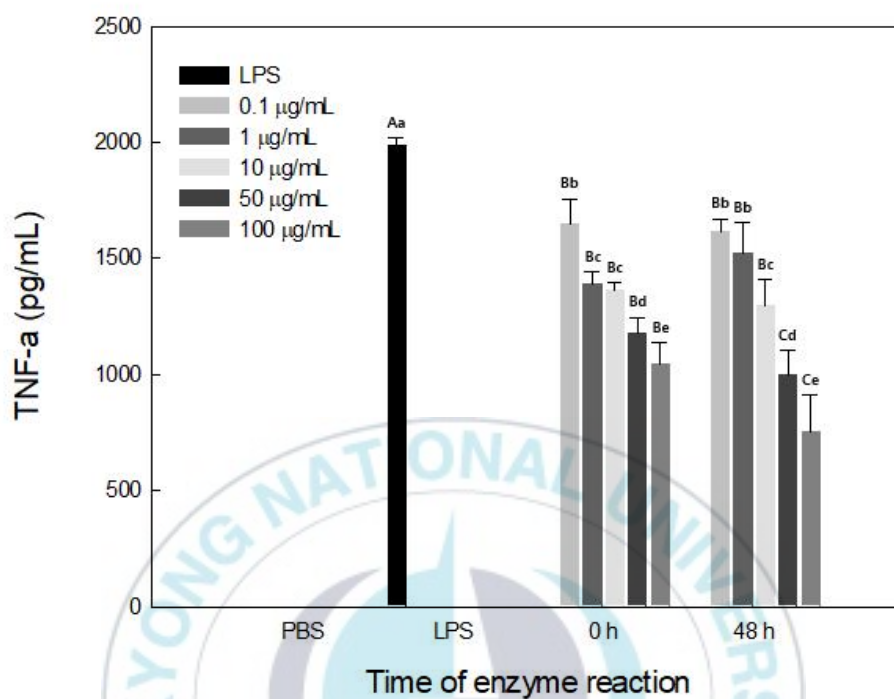


Fig. 6. Inhibitory effect of enzymatic extracts of *Sargassum muticum* with incubation time on the production of TNF- α in RAW 264.7 cells.

Cells were incubated in the presence of LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) alone or with samples (0.1, 1, 10, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$). The supernatant was isolated and analyzed using ELISA kit for cytokines. Means with different letters (A-C) and (a-e) above the bars are significantly different ($P < 0.05$).

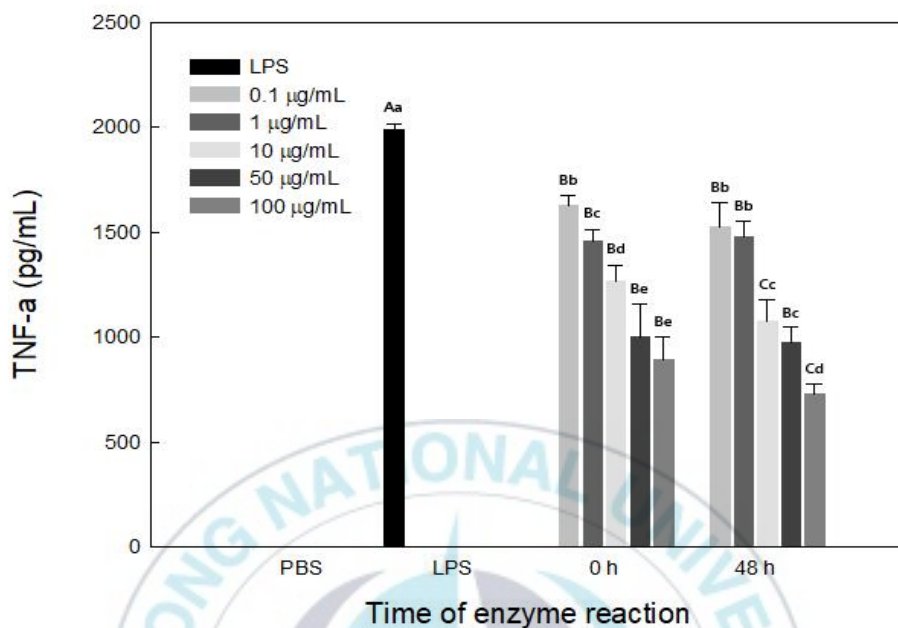


Fig. 7. Inhibitory effect of enzymatic extracts of *Sargassum patens* C. Agardh with incubation time on the production of TNF- α in RAW 264.7 cells.

Cells were incubated in the presence of LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) alone or with samples (0.1, 1, 10, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$). The supernatant was isolated and analyzed using ELISA kit for cytokines. Means with different letters (A-C) and (a-e) above the bars are significantly different ($P < 0.05$).

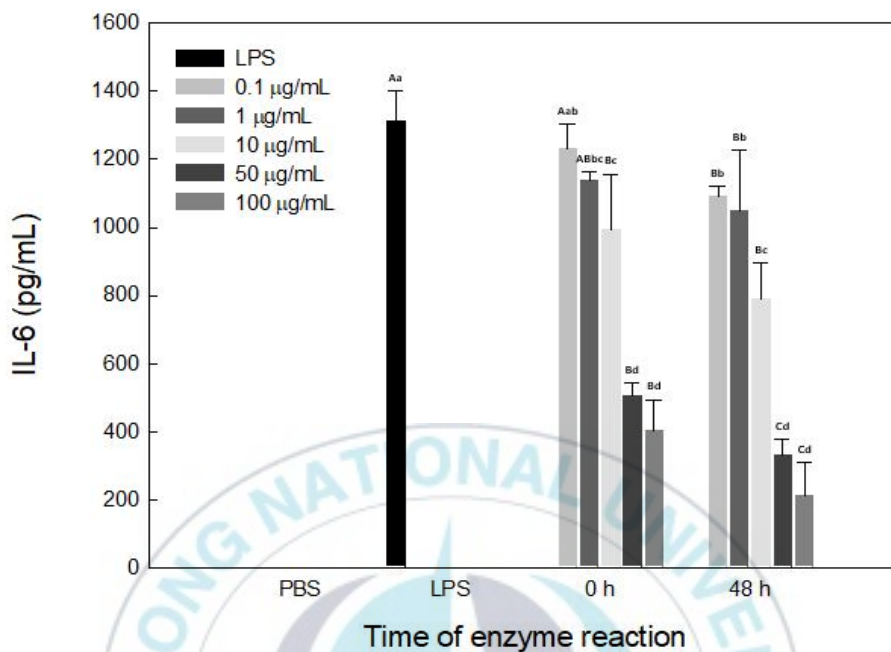


Fig. 8. Inhibitory effect of enzymatic extracts of *Sargassum muticum* with incubation time on the production of IL-6 in RAW 264.7 cells.

Cells were incubated in the presence of LPS (1 µg/mL) alone or with samples (0.1, 1, 10, 50 and 100 µg/mL). The supernatant was isolated and analyzed using ELISA kit for cytokines. Means with different letters (A-C) and (a-d) above the bars are significantly different ($P<0.05$).

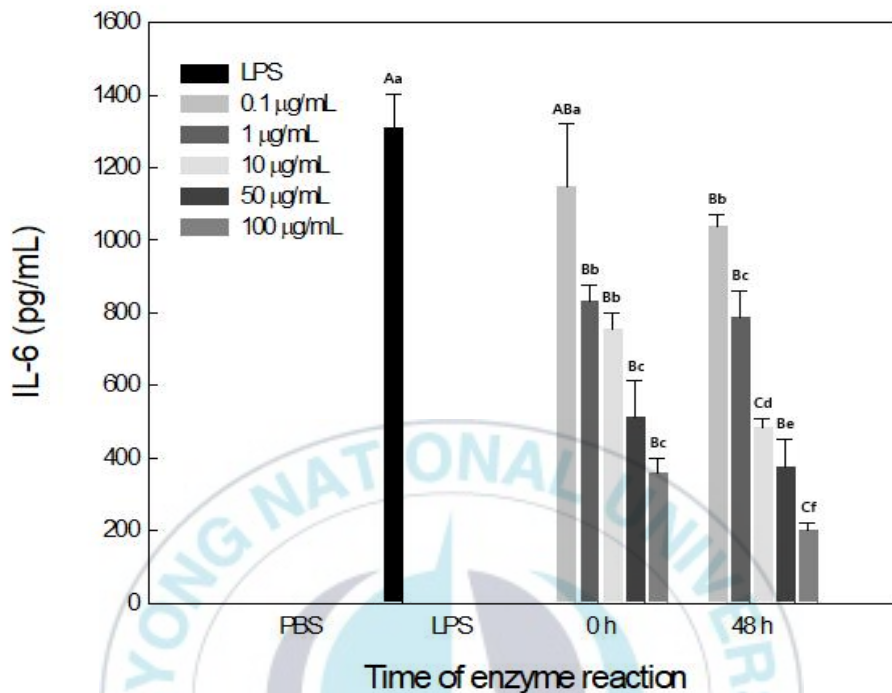


Fig. 9. Inhibitory effect of enzymatic extracts of *Sargassum patens* C. Agardh with incubation time on the production of IL-6 in RAW 264.7 cells.

Cells were incubated in the presence of LPS (1 µg/mL) alone or with samples (0.1, 1, 10, 50 and 100 µg/mL). The supernatant was isolated and analyzed using ELISA kit for cytokines. Means with different letters (A-C) and (a-e) above the bars are significantly different ($P<0.05$).

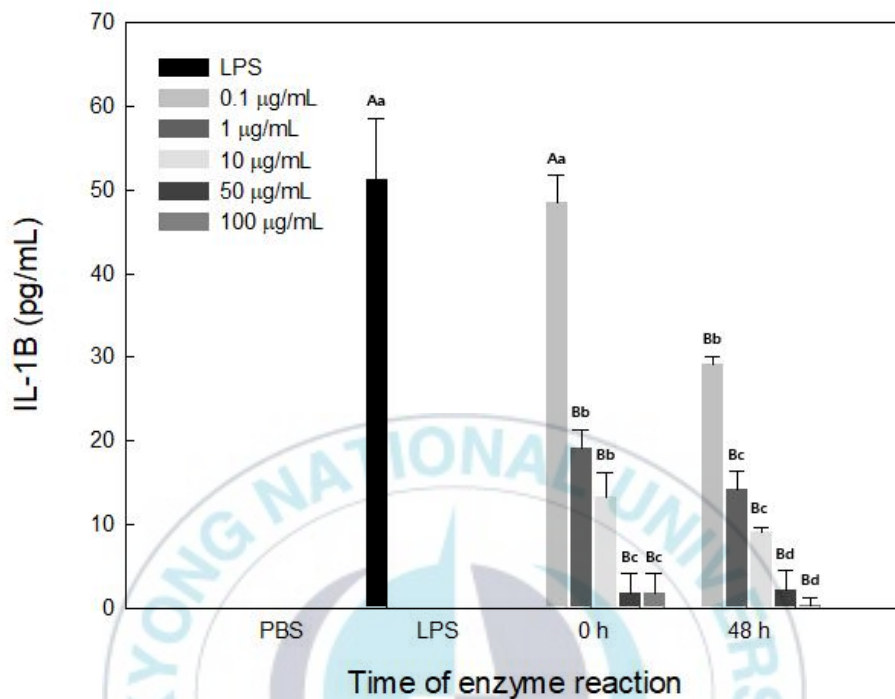


Fig. 10. Inhibitory effect of enzymatic extracts of *Sargassum muticum* with incubation time on the production of IL-1 β in RAW 264.7 cells.

Cells were incubated in the presence of LPS (1 μ g/mL) alone or with samples (0.1, 1, 10, 50 and 100 μ g/mL). The supernatant was isolated and analyzed using ELISA kit for cytokines. Means with different letters (A-C) and (a-d) above the bars are significantly different ($P < 0.05$).

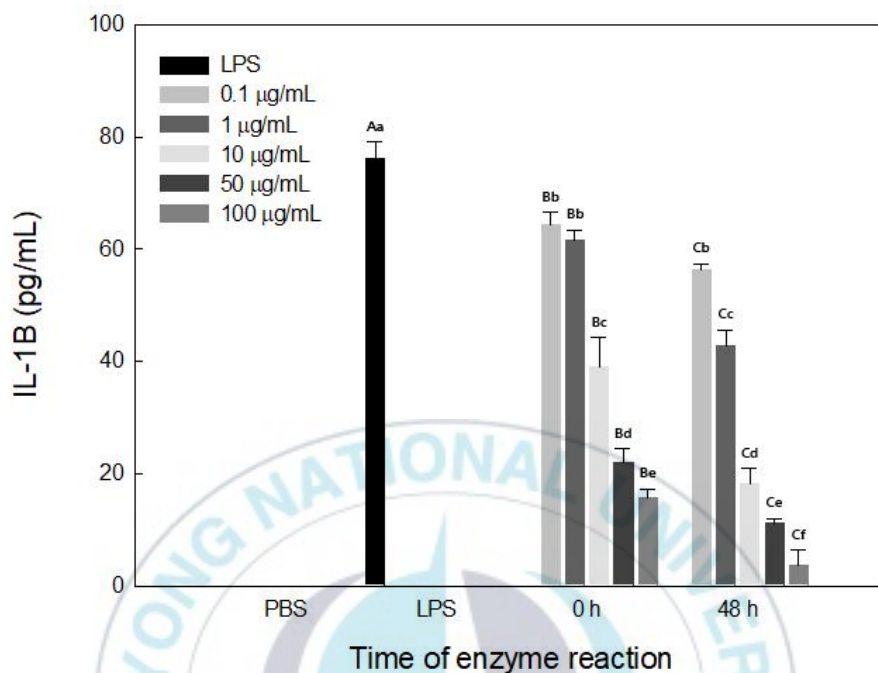


Fig. 11. Inhibitory effect of enzymatic extracts of *Sargassum patens* C. Agardh with incubation time on the production of IL-1 β in RAW 264.7 cells.

Cells were incubated in the presence of LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) alone or with samples (0.1, 1, 10, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$). The supernatant was isolated and analyzed using ELISA kit for cytokines. Means with different letters (A–C) and (a–f) above the bars are significantly different ($P < 0.05$).

요 약

본 연구에서는 갈조류인 경단구슬모자반과 쌍발이모자반에 함유되어 있는 다당류를 저분자화하기 위하여 알긴산 분해 효소를 생산하는 균주인 *Shewanella oneidensis* PKA 1008의 조효소액을 첨가하여 각 시료에 함유되어 있는 다당류를 알긴산 올리고당으로 분해하고자 하였다. 또한 경단구슬모자반과 쌍발이모자반의 알긴산 올리고당 특성 및 항염증 효과를 확인하고자 하였다.

1. 원료의 일반성분과 알긴산 함량

경단구슬모자반의 일반성분을 분석한 결과, 수분은 12.30%, 조회분은 19.01%, 조지방은 1.65%, 조단백질은 12.20%, 총당 함량은 53.35%이었으며, 총당 중 알긴산 함량은 26.46%로 확인되었다.

쌍발이모자반의 일반성분을 분석한 결과, 수분은 8.29%, 조회분은 21.64%, 조지방은 0.60%, 조단백질은 18.10%, 총당 함량은 51.37%이었으며, 총당 중 알긴산 함량은 32.37%로 확인되었다.

2. 추출 분해물의 특성

2-1. 경단구슬모자반 분해물의 pH를 측정한 결과, 반응 0시간에 pH 7.88에서 반응시간이 길어질수록 pH의 값이 유의적으로 감소하였고, 반응 60시간에서 pH 7.18로 가장 낮은 pH를 확인할 수 있었다.

쌍발이모자반 분해물의 pH를 측정한 결과, 반응 0시간에 pH 8.01에서 반응시간이 길어질수록 pH의 값이 유의적으로 감소하였고, 반응 48시간에서 pH 7.17로 가장 낮은 pH를 나타내었다.

2-2. 경단구슬모자반 분해물의 색도를 측정한 결과, 명도(L*) 및 황색도(b*)는 반응 48시간에 각각 10.24, 21.92로 가장 낮은 값을 나타내었고, 적색도(a*)의 경우 반응 60시간에서 가장 낮은 값인 3.05를 확인할 수 있었다.

쌍발이모자반 분해물의 색도를 측정한 결과, 명도(L*) 및 황색도(b*)는 각각 31.99, 52.05로 반응 24시간에서 낮은 값을 보였고, 적색도(a*)의 경우, 반응 0시간에서 가장 낮은 값인 5.87을 확인할 수 있었다.

2-3. 경단구슬모자반 분해물의 환원당 및 점도를 측정한 결과, 환원당은 반응시간이 증가할수록 그 함량이 유의적으로 증가하여 반응 48시간에서 470.54 $\mu\text{g/mL}$ 로 가장 높은 환원당 함량을 나타내었다. 점도는 반응시간이 길어질수록 유의적으로 감소하여 반응 60시간에서 1.32 cP로 가장 낮은 값을 확인할 수 있었다.

쌍발이모자반 분해물의 환원당 및 점도를 측정한 결과, 환원당 함량은 반응시간이 증가할수록 그 함량이 유의적으로 증가하여 반응 24시간에서 571.91 $\mu\text{g/mL}$ 로 가장 높은 환원당 함량을 나타내었고, 점도는 반응시간이 길어질수록 유의적으로 감소하여 반응 48시간에서 2.14 cP로 가장 낮은 점도 값을 확인할 수 있었다.

3. 추출 분해물의 항염증 효과

3-1. 경단구슬모자반에 *Shewanella oneidensis* PKA 1008이 생성한 조효소를 반응시켜 0-60시간 동안 분해시킨 후, 분해산물의 TLC를 분석한 결과, 반응 24시간 이후 부터 monosaccharide로 분해됨을 확인할 수 있었다.

쌍발이모자반에 *Shewanella oneidensis* PKA 1008이 생성한 조효소를 반응시켜 0-48시간 동안 분해시킨 후, 분해산물의 TLC를 분석한 결과, 반응 3시간 이후부터 분해되기 시작하여 반응 12시간 이후 부터 monosaccharide로 분해되었다.

3-2. 경단구슬모자반과 쌍발이모자반 추출 분해물에 대한 세포 독성과 염증매개 cytokine (TNF- α , IL-6 및 IL-1 β)의 분비량을 측정한 결과, 경단구슬모자반과 쌍발이모자반의 추출 분해물 모두 세포 독성이 나타나지 않았다.

경단구슬모자반 분해물 시료를 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에 처리하고 TNF- α 의 분비량을 측정한 결과, 경단구슬모자반 분해물 처리에 의해 TNF- α 의 분비량이 유의적으로 감소되었으며, 특히 반응 48시간 시료 처리시, 약 62% 억제되는 것으로 나타났다. 쌍발이모자반 추출 분해물의 경우, TNF- α 의 분비량은 반응 48시간 시료 처리 시 약 63% 이상 감소하여 반응 시간에 따른 유의적인 억제활성을 보였다.

또한, 경단구슬모자반 추출 분해물 처리에 의한 IL-6의 분비량은 반응 48시간에서 약 83%의 억제 효과를 보였다. 쌍발이모자반 추출 분해물의 경우도 반응 48시간 시료 처리 시 약 84%의 가장 높은 IL-6 분비 억제 효과를 나타내었다.

경단구슬모자반 추출 분해물 처리에 의한 IL-1 β 분비량을 측정한 결과, 반응 48시간 시료 처리 시 IL-1 β 의 분비량은 약 98% 억제되어 가장 큰 억제활성을 보였다. 또한 쌍발이모자반 추출 분해물의 경우에도 반응 48시간 시료 처리 시 IL-1 β 의 분비를 약 95% 억제하여 높은 억제활성을 나타내었다.

이에 따라 *S. oneidensis* PKA 1008 유래 조효소에 의한 경단구슬모자

반과 쌍발이모자반의 추출 분해물은 염증에 관여하는 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 와 같은 cytokine의 분비를 억제하여 염증을 억제하는 것으로 판단된다.



참 고 문 헌

Anzai HH, Asada A, Koshiba S, Yoshida H, Kobayashi N, Uchida and E Nishide. 1991. Distribution of polysaccharide digestive enzymes in a marine gastropod *Dolabella auricularia*. *Nippon. Suisan. Gakk.* **57**: 2077-2081.

Ahmed J, Shivhare US, Debnath S. 2002. Colour degradation and rheology of green chilli puree during thermal processing. *INT. J. FOOD SCI. TECH.* **37**: 57-63.

In AOAC. 1990. Official methods of analysis. Washington DC, USA, *Association of Official Analytical Chemists*. 152-164.

Bark SW, Park SH, Kim MJ, Bae NY, Park JH, Lim ES, Ahn DH. 2015. Separation of alginate lyase from *Shewanella oneidensis* PKA 1008 and its potential industrial applications. *Korean J. Fish Aquat. Sci.* **10**: 125-125.

Bocanegra A, Bastida S, Benedi J, Rodenas S, Sanchez-Muniz FJ. 2009. Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. *J. Med. Food.* **12**: 236-258.

Boyen C, Kloareg B, Polne-Fuller M, Gibor A. 1990. Preparation of alginate lyases from marine molluscs for protoplast isolation in brown

algae. *Phycologia*. **29**: 173–181.

Canjura FL, Schwartz SJ, Nunes RV. 1991. Degradation kinetics of chlorophylls and chlorophyllides. *J. Food Sci.* **56**: 1639–1643.

Cho DM, Kim DS, Lee DS, Kim HR, Pyeun JH. 1995. Trace components and functional saccharides in marine algae. 1. Changes in proximate composition and trace elements according to the harvest season and places. *J. Kor. Fish. Soc.* **28**: 49–59.

Cho KJ, Lee YS, Ryu BH. 1990. Antitumor effect and immunology activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.* **23**: 345–352.

Cho M, Kim BY, Rhim JH. 2003. Degradation of Alginate Solution by Using γ -Irradiation and Organic Acid. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**: 67–71.

Ciancia M, Quintana I, Cerezo AS. 2010. Overview of anticoagulant activity of sulfated polysaccharides from seaweeds in relation to their structures, focusing on those of green seaweeds. *Curr. Med. Chem.* **17**: 2503–2529.

Cumashi A, Ushakova NA, Preobrazhenskaya ME, D'ncecco A, Piccoli A, Totani L. 2007. A comparative study of the anti-inflammatory,

anticoagulant, antiangiogenic and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiol.* **17**: 541-542.

Eppley RW and R Lasker. 1959. Alginase in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science*. **129**: 214-215.

Folch J, Lees M, and Sloane-Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**: 497-509.

Gacesa P. 1988. Alginates Carbohydr. *Polym.* **8**: 161 - 182.

Gerster H. 1993. Anticarcinogenic effects of common carotenoids. *Int. J. Vitam. Nutri. Res.* **63**: 93-98.

Güven KC, Özsoy Y, Ulutin ON. 1991. Anticoagulant, fibrinolytic and antiaggregant activity of carrageenans and alginic acid. *Botanica marina*. **34**: 429-432.

Haug A, Larsen B, Smidsrød O. 1974. Uronic acid sequence in alginate from different sources. *Carbohydr. Res.* **32**: 217-225.

Iwamoto Y, Araki R, Iriyama KI, Oda T, Fukuda H, Hayashida 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.

Jeon MR, Choi SH. 2012. Quality characteristics of pork patties added with seaweed powder. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **32**: 77-83.

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. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 432-438.

Kennedy L, Mcdowell K, Sutherland IW. 1992. Alginases from *Azotobacter* species. *Microbiology.* **138**: 2465-2471.

Kim CY, Park YH. 1975. Alginic acid contents in brown algae. *Bull. Natl. Fish. Univ. Busan.* **15**: 27-30.

Kim JW, Kwon YR, Youn KS. 2012. Quality characteristics and antioxidant properties in spray-dried and freeze-dried powder prepared with powdered seaweed extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* **44**: 716-721.

Kim MR, Choir MA, Jeong JS. 2008. Development of fermented beverage using the sea tangle extracts, and quality characteristics thereof. *Korean J. Food Preserv.* **15**: 21-29.

Kim HJ, Kim KBWR, Kim DH, SunWoo C, Jung SA, Jeong DH et al., Ahn DH. 2013. The Optimal Production and Characteristics of an Alginate-degrading Enzyme from *Vibrio* sp. PKA 1003. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **42**: 434-440.

Kim HK, Lee JC , Kang NH, Kim SH, Kim JG, Shung KC. 2007. Purification and characterization of the extracellular alginate lyase from *Streptomyces* sp. MET 0515. *J. Life. Sci.* **17**: 625-633.

Kim JH, Kim YH, Kim SK, Kim BW, Nam SW. 2011. Properties and industrial applications of seaweed polysaccharides-degrading enzymes from the marine microorganisms. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 189-199.

Kim JH, Lee DS, Lim CW, Park HY, Park JH. 2002. Antibacterial activity of sea-mustard, *Laminaria japonica* extracts on the cariogenic bacteria, *Streptococcus mutans*. *Korean J. Fish Aquat. Sci.* **35**: 191-195.

Kim JY, Lee JA, Kim KN, Yoon WJ, Lee WJ, Park SY. 2007. Antioxidative and antimicrobial activities of *Sargassum muticum* extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **36**: 663-669.

Kim MJ, Bae NY, Bark SW, Kim KBWR, Park JH, Park SH, Ahn DH. 2015. Anti-inflammatory effect of alginate oligosaccharides

produced by an alginate-degrading enzyme from *Shewanella oneidensis* PKA 1008 on LPS-induced RAW 264.7 cells. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.* **48**: 888-897.

Kim MJ, Kim MJ, Kim KBWR, Park SH, Choi HD, Park SY et al., Ahn DH. 2017. Anti-Inflammatory effect of *Sargassum patens* C. Agardh ethanol extract in LPS-induced RAW264. 7 cells and mouse ear edema. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 110-117.

Kim OJ, Lee DG, Lee SM, Lee SJ, Do HJ, Park HJ et al., Ha JM. 2010. Isolation and characteristics of alginate-degrading *Methylobacterium* sp. HJM27. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 144-150.

Kim SJ, Kim HJ, Moon JS, Kim JM, Kang SG, Jung ST. 2004. Characteristic and extraction of fucoxanthin pigment in *Undaria pinnatifida*. *Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **33**: 847-851.

Lee EJ and Sung MK. 2003. Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by seatangle, a fiber-rich seaweed. *Plant Foods Human Nutr.* **58**: 1-8.

Lee HJ, Kim HC, Vitek L and Nam MC. 2010. Algae consumption and risk of type 2 diabetes, Korean National Health and Nutrition Examination Survey in 2005. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **56**: 13-18.

Lee HJ, Kim JH, Lee CH, Kim JS, Kwak ST, Lee KB, Song KS, Choi BW, Lee BH. 1999. Inhibitory activities of sea weeds on prolyl endopeptidase, tyrosinase and coagulation. *Korean J. Pharmacog.* **30**: 231-237.

Lee YS, Kim DS, Ryu BH, Lee SH. 1992. Antitumor and immunomodulating effects of seaweeds toward sarcoma-180cell. *J. Korean Soc, Food Sci. Nutr.* **21**: 544-550.

Linker ALFRED and Evans LR. 1984. Isolation and characterization of an alginase from mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol. Res.* **159**: 958-964.

Mascio P, Kaiser S, Sies H. 1989. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem Biophys.* **274**: 532-538.

Mishell BB, Shiigi SM. 1980. Selected methods in cellular immunology. pp. 4-27. 1st ed, W H Freeman & Co., San Francisco, CA, USA.

Miyake O, Hashimoto W, and Murata K. 2003. An exotype alginate lyase in *Sphingomonas* sp. A1: overexpression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of alginate lyase IV (A1-IV). *Protein Expr. Purif.* **29**: 33-41.

Moore CG, Mathieson S, Mills DJ, Bett BJ. 1987. Estimation of meiobenthic nematode diversity by non-specialists. *Mar. Pollut. Bull.* **18**: 646-649.

Muramatsu T, S Hirose, and M Katayose. 1977. Isolation and properties of alginate lyase from the mid gut gland of wreath shell *Turbo cornutus*. *Agric. Biol. Chem.* **41**: 1939-1946.

Nakashima H, Kido Y, Kobayashi N, Motoki Y, Neushal M, Yamamoto N. 1987. Purification and characterization of an avian myeloblastosis and human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor sulfated polysaccharide extracted from sea algae. *Agents Chemother.* **31**: 1524-1528.

Namvar F, Mohamad R, Baharara J, Zafar-Balanejad S, Fargahi F, Rahman HS. 2013. Antioxidant, antiproliferative, and antiangiogenesis effects of polyphenol-rich seaweed (*Sargassum muticum*). *Biomed Res. Int.* **9**: 604787.

Nelson N. 1994. A photometric adaptation of the Somgyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**: 375-380.

Oak JH, Lee IK. 2005. Taxonomy of the genus *Sargassum* (Fucales, Phaeophyceae) from Korea I. Subgenus *Bactrophyucus* section *Teretia*.

Algae. **20**: 77-90.

Park YH. 1969. Seasonal variation in the chemical composition of brown algae with special reference to alginic acid. *J. Kor. Fish. Soc.* **2**: 71-82.

Park SH. 2017. Characterization and functionality of enzymatic extract of *Sargassum coreanum* using crude enzyme from *Shewanella oneidensis* PKA 1008. pp. 250-250. Master Dissertation. *University of Pukyong, Busan, Korea*.

Park YK, Kang SG, Jung ST, Kim DH, Kim SJ, Pak JI et al., Kim JM. 2007. Development of Value-Added Products Using Seaweeds. *J. Mar. Biotechnol.* **2**: 133-141.

Saha SK, Brewer CF. 1994. Determination of the concentrations of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glyco-proteins using the phenol-sulfuric acid method. *Carbohydr. Res.* **254**: 157-167.

Lee SC, Oh JH, Hwang YI, and Kim JM. 2002. Use of Exo-polygalacturonase to improve extraction yields of alginic acid from sea mustard (*Undaria pinotifida*). *Prev. Nutr. Food Sci.* **7**: 317-319.

Sunwoo C, Kim KBWR, Kim DH, Jung SA, Kim HJ, Jeong DH, Jung

HY, Kang BK, Bark SW, Lim SM, Hong YK, Ahn DH. 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.

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.* **53**: 246-252.

Wataru HO, Masako H, Tomohiro, M Keiko, and M Kousaku. 1998. *Sphingomonas* sp. Al lyase active on both poly- β -D-mannuronate and heteropolymeric regions alginate. *J. Ferment. Bioeng.* **86**: 236-238.

Wong TY, Preston LA and 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.

Xu X. 2019. Characterization and anti-inflammatory effect of extracts from enzymatic using crude enzyme by *Shewanella oneidensis* PKA 1008 and gamma-irradiation on *Undaria pinnatifida* roots and *Sargassum fulvellum*. Master Dissertation. *University of Pukyong, Busan, Korea.*

Xu X, Jeong SM, Lee JE, Kang WS, Ryu SH, Kim K et al., Ahn DH. 2020. Characterization of *Undaria pinnatifida* Root Enzymatic Extracts Using Crude Enzyme from *Shewanella oneidensis* PKA 1008 and Its Anti-Inflammatory Effect. *J. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 79–84.

Yoon MO, Lee SC, Rhim JW, Kim JM. 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.

Zhu B, Yin H. 2015. Alginate lyase: review of major sources and classification, properties, structure–function analysis and applications. *Bioeng.* **6**: 125–131.

감사의 글

앞이 보이지 않고, 캄캄하기만 하던.. 그래서 더 길게만 느껴지던 지난 2년을 되돌아보며, 제 인생의 첫 번째 반환점이었던 석사과정을 무사히 마칠 수 있도록 도와주신 많은 분들께 짧게나마 이 글을 통해서라도 감사의 뜻을 전하고자 합니다.

먼저 언제나 저와 함께 동행하시며, 광야같은 이 곳에서의 시간들을 빛으로 채워주신 주님께 영광과 감사를 드립니다. 저만 그런 것이 아니겠지만, 타지에서 2년간의 생활은 참 힘들고, 때로는 지치는 순간들이 많았습니다. ‘하늘은 스스로 돕는자를 돕는다고 한 말씀처럼 스스로 노력하면 그 노력이 빛을 발할 것’이라 격려해주시고, 때로는 꾸짖음으로 큰 가르침을 주신 안동현 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 부족하고 모자란 저의 논문을 끝까지 섬세하고, 따뜻하게 지도해주신 심길보 교수님과 격려와 조언 아끼지 않으신 전병수교수님께도 진심으로 감사드립니다.

2년의 시간동안 그 누구보다 정든 자개방 실험실과 실험실원들을 잊지 못 할 것 같습니다. 교수님과 학생들의 중심을 잡아주시며, 아낌없는 지도를 해주신 정소미 박사님께 감사드리고, 칙칙한 대학원 생활에 사랑이의 귀여운 모습을 간간히 봐서 그나마 버틸 수 있었던 것 같습니다. 그리고 제 석사 생활의 중심이자 멘탈이 약한 저를 언제나 단호히 잡아주었던 제 선배이자 인생의 멘토인 샤오통 언니께 진심으로 사랑하고, 감사하다는 말 전하고 싶습니다. 또한, 석사 과정을 같이 시작해 많은 안정과 편안함을 준 우신 언니, 시형님과 2년차 때 만나서 묵묵히 얘기들어주며 공감해준 한호님, 이 논문을 쓰기까지 많은 도움을 준 수룡님께도 진심으로 감사드립니다. 8월에 만나 부족한 미생물의 기초를 알려준 가

혜선생님한테도 깊은 감사의 말 전합니다. 또한, 2년간의 생활을 돌아보면 김유진이라는 사람을 빼 놓을 수 없는데, 언제나 저의 고통을 같이 아파해주고, 슬퍼해줘서 진심으로 고맙고, 사랑한다는 말 전하고 싶습니다. 제 곁을 채워준 귀여운 우리 수형이에게도, 제 인생의 예외이자 뭐든 다 안 맞지만, 항상 밝고, 씩씩한 우리 예린이한테도 진심으로 고맙고, 사랑한다는 인사 전합니다. 끝자락에 만나 소중한 시간 보낸 예희에게도, 정철이, 현수, 유석이, 훈서에게도 감사 인사를 전합니다.

또한, 학교 밖에서도 많은 도움과 관심을 받았는데, 2년간의 시간들을 그나마 힐링으로 채워준 대연성결교회와 우리 예전사분들께 진심으로 감사 인사를 전해드립니다. 처음 부산에 와 많이 흔들렸던 저를 믿음으로 붙잡아줬던 예술언니와 기쁨이, 1년차와 2년차 모두 함께한 민기님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 많은 시련과 고난으로 주저앉은 저를 일으켜준 예랑언니께도 진심으로 사랑한다고 전하고 싶습니다.

그 무엇보다도 항상 제 편인 우리 가족들, 본인보다 항상 자식들을 더 먼저 걱정하는 듄직하고, 멋있는 우리 아빠, 힘들다고 투정부리는 저를 격려해주시며, 이해해주셨던 사랑스러운 우리 엄마, 따뜻하고, 다정한 우리 오빠, 가족의 소중함을 깨닫게 해준 가족이자 친구인 우리 언니한테도 제 온 마음다해 사랑해도 아깝지 않을만큼 감사하고, 사랑하며, 존경한다는 말 전하고 싶습니다.

너무 거창할지도 모르지만, 진짜 이 논문은 저 혼자만의 노력으로 완성한 것이 아닌 많은 분들의 격려와 가르침 그리고 고난과 시련으로 단련한 단단함으로 완성된 단편의 영화와 같다고 말 할 수도 있을 것 같습니다. 그만큼 이 말을 쓰고 있는 지금도 파노라마처럼 기억의 조각들이 스쳐 지나갑니다. 다시 한 번 모든 분들께 감사의 마음을 전하며, 실망시키지 않고, 후회 없는 삶 살도록 노력하는 사람이 되겠습니다. 저와 함께

계속해서 깊은 관계를 이어나가는 분들과 스쳐지나간 모든 분들의 삶을
언제나 응원하고 기도하겠습니다. 감사합니다.

