

工學碩士 學位論文)

Vibrio sp. PKA 1003
이 생성하는 알긴산 분해 효소의
정제 및 특성



2013年 8月

釜慶大學校 大學院

食 品 工 學 科

金 賢 知

工學碩士 學位論文

Vibrio sp. PKA 1003
이 생성하는 알긴산 분해 효소의
정제 및 특성

指導教授 安 東 賢

이 論文을 工學碩士 學位論文으로 提出함



2013年 8月

釜慶大學校 大學院

食 品 工 學 科

金 賢 知

金 賢 知의 工學碩士 學位論文으로 認准함

2013年 8月



주 심 공학박사 전 병 수 ①인

위 원 수산학박사 조 영 제 ①인

위 원 농학박사 안 동 현 ①인

목 차

Abstract	iv
----------------	----

서 론	1
-----------	---

재료 및 방법

1. 실험재료	
1-1. 알긴산 분해 균주의 분리 및 동정	7
1-2. 시약	7
2. <i>Vibrio</i> sp. PKA 1003 생육 조건 확인	
2-1. 생육활성 측정	8
2-2. pH	8
2-3. NaCl 농도	8
2-4. 온도	9
2-5. 배양 시간	9
3. 조효소의 특성	
3-1. 조효소의 제조	9
3-2. 알긴산 분해능 측정	9
3-2-1. 점도 측정	9
3-2-2. 환원당 정량	10
3-3. pH	12

3-4. 온도	12
3-5. 기질 농도	12
3-6. 반응 시간	12
4. 알긴산 분해산물의 TLC 분석	13
5. 알긴산 분해 조효소액에 대한 trypsin의 영향	13
6. 효소 정제	
6-1. Ammonium sulfate 염석 및 투석	14
6-2. Ion-exchange chromatography	14
6-3. Gel chromatography	16
6-4. 단백질 농도 측정	16
7. 정제 효소 특성	
7-1. pH 영향	18
7-2. 온도 영향	18
7-3. NaCl 농도 영향	18
7-4. 금속 특이성	19
7-5. 알긴산 분해 양식	19

결과 및 고찰

1. 알긴산 분해균의 분리 및 동정	20
2. <i>Vibrio</i> sp. PKA 1003 생육 조건 확인	22
2-1. pH	22
2-2. NaCl 농도	23
2-3. 온도	24

2-4. 배양 시간	25
3. 조효소의 특성	30
3-1. pH	30
3-2. 온도	31
3-3. 기질 농도	31
3-4. 반응 시간	35
4. 알긴산 분해산물의 TLC 분석	37
5. 알긴산 분해 조효소액에 대한 trypsin의 영향	39
6. 효소 정제	41
7. 정제 효소 특성	49
7-1. pH 영향	49
7-2. 온도 영향	49
7-3. NaCl 농도 영향	53
7-4. 금속 특이성	53
7-5. 알긴산 분해 양식	53
요 약	57
참 고 문 헌	59
감 사 의 글	73

Purification and Characterization of Alginate-Degrading Enzyme Produced by *Vibrio* sp. PKA 1003

Hyun Jee Kim

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

Abstract

Alginates are a quite abundant in nature. In brown algae, they are produced as a structural component, comprising up to 40% of dry weight. Alginate is a linear polysaccharide in which β -D-mannuronate (M) and α -L-guluronate (G) are covalently (1-4)-linked in different sequences. α -L-Guluronate is C5 epimer of β -D-mannuronate. The alginate has unique physical properties such as high viscosity and gelling property. So, alginates are widely used as stabilizer, viscosifier, and gelling agent in the food and beverage, paper and printing, biomaterials, and pharmaceutical industries. Also, alginates have various functions such as anticancer, antibacterial, anti-cholesterol and immuno stimulating activity. So, numerous studies are going on to improve its uses, and one of them is lowering molecular weight through alginate-degrading. Alginate oligosaccharides have been shown some interesting biological activities. Thus, alginate lyases have

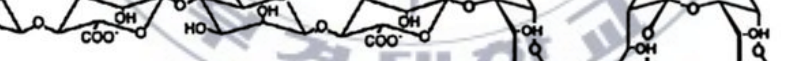
attracted much attention as biocatalysts for preparation of functional oligosaccharides. Now, alginate lyases have been found and isolated from various sources, such as marine algae, marine invertebrates, marine and some soil microorganisms, but there is still no report on high efficiency alginate-degrading enzyme. Thus, this study was conducted to screen and isolate the high efficiency alginate-degrading enzyme from marine microorganism. The marine bacterium producing alginate-degrading enzyme was isolated from brown seaweed (*Sargassum thunbergii*). The results of 16S ribosomal RNA sequence analysis was the strain the genus *Vibrio* and the strain was subsequently named *Vibrio* sp. PKA 1003. The optimum culture conditions for the growth of *Vibrio* sp. PKA 1003 were at pH 7, 3% NaCl, 25°C, and 6% alginic acid with 48 hour incubation time. A crude enzyme preparation from *Vibrio* sp. PKA 1003 showed its highest levels of alginate-degradation activity when cultured at pH 9, 30°C, and 6% alginic acid with 63 hour incubation time. Thin layer chromatography analyses confirmed that the crude enzyme released monomers or oligomers from sodium alginate, and results from trypsin treatment showed that the alginate degrading activity depends on this enzyme production by *Vibrio* sp. PKA 1003. To verify effects of pH, temperature, NaCl, metal ion on alginate-degrading activity, Alginate-degrading enzyme produced by *Vibrio* sp. PKA 1003 which was purified by ammonium sulfate with salting-out, dialysis, DEAE-sephadex, Sephadex G-100 and Sephacryl S200-HR column chromatography (Specific activity : 12.27 U/mg). The purified enzyme showed its highest levels of

alginate-degradation activity when cultured at pH 7, 25°C and 0.02 M NaCl. Ca^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Mg^{2+} and K^{+} suppressed the activity of purified alginate-degrading enzyme. Compared with the control, Hg^{2+} was no significantly changes on activity. The K_m and V_{max} values of purified alginate-degrading enzyme appeared as 1.175 mg/mL and 3.598 U/mL. These results suggest that *Vibrio* sp. PKA 1003 and its alginate-degrading enzyme is useful for the production of alginate oligosaccharides.



서 론

해조류는 우리나라를 비롯한 동양권에서 오래전부터 식용 및 약용 등으로 많이 이용하여온 해양 자원으로써(Kim and Bae, 2002), 세계식량기구(FAO)에 의하면, 해조류의 세계 생산량은 2001년 972만 톤, 2010년 1901만 톤으로 계속적으로 증가하고 있는 추세이다(FAO, 2010). 현재 해조류 생산량의 80% 이상이 아시아의 태평양 지역에서 생산되며, 이 중 상당부분은 중국, 일본, 한국에서 생산하여 소비하고 있다 (Kim et al., 2011). 해조류는 성장이 빠르고 단위면적당 생산성이 우수하다고 알려져 있기 때문에 (Park and Jeong, 2013) 자원이 풍부하여 산업적으로 다양하게 이용되어지고 있다. 탄수화물은 해조류 구성성분에서 높은 비율을 차지하는 것으로써, 갈조류의 경우, 종류와 시기에 따라 탄수화물이 30~67% 함유되어 있으며, 주로 alginate, laminaran, fucoidan 그리고 mannitol 등의 수용성 다당류로 구성되어 있다 (Park and Jeong, 2013; Korenaga and Fujii, 2000; Lee et al., 1998). 그 중에서도 알긴산 (alginic acid)은 갈조류의 세포막 또는 세포간 물질을 구성하는 주성분으로 갈조류 건조 중량의 약 40%에 달하는 것도 있으며(Lee et al., 2009), β -D-mannuronic acid (M)와 α -L-guluronic acid (G)의 α -1,4 또는 β -1,4 결합으로 이루어진 hetero형 산성 다당류이다 (Joo et al., 1996; Joo et al., 1993). 알긴산은 단당류들의 결합 방법에 따라 M-M, G-M, M-G, G-G와 같이 4가지 형태로 만들어질 수 있는데 (Shin et al., 2012), 원료의 종류, 해조의 부위, 채집시기 및 생육 장소 등 다양한 요인에 의해 알긴산의 구성 형태가 다른 원인이 된다



$$M \xrightarrow{\beta 1-4} M \xrightarrow{\beta 1-4} M \xrightarrow{\beta 1-4} M \xrightarrow{\beta 1-4} G \xrightarrow{\alpha 1-4} G \xrightarrow{\alpha 1-4} G \xrightarrow{\alpha 1-4} G$$

 M : β -D-Mannuronate G : α -L-Guluronate

뿐만 아니라 최근 알긴산 유래 올리고당의 항균, 항암 작용

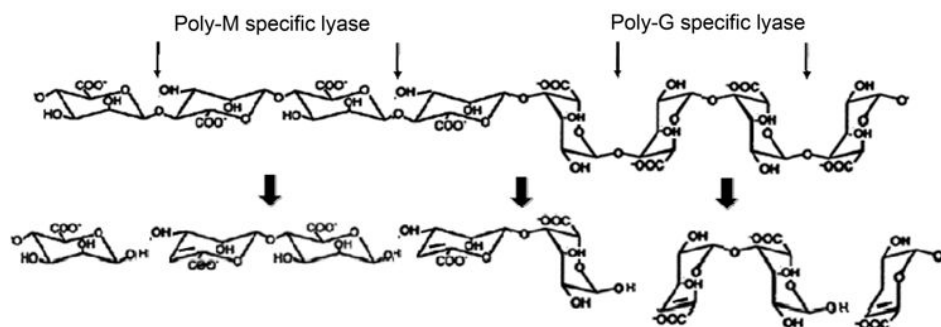
(Davidson et al., 1976), 면역 증강 (Guven et al., 1991), 장내세균 군집 개선 효과 (Joo et al., 1995) 및 항콜레스테롤 효과 (Lee and Lee 1993) 등 다양한 생체조절 기능이 월등하게 높게 나타난 연구 결과들이 보고됨에 따라 알긴산을 이용한 올리고당 제조에 대한 관심이 높아지고 있다. 현재 알긴산은 식품 첨가물로 이용시 알긴산 농도가 높아짐에 따라 점성이 강해지고 식품 고유의 특성을 잃게하는 단점 등으로 인해 사용에 제한을 받고 있는 실정이다 (Kaneko et al., 1990, Takeuchi et al., 1994). 따라서 알긴산을 저분자화할시에 알긴산이 갖는 특성을 유지하면서 단점을 보완하여 그 이용범위 또한 확대할 수 있을 것으로 사료된다 (Joo et al., 1995).

알긴산을 저분자화하기 위한 방법으로는 고온 고압 (Kim et al., 2010) 및 방사선 (Wasikiewicz et al., 2005) 등의 물리적 방법, 산과 알칼리 처리 (Lee et al., 1998)를 이용한 화학적 방법 및 해조 섭식 생물 및 미생물이 생산하는 효소를 이용한 생물학적 방법 (Shin, 2012) 등이 보고되고 있다. 하지만 해조류 유래 탄수화물 대부분이 비소화성 복합 다당류로서 산이나 알칼리에 비교적 안정한 특성으로 인하여 알긴산의 저분자화 및 정제에 어려움을 겪고 있으며 (Lee et al., 2009), 따라서 최근에는 기능성 해조 올리고당 생산에 해조 다당의 화학적 분해보다는 효소를 이용한 생물학적 분해에 대한 연구가 진행되고 있다 (Joo et al., 1996, Uo et al., 2006). 알긴산 분해효소인 alginate lyase (EC 4.2.2.3)는 β -elimination 작용을 통해 알긴산을 분해시키며, 이 반응으로 인해 단위체 사이의 glycosidic bond가 끊어지면서 C-4와 C-5 사이에 이중결합이 형성되며, 알긴산은 분해되고 비환원성 말단으로

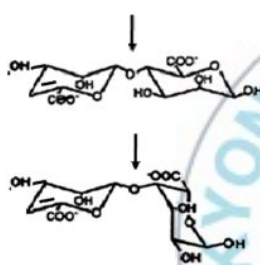
4-deoxy-L-erythro-hex-4-enepyranosyluronate을 갖는 알긴산 올리고머가 생성된다 (Gacesa, 1987, Michaud et al., 2003, Wong et al., 2000). 알긴산 분해효소는 자르는 부위에 따라 중간을 자르는 endo-type, 끝 부분을 자르는 exo-type 으로 나눌 수 있다. 이 중에서도 endo-type의 알긴산 분해효소는 기질특이성에 따라 poly-G 특이성 (Hu et al., 2006, Kim et al., 2009), poly-M 특이성 (Iwamoto et al., 2001) 및 poly MG 특이성 알긴산 분해효소로 나눌 수 있다 (Shin, 2012; Fig 2).

현재 전복 (Nakada and Sweeny, 1967, Nisizawa et al., 1968), 성게 (Eppley and Lasker, 1959), 불가사리 (Elyakova and Favorov 1974), 소라 (Muramatsu et al., 1977) 및 고둥 (Joo et al., 1993)과 같은 해조 섭식 생물이나 *Azotobacter vinelandii* (Ertesvåg et al., 1998), *Alginomonas alginica* (Eller and Payne, 1960), *Vibrio* sp. (Joo and Lee, 1993), *Pseudomonas* sp. (Davidson et al., 1976), *Alteromonas* sp. (Iwamoto et al., 2001) 및 *Bacillus* sp. (Nakagawa et al., 1998) 등의 미생물로부터 알긴산 분해효소를 분리하고 특성을 밝혔다고 보고된바 있으며 (Lee et al., 2009). 이외에도 해수, 토양, 분변 등 다양한 소재로부터 알긴산 분해능이 우수한 균주들을 찾아내고 있다 (Uo et al., 2006). 하지만 여전히 알긴산 분해효소를 고효율로 생산하는 미생물 분리에 대한 보고는 거의 없는 실정이며, 미생물 유래 알긴산 분해효소의 활성이 상대적으로 낮아 여전히 실용화되지 못하고 있는 실정이다 (Lee et al., 2009, Kim and Bae, 2002).

A Endotype lyase



B Exotype lyase



C Conversion

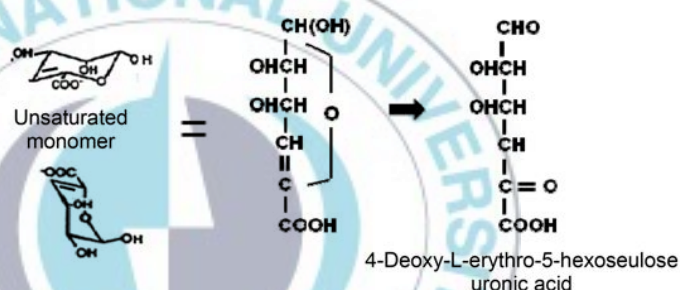


Fig. 2. Alginate degradation by endolytic (A) and exolytic (B) alginate lyases-catalyzed β -elimination reactions. Unsaturated monosaccharides are released from alginate or oligosaccharides by exolytic alginate lyase, and the monosaccharide is nonenzymatically converted into 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid (C). Thin arrows indicate the cleavage sites for the corresponding alginate lyases.

이에 본 연구에서는 산업적으로 응용가능한 알긴산 올리고당을 효소적 분해를 이용하여 제조하기 위한 기초 연구로서 해조류로부터 알긴산 분해 활성이 우수한 미생물을 탐색 및 분리한 후, 알긴산 분해 효소를 생산하는 미생물의 최적 생육 조건 및 그 조효소액의 알긴산 분해 특성을 알아보고자 하였으며, 알긴산 분해효소를 정제 및 특성을 파악하고자 하였다.



재료 및 방법

1. 실험재료

1-1. 알긴산 분해 균주의 분리 및 동정

알긴산 분해 미생물의 분리를 위해 부산의 송정 연안에서 분해가 진행 중인 해조류 및 그 주변 해수를 채집하였으며, 멸균된 2% NaCl phosphate buffer (pH 7.4)를 이용하여 해수 및 해조류를 희석하였다. 희석액은 marine agar (MA) 배지에 분주·도말 후, 30℃에서 48시간 배양하였으며, 생성된 colony를 확인하고 형태적으로 다른 colony를 선택하였다. 선택된 균주는 알긴산 분해 활성 측정을 위해 균체 배양액과 알긴산을 1:1로 혼합하여 30℃에서 24시간 배양 후, 환원당 생성량 및 점도 측정으로 알긴산 분해능을 확인하였다. 이 중 알긴산 분해능이 우수한 단일 colony는 염기서열을 결정하기 위해 (주)마크로젠 (Seoul, Korea)에 의뢰하여 16S rRNA sequence analysis로 분석하였고, 이 후 확인된 16S rDNA 염기서열에 대하여 NCBI blast를 통해 동정하였다.

1-2. 시약

본 실험에서 사용한 marine broth (MB) 및 marine agar (MA)는 Difco사 제품이며, 실험에 사용한 alginic acid sodium salt from brown algae, Trizma, DEAE sephadex 및 Sephacryl S200-HR은

Sigma사의 제품이다. SephadexTM G-100 및 Vivaspin 6는 GE Healthcare 사의 제품이다. 또한 염석에 사용한 ammonium sulfate ((NH₄)₂SO₄)는 Junsei사의 제품이며, 투석막 (M.W. 12-14,000)은 Spectrum Laboratories사의 것을 사용하였다.

2. *Vibrio* sp. PKA 1003 생육 조건 확인

2-1. 생육활성 측정

시험균주의 생육활성 측정은 각 조건에서 균주를 배양한 후, 600 nm 에서 흡광도 (Thermo spectrosonic UV, Thermo Co., NY, USA)를 측정하였다.

2-2. pH

0.1 N 및 1 N의 HCl과 NaOH를 이용하여 MB 배지의 pH를 25℃에서 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10으로 맞추는 후 멸균하였으며, 멸균된 배지 5 mL에 10⁶ CFU/mL 농도의 균 100 µL를 접종하여 30℃에서 24시간 배양 후, 흡광도를 측정하였다.

2-3. NaCl 농도

최적 pH로 조절한 MB 배지의 NaCl 농도를 2, 3, 4, 5 및 6%로 맞추는 후 멸균하였으며, 멸균된 배지 5 mL에 10⁶ CFU/mL 농도의 균 100 µ

L를 접종하여 30℃에서 24시간 배양 후, 흡광도를 측정하였다.

2-4. 온도

최적 pH 및 NaCl 농도로 조절한 MB배지를 멸균 후, 멸균된 배지 5 mL에 10^6 CFU/mL 농도의 균 100 μ L를 접종하여, 10, 20, 25, 30, 35 및 40℃ 조건에서 24시간 배양하면서 흡광도를 측정하였다.

2-5. 배양 시간

최적 pH 및 NaCl 농도로 조절한 MB배지를 멸균 후, 멸균된 배지 5 mL에 10^6 CFU/mL 농도의 균 100 μ L를 접종하여, 최적 온도 조건으로 96시간까지 배양하면서 3시간 간격으로 흡광도를 측정하였다.

3. 조효소 특성

3-1. 조효소의 제조

Vibrio sp. PKA 1003을 최적 생육 조건으로 대량 배양 후, 원심분리기 (Supra 30K, Hanil Science Co., Korea)를 이용하여 4℃에서 12,000 $\times g$, 30분간 원심하여 상층액을 조효소로 하였다.

3-2. 알긴산 분해능 측정

3-2-1. 점도 측정

점도 측정은 Richard 등 (Richard and Levein, 1976)의 방법을 참고하였다. 조효소를 알긴산과 1:1 혼합 후, 배양한 시료를 회전 점도계

(LVTDV-II, Brookfield Co., Middleboro, MA, USA)를 이용하여 1.5 rpm, 52 cP 및 25℃에서 각 조건별로 측정하였다.

3-2-2. 환원당의 정량

환원당의 정량은 Nelson (Nelson, 1944)의 Somogyi-Nelson법을 참고하였다. 시료 0.5 mL와 구리시약 (100 ml 당 KNa tartarate, 2.5 g; Na_2CO_3 , 2.5 g; Na_2SO_4 , 20 g; NaHCO_3 , 2.0 g) 0.5 mL을 test tube에 각각 취하고, water bath에서 20분간 가열하여 Cu_2O 을 생성시키고, 산성조건하에서 몰리브덴산 용액 1 mL를 가하여 발색시킨 다음, 520 nm에서 흡광도 (Optizen 2120 UV, Mecasys, Daejeon, Korea)를 측정하였다. glucose를 표준물질로 하여 얻은 검량곡선(Fig. 3)을 이용하여 환원당을 정량 하였다.

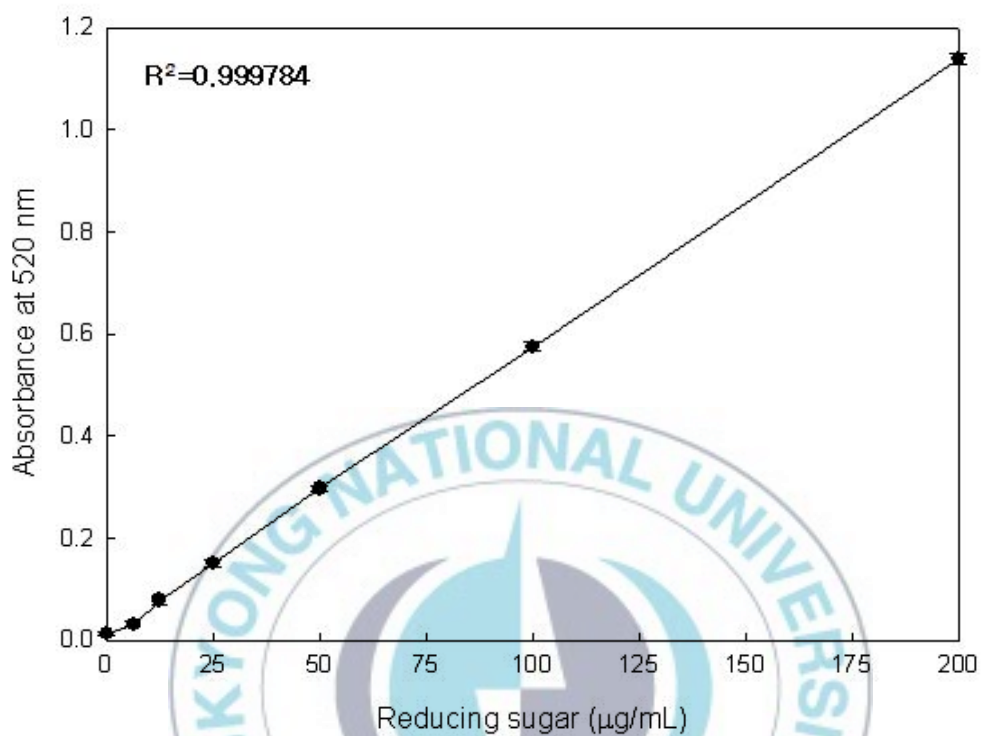


Fig. 3. Standard curve for determination of reducing sugar.

3-3. pH

2.5% NaCl phosphate buffer (pH 7.0)을 이용하여 알긴산을 수화 하였으며, 0.1 N 및 1 N의 HCl과 0.1 N 및 1 N의 NaOH를 이용하여 조효소 및 알긴산의 pH를 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10으로 조절하였다. 조효소 및 알긴산은 1:1로 혼합 후, 25℃에서 48시간 배양하였고, 점도 및 환원당 함량을 측정하였다.

3-4. 온도

0.1 N 및 1 N의 HCl과 0.1 N 및 1 N의 NaOH를 이용하여 조효소 및 알긴산을 최적 pH로 조절하였다. 조효소 및 알긴산을 1:1로 혼합 후, 각각 10, 20, 25, 30, 35 및 40℃ 조건에서 48시간 배양하였고, 점도 및 환원당 함량을 측정하였다.

3-5. 기질 농도

0.1 N 및 1 N의 HCl과 0.1 N 및 1 N의 NaOH를 이용하여 조효소 및 알긴산을 최적 pH로 조절하였다. 조효소 및 1-9% 농도의 알긴산을 각각 1:1로 혼합 후, 최적 온도 조건에서 48시간 배양 하였고, 배양된 시료의 점도 및 환원당 함량을 측정하였다.

3-6. 반응 시간

최적 pH 및 최적 기질 농도로 조절한 알긴산과 조효소액을 1:1로 혼합 후, 최적 온도 조건에서 72시간까지 배양하였고, 배양된 시료에 대하여 3시간 간격으로 점도 및 환원당 함량을 측정하였다.

4. 알긴산 분해산물의 Thin-layer chromatography(TLC) 분석

분리·동정된 알긴산 분해균으로부터 획득한 알긴산 분해 조효소액을 이용하여 시간에 따른 알긴산 분해 정도를 알아보기 위하여 TLC 분석을 실시하였다. 조효소액과 알긴산을 1:1로 혼합하여 30℃에서 각각 3, 6, 12, 15, 18, 21, 24, 31, 42 및 63시간 반응시킨 후, 100℃에서 5분간 가열 및 $10,000 \times g$, 4℃, 10 분 동안 원심분리하여 단백질을 제거한 다음 상층액을 4배 희석하여 TLC Silica gel 60 F₂₅₄, 25 glass plates 20×20 cm (Merck, Darmstadt, Germany)로 분석을 행하였다 (Li et al., 2011). TLC 분석은 TLC plate에 약 7.5 mg/mL 농도의 시료 3 μ L를 spotting한 다음, 1-butanol/acetic acid/H₂O (2:1:1, by volume)를 이용하여 전개시켰으며, 10%(v/v) H₂SO₄ in ethanol 용액을 분무한 후, 110℃에서 약 40분간 그을리는 방법으로 가시화시켰다.

5. 알긴산 분해 조효소액에 대한 trypsin의 영향

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

6. 효소 정제

Vibrio sp. PKA 1003을 최적 생육 조건에서 배양한 후, 원심분리 ($12,000 \times g$, 30 min, 4°C)하여 균체를 분리하고, 상층액을 조효소로 하였다. 조효소는 ammonium sulfate 염석, 투석, ion-exchange chromatography 및 gel chromatography 과정을 거치며 정제하였으며, 각 분획별 활성 측정을 위해 0.6% 알긴산 및 분획을 1:1로 혼합 후, 30°C 에서 5일간 배양하여 환원당 함량을 측정하였다.

6-1. Ammonium sulfate 염석 및 투석

조효소를 40% 및 80% 포화 ammonium sulfate 용액으로 순차적으로 염석을 행하였으며, $12,000 \times g$ 로 30분간 원심분리하여 상층액과 침전물로 분리하였다. 80% 포화 ammonium sulfate 용액으로 염석한 분획에서 침전물을 획득하여, 이를 소량의 30 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)로 용해시켰다. 용해된 침전물은 4°C 에서 48시간 동안 동일 buffer를 교체하면서 투석을 실시하였다.

6-2. Ion-exchange chromatography

DEAE-sephadex (Sigma aldrich Co., USA)는 0.3 M NaCl 용액으로 팽화시켜 사용하였으며, 팽화된 DEAE-sephadex ($\varnothing 1.7 \text{ cm} \times 20.0 \text{ cm}$)는 30 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)으로 평형화시켰다. 투석한 효소를 흡착시킨 후 0-1.0 M NaCl의 농도구배로 단계적으로 용출하였다. 모든 정제과정은 4°C 에서 실시하였다.

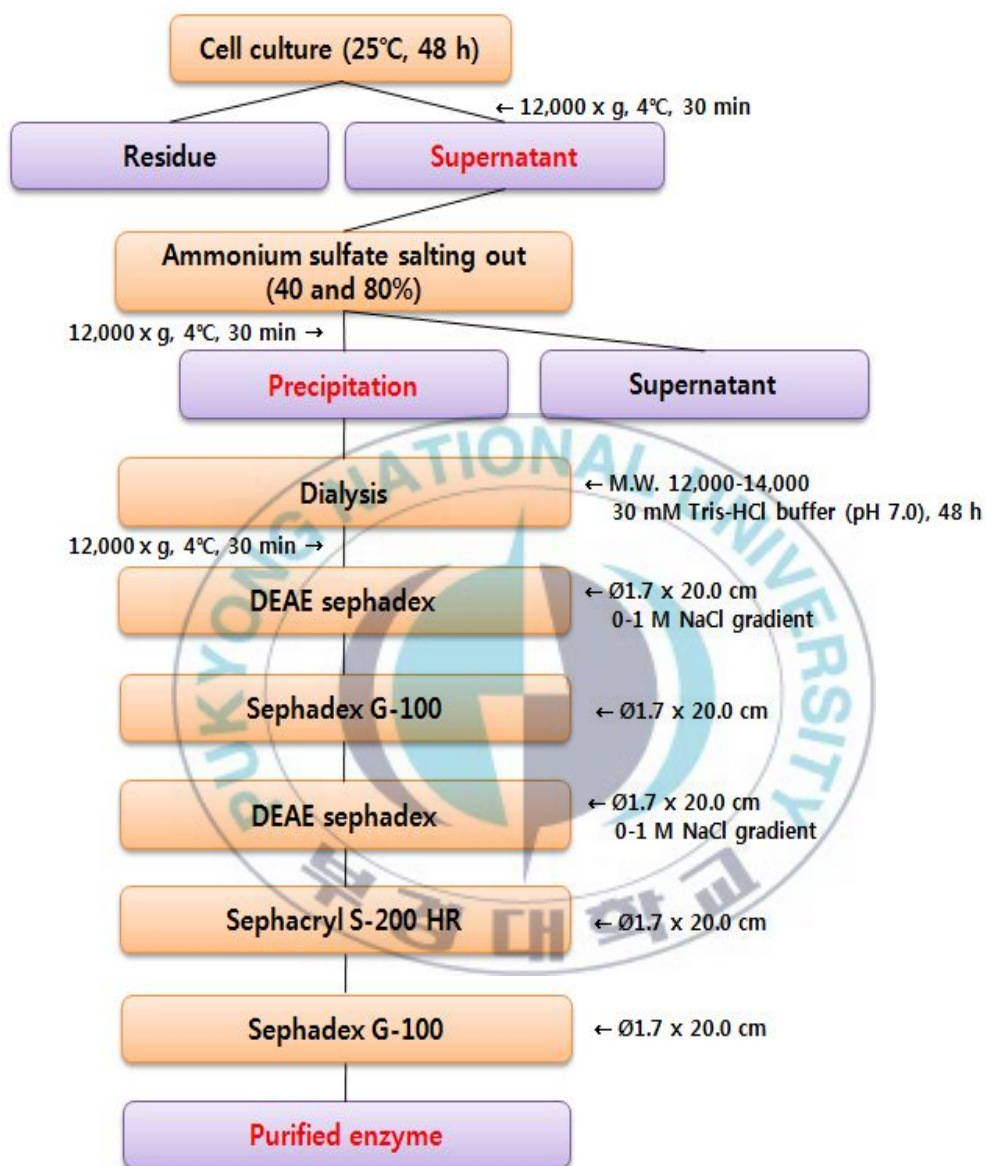


Fig. 4. Procedure for purifying the alginate-degrading enzyme produced by *Vibrio* sp. PKA 1003.

6-3. Gel chromatography

Sephadex G-100 (GE Healthcare Co., USA)은 30 mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)로 팽화시켜 사용하였으며, DEAE 분획 중 활성이 강한 분획을 농축한 후, 팽화된 Sephadex G-100 ($\varnothing 1.6$ cm $\times$ 30 cm)로 용출 및 분획하였다. 모든 정제과정은 4℃에서 실시하였다.

6-4. 단백질 농도 측정

Robert (Robert, 1996)의 방법을 참고하였으며, Bovine serum albumin (BSA, Sigma aldrich Co., USA)를 표준물질로 하여 280 nm에서 얻은 검량곡선 (Fig. 5)을 이용하여 단백질 농도를 측정하였다.



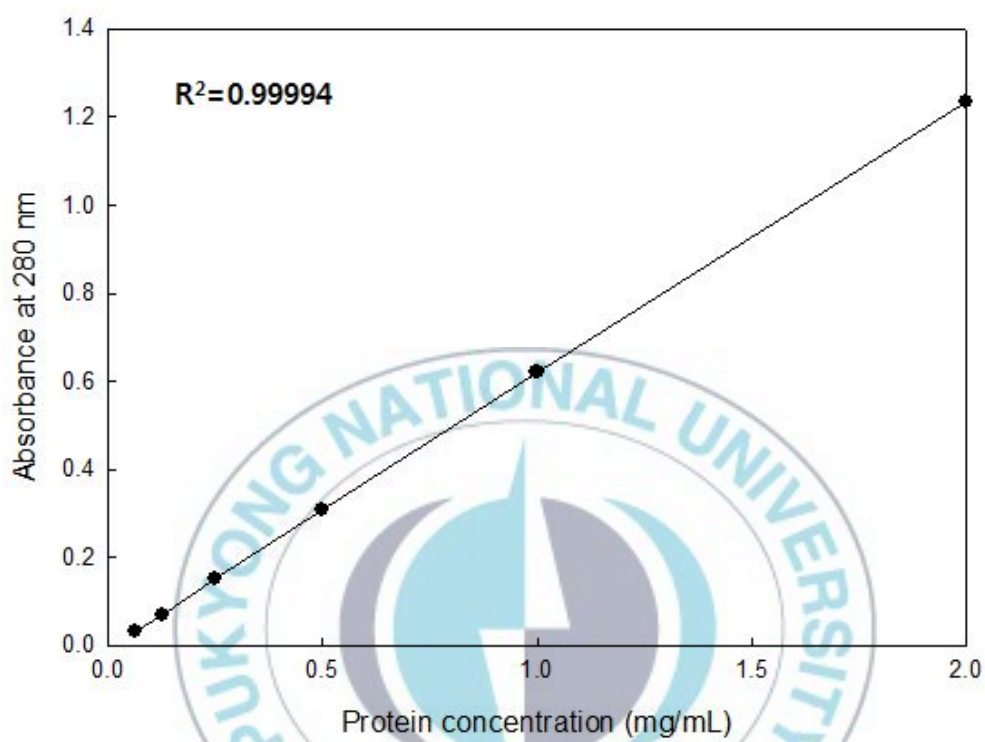


Fig. 5. Standard curve for protein.

7. 정제 효소 특성

7-1. pH 영향

정제 효소 활성에 미치는 pH의 영향을 확인하기 위하여 0.1 M acetate buffer (pH 4.0-6.0), 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0-9.0), 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 10.0-11.0)을 이용하여 알긴산을 수화하였다. 정제 효소 (0.5 mL), 알긴산 (0.5 ml) 및 각 pH별 완충액 (1 mL)을 혼합 후, 30℃에서 24시간 배양하였고, 환원당 함량을 측정하였다. 각 실험 조건에서 최대 활성을 보인 것을 100%로 간주하고 상대 활성으로 나타내었다.

7-2. 온도 영향

정제 효소 활성에 미치는 온도 영향을 확인하기 위하여 정제 효소 (0.5 mL), 알긴산 (0.5 ml) 및 완충액 (1 mL)을 혼합 후, 배양 온도를 10℃에서 40℃까지 달리하여 24시간 배양하였고, 환원당 함량을 측정하였다. 각 실험 조건에서 최대 활성을 보인 것을 100%로 간주하고 상대 활성으로 나타내었다.

7-3. NaCl 영향

정제 효소 활성에 미치는 NaCl 농도 영향을 확인하기 위하여 기질용액에 NaCl 농도를 0-2.0 M로 달리하여 첨가하고, 정제 효소 (0.5 mL), 알긴산 (0.5 ml) 및 완충액 (1 mL)을 혼합 후, 30℃에서 24시간 배양하였고, 환원당 함량을 측정하였다. 각 실험 조건에서 최대 활성을 보

인 것을 100%로 간주하고 상대 활성으로 나타내었다.

7-4. 금속 특이성

정제효소의 금속 이온에 대한 특이성을 확인하기 위해 Joo 등 (1993)의 방법을 참고하였으며, 정제 효소 (0.25 mL)에 금속이온 농도를 0.01 M로 조정한 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)를 혼합 후, 4℃에서 1시간 전반응을 실시하였다. 전 반응을 실시한 효소 용액에 최적 기질 농도를 0.25 mL 첨가하여 혼합 후, 최적 배양 온도 및 시간 조건에서 배양하였으며 배양된 시료는 환원당 정량하였다. 각 실험 조건에서 최대 활성을 보인 것을 100%로 간주하고 상대 활성으로 나타내었다.

7-5. 알긴산 분해 속도 양식

Vibrio sp. PKA 1003이 생성한 효소의 분해 속도를 확인하기 위하여 효소농도를 고정하고 기질 농도를 달리하여 반응시킨 후, 반응 시간당 생성되는 환원당을 측정하였다. Lineweaver-Burk plot (Lineweaver et al., 1934)으로부터 반응속도 정수 (K_m)와 최대반응속도 (V_{max})를 구하였다.

8. 통계처리

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.

결과 및 고찰

1. 알긴산 분해균의 분리 및 동정

부산 송정 연안에서 채집한 분해중인 지층이 (*Sargassum thunbergii*)와 그 주변 해수로부터 형태적으로 다른 colony를 분리하였으며, 알긴산 분해능이 우수한 단일 colony는 (주)마크로젠에서 16S rRNA sequence analysis 로 16S rDNA 염기서열을 확인한 후 (Fig. 6), NCBI blast를 통해 동정하였다. 그 결과 *Vibrio* sp. V140 (GenBank: DQ146978.1), *Vibrio crassostreae* strain CAIM 1405 (GenBank: EF094887.1) 및 *Vibrio pomeroyi* strain DHQ25 (GenBank: GU198497.1)와 모두 99%의 높은 상동성을 나타내었으며, 이로부터 *Vibrio* sp. 세균들과 아주 높은 연관관계를 보이는 것을 알 수 있었다. 일반적으로 16S rDNA의 유사성이 97% 이상이면 동일한 종 (species)으로 분류하므로 분리한 균주를 최종적으로 *Vibrio* sp. PKA 1003으로 명명하였다.



Sargassum thunbergii



Single colony

1 GCTCAGATTG AACGCTGGCG GCAGGCCTAA CACATGCAAG TCGAGCGGAA
 51 ACGACACTAA CAATCCTTCG GGTGCGTTAA TGGGCGTCGA GCGGCGGACG
 101 GGTGAGTAAT GCCTAGGAAA TTGCCTTGAT GTGGGGGATA ACCATTGGAA
 151 ACGATGGCTA ATACCGCATA ATGCCTACGG GCCAAAGAGG GGGACCTTCG
 201 GGCCTCTCGC GTCAAGATAT GCCTAGGTGG GATTAGCTAG TTGGTGAGGT
 251 AATGGCTCAC CAAGGCGACG ATCCCTAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC
 301 CACACTGGAA CTGAGACACG GTCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG
 351 GAATATTGCA CAATGGGCGA AAGCCTGATG CAGCCATGCC GCGTGTATGA
 401 AGAAGGCCTT CGGGTTGTAA AGTACTTTCA GTTGTGAGGA AGGGGGTGTA
 451 GTTAATAGCG GCATCTCTTG ACGTTAGCAA CAGAAGAAGC ACCGGCTAAC
 501 TCCGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGGAGG GTGCGAGCGT TAATCGGAAT
 551 TACTGGGCGT AAAGCGCATG CAGGTGGTTC ATTAAGTCAG ATGTGAAAGC
 601 CCGGGGCTCA ACCTCGGAAC TGCATTTGAA ACTGGTGAAC TAGAGTACTG
 651 TAGAGGGGGG TAGAATTTCA GGTGTAGCGG TGAAATGCGT AGAGATCTGA
 701 AGGAATACCA GTGGCGAAGG CGGCCCCCTG GACAGATACT GACACTCAGA
 751 TCGGAAAGCG TGGGGAGCAA ACAGGATTAG ATACCCTGGT AGTCCACGCC
 801 GTAAACGATG TCTACTTGA GGTGTGGCC TTGAGCCGTG GCTTTCGGAG
 851 CTAACGCGTT AAGTAGACCG CCTGGGAGT ACGGTCGCAA GATTAAACT
 901 CAAATGAATT GACGGGGGCC CGCACAAGCG GTGGAGCATG TGGTTTAATT
 951 CGATGCAACG CGAAGAACCT TACCTACTCT TGACATCCAG AGAAGCCAGC
 1001 GGAGACGCAG GTGTGCCTTC GGGAGCTCTG AGACAGGTGC TGCATGGCTG
 1051 TCGTCAGCTC GTGTTGTGAA ATGTTGGGT AAGTCCCGCA ACGAGCGCAA
 1101 CCCTTATCCT TGTTTGCCAG CGAGTAATGT CGGGAAGTCC AGGGAGACTG
 1151 CCGGTGATAA ACCGGAGGAA GGTGGGGACG ACGTCAAGTC ATCATGGCCC
 1201 TTACGAGTAG GGCTACACAC GTGCTACAAT GGCGCATACA GAGGGCAGCA
 1251 AGCTAGCGAT GGTGAGCGAA TCCCAAAAAG TCGTCGTAG TCCGGATTGG
 1301 AGTCTGCAAC TCGACTCCAT GAAGTCGGAA TCGCTAGTAA TCGTAGATCA
 1351 GAATGCTACG GTGAATACGT TCCCGGGCCT TGTACACACC GCCCGTCACA
 1401 CCATGGGAGT GGGCTGCAAA AGAAGTGGGT AGTTTAACCT TTCGGGGAGG
 1451 ACGCTCACCA CTTTGTGGTT CATGACTGGG

Fig. 6. 16S rDNA nucleotide sequence of *Vibrio* sp. PKA 1003.
 The isolated bacteria was identified *Vibrio* sp. V 140
 and 99% matched to NCBI accession#;DQ146978.1.

2. *Vibrio* sp. PKA 1003 생육 조건 확인

미생물을 효소의 공급원으로 사용하면, 세대기간이 짧기 때문에 단시간에 다량의 효소를 생산하는 것이 가능하며, 균종에 따라서 특정의 효소를 다량으로 생산할 수 있으며, 인공적으로 조절된 배양이 가능해서 생산관리가 쉽고, 생산균에 인위적인 변이를 일으켜서 생산성을 높일 수 있다는 등의 여러 가지 장점이 있다 (No et al., 2003). 이처럼 미생물 유래 효소가 경제적인 측면이나 공업적인 규모의 활용측면에서 가진 장점으로 인해 미생물로부터의 효소 생산에 관심이 높아지고 있다 (Jin et al., 2013). 미생물이 생산하는 효소는 균주의 배양방법, 균주 배양을 위한 배지조성 등 다양한 배양조건에 따라 그 생산량이 현저하게 변화하게 된다 (No et al., 2003). 따라서 미생물의 배양조건을 검토하는 것은 실험실 규모에서의 효소연구 뿐만 아니라 효소의 공업적 생산을 완성하는데 가장 먼저 고려해야 하는 중요한 단계이다 (No et al., 2003). 따라서 효율적인 효소 생산을 위해서 본 균주에 대한 배양 최적 조건을 결정하기 위한 선행연구가 진행되어야 할 것으로 판단되어 pH, NaCl 농도, 배양 온도 및 배양시간, 기질농도에 대하여 실험을 진행하였다.

2-1. pH

미생물의 생육은 효소활성에 영향을 미치는 pH에 의해 크게 영향을 받고 있으며, 미생물의 종류에 따라 각각 최적의 pH가 있다 (Kim, 2004). *Vibrio* sp. PKA 1003의 최적 pH 조건을 확인하기 위하여 0.1 N 및 1 N HCl과 0.1 N 및 1 N NaOH로 배지의 초기 pH를 2에서 10

까지 조절하고 각 배지에 10^6 CFU/mL의 균액을 접종 후, 30℃에서 24시간 배양하였다. 배양액의 흡광도를 측정한 결과 (Fig. 7), pH 2, 4, 6, 7, 8, 9 및 10의 흡광도 값은 각각 0.013, 0.015, 0.426, 0.460, 0.363, 0.343 및 0.310으로써 pH 6 이상의 영역에서 *Vibrio* sp. PKA 1003 균주의 생육이 활발한 것을 확인하였으며, 그 중에서도 pH 7에서 0.460으로 가장 활성이 뛰어난 것으로 나타났다. 반면 pH 4 이하의 영역에서는 생육이 정지되는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과로부터 *Vibrio* sp. PKA 1003 균주의 경우, 중성 또는 미알칼리성 영역에서 균주의 증식이 활발하게 일어나는 것을 확인할 수 있었으며, 본 균주의 최적 생육 pH를 7로 결정하였다. 이러한 결과는 Hu 등 (Hu et al., 2006)이 알긴산 분해 효소를 생성하는 균주인 *Vibrio* sp. 510이 pH 6.5에서 알긴산 분해 효소를 최대로 생성한다고 보고한 것과 일치하는 결과이며, 알긴산 분해 효소의 경우, 중성 부근에서 활성이 뛰어난 것으로 판단할 수 있었다.

2-2. NaCl 농도

Baumann 등 (1971)은 해양 미생물의 경우, 성장 및 효소 생산에 적정 농도의 1가 또는 2가 이온이 필요하다고 보고한바 있다. 이에 *Vibrio* sp. PKA 1003 균주가 해양환경으로부터 분리되었기에 일정농도의 NaCl이 요구될 것으로 판단되어 (Baxter, 1959), 최적 pH로 조절한 배지에 NaCl 농도를 2-6%로 조절하였고, 각 배지에 10^6 CFU/mL의 균액을 접종 후, 30℃에서 24시간 배양하였다. 그 결과 (Fig. 8), *Vibrio* sp. PKA 1003 균주의 경우, 2 및 3% NaCl 농도에서 0.464 및

0.481로 높은 생육 활성을 보였으며, 그 중에서도 3% NaCl 농도에서 균주의 성장이 가장 활발한 것으로 나타났다. 또한 4% 이상의 농도에서는 활성이 급격히 저하되는 것을 알 수 있었으며, 따라서 3% NaCl을 최적 조건으로 하였다. 이러한 결과로부터 *Vibrio* sp. PKA 1003이 해양 유래의 미생물로 NaCl에 대하여 약호염성 또는 내염성이 있는 균주라는 것을 알 수 있었다. 대부분의 내염성 미생물들은 고염농도 환경에 처하면 세포내에 proline이나 glycine, betaine 등 저분자 질소 화합물 혹은 trehalose, floridoside 및 digeneaside 등 특수한 구조의 당류들이 세포내에 축적되며 세포내부와 외부의 삼투압 균형을 맞추어 줌으로서 세포의 탈수를 막아 고염농도 환경에 적응한다고 보고되고 있다(Jo, 1988). *Vibrio* sp. PKA 1003의 최적생육 NaCl 농도는 3%로 하였으며, 이러한 *Vibrio* sp. PKA 1003의 내염성이 본 균주의 산업적 응용 가능성을 증대시켜줄 것으로 사료되어 진다.

2-3. 배양온도

온도는 효소 활성의 속도에 영향을 미치는 인자로서 효소는 미생물의 생육에 필수적이다 (Alcamo, 2004). *Vibrio* sp. PKA 1003의 최적 배양 온도를 확인하기 위하여, 배지의 pH 및 NaCl 농도를 최적 조건으로 조절하였고, 10^6 CFU/mL의 균액을 접종 후, 각각 10, 20, 25, 30, 35 및 40℃에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액의 흡광도를 측정한 결과 (Fig. 9), 각 온도별로 흡광도값이 0.139, 0.457, 0.626, 0.450, 0.025 및 0.037로써 20-30℃ 영역에서 생육이 활발한 것으로 나타났으며, 그 중에서도 25℃를 *Vibrio* sp. PKA 1003 균주의 최적 생육 온도로 결정하

였다. 이러한 결과는 해수세균의 경우 20℃ 부근에서 성장이 활발한 것으로 알려져 있는데 이와 일치하는 결과이며 (Uo et al., 2006), Hu 등 (Hu et al., 2006)이 *Vibrio* sp. 510 균주가 26℃에서 알긴산 분해 효소를 가장 많이 생성한다고 보고한 것과도 일치하는 결과이다.

2-4. 배양 시간

Vibrio sp. PKA 1003의 최적 배양 시간을 확인하기 위하여, 배지의 pH 및 NaCl 농도를 최적 조건으로 조절하였고, 10^6 CFU/mL의 균액을 접종 후, 최적 온도에서 132시간 동안 배양하면서 3시간 간격으로 흡광도를 측정하였다. 그 결과 (Fig. 10), 배양 12시간까지는 균의 성장이 급격히 증가하였고 이후 균의 성장속도가 급격히 줄어들었으며 48시간 이후에는 균체의 성장이 거의 없었다. 따라서 48시간까지가 균이 활발히 증식하는 대수증식기이고, 48시간 이후는 균체량에 거의 변화가 없이 일정해지는 정지기인 것으로 판단되어 진다. Uo 등 (Uo et al., 2006)과 Kim 등 (Kim et al., 2010)의 연구결과에 따르면 균주의 성장 최적 조건과 알긴산 분해 최대 활성이 동일한 지점에서 나타났고, 이 지점은 정지기 이전의 시점으로 보고한 바 있다. 따라서 본 연구에서도 균체량이 최대로 많아지는 시점인 48시간을 최적 배양 시간으로 하였다.

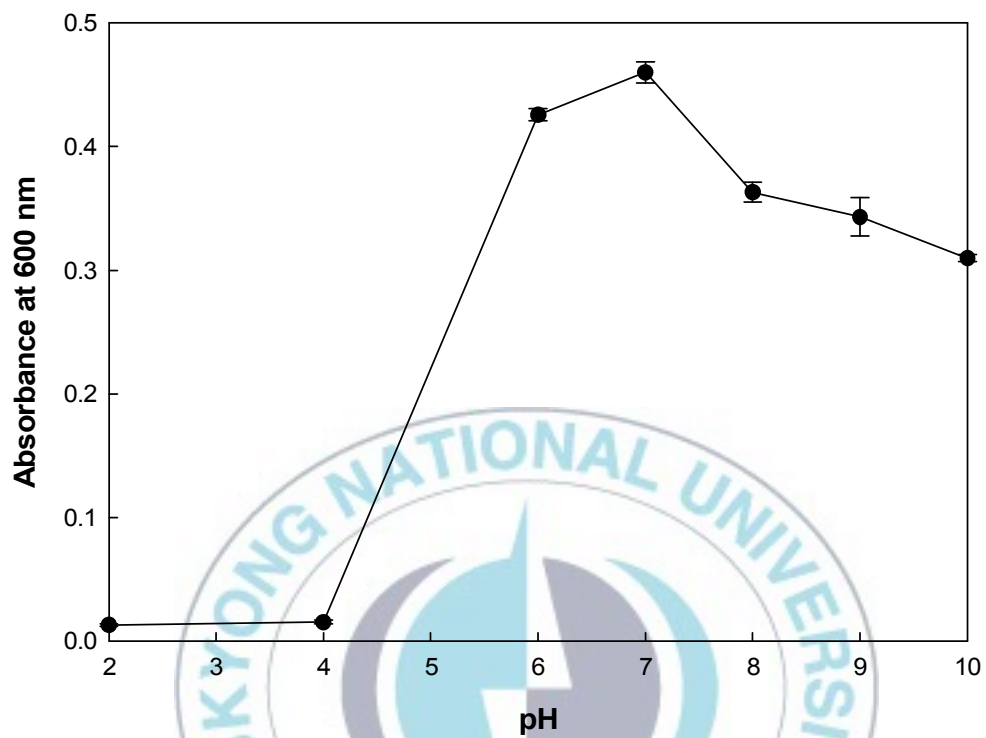


Fig. 7. Effect of pH on growth of *Vibrio* sp. PKA 1003.

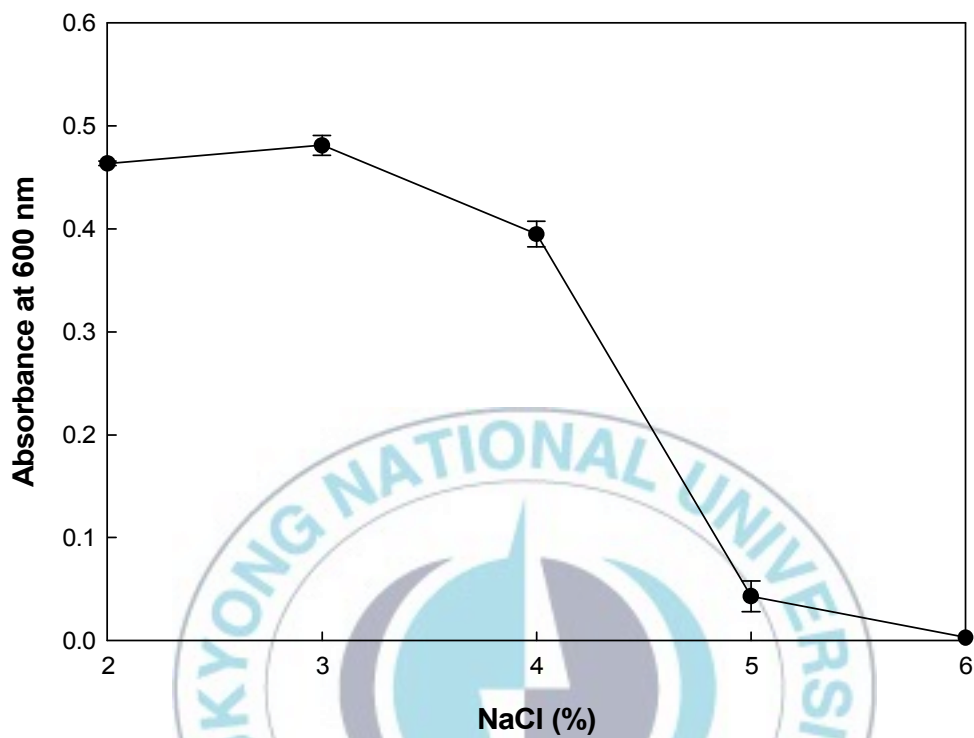


Fig. 8. Effect of NaCl concentration on growth of *Vibrio* sp. PKA 1003.

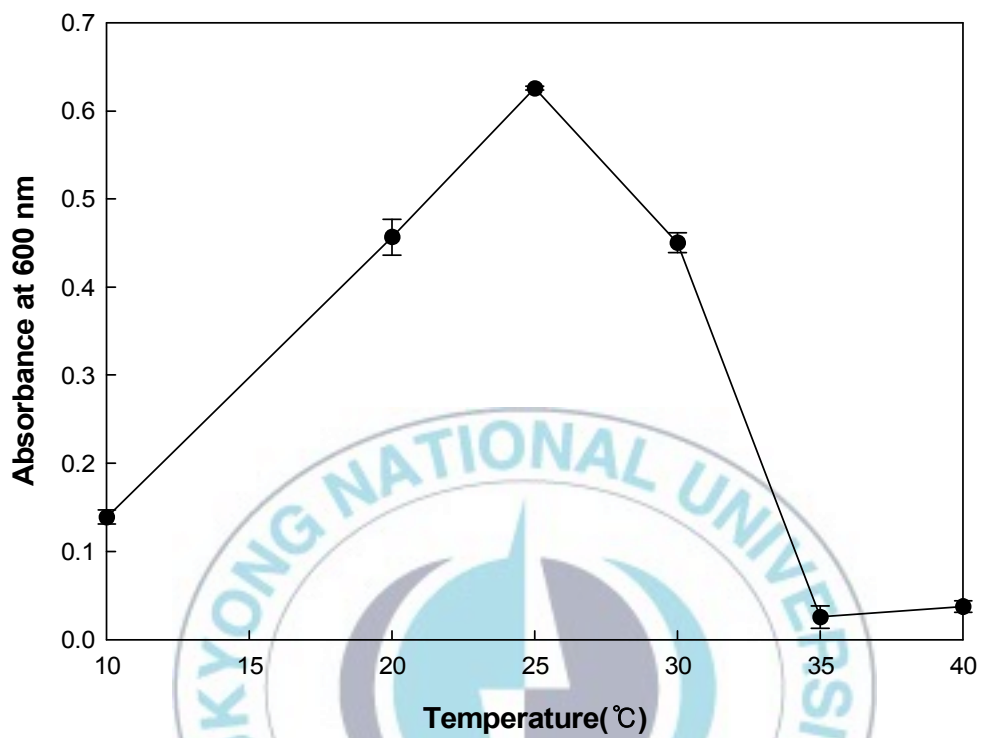


Fig. 9. Effect of temperature on growth of *Vibrio* sp. PKA 1003.

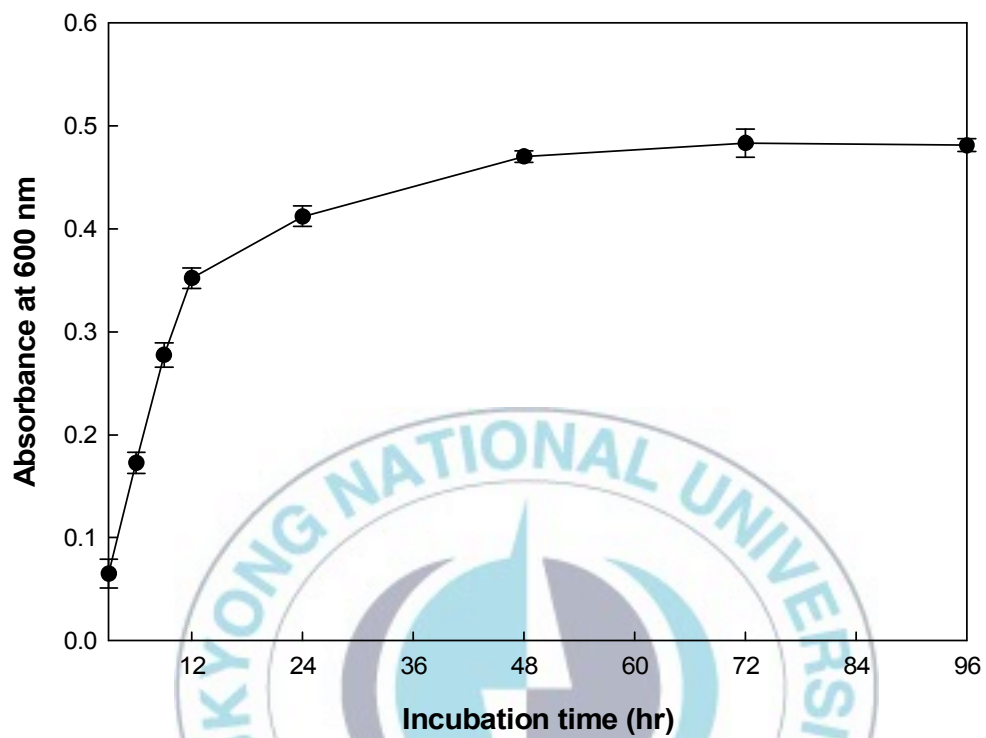


Fig. 10. Effect of incubation time on growth of *Vibrio* sp. PKA 1003.

3. 조효소의 특성

효소는 특정 pH 범위를 벗어나거나 혹은 기질의 이온화 상태에 따라 불활성화되는 경우도 있기 때문에 pH 변화는 효소의 촉매반응에서 매우 중요한 역할을 한다 (No et al., 2003). 또한 온도는 효소와 기질의 안정성 및 완충용액의 이온화 정도 등에 영향을 미침으로써 효소의 반응에서 가장 중요한 변수로 작용하는 것 중 하나라고 할 수 있다. 이처럼 효소의 활성은 단백질의 구조적 특성상 다양한 환경 요인에 크게 영향을 받는다 (Jin et al., 2013). 따라서 본 효소에 대하여 기본적인 특성을 파악하고 효소 활성의 최적화 조건을 결정하기 위하여 pH, 온도, 기질 농도 및 반응시간에 대하여 실험을 진행하였다.

3-1. pH

Vibrio sp. PKA 1003이 생성하는 조효소액의 알긴산 분해 최적 pH를 확인하기 위하여, 조효소액 및 알긴산의 pH를 각각 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10으로 조절하였고, 조효소 및 알긴산을 1:1 비율로 혼합하여 25℃에서 48시간 동안 배양 후, 생성된 환원당을 정량하였다. 그 결과 (Table 1), pH 9에서 환원당 생성량이 733.87 $\mu\text{g/mL}$ 로 가장 높은 것을 확인하였으며, 점도 측정 결과에서도 각 pH별로 점도가 각각 8486, 1059, 193.50, 36.85, 27.64 및 27.64 cP로써 pH 9이상의 영역에서 최저치를 나타내는 것을 확인하였다. 따라서 pH 9을 최적조건으로 하였으며, 이러한 결과는 Takeshita 등 (Takeshita et al., 1993)이 도미의 장으로부터 분리한 *Vibrio* sp. 의 조효소가 알칼리성 영역인 pH 8.5에서 최대 분해 활성을 나타내었다는 것과 일치하는 결과이다.

3-2. 온도

최적 pH 조건으로 맞춘 알긴산과 조효소를 1:1 혼합 후, 10, 20, 25, 30, 35 및 40℃로 온도를 달리하여 48시간 동안 교반 배양한 후, 배양된 시료의 점도 및 환원당 함량을 측정하였다. 그 결과 (Table 2), 30℃에서 환원당 함량이 727.10 ug/mL로 가장 높았고 점도가 9.22 cP로 가장 낮아 가장 높은 분해활성을 나타내는 것을 확인하였으며, 35℃ 이상의 온도에서는 알긴산 분해 활성이 급격히 낮아지는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 Joo 등 (Joo et al., 1993)이 해양생물로부터 분리한 균주들의 알긴산 분해 활성이 25~30℃로 토양으로부터 분리한 균주들에 비해 다소 저온에서 활발하다는 보고와 일치하는 결과였다.

3-3. 기질 농도

1-9%로 농도를 달리한 알긴산 및 조효소를 최적의 pH로 조절한 후, 1:1로 혼합하여 30℃에서 48시간 동안 배양 후, 환원당 함량을 측정하였다. 그 결과 (Table 3), 농도별로 환원당 함량이 각각 195.44, 625.86, 634.10, 808.06, 622.42 및 539.87 $\mu\text{g/mL}$ 로 6% 알긴산 농도에서 가장 높은 분해 활성을 나타내는 것을 확인하였으며, 6% 이상의 농도에서는 알긴산 분해능이 급격히 저하되는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 알긴산 농도가 높아짐에 따라 배지의 점성이 강해져 일정 농도 이상에서는 기질이 오히려 효소의 작용을 저해하는 요소로 작용하였기 때문인 것으로 사료되어지며, 이처럼 기질이 일정 농도 이상으로 과다하게 존재하면 오히려 효소의 반응이 저해되는 경우가 있는데, 이를 “기질 저해”라고 한다 (Reed et al., 2010).

Table 1. Effect of pH on alginate degrading activity of crude enzyme measured by viscometry and reducing sugar assay

	Viscometry (cP)		Reducing sugar (µg/mL)	
	Untreated ¹⁾	Treated	Untreated	Treated
pH 2	12,156±29.69 ^{Ac2)}	8,486±12.73 ^{Ba}	13.42±1.85 ^{Ba}	24.76±1.27 ^{Af}
pH 4	12,362±27.27 ^{Ab}	1059±12.02 ^{Bb}	5.35±1.94 ^{Bb}	113.46±1.22 ^{Ae}
pH 6	12,475±23.56 ^{Aa}	193.50±10.62 ^{Bc}	6.20±1.59 ^{Bb}	371.80±1.37 ^{Ad}
pH 8	12,457±29.25 ^{Aa}	36.85±15.04 ^{Bd}	6.20±1.74 ^{Bb}	546.41±1.36 ^{Ac}
pH 9	11,821±12.73 ^{Ad}	27.64±13.02 ^{Bd}	5.87±1.54 ^{Bb}	733.87±6.57 ^{Aa}
pH 10	5,749±18.50 ^{Ae}	27.64±13.02 ^{Bd}	5.01±0.83 ^{Bb}	693.25±1.57 ^{Ab}

¹⁾Mixture of alginate and MB.

²⁾Means in the same row (A–B) and the same column (a–f) bearing different superscripts are significantly different ($p<0.05$).

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

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

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

¹⁾Mixture of alginate and MB.

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

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

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

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

(Unit : $\mu\text{g/mL}$)

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

¹⁾Mixture of alginate and MB.

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

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

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

3-4. 반응 시간

최적 시간 조건을 결정하기 위해 앞서 결정한 최적 활성 조건으로 맞추어 6% 알긴산과 조효소를 1:1로 혼합 후, 30℃에서 시간을 달리하여 교반 배양하여 점도 및 환원당 함량을 측정한 결과 (Table 4), 63시간에서 환원당 함량이 1,034.71 ug/mL 및 점도가 23.03 cP로 최대 분해 활성을 나타내었으며, 그 이후에는 큰 변화가 관찰되지 않았다. 따라서 63시간을 최적 활성 조건으로 하였다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, *Vibrio* sp. PKA 1003이 생산하는 조효소의 최적 알긴산분해 조건은 pH 9, 30℃, 6% 알긴산 및 배양시간 63시간인 것으로 나타났다. Joo 등 (Joo et al., 1993)의 *Bacillus licheniformis* AL-577 및 Uo 등 (Uo et al., 2006)의 *Vibrio* sp. AL145가 최적 조건에서 환원당 생성량이 각각 0.899 mg/mL 및 0.355 mg/mL로 고활성 균주들으로써 산업적 활용 가능성이 있다고 Joo 등 (Joo et al., 1993)과 Uo 등 (Uo et al., 2006)이 보고하였으며, 본 균주의 경우, 환원당 생성량이 1.035 mg/mL로 추후 산업적으로 이용할 가능성이 충분하다고 사료된다.

Table 4. Effect of incubation time on alginate degrading activity of crude enzyme measured by viscometry and reducing sugar assay

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

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

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

4. 알긴산 분해 산물의 TLC 분석

TLC는 유리판 위에 알루미나 및 실리카겔 등의 흡착제를 발라 그 박층에 의해서 크로마토그래피를 행하는 것으로서, 흡착제 층을 고정상으로 적당한 용매를 이동상으로 사용한다. 모세관 현상에 의하여 시료가 전개되게 되는데, 시료 내에 들어있는 각 성분의 고정상 또는 이동상에 대한 흡착정도 또는 농도의 차이에 의하여 이동거리가 다르게 되어 물질이 분리되는 원리를 이용한 것이다. 일반적으로 TLC의 경우, 전개 시간이 30분~1시간 정도이기 때문에 시간이 절약되고 물질의 전개가 효과적으로 이루어지기 때문에 상당히 낮은 화합물까지도 분리, 검출 가능하다는 장점을 가지고 있다 (Lee et al., 2006). 따라서 *Vibrio* sp. PKA 1003 균주가 생산하는 조효소액을 알긴산에 처리하였을 시에 증가된 환원당이 알긴산의 분해에 의한 것이 맞는지 또 알긴산 올리고당이 생성되는지 확인하기 위하여 TLC 분석을 실시하였다. 그 결과 (Fig. 11), 배양 6시간까지는 전개용매에 의한 이동이 나타나지 않았으나 배양 12시간부터 알긴산이 서서히 분해되어 2개의 spot이 생성되기 시작하였으며, 24시간까지 농도가 서서히 짙어지는 것을 관찰할 수 있었다. 배양 24시간 이후부터 최적 분해 시간까지는 TLC상으로 큰 차이가 나타나지 않았으며, 이상으로부터 알긴산 분해 효소에 의해 알긴산이 단당 또는 올리고당으로 사료되어지는 여러 가지 저분자 물질로 분해되는 것을 확인할 수 있었으며, *Vibrio* sp. PKA 1003 균주가 생산하는 효소가 해조다당인 알긴산을 저분자화 하기 위해 유용하게 이용될 것으로 사료된다.



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

5. 알긴산 분해 조효소액에 대한 trypsin의 영향

Trypsin은 단백질을 가수분해하는 알칼리성 프로테아제 그룹 (alkaline protease group)에 속하는 효소로써, peptide 사슬을 끊는 endopeptidase이다 (Simpson and Haard, 1984). 조효소액에 의한 알긴산 분해가 조효소액 내의 효소에 의한 것인지를 확인하기 위하여 단백질 분해 효소인 trypsin과 조효소액을 미리 반응시킨 다음 알긴산과 혼합하여 환원당 생성량을 확인하였다. *Vibrio* sp. PKA 1003 균주가 생산하는 조효소액에 trypsin을 처리한 결과 (Table 5), trypsin 처리구 및 조효소액 처리구의 환원당 함량이 각각 70.90 및 538.62 $\mu\text{g/mL}$ 로 조효소액에 trypsin을 처리할 시 그 활성이 현저하게 감소되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 단백질 분해효소인 trypsin에 의하여 알긴산 분해 효소가 분해되어 그 기능을 상실하기 때문인 것으로 사료되어지며, 이러한 결과로부터 알긴산 분해는 *Vibrio* sp. PKA 1003 균주가 생산하는 효소에 의한 것임을 확인할 수 있었다.

Table 5. Effects of trypsin treatment on alginate-degrading activity of crude enzyme by reducing sugar assay

	Reducing sugar ($\mu\text{g/mL}$)
Untreated	13.29 ± 0.88^c
Crude enzyme + Trypsin	70.91 ± 2.10^b
Crude enzyme	538.62 ± 0.66^a



6. 효소 정제

Vibrio sp. PKA 1003 균주가 생성하는 효소를 정제하기 위하여 40 및 80% 포화 ammonium sulfate 용액으로 염석을 실시하였다. 먼저, 40% 포화 ammonium sulfate 용액으로 염석한 후, 원심분리 ($12,000 \times g$, 30 min, 4°C)하였으며, 상층액은 80% 포화 ammonium sulfate 용액으로 염석한 조효소는 원심분리 ($12,000 \times g$, 30 min, 4°C)한 후, 침전물과 상층액을 분리하였다. 80% 포화 ammonium sulfate 용액으로 염석 후 얻은 침전물은 30 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)로 용해시킨 후, 4°C 에서 48시간 동안 동일 buffer로 투석 (M.W. 12,000-14,000)을 행하였고, 투석 용액의 알긴산 분해 활성을 측정한 결과(Fig. 12), 80% 포화 ammonium sulfate 염석 침전물의 알긴산 분해 활성이 높게 측정되는 것을 확인하였고, 본 조건을 최적조건으로 잡고 이후 실험을 진행하였다. 0-0.7 M NaCl 농도로 단계적 용출법을 이용하여 DEAE sephadex를 실시한 결과 (Fig. 13), 총 240개의 fraction을 획득하였고, 0.4 M 농도에 130-137번 fraction이 알긴산 분해활성이 뛰어난 것을 확인하였다. 따라서 본 fraction을 농축하여 sephadex G-100을 실시한 결과 (Fig. 14), 25-27번 fraction의 활성이 뛰어난 것을 확인하였으며, 동일한 방법으로 DEAE-sephadex, sephacryl S200-HR 및 sephadex G-100을 실시한 결과 (Fig. 15, 16, 17), 각각 129, 28 및 24번 fraction에서 알긴산 분해활성이 가장 뛰어난 것을 확인하였으며, sephadex G-100까지 실시한 시료의 specific activity가 12.27 U/mg인 것을 확인하였다 (Table 6).

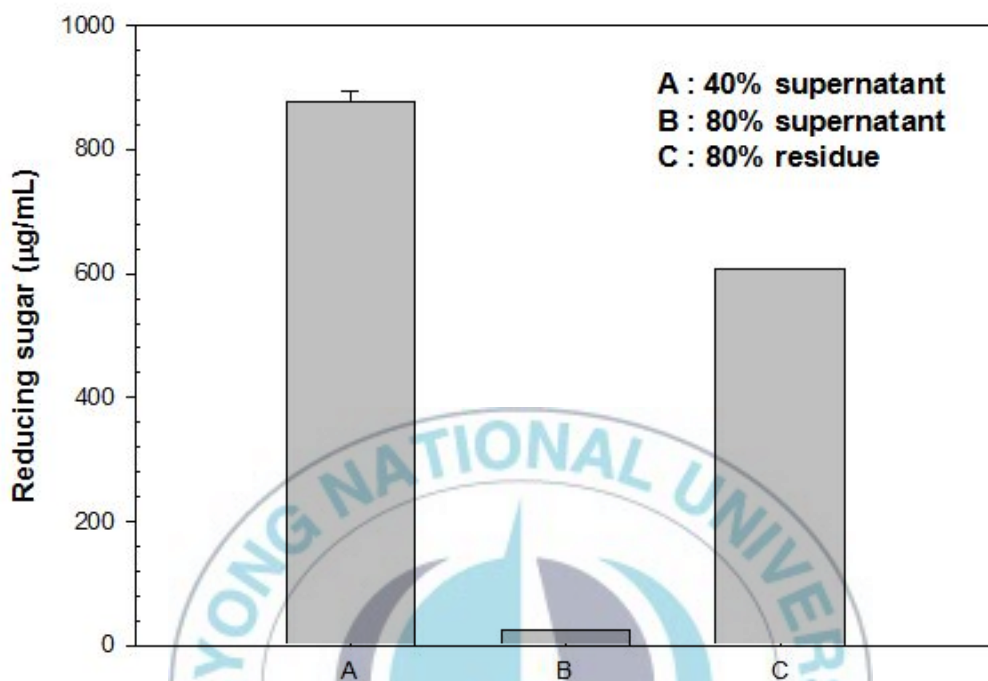


Fig. 12. Enzyme activity of ammonium sulfate salting out fractions measured by reducing sugar assay.

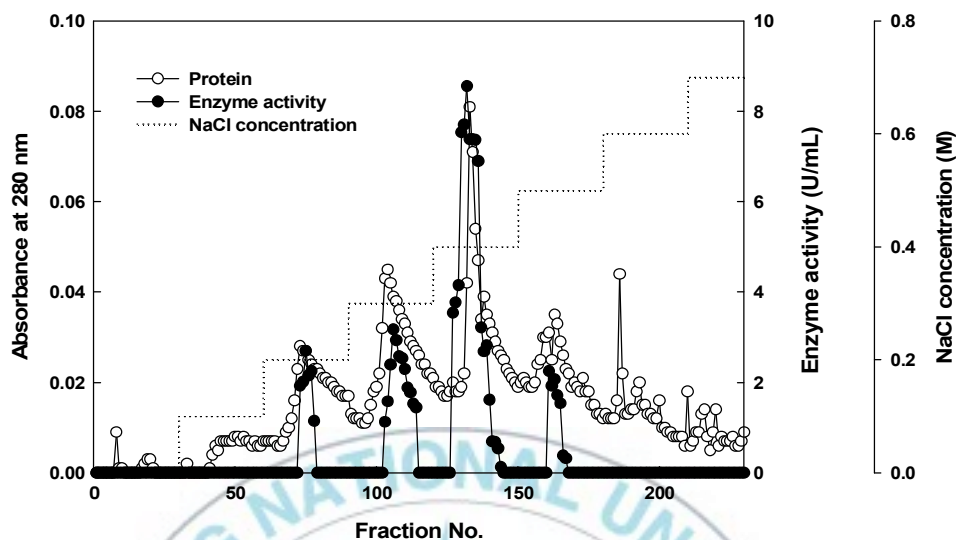


Fig. 13. DEAE sephadex chromatography of purified fraction by saturated ammonium sulfate solution in the range of 80% for purifying the extracellular enzyme. The enzyme was eluted with a gradient of 0.0–1.0 M NaCl in 0.03 M Tris-HCl buffer, pH 7.0.

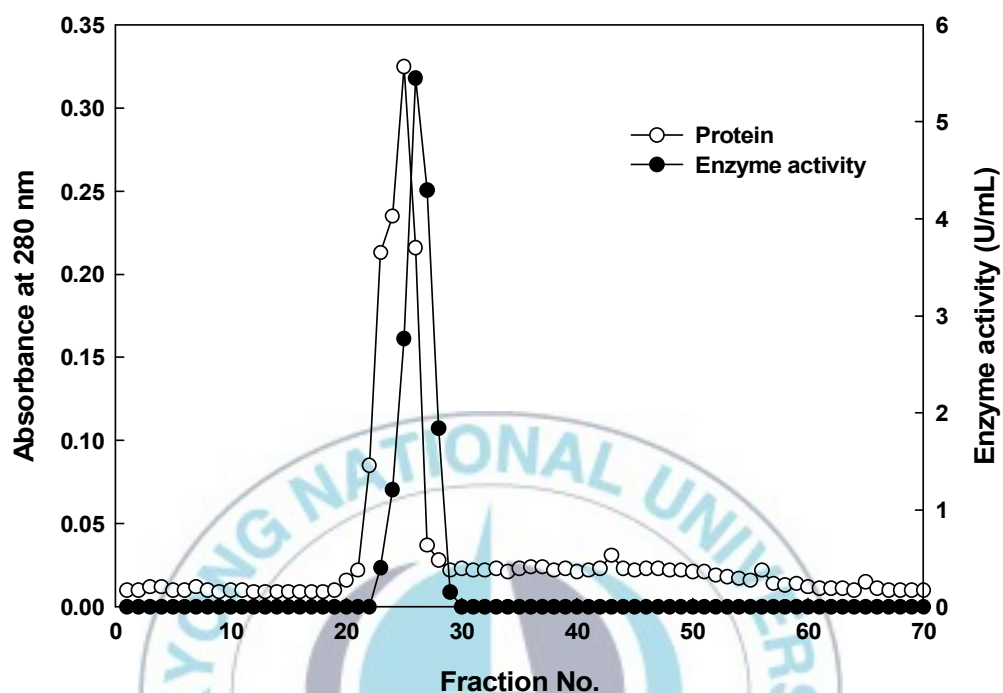


Fig. 14. Sephadex G-100 chromatography of purified fraction by DEAE sephadex chromatography for purifying the extracellular enzyme. The enzyme was eluted with 0.03 M Tris-HCl buffer, pH 7.0.

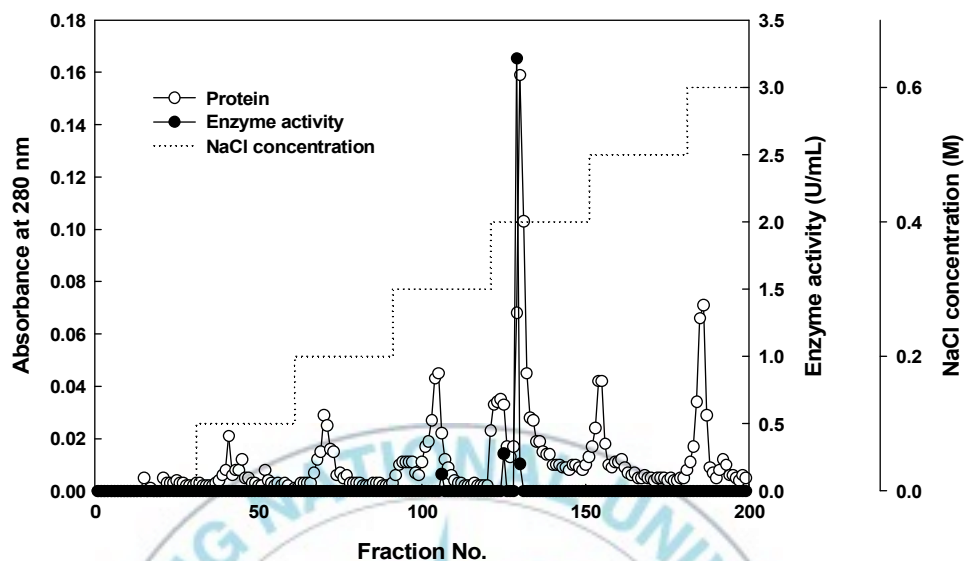


Fig. 15. DEAE sephadex chromatography of purified fraction by sephadex G-100 chromatography for purifying the extracellular enzyme. The enzyme was eluted with a gradient of 0.0–1.0 M NaCl in 0.03 M Tris-HCl buffer, pH 7.0.

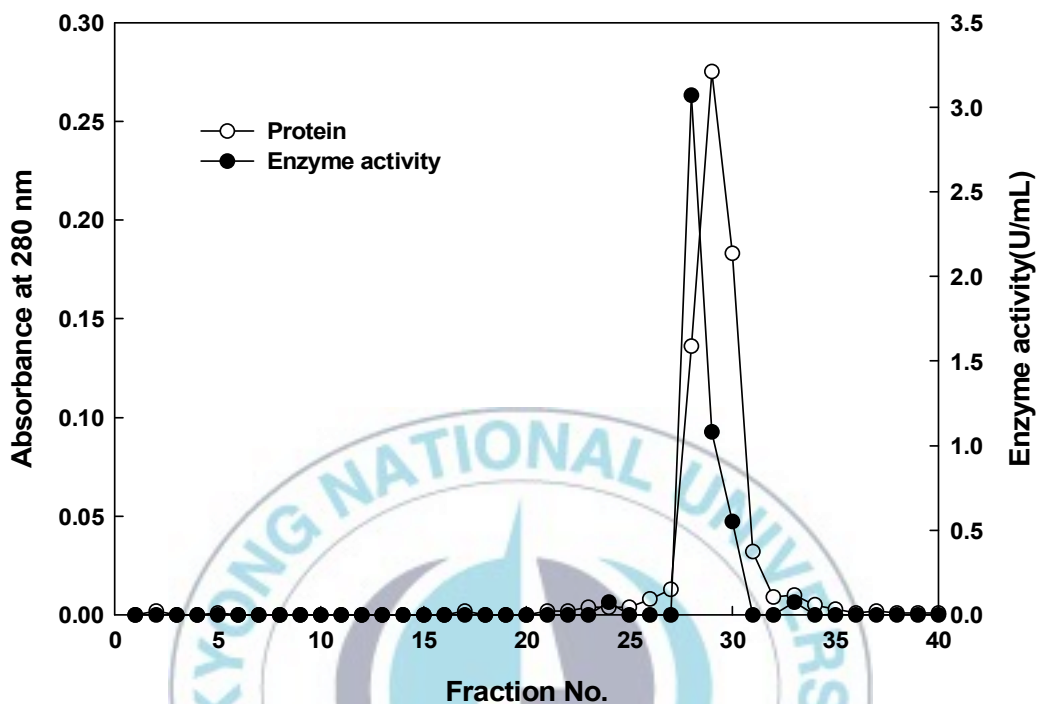


Fig. 16. Sephacryl S-200 HR chromatography of purified fraction by DEAE sephadex chromatography for purifying the extracellular enzyme. The enzyme was eluted with 0.03 M Tris-HCl buffer, pH 7.0.

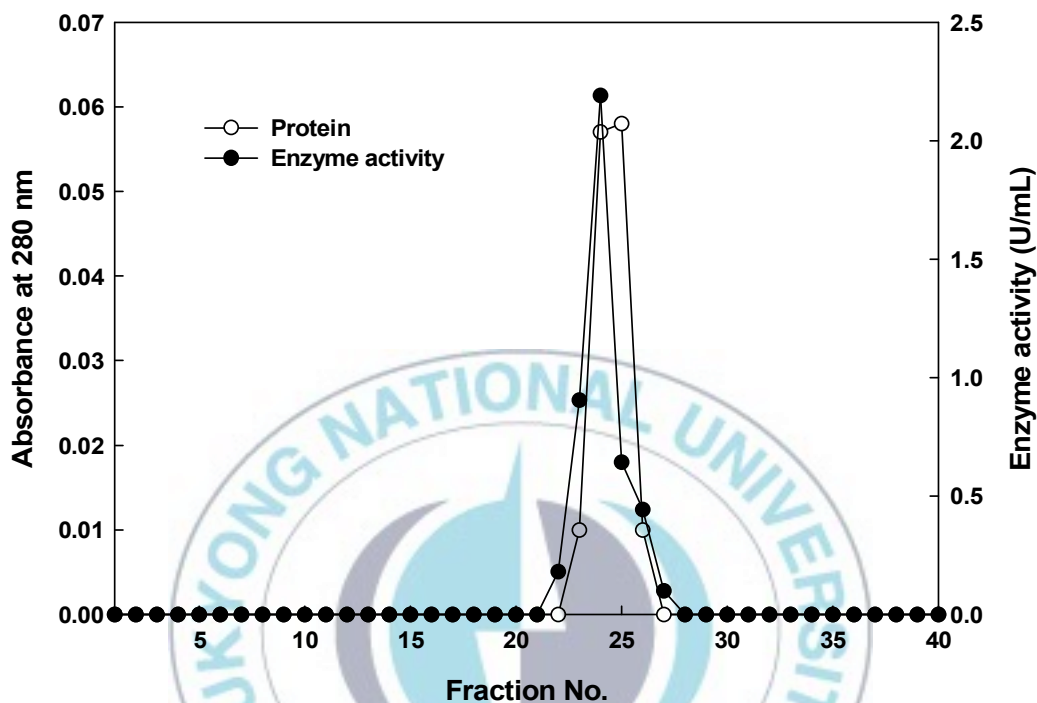


Fig. 17. 2nd Sephadex G-100 chromatography of purified fraction by sephacryl S-200 HR chromatography for purifying the extracellular enzyme. The enzyme was eluted with 0.03 M Tris-HCl buffer, pH 7.0.

Table 6. Summary of the purification of alginate-degrading enzyme from *Vibrio* sp. PKA 1003

Purification step	Total activity (U)	Protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude enzyme	56.41	36900.24	0.0015	1	100
Ammonium sulfate precipitation (40–80%)	39.00	1558.21	0.0250	16.37	69.13
DEAE sephadex	8.56	17.22	0.4969	325.27	15.17
Sephadex G-100	5.44	9.93	0.5477	358.27	9.64
DEAE sephadex	3.21	1.25	2.5700	1681.29	5.70
Sephacryl S200-HR	3.07	0.96	3.2061	2097.40	5.44
Sephadex G-100	2.19	0.18	12.2691	8026.38	3.88

¹⁾One unit of the enzyme activity is defined as that amount required to yield 1 μ mol of reducing sugar per min under defined conditions of assay.

7. 정제 효소 특성

pH 변화에 대한 정제 효소의 활성 변화를 측정한 결과 (Fig. 18), pH 7.0-9.0 사이의 영역에서 효소의 활성이 활발한 것을 확인할 수 있었으며, 그 중에서도 pH 7.0에서 최대활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 또한 pH 10 및 11의 강알칼리 영역에서는 효소의 활성이 급격히 저하되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Table 7에 정리된 다양한 미생물 유래의 알긴산 분해 효소들의 최적 pH가 7.0-8.5 사이인 것과 비교하였을때, 유사한 결과인 것을 확인할 수 있었다. 온도 영향을 확인한 결과 (Fig. 19), 20℃ 이하의 영역에서는 효소의 활성이 급격히 저하되는 것으로 나타났으며, 25℃에서 효소의 알긴산 분해 활성이 가장 뛰어난 것을 확인할 수 있었다. 25℃ 이상의 온도에서는 알긴산 분해 효소의 활성이 서서히 감소되는 것으로 나타났으나, 30℃까지는 90% 이상의 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 Table 8에 표시된 알긴산 분해 효소들의 최대 활성 영역이 30-55℃ 사이인 것과 비교시 다소 낮은 온도인 것으로 나타났으나, 해양으로부터 분리한 미생물인 *Alteromonas* sp. 272 (Iwamoto et al., 2001), *Pseudomonad* sp. (Davidson et al., 1976) 및 *Streptomyces* sp. ALG-5 (Kim et al., 2009) 가 생산해내는 알긴산 분해 효소의 경우, 모두 비교적 낮은 온도인 30℃에서 최적 활성을 나타낸다고 보고된 것으로 보아 해양 유래 미생물의 경우, 온도가 낮은 해양이라는 환경에서 살아가기 때문에 그로부터 분리한 효소 또한 비교적 낮은 온도에서 활성을 띠는 것으로 사료된다.

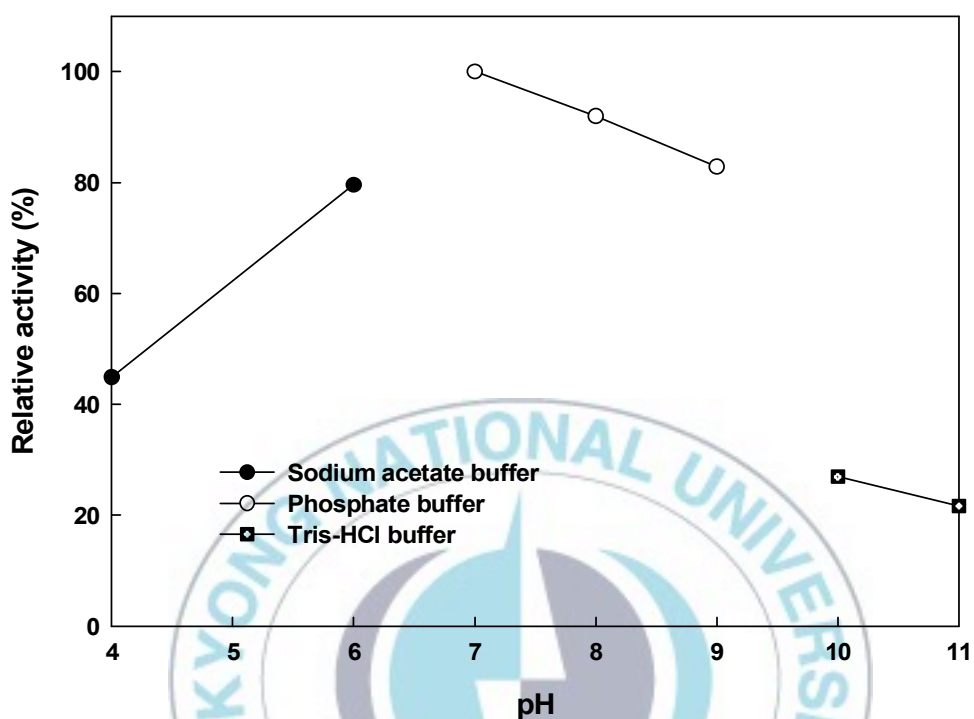


Fig. 18. Effects of pH on activity of alginate-degrading enzyme produced by *Vibrio* sp. PKA 1003.

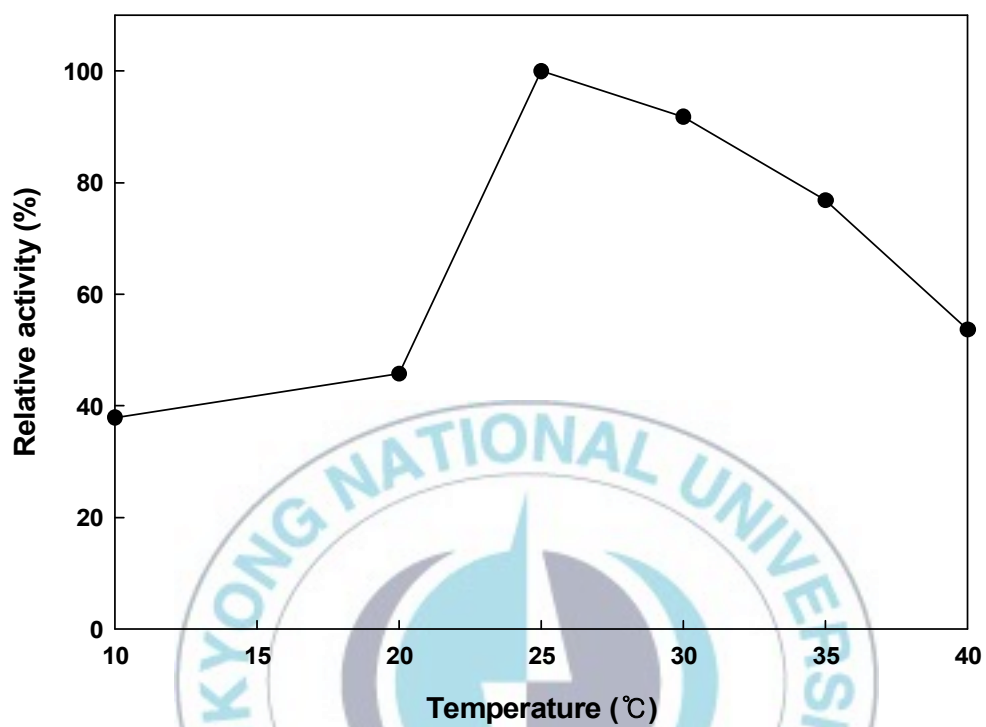


Fig. 19. Effects of temperature on activity of alginate-degrading enzyme produced by *Vibrio* sp. PKA 1003.

Table 7. Comparison of specific activity, optimal temperature and pH of alginate lyases from different microorganisms

Microorganism	Optimal conditions		Specific activity (U/mg)	Reference
	pH	Temp (°C)		
<i>Vibrio</i> sp. PKA 1003	7.0	25	12.27	–
A marine bacterium	7.8	–	45.00	Romeo and Preston, 1986
<i>Alteromonas</i> sp. 272	7.5–8.0	30	16.84	Iwamoto et al., 2001
<i>Azotobacter vinelandii</i>	8.1–8.4	30	–	Ertesvåg H et al., 1994
<i>Corynebacterium</i> sp.	7.0	55	0.86	Matsubara et al., 1998
<i>Enterobacter</i> sp.	7.5	35	40.22	Shimokawa et al., 1997
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	7.0–8.0	35–45	0.40	Alekseeva et al., 2004
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. SM0524	8.5	50	–	Joo et al., 1993
<i>Pseudomonad</i> sp.	7.5	30	68.44	Davidson et al., 1976
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6.2	30	–	Linker and Evans, 1984
<i>Pseudomonas</i> sp.	7.5	–	3.34	Miyazaki et al., 2001
<i>Streptomyces</i> sp. ALG-5	7.0	30	–	Kim et al., 2009
<i>Vibrio</i> sp.	8.2	–	1.81	Kitamikado et al., 1992
<i>Vibrio</i> sp. 510-64	7.5	35	25	Hu et al., 2006
<i>Vibrio</i> sp. YKW-34	7.0	40	55.93	Fu et al., 2007

정제된 효소의 활성화에 미치는 NaCl의 영향을 측정한 결과 (Fig. 20), 0.2 M NaCl까지 활성이 80% 이상으로 유지되었으며, 0.02 M NaCl에서 최대 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 그 이상의 농도에서는 활성이 서서히 줄어들었다. Baxter (Baxter, 1959)가 호염 효소의 경우, 1가 양이온이 효소의 활성화에 영향을 미친다고 하였으며, 이는 1가 양이온이 효소 분자 내의 정전기적 반발력을 감소시키는 역할을 하기 때문인 것으로 보고한 바 있다. 따라서 본 연구의 정제 효소도 해양 미생물로부터 분리한 효소이기 때문에 균체의 성장 및 효소의 활성화에 일정 농도의 NaCl이 요구되는 것으로 사료된다.

정제된 효소에 대한 금속 이온의 영향을 확인한 결과 (Fig. 21), Hg^{2+} 의 경우, Control구와 비교시 효소의 활성화에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 반면, Fe^{3+} 및 Ca^{2+} 의 경우, 각각 43% 및 53%의 효소 활성을 저해하였으며, Co^{2+} , Mg^{2+} 및 K^{+} 는 20% 이하의 효소 활성 저해율을 보이는 것으로 나타났다. Joo 등 (Joo et al., 1993)이 일반적으로 thiol-효소와 serine-효소는 대개의 2가 금속이온에 의해 활성을 잃게 되는데 이는 효소활성 부위에 있는 SH기와 OH기에 이들 금속이온이 높은 친화성을 가져 기질과의 반응을 억제하기 때문인 것으로 판단된다고 보고한바 있다. 따라서 본 효소의 경우, thiol- 또는 serine-계 효소일 가능성이 있는 것으로 사료된다.

알긴산의 농도에 따른 반응 속도를 Lineweaver-Burk plot로 측정한 결과 (Fig. 22), 반응 속도식은 $y = 0.3266x + 0.2779$ 이었고, 이때의 반응 속도 정수 (K_m)는 1.175 mg/mL 이었으며, 최대 반응 속도 (V_{max})는 3.598 U/mL 이었다.

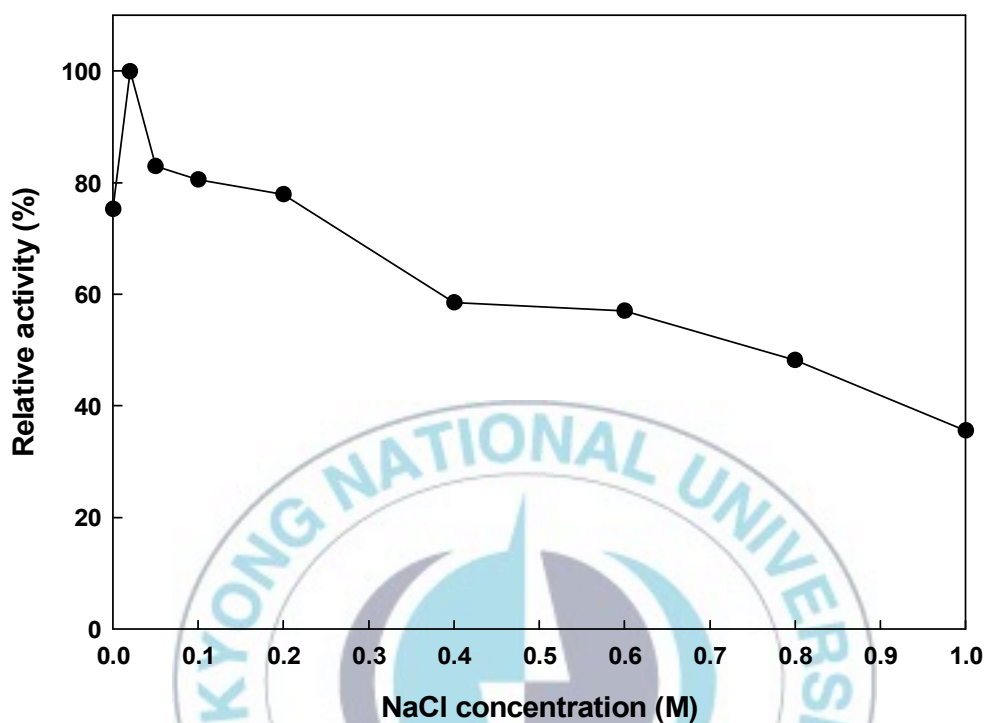


Fig. 20. Effects of NaCl concentration on activity of alginate-degrading enzyme produced by *Vibrio* sp. PKA 1003.

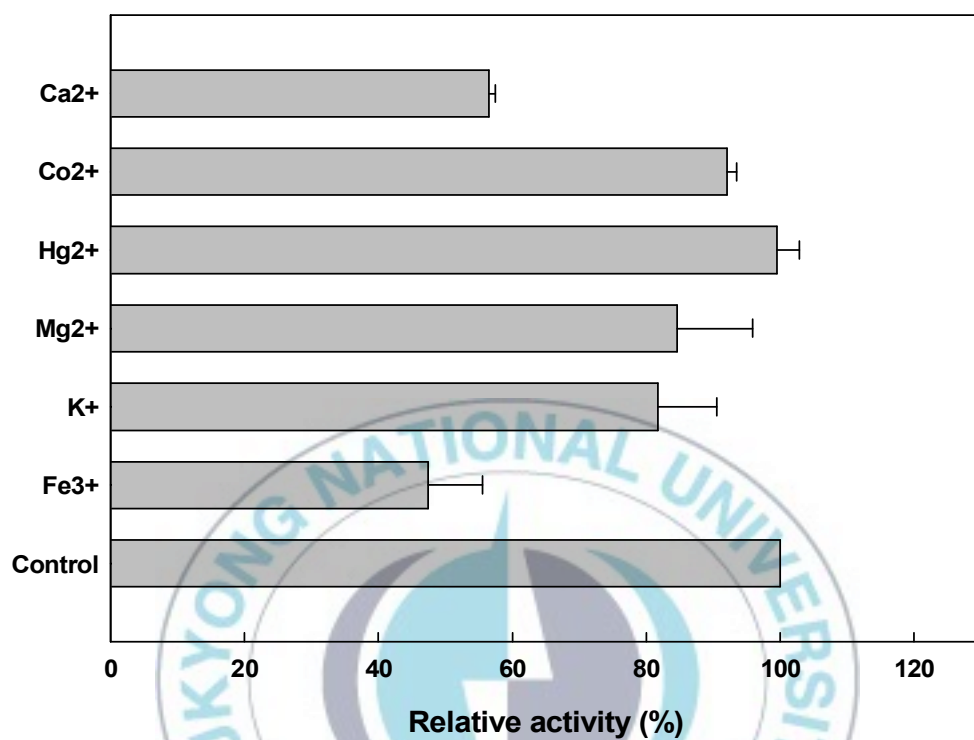


Fig. 21. Effects of metal ions on activity of alginate-degrading enzyme produced by *Vibrio* sp. PKA 1003.

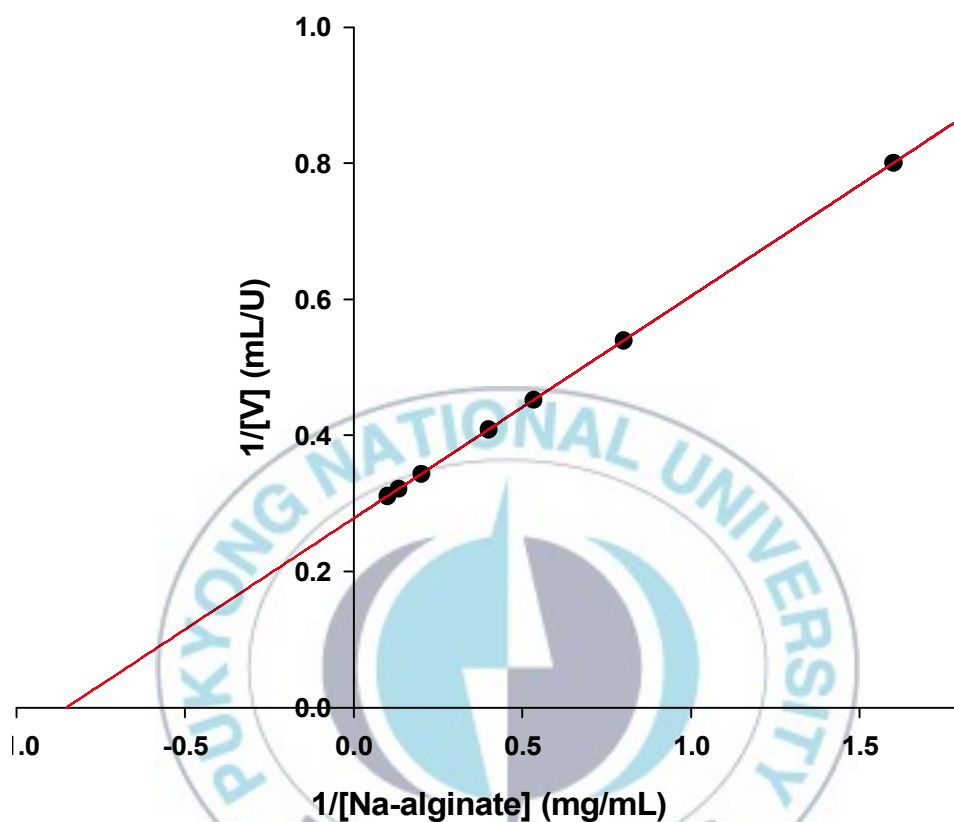


Fig. 22. Lineweaver-Burk plots for the degradation of alginate by the alginate lyase produced by *Vibrio* sp. PKA 1003 enzyme activity was determined at different alginate concentration of 0.0625–10 mg/mL according to SOMOGYI-NELSON method described in the text.

요 약

1. 알긴산 분해능이 우수한 단일 colony의 16S rRNA sequence 분석 후, NCBI blast search를 통해 동정한 결과, *Vibrio* sp. V140으로 동정되었고 *Vibrio* sp. PKA 1003으로 명명하였다.

2. *Vibrio* sp. PKA 1003 균주의 최적 생육 조건은 pH 7, 3% NaCl, 25℃ 및 배양시간 48시간 이었다.

3. *Vibrio* sp. PKA 1003 균주가 생성하는 조효소 특성을 확인한 결과, pH 9, 30℃, 6% 알긴산 및 배양시간 63시간에서 최적의 알긴산 분해 효율을 나타내는 것으로 나타났으며, 환원당 생성량이 1.035 mg/mL로 추후 산업적으로 이용할 가능성이 충분하다고 사료된다.

4. 배양시간에 따라 TLC를 실시한 결과, 조효소액에 의해 알긴산이 여러 가지 단당 또는 올리고당으로 저분자화되는 것을 확인하였다. 또한 조효소액에 trypsin을 처리하여 실험한 결과, trypsin 처리구 및 조효소액 처리구의 환원당 생성량이 각각 70.91 및 538.62 µg/mL로써 알긴산 분해 활성이 효소에 의한 것으로 나타났다.

5. *Vibrio* sp. PKA 1003이 생성한 조효소를 ammonium sulfate 염석, 투석 및 chromatography(DEAE-sephadex, sephacryl S-200 HR 및 sephadex G-100)를 순차적으로 진행하여 정제하였다(Specific activity

: 12.27 U/ml).

6. 정제된 효소의 특성을 확인한 결과, pH 7, 25°C, 0.02 M NaCl 에서 최대 활성을 나타내었다. 0.02 M NaCl 처리구와 비교시 Hg^{2+} 는 효소 활성에 큰 영향을 주지 않았으나, Ca^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Mg^{2+} 및 K^{+} 는 효소의 활성을 저해시키는 것으로 나타났다.

7. 기질농도에 따른 반응속도를 Lineweaver-Burk plot 으로 측정한 결과, 반응속도정수(K_m)는 1.175 mg/mL 이었으며, 최대반응속도(V_{max})는 3.598 U/mL 이었다.

8. 이상의 결과들을 종합해 볼 때, *Vibrio* sp. PKA 1003 균주가 생성하는 알긴산 분해 효소가 최적 조건에서 알긴산을 효율적으로 저분자화하여 알긴산 올리고당 제조에 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

참고 문헌

Alcamo E. 2004. Microbes and society. an introduction to microbiology. Seoul. worldscience. 152.

Alekseeva SA, Bakunina IY, Nedashkovskaya OI, Isakov VV, Mikhailov VV and Zvyagintseva TN. 2004. Intracellular alginolytic enzymes of the marine bacterium *Pseudoalteromonas citrea* KMM 3297. *Biochem (MOSC)* 69: 262-269.

Baumann P, Baumann L, Mandel M. 1971. Taxonomy of marine bacteria: the genus *Beneckea*. *Journal of Bacteriology* 107, 268-294.

Baxter RM. 1959. An interpretation of the effects of salts on the lactic dehydrogenase of *Halobacterium salinarium*. *Can J Microbiol* 5, 47-57.

Choi JH, Kim DW. 1997. Effect of alginic acid-added functional drink(HAEJOMIIN) in Brown algae(*Undaria pinnatifida*) on obesity and biological activity of SD rats. *J life Sci* 7: 361-370.

Davidson IW, Sutherland IW, Lawson CJ. 1976. Purification and properties of an alginate lyase from a marine bacterium. *Biochem J*

159: 707–713.

Eller J, Payne WJ. 1960. Studies on bacterial utilization of uronic acids IV. *J Bacteriol* 80: 193–199.

Elyakova LA, Favorov VV. 1974. Isolation and certain properties of alginate lyase VI from the mollusk *Littorina* sp.. *Biochim Biophys Acta* 358: 341–354.

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

Ertesvåg H, Erlien F, Skjåk-Bræk G, Rehm BHA, Valla S. 1998. Biochemical properties and substrate specificities of a recombinantly produced *Azotobacter vinelandii* alginate lyase. *J Bacteriol* 180: 3779–84.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2010. Yearbook of Fishery Statistics Summary Tables. ftp://ftp.fao.org/fi/stat/summary/summ_10/a-5.pdf.

Fu XT, Lin H and Kim SM. 2007. Purification and characterization of a Na⁺/K⁺ dependent alginate lyase from turban shell gut *Vibrio*

sp. YKW-34. *Enzyme and Microbial Technology* 41: 828-834.

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

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

Hattori M, Aiba Y, Nagasawa K, Takahashi K. 1996. Functional improvement of alginic acid by conjugating with β -lactoglobulin. *J Food Sci* 61: 1171-76.

Haug A. 1959. Ion exchange properties of alginate fractions. *Acta Chem Scand* 13: 1250-51.

Haug A, Larsen 1963. The solubility of alginate at low pH. *Acta Chem Scand* 17: 1953-62.

Haug A, Smidsrod O. 1962. Determination of intrinsic viscosity of alginates. *Acta Chem Scand* 16: 1569-78.

Hu X, Jiang X and Hwang HM. 2006. Purification and characterization of an alginate lyase from marine bacterium *Vibrio* sp. mutant strain 510-64. *Curr Microbiol* 53: 135-140.

Kim CH. 2004. Food microbiology. Seoul, Yuhansa, pp 76.

Korenaga T, Fujii SI. 2000. Separation and enzymatic saccharification of cellulose from Wakame (*Undaria pinnatifida*). *J Food Compost Anal* 13: 865-871.

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.

Jin LH and Lee JH. 2010. Development of nanoenzymes for the production of glucose from seaweed and various polysaccharide. *KSBB Journal* 25:453-458.

Jin YR, Yu SN, Kim KY, Kim SH, Park SK, Kim HK, Lee YS, Choi YL, Ji JH and Ahn SC. 2013. Production and characterization of alkaline protease of *Micrococcus* sp. PS-1 isolated from

seawater. *Journal of Life Science* 23: 273-281.

조무제. 1988. 내염성 미생물의 생태학과 산업적 이용가능성. *미생물과 산업* 14: 31-32.

Joo DS, Cho SY, Lee EH. 1993. Isolation of alginate-degrading bacteria and production of alginate-degrading activities by the bacteria. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 21: 207-213.

Joo DS, Lee EH. 1993. Purification of extracellular enzyme produced by *Vibrio* sp. AL-145. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 22: 234-239.

Joo DS, Lee JS, Cho SY, Shin SJ, Lee EH. 1995. Changes in functional properties of alginic acid by enzymatic degradation. *Korean J Food Sci Technol* 27: 86-91.

Joo DS, Lee JS, Park JJ, Cho SY, Ahn CB, Lee EH. 1995. Purification and characterization of the intracellular alginase from *Vibrio* sp. AL-145. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 23: 432-438.

Joo DS, Lee JS, Park JJ, Cho SY, Kim HK, Lee EH. 1996. Preparation of oligosaccharides from alginic acid by enzymic hydrolysis. *Korean J Food Sci Technol* 28: 146-151.

Jung DY, Son CW, Kim SK, Kim YJ, Chung CH, Lee JW. 2009. Biosorption of metal ions by seaweed alginate, polyguluronate and polymannuronate. *J life Sci* 19: 553-560.

Jung JY, Hur SS, Choi YH. 1999. Studies on the efficient extraction process of alginic acid in sea tangle. *Food Engineering Progress* 3: 90-97.

Kaneko Y, Yonemoto Y, Okayama K, Kimura A. and Murata K.. 1990. Symbiotic formation of alginate lyase in mixed culture of bacteria isolated from soil. *J Ferm Bioeng* 69: 192-194.

Kim DE, Lee EY, Kim HS. 2009. Cloning and characterization of alginate lyase from a marine bacterium *Streptomyces* sp. ALG-5. *Mar Biotechnol* 11: 10-16.

Kim HS, Bae TJ. 2002. Studies on the hydrolysis of seaweed using microorganisms and its application. *J Korean Fish Soc* 35: 438-444.

Kim JD, Yoon YH, Shin TS, Kim MY, Byun HS, Oh SJ and Seo HJ. 2011. Bioethanol production from seaweed *Ulva pertusa* for environmental application. *Korean Society for Biotechnology and*

Bioengineering Journal 26: 317-322.

Kim OJ. 2011. Isolation and characterization of alginate degrading bacteria separated from brown seaweed. *MS thesis*. Silla University, Busan, Korea.

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

Kitamikado M, Tseng CH, Yamaguchi K and Nakamura T. 1992. Two types of bacterial alginate lyases. *Appl Environ Microbiol* 58: 2474-2478.

Kobayashi H. 1997. Some properties and action mode of (1→4)-α-L-guluronan lyase from *Enterobacter cloacae* M-1. *Carbohydr Res* 304: 125-132.

Kohn R, Larsen B. 1972. Preparation of water-soluble polyuronic acids and their calcium salts, and the determination of calcium ion activity in relation to the degree of polymerization. *Acta Chem Scand* 26: 2455-68.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the bacteriophage T. *Nature* 227: 680-686.

Lange, III LG, Spilburg CA. 1989. Use of sulfated polysaccharides to decrease cholesterol and fatty acid absorption. USA. 5,063,210. N7151-6. *Kor J Microbiol Biotechnol* 37: 350-354.

Lee BH, Lee SB, Kim WK. 2009. Alginate fiber. *Fiber Tech Ind* 13: 21-24.

Lee DS, Kim HR, Cho DM, Nam TJ, Pyeun JH. 1998. Uronate compositions of alginates from the edible brown algae. *J Korean Fish Soc* 31: 1-7.

Lee DS, Kim HR, Pyeun JH. 1998. Effect of low-molecularization on rheological properties of alginate. *J Korean Fish Soc* 31: 82-89.

Lee JH, Bae MJ, Kim YC, Nam SW. 2009. Identification and characterization of alginate lyase producing *Pseudomonas* sp. N7151-6. *Kor J Microbiol Biotechnol* 37: 350-354.

Lee JH, Lee EY. 2003. Isolation of alginate-degrading marine

bacteria and characterization of alginase. *J Life Sci* 13: 718-722.

Lee GB, Yang JB, Go MS. 쉬운식품분석. Seoul, yuhansa, pp 310.

Lineweaver H, Burk D. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the american chemical society*. 56, 658-666.

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

Li JW, Dong S, Song J, Li CB, Chen XL, Xie BB, Zhang YZ. 2011. Purification and characterization of a bifunctional alginate lyase from *Pseudoalteromonas* sp. SM0524. *Mar Drugs* 9: 109-123.

Matsubara Y, Kawada R, Iwasaki K, Oda T and Muramatsu T. 1998. Extracellular poly(alpha-L-guluronate)lyase from *Corynebacterium* sp.: purification, characteristics, and conformational properties. *J Protein Chem* 17: 29-36.

Michaud P, Costa AD, Courtois B, Courtois J. 2003. Polysaccharide lyases : recent developments as biotechnological tools. *Crit Rev*

Biotechnol 23: 233-266.

Miyazaki M, Obata J, Iwamoto Y, Oda T and Muramatsu T. 2001. Calcium sensitive extracellular poly(α -L-guluronate)lyase from a marine bacterium *Pseudomonas* sp. strain F6: purification and some properties. *Fisheries Sci* 67: 956-964.

Muramatsu T., S. Hirose, M. Kayose. 1977. Isolation and properties of alginate lyase from the mid-gut gland of wreath shell *Turbo cornutus*. *Agric Biol Chem* 41: 1939-46.

Nakada HI, Sweeny PC. 1967. Alginic acid degradation by eliminases from abalone hepatopancreas. *J Biol Chem* 242: 845-851.

Nakagawa A, Ozaki T, Chubachi K, Hosoyama T, Okubo T, Iyobe S, Suzuki T. 1998. An effective method for isolating alginate lyase-producing *Bacillus* sp. ATB-1015 strain and purification and characterization of the lyase. *J Appl Microbiol* 84: 328-335.

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

Nisizawa KS, Fujibayashi S, Kashiwabara Y. 1968. Alginate lyases

in the hepatopancreas of a marine mollusc, *Dolabella auricula* Solander. *J Biochem* 64: 25-37.

No MJ, Jang PS, Lee SC. 2003. Food enzyme technology. Seoul, Shinkwangpub, pp 82-83.

Park DH and Jeong GT. 2013. Production of reducing sugar from macroalgae *Saccharina japonica* using ionic liquid catalyst. *Korean Chem Eng Res* 51:106-110.

Reed MC, Lieb A, Nijhout HF. 2010. The biological significance of substrate inhibition: A mechanism with diverse functions. *Bioessays* 32, 422-429.

Richard AS, Levein RE. 1976. Viscometric assay of bacterial alginase. *Appl Environ Microbiol* 31: 896-899.

Robert KS. 1996. Protein purification: principle and practice(3rd ed). Springer Verlag. New York. pp 44-49.

Romeo T, Preston JF. 1986. Purification and structural properties of an extracellular (1-4)- β -D-mannuronan-specific alginate lyase from a marine bacterium. *Biochem* 25: 8385-91.

Simpson BK, Haard NF. 1984. Trypsin from Greenland cod, *Gadus ogac*. Isolation and comparative properties. *Comp Biochem Physiol* 79B: 613-622.

Shimokawa T, Yoshida S, Kusakabe I, Takeuchi T, Murata K, Kobayashi H. 1997. Some properties and action mode of (1→4)- α -L-guluronan lyase from *Enterobacter cloacae* M-1. *Carbohydr Res* 304: 125-132.

Shin JW. 2012. Cloning and characterization of oligomeric alginate lyase from *Stenotrophomonas* sp. KJ-2. *Master Thesis*. Kyung Hee University. Yongin-si, Gyeonggi-do, Korea

Smidsrod O. 1970. Solution properties of alginate. *Carbohydr Res* 13: 359-372.

Smidsrod O, Haug A. 1965. The effect of divalent metals on the properties of alginate solutions. I. Calcium ions. *Acta Chem Scand* 19: 329-340.

Takeshita S, Sato N, Igarashi M, Muramatsu T. 1993. A highly denaturant-durable alginate lyase from a marine bacterium:

Purification and properties. *Biosci Biotech Biochem* 57: 1125–28.

Takeuchi T, Murata K, Kusakabe I. 1994. A method for depolymerization of alginate using the enzyme system of *Flavobacterium multivolum*. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkai-shi* 41: 505–511.

Uo MH, Joo DS, Cho SY. 2006. Screening and cultivation characteristics of alginate degrading bacteria. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 109–114.

Uo MH, Joo DS, Cho SY, Min TS. 2006. Purification and characterization of the extracellular alginase produced by *Bacillus licheniformis* AL-577. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 231–237.

Wasikiewicz JM, Yoshii F, Nagasawa N, Wach RA, Mitomo H. 2005. Degradation of chitosan and sodium alginate by gamma radiation, sonochemical and ultraviolet methods. *Rad Phys Chem* 73: 287–295.

Wong TY, Preston LA, Schiller NL. 2000. Alginate lyase: Review of major sources and enzyme characteristics, structure–function analysis, biological roles, and application. *Annu Rev Microbiol* 54:

289-340.

Yonemoto Y, Mutata K, Kimura A, Yamaguchi H, Okayama K.
1991. Bacterial alginate lyase; characterization of alginate
lyase-producing bacteria and purification of the enzyme. *J Ferm
Bioeng* 72: 152-157.



감 사 의 글

어느덧 2년 동안의 석사기간이 지나고 논문을 완성할 수 있게 되었습니다. 마무리 단계에 서서 지난 시간을 되돌아보니 여전히 부족했던 저 자신에 대해 많은 아쉬움이 남습니다. 대학원 생활은 저에게 결코 쉽지만은 않았고, 짧지 않은 시간이었습니다. 매순간순간이 저에게 커다란 시험과 도전의 시간이었고, 또 그런만큼 그 시간들을 겪어냄으로써 학문적인 부분 뿐만 아니라 내면적으로도 많이 성장할 수 있었던 시간이었습니다. 그 긴 시간동안 포기하지 않고 끝까지 달릴 수 있었던 건 제 주변의 많은 분들의 응원 덕분이었습니다. 이 글을 통해서 무사히 졸업할 수 있도록 도와주신 모든 분들께 감사의 인사를 전하고자 합니다.

먼저 학부생 때부터 존경해왔고, 자신감이 부족했던 저에게 끊임없이 스스로 꿈을 향해 도전할 수 있는 용기를 낼 수 있도록 도와주셨고, 석사과정 동안 연구자의 자세와 마음가짐 뿐만 아니라 내면적으로 강하고 바른 사람이 될 수 있도록 저에게 늘 아낌없는 조언을 해주신 지도교수님이신 안동현 교수님 정말 감사합니다. 그리고 부족한 저의 논문을 심사해 주신 조영제 교수님, 전병수 교수님을 비롯하여 학부 때부터 다양한 전공 지식을 쌓을 수 있도록 도와주신 김선봉 교수님, 양지영 교수님, 이양봉 교수님, 김영목 교수님께도 감사의 인사를 드리고 싶습니다.

2년의 실험실 생활동안 많은 시간을 함께했던 실험실원들에게도 감사합니다. 먼저 실험실의 말언니로써, 항상 저희들이 내면적으로 강한 사람으로 성장할 수 있도록 이끌어 주셨던 꽃봉언니, 처음 실험실에 들어왔을 때 여러 가지 실험을 가르쳐 주셨던 정지언니, 그리고 항상 친언니처럼 진심어린 조언을 아끼지 않고, 아플 때는 그 상처가 굼지 않도록 따뜻하게 위로해주셨던 지희언니와 민지언니 감사드립니다. 그리고 선배로써 후배인 저희들을 잘 이

끌어주고, 진심을 다해 고민상담도 해주고 또 후배들을 어떻게 이끌어야 할지에 대한 방향을 잡아줬던 진정한 리더, 금동선배와 실험적인 측면에서 많은 가르침을 줬고, 항상 너그럽게 저의 실수를 넘겨주었던, 진정한 선배의 면모를 보여주었던 저에겐 영원한 사수인 찬이선배도 너무너무 감사드립니다. 그리고 힘들 때나 즐거울 때나 함께 했던 슬아. 온전히 내 힘으로 일어서지 못할 때 항상 옆에서 쓰러지지 않도록 지탱해주고, 잡아주고, 많은 이야기 해줘서 너무너무 고맙다는 말 전하고 싶습니다. 그리고 항상 똑부러진 모습이 좋았던, 하지만 사실은 여리디 여린 여자인 다현이, 그리고 무뚝뚝하면서도 배려심 깊은 보경이, 듬직한 시우, 입실동기이자 항상 언니에게 힘을 줬던 귀요미 원민이, 때때로 선배로써의 보람을 느끼게 해주었던 보람이 언니, 이제 막 대학원생이 된 자은이, 홍민이, 항상 선배들에게 살갑게 웃으면서도 실험실이 잘 돌아가도록 너무나도 애써주는 학부생들 나경이, 초혜, 연옥이, 지훈이, 우리 막둥이들 지혜, 난영이에게도 너무너무 고맙다는 말 전하고 싶습니다.

그리고 처음 대학원을 들어올 때부터 항상 선배로써 인생 상담을 해주셨던 나에겐 영원한 인생의 스승이 될 홍희장님(정욱선배)!!, 함께 대학원 생활을 한다는 것만으로도 힘이 되었던 홍희선배, 준호선배 감사드립니다. 또 솔로부대로써 나의 진정한 매력을 많이 알아준 국진선배 그리고 내 동기 지혜, 사소한 수다떨 수 있게 시간내준 영이, 강수(수진이), 내가 맥주한잔 하고플 때마다 언제든 마다않고 달려와 주었던 한효(효림이), 항상 나에게 무한한 신뢰를 보여주었던 이지(지은이), 나의 10년지기 친구이자 말하지 않아도 편한 돌프(경연이), 항상 연애상담하곤 하던 스님(이주현), 먼저 사회로 뛰어들어 직장인 이야기를 많이 해주고, 징징거리던 나를 받아주었던 탄끼(민영이), 포켓 걸(현지), 나를 꽤 괜찮은 사람으로 만들어 주었던, 한마디 말로 힘이 되어주었던 주연이, 희예, 미라, 동기사랑은 나라사랑이라고 학부생때부터 외쳐왔는

데, 정말정말 힘든 시기에 귀여운 사진으로 그 말이 헛된 것이 아니었음을 느끼게 해준 동문 동기인 명성이, 그리고 언니같은 경희, 따뜻한 아이 효석이, 곧 애엄마가 될 동은이, 알고보면 따뜻한 남자인 상업이와 태진이에게도 고맙다는 말 전하고 싶습니다. 그리고 대학원 막바지에 제일 큰 힘이 되어주었던 병준이 오빠!!, 나이스바디 성훈이, 룡초(민서), 쫄미(미라), 햇님이(혜림이)에게도 감사의 말 전하고 싶습니다.

마지막으로 항상 묵묵히 그리고 꾸준히 26년 동안 딸의 뒷바라지 해주신 제 인생의 영원한 버팀목, 아빠, 엄마께 깊은 감사의 인사드리고 싶습니다. 그리고 역시 제 뒷바라지에 한몫한 친구같이 편한 우리 언니 만민이, 그리고 무뚝뚝한 동생 지한이도 군대 씩씩하게 잘 다녀와줘서 고맙다는 말 전하고 싶습니다.

기나긴 여정을 끝으로 이제는 새로운 도약을 위해 준비해야할 시기입니다. 아직도 많이 서툴고 부족하지만 2년 동안의 소중한 경험을 바탕으로 어떠한 시기에도 움츠러들거나 두려워하지 않고 모든 일에 최선을 다해 성실히 임할 것입니다. 다시 한번 무사히 논문이 완성되도록 도움을 주신 많은 분들께 감사의 마음을 전하며, 앞으로도 열심히, 끊임없이 꿈을 향해 달려가는 모습으로 보답하도록 하겠습니다.