



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



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

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)

工學碩士學位論文

Shewanella oneidensis PKA 1008

유래 조효소에 의한

알긴산 분해패턴과

미야베모자반 (*Sargassum miyabei*)

추출 분해물의 항염증 특성

2025年 2月

國立釜慶大學校 大學院

食品工學科

羅 鉉 植

工學碩士學位論文

Shewanella oneidensis PKA 1008

유래 조효소에 의한

알긴산 분해패턴과

미야베모자반 (*Sargassum miyabei*)

추출 분해물의 항염증 특성

指導教授 安東賢

이 論文을 工學碩士學位論文으로 提出함

2025年 2月

國立釜慶大學校 大學院

食品工學科

羅 鉉 植

羅鉉植의 工學碩士 學位論文 認准함

2025年 2月 21日



주심 공학박사 전병수 (인)

위원 공학박사 심길보 (인)

위원 농학박사 안동현 (인)

목 차

Abstract	iii
서 론	1
재료 및 방법	4
1. 재 료	4
1-1. 시험균주	4
1-2. 실험재료 및 시약	4
2. 방 법	5
2-1. 조효소액 제조	5
2-2. 알긴산, PolyM, PolyG 효소 분해물의 제조	5
2-3. 효소 분해물의 특성	5
2-3-1. 환원당	5
2-3-2. 저분자화 및 알긴산 분해패턴 파악	5
2-3-3. 저분자화 특성 분석	5
2-4. 미야베모자반 효소 분해물의 제조	7
2-5. 효소 분해물의 특성	7
2-5-1. pH	7
2-5-2. 색도	8
2-5-3. 환원당 및 점도	8
2-5-4. 저분자화 및 저분자화 특성 분석	8

2-5-5. 항염증 효과	9
2-6. 통계처리	12
결과 및 고찰	14
1. 알긴산, PolyM, PolyG 분해물의 특성	14
1-1. 기질 특이성	14
1-2. 저분자화 및 알긴산 분해패턴 파악.....	19
1-3. 저분자화 특성 분석.....	28
2. 미야베모자반 분해물의 특성 및 항염증 특성.....	35
2-1. 미야베모자반 분해물의 특성.....	35
2-1-1. pH.....	35
2-1-2. 색도	38
2-1-3. 환원당 및 점도	40
2-1-4. 저분자화 및 저분자화 특성 분석	43
2-2. 항염증 특성	53
2-2-1. 항염증 효과	53
요 약	61
참 고 문 헌	65

Alginate Degradation Patterns by Crude Enzyme from
Shewanella oneidensis PKA 1008 and Anti-inflammatory
Properties of *Sargassum miyabei* Extracts

Hyun-Sik Na

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

Abstract

Alginate lyases have gained significant attention as biocatalysts for the preparation of functional oligosaccharides. Alginate lyases have become the focus of numerous studies aimed at the efficient utilization of alginate, with one approach being its degradation into smaller molecules. Crude enzyme was prepared from strain for further research. *Sargassum miyabei* belongs to the brown algae and contains various polysaccharides, including alginate, fucoidan, and mannitol. This study aimed to elucidate the alginate degradation patterns of a crude enzyme extracted from *Shewanella oneidensis* PKA 1008 and examine the characteristics of extracts prepared by incubating this enzyme with *S. miyabei*. To determine substrate specificity, alginate, polyM, and polyG were incubated at 30° C for 0–48 h in a 1:1 (v/v) ratio with the crude enzyme, and changes in reducing sugars and thin-layer chromatography (TLC) of the reactants were measured. The reducing sugar of polyM showed the maximum increment, reaching 171.72 $\mu\text{g/mL}$ at 12 h, while polyG increased slightly. In comparison to alginate, the activity of polyM was observed to be 76 times that of alginate, while the activity of polyG demonstrated a value of 2.9 times that of alginate. After 12 h of incubation, polyM was mainly

degraded to trisaccharides, while polyG degraded to a mixture of di-, tri-, and tetrasaccharides. To confirm the precise degradation patterns, purified alginate oligosaccharides (DP2-6) were reacted with the crude enzyme. In the case of mannuronic acid oligomers, hexamer (DP6) was degraded to a trisaccharide. In the case of guluronic acid oligomers, tetramer (DP4) was degraded to disaccharides, pentamer (DP5) to di- and trisaccharides, and hexamer (DP6) to di-, tri-, and tetrasaccharides. To characterize the brown algae extract, *S. miyabei* and the crude enzyme were mixed and reacted at 30° C for 0-72 h. The reducing sugar of *S. miyabei* increased significantly to 2421.60 $\mu\text{g/mL}$ at 72 h. Significant decreases in pH and viscosity were observed at 72 h compared to initial measurements, and TLC revealed that di-, tri-, and tetrasaccharides were the primary products. These results indicated that the crude enzyme from *Shewanella oneidensis* PKA 1008 exhibits specificity for polyM and partial activity against polyG. The minimum substrates that could act were M6 and G4 also G5 and G6 could be degraded, suggesting that guluronate may have a broader substrate selectivity. It can act on both types of polysaccharides and be effectively degraded polysaccharides contained in *S. miyabei*.

서론

21세기에 들어 국민소득이 증대되어 생활 수준이 향상되면서 고급, 다양, 간편화된 식품을 찾게 되었고, 특히 웰빙(well-being) 문화가 확산되며 건강식품에 대한 소비가 크게 증가되고 있다(Sloan, 2002). 특히 비만, 암, 고혈압, 당뇨 등 성인병 발병률이 증가하면서 식이섬유소 공급원으로써 해조류가 주목받고 있다(Han et al., 2002). 해조류는 식품산업, 화장품산업, 의학산업 등 여러 산업의 원료로 이용되고 있으며(Gacera, 1988), 해조류 성분을 식품 산업에 응용하기 위해 향산화(Kim et al., 2013), 항염증(Lee et al., 2011), 면역 증진(Cho et al., 1990), 항암(Cumashi et al., 2007), 항바이러스(Nakashima et al., 1987) 등 생리활성 연구가 활발히 진행되고 있다. 해조류는 색소 성분의 조성에 따라 갈조류(brown algae), 홍조류(red algae) 및 녹조류(green algae)로 나뉜다. 해조류의 기능성 물질은 세포벽의 골격, 구성, 저장 다당류에서 기인하며, 대표적으로 미역, 다시마, 감태, 툇, 모자반류와 같은 갈조류에는 알긴산 및 후코이단이 풍부하고 김, 우뚝가사리, 꼬시래기와 같은 홍조류에는 한천 및 카라기난이 풍부하다.

미역, 다시마, 감태, 툇, 모자반류와 같은 갈조류의 세포벽을 구성하는 알긴산은 우론산 단량체로 이루어져 있으며, β -D-mannuronic acid가 β -1, 4 글리코시드 결합한 형태인 polymannuronate (polyM), α -L-guluronic acid가 α -1, 4 글리코시드 결합한 형태인 polyguluronate (polyG) 또는 β -D-mannuronic acid와 α -L-guluronic acid가 교대로 배열된 polyMG 형태로 존재한다(Gaserod et al., 1998; Wong et al., 2000). 알긴산의 분자량, M/G 비율, M과 G 잔기의 배열 등에 따라 겔 형성능, 점도 및 수분 흡수능, 유화능 등의 물리화학적 특성이 변하는 것으로 알려져 있다(Gaserod et al., 1998; Horn et al., 1999; Kim et al., 2011). 이처럼 다양한 물리화학적 특성을 가져 유화제, 안정제, 증점제,

보습제 등의 형태로 식품, 화장품, 의약품 분야에 널리 사용되고 있다(Rehm et al., 1997; An and Lee, 2000; Goh et al., 2012). 그러나 알긴산은 상온에서 용해되는데 오래 걸리며, 농도 비례적으로 점도가 높아져 산업적으로 이용에 한계가 있다. 이러한 문제를 해결하고자 다당류를 저분자화하는 연구가 진행되고 있다(Rehm et al., 1997). 또한 알긴산을 저분자화하여 생산한 알긴산 올리고당은 비만 억제(Terakado et al., 2012), 혈당수치감소(Zhang et al., 2008), 세포 증식 촉진 및 식물 성장 조절(Yokose et al., 2009) 등의 기능을 가진다. 현재까지 다당류의 저분자화 방법으로 가열가수분해, 화학적 분해, 방사선 조사, 효소에 의한 분해법 등이 알려져 있다(Song et al., 2007). 효소에 의한 분해법은 높은 비용과 열 안정성, 느린 생산 속도 등의 단점은 있으나 타겟으로 하는 올리고당을 선택적으로 분해 및 생성할 수 있고 부산물 생성을 줄일 수 있는 등의 장점이 있어 알긴산 분해 효소에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(Kim et al., 2012).

알긴산 분해 효소는 β -elimination 메커니즘을 통해 알긴산의 글리코시드 결합을 분해하고 비환원 말단에 이중결합을 형성하면서 불포화 올리고당을 생성한다. 알긴산 분해 효소는 기질 특이성에 따라 polyM-특이적 효소, polyG-특이적 효소, polyMG-특이적 효소로 나뉘며, 작용 부위에 따라 알긴산 중합체 내부를 분해하는 endo-type, 끝부분을 분해하는 exo-type으로 분류될 수 있다(Gacesa, 1988; Wong et al., 2000; Zhu and Yin, 2015). Endo-type 효소는 불포화 올리고당(이당류, 삼당류, 사당류)을 생성하고(Kim et al., 2012), exo-type 효소는 단일 올리고당 또는 불포화 단당류를 생성한다(Park et al., 2012).

이전 연구(Sunwoo et al., 2013)에서는 녹조류 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)로부터 알긴산 분해 활성이 있는 균을 16S rDNA 서열 분석하여 동정한 결과 *Shewanella oneidensis* 계통의 균주임을 확인하고 *Shewanella oneidensis* PKA 1008이라고 명명하고, 알긴산 분해 조효소 생산 최적 조건과 특성에 대해 보고하였다. 알긴산 분해 효소에 의해

제조된 알긴산 올리고당의 항염증 효과(Kim et al., 2015)와 *Shewanella oneidensis* PKA 1008 조효소액을 이용한 경단구슬모자반(*Sargassum muticum*) 및 쌍발이모자반(*Sargassum patens* C. Agardh) 분해물의 특성과 항염증 효과(Lee, 2021), 미역뿌리(*Undaria pinnatifida* Root) 및 참모자반(*Sargassum fulvellum*) 분해물의 특성과 염증 억제능 효과(Xu, 2019), 큰잎모자반(*Sargassum coreanum*) 분해물의 특성 및 면역증진 효과 등 해조류와 접목시킨 연구가 계속되고 있다.

미야베모자반(*Sargassum miyabei*)은 일본 해안에 널리 분포하는 갈조류이며(Umezaki, 1983), 미야베모자반의 지방산 및 지질 구성에 대한 연구(Kulikova and Khotimchenko, 2000) 및 미야베모자반 에탄올 추출물의 항산화 효과(He et al., 2022), 항암 효과(Surits et al., 2020), 항비만 효과(Kim et al., 2020)에 관한 연구가 보고되어 있으나 미야베모자반을 미생물 유래 효소 처리하여 특성을 알아본 연구는 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 *Shewanella oneidensis* PKA 1008 유래 조효소의 기질 특이성과 알긴산 분해패턴을 환원당 함량, TLC, ESI-MS 분석을 통해 규명하고, 미야베모자반에 함유되어 있는 다당류를 알긴산 올리고당으로 저분자화하여 특성을 알아보고 항염증 소재로써 산업적 이용 가치를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1-1. 시험 균주

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

1-2. 실험재료 및 시약

본 실험에서 사용한 Alginic acid sodium salt from brown algae (sodium alginate, M/G ratio 1.56)는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)의 제품을, polymannuronic acid (polyM, M/G ratio 12.56)과 polyguluronic acid (polyG, M/G ratio 0.11), D-mannuronic acid oligosaccharides (DP: 1-6, purity: over 96%) and L-guluronic acid oligosaccharides (DP: 1-6, purity: over 96%)는 Qingdao BZ Oligo Biotech Co., Ltd. (Qingdao, China)에서 구입하여 사용하였다.

미야베모자반 (*Sargassum miyabei*)은 2015년에 부산시 남구 백운포에서 채취하여 담수로 깨끗이 수세하였다. 하루동안 자연건조 후, 동결건조하여 분말화 및 진공포장상태로 -20°C 에서 저장하며 사용하였다.

Marine broth (MB)는 BD Difco (NJ, USA)에서, Sodium azide는 Junsei Chemical Co., Ltd (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 구리시약 A 제조에 사용된 sodium carbonate anhydrous, sodium bicarbonate는 Samchun Chemical Co., Ltd. (Gyeonggi-do, Korea)에서, potassium sodium tartrate tetrahydrate는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서, sodium sulfate는 Junsei Chemical Co., Ltd (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 구리시약 B 제조에 사용된 Copper

sulfate pentahydrate는 Yakuri Pure Chemicals Co., Ltd. (Kyoto, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

2. 방법

2-1. 조효소액 제조

S. oneidensis PKA 1008을 최적 배양 조건인 pH 9, 2% NaCl 농도를 갖춘 MB 배지에서 30℃ 조건으로 24시간 대량 배양하였다. 원심분리기(Supra 30K, Hanil Sciecn Co., Korea)를 이용하여 4℃에서 10,000×g로 30분간 원심 분리하여 균체를 분리하고 상층액을 조효소액으로 하였다.

2-2. 알긴산, PolyM 및 PolyG 효소 분해물의 제조

10 mM phosphate buffer (pH 9)를 이용하여 세 가지 기질(sodium alginate, polyM 및 polyG)을 각각 0.5% 농도로 제조하였다. *S. oneidensis* PKA 1008 조효소액을 최적 활성 pH 9로 맞추기 위해 1 N NaOH를 이용하였다. 0.5% sodium alginate, polyM 및 polyG를 *S. oneidensis* PKA 1008 조효소액과 1:1 비율(v/v)로 각각 혼합하였다. 이때 미생물 오염을 방지하기 위해 sodium azide 0.02%를 첨가하였다. 각 시료를 30℃에서 0, 12, 24 및 48시간 동안 교반하며 반응시켰다.

2-3. 효소 분해물의 특성

2-3-1. 환원당

Somogyi-Nelson 법(Nelson, 1994)을 이용하여 환원당을 정량하였다. 구리시약 A와 구리시약 B를 25:1의 비율(v/v)로 제조하여 구리시약 D로 사용하였다. 15 mL conical tube에 시료 0.15 mL와 구리시약 D 0.15 mL를 넣은 후, 100℃에서 20분간 가열하여 copper(I) oxide를 생성시키고, 산성 조건하에서 몰리브덴산 용액 0.3 mL를 첨가하였다. 그 후, UV 분광

광도계(Genesys 10SUV, Thermo Spectronic Rochester, NY, USA)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였고, glucose 검량 곡선(Fig. 1)을 이용하여 환원당을 정량하였다. 환원당 standard curve는 glucose를 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 측정하여 환원당을 정량하였다.

2-3-2. 저분자화 및 알긴산 분해패턴 파악

0.5% sodium alginate, polyM 및 polyG 기질과 조효소액을 1:1 비율로 혼합하여 30°C에서 0, 12, 24, 48시간 동안 반응시킨 분해물의 효소를 불활성화시키기 위해 100°C 물에 10분간 가열하고 원심분리(10,000×g, 30 min, 4°C) 한 후, 상층액을 동결건조 하였다.

PKA 1008의 분해 기작을 규명하기 위해 다양한 DP의 올리고당을 사용하였다. 10 mM phosphate buffer (pH 9)를 이용하여 D-mannuronic acid oligosaccharides (DP: 2-6), L-guluronic acid oligosaccharides (DP: 2-6) 기질을 각각 0.5% (w/v) 농도로 제조하였다. *S. oneidensis* PKA 1008 조효소액을 최적 활성 pH 9로 맞추기 위해 1 N NaOH를 이용하였다. 0.5% D-mannuronic acid oligosaccharides (DP: 2-6), L-guluronic acid oligosaccharides (DP: 2-6)를 *S. oneidensis* PKA 1008 조효소액과 1:1 비율(v/v)로 각각 혼합하였다. 이때 미생물 오염을 방지하기 위해 sodium azide 0.02%를 첨가하였다. 각 시료를 30°C에서 48시간 동안 교반하며 반응시켰다.

저분자화 및 알긴산 분해패턴 파악을 위해 TLC (Thin Layer Chromatography) 분석을 진행하였다.

TLC는 Silica gel F₂₅₄ plate에 시간별로 용해된 sample 10 μL 씩 spotting 하였고, 전개용매는 1-butanol : formic acid : water (4 : 6 : 1 v/v/v)로 제조하여 사용하였다. 1시간 20분 전개 후 10% 황산에탄올 용액을 분무한 후 110°C, 30분간 가열하여 시각화하였다. Standard mixture는 alginic acid oligosaccharides (DP: 1-6)을 사용하였다.

2-3-3. 저분자화 특성 분석

효소 분해물을 저분자화 특성을 분석하기 위해 ESI-MS (Electrospray Ionization Mass Spectrometry), TGA (Thermogravimetric Analysis), DSC (Differential Scanning Calorimetry)를 진행하였다.

ESI-MS는 액체크로마토그래피 고성능 혼합형 질량분석기(maXis HD, Bruker Daltonics GmbH & Co. KG, HB, GER)를 사용하여 분석하였다. 동결건조한 alginate 분해물 시료 1 mg을 0.1% formic acid에 용해한 후 필터링하여 질량 분석기에 직접 주입하였다. 질량 스펙트럼을 얻기 위해 음이온화 모드로 50-1000 m/z의 스캔 범위로 측정하였다.

TGA와 DSC는 동시측정열분석기(SDT 650, TA Instruments, New Castle, USA)를 사용하여 분석하였다. 동결건조한 alginate 분해물 시료 1 mg을 알루미나 도가니에 균일하게 분포시킨 후 상온에서 800℃까지 10℃/min의 승온 속도로 가열하였다.

2-4. 미야베모자반 효소 분해물의 제조

10 mM phosphate buffer (pH 9)를 이용하여 미야베모자반(*S. miyabei*)을 20 mg/mL 농도로 제조하였다. *S. oneidensis* PKA 1008 조효소액을 최적 활성 pH 9로 맞추기 위해 1 N NaOH를 이용하였다. 20 mg/mL 농도로 제조한 미야베모자반 시료를 *S. oneidensis* PKA 1008 조효소액과 1:1 비율(v/v)로 혼합하였다. 이때 미생물 오염을 방지하기 위해 sodium azide 0.02%를 첨가하였다. 각 시료를 30℃에서 0, 6, 12, 24, 48 및 72시간 동안 교반하며 반응시켰다.

2-5. 효소 분해물의 특성

2-5-1. pH

미야베모자반 효소 분해물의 pH 측정은 pH meter (HM-25R, TOA, Kobe, Japan)를 사용하여 3반복 측정하였다.

2-5-2. 색도

미야베모자반 효소 분해물의 색도 측정은 시료를 액체 시료용 cell에 취한 후, 색차계(JC801, Color Technosystem Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 명도(lightness, L^*), 적색도(redness, a^*), 황색도(yellowness, b^*)를 최소 5회 이상 반복 측정하였다. 이때 사용된 표준색판의 값은 $L^*=98.76$, $a^*=0.22$, $b^*=-0.62$ 이었다.

2-5-3. 환원당 및 점도

Somogyi-Nelson 법(Nelson, 1994)을 이용하여 환원당을 정량하였다. 구리시약 A와 구리시약 B를 25:1의 비율(v/v)로 제조하여 구리시약 D로 사용하였다. 15 mL conical tube에 시료 0.15 mL와 구리시약 D 0.15 mL를 넣은 후, 100°C에서 20분간 가열하여 copper(I) oxide를 생성시키고, 산성 조건하에서 몰리브덴산 용액 0.3 mL를 첨가하였다. 그 후, UV 분광광도계(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 glucose를 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 측정하여 환원당을 정량하였다.

효소 분해물의 점도 측정은 점도계(DVNXLV, Brookfield Co., Middleboro, MA, USA)를 사용하였다. Stevens와 Levin (Steven et al., 1976)의 방법을 참고하여 40 cP spindle을 장착한 뒤 25°C, 30 rpm의 조건으로 측정하였다.

2-5-4. 저분자화 및 저분자화 특성 분석

미야베모자반 시료를 조효소액을 1:1 비율로 혼합하여 30°C에서 0, 12, 24, 48 및 72시간 동안 반응시킨 분해물을 원심분리(10,000×g, 30 min, 4°C)한 후, 상층액을 동결건조 하였다. 동결건조된 시료를 20 mg/mL로

용해시킨 후, 99.5% Ethanol을 시료의 4.1배만큼 첨가하여 4℃에서 12시간 동안 조당을 추출하였다. 조당 추출 후 6,220×g, 4℃에서 30분간 원심분리하여 상층액은 제거하고 침전물만 상온건조시켜 사용하였다.

저분자화 및 효소 분해물의 저분자화 특성을 분석하기 위해 TLC (Thin Layer Chromatography), ESI-MS (Electrospray Ionization Mass Spectrometry), TGA (Thermogravimetric Analysis), DSC (Differential Scanning Calorimetry) 분석을 진행하였다.

TLC는 Silica gel F₂₅₄ plate에 시간별로 용해된 sample 10 μL씩 spotting 하였고, 전개 용매는 1-butanol : formic acid : water (4 : 6 : 1 v/v/v)로 제조하여 사용하였다. 1시간 20분 전개 후 10% 황산에탄올 용액을 분무한 후 110℃, 30분간 가열하여 시각화하였다. Standard mixture는 alginic acid oligosaccharides (DP: 1-6)을 사용하였다.

ESI-MS는 액체크로마토그래피 고성능 혼합형 질량분석기(maXis HD, Bruker Daltonics GmbH & Co. KG, HB, GER)를 사용하여 분석하였다. 동결건조한 미야베모자반 분해물 시료 1 mg을 0.1% formic acid에 용해한 후 필터링하여 질량 분석기에 직접 주입하였다. 질량 스펙트럼을 얻기 위해 음이온화 모드로 50-1000 m/z의 스캔 범위로 측정하였다.

TGA와 DSC는 동시측정 열분석기(SDT 650, TA Instruments, New Castle, USA)를 사용하여 분석하였다. 동결건조한 미야베모자반 분해물 시료 1 mg을 알루미나 도가니에 균일하게 분포시킨 후 상온에서 800℃까지 10℃/min의 승온 속도로 가열하였다.

2-5-5. 항염증 효과

세포배양

mouse의 대식세포인 RAW 264.7 (KCLB 40071)을 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였으며, 10% inactivated fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin-streptomycin

(PS)를 첨가한 DMEM을 배양액으로 하여 37℃, 5% CO₂ incubator (MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 배양하였다. 실험 과정의 모든 세포는 80~90% 밀도로 자랐을 경우 계대 배양하였고, 20 passages 이하의 세포만 실험에 사용하였다.

세포 독성 측정

RAW 264.7 세포에 대한 미야베모자반 분해물의 세포독성을 평가하기 위해 Park 등(2006)의 방법을 약간 변형하여 MTT assay를 실시하였다. RAW 264.7을 96 well plate에 2.5x10⁵ cells/mL의 농도로 분주하고 20시간 전배양하였다. 0.1 μg/mL LPS와 미야베모자반 분해물을 농도 별(0, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 및 10 μg/mL)로 각각 처리하여 37℃, 5% CO₂ incubator (MCO-15AC, Sanyo, Osaka, Japan)에서 24시간 분배양하였다. 배양 후 5 mg/mL MTT reagent (thiazol blue tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich)를 20 μL 첨가한 뒤 2시간 재배양하였다. 2시간 후 상층액을 제거하고 DMSO 100 μL를 분주한 뒤 차광하여 20분간 shaking 하였다. 이를 microplate reader (Model 550, Bio-rad, Richmond, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도(optical density (O.D))를 측정하였다. 세포증식능은 다음 식을 이용하여 산출하였다.

$$\text{Proliferation index (\%)} = \text{sample의 O.D/control의 O.D} * 100$$

Nitric oxide 생성량 측정

미야베모자반 분해물의 항염증 효과를 확인하기 위해 RAW 264.7 세포에서의 NO (Nitric oxide) 생성에 대한 억제효과를 Griess 반응(Lee et al., 2000)을 이용하여 측정하였다. DMEM 배지에 RAW 264.7 세포를 2.5x10⁵ cells/mL의 농도로 24 well plate에 접종하고 20시간 전배양 후 PBS로 세척하였다. 새 배지에 0.1 μg/mL LPS와 미야베모자반 분해물 0, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 및 10 μg/mL을 각각 처리하여 24시간 분

배양하였다. 이를 원심분리(3000 rpm, 10 min, 4℃)하여 얻은 상층액을 동량의 griess 시약(0.1% naphthylendiamine dihydrochloride + 1% sulfanilamide)과 microplate에 함께 첨가하여 37℃에서 10분간 반응한 뒤 microplate reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정 한 후, 그 값을 sodium nitrite (NaNO₂)의 농도별 표준곡선과 비교하여 산출하였다.

염증성 cytokine 분비량 측정

미야베모자반 분해물의 항염증 효과를 측정하기 위해 pro-inflammatory cytokine인 TNF- α , IL-6의 분비량을 ELISA-kit (Mouse ELISA set, BD Bioscience, San Diego, CA, USA)을 이용하여 sandwich ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 방법(Enavall and Perlmann, 1972)으로 측정하였다. TNF- α , IL-6 측정을 위해 RAW 264.7 세포를 2.5×10^5 cells/mL 농도로 plate에 접종하여 18시간 전배양하였다. 이후, 0.1 μ g/mL LPS와 미야베모자반 분해물(0, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 및 10 μ g/mL)을 각각 처리하여 18 시간 분 배양한 뒤 배양액의 상층액을 취했다. Anti-mouse TNF- α , IL-6를 capture antibody로 microplate에 각각 분주하고 4℃에서 하룻밤 동안 coating시켰다. 0.05% Tween 20 이 포함된 phosphate buffered saline (PBST)으로 coating buffer를 제거하고 10% FBS 용액을 분주하고 1시간 동안 blocking 하였다. 이를 PBST를 이용하여 세척한 후 microplate에 각 상층액을 분주하여 2시간 반응시켰다. 다시 PBST로 세척하고 biotinylated anti-mouse TNF- α , IL-6 detection antibody와 SAV-HRP를 첨가한 후 실온에서 1시간 반응시켰다. 이를 다시 PBST로 세척한 다음, O-phenylenediamine Dihydrochloride (OPD)용액 첨가 후 30분간 실온에서 암반응시켰다. 2 N H₂SO₄를 첨가하여 반응을 종료시킨 후, microplate reader를 이용하여 490 nm에서 O.D값을 측정하였다.

2-6. 통계 처리

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



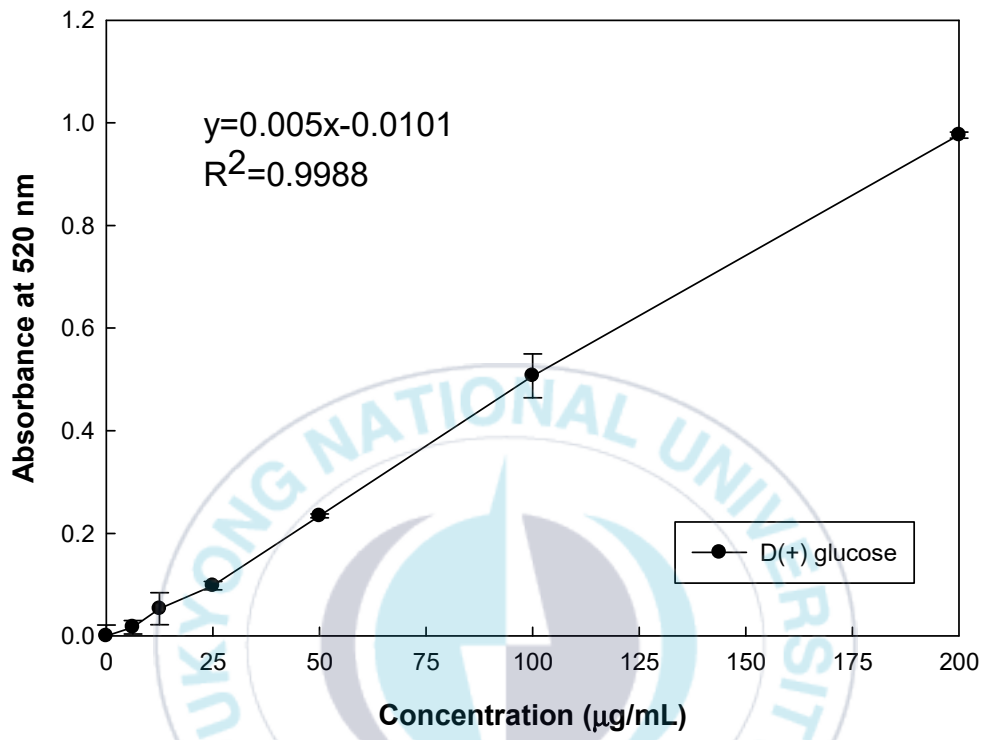


Fig. 1. Standard curve for determination of reducing sugar.

결과 및 고찰

1. 알긴산, PolyM, PolyG 분해물의 특성

1-1. 기질 특이성

S. oneidensis PKA 1008 유래 조효소액을 alginate 및 polyM, polyG 기질과 각각 혼합한 후, 30°C에서 0-48시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 시간별 분해물의 환원당 측정 결과를 Table 1-3에 나타내었다.

Alginate 분해물의 환원당 측정 결과, 환원당 함량이 반응 전(0시간)에서 14.42 $\mu\text{g/mL}$ 로 비교적 낮았다. 반응 시간이 증가할수록 유의적으로 완만하게 증가하여 반응 24시간 후 16.82 $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었고, 이후 시간에서는 유의적인 차이가 없었다. polyM 분해물의 환원당 측정 결과, 반응 전(0시간)에서 56.72 $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었고, 반응 12시간 후 급격히 증가하여 171.72 $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었으며, 이후 시간에서는 유의적인 차이가 없었다. polyG 분해물의 환원당 측정 결과, 반응 전(0시간)에서 96.12 $\mu\text{g/mL}$ 로 비교적 높았다. 반응 시간이 증가할수록 유의적으로 소량 증가하여 반응 24시간 후 102.82 $\mu\text{g/mL}$ 로 측정되었고, 이후 시간에서는 유의적인 차이가 없었다.

각 기질의 상대적 활성도를 비교하여 알긴산 분해 효소의 기질 특이성을 분석한 연구가 있다. Kam 등(2011)의 연구에서는 *Pseudomonas* sp. strain KS408에서 분리한 효소는 polyM 특이적이며, polyMG도 일부 활성을 가지지만 polyG에 대해서는 활성이 거의 없는 것으로 보고하였다. Park 등(2012)의 연구에서는 *Sphingomonas* sp. MJ-3에서 분리한 효소는 polyM 특이적이며 polyG, polyMG에 대해 모두 활성을 가졌다고 보고하였다. Cheng 등(2020)의 연구에서는 *Streptomyces ecolicolor* A3(2)에서 분리한 효소는 polyM 특이적이며 polyG도 일부 활성을 가지는 것으로 보고하였다. Wang 등(2023)의 연구에서는 *Vibrio* sp.

W2에서 분리한 효소는 polyG 특이적이며 polyM도 활성을 가진다고 보고하였다.

본 연구에서는 alginate 분해활성을 100%를 기준으로 하였을 때, polyM의 활성은 alginate의 76배, polyG의 활성은 alginate의 2.9배를 나타내 polyM, polyG, alginate 순으로 높은 활성을 보였다. 따라서 *S. oneidensis* PKA 1008 유래 조효소는 polyM 특이적이며, polyG 기질에도 일부 활성을 가지는 것으로 확인하였다.



Table 1. Changes in reducing sugar of enzymatic extracts of sodium alginate with incubation time

Time (h)	Reducing sugar ($\mu\text{g/mL}$)
0	$14.42 \pm 0.28^{\text{c}1)}$
12	$15.92 \pm 0.42^{\text{b}}$
24	$16.82 \pm 0.28^{\text{a}}$
48	$17.32 \pm 0.99^{\text{a}}$

¹⁾Means in the same column (a–c) bearing different superscript in samples are significantly different ($p < 0.05$).

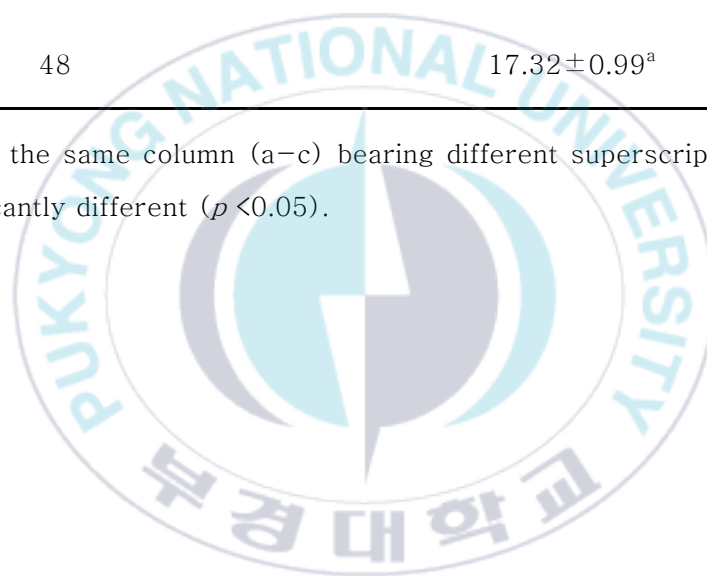


Table 2. Changes in reducing sugar of enzymatic extracts of polymannuronic acid (polyM) with incubation time

Time (h)	Reducing sugar ($\mu\text{g/mL}$)
0	$56.72 \pm 0.42^{\text{b}1)}$
12	$171.72 \pm 0.99^{\text{a}}$
24	$172.02 \pm 0.85^{\text{a}}$
48	$172.22 \pm 0.28^{\text{a}}$

¹⁾Means in the same column (a–b) bearing different superscript in samples are significantly different ($p < 0.05$).

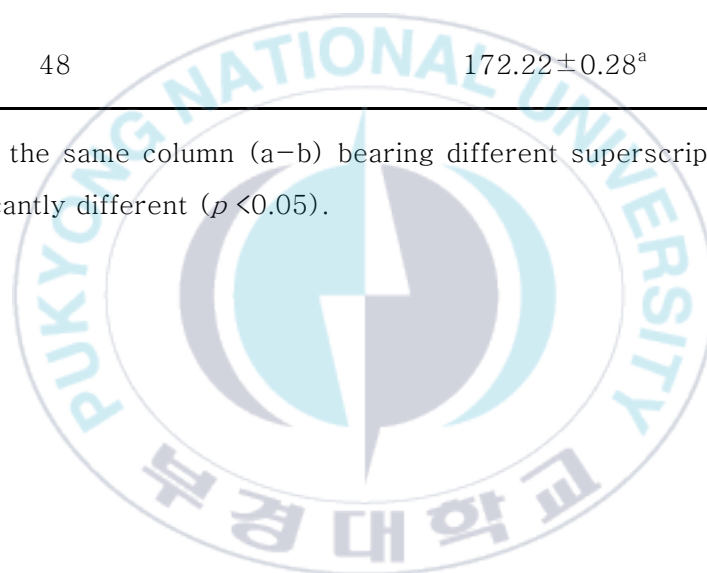
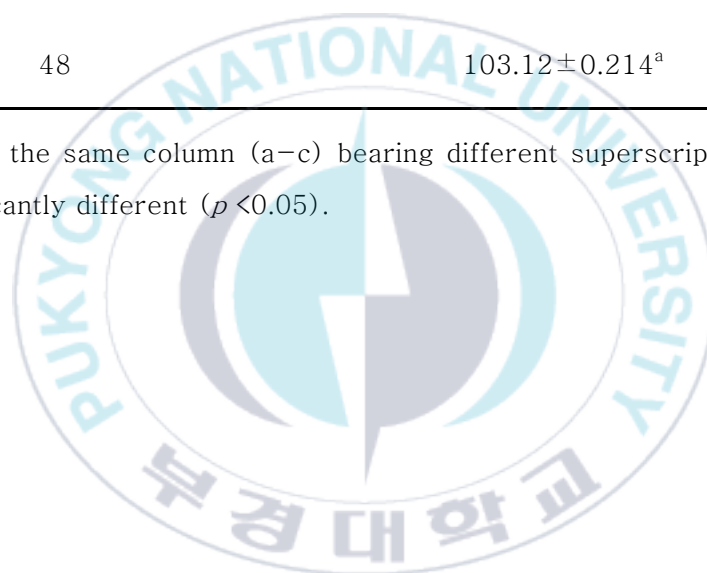


Table 3. Changes in reducing sugar of enzymatic extracts of polyguluronic acid (polyG) with incubation time

Time (h)	Reducing sugar ($\mu\text{g/mL}$)
0	$96.12 \pm 0.42^{\text{c}1)}$
12	$100.52 \pm 0.14^{\text{b}}$
24	$102.82 \pm 0.57^{\text{a}}$
48	$103.12 \pm 0.214^{\text{a}}$

¹⁾Means in the same column (a–c) bearing different superscript in samples are significantly different ($p < 0.05$).



1-2. 저분자화 및 알긴산 분해패턴 파악

S. oneidensis PKA 1008 조효소액을 이용한 alginate, polyM, polyG 분해물의 저분자화를 시각적으로 확인하기 위해 Thin Layer Chromatography (TLC) 분석을 실시하였으며, 그 결과를 Fig. 2-4에 나타내었다.

Alginate 분해물의 TLC 분석 결과, 반응 전(0시간)에서는 저분자화가 관찰되지 않았으며, 반응 12시간 이후부터 trimer로 저분자화된 것을 확인하였다. polyM 분해물의 TLC 분석 결과, 반응 전(0시간)에서는 저분자화가 관찰되지 않았으며, 반응 12시간 이후부터 trimer 위치에 1개의 spot을 확인하였다. polyG 분해물의 TLC 분석 결과, 반응 전(0시간)에서는 저분자화가 관찰되지 않았으며, 반응 12시간 이후 trimer, tetramer로 분해되었고, 반응 24시간 이후부터 dimer, trimer, tetramer로 분해되었다. polyM, polyG 분해물의 TLC 결과는 반응 12시간 이후부터는 큰 변화 없이 환원당 결과의 경향과 일치하였다.

Kam 등(2011)의 연구에서는 *Pseudomonas* sp. strain KS408에서 분리한 효소를 이용한 분해물의 TLC 분석을 진행한 결과, alginate, polyM, polyMG 분해물은 dimer, trimer, tetramer로 저분자화 되었으나, polyG 분해물은 저분자화되지 않은 것을 확인할 수 있었다. Li 등(2011)의 연구에서는 *Pseudoalteromonas* sp. SM0524에서 분리한 효소를 이용한 분해물의 TLC 분석을 진행한 결과, alginate와 polyM의 주요 분해 생성물은 dimer, trimer이었고, polyG의 주요 분해 생성물은 trimer, tetramer라고 보고하였다.

본 연구 결과는 alginate, polyM, polyG 기질에 대한 *S. oneidensis* PKA 1008 조효소의 분해패턴을 TLC로 분석하였을 때 polyM의 주요 분해 생성물은 trimer였으며, polyG는 dimer, trimer, tetramer로 저분자화될 수 있음을 확인할 수 있었다. alginate는 M block과 G block으로 구성되어 있는데, 알긴산 표품의 M block의 비중이 높고 polyM 특이적인 환원당 결과로 보아 M block이 효율적으로 분해되어

trimer 위치의 spot만 나타난 것으로 사료된다. 추가적인 분석을 위해 시간별로 저분자화된 분해물을 이용하여 ESI-MS, DSC 및 TGA 분석을 진행하였다.



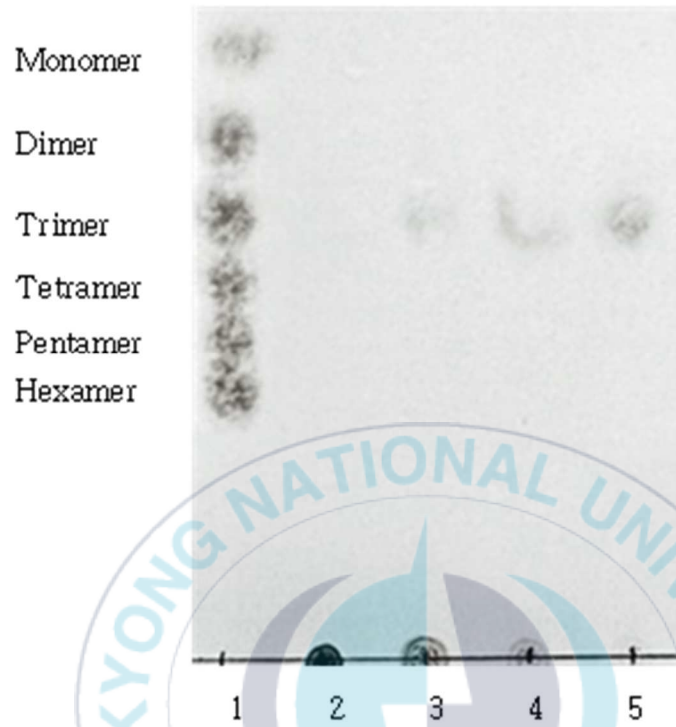


Fig. 2. TLC analysis of enzymatic extracts of sodium alginate by alginate-degrading crude enzyme with various incubation time. Reaction time: lane 1, standard; lane 2, 0 h; lane 3, 12 h; lane 4, 24 h; lane 5, 48 h.

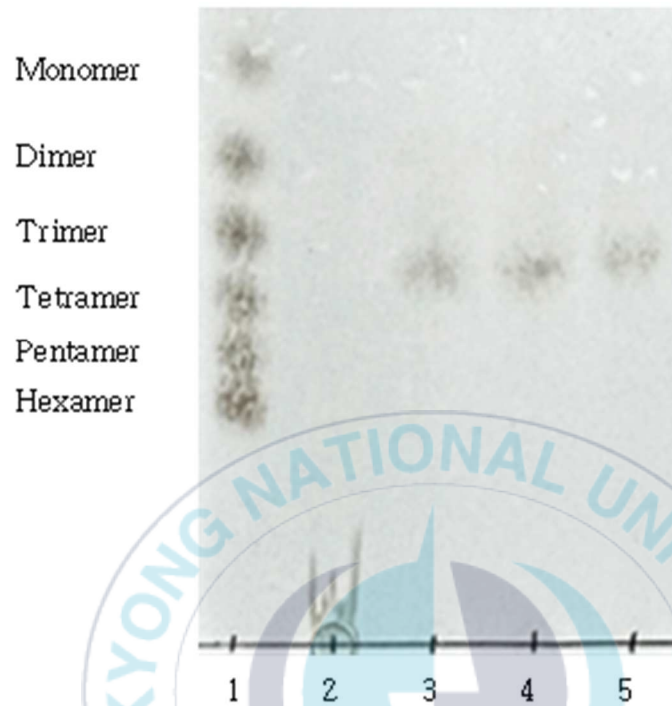


Fig. 3. TLC analysis of enzymatic extracts of polymannuronic acid by alginate-degrading crude enzyme with various incubation time. Reaction time: lane 1, standard; lane 2, 0 h; lane 3, 12 h; lane 4, 24 h; lane 5, 48 h.

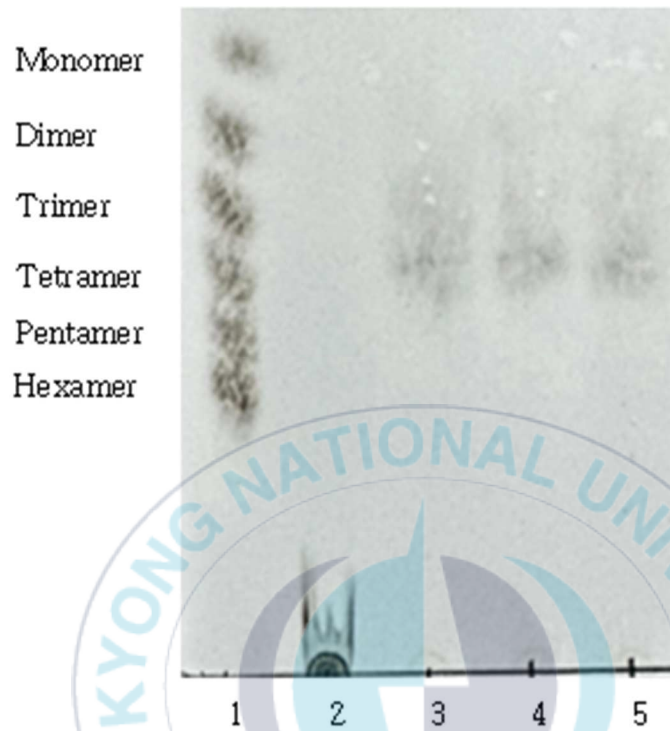


Fig. 4. TLC analysis of enzymatic extracts of polyguluronic acid by alginate-degrading crude enzyme with various incubation time. Reaction time: lane 1, standard; lane 2, 0 h; lane 3, 12 h; lane 4, 24 h; lane 5, 48 h.

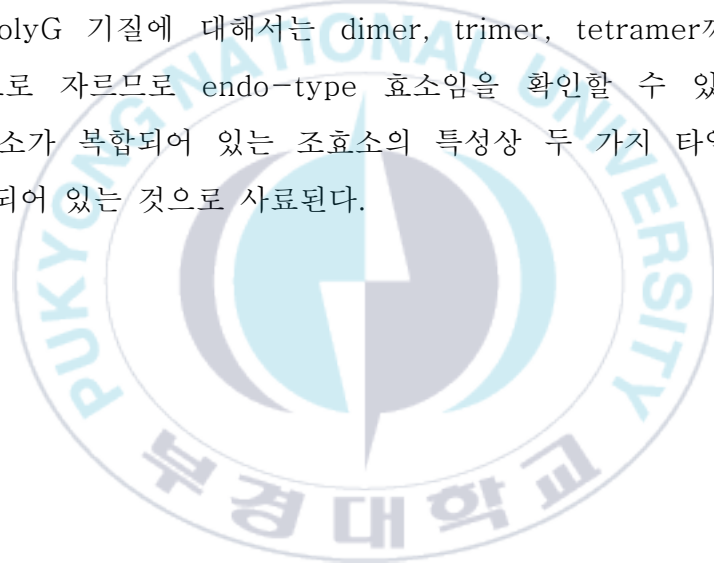
S. oneidensis PKA 1008 조효소의 알긴산 분해패턴을 확인하기 위해 D-mannuronic acid oligosaccharides (DP: 2-6)와 L-guluronic acid oligosaccharides (DP: 2-6)를 기질로 하여 각각 30°C에서 48시간 동안 반응시켰다 이후 Thin Layer Chromatography (TLC) 분석을 실시하였으며, 그 결과를 Fig. 5-6에 나타내었다.

D-mannuronic acid oligosaccharides 분해물의 TLC 분석 결과, M2-5의 경우 효소 처리를 하여도 저분자화가 나타나지 않았으며 M6는 분해되어 trimer를 생성하였다. L-guluronic acid oligosaccharides 분해물의 TLC 분석 결과, G2-3의 경우는 효소에 의해 분해가 되지 않았으며 G4는 저분자화되어 dimer를 생성하였고, G5는 분해되어 dimer, trimer를 생성하였고, G6는 분해되어 dimer, trimer, tetramer를 생성하였다.

Liang 등(2023)의 연구에서는 *Pichia pastoris* GS115 유래 알긴산 분해효소의 기질분해패턴은 D1-4, G1-4는 저분자화되지 않았고, D5와 G5가 효소가 작용할 수 있는 가장 짧은 기질이었고 monomer, dimer, trimer, tetramer로 분해되었다고 보고하였다. Zheng 등(2023)의 연구에서는 *Rubrivirga marina* 유래 알긴산 분해효소의 기질분해패턴은 D2, G2는 저분자화되지 않았고, D3, G3의 경우 monomer와 dimer로 분해가 되었으나 효율적으로 분해하지 못했다. 따라서 D4와 G4가 효소가 작용할 수 있는 가장 짧은 기질이었고 dimer 또는 monomer 및 trimer로 분해가 되었는데 주로 dimer로 분해가 되었다. D5, G5는 dimer 및 trimer 또는 monomer 및 tetramer로 분해가 되었는데 주로 dimer 및 trimer로 분해가 되었다고 보고하였다.

본 연구는 *S. oneidensis* PKA 1008 조효소가 작용할 수 있는 최소 기질을 파악하고 그에 따른 분해산물을 알아보았다. D-mannuronic acid oligosaccharides 분해물의 경우 M6이 최소 인식 기질이었으며, 주요 분해산물은 trimer이었다. L-guluronic acid oligosaccharides 분해물의 경우 G4가 최소 인식 기질이었으며, 주요 분해산물은 dimer이었다. G5와

G6도 저분자화될 수 있었으며, G6의 경우 trimer 2분자 또는 dimer 및 tetramer로 분해가 되었는데, G4가 dimer로 분해된 것으로 보아 G6 분해산물인 tetramer도 추가 반응이 일어난다면 dimer로 한 번 더 분해될 수 있음을 암시할 수 있다. 또한 D-mannuronic acid oligosaccharides보다 더 폭 넓은 기질 선택성을 가질 수 있음을 시사한다. 이러한 결과와 polyM, polyG TLC 결과와 종합해 봤을 때, polyM 기질에 대해서는 trimer만 생성이 되었으므로 비환원 말단에서부터 trimer 단위로 자르는 exo-type 효소임을 확인할 수 있었고, polyG 기질에 대해서는 dimer, trimer, tetramer까지 다양한 올리고당으로 자르므로 endo-type 효소임을 확인할 수 있었다. 이는 다양한 효소가 복합되어 있는 조효소의 특성상 두 가지 타입의 효소가 모두 포함되어 있는 것으로 사료된다.



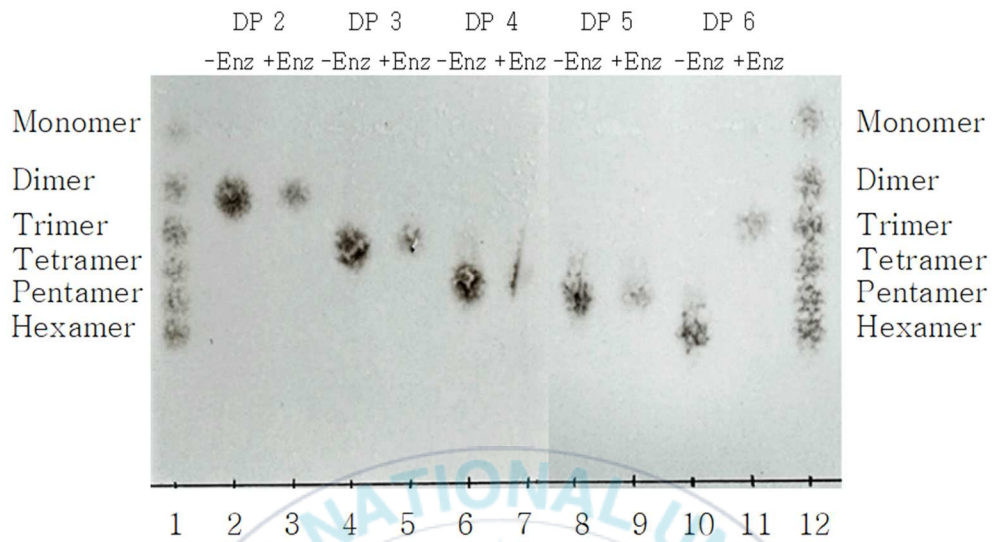


Fig. 5. TLC analysis of the degradation products of D-mannuronic acid oligosaccharides (DP: 2-6) for determination of substrate binding sites of alginate-degrading crude enzyme. (-Enz: enzyme free; +Enz: enzyme added).

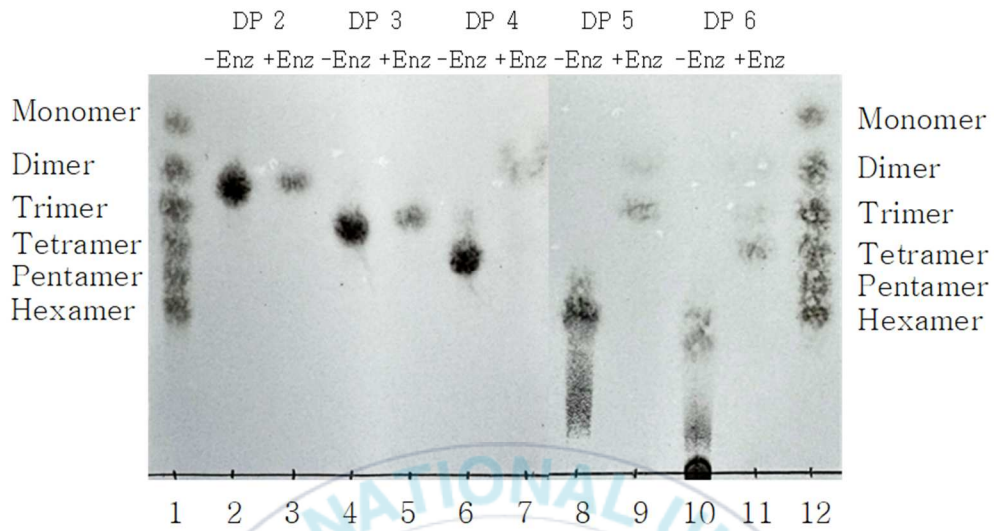


Fig. 6. TLC analysis of the degradation products of L-guluronic acid oligosaccharides (DP: 2-6) for determination of substrate binding sites of alginate-degrading crude enzyme. (-Enz: enzyme free; +Enz: enzyme added).

1-3. 저분자화 특성 분석

효소 분해물의 저분자화 특성을 분석하기 위해 alginate 분해물 0 h, 48 h을 각각 0.1% formic acid에 용해한 후 필터링하여 질량 분석기에 직접 주입하여 전기 분무 이온화 질량 분석(ESI-MS)를 진행하였다.

Alginate 분해물의 ESI-MS 결과, 모두 단일 전하 음이온이 검출되었으며, monomer는 175.02 m/z ($[\Delta DP1-H]^-$), dimer는 351.06 m/z ($[\Delta DP2-H]^-$) 및 373.04 m/z ($[\Delta DP2-2H+Na]^-$), trimer는 527.09 m/z ($[\Delta DP3-H]^-$), 549.07 m/z ($[\Delta DP3-2H+Na]^-$) 및 571.05 m/z ($[\Delta DP3-3H+2Na]^-$), tetramer는 703.12 m/z ($[\Delta DP4-H]^-$), pentamer는 879.15 m/z ($[\Delta DP5-H]^-$)로 검출되었다.

Alginate 반응 전(0시간) 분해물의 경우, 초기부터 다량의 monomer와 dimer부터 pentamer까지 다양한 올리고당이 검출되었다. 반응 48시간 이후 trimer가 급격히 증가하였으며, 이는 알긴산의 구성이 guluronic acid보다 mannuronic acid가 많은 점과 polyM 특이적인 결과에 기인하여 이러한 결과가 나타난 것으로 사료된다. 또한 trimer 위치에 1개의 spot이 형성된 alginate TLC 결과와 일치하였다. 동시에 tetramer는 약간 감소하였고 dimer는 약간 증가하였는데 ESI-MS의 측정 감도가 높아 TLC 결과에는 나타나지 않은 것으로 추정된다. Monomer는 초기에 많은 양이 검출되었는데, Zhang 등(2006)의 연구에 따르면 ESI-MS 측정 시 monomer의 환원말단에서 탈카르복실화가 일어나면 175 m/z 이온이 생성될 수 있다는 점과 반응 전(0시간) 분해물은 효소 작용이 일어나기 전의 상태이므로, 효소에 의한 생성이 아닌 것으로 사료된다. Monomer가 검출된 ESI-MS 결과와 다르게 TLC 측정 결과에서는 monomer위치에 spot이 나타나지 않았는데, 이는 10% 황산에탄올을 사용하여 발색하는 경우 포화 또는 불포화 당류는 잘 나타나지만, 불포화 단당(DEH : 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid)은 발색 되지 않는 결과와 일치하였다.

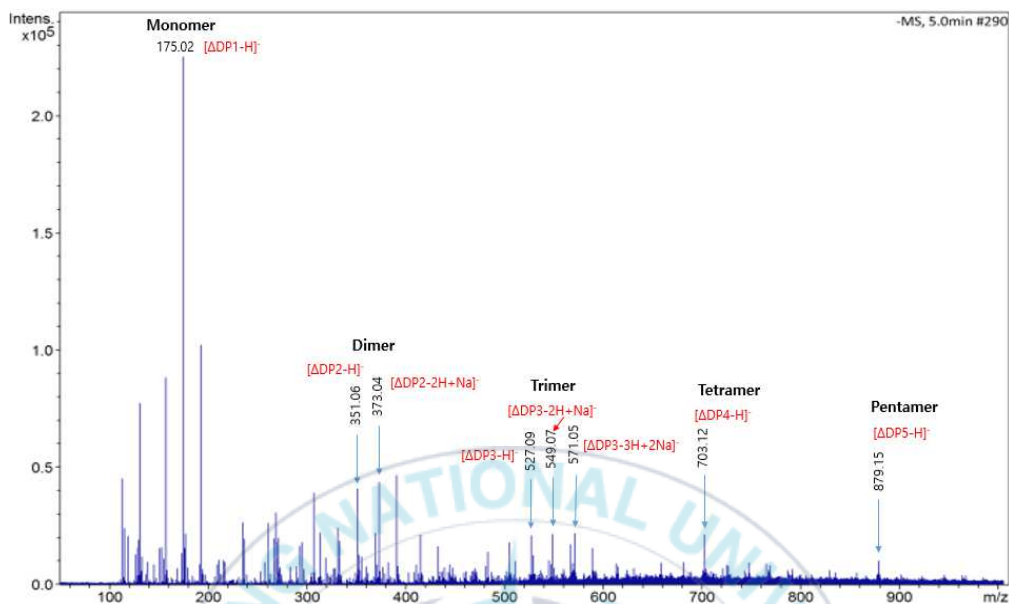


Fig. 7. ESI-MS analysis of enzymatic extracts of sodium alginate by alginate-degrading crude enzyme with 0 h incubation time (prior to enzymatic reaction).

The oligosaccharides are described by their degree of polymerization (DP_x).

Unsaturated oligosaccharides are denoted in this study as ΔDP_x.

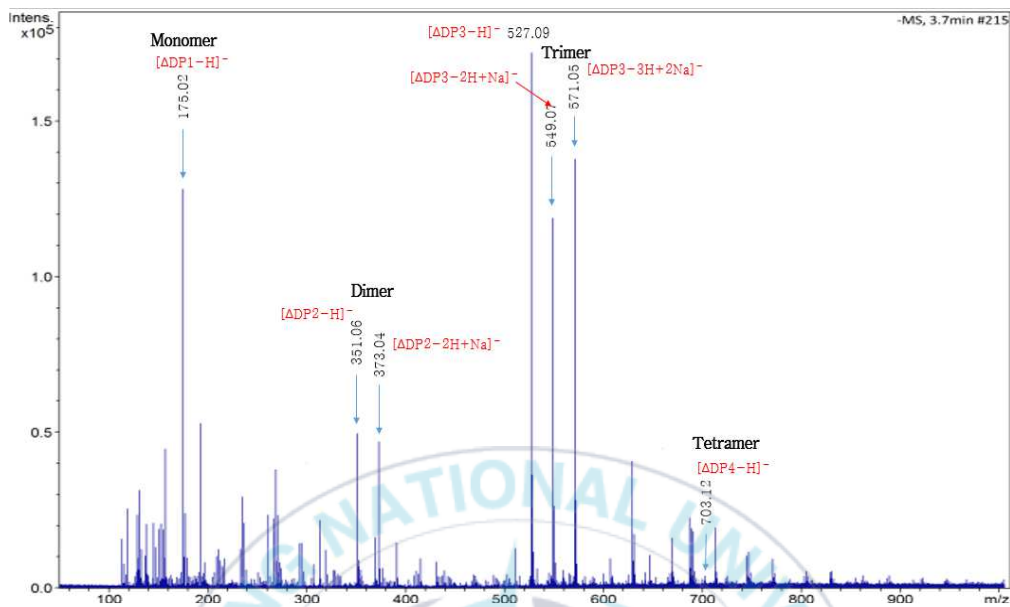


Fig. 8. ESI-MS analysis of enzymatic extracts of sodium alginate by alginate-degrading crude enzyme with 48 h incubation time.

The oligosaccharides are described by their degree of polymerization (DP_x).

Unsaturated oligosaccharides are denoted in this study as ΔDP_x.

효소 분해물의 저분자화 특성을 분석하기 위해 동결건조한 Alginate 분해물 0 h, 48 h을 각각 알루미늄 도가니에 균일하게 분포시킨 후 상온에서 800℃까지 10℃/min의 승온 속도로 가열하여 시차 주사 열량 분석(DSC)을 진행하였다.

Alginate 분해물의 DSC 결과, 반응 전(0시간) 분해물의 경우 72.32℃에서, 반응 48시간 분해물의 경우 70.30℃에서 흡열피크가 확인되었다. 이후 온도에서는 명확한 피크가 확인되지 않았다. Soares 등(2004)의 연구에 따르면 알긴산 나트륨의 DSC 곡선에서 100℃에 가까운 흡열피크는 탈수에 의해, 약 240~260℃에서 발열 피크는 바이오폴리머의 분해에 의해, 마지막으로 300℃ 이상에서는 탄소질 물질의 분해에 의한 결과라고 보고하였다. 또한 Yao 등(2018)의 연구에 따르면 세 가지 분자량(2660, 3890 및 4640 kDa)을 갖는 알긴산 나트륨이 닭가슴살 미오신 겔의 보수능(WHC)에 미치는 영향을 조사한 결과, 고분자량일수록 수분 보유 함량 능력이 좋은 것으로 나타났으며 이는 더 강한 분자 간 상호작용과 네트워크의 결합 효과 때문이라고 보고하였다.

따라서 반응 전(0시간)과 반응 48시간 분해물 모두 70℃ 부근에서 나타난 흡열피크는 탈수에 기인한 것이며, 반응 48시간 분해물의 피크 면적이 반응 전(0시간) 분해물의 피크 면적보다 작은 것으로 보아 효소에 의해 저분자화된 알긴산의 수분 보유 함량 능력이 저하되어 이러한 결과가 나타난 것으로 사료된다. 또한 이후 온도에서는 뚜렷한 피크를 확인할 수 없었다.

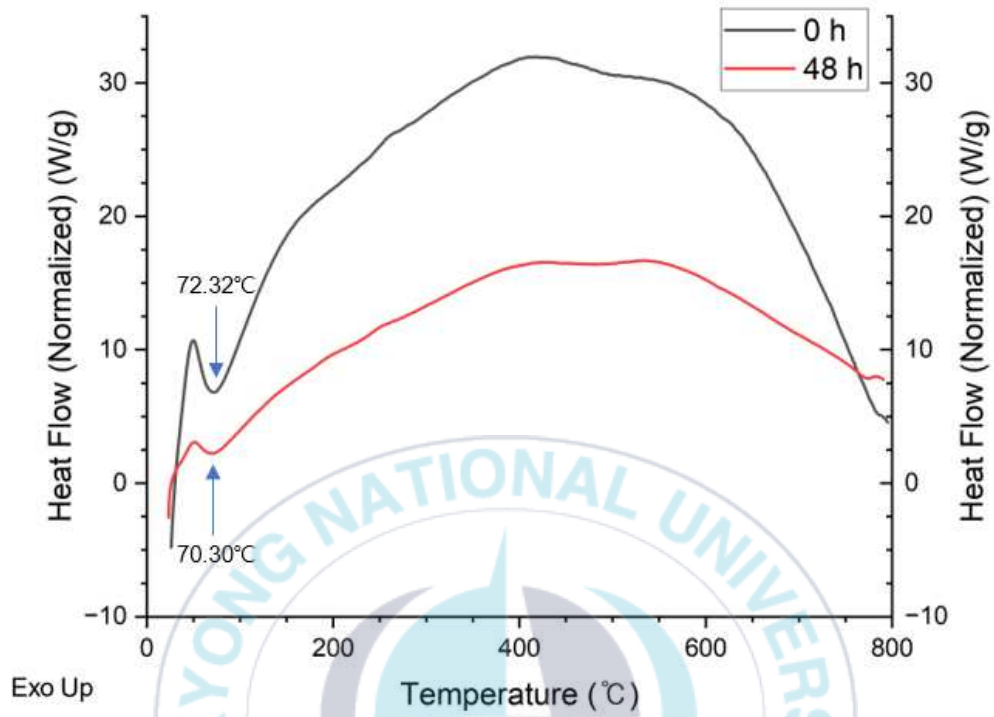


Fig. 9. DSC thermograms of enzymatic extracts of sodium alginate by alginate-degrading crude enzyme.

효소 분해물의 저분자화 특성을 분석하기 위해 동결건조한 Alginate 분해물 0 h, 48 h을 각각 알루미늄 도가니에 균일하게 분포시킨 후 상온에서 800℃까지 10℃/min의 승온 속도로 가열하여 열중량 분석(TGA)을 진행하였다.

Alginate 분해물의 TGA 결과, 단계적인 중량 손실이 나타났으며, 200℃ 부근에서 가장 특징적인 변화를 확인하였다. 반응 전(0시간) 분해물의 경우 224.44℃에서, 48시간 분해물의 경우 193.42℃에서 급격한 중량 손실이 일어났다. Pathak 등(2008)의 연구에 따르면 초기 중량 손실은 샘플에서 수분이 증발한 것이며, 200~300℃ 동안의 중량 손실이 가장 빠르고 생체고분자 분해에 의한 것이라고 하였다. 또한 Wu 등(2016)의 연구에 따르면 β -D-4 글리코시드 결합이 열분해 공정에 미치는 영향을 확인하기 위해 cellulose, cellobiose 및 glucose의 열분해 특성을 확인한 결과, 분해 개시 온도는 glucose의 경우 213℃, cellulose의 경우 276℃로 중합도가 증가함에 따라 증가하였다고 보고하였다.

따라서 반응 48시간 분해물의 분해개시온도가 반응 전(0시간) 분해물보다 더 낮은 것은 효소에 의해 알긴산이 저분자화되면서 중합도가 낮은 올리고당이 생성되어 이러한 결과가 나타난 것으로 사료된다. 또한 200℃ 부근에서 두 개의 슬라이드 형태로 중량이 감소하는데 이는 다양한 올리고당이 생겨남에 따라 여러 개의 단계적 중량 감소가 일어난 것으로 사료된다.

이러한 열분석 결과로 알긴산이 저분자화되었음을 확인할 수 있었다.

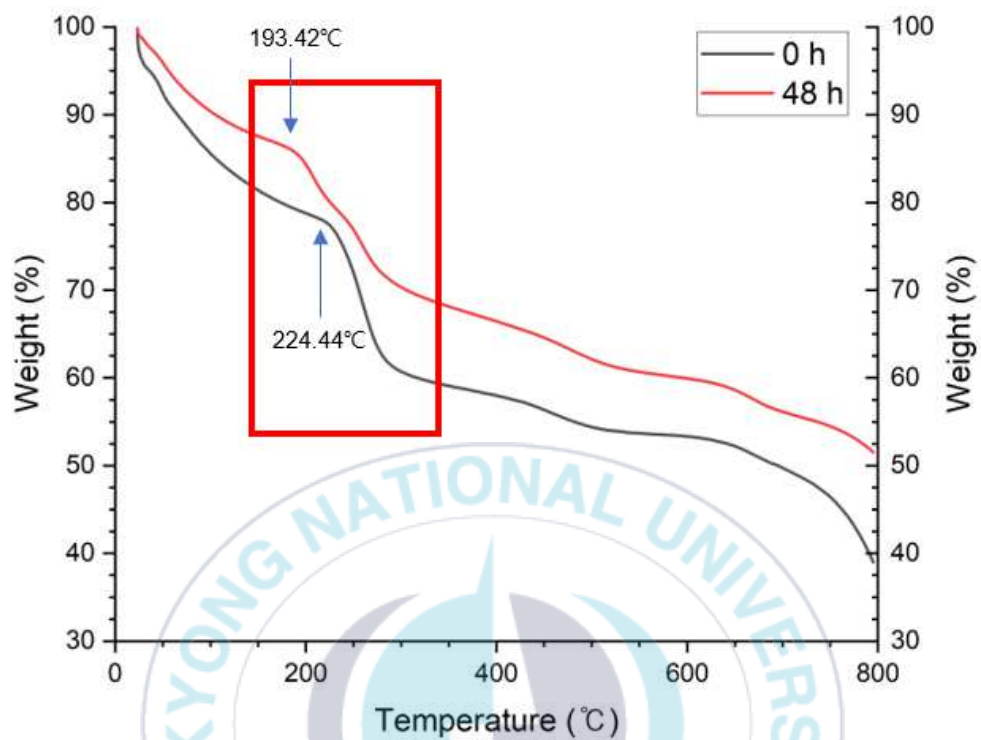


Fig. 10. TGA thermograms of enzymatic extracts of sodium alginate by alginate-degrading crude enzyme.

2. 미야베모자반 분해물의 특성 및 항염증 특성

2-1. 미야베모자반 분해물의 특성

2-1-1. pH

미야베모자반 분말과 10 mM phosphate buffer (pH 9)를 혼합하여 20 mg/mL 농도로 제조하였다. 이를 *S. oneidensis* PKA 1008 조효소액과 1:1 비율(v/v)로 혼합하여, 효소의 최적 활성 조건인 30°C에서 0-72시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 시간별 분해물의 pH 측정 결과를 Table 4에 나타내었다.

미야베모자반 분해물의 pH 측정 결과, 반응 전(0시간) pH 8.47에서 반응 시간이 증가할수록 유의적으로 감소하였고, 반응 24시간에서 pH 6.95로 가장 낮은 값을 나타내었다. 이러한 결과는 큰잎모자반(*Sargassum coreanum*), 미역뿌리(*Undaria pinnatifida* roots) 및 참모자반(*Sargassum fulvellum*)과 경단구슬모자반(*Sargassum muticum*) 및 쌍발이모자반(*Sargassum patens* C. Agardh)을 *S. oneidensis* PKA 1008 조효소액과 반응시킨 분해물의 pH가 반응 시간이 증가할수록 감소하는 결과(Lee, 2021; Park, 2017; Xu, 2019)와 일치하였다. 알긴산의 β -1,4-glycosidic 결합이 알긴산 분해효소(alginate lyase)에 의해 β -제거 반응으로 분해되어 α -L-guluronate 또는 β -D-mannuronate이 생성된다(Garron et al., 2010). 따라서 반응 시간이 증가함에 따라 갈조류 세포벽의 주요 구성성분인 알긴산이 효소에 의해 분해되면서 산성을 띠는 mannuronate와 guluronate가 증가하여 pH가 감소한 것으로 사료된다.

이로 보아 미야베모자반 분말에 *S. oneidensis* PKA 1008 조효소액을 혼합함으로써 조효소에 의해 미야베모자반의 알긴산이 저분자화됨을 확인할 수 있었다. 그 외의 원인으로 미생물의 오염 및 성장으로 인해 pH가 감소할 수 있으나, 효소 분해물 제조 시 0.02% sodium azide를

참가하여 미생물의 오염을 방지하였으므로 미생물의 오염에 의한 영향은 적을 것으로 사료된다.



Table 4. Changes in pH of enzymatic extracts of *Sargassum miyabei* with incubation time

Time (h)	pH
0	8.47 ± 0.01 ^{a1)}
6	7.78 ± 0.01 ^b
12	7.66 ± 0.01 ^c
24	6.95 ± 0.01 ^e
48	7.10 ± 0.01 ^d
72	7.10 ± 0.01 ^d

¹⁾Means in the same column (a–e) bearing different superscript in samples are significantly different ($p < 0.05$).

2-1-2. 색도

미야베모자반 분말을 *S. oneidensis* PKA 1008 조효소액과 혼합하여 시간별로 분해물의 색도를 측정된 결과는 Table 5와 같다.

미야베모자반 분해물의 색도 측정 결과, 반응 전(0시간)에서 명도(L*)가 68.90이었으며, 반응 72시간에서 54.77로 반응 시간이 증가할수록 감소하는 경향을 나타냈다. 반응 전(0시간)에서 적색도(a*)와 황색도(b*)의 경우, 각각 3.09, 48.90으로 가장 낮았으며, 반응 72시간에서 각각 14.90, 53.24로 반응 시간이 증가할수록 값이 점점 증가하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 지충이(*Sargassum thunbergii*) 효소분해물과 미역뿌리(*Undaria pinnatifida* roots) 및 참모자반(*Sargassum fulvellum*) 효소분해물의 색도가 반응 시간이 증가할수록 명도는 감소, 적색도 및 황색도는 증가하는 결과(Bark et al., 2015; Xu, 2019)와 일치하였다. 해조류에는 광합성 색소인 chlorophyll과 carotenoids계 색소가 풍부하며, 특히 갈조류에는 chlorophyll a와 c, β -carotene, fucoxanthin 등이 풍부하다. Fucoxanthin은 carotenoids 중 xanthophyll 유도체로 갈색 또는 주황색을 띤다(Beppu et al., 2009; Peng et al., 2011; Poojary et al., 2016; Garcia-Perez et al., 2022; Din et al., 2022). Chlorophyll은 산, 알칼리, 온도, 빛, 금속이온 및 효소 등에 의해 분해가 될 수 있으며, 분자 중심에 있는 마그네슘 이온이 수소원자로 대체되어 탁한 황색 또는 갈색을 띠는 pheophytin으로 변한다(Canjura et al., 1991; Ahmed et al., 2002; Ambra et al., 2023).

따라서 알긴산 분해 조효소 처리에 의해 갈조류 세포벽의 주요 성분인 알긴산이 분해되어 세포 내부의 fucoxanthin을 포함한 여러 색소들이 추출되었을 것으로 사료된다. 명도의 감소는 효소 처리로 인해 더 많은 색소가 노출되었고, 반면 적색도와 황색도의 증가는 일부 β -carotene의 영향도 있을 수 있으나, 추출된 색소 중에 fucoxanthin 이 많은 비율을 차지하기 때문에 fucoxanthin의 영향이 클 것으로 사료된다.

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

Time (h)	L*	a*	b*
0	68.90±0.02 ^{c1)}	3.09±0.07 ^f	48.90±0.16 ^f
6	71.49±0.08 ^a	6.74±0.10 ^e	58.89±0.12 ^d
12	69.79±0.15 ^b	8.32±0.10 ^d	60.87±0.18 ^b
24	66.66±0.02 ^d	10.52±0.07 ^c	63.18±0.10 ^a
48	62.21±0.02 ^e	12.59±0.08 ^b	60.05±0.03 ^c
72	54.77±0.05 ^f	14.90±0.27 ^a	53.24±0.08 ^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 유래 조효소액을 미야베모자반 분말과 혼합한 후, 30℃에서 0-72시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 시간별 분해물의 환원당 및 점도 측정 결과를 Table 6에 나타내었다.

미야베모자반 분해물의 환원당 측정 결과, 환원당 함량이 반응 전(0시간)에서 211.10 $\mu\text{g/mL}$ 로 비교적 낮았고, 반응 시간이 증가할수록 유의적으로 증가하여 반응 72시간에서 2421.60 $\mu\text{g/mL}$ 로 반응 전 대비 10배 이상의 수치를 나타내었다. 미야베모자반 분해물의 점도 측정 결과, 반응 초기에 2.31 cP였으며, 반응 시간이 증가할수록 유의적으로 감소하여 반응 72시간에서 2.01 cP로 가장 낮은 점도를 보였다.

Kim과 Cho(2000)의 연구에서 alginate를 저분자화하기 위해 가열하였을 때 가열시간이 경과함에 따라 평균 분자량과 점도가 급격히 감소하였으며, 평균 분자량과 점도는 서로 비례하는 상관관계를 나타낸다고 보고하였다. 본 연구 결과는 기존에 보고되었던 *S. oneidensis* PKA 1008 조효소액을 alginate 기질과 혼합하여 최적 활성 조건에서 0-60시간 동안 반응시켰을 때, 반응 시간이 증가할수록 환원당 함량이 증가하고, 점도가 감소한다는 연구 결과(Sunwoo et al., 2013)와 일치하였다. 또한 Park (2017)의 연구에서는 *S. oneidensis* PKA 1008 조효소액을 큰잎모자반과 반응 시 48시간에서 가장 효율적인 분해가 가능하다고 보고하였고, Xu (2019)의 연구에서는 미역뿌리 및 참모자반과 반응 시 24시간이 최적 분해 시간이었다고 보고하였고, Lee (2021)의 연구에서는 경단구슬모자반 및 쌍발이모자반과 반응 시 각각 48시간, 24시간이 최적 분해 시간이었다고 보고하였다.

본 연구에서는 미야베모자반 분해물이 72시간 반응에서 가장 높은 환원당 함량과 가장 낮은 점도를 나타내었다. 반응 72시간 이후에도 이러한 경향이 지속될 가능성이 있으나, 산업적 이용을 고려할 때 효율성과 경제성 측면에서 비효율적일 수 있다. 따라서 *S. oneidensis* PKA 1008 유래 조효소액이 미야베모자반에 함유되어 있는 다당류를 가장

효율적으로 저분자화 시킬 수 있는 반응 시간은 72시간임을 확인할 수 있었으며, 이 시간대에서 다량의 올리고당이 분해될 것으로 추측할 수 있었다.



Table 6. Changes in reducing sugar and viscosity of enzymatic extracts of *Sargassum miyabei* with incubation time

Time (h)	Reducing sugar ($\mu\text{g/mL}$)	Viscosity (cP)
0	211.10 \pm 11.31 ^{f1)}	2.31 \pm 0.01 ^a
6	876.60 \pm 2.12 ^e	2.24 \pm 0.01 ^b
12	1114.60 \pm 38.89 ^d	2.21 \pm 0.02 ^c
24	1389.60 \pm 9.19 ^c	2.09 \pm 0.01 ^d
48	1859.10 \pm 43.84 ^b	2.05 \pm 0.01 ^e
72	2421.60 \pm 45.96 ^a	2.01 \pm 0.01 ^f

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

2-1-4. 저분자화 및 저분자화 특성 분석

S. oneidensis PKA 1008 조효소액을 이용한 미야베모자반 분해물의 저분자화를 시각적으로 확인하기 위해 Thin Layer Chromatography (TLC) 분석을 실시하였으며. 그 결과를 Fig. 7에 나타내었다.

미야베모자반 분해물의 TLC 분석 결과, 반응 전(0시간)에서는 저분자화된 뚜렷한 spot을 확인할 수 없었고, 반응 12시간부터 점차 저분자화되어 dimer, trimer, tetramer로 분해됨을 확인할 수 있었다. 반응 72시간에서는 더 이상 monomer로의 분해는 없었고 dimer, trimer, tetramer spot의 농도가 더욱더 짙어짐을 관찰할 수 있었다.

Falkeborg 등(2014)의 연구에서는 *Sphingobacterium*이 생산하는 알긴산 분해효소를 이용하여 알긴산 시료를 시간별로 분해한 후 TLC 분석을 진행한 결과, 반응 전(0시간)에서는 저분자화가 되지 않았으나 반응 시간이 증가할수록 저분자화가 진행되어 반응 23시간 이후 최종적으로 dimer, trimer, tetramer로 분해되었다고 보고하였다. Zhu 등(2016)의 연구에서는 *Cellulophaga* sp. NJ-1이 생산하는 알긴산 분해효소를 이용하여 저분자화된 알긴산을 TLC 분석한 결과, 반응 3시간부터 저분자화가 시작되어 36시간 반응 후 최종적으로 dimer, trimer, tetramer로 분해되었다고 보고하였다. 이러한 연구는 본 연구 결과와 비슷한 결과를 보였다.

따라서 *S. oneidensis* PKA 1008 조효소액은 미야베모자반에 함유되어 있는 다당류를 올리고당으로 저분자화할 수 있다는 것을 확인 할 수 있었으며, 주요 분해 생성물은 dimer, trimer, tetramer임을 확인하였다. 시간별로 저분자화된 분해물을 이용하여 ESI-MS, DSC 및 TGA 분석을 진행하였다.

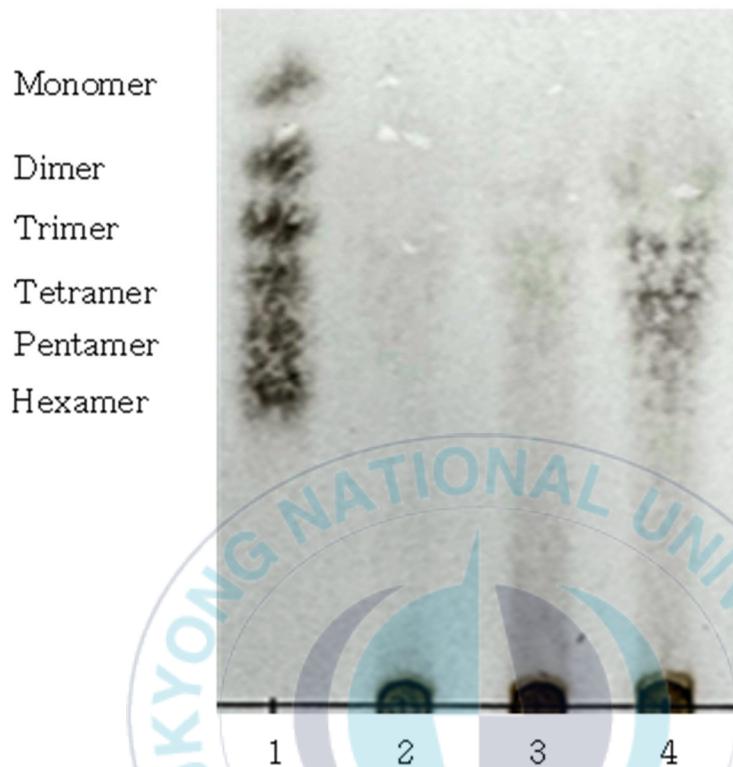


Fig. 11. TLC analysis of enzymatic extracts of *Sargassum miyabei* by alginate-degrading crude enzyme with various incubation time.

Reaction time: lane 1, standard; lane 2, 0 h; lane 3, 12 h; lane 4, 72 h.

효소 분해물의 저분자화 특성을 분석하기 위해 미야베모자반 분해물 0 h, 72 h을 각각 0.1% formic acid에 용해한 후 필터링하여 질량 분석기에 직접 주입하여 전기 분무 이온화 질량 분석(ESI-MS)을 진행하였다.

미야베모자반 분해물의 ESI-MS 결과, 모두 단일 전하 음이온이 검출되었으며, monomer는 175.02 m/z ($[\Delta DP1-H]^-$), dimer는 351.06 m/z ($[\Delta DP2-H]^-$) 및 373.04 m/z ($[\Delta DP2-2H+Na]^-$), trimer는 527.09 m/z ($[\Delta DP3-H]^-$), 549.07 m/z ($[\Delta DP3-2H+Na]^-$) 및 571.05 m/z ($[\Delta DP3-3H+2Na]^-$), tetramer는 703.12 m/z ($[\Delta DP4-H]^-$)로 검출되었다.

미야베모자반 반응 전(0시간) 분해물 대비 반응 48시간 분해물에서 monomer, dimer, trimer는 증가하는 경향을 나타내었고, tetramer는 큰 변화가 없었다. Monomer는 다른 올리고당에 비해 비교적 많은 양이 검출되었는데, ESI-MS 측정 시 monomer의 환원말단에서 탈카르복실화가 일어나면 175 m/z 이온이 생성될 수 있다는 결과(Zhang et al., 2006)와 *Saccharina japonica*로부터 추출한 fucoidan의 정제 과정에서 얻어진 분획물의 ESI-MS 측정 결과 175 m/z 이온이 생성된 결과(Jin et al., 2012)로 보았을 때, 미야베모자반은 갈조류의 일종이므로 알긴산뿐만 아니라 fucoidan, laminarin 등 다양한 다당류가 함유되어 있을 것으로 추측할 수 있으며, 본 연구에서 사용한 효소는 알긴산 분해 효소뿐만 아니라 다양한 효소가 복합된 조효소(crude enzyme)이므로 monomer의 생성은 PKA 1008 조효소에 의한 것이라고 보기는 어렵다. Minghou 등(1984)의 연구에 따르면 *Sargassum miyabei*의 평균 M/G 비율은 0.76이었으며 polyG 비율이 조금 더 높아 dimer와 trimer가 균형 있게 증가한 것으로 사료된다. Alginate 결과와 마찬가지로 Monomer가 검출된 ESI-MS 결과와 다르게 TLC 측정 결과에서는 monomer 위치에 spot이 나타나지 않았는데, 이는 10% 황산에탄올을 사용하여 발색하는 경우 포화 또는 불포화 당류는 잘 나타나지만, 불포화 단당(DEH : 4-

deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid)은 발색 되지 않는 결과와 일치하였다.

더 정확한 분석을 위해 효소 정제, 미야베모자반의 다당류 성분 분석, NMR, FT-IR과 같은 구조분석 등의 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.



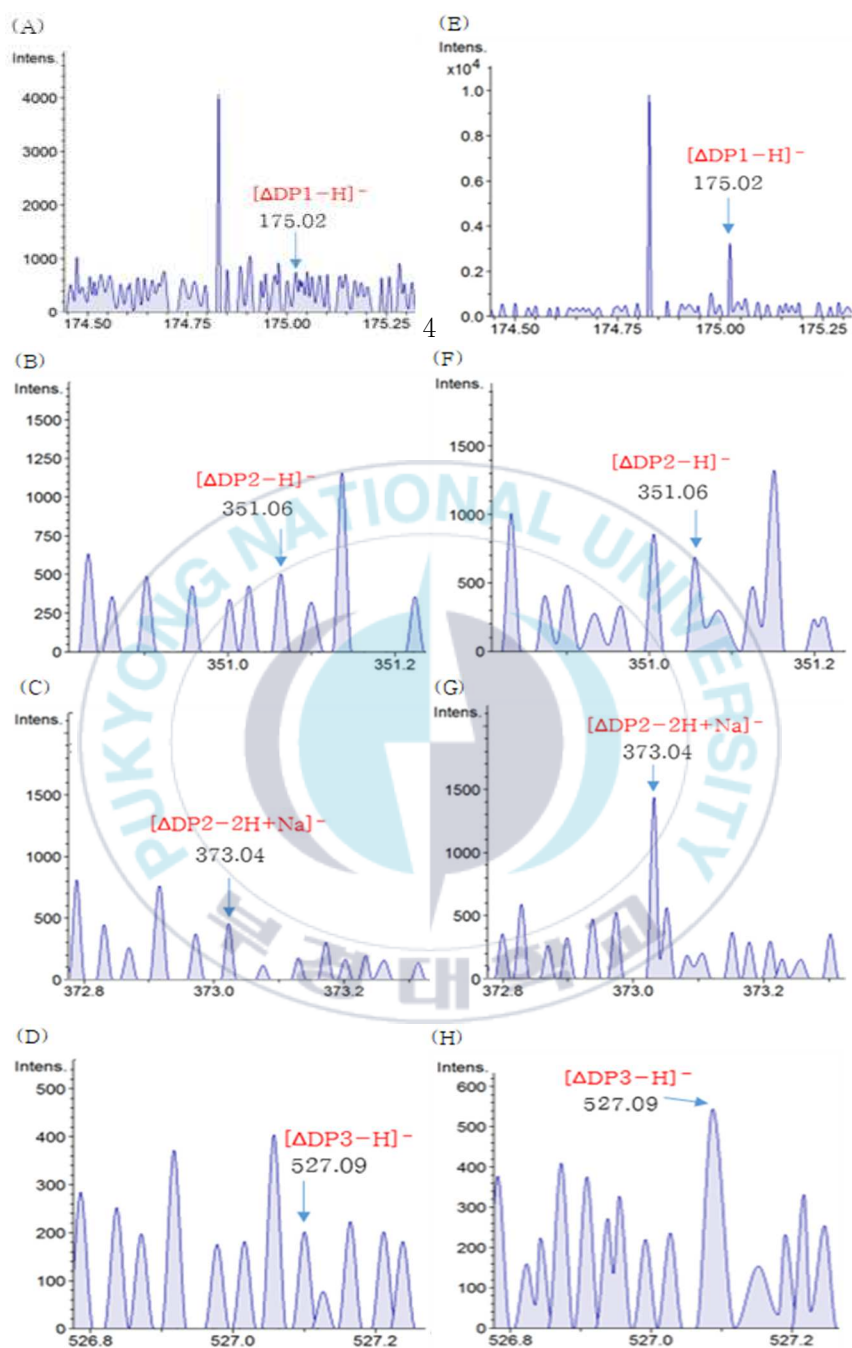


Fig. 12. ESI-MS analysis of enzymatic extracts of *Sargassum miyabei* by alginate-degrading crude enzyme with 0 h incubation time (prior to enzymatic reaction) (A-D) and 72 h incubation time (E-H).

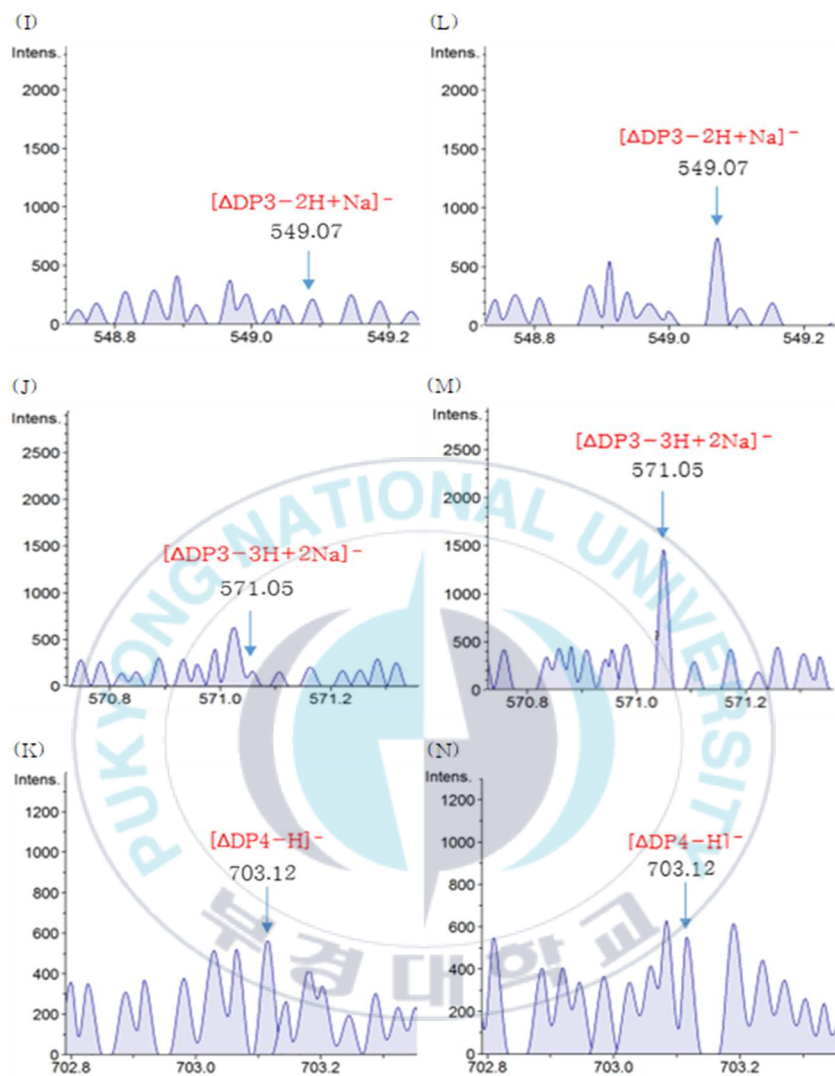


Fig. 13. ESI-MS analysis of enzymatic extracts of *Sargassum miyabei* by alginate-degrading crude enzyme with 0 h incubation time (prior to enzymatic reaction) (I-K) and 72 h incubation time (L-N).

효소 분해물의 저분자화 특성을 분석하기 위해 동결건조한 미야베모자반 분해물 0 h, 72 h을 각각 알루미늄 도가니에 균일하게 분포시킨 후 상온에서 800℃까지 10℃/min의 승온 속도로 가열하여 시차 주사 열량 분석(DSC)을 진행하였다.

미야베모자반 분해물의 DSC 결과, 반응 전(0시간) 분해물의 경우 80.88℃에서, 48시간 분해물의 경우 76.69℃에서 흡열피크가 확인되었다. 이후 온도에서는 명확한 피크가 확인되지 않았다. 알긴산 분해물 흡열피크 온도보다 높게 나타났는데 이는 미야베모자반에 알긴산 이외에도 다양한 다당류가 존재하고 불순물도 존재하기 때문에 이러한 결과가 나타난 것으로 사료된다.

따라서 반응 전(0시간)과 반응 72시간 분해물 모두 80℃ 부근에서 나타난 흡열피크는 탈수에 기인한 것이며, 반응 72시간 분해물의 피크 면적이 반응 전(0시간) 분해물의 피크 면적보다 약간 작은 것으로 보아 효소에 의해 저분자화된 알긴산의 영향을 받아 수분 보유 함량 능력이 저하되어 이러한 결과가 나타난 것으로 사료된다. 또한 이후 온도에서는 뚜렷한 피크를 확인할 수 없었다.

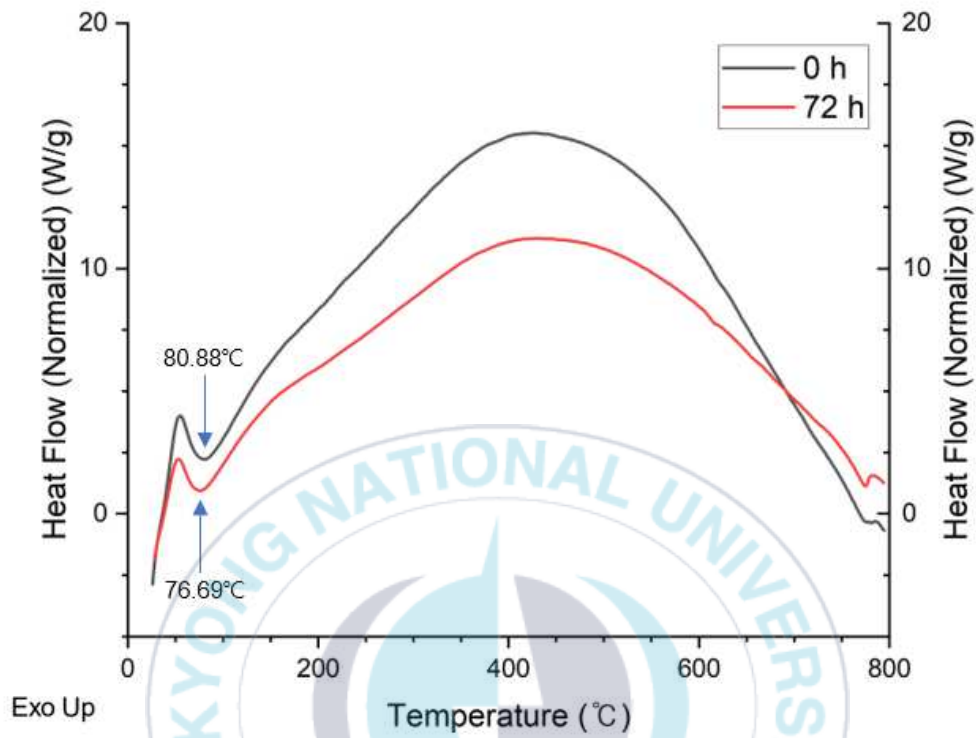
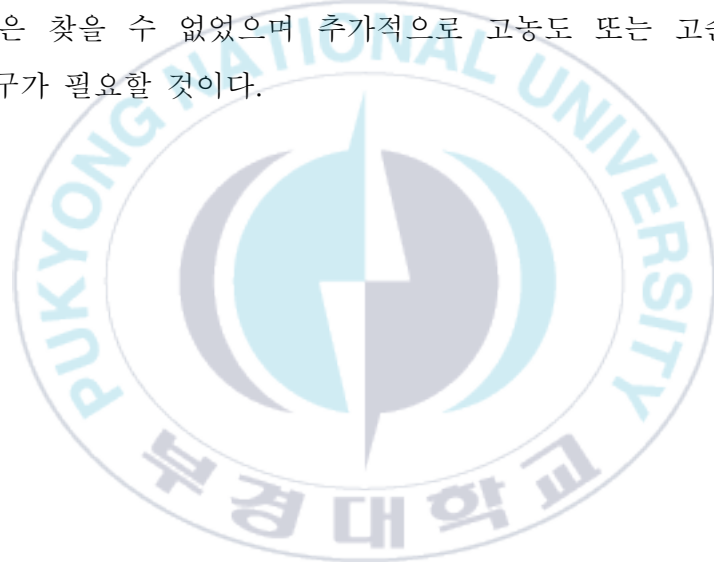


Fig. 14. DSC thermograms of enzymatic extracts of *Sargassum miyabei* by alginate-degrading crude enzyme.

효소 분해물의 저분자화 특성을 분석하기 위해 동결건조한 알긴산 분해물 0 h, 48 h을 각각 알루미늄 도가니에 균일하게 분포시킨 후 상온에서 800℃까지 10℃/min의 승온 속도로 가열하여 열중량 분석(TGA)을 진행하였다.

미야베모자반 분해물의 TGA 결과, 알긴산 분해물과 달리 특징적인 변화를 관찰할 수 없었다. 이는 미야베모자반의 복잡한 매트릭스로 인해 완만한 피크가 형성된 것으로 사료된다.

따라서 미야베모자반 분해물의 경우, 알긴산이 저분자화됨에 따른 명백한 열적 특성은 찾을 수 없었으며 추가적으로 고농도 또는 고순도 시료를 사용한 연구가 필요할 것이다.



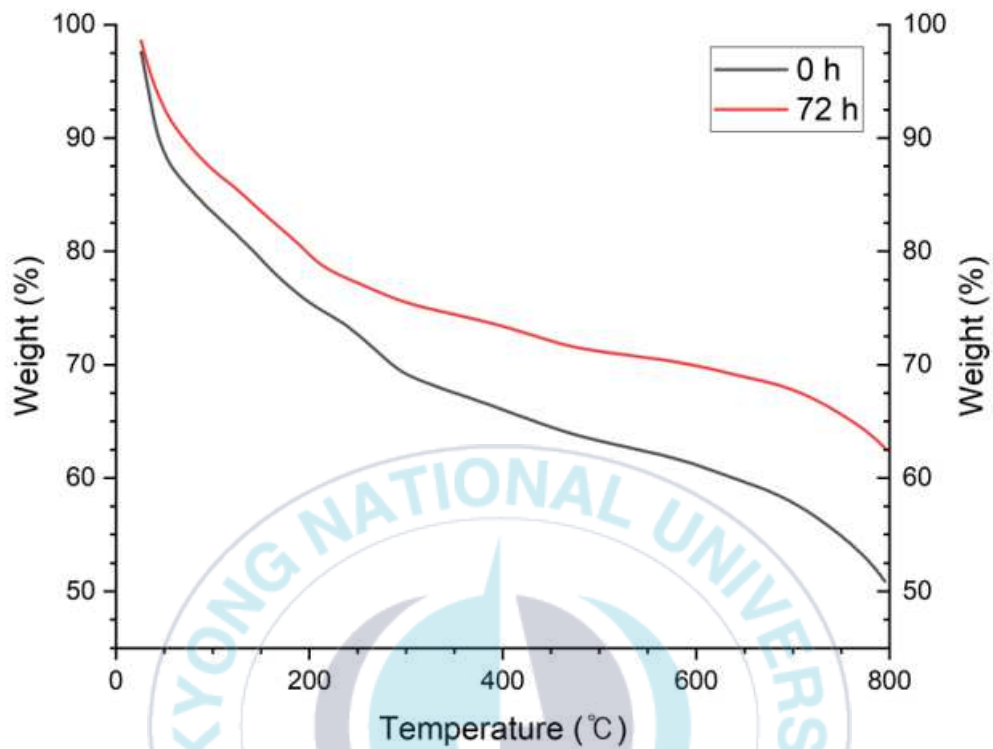


Fig. 14. DSC thermograms of enzymatic extracts of *Sargassum miyabei* by alginate-degrading crude enzyme.

2-2. 항염증 특성

2-2-1. 항염증 효과

세포 독성 측정

대식세포는 병원체 등으로 인한 염증 반응 시에 nitric oxide(NO) 및 다양한 cytokine을 생산하여 감염 초기에 면역세포로써 생체방어에 중요한 역할을 한다(Higuchi et al., 1990).

본 연구에서는 미야베모자반 조효소 분해물이 대식세포인 RAW 264.7 세포에 미치는 세포 독성을 평가하고, 항염증 효과 실험에 적합한 농도 범위를 설정하기 위해 MTT assay를 실행하였다.

미야베모자반 분해물을 0, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 및 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 세포에 처리하여 배양한 결과, 분해물을 처리하지 않은 대조구와 비교하였을 때 모든 시간대에서 LPS 처리와 관계없이 모든 농도에서 RAW 264.7 세포에 대해 세포 증식능이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 15). 이는 모자반과 비틀대 모자반 에탄올 추출물에 대한 세포 독성 실험 결과, 세포 독성은 나타나지 않았으며 농도 의존적으로 세포 증식률이 증가하는 결과와 유사하다(Kim, 2012).

따라서 미야베모자반 조효소 분해물은 RAW 264.7 세포에 독성을 띠지 않았으며, 이후 RAW 264.7 세포를 이용한 미야베모자반 분해물의 항염증 효과 실험은 각각 0, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 및 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 범위로 진행하였다.

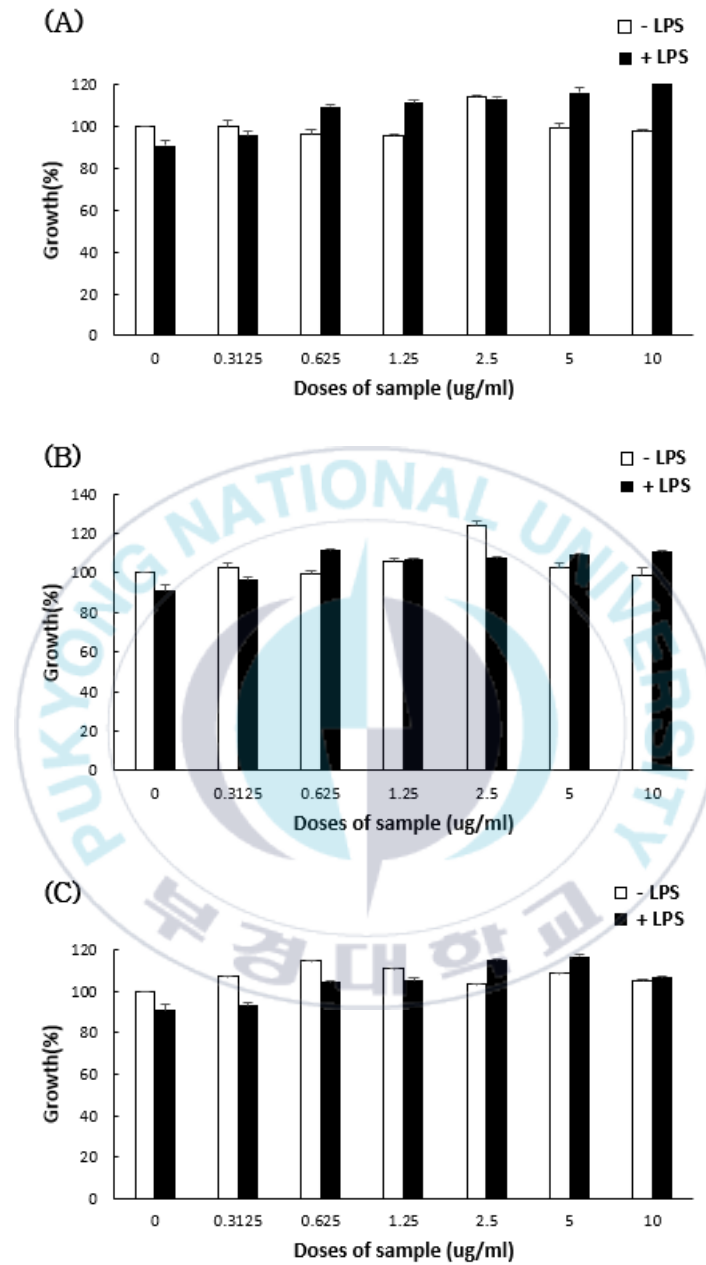


Fig. 15. Effect of enzymatic extracts of *Sargassum miyabei* with incubation time 0 h (A) 12 h (B) 72 h (C) on the cell viability in LPS-induced RAW 264.7 cells.

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

Nitric oxide 생성량 측정

Nitric oxide (NO)는 NO synthase (NOS) 효소에 의해 L-arginine으로부터 생성되는 반응성이 강한 자유라디칼로, 면역반응, 세포독성, 신경전달 및 혈관이완 등 다양한 생리학적 과정에 중요한 역할을 한다. 대식세포는 항원 침입 시 inducible NOS (iNOS)를 발현하여 NO를 합성하며, 적절한 수준의 NO는 세포 기능 유지에 기여한다. 그러나 LPS에 의해 과도하게 발현된 iNOS는 대량의 NO를 생성해 세포독성을 유발하고, 이는 조직 손상과 면역 체계 이상으로 이어질 수 있다(Korhonen et al., 2005; Xie and Nathan, 1994).

미야베모자반 조효소 분해물이 LPS 유도 염증 매개체인 NO의 생성에 미치는 영향을 확인하기 위해 MTT assay와 동일한 농도인 미야베모자반 분해물을 농도별로 (0, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 및 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 처리하여 생성된 NO를 griess 시약을 이용하여 측정하였다.

정상세포에 LPS를 처리하였을 때 NO 생성량이 증가하였고 미야베모자반 분해물 처리에 의해 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 16). 반응 전(0시간) 분해물의 경우 약 31.82%, 반응 12시간 분해물의 경우 50%, 반응 72시간 분해물의 경우 약 47.73%의 억제효과를 보였다. 또한 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 반응 전(0시간) 분해물 대비 반응 12시간 분해물은 약 26.67%, 반응 72시간 분해물은 약 23.33%의 억제효과를 보였다. 전체적으로 반응 12시간 분해물이 높은 NO 생성 억제능을 보였다. 이러한 결과는 미야베모자반 에탄올 추출물에 관한 연구(Kim et al., 2016), 짝잎모자반 에탄올 추출물에 관한 연구(Kim et al., 2017)에서 보인 NO 생성 억제능 결과와 유사하다. 갈조류에 포함된 황 함유 다당류인 fucoidan이 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에서 NO 생성과 iNOS 단백질 발현을 억제한다는 보고(Kim et al., 2008)를 바탕으로 갈조류인 미야베모자반의 NO 생성 억제효과에 영향을 미친 것으로 사료된다.

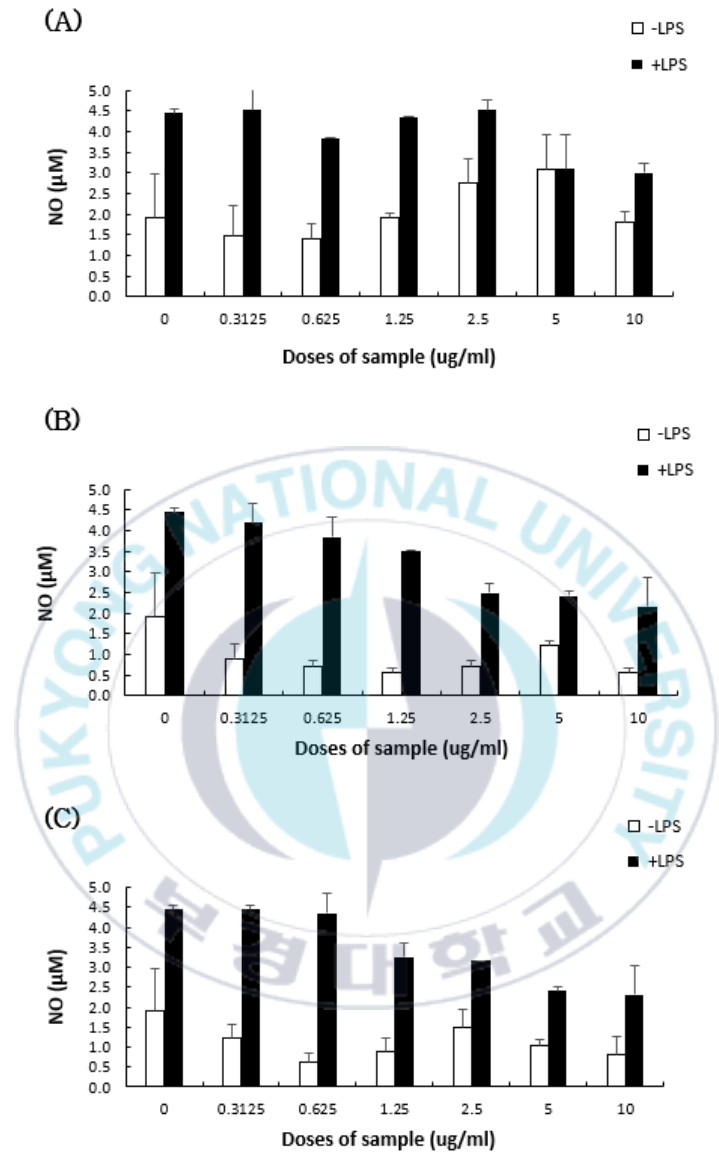


Fig. 16. Inhibitory effect of enzymatic extracts of *Sargassum miyabei* with incubation time 0 h (A) 12 h (B) 72 h (C) on production of nitric oxide in LPS-induced RAW 264.7 cells.

염증성 cytokine 분비량 측정

LPS와 같은 항원 자극에 의해 활성화된 대식세포는 IL-6, TNF- α 등의 cytokine을 분비하여 면역 반응을 조절한다. LPS에 의해 생성된 TNF- α 는 초기 염증 반응을 매개하는 매개체로 종양 세포를 파괴할 수 있는 능력을 가지고 있다. 하지만 지속적으로 염증을 촉진하여 만성적인 염증을 유발하게 되면 세포독성, 염증성 장 질환, 패혈성 쇼크 등의 자가면역 질환의 요인이 된다(Kim et al., 2014). IL-6는 간세포, 림프구, 대식세포 등 다양한 세포에서 분비되는 대표적인 cytokine이며 정상 상태에서는 B세포 분화 및 성장을 촉진한다. 반면, 과도하게 생산되면 류머티즘성 관절염, 크론병 등의 자가면역질환 및 악성 종양과 감염성 질환을 유발한다(Kishimoto, 2006).

따라서 미야베모자반 분해물을 LPS로 유도된 RAW 264.7 세포에 반응 시간별(0, 12 및 72 h), 농도별(0, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 및 10 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하여 염증성 cytokine인 TNF- α 와 IL-6의 생성 억제에 미치는 영향을 확인하였다. 정상세포에 LPS를 처리하였을 때 TNF- α 생성량이 증가하였고 시간별 미야베모자반 분해물 처리에 의해 농도 의존적으로 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 17). 반응 전(0시간), 반응 12시간, 반응 72시간 분해물 모두 각각 약 85.67%, 85.88%, 86.01%로 높은 억제능을 가지는 것으로 나타났다. IL-6의 경우 역시 미야베모자반 분해물 처리에 의해 농도 의존적으로 감소하였으며(Fig. 18), 반응 전(0시간), 반응 12시간, 반응 72시간 분해물 모두 각각 약 95.84%, 96.13%, 96.20%로 높은 억제능을 가지는 것으로 나타났다. TNF- α 와 IL-6 모두 분해물의 배양 시간에 따른 차이는 확인할 수 없었다.

이러한 결과는 미야베모자반 에탄올 추출물에 대한 염증성 cytokine 생성 억제 결과(Kim et al., 2016)와 유사하다. 결론적으로 미야베모자반 조효소 분해물이 LPS 자극으로 유도된 RAW 264.7 세포의 TNF- α , IL-6와 같은 염증성 cytokine의 생성을 효과적으로 억제하여 우수한

항염증 효과를 나타내었다. 또한 조효소를 활용한 저분자화된 해조류를 항염증 소재로 개발하여 산업적 활용이 기대된다.



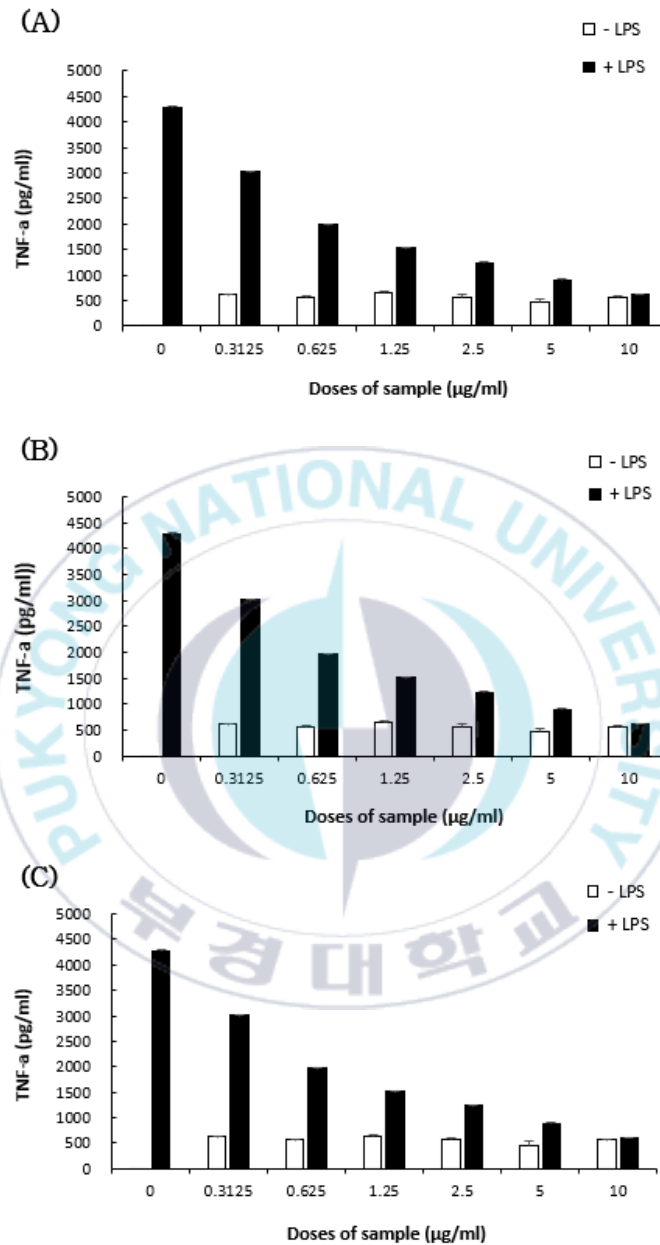


Fig. 17. Inhibitory effect of enzymatic extracts of *Sargassum miyabei* with incubation time 0 h (A) 12 h (B) 72 h (C) on the production of TNF- α in LPS- induced RAW 264.7 cells.

The levels of pro-inflammatory cytokines in the supernatant were measured by ELISA.

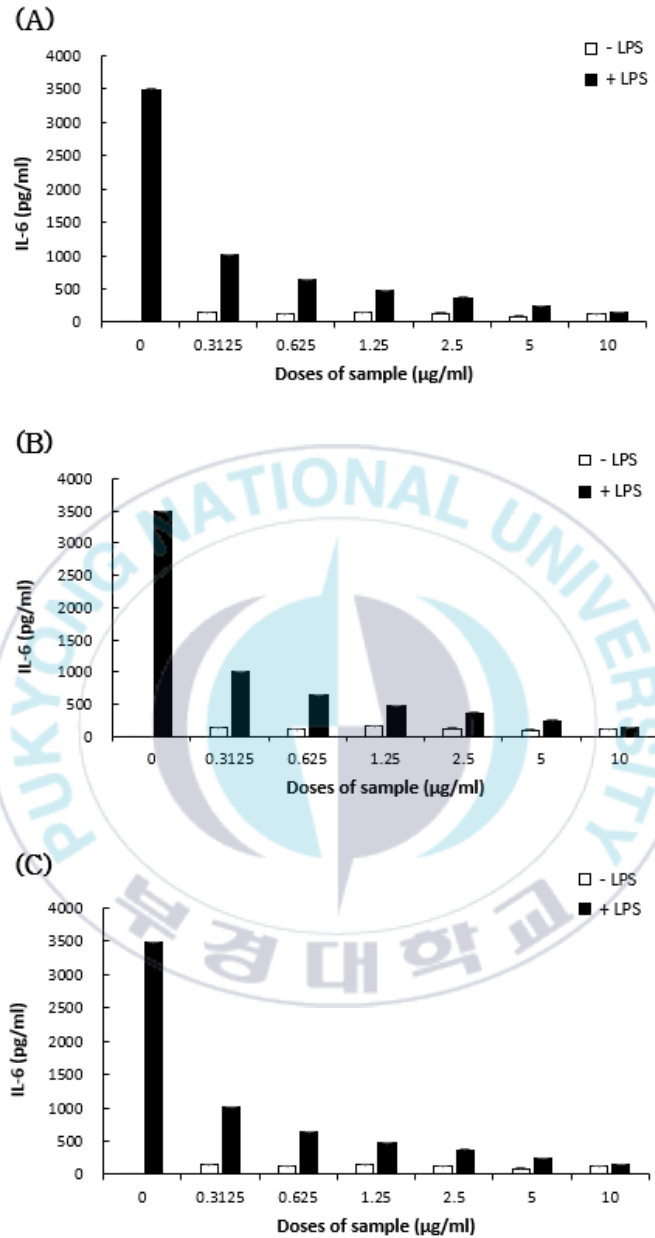


Fig. 18. Inhibitory effect of enzymatic extracts of *Sargassum miyabei* with incubation time 0 h (A) 12 h (B) 72 h (C) on the production of IL-6 in LPS- induced RAW 264.7 cells.

The levels of pro-inflammatory cytokines in the supernatant were measured by ELISA.

요 약

본 연구에서는 알긴산 분해 효소를 생산하는 균주인 *Shewanella oniedensis* PKA 1008 유래 조효소의 기질 특이성과 알긴산 분해패턴을 확인하였다. 또한 조효소를 이용하여 미야베모자반에 함유되어 있는 알긴산을 올리고당으로 저분자화하여 분해물의 특성 및 항염증 특성을 확인하고자 하였다.

1. 알긴산, PolyM, PolyG 분해물의 특성

- *S. oniedensis* PKA 1008 유래 조효소의 기질 특이성을 확인한 결과, alginate와 polyG 기질에 대한 환원당 함량은 유의적으로 완만하게 증가한 반면, polyM 기질은 반응12시간에서 급격한 증가를 나타냈다. 따라서 polyM > polyG > alginate 순으로 활성이 뛰어나 polyM 특이적이며 일부 polyG 에 대한 활성도 보였다.
- *S. oniedensis* PKA 1008 유래 조효소의 알긴산 분해패턴을 확인한 결과, D-mannuronic acid oligosaccharides의 경우, 효소가 작용할 수 있는 최소 인식 기질은 M6였으며 주요 생성물은 trimer였다. polyM 결과와 종합해 볼 때, polyM 기질에 대해서는 trimer 단위로 자르는 exolytic 효소임을 확인할 수 있었다. L-guluronic acid oligosaccharides의 경우, 효소가 작용할 수 있는 최소 인식 기질은 G4였으며 G4-6이 di-, tri-, tetramer로 저분자화되어 polyM보다 더 폭넓은 기질 선택성을 보였다. 또한 polyG TLC 결과와 종합해 볼 때, polyG 기질에 대해서는 DP2-4의 다양한 올리고당으로 자르므로 endolytic 효소임을 확인할 수 있었다.

- 알긴산 효소 분해물의 저분자화 특성을 분석하기 위해 ESI-MS 분석을 진행한 결과, 반응 48시간 이후 주요 생성물은 trimer였으며 527.09 m/z ($[\Delta DP3-H]^-$), 549.07 m/z ($[\Delta DP3-2H+Na]^-$) 및 571.05 m/z ($[\Delta DP3-3H+2Na]^-$)로 검출되었다. 또한 dimer는 351.06 m/z ($[\Delta DP2-H]^-$) 및 373.04 m/z ($[\Delta DP2-2H+Na]^-$)로 검출되었으며 약간 증가하였다.
- Alginate 분해물의 열분석 결과, DSC에서 나타난 70°C 부근 흡열피크는 탈수에 기인한 것이며 저분자화된 알긴산 분자가 수분 보유 능력에 영향을 주어 반응 48시간 분해물이 반응 전(0시간) 분해물보다 낮은 온도에서 흡열피크를 형성하고 피크면적이 감소함을 확인하였다. TGA 결과 또한 DSC와 비슷한 경향을 보여 반응 48시간 분해물이 저분자화됨에 따라 더 낮은 온도에서 급격한 중량 손실이 일어났다.

2. 미야베모자반 분해물의 특성 및 항염증 특성

- 미야베모자반 분해물의 pH 측정 결과, 반응 시간이 증가할수록 유의적으로 감소하였다.
- 미야베모자반 분해물의 색도 측정 결과, 명도(L*)는 유의적으로 감소하였으며, 적색도(a*)와 황색도(b*)는 유의적으로 증가하였다.
- 미야베모자반 분해물의 환원당 및 점도 측정 결과, 반응 72시간에서 2421.60 $\mu\text{g/mL}$ 로 반응 전(0시간) 대비 10배 이상의 수치를 나타냈으며, 점도는 반응 시간에 따라 감소하는 경향을 보여, 반응 72시간에서 2.01 cP로 가장 낮은 점도를 보였다.

- 미야베모자반 분해물의 TLC 분석 결과, 반응 전(0시간)에서는 저분자화된 뚜렷한 spot을 확인할 수 없었고, 반응 12시간부터 점차 저분자화되어 dimer, trimer, tetramer로 분해됨을 확인할 수 있었다. 반응 72시간에서는 더 이상 monomer로의 분해는 없었고 spot의 농도가 더욱더 짙어짐을 확인하였다.
- 미야베모자반 효소 분해물의 저분자화 특성을 분석하기 위해 ESI-MS 분석을 진행한 결과, 반응 72시간 이후 주요 생성물은 trimer였으며 527.09 m/z ($[\Delta DP3-H]^-$), 549.07 m/z ($[\Delta DP3-2H+Na]^-$) 및 571.05 m/z ($[\Delta DP3-3H+2Na]^-$)로 검출되었다. 또한 dimer는 373.04 m/z ($[\Delta DP2-2H+Na]^-$)에서 약간 증가하였다. 미야베모자반에는 알긴산뿐만 아니라 다양한 다당류가 함유되어 있을 것으로 예상되어 더 정확한 분석을 위해 효소 정제, 미야베모자반의 다당류 성분 분석, NMR, FT-IR과 같은 구조분석 등의 추가연구가 필요할 것으로 사료된다.
- 미야베모자반 분해물의 열분석 결과, DSC에서 나타난 80°C 부근 흡열피크는 탈수에 기인한 것이며 저분자화된 알긴산 분자가 수분 보유 능력에 영향을 주어 반응 72시간 분해물이 반응 전(0시간) 분해물보다 낮은 온도에서 흡열피크를 형성하고 피크면적이 약간 감소함을 확인하였다. TGA 결과에서는 저분자화됨에 따른 변화를 관찰할 수 없었다.
- 미야베모자반의 항염증 특성을 확인하기 위해 미야베모자반 조효소 분해물에 대한 세포 독성과 Nitric oxide (NO) 및 염증성

cytokine (TNF- α , IL-6)의 분비량을 측정 한 결과, 세포 독성은 나타나지 않았다.

- NO 생성량의 경우, 반응 전(0시간) 분해물에서 약 31.82%, 반응 12시간 분해물의 경우 50%, 반응 72시간 분해물의 경우 약 47.73%의 억제효과를 보였다. 또한 배양 시간별 억제효과는 반응 전(0시간) 분해물 대비 반응 12시간 분해물은 약 26.67%, 반응 72시간 분해물은 약 23.33%의 억제효과를 나타냈다.
- TNF- α 와 IL-6 생성량의 경우, 모두 미야베모자반 분해물 처리에 의해 농도 의존적으로 감소하였으며 반응 72시간 분해물에서 각각 약 86.01%, 96.20%로 높은 억제능을 가지는 것으로 나타났다. TNF- α 와 IL-6 모두 분해물의 배양 시간에 따른 차이는 확인할 수 없었다.

이에 따라 *Shewanella oniedensis* PKA 1008 유래 조효소에 의한 미야베모자반 분해물은 NO와 염증성 cytokine 생성을 억제하여 항염증 효과가 있는 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

- Ahmed, J., Shivhare, U. S., and Debnath, S. 2002. Colour degradation and rheology of green chilli puree during thermal processing. *Int J Food Sci Technol*, 37(1), 57–63.
- Ambra, R., Pastore, G., and Natella, F. 2023. The fate of chlorophylls in alkali-treated green table olives: A review. *Molecules*, 28(18), 6673. <https://doi.org/10.3390/molecules28186673>
- An, B. J., and Lee, J. T. 2000. An application and the natural stabilizer in the food industry. *Food Ind Nutr*, 5(3), 57–61.
- Bark, S. W., Kim, K. B. W. R., Kim, M. J., Kang, B. K., Pak, W. M., Ahn, N. K., Choi, Y. U., Park, J. H., Bae, N. Y., and Lim, S. M. 2015. Antioxidant effect of enzymatic hydrolysate from *Sargassum thunbergii* using *Vibrio crassostreae* PKA 1002 crude enzyme. *Microbiol Biotechnol Lett*, 43(2), 105–111.
- Beppu, F., Niwano, Y., Tsukui, T., Hosokawa, M., and Miyashita, K. 2009. Single and repeated oral dose toxicity study of fucoxanthin (FX), a marine carotenoid, in mice. *J Toxicol Sci*, 34(5), 501–510.
- Canjura, F. L., Schwartz, S. J., and Nunes, R. V. 1991. Degradation kinetics of chlorophylls and chlorophyllides. *J Food Sci*, 56(6), 1639–1643.
- Cheng, D., Liu, Z., Jiang, C., Li, L., Xue, C., and Mao, X. 2020. Biochemical characterization and degradation pattern analysis of a novel PL-6 alginate lyase from *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Food Chem*, 323, 126852. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126852>

- Cho, K. J., Lee, Y. S., and Ryu, B. H. 1990. Antitumor effect and immunology activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Korean J Fish Aquat Sci*, 23(5), 345–352.
- Cumashi, A., Ushakova, N. A., Preobrazhenskaya, M. E., D'Incecco, A., Piccoli, A., Totani, L., Tinari, N., Morozevich, G. E., Berman, A. E., Bilan, M. I., Usov, A. I., Ustyuzhanina, N. E., Grachev, A. A., Sanderson, C. J., Kelly, M., Rabinovich, G. A., Iacobelli, S., and Nifantiev, N. E. 2007. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology*, 17(5), 541–552.
- Din, N. A. S., Mohd Alayudin, A. S., Sofian-Seng, N.-S., Rahman, H. A., Mohd Razali, N. S., Lim, S. J., and Wan Mustapha, W. A. 2022. Brown algae as functional food source of fucoxanthin: A review. *Foods*, 11(15), 2235. <https://doi.org/10.3390/foods11152235>
- Engvall, E., and Perlmann, P. 1972. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA: III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol*, 109(1), 129–135.
- Falkeborg, M., Cheong, L. Z., Gianfico, C., Sztukiel, K. M., Kristensen, K., Glasius, M., Xu, X., and Guo, Z. 2014. Alginate oligosaccharides: Enzymatic preparation and antioxidant property evaluation. *Food Chem*, 164, 185–194.
- Gacesa, P. 1988. Alginates. *Carbohydr Polym*, 8(3), 161–182.
- Garcia-Perez, P., Lourenço-Lopes, C., Silva, A., Pereira, A. G., Fraga-Corral, M., Zhao, C., Xiao, J., Simal-Gandara, J., and Prieto, M. A. 2022. Pigment composition of nine brown algae from the

- Iberian northwestern coastline: influence of the extraction solvent. *Mar Drugs*, 20(2), 113. <https://doi.org/10.3390/md20020113>
- Garron, M. L., and Cygler, M. 2010. Structural and mechanistic classification of uronic acid-containing polysaccharide lyases. *Glycobiology*, 20(12), 1547–1573.
- Gåserød, O., Smidsrød, O., and Skjåk-Bræk, G. 1998. Microcapsules of alginate–chitosan-I: a quantitative study of the interaction between alginate and chitosan. *Biomaterials*, 19(20), 1815–1825.
- Goh, C. H., Heng, P. W. S., and Chan, L. W. 2012. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydr Polym*, 88(1), 1–12.
- Han, K. H., Choi, M. S., Ahn, C. K., Youn, M. J., and Song, T. H. 2002. Soboru bread enriched with dietary fibers extracted from kombu. *Korean J Soc Food Cookery Sci*, 18(6), 619–624.
- He, S., Zhang, Y., Yuan, Y., Farooq, M. A., Fayyaz, M. S., Su, D., Zeng, Q., and Rahaman, A. 2022. Process optimization and antioxidative activity of polyphenols derived from different seaweed species *Sargassum Miyabei*, *Undaria Pinnatifida* Suringar, and *Sargassum Thunbergii*. *Food Sci Nutr*, 10(6), 2021–2028.
- Higuchi, M., Higashi, N., Taki, H., and Osawa, T. 1990. Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J Immunol*, 144(4), 1425–1431.

- Horn, S. J., Moen, E., and Østgaard, K. 1999. Direct determination of alginate content in brown algae by near infra-red (NIR) spectroscopy. *J Appl Phycol*, 11, 9–13.
- Inoue, A. 2018. Characterization of PL-7 family alginate lyases from marine organisms and their applications. *Methods Enzymol*, 605, 499–524.
- Jin, W., Wang, J., Ren, S., Song, N., and Zhang, Q. 2012. Structural analysis of a heteropolysaccharide from *Saccharina japonica* by electrospray mass spectrometry in tandem with collision-induced dissociation tandem mass spectrometry (ESI-CID-MS/MS). *Mar Drugs*, 10(10), 2138–2152.
- Kam, N., Park, Y. J., Lee, E. Y., and Kim, H. S. 2011. Molecular identification of a polyM-specific alginate lyase from *Pseudomonas* sp. strain KS-408 for degradation of glycosidic linkages between two mannuronates or mannuronate and guluronate in alginate. *Can J Microbiol*, 57(12), 1032–1041.
- Kim, B. H., Oh, J. M., Kang, K. W., Kwak, S. H., Yun, S. Y., Lee, C. H., Lee, H. S., and Kim, S. K. 2008. Evaluation of oxy-radical scavenging capacity of fucoidan. *Environ Anal Health Toxicol*, 23(1), 41–45.
- Kim, B. W., Kim, J. I., Kim, H. R., and Byun, D. S. 2014. Anti-inflammatory effect of an ethyl acetate fraction from *Myagropsis yendoi* on lipopolysaccharides-stimulated RAW 264.7 cells. *Korean J Fish Aquat Sci*, 47(5), 527–536.
- Kim, D. S., Lee, S. G., Kim, M. y., Hahn, D. y., Jung, S. K., Cho, T. O., and Nam, J. O. 2020. *Sargassum miyabei* yendo brown algae exert anti-oxidative and anti-adipogenic effects on 3t3-l1

- adipocytes by downregulating PPAR γ . *Medicina*, 56(12), 634.
<https://doi.org/10.3390/medicina56120634>
- Kim, H. J., Lee, S. M., Kim, S. K., and Lee, J. H. 2012. Characterization of *Erwinia tasmaniensis* isolated from nuruk producing alginate lyase. *Appl Chem Eng*, 23(1), 100–104.
- Kim, H. T., Chung, J. H., Wang, D., Lee, J., Woo, H. C., Choi, I. G., and Kim, K. H. 2012. Depolymerization of alginate into a monomeric sugar acid using Alg17C, an exo-oligoalginate lyase cloned from *Saccharophagus degradans* 2–40. *Appl Microbiol Biotechnol*, 93, 2233–2239.
- Kim, J. H., Kim, Y. H., Kim, S. K., Kim, B. W., and Nam, S. W. 2011. Properties and industrial applications of seaweed polysaccharides-degrading enzymes from the marine microorganisms. *Microbiol Biotechnol Lett*, 39(3), 189–199.
- Kim, M. J. 2012. Anti-inflammatory activity of the *Sargassum fulvellum* and *Sargassum sagamianum* ethanol extracts. Master Thesis. Pukyong National University, Busan, Korea.
- Kim, M. J., Bae, N. Y., Bark, S. W., Kim, K. B. W. R., Park, J. H., Park, S. H., and Ahn, D. H. 2015. Anti-inflammatory effect of alginate oligosaccharides produced by an alginate-degrading enzyme from *Shewanella oneidensis* PKA1008 on LPS-induced RAW 264.7 cells. *Korean J Fish Aquat Sci*, 48(6), 888–897.
- Kim, M. J., Bae, N. Y., Kim, K. B. W. R., Park, S. H., Jang, M. R., Im, M. H., and Ahn, D. H. 2016. Anti-inflammatory activity of ethanol extract of *Sargassum miyabei* Yendo via inhibition of NF- κ B and MAPK activation. *Microbiol Biotechnol Lett*, 44(4), 442–451.

- Kim, M. J., Kim, K. B. W. R., Park, S. H., Choi, J. S., and Ahn, D. H. 2017. Inhibitory activity of *Sargassum hemiphyllum* ethanol extract on inflammatory response in LPS-induced RAW 264.7 cells and mouse model. *Korean J Biotechnol Bioeng*, 32(4), 319–327.
- Kim, S. J., Lee, G., Moh, S. H., Park, J. b., Auh, C. K., Chung, Y. j., Ryu, T. K., and Lee, T. K. 2013. Phenolic contents and antioxidant activities of six edible seaweeds. *J Korea Acad Ind Coop Soc*, 14(6), 3081–3088.
- Kim, Y. Y., and Cho, Y. J. 2000. Studies on physicochemical and biological properties of depolymerized alginate from sea tangle, *Laminaria japonicus* by thermal decomposition-1. Changes in viscosity, average molecular weight and chemical structure of depolymerized alginate. *Korean J Fish Aquat Sci*, 33(4), 325–330.
- Kishimoto, T. 2006. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res Ther*, 8, 1–6.
- Korhonen, R., Lahti, A., Kankaanranta, H., and Moilanen, E. 2005. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 4(4), 471–479.
- Kulikova, I. V., and Khotimchenko, S. V. 2000. Lipids of different thallus regions of the brown alga *Sargassum miyabei* from the Sea of Japan. *Russ J Mar Biol*, 26, 54–57.
- Lee, C. J., Song, E. J., Kim, K. B. W. R., Jung, J. Y., Kwak, J. H., Choi, M. K., Kim, M. J., Kim, D. H., SunWoo, C., and Park, J. G. 2011. Effect of gamma irradiation on immune activity and physicochemical properties of *Myagropsis myagroides* water extract. *Korean J Fish Aquat Sci*, 44(1), 50–57.

- Lee, J. E. 2021. Effect of properties and anti-inflammatory of *Sargassum muticum* and *Sargassum patens* C. Agardh extracts using crude enzyme from *Shewanella oneidensis* PKA 1008. Master Thesis. University of Pukyong. Busan Korea.
- Lee, S. T., Jeong, Y. R., Ha, M. H., Kim, S. H., Byun, M. W., and Jo, S. K. 2000. Induction of nitric oxide and TNF- α by herbal plant extracts in mouse macrophages. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 29(2), 342–348.
- Li, D., Chen, L., Yi, X., Zhang, X., and Ye, N. 2010. Pyrolytic characteristics and kinetics of two brown algae and sodium alginate. *Bioresour Technol*, 101(18), 7131–7136.
- Li, J. W., Dong, S., Song, J., Li, C. B., Chen, X. L., Xie, B. B., and Zhang, Y. Z. 2011. Purification and characterization of a bifunctional alginate lyase from *Pseudoalteromonas* sp. SM0524. *Mar Drugs*, 9(1), 109–123.
- Liang, Q., Huang, Y., Liu, Z., Xiao, M., Ren, X., Liu, T., Li, H., Yu, D., Wang, Y., and Zhu, C. 2023. A recombinant alginate lyase Algt1 with potential in preparing alginate oligosaccharides at high-concentration substrate. *Foods*, 12(21), 4039. <https://doi.org/10.3390/foods12214039>
- Minghou, J., Yujun, W., Zuhong, X., and Yucai, G. (1984). Studies on the M: G ratios in alginate. Eleventh International Seaweed Symposium: Proceedings of the Eleventh International Seaweed Symposium, held in Qingdao, People's Republic of China, June 19–25, 1983.
- Nakashima, H., Kido, Y., Kobayashi, N., Motoki, Y., Neushul, M., and Yamamoto, N. 1987. Purification and characterization of an avian myeloblastosis and human immunodeficiency virus reverse

- transcriptase inhibitor, sulfated polysaccharides extracted from sea algae. *Antimicrob Agents Chemother*, *31*(10), 1524–1528.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J Biol Chem*, *153*(2), 375–380.
- Park, H. H., Kam, N., Lee, E. Y., and Kim, H. S. 2012. Cloning and characterization of a novel oligoalginate lyase from a newly isolated bacterium *Sphingomonas* sp. MJ-3. *Mar Biotechnol*, *14*, 189–202.
- Park, S. H. 2017. Characterization and functionality of enzymatic extract of *Sargassum coreanum* using crude enzyme from *Shewanella oneidensis* PKA 1008. Master Dissertation. University of Pukyong. Busan Korea.
- Park, Y. M., Won, J. H., Yun, K. J., Ryu, J. H., Han, Y. N., Choi, S. K., and Lee, K. T. 2006. Preventive effect of *Ginkgo biloba* extract (GBB) on the lipopolysaccharide-induced expressions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 via suppression of nuclear factor- κ B in RAW 264.7 cells. *Biol Pharm Bull*, *29*(5), 985–990.
- Pathak, T. S., Kim, J. S., Lee, S. J., Baek, D. J., and Paeng, K. J. 2008. Preparation of alginic acid and metal alginate from algae and their comparative study. *J Polym Environ*, *16*, 198–204.
- Peng, J., Yuan, J. P., Wu, C. F., and Wang, J. H. 2011. Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: Metabolism and bioactivities relevant to human health. *Mar Drugs*, *9*(10), 1806–1828.
- Poojary, M. M., Barba, F. J., Aliakbarian, B., Donsì, F., Pataro, G., Dias, D. A., and Juliano, P. 2016. Innovative alternative technologies

- to extract carotenoids from microalgae and seaweeds. *Mar Drugs*, 14(11), 214. <https://doi.org/10.3390/md14110214>
- Rehm, B., and Valla, S. 1997. Bacterial alginates: biosynthesis and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 48, 281–288.
- Sloan, A. E. 2002. The top 10 functional food trends: the next generation. *Food Technol*, 56(4), 32–57.
- Soares, J. P., Santos, J. E., Chierice, G. O., and Cavalheiro, E. T. G. 2004. Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. *Eclética Química*, 29, 57–64.
- Song, E. J., Lee, S. Y., Kim, K. B. W. R., Park, J. G., Kim, J. H., Lee, J. W., Byun, M. W., and Ahn, D. H. 2007. Effect of gamma irradiation on the physical properties of alginic acid and λ -carrageenan. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 36(7), 902–907.
- Stevens, R. A., and Levin, R. E. 1976. Viscometric assay of bacterial alginate. *Appl Environ Microbiol*, 31(6), 896–899.
- Sunwoo, C., Kim, K. B. W. R., Kim, D. H., Jung, S. A., Kim, H. J., Jeong, D. H., Jung, H. Y., Kang, B. K., Bark, S. W., and Lim, S. M. 2013. Optimization of conditions for the production and properties of alginate-degrading crude enzyme from *Shewanella oneidensis* PKA 1008. *Microbiol Biotechnol Lett*, 41(3), 372–378.
- Surits, V. V., Usoltseva, R. V., Shevchenko, N. M., Thinh, P. D., and Ermakova, S. P. 2020. Structural characteristics and anticancer activity in vitro of fucoidans from brown seaweeds *Sargassum miyabei* and *S. oligocystum*. *Chem Nat Compd*, 56, 34–38.
- Terakado, S., Ueno, M., Tamura, Y., Toda, N., Yoshinaga, M., Otsuka, K., Numabe, A., Kawabata, Y., Murota, I., and Sato, N. 2012. Sodium alginate oligosaccharides attenuate hypertension and

- associated kidney damage in Dahl salt-sensitive rats fed a high-salt diet. *Clin Exp Hypertens*, 34(2), 99–106.
- Umezaki, I. 1983. Ecological studies of *Sargassum miyabei* Yendo in Maizuru bay, Japan Sea [Japan]. *Nippon Suisan Gakkai Shi*, 49(12), 1825–1834.
- Wang, H. Y., Chen, Z. F., Zheng, Z. H., Lei, H. W., Cong, H. H., and Zhou, H. X. 2023. A novel cold-adapted and high-alkaline alginate lyase with potential for alginate oligosaccharides preparation. *Molecules*, 28(17), 6190.
<https://doi.org/10.3390/molecules28176190>
- Wong, T. Y., Preston, L. A., and Schiller, N. L. 2000. Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. *Annu Rev Microbiol*, 54(1), 289–340.
- Wu, S., Shen, D., Hu, J., Zhang, H., and Xiao, R. 2016. Role of β -O-4 glycosidic bond on thermal degradation of cellulose. *J Anal Appl Pyrolysis*, 119, 147–156.
- Xie, Q. W., and Nathan, C. 1994. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J Leukoc Biol*, 56(5), 576–582.
- 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 Thesis. Pukyong National University, Busan, Korea.
- Yao, J., Zhou, Y., Chen, X., Ma, F., Li, P., and Chen, C. 2018. Effect of sodium alginate with three molecular weight forms on the water holding capacity of chicken breast myosin gel. *Food Chem*, 239, 1134–1142.

- Yokose, T., Nishikawa, T., Yamamoto, Y., Yamasaki, Y., Yamaguchi, K., and Oda, T. 2009. Growth-promoting effect of alginate oligosaccharides on a unicellular marine microalga, *Nannochloropsis oculata*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 73(2), 450–453.
- Zhang, D., Fujii, I., Lin, C., Ito, K., Guan, H., Zhao, J. e., Shinohara, M., and Matsukura, M. 2008. The stimulatory activities of polysaccharide compounds derived from algae extracts on insulin secretion in vitro. *Biol Pharm Bull*, 31(5), 921–924.
- Zhang, Z., Yu, G., Zhao, X., Liu, H., Guan, H., Lawson, A. M., and Chai, W. 2006. Sequence analysis of alginate-derived oligosaccharides by negative-ion electrospray tandem mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 17, 621–630.
- Zheng, Y., Wang, Y., Dan, M., Li, Y., Zhao, G., and Wang, D. 2023. Characterization of degradation patterns and enzymatic properties of a novel alkali-resistant alginate lyase AlyRm1 from *Rubrivirga marina*. *Curr Res Food Sci*, 6, 100414. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.100414>
- Zhu, B., Chen, M., Yin, H., Du, Y., and Ning, L. 2016. Enzymatic hydrolysis of alginate to produce oligosaccharides by a new purified endo-type alginate lyase. *Mar drugs*, 14(6), 108. <https://doi.org/10.3390/md14060108>
- Zhu, B., and Yin, H. 2015. Alginate lyase: Review of major sources and classification, properties, structure–function analysis and applications. *Bioengineered*, 6(3), 125–131.