

Shewanella oneidensis PKA 1008의 알긴산 분해 조효소 생산 최적 조건과 조효소의 특성

선우찬¹, 김꽃봉우리², 김동현¹, 정슬아¹, 김현지¹, 정다현¹, 정희예¹, 강보경¹, 박시우¹, 임성미³, 홍용기⁴, 안동현^{1*}

¹부경대학교 식품공학과/식품연구소

²부경대학교 수산과학연구소

³동명대학교 식품공학과

⁴부경대학교 생물공학과

Received : December 27, 2012 / Revised : May 7, 2013 / Accepted : May 9, 2013

Optimization of Conditions for the Production and Properties of Alginate-degrading Crude Enzyme from *Shewanella oneidensis* PKA 1008. Sunwoo, Chan¹, Koth-Bong-Woo-Ri Kim², Dong-Hyun Kim¹, Seul-A Jung¹, Hyun-Jee Kim¹, Da-Hyun Jeong¹, Hee-Ye Jung¹, Bo-Kyeong Kang¹, Si-Woo Bark¹, Sung-Mee Lim³, Yong-Ki Hong⁴, and Dong-Hyun Ahn^{1*}.

¹Department of Food Science & Technology/Institute, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea, ²Institute of Fisheries Sciences, Pukyong National University, Busan 619-911, Korea, ³Department of Food Science & Technology Tongmyong University, Busan 608-735, Korea, ⁴Department of Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

An alginate-degrading bacterium, identified as *Shewanella oneidensis* PKA 1008 by 16S ribosomal RNA sequence analysis, was isolated from the green alga *Ulva pertusa*. Optimal conditions for the alginate-degrading ability of its crude enzyme were then determined. The optimal culture conditions for the growth of *S. oneidensis* PKA 1008 were pH 9, 2% NaCl, 30°C, and 24 hours incubation time. The crude enzyme produced by *S. oneidensis* PKA 1008 showed the highest alginate-degrading activity at pH 9, 30°C and produced 1.001 g of reducing sugar per liter in 3.5% (w/v) sodium alginate for 1 hour.

Keywords: Alginate-degrading crude enzyme, *Shewanella oneidensis* PKA 1008

현재 해조류는 새로운 기능성 소재로 많은 연구가 이루어지고 있는데, 이는 육상과는 다른 환경에 서식 하는 해조류의 특성상 육상 생물과는 다른 생리활성 물질을 함유할 것으로 기대되고 있기 때문이며 해조류의 풍부한 다당류가 새로운 생리활성 물질의 보고라고 할 수 있기 때문이다[10]. 이러한 해조류의 특이적 생육 환경으로 기인한 기능성으로는 항종양[15], 항혈액응고[23] 및 면역력 증강[2] 등이 알려져 있다. 해조류의 기능성 성분은 녹조류(green algae), 홍조류(red algae) 및 갈조류(brown algae)의 골격, 구성 및 저장 다당류에서 많이 찾을 수 있으며, 대표적인 것은 다시마(*Laminaria japonica*), 감태(*Ecklonia cava*), 미역(*Undaria pinnatifida*) 및 모자반(*Sargassum fulvellum*)과 같은 갈조

류에 포함되어 있는 알긴산이다. 알긴산은 갈조류 세포벽 구성 다당류로서 2종류의 uronic acid인 D-mannuronic acid와 L-guluronic acid가 다양한 비율로 1,4 glycoside 결합을 하고 있는 polyuronide이다[26]. 알긴산은 분자량, 결합 순서, 결합 구조에 따라 다양한 겔형성능, 점도 증진능, 수분 흡수능, 결합능 및 필름 형성능 등의 물리적 특징을 가지며, 이러한 특징은 식품산업에서 안정제, 보습제 및 증점제로 이용되고 있다[8]. 또한 알긴산은 난소화성 특성을 부각시켜 식이섬유로서 변비 치유[3], 비만 억제 등의 성인병 예방 식품으로 기대되고 있으며[4], 중금속 배출 및 콜레스테롤 배출 등의 효능이 보고되고 있다[9].

이와 같은 다양한 기능성이 밝혀지면서 알긴산의 이용을 확대하기 위해 많은 연구가 이루어지고 있지만, 상온에서 용해 시간이 길고 농도가 높아짐에 따라 고점도 특성을 보여 산업적 이용이 제한적이다. 이를 해결하기 위해 알긴산의 저분자화 방법이 제시되고 있으며, 산업적 이용이 가능한 알긴

*Corresponding author

Tel: +82-51-629-5831, Fax: +82-51-629-5824

E-mail: dhahn@pknu.ac.kr

© 2013, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

산 올리고당 생산을 위해 알긴산 분해 효소에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다.

현재 해양 환경, 해양 동물 및 미생물 유래의 알긴산 분해 효소의 탐색과 생화학 및 분자생물학적 연구가 활발히 이루어지고 있다[18]. 알긴산 분해 효소는 성게, 전복, 소라 등 해조류 섭식 동물[30] 및 해수와 해저 토양 유래 미생물인 *Azotobacter vinelandii* [7], *Vibrio* sp. [27], *Pseudomonas* sp. [17], *Klebsiella aerogenes* [13], *Flabobacterium* sp. [1], *Alginovibrio aquatilis* [24] 등에서 생산하는 것으로 알려져 있지만 알긴산 분해 효소를 고효율로 생산하는 미생물에 관한 보고는 아직 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 알긴산 올리고당을 효소적으로 제조하기 위한 기초연구로서, 분해중인 해조류 및 그 주변 해수로부터 알긴산 분해 활성이 우수한 미생물을 탐색하고, 미생물이 생성한 알긴산 분해 조효소의 분해 특성을 확인하고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 alginic acid sodium salt from brown algae (Aldrich Chemical Co., USA)를 사용하였으며, marine broth (MB, Difco, USA) 및 marine agar (MA, Difco, USA)를 사용하였다.

알긴산 분해 미생물의 분리 및 동정

부산의 송정 연안에서 분해중인 해조류 *Ulva pertusa*를 채집한 후 멸균된 2% NaCl phosphate buffer (pH 7.4)을 이용하여 희석하였다. 희석액은 MA 배지에 분주·도말 한 후 30°C에서 24시간 배양하였으며, 생성된 colony 중에서 형태적으로 다른 colony를 선택하였다. 선택한 colony는 알긴산 분해능을 확인하기 위해 4% 알긴산과 10⁶ cfu/ml 농도의 균배양액을 1:1 혼합하여 30°C에서 24시간 반응 후 점도 및 환원당 함량을 측정하였다. 이 중 알긴산 분해능이 높은 colony는 (주)마크로젠에 의뢰하여 16S rRNA sequence analysis로 분석하였고 이후 16S rDNA 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 blast server를 사용하여 염기서열을 비교 분석하여 균들을 동정하였다.

분리·동정된 알긴산 분해 미생물의 생육 특성 확인

분리·동정된 알긴산 분해 미생물의 최적 생육 조건(pH, NaCl, 배양 온도 및 배양 시간)을 확인하기 위해 MB 배지를 기본 배지로 사용하였고, 균은 10⁶ cfu/ml 농도로 접종하여 각 실험 조건에서 배양한 후 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 먼저, pH 확인을 위해 MB 배지를 0.1 N 및 1 N

HCl과 0.1 N 및 1 N NaOH로 pH 2-10으로 조정하였으며, 균을 접종 후 30°C에서 24시간 배양하였다. 최적 NaCl 농도를 확인하기 위해 최적 pH인 pH 9로 조정된 MB 배지의 NaCl 농도를 2-8%로 조정된 후 균을 접종하고 30°C에서 24시간 배양하였다. 최적 pH 및 NaCl 농도인 pH 9 및 2% NaCl로 조정된 MB 배지에 균을 접종 후 배양 온도를 10-50°C로 조정하고 24시간 배양하여 최적 온도 조건을 확인하였고, pH 9, 2% NaCl 및 30°C 조건에서 균을 36시간까지 배양하며 3시간 간격으로 균체량을 측정하여 최적 배양 시간 조건을 확인하였다.

알긴산 분해 조효소액 제조

분리·동정한 알긴산 분해균을 최적 생육 조건(pH 9, 2% NaCl, 30°C 및 배양 24시간)으로 대량 배양하였으며, 배양액을 원심분리기(SUPRA 22K, Hanil Science Co., Korea)로 12,000 × g, 30 min, 4°C 조건으로 원심 분리하여 상층액과 침전물을 분리하였고, 상층액을 조효소로 하였다.

알긴산 분해 조효소의 특성 확인

분리·동정한 알긴산 분해균이 생성한 조효소의 최적 알긴산 분해 pH, 온도, 알긴산 농도 및 반응 시간 조건을 확인하기 위해 점도 및 환원당을 측정하였다. 점도 측정은 점도계(LVLTDV-II, Brookfield Co., USA)를 이용하여 Richard 등 [21]의 방법을 참고하여 25°C, 52 cP 및 0.5 rpm 조건에서 실험을 수행하였다. 환원당 측정은 Somogyi-Nelson법[19]으로 520 nm에서 표준당(glucose)으로 작성한 검량 곡선으로 환원당 함량을 정량하였다. 효소 1 unit는 1분에 1 μmole의 환원당을 생산하는 효소양으로 정의하였고, 각 실험 조건에서 최대 활성을 보인 것을 100%로 간주하고 상대 활성으로 나타내었다. 최적 pH 조건을 확인하기 위해 0.1 N 및 1 N HCl과 0.1 N 및 1 N NaOH를 이용하여 pH 2-10까지 조정하였으며, 알긴산과 조효소를 1:1 혼합 후 30°C에서 24시간 반응시켰다. pH 9 조건에서 온도를 10-50°C로 달리하여 알긴산과 조효소 1:1 혼합물을 24시간 반응 시킨 후 최적 온도 조건을 확인하였으며, 최적 알긴산 농도를 확인하기 위해 1-9% 농도의 알긴산을 조효소와 1:1 혼합한 후 pH 9 및 30°C 조건에서 24시간 반응 시켰다. 또한 반응 시간에 따른 조효소의 알긴산 분해능을 확인하기 위해 pH 9, 30°C 조건에서 7% 알긴산과 조효소를 1:1 혼합한 후 60시간까지 반응시키며 시간별로 분해정도를 확인하였다.

결과 및 고찰

알긴산 분해균의 분리 및 동정

부산 송정연안에서 채취한 분해중인 해조류 *Ulva pertusa*

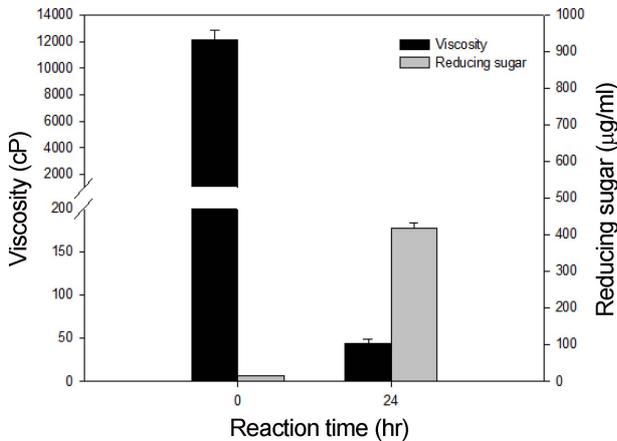


Fig. 1. The alginate degrading ability of isolated marine bacteria measured by viscomerty and reducing sugar assay.

```

1 TATATTTTT TTTTCTCAG ATTGAACGCT GCGGCGAGGC CTAACACATG
51 CAAGTCGAGC GGCAGCACAA GGGAGTTTGC TCCTGAGGTG GCGAGCGGCG
101 GACGGGTGAG TAATGCCTAG GGATCTGCCC AGTCGAGGGG GATAACAGTT
151 GGAAACGACT GCTAATACCG CATAACGCCCT ACGGGGGAAA GGAGGGGACC
201 TTCGGGCCTT CCGCGATTGG ATGAACCTAG GTGGGATTAG CTAGTTGGTG
251 AGGTAATGGC TCACCAAGGC GACGATCCCT AGCTGTTCTG AGAGGATGAT
301 CAGCCACACT GGGACTGAGA CACGGCCAG ACTCCTACGG GAGGAGCAG
351 TGGGAATAT TGCACAATGG GCGAAAGCCT GATGCAGCCA TGCCGCGTGT
401 GTGAAGAAGG CCTTCGGGTT GTAAAGCACT TTCAGTAGGG AGGAAAGGTT
451 ATTGCTTAAT ACTCATTAGC TGTGACGTTA CCTACAGAAG AAGGACCGGC
501 TAACTCCGTG CCAGCAGCCG CGGTAATACG GAGGGTCCGA GCGTTAATCG
551 GAATTAAGTG GCGTAAAGCG TGCGCAGGCG GTTTGTTAAG CCAGATGTGA
601 AATCCCCGGG CTCAACCTGG GAATTGCATT TGGAACTGGC GAACTAGAGT
651 CTTGTAGAGG GGGGTAGAAT TCCAGGTGTA GCGGTGAAAT GCGTAGAGAT
701 CTGGAGGAAT ACCGGTGGCG AAGCGGCCCC CCTGGACAAA GACTGACGCT
751 CATGCACGAA AGCGTGGGGA GCAAACAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCCA
801 CGCCGTAAAC GATGTCTACT CGGAGTTTGG TGTCTTGAAC ACTGGGCTCT
851 CAAGCTAACG CATTAAAGTAG ACCGCCTGGG GAGTACGGCC GCAAGTTAA
901 AACTCAAATG AATTGACGGG GGCCCGCACA AGCGGTGGAG CATGTGGTTT
951 AATTGATGTC AACGCGAAGA ACCTTACCTA CTCTTGACAT CCACAGAAGA
1001 TTGCAGAGAT GCGATTGTGC CTTCGGGAAC TGTGAGACAG GTGCTGCATG
1051 GCTGTCGTCA GCTCGTGTG TGAATGTTG GGTAAAGTCC CGCAACGAGC
1101 GCAACCCCTA TCCTTATTTG CCAGCACGTA ATGGTGGGAA CTCTAGGGAG
1151 ACTGCCGGTG ATAAACCGGA GGAAGGTGGG GACGACGTCA AGTCATCATG
1201 GCCCTTACGA GTAGGGTAC ACACGTGCTA CAATGGCGAG TACAGAGGGT
1251 TGCAAAGCCG CAGAGTGGAG CTAATCTCAC AAAGCTCGTC GTAGTCCGGA
1301 TTGGAGTCTG CAACTCGACT CCATGAAGTC GGAATCGCTA GTAATCGTGA
1351 ATCAGAATGT CACGGTGAAT ACGTTCCCGG GCCTTGTACA CACCGCCGCT
1401 CACACCATGG GAGTGGGCTG CAAAAGAAGT GGGTAGTTTA ACCTTCGGGA
1451 GAACGCTCAC CACTTTGTGG TTCATGACTG GGGTG
    
```

Fig. 2. 16S rRNA nucleotide particle sequence of *Shewanella oneidensis* PKA 1008.

로 부터 형태적으로 다른 다수의 colony를 분리하였으며, 그 중 알긴산 분해능이 우수한 colony는 환원당 생성량이 418 µg/ml이고, 99% 점도 감소율을 보였다(Fig. 1). 또한 이 균주의 16S rRNA 염기서열을 분석하였고(Fig. 2) NCBI blast search를 통해 확인한 결과, *Shewanella oneidensis* strain (NCBI accession #; AB447987)와 99% 유사성을 보여 *Shewanella oneidensis* strain으로 동정되었으며, *Shewanella oneidensis* PKA 1008로 명명하였다.

알긴산 분해균의 생육 특성 확인

S. oneidensis PKA 1008의 최적 pH 조건을 확인한 결과 (Fig. 3), pH 6, 7, 8, 9 및 10에서 흡광도값은 0.279, 0.309,

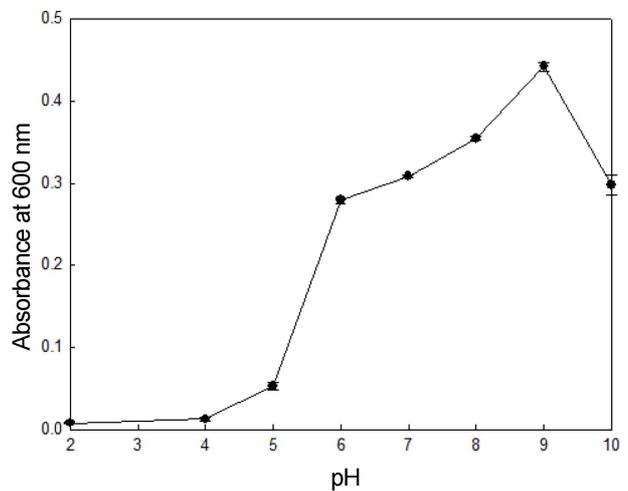


Fig. 3. Effect of pH on growth of *Shewanella oneidensis* PKA 1008.

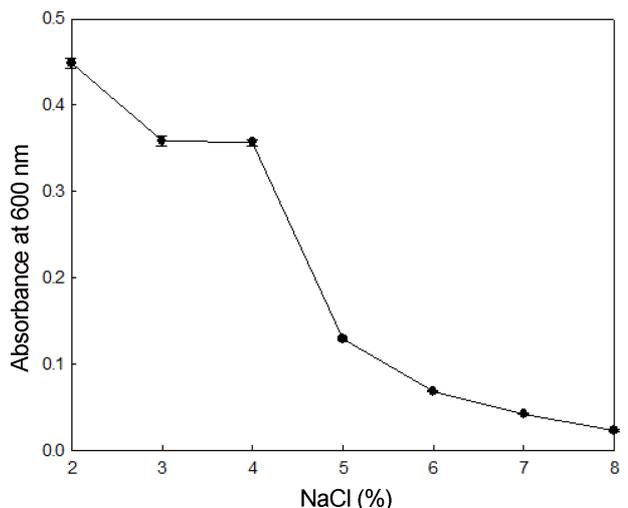


Fig. 4. Effect of NaCl concentration on growth of *Shewanella oneidensis* PKA 1008.

0.355, 0.442 및 0.298으로 측정되었으며 pH 9에서 흡광도 값이 가장 높게 측정되어 *S. oneidensis* PKA 1008은 pH 9에서 생육 활성이 가장 좋은 것으로 확인되었다.

해양에서 분리한 *S. oneidensis* PKA 1008의 NaCl 농도와 생육관계를 알아본 결과(Fig. 4), 2%와 3% 농도에서 흡광도 값이 각각 0.449, 0.385로 나타났고, 4% 이상에서는 흡광도 값이 급격히 줄어드는 것으로 측정되었다. 해양 유래 미생물의 경우 NaCl 농도가 3% 내외의 범위에서 최적 생육 조건인 것으로 알려져 있으며[14], 해양에서 분리한 알긴산 분해균인 *Bacillus licheniformis* [29]와 *Methylobacterium* sp. HJM27 [11]은 2%와 2.5%가 최적 NaCl 농도인 것으로 알려져 있다. 또한 Joo 등[5]의 연구에서 해양에서 분리한 4종의 균주는 2.5-3.0% NaCl에서 알긴산 분해 활성이 높고 토양에

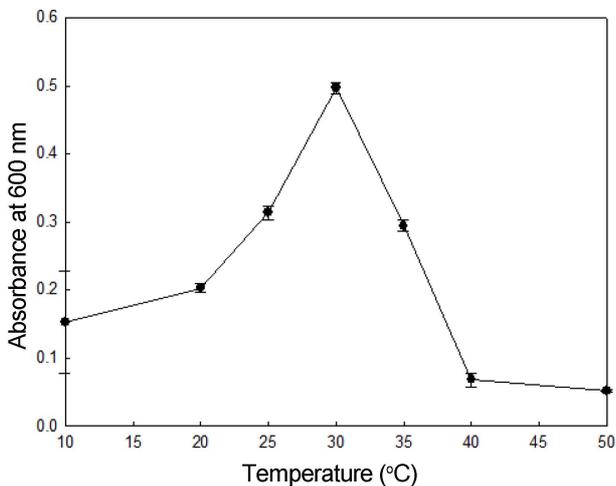


Fig. 5. Effect of temperature on growth of *Shewanella oneidensis* PKA 1008.

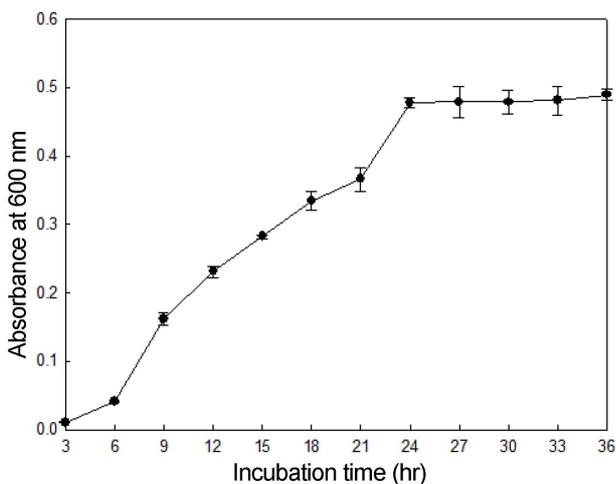


Fig. 6. Effect of incubation time on growth of *Shewanella oneidensis* PKA 1008.

서 분리한 1종의 균주는 0.85% NaCl 이하에서 분해 활성이 높다고 보고된바 있다. 이러한 결과를 미루어 볼 때, 해양 유래의 알긴산 분해균의 생육 및 알긴산 분해 활성이 NaCl 농도 2% 이상에서 높은 것으로 사료되어지며, 본 연구에서 분리한 알긴산 분해균 *S. oneidensis* PKA 1008 역시 2% NaCl에서 가장 높은 생육 활성을 보였다. *S. oneidensis* PKA 1008의 최적 생육 온도를 확인한 결과(Fig. 5), 10, 20, 25, 30 및 35°C에서 흡광도 값이 각각 0.153, 0.203, 0.313, 0.497 및 0.294로 30°C에서 균주의 활성이 최대인 것을 확인하였다. 이러한 결과는 해수 유래 미생물이 20-30°C 부근에서 생육 활성이 높은 것과 유사한 것으로 확인되었다.

S. oneidensis PKA 1008의 시간별 생육정도를 확인한 결과(Fig. 6), 배양 24시간까지는 균수가 증가하는 대수증식기로 확인되었으며, 배양 24시간부터 36시간까지는 균수가 완만하게 증가하는 정지기로 나타나 본 실험에서는 24시간을 *S. oneidensis* PKA 1008의 최적 생육 시간 조건으로 하였다.

이상으로 *S. oneidensis* PKA 1008의 최적 생육 조건은 pH 9, 2% NaCl, 30°C 및 배양 24시간인 것으로 확인되었으며, 이러한 해양 유래의 알긴산 분해균인 *Vibrio crassostreae* PKA 1002 [25]가 pH 9, 2% NaCl, 30°C 그리고 *Bacillus licheniformis* AL-577 [29]가 2% NaCl, pH 7.5 및 30°C인 결과와 유사한 것을 확인할 수 있었으며, *S. oneidensis* PKA 1008도 알칼리(pH 9) 및 중온(30°C) 영역에서 대량 배양하여 균체의 효소를 획득할 수 있을 것으로 사료되어진다.

알긴산 분해 조효소의 특성 확인

S. oneidensis PKA 1008이 생성한 알긴산 분해 조효소의 최적 pH를 확인한 결과(Fig. 7), pH 8, 9 및 10의 알칼리 영역에서 알긴산 분해능 활성이 높았으며 특히, pH 9에서 분해 활성이 가장 높은 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 *Pseudomonas* sp. SM0524 [16]과 *Agarivorans* sp. [12]이 각각 약알칼리 영역인 pH 8.5 및 강알칼리 영역인 pH 10 부근에서 알긴산 분해 효소의 활성이 최대인 결과와 유사한 것으로 나타났다.

조효소의 알긴산 분해 활성과 온도와의 상관관계를 확인한 결과(Fig. 8) 10°C에서는 분해 활성이 상당히 낮았으나, 분해활성이 20°C부터 증가하여 30°C에서 최대로 증가하였으며, 그 이후에는 활성이 감소하는 것으로 나타났다. 점도 측정 결과에서도, 30°C에서 110 cP로 가장 낮은 값을 나타내어 조효소의 알긴산 분해 활성이 최대로 보인 온도와 일치하였다. 이러한 결과는 *Azotobacter* sp. [7], *Enterobacter cloacae* M-1 [20] 및 *Alteromonas* sp. strain H-4 [22]가 생성한 효소의 최적 활성 온도가 30°C인 결과와 일치하였다. 또한 본 연구에서 분리한 균주의 최적 생육 온도가 30°C인 것으로 미루어 보아 미생물의 서식 환경이 분비하는 효소의

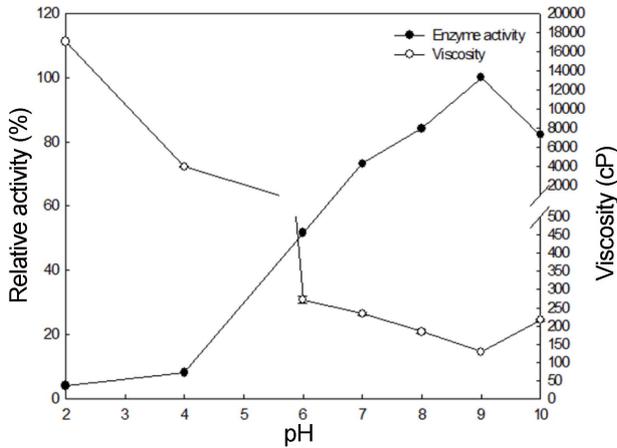


Fig. 7. Effect of pH on alginate degrading activity of crude enzyme measured by viscometry and reducing sugar assay. The mixture of alginate and crude enzyme were incubated for 24 h and viscosity was measured at 25°C, 52 cP and 0.5 rpm. The relative activity was shown as percentages of the enzyme activity.

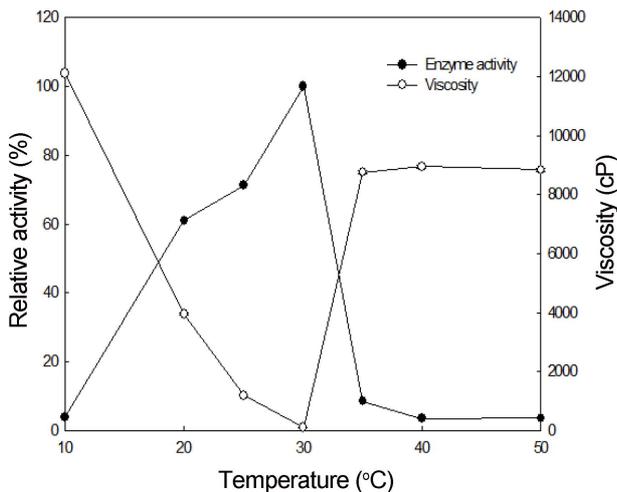


Fig. 8. Effect of temperature on alginate degrading activity of crude enzyme measured by viscometry and reducing sugar assay.

The mixture of alginate and crude enzyme were incubated for 24 h and viscosity was measured at 25°C, 52 cP and 0.5 rpm. The relative activity was shown as percentages of the enzyme activity.

최적 활성 온도와 상관 관계가 있는 것으로 사료되어 진다.

알긴산 농도를 0.5-4.5% (working concentration)로 달리 하여 조효소액과 1:1 혼합 후 30°C에서 24시간 반응 시킨 후 효소 활성을 측정하였다. 그 결과(Fig. 9), 3.5%인 알긴산 농도까지 조효소의 알긴산 분해 활성은 증가하였고, 그 이상의 농도에서는 활성이 다소 감소하여 최적 기질 농도가 3.5%임을 확인하였다. 이러한 결과는 일정 알긴산 농도 이상에서 균체 성장의 급격한 저하와 함께 알긴산 분해 활성이 저하

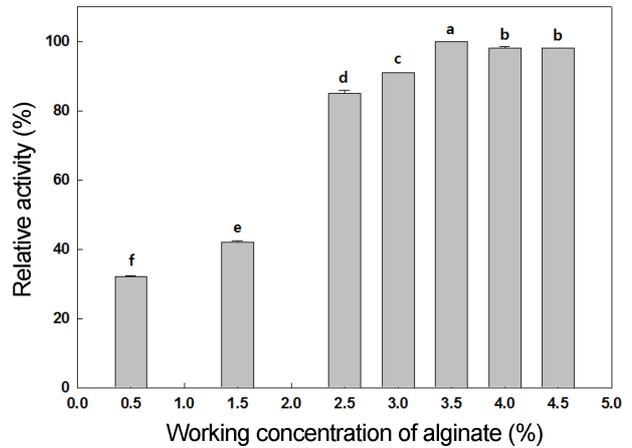


Fig. 9. Effect of alginate concentration on alginate degrading activity of crude enzyme measured by reducing sugar assay. The mixture of alginate and crude enzyme were incubated at 30°C for 24 h. The relative activity was shown as percentages of the enzyme activity. Means with different letters, displayed in figure, are significantly different ($p < 0.05$).

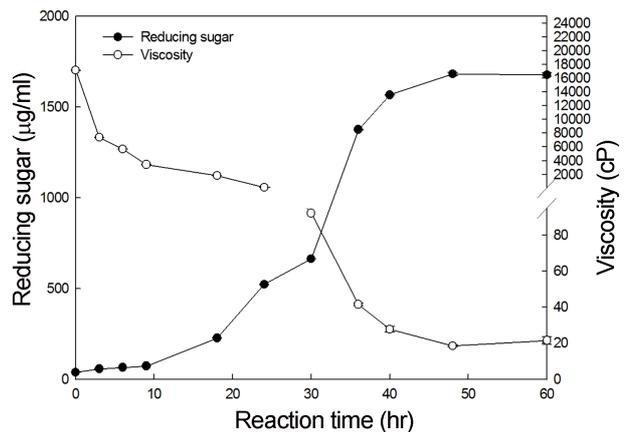


Fig. 10. Effect of reaction time on alginate degrading activity of crude enzyme measured by reducing sugar assay.

The mixture of alginate and crude enzyme were incubated at 30°C for 72 h. The viscosity was measured at 25°C, 40 cP and 0.5 rpm.

된다고 보고한 Yonemoto 등[31] 및 Uo 등[29]의 연구와 유사한 것으로 배지의 alginate 농도가 높아지면 점성이 커져 교반이 제대로 되지 않아 배지의 조효소 작용이 잘 이루어지지 않기 때문인 것으로 사료되어진다. 또한 pH 9, 30°C 및 3.5% 알긴산 조건에서 60시간까지 반응한 결과(Fig. 10), 환원당 생성량이 반응 0시간부터 반응 40시간까지 점차적으로 증가하였으며, 반응 48시간에는 1681 µg/ml로 가장 많았으며, 점도의 경우 반응 0시간에 17146 cP에서 반응 48시간에는 18.43 cP로 가장 낮은 값을 나타내었다.

따라서 *S. oneidensis* PKA 1008이 생성한 알긴산 분해 조

효소는 pH 9, 배양온도 30°C, 3.5% 알긴산, 배양시간 48시간 조건에서 알긴산을 가장 효과적으로 분해하는 것으로 나타났다.

이상의 결과로 미루어 보았을 때, 해양에서 분리한 *S. oneidensis* PKA 1008 유래 알긴산 분해 조효소의 특성은 Thiang 등[28]이 대부분의 해양 세균 유래의 알긴산 분해 효소의 최적 pH 및 온도 조건이 pH 7.5-8.5 및 25-50°C라고 보고한 바 있는데[28], 이러한 결과와 유사한 것으로 나타났다. 또한 *Methylobacterium* sp. HJM27 [11], *Vibrio* sp. AL-145 [6] 및 *Bacillus licheniformis* AL-577 [29]가 각각 환원당 생성능이 반응 1시간에 1.217 g/l, 반응 50분에 0.355 및 0.899 g/l로 산업적 이용가능성이 있다고 보고하였으며 본 연구에서 분리·동정한 알긴산 분해균 *S. oneidensis* PKA 1008의 환원당 생성능은 반응 1시간에 1.001 g/l로 확인되었다. 따라서 추후 *S. oneidensis* PKA 1008가 생산하는 알긴산 분해 효소를 정제하여 알긴산 저분자화에 이용 가능할 것으로 사료되어 진다.

요 약

부산 송정 연안에서 분해중인 해조류로부터 알긴산 분해 미생물을 분리·동정하고 미생물의 생육 조건 및 미생물이 생성한 조효소의 알긴산 분해 특성을 확인하였다. *Ulva pertusa*로부터 분리한 알긴산 분해균을 동정한 결과, *Shewanella oneidensis* strain로 확인되었으며, *S. oneidensis* PKA 1008 명명하였다. *S. oneidensis* PKA 1008의 최적 생육 조건을 확인한 결과, pH 9, 2% NaCl, 30°C 및 배양 24시간인 것으로 확인되었다. 또한 *S. oneidensis* PKA 1008 유래 알긴산 분해 조효소는 pH 9, 30°C에서 분해 활성이 최대이며, 3.5% 알긴산(working concentration)에서 1시간 반응 시 1.001 g/l의 환원당을 생성하는 것으로 확인되었다.

Acknowledgments

This work was supported by a Research Grant of Pukyong National University (2013Year:20130572).

References

- An QD, Zhang GL, Wu HT, Zhang ZC, Zheng GS, Luan L, et al. 2009. Alginate-deriving oligosaccharide production by alginate from newly isolated *Flavobacterium* sp. LXA and its potential application in protection against pathogens. *J. Appl. Microbiol.* **106**: 161-170.
- Cho KJ, Lee YS, Ryu BH. 1990. Antitumor effect and immunology activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Bull. Korean Fish. Soc.* **23**: 245-352.
- Choi JH, Kim DW. 1997. Effect of alginic acid-added functional drink (HAETOMINI) brown algae (*Undaria pinnatifida*) on obesity and biological activity of SD rats. *Korean J. Life Sci.* **7**: 361-370.
- Choi JH, Rhim CH, Kim JY, Yang JS, Choi JS, Byun DS. 1986. Basic studies on the development of diet for the treatment of obesity: the inhibitory effect of alginic acid as a dietary fiber on obesity. *J. Korean Fish. Soc.* **19**: 303-311.
- Joo DS, Cho SY, Lee EH. 1993. Isolation of alginate-degrading bacteria and production of alginate-degrading activity by the bacteria. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 207-213.
- Joo DS, Lee JS, Park JJ, Cho SY, Ahn CB, Lee EH. 1995. Purification and characterization of the intracellular alginate from *Vibrio* sp. AL-145. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 432-438.
- Kennedy L, Mcdowell K, Sutherland IW. 1992. Alginases from *Azotobacter* species. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 2465-2471.
- Kim HS, Lee CG, Lee EY. 2011. Alginate lyase: structure, property, and application. *Biotech. Biopro. Eng.* **16**: 843-851.
- Kim IH, Nam TJ. 2005. Effect of polymannuronate on cholesterol contents of liver tissue and feces in rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**: 1553-1558.
- Kim JH, Kim YH, Kim SK, Kim BW, Nam SW. 2011. Properties and industrial applications of seaweed polysaccharides-degrading enzymes from the marine microorganisms. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 189-199.
- Kim OJ, Lee DG, Lee SM, Lee SJ, Do HJ, Park HJ, et al. 2010. Isolation and characteristics of alginate-degrading *Methylobacterium* sp. HJM27. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 144-150.
- Kobayashi T, Uchimura K, Miyazaki M, Nogi Y, Horikoshi K. 2009. A new high-alkaline alginate lyase from a deep-sea bacterium *Agarivorans* sp.. *Extremophiles* **13**: 121-129.
- Lange B, Wingender J, Winkler UK. 1989. Isolation and characterization of an alginate lyase from *Klebsiella aerogenes*. *Arch. Microbiol.* **152**: 302-308.
- Lee JH, Bae MJ, Kim YC, Nam SW. 2009. Identification and characterization of alginate lyase producing *Pseudomonas* sp. N7151-6. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 350-354.
- Lee YS, Kim DS, Ryu BH, Lee SH. 1992. Antitumor and immunomodulating effects of seaweeds toward sarcoma-180 cell. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **21**: 544-550.
- Li JW, Dong S, Song J, Li CB, Shen XL, Xie BB, et al. 2011. Purification and characterization of bifunctional alginate lyase from *Pseudoalteromonas* sp. SM0524. *Marine Drugs.* **9**: 109-123.
- Liyan L, Xialu J, Huashi G, Peng W, Hong G. 2011. Three alginate lyases from marine bacterium *Pseudomonas fluorescens*. HZJ216: purification and characterization. *Appl. Biochem. Biotech.* **164**: 305-317.
- Miyake O, Hashimoto W, Murata K. 2003. An exotype alginate lyase in *Sphingomonas* sp. Al: overexpression in *Escherichia*

- coli*, purification and characterization of alginate lyase. *Protein Expr. Purif.* **29**: 33-41.
19. Nelson A. 1944. A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**: 375-380.
 20. Nibu Y, Satoh T, Nishi Y, Takeuchi T, Murata K, Kusakabe I. 1995. Purification and characterization of extracellular alginate lyase from *Enterobacter cloacae* M-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**: 623-637.
 21. Richard, AS, Levein RE. 1976. Viscometric assay of bacterial alginase. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**: 896-899.
 22. Sawabe T, Ohtsuka M, Ezura Y. 1997. Novel alginate lyases from marine bacterium *Alteromonas* sp. strain H-4. *Carbohydr. Res.* **304**: 69-76.
 23. Scot M, Colin GM, David J, Mills L, Brian JB. 1987. Estimation of meiodontic nematode diversity by non specialists. *Marine Pollution Bulletin* **38**: 646-649.
 24. Stevens RA, Levin RE. 1977. Purification and characteristics of an alginase from *Alginovibrio aquatilis*. *Appl. Environ. Microb.* **3**: 1156-1161.
 25. Sunwoo C, Kim KBWR, Kim DH, Jung SA, Kim HJ, Jeong DH, *et al.* 2012. Optimization of conditions for the production of alginate-degrading crude enzyme from *Vibrio crassostreae* PKA 1002. *Korean J. Microbial. Biotechnol.* **40**: 243-249.
 26. Takamistu C, Takashi B, Nozomi H, Mikihiko K. 2008. Purification and Characterization of alginate lyase from *Pseudoalteromonas* sp. Strain No. 1786. *J. Appl. Glycosci.* **55**: 81-88.
 27. Takeshita S, Sato N, Igarashi M, Muramatsu T. 1993. A highly denaturant durable alginate lyase from a marine bacterium: purification and properties. *Biosci. Biotech. Bioch.* **57**: 1125-1128.
 28. Thiang YW, Preston LA, Schiller NL. 2000. Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics structure-function analysis, biological roles and applications. *Annu. Rev. Microbial.* **54**: 289-340.
 29. Uo MH, Joo DS, Joo SY. 2006. Screening and cultivation characteristics of alginate degrading bacteria. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **35**: 109-114.
 30. Yi KW, Shin IS. 2006. Isolation of marine bacterium decomposing sea tangle (*Laminaria japonica*) to single cell detritus. *Korean J. Food Sci. Technol.* **38**: 237-240.
 31. 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.