

알긴산 분해 해양미생물의 분리 및 alginase 특성 평가

이재화¹ · 이은열[†]

경성대학교 공과대학 식품공학과
¹신라대학교 공과대학 생명공학과

Isolation of Alginate-Degrading Marine Bacteria and Characterization of Alginase

Jae-Hwa Lee¹ and Eun Yeol Lee[†]

Department of Food Science and Technology, Kyungsoong University, Busan 608-736, Korea
¹Department of Bioscience and Biotechnology, Silla University, Busan 617-736, Korea

Abstract

Various marine microorganisms were isolated from seaweed, and their alginate-degrading activities were investigated. An alginate-degrading bacteria, *Vibrio* sp. AEBL-211, showed highest level of alginase activity when cultured on a mineral salt medium containing 0.7%(w/v) sodium alginate as the sole carbon source. The intracellular alginase from AEBL-211 was partially purified by ion chromatography on DE 52-cellulose column and gel filtration on Sepacryl G-200 column, and showed guluronate-specific lyase activity.

Key words – alginase, alginate, *Vibrio* sp., guluronate

서 론

알긴산(alginate)은 갈조류의 세포벽을 구성하는 다당류로 *D*-mannuronic acid와 *L*-guluronic acid가 α -1,4 결합 또는 β -1,4 결합으로 형성된 다당류이다[1]. 알긴산은 젤 형성능, 고점성, 필름형성능 등의 특성이 있어 식품 첨가제로 널리 사용되고 있으며, 최근에는 상처봉합제 등의 의약품 소재로도 응용되고 있다[9]. 1991년 세계 알긴산 생산량은 약 27,000톤이며, 시장규모는 약 230백만불 규모였다[4]. 또한, 알긴산은 체내 중금속 흡수 제거효과, 콜레스테롤 저

하효과 등이 있는 것으로도 알려져 기능성 식품소재로서도 활용될 수 있다.

올리고당의 항암 및 항균작용, 면역증강, 장내세균 군집 개선효과, 항콜레스테롤 효과, 기타 다양한 생체조절기능에 대한 연구 결과들이 발표됨에 따라 해조류 유래의 알긴산을 기반으로 한 올리고당 제조에 대한 관심이 높아지고 있다[2,5,6]. 따라서, 기능성 알긴산 올리고당을 생산할 수 있는 미생물 유래의 알긴산 분해효소(alginase)에 대한 생화학 및 분자생물학적 연구도 활발히 진행되고 있다[7]. Alginase는 *Alginovibrio aquatilis*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas maltophilia*, *Vibrio* sp. 등의 다양한 해양 미생물로부터 alginase 활성이 측정되었다[10,11]. Alginase는 알긴산의 *D*-mannurosyl 또는 *L*-

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 82-51-620-4716, Fax : 82-51-622-4986
E-mail : eylee@star.ksu.ac.kr

guluronosyl linkage에 작용하는 endo 또는 exo 형태의 β -eliminase 활성을 가지고 있다.

다양한 기능성을 가지는 알긴산 올리고당 제조용 생물 공정을 개발하기 위해서는 우선적으로 알긴산을 특징적으로 분해하는 활성을 가지는 alginase 확보가 중요하다. 분해 특성이 밝혀진 alginase는 사용 용도에 맞는 조성 및 구조를 가지도록 알긴산을 tailoring하는데 응용될 수 있다. 예로, 젤 형성능의 경우 polyguluronate 조성이 높은 알긴산으로 제조된 젤은 딱딱한 반면, polymannuronate 조성이 높은 알긴산을 사용한 경우 유연성이 우수한 젤을 제조할 수 있다[1]. 본 연구에서는 생리활성 기능을 가진 알긴산 올리고당을 제조하기 기초 연구로써 알긴산 분해능이 있는 신규 미생물 균주를 선별하고 해양 미생물 유래의 alginase의 부분정제 및 분해 특성을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 분리용 시료 및 배지

부산 해운대 앞 바다에서 채취한 다양한 종류의 미역 시료로부터 알긴산 분해 균주를 선별하였다. 균주 분리용 다층 평판배지의 하층은 NaCl 2.5%(w/v), KH_2PO_4 0.1%(w/v), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%(w/v), KCl 0.05%(w/v), NH_4Cl 0.1%(w/v), agar 2%(w/v), PH 7.0으로 구성하였고, 상층은 sodium alginate 1%(w/v), agar 2%(w/v), PH 7.0으로 구성하였다[5,6]. 다층 평판 배지에 균질화시킨 미역 샘플 0.1 ml를 spreading 하여 콜로니를 분리하였다.

균주 및 배양조건

고체배지에서 알긴산 분해능을 확인한 균주들은 bacto-peptone 0.5%(w/v), sodium alginate 0.5%(w/v), NaCl 2.5%(w/v)로 구성된 액체배지에서 배양하였다. 고체배지 상에서 3~4일간 배양한 후 형성된 콜로니를 액체배지에 접종하고, 30°C, 300 rpm에서 3일간 배양한 다음 원심 분리하여 (12,000 rpm, 30 min) 균체의 효소와 균체내 효소 분리를 위한 시료로 사용하였다.

알긴산 분해효소 활성 측정

알긴산 분해효소 활성은 0.8%(w/v) sodium alginate를 기질로 사용하여 37°C에서 1 hr 반응시킨 다음 반응 전후의 환원당량을 Somogy-Nelson법 또는 DNS법에 의해 550

nm에서 흡광도를 측정하여 표준 검량선 (표준당은 maltose)으로부터 환원당량을 결정하여 활성을 분석하였다. 알긴산 효소활성을 측정하기 위한 기질로는 점성이 다른 sodium alginate를 사용하였다. 효소 1 unit는 1분간에 1 μmol 의 환원당을 생산하는 효소량으로 하였다.

조효소액 제조

균체의 조효소액은 배양액을 한외여과기를 이용하여 농축하여 조효소액을 제조하였고, 균체내 조효소액을 제조하기 위하여 냉각시킨 30 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)로 원심분리한 균체를 세척하고 bead beater를 이용하여 약 30 분간 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 균체를 냉각된 30 mM Tris-HCl buffer(pH7.0)에 재현탁시킨 다음 원심분리 (12,000rpm, 30 min)하여 상층액을 균체내 조효소액으로 사용하였다.

단백질 농도 및 분자량 측정

효소 정제 과정에서 단백질 희분은 분광광도계로써 280 nm에서 흡광도를 측정하여 검색하였고, 단백질 농도는 Bradford법을 이용하여 bovine serum albumin (sigma. Co. USA)을 표준단백질로 하여 얻은 검량 곡선으로부터 구하였다. 분자량은 SDS-PAGE (12% polyacrylamide gel electrophoresis)에 의하여 측정하였다.

Alginase 정제

조제된 조효소액을 한외여과기로 농축하여 30 mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)로 평형화된 음이온 교환수지인 DE52-Cellulose column (4.0×30 cm)에 NaCl을 이용하여 0~1.0 M까지 농도 구배를 주면서 단백질을 용출시켰다. 용출액을 10 ml/tube로 분획하였으며, 활성분획을 회수하여 ultrafiltration cell (Amicon Co., MWCO: 12,000)을 이용하여 농축시킨 다음, gel filtration chromatography인 Sephacryl G-200 column (1.5×1 m)을 이용하여 정제하였다. 각 분리단계에서의 각각의 희분액에 포함된 총단백질 농도는 Bradford법을 이용하여 결정하였으며, 기준 물질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

결과 및 고찰

알긴산 분해 균주 선별 및 동정

알긴산 분해 활성을 가지는 해양 미생물을 분리하기 위

하여 부산 해운대 앞 바다에서 다양한 종류의 미역류를 채취하여 미생물 분리원으로 사용하였다. NaCl 2.5%(w/v), KH₂PO₄ 0.1%(w/v), FeSO₄ · 7H₂O 0.05%(w/v), KCl 0.05%(w/v), NH₄Cl 0.1%(w/v), agar 2%(w/v)로 구성된 하층 평판위에 유일 탄소원으로 sodium alginate 1%(w/v)을 첨가한 agar 2%(w/v)로 구성된 상층배지를 만든 다음, 무균의 homogenizer를 이용하여 균질화시킨 미역 샘플 0.1 ml를 spreading 하였다. 3~7일간 배양한 결과 알긴산을 유일탄소원으로 제공된 고체배지상에서 성장하는 콜로니를 다수 얻을 수 있었다. 성장을 보인 콜로니들은 성장을 위해 알긴산을 분해하여 탄소원 및 에너지원으로 활용하였으므로 고체 배지상에 halo가 형성되는 것을 관측할 수 있었다. Table 1에서와 같이 콜로니가 성장함에 따라 알긴산 한천 배지에서 콜로니 주변에 halo가 형성되고 직경이 커지는 모습이 관측되어 균체의 알긴산 분해효소 생성능이 있음을 알 수 있었다.

분리된 균주는 rod 형태의 Gram-negative 균으로 spore가 없으며, 알긴산 한천 및 TCBS 평판에서의 콜로니 색깔은 노란색이었다. Oxidase 및 nitrase는 양성이고, glucose, maltose, mannitol, N-acetyl-glucosamine, sorbitol 등을 대사하여 산을 생성하였다. GC content는 약 43% 정도였으며, 생화학 및 영양적인 특성 분석 결과와 Bergey's manual 등에 의해 *Vibro* 속으로 동정되었으며, *Vibrio* sp. AEBL-211로 명명하였다.

알긴산 분해능

Vibrio sp. AEBL-211를 0.8%(w/v) sodium alginate가 들어있는 액체배지에서 배양하여 제조한 조효소액을 이용하여 sodium alginate 기질에 대한 분해반응을 실시하여

알긴산 분해능을 평가하였다. 알긴산 분해과정에서 생성되는 환원당을 비교해 본 결과, *Vibrio* sp. AEBL-211, AEBL-212 균주가 각각 0.17 mg/ml, 0.16 mg/ml로 가장 많은 환원당을 생성하였다 (Table 1). *Vibrio* sp. AEBL-211 등의 균주에 대하여 pH, 온도, 탄소원 및 질소원이 세포 성장 및 alginase 생성에 미치는 영향을 분석하고 최적화시킨 조건에서 얻은 조효소액이 아님에도 불구하고, 상대적으로 높은 환원당 생성량을 보여주어 alginase 효소생산용 균주로서의 이용 가능성을 보여주었다. 또한, *Vibrio* sp. AEBL-211는 고체 agar plate 상에서 시간 경과에 따른 halo 크기도 가장 크게 형성되어 알긴산 분해능이 좋은 것으로 판단하였다 (Table 2). 이들 알긴산 분해균주들은 알긴산 이외에 다른 탄소원을 제공하여 배양한 경우에는 알긴산 분해능이 저하되는 현상을 보여주어 alginase는 유도효소의 일종으로 판단되었다.

Alginase 부분정제

Vibrio sp. AEBL-211의 균체의 및 균체내 alginase 효소의 활성 특성을 평가하기 위하여 효소를 부분적으로 정제하였다. 정제 방법 및 순서가 Fig. 1에 제시되어 있다. 균체의 조효소액은 배양액을 한외여과기로 농축하여 제조하였고, 균체내 조효소액은 원심분리한 균체를 냉각시킨 30 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)로 세척하고 bead beater를 이용하여 약 30분간 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 균체를 냉각된 30 mM Tris-HCl buffer(pH7.0)에 재현탁시킨 다음 원심분리 (12,000 rpm, 30 min)하여 상층액을 균체내 조효소액으로 사용하였다. 조제된 조효소액을 한외여과기로 농축한 다음 30 mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)로 평형화시킨 음이온 교환수지인 DE52-Cellulose column (4.0×30 cm)에 NaCl을 용출용액으로 이용하여 0~1.0 M까지 농도 구

Table 1. The alginate degrading ability of the isolated *Vibrio* sp. AEBL-211 and AEBL-212

Strain	AEBL-211	AEBL-212
¹ Cell growth	0.706	1.015
² Protein(mg/ml)	0.170	0.138
³ Reducing sugar (mg/ml)	0.171	0.159

¹Optical density value at 620 nm.
²Determined by Bradford method.
³Determined by DNS method.

Table 2. Diameter of halo formed by *Vibrio* sp. AEBL-211

day	Diameter of halo (cm)	Size of colony (cm)
1th	0	0
2nd	0.2	0.1
3rd	0.4	0.2
4th	0.7	0.3
5th	0.9	0.3
6th	1.0	0.4

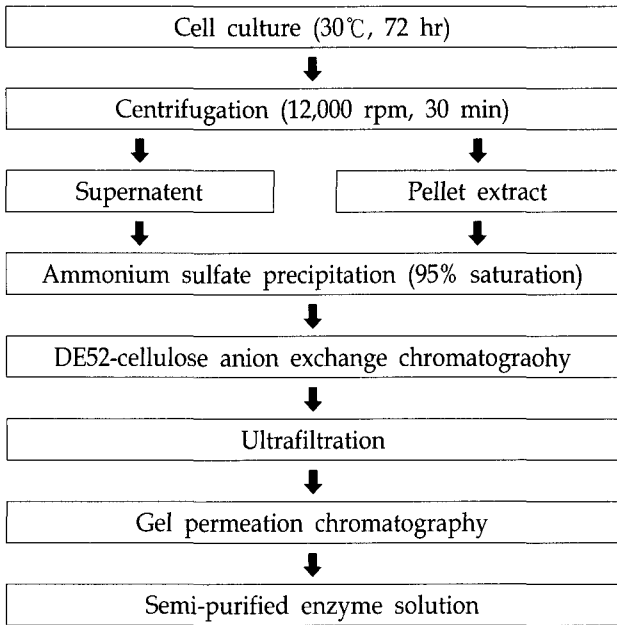


Fig. 1. Schematic diagram of purification of extracellular and intracellular alginase.

배를 주면서 효소를 용출시켰다. 용출액은 10 ml/tube로 분획하였으며, 활성이 있는 분획을 회수하여 ultrafiltration을 통해 농축시킨 다음, Sephacryl G-200 column (1.5 × 1m)을 이용하여 다시 정제하였다.

Fig. 1에 제시되어 있는 방법을 이용하여 상대적 alginase 활성이 높았던 균체내 조효소액으로부터 alginase의 부분정제를 실시하였다. 우선, 과채된 균체에서 얻은 상층액에 대하여 DE 52-cellulose를 사용한 이온교환 크로마토그래피를 행한 결과가 Fig. 2에 제시되어 있다. 0.8%(w/v) Sodium alginate 기질에 대한 분해 활성이 있는 획분이 검출되었으며, 이 활성 획분을 모아 투석 및 농축시킨 다음, Sephacryl G-200 column을 사용하여 겔 여과 크로마토그래피를 실시하였다. Fig. 3과 같이 알긴산 분해능이 검출된 획분을 얻을 수 있었으며, 이러한 획분액을 투석 및 농축한 후 SDS-PAGE를 실시하였다. SDS-PAGE 젤의 30kDa 부근에서 band가 검출되어 *Vibrio* sp. AEBL-211 유래의 intracellular alginase는 약 30kDa 정도의 분자량을 가지는 것으로 판단하였다. 문헌에 보고된 *Vibrio* 유래의 세포외 alginate lyase 활성을 가지는 단백질의 크기는 약 25,000~27,000 정도의 분자량을 가지며, 세포내 alginase는 약 23,000 정도의 분자량을 가지는 것으로 보고되고 있어[5], 이들 효소와

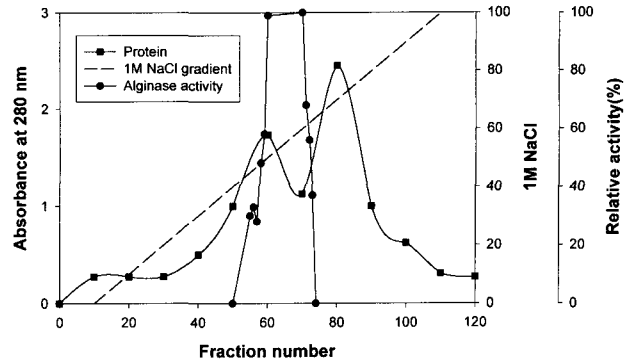


Fig. 2. Chromatography for the purification of alginase using DE52-cellulose column. Proteins were eluted using a gradient of 0~1.0 M of NaCl.

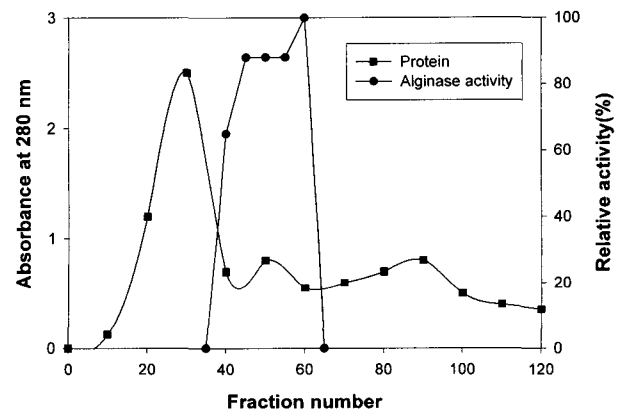


Fig. 3. Chromatography for the purification of alginase using Sephacryl G-200 column. Proteins were eluted using a gradient of 0~1.0 M of NaCl.

는 다른 alginase 효소임을 추론할 수 있었다.

Alginate 활성 특성 분석

일반적으로 sodium alginate의 점도가 높을수록 guluronic acid에 대한 mannuronic acid의 비율이 낮아지는 것으로 알려져있다[3,5,8]. 이러한 알긴산 조성의 차이를 alginate의 분해특성 평가에 활용하기 위하여, 부분 분리한 alginate 조효소를 이용하여 guluronic acid에 대한 mannuronic acid의 비율이 다른 고점성, 중간 점성, 낮은 점성을 가진 3종류의 Na-alginate 시료에 대한 분해능을 평가하였다. 12 시간의 반응시간동안 분해과정을 측정된 결과, guluronic acid에 대한 mannuronic acid의 비율이 가장 낮은 고점성 알긴산 시료에서 상대적 alginate 분해 효율이

가장 높아 *Vibrio* sp. AEBL-211 유래의 균체내 alginase는 guluronic acid의 상대적 양이 많은 알긴산에 대한 활성이 우수함을 알 수 있었다.

요 약

다양한 종류의 미역으로부터 알긴산 분해 활성을 가지는 해양 미생물인 *Vibrio* sp. AEBL-211을 분리하였다. 우선, 알긴산 고체배지에서의 halo 크기가 크고 환원당 생성량이 가장 많은 해양 미생물을 선발하고, 생화학 및 영양적인 특성 분석 결과 등을 바탕으로 *Vibro* 속으로 동정하였다. DE 52-cellulose 및 Sephacryl G-200를 이용한 음이온 교환 및 gel permeation chromatography를 통해 부분 정제된 alginase 효소액을 얻었다. 부분 정제된 alginase 효소를 이용하여 guluronic acid에 대한 mannuronic acid의 비율이 다른 sodium alginate 시료에 대한 분해능을 평가한 결과, guluronic acid의 상대적 양이 많은 알긴산에 대한 활성이 상대적으로 우수하여 *Vibrio* sp. AEBL-211 유래의 alginase는 guluronic acid가 많은 G-rich block에 대한 분해활성이 높은 특성을 가지는 것으로 판단되었다.

참 고 문 헌

- Gacesa, P. 1988. Alginates. *Carbohydr. Polym.* **8**, 161-182.
- Güven, K. C., Y. Özsoy and O. N. Ulutin. 1991. Anticoagulant, fibrinolytic and antiaggregant activity of carragenans and alginic acid. *Biotanica Marina* **34**, 429-435.
- Haug, A., B. Larsen and O. Smidsrod. 1974. Uronic acid sequence in alginic acid sequence in alginate from different sources. *Carbohydrate Research* **32**, 217-225.
- Hicks, S. J. and P. Gacesa. 1996. Heterologous expression of full-length and truncated forms of the recombinant guluronate-specific alginate lyase of *Klebsiella pneumoniae*. *Enzyme Microbiol. Technol.* **19**, 68-73.
- Joo, D.-S., J.-S. Lee, J.-J. Park, S.-Y. Cho, H.-K. Kim and E.-H. Lee. 1996. Preparation of oligosaccharides from alginic acid by enzymatic hydrolysis. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **28**, 146-151.
- Joo, D.-S., J.-S. Lee, J.-J. Park, S.-Y. Cho, C.-B. Ahn and E.-H. Lee. 1995. Purification and characterization of the intracellular alginase from *Vibrio* sp. AL-145. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 432-438.
- Miyake, O., W. Hashimoto and K. Murata. 2003. An exotype alginate lyase in *Sphingomonas* sp. A1: overexpression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of alginate lyase. *Protein Expression Purification* **29**, 33-41.
- Penman, A. and G. R. Sanderson. 1972. A method for the determination of uronic acid sequence in alginates. *Carbohydrate Research* **25**, 273-282.
- Rehm, B. H. A. and S. Valla. 1997. Bacterial alginates: biosynthesis and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 281-288.
- Sutherland, I. W. 1995. Polysaccharide lyases. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**, 323-347.
- Wong, T. Y., L. A. Preston and N. L. Schiller. 2000. Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**, 289-340.

(Received September 6, 2003; Accepted October 14, 2003)