한국환경과학회지 제13권(제12호), 1139~1144, 2004
J. of the Environmental Sciences

미생물을 이용한 미역줄기에서 알긴산염 추출 및 저분자화

안 성 준 · 김 영 숙* · 박 권 필
순천대학교 화학공학과, *순천대학교 생물학과
(2004년 9월 4일 접수; 2004년 12월 24일 채택)

Extraction and Degradation of Alginate from Brown Seaweed Stem Using Microorganism

Seong-Jun Ahn, Young-Sook Kim* and Kwon-Pil Park
Dept. of Chem. Eng., Sunchon University, Sunchon 540-742, Korea
**Dept. of Biology, Sunchon University, Sunchon 540-742, Korea*
(Manuscript received 4 September, 2004; accepted 24 December, 2004)

We studied a extraction and degradation of alginate from seaweed-stems using microorganism DS-02. DS-02 has a maximum growth rate at 30℃ and the enzyme has a maximum activity of alginate extraction at 35℃. The yield of alginate extraction using DS-02 is about 16.0% for 3.0 hour and molecular weight of the alginate decreased to about 1/8 of initial value after 24 hour extraction. Alginate extraction method by DS-02, compared with general alkali-extraction method, has an advantage of decreasing the molecular weight of alginate during extraction.

Key Words : Alginate, Extraction, Microorganism, Degradation waste-seaweed

1. 서 론

풍부한 미네랄과 많은 양의 섬유소를 함유한 미역은 주로 잎부분이 식용으로 이용되고 있지만 줄기부분도 미역 잎과 그 조성이 비슷해[1] 여러 용도로 활용할 수 있다. 미역은 채취과정에서 미역의 밑부분을 잘라서 그대로 바다에 버리는데 이 폐기되는 미역의 대부분이 줄기이고 약간의 포자엽과 뿌리 잎을 포함하고 있다. 바다에 폐기되는 미역의 양은 전체미역의 약 40~60%로 우리나라에서만 14~21만톤이 매년 남해안에 폐기되어 바다 오염과 미역의 좁쌀병 등을 발생시키는 원인이 되고 있다. 미역폐기물을 바다에서 수거하지 않고 바다에 버리는 것은 미역폐기물을 수거해 와도 육상에서 활용할 방법이 없어 또 다른 환경오염을 만들기 때문이다.

미역 폐기물은 가축의 사료 또는 유기질비료와 같은 저가 제품의 원료로 이용될 수 있지만, 미역폐기물에서 알긴산염(alginate)을 추출하면 나염용, 저온에서 증점제 및 공업용[2] 으로 사용될 수 있고 그리고 연구개발 중인 중금속 흡착제[3~5] 및 약물전달시스템용[6,7] 등으로도 이용될 수 있다. 지금까지 알긴산 추출은 미역의 잎에서 주로 이뤄졌는데 미역의 폐기물 중에서 추출해도 가능한 것으로, 미역폐기물에서 알긴산을 추출하면 원가가 절감되는 효과와 환경오염방지라는 이점이 있다. 미역 채취 시기와 지역에 따라 다르지만[8,9] 미역 중 알긴산 함량은 약 20~30 wt%로 실제 추출량은 미역중량의 15~20% 정도이다. 미역에서 화학적으로 알긴산염을 추출하는 주요 공정은 알칼리 수용액에서 알긴산염을 추출 후 여과하는 공정인데 알긴산염 수용액의 점성이 강해 여과가 어려운 문제점이 있다. 알칼리로 NaOH, Na_2CO_3, $NaHCO_3$등을 사용해 화학적으로 알긴산을 추출하는 방법은 폐수처리문제와 식용으로 사용 시 많은 세척과정이 요하는 등 개선해야 할 점이 있어 친환경적인 방법으로 미생물을 사용해 알긴산염을 추출하는 방법에 대해 본 연구에서 고찰하게 되었다.

미역 중의 알긴산염은 분자량이 약 300~400 kDa인 고분자인데 알긴산염이 저분자화 되면 동물의 체

Corresponding Author : Kwon-Pil Park, Dept. of Chem. Eng., Sunchon University, Sunchon 540-742, Korea
Phone: +82-61-750-3584
E-mail: parkkp@sunchon.ac.kr

내에서 알긴산염 용해도 및 담즙산 결합능을 현저히 증가시키고[10] 실험동물의 간장지질 조성을 생리적으로 개선하는 효과가 현저히 증가함[11]을 보였다. 알긴산염의 저분자화 방법은 산분해[12,13], 열분해, 감마선분해[14], 라디칼분해[15], 미생물에 의한 분해[16]등 여러 방법이 있다. 본 연구의 미생물에 의해 미역줄기로부터 알긴산염을 추출하는 과정에서 알긴산염이 저분자화 되는 효과가 있어서 알긴산염의 저분자화에 대해서도 검토하였다.

2. 실 험

2.1. 균주 분리 및 배양

남해안 여수지역에서 뻘 시료를 채취하여 멸균증류수에 풀어 정치시킨 후 흙 성분을 침전시키고 상부의 용액을 분리하였다. 분리 용액을 해수와 peptone (DIFCO, Bacto) 그리고 yeast extract(DIFCO, Bacto™) 등이 혼합된 배양액에 넣고 30℃에서 1일 배양하였다. 이 배양액 0.2 ml를 marine agar(DIFCO™ Marine Agar 2216)고체배지상에서 배양 후 분리된 4~5종의 미생물 중에서 해조류를 분해하는 균 DS-02를 확인하고 이 균을 순수 분리하였다. DS-02균은 동정 결과 γ-proteobacteria에 속하는 균으로 밝혀졌다.

해수 1000 ml에 peptone 5 g과 yeast extract 1 g을 투입하고 용해 후 멸균처리한 용액을 분리균주 DS-02의 배양액으로 사용하였다.

2.2. DS-02에 의한 알긴산염 추출

미역줄기시료는 3월에 고흥지역에서 채취한 미역에서 밑부분의 줄기를 1~2 cm 크기로 절단해 사용하였다. 시료중량을 정확히 하기 위해 미역시료를 증류수로 세척하고 60℃ 오븐에서 48시간 건조하였다. 본 실험에서는 미생물에 의한 알긴산염 추출 및 저분자화를 두 가지 방법으로 수행하였는데, 미생물이 생존한 상태에서 실험한 방법(배양액 방법이라 함)과 배양액에서 미생물을 제거하고 남은 용액으로 실험한 방법(효소액 방법 이라 함)에 의해 실험을 진행시켰다. 배양액 방법은 해수 200 ml에 peptone 1 g과 yeast extract 0.2 g, marine agar 고체배지상에서 배양된 DS-02 균 0.1 g을 넣고 미역 시료 10 g을 같이 투입해 알긴산염 추출 및 저분자화 실험을 한 것이다. 효소액 방법은 배양액 방법과 비슷한데 다른점은 초기에 미역을 투입하지 않고 1일 DS-02균을 배양한 후 원심분리하여 DS-02균을 제거하고 남은 용액(효소액)에 미역시료 10 g을 투입해 실험한 것이다. 여기서 효소액은 원심분리기(Mega17R, Hanil)에서 4℃, 10,000 rpm으로 균을 원심분리시키고 배양액 중에 남은 균을 다시 여과(filter paper pore : 0.45 μm)하여 얻었다. DS-02 균과 생성 효소가 산업화 공정에 얼마나 유용하게 사용될 수 있을 지 검토하기 위해 상온보다 높은 온도 범위(30~45℃)에서 저분자화 및 추출실험을 수행하였다. 알긴산염 용액을 여과하여 탈알긴산염(dealginate)을 제거하고 알긴산염용액에 에탄올을 가해 부상하는 알긴산염을 건져내 60℃에서 건조하여 알긴산염을 회수하였다.

2.3. 분석

알긴산염의 분자량은 시료를 0.1 M $NaNO_3$ 수용액에 용해시켜 ultrahydrogel column이 들어 있는 Waters GPC(Gel Permeation Chromatography) System (Alliance 2690 + 2414 RI System)에서 0.9 ml/min 유속하에 분석하였으며, pullulan standard(M.W. 5,900~788,000 Da)를 이용하였다. Fig. 1은 알긴산염 분자량 측정을 위해 pullulan standard를 이용하여 얻은 GPC 검량곡선이다. 본 실험의 알긴산염 분자량 범위인 20,000~500,000 Da을 포함하고 전 분자량 범위에서 직선을 이루고 있어 검량곡선으로 사용하기에 적합함을 보였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 알긴산염 추출

DS-02 미생물에 의한 알긴산염의 추출수율을 시간에 따라 Fig. 2에 나타내었다. 전 논문[1]에서 보고하였듯이 알칼리(Na_2CO_3 2%)수용액에서는 60℃에서 초음파(47kHz)을 사용하였을 때 수율이 19.3%, 정치방법에서 15.0% 이었다. 화학적인 방법에서 초음파를 사용하면 미생물에 의한 방법보다 추출 수율이 약 3% 정도 높으나 정치방법은 미생물방법과 추출수율이 비슷하다. 예상보다 미생물에 의한 추출 속도도 빨라 3시간 정도 지났을 때 일정한 수율에 도달해 화학적인 방법에 의한 것과 비슷한 속도를

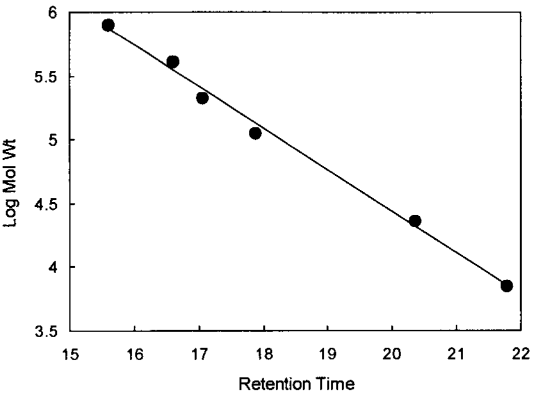

Fig. 1. GPC calibration curve constructed with Pullulan standard(M.W.:5,900~788,000).

나타내었다. 미역줄기의 겉 표면은 단단해 용액의 침투가 쉽지 않으나 절단하면 단면은 다공성이어서 절단면을 통한 용액의 침투가 미역줄기 내부까지 쉽게 이뤄질 수 있기 때문에 미역줄기에서 알긴산염 추출속도가 증가한 것으로 판단된다.

Fig. 3은 온도에 따른 배양액과 효소액에서 각각 24시간 교반 후 알긴산염 추출수율을 보인 것이다. 균이 있는 배양액에서는 30℃에서 최고 수율을 나타내고 35℃이상에서 수율이 감소함을 보이는데 이는 DS-02균이 35℃이상의 온도에서는 균의 증식 및 효소배출이 둔화되기 때문이라고 생각된다. 그렇지만 균이 없는 효소액에서는 35℃에서 최고수율을 보이고 있다. 효소반응도 온도가 상승하면 반응속도가 상승하나 효소가 열에 약해 40℃이상에서는 제 기능을 발휘하지 못해 수율이 감소한 것으로 판단된다.

미역을 습윤 상태로 상온에서 장시간 DS-02균에 의해 저장할 수 있음을 보고한 바 있다[16]. 이 저장과정 중에 침출수가 발생하고 저장시간이 길어짐에 따라 침출수의 양이 증가함을 보였다. 이 침출수 중에서 알긴산염을 회수하여 그 수율을 측정한 결과를 Fig. 4에 도시하였다. DS-02균 배양액을 10% 넣으면 5% 때보다 수율이 약간 증가함을 나타내고 있고, 배양액 10% 일 때 추출수율이 8주 후에 약 3%로 작지만 저장 후에 침출수에서 알긴산염을 회수하여 사용할 수 있음을 보이고 있다.

3.2. 저분자화

미생물에 의한 미역 내의 알긴산염 저분자화는 미역 잎이나 줄기에 알긴산염이 남아 있으면서 저분자화가 되는 것과 미역에서 알긴산염이 분해되어 용액 중에서 저분자화가 되는 경우로 나눌 수 있다. 미역 잎 시료를 배양액에서 교반 후 미역 잎 중의 알긴산염을 알칼리로 추출해 그 분자량을 측정한 실험[16]에서도 알긴산염의 분자량 감소가 1일 만에 약 1/5~1/4로 감소함을 보였다. 본 실험의 미역줄기에서 추출되는 용액 중에서는 DS-02배양액의 경우 1일 만에 효소액에서는 2일 만에 알긴산염 분자량이 처음의 약 1/8 로 감소하여 분자량이 약 50 kDa이 되었음을 Fig. 5에서 볼 수 있다. 효소액에서 분자량감소속도가 약간 느리나 2일 후에는 거의 같고 만약 효소액에서 35℃로 반응을 진행시켰다면 저분자화속도가 더 빨라졌으리라 본다. 알긴산염 저분자화는 미역잎에서와 같이 미역줄기 중에서도 이뤄지고 액중에 추출된 후에도 저분자화가 진행된다고 보는데 미역잎과 미역줄기에서 알긴산염 저분자화 정도가 비슷하게 이루어졌다.

서론에서 언급하였듯이 알긴산염 저분자화 방법은 여러 방법이 있는데 본 실험의 미생물에 의한 방

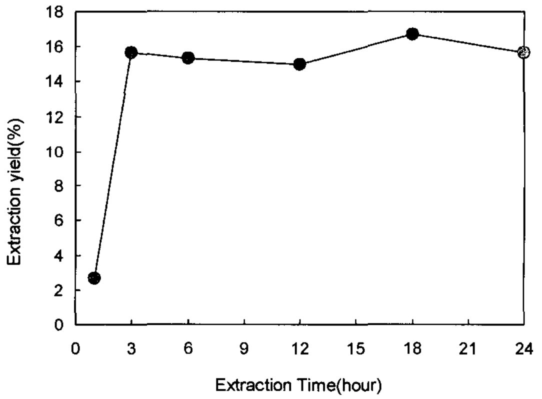

Fig. 2. Extraction yields of alginate from seaweed stems by DS-02 organism at 30℃.

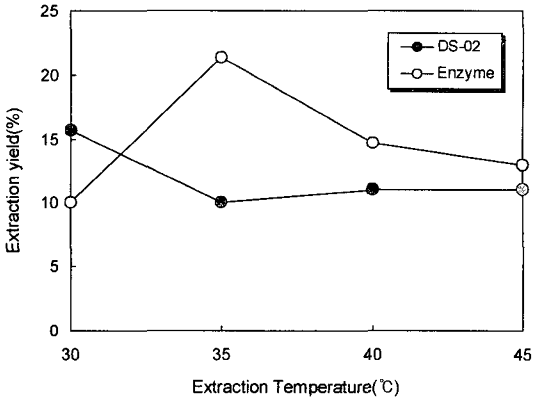

Fig. 3. Effect of temperature on the extraction yields of alginate from seaweed stems by DS-02 solution and by the enzyme solution for 24 hour extraction.

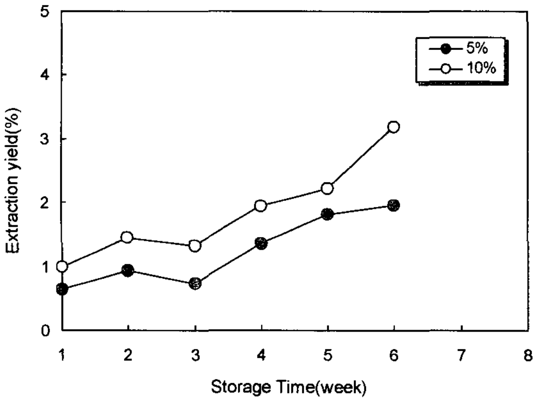

Fig. 4. Extraction yields of alginate from seaweed stems during storage process with DS-02 5% and 10% solution.

법과 비교하기 위해 산분해 방법을 실험하였다. Fig. 6에 각 염산 농도에 6, 12, 24시간 접한 미역줄기에서 추출한 알긴산염 분자량을 나타냈다. 염산 농도가 진해질수록 알긴산염의 분자량이 감소함을 보이고 있다. 미생물에 의해 24시간에 약 50 kDa 정도로 저분자화된 것은 HCl 50%에 의한 저분자화효과와 비슷해 미생물에 의한 저분자화 효과가 매우 강력함을 알 수 있다.

산에 의한 알긴산염 저분자화는 많이 연구·보고되었지만 알칼리에 의한 알긴산염의 저분자화는 보고된 바 없어 알긴산염이 알칼리에 의한 추출 과정에서 저분자화가 얼마나 진행되는 지 알아보기 위한 실험을 수행하였다. 알칼리로 3% Na_2CO_3 수용액을 이용해 추출시간에 따른 분자량을 측정한 것을 Fig. 7에 나타내었다. 알칼리로 추출할 때 초음파를 가한 상태에서 보통 6시간 추출하면 알긴산염의 분자량이 약 380 kDa 정도인데 24시간 추출해도 분자량 감소가 거의 없고 2일 이후 분자량이 점차 감소해 5일에 200 kDa 정도로 감소함을 보인다. Na_2CO_3 농도가 3%로 낮지만 HCl 5%에 의해 24시간 후 240 kDa 정도로 감소시킨 것과 비교해도 알칼리에 의한 저분자화정도는 미약하다. 미생물에 의한 추출과정이 알칼리 추출보다 우수한 점은 추출 수율은 약간 감소했지만 추출 중에 알긴산염의 저분자화가 동반되는 것이다. 서론에서도 언급했듯이 알긴산염이 저분자화 되면 동물의 체내에서 알긴산염 용해도 및 담즙산 결합능을 현저히 증가시켜 알긴산염 흡수효과가 향상되기 때문에 알긴산염을 저분자화하면 그 만큼 이점이 있다.

지금까지 미역에서 알긴산을 추출할 때 제일 어려운 공정은 여과공정으로 알려져 있는데, 이는 알칼리에 의해 알긴산염이 추출되어 점도가 높은 액상과 겔상태의 디알기네이트(dealginate) 때문에 여과속도가 매우 느린 문제점 때문이었다.

Fig. 8에 미생물을 이용한 미역줄기에서 알긴산염 추출시간에 따른 용액의 점도를 나타냈다. 점도와 분자량간에 관계는 아래 Mark-Houwink-Sakurada (MHS) 식으로 알 수 있는데[17]

$$\eta = K(M)^a \quad (0.5 < a < 1)$$

여기서 η는 용액 점도 K는 비례상수 M은 분자량을 나타낸다. 미생물에 의한 알긴산염 추출방법에서 추출시간이 경과함에 따라 알긴산염 분자량이 감소하므로 MHS식에 의해 예상할 수 있듯이 점도도 감소함을 보인다. 미생물을 이용한 알긴산염 추출공정은 점도감소에 의해 알긴산염 추출공정의 문제점이었던 느린 여과속도를 향상시킬 수 있음을 보이고 있다.

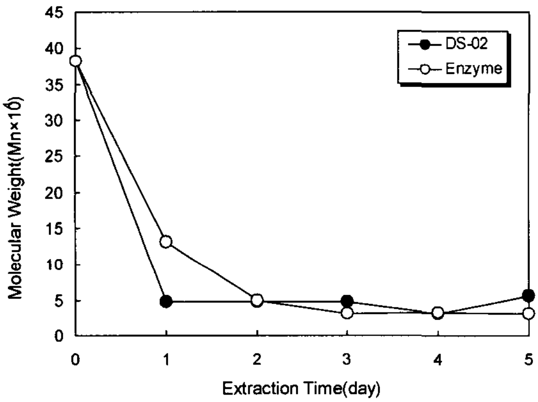

Fig. 5. Molecular weights of alginate from seaweed stems by DS-02 solution and by the enzyme solution.

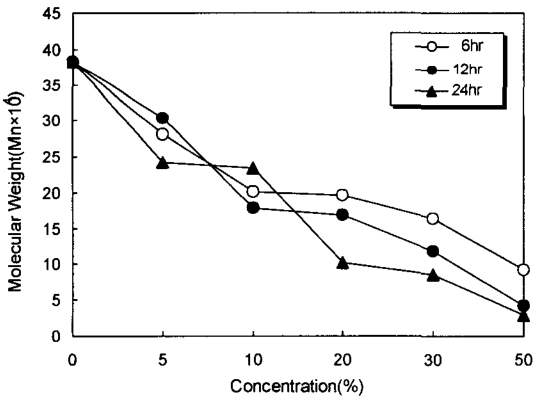

Fig. 6. Variation of molecular weight of alginate with changes of HCl concentration and extraction time.

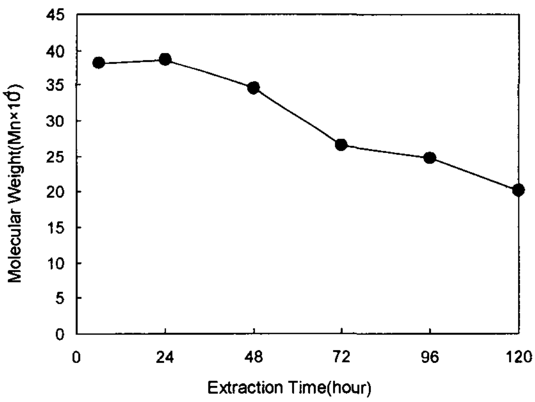

Fig. 7. Molecular weights of alginate from seaweed stems by Na_2CO_3 3% solution during extraction process.

Fig. 9에 미생물을 이용한 미역줄기에서 알긴산염을 24시간 추출할 때 각 온도에 따른 알긴산염 분자량의 변화를 나타냈다. 앞의 Fig. 3에서도 미생물의 성장 및 증식이 30℃이상 온도에서는 약해 알긴산염 추출 수율이 낮았듯이, 30℃이상 온도에서 미생물의 활동이 미약해 배출 효소량이 작고 그 결과 분자량감소가 작은 것으로 보인다. 만약 효소가 충분하면 Fig. 3에서 보인 것처럼 35℃에서 효소활성이 최고이므로 저분자화가 30℃보다 많이 진행될 수 있었을 것이다. 그래서 알긴산염의 추출수율과 저분자화를 동시에 높일 수 있는 최적 운전 방법은 먼저 30℃에서 균을 증식시켜 많은 균 개체수에 의해 효소 생산량을 최대로 한 다음 온도를 35℃로 올려 효소에 의한 추출 및 분해 속도가 최고가 되게 2단계로 운전하는 방법이라고 보는데 이 방법에 대한 검증연구가 더 필요하다. 그리고 Fig. 9의 결과는 24시간 실험한 것으로 2일 실험했다면 Fig. 5에서 처럼 배양액방법과 효소액방법이 30℃에서 비슷한 결과를 보일것으로 예측된다. 배양액방법에서는 미역이 DS-02균의 효소 발생을 촉진시켜 즉 유도성 효소(inducible enzyme)[18] 효과로 알긴산염을 더 빨리 분해시켜 효소가 분해시킬 수 있는 알긴산염의 분자량까지 일찍 도달 한 것으로 보인다. DS-02 효소를 순수 분리하는 연구가 완성되어 배양액과 효소액에서 알긴산염 분해효소(alginate lyase)양을 측정하면 명확한 이유를 알 수 있으리라 예측된다. Fig. 10에는 저장 중 침출된 액상에서 알긴산염을 회수한 후 그 분자량을 측정한 것이다. Fig. 4에 보였듯이 알긴산염의 양은 작지만 분자량 감소가 뚜렷하게 나타나 흡수율이 높은 양질의 알긴산염이므로 회수해서 이용할 가치가 있다고 판단된다.

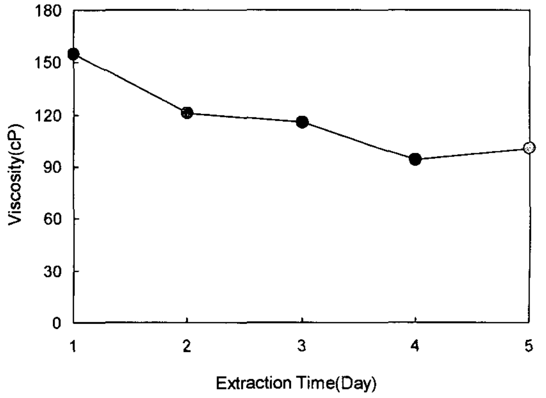

Fig. 8. Viscosity of alginate solution as a function of extraction time during extraction process using DS-02 culture solution.

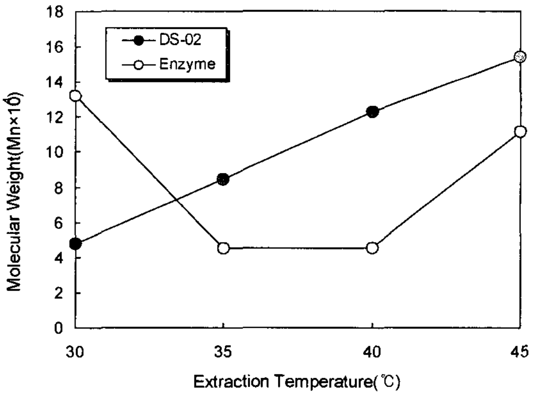

Fig. 9. Effect of temperature on alginate extraction from seaweed stems by DS-02 and by the enzyme solution for 24 hour.

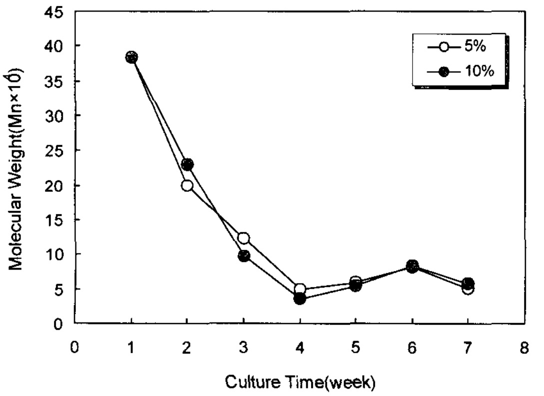

Fig. 10. Molecular weight of alginate from seaweed stems with DS-02 5% and 10% solution during storage process.

4. 결 론

본 연구에서는 미역폐기물을 활용하기 위해 미생물을 이용해 미역줄기에서 알긴산염을 추출하는 방법에 대해 연구하였다. DS-02균은 증식 및 성장에 적합한 온도가 30℃였고 알긴산염 분해효소인 alginate lyase의 최적 활성온도는 35℃였다. 미역 줄기에서 DS-02배양균에 의해 3시간 알긴산염을 추출하여 수율 약 16 %을 얻을 수 있었고 분자량을 24시간 만에 50 kDa 로 감소시켜 알칼리 추출방법에 비해 수율은 약간 낮은 편이지만 저분자화 시키는 효과가 염산 50%수용액과 비슷하였다. 그리고 배양액에 의한 알긴산염 추출 중에 분자량 감소에 의한 점도감소에 의해 알긴산염 추출공정의 난제였던 여과문제를 해결할 수 있는 효과도 있었다.

미역줄기에 DS-02균배양액 5-10%를 혼합한 후 밀봉해 저장하는 과정에서 발생하는 침출용액에서

알긴산염을 8 주 후 회수하면 그 수율이 2~3%이고 알긴산염의 분자량은 4주 후 약 50 kDa으로 저장과정에서 저분자화 되었다.

참 고 문 헌

1) Park, K. P., T. H. Kim and Y. S. Kim, 2003, Extraction of alginate from waste-brown seaweed and use of dealginate, J. of the Environmental Sciences, 12(1), 63-68.
2) 씨스켐닷컴(주), Chem. Inform. Rep., http://www.cischem.com/chemical_ report/cr_29/cr29_54.html
3) Kim, Y. J., Y. J. Yoo and H. Y. Lee, 1995, Characterization of Lead Adsorption by Undaria Pinnatifida, Biotechnol. Letters, 17(3), 345-350.
4) Matheickal, J. T. and Q. Yu, 1999, Biosorption of Lead(II) Copper(II) from Aqueous Solutions by Pre-treated Biomass of Australian Marine Algae, Bioresource Technology, 69, 223.
5) Kim, Y. H., J. Y. Park, S. H. Kim and Y. J. Yoo, 1997, Separation of Heavy Metals Using Chemically Modified Biomass, Proceedings of the Asia-Pacific Biochemical Engieering Conference, 2, 975.
6) Chretien, C, V. Boudy, P. Allain and J. C. Chaumeil, 2004, Indomethacin release from ion-exchange microspheres : impregnation with alginate reduces release rate, J. Controlled Release, 96, 369-378.
7) Ferreira, P. A. and A. J. Almeida, 2004, Cross-linked alginate beads: a new matrix controlled release of pindolol, J. Controlled Release, 97, 431-439.
8) Suzuki, T., K. Nakai, Y. Yoshi, T. Shirai and T. Hirano, 1993, Seasonal variation in the dietary fiber content and molecular weight of soluble dietary fiber in brown alga, Hijiki, Nippon Suisan Gakkaishi, 59(9), 1633-1638.
9) Saude, N., H. Cheze-Lange, D. Beunard, P. Dhulster, D. Guillochon, A. M. Caze, M. Morcellet and G. A. Junter, 2002, Alginate production by *Azotobacter vinelandii* in a membrane bioreactor, Process Biochemistry, 38, 273-278.
10) Lee, D. S., H. R. Kim and J. H. Pyeun, 1998, Effect of low-molecularization on rheological properties of alginate, J. Korean Fish. Soc., 31(1), 187-195.
11) Lee, D. S., T. J. Nam and J. H. Pyeun, 1998, Effect of low-molecular alginates on cholesterol levels and fatty acid compositions of serum and liver in cholesterol-fed rats, J. Korean Fish. Soc., 31(3), 399-408.
12) Ikeda, A., A. Takemura and H. Ono, 2000, Preparation of low-molecular weight alginic acid by acid hydrolysis, Carbohydrate Polymer, 42, 421-425.
13) Nakagawa, S. and H. Okuda, 1996, Effect of Organic Acids on Decomposition of Alginic Acid, Nippon Shokuhin Kakaku Kaishi, 43(8), 917-922.
14) Nagasawa, N., H. Mitomo, F. Yoshii and T. Kume, 2000, Radiation-induced degradation of sodium alginate, Polymer Degradation and Stability, 69, 279-285.
15) Kim, K. S., M. H. Lee and S. H. Cho, 2002, Radical Degradation of Sodium Alginate, J. Chitin Chitosan, 7(1), 8-13.
16) Ahn, S. J, Y. S. Kim and K. P. Park, 2004, Storage of Waste-Brown Seaweed and Degradation of Alginate Using Microorganism, J. of the Environmental Sciences, 13(3), 313-318.
17) Stephen, L. R., 1993, Fundamental Principles of Polymeric Materials, Jhon Wily, Inc., New York, 58-65pp.
18) 정동효, 1992, 효소학개론, 대광서림, 264pp.