



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0039591
(43) 공개일자 2014년04월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/04 (2006.01) C12P 7/64 (2006.01)
C12N 1/12 (2006.01) C12R 1/89 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0105924
(22) 출원일자 2012년09월24일
심사청구일자 2012년09월24일

(71) 출원인
전남대학교산학협력단
광주광역시 북구 용봉로 77
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)
(72) 발명자
김두운
광주 북구 우치로537번길 10, 105동 103호 (일곡
동, 동아아파트)
우희철
부산 남구 분포로 111, 133동 406호 (용호동, 엘
지메트로시티아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양부현

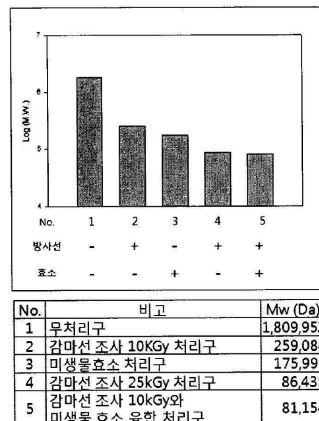
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **해조류로부터 알지네이트 올리고당 및 휘발성 지방산 생산 방법**

(57) 요약

본 발명은 감마선 조사 (또는 전자선 조사) 및 미생물 효소처리 융합 기술을 이용하여 해조류로부터 알지네이트 올리고당 및 휘발성 지방산(Volatile fatty acid)을 생산하는 방법을 제공한다. 본 발명은 식품내 방사선 허용 기준 범위에서 감마선을 조사한 후 알지네이트 라이아제를 처리하는 것으로 고준위의 감마선 조사 (또는 전자선)에 따른 고비용 및 안정성 문제와 효소를 이용한 생물학적 방법의 낮은 생산수율을 극복할 수 있으며 친환경적이면서 높은 수율로 알지네이트 올리고당 및 휘발성 지방산(Volatile fatty acid)을 생산할 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

최재형

부산 부산진구 전포대로 156, 102동 2907호 (전포동, 한라비발디)

황예슬

전남 여수시 소호1길 38, (소호동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20120631251-00

부처명 농림수산식품부

연구사업명 용역사업

연구과제명 바이오매스용 해조류 대량생산 기술개발

기 여 율 1/1

주관기관 부경대학교 산학협력단

연구기간 2012.06.22 ~ 2012.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 해조류로부터 알지네이트 올리고당(alginate oligosaccharide) 및 휘발성 지방산(Volatile fatty acid) 생산 방법:

- (a) 분말화된 해조류에 감마선(gamma-ray) 또는 전자선(electron beam)을 조사하는 단계; 및
- (b) 상기 단계 (a)의 결과물에 서열목록 제2서열에 기재된 아미노산 서열을 가지는 알지네이트 라이아제(alginate lyase)를 처리하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 해조류는 다시마(*Laminaria japonica*), 톳(*Hizikia fusiformis*), 미역(*Undaria pinnatifida*), 대황(*Eisenia bicyclis*), 모자반(*Sargassum confusum*), 우뚝가사리(*Gelidium amansii*), 참김(*Porphyra tenera*), 돌김(*Porphyra yezoensis*), 파래김(*Undaria pinnatifida*), 파래(*Enteromorpha*) 및 청각(*Codium fragile*)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 해조류는 다시마(*Laminaria japonica*)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)에서 감마선 또는 전자선은 흡수선량이 1-10 kGy이 되도록 조사하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 알지네이트 라이아제는 효소 보조인자를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 알지네이트 라이아제 처리는 pH 6-9 및 30-70℃에서 48-80시간 동안 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 해조류로부터 알지네이트 올리고당(alginate oligosaccharide) 및 휘발성 지방산(Volatile fatty acid)을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 우리나라는 삼면이 바다에 접하고 있고 육지보다 넓은 해양을 국토로 가지로 있으며, 국내 해조류 생산량은 1,049만톤으로 전 세계 생산량의 60.5%를 차지하는 풍부한 자원이다. 해조류는 식품으로써, 음료, 식자재, 주

류 등식용으로 활용될 뿐만 아니라 바이오에너지 생산, 이산화탄소 저감, 생리활성 물질 개발 등 새로운 이용분야가 개척되고 있어 향후 해조류 이용분야는 더욱 확대될 것으로 전망된다.

[0003] 해조류를 이용한 가공에서 가장 문제가 되는 것은 단단한 조체와 점액성의 세포벽 충전 물질인 세포 간 다당체의 분해가 어렵다는 것이다. 현재 알지네이트 같은 해조 다당체의 저분자화를 위하여 염산, 유기산에 의한 산가수분해법, 고온, 고압 혹은 방사선을 이용한 방법, 분해효소를 이용한 생물학적 방법 등이 보고되고 있으며, 단일조건 전처리시 대규모의 오염물질 발생, 낮은 수율, 고가의 설치비 또는 유지비 등의 한계점이 있으므로 극복할 수 있는 대안제시가 필요하다.

[0004] 감마선조사 (또는 전자선조사) 및 미생물 효소 융합기술의 접목은 해조 다당체 분해도 증가를 통한 수율향상, 안정적인 생산체계 구축, 친환경적 전처리, 낮은 공정비를 통한 경제성 증가를 기대하며, 식품 또는 신소재 개발 및 연구분야 뿐만 아니라 바이오에너지 생산분야에 활용이 가능하다.

[0005] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 해조류로부터 알지네이트 올리고당 및 휘발성 지방산(Volatile fatty acid)을 효과적으로 생산할 수 있는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 감마선 (또는 전자선)을 조사한 해조류에 전복 장내 유래의 미생물로부터 분리한 알지네이트 라이아제를 처리하면 해조류의 다당체 분해를 증진시킬 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0007] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 해조류로부터 c(alginate oligosaccharide) 및 휘발성 지방산(Volatile fatty acid) 생산 방법을 제공한다:

[0009] (a) 분말화된 해조류에 감마선(gamma-ray) 또는 전자선(electron beam)을 조사하는 단계; 및

[0010] (b) 상기 단계 (a)의 결과물에 서열목록 제2서열에 기재된 아미노산 서열을 가지는 알지네이트 라이아제(alginate lyase)를 처리하는 단계.

[0011] 본 발명자들은 해조류로부터 알지네이트 올리고당 및 휘발성 지방산(Volatile fatty acid)을 효과적으로 생산할 수 있는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 감마선 또는 전자선을 조사한 해조류에 전복 장내 유래의 미생물로부터 분리한 알지네이트 라이아제를 처리하면 해조류의 다당체 분해를 증진시킬 수 있음을 규명하였다.

[0012] 본 명세서에서 용어 알지네이트 라이아제는 G 블록-특이 폴리구루로네이트(polyguluronate) 및 M 블록-특이 폴리만뉴로네이트(polymannuronate)로 구성된 알지네이트를 분해하여 저분자화 하는 효소를 의미한다.

[0013] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 알지네이트 라이아제는 전복의 장내 미생물로부터 유래된 것이다. 가장 바람직하게는 상기 알지네이트 라이아제는 서열목록 제2서열에 기재된 아미노산 서열을 갖는다.

[0014] 본 발명에 따르면, 해조류로부터 알지네이트 올리고당 및 휘발성 지방산(Volatile fatty acid)을 생산하기 위해 우선 분말화된 해조류에 버퍼를 첨가하여 액상화시킨다. 본 발명에서 이용되는 버퍼는 인삼염 버퍼로 바람직하게는 pH 5.0-7.0이다.

- [0015] 액상화된 해조류에 감마선 또는 전자선을 조사한다. 바람직하게는 감마선 (또는 전자선)은 흡수선량이 1-20 kGy, 보다 바람직하게는 1-10 kGy, 보다 더 바람직하게는 5-10 kGy, 가장 바람직하게는 10 kGy이 되도록 조사한다.
- [0016] 감마선 (또는 전자선)을 조사한 액상 해조류에 알지네이트 라이아제를 처리한다. 알지네이트 라이아제는 효소 보조인자를 추가적으로 포함할 수 있다. 본 발명에서 알지네이트 라이아제에 추가적으로 포함되는 효소 보조인자는 효소 반응에서 효소의 활성화에 작용하는 당업계에 알려진 다양한 조효소 및 금속이온 등을 포함할 수 있다. 바람직하게는 본 발명에 이용되는 효소 보조인자는 NAD 또는 Ag^+ 이다.
- [0017] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 알지네이트 라이아제 처리는 pH 6-9 및 30-70℃에서 48-80시간동안 실시한다. 보다 바람직하게는 pH 7.0-8.0, 40-50℃에서 65-80시간동안 실시하고, 가장 바람직하게는 pH 7.0, 45℃에서 72시간 동안 실시한다.
- [0018] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 알지네이트 올리고당 생산 및 휘발성 지방산(Volatile fatty acid)에 이용되는 해조류는 바람직하게는 다시마(*Laminaria japonica*), 톳(*Hizikia fusiformis*), 미역(*Undaria pinnatifida*), 대황(*Eisenia bicyclis*), 모자반(*Sargassum confusum*), 우뚝가사리(*Gelidium amansii*), 참김(*Porphyra tenera*), 돌김(*Porphyra yezoensis*), 파래김(*Undaria pinnatifida*), 파래(*Enteromorpha*) 또는 청각(*Codium fragile*)이고, 보다 바람직하게는 다시마, 미역, 참김, 돌김, 파래김, 파래 또는 청각이며, 보다 더 바람직하게는 다시마, 미역, 돌김 또는 청각이고, 가장 바람직하게는 다시마이다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0020] (a) 본 발명은 감마선 조사(또는 전자선 조사) 및 미생물 효소처리 융합 기술을 이용하여 해조류로부터 알지네이트 올리고당 및 휘발성 지방산(Volatile fatty acid)을 생산하는 방법을 제공한다.
- [0021] (b) 본 발명은 식품 내 방사선 허용기준 범위에서 감마선(또는 전자선)을 조사한 후 알지네이트 라이아제를 처리하는 것으로 고준위의 감마선(전자선) 조사에 따른 고비용 및 안정성 문제와 효소를 이용한 생물학적 방법의 낮은 생산수율을 극복할 수 있으며 친환경적이며 높은 수율로 알지네이트 올리고당 및 휘발성 지방산(Volatile fatty acid)을 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 감마선 조사 선량에 따른 다시마의 분자량 변화를 측정한 결과이다.
- 도 2는 감마선 조사하고 알지네이트 라이아제를 처리한 후 다시마의 분자량 변화를 측정한 결과이다.
- 도 3은 알지네이트 올리고당 생성효율을 TLC를 통해 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0024] 실시예

- [0025] 해조류인 다시마를 건조 분말화 시킨 후, pH 6.0 인산염 버퍼를 이용하여 액상으로 조제(540g/18L) 한 후 한국 원자력연구원 정읍분소에 있는 감마선 조사 시설에서 ^{60}Co 을 선원으로 이용하여 실온에서 시간당 10 kGy의 일정한 선량률로 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300 kGy의 흡수선량을 얻도록 조사하였다. 감마선 조사를 한 다시마의 조사선량에 따른 분자량 변화를 측정하기 위해 GPC(Gel Permeation Chromatography)를 이용하여 분자량(Mw)을 측정하였고, 분자량 산출을 위한 표준품으로 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 표준곡선을 그려 샘플의 분자

량 측정에 이용하였다. 샘플의 분자량을 측정한 결과 감마선 조사를 하지 않은 다시마의 경우 분자량이 1,800 kDa 정도였으나 25 kGy에서 86.4 kDa으로 급격하게 감소하였다. 조사량이 증가할수록 분자량이 감소하여 100 kGy 조사구에서 3.1 kDa까지 저분자화 되었으나, 200 kGy에서는 분자량이 2.1 kDa으로 분자량 감소가 둔화되는 결과를 보였다(도 1, 표 1).

표 1

[0026] GPC(Gel Permeation Chromatography)를 이용한 다시마 저분자화 분석결과

선량(kGy)	Mw(Da)
	<i>S. japonica</i>
0	1,809,952
10	259,084
25	86,435
50	54,396
75	37,361
100	31,090
200	21,078
300	17,901

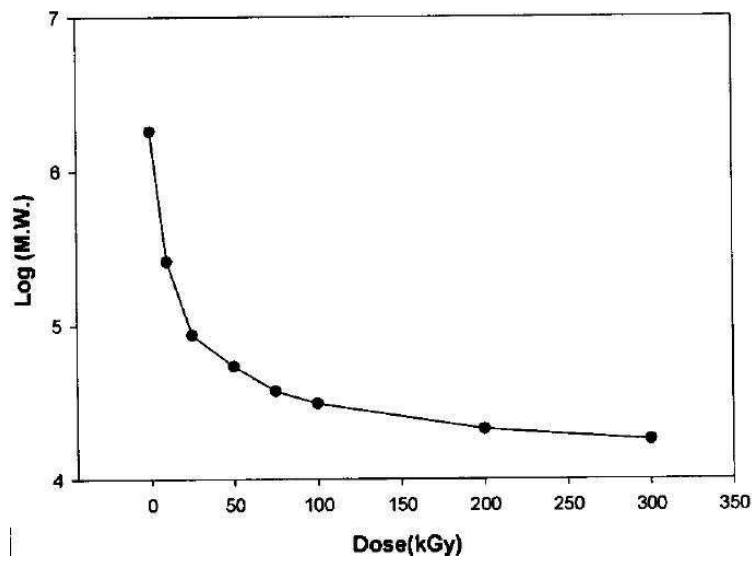
[0027] 이와 같은 결과를 이용하여 전복 내장유래 미생물효소와 10 kGy의 감마선 조사 융합기술을 적용함으로써 25 kGy의 다시마 분해도 효과를 얻고자 하였다. 샘플은 10 kGy 감마선조사를 실시한 0.6% 다시마분말이 포함된 액상과 알지네이트 라이아제를 NAD^+ , AgNO_3 와 같은 보조인자가 첨가된 pH 7.0, 45℃의 최적조건에서 72시간 동안 반응을 시켜 생성된 최종산물을 이용하였다. GPC(Gel Permeation Chromatography)를 이용하여 관찰된 분자량 변화의 경우, 단일 전처리시 다시마 분자량은 10 kGy의 감마선 조사의 경우 259 kDa, 미생물 효소의 경우 175 kDa로 확인되었으며, 융합조건 시 81.1 kDa로 25 kGy의 단일 감마선 조사구보다 더 낮은 분자량을 확인하였다(도 2).

[0028] 알지네이트 올리고당 생성효율을 TLC(Thin-layer chromatography)를 통해 분석한 결과, 단일 처리(감마선 조사 또는 알지네이트 라이아제 처리) 조건보다 감마선 조사 후 알지네이트 라이아제를 처리한 경우, 알지네이트 올리고당 생산 수율이 증가되었음을 확인하였다(도 3). 따라서, 감마선조사 및 알지네이트 라이아제 효소 처리를 융합하여 해조류에 적용하면, 해조류 다당체 분해를 효과적으로 증진할 수 있으며, 이것은 단일 처리보다 적은 분자량의 올리고당을 생산할 수 있다는 것을 나타낸다.

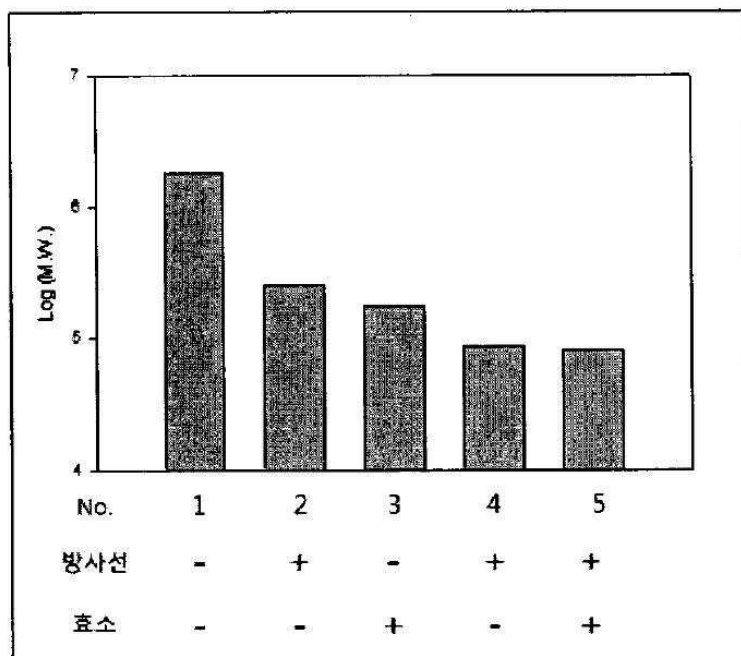
[0029] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1

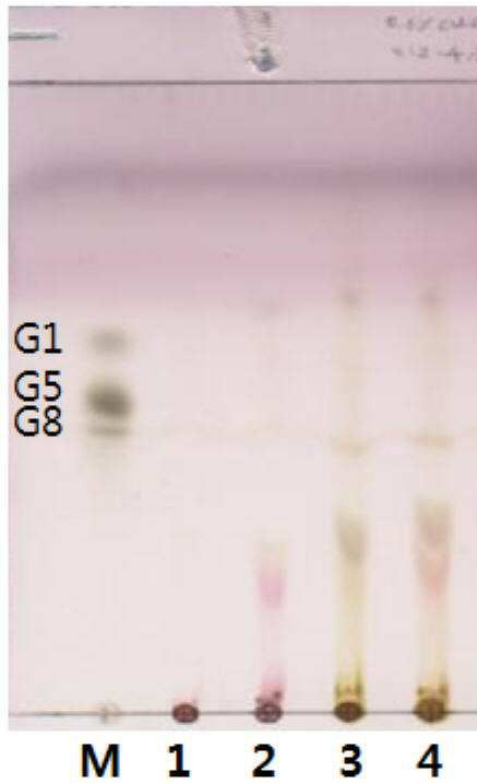


도면2



No.	비고	Mw (Da)
1	무처리구	1,809,952
2	감마선 조사 10kGy 처리구	259,084
3	미생물효소 처리구	175,991
4	감마선 조사 25kGy 처리구	86,435
5	감마선 조사 10kGy와 미생물 효소 융합 처리구	81,154

도면3



서열 목록

<110>	INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY	
<120>	Methods for Producing Alginate Oligosaccharide and Volatile Fatty Acid from Marine Algae	
<130>	PN120473	
<160>	2	
<170>	KopatentIn 2.0	
<210>	1	
<211>	972	
<212>	DNA	
<213>	Alginate lyase nucleotide sequence	
<400>	1	
	atgatgagtt taaaaacatt gggtagttct aaaggcaaga aagcggtttt cggtagctgtt	60
	gccttagccg ctgcgtgac aatgactgca tgttcaaatg tagcgctaa caatgcgcca	120
	aaaactaaag cgccttcaga caactttgac ctactagggt ggacagtaag tgtgcctatc	180
	gattctgatg gcgatggcaa atctgaccaa attaaagaaa aagaattagc agctggttac	240
	tctgacgcta actatttcta cttggcagaa gatggcggca tggatattta agcgccagt	300
	aaaggtgcta aaacatctaa aaacaccact tacactcggt cagaattacg tgaaatgatt	360

cgccgtggta acactcaata caaaacgaaa ggtgttggcg gtaacaactg ggtattctca 420
acggctcctc aagcagacca gaaagtagct ggcggtgttg acggtactct agaagcaact 480
ctagccgtta accacgtaac aactacaggt aaaaactggc aggttggtcg tgtgatcatc 540
ggtcaaatcc actcaaaca caacgaacca attcgtttgt actaccgtaa attgccacaa 600

aacgaaacag gttctatcta ctttgcgcac gaaccacgta aagcgtttgg taaagaaact 660
tggcacaaca tcacggtaa ctactacct gattactggc accaagatgc aacaccaaca 720
gagcctacag acggtatcaa acttaacgag aaattcagct accgtatcca agttaaggt 780
aacgagcttt ctgtaactat catgcgtgat ggtaaaaaag accttgtaa aacagtcgac 840
atgtctgaga gtggcttcgg tgaaggcggc caatacatgt actttaagc gggcgtttac 900
aaccaaaaca aaacaggcga tgcagacgac tacgcacaag caactttcta caagcttaac 960
gtaactcact aa 972

<210> 2
<211> 323
<212> PRT
<213> Alginate lyase amino acid sequence
<400> 2

Met Met Ser Leu Lys Thr Leu Gly Thr Ser Lys Gly Lys Lys Ala Val
1 5 10 15

Phe Gly Ala Val Ala Leu Ala Ala Ala Leu Thr Met Thr Ala Cys Ser
20 25 30

Asn Val Ala Pro Asn Asn Ala Pro Lys Thr Lys Ala Pro Ser Asp Asn
35 40 45

Phe Asp Leu Leu Gly Trp Thr Val Ser Val Pro Ile Asp Ser Asp Gly

50 55 60
Asp Gly Lys Ser Asp Gln Ile Lys Glu Lys Glu Leu Ala Ala Gly Tyr

65 70 75 80
Ser Asp Ala Asn Tyr Phe Tyr Leu Ala Glu Asp Gly Gly Met Val Phe

85 90 95
Lys Ala Pro Val Lys Gly Ala Lys Thr Ser Lys Asn Thr Thr Tyr Thr

100 105 110
Arg Ser Glu Leu Arg Glu Met Ile Arg Arg Gly Asn Thr Gln Tyr Lys

115 120 125
 Thr Lys Gly Val Gly Gly Asn Asn Trp Val Phe Ser Thr Ala Pro Gln
 130 135 140
 Ala Asp Gln Lys Val Ala Gly Gly Val Asp Gly Thr Leu Glu Ala Thr
 145 150 155 160
 Leu Ala Val Asn His Val Thr Thr Thr Gly Lys Asn Trp Gln Val Gly
 165 170 175
 Arg Val Ile Ile Gly Gln Ile His Ser Asn Asn Asn Glu Pro Ile Arg
 180 185 190
 Leu Tyr Tyr Arg Lys Leu Pro Gln Asn Glu Thr Gly Ser Ile Tyr Phe
 195 200 205
 Ala His Glu Pro Arg Lys Ala Phe Gly Lys Glu Thr Trp His Asn Ile
 210 215 220
 Ile Gly Asn Ser Leu Pro Asp Tyr Trp His Gln Asp Ala Thr Pro Thr
 225 230 235 240
 Glu Pro Thr Asp Gly Ile Lys Leu Asn Glu Lys Phe Ser Tyr Arg Ile
 245 250 255
 Gln Val Lys Gly Asn Glu Leu Ser Val Thr Ile Met Arg Asp Gly Lys
 260 265 270
 Lys Asp Leu Val Lys Thr Val Asp Met Ser Glu Ser Gly Phe Gly Glu
 275 280 285
 Gly Gly Gln Tyr Met Tyr Phe Lys Ala Gly Val Tyr Asn Gln Asn Lys
 290 295 300
 Thr Gly Asp Ala Asp Asp Tyr Ala Gln Ala Thr Phe Tyr Lys Leu Asn
 305 310 315 320
 Val Thr His