



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0117924
(43) 공개일자 2014년10월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/56 (2006.01) C12P 19/04 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0032885
(22) 출원일자 2013년03월27일
심사청구일자 2013년03월27일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)
(72) 발명자
안동현
부산 남구 분포로 113, 203동 2202호 (용호동, 엘
지메트로시티아파트)
선우찬
경북 포항시 남구 동해면 일월로 96-8,
김현지
부산 북구 금곡대로 268, 307동 802호 (화명동,
화명대림타운)
(74) 대리인
김순웅

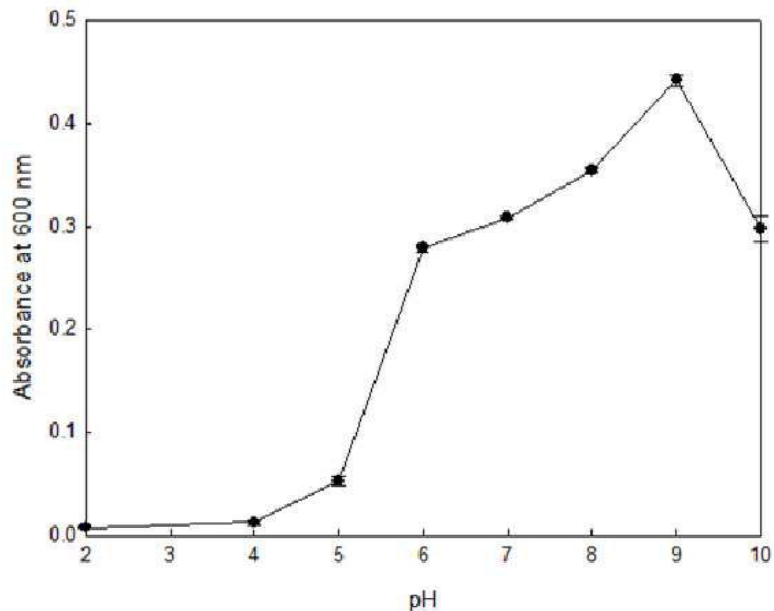
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 쉬와넬라 오나이텐시스를 이용한 알긴산 분해 효소의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 쉬와넬라 오나이텐시스를 이용한 알긴산 분해 효소의 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 알긴산 분해 효소를 이용한 알긴산 저분자 물질의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 쉬와넬라 오나이텐시스는 최적 pH, NaCl 농도, 온도 및 배양 시간을 포함한 최적 배양 조건에서 알긴산 분해 조효소를 효율적으로 제조할 수 있으며, 상기 알긴산 분해 조효소를 정제하여 최적 pH, NaCl 농도 및 온도 조건에서 다당류인 알긴산을 효율적으로 저분자화하여 알긴산 올리고당을 제조할 수 있다.

대표도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

- 1) 쉬와넬라 오나이덴시스를 pH 8 내지 10, 1 내지 3%의 NaCl 농도, 및 25℃ 내지 35℃에서 21시간 내지 27 시간 동안 배양하여 배양액을 얻는 단계;
- 2) 상기 1)단계의 배양액을 황산 암모늄 염석 및 투석으로 정제하여 알긴산 분해효소 분획물을 획득하는 단계; 및
- 3) 상기 2)단계의 분획물을 크로마토그래피로 정제하여 높은 활성을 가진 알긴산 분해 효소 분획물을 획득하는 단계;를 포함하는, 알긴산 분해 효소의 제조방법.

청구항 2

제1항에 의하여 제조된 알긴산 분해 효소를 알긴산과 반응시키는 것을 특징으로 하는 알긴산 올리고당의 제조방법.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 반응은 pH 8 내지 10, 0.01 내지 0.1M의 NaCl 농도 및 25℃ 내지 35℃의 조건에서 수행되는 것을 특징으로 하는, 알긴산 올리고당의 제조방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 쉬와넬라 오나이덴시스를 이용한 알긴산 분해 효소의 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 알긴산 분해 효소를 이용한 알긴산 저분자 물질의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 해조류는 식용이나 산업용으로 다양하게 이용해 온 해양 자원으로 의학, 화장품 그리고 식품 산업의 원료로 다양한 분야에서 이용되고 있다. 특히 해조류는 육상과는 다른 특이적 환경에서 서식하기 때문에 생육 환경으로부터 기인한 항종양, 항바이러스, 항혈액응고 및 면역력 증강 등의 기능성이 알려져 있다. 이중 갈조류의 세포벽 구성 다당류인 알긴산은 D-만누론산(D-mannurinic acid)과 L-글루론산(L-guluronic acid)의 -1,4 결합 또는 -1,4 결합으로 이루어진 복합다당류로서, 결합 순서 및 결합 구조에 따라 겔 형성능, 점도 증진능, 수분 흡수능, 결합능 및 필름 형성능 등의 물리적 특징을 가지고 있어 식품 산업에서 아이스크림, 빙과, 시럽, 가공 우유, 젤리, 잼, 어육 연제품의 안정제와 증점제로 많이 이용되고 있다. 또한 최근에는 알긴산의 난소화성 특성을 부각시켜 식이 섬유로서 변비 치유, 비만 억제 등의 성인병 예방 식품으로 기대되며, 항암 작용, 중금속 배출, 콜레스테롤 배출 등의 효능이 보고되고 있다. 이와 같은 알긴산의 기능성이 밝혀지면서 그 이용을 확대하기 위해 다양한 연구가 진행되고 있으며, 상온에서 용해 시간이 길고, 농도가 높아짐에 따라 고점도 특성을 보여 산업적 이용이 제한적인 문제점을 해결하기 위해 알긴산을 저분자화하는 연구가 많이 이루어지고 있다. 알긴산 저분자화 방법으로는 고온 고압, 산처리, 방사선 조사 등의 방법이 있지만, 비용이 많이 들고, 중화의 어려움이 있으며, 안전성 검증에 대한 문제점이 있어 현재 알긴산 저분자화를 위한 방법으로 효소적 가수분해 방법에 대한 연구가 많이 이루어 지고 있다.

[0003] 알긴산 분해 효소는 성게(*Strongylocentrotus purpuratus*), 군소(*Dolabella auriculria*), 소라(*Turbo Corntus*)등 해조류 섭식 동물의 내장이가 그 분변에서 분리가 이루어지고 있으며, *Altermonas* sp., *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptomyces* sp., *Sphingomonas* sp. 등의 해수와 해저 토양 유래의 알긴산 분해 효소를 분리하는 미생물에서 분리가 이루어지고 있다.

[0004] 미생물 유래의 알긴산 분해 효소 유전자를 클로닝함으로써 효소를 대량 생산할 수 있는 이점을 살릴 수 있어 현재 미생물 유래 알긴산 분해 효소의 정제 및 정제 효소의 특성에 관한 연구가 많이 이루어지고 있는 실정이다.

[0005] 이에 본 발명자들은 알긴산 분해 미생물 쉬와넬라 오나이덴시스(*Shewanella oneidensis*) PKA 1008의 최적 생육

조건, 최적 효소 생산 조건을 확인하고, 상기 최적 조건으로 획득한 조효소를 정제하여 효소의 최적 분해 조건을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 발명의 목적은 쉬와넬라 오나이텐시스(*Shewanella oneidensis*)를 이용한 알긴산 분해 효소의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0007] 발명의 다른 목적은 상기 제조방법으로 제조된 알긴산 분해 효소를 알긴산과 반응시키는 것을 특징으로 하는 알긴산 올리고당의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 따라서, 본 발명은 쉬와넬라 오나이텐시스(*Shewanella oneidensis*)를 이용한 알긴산 분해 효소의 제조방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조된 알긴산 분해 효소를 알긴산과 반응시키는 것을 특징으로 하는 알긴산 올리고당의 제조방법 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명의 쉬와넬라 오나이텐시스는 최적 pH, NaCl 농도, 온도 및 배양 시간을 포함한 최적 배양 조건에서 알긴산 분해 조효소를 효율적으로 제조할 수 있으며, 상기 알긴산 분해 조효소를 정제하여 최적 pH, NaCl, 농도 및 온도 조건에서 다당류인 알긴산을 효율적으로 저분자화하여 알긴산 올리고당을 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0011] 도 1은 본 발명의 미생물의 알긴산 분해능을 측정한 점도 및 환원당 값을 나타낸 도이다.
- 도 2는 본 발명의 알긴산 분해 균의 pH별 생육 곡선을 나타낸 도이다.
- 도 3은 본 발명의 알긴산 분해 균의 NaCl 농도별 생육 곡선을 나타낸 도이다.
- 도 4는 알긴산 분해 균의 배양 온도별 생육 곡선을 나타낸 도이다.
- 도 5는 알긴산 분해 균의 배양 시간별 생육 곡선을 나타낸 도이다.
- 도 6은 조효소의 황산암모늄 염석물의 분획별 환원당 생성능을 나타낸 도이다.
- 도 7은 80% 포화 황산암모늄 염석 침전물을 DEAE-sephadex 실시하여 얻은 분획별 단백질 농도 및 효소 활성을 나타낸 도이다.
- 도 8은 DEAE-sephadex 활성 분획을 sephadex G-100 실시하여 얻은 분획별 단백질 농도 및 효소 활성을 나타낸 도이다.
- 도 9는 Sephdex G-100 활성 분획을 DEAE-sephadex 실시하여 얻은 분획별 단백질 농도 및 효소 활성을 나타낸 도이다.
- 도 10은 DEAE-sephadex 활성 분획을 sephacryl S-200 HR 실시하여 얻은 분획별 단백질 농도 및 효소 활성을 나타낸 도이다.
- 도 11은 본 발명의 알긴산 분해 효소의 최적 pH 조건을 나타낸 도이다.
- 도 12는 본 발명의 알긴산 분해 효소의 최적 온도 조건을 나타낸 도이다.
- 도 13은 본 발명의 알긴산 분해 효소의 최적 NaCl 농도 조건을 나타낸 도이다.
- 도 14는 본 발명의 알긴산 분해 효소의 금속 이온에 대한 특이성을 나타낸 도이다.
- 도 15는 알긴산 분해 효소의 반응 속도 정수 및 최대 반응 속도를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명은
- [0013] 1)쉬와넬라 오나이텐시스를 pH 8 내지 10, 1 내지 3%의 NaCl 농도, 및 25℃ 내지 35℃에서 21시간 내지 27 시간 동안 배양하여 배양액을 얻는 단계;
- [0014] 2)상기 1)단계의 배양액을 황산 암모늄 염석 및 투석으로 정제하여 알긴산 분해효소 분획물을 획득하는 단계; 및
- [0015] 3)상기 2)단계의 분획물을 크로마토그래피로 정제하여 높은 활성을 가진 알긴산 분해 효소 분획물을 획득하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 알긴산 분해 효소의 제조방법을 포함하는, 쉬와넬라 오나이텐시스 (*Shewanella oneidensis*)를 이용한 특징으로 하는 알긴산 분해 효소의 제조방법을 제공한다.
- [0016] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0017] 본 발명에서는 부산 연안 송정 앞바다에서 분해가 진행 중인 녹조류 구멍갈파래로부터 알긴산 분해 미생물을 분리, 동정하였으며, 이중 알긴산 분해 활성이 높은 쉬와넬라 오나이텐시스(*Shewanella oneidensis*) PKA 1008의 최적 생육 pH, NaCl 농도, 배양 온도 및 배양 시간을 확인한 후, 상기 조건으로 조효소를 생산하여, 생성된 조효소를 황산암모늄 염석, 투석, 크로마토그래피(sephadex G-25, sephadex G-100, DEAE-sephadex 또는 sephacryl S-200HR)를 실시하여 정제하였으며, 정제 효소의 최적 pH, 온도, NaCl 농도, 금속 이온 특이성 및 최대 반응 속도식을 확인하였다.
- [0018] 본 발명의 알긴산 분해효소의 제조방법에서, 상기 1)단계는 쉬와넬라 오나이텐시스를 배양하여 배양액을 얻는 단계로, 상기 균주를 pH 8 내지 10, 바람직하게는 pH 9, 1 내지 3%의 NaCl 농도, 바람직하게는 2%의 NaCl 농도, 25℃ 내지 35℃의 온도, 바람직하게는 30℃에서 21시간 내지 27시간 동안, 바람직하게는 24시간 동안 배양할 수 있다.
- [0019] 상기 2)단계는 배양액을 정제하여 알긴산 분해효소 분획물을 획득하는 단계로, 상기 정제는 황산 암모늄 염석 및 투석이 바람직하다. 즉, 30% 내지 50%의 황산 암모늄 및 70% 내지 90%의 황산 암모늄 용액으로 염석 및 투석할 수 있다.
- [0020] 상기 3)단계는 2)단계에서 알긴산 분해효소를 갖는 분획물을 크로마토 그래피를 이용하여 정제하여 알긴산 분해 효소 분획물을 획득하는 단계로, 상기 크로마토그래피를 수행하는 과정은 DEAE-sephadex를 수행하고, 알긴산 분해 활성이 높은 분획을 추출 후, sephadex G-100를 수행하고, 알긴산 분해 활성이 높은 분획을 추출 후, DEAE-sephadex를 재실시하고, 활성 분획은 sephacryl S-200 HR을 수행할 수 있다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 의하여 제조된 알긴산 분해 효소를 알긴산과 반응시키는 것을 특징으로 하는 알긴산 올리고당의 제조방법을 제공한다.
- [0022] 본 발명의 상기 반응은 pH 8 내지 10, 0.01 내지 0.1M의 NaCl 농도 및 25℃ 내지 35℃의 조건에서 수행될 수 있다.
- [0023] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0024] [실시예 1] 쉬와넬라 오나이텐시스 PKA 1008 균주의 동정 및 상기 균주의 최적 생육조건 확인
- [0025] 1. 쉬와넬라 오나이텐시스 PKA 1008 균주의 동정(구체적 배양방법 필요할듯요, 배지등)
- [0026] 본 발명에서 사용한 균주는 부산 연안 송정 앞바다에서 분해가 진행 중인 녹조류 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)로부터 획득한 단일 콜로니(colony) 중 알긴산 분해능이 우수한 콜로니를 이용하였으며, (주) 마크로젠에서 쉬와넬라 오나이텐시스 16S rRNA 서열(서열번호1) 분석 후, NCBI blast search를 통해 동정한 결과, 쉬와넬라 오나이텐시스로 동정되었고, 쉬와넬라 오나이텐시스(*Shewanella oneidensis*) PKA 1008로 명명후, 본 발명의 미생물 균주로 이용하였다. 본 발명의 균주의 알긴산 분해능을 확인하기 위하여, 점도 및 환원당 값을 확인하였으며, 이의 결과를 도 1에 나타내었다.
- [0027] 도 1에 나타난 바와 같이, 본원 발명의 쉬와넬라 오나이텐시스 PKA 1008 균주를 배양하는 경우, 환원당이 증가되고, 점도가 감소하므로, 상기 균주는 알긴산 분해능이 있음을 알 수 있다.

[0028]

[0029] **2. 쉬와넬라 오나이텐시스 PKA 1008 균주의 생육 최적 pH 확인**

[0030]

0.1 N 및 1 N HCl과 NaOH를 이용하여 MB(marine broth, Difco co., NY, USA) 배지의 pH를 25℃에서 2, 4, 6, 7, 8, 9 및 10으로 조정 한 후, 121℃에서 10분간 멸균하였으며, 멸균된 배지에 10^6 cfu/mL 농도의 쉬와넬라 오나이텐시스 PKA 1008 균주를 접종하여 30℃에서 24 시간 동안 배양 후, 흡광도(Thermo sepctrosonic UV, Thermo Co., NY, USA)를 측정하였다. 이의 결과를 도 2에 나타내었다.

[0031]

도 2에 나타난 바와 같이, 알긴산 분해균 쉬와넬라 오나이텐시스 PKA 1008의 최적 생육 pH를 확인한 것으로, 실험을 실시한 결과, pH 6, 7, 8, 9 및 10에서 흡광도값은 각각 0.279, 0.309, 0.355, 0.422 및 0.298로 측정되어, pH 9에서 균체의 생성량이 가장 많은 것으로 나타났다. 따라서, 본 발명의 균주의 최적 생육 pH는 pH 9인 것을 확인할 수 있었다.

[0032] **3. 쉬와넬라 오나이텐시스 PKA 1008 균주의 생육 최적 NaCl 농도 확인**

[0033]

본 발명의 균주의 생육 최적 NaCl 농도를 확인하기 위하여, NaCl 농도 2, 3, 4, 5, 6, 7 및 8%로 조정 한 MB 배지를 0.1 N 및 1 N HCl과 NaOH를 이용하여 최적 pH 조건인 pH 9로 맞춘 후, 멸균하여 사용하였다. 멸균된 각 NaCl 농도의 배지에 10^6 cfu/mL 농도의 쉬와넬라 오나이텐시스 PKA 1008를 접종하여 30℃에서 24 시간 동안 배양 후, 흡광도를 측정하였다. 이의 결과를 도 3에 나타내었다.

[0034]

도 3에 나타난 바와 같이, 2%와 3%의 NaCl에서 흡광도 값이 각각 0.449 및 0.385로 나타났고, 그 이상의 농도에서는 흡광도 값이 급격히 감소하여 2% NaCl 농도에서 균의 생육이 가장 활발한 것으로 나타났다. 따라서, 본 발명의 균주의 최적 NaCl 농도가 2%인 것으로 확인되었다.

[0035] **4. 쉬와넬라 오나이텐시스 PKA 1008 균주의 생육 최적 온도 확인**

[0036]

본 발명의 균주의 최적 온도를 확인하기 위하여, 최적 pH 9 및 2% NaCl 농도로 조정 한 MB 배지를 멸균 후, 본원 발명의 균주를 10^6 cfu/mL 농도 접종하여, 10, 20, 30, 35, 40 및 50℃ 온도 조건에서 24시간 동안 배양하면서 흡광도를 측정하였다. 이의 결과를 도 4에 나타내었다.

[0037]

도 4에 나타난 바와 같이, 10℃에서의 흡광도값이 0.153에서 30℃에서는 0.497로 증가하였고, 35℃에는 0.294로 낮아졌으며, 그 이상의 온도에서는 생육이 미비한 것으로 나타났다. 상기 결과에 따라, 본 발명의 균주의 최적 생육 온도가 30℃인 것으로 확인되었다.

[0038] **5. 쉬와넬라 오나이텐시스 PKA 1008 균주의 생육 최적 배양 시간 확인**

[0039]

본 발명의 균주의 생육 최적 배양시간을 확인하기 위하여, MB 배지를 최적 pH 9, 2% NaCl 농도로 조정 한 후, 균을 10^6 cfu/mL 농도로 접종하여, 최적 온도인 30℃에서 48 시간 동안 3 시간 간격으로 흡광도를 측정하였다. 이의 결과를 도 5에 나타내었다.

[0040]

도 5에 나타난 바와 같이, 24 시간까지 균수가 급격히 증가하는 대수증식기로 나타났고, 24시간 내지 36시간 동안은 완만하게 증가하는 정지기로 나타났다. 따라서 본 발명의 균주의 최적 생육 조건은 24시간으로 확인되었다.

[0041] **[실시예 2] 알긴산 분해 효소의 제조**

[0042]

1. 조효소의 분리

[0043]

쉬와넬라 오나이텐시스 PKA 1008을 최적 생육 조건인 pH 9, 2% NaCl, 30℃ 조건으로 24시간 동안 대량 배양한 후, 원심분리기(Supra 30K, Hanil Science Co., Korea)를 이용하여 4℃, 12,000g 조건에서 30분 동안 원심 분리하여 상층액을 조효소로 이용하였다.

2. 황산암모늄을 이용한 염석 및 투석

상기 1에서 분리한 조효소를 40% 및 80% 포화 황산암모늄 용액으로 순차적으로 염석을 행하였으며, 12,000g로 30분 동안 원심 분리하여 상층액과 침전물로 분리하였다. 80% 포화 황산암모늄 용액으로 염석한 분획에서 침전물을 획득하여, 이를 30 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.0)으로 용해시켰으며, 동일 완충 용액을 교체하면서 투석막(Membran filter M.W 12-14,000, Sectrum Laboratories Co., USA)으로 4 시간 내지 24 시간 동안 투석을 실시하였다. 황산암모늄 분획물별 알긴산 분해 활성을 도 6에 나타내었다.

도 6에 나타난 바와 같이, 40% 황산암모늄 염석 상층액의 환원당 생성량은 1541 g/mL이며, 80% 황산암모늄 염석 상층액에서는 환원당 생성량이 미비하였다. 또한, 80% 황산암모늄 염석 침전물의 환원당 생성량은 880 g/mL으로 나타나 80% 황산암모늄 염석 침전물 분획을 더욱 정제하였다.

쉬와넬라 오나이텐시스 균이 생성한 조효소를 황산암모늄 염석을 실시한 결과, 80% 포화 황산암모늄 염석 침전물이 높은 알긴산 분해 활성을 나타내는 것으로 나타났으며, 비활성 0.18 U/mg, 수율 53.85%인 것으로 나타났다.

3. 크로마토그래피를 이용한 알긴산 분해 효소 정제

황산암모늄 염석을 실시하였으며, 조효소를 40% 및 80% 포화 황산암모늄 용액으로 순차적으로 염석을 진행하였고, 각 염석 용액은 12,000g, 4℃ 조건으로 30분 동안 원심분리하여 상층액과 침전물로 분리하였다. 80% 포화 황산암모늄 염석 침전물에서 알긴산 분해 활성이 확인되어 이 분획을 30 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.0)으로 용해시켰다. 용해물은 30 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.0)로 4 내지 24 시간 동안 동안 투석을 실시하였고 DEAE-sephadex(φ1.8 cm x 16 cm)를 실시하였다. DEAE-sephadex는 30 mM Tris-HCl로 평형화하였으며, 30 mM Tris-HCl(pH 7.00)의 NaCl 농도를 0.0 내지 1.0 M로 달리하여 농도구배로 단계적 분획을 실시하였다. DEAE-sephadex의 활성 분획은 sephadex G-100(φ1.8 cm x 16 cm)를 실시하였으며, 30 mM Tris-HCl로 평형화 한 후, 동일 완충액으로 분획하였다. Sephadex G-100의 활성 분획물은 DEAE-sephadex(φ1.8 cm x 16 cm)를 재실시하였고, 재실시한 DEAE-sephadex의 활성 분획은 sephacryl S-200 HR을 실시하였다. sephacryl S-200 HR(φ1.8 cm x 16 cm)의 경우 30 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.0)으로 평형화시켰으며, 동일 완충액으로 분획을 실시하였다. 상기의 결과를 도 7 내지 10에 나타내었다. 또한, 쉬와넬라 오나이텐시스 PKA 1008이 생성한 알긴산 정제 과정을 표 1에 나타내었다.

표 1

정제 단계	총 단백질	전체 활성 ¹⁾ (U)	비활성(Specific activity) (U/mg)	수율 (%)	배수
원재료 효소	2453.23	208.03	0.08	100	1.00
80% 황산염 암모늄 분획물	613.31	112.03	0.18	53.85	2.15
DEAE-sephadex	17.18	95.12	5.54	45.72	65.31
Sephadex G-100	4.27	39.54	8.36	19.01	98.62
DEAE-sephadex	1.29	23.78	18.44	11.43	217.45
Sephacryl S-200 HR	0.24	9.89	41.84	4.75	493.44

¹⁾ 효소 단위 1unit은 1분에 1mol의 환원당을 생성하는데 필요한 효소량으로 정의 함.

도 7에 나타난 바와 같이, 80% 황산암모늄 염석 침전물을 DEAE-sephadex를 실시한 경우, 총 180개의 분획을 획득하였으며, 분획 89, 90, 91 및 92이 알긴산 분해 활성이 높게 나타났고, 활성 분획 4개는 비활성 5.54 U/mg, 수율 45.72%인 것으로 나타났다. 이 후, 상기 분획들에 대해 sephadex G-100를 실시하기로 하였다.

또한, 도 8에 나타난 바와 같이, 상기 DEAE-sephadex의 활성 분획을 sephadex G-100을 수행한 경우, 총 80개의

분획을 획득하였으며, 그 중 분획 17, 18, 19 및 20에서 가장 높은 알긴산 분해 활성이 측정되었고, 상기 분획들은 비활성 8.36 U/mg, 수율 19.01 인것으로 나타났다. 이 후, 상기 분획들에 대해 DEAE-sephadex를 실시하기로 하였다.

[0054] 또한, 도 9에 나타난 바와 같이, sephadex G-100의 활성 분획을 0.0-1.0 M의 NaCl이 함유된 30 mM Tris-HCl을 이용하여 단계적 용출을 실시한 경우, 0.4 M NaCl 농도에서 알긴산 분해 활성이 높은 분획 90 및 91를 획득하였으며, 상기 분획들은 비활성 18.44 U/mg, 수율 11.43인 것으로 나타났다. 이 후, 상기 분획들에 대해 sephacryl S-200 HR을 실시하기로 하였다.

[0055] 또한, 표 1 및 도 10에 나타난 바와 같이, DEAE-sephadex에서 분리획득한 활성이 높은 분획을 sephacryl S-200 HR을 실시한 경우, 분획 44에서 알긴산 분해 활성이 가장 높은 하나의 활성 분획을 획득 있었고, 상기 분획은 총단백질, 총활성, 비활성, 수율 및 정제도는 0.24 mg, 9.89 U, 41.84 U/mg, 4.75% 및 493.44 인 것으로 나타났다.

[실시예 3] 알긴산 분해 효소 활성의 최적 조건 확인

[0057] 1. 알긴산 분해 효소 활성의 최적 pH 조건

[0058] 상기 실시예 2에서 정제된 정제 효소 0.25 mL에 대하여 1.4% 알긴산 0.25 mL과 각각의 pH 완충액들(pH 2.0 내지 4.0 ; 0.1 M sodium acetate-acetate buffer, pH 6.0 내지 8.0 ; 0.1 M phosphate buffer, pH 9.0 내지 11.0 ; 0.1 M Tris-HCl buffer) 0.5 mL을 혼합하여 30℃에서 3 시간 동안 반응시킨 후 환원당을 측정하여, 최적 pH 조건을 확인하였다. 이의 결과를 도 11에 나타내었다.

[0059] 도 11에 나타난 바와 같이, 알긴산 분해 효소 활성은 pH 9.0에서 최대 활성을 보였으며, pH 7.0 이하 및 pH 10 이상에서는 활성이 급격히 저하되는 것으로 확인되어, 본 연구에서 분리한 알긴산 분해 효소는 pH 9가 최적 효소 활성 조건인 것으로 확인되었다.

[0060] 2. 알긴산 분해 효소 활성의 최적 온도

[0061] 정제효소 0.25 mL에 1.4% 알긴산 0.25 mL, 0.1 M Tris-HCl 완충액(pH 9.0) 0.5 mL을 혼합하여 반응 온도를 10 내지 40℃까지 달리하여 3 시간 동안 반응 시킨 후 환원당을 측정하여 효소 활성 최적 온도를 확인하였다. 이의 결과를 도 12에 나타내었다.

[0062] 도 12에 나타난 바와 같이, 25℃ 및 30℃에서 알긴산 분해 활성이 높게 측정되었고, 특히 30℃에서 가장 높은 활성을 나타내어, 알긴산 분해 효소의 최적 온도 조건은 30℃인 것으로 확인되었다.

[0063] 3. 알긴산 분해 효소 활성의 최적 NaCl 농도

[0064] 효소, 기질 및 완충용액 혼합물의 최종 NaCl 농도를 0.0 내지 2.0 M로 달리하여, 0.1 M Tris-HCl 완충액(pH 9.0) 0.5 mL에 1.4% 알긴산 0.25 mL 과 효소를 0.25 mL를 혼합하여 30℃에서 3 시간 동안 반응 후, 효소 활성을 측정하였다. 이의 결과를 도 13에 나타내었다.

[0065] 도 13에 나타난 바와 같이, NaCl이 전혀 첨가되지 않을 경우는 효소 활성이 거의 나타나지 않았으며, NaCl 농도가 0.05 M일 때, 효소 활성이 가장 높고, 0.1 M 농도 이상에서 효소 활성이 급격히 줄어드는 것을 확인할 수 있었다.

[0066] 4. 알긴산 분해 효소의 금속이온에 대한 효소 활성

[0067] 염화물(Cl⁻)형의 1, 2가 이온과 0.2 M NaCl을 기질인 1.4% 알긴산과 혼합하여 효소와 반응시켰을 때 활성에 미치는 영향을 측정하였다. 정제 효소 0.25 mL에 금속이온 농도를 10 mM 농도로 조정한 0.1 M Tris-HCl 완충액(pH 9.0)과 혼합하여 4℃에서 1 시간 동안 정치시킨 후, 1.4% 알긴산 기질 용액(0.2M NaCl 함유) 0.25 mL를 가하여 30℃에서 3 시간 동안 반응시켜 환원당을 측정하였다. 0.2 M NaCl만 첨가된 것을 대조 실험으로 하여 금속이온이 효소활성에 미치는 영향을 확인하였다. 이의 결과를 도 14에 나타내었다.

[0068] 도 14에 나타난 바와 같이, 10mM 농도의 Ca^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} 의 경우 60% 이상의 효소 활성 저해율을 보였고, Mg^{2+} , Ba^{2+} 및 Hg^{2+} 를 첨가한 경우, 약 40% 이하의 효소 활성 저해율을 보였다.

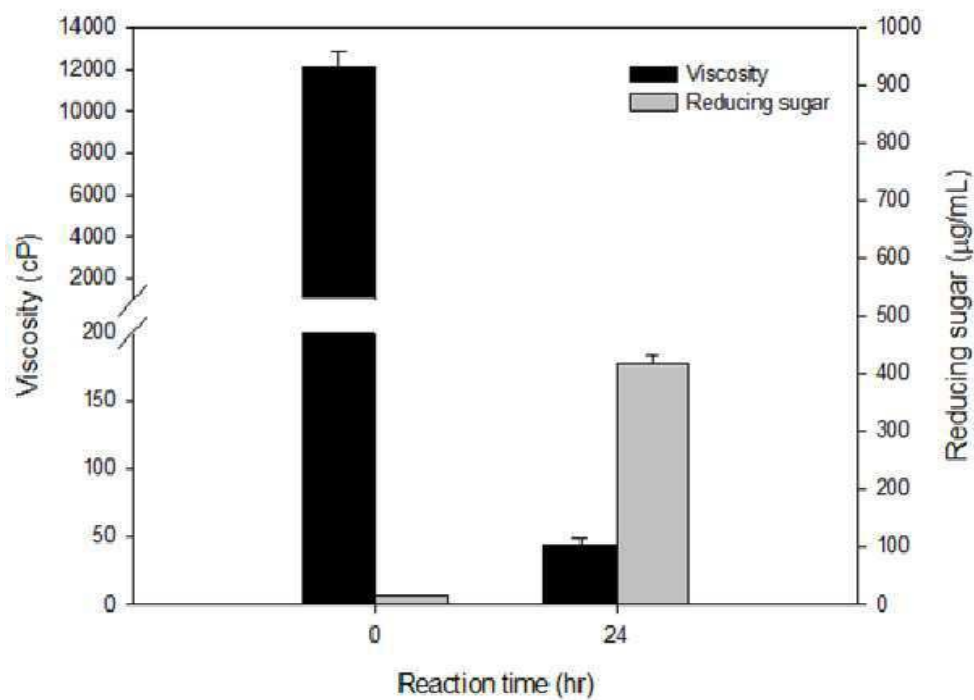
[0069] 5. 반응속도 정수 (K_m) 및 최대반응속도정소 (V_{max}) 측정

[0070] 효소 농도를 고정하고 기질 농도를 0.25-2.5%로 달리하여 반응시킨 후 반응시간당 생성되는 환원당을 측정하여 Lineveacer-Burk plot로부터 반응속도 정수(K_m)과 최대반응속도(V_{max})를 구하였다. 도 15에 나타내었다.

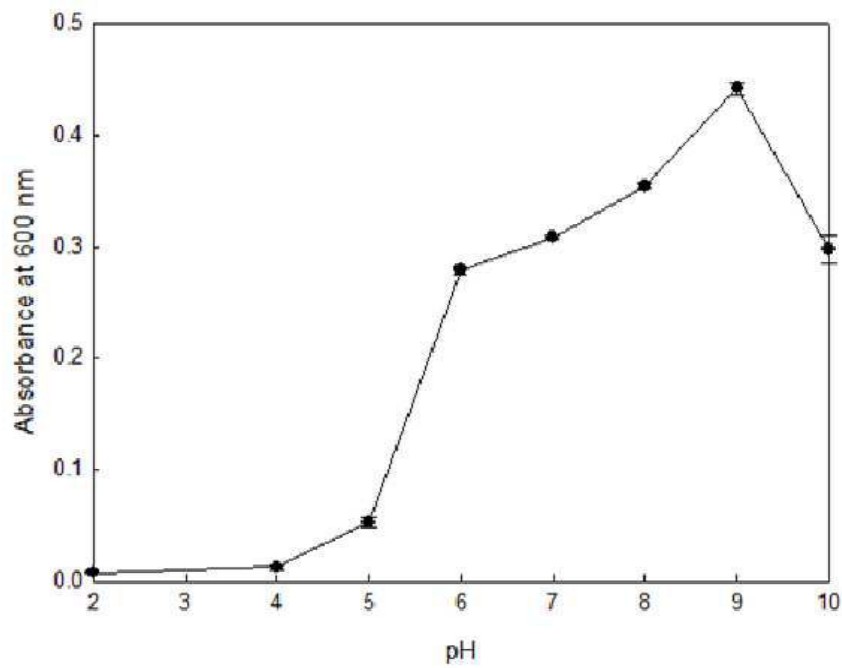
[0071] 도 15에 나타난 바와 같이, 알긴산 농도에 따른 반응속도를 Lineweave-Burk plot로 측정하였다. 그 때의 반응속도 식은 $y = 0.003877x - 0.001135 (R^2 = 0.9957)$ 이었다. 이 대의 반응속도 정수(K_m)는 1.099% 였으며, 최대반응속도 V_{max} 는 67.58 U/mg이었다.

도면

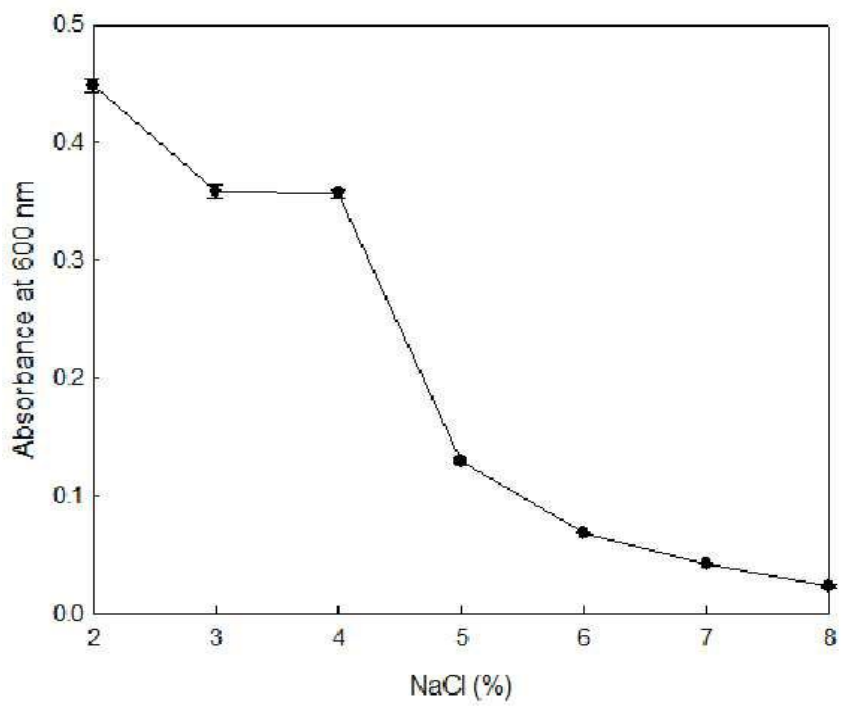
도면1



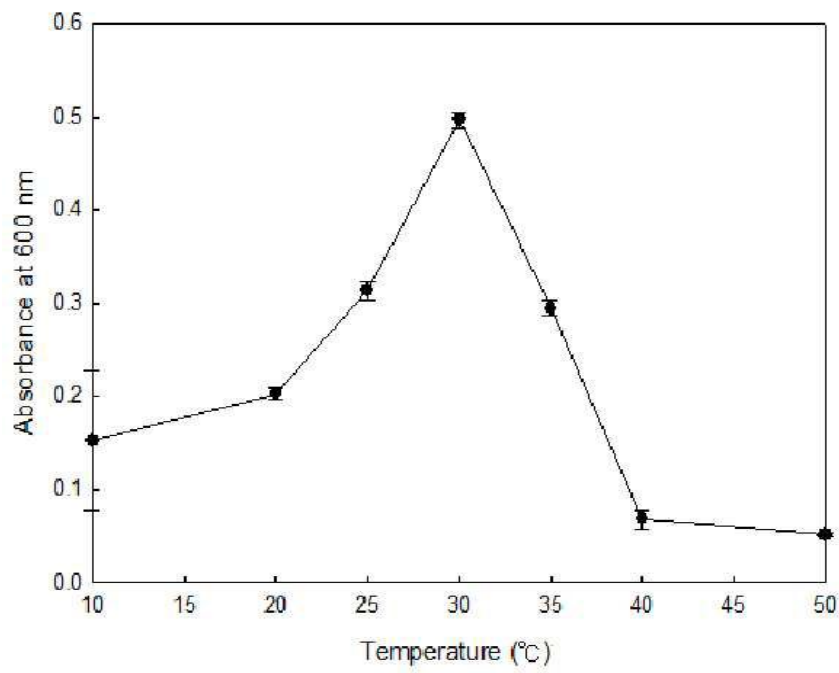
도면2



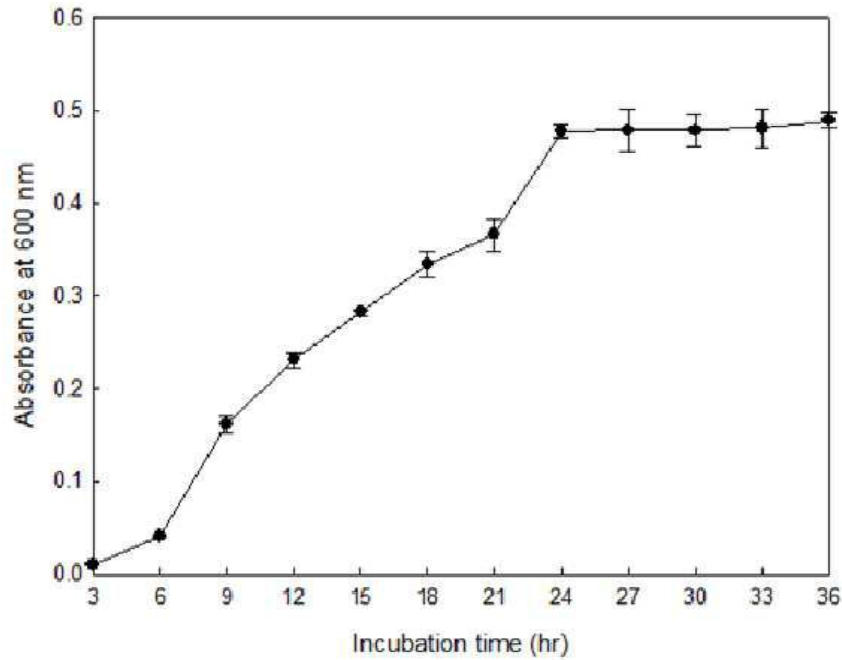
도면3



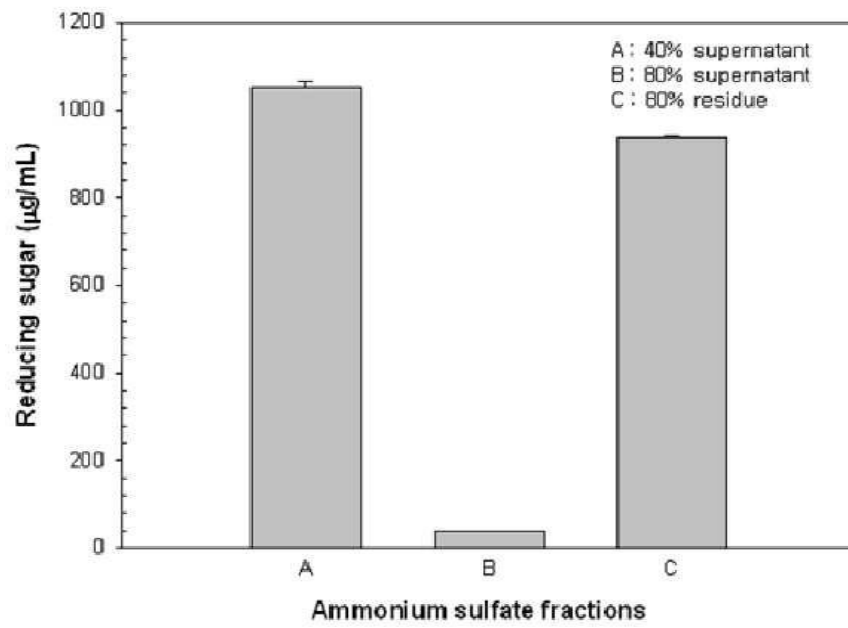
도면4



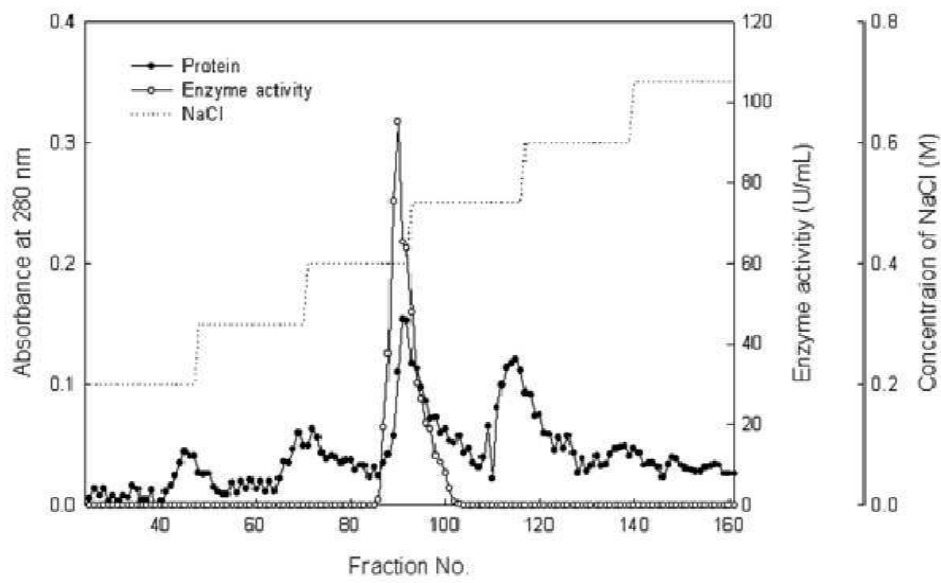
도면5



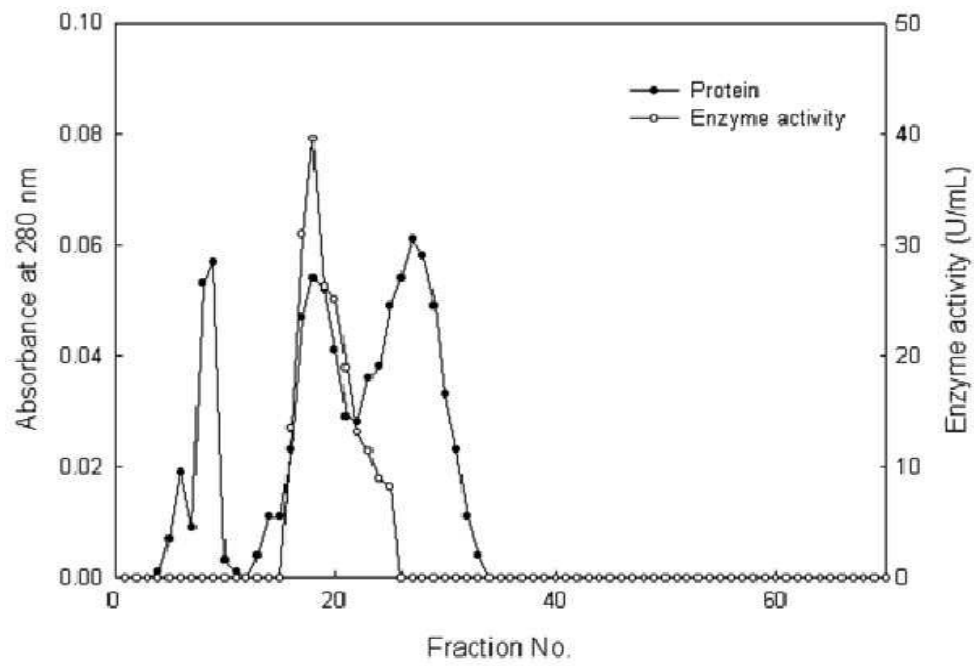
도면6



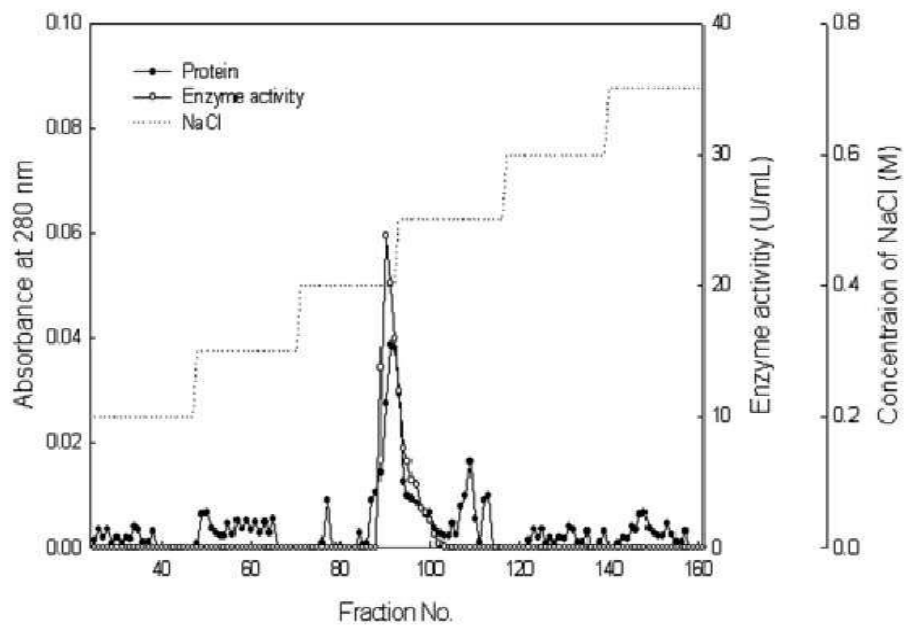
도면7



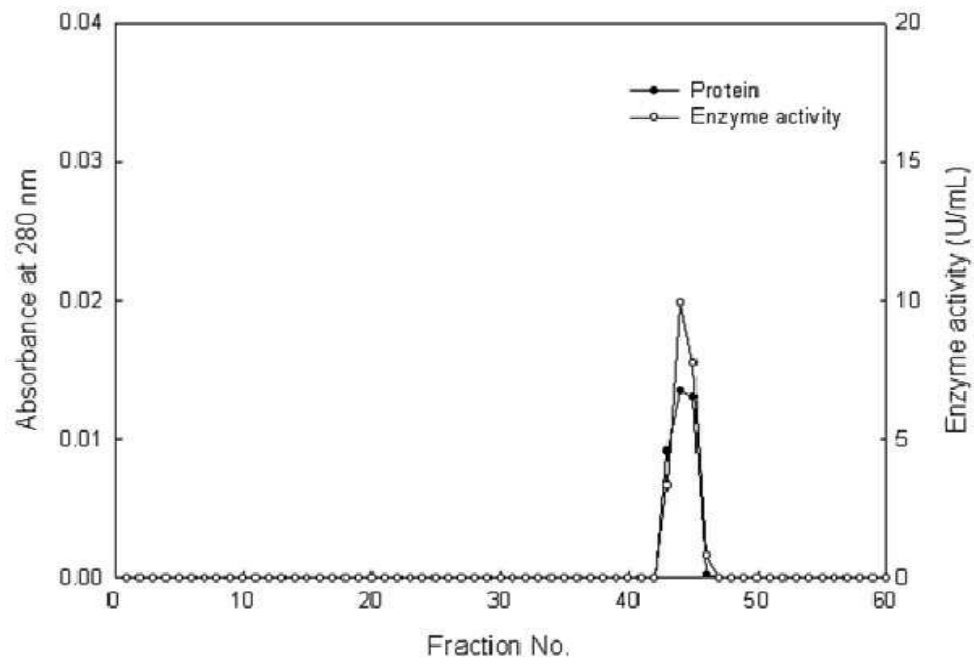
도면8



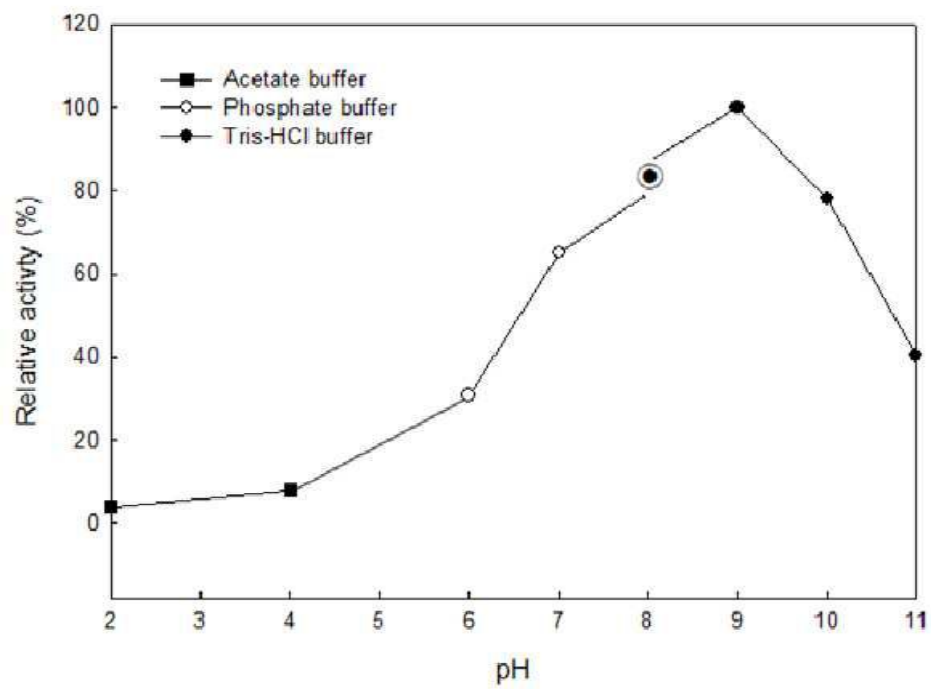
도면9



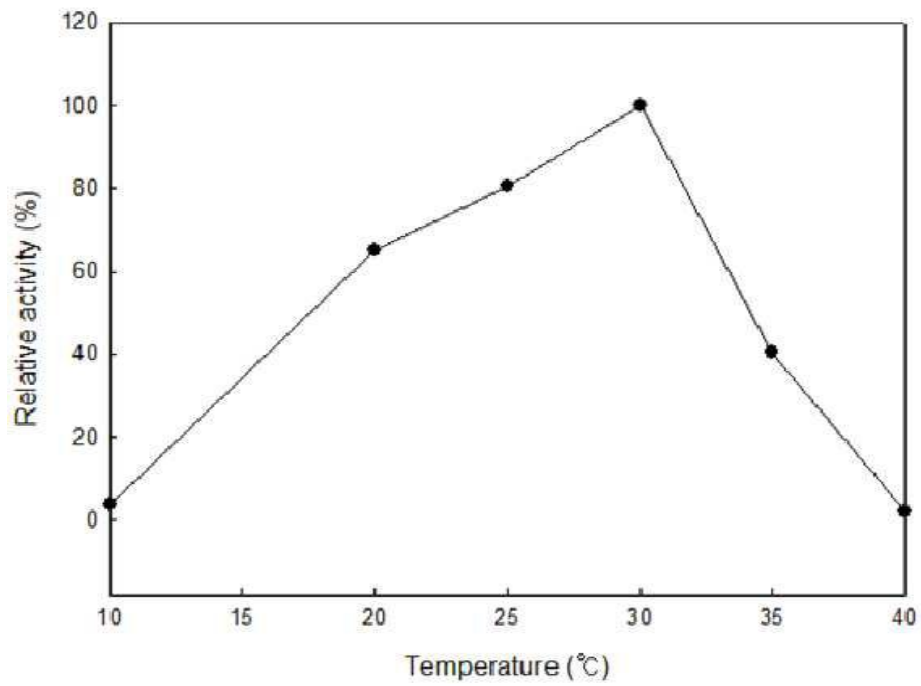
도면10



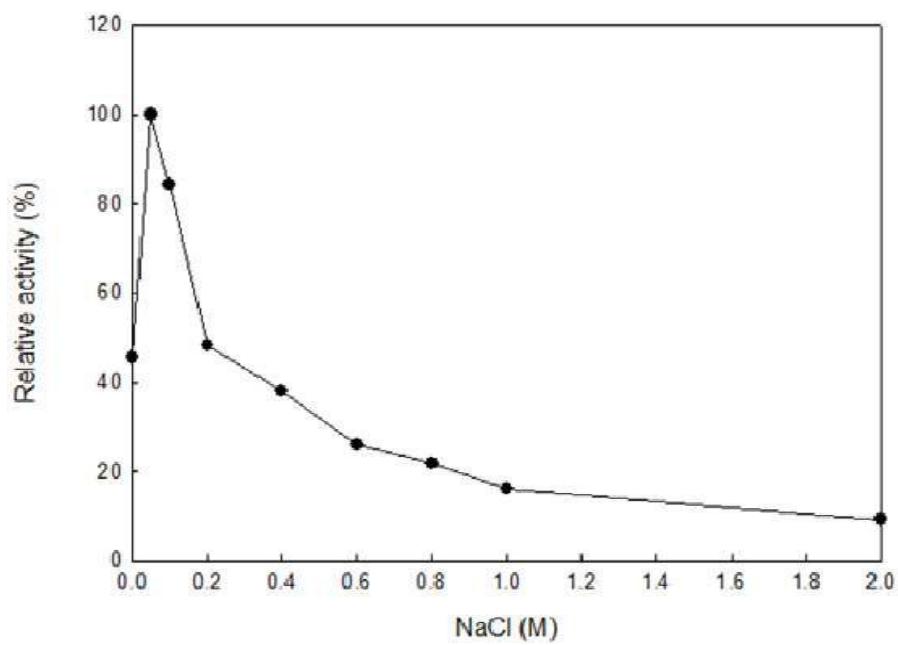
도면11



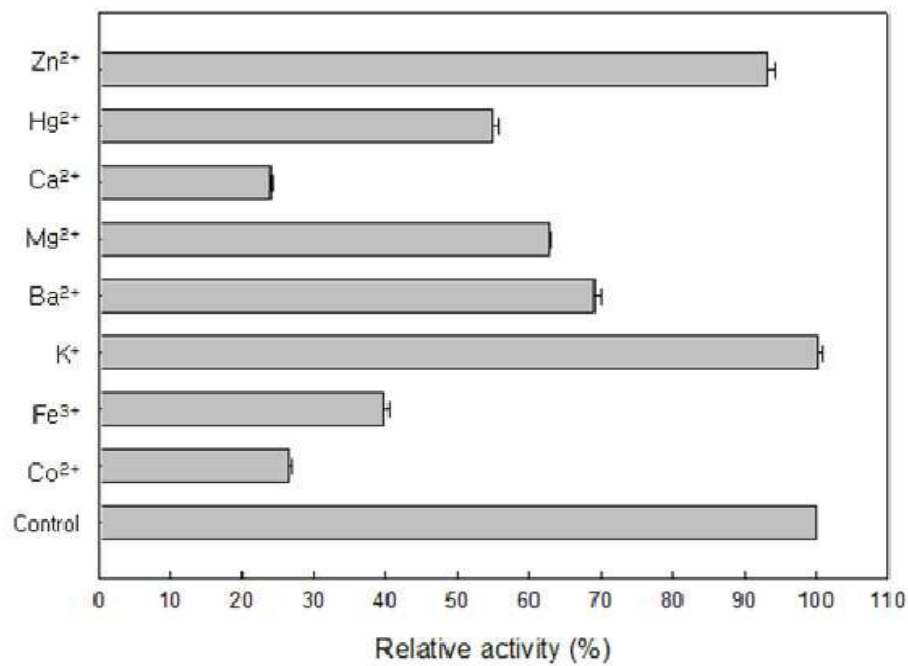
도면12



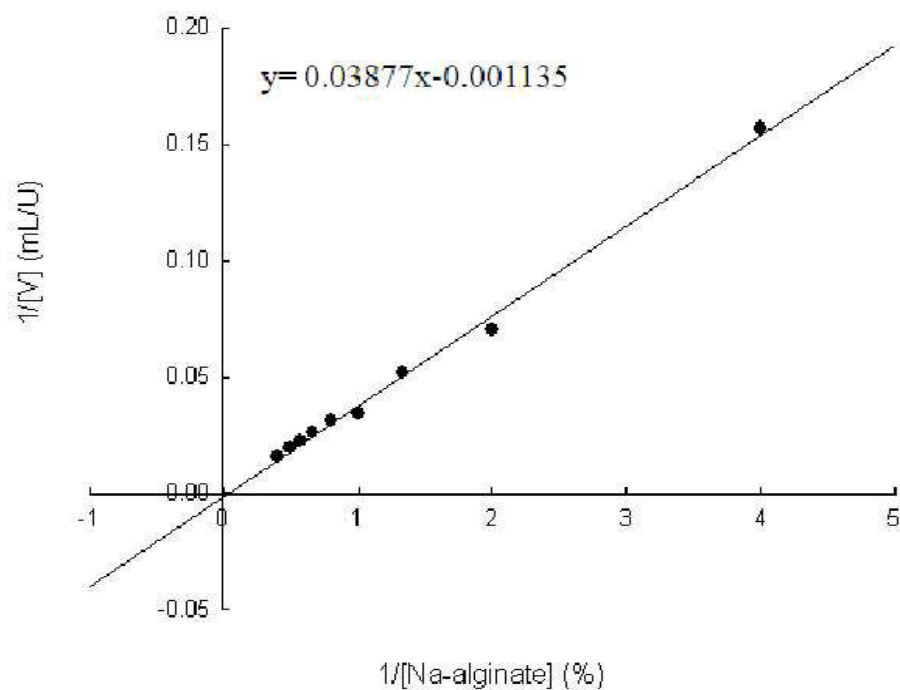
도면13



도면14



도면15



서열 목록

- <110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation
- <120> Method for preparing alginate degrading enzyme using *Shewanella oneidensis*

<130> BUKY-1.20P

<160> 1

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 1485

<212> DNA

<213> Shewanella oneidensis PKA 1008

<400> 1

tatatttttt tttttctcag attgaacgct ggcggcaggc ctaacacatg caagtcgagc 60

ggcagcaciaa gggagtttgc tcctgagggtg gcgagcggcg gacgggtgag taatgcctag 120

ggatctgccc agtcgagggg gataacagtt ggaaacgact gctaataccg catacgccct 180

acgggggaaa ggaggggacc ttcgggcctt ccgcgattgg atgaacctag gtgggattag 240

ctagttgggtg aggtaatggc tcaccaaggc gacgatccct agctgttctg agaggatgat 300

cagccacact gggactgaga cacggcccag actcctacgg gaggcagcag tggggaatat 360

tgcacaatgg gcgaaagcct gatgcagcca tgcgcgtgtg gtgaagaagg ccttcgggtt 420

gtaaagcact ttcagtaggg aggaaaggtt attgcttaat actcattagc tgtgacgtta 480

cctacagaag aaggaccggc taactccgtg ccagcagccg cggtaatacg gaggggccga 540

gcgttaatcg gaattactgg gcgtaaagcg tgcgcaggcg gtttgtaag ccagatgtga 600

aatccccggg ctcaacctgg gaattgcatt tggaactggc gaactagagt cttgtagagg 660

ggggtagaat tccagggtga gcggtgaaat gcgtagagat ctggaggaat accggtggcg 720

aaggcggccc cctggacaaa gactgacgct catgcacgaa agcgtgggga gcaaacagga 780

ttagatacce tggtagtcca cgccgtaaac gatgtctact cggagtgttg tgtcttgaac 840

actgggctct caagctaacg cattaagtag accgcctggg gactacggcc gcaaggttaa 900

aactcaaatg aattgacggg ggcccgcaca agcgggtggag catgtggttt aattcgatgc 960

aacgcgaaga accttaccta ctcttgacat ccacagaaga ttgcagagat gcgattgtgc 1020

cttcgggaac tgtgagacag gtgctgcatg gctgtcgtca gctcgtgttg tgaaatgttg 1080

ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccccta tccttatttg ccagcacgta atgggtggaa 1140

ctctagggag actgccggtg ataaaccgga ggaagggtggg gacgacgtca agtcatcatg 1200

gcccttacga gtagggctac acacgtgcta caatggcgag tacagagggt tgcaaagccg 1260

cgagggtggag ctaatctcac aaagctcgtc gtagtcggga ttggagtctg caactcgact 1320

ccatgaagtc ggaatcgcta gtaatcgtga atcagaatgt cacggtgaat acgttcccgg 1380

gccttgtaga caccgcccggt cacacccatgg gagggggctg caaaagaagt gggtagttta 1440

accttcggga gaacgctcac cactttgtgg ttcattgactg gggtg 1485