[UCI]I804:24011-200000235888

2008 年 *2*月

碩士學位論文

Isolation of *Pseudoalteromonas agarovorans* and optimization of saccharification

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

化 學 工 學 科

朴 玉 蘭

당화능을 갖는 *Pseudoalteromonas agarovorans* 분리 및 당화의 최적화

Isolation of *Pseudoalteromonas agarovorans* and optimization of saccharification

*2008*年　　*2*月

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

化 學 工 學 科

朴　玉　蘭

Isolation of *Pseudoalteromonas agarovorans* and optimization of saccharification

指導敎授　曺　秉　旭

이 論文을 工學 碩士學位申請 論文으로 提出함.

*2008*年　*2*月

朝 鮮 大 學 校　大 學 院

化 學 工 學 科

朴　玉　蘭

朴玉蘭의 碩士學位論文을 認准함

委員長　　朝鮮大學校 敎　授　　車 月 石　印

委　員　　朝鮮大學校 敎　授　　曺 秉 旭　印

委　員　　朝鮮大學校 敎　授　　趙　　勳　印

*2008*年　　*2*月

朝 鮮 大 學 校　大 學 院

目　　次

LIST OF FIGURES ····· ii

LIST OF TABLES ····· iii

Abstract ····· iv

Ⅰ. 서론 ····· 1

Ⅱ. 재료와 방법 ····· 3

1. 분석방법 ····· 3

2. 균주의 분리 및 배지 조성 ····· 3

3. 분리 균주의 동정 ····· 4

4. 당화 최적배양 조건 ····· 5

5. 당화 최적배지 조건 ····· 5

6. Scale up ····· 6

III. 결과 및 고찰 ····· *6*

1. 균주의 동정 ····· 6

2. 알긴산으로부터 당화를 위한 최적배양 조건 ····· 13

3. 알긴산으로부터 당화를 위한 최적배지 조건 ····· 21

4. Scale up ····· 33

Ⅳ. 결론 ····· 35

Ⅴ. 참고 문헌 ····· 37

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Morphology of *P. agarovorans*, observed by using TEM·····7
Fig. 2. 16S rDNA gene sequence of *P. agarovorans CHO-33*·····11
Fig. 3. Phylogenetic tree base on ITS sequences of strains *CHO-33*·····12
Fig. 4. Effect of agitation rate on cell concentration, pH, and saccharification in the culture of *P. agarovorans*·····14
Fig. 5. Effect of preculture time on cell concentration, pH, and saccharification in the culture of *P. agarovorans*·····16
Fig. 6. Effect of culture temperature on cell concentration, pH, and saccharification in the culture of *P. agarovorans*·····18
Fig. 7. Effect of inoculation volume on cell concentration, pH, and saccharification in the culture of *P. agarovorans*·····20
Fig. 8. Effect of alginate concentration on cell concentration, pH, and saccharification in the culture of *P. agarovorans*·····22
Fig. 9. Effect of initial pH on cell concentration, pH, and saccharification in the culture of *P. agarovorans*·····24
Fig. 10. Effect of NaCl concentration on cell concentration, pH, and accharification in the culture of *P. agarovorans*·····29
Fig. 11. Effect of K_2HPO_4 concentration on cell concentration, pH, and saccharification in the culture of *P. agarovorans*·····31
Fig. 12. Effect of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ concentration on cell concentration, pH, and saccharification in the culture of *P. agarovorans*·····32
Fig. 13. Scale up for effective saccharification from alginate in the culture of *P. agarovorans* and *S. maltophilia*·····34

LIST OF TABLES

Table 1. Composition of medium for *P. agarovorans*·····4
Table 2. Biochemical and physiological characteristrcs of strain *CHO-33*·····8
Table 3. Composition of fatty acids from *P. agarovorans*·····9
Table 4. Percentage 16s rDNA similarity between strain CHO-33 and reference strains·····12
Table 5. Effect of nitrogen sources on cell concentration, pH, and saccharification·····27

Abstract

Isolation of *Pseudoalteromonas agarovorans* and optimization of saccharification

Yu Lan Piao
Advisor : Prof. Byung Wook Jo
Dept of Chemical Engineering
Graduate School of Chosun University

To obtain the strain for effective saccharification of alginate, a number of marine bacteria were isolated from seawater in Korea. Among ten strains, the strain CHO-33 was selected, because it exhibited the high saccharification yield. In order to identify the isolated strain CHO-33, the biochemical and physiological characteristics were determined. The cell was round-shaped, Gram-negative, motile, and strictly aerobic. Growth occurs in media containing 1-8% of NaCl and temperature ranging from 5-38°C. The strain CHO-33 could utilize D-glucose, maltose, and D-mannitol but it does not utilize D-fructose, mannose, sucrose, and glycogen. In addition, this strain was sensitivity to carbenicillin, tetracycline, ampicillin, and streptomycin. In order to perform the phylogenetic analysis, the 16s rDNA of the strain cho-33 was amplified by PCR. The lengths of the almost complete 16 rDNA gene sequences of strain CHO-33 was 1,439 bp. The 16s rDNA gene sequences of the related taxa were obtained from GeneBank. Phylogenetic analysis based on 16S rDNA gene sequences indicated that the strains CHO-33 is similar to the type strains of belong to *Pseudoalteromonas* sp., indicating that the strain CHO-33 is member of the genus *Pseudoalteromonas* The strain CHO-33 was found to form a coherent cluster with the type strain of *Pseudoalteromonas agarovorans*

(98.4%), *P. atlantica* X82134 (97.3%), *P. espejiana* X82143 (97.1%), *P carrageenovora* X82136 (96.8%), *P. tetraodonis* X82139 (96.8%), *P. issachenkonii* AF316144 (95.0%), *P. undina X82140* (96.7%), *P. elyakovii* AF082562 (98.3%), *P. distincta* AF082564 (98.1%), *P. haloplanktis* X67024 (97.1%), *P. nigrifaciens* X82146 (97.6%), and *P. antartica* X98336(94.3%). Therefore, the strain CHO-33 was determined to be *Pseudoalteromonas agarovorans* CHO-33, a taxon that is physiologically, chemotaxonomically, and phylogenetically distinct from the related strains.

Environmental factors effecting saccharification from alginate using *Pseudoalteromonas agarovorans* CHO-33 were investigated in flask cultures. The cell concentrations increased from 0.2 to 0.7 OD at 660 nm when the algitation rate increased from 0 to 180 rpm. On the other hand, the maximum concentration of sugar was obtained at 6.8 g/L after 3 days of culture at 15 rpm. After 2 days of preculture at 29℃, the sugar concentration peaked at 9.55 g/L after 3 days of culture. When 30 g/L of NaCl was used, the maximum concentration of sugar, 10.12 g/L, was obtained after 3 days of culture. Yeast extract and peptone were the best nitrogen source for effective saccharification. Especially, the sugar concentration was 10.8 g/L after 3 days of culture using a mixture of 1.0 g/L of yeast extract and 1.0 g/L of peptone.

Under optimum conditions of culture and media using *Pseudoalteromonas agarovorans* CHO-33, scale-up for effective saccharification from alginate was carried out in 5 L flasks. The cell concentration after 2 days of culture was 0.2 to 0.3 OD at 660 nm and showed no further increase after 3 day of culture. The sugar concentrations from alginate were increased with increasing culture time to 11.95 g/L after 2 days of culture. The rate of saccharification was 0.25 g sugar/hr, which was about 16.0 fold higher than that of *S. maltophilia.*

Ⅰ. 서 론

해조류의 전 세계적인 산업규모는 연간 10조 달러에 이르고 있다. 특히 다시마 (500만 톤), 미역 (75만 톤), 김 (55만 톤) 등은 매년 700만 톤 이상이 생산되고 있다. 이러한 해조류를 이용하여 기능성고분자, 수술용 접착제, 바이오 색소, 오존 방지제, 등이 이미 상품화 되어 있고, 신 기능성 미생물과 효소에 대한 탐색도 활발하게 추진되고 있다. 우리나라의 해조류 생산량은 전체 수산물 생산량 중 대략 25%를 차지하는 대규모 수산자원이지만 가공방법은 주로 소건품, 저건품, 염장품, 조미구이제품 등 단순가공 위주로만 이루어지고 있으며, 특히 해조류는 신 선물 상태로 유통이 매우 취약하여 가공이 필수적인데도 불구하고 현재의 가공수준이나 가공기술개발의 미흡으로 대규모자원인 해조류를 거의 그대로 방치하여 두고 있다.

최근에는 해조류로부터 신규물질로서는 항생제 (istamycin, apalsmomycin), 소염제 (manoalide), 제초제 (cytokinin) 등이 상용화되었고, 항생물질 (KRN 700, dolastin 10, Lu-103793, bryostsin, didemnin B, ectainascidin, squalamin), 염증 및 피부치료제 (IPL-567, methopterosin), 진통제 (CNX-111) 등은 임상실험 중에 있다. 특히 건조한 해조류의 탄수화물은 가장 중요한 성분으로 50% 정도를 차지하며 대부분 해조 특유의 점성 다당류로 구성 되어 있다. 이들의 구성 당 중에는 카르복실기나 황산기를 지닌 당 성분이 함유되어 있는데, 이들의 역할은 해수 중에 이온을 선택적으로 흡수 또는 교환하고 수분을 일정하게 유지 시켜주는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 이들 다당류가 분해되면 D-glucose, D-galactose, D-xylose, L-rhamnose, L-arabinose, D-glucuronic acid, D-galactronic acid 이외에 L-fructose, 6-methyl-D-galactose나 D-mannuronic acid, L-glucuronic acid와 같은 uronic acid 등을 생성 한다. 특히 다시마와 미역의 세포사이에는 알긴산 (alginic acid) 퓨코이단 (fucoidan), 라마나란 (laminaran) 등의 점질성 다당류로 구성되어 있다. 알긴산은 갈조류에서 함유량이 건조물기준으로 약 20-30% 정도로 D-mannuronic acid와 L-glucuronic acid가 베타-1,4 결합된 산성 다당 이며, 분자량은 32,000에서 200,000정도이다. 또한 *Lithospermum erythorhizon*으로부터

shikonin을 효율적으로 생산하기위해 alginate로부터 분해된 oilgosaccharides가 에너지원으로써 이용되고 있고, 그리고 *Penicillium chrysogenum*로부터 페니실린G를 효율적으로 생산하기 위해 alginate oilgosaccharides oilgomannuronate 와 oligogulurinate, mannan oilgosaccharides 등이 각각 이용 되었다. 또한 b*iofidobacteria* 배양에 alginate oilgosaccharides를 배지에 첨가할 경우 균체 농도가 증가 했다고 보고되었다. 지금까지 이런 해조류 및 alginate로부터 당화를 위해 효소 (alginate lyase), 열분해, 가스화, 액화, 같은 열화학적 방법과 가수 분해법, 발효로부터 생산되는 효소를 이용하는 미생물학적 방법이 많이 연구 되어졌다. 그러나 아직까지 많은 연구가 진행됨에도 불구하고 실효성을 거두지 못하여 실용화 되지 못하고 있는 실정이다. 본 연구는 남해안에서 해조류 당화 가능한 균주를 분리하여 동정하였고, 또한 해조류로부터 직접 당화에 대한 최적 배양 및 배지 조건을 검토 하였다.

.

Ⅱ.재료 및 방법

1. 분석방법

균주의 성장은 UV-spectrophotometer (shimazu UV-160, Japan)를 사용하여 660 nm에서의 O.D (optical density) 값으로 측정 하였다. 아르긴산 으로부터 분해되여 생성된 총 당의 농도는 DNS (dinitrosalicylic acid)를 이용한 환원당 정량 법으로 확인 하였다. 배양액 1 ml를 5000 rpm으로 20min 동안 원심 분리 하여 얻은 상등 액 50 μL를 DNS용액 2 ml에 첨가하고 10min 동안 끓인 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2. 균주의 분리 및 배지 조성

남해안 등에서 채취한 해조류 시료를 기질이 포함된 액상 배지에 접종하여 3-4주 동안 적응 배양한 후 각각의 분리 원 시료에서 균주를 채취하여 평판배양 하였다. 평판 배양에서 생성된 균주를 분리하고 다시 액체 배지에 배양한 다음 다시 성능이 우수한 균주를 다시 평판 배양하는 반복 과정 수차례 수행하여 균주를 분리한 후 본 실험에 사용 하였다. 분리된 균주는 30% glycerol을 첨가하여 -80℃에 냉동 보관하여 사용 하였다. 먼저 균주는 Table 1의 배지를 이용하여 50 ml 삼각플라스크에 액체 배지를 10 ml씩 분주하여 121℃에서 15분간 고압증기 멸균한 후 전배양액을 1.0%되게 접종하여 32℃에서진탕 배양 하였다. 전 배양액은 보관중인 한천 사면 배지로부터 균주를 백금으로 일회 취하여 액체배지에 접종하고 24시간 진탕 배양한 것을 사용하였다. 1차 진탕 배양된 균주를 고체 평판배지에 도말 하여 3일간 32℃에서 배양 하였다. 평판 배양한 균주의 colony를 분리하여 다시 액체배지에 접종하여 5일간 배양한 후 5회에 걸쳐 계대 배양하여 우수한 균주를 분리 하였다.기본 배지는 Table 1에 있는 배지에 1.5% 한천 (w/v)을 첨가한 평판 고체 배지를 사용 하였다. 한천 배지에서 생성된 균주의 colony 중 우수한 colony를 1 백금이 씩 취하여 다시 액체 배지에 접종하여 진탕 배양 하였다. 모든 실험은 shaking

incubator를 이용하여 온도는 32℃, 교반속도는 100 rpm, 배지의 pH는 7-8을 유지하였다. 이 과정을 수회 반복하여 우수한 균주를 분리하였다.

Table 1. Composition of medium for ***P. agarovorans***

배지성분	농도 (g/L)
Alginate	0.5
Peptone	2.0
Yeast extract	0.2
K_2HPO_4	0.5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5
NaCl	10.0

3. 분리균주의 동정

분리균주를 형태적, 생리 및 생화학적 특성을 조사한 후 Bergey's manual of systematic bacteriology와 Methods in microbiology 및 Laboratory manual of general bacteriology에 준하여 동정을 실시하였다.

1) 형태학적 특성

분리균주의 크기와 형태는 그람 염색하여 광학현미경으로 관찰 하였다. 또한 분리 균주를 정밀 관찰하기 위하여 투과전자현미경 (Transmission electron microscope, TEM)을 이용 하였다. 투과전자현미경 촬영을 위한 시료의 전처리 과정으로 균을 0.1 M phosphate buffer solution (PBS, pH 7.0)을 사용하여 세척한 후 균체를 회수 하였다. 1차 고정으로 단백질을 고정시키기 위해 2.5% glutaraldehyde solution을 첨가하여 1시간 동안 방치한 후 원심분리를 하고 PBS로 균체를 세척하였다. 2차 고정으로 지질을 고정시키기 위해 1.0% osmium jtetraoxide solution을 첨가한 후 1시간 동안 방치한 다음 원심분리 하고 50-100% 알코올을

사용하여 단계적으로 시료로 사용할 균체를 탈수시켰다. propylene oxide로 치환한 후 epone mixture로 포매 후 epone block을 만들어서 1 μm로 coating 1% toluidine blue 로 염색하여 관찰한 뒤 hexamethyl-disilazane을 첨가한 다음 20분간 방치시키는 건조 과정을 2회 반복한 후 도금 단계를 거쳐 확대 촬영 하였다.

2) 생리 및 생화학적 특성

분리 균주의 생화학적 특성 파악을 위해 16s rDNA sequence 분석을 실시하였다. Genomic DNA extraction (for gram-positive bacteria)은 INTRON Co을 사용하였다. 증폭 PCR (35cycle)은 PCR premix (Bioneer사)의 제품을 사용 하였다. 또한 분리 균주의 세포막 지방산 조성 (cellular fatty acids profile)은 우선 세포막의 지질로부터 지방산을 추출한 후 메틸에스터화 시킨 다음 가스크로마토그래피로 분석하였다.

4. 당화 최적 배양 조건

분리된 균주 (*Pseudoalteromonas agarovorans*)를 이용하여 알긴산으로부터 효율적 당화를 위한 최적 배양 조건을 찾기 위해 전 배양 시간 및 접종량, 교반 속도, 배양온도 등을 검토하였다.

5. 당화 최적 배지 조건

분리된 균주 (*Pseudoalteromonas agarovorans*)를 이용하여 알긴산으로부터 효율적 당화를 위한 배지 최적조건을 찾기 위해 알긴산 농도, 배지 초기 pH, NaCl농도, 질소원 종류 및 농도, 무기물 종류 및 농도 등을 검토 하였다.

6. Scale up

최적 배양 및 배지 조건을 이용하여 2 L 배지가 함유된 5 L 의 플라스크에서 scale up 하였다.

Ⅲ.결과 및 고찰

1. 균주의 동정

여러 종류의 분리원에서 분리한 sample을 고체배지에 평판 도말 하였다. 그 중 우수한 colony를 형성한 것을 액체배지에 배양하고 다시 고체배지에 평판 도말 하는 것을 반복하여 순수 분리하여 형태적, 생리 및 생화학적 특성을 조사 하였다.

1) 형태학적 특성

분리균주인 *P. agarovorans*의 형태학적 특성을 관찰하기 위해 TEM으로 확대 촬영하였다. TEM과 형태학적 특성은 Fig. 1과 Table 2와 같다. *P. agarovorans*은 그람 음성 균이고, 형태적으로는 구균의 형태이며, 운동성이 관찰 되었다. 또한 콜로니 형태는 round form 이였다.

Fig. 1. Morphology of P. agarovorans, observed by using TEM

Table 2 에서는 *P. agarovorans* 균주는 1-8%의 NaCl에서 배양되며 배양온도의 범위는 5-38℃이며 maltose, D-mannitol, D-glucose와 같은 탄수화물은 잘 흡수하지만 D-fructose, mannose, sucrose, glycogen과 같은 탄수화물은 흡수하지 않는다.

Table 2. Biochemical and physiological characteristics of strain CHO-33

Characteristics	Strains CHO-33
Morphological:	
Form	Round
Gram staining	Gram-negative
Flagela	-
Pigmentation	-
Growth at/in:	
4℃	-
5-38	+
40℃	-
1-8% of NaCl	+
pH range of growth	6-10
Nitrate reduction	-
Utilization of:	
Maltose	+
D-glucose	+
D-mannitol	+
D-fructose	-
Mannose	-
Sucrose	-
Glycogen	-

2) 생리 및 생화학적 특성

2-1. 지방산 조성

세포막의 지방조성은 균을 분류하고 동정 하는데 주요한 지표가 되기 때문에 microbial identification system을 사용하여 균주의 세포가 지방산을 분석 하였다. 세포막의 지방산 조성 결과는 Table 3 같다. 그 결과 11:0 2OH가 0.24%, 11:0 iso 3OH가 0.19%, 11:0 3OH가 1.11%, 13:0 anteiso가 0.05%, 12:0 iso 3OH가 0.75%, 14:0 iso 3OH가 0.11%, 13:0 2OH가 0.08%, 15:0 anteiso가 0.18%, 15:1 w8c가 1.59%, 16:0 가 18.93%, 17:1 w8c가 7.09%, 18:0가 0.47%였으며, library를 이용하여 조성의 유사성을 분석한 결과 *P. agarovorans* 와 98% 유사성을 보였다.

Table 3. Composition of fatty acids from P. agarovorans

Fatty acids	*Concentration (%)*
11:0 2OH	0.24
11:0 iso 3OH	0.19
11:0 3OH	1.11
13:0 anteiso	0.05
12:0 iso 3OH	0.75
14:0 iso 3OH	0.11
13:0 2OH	0.08
15:0 anteiso	0.18
15:1 w8c	1.59
16:00	18.93
17:1 w8c	7.09
18:00	0.47

2-2. Sequence 및 계통분류

당화 성능이 우수한 균주를 분리하여 본 연구에 사용 하였고, 배양과정에 시료를 채취하여 미생물을 분리한 후 16s rDNA sequences를 하였다. 16s rDNA sequences 결과는 Fig. 2 와 Table 4에 나타내었다. 16s rDNA sequences 유전자 분석을 행한 결과 이 균주의 염기쌍은 1439 bp의 염기서열을 결정하고 있으며 이를 근거로 reference와 비교하여 similarity를 구한 결과 본 균주는 *Pseudoalteromonas agarovorans*로 추정되었다. 계통분류는 Fig. 3에서 나타 내였다. *Pseudoalteromonas agarovorans*표준 균주와 98.4%의 유사도를 나타 내였으며 *P. atlantica X82134* (97.3%), *P. espejiana X82134* (97.1%), *P. carrageenovora X82136*(96.8%), *P. tetraodonis X82139* (96.8%),*P. issachenkonii AF31644* (95%), *P. undina X82140* (96.7%),*P. elyakovii AF082562* (98.3%),*P. distincta AF082564* (98.1%), *P. haloplanktis X67024* (97.1%),*P. nigrifaciens X82146*(97.6%),*P. antartica X98336 (94.3%)*로 나타내여 *Pseudoalteromonas agarovorans*가장 가까운 균으로 판명되었으며 이상과 같이 균주의 형태학적, 배양학적 특성과 생리 및 생화학적 특성을 분석하여 Bergey's manual of systematic bacteriology와 methods in microbiology 및Laboratory manual of general bacteriology에 의해 고려해 볼 때 *Pseudoalteromonas agarovorans*로 추정되며 *Pseudoalteromonas agarovorans CHO-33*으로 명명하였다.

```
   1 GAGCATGGCG GAGCTACCAT GCAGTCGAGC GGTAACAGAG AGTAGCTTGC
  51 TACTTTGCTG ACGAGCGGCG GACGGGTGAG TAATGCTTGG GAACATGCCT
 101 TGAGGTGGGG GACAACAGTT GGAAACGACT GCTAATACCG CATAATGTCT
 151 ACGGACCAAA GGGGGCTTCG GCTCTCGCCT TTAGATTGGC CCAAGTGGGA
 201 TTAGCTAGTT GGTGAGGTAA TGGCTCACCA AGGCGACGAT CCCTAGCTGG
 251 TTTGAGAGGA TGATCAGCCA CACTGGGACT GAGACACGGC CCAGACTCCT
 301 ACGGGAGGCA GCAGTGGGGA ATATTGCACA ATGGGCGCAA GCCTGATGCA
 351 GCCATGCCGC GTGTGTGAAG AAGGCCTTCG GGTTGTAAAG CACTTTCAGT
 401 CAGGAGGAAA GGTTAGTAGT TAATACCTGC TAGCTGTGAC GTTACTGACA
 451 GAAGAAGCAC CGGCTAACTC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGGGT
 501 GCGAGCGTTA ATCGGAATTA CTGGGCGTAA AGCGTACGCA GGCGGTTTGT
 551 TAAGCGAGAT GTGAAAGCCC CGGGCTCAAC CTGGGAACTG CATTTCGAAC
 601 TGGCAAACTA GAGTGTGATA GAGGGTGGTA GAATTTCAGG TGTAGCGGTG
 651 AAATGCGTAG AGATCTGAAG GAATACCGAT GGCGAAGGCA GCCACCTGGG
 701 TCAACACTGA CGCTCATGTA CGAAAGCGTG GGGAGCAAAC AGGATTAGAT
 751 ACCCTGGTAG TCCACGCCGT AAACGATGTC TACTAGAAGC TCGGAGCCTC
 801 GGCTCTGTTT TTCAAAGCTA ACGCATTAAG TAGACCGCCT GGGGAGTACG
 851 GCCGCAAGGT TAAAACTCAA ATGAATTGAC GGGGGCCCGC ACAAGCGGTG
 901 GAGCATGTGG TTTAATTCGA TGCAACGCGA AGAACCTTAC CTACACTTGA
 951 CATACAGAGA ACTTACCAGA GATGGTTTGG TGCCTTCGGG AACTCTGATA
1001 CAGGTGCTGC ATGGCTGTCG TCAGCTCGTG TTGTGAGATG TTGGGTTAAG
1051 TCCCGCAACG AGCGCAACCC CTATCCTTAG TTGCTAGCAG GTAATGCTGA
1101 GAACTCTAAG GAGACTGCCG GTGATAAACC GGAGGAAGGT GGGGACGACG
1151 TCAAGTCATC ATGGCCCTTA CGTGTAGGGC TACACACGTG CTACAATGGC
1201 GCATACAGAG TGCTGCGAAC TCGCGAGAGT AAGCGAATCA CTTAAAGTGC
1251 GTCGTAGTCC GGATTGGAGT CTGCAACTCG ACTCCATGAA GTCGGAATCG
1301 CTAGTAATCG CGTATCAGAA TGACGCGGTG AATACGTTCC CGGGCCTTGT
1351 ACACACCGCC CGTCACACCA TGGGAGTGGG TTGCTCCAGA AGTAGATAGT
1401 CTAACCCTCG GGAGGACGTT ACCACGGAGG ATCAGGCG
```

Fig. 2. 16s rDNA gene sequence of the isolated strain CHO-33

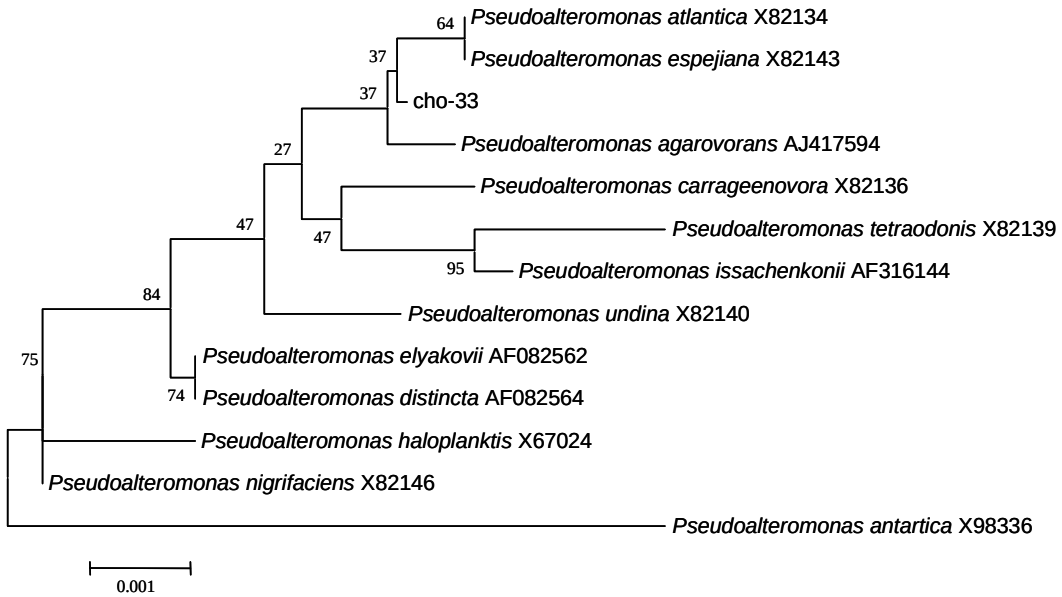

Fig. 3. Phylogenetic tree base on ITS sequences of strains CHO-33.

Table 4 Percentage 16 rDNA similarity between strain CHO-33 and reference strains

	(%) Sequence similarity												
Species(Taxon)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. Strain cho-33	1.000	0.984	0.973	0.971	0.968	0.968	0.950	0.967	0.983	0.981	0.972	0.976	0.943
2. *P. agarovorans* AJ417594		1.000	0.979	0.972	0.974	0.975	0.953	0.972	0.997	0.995	0.981	0.984	0.952
3. *P.atlantica* X82134			1.000	0.988	0.992	0.983	0.936	0.964	0.978	0.977	0.975	0.982	0.934
4. *P.espejiana* X82143				1.000	0.983	0.978	0.942	0.965	0.972	0.970	0.968	0.976	0.934
5. *P.carrageenovora* X82136					1.000	0.981	0.934	0.965	0.975	0.974	0.971	0.979	0.931
6. *P.tetraodonis* X82139						1.000	0.943	0.965	0.976	0.975	0.972	0.979	0.936
7. *P.issachenkonii* AF316144							1.000	0.944	0.954	0.952	0.939	0.941	0.942
8. *P.undina* X82140								1.000	0.972	0.971	0.972	0.976	0.938
9. *P.elyakovii* AF082562									1.000	0.997	0.983	0.986	0.954
10. *P.distincta* AF082564										1.000	0.981	0.985	0.954
11. *P.haloplanktis* X67024											1.000	0.986	0.945
12. *P.nigrifaciens* X82146												1.000	0.946
13. *P.antartica* X98336													1.000

2. 알긴산으로부터 당화를 위한 최적 배양조건

1) 당화에 미치는 교반 속도의 영향

분리 균주의 산소 호흡에 따른 영향을 보기 위하여 교반 속도에 따른 당화, pH, 균체 농도 변화를 조사하기 위하여 교반속도 0, 15, 60, 120, 180 rpm에서 실험을 진행 하였다. 배양조건은 배지 초기 pH 8.0, 교반속도 0 rpm, 접종 량 20%, 전 배양 시간 2일, 온도 30℃에서 실험을 3일 동안 진행 하였다. 종균을 위한 배지에는 peptone 2 g/L, yeast extract 1 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, NaCl 30 g/L을 사용하였고, 당화를 위한 기본배지에 alginate 30 g/L, peptone 0.5 g/L, yeast extract 1 g/L, NaCl 30 g/L을 사용하였다. 교반 속도 변화에 의한 균체성장, pH, 당화의 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 교반 속도가 0-15 rpm에서 배양할 때 배양 1일 후 균체농도는 0.2-0.3 OD_{660} 였다. 그리고 배양 2일 후에는 거의 증가 하지 않았다. 그러나 60에서 120 rpm으로 증가될 경우 균체농도는 0.5에서 0.6 OD_{660}로 증가 하였다. pH는 배양 3일부터 교반 속도가 낮을수록 낮았다. 알긴산에서 분해된 총 환원당은 교반 속도가 60-120 rpm에서 배양 할 경우 배양 2일 후 5.9 g/L이 얻어졌고, 배양 3일 후부터 감소하기 시작 하였다. 그러나 교반 속도가 15 rpm에서 배양할 경우 생성되는 당 함량은 배양시간 증가와 함께 증가 하여 3일 후에 최대생산량, 6.8 g/L이 얻어졌다.

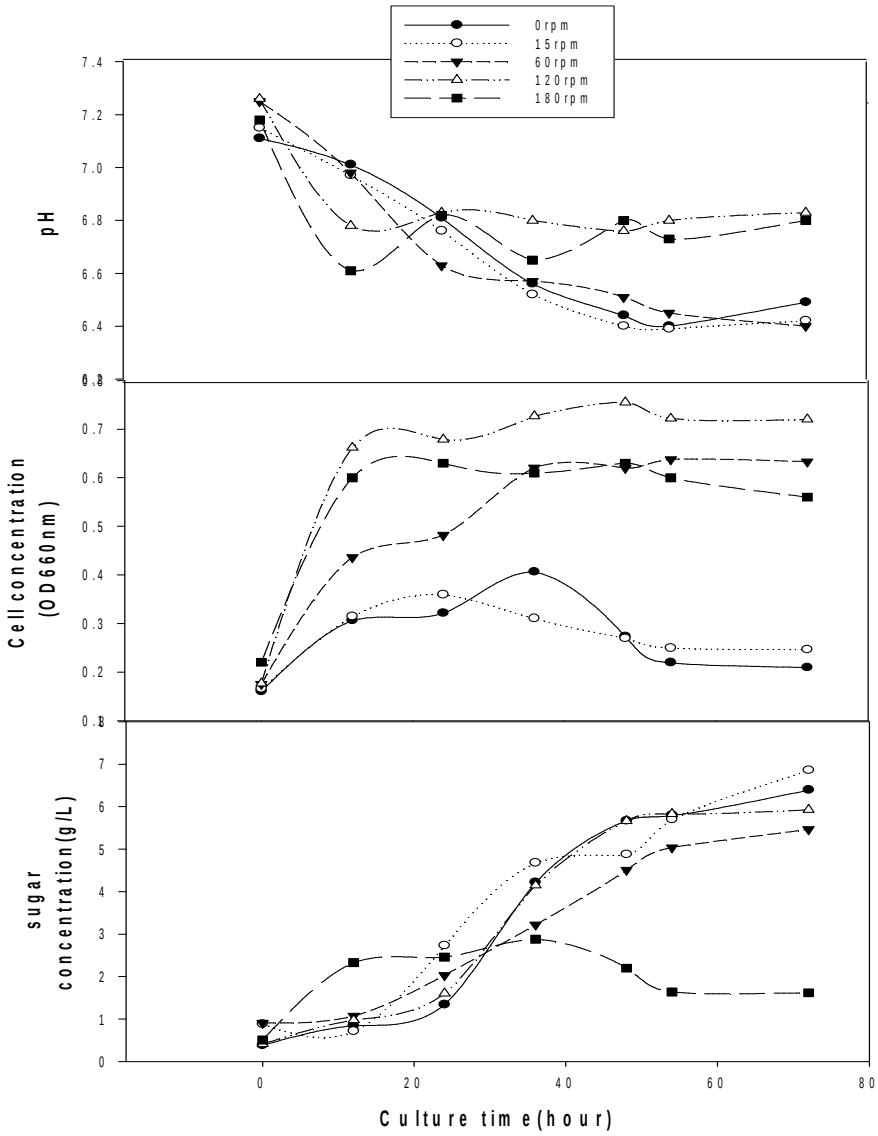

Fig. 4 Effect of agitation rate on cell concentration, pH, and saccharification in the culture of P. agarovorans

2) 당화에 미치는 전 배양 시간 영향

전 배양 시간은 균체 성장 및 당화에 주요한 요소 중의 하나이다. 전 배양시간에 의한 당화 효율을 효율적으로 하기 위해 전 배양 시간을 12시간, 24시간, 36시간, 48시간으로 검토 하였다. 배양조건은 배지 초기 pH 8.0, 교반 속도 15 rpm, 접종량 20%, 온도 30℃에서 실험을 3일 동안 진행 하였다. 종균을 위한 배지에는 peptone 2 g/L, yeast extract 1 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, NaCl 30 g/L을 사용하였고, 당화를 위한 기본배지에 alginate 30 g/L, peptone 0.5 g/L, yeast extract 1 g/L, NaCl 30 g/L을 사용하였다. 전 배양 시간에 의한 균체성장, pH, 당화 능의 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 전 배양 시간에 따라 pH는 배양 1일 후부터 3일까지 6.9-7.6 범위였다. 균체농도는 전 배양 2일에서 배양 1일 후 OD_{660} 값이 0.37로 최대 균체 농도로 나타났다. 알긴산에서 분해된 당은 전 배양 시간과 관계없이 배양시간 증가와 함께 증가 하였다. 그러나 전 배양 시간 1일에서 본 배양에 접종할 경우 배양 3일 후에 최대 생산량, 9.5 g/L이 얻어졌다.

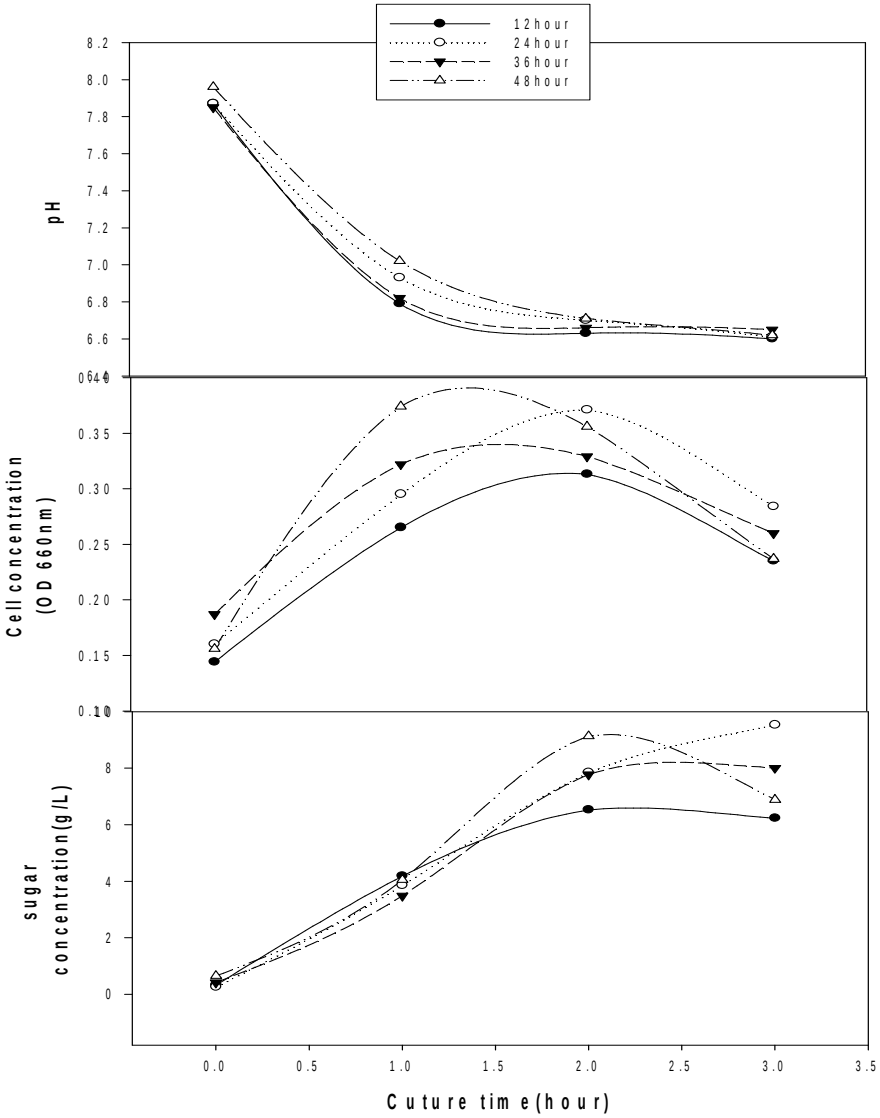

Fig. 5. Effect of preculture time on cell concentration, pH, and saccharification in the culture of P. agarovorans

3) 당화에 미치는 배양온도 영향

배양온도는 균체 성장 및 당화에 영향을 주는 중요한 요소 중의 하나이다. 배양온도에 의한 당화를 효율적으로 하기 위해 배양온도 27, 29, 31, 33℃에서 3일 동안 검토 하였다. 배양 조건은 배지 초기 pH 8.0, 교반속도 15 rpm, 전 배양 시간 1일, 접종 량 20%에서 실험을 진행 하였다. 종균을 위한 배지에는 peptone 2 g/L, yeast extract 1 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, NaCl 30 g/L을 사용하였고, 당화를 위한 기본배지에 alginate 30 g/L, peptone 0.5 g/L, yeast extract 1 g/L, NaCl 30 g/L을 사용하였다. 온도 변화에 의한 균체성장, pH, 당화의 결과는 Fig. 6에 나타내었다. 배양온도가 27-31℃일 때 균체농도는 배양 1일 후 0.2-0.3 OD_{660}였다. 그러나 33℃에서 배양 할 경우 균체농도는 3일 후에도 계속 증가 하고 있었다. pH는 27-33℃ 범위에서 배양할 때는 거의 비슷하였다. 알긴산에서 분해된 당은 배양시간증가와 함께 증가하였다. 특히 29℃에서 배양할 경우 최대 결과 치, 9.55 g/L이 얻어졌다.

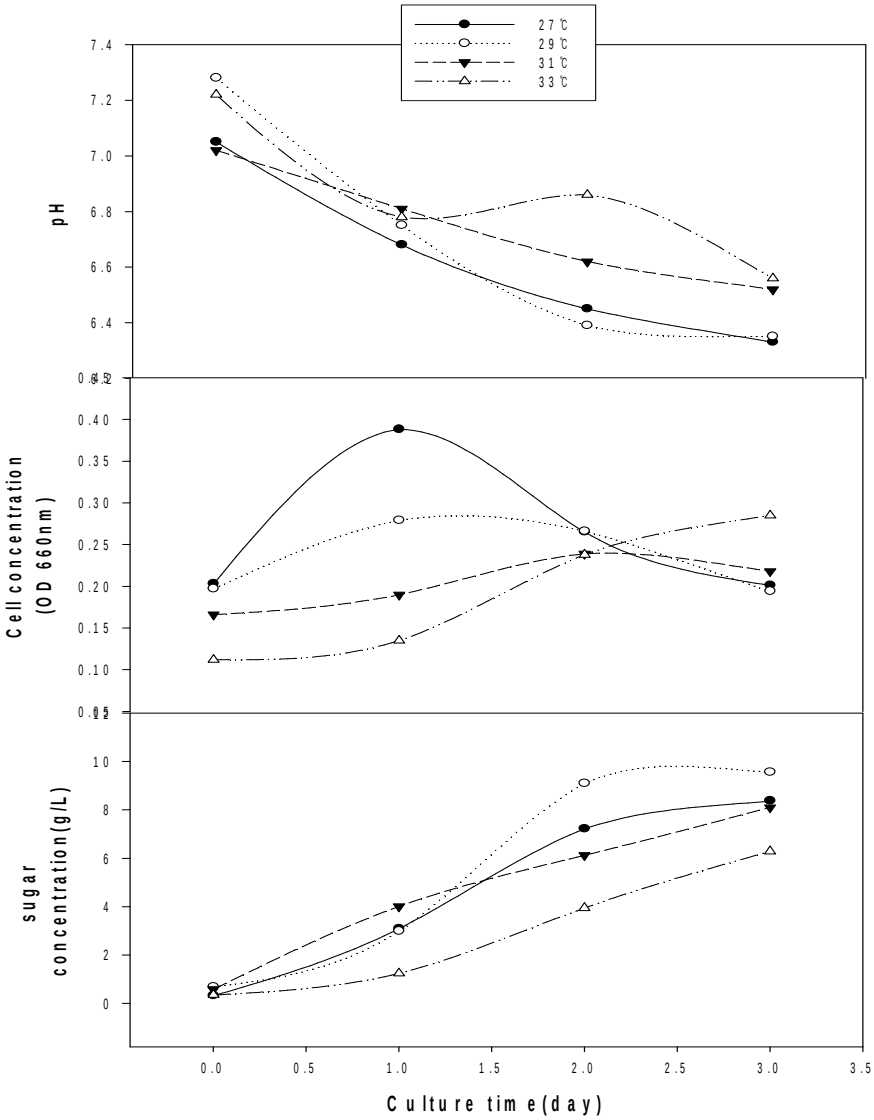

Fig. 6. Effect of culture temperature on cell concentration, pH, and saccharification in the culture of P. agarovorans

4) 당화에 미치는 접종 량 영향

종 배양에서 본 배양에 접종할 때 종균의 접종 량은 균체 성장 및 당화에 영향을 주는 중요한 요소 중의 하나이다. 일반적으로 접종 은 균체 증식속도에 의해서 결정되어지고 있다. 따라서 산업적 규모에서 대량 배양 하면 전 배양 회수가 증가하여 오염 위험성, 코스트가 증가 하게 된다. 또한 전 배양 단계에서 대량 배양을 위한 반응기를 사용할 경우 선단력에 의해 본 배양에 나쁜 영향을 미칠 가능성도 있다. 따라서 종균 접종 량에 의한 당화를 효율적으로 하기 위해, 접종 량 5, 10, 20, 30%로 변화 하면서 3일 동안 배양을 검토 하였다. 배양조건은 배지 초기 pH 8.0, 교반속도 15 rpm, 배양온도 29℃, 전 배양시간 1일에서 실험을 진행 하였다. 종균을 위한 배지에는 peptone 2 g/L, yeast extract 1 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, NaCl 30 g/L을 사용하였고, 당화를 위한 기본 배지에 alginate 30 g/L, peptone 0.5 g/L, yeast extract 1 g/L,, NaCl 30 g/L을 사용하였다. 본 배양 접종량 변화에 의한 균체성장, pH, 당화의 결과는 Fig. 7에 나타내었다. 접종 량 5-30 % 범위에서 접종 할 경우 pH는 모두 배양 1일 후 8.0에서 6.7-6.8로 감소하였고, 배양 2일 후부터는 변화가 크지 않았다. 균체농도 20-30%에서 5-10%에서 보다 오히려 균체 농도가 작다. 알긴산으로부터 생산된 당은 접종량에 관계없이 배양 1일 후부터 배양 증가와 함께 증가 하였다. 그러나 접종 량 10%를 본 배양에 접종할 경우 최대 결과가 얻어졌다.

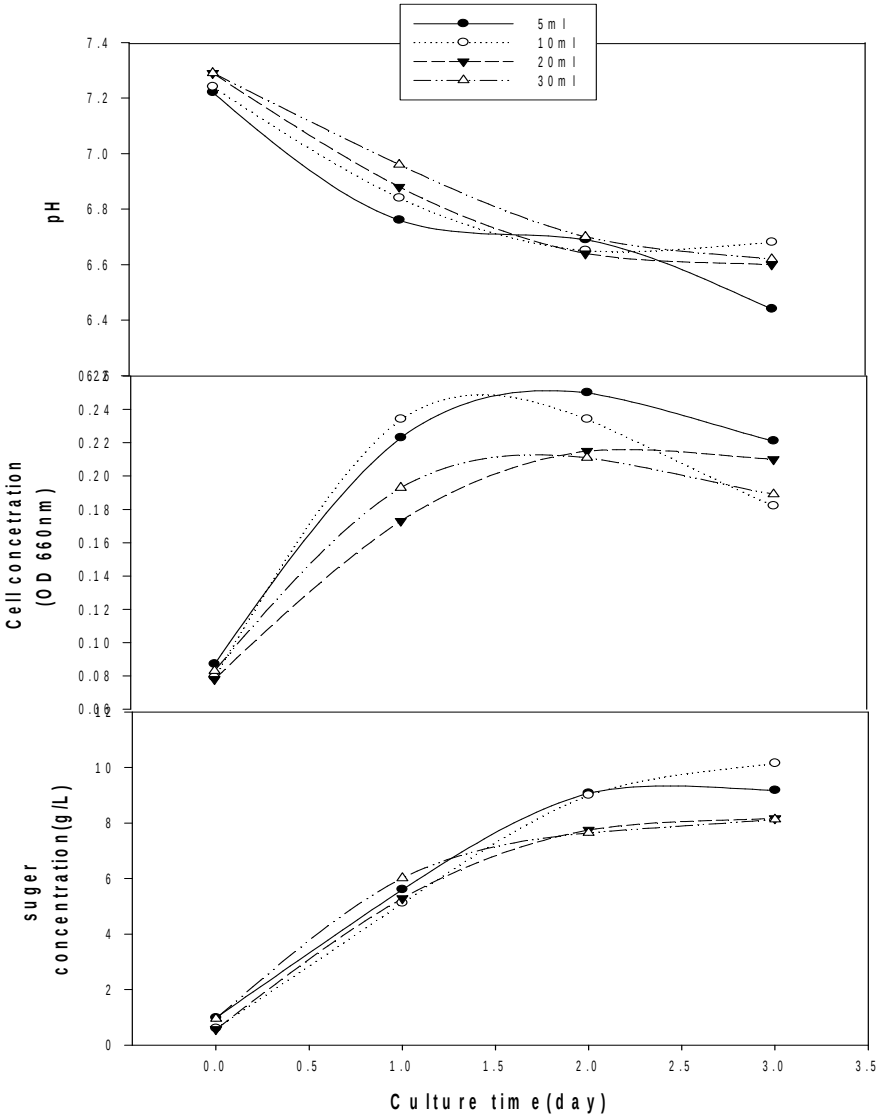

Fig. 7. Effect of inoculation volume on cell concentration, pH, and saccharification in the culture of P. agarovorans

3. 알긴산으로부터 당화를 위한 최적 배지 조건

1) 당화에 미치는 알긴산 농도 영향

알긴산 농도 및 해조류 농도는 균체 성장 및 당화에 영향을 주는 중요한 요소 중의 하나이다. 알긴산으로부터 당화를 효율적으로 하기 위해, 알긴산 농도를 10, 20, 30, 40 g/L로 변화 하면서 3일 동안 검토하였다. 배양 조건은 배지 초기 pH 8.0, 교반속도 15 rpm, 전 배양 시간 1일, 배양온도 29℃, 접종 량 10 %에서 실험을 진행 하였다. 종균을 위한 배지에는 peptone 2 g/L, yeast extract 1 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, NaCl 30 g/L을 사용하였고, 당화를 위한 기본 배지에 peptone 0.5 g/L, yeast extract 1 g/L, NaCl 30 g/L을 사용하였다. 알긴산 농도 변화에 의한 균체 성장, pH, 당화의 결과는 Fig. 8에 나타내었다. 알긴산 10-40 g/L을 이용할 경우 pH는 배양 1일 후 8.0에서 6.5-6.7로 감소하였고, 배양 2일 후부터 크게 변화하지 않았다. 그러나 그중에서 알긴산 농도가 30 g/L인 경우는 배양 후 pH는 6.28로 가장 크게 감소 되였다. 균체 농도는 알긴산 10 g/L을 제외하고 배양 시간 3일까지 계속하여 감소하였다. 알긴산으로부터 생산된 총 당은 알긴산 농도 증가와 함께 배양 1일 후부터 증가 하였다. 그러나 알긴산을 40 g/L 이상 사용할 경우 점성 때문에 배지 조제에 문제가 있었다. 당화 수율을 보면 30 g/L을 사용할 경우 최대 결과가 얻어졌다.

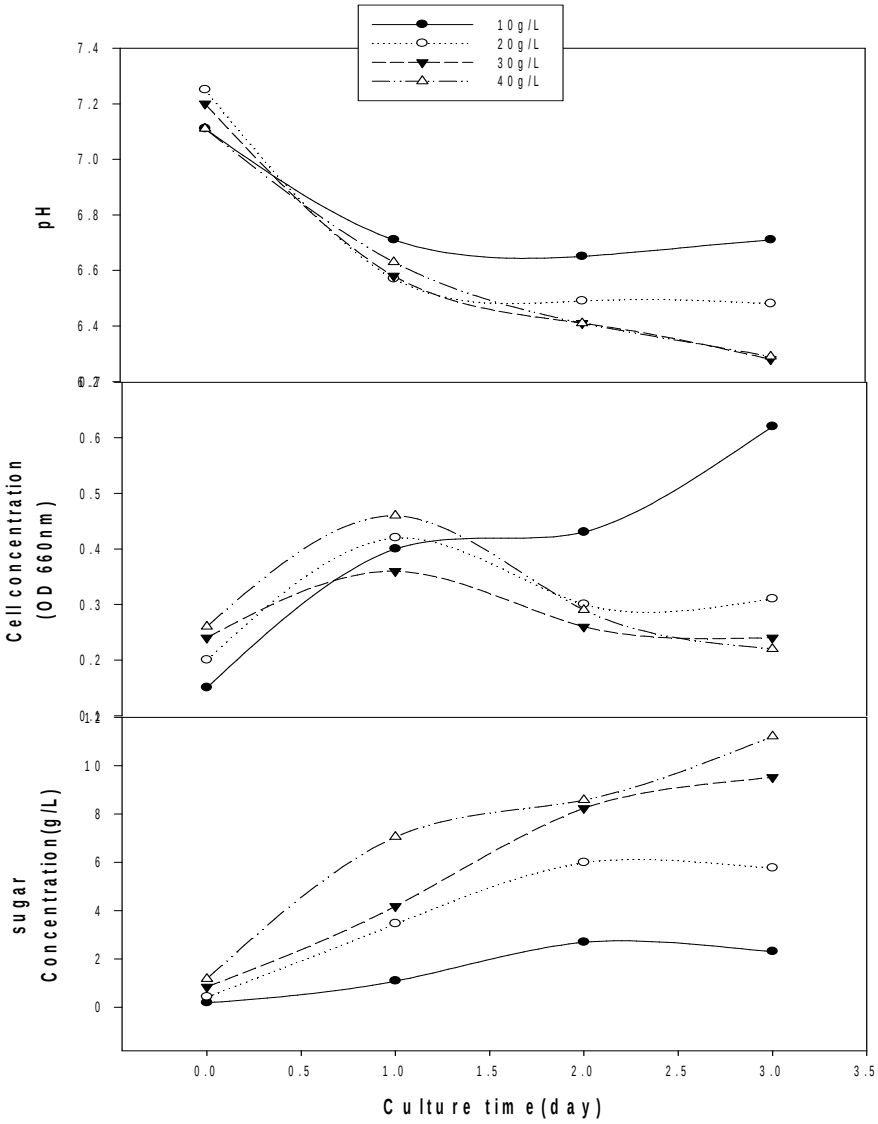

Fig. 8. Effect of aiginate concentration on cell concentration, pH, and saccharification in the culture of P. agarovorans

2) 당화에 미치는 pH의 영향

배양 배지의 초기 pH는 균체 성장에 영향을 주는 중요한 요소 중의 하나이다. 본 배양 배지의 초기 pH 변화로부터 당화를 효율적으로 하기 위해, 초기 pH를 6, 7, 8, 9, 10로 변화 하면서 3일 동안 검토 하였다. 배양조건은 교반속도 15 rpm, 전배양 시간 1일, 배양온도 29℃, 접종량 10%에서 실험을 진행하였다. 종균을 위한 배지에는 peptone 2 g/L, yeast extract 1 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, NaCl 30 g/L을 사용하였고, 당화를 위한 기본 배지에 alginate 30 g/L, peptone 0.5 g/L, yeast extract 1 g/L, NaCl 30 g/L을 사용하였다. 배지의 초기 pH 변화에 의한 균체 성장, pH, 당화결과는 그림 Fig. 9에 나타내었다.배지의 초기 pH 10와 9에서 배양할 경우 pH는 배양 1일 후 8.8에서 7.7과 7.5에서 6.9 로 각각 감소하였고, 배양 2일 후부터 거의 변화하지 않았다. 또한 초기 pH 7에서는 6.8에서 배양 3일 후에는 6.4로 떨어졌지만 그 변화가 크지 않았다. pH 6에서는 배양 1일 후에는 6.2에서 6.3으로 증가하였지만 배양 2일 후에는 6.2로 감소 되였고 배양 3일 후에는 pH 거의 일정 하였다. 균체 농도는 초기 pH 6-9에서 배양 할 경우 배양 2일까지는 배양 시간 증가와 함께 증가하여 배양 3일 후부터는 거의 증가 하지 않았다. 그러나 초기 pH 10일 경우 배양 3일 후에도 증가하는 것으로 나타났다. 알긴산으로부터 생산된 당은 초기 pH 변화와 관계없이 배양시간 증가와 함께 증가하였다. 그러나 배지의 초기 pH 8.0일 경우 최대 결과가 얻어졌다.

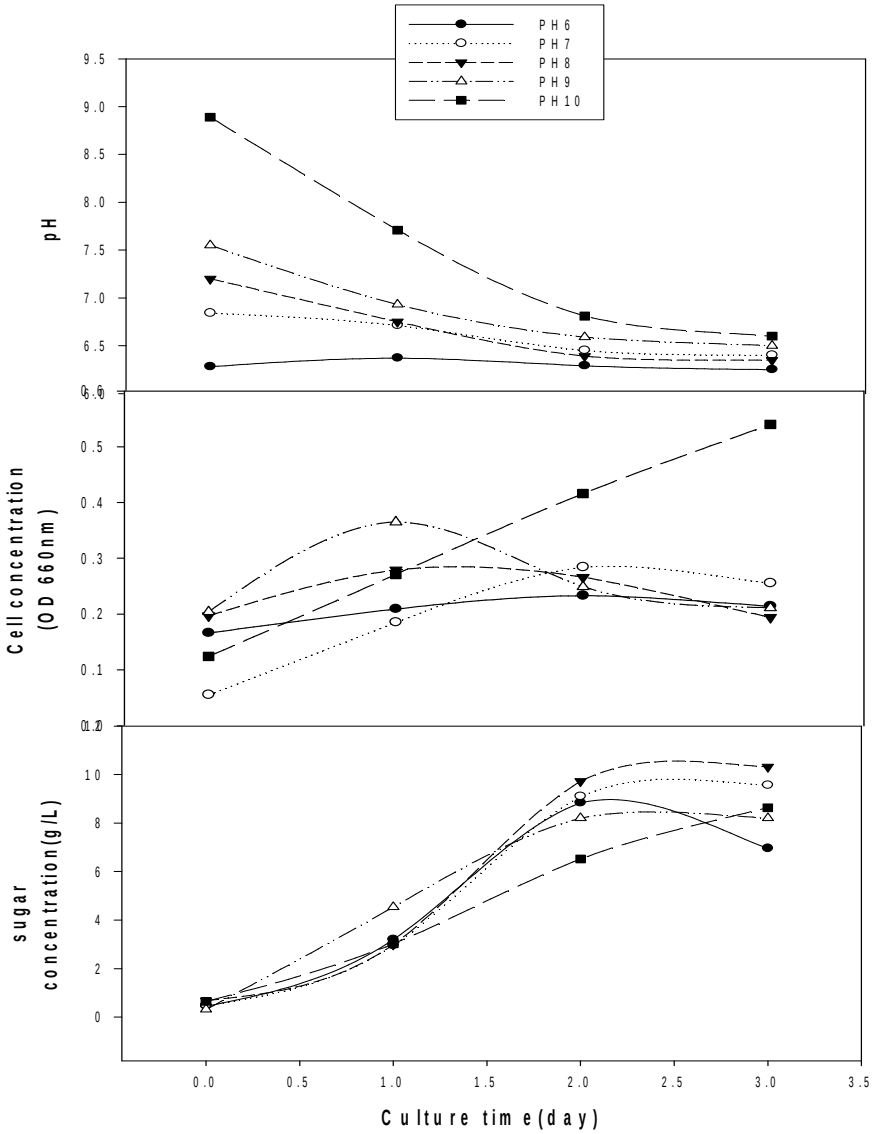

Fig. 9. Effect of initial pH on cell concentration, pH, and saccharification in the culture of P. agarovorans

3) 당화에 미치는 질소원 종류 및 농도의 영향

배양 배지에서 질소원 종류 및 농도는 균체 성장과 당화에 영향을 주는 중요한 요소 중의 하나이다. 알긴산으로부터 당화를 효율적으로 하기 위해, 질소원 종류와 농도를 변화 하면서 flask에서 3일 동안 검토하였다. 유기 및 무기 질소원은 다음과 같은 종류와 농도를 사용 했다. CSL 1-3 g/L: peptone, 1-3 g/L: yeast extract, 1-3 g/L: malt extract, 1-3 g/L; ammonia sulfate, 1-3 g/L; urea, 1-3 g/L. 배양조건은 교반속도 15 rpm, 전 배양시간 1일, 배양온도 29℃, 접종량 10%에서 실험을 진행하였다. 종균을 위한 배지에는 peptone 2 g/L, yeast extract 0.1 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, NaCl 30 g/L을 사용하였고, 당화를 위한 기본배지에 alginate 30 g/L, NaCl 30 g/L을 사용하였다. 질소원 종류 및 농도 변화에 의한 균체 성장, pH, 당화결과 Table 5에 나타내었다. 배양중의 pH는 urea 1 g/L을 사용할 경우 배양 3일 후에 9.12에서 6.61로 감소하였고, 배양 3일 후에는 감소하지 않았다. 그리고 urea 2-3g/L을 사용할 경우 배양 초기부터 9.15에서 감소하기 시작하여 7.3와 6.8까지 각각 감소하였다. 그러나 yeast extract와 peptone 경우는 농도와 관계없이 배양 1일 후에 7.4에서 6.8로 감소하였고, 배양 3일 후에는 6.2까지 감소하였다. Malt extract도 역시 농도와 관계없이 pH 7.19에서 배양 1일부터 배양 3일까지 6.5-6.3 범위였다. 또한 ammonium sulfate 2-3 g/L을 사용 할 경우 배양 2일 후에 pH 7.07에서 6.35까지 감소하였으나 배양 3일 후부터는 5.6-5.3 범위였다. 그러나 ammonium sulfate 1 g/L을 사용할 경우는 배양 3일까지 7.3에서 6.19까지 감소하였다. CSL 1-3 g/L을 사용할 경우 pH 7.6에서 배양 3일까지 6.3까지 감소하였다. 균체농도는 yeast extract, peptone, CSL 농도가 1 g/L에서 3 g/L로 증가할 경우 배양 1일까지 0.12-0.15에서 0.4-0.6 OD_{660} 까지 증가하였고, 배양 1일 후부터는 감소하였다. 그러나 malt extract, ammonia sulfate, urea 경우는 농도에 관계없이 배양 전 기간 0.1-0.3 범위였다. 유기질소원인 yeast extract, peptone, CSL을 이용할 경우 농도가 1 g/L에서 3 g/L로 증가 할 경우 알긴산으로부터 분해된 당은 배양 3일까지 급격히 증가하였고, yeast extract와 peptone이 최대 결과가 얻어졌다. 혼합 질소원을 테스트하기 위해 peptone 2 g/L과 yeast extract 1 g/L, peptone 1.5 g/L와 yeast extract 1.5 g/L, peptone 1 g/L과 yeast extract 2 g/L을 사용 하

였다. 결과는 pH 경우 혼합 농도에 관계없이 배양 1일 후 7.5-6에서 7.2로 감소해서 배양 2일 후부터 다시 증가하여 배양 5일 후에 7.6-7.7 범위였다. 균체농도도 혼합질소원 농도와 관계없이 거의 일정 하였다. 그러나 peptone 2 g/L와 yeast extract 2 g/L을 혼합사용할 경우 생성되는 당 함량은 10.5 g/L 였다.

Table 5. *Effet of nitrogen sources on cell concentration, pH, and saccharification*

Nitrogen sources	*sugar concentration (g/L)*
Peptone 1 g/L	9.4
Peptone 2 g/L	10.3
Peptone 3 g/L	9.5
Yeast extract 1 g/L	9.9
Yeast extract 2 g/L	10.7
Yeast extract 3 g/L	9.5
CSL 1 g/L	8.5
CSL 2 g/L	9.8
CSL 3 g/L	8.3
Malt extract 1 g/L	8.4
Malt extract 2 g/L	5.5
Malt extract 3 g/L	4.6
Urea 1 g/L	5.6
Urea 2 g/L	4.8
Urea 3 g/L	3.4
Ammonium sulfate 1 g/L	9.5
Ammonium sulfate 2 g/L	9.0
Ammonium sulfate 3 g/L	9.9

4) 당화에 미치는 NaCl농도 영향

알긴산으로부터 당화를 효율적으로 하기 위해, NaCl 농도를 0, 10, 20, 30, 40, 50 g/L로 변화 하면서 flask에서 3일 동안 검토하였다. 배양조건은 교반속도 15 rpm, 전 배양시간 1일, 배양온도 29℃, 접종 량 10 %에서 실험을 진행 하였다. 종균을 위한 배지에는 peptone 2 g/L, yeast extract 1 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, NaCl 30 g/L을 사용하였고, 당화를 위한 기본 배지에 alginate 30 g/L, peptone 1 g/L, yeast extract 2 g/L을 사용하였다. NaCl 농도변화에 의한 균체성장, pH, 당화결과는 그림 Fig. 10에 나타내었다. 배양중의 pH는 NaCl 농도 10 g/L을 사용할 경우 배양 1일 후 7.4으로 감소해서 3일 까지 계속하여 감소하였다. 그러나 20-50 g/L을 사용할 경우는 배양 1일후 6.8로 나타났으며 배양 2일후부터 변화가 크지 않았다. 그리고 알긴산 농도가 증가함에 따라 pH가 감소하였다. 균체 농도는 NaCl 양이 증가함에 따라 증가 하였다. NaCl 농도 10-40 g/L을 사용할 경우 균체 농도는 배양 2일까지 02-03 OD_{660} 증가하다가 배양 3일에서 감소하였으나 50 g/L을 사용 하였을 때는 배양 3일 후에도 0.4 OD_{660}에서 계속하여 증가하였다. 그러나 알긴산으로부터 분해된 당화는 배양 3일까지 급격히 증가하였고, 30 g/L을 사용 할 경우 최대 결과가 얻어졌다.

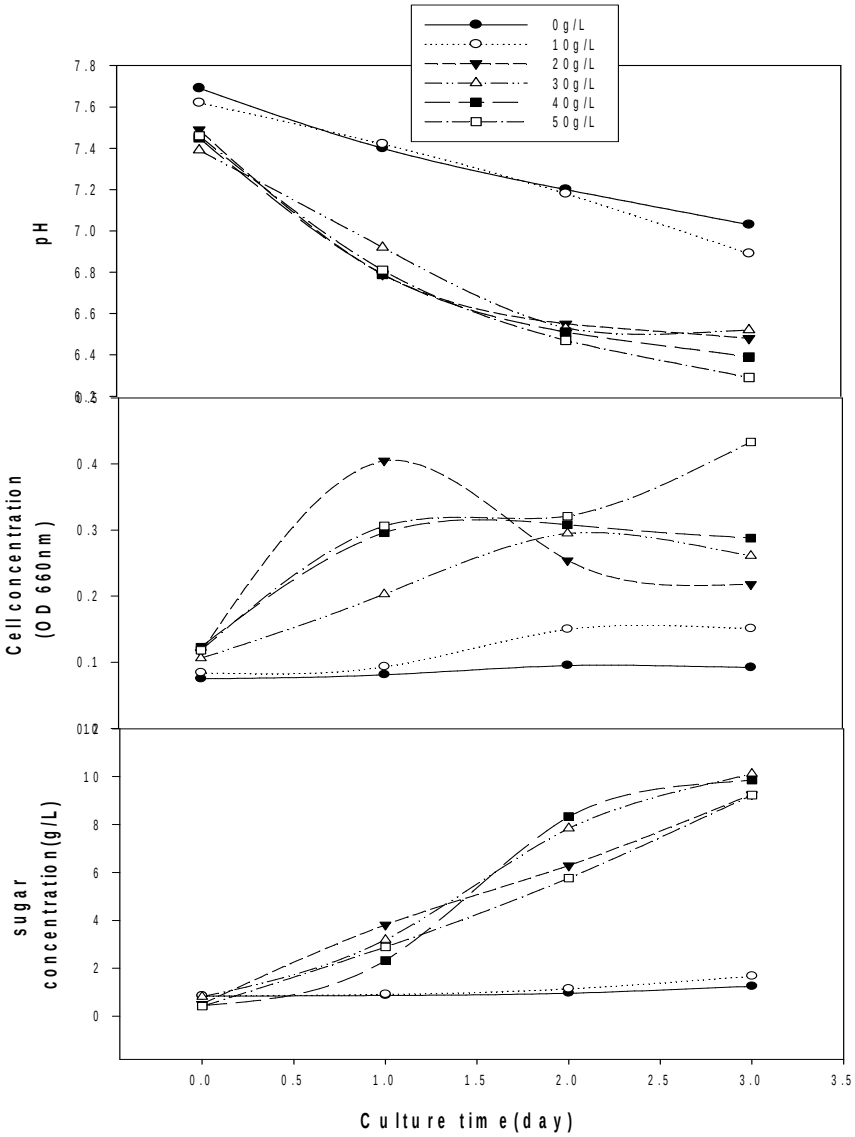

Fig. 10. Effect of NaCl concentration on cell concentration, pH , and sccharification in the culture of P. agarovorans

5) 당화에 미치는 무기물 종류 및 농도 영향

알긴산으로부터 당화를 효율적으로 하기 위해, K_2HPO_4 농도를 0. 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 g/L과 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0, 0.3, 1.0 2.0, 3.0 g/L로 각각 변화 시키면서 flask에서 3일 동안 검토하였다. 배양조건은 교반속도 15 rpm, 전 배양시간 1일, 배양온도 29℃, 접종 량 10 %에서 실험을 진행하였다. 종균을 위한 배지에는 peptone 2 g/L, yeast extract 1 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, NaCl 30 g/L을 사용하였고, 당화를 위한 기본 배지에 alginate 30 g/L, peptone 1 g/L, yeast extract 2g/L, NaCl 30 g/L을 사용하였다. K_2HPO_4 및 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$의 농도 변화에 의한 균체 성장, pH, 당화결과는 Fig. 11와 Fig. 12에 나타내었다. K_2HPO_4 0.5-1.0 g/L 사용 시 pH 및 균체 농도는 거의 비슷하였다. 그러나 0.5 g/L와 1.0 g/L에서 배양 3일 후 당 농도는 각각 10.43 g/L와 10.81 g/L였다. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 경우는 0.3 g/L을 이용할 때 생성되는 당 함량은 11.05 g/L였다.

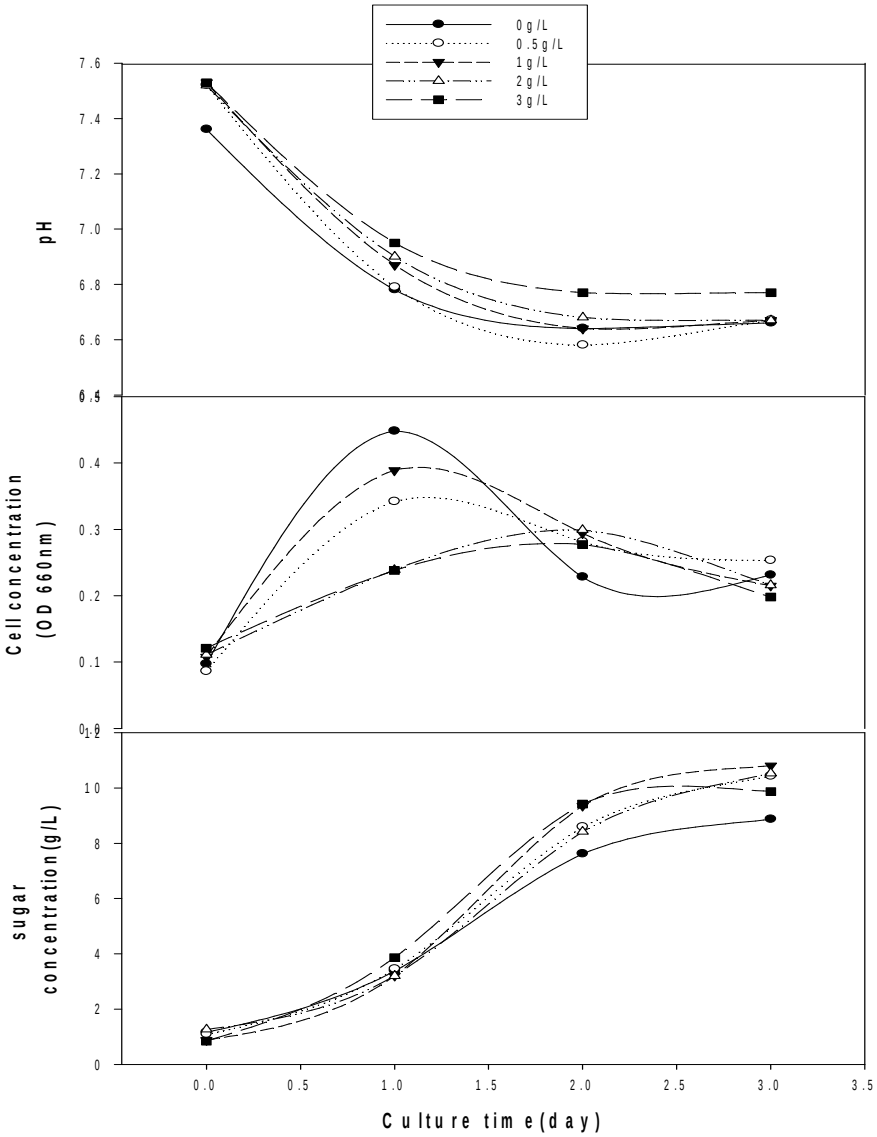

Fig. 11. Effect of K_2HPO_4 concentration on cell concentration, pH, and saccharification in the culture of P. agarovorans

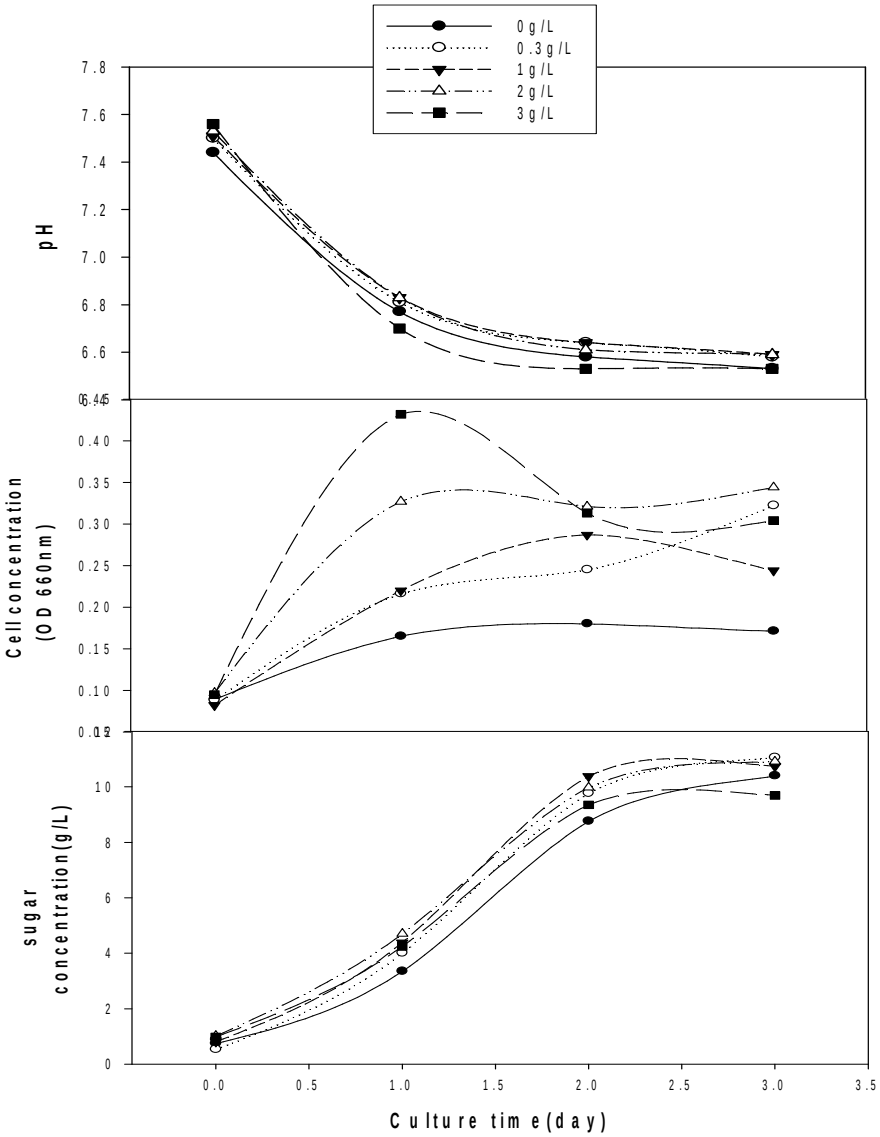

Fig. 12. Effect of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ concentration on cell concentration, pH, and saccharification in the culture of P. agarovorans

4. Scale up

배양조건은 교반속도 15 rpm, 전 배양시간 2일, 배양온도 29℃, 접종량 10%를 이용 하여 당화를 위한 기본 배지가 2 L 들어 있는 5 L 플라스크에서 실험을 진행하였다. 종균을 위한 배지에는 peptone 2 g/L, yeast extract 2 g/L, K_2HPO_4 0.1 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, NaCl 30 g/L을 사용하였고, 당화를 위한 기본 배지에는 alginate 30 g/L, peptone 2 g/L, yeast extract 2 g/L, NaCl 30 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g/L을 사용하였다. *P. agarovorans* 와 *S. maltophilia* Scale up 결과는 Fig. 13에 나타내었다. *S. maltophilia* 균주의 pH는 배양 초기에서 배양 2일까지 7.3-7.5의 범위였고, 배양 3일 후는 7.0으로 감소하였다. 배양 4일 후 약간 증가하여 배양 5일 동안 7.2-7.3 범위로 유지 되었다. 균체 농도는 배양 3일까지 0.45 OD_{660}까지 증가하여 배양 11일 후에는 증가하지 않았다. 이 결과는 500 ml flask 결과에 비하여 약간 낮은 농도이다. 알긴산으로부터 분해된 당은 배양 시간 증가와 함께 증가하여 배양 9일 후 5.2 g/L이 얻어졌다. 이 결과는 small flask에서의 결과보다 약간 감소한 것이다. *P. agarovorans* 균주의 pH는 배양 초기에서 배양 3일까지 7.4-6.8의 범위였고, 배양 3일까지 감소하였다. 균체 농도는 배양 2일까지 0.45 OD_{660}까지 증가하여 배양 3일 후에는 감소하였다. 이 결과는 500 ml flask 결과에 비하여 약간 낮은 농도이다. 알긴산으로부터 분해된 당은 배양 시간 증가와 함께 증가하여 배양 2일에 11.95 g/L이 얻어졌다. 이 결과는 small flask에서의 결과보다 약간 증가한 것이다. Fig. 13에서 나타낸 것과 같이 *P. agarovorans* 와 *S. maltophilia* 균주의 당화효율을 보면 *P. agarovorans* 균주가 *S. maltophilia*균주의 보다 효율이 약 16배나 높은 것으로 나타 내였다.

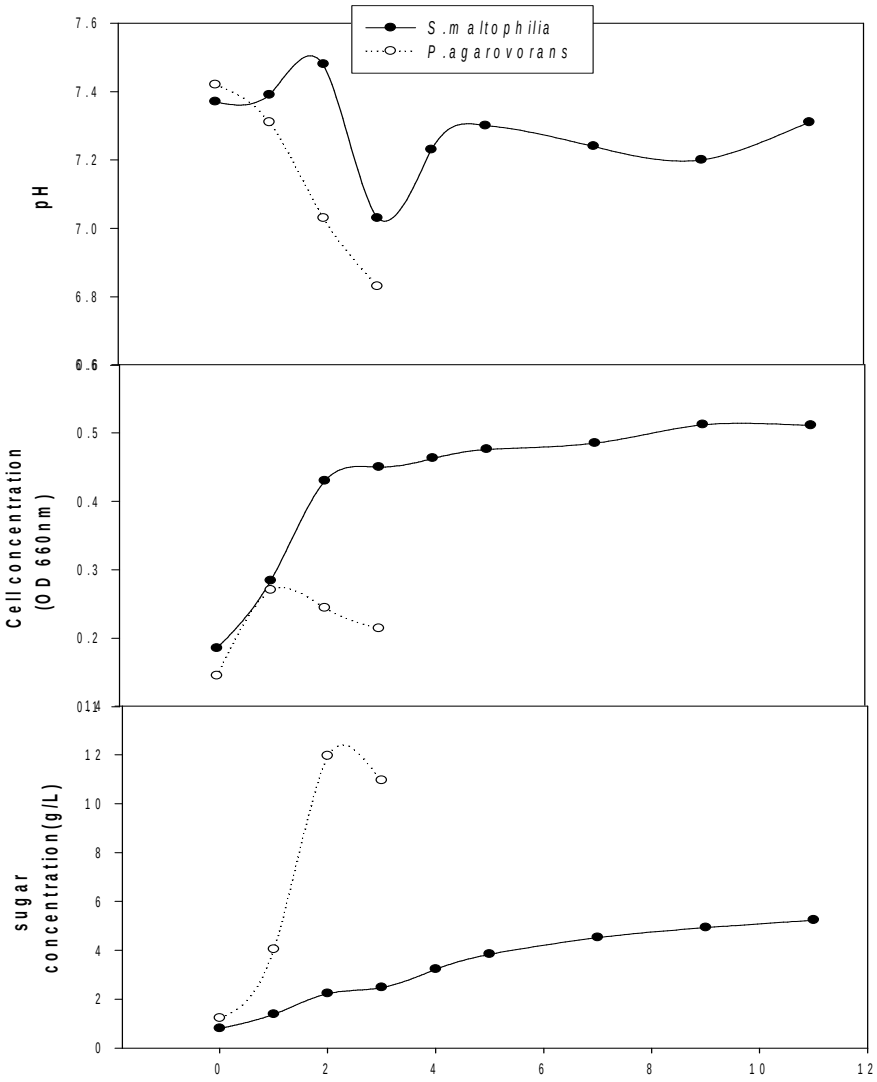

Fig. 13. Scale up for effective saccharification from alginate in the culture of P. agarovorans and *S. maltophilia*

Ⅳ. 결　　론

*P. agarovorans*은 그람 음성 균으로 형태적으로는 구균의 형태이며 운동성이 관찰 되었다. 또한 콜로니 형태는 round form이였다. 세포막 지방조성의 library를 이용하여 유사성을 분석한 결과 *Pseudoalteromonas agarovorans*와 98% 유사성을 보였다. 16s rDNA 유전자 분석에서 이 균주의 염기쌍은 1439 bp의 염기서열을 결정하고 이를 근거로 reference와 비교하여 similarity를 구한 결과 본 균주는 *Pseudoalteromonas agarovorans.로* 추정 되었으며, *Pseudoalteromonas agarovorans*의 표준 균주 98%의 유사도를 나타내어 가장 가까운 균으로 판명 되었다.

분리된 균주 (*P.agarovorans CHO-33*)를 이용하여 알긴산으로부터 효율적 당화를 위한 최적 배양 및 배지 조건을 검토 하였다. 교반 속도 0-15 rpm에서 배양할 때 균체농도는 배양 1일 후 0.2-0.3 OD_{660}였다. 그러나 60에서 120 rpm으로 증가될 경우 균체농도는 0.5에서 0.6 OD_{660}로 증가 하였다. 알긴산에서 분해된 당은 교반속도가 15 rpm에서 배양할 경우 배양 시간증가와 함께 증가 하여 3일 후에 최대 생산량이 얻어졌다. 전 배양 시간 1일에서 본 배양에 접종할 경우 배양 3일 후에 최대 생산량, 6.8 g/L이 얻어졌다. 알긴산에서 분해된 당은 27-31℃에서 2일 후부터 감소되었다. 33℃에서는 배양 3일 후에도 계속 증가 하고 있었다. 특히 29℃에서 배양할 경우 최대 결과 치, 9.55 g/L이 얻어졌다. 접종량 5-30 % 범위에서 접종할 경우 알긴산으로부터 생산된 총 당은 접종량 10%를 본 배양에 접종할 경우 최대 결과가 얻어졌다. 다양한 알긴산농도에서 당화 수율을 보면 알긴산 30 g/L을 사용할 경우 가장 좋은 결과가 얻어졌다. 또한 배지의 초기 pH가 7.0-8.0일 경우 알긴산으로부터 생산된 당의 농도는 최대가 되었다. 여러 질소원 중에서 yeast extract와 peptone 사용에서 당화가 가장 유리함을 알았다. 특히 혼합 질소원인 peptone 2 g/L와 yeast extract 2 g/L을 사용할 경우 당은 8.8 g/L로 나타났다. NaCl 농도 30 g/L을 사용할 경우 알긴산으로부터 분해된 당의 농도는 배양 3일까지 급격히 증가하였고, 가장 높은 결과를 얻었다. K_2HPO_4 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g/L을 첨가 할 경우는 생성되는 당 함량은 11.05 g/L로 좋은 결과를 보였다.

최적 배양 및 배지조건을 이용한 배양의 scale up에서 *S. maltophilia* 균주의

pH는 배양 초기에서 배양 2일까지 7.3-7.5의 범위였고, 배양 3일 후는 7.0으로 감소하였다. 배양 4일 후 약간 증가하여 배양 5일 동안 7.2-7.3 범위로 유지 되었다. 균체 농도는 배양 3일까지 0.45 OD_{660}까지 증가하여 배양 11일 후에는 증가하지 않았다. 이 결과는 500 ml flask 결과에 비하여 약간 낮은 농도이다. 알긴산으로부터 분해된 당은 배양 시간 증가와 함께 증가하여 배양 9일 후 5.2 g/L이 얻어졌다. 이 결과는 small flask에서의 결과보다 약간 감소한 것이다. *P. agarovorans* 균주의 pH는 배양 초기에서 배양 3일까지 7.4-6.8의 범위였고, 배양 3일까지 감소하였다. 균체 농도는 배양 2일까지 0.45 OD_{660}까지 증가하여 배양 3일 후에는 감소하였다. 이 결과는 500 ml flask 결과에 비하여 약간 낮은 농도이다. 알긴산으로부터 분해된 당은 배양 시간 증가와 함께 증가하여 배양 2일에 11.95 g/L이 얻어졌다. 이 결과는 small flask에서의 결과보다 약간 증가한 것이다. *P. agarovorans* 와 *S. maltophilia* 균주의 당화효율을 보면 *P. agarovorans* 균주가 *S. maltophilia*균주의 보다 효율이 약 16배나 높은 것으로 나타 내였다.

V. 참 고 문 헌

1. A. Haug and B. Larsen, Proc. 5th Int. Seaweed Symp. A study of the constitutionof alginic acid by partial acid hydrolysis, pp. 271-277, Pergamon Press, Oxford (1965).

2. Y. Tomoda, K. Umemura, T. Adachi, *Biotechnol. Biochem.,* ***42,*** 6512 (1991).

3. Y. Yonemoto, H. Yamashia, T. Kitabtake, Y. Ishida, A. Kimura, K. Murta, *J. Ferment. Bioeng.,* ***78,*** 687 (1993).

4. Y. Kaneko, Y. Yonemoto, K.Okayama, A. Kimura, and K. Murata. *J. Ferment. Bioeng.,* ***70,*** 147 (1990).

5. T.A. Bolatito, B. Christopher and K. Tajalli, *Biotechnol. Bioeng.*, ***53,*** 173 (1997).

6 T.A. Bolatito, T. Candan, B. Christopher, and K.Tajalli, *FEMS Microbiol. Lett.*, ***166,*** 165 (1998).

7. H. Akiyama, T. Endo, R. Nakakita, K. Murata, Y. Yenemoto, K. Okayama, *Biosci. Biotechnol. Biochem.,* ***56,*** 355 (1992).

8. M. Otteriei, G. Skjark-Braek, O. Smidsord, T. Espevik, *J. Immune. Ther.,* ***10,*** 286 (1991)

9. Y. S. Park, J. M. Song, J. S. Jung, H. Cho, S. Y. Cho, and W. S. Shin, *J. Microbiol. Bioeng.*, in press (2007)

10. Y. Thiang, A. Lori, and N. Schiller, *Annu. Rev. Microbiol.*, ***54,*** 289 (2000).

11. T. Sawabe, Y. Ezura, T. Kimura, *Nippon Suisan Kakkaishi*, ***58,*** 521 (1992).

12. K. H. Min, S. F. Sasaki, Y. Kashiwabara, H. Suzuki, K. Nisizawa, *J. Biochem.*, ***81,*** 539 (1977).

13. 이 홍금, 보건산업기술동향, 겨울호, 42-47, (2001).

14. 이봉호, 최 병욱, 해조류로부터 항산화제 및 치매치료제 성분의 추출 및 기능성 제품의 개발, 한밭대학교 연구 보고서, 123, (2000).

15. 김상진, 해양 바이오산업 발전에 대한 소고, 생물 산업,***15,*** 16-18, (2002),

16. 이유경, 이 홍금, 조류의 산업적 이용, 생물 산업,***15,***19-31, (2002),

17. 김상진, 마국 해양생명공학 연구 동향, 미생물과 산업, 28, (2002).

18. 장정옥, 류 화정, 이 온구, 점미, 백미, 흑미, 세포벽의 비전분성 다당류 성분 분석, 대한 가정학회지, ***39(1),*** 91-102, (2001).

19. Bolatito Ariyo, Christopher Bucke, and Tajalli Keshavarz, Alginate oligosaccharide as enhancers of penicillin production in cultures of Penicillium chrysogenum, *Biotechnology and Bioengineering,* ***53,*** 17-20, (1997).
20. Bolatito Ariyo, Candan Tamerler, Christopher Bucke, and Tajalli Keshavarz, Enhanced penicillin production by oligosaccharide from batch cultures of Penicillium chrosogenum in stirred-tank reactors, *FEMS Microbiology Letters*, ***166,*** 165-170, (1998).
21 H. Akiyama., T. Endo, R. Nakakita, K. Murata, Y. Yenemoto, K. Okayama, Effect of depolymerased alginates on the growth of Bifidobacteria, Biosci, *Biotechnol. Biochem.*, ***56,*** 355-356, (1992).
22. Peter gacesa, Enzymic degradation of alginates, *Int. J. Biochem.*, ***24(4),*** 545-552, (1992).
23. Y. Kaneko, Y. Yonemoto, K. Okayama, A. Kimura and K. Murata, Bacterial alginate lyase properties of the enzyme formed in a mixed culture of bacteria isolated from soil. *J. ferment. Bioengang.*, ***70,*** 147-149, (1990).
24. Thian Yin Won, Lori A. Peston, and Neal L. Schiller, Alginate lyase, *Annu. Rev. Microbiol.*, ***54,*** 289-340, (2000)

저작물 이용 허락서

학 과	화학공학과	학 번	20067710	과 정	석사
성 명	한글: 박옥란 한문 :朴玉蘭 영문 : Yu Lan Piao				
주 소	조선대학교 백학여학사				
연락처	E-MAIL : pyl0921@naver.com				
논문제목	한글 : 당화능을 갖는 *Pseudoalteromonas agarovorans* 분리 및 당화의 최적화 영어:Isolation of *Pseudoalteromonas agarovorans* and optimization				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(O) 반대( )

2007년 2 월 일

저작자: 박 옥 란 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하