

한국산 다시마 유래 Fucoidan의 정제 및 분해균의 분리

김대선 · 임동중 · 문성훈 · 서현호¹ · 박용일*
가톨릭대학교 생명공학부, ¹진주산업대학교 환경공학과

Purification of Fucoidan from Korean Sea Tangle (*Laminaria religiosa*) and Isolation of Fucoidan-Degrading Microorganisms. Kim, Dae-Sun, Dong-Jung Lim, Seong-Hoon Moon, Hyun-Hyo Suh, and Yong-Il Park*. Division of Biotechnology, The Catholic University of Korea, Bucheon 420-743, Korea, ¹Dept. of Environmental engineering, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea – The fucoidan from *Laminaria religiosa* collected at Wando in Korea was purified with the yield of 2.3% in mass. The monosaccharide composition of the purified fucoidan was nearly identical to that of the commercial standard: fucose 63.71%, xylose 22.98%, galactose 6.62%, mannose 0.24%, and uronic acid 3.26%. Microorganisms capable of degrading the purified fucoidan were isolated from the colonies on the minimal medium containing 0.2% of purified fucoidan as a sole carbon source. Of these isolates, a strain showing a relatively higher capability to degrade fucoidan, up to 63%, was partially characterized as a Gram positive, aerobic, moderately halophilic marine bacterium.

Key words: Fucoidan, degradation, *Laminaria religiosa*, marine bacteria

Fucoidan은 세포 내 골지체에서 합성되어 모든 갈조류의 주로 세포간 조직에 존재하며 종에 따라 엽체의 삼출액(exudate)에도 존재하는 다당류로서[17], L-fucose가 주로 α -1,3 결합으로된 골격으로 D-xylose, D-galactose 및 uronic acid 등을 함유한 합황 hetero형 산성 다당이다[1, 2, 7, 15]. 일반적으로 fucoidan은 L-fucose의 에스테르화황산을 주성분으로 하여 glucuronic acid를 함유한 U-fucoidan, 황산 fucose로 구성된 F-fucoidan, 그리고 galactose를 함유한 G-fucoidan으로 구분된다[18]. Fucoidan은 갈조류 등에 존재하는 기타 식이섬유 다당인 alginic acid, carrageenan, laminaran 등과는 구조 및 생리적 작용이 다르고 오히려 동물의 혈액응고 저해능이 있는 산성 다당인 heparin과 구조 및 작용이 매우 유사하여 항혈액응고 및 혈액정화활성을 나타낸다[7]. 또한, antiinflammatory, antitumor, antiviral 및 immunosuppressive 등의 탁월한 생리활성능이 밝혀지고 있다[8, 9, 14, 21]. 이러한 생리적 기능성 이외에도 fucoidan은 점성이 낮고 우수한 용해성으로 수용성 식이섬유 소재로서 응용 가능성이 매우 높다. 한편 fucoidan의 항암활성, 항 HIV, 항혈액응고 작용 등은 모두 polysaccharide 상태보다 작은 분자량 상태에서 활성이 증가한다고 보고되고 있음으로[6, 13, 17], fucoidan의 산업적 응용성을 향상시키기 위해서는 oligosaccharide 생산에 관한 연구가 요구된다. 그러나 현재 우리나라 해조류 유래 fucoidan을 가수분해하여

fucooligosaccharide를 생산하는 fucoidan 분해효소에 관련된 연구 및 이 효소의 산업적 생산에 관한 보고는 거의 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 궁극적으로는 fucoidan으로부터 올리고당 생산 기술을 확립하기 위한 기초연구로서 완도지방의 국내산 다시마로부터 fucoidan을 추출, 분리·정제하여 구성 성분조성을 조사하였고, fucoidan 가수분해능을 가진 해양유래 미생물을 선별, 분리하였다.

본 실험에 사용된 다시마(*Laminaria religiosa*)는 전라도 완도군 금일수협으로부터 완도 근해에서 2002년 4-5월 경 채취한 건다시마(상품)를 시료로 사용하였다. 성분당 분석을 위한 표준물질로서 commercial fucoidan, L-fucose, D-galactose, D-xylose, D-mannose (Sigma Co. St Louis, USA)등을 사용하였으며 fucoidan 추출 및 정제, 성분당 분석 실험에 사용된 모든 시약은 특급시약으로 하였다.

다시마로부터 fucoidan의 추출은 Tako 등[19]의 방법을 변형하여, 분쇄(3×3 cm)된 건다시마 100 g을 0.1 N HCl 1 l에 넣어 상온에서 24시간 동안 추출하였다. 이를 Scotch Bright pad로 여과하여 얻은 여액을 NaOH로 중화한 후 생긴 침전물을 동일 방법으로 재차 여과하였다. 또한 여과시 얻은 잔사물 20 g에 5배량의 0.2 N HCl을 가하여 70°C에서 2시간 동안 2차 추출하였으며 전체 여액을 60°C에서 1 l로 농축시킨 후, 농축액의 3배 용량의 95% 에탄올을 첨가한 후 원심분리(8,000 rpm, 15 min)로 회수하여 증류수에 용해시켰다. 용해시 중탕조건에서 pH 2로 조정된 후 침전물을 용해하고 여기에 CaCl₂을 최종농도가 2 M이 되도록 첨가한 후, 침전물을 동일방법으로 원심분리로 제거한 것을 상등액에 다시 3배 용량의 95% 에탄올을 첨가하여 재침전시켰다. 재침전물

*Corresponding author

Tel: 82-2-2164-4512, Fax: 82-2-2164-4846

E-mail: yongil382@catholic.ac.kr

을 원심분리로 회수한 다음, 증류수에 용해시켜 evaporator (N-1000, Eyela Co., Japan)로 잔류 에탄올을 제거한 후에 동결 건조하였다. 동결 건조한 시료를 3.26%(w/v)의 비율로 증류수(pH 2)에 녹여 4°C에서 48시간 동안 투석(MWCO 14,000)한 것을 동결 건조하여 fucoidan을 회수하였다.

정제된 fucoidan의 구성 성분당 분석을 위해 증류수 1 ml에 50 mg의 fucoidan을 녹인 후 4 M trifluoroacetic acid (TFA) 1 ml과 혼합하고 100°C, 4시간 동안 교반하면서 산 가수분해 시켰다. 반응종료 후, 0.45 µm syringe filter로 여과하고 증류수(0.1 ml) 첨가 후 Speed-Vac(Module spin 40, Biotron, Korea)에서의 건조를 3회 반복하여 잔류 TFA를 제거하였다. 산기수분해물 분석은 HPAEC-PAD(High Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detector)로 다음과 같이 분석하였다. CarboPac PA-1(4×250 mm, Dionex Co., USA) 컬럼이 장착된 Bio-LC(DX 500 Chromatography System, Dionex Co., USA)를 이용하여 20 µl를 injection하여 1 ml/min 속도로, 100 mM NaOH로 10분간 isocratic mode로 용출하면서 Electrochemical detector(ED 50, Dionex Co., USA)를 이용 검출하였다. 대조구로는 동일 조건으로 산기수분해한 표준 fucoidan(Sigma Co., USA)을 사용하였다. Fucoidan 분해미생물 탐색을 위해 경남 통영인근 해역에서 어패류, 해조류, 해변토양에서 채취한 시료를 생리식염수로 5배 희석하고 fucoidan을 첨가(0.2%)한 최소배지(NH₄Cl 1.0 g, Na₂HPO₄ 4.8 g, KH₂PO₄ 4.4 g, NaCl 20 g, MgSO₄·7H₂O 5.5 g, CaCl₂ 0.1 g, FeSO₄·7H₂O 0.002 g, agar 16 g/l, pH 7.5)에 도달하여 30°C에서 2일 배양 후, 생육한 colony를 1차 선별하고, 선별된 균주를 여과(0.2 µm pore-sized membrane filter, Millipore)된 해수에 sole carbon source로서 fucoidan 2 g/l를 첨가하여 멸균(121°C, 15 min)한 뒤 접종하여 30°C, 120 rpm 진탕배양기에서 5일간 배양하여 현저한 증식도를 보이는 2 균주를 최종 선별하여 각각 JK1, JK4로 명명하였다.

Fucoidan 분해효소 활성은 상기의 액체배지에서 분리균을 5일간 배양 후 원심분리(8,000 rpm, 15 min)하여 배양액과 균체 파쇄물에 대해 효소활성을 분석하였으나 배양액에서는 효소활성이 미미하여 균체 파쇄물을 조효소액으로 하여 실험에 사용하였다. 조효소액의 조제는 상기배양에서 얻어진 균체를 수차례 50 mM phosphate buffer(pH 7.2)로 세척하여 ultrasonication(20 kHz, 60 sec, 3 times)으로 균체를 파쇄하여 원심분리(12,000 rpm, 15 min)한 후 상층액을 조효

소액으로 사용하였다. 효소반응 및 반응물 분석은 효소액을 0.4%(w/v) fucoidan을 동일 buffer에 녹여서 25°C에서 24 h 동안 반응한 반응물을 100°C에서 3분간 가열처리하여 반응 정지시킨 후 가수분해물을 CarboPac PA-100(4×250 mm, Dionex Co., USA), 200 mM NaOH를 기본용매로 하고 100 mM NaNO₃를 분당 2%씩 증가한 농도구배로 하여 30분간 용출하면서 분석하였다.

실험 결과, 건다시마 100 g에서 추출하여 얻은 정제된 fucoidan의 양은 1.553 g 였으며 1차 추출과정에서 여과시 회수한 잔사물 46.5 g을 2차 추출하여 얻은 결과 정제된 fucoidan은 0.675 g이었다. 따라서 본 실험에 의한 추출과정에 의해 총 2.23 g의 양질의 fucoidan을 얻었으며 이때 총 회수율은 건량비로 약 2.3% 정도였다. Table 1에 갈조류의 종류와 추출방법에 따른 회수율의 차이를 비교하였다. 기존에 보고된 정제된 fucoidan의 수율은 열수 및 용매추출시 4.8%였다[11, 12]. 본 실험에서의 fucoidan 정제 수율은 구등[5]이 보고한 부산 근해에서 채취된 다시마로부터의 수율(4.8%)보다 낮은 결과를 나타내었다(Table 1). 이러한 수율 차이는 다시마의 회수과정, 서식장소, 채취시기 및 성숙정도, 추출방법 등에 따른 차이에 기인하는 것으로 사료된다[5, 20]. Fucoidan의 정제도를 검토하기 위해 표준시료

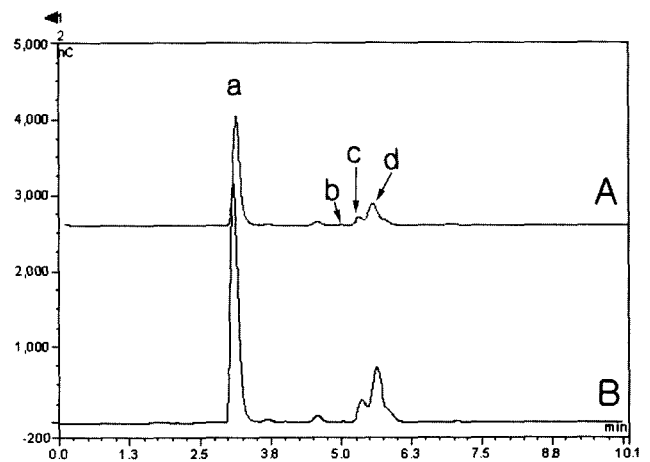


Fig. 1. HPAEC-PAD analysis for the degree of purification of the fucoidan. Acid hydrolysis of the purified fucoidan was performed with 2 M trifluoroacetic acid for 4 h at 100°C and the hydrolysates were analysed by HPAEC-PAD using Bio-LC(Dionex) as described in the text. Symbol: a, L-fucose; b, D-mannose; c, D-xylose; d, D-galactose; A, hydrolysate of fucoidan; B, hydrolysate of commercial fucoidan.

Table 1. Yields of fucoidans extracted from sea tangles.

Species	Fucoidan (% in mass)	Reference or source
<i>Laminaria religiosa</i> (Pusan, Korea)	4.8	Koo, <i>et al.</i> (1995)
<i>Laminaria cichorioides</i> (Troitsa Bay, Japan)	3.5	Tatiana <i>et al.</i> (2003)
<i>Laminaria japonica</i> (Rifovaya Bay, Japan)	1.3	"
<i>Laminaria religiosa</i> (Wando, Korea)	2.3	This study

fucoidan(Sigma, USA)을 대조구로 하여, 동일조건에서 산가수분해한 후 Bio-LC상에서 비교, 분석한 결과 구성성분당 조성이 거의 동일한 양상의 chromatogram을 얻을 수 있었으며 기타 불순물이 검출되지 않았다(Fig. 1). 이러한 결과로 미루어 본 실험과정을 통해 최종 얻어진 정제 fucoidan은 순도가 높은 수준의 시료로서 대조구인 표준 fucoidan과 거의 동일한 구조의 해조다당인 것으로 사료되었으며 이를 차후의 효소반응 실험의 기질로 사용하였다(Fig. 2). 정제된 fucoidan의 구성 성분당을 조사, 정량하기 위해 산가수분해 후 Bio-LC로 분석하여 표준 단당류와 비교하여 분석한 결과를 Table 2에 각각 나타내었다. 정제 fucoidan의 구성 성분당은 fucose(63.71%)와 xylose(22.98%)가 가장 높은 비율로 나타났으며 소량의 galactose(6.62%)와 mannose(0.24%), uronic acid(3.26%)가 함유되어 있어 F-fucoidan에 가까운 것으로 사료되었다.

Fucoidan 분해미생물은 최소 배지내에서 생육정도가 우수한 16개 균주 중에서 형태학적 성질이 서로 상이하고 성장이 우수한 균주 2개(JK1, JK4)를 선별하였다(Table 3). 그중 해양으로부터 분리된 JK4의 생화학적 및 생육특성을 조사한 결과 Gram positive균으로서 cocci 형태였으며 catalase 및 oxidase 활성능을 가지며 0.5-10% NaCl 함유배지 상에 생육이 가능하여 중도호염균(moderate halophile)으로 밝혀

Table 2. Monosaccharide composition of the purified fucoidan of *Laminaria religiosa*.

Monosaccharide composition (%) ^a				
Fuc ^b	Xyl	Gal	Man	Uronic acid ^c
63.71	22.98	6.62	0.24	3.26

^a The composition was calculated from the area of each peak on the HPAEC-PAD chromatogram of acid hydrolysate of the purified fucoidan; the total area of all the significant peaks were set at 100%.

^b Abbreviations: Fuc, fucose; Xyl, xylose; Gal, galactose; Man, mannose. ^cUronic acid was quantified by the Carbazole assay method using α -D-galacturonic acid as a standard.

Table 3. Cell growth on minimal medium containing fucoidan as a sole carbon source.

Isolated strain	Growth ^a	Isolated strain	Growth
JK1	++++	JK 9	++
JK2	+++	JK10	+++
JK3	+++	JK11	++
JK4	++++	JK12	++
JK5	+++	JK13	++
JK6	++	JK14	++
JK7	++	JK15	++
JK8	++	JK16	++

The isolated strains were cultivated at 30°C for 2 days in the minimal medium containing 0.2%(w/v) fucoidan as a sole carbon source and the growth was measured at 600 nm as described in the text.

^aThe order of relative growth was expressed as ++ < +++ < ++++.

Table 4. Biochemical and growth characteristics of the strain JK4.

Gram staining	Positive
Shape	Cocci
Motility	+
Optimum pH	7.0 - 8.0
Growth at/in	
0% NaCl	-
0.5% NaCl	+
3% NaCl	+
10% NaCl	+
20% NaCl	-
20°C	-
25°C	+
35°C	+
40°C	-
Catalase	+
Oxidase	+
OF test	fermentation
ONPG	-

Symbols: +, positive; -, negative.

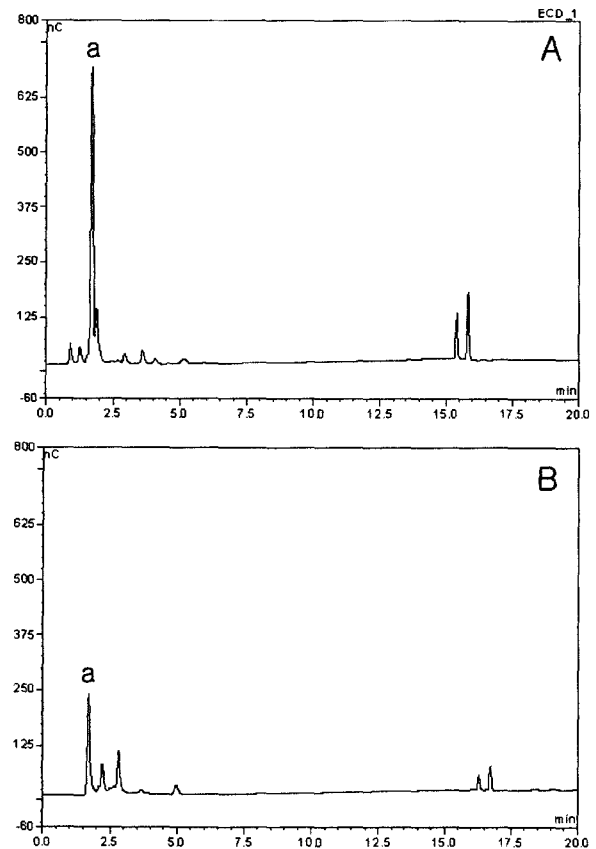


Fig. 2. HPAEC-PAD analysis for the enzymatic hydrolysis of the fucoidan. Enzymatic hydrolysis was performed at 25°C for 24 h in 50 mM phosphate buffer (pH 7.2) containing 0.4%(w/v) fucoidan. Procedures for enzyme preparation and HPAEC-PAD analysis of enzyme hydrolysates were performed as described in the text. Symbol: a, peak of fucoidan; A, fucoidan as a control; B, enzyme-treated fucoidan.

졌다(Table 4).

선별된 두 균주 중 fucoidan 분해능이 보다 우수한 JK4의 균체 파쇄액을 조효소액으로 하고 0.4%(w/v) fucoidan과 반응 후 Bio-LC로 분석한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2의 A는 정제된 fucoidan(A)와 JK4 유래 효소반응물(B)를 각각 비교분석한 결과이며, B에 나타난 fucoidan 함량(peak a)이 A에 비해 면적비로 볼 때 분해율은 63.43%으로 매우 현저히 감소됨을 알 수 있었다. 이는 본 연구에서 선별된 JK4 균주가 기존에 Sakai 등[16]이 보고한 *Fucophilus fucoidanolyticus*의 경우와 같이 intracellular type의 fucoidan 가수분해효소를 함유하고 있으며 세포 대사를 위한 탄소원으로서 fucoidan을 이용하는 것으로 사료되었다. 본 연구실에서는 현재 선별된 fucoidan 분해균의 동정, 가수분해효소의 정제 및 특성 규명 등에 대한 연구를 진행 중에 있다.

감사의 글

본 연구는 2002년 가톨릭대학교 교비 정착연구비의 지원에 의해 연구 수행된 결과이며 이에 깊이 감사드리는 바입니다.

REFERENCES

- Chevolot, L., A. Foucault, F. Chaubet, N. Kervarec, C. Sinquin, A. M. Fisher, and C. Boisson-Vidal. 1999. Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity. *Carbohydr. Res.* **319**: 154-165.
- Chizhov, A. O., A. Dell, H. R. Morris, S. M. Haslam, R. A. McDowell, A. S. Shashkov, N. E. Nifant'ev, E. A. Khatuntseva, and A. I. Usov. 1999. A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Carbohydr. Res.* **320**: 108-119.
- Furukawa, S. I., T. Fujikawa, D. Koga, and A. Ide. 1992. Production of fucoidan-degrading enzymes, fucoidanase, and fucoidan sulfatase by *Vibrio* sp. N-5. *Nippon Suisan Gakkaishi*. **58**: 1499-1503.
- Ji, J. W. 1997. Purification and sugar constituents of fucoidan from brown algae. Master's thesis. *Graduate School of Konkuk University*.
- Koo, J. G., K. S. Jo, J. R. Do, and S. J. Woo. 1995. Isolation and purification of fucoidans from *Laminaria religiosa* and *Undaria pinnatifida* in Korea. *J. Kor. Fish Soc.* **28**: 227-236.
- Koyanagi, S., N. Tanigawa, H. Nakagawa, S. Soeda, and H. Shimeno, 2003. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. *Biochem. Pharmacol.* **65**: 173-178.
- McCandless, E. L. and J. S. Craigie. 1979. Sulfated polysaccharides in red and brown algae. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **30**: 41-67.
- McClure, M. O., J. P. Moore, D. F. Blanc, P. Scotting, G. M. Cook, R. J. Keynes, J. N. Weber, Davies, D., and R. A. Weiss. 1992. Investigation into the mechanism by which sulfated polysaccharides inhibit HIV- infection in vitro. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **8**: 19-26.
- Nagumo, T. and T. Nishino. 1997. Fucan sulfates and their anticoagulant activities, pp. 545-574, In S. Dumitriu. (ed.), *Polysaccharides in Medicinal Applications, New York-Basel-Hong Kong*.
- Natalie M. T. and I. N. Henry. 2003. Enzymic degradation of fucoidan by enzymes from the hepatopancreas of abalone, *Haliotis* species, *Arch. Biochem. Biophys.* **118**: 172-177.
- Nishide, E., H. Anzai, and N. Uchida. 1987. A comparative investigation on the contents of fucose-containing polysaccharides from various Japanese brown algae. *Nippon Suisan Gakkaishi*. **53**: 1080-1083.
- Nishino, T., G. Yokoyama, K. Dobashi, M. Fujihara, and T. Nagumo. 1989. Isolation, purification, and characterization of fucose-containing sulfated polysaccharides from the brown seaweed *Ecklonia kurome* and their blood-acticoagulant activities. *Carbohydr. Res.* **186**: 119-129.
- Nishino, T., H. Kiyohara, and H. Yamada, and H. Nagumo. 1991. An anticoagulant fucoidan from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Phytochem.* **30**: 535-539.
- Patankar, S., S. Oehninger, T. Barnett, R. L. Williams, and G. F. Clark. 1993. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. *J. Biol. Chem.* **268**: 21770-21776.
- Percival, E. and R. H. McDowell. 1967. *Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides*. Academy Press Inc, London.
- Sakai, T., K. Ishizuka, K. Shimanaka, K. Ikai, and I. Kato. 2003. Structures of oligosaccharides derived from *Cladosiphon okamuranus* fucoidan by digestion with marine bacterial enzymes. *Mar. Biotechnol.* **5**: 536-544.
- Schaeffer, D. J. and V. S. Krylov. 2000. Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and Cyanobacteria. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **45**: 208-227.
- Sung, J. H. 2002. Studies on the function and utilization feasibility of fucoidan extracted from marine algae. Master's thesis. *Graduate School of KangWon University*.
- Tako, M., M. Uehara, Y. Kawashima, I. Chinen, and F. Hongo. 1996. Isolation and identification of fucoidan from Okinawamozuku, Oyo Toshitsu Kagaku. *J. Appl. Glycosci.* **43**: 143-148.
- Tatiana N. Z., M. S. Nataliya, O. C. Alexander, N. K. Tatiana, V. S. Elena, and V. I. Vladimir. 2003. Water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. Distribution, structure, and their dependence on the developmental conditions, *J. Exp. Marine Biol. Ecol.* **294**: 1-13.
- Yamamoto, I., T. Nagumo, M. Takahasi, M. Fujihara, Y. Suzuki, and I. Iizima. 1981. Antitumor effect of seaweeds III. Antitumor effect of an extract from *Sargassum Kjellmanianum*. *J. Exp. Med.*, **51**: 187-189.

(Received Nov. 1, 2004/Accepted Dec. 10, 2004)