

해조류로부터 푸코이단/알지네이트의 고순도 분리정제

김종기* · 양재호

대구가톨릭대학교 해양바이오산업연구센터

Methods for High Quality Purification of Alginate and Fucoidan from Marine Brown Algae. Kim, Jong-Ki* and Yang, Jae-Ho. *Marine Biotechnology Research, Catholic University of Daegu, Daegu, 705-718, Korea*

Abstract High quality of purified alginate and fucoidan is required for the medical uses to prevent the unexpected side effects from the contaminated endotoxin present in the materials. We attempted to establish an efficient and fast mass scale production method for the highly purified poly-G alginate from the sea weeds. In addition, lab scale method was established to obtain the fraction of higher purity from the commercially available fucoidan source (about 85% purity).

Key words : Alginate, fucoidan, purification, marine algae

서 론

미역/다시마와 같은 갈조류에 함유된 다당류는 여러 생리적 기능뿐만 아니라 분자구조적 특성 및 그의 무독성으로 인해 다양한 생리활성물질로서 많이 주목받고 있다. 대표적인 예로 alginate, fucoidan은 주로 다시마, 미역같은 갈조류에 많이 들어있는 다당류이다. 최근에는 해양 생물의 특이성에 착안하여 이들 다당류의 새로운 생리활성에 대한 연구가 행해지고 있으며, 생체내에서 항종양성, 항바이러스성, 항혈액응고, 면역력증강등의 생리기능을 가지고 신체리듬을 조절하고 면역활동을 활성화시키는 것으로 보고됨에 따라 기존의 염장, 건어물 등의 1차 식품에서 국민건강 식품으로 활용이 증가되고 있다. 특히 해조류에 많이 포함된 다당류는 생리적 기능뿐만 아니라 분자구조적 특이성으로 인하여 그의 물성을 이용하여 산업전반에 대해서 공업적, 의약용으로의 활용도가 상당히 증가하고 있으며 부작용이 거의 없는 대체 생체조직물질로서, 신기능성 소재물질로서도 주목받고 있음에도 불구하고 국내에서는 그동안 이들 해조류의 생리 활성물질 분리 및 정제에 관

한 연구가 미비하며 그나마 alginate정제에 관한 연구가 몇몇 시행되어졌을 뿐 우수한 생리활성을 가지는 것으로 알려진 fucoidan, 등의 다당류에 대한 정제 공정 및 이들 정제 다당류의 의약산업화의 적용에 관한 연구가 전무한 실정이다. 따라서 원재료는 수출하고 추출물인 다당류는 전량 역수입에 의존하고 있는 실정이다. 이에 본 연구는 국내에서는 raw material로 수출하거나 기존의 식용으로만 이용되어 온 미역/다시마에서 고도의 정제된 생리 활성을 가지는 다당류를 분리 제조하고, 의학적 용도에 맞게 가공함으로써 생물의약 산업화 적용을 통해 국가 경쟁력 확보 및 지역산업의 활성화에 기여하고자 한다.

알지네이트와 푸코이단의 개발활용은 인체에 이식하거나 정맥주사등의 인체적용에 해당하므로 면역반응에 의한 부작용이 없도록 고순도의(99% 이상, endotoxin 0.05% 이하) 다당이 필요하다. 따라서 본 연구는 실험실 스케일에서 알지네이트의 고순도 분리정제 방법을 확보하고 대량생산공정개발이나, 푸코이단의 고순도정제 및 대량생산의 공정개발 방법을 확보하고자 하였다.

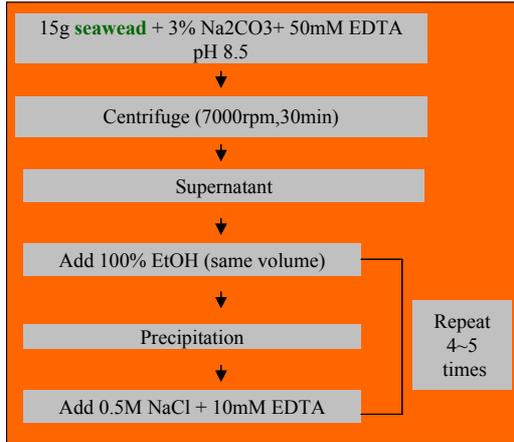
* Corresponding author

Phone: +82-53-650-4335, Fax: +82-

E-mail: jkkim@cu.ac.kr

재료 및 방법

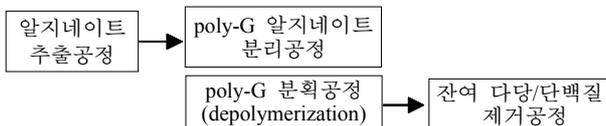
고순도 poly-G 알지네이트의 대량생산공정



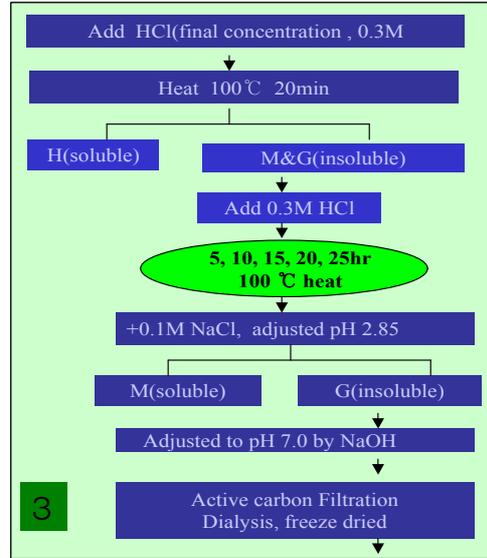
- 실험실 수준에서 위의 공정은 고순도 알지네이트를 분리하는 공정이나 대량생산에는 (100 g 이상 loading하는 경우) 적합하지 않다. 위의 공정에서 일 단 색깔을 가지고 있는 polyphenol 성분을 분리하는 공정과 다른 수용성 다당을 분리하는 공정이 혼합되어 있다. 대량생산 공정을 위하여 XAD-hydrophobic column을 사용하면 다당성분들이 adsorbing 이 안되기 때문에 polyphenol과 분리가 된다. 그러나 잔여 푸코이단을 비롯한 타 수용성 다당의 분리는 쉽지 않다.

알코올 침전법을 사용하거나 acetic acid 처리를 반복적으로 (4-5회) 수행하면 푸코이단과 분리를 할 수 있으나 시간이 너무 오래 걸리는 단점이 있으며 수율이 감소할 수 있다.

잔여 다당을 제거하는 공정을 알지네이트 정제후 하지 않고 poly-G 가공 후에 별도로 수행하면 poly-G 공정 수행중에 잔여 타다당이 감소되므로 훨씬 더 반복제거공정을 줄일 수 있다고 판단되어 다음과 같은 순서로 공정을 기획/수행하였다.



poly-G 알지네이트 공정은 전통적인 weak acid-hydrolysis(Hauger) 법으로 다음과 같이 수행하였다.



푸코이단의 분별

푸코이단 분별을 위해서 해조류 분말에 물을 첨가하여 교반 시킨 후 원심분리하여 상등액을 취한다. 여기에 0.5M CaCl₂ 처리 후 원심분리 한 상등액에 1M CaCl₂를 첨가하여 13시간동안 실온에서 교반 후 원심분리한 후 상등액에 95% Ethanol 3 vol. 또는 Aceton을 첨가하여 7시간 4°C에서 정치시킨 후 원심분리하여 침전물을 분리하여 건조시킨다. CPC 처리는 1M CaCl₂를 처리한 sample에 5% CPC를 첨가하여 24시간 실온에서 정치시킨 후 침전물을 2M NaCl : Ethanol (100 : 15, V/V) 용액 15 ml 첨가하여 4°C에서 24시간 반응시킨다. 원심분리하여 침전물을 얻은 후 95% Ethanol 3 vol., Aceton에 녹인 후 7시간 4°C에서 정치시켜 침전물을 원심분리(9,000 g, 30분, 4°C)하여 상등액을 얻어 filtering 시킨 후 물에서 3일간 실온에서 투석시킨 후 동결 건조하여 사용하였다.

푸코이단 정제를 위한 Ion exchange chromatography

이온교환수지로는 DEAE-Cellulose Column XK26 (2.5×25cm, Pharmacia)을 사용하였으며 50mM Sodium acetate (pH 5.0)로 평형화 시켰다. 알긴을 제거한 sample 또는 원액 (100 mg/ 3ml의 0.05 mM sodium acetate, pH 5.0) 1ml을 column에 주입한 후 400ml의 50 mM sodium acetate 용액으로 흘린 후 6시간 동안 5M NaCl solution을 linear gradient를 주어

용출시켰다. 이때 사용한 flow rate는 0.5ml/ml이며 fraction volume은 5ml였고 검출은 206nm를 사용하였다.

푸코이단 정제과정 중의 Rechromatography

Ion exchange chromatography를 통해서 얻은 20-40번 fraction (running time 3시간 30분부터 6시간 30분)을 모아서 물에서 투석을 24시간 시킨 후 동결건조하였다. 건조된 분말을 0.05mM sodium acetate buffer (pH 5.0) 1ml에 녹인 후 membrane filter를 통과시켜 column에 주입하였다. Elution은 first ion exchange chromatography의 방법과 동일하였다.

결 과

고순도 poly-G 알지네이트의 대량생산공정

본 연구에서 사용한 방법은 산분해시간을 다양하게 연장하여 생성되는 poly-G의 fragmentation/분자량을 다양하게 만들기 위한 depolymerization가공(DP가공)이 포함되어 있다. 본 연구에서는 이러한 poly-G의 분자량(molecular weight 즉, Degree of Polymerization)를 조정하기 위해 두 가지 다른 방법을 사용하여 비교하고자 하였다. 액상상태에서 위와 같이 산분해를 하거나 (Table 1.) gel을 만든 후 진공냉동건조 후 열을 가하여 분해하는 고체열분해법을 사용하여 생성된 poly-G fraction의 점성도를 측정 비교하였다. (Table 2.)

반응 시간을 길게하여 6일간 점도를 비교한 결과 하루가 지난 후부터는 거의 일정한 점도를 보여주고 있었다. (Fig. 1.)

고순도 푸코이단 분획 대량생산공정 개발

이온교환크로마토그래피 분획공정

현재 대부분의 푸코이단 fractionation은 anion exchange chromatography법을 사용하나 실질적으로 monitoring은 일일이 시간별로 fraction을 받아 phenol-황산법 반응에 따라 UV-490nm측정을 하여야 한다. 본 연구에서도 Ethanol, Aceton, CPC 분획물을 ion exchange chromatography로 정제한 결과 490nm에서는 20-40번 fraction에서 peak가 보였다. (Fig. 2)

Table 1. 액상산분해법을 이용한 poly-G 분획의 점성도 (단위 cP)

	1% wt	2%	3%	4%	5%	6%	7%	8%	9%	10%
5hour	1.77	1.74	2.28	2.40	2.82	2.94	3.33	3.51	4.14	4.26
10 h										
15 h	1.53		1.77		2.22		2.58			
20 h										
25 h	1.32		1.54		1.98		2.55			
40 h										

Table 2. 고체열분해법을 이용한 poly-G 분획의 점성도 (단위 cP)

day		0	1	2	3	4	5	6
80℃	LVG (1%)	51.6	12.2	11.7	8.7	7.5	6.7	6.8
	SA (1%)	531.2	19.6	18.7	10.8	8.4	7.8	6.4
hour		0	1	2	3	4	5	6
120℃	LVG (1%)	51.6	10.5	7.5	5.2	5.0	4.6	4.4
	SA (1%)	1500	35.2	19.7	13.6	10.6	9.3	8.0

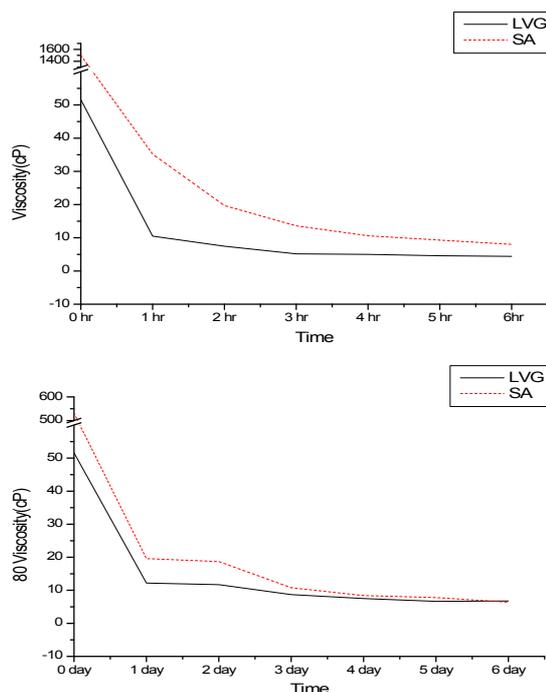


Fig. 1. Change of viscosity

분리공정화 하려면 바로 UV흡수 검출을 하던가 다른 검출법으로서 확인하는 방법이 필요하다.

미역포자엽으로부터 푸코이단 추출

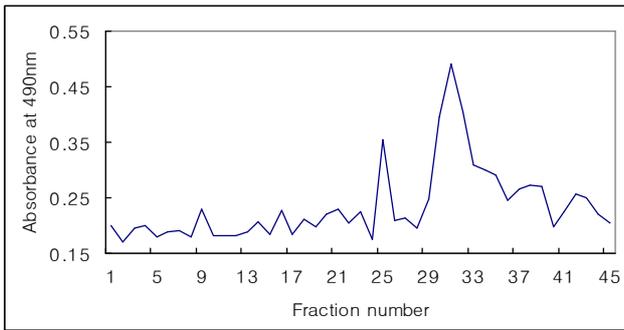


Fig. 2. Detection at 490 nm

푸코이단은 thrombin의 활성을 억제하여 항혈액 응고특성을 갖는다고 잘 알려져 있으나 이의 임상적 활용과 의료용재료산업화를 위해서는 99.9%이상의 순도와 가공을 통한 혈소판응집 부작용을 극복해야 한다. 더불어 산업화를 위한 단순화된 대량생산공정의 개발이 동반해야 된다.

즉 UV-206nm에서 monitoring하면 LC profile은 위 그림 A와 같이 fraction이 구별이 되지 않는다. (Fig. 3.) 이의 한 가지 원인으로 다른 수용성다당이나 단백질의 혼합일 가능성에 따라 다음과 같이 재분리 과정을 거친 다음 re-chromatography를 수행하여 새로운 분획의 존재를 확인하였다. F3가 두 분획으로 나누어진다.

또 다른 이유로 검출 파장이 206 nm부근은 이온들의 흡수 파장이 있을 있으므로 226nm에서 검출하면 보다 선명한 peak profile을 볼 수 있어, 분획이 resolving되지는 않으나 먼저 다당체가 분리되어 나오는 fraction을 정확히 찾을 수 있다. (Fig. 4.) 따라서 먼저 fraction을 이온크로마토그래피법으로 분리한 다음 re-chromatography하는 공정을 사용하였다.

폐놀황산법하고 나서 fraction모아서 3개 type으로 나누어 양과 구성성분을 분석하였다. (Table 3.)

푸코이단 추출을 위한 3개 type은 Ethanol, 40% Acetate, 5% CPC 침전물이며 이를 rechromatography 법으로 다시 정제하였다. Rechromatography를 행하여 각각의 peak를 얻었으며 F3에서는 I, II의 큰 peak를 나타내는 fraction을 얻을 수 있었다. (Fig. 5.)

고찰

뇌혈관질환(동맥류)에 대한 코일혈관색전술은 수술적 절개를 대신하는 기술로서 이용되기 시작했으

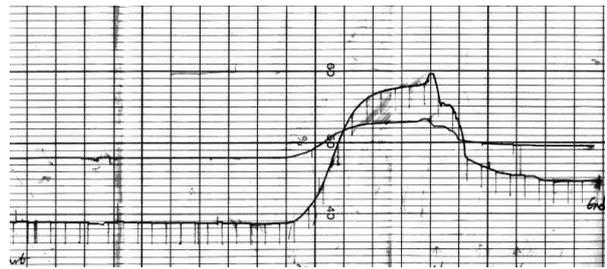


Fig. 3. Detection at 206 nm

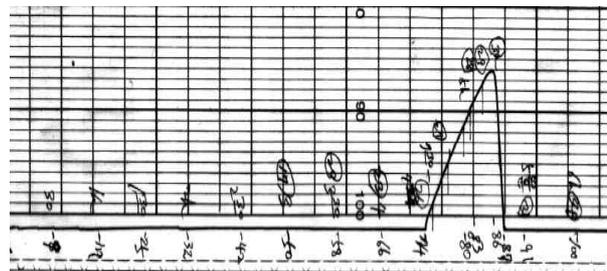


Fig. 4. Detection at 226 nm

Table 3. 분획 peak의 구성성분

	yield	sulfate	protein	Uronic acid	Fuc	Xyl	Man	Gal	Glu	APTT sec
F1	4.4	19.1	11.7	37.8	74.8	12.2	3.2	2.6	7.2	220
F2	19.4	36.1	5.9	12.4	56.7	10.8	3.3	38.6	7.0	310
F3	76.2	42.6	3.4	10.7	31.8	-	1.8	57.9	2.2	520

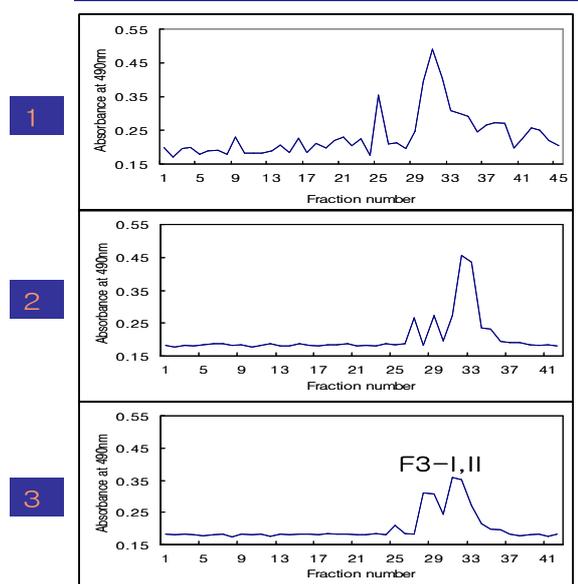


Fig. 5. Rechromatography after elution with ion chromatography

나, packing율이 낮아 재발하거나, 경부가 큰 경우에 적용이 불가능하다. 미세카테타 delivery device 기술은 일반적 혈관색전술의 적용범위를 크게 넓리면서 현재 AVM과 뇌동맥류에 사용되는 사용되는 cyanoacrylate, polycellulose acetate 등이 생체적합성이 떨어져서 glue가 혈관벽에 부착되면서 출혈을 유발하거나 혈관내 주입의 조정의 어려움, glue가 쉽게 경화되어 미세카테타의 혈관벽흡착을 유도하는 등의 부작용이 있어 새로운 색전소재개발이 시급한 실정이다.

현재 헤파린은 혈전용해제나 혈액응고방지제로 가장 널리 사용되는 황화성 다당류이다. 헤파린은 항응고효소인 antithrombin을 활성화함으로써 항혈전작용을 유도하며 pentasaccharide가 antithrombin에 친화성을 가지고 있다. 그러나 사용범위가 넓어서 저분자량 헤파린의 경우 출혈을 유도하거나 헤파린-반응성 immunoglobulin에 의해 혈소판의 방출과 응집의 부작용을 초래하기도 한다. 더구나 체외혈액순환시에는 반감기가 짧은 혈액응고방지제가 필요하고 정맥 혈전색전증에서는 오랫동안 지속되는 용해제제가 필요하므로 헤파린 단일 제제로는 이러한 다양한 임상적 조건에 부합할 수가 없으므로 새로운 형태의 혈전용해제 및 혈액응고제가 필요하다.

혈관내 색전술은 소재의 발달로 수술에 비해 선호도가 계속 증가될 것이며 색전술은 단순히 동맥류의 차단만이 목적이 아니라 조직공학적 치유방법과 접목하여 동맥류 경부에서 새로운 혈관상피세포가 자라도록 함으로써 동맥류가 떨어져나가도록 하는 궁극적인 healing단계로의 발전이 기대된다.

분자량, 당배열 분리조정에 사용하는 HPLC는 semiprep scale이므로 산업화를 위해서는 단가경쟁성이 있는 경제적 대량생산이 필요하며 수율을 높히면서 (목표 20%) 분리법을 prep scale의 gel chromatography의 공정 개발이 필요할 것이다.

따라서 본 연구결과는 해조류성분의 고순도 분리 기술을 향상시켜 해조류 다당류의 의료용 소재로서의 활용가능성 및 시장성을 향상시키는 데 기여할 것이다.

감사의 글

이 연구는 대구가톨릭대학교 해양바이오연구센

터 (RIC) 지원에 의해 이루어 졌습니다.

참 고 문 헌

1. Alekseyenko. T. V., Zhanayeva. S. Y., Venediktova. A. A., Zvyagintseva. T. N., Kuznetsova. T. A., Besednova. N. N. and Korolenko. T. A. 2007. Antitumor and antimetastatic activity of fucoidan, a sulfated polysaccharide isolated from the Okhotsk Sea *Fucus evanescens* brown alga. *Bull. Exp. Biol. Med.* **143**, 730-732.
2. Charrier. B., Coelho. S. M., Le. Bail. A., Tonon. T., Michel. G., Potin. P., Kloareg. B., Boyen. C., Peters. A. F. and Cock. J. M. 2008. Development and physiology of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*: two centuries of research. *New Phytol.* **177**, 319-332.
3. Doh-Ura. K., Kuge. T., Uomoto. M., Nishizawa. K., Kawasaki. Y. and Iha. M. 2007. Prophylactic effect of dietary seaweed Fucoidan against enteral prion infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 2274-2277.
4. Gan. L., Xin. X. L., Li. J., Liu. H. Y., Zhang. Z. Q., Qian. J., Ding. J. and Geng. M. Y. 2005. Characterization of conformational epitope of alginate-derived polymannuronates by surface plasmon resonance. *Biochimie.* **87**, 959-966.
5. Hayashi. K., Nakano. T., Hashimoto. M., Kanekiyo. K. and Hayashi. T. 2008. Defensive effects of a fucoidan from brown alga *Undaria pinnatifida* against herpes simplex virus infection. *Int. Immunopharmacol.* **8**, 109-116.
6. Jain. S., Roy. I. and Gupta. M. N. 2004. A smart bioconjugate of trypsin with alginate. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* **32**, 325-337.
7. Koivikko. R., Lojonen. J., Pihlaja. K. and Jormalainen. V. 2007. High-performance liquid chromatographic analysis of phlorotannins from the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Phytochem. Anal.* **18**, 326-332.
8. Makoto. Iwashima. M., Tako. N., Hayakawa. T., Matsunaga. T., Mori. J. and Saito. H. 2008. New chromane derivatives isolated from the brown alga, *Sargassum micracanthum*. *Chem. Pharm. Bull.* **56**, 124-128.
9. Philchenkov. A., Zavelevich. M., Imbs. T., Zvyagintseva. T. and Zaporozhets. T. 2007. Sensitization of human malignant lymphoid cells to etoposide by fucoidan, a brown seaweed polysaccharide. *Exp. Oncol.* **29**, 181-185.
10. Shi. L., Harms. H. and Wick. L. Y. 2008. Electroosmotic flow stimulates the release of alginate-bound phenanthrene. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 2105-2110
11. Veena. C. K., Josephine. A., Preetha. S. P., Varalakshmi. P. and Sundarapandiyam. R. 2006. Renal peroxidative changes mediated by oxalate: the protective role of fucoidan. *Life Sci.* **79**, 1789-1795.