

방사무늬김(*Porphyra yezoensis*)에서 추출한 Porphyrin 효소 분해물의 화학적 결합 특성

박진희 · 구재근*

군산대학교 식품생명공학과

Structural Features of Enzymatic Hydrolysate of Porphyrin Isolated from *Porphyra yezoensis*

Jin-Hee Park and Jae-Geun Koo*

Department of Food Science and Biotechnology, Kunsan National University, Kunsan 573-701, Korea

Enzymatic hydrolysate of porphyrin from *Porphyra yezoensis* was prepared by treatment with β -agarase. The hydrolysate was fractionated into molecular sizes of <3, 3-30, and 30-300 kDa using an ultrafiltration membrane. The membrane fractions were further separated into neutral and anionic fractions using Dowex 1 \times 8 ion exchange chromatography. After hydrolysis of porphyrin with β -agarase, 23.2% of the starting porphyrin was recovered as a neutral fraction of low-molecular weight (<3 kDa), and 28.9% remained as an enzyme-resistant anionic fraction of high molecular weight (>300 kDa). Desulfation of porphyrin and ^{13}C -NMR analysis of the anionic fraction of low molecular weight (<3 kDa) showed that the anionic fraction has a backbone consisting of 3-linked β -D-galactose units alternating with either 4-linked α -L-galactose 6-sulfate or 3, 6-anhydro- α -L-galactose units. These results indicate that porphyrin is a copolymer of two moieties, about 25% of which are composed of neogaroise moieties and 75% as anionic moieties.

Key words: *Porphyra yezoensis*, Porphyrin, β -Agarase, Structure, ^{13}C -NMR

서 론

수용성 다당인 porphyrin은 *Porphyra*속에서 함유되어 있는 황산기를 함유한 산성 다당의 총칭으로 3,6-anhydro-L-galactose, D-galactose, 6-O-methyl-D-galactose, ester sulfate로 구성되어 있다(Anderson et al., 1965). Sulfate와 methoxy기를 함유하는 점을 제외하고는 agarose와 동일한 구조를 가지고 있어 L-galactose unit가 sulfate로, D-galactose unit가 methyl기로 치환된 agarose라고 할 수 있다. 반면에 홍조류인 *Eucheuma*에서 추출되어 식품첨가물로 사용되고 있는 카라기난의 구성성분은 3,6-anhydro-D-galactose, D-galactose, ester sulfate로 porphyrin과 구성성분 뿐 아니라, 구성 성분의 결합 방식도 차이가 난다(Morrice et al., 1983). 현재까지 보고된 porphyrin의 결합구조는 6-methyl D-galactose나 D-galactose가 L-galactose, 3,6-anhydro-L-galactose, 혹은 L-galactose-6-sulfate와 서로 교대로 α (1 \rightarrow 3), β (1 \rightarrow 4) 결합된 직쇄 구조를 가진 것으로 알려져 있다(Gretz et al., 1983). 그러나 porphyrin의 구성성분과 결합구조는 해조 품종, 채취시기, 생육조건에 따라 달라질 뿐 아니라 주요 구성 성분인 L-galactose-6-sulfate가 porphyrin내 균일하게 분포하는지 혹은 불균일하게 분포하는지 밝혀지지 않고 있다(Morrice et al., 1984).

Porphyrin은 항종양 활성(Noda et al., 1989; Kown and Nam, 2007), 항고지혈 활성(Jung et al., 2001; Lee et al., 2010) 등의 생리 활성이 보고되고 있어 기능성 식이섬유로서의 이용 가능성이 높다. 그러나 황산기를 함유한 산성 다당의 생리 기능성은 일반적으로 구조 및 분자량에 따라 달라진다(Teruya et al., 2007). 따라서 국내산 김에서 추출한 porphyrin을 이용한 새로운 기능성 식품소재 개발을 위해서는 정제 porphyrin의 결합 구조에 관한 조사가 우선 필요하다.

본 연구는 국내에서 대량 양식되고 있는 방사무늬김(*Porphyra yezoensis*)에서 추출한 porphyrin의 결합 구조를 밝히기 위해 정제 porphyrin을 β -agarase로 가수분해한 후 환외여과막으로 분자량 별로 분획하였다. 분자량 별 분획물을 다시 이온교환 수지 칼럼으로 중성과 극성으로 나누어 수율, 구성당 조성 및 ^{13}C -NMR 측정을 하여 porphyrin의 결합 구조를 조사하였다.

재료 및 방법

재 료

실험에 사용한 정제 porphyrin은 Park and Koo (2008) 방법에 따라 제조하였다. 즉, 경기도 화성군 장안면에서 3월 중순 경에 채취하여 건조한 방사무늬김(*P. yezoensis*)의 열수 추출액에 에탄올을 첨가하여 crude porphyrin을 제조한 후 cetylpyri-

*Corresponding author: kseaweed@kunsan.ac.kr

Table 1. Yield and chemical composition of fractions obtained after β -agarase hydrolysis and ion exchange chromatography of porphyran

| Fractions ¹⁾ | Yield (%) | Sulfate (%) | Mole ratio | | |
|-------------------------|-----------|-------------|------------|--------------------|-----------------------|
| | | | Galactose | 6-Methyl galactose | 3,6-Anhydro galactose |
| Neutral fractions | | | | | |
| N-3,000 | 23.2 | tra | 1.00 | 0.04 | 1.04 |
| N-30,000 | 3.4 | | | | |
| N-300,000 | 1.2 | | | | |
| Anionic fractions | | | | | |
| A-3,000 | 4.0 | 12.0 | 1.00 | 0.03 | 0.76 |
| A-30,000 | 5.0 | | | | |
| A-300,000 | 6.5 | | | | |

¹⁾Fractionated by ultrafiltration and ion-exchange chromatography.

Table 2. Yield and chemical composition of porphyran and desulfated porphyran

| Sample | Yield (%) | Sulfate (%) | Mole ratio | | |
|----------------------|-----------|-------------|------------|--------------------|-----------------------|
| | | | Galactose | 6-Methyl galactose | 3,6-Anhydro galactose |
| Porphyran | 100.0 | 13.4 | 1.00 | 0.07 | 0.32 |
| Desulfated porphyran | 73.0 | 0.1 | 1.00 | 0.03 | 1.04 |

dinium chloride와 61-70% 에탄올을 사용하여 정제하였다. 정제 porphyran의 galactose, 3,6-anhydrogalactose, 6-methyl galactose, sulfate의 mole 비는 1.00 : 0.32 : 0.07 : 0.53 이며, 분자량은 550 KDa이다.

방 법

효소 가수분해 및 분획

정제 porphyran을 효소 가수분해한 후 극성 및 분자량에 따라 분리하였다(Morrice et al., 1983). 즉, 정제 porphyran 2 g을 0.01 M sodium phosphate buffer (pH 6.5) 100 mL에 녹인 후 β -agarase (Sigma Co.) 200 U를 가하여 실온에서 24시간 효소 분해한 후 원심분리(4,000 g, 15분)하였다. 상층액을 molecular weight cut-off이 3,000, 30,000, 300,000인 한외여과막(DIA-FLO ultrafiltration membrane, Amicon Division)을 사용하여 분자량 별로 분리한 후 각 분자량 분획물을 Dowex 1 \times 8 이온교환수지 칼럼(200 mesh, 2.0 \times 70 cm)에 주입하고 증류수로 중성 분획물을 용출한 후 2 N NaCl용액으로 극성 분획물을 용출하였다. 용출된 분획물을 다시 감압 농축한 후 Bio gel P-2 칼럼 (200 mesh, 1.0 \times 100 cm)으로 탈염한 후 동결 건조하여 분자량이 3,000이하인 중성(N-3,000)과 극성(A-3,000) 분획물, 분자량이 3,000-30,000인 중성(N-30,000)과 극성(A-30,000) 분획물, 분

Table 3. Chemical shift assignments for ¹³C-NMR spectra of neoagarose and A-3,000 fraction

| Assignment | Chemical shift (ppm) | |
|------------------------------|----------------------|---------|
| | neoagarohexose | Charged |
| C-1 of G | | 103.97 |
| C-1 of G | | 103.76 |
| C-1 of Gnr, G | 102.69 | 102.70 |
| C-1 of 6-S-G | | 101.82 |
| C-1 of 6-S-G | | 101.63 |
| C-1 of Ar, A | 98.77 | 98.79 |
| C-1 of Anr | 98.57 | 98.59 |
| C-1 of G _b | 97.07 | 97.09 |
| C-1 of G _a | 93.07 | 93.09 |
| C-3 of G _b | 82.95 | 82.96 |
| C-3 of G | 82.50 | 82.51 |
| C-3 of Gnr | 82.43 | 82.49 |
| C-3 of Anr | 81.30 | 81.32 |
| C-3 of Ar, A | 80.37 | 80.39 |
| C-3 of Ga | 79.75 | 79.77 |
| C-5 of Anr | | 77.73 |
| C-4 of Ar, A | 77.72 | 77.61 |
| C-5 of Ar, A | 75.86 | 75.87 |
| C-5 of Gnr, G | 75.74 | 75.75 |
| C-5 of G _B | 75.54 | 75.58 |
| C-5 of G _B | 71.81 | 71.83 |
| C-5 of Ga | 70.95 | 70.98 |
| C-2 of Gnr | 70.56 | 70.55 |
| C-2 of G | 70.53 | 70.47 |
| C-4 of Anr | 70.38 | 70.40 |
| C-2 of Ar, A | 70.06 | 70.09 |
| C-2 of Gnr | 69.96 | 69.97 |
| C-6 of Ga | 69.81 | 68.81 |
| C-6 of Ar, A | 69.70 | 69.70 |
| C-6 of Anr | 69.42 | 69.33 |
| C-4 of G _B | 69.17 | 69.19 |
| C-4 of Gnr, G | 69.06 | 69.08 |
| C-2 of Ga | 68.32 | 68.33 |
| C-6 of Ga | | 61.95 |
| C-6 of G _B ,Gnr,G | | 61.75 |

¹⁾G : 3-O-linked β -D-galactopyranose of internal repeating unit, A : 4-O-linked 3,6-anhydro- α -L-galactopyranose of internal repeating unit, r ; reducing end of the repeating unit, nr : nonreducing end of the repeating unit, Ga, G_B : anomers of D-galactopyranose at the reducing end of repeating unit, 6-S-G : 6-O-sulfate- α -L-galactopyranose

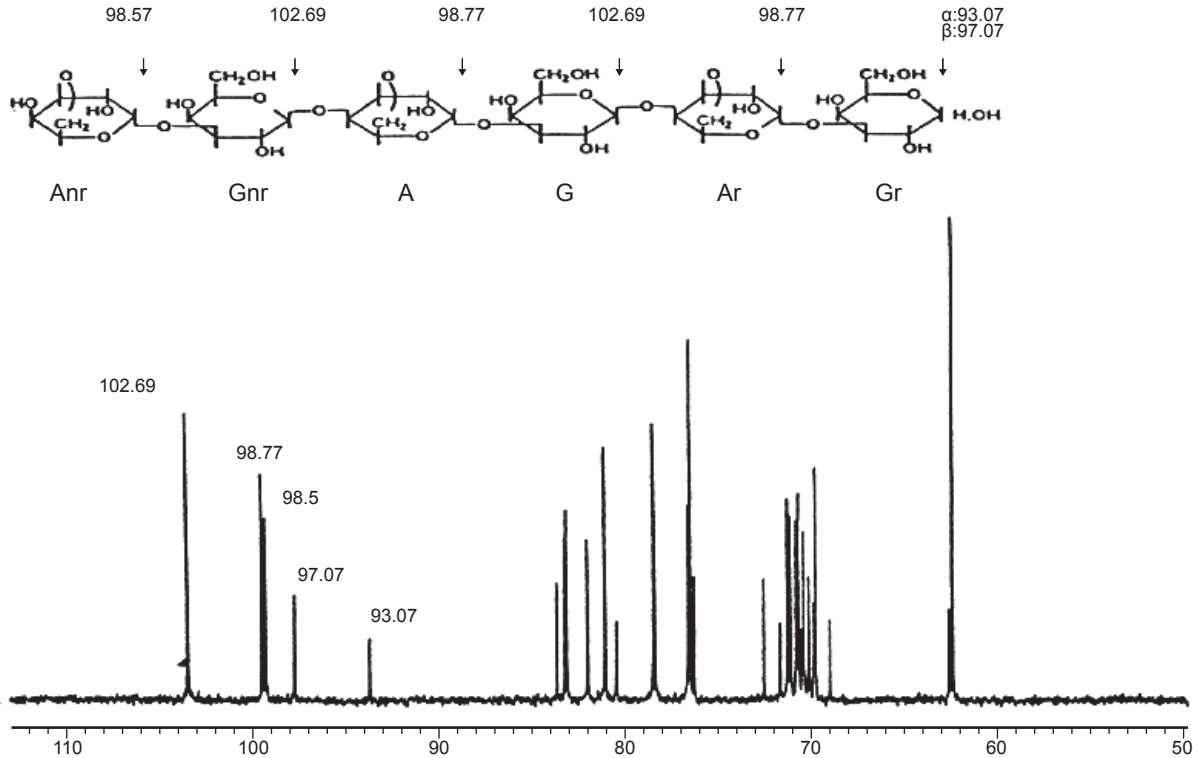


Fig. 1. ¹³C-NMR spectrum of neogarahexose.

자량이 30,000-300,000인 중성(N-300,000)과 극성(A-300,000) 분획물을 제조하였다.

화학적 조성 분석

황산기의 함량은 Dodgson et al. (1962)의 방법에 따라 분석하였다. 구성당 조성은 Furneaux et al. (1990)의 방법에 따라 acetylation한 후 SP-2330 칼럼(0.25 mm I.D. × 30 m)으로 230℃에서 gas chromatography (HP 6890)로 분석하였다.

알칼리 처리에 의한 황산기 제거

정제 porphyran을 Rees et al. (1961)의 방법에 따라 알칼리 처리하여 황산기를 제거하였다. 즉, 정제 porphyran 1 g을 200 mL의 증류수에 녹인 후 원심분리(5000 g, 15분)하여 분리한 상층액에 NaBH₄ 200 mg을 가하여 30℃에서 24시간 환원시켰다. 다시 NaOH 10 g과 NaBH₄ 2 g을 첨가하여 용해시키고 80℃ 온수에 넣어 4시간 동안 가열하였다. 묽은 염산으로 중화하고 48시간 증류수로 투석한 후 동결 건조하여 황산기가 제거된 porphyran (desulfated porphyran)을 제조한 후 화학적 조성을 분석하였다.

¹³C-NMR의 측정

효소 분해하여 얻은 분자량 3,000이하의 N-3,000과 A-3,000을 각각 D₂O에 녹여 ¹³C-NMR (125 MHz, Bruker사, AMX500)을 이용하여 실온에서 측정하였다. 핵자기 공명 흡수

위치(Cheical shift)는 DMSO를 시료에 첨가하여 측정한 후 TMS (Tetramethylsilane)로 환산하여 나타내었다.

결과 및 고찰

효소 가수분해에 의한 분획

Porphyran의 구조 특성을 조사하기 위해 정제 porphyran을 β-agarase로 가수분해한 후 ultrafiltration membrane과 이온 교환 수지 칼럼으로 분획하여 각 분획물의 수율과 화학적 조성을 측정하였다(Table 1). 효소 가수분해된 분자량 300,000이하의 porphyran의 총 수율은 43.3%이고, 효소 활성 저항성을 나타내는 300,000이상 고분자 분획물은 28.9%였다. 분자량에 따른 수율은 중성 분획물인 N-3,000이 23.2%, N-30,000이 3.4%, N-300,000이 1.2%로 분획물의 분자량이 클수록 수율이 떨어졌다. 반면에 극성 분획물은 A-3,000이 4.0%, A-30,000이 5.0%, A-300,000이 6.5%로 분자량이 클수록 수율이 높았다. 또한 전체 중성 분획물의 수율이 극성 분획물의 수율에 비해 높았고 특히 중성 분획물 중 N-3,000의 수율이 23.2%로 현저히 높았다. 이는 극성 분획물에는 황산기가 함유되어 있어 β-agarase의 활성이 저해되어 가수분해도가 떨어지기 때문으로 생각된다. *P. umbilicalis*에서 추출한 porphyran도 β-agarase로 가수분해하여 분획한 결과 중성 분획물이 19%, 음이온 분획물이 3.3%로 분

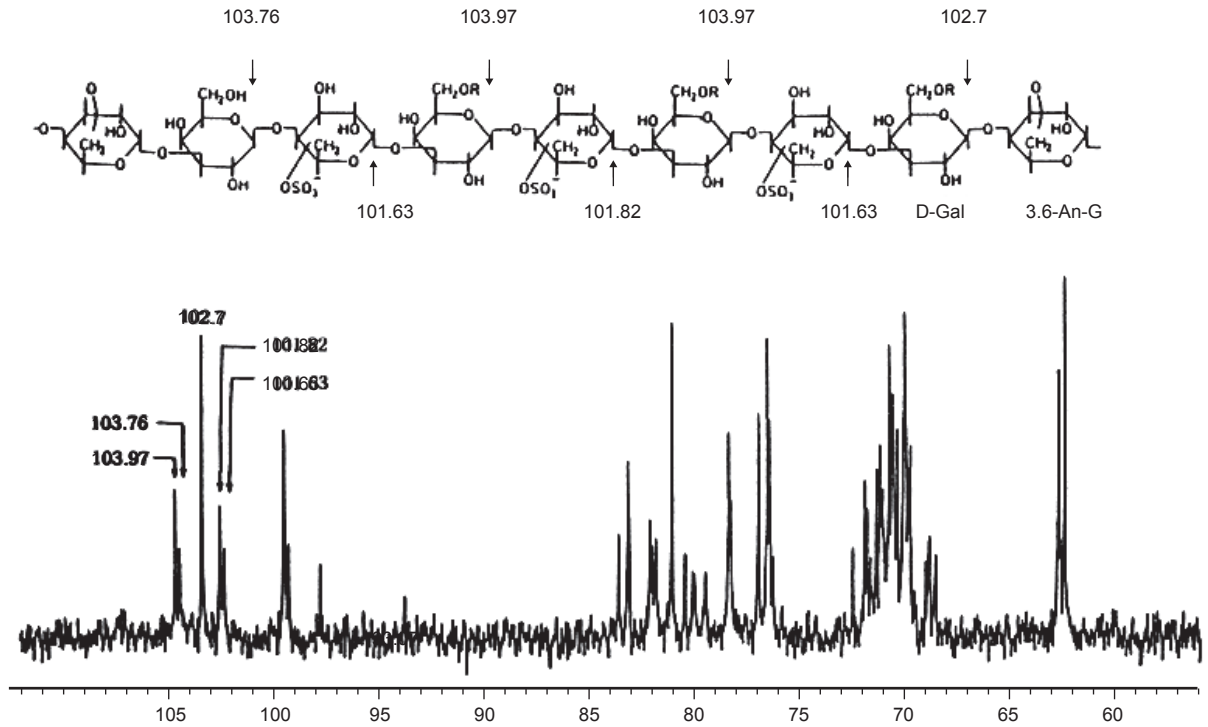


Fig. 2. ¹³C-NMR spectrum of A-3,000 fraction.

실험 결과와 유사하게 중성 분획물이 극성 분획물 보다 높았다 (Morrice et al., 1983).

황산기 함량은 중성 분획물에는 검출되지 않았으나 산성 분획물에서는 A-3,000이 12.0%, A-30,000 17.0%, A-300,000 9.8%로 분획물에 따라 함량의 차이가 많았다. 중성 분획물인 N-3,000의 구성당 조성은 galactose와 3,6-anhydrogalactose의 mole 비가 약 1 : 1로 neoagarobiose와 조성이 유사함을 알 수 있다. 반면에 극성 분획물인 A-3,000의 galactose : 3,6-anhydro-galactose의 mole비는 1 : 0.76으로 3,6-anhydro-galactose의 비율이 중성 분획물에 비하여 적었으나 원시료인 정제 porphyran에 비하여는 높았다. 이상의 porphyran의 효소 분획물의 수율과 화학 조성 결과로 미루어 볼 때 porphyran은 황산기를 함유한 산성 다당 block과 황산기를 함유하지 않은 neoagarose block으로 이루어져 있으며 전체 porphyran에서 중성 block인 neoagarose block이 약 25% 정도이나 neoagarose의 중합도를 측정하기 위해서는 추가 연구가 필요하다고 판단된다.

알칼리 처리에 의한 황산기 결합 위치 측정

알칼리 처리하여 제조한 desulfated porphyran의 수율 및 화학조성은 Table 2와 같다. Desulfated porphyran의 수율은 73.3%이고, 황산기 함량은 13.4%에서 0.1%로 대부분의 황산기가 제거되었다. 또한 구성당인 galactose와 3,6-anhydro-galactose의 mole 비는 1 : 0.32에서 1 : 1.04로 알칼리 처리에 따라 3,6-anhydro-galactose가 증가되었다. 다당에 결합되어 있

는 황산기는 결합 위치에 따라 알칼리 처리시 안정성이 달라지는 데 황산기가 결합된 이웃 위치의 hydroxyl group이 sulfate와 trans 구조이거나 혹은 황산기가 C-6에 결합되었을 때는 쉽게 제거된다(Percival and McDowell, 1967). 또한 porphyran 황산기의 86%는 3,6-anhydrogalactose의 전구물질인 6-sulfate galactose로 존재하며 알칼리 처리를 하여 황산기를 제거하면 3,6-anhydro-galactose가 생성된다고 알려져 있다(Rees, 1961). 따라서 본 실험에서 제조한 porphyran도 알칼리 처리시 황산기가 감소하고 3,6-anhydro-galactose가 증가됨을 미루어 볼 때 황산기의 대부분이 C-6에 결합되어 있을 것으로 추정할 수 있다. Desulfated porphyran의 galactose, 3,6-anhydro-galactose, 6-methylgalactose의 mole 비가 1.00 : 1.04 : 0.03로 agarose와 유사한 조성을 나타내었다.

¹³C-NMR측정

Porphyran의 결합 특성을 조사하기 위해 β-agarase로 가수분해한 후 ultrafiltration membrane과 이온교환 수지 칼럼으로 분획한 A-3,000 분획물의 ¹³C-NMR을 측정하였다. 구성당의 hydroxyl가 glycosylation될 경우 가장 가까이에 있는 탄소의 peak가 downfield로 shift (α-effect)되며 이 주위에 있는 탄소는 upfield로 shift (β-effect)된다. 그러나 다당은 동일한 구성성분이라도 결합 양식 및 주위에 결합된 구성당에 따라 chemical shift값이 달라진다. 따라서 본 실험에서는 기준 물질로 neoagarohexose (Sigma co.)를 이용하여 구성당의 peak를 assignment한 후

이를 이용하여 A-3,000의 signal을 assignment하였다(Lahaye et al, 1989). Fig. 1은 neoagarohexose의 ^{13}C -NMR spectrum을 나타낸 것으로 42개의 peak가 검출되었다. Fig. 2는 분자량 3,000이하의 산성 분획물인 A-3,000의 ^{13}C -NMR 스펙트럼으로 각각의 peak의 assignment는 Table 3과 같다. 102.70 ppm은 3,6-anhydro-L-galactose와(1→3) 결합한 β -D-galactose의 C-1 탄소에 해당된다. 103.97 ppm은 a-L-galactopyranose 6-sulfate가 양쪽에 결합되어 있는 β -D-galactose의 C-1 탄소에 해당되며, 103.76 ppm은 3,6-anhydro-L-galactose와 6-O-sulfate-a-L-galactopyranose가 양쪽에 결합되어 있는 β -D-galactose의 C-1 탄소에 해당된다. 6-O-sulfate-a-L-galactopyranose의 C-1 탄소의 signal은 양쪽에서 sulfate가 있는 경우와 한쪽에 sulfate가 있는가에 따라 101.82 ppm과 101.63 ppm을 나타낸다. 따라서 방사무늬김에서 분리한 porphyran의 효소가수분해물인 A-3,000의 결합 골격은 β -D-galactose에 4-linked 3,6-anhydro-L-galactose와 6-O-sulfate-a-L-galactopyranose가 결합된 전형적인 porphyran의 구조임을 알 수 있다.

참고문헌

- Anderson NS, Dolan TCS and Rees DA. 1965. Evidence for a common structure pattern in the polysaccharide sulphates of the Rhodophyce. *Nature* 13, 1060-1062.
- Dodgson KS and Price RG. 1962. A note on the determination of the ester sulfate content of sulphated polysaccharides. *Biochem J* 84, 106-110.
- Furneux RH, Miller IJ and Stevenson TT. 1990. Agaroids from New Zealand members of the *Gracilariaceae* (*Gracilariales*, *Rhodophyta*) a novel dimethylated agar. *Hydrobiologia* 204/205, 645-654.
- Gretz MR, McCandless EL, Aronson JM and Sommerfeld MR. 1983. The galactan sulphates of the conchocelis phases of *Porphyra leucostricta* and *Bangia atropurpurea*(*Rhodophyta*). *J. Experimental Botany* 34, 705-711.
- Jung KJ, Jung BM and Kim SB. 2001. Effect of porphyran isolated from laver, *Porphyra yezoensis*, lipid metabolism in hyperlipidemic and hypercholesterolemic rats. *J Food Sci Technol* 33, 633-640.
- Kwon MJ and Nam, TJ. 2006. Porphyran induces apoptosis related signal pathway in AGS gastric cancer cell lines. *Life Science* 79, 1956-1962.
- Lahaye M and Yaphe W. 1989. ^{13}C -NMR spectroscopic investigation of methylated and charged agarose oligosaccharides and polysaccharides. *Carbohydrate Res* 190, 249-265.
- Lee JS, Lee MH and Koo JG. 2010. Effects of porphyran and insoluble dietary fiber isolated from laver, *Porphyra yezoensis*, on lipid metabolism in rats fed high fat diet. *Korean J Food Nutr* 23, 562-569.
- Morrice LM, McLean MW, Long WF and Williamson FB. 1983. Porphyran primary structure. *J Biochem* 133, 673-684.
- Morrice LM, McLean MW, Long WF and Williamson FB. 1984. Porphyran primary structure. *Hydrobiologia* 116, 572-575.
- Noda H, Amano H and Aeashima K. 1989. Antitumour activity of polysaccharides and lipids from algae. *Nippon Suisan-gakkaishi*. 55, 1265-1271.
- Park JH and Koo JG. 2008. A simple purification method and chemical properties of porphyran from *Porphyra yezoensis*. *J Kor Fish Soc* 41, 409-413.
- Percival E and McDowell RH. 1967. The elucidation of the structure of polysaccharides. In: *Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides*. Percival E and McDowell RH, ed. Academic press, London, Great Britain, 26-50.
- Rees DA. 1961. Enzymic synthesis of 3,6-anhydro-L-galactose within porphyran from L-galactose 6-sulfate units. *Biochem. J* 81, 347-352.
- Teruya TT, Konish T, Uechi S, Tamaki H and Tako M. 2007. Anti-proliferative activity of oversulfated fucoidan from commercially cultured *Cladosiphon okamuranus* TOKIDA in U937 cells. *Int J Biol Macromol* 41, 221-226.

2011년 10월 26일 접수

2011년 11월 7일 수정

2011년 12월 7일 수리