*J. Fd Hyg. Safety 11(1), 25 - 29(1996)*

# 가리비(*Patinopecten yessoensis*)의 간 췌장으로 부터 분리한 Fucoidanase의 특성

류병호* · 김동석* · 이영숙**
*경성대학교 식품공학과, **부산시보건환경 연구원

# Characterization of Fucoidanase Screened from the Hepatopancreas of *Patinopecten yessoensis*

**Beung-Ho Ryu*, Dong-Seuk Kim*, Young-Suk Lee****
**Department of Food Science and Biotechnology, Kyungsung University, Pusan 608-736, Korea*
***Public Health and Environment Institute of Pusan*

**ABSTRACT** — A fucoidanase, which was screened from the heptopancreas of Patinopectin yessoensis, was fractionated according to by ammounium sulfate precipitation and anion exchange chromatography. The crude fucoidanase activity was hydrolyzed a small amounts of fucoidan agar and not carrageenan. The crude enzyme hydrolyzed fucoidan to produce oligosaccha-rides of fucose, glucose, maltose maltotriose and maltotetraose as the reaction products.

**Key words** Heptopancreas, Fucoidanase, *Patinopecten yessoensis*

## 서 론

해조류의 다당체는 해양 환경의 특이성으로 인하여 면역력 증강 작용,[1,2] 항 종양활성,[3,4] 항 Virus활성[5] 및 혈액응고[6] 등 생리활성 물질이 들어있어 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 해조류의 다당체인 fucoidan은 heparin과 같이 항 혈액응고 활성이외에 강력한 항암, cholesterol억제 및 항 AIDS virus의 효과가 있는 것으로 알려져 주목을 받고 있다.[7,8] 이러한 fucoidan은 유황함유 5탄당의 다당체로서 해조류 중의 갈조류에 널리 분포 되어 있다.[9,10] 지금까지 알려진 바에 의하면 갈조류에 존재하는 fucoidan의 함유량은 10~40% 정도로 *Fucus vesiculosus* 등 12종류 이상의 갈조류에서 fucoidan의 함유량이 보고 되었다.[9-11] 갈조류 중 *Pelvetia wrightii*,[10] *Lessonia nigrescens*[11] *Ecklonia kurome*,[12] *Hizikia fusiforme*[13] 등은 heparin과 같은 항 혈액응고 활성이 있는 것으로 보고되었으며 *Hizikia fusiforme*[11] 및 *Ecklonia kurome*[12]의 fucoidan은 heparinoid보다 항 혈액응고 활성이 더욱 강하며, 이러한 현상은 분자량과 황산기의 함유량에 상관성이 있는 것으로 보고되었다.[12,13] 이와 같이 해조류의 다당체가 biomass의 훌륭한 자원으로 알려져 있어 fucoidan의 실용화 가능성을 검토하기 위하여 fucoidan 분해효소를 사용하여 oligosaccharide로 분해하여 그 신기능성 소재로서 연구할 필요가 있다. 해조류 다당체의 분해에 대한 연구로는 carrageenan,[14-16] alginate,[17,18] fucoidin[19] 및 fucoidan[20] 등에 대하여 연구한 바 있다.

본 연구는 fucoidan의 신기능 소재로서 활용하기 위한 방안의 하나로 우선 fucoidan을 분해하기 위하여 분해효소를 검색하여 가리비(*Patinopecten yessoensis*)에서 강력한 fucoidanase를 분리하여 약간의 결과를 얻었으므로 보고하고자 한다.

## 재료 및 실험방법

### 재료

가리비의 간 췌장에서 fucoidan을 분해하는 효소를 검색하였다. 본 실험에서 기질로서 사용되는 fucoidan은 Sigma Co.에서 구입하였다.

### 실험방법

**Fucoidan을 분해하는 조효소(crude enzyme)의 검색** — Fucoidan을 분해하는 효소의 검색은 가리비의 간췌장의 시료에 0.1 M phosphate buffer, pH 6.0, 3.0% NaCl 및 0.4 M

† Author to whom correspondence should be addressed.

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$의 혼합액(10:80:10)을 시료의 약 2배 용량을 넣은 후 0.6 mM phenylmethyl sulfate fluoride (PMSF)을 넣고 균질기로서 3,000×g에서 3분간 균질화 시킨 후 12,000×g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 그 상등액을 30% $(NH_4)_2SO_4$ 포화 용액을 가하여 생성하는 침전을 12,000×g에서 30분간 원심분리하여 제거한 후 그 상등액에 70% $(NH_4)_2SO_4$ 포화 용액을 가하여 생성되는 침전을 15,000×g로 다시 30분간 원심분리하였다. 그 침전을 0.01 M phosphate buffer, pH 6.0 에 용해 시킨 후 Bio-gel P-6DG(Bio-Rad)로 탈염하여 얻는 획분을 조효소로 하였다.

**Fucoidan의 환원당 정량** — 0.4% fucoidan용액 2.0 m*l* 및 0.1 M-acetate buffer, pH 5.0, 2.0 m*l*를 35°에서 5분간 배양한 다음, 여기에 조 효소액(crude enzyme) 1.0 m*l*를 가하여 효소반응을 시켰다. 효소 반응액을 경시적으로 취하여 L-fucose를 표준품으로 하여 환원당을 정량 하였다.[21]

**α-L-Fucosidase 활성의 측정** — L-Fucosidase 활성의 측정은 p-nitrophenyl α-L-fucoside를 기질로하여 측정하였다.[22] 50 mM acetate buffer, pH 5.5에 용해시킨 2 mM p-nitrophenyl α-L- fucoside 200 μl에 조 효소액 50 μl를 가하여 30°C에서 반응시켰다. 반응 후 0.5M $Na_2CO_3$ 2.2 m*l*를 가하여 반응을 정지시켜 유리되어 나오는 p-nitrophenol의 량을 400 nm에서 측정하였다. α-L-Fucosidase 활성은 이 반응에서 1분간에 p-nitro-phenol 1 μM을 유리하는 효소의 량을 1 unit로 하였다.

**Fucoidan의 점도 측정** — 0.4% fucoidan 용액 2.0 m*l*와 0.1 M acetate buffer, pH 5.0, 2.0 m*l*의 혼합액을 35°C에서 5분간 배양시킨 후 여기에 조 효소액 1.0 m*l*를 가하여 효소반응을 시작하여 경시적으로 Oswald 점도계로서 측정하여 점도를 산출하였다.

$$[V] = \frac{t_2 - t_3}{t_1 - t_3}$$

[V] : 점도

$t_1$ : 반응 전의 유속

$t_2$ : 반응후의 유속

$t_3$ : 물의 유속

**총당의 정량** — 총당은 phenol 황산법[23]에 따라 L-fucose를 표준품으로 하여 측정하였다.

**조효소에 의한 분해물의 TLC** — Silica gel의 plate를 사용하여 전개 용매(n-butanol: acetic acid: $H_2O$=2:1:1)로서 전개하였다. TLC에 전개한 silica gel을 건조 시킨 후 20% $H_2SO_4$-methanol 용액으로 분무한 후 150°C에서 10분간 배건한 후 나타나는 band를 표준품과 비교하였다.

**음이온 교환 크로마토그래피에 의한 당의 분획** — DEAE-Toyopearl 650 M을 column(3.2×45 cm)에 충진시킨 후 증류수로서 평형화 하였다. 여기에 crude enzyme의 분해물을 첨가하고 증류수 및 1.0 M-NaCl의 순으로 용출하여 분획하였다.[22]

**Gel 크로마토그래피** — 앞에서 분획한 fucoidanase 획분을 Bio-gel P-2(Bio-Rad)를 column(2.2×100 cm)에 충진시킨 다음 용출시켰다.[22]

## 결과 및 고찰

### Fucoidan의 분해효소의 검색

가리비(*Patinopecten yessoensis*)의 간 췌장에서 분리하여 얻은 조 효소액의 분해 활성을 측정한 결과는 Fig. 1 에 나타내었다. 조 효소액을 가하여 반응하였을 때 반응을 시작한 이후 30분에 환원당은 경시적으로 증가하기 시작하였다. 조 효소의 반응 4시간에서 환원당의 량이 증가하였으나, 반응 12시간 이후부터 환원당은 다소 증가할 뿐 큰 변화는 찾아 볼 수 없었다.

한편 fucoidan 수용액은 다당체의 일반적 성질로 보아 점성이 강하나 분해되면 oligosaccharide로 되면서 점질이 떨어진다. 본 실험에서 fucoidan에 조효소를 넣어 경시적으로 반응액을 취하여 Oswald 법으로 점도를 측정하였다. Fig. 2에 나타낸 바와 같이 fucoidan을 조효소로 반응 시킨 후 10분 경과시에 점도가 떨어 지다가 반응 30분 후에는 급격한 점도의 저하가 일어 났으며 반응 4시간 부터는 점도의

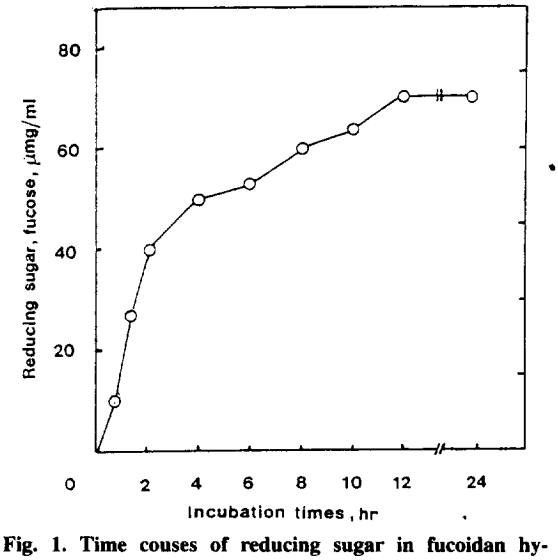


**Fig. 1. Time couses of reducing sugar in fucoidan hydrolyzates by crude enzyme.**

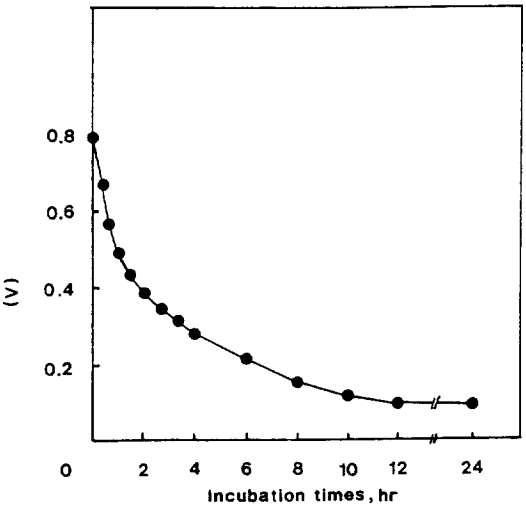


**Fig. 2. Time courses of viscosity in fucoidan hydrolyzates by crude enzyme. A value of [V]obs was measured by the below formula,**

$$[V]=\frac{t_2-t_3}{t_1-t_3}$$

**[V] : Viscosity**
**$t_1$ : efflux time before reaction**
**$t_2$ : efflux time after reaction**
**$t_3$ : efflux time of water**

**Table 1. Polysaccharides hydrolytic activities of crude enzyme.**

| Polysaccarides | Increase of reducing sugar (μg/m*l*) | Decrease of viscosity, [V] |
|---|---|---|
| Fucoidan | 32.5 | 0.2 |
| Alginic acid | 24.5 | 0.6 |
| *k*-carrageenan | 8.5 | 0.8 |
| Agar | 10.0 | 0.8 |

저하는 완만한 곡선을 보여 주었다. 조 효소액의 반응 시간에 따른 변화에서 환원당의 량이 증가하면 점도는 저하되는 경향을 볼 수 있었다. 따라서 가리비의 간 췌장에서 추출한 조 효소에는 fucoidan을 분해하는 효소가 들어 있는 것으로 확인 되었다.

### 해조류 다당체의 기질에 대한 분해 활성

췌장에서 얻은 조효소의 분해능을 확인하기 위하여 fucoidan, alginic acid, *k*-carrageenan 및 agar를 기질로 하여 점도 저하 활성 및 환원당의 증가여부를 측정하였다.

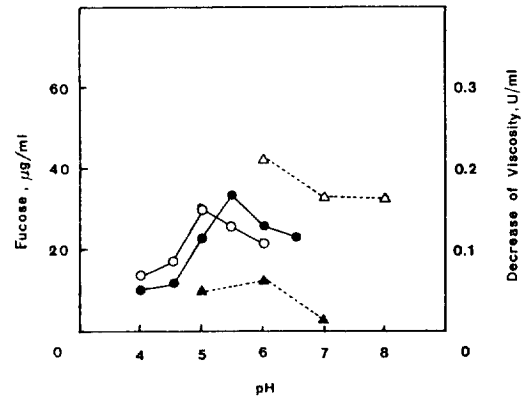


**Fig. 3. Effects of pH on fucoidan hydrolysis by crude enzyme.**
● – ●: Increase of reducing sugar,
○ – ○: decrease of viscosity. 0.2 M acetate buffer,
△ – △: Increase of reducing sugar,
▲ – ▲:L Decrease of viscosity.

Table 1에서 보는 바와 같이 조효소의 활성은 fucoidan에 대하여 분해 활성이 가장 높고, alginic acid도 다소 분해하였다. 그러나 *k*-carrageenan은 거의 분해 하지 않았으며, agar는 전혀 분해 활성을 나타내지 않았다.

### 조효소의 최적 pH 및 온도

조효소액의 pH를 알아보기 위하여 0.2 M-phosphate buffer로서 pH 6.0, 6.5, 7.0 및 7.5에서, 또 0.2 M-acetate buffer를 사용하여 pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 및 6.0으로 pH를 구분하여 fucoidanase 분해 활성을 측정하였다. Fig. 3에 나타낸 바와 같이 조효소 활성의 최적 pH는 점도 저하 활성과 환원당의 활성이 증가하는 pH 5.5부근으로 2종류의 완충액으로서 활성에는 큰 차이를 찾아 볼 수 없었다. 한편 조효소 반응액의 최적 온도를 알아 보기 위하여 5, 15, 20, 25, 30 및 35°C에서 측정하였더니 30°C부근에서 활성이 가장 높았다.

### Fucoidan을 기질로서의 조효소 반응에 의한 분해물의 확인

0.4% fucoidan 30 m*l*, 4 mM acetate buffer(pH 5.5) 40 m*l*에 조효소액 1.5 m*l*를 가하여 30°C에서 24시간 반응 시켰다. 이 반응액에 5배 용량의 ethylalcohol을 가하여 반응을 정지시키고 24시간 방치하여 단백질과 미반응의 fucoidan을 침전하여 제거하였다. 이를 1,200×g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 감압 농축한 후 TLC를 실시하였다.

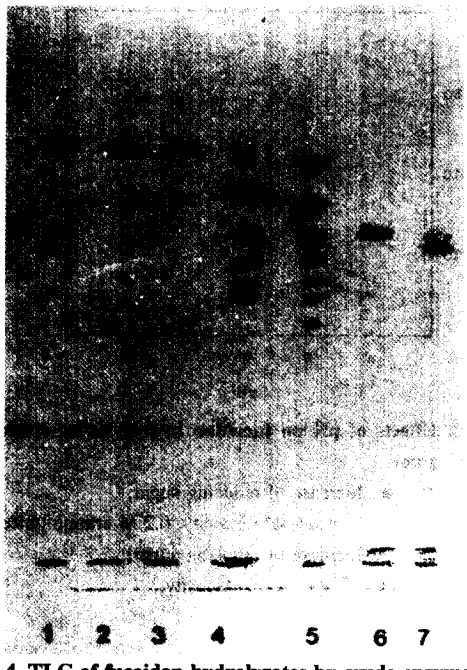


**Fig. 4. TLC of fucoidan hydrolyzates by crude enzyme.**

Sample were carried out on silica gel plate chromatogram with solvent (n-butanol: acetic acid:water, 2:1:1) and oligosaccaride of fucoidan hydrolyzates were detected by baking at 150°C after spraying with 20% $H_2SO_4$/Methanol.

1, 2, 3: Fucose, 4: Mixture of fucose, glucose, maltose, maltotriose, maltotetraose, 5: Hydrolyzates by crud enzyme with fucoidan, 6: galactose, 7: galactose-6-sulfate,

Fig. 4에서 보는 바와 같이 조효소에 의한 fucoidan의 분해물은 5개의 band를 나타내었으며, 4개의 band중에서 1개의 band가 표준품인 standard mixture와 Rf가 거의 비슷하였으며 2개의 band는 glucose 및 galactose의 표준품과 거의 비슷한 Rf치를 나타내었다.

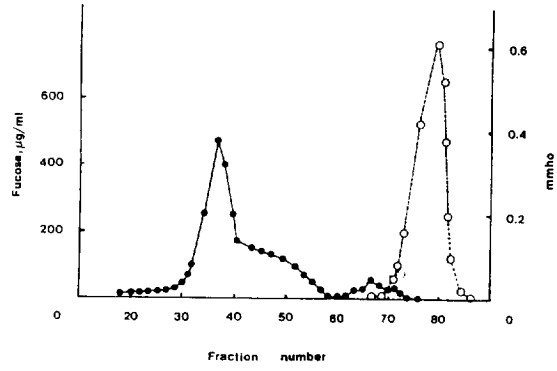


**Fig. 5. Gel-filteration of fucoidan hydrolyzates with Bio-Gel P-2.**

● – ●: Carbohydrate as fucose

○ – ○: Elecro conductivity (m mho)

### Ion 교환 chromatography

Ion 교환 수지인 DEAE-Toyopearl 650 M로 조효소의 반응에 의한 fucose의 분해물을 분획하기 위하여 농축용액 50ml를 첨가하여 이온 교환수 및 0.1 M NaCl로서 용출 시킨 결과 DEAE-Toyopearl 650 M의 용출 획분 10.5 μg을 얻었다. 이 획분을 감압 농축하여 얻은 5.3 mg 을 Bio-Gel P-2로서 Gel 여과를 실시하였다. Fig. 5에 나타낸 바와 같이 Gel획분의 fraction A(No. 34~42), Fraction B(No. 62~74)를 각각 포집하여 감압농축한 다음 TLC로 gel 획분의 oligosaccharide를 확인하였다.

## 감사의 말씀

본 연구는 1995년도 경성대학교 종합식품 연구소의 연구지원비에 의하여 이루워진 것으로 이에 감사드립니다.

## 국문요약

Fucoidan을 분해하는 효소를 분리하기 위하여 각종 어류의 내장으로부터 검색하였다. 각종 어류 중 가리비의 간 췌장에서 fucoidan의 분해능이 우수한 효소를 확인하였다. 가리비의 간 췌장을 blender로서 마쇄한 다음 30~70% $(NH_4)_2SO_4$ 포화수용액을 가하여 조효소를 얻었다. 이 조효소의 fucoidan 분해 활성을 점도 저하 활성 및 환원당의 증가에 대하여 측정하였든바 간췌장 조효소 중에는 fucoidan 분해효소가 존재 하는 것을 확인하였다. 본 실험에서 얻은 조효소는 agar는 다소 분해하였으나 *k*-carrageenan은 분해하지 못하였다. 이 조효소는 fucoidan을 분해하여 oligosaccharide인 fucose, glucose, galactose 및 maltose, maltotriose 및 maltotetraose 등을 생성하였다.

## 참고문헌


1. Baba, M., Snoeck, R., Pauwelis. R., and Dc clercq, E., Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, and human immunodeficiency virus, Antimicrobial Agent and Chemotherapy, **32**, 1742-1745, 1988.
2. 官地遠, 松永是: マリハ"イオテクノロシ"の 展望, 化學工業, **604**, 86, 1988.9. 西澤一俊: 藻類の 酸性多糖類 と その 生理活性, 食品開發, **8**, 28, 1979.
3. 이영숙, 김동석, 류병호, 이성호: 파래와 곰피에서 추출한 당 단백질의 Sarcoma-180 cell에 대한 항암효과 및 면역활성, 한국영양식량학회자, **21**, 544-550, 1992.
4. 조경자, 이영숙, 류병호: 청각과 김에서 추출한 당 단백질의 Sarcoma-180에 대한 항암효과 및 면역활성. 한국수산학회지, **23**(5), 345-352, 1990.
5. Nakashima, H., Kido, Y., Kobayashi, N., Motoki, Y., Neushal, M., and Yamamoto, N.: Purification and characterization of an avian Myeloblastosis and human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor sulfated polysaccharide extracted from sea algae, *Antimicrobial agents and chemeotherapy,* **31**, 1524-1531, 1987.
6. Nishino, T., Aizu, Y., and Nagumo, T.: The relationship between the molecular weight and the anticoagulant activity of two types of fucan sulfates from the Brown seaweed *Ecklonia kurome, Agric. Biol. Chem.,* **55**, 791-798, 1991.
7. 遠和夫: 化學刊, No. 111, 海洋天然物, 化學同一, p.73, 1988.
8. Watanabe, I.: Current to topics in marine biotechnology, Tech.press, p.11, 1989.10. Percival, E., and McDowell, R. H.: Chemistry and Enzymology of Marine algae polysaccharides, Academic press, London, p.219, 1967.
9. 西澤一俊: 藻類の 酸性多糖類 と その 生理活性, 食品開發, **8**, 28-33, 1979.
10. Anno, K., Terahata, M., Hayashi, Y., and Seno, N.: Isolation and purification of fucoidan from brown seaweed *Pelvetia wrightii, Agr., Biol., Chem.,* **30**, 495, 1966.
11. Percival, E., Venegasjara, M. F., and Weigel, H. : Structural studies of the water soluble fucan from *Lessonia nigrescens, Carbohydrate Res.,* **126**, 283-291, 1984.
12. Nishino, T., and Nagumo, T.: Structural characterization of a new coagulant fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia Kurome, Carbohydrate Res.,* **211**, 77-84, 1991.
13. Dobashi, K., Nishino, T., Fujihara, M., amd nagumo, T., Isolation and preliminary characterization if fucose containg sulfated polysaccharide with blood-anticoagulant activity from the brown seaweed *Hizidia fusiforme, Carbohydrate Research,* **194**, 315-322, 1989.
14. Sarwar, G., T. Sakata, and D. Kakimoto. Isolation amd characterization of carrageenan-decomposing bacteria from marine environment. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **29**, 141-145, 1983.
15. Weigel, J., J. R. Turvey, and W. Yaphe. The enzymic hydrolysis of k-carrageenan with *k*-carrageenase from *Pseudomonas carrageenovora. Proc. Int. Seaweed Symp.* **5**, 329-332, 1965.
16. Weigel, J., and W. Yaphe. The enzymic hydrolysis of carrageenan by Pseudomonas carrageenovora: purification of a *k*-carrageenase. *Can. J. Microbiol.* **12**, 939-947, 1966.
17. Sawabe, T., Y. Sakata, and T. Kimura. Characterization of an alginolytic marine bacterium from decaying rishifi-kombu *Laminaria japonica. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **58**: 141-145, 1992.
18. Yonemoto, Y., K. Murata, A. Kimura, H. Yamaguchi, and K. Okayama. Bacterial alginate lyase: characterization of alginate lyase-producing bacteria and purification of the enzyme. *J. Ferment. Bioeng.* **72**:152-157, 1991.
19. Yaphe, W., and K. Morgan. Enzymic hydrolysis of fucoidin by *Pseudomonas atlantica* and *Pseudomonas carrageenovora. Nature (London)* **183**, 761-764, 1959.
20. Kitamura, K., Matsuo, M., Yasui, T., Enzymic degradation of fucoida by fucoidanase from the hepatopancreas of *Pationpectin yessoensis, Biossi. Biotech. Biochem.,* **56**, 490-492. 1992.
21. Crifton, E., Pomerang, Y., Food Analysis Laboratory Experiments, p 94, The Avi publishing Co., 1973.
22. Kitamura, K., Matsuo, M., Yasui, T., Fucoidan from brown seaweed, *Laminaria angustata, Agri. Bio. Chem.,* **55**, 615-618, 1991.
23. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Robers, P. A., Smith. S., Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal chem.,* **28**, 350-356, 1956.