

Agarase에 의한 한천 분해물의 제조 및 기능 특성

주 동 식 · 조 순 영 · 이 응 호

부경대학교 식품공학과, ¹강릉대학교 식품공학과
(접수 : 1998. 3. 5., 게재승인 : 1998. 5. 6.)

Preparation of Agar Hydrolysates by Agarase and Functionality of the Hydrolysates

Dong-Sik Joo, Soon Young Cho¹, and Eung Ho Lee[†]

Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

¹Department of Food Science, Kangnung National University, Kangnung 200-701, Korea

(Received : 1998. 3. 5., Accepted : 1998. 5. 6.)

Agar hydrolysates or agarooligosaccharides from agar prepared by *Cytophaga* agarase showed eight spots on TLC plate and the degree of polymerization of the spots were in the range of 2.5 - 6.5. Each component of the hydrolysate as tested the several functionalities such as antimicrobial activity, anticavity activity, and anticoagulant activity. The anticavity activity and anticoagulant activity were found in all fractions of hydrolysates and several spot on TLC, whereas the anticoagulant activity was very low.

Key Words : agarase, agar hydrolysates, degree of polymerization

서 론

근년 당류에 대한 생체내 역할 규명이 새롭게 행해지면서 당류에 대한 과거의 인식이 많이 변화하고 있으며, 당쇄공학이라는 학문의 영역으로 그 범위를 넓혀가고 있다(1,2). 특히 최근에는 몇 개의 단당이 결합된 올리고당의 섭취가 가져다주는 생체내 역할-비피더스균 활성 촉진 및 장내 세균군의 개선, 항콜레스테롤, 생체조절 인자, 항충치성 등-이 밝혀지면서 많은 연구자들의 관심 대상이 되고 있다(3-5). 그러나 지금까지 이러한 당류의 연구는 주로 육상 식물 유래 당류에 대해서만 행해졌고, 해양 식물 유래 당류에 대해서는 깊은 연구가 이루어져 있지 않고, 최근에 와서야 몇몇 연구들이 국내외에서 이루어지고 있다(6-8). 한편, 해양 유래 다당류는 알긴산(alginic acid), 한천(agar-agar) 및 카라기난(carrageenan)이 주된 것인데, 알긴산을 원료로한 알긴산 올리고당류의 연구는 이미 국내에서도 행해진 바 있다(9).

본 연구는 해양조류 중에서 홍조류로부터 제조되는 당질로서 열 가역성 겔을 형성하는 특성을 가지고, agarose와 황산기를 함유하고 있는 agarpectin이 결합한 산성다당류인 한천을 원료로 하여 올리고당 형태의 분해물을 제조하고자 한다. 이러한 목적을 위해 한천을 분해하는 미생물을 해양 환경에서 분리하여 미생물학적 특성과 이 미생물이 생산하는 효소의 특성을 밝혔다(10). 본 논문에서는 특성이 밝혀진 한천 분해균(*Cytophaga* sp.

ACLJ-18)이 생산하는 효소와 한천의 반응에 의한 올리고당 형태의 분해산물을 제조하고, TLC plate에서 구성당의 형태를 확인한 후 이로부터 직접 몇몇 spot를 분리하여 중합도를 측정하였다. 아울러 얻어진 분해물 및 TLC에서 분리한 올리고당류가 가지는 항균성, 항충치성, 항혈액응고능 등을 측정하여 그 결과를 정리하였다.

재료 및 방법

사용 한천, 효소 및 한천과 효소 반응

한천 분해물 제조에 이용한 한천은 국내 한천 회사[(주)명신]에서 생산한 한천을 이용하였는데, 한천의 농도를 0.5%(pH 7.0, 0.35M NaCl 함유)되게 필요할 때마다 만들어 사용하였다.

효소는 *Cytophaga* sp. ACLJ-18(10)에서 얻어진 조효소액을 부분 정제(11) 효소(단백질 농도:250-300ug/ml)를 일정량씩 여러개의 소형 튜브에 분주하여 동결해두고 필요할 때마다 급속해동하여 이용하였다.

분해물 생산을 위해 한천과 효소의 반응은 만들어진 한천 기질 1000ml에 대해 부분 정제 효소를 20ml의 비율로 가하여 40°C에서 행하였다. 반응 시간별 분해율을 측정하여 분해율의 증가가 없는 시점에서 부분 정제 효소를 10ml 더 가하여 반응을 계속시키면서 분해율의 측정하였고, 최종 40시간까지 계속 분해를 행하였다.

환원당, 전당 및 분해율 측정

효소와 기질 반응에 따라 생성되는 환원당 함량은 Somogyi-

[†] Corresponding Author : Dept. of Food Science and Technology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea.
Tel : 051-620-6412, Fax : 051-622-9258

Nelson법(12)에 따라, 전당은 phenol-sulfuric acid 법(13)에 따라 흡광도를 측정하여 galactose로부터 구한 표준 검량선으로부터 구하였다.

반응시간에 따른 한천의 분해율은 반응액의 전당에 대해 분해되어 생성된 환원당의 비로 나타내었다.

TLC(thin layer chromatography)

TLC glass plate(Kieselgel 60, Merck Co.)를 적절한 크기로 자른 후 105℃에서 1시간 건조한 후 건조자기에서 방냉하였다. 이 plate에 분해물을 일정량 spotting한 후, 1시간 전에 제조해 놓은 전개용매(n-butanol:acetic acid:water=2:1:1)를 이용하여 전개를 실시하였다. 전개한 후 건조하여 발색제(aniline 4ml, diphenylamine 4g, acetone 200ml, 85% phosphoric acid 30ml)를 분무하여 105℃에서 1시간 발색시켜 spot를 확인하였다.

중합도(DP) 측정

분해물의 TLC에서 spot 별로 절취하여 물에 녹여낸 시료 획분의 중합도는 Timell's modification 법(9)에 따라 측정하였다.

한천 분해물의 항균성 및 항충치성

반응 시간에 따라 얻어진 한천 분해물과 TLC 상에서 얻어진 올리고당 획분의 항균성 및 항충치성을 paper disk 법(15)을 이용하여 측정하였다. 멸균된 petri dish에 Mueller Hinton agar 배지(beef extract 19.7g, casamino acid 1.6g, bacto soluble starch 0.1g, 4.84 mg Ca²⁺, 4.24 mg Mg²⁺, agar 18g, 1L D.W.)를 20ml 씩 부어 평판을 만들고 시험 병원균주들을 37℃에서 12시간 배양시킨 균액을 면봉을 이용하여 petri dish 상에 도말하여 접종시킨 다음, 배양온도보다 약간 낮은 25℃에서 2시간 전배양시킨 후 역시 멸균된 paper disk(8mm diameter, Advance Toyo, Japan)를 평판위에 올려놓고 그위에 0.45µm membrane filter로 여과한 분해물 및 올리고당 획분 50µl를 주사기로 가한 후 37℃로 조절된 배양기에서 배양하였다. 배양 12시간과 24시간 경과후 disk paper 주위의 투명한 생성 여부로 항균성 유무를 판별하였다. 본 실험에 사용한 병원성 균주는 그람 양성 세균으로 *Bacillus cereus*, *B.subtilis*, *Staphylococcus aureus*를, 그람 음성 세균으로 *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*를 이용하였다. 항충치성 실험에는 충치균의 하나인 *Streptococcus intermedius*를 이용하여 항균성 실험과 동일한 방법으로 행하였다.

항혈액 응고능 측정

혈장은 정맥혈 4.5ml를 채취하여 0.5ml의 sodium citrate(3.8%) 용액과 혼합한 다음 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 분리한 혈장은 -20℃에 저장하여두고 실험에 사용하였다(16).

활성 트롬보플라스틴 시간 측정(APTT, Activated partial thromboplastin time)은 혈장 100µl에 분해물 및 올리고당 용액 10µl를 넣고 교반한 후 37℃ 항온수조에서 2분간 가온하였다. 여기에 100µl actin을 첨가한 후 다시 37℃ 항온수조에서 3분간 가온하였다. 3분이 되는 순간 미리 37℃로 가열하여둔 0.025M CaCl₂ 용액 100µl를 넣음과 동시에 응고시간을 측정하였다.

프로트롬빈 시간 측정(PT, Prothrombin time)은 37℃ 항온수

조에서 1분 이상 미리 가온하여둔 thromboplastin C(Pharmacia Co.) 200µl에 37℃에서 미리 5분 이상 가온하여둔 혈장과 시료 용액 혼합액(혈장:시료 용액 = 10:1) 100µl를 가함파 동시에 응고 시간을 측정하였다.

결과 및 고찰

반응시간에 따른 분해율 변화

한천과 효소의 반응시간에 따른 분해율을 측정한 결과 Figure 1과 같다. 반응 2시간에서 2%의 분해율이 측정된 후 반응시간에 따라 급격하게 분해율이 증가되어 반응 15시간에는 약 20%의 분해율을 보였다. 반응 17시간에 30%의 분해율을 나타낸 후, 20시간에는 분해율이 약간 증가되어 32%에 머물렀는데, 반응이 거의 끝난 것으로 판단되어 반응액에 부분 정제 효소액 10ml를 추가하여 다시 반응을 계속시킨 결과, 23시간째 분해율이 32.1%, 40시간에 33% 정도로 더 이상 한천이 분해되지 않음을 알 수 있었다. 이는 한천의 구조중에서 본 효소가 작용하여 분해될 수 있는 부분이 20시간반응으로 거의 분해된다는 것으로 예측할 수 있는데, 향후 분해 산물의 구조 분석이 행해진다면 정확한 효소의 작용부위를 예측할 수 있을 것으로 판단되며, 이러한 결과를 토대로 특정 올리고당의 제조에 본 효소의 이용도 가능하리라 생각된다.

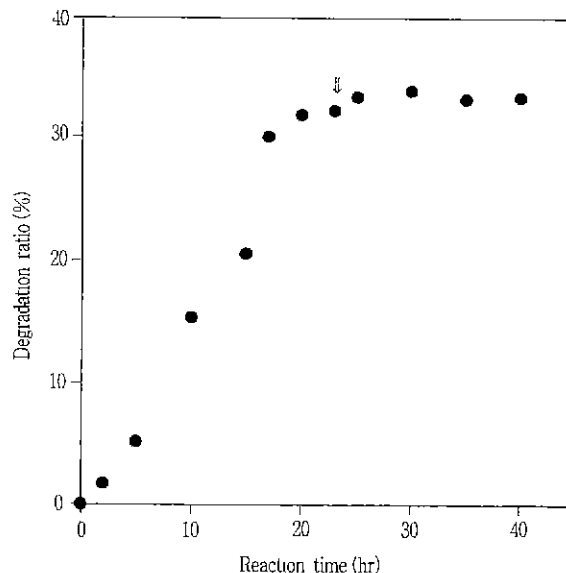


Figure 1. Degradation ratio of agar for reaction time with the agarase. Degradation ratio : (reducing sugar/total sugar) × 100. The arrow indicates the addition time of 10ml crude enzyme solution.

TLC 및 중합도

반응 시간에 따라 얻어진 분해물의 TLC를 Figure 2에 나타내었다. 반응 17시간에서 보여준 spot가 3개 였으나, 반응 23시간의 분해물은 6개, 반응 30시간은 8개의 spot을 형성하는 것을 확인할 수 있었다. 반응시간이 경과함에 따라 이동도가 큰 spot들이 나타남을 알 수 있는데, 이는 반응시간의 경과로 올리고당 형태의 당질이 더욱 작게 분해되는 것으로 생각되어졌다.

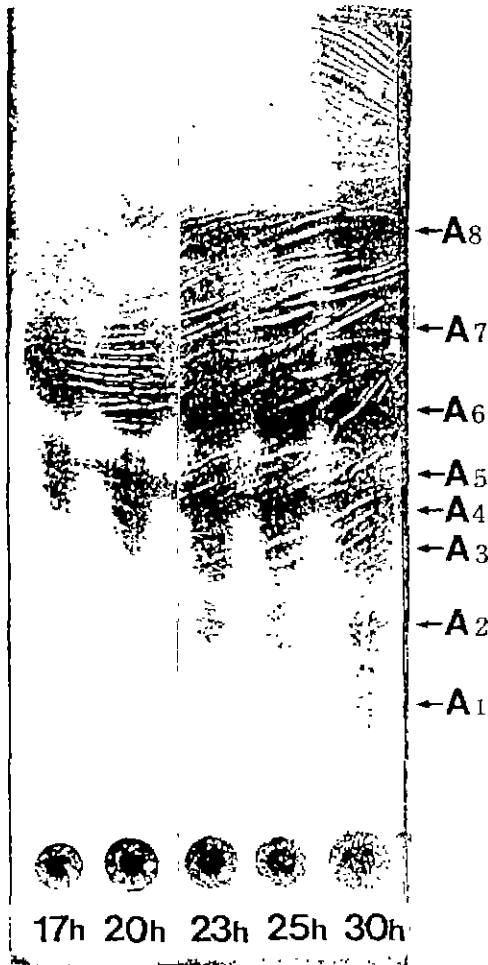


Figure 2. Thin layer chromatography of the hydrolysed products from agar by agarase.

Table 1. Degree of polymerization(DP) of oligosaccharide fractions separated from TLC plate.

Spot No. ^{*1}	DP ^{*2}
A1	11.4±1.5
A2	8.2±1.0
A3	6.8±1.0
A4	4.4±0.5
A5	3.7±0.5
A6	3.4±0.5
A7	2.2±0.5
A8	1.8±0.5

*1 Spots obtained from TLC plate(Figure 1)

*2 DP : degree of polymerization

TLC 결과로만 올리고당의 여부를 확인할 수 없고, 실제 환원 올리고당 표준품의 구입도 쉽지않아서 각 spot를 동일한 조건에서 전개하여 얻어진 몇 개의 plate에서 이동도별로 끊어모아 물에 용해하여 중합도를 구해서 간접적으로 올리고당임을 확인한 결과 Table 1과 같다. 전체적인 spot에 따른 중합도는 어느정도 구별이 되었으나 실험 방법에 있어서 오차의 범위가 매우 넓어 정확한 중합도는 예측하기가 매우 힘들었으며, 전개된 spot 중에서는 중합도 3.0에서 7.0 사이의 함량이 가장 높은 비를 차지하였다(약 60%). 본 실험에서는 분해된 산물중에 함유된 미분해 다당류의 제거를 위해 알코올 침전 등을 행하지 않았기 때문에 전개되지 못한 당 함량도 높은 것으로 판단되었고, 향후 지속적인 연구에서는 알코올 첨가에 의해 미분해 당류를 제거하는 전 처리를 행한후 겔 크로마토그래피를 이용한 정제 및 TLC 전개

Table 2. Antimicrobial and anticavity activities of agar hydrolysates and fractions obtained from TLC plate.

Sample	<i>E. coli</i>		<i>St. aureus</i>		<i>B. cereus</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>St. intermedius</i>	
	12 ^{*4}	24	12	24	12	24	12	24	12	24
Ah-17 ^{*2}									-	±
Ah-20					±	-			+	±
Ah-23	± ^{*5}	-	±	-	±	-	±	-	+	±
Ah-25	±	-	±	-	±	-	±	-	+	±
Ah-30			±	-					+	±
A3 ^{*3}			+	+	+	-	-	-	+	+
A4			+	+	+	-	+	-	+	+
A5			+	±	+	±	+	-	+	+
A6			+	-	±	-	+	-	+	+
A7					±	-			±	-

*1 : agar(Myong shin Co.,)

*2 : enzymic agar hydrolysates on each degradation time

*3 : hydrolysates obtained from TLC plate(Figure 2)

*4 : incubation time

*5 : antimicrobial activity ; + - high(15>Clear zone diameter>12mm)

± - a little active(Clear zone diameter<12mm)

- - not active

에 의한 분획을 시도할 필요가 있을 것으로 사료되고, 더 나아가 HPLC나 FPLC 등을 이용한 올리고당류의 분획도 필요하다고 생각되는데, 아직 산성 해조 다당류로부터 얻어진 분해 산물에 대한 이러한 시도들이 없어 기초적인 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 여겨진다.

항균성 및 항충치성

17시간 이상 분해시켜 전당 함량이 3.5mg/ml인 한천 분해물과 TLC 상에서 획득한 전당함량이 0.5mg/ml인 올리고당류의 항균성 및 항충치성을 실험한 결과는 Table 3과 같다. 한천 분해물의 경우 시험 병원균에 대해서 강한 항균 활성을 나타내지 못하는 것으로 확인되었고, 반면 항충치 활성은 분해 산물 모두에서 확인되었으며, TLC로부터 획득한 올리고당의 획득들은 24시간 이상 항충치 활성을 유지하는 것으로 나타났다. 이는 올리고당이 일반적으로 항충치 특성을 가지는 것으로 널리 알려져 있는 것과 일치하는데(17), 항충치 활성 기작은 좀 더 실험이 되어져야 할 것으로 판단되고, 정확하게 어떤 올리고당류가 활성에 관계되는지도 지속적인 연구가 이루어져야 확인될 것으로 생각된다.

항혈전성

한천 제조시 조건에 따라 다소의 차이는 있겠지만 한천이 황산기를 함유하게되며, 일반적으로 황산기를 함유하는 당질의 경우 항혈액응고능을 가지는 것으로 확인되고 있다(18). 본 연구에서도 황산기를 함유하는 한천 분해물과 올리고당이 가지는 항혈액응고능을 측정된 결과는 Table 4와 같다.

한천과 한천 분해물의 TLC 획득 모두 APTT 활성은 관찰되

었으나 일반적으로 항혈액응고 작용을 강하게 가지는 헤파린과는 비교되지 않을 정도로 약하다는 결론을 얻을 수 있었고, PT 활성은 전혀 관찰되지 않았다. 실제 황산기 당류의 분자량과 항혈액응고능은 상관성을 가진다는 것을 고려한다면, 분해 시간을 좀더 짧게한 즉 분자량이 좀 더 큰 산물에 대한 부가적인 실험이 행해져야 할 것으로 판단되었다. PT의 연장은 혈액응고의 외인성 경로에 관여하는 응고인자가 결핍되거나 억제물질이 존재할 때 일어나고, APTT는 내인성 경로의 단독 혹은 복합적 결핍이나 이들 인자의 억제물질이 존재할 때 일어난다고 하는데(16), 한천 분해물이나 분획 올리고당류는 내인성 경로 인자를 저해하는 작용 때문에 항혈액응고 작용이 일어나는 것으로 여겨진다.

요 약

한천 분해균(*Cytophaga* sp. ACLJ-18)이 생산하는 효소를 이용하여 한천을 올리고당 형태의 분해 산물을 제조하고, TLC plate에서 구성당의 형태를 확인한 후 이로부터 직접 몇몇 spot를 분리하여 중합도를 확인하였다. 아울러 얻어진 분해물 및 TLC에서 분리한 올리고당류가 가지는 항균성, 항충치성, 항혈액응고능 등을 측정하였다. 효소와 한천의 반응 시간에 따른 분해율은 반응 17시간에 약 30%를 나타낸 후 이후 40시간 반응까지 33% 정도로 최대 분해율에 도달하였다. 17시간 이상 반응시킨 분해물들을 TLC 상에서 8개의 band로 분리할 수 있었고, 이들 band들의 중합도는 3.0-7.0 정도를 나타내었다. 얻어진 분해물과 TLC 획득들의 평균 활성은 미약하게 관찰되었으나, 항충치 활성은 실험 시료 대부분이 강한 것으로 확인되었고, 아울러 약하지만 항혈액응고능도 있었다.

감사의 말

본 연구는 1994년 한국과학재단 연구비 지원(과제번호 : 94-0402-07-01-3)으로 수행된 연구 결과의 일부이며 이에 깊이 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. 佐佐木隆造 (1993), 糖鎖の生物機能, 日本農藝化學會誌, 67, 1727-1745.
2. 박준태 (1994), Carbohydrates/Polysaccharides의 의학적 이용 및 현재의 개발현황, 생물공학 NEWS, 1, 31-36.
3. Bullen, C.L., P.V. Teale, and A.T. Willis (1976), Bifidobacteria in the intestinal tract on infants. An *in vivo* study, *J. Med. Microbiol.*, 3, 338-344.
4. 日高秀昌, 榮田利章, 足立 暁, 齊藤安弘 (1987), フラクトオリゴ糖の工業生産とその利用開發, 日本農藝化學會誌. 61(8), 915-923.
5. 菅野智榮 (1989), イソマルトオリゴ糖の生理機能とその應用, *New Food Industry*, 31(6), 9-16.
6. 金東洙, 朴榮浩 (1984), 알긴酸的 化學的 組成 및 그 物性에 대한 研究. (1)갈태 알긴酸的 우론酸 組成, 韓國水産學會誌. 17. 391.

Table 3. Effect of agar hydrolysates on anticoagulant activity.

Sample	Clotting time(sec)	
	PT*4	APTT
Control*1	15	30
Ah-17*2	15	30
Ah-20	15	34
Ah-23	15	33
Ah-25	15	35
Ah-30	15	33
A1*3	15	31
A2	15	36
A3	15	35
A4	15	38
A5	15	33
A6	15	35
A7	15	33
A8	15	32

*1, *2, *3 : refer to the comment in Table 2.

*4 : PT-Prothrombin time

APTT-Activated partial thromboplastin time

7. 구재근, 조길석, 도정룡, 우순자 (1995), 한국산 다시마 및 미역으로부터 Fucoidan의 추출 및 정제, *한국수산학회지*, **28**, 227.
8. Duckworth, M. and W. Yaphe (1971), The structure of agar. Part 1. The fractionation of a complex mixture of polysaccharides, *Carbohydr. Res.*, **16**, 189-197.
9. 주동식, 이정석, 박중재, 조순영, 김희경, 이응호 (1996), 효소 분해에 의한 알긴산 올리고당류의 제조, *한국식품과학회지*, **28**(1), 146-151.
10. 조순영, 주동식, 최용석, 김옥선, 송해미, 이응호 (1996), 한천 분해균 *Cytophaga* sp. ACLJ-18의 분리 및 효소 생산 조건 최적화, *한국생물공학회지*, **11**(5), 593-599.
11. 주동식, 송해미, 이정석, 조순영, 이응호 (1998), 한천 분해균 (*Cytophaga* sp. ACLJ-18)이 생산하는 agarase의 정제 및 특성, *한국생물공학회지* 투고중.
12. Somogyi, M. and N. Nelson(1952), Notes on sugar determination, *J. Biol. Chem.*, **195**, 19-23.
13. 日本食品工業學會 (1984), 食品分析法, p.189, 光琳, 日本.
14. Hirst, E.L., E. Percival, and J.K. Wold (1964), The structural of alginic acid. Part IV. Partial hydrolysis of the reduced polysaccharide, *J. Chem. Soc.*, **8**, 1493-1499.
15. Lorian, V.(1991), Antibiotics laboratory medicine, pp. 17-105, Williams & Wilkins, Baltimore,
16. 김상인, 조한익, 박성섭 (1992), 혈액학, p.313, 서울대학교 의과대학편, 서울.
17. 李應昊, 周東植 (1994), 올리고당의 機能特性, *冷凍·空調工學*, **13**(3), 155-166.
18. Nishino, T. and T. Nagumo (1992), Anticoagulant and antithrombin activities of oversulfated fucans, *Carbohydr. Res.*, **229**, 355-362.