

분지 베타 글루칸의 저분자화 기술 연구

¹신 현 재 · † 이 등 철

¹(주)엔지뱅크, † 충북과학대학 바이오생명정보과
(접수 : 2003. 3. 26. 게재승인 : 2003. 10. 26.)

Study on the Process to Decrease the Molecular Weight of β -(1,6)-branched β -(1,3)-D-Glucans

Hyun-Jae Shin¹ and Dong-Cheol Lee[†]

¹EnzBank, Inc., 309 BVC, KRIBB, Yusong, Daejeon 305-333, Korea

[†] Department of Biotechnology, Chungbuk, Provincial University, Okcheon, Chungbuk 373-807, Korea

(Received : 2003. 3. 26. Accepted : 2003. 10. 26.)

β -(1,6)-Branched β -(1,3)-D-glucans are known to enhance the immune system in human body, and in most cases have higher molecular weights over 1 MDa. In order to enhance the efficacy of glucans by decreasing their molecular weights, sonication, acid treatment, and enzymatic hydrolysis were tested and compared in this work. Treatment of sonication was effective to decrease the molecular weight to the extent of several dozens of kilo-daltons, but have a risk to disorder the triple helical structure of the glucans. Acid treatment was also an effective method to degrade polysaccharides, but β -(1,6)-branches of the glucan molecules was found to be also hydrolyzed. Treatment of β -(1,3)-glucanase was an effective method to decrease the molecular weight in mild conditions, but could not hydrolyse the highly β -(1,6)-branched β -(1,3)-glucans efficiently.

Key Words : Beta-glucan, sonication, acid treatment, enzymatic hydrolysis

서 론

다양한 종류의 다당류들이 인체 면역 기능을 강화시켜 주는 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 약리적으로 그러한 물질들을 biological response modifiers (BRM)이라고 부르는데 그 가운데 한 종류인 분지 베타 글루칸 (β -(1,6)-branched β -(1,3)-D-glucan, 이하 BBG)은 최근 그 효능의 우수성이 조금씩 알려지고 있다. BBG는 공통적으로 중심에 β -(1,3)-linked-D-glucopyranosyl unit를 갖고 있으며, 무작위적으로 β -(1,6)-D-glucopyranosyl unit의 가지구조를 가지고 있다(Fig. 1). BBG의 주요한 의약적 효능은 항암 작용으로서, 즉각적인 cytotoxicity 에 의한 작용보다는 면역체계를 활성화함으로써 간접적으로 효능을 나타내게 된다(1). 항암 효능 이외에도 알러지 예방효과, 항균, 항바이러스, 항응고제 효능 및 상처 치유 활성이 있는 것으로 알려져 있다(2). 일반 면역세포에 뿐 아니라 피부 세포인 fibroblast 에도 glucan

에 대한 pattern recognition receptor 가 존재한다는 최근의 논문은, BBG의 피부 재생 효능의 기작도 잘 설명해주고 있다(3).

이렇게 다양한 BBG의 효능들은, 그 분자량 및 (1,6)-linked side chain의 분지도, 그리고 이와 연관된 3차 분자 구조와 상관 있는 것으로 알려져 있다(4). 또한, 다양한 생물체에서 유래한 BBG 들의 효능 차이는, 결국 그 분자량과 분지도 (DB)의 차이에서 기인하는 것으로 여겨지고 있다. 그러나, 생물체에서 추출되거나 세포 외로 생산되는 무가공의 천연 BBG들의 대부분은 약리적으로 최적인 분지도, 분자량 조건을 충분히 충족시키지 못하고 있다. 특히, 일반적으로 산업화되어 있는 액체 배양에 의한 BBG 생산의 경우에는, 배양조건의 미묘한 차이나 균주 자체의 변이에 따라 생산되는 분자들의 구조나 분자량이 일정치 않고 변화된다고 알려져 있다. 그러므로, 현재 산업화되어 있는 BBG 소재들은 대개 건강보조식품의 원료나 화장품 원료로서 응용되고 있으며, 국내적으로는 아직 화장품 법상의 기능성 화장품 원료로서도 인정받지 못하고 있는 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 몇 가지 고분자량의 BBG을 소재로 하여 우선적으로 분자량 감쇄 기술을 고찰해 보고자 한다. 향후, 분리정제 기술을 바탕으로 BBG의 분자량별 library를 구축하는데 일조를 하리라 사료된다.

[†] Corresponding Author : Department of Biotechnology, Chungbuk Provincial University, Okcheon, Chungbuk Province, Korea
Tel : +82-43-730-6401, Fax : +82-43-730-6409
E-mail : dcllee@ctech.ac.kr

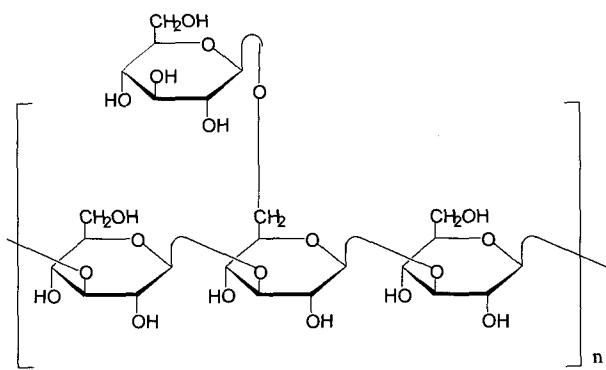


Figure 1. Molecular structure of BBG.

재료 및 방법

시약 및 재료

β -(1,3)-glucan로는 SC-Glucan™을 주로 사용하였으며, 기타 cinerean, curdlan, pustulan 등을 사용하였다. (주)태평양에서 skin care 용 화장품의 원료로 생산되는 SC-Glucan™은 치마버섯인 *Schizophyllum commune* Fr.의 균사체 배양에 의해 생산되는 수용성 β -(1,3)-D-glucan으로서, 분자량은 약 2.0 MDa로 알려져 있다. 0.4% 농도의 수용액 상으로 생산되어지고 있다. *Alcaligenes faecalis* 유래의 curdlan은 Megazyme (아일랜드)사에서, *Umbilicaria papulosa* 유래의 pustulan은 미국 Calbiochem사에서 구입하였다. Cinerean은 *Botrytis cinerea*로부터 생산되는 extracellular polysaccharide로서, 본 연구에서는 균주를 직접 배양하여 수득하였다. 20 g/L 농도의 포도당을 단일 탄소원으로, 1.5 g/L의 KNO₃를 단일 질소원으로 하여 minimal salt 배지에서 *Botrytis cinerea*를 배양하였으며, 기타 배양 조건과 다당류의 침전 조건은 Stahmann 등에 의해 기술된 바와 같다(6). Aniline Blue Fluorochrome은 BioSupplies사 (미국)에서 구입하였다. 기타 시약 및 소모품은 분석급을 사용하였다.

분자량 조절

물리적인 분자량 조절 방법에 사용된 초음파 처리기는 미국 Sonics사의 VC-130 (130 watt) 기기를 사용하였다. 화학적 가수분해 반응에 의한 분자량 조절 방법은 다음과 같다. 동결 건조된 SC-Glucan™ powder를 98%의 formic acid에 suspending 시키고, 약 85°C에서 20분간 처리하였다. 이 반응 시간과 온도가 가수 분해정도를 결정하게 되며 마련되는 저분자 SC-Glucan™의 분자량을 결정하게 된다. 반응이 끝난 후, 반응액 대비 약 1.5배 용량의 ethanol을 첨가하여 가수 분해된 SC-Glucan™을 침전시키고, 원심분리 등의 방법으로 회수하였다. 초순수를 첨가하여 다시 용해시킨 후, 3시간 동안 끓이는 방법으로 잔류된 formic acid를 제거하였다.

생화학적 방법에 사용된 효소는 endo- β -(1,3)-glucanase와 β -(1,6)-glucanase로서, 상업적으로 시판 (미국 Megazyme사, SIGMA-Aldrich사 등)되고 있거나 본 연구자들이 확보하고

있는 β -glucanase 효소들을 이용하여 β -(1,3)-glucan의 저분자화 가능성을 조사 및 고찰하였다.

분자량 측정

분자량은 HPLC system과 refractive index detector를 이용하여 gel filtration chromatography (GFC)의 방법으로 측정하였다. HPLC 시스템은 영린기기의 ACME model을 이용하였으며, GFC column은 미국 Waters사의 Ultrahydrogel-linear, Ultrahydrogel-1000, Ultrahydrogel-2000 등과 Ultrahydrogel-guard column을 사용하였다. 분자량 standard로는 역시 미국 Waters사의 polyethyleneoxide와 pullulan kit를 사용하였다.

BBG의 3차 구조 변화에 대한 관찰

BBG의 3차 구조의 변화는 aniline blue complexing fluorescence 방법(5)을 이용하여 간접적으로 측정하였다. 전형적인 triple helix 구조의 β -(1,3)-glucan인 curdlan과 전형적인 non-ordered 구조의 β -(1,6)-glucan인 pustulan을 표준 물질로서 이용하였다. Triple helix 구조인 경우, aniline과 BBG가 효과적으로 complex를 이루게 되어 높은 fluorescence를 나타내게 되며, triple helix 구조가 사라짐에 따라 fluorescence가 감소하게 된다. 형광광도계는 일본 Shimadzu사의 RF-5301을 사용하였다.

결과 및 고찰

물리적인 방법을 이용한 분자량 감쇄

고분자 다당류에 대한 물리적인 저분자화법으로서 실험실 수준에서 널리 이용되어온 초음파 처리법을 이용하여, BBG의 저분자화를 시도하였다. 초음파 처리강도 2 intensity에서 시간에 따른 분자량의 변화를 gel filtration chromatography로 측정 한 결과는 Fig. 2와 같다.

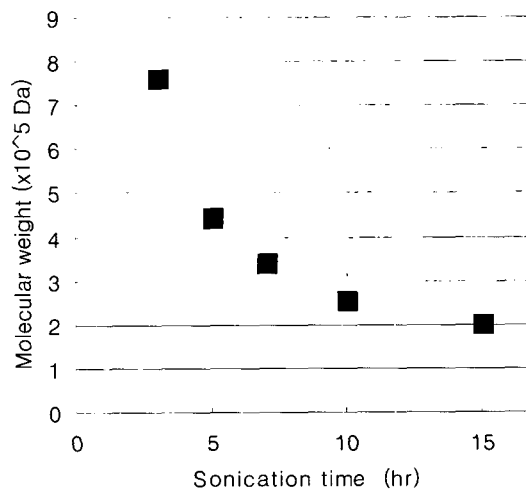


Figure 2. Decrease in the molecular weight of SC-Glucan™(0.4%) by sonication.

초음파 처리에 따라 분자량의 감소가 이루어짐을 관찰 할 수 있었으나, 분자량 감소에 따라 처리 시간에 따른 효율 역시 낮아짐을 확인하였다. (주)태평양의 SC-Glucan™에 대한 실험 결과에 이어서, 균류인 *Botrytis cinerea*에서 추출된 BBG인 Cinerean에 대한 초음파 처리 결과를 조사하였다. 천연 상태로는 Cinerean의 분자량이 SC-Glucan™보다 1/10 수준이다. Cinerean 역시 초음파 처리에 따라 분자량의 감소가 관찰 되었다(Fig. 3). 또한, 낮은 분자량까지 SC-Glucan™보다는 효율적인 처리 결과를 보여주었다. SC-Glucan™이 Cinerean보다 β -(1,6)-branch들이 많고 따라서 triple helix의 3차 구조가 좀 더 강하므로, 분자량 감소의 효율이 낮은 것이라 추정된다. 초음파 처리에 따르는 SC-Glucan™과 Cinerean의 3차 구조 변화를 aniline blue complexing fluorescence 방법(5)으로 조사하였다. 초음파 처리에 따라 aniline complex의 fluorescence가 점차로 감소하는 것을 관찰하였으며, 이는 BBG의 triple helix 3차 구조에 명확한 변화를 일으키는 것으로 판단되고 있다. 이러한 구조 변화의 문제는 향후 저분자화 된 BBG의 효능에 있어서 천연의 경우와 큰 차이를 나타낼 가능성이 있다.

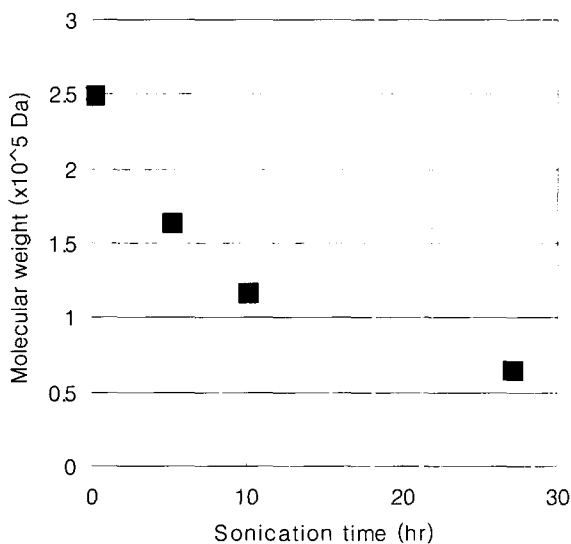


Figure 3. Decrease in the molecular weight of Cinerean by sonication.

화학적 방법을 이용한 분자량 감쇄

본 연구에서는, 산 처리를 통하여 BBG의 분자량을 감소시켰으며, alkaline 조건을 가하여 triple helix인 3차 구조를 dissociation시키고 alkaline 조건을 유지하면서 저분자량의 β -(1,3)-glucans을 분리하였다. 이것을 적절한 pH와 온도의 조건에서 다시 annealing 시켜서 triple helix 구조를 되찾도록 하였다. 상기된 실험 방법에 따라 가수분해 되고 저분자화된 SC-Glucan™ 용액에 NaOH를 첨가하여 pH를 12.5로 맞추었다. 이 과정에서 triple helix 구조의 SC-Glucan™은 단일 chain으로 분리 변성되며, 이후의 ultrafiltration (UF)을 통한 저분자 fraction의 분리가 비교적 용이하게 된다. 우선, cut-off 200,000의 UF membrane을 통하여 고분자 fraction을 제거하고 난 후 cut-off 20,000의 membrane을 이용하여 oligomeric fraction을 제거하였다. 마련된 분자량 200,000이하의 알칼리성 SC-Glucan™

용액에, 고농도의 염산을 첨가하여 pH를 7.0으로 맞추고, 60°C에서 20분간 고온처리하며 triple helix 구조로 re-annealing 시켰다. 이후 cut-off 20,000 UF membrane을 통하여 잔류한 NaCl을 제거하고 농축하였다. 제조된 저분자 SC-Glucan™의 평균 분자량은 gel filtration chromatograph로부터 약 90,000으로 확인되었다. 화학적 처리 후의 conformation 변화를, 전형적인 triple helix 구조의 β -(1,3)-glucan인 curdlan과 전형적인 non-ordered 구조의 β -(1,6)-glucan인 pustulan을 control sample로 하여, aniline blue complexing fluorescence 방법(5)으로 측정하였다. 정상적인 BBG의 경우 높은 fluorescence를 보이게 되지만, NaOH를 농도별로 첨가하게 되면 triple helix의 dissociation에 따라 fluorescence가 감소하게 된다. Table 1의 결과로부터, 마련된 저분자 SC-Glucan™이 화학적 처리에도 불구하고 효과적으로 triple helix 구조를 유지하고 있음을 확인할 수 있다. 그러나 annealing 기술에 의한 triple helix 구조의 유지에도 불구하고, β -(1,3)-glucan의 약리적 효능에 필수적인 β -(1,6)-branch의 분지도는 화학적 처리에 의해 상당량 감소되었음이, 현재 진행되는 실험에서 확인되고 있다.

Table 1. The conformation of β -(1,3)-glucans after acid hydrolysis, observed by aniline blue complexing fluorescence

Sample	Fluorescence (-)		
	NaOH 25mM	NaOH 100mM	NaOH 150mM
Blank	0	1	0
Curdlan	50.9	39.5	35.0
Pustulan	8.8	8.0	7.9
SC-Glucan™ after acid hydrolysis	42.0	27.5	21.9

효소적 방법을 이용한 분자량 감쇄

기질 특이적인 효소 반응을 이용하여 β -(1,3)-glucan을 가수분해하는 것이야말로, β -(1,3)-glucan의 3차 구조나 β -(1,6)-의 분지도를 유지하면서도 분자량을 효과적으로 감소시킬 수 있는 가장 산업화 가능한 기술이라 할 수 있다. BBG를 효소적으로 가수분해하여 분자량을 감소시킬 때, 분자 구조상 가장 난관이 되는 부분이 β -(1,6)-branch 부분일 것이다. 오직 β -(1,3)-chain일 경우엔 endo- 혹은 exo- β -(1,3)-glucanase로 가수분해하면 될 것이고, 오직 β -(1,6)-chain일 경우엔 역시 endo-나 exo- β -(1,6)-glucanase로 가수분해하면 되겠으나, β -(1,6)-branch의 부분은 효소 분자 구조의 active site를 고려할 때, 두 효소 모두가 분자적으로 접근하기 힘든 위치일 것이다.

따라서, 우선, 분지도가 낮은 Cinerean을 대상으로, 본 연구자들이 확보하고 있는 endo- β -(1,3)-glucanase를 이용하여 가수분해 반응을 조사하였다. 최적의 효소 반응 조건에서 일정 시간의 반응 후에, 열처리를 통하여 효소를 불활성화 시킴으로써 반응을 중지하였으며, 반응의 산물은 GFC-HPLC를 통하여 분리하고 RI detector 검출을 통하여 산물의 분자량 분포를 측정하였다. 일정 시간의 효소 반응에 따른 가수분해 산물은 정규 분포적인 분자량 분포를 나타내었으며, 반응 시간에 따라 평균 분자량이 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 또한, 낮은 효소량 (0.01 unit/mL)을 투여하여 반응을 서서히 진행시킴으로써, oligomeric fragment의 생성을 억제할 수 있었다. 효소 반

응 산물은 비교적 넓은 범위의 정규적 분자량 분포를 보였으나, aniline blue complexing fluorescence 조사 결과 3차 구조의 변화는 관찰되지 않았다. 분자량 100,000 Da 이하의 저분자당인 경우엔, 상기한 화학적 처리법에서와 같이 UF membrane을 이용한 방법이 분리정제에 이용될 수 있었으나, 수십만 Da 정도의 저분자 β -(1,3)-glucan의 경우엔 UF 방법이 효과적이지 못하였다. 이제까지 기술한 BBG 저분자화 기술 자체와 함께, 필요한 저분자 BBG 분획을 분리 정제하는 기술이 산업화의 관건이라 할 수 있겠다.

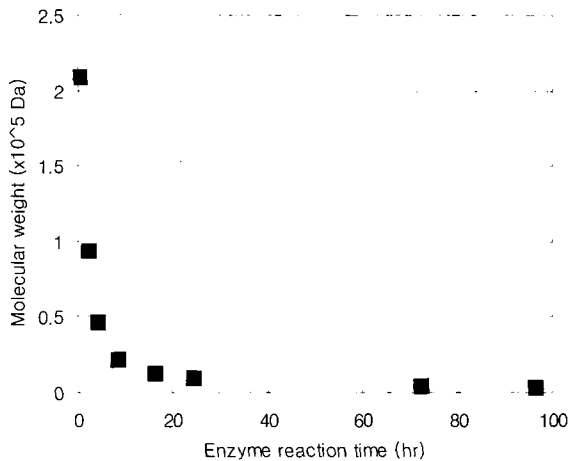


Figure 4. Decrease in the molecular weight of Cinerean by treatment of endo- β -(1,3)-glucanase.

분지도가 낮은 Cinerean의 경우와 달리, 분지도 DB=0.3에 달하는 SC-Glucan™에 대해서도 효소에 의한 분자량 감소 여부를 조사하였다. 상업적으로 시판되고 있거나 본 연구자들이 취득하고 있는 십여 가지 β -(1,3)-glucanase를 이용하여 효소반응을 수행하여 보았으나 효과적인 가수분해 반응이 관찰되지 않았다. 특히, β -(1,6)-glucanase를 이용하더라도 β -(1,6)-branch에서 분리되는 glucose가 관찰되지 않았다. 이는 β -(1,6)-branch 부분에서 endo- β -(1,3)-glucanase나 endo- β -(1,6)-glucanase가 효과적으로 작용하지 못하고 있음을 의미한다.

요 약

분자량이 1 MDa 이상인 β -(1,6)-branched β -(1,3)-glucan의 효과적인 저분자화 방법을 물리적인 방법, 화학적인 방법, 효소적인 방법으로 나누어 고찰하였다. 물리적인 방법인 초음파 처리의 경우엔, 저분자화가 진행됨에 따라 감소하는 저분자화의 효율로 인하여 산업적으로 일정 수준이하의 BBG을 수득하기에 난점이 있으며, 또한 3차 구조의 변성 문제도 주목해야 할 것이다. 화학적인 산 처리법의 경우, 분자량 100,000 Da 이하의 BBG을 산업적으로 수득하기에는 유리할 수 있으나, 약리적 효능에 결정적인 β -(1,6)-branch의 파괴가 단점이라 할 수 있다. 효소적인 방법이야말로 triple helix 3차 구조의 변성 문제나 β -(1,6)-branch의 감소 문제를 피하며, 효과적으로 분자량을 감소시킬 수 있음이 확인되었으나, 아직 분지도가 높은 β

-(1,6)-branched β -(1,3)-glucan까지 효과적으로 가수분해 할 수 있는 효소를 screening 하지는 못하였다.

감 사

본 연구는 교육인적자원부에서 지원하는 2002년도 전문대학 재정지원사업의 특성화프로그램 사업비로 진행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Kraus, J. and G. Franz (1991), β (1 \rightarrow 3)Glucans: antitumor activity and immunostimulation, In *Fungal Cell Wall and Immune Response*. J. P. Latge and D. Boucias Eds; NATO ASI Series H53, Springer, Berlin, pp431-444.
2. Jamas, S., D. D. Easson Jr., G. R. Ostroff and A. B. Onderdonk (1991), PGG-Glucans, A novel class of macrophage activating immuno modulators ACS Symp. Ser., 469, 44-51.
3. Kougias, P., D. Wei, P. J. Rice, H. E. Ensley, J. Kalbfleisch, D. L. Williams, and I. W. Browder (2001), Normal human fibroblasts express pattern recognition receptors for fungal (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans, *Infection & Immunity* 69, 3933-3938.
4. Bohn, J. A. and J. N. Bemiller (1995), (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships, *Carbohydrate Polymers* 28, 3-14.
5. Adachi, Y., N. Ohno, Y. Suzuki, K. Sato, T. Yadomae, and S. Oikawa (1988), Degradation with formic acid of conformationally different (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans isolated from liquid-cultured mycelium of *Grifola frondosa*, *Carbohydr. Res.* 177, 91-100.
6. Stahmann, K., P. Pielken, K. Schimz, and H. Sahn (1992), Degradation of extracellular (beta)-(1,3)(1,6)-d-glucan by *Borytys cinerea*, *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3347-3354.