

황 흡착 알긴산의 *Lactobacillus acidophilus* 성장에 미치는 영향 및 항 돌연변이 작용

- 연구노트 -

강경금 · 박난희 · 김정목[†]

목포대학교 생명공학부 식품생물공학전공

The Antimutagenic Activity of Sulfated Alginate and Its Effect on the Growth of *Lactobacillus acidophilus*

Kyung-Kum Kang, Nan-Hee Park and Jeong-Mok Kim[†]

Dept. of Food Science and Biotechnology, Mokpo National University, Chonnam 534-729, Korea

Abstract

The alginate extracted from *Hizikia fusiforme* by the acid alkali soluble alginate (AASA) extraction method was reacted with Na₂SO₄. The amount of sulfate absorbed in the 3% alginate solution was determined about 18,435 ppm by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. Both alginate and S-alginate stimulated the growth of *Lactobacillus acidophilus* in MRS broth and peptone water medium. The addition of S-alginate to the media showed the higher bacterial numbers than alginate supplement. There was no mutagenic activity of S-alginate in the Ames test using the *Salmonella Typhimurium* TA98 and TA100 strains. The S-alginate showed suppressive effect against 2-NF and MMS of mutagens.

Key words: alginate, *Lactobacillus*, antimutagenicity

서 론

해조류의 다당류에는 조체 골격을 구성하는 구조 다당류인 셀루로즈와, 세포벽과 세포질 및 세포간격을 총진하는 점질 다당류가 있다. 셀루로즈는 중성다당에 속하는 반면, 알긴산처럼 카르복실기 혹은 fucoidan 같은 황산기가 결합되어 있는 산성기를 가진 구성당은 산성다당으로 구분되는 데 해조류의 산성다당의 다양한 생리활성 작용이 최근 활발히 연구되고 있다. 갈조류의 다당류는 전물기준으로 약 30~67% 정도 차지하며 이들 중 60~80%가 알긴산이며 이외에도 fucoidan 및 중성다당인 laminaran 등으로 구성되어 있다(1). 알긴산은 β -D-mannuronic acid(M)와 α -L-guluronic acid(G)가 α -1, 4결합 또는 β -1, 4결합한 hetero형 직쇄 다당류이고(2), fucoidan은 L-fucose와 황산에스테르가 주요 구성성분으로 황산기를 많이 함유하고 있다. 최근에는 이들 다당류가 식품, 의학 분야에서 활용을 위해 많은 연구가 행해지고 있는데, 갈조류에서 추출한 황산기를 함유한 산성다당이 혈액 응고저지 작용이 있는 것으로 밝혀지고 있으며(3), 혈액 중에 존재하는 함황 산성다당인 heparin과 생리적 특성이 유사하여 항 혈액응고 작용을 나타낼 뿐만 아니라 항암 작용 등 다양한 생리적 기능이 밝혀지고 있다(4,5). 항응고작

용에는 sulfate가 매우 중요한 역할을 함으로 해조류로부터 sulfated polysaccharide에 관한 연구가 진행되어졌다(6). 뿐만 아니라 알긴산의 혈중 콜레스테롤 저하(7,8), 고지혈증 예방의 역할과(9) M/G 비율의 증가에 따른 항증양활성에 대한 연구도 행하여졌다(10). 알긴산은 장내 유해 미생물의 억제시키고 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*의 증식을 촉진한다고 하였으며(11,12), 다시마 알긴산의 가열 가수분해에 따른 분자량 50,000 Da의 저분자 알긴산은 쥐의 장내세균 중 유해균의 증식을 억제하고 유익균의 증식을 촉진시켜 장내 미생물 균형을 개선시키는 역할을 하였다(13). 본 연구의 목적은 황산기를 함유하는 다당류가 여러 가지 생리적인 기능이 있다는 것이 알려져 있으므로 이를 토대로 알긴산에 황을 인위적으로 붙여 *Lactobacillus acidophilus*의 성장에 어떠한 영향을 미치는지에 대하여 알아보았고 sulfated alginate의 돌연변이원성과 항돌연변이성에 대하여 살펴보았다.

재료 및 방법

황 흡착 및 정량

전남 완도에서 6월에 수확된 건조된 톳(*Hizikia fusiforme*) 분말로부터 Acid Alkali Soluble Alginate(AASA) 추

[†]Corresponding author. E-mail: jmkim@mokpo.ac.kr
Phone: 82-61-450-2427, Fax: 82-61-454-1521

출방법(14)에 의해 얻어진 알긴산을 3%의 용액으로 만든 후 0.1 M Na₂SO₄에 첨가하여 실온에서 6시간 동안 교반하면서 반응하였다. 반응이 끝난 후 1:1(w/v)의 비율로 ethyl alcohol을 첨가해서 sulfate를 흡착한 알긴산 겔을 원심분리해서 회수한 다음 ethyl alcohol로 여러 번 세척해서 정제된 침전물만 얻어 전조하였다. 전조된 알긴산을 2% HNO₃용액에 교반하면서 용해해서 유리여과기로 여과한 다음 일정량으로 하여 시험용액으로 하였다. 그런 다음 Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry(ICP-AES, Spectro analytical instruments, Germany)를 이용해서 sulfate를 정량하였다.

S-alginate의 유산균에 대한 영향

본 실험에 사용된 균주는 한국종균협회에서 분양받은 *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3151를 사용하였고 MRS broth에 균을 접종해서 35°C 수육조에서 18시간 배양하였다. Sulfate가 부착된 알긴산(S-Alginate)을 MRS broth(Oxoid Co., England)에 각각 0.25, 1, 2% 농도가 되게 준비하였다. 대조구로서 MRS broth에 sulfate가 부착되지 않은 툷에서 추출한 알긴산을 사용하였다. 배양한 균주를 멸균된 각각의 배지에 0.1 mL씩 접종하고 35°C 수육조에서 100 rpm으로 진탕하면서 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24시간별로 배양하면서 미생물 수를 측정하였다. 한편 유산균의 배지로 많이 이용되는 MRS broth는 Mg₂SO₄가 0.2 g/L의 비율로 함유되어 있기 때문에 sulfate가 전혀 함유되어 있지 않는 Peptone water 배지를 이용하여 S-alginate를 농도별로 준비한 후 균주를 접종하고 0, 1, 2, 4, 8, 12, 18, 24, 30, 36, 40시간별로 *Lactobacillus acidophilus*의 성장에 미치는 영향을 조사하였다.

돌연변이원성 및 항돌연변이원성 실험

본 실험에 사용된 균주는 *Salmonella Typhimurium*의 frame shift 변이균주인 TA98과 base-pair substitution 변이균주인 TA100을 Moltox회사(Boone, NC, USA)로부터 구입하여 Marson과 Ames의 방법(15)에 따라 histidine 요구성, deep rough(rfa) 돌연변이, crystal violet 감수성, UV 감수성(*uvrB*), R-factor에 의한 ampicillin 내성, 자연발생 복귀 돌연변이수 등의 유전적 특징을 확인한 후에 본 실험에 이용하였다. 직접 돌연변이원으로 사용된 2-nitro fluorene(2-NF)와 methyl methane sulfonate(MMS), 균주 및 양성 돌연변이물질을 용해 및 희석하는데 사용된 DMSO는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였고 Vogel-Bonner minimal glucose agar plate, top agar, nutrient broth 및 bacto agar는 Difco(Detroit, MI, USA)에서, nutrient agar No 2는 Oxoid(Hampshire, England)에서 구입하였다. 멸균된 glass cap tube에 0.5%, 1%, 2%로 준비된 S-alginate 시료를 25 µL/plate씩 가하고 여기에 *Salmonella Typhimurium* TA98 또는 TA100을 0.1 mL 가한 다음 0.25 M phosphate buffer(pH 7.4) 0.5 mL를 넣었다. 이를 His/Bio이 첨가된 2.5

mL Top Agar(45°C)에 넣고 잘 혼합한 후 미리 조제해 놓은 minimal glucose agar plate 위에 도말한 후 37°C에서 48시간 배양하여 생긴 복귀돌연변이(His⁺ revertant colony)수를 세어서 대조구에 대한 mutagenicity ratio(MR)로 돌연변이원성의 유무를 판정하였다. 항 돌연변이원성 실험은 Ames Assay를 개량한 pre-incubation법에 따라 행하여졌고 돌연변이 유발물질로 TA98과 TA100 균주에 대해서는 2-NF와 MMS가 각각 사용되어졌다. 준비된 S-alginate는 직접 돌연변이원과 함께 30분간 배양한 후 돌연변이원성 실험과 동일한 조건으로 실시하여 생긴 복귀돌연변이수를 세어 항 돌연변이작용을 살펴보았다. 항 돌연변이 활성을 변이원 물질의 활성에 대한 시료의 억제율(inhibition %)로 표현하였다. 각각의 실험은 2회 반복 4 plates씩 실시하였다.

결과 및 고찰

알긴산에 sulfate 흡착

톳으로부터 산·알칼리(AASA) 방법으로 추출한 알긴산과 반응시킨 sulfate가 얼마나 흡착되었는지 알아보기 위해서 표준곡선을 구하고 ICP-AES로 측정을 한 결과 3% alginate 용액에서 18,435 ppm의 농도의 sulfate가 검출되었다.

Lactobacillus 성장에 대한 sulfated alginate의 영향

해조류의 많은 기능적 특성은 sulfate기가 중요한 역할을 한다고 알려져 있는데 alginate는 황산기를 가지고 있지 않아 그 기능성이 황산기를 함유한 다당류에 비해 부족하다고 할 수 있다. 따라서 알긴산에 인위적으로 sulfate를 부착하도록 한 후 이들이 *Lactobacillus*의 성장에 미치는 영향을 알아보았다. MRS broth와 peptone water 배지에 있어서 S-alginate와 alginate를 0.25, 1, 2% 농도별로 첨가하여 *Lactobacillus acidophilus*를 접종한 후 배양하면서 유산균의 성장에 대한 영향을 Fig. 1에 나타내었다. 비록 초기 접종균수에서 차이는 있지만 *Lactobacillus*는 peptone water 배지보다도 MRS broth에서 빠른 성장을 보였고 대조구와 비교하여 alginate의 첨가는 확실히 *Lactobacillus*의 성장에 영향이 있음을 보여주고 있다. 최적배지인 MRS broth에서는 8시간 경과 후 *Lactobacillus*의 수가 최고를 나타내었는데 0.25% alginate 첨가 배지에서는 약 5.37×10^9 CFU/mL, 1%에서는 5.75×10^9 CFU/mL, 2%에서는 6.61×10^9 CFU/mL로서 alginate의 농도가 높을수록 많은 균수를 나타내었다. MRS broth와 peptone water 배지 모두에서 S-alginate를 첨가한 것도 유산균의 성장을 증가시키는 것으로 나타났으며, 0.25% 농도에 있어서는 S-alginate와 alginate를 첨가한 경우 유산균의 성장은 비슷한 값을 나타내었으나 peptone water 배지에서 S-alginate의 첨가는 8시간 경과 후 1%와 2% 농도의 경우 균수가 각각 1.35×10^8 CFU/mL와 2.24×10^8 CFU/mL를 나타내어 alginate의 첨가시 균수 7.08×10^7 CFU/mL와 7.94×10^7 CFU/mL에 비해 높게 나타났다. *Lactobacillus*의

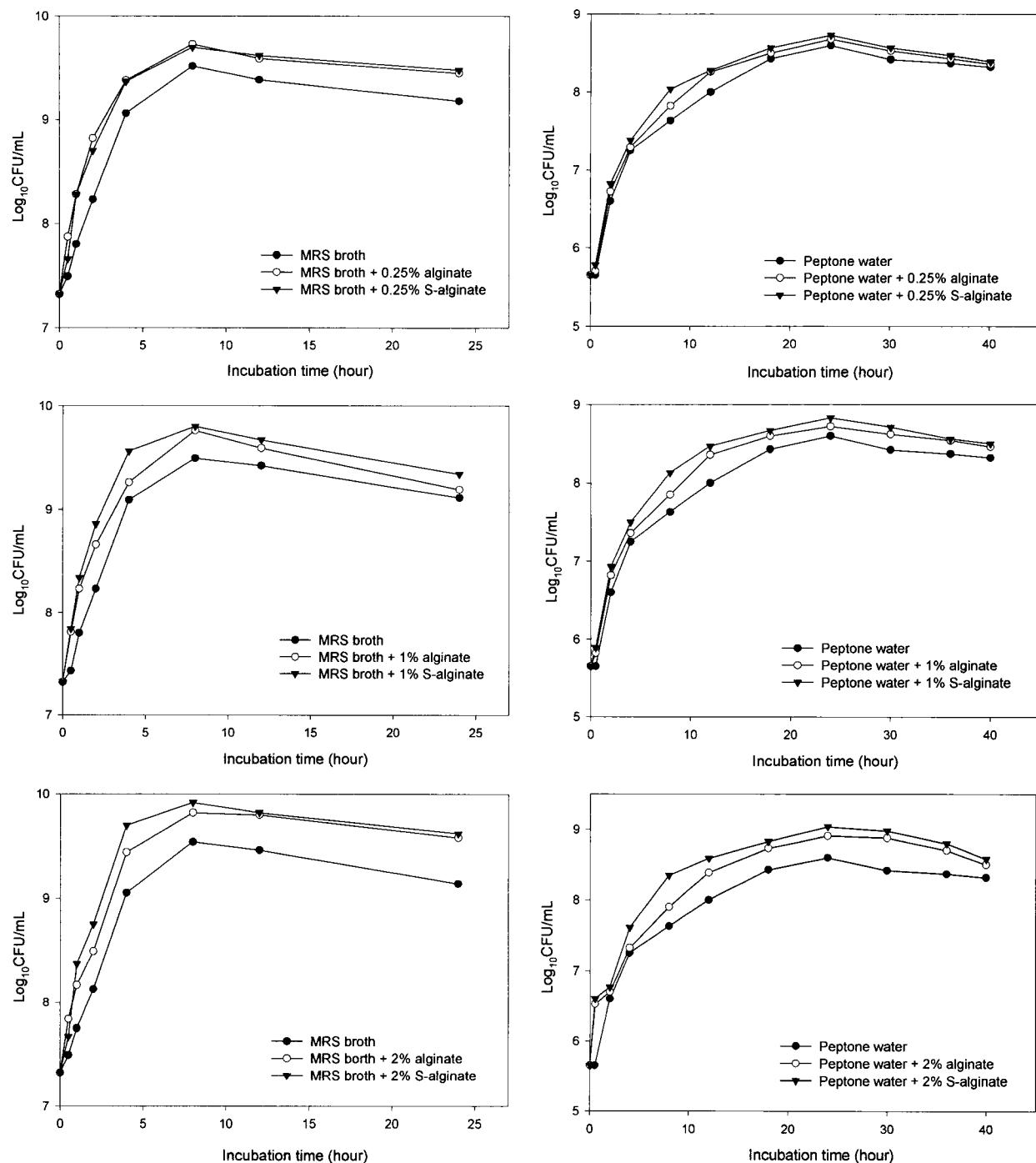


Fig. 1. Effect of the S-alginate on the growth of *Lactobacillus acidophilus* in MRS broth and peptone water at 35°C. Values represent 2 separate experiments.

성장과정에서 대수기에서는 S-alginate 첨가가 alginate에 비해 균의 성장이 약간 빠르게 나타났으며 균의 성장이 정지기에 도달한 후에는 큰 차이를 보이지 않았다.

돌연변이원성 및 항 돌연변이원성

S-alginate의 안전성을 확인하기 위해서 Ames test에 의한 돌연변이원성을 실험한 결과는 Table 1에 나타나 있다.

Salmonella Typhimurium TA98은 frame shift형의 돌연변이, TA100은 base-pair substitution형의 돌연변이를 받고 복귀변이하여 히스티딘 비요구성(His^+)으로 변하는 것을 이용한 것으로 황이 부착된 0.5, 1, 2% alginate에서 사용된 두 균주 모두 돌연변이성은 나타나지 않았다. Mutagenicity ratio(MR) 값들은 0.99에서 1.20의 값을 보여 주었는데 이것은 전혀 독성을 내포하고 있지 않다는 것을 의미한다. 본 실험

Table 1. Mutagenicity of S-alginate from *Hizikia fusiforme* to *Salmonella Typhimurium* TA98 and TA100

Samples	Dose/ plate	No. of revertant <i>S. Typhimurium</i> colonies (CFU/plate) ¹⁾			
		TA98	MR ²⁾	TA100	MR
Buffer	25 μL	50±5	-	153±20	-
DMSO	25 μL	46±6	-	164±31	-
0.5% S-Alg	25 μL	56±2	1.12	157±14	1.03
1% S-Alg	25 μL	52±4	1.12	152±18	0.99
2% S-Alg	25 μL	58±8	1.16	184±24	1.20

¹⁾Mean±standard deviation from eight plates of duplicate trials.²⁾Mutagenicity ratio (MR) is the number of revertants per test dose divided by revertants per controls.**Table 2. Antimutagenicity of S-alginate from *Hizikia fusiforme* to *Salmonella Typhimurium* TA98 and TA100**

Samples	Dose/ plate	No. of revertant <i>S. Typhimurium</i> colonies (CFU/plate) ¹⁾			
		TA98	Inhibition %	TA100	Inhibition %
2-NF	30 μL	3488±215	-	-	-
MMS	30 μL	-	-	1695±75	-
0.5% S-Alg	25 μL	2981±198	14.5	11496±132	11.7
1% S-Alg	25 μL	3012±340	13.6	1433±114	15.5
2% S-Alg	25 μL	2657±351	19.2	1404±90	17.2

¹⁾Mean±standard deviation from eight plates of duplicate trials. MMS (methylmethanesulfonate) and 2-NF (2-nitrofluorene) were dissolved in DMSO (dimethylsulfoxide). The concentration of mutagens was 5 μg/25 μL.

에서는 쥐의 간에서 추출한 대사활성효소 시스템인 S-9 mix를 사용하지 않았다. 따라서 직접변이원으로서 TA98을 위해서는 2-NF, TA100을 위해서는 MMS를 사용하였는데 직접변이원에 S-alginate 첨가구가 TA98에 대해서는 14~19%의 돌연변이 억제 효과를 나타내었고 TA100에 대해서는 12~17%의 억제를 보였다(Table 2). 그러나 S-alginate 농도에 따른 유의성은 크게 없었으며 이는 알gin산에 부착된 황의 함량이 본 실험의 농도 범위에서는 큰 차이가 없었기 때문으로 여겨진다.

요 약

통으로부터 산·알칼리(AASA) 방법으로 추출한 알gin산에 인위적으로 sulfate를 흡착시킨 후 ICP-AES를 이용해서 확인한 결과 3% alginate 용액에서 18435 ppm 농도의 sulfate가 검출되었다. 배지 자체적으로 황을 함유하고 있는 MRS broth와 황이 없는 peptone water배지에 S-alginate와 alginate를 0.25, 1, 2% 농도별로 첨가하여 *Lactobacillus acidophilus*를 접종한 후 배양하면서 유산균의 성장을 대한 영향을 살펴 본 결과 모든 농도에서 이들 배지에 S-alginate를 첨가한 것이 유산균의 성장을 증가시키는 것을 알 수 있었다. S-alginate와 alginate를 0.25% 첨가한 경우 유산균의 성장은 비슷한 값을 나타내었으나 농도가 증가할수록 S-alginate를 첨가한 군이 alginate만 첨가한 군보다는 유산균

의 성장을 늘리는 것으로 나타났다. Ames test를 통해서 S-alginate는 돌연변이성을 전혀 나타내지 않았으며 항 돌연변이성은 직접변이원에 대하여 TA98군주는 14~19%, TA100 군주에 대해서는 12~17%까지의 억제율을 보였으며 2%의 S-alginate가 가장 높은 억제율을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부와 목포시에서 지원하는 기술개발 용역사업(해조류 가공과 기능성 물질 개발연구) 연구 결과의 일부로 연구비 지원에 감사하며, 연구수행에 많은 도움을 준 한국과학재단지정 지역협력연구센터(RRC)인 목포대학교 식품산업기술연구센터에도 감사드립니다.

문 헌

1. Lahaye M. 1991. Marine algae as sources of fibers: Determination of soluble and insoluble dietary fiber contents in some sea vegetables. *J Sci Food Agric* 54: 587-594.
2. Nishide E, Kinoshita Y, Anzai H, Uchida N. 1988. Distribution of hot-water extractable material, water-soluble alginate and alkali-soluble alginate in different parts of *Undaria pinnatifida*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54: 1619-1622.
3. Nishino T, Takabe Y, Nagumo T. 1994. Isolation and partial characterization of a novel β-D-galactan sulfate from the brown seaweed *Laminaria angustata* var *longissima*. *Carbohydr Polym* 23: 165-173.
4. Kim KI, Seo HD, Lee HS, Jo HY, Yang HC. 1998. Studies on the blood anticoagulant polysaccharide isolated from hot water extracts of *Hizikia fusiforme*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 1204-1210.
5. Hajime O, Yasushi S, Kanko Y, Isamu U, Koichi K. 1994. Possible antitumor promoting properties of marine algae and *in vivo* activity of Wakame seaweed extract. *Biosci Biotech Biochem* 56: 994-999.
6. Nishino T, Aizu Y, Nagumo T. 1991. The influence of sulfate content and molecular weight of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome* on its antithrombin activity. *Thrombosis Res* 64: 723-730.
7. Watanabe K, Iwata K, Tandai Y, Nishizawa M, Yamagishi T, Yoshizawa I. 1992. Effects of soluble alginates on the excretion of cholesterol, Trp-p-1 and aflatoxin B1 in rats. *Jpn J Toxicol Environ Health* 38: 258-262.
8. Tsuji K, Oshima S, Matsuzaki E, Nakamura A, Inami S, Tezuka T. 1968. Effect of polysaccharides on cholesterol metabolism (Part 1). Studies on konnyaku powder, sodium alginate and pectin. *Jpn J Nutr* 26: 113-122.
9. Tsai AC, Elias J, Kelley J, Lin RC, Robson JRK. 1976. Influence of certain dietary fibers on serum and tissue cholesterol levels in rats. *J Nutr* 106: 118-123.
10. Fujihara M, Nagumo T. 1993. An influence of the structure of alginate on the chemotactic activity of macrophages and the antitumor activity. *Carbohydr Res* 243: 211-216.
11. Fujii T, Kuda T, Saheki K, Okuzumi M. 1992. Fermentation of water-soluble polysaccharides of brown algae by human intestinal bacteria *in vitro*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58: 147-152.
12. Kuda T, Oyamada A, Fujii T. 1994. Effects of depolymerized sodium alginate on human fecal and intestinal

- environment. *Nippon Suisan Gakkaishi* 60: 85-90.
13. Kim YY, Cho YJ. 2001. Studies on physicochemical and biological properties of depolymerized alginate from sea tangle, *Laminaria japonicus* by thermal decomposition. 6. Effects of depolymerized alginate on fecal microflora in rats. *J Korean Fish Soc* 34: 77-83.
14. Haug A, Larsen B, Smidsrød O. 1974. Uronic acid sequence in alginic acid from different sources. *Carbohydr Res* 32: 217-225.
15. Maron DM, Ames BN. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 113: 173-215.

(2004년 1월 5일 접수; 2004년 3월 24일 채택)