한국생물공학회지 제20권 제5호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 20, No. 5, 355-358(2005)

Bacteroides fragilis Roid8의 α-fucosidase 조효소 특성

[1]허 순 영 · [2]박 명 수 · [1,2]권 빈 · [1]† 지 근 억
[1]서울대학교 식품영양학과, [2](주)비피도 기술연구소, † 서울대학교 생활과학연구소
(접수 : 2005. 4. 18., 게재승인 : 2005. 7. 6.)

Characterization of Crude α-Fucosidase from *Bacteroides fragilis* Roid8

Soon Young Heo[1], Myung Soo Park[2], Bin Kwon[1,2], and Geun Eog Ji[1]†
[1]Department of Food and Nutrition, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
[2]Research Center, BIFIDO Co. Ltd., Seoul 151-057, Korea
† Research Institute of Human Ecology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
(Received : 2005. 4. 18., Accepted : 2005. 7. 6.)

Bacteroides is the most predominant bacteria in the human large intestinal tract. *Bacteroides fragilis* Roid8 isolated from a Korean faecal sample showed high α-fucosidase activity compared to other bacterial species. The optimized meidum for the production of α-fucosidase from *B. fragilis* contained BHI 37 g, hemin 10 mg, cysteine 0.5 g, resazurin 1 mg, vitamin K 1 mg, and starch 5 g per 1 L. The crude α-fucosidase obtained through DEAE-sepharose and CM- cellulose chromatography showed optimum temperature and pH at 40℃ and 7.0, respectively. Among several metals, Co^{++} and Zn^{++} showed strong inhibition on enzyme activity.

Key Words : *Bacteroides fragilis*, α-fucosidase, characterization

서 론

*Bacteroides*는 그람음성, 편성 혐기성간균으로서 유아기 이후로부터 노년에 이르기까지 인체의 장내에 가장 많이 존재하는 균이며 장내에서 면역의 형성 및 장내 균총의 유지에 가장 중요한 역할을 한다(1, 2). 장외의 장기로부터의 임상검체나 수술 후 감염에 관여하는 기회 감염균으로서도 역시 혐기성균 중 가장 높은 빈도를 차지하고 있다(3, 4). 태아는 모체 속에서는 무균상태로 있다가 출생과 더불어 많은 균이 장내에 서식하게 되는데 일반적으로 사람의 장내에는 약 100 조개 이상의 세균이 서식하고 있으며 배변고형물의 30% 이상을 차지하게 된다(5). 이 중 혐기성 세균이 99% 이상이라는 것이 세균의 배양기술의 발달로 밝혀졌다. 신생아는 모유를 먹을 경우 약 5일 경에는 혐기성 세균인 *Bifidobacterium*이 장내에 정착하여 상재 세균으로서 자리 잡고 장내세균의 90%를 차지하게 된다. 유아가 성장하여 식이를 이유식으로 바꾸면서 서서히 장내 균총이 변화하여 점차 성인과 같은 균총을 갖게 되는데 *Bacteroides*가 최우세 균주가 되고 *Eubacterium, Peptococcus, Bifidobacterium* 등의 순으로 분포하게 된다. *Bifidobacterium*의 종류도 유아형으로부터 성인형의 *B. adolesentis, B. longum* 등으로 바뀌게 된다. 이들 균총의 형성과 식이와의 관계를 보면 육식을 주로 섭취하는 사람들은 채식을 주로 섭취하는 사람들에 비하여 *Bifidobacterium*의 수가 감소하고 *Bacteroides*와 *Clostridium* 등의 수가 증가하는 것으로 조사되었다(6). 이들 균이 장내에 정착하는 것은 식이 외에도 장세포 부착인자, 장벽으로부터 분비되는 mucin, 담관으로부터 분비되는 담즙산, 산화환원 전위, pH 등의 영향을 받는다(7, 8).

위와 같이 *Bacteroides*는 이유식 이후로 지속적으로 장내의 가장 우세한 균총임에도 불구하고 인체 장내 세균으로서의 *Bacteroides*에 대한 연구는 미미하며 한국인 분류 균주에 대한 α-fucosidase의 연구는 보고된 바 없다. 본 연구에서는 식이성분과 장 점막에 존재하는 fucose 기질의 장내 생리 대사를 연구하기 위한 일환으로 한국인의 분변으로부터 분리한 *Bacteroides fragilis* Roid8의 α-fucosidase 효소활성과 생산조건을 조사하였다.

† Corresponding Author : Department of Food and Nutrition, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
Tel : +82-2-880-8749, Fax : +82-2-880-6282
E-mail : geji@bifido.com

재료 및 방법

균주 및 배양

실험 균주는 한국인의 분변으로부터 *Bacteroides*용 VA선택 배지에서 분리되어 서울대학교 식품영양학과 식품미생물실에 보관중인 *Bacteroides fragilis* Roid8 균주를 사용하였다(9). *B. fragilis* Roid8를 생산하기 위한 기본배지로는 혐기성 세균의 생육배지인 Brain Heart infusion (BHI)를 이용하였다. 배양조건으로 혐기적 상태를 유지하기 위하여 혐기적 배양 상태를 유지시켰다. 혐기 상태를 유지하기 위하여는 혼합 가스 (CO_2 5%, N_2 95%)를 활용하거나 ANOXOMAT WS8000 system (MART Microbiology BV, Lichtenvoorde, the Netherlands)를 활용하였다. 일반적으로 배양은 37℃에서 이루어졌다. 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 1 L 배지당 BHI 37 g, hemin 10 mg, cysteine 0.5 g, resazurin 1 mg, vitamin K 1 mg, starch 5 g을 함유하였고 0.45 μm 여과 살균한 각각의 탄소원을 0.5% 농도가 되도록 고압멸균한 배지에 첨가하였다.

효소역가 측정

α-Fucosidase 활성은 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0), 10 mM P-nitropheny1(PNP)-α-fucoside, 효소 용액을 각각 100 μl 첨가하여 일정 온도에서 반응시킨 후 Na_2CO_3 600 μl를 첨가하여 반응을 중지시키고 400 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소역가 1 unit는 분당 1 μmole의 PNP를 생산하는 효소의 양으로 정하였다. 여러 종류의 glycosidase 활성 측정도 각각의 해당 기질을 이용하여 α-fucosidase 효소의 활성 측정에 준하여 수행하였다.

α-fucosidase의 조효소액 분리 및 효소 특성

배양액을 3,000 x g에서 30분 원심분리하여 균체를 모은 후 10 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 2회 세척하고 균체를 동일 완충액에 현탁하여 10분간 초음파 파쇄기로 파쇄한 것을 12,000 x g에서 3시간 원심분리하여 상등액을 준비하였다. 이 상등액을 한외 여과하여 농축시켰다. 위 효소액을 상기완충용액으로 평형화시킨 DEAE-sepharose column (3.0 X 30.0 cm)에 주입하고 20 mM phosphate buffer (pH 7.4)를 24 ml/hr 유속으로 단백질부분을 씻어낸 다음 흡착 단백질 부분은 NaCl gradient (O-1M)로 24 ml/hr 속도로 5 ml/fraction씩 받았다. DEAE-sepharose column에서 효소활성이 높은 분획을 모아 Amicon사의 한외여과지로 농축한 후 pH 6.8로 평형화시켜 CM-cellulose column에 주입한 후 24 ml/hr 유속으로 3 ml/fraction씩 받았다. CM에서 효소활성이 높은 분획을 모아 농축시킨후 조효소액으로 사용하였다. 각 효소액의 최적온도는 20℃에서 70℃까지 10℃ 간격으로 효소반응온도를 달리하여 각 기질에 대한 효소의 역가를 측정한 뒤 상대 활성을 측정하였다. 각 효소액의 최적 pH는 0.1 M citrate-Na_2HPO_4 buffer를 사용하여 pH 4.0-9.0에서 각 기질에 대한 효소의 역가를 측정한 뒤 상대 활성을 측정하여 결정하였다. 무기염류의 영향을 조사하기 위하여는 각각 10 mM $AlCl_3$, $BaCl_2$, $CaCl_2$, $CoCl_2$, $CuCl_2$, $FeCl_3$, $MgCl_2$, $MnCl_2$, $ZnCl_2$를 첨가한 후 효소 활성을 조사하였다.

결과 및 고찰

사용 균주의 특성

Ji 등(9)의 연구에서 *B. fragilis* Roid8은 *B. fragilis* ATCC25285과 생리적인 특징 및 항생제 내성 등에서 거의 동일한 균주로 보고되었다. 본 실험에서는 사용된 균주의 발효 특성과 glycosidase 효소패턴을 조사하여 그 결과를 Table 1에 나타내었다. 사용된 균주는 *Bacteroides* 균주들에 비하여 일반적으로 α-fucosidase 활성이 상대적으로 높았고 *Bifidobacterium* sp. Int 57, *Clostridium butyricum*, *Enterococcus faecalis*, *Eubacterium limosum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Staphylococcus aureus*, *Bifidobacterium adolescentis* 등에서는 효소 활성이 거의 나타나지 않았다(data not shown).

Table 1. Characteristics of *Bacteroides fragilis* Roid8 used in this study

Carbohydrate fermentations							
arabinose	-	arbutin	-	cellobiose	-	esculin	+
fructose	+	galactose	+	gluconate	-	glucose	+
inulin	-	lactose	+	maltose	+	mannitol	-
mannose	+	melezitose	-	melibiose	+	myoinositol	-
raffinose	+	rhamnose	-	salicine	-	sorbitol	-
starch	+	sucrose	+	trehalose	-	xylose	+

Glycosidase patterns and their optimum temperatures in parenthesis			
α-glucosidase	+ (50℃)	β-glucosidase	+ (50℃)
α-galactosidase	+ (40℃)	β-galactosidase	-
α-arabinofuranosidase	-	β-xylosidase	-
β-glucuronidase	+ (50℃)	α-fucosidase	+ (40℃)
chitobiase	+ (45℃)	α-mannosidase	-
N-acetyl-β-glucosaminidase	+(45℃)	β-galacturonidase	-

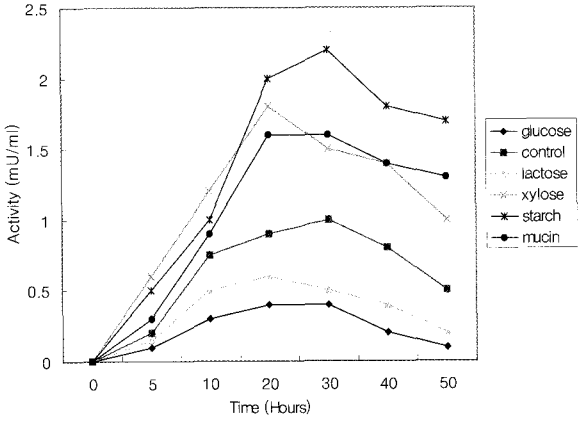

Figure 1. Effect of carbon sources on *Bacteroides fragilis* α-fucosidase production.

BHI를 기본배지로 하여 여러 종류의 탄수화물을 각각 0.5% 첨가하고 37℃에서 배양하여 생산된 α-fucosidase의 활성을 조사한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 이 효소에 대한 생산을 월등히 높여주는 기질은 없었으나 xylose, starch, mucin 등에서 조사된 각 효소들의 생산이 비교적 높았고 배양 후기에 효소활성이 줄어드는 속도는 starch와 mucin에서 비교적 느렸다. 일반적으로 lactose와 glucose는 α-fucosidase 생산을 저하시켰다. 이러한 결과는 lactose와 glucose가 일반적으로 glycosidase 생산을 저하시키

는 것과 같은 양상을 보여준 것이었다(10). 위와 같은 결과에 따라 α-fucosidase를 생산하기 위한 다음의 연구에서는 starch를 첨가한 배지를 이용하여 *B. fragilis* Roid8 균주를 배양하였다. *Fusarium*에서는 fucose가 α-fucosidase의 생산을 증가(11)시켰지만 *B. fragilis* Roid8에서는 이와 같은 결과가 관찰되지 않았다 (data not shown).

조효소액의 효소 특성

균체의 파쇄액을 ultrafiltration, DEAE-sepharose, 및 CM-cellulose를 거쳐 조효소액을 분리하여 20, 30, 40, 50, 60, 70℃로 효소반응 온도를 달리하여 각 기질에 대한 효소활성을 측정한 결과(Table 2) α-fucosidase 조효소액의 최적온도는 40℃로 조사되었다. 조효소액에 pH 4~9까지의 buffer를 가한 후 40℃로 반응시켰을 때 pH 7에서 가장 활성이 높았다. 정제된 α-fucosidase에 대한 금속이온의 영향을 조사한 결과 각각의 무기염 중 Co^{++}와 Zn^{++}이 α-fucosidase의 역가를 감소시키는 효과가 상대적으로 큰 것으로 나타났다.

Table 2. Relative activities of *Bacteroides fragilis* α-fucosidase at different temperatures, pHs and metals

Temp. (℃)	Relative activity (%)	pH	Relative activity (%)	Metals (10 mM)	Relative activity (%)
30	82	4	35	None	100
40	100	5	71	$AlCl_3$	74
50	90	6	89	$BaCl_2$	78
60	51	7	100	$CaCl_2$	82
70	10	8	78	$CoCl_2$	50
		9	29	$CuCl_2$	99
				$FeCl_3$	79
				$MgCl_2$	72
				$MnCl_2$	82
				$ZnCl_2$	32

L-fucose는 당단백질의 당부위중 비 환원 말단에서 자주 발견되는데 이 당단백질은 포유동물의 세포 표면, 장내의 mucin, 혈액형 항원, 당지질 등의 구성 성분이다. 또한 L-fucose는 모유의 올리고당 및 복합당에도 존재한다. 따라서 α-fucosidase는 이들 당단백질로부터 L-fucose를 이용하는데 중요한 역할을 하는데 장내에서는 특히 mucin 분해에 깊이 관여하고 있다(7, 8). Mucin은 goblet 세포에 의하여 생산되는 산성 당단백질로서 장상피세포를 보호하는 gel을 형성한다. 점막 유동층 mucin은 당 부위가 mucin 분자량의 85%를 차지하며 당의 종류로서는 hexosamines, fucose, sialic acid 등으로 이루어져 있다. 장내 세균에 의하여 분리되는 fucose는 *Bacteroides*의 세포에 존재하는 FucR와 결합하여 숙주의 fucosylated glycan 생산을 조절하는 인자를 생산하여 숙주와 장내 세균과의 상호 신호 전달을 조절한다(12). 현재 인체의 전체 유전자가 거의 해독되어 있는 상황에서 *Bacteroides*가 숙주의 장 조직과 세포의 활동을 조절하는 현상이 구체적으로 연구되고 있는데 fucose 당의 대사 조절에 *Bacteroides*가 관여하는 것으로 보고되었다(13). 또한 식이중에 함유되어 있는 mucin도 위나 소장을 통과하면서 분해되거나 흡수되지 않기 때문에 대부분 대장으로 내려와 균총에 의한 대사를 받아 탄소원으로 사용된다. 장 점막 상피세포의 mucin을 과도하게 분해하게 되면 장을 외부물질 즉 장내 고형 물질들로부터 보호할 수 없기 때문에 장 내용물속에 들어있는 여러 가지 독성 물질이 장내로 흡수될 뿐만 아니라 세포자체가 손상을 입는다. 본 연구에서 조사된 α-fucosidase의 최적 pH와 최적 온도는 본 균주가 인체의 장 환경에 잘 적응되어 fucose 대사에 직접 관여할 것이라는 것을 시사하며 추가적인 연구를 통하여 장내의 환경에서 작용하는 식이 또는 장 점막 mucin에 대한 fucose기질 이용성을 연구하는데 본 연구의 결과가 기초 자료로서 활용될 수 있을 것이다.

요 약

Bacteroides fragiles Roid8은 인간의 장내에서 가장 우세한 균종에 속하는 것으로서 효소활성을 측정해본 결과 다른 균들에 비해 α-fucosidase의 활성이 높은 것으로 나타났다. 본 연구실에서 조사된 α-fucosidase의 생산 최적배지 조성은 1 L 배지당 BHI 37 g, hemin 10 mg, cysteine 0.5 g, resazurin 1 mg, vitamin K 1 mg, starch 5 g을 함유하였다. 또한 DEAE-sepharose와 CM-cellulose 크로마토그래피를 거쳐 조효소액을 분리하여 조사한 결과 효소의 최적 반응온도는 40℃, 최적반응 pH는 7.0이었다. 무기 금속이온의 영향은 Co^{++}과 Zn^{++} 존재 하에서 효소역가가 낮아졌다.

감 사

본 연구는 국가지정연구실 지원 (M1-0302-00-0098)의 일부로 수행되어 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Cummings, J. H. and G. T. Macfarlane (1991), The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon, *J. Appl. Bacteriol.* **70,** 443-459.
2. Rhee, K. J., P. Sethupathi, A. Driks, D. K. Lanning, and K. L. Knight (2004), Role of commensal bacteria in development of gut-associated lymphoid tissues and preimmune antibody repertoire, *J. Immunol.* **172,** 1118-1124.
3. Goldin, B., A. M. Linchtenstein, and S. L. Gorbach, (1988), The roles of the intestinal flora. p. 500-515, in Hills M.E. and Young V.R. (eds.) "Modern Nutrition in Health and Disease" LEA and Febiger, Phildelphia.
4. Saito T., K. Senda, S. Takakura, N. Fujihara, T. Kudo, Y. Linuma, N. Fujita, T. Komori, N. Baba, T. Horii, K. Matsuoka, M. Tanimoto, and S. Ichiyama (2003), Anaerobic bacteremia: the yield of positive anaerobic blood cultures: patient characteristics and potential risk factors, *Clin. Chem. Lab. Med.* **41,** 293-297.
5. Mitsuoka. T. (1982), Recent trends in research on intestinal flora, *Bifidobact. Microfl.* **1,** 3-24.
6. Schneeman, B. O. (2002), Gastrointestinal physiology and functions, *Br. J. Nutr.* **88,** S159-163.
7. Hoskins, L. C., M. Agustines, W. B. Mckee, E. T. Boulding., M. Kriaris, and G. Niedermeyer (1985), Mucin degradation in human

colon ecosystems. Isolation and properties of fecal strains that degradade ABH blood group antigens and oligosaccharides from mucin glycoproteins, *J. Clin. Invest.* **75,** 944-953.

8. Salyers, A. A., S. E. H. Wet, J. R. Vercellotti, and T. D. Wilkins (1977), Fermentation of mucins and plant polysaccharides by anaerobic bacteria from the human colon, *Appl. Environ. Microbiol.* **34,** 529-533.
9. Ji, G. E., I. H. Kim, and S. K. Lee (1994), Investigation of selective medium for isolation and enumeration of *Bacteroides* sp. from the feces of the Korean people, *Kor. J. Food Sci. Technol.* **26,** 295-299.
10. Park, H. K., D. H. Kang, S. H. Yoon, K. H. Lee, S. K. Lee, and G. E. Ji (1992), The enzymatic pattern of *Bifidobacterium* sp. Int-57 isolated from Korean feces, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20.** 647-654.
11. Yamamoto, K., Y. Tsuji, H. Kumagai, and T. Toochikura (1986), Induction and purification of alpha-L-fucosidase from *Fusarium oxysporum, Agri. Biol. Chem.* **50,** 1689-1695.
12. Hooper, L. V., J. Xu, P. G. Falk, T. Midtvedt, and J. I. Gordon (1999), A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive system, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96,** 9833-9838.
13. Xu, J., M. K. Bjursell, J. Himrod, S. Deng, L. K. Carmichael, H. C. Chiang, L. V. Hooper, and J. I. Gordon (2003), A genomic view of the human-*Bacteroides thetaiotamicron* symbiosis, *Science* **299,** 1999-2002.