

군소(*Aplysia kurodai*)에 분포하는 글루코사미노글리칸의 추출과 기능특성

1. 다당류 추출의 최적화와 글루코사미노글리칸의 정제

윤보영 · 최병대 · 최영준*

경상대학교 해양식품공학과/해양산업연구소

Extraction of Glycosaminoglycan from Sea Hare, *Aplysia kurodai*, and Its Functional Properties 1. Optimum Extraction of Polysaccharide and Purification of Glycosaminoglycan

Bo-Yeong Yoon, Byeong Dai Choi, and Yeung Joon Choi[†]

Dept. of Seafood Science and Technology/Institute of Marine Industry,
Gyeongsang National University, Gyeongnam 650-160, Korea

Abstract

The optimum condition was investigated for the extraction of glycosaminoglycan (GAG) from sea hare, *Aplysia kurodai*. The most effective enzyme was Flavourzyme for extraction of glycosaminoglycan. The optimum incubation temperature and time for hydrolysis were 60°C and 15 hr, respectively. The yield of precipitated polysaccharide depended on Brix and ethanol volume. The most effective concentration of Brix and ethanol were sixty and 5 volume of ethanol, respectively. Most GAG was eluted between 0.5 M and 0.75 M NaCl gradient on DEAE-Sepharose column, and identified by electroconductivity. The contents of hexuronic acid from polysaccharide extract and GAG were 1.0 g/100 g and 6.0 g/100 g, respectively. Hexosamine of polysaccharide and GAG as indicator of GAG component was 5.6 g/100 g and 25.7 g/100 g, respectively. GAG was identified as heparan sulfate compared with bands of other GAG on agarose gel electrophoresis, and its molecular weight was 29.6 kDa on Superdex 200 HR column.

Key words: sea hare, *Aplysia kurodai*, glycosaminoglycan, purification, heparan sulfate

서 론

Glycosaminoglycan(GAG)는 반복하는 이당류 단위를 가진 음이온성 이형다당류로서 과거에는 뮤코(muco)다당이라 하였다(1). 이들의 구조적 특성은 산성당(uronic acid)과 아미노당(N-acetylglucoamine, N-acetylgalactosamine)의 결합을 통해 사슬이 무수히 반복되는 구조를 가지고 있으며 당 잔기에 황산기(SO₃⁻) 혹은 카르복실기(COO⁻)를 가져 음전하를 띠고, 당 잔기들 간의 결합 형태와 sulfate의 수와 위치에 따라 그 특성이 분류된다(2). GAG는 여러 분자종이 있으며, 황산기의 유무에 따라 황산화 다당과 비황산화 다당으로 크게 나누어지며, 대표적인 GAG는 hyaluronic acid, chondroitin sulfate, dermatan sulfate, heparin/heparan sulfate와 keratan sulfate이다(3). Hyaluronic acid를 제외한 GAG는 당단백질과는 다른 프로테오글리칸으로 존재하며 음이온기가 많은 chondroitin sulfate와 keratan sulfate(또는 dermatan sulfate)의 콘드로이틴군(chondroitin family)과 헤파린군(heparin family)은 결합 부위에 중심단백질을 가

지고 있다(4).

최근 GAG의 여러 가지 생물학적 활성이 알려짐에 따라 의약품, 화장품 및 기능성식품 소재로 사용하고 있어 제약 및 기능성 분자로서의 가치가 증가하고 있다(5,6). GAG는 성장 인자와 사이토카인 생성을 조절하고(7), 조직의 결합이나 특수한 조직의 성숙에 영향을 미치며, 생물학적인 필터로서 역할을 수행하고 콜라겐 섬유 합성과 피부의 인장강도를 조절하며 암세포의 성장과 침윤에도 영향을 미친다(8).

그러나 GAG의 주원료로 사용되고 있는 소, 돼지, 닭 등의 축육은 광우병, 돼지 인플루엔자, 콜레라, 구제역, 조류독감 등의 여러 가지 질병으로 인해 원료로서의 안전성 확보가 어렵고, 상어연골과 껍질, 고래, 참치와 같은 다량어류는 개체수의 감소로 인해 멸종 방지를 위한 여러 가지 국제적 협약들이 맺어져 있으며, 이로 인해 연간 생산량이 한정되어 있다. 이 같은 자원 확보의 어려움 때문에 GAG의 원료로 사용할 수 있는 새로운 대체자원이 필요한 실정이다.

군소는 약탈자에 대하여 자신을 방어하고 서로의 정보 전달을 위해 복잡한 화학물질을 분비하는 패각이 없는 해산

[†]Corresponding author. E-mail: yjchoi@gnu.ac.kr
Phone: 82-55-640-3115, Fax: 82-55-640-3111

무척추동물이며, 이들이 분비하는 화학물질과 독특한 대사 산물로 인하여 오랫동안 주목을 받아 왔다(9). Aplyronine A, B 및 C는 HeLa-S₃세포에 대하여 IC₅₀이 각각 0.48, 3.11, 21.2 ng/mL인 강력한 세포독성을 나타내며, 특히 A는 항암 작용이 있어 항암제의 후보물질로 연구되고 있다(10-12). 그러나 현재까지 항암효과를 보이는 물질은 모두 유기용매 분획을 통해 분리 정제되었으며, 군소의 수용성 추출물에 관한 연구는 암세포의 세포사멸을 보고한 60 kDa의 잉크 단백질 (APIT, *Aplysiapunctata* inktoxin)(13)과 락틴을 이용한 기질 특이적 GAG의 분리(14)를 제외하고는 거의 이루어지지 않았다.

본 연구는 남해안 일대에서 여름철에 어획되어 부산과 경남지역을 중심으로 소비되고 있는 군소로부터 다당류와 GAG를 추출하기 위한 단백질 가수분해효소의 처리조건, 다당류의 침전 및 회수 조건과 정제 방법을 조사하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

끓는 물에서 5분 동안 자숙하여 냄새를 제거한 군소 (*Aplysia kurodai*)를 통영시 잠수기조합에서 구입하여 육질과 내장을 분리한 다음 동결건조 하여 -20°C의 냉동고에 보관하면서 시료로 사용하였다. 단백질 분해효소로서 Flavourzyme 500 MG와 Neutrase는 Novozymes(Seoul, Korea) 제품을 사용하였으며, DEAE-Sepharose 수지와 Superdex HR-200 칼럼은 GE health care Korea(Seoul, Korea)에서 구입하였고, papain(76220), heparinase I(H2519), chondroitin ABC lyase(C2905), 분자량 측정을 위한 표준단백질과 GAG 및 그 외의 모든 시약은 Sigma-Aldrich 사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

성분분석

일반성분의 분석: 동결건조한 군소의 일반성분은 AOAC 법(15)에 따라 수분은 상압가열건조법, 조회분은 건식회화법, 조단백질은 micro Kjeldahl법으로 분석하였으며, 조지방은 Folch법(16)으로 분석하고, 탄수화물은 100%에서 위 성분의 합을 감하여 구하였다.

단백질 함량의 측정: 단백질 농도는 Lowry법(17)으로 측정하여 bovine serum albumin으로 작성한 검량곡선에 따라 계산하였다.

당 함량의 측정: 각 획분의 총 탄수화물 함량은 phenol-sulfuric acid법(18), uronic acid 함량은 Bitter 등의 carbazole assay을 다소 변형한 방법(19)으로, N-acetylhexosamines 함량은 MBTH(3-methy-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride) 법(20)으로 각각 측정하였다. 즉 phenol-sulfuric acid 법은 증류수에 녹인 시료 150 µL를 13 mL 시험관에 취하고 5%(w/v) phenol 용액 150 µL와 혼합한 후 신속히 진한 황산 750 µL 첨가해 10분간 실온에서 반응시

켰다. 그 후 다시 한 번 vortex를 이용해 혼합해 준 뒤 발색될 때까지 실온에서 30분간 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하여 D-galactose로 작성한 검량곡선에 따라 계산하였다.

Uronic acid 함량은 증류수에 용해되어 있는 시료 200 µL를 cap tube에 분취하고 4 M ammonium sulfate 20 µL를 가하여 혼합하였다. 진한 황산에 25 mM의 농도로 용해시킨 sodium tetraborate 1 mL를 첨가한 뒤 100°C에서 5분간 가열하고 실온에서 방냉하였다. 시험관의 방냉이 적절히 이루어지면 0.1% carbazole 용액을 40 µL 가하고 다시 100°C에서 15분간 반응시켜 주었다. 다시 방냉한 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. Uronic acid 함량은 glucuronolactone으로 작성한 검량곡선으로 계산하였다.

MBTH 법에 의한 당 함량의 측정은 증류수에 녹아있는 시료 100 µL를 13 mL 시험관에 분취하고 1,9-dimethyl-methylene blue(pH 3.0) 용액 2.5 mL를 가하여 혼합하고 525 nm에서 흡광도를 측정하였으며, N-acetyl-D-galactosamine으로 작성한 검량곡선으로 함량을 구하였다.

다당류 추출을 위한 최적 조건의 설정

효소처리에 의한 다당류의 최적 추출 조건의 설정: 다당류 추출을 위한 최적 조건을 조사하기 위하여 반응시간과 온도를 독립변수로, 수율을 종속변수로 설정하여 반응표면 분석을 실시하였다(21). 단백질 가수분해효소는 Flavourzyme 500 MG, Neutrase 및 papain을 사용하였고, 효소 반응을 위한 pH는 7.0으로 고정하였으며, 반응 후의 수율은 가수분해 후 ethanol 침전에 따라 생성하는 침전물을 105°C에서 12시간 건조시켜 건조물의 함량으로 측정하였다.

당도(Brix) 및 ethanol 사용량에 따른 다당류 침전 조건의 설정: 예비실험을 통해 ethanol을 이용한 다당 침전의 수율은 당 함량에 의존함을 확인하고 ethanol 사용량을 고정하고 Brix 농도에 따른 ethanol 침전 수율을 측정하였다. Ethanol의 사용량에 따른 추출 최적 조건 설정은 최적 Brix 농도로 설정된 추출물에 3, 5, 7배량의 ethanol을 첨가하여 침전되는 다당류의 함량을 측정하여 수율로 표시하였다.

최적 조건에 따른 다당류의 추출: 군소 육질에서 다당류의 추출은 Fig. 1과 같이 수행하였다. 즉 동결 건조시료 1 g에 10배량의 50 mM sodium phosphate 완충액(pH 6.0)을 첨가하고, 기질에 대하여 단백질 농도비가 1/50이 되도록 Flavourzyme 500 MG을 첨가하여 60°C의 항온 수조에서 흔들며 주면서 15시간 동안 가수분해하였다. 원심분리(3,000 × g, 30 min)하여 얻은 가수분해물의 상등액에 최종농도가 3% 되도록 trichloroacetic acid를 첨가하여 실온에서 30분 방치한 후 원심분리(3,000 × g, 30 min)하여 침전한 단백질을 제거하였다. 회전진공증발기로 40°C 이하에서 상등액의 Brix가 60이 될 때까지 감압농축 하였다. 농축물에 5배량의 ethanol을 첨가하여 알코올 불용성 물질을 침전시키고 원심분리(3,000 × g, 30 min)하여 그 침전물을 추출 다당류로 사용하였다.

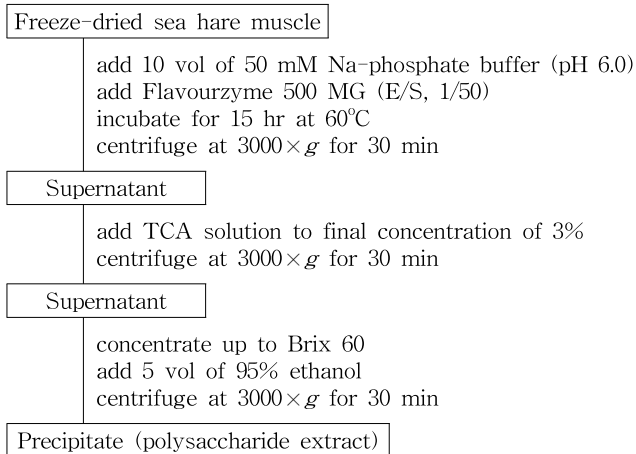


Fig. 1. Procedure for the extraction of polysaccharide from sea hare muscle.

DEAE-Sepharose에 의한 GAG의 분리 및 정제

최적 조건으로 추출한 다당류를 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.0)에 용해시킨 후(50 mg/mL), 같은 완충액으로 평형화시킨 DEAE-Sepharose 칼럼(1.6×15 cm)에 200 μ L를 loading하여 칼럼 부피와 동량의 50 mM sodium phosphate 완충액(pH 6.0)으로 세척한 후, 2 M NaCl을 포함한 같은 완충액을 사용하여 유속 1 mL/min으로 선형균배 하였으며 용출액의 GAG는 254 nm에서 검출하였다. 용출액은 0~70 min에서는 5 mL, 70~120 min에서는 2 mL씩 분획하였다.

효소 처리

효소 처리 과정을 거쳐 GAG를 확인하기 위해 정제한 시료(100 μ g)를 chondroitin sulfate ABC lyase와 heparinase I로 각각 37°C에서 15시간 동안 가수분해 하였다. 가수분해 후 100°C에서 2분 동안 효소를 실활 시키고 0.45 μ m 필터로 여과한 여액을 시험관에 50 μ L씩 분취하여 250 μ L의 30 mM HCl을 첨가하여 탈중합 시켰다. 반응액은 분광광도계로 232 nm에서 흡광도를 측정하였으며, chondroitin 4-sulfate를 표준물질로 사용하여 작성한 검량곡선에 따라 GAG의 함량을 측정하였다.

Agarose 전기영동

DEAE-Sepharose 칼럼에서 정제한 GAG는 Dietrich 방법(22)에 따라 0.6% agarose gel(w/v)에서 전기영동 하여 정제도를 확인하였다. 0.05 M 1,3-diaminopropane/acetate 완충액(pH 9.0)을 사용하여 4시간 동안 전개 후 acetic acid/ethanol/D.I.W.(0.1:5:5, v/v/v)에 용해된 0.1% toluidine blue로 염색하고, 0.1% acetic acid로 탈색하여 전기영동 band를 확인하였다. Chondroitin 4-sulfate, chondroitin 6-sulfate, dermatan sulfate 및 heparin 표준품과 chondroitin 4-sulfate, chondroitin 6-sulfate 및 dermatan sulfate는 chondroitinase ABC lyase로, heparin은 heparinase I로 처

리하여 얻은 탈중합물을 같은 조건으로 전기영동 하여 정제 및 효소 처리한 GAG와 이동도를 비교하였다.

분자량의 측정

정제한 GAG의 분자량을 확인하기 위해 50 mM phosphate 완충액(pH 6.0)로 평형화된 Superdex 200 HR column(1.0×30 cm)에 200 μ L의 시료를 주입한 후 같은 완충액으로 유속 0.3 mL/min로 용출하였으며, 254 nm에서 검출하였다. 분자량 측정은 apoferritin(MW, 443,000), alcohol dehydrogenase(MW, 150,000), fructose-6-phosphate kinase(MW, 84,000) 및 carbonic anhydrase(MW, 29,000)로 작성한 표준곡선으로 측정하였다.

결과 및 고찰

수율과 일반성분

군소 특유의 냄새와 색소를 제거하고 부피를 줄이기 위해 일반적으로 사용하는 열수 블랜칭을 실시한 후에 육질과 내장을 분리하고 동결건조 하였으며, 동결건조 후 수율은 육질이 24%, 내장은 31%이었다. 그리고 건조 중량 대비 총 수율은 25%로 나타났다. 해양생물의 내장은 육에 비해 많은 지방 함량을 가지고 있으며, 예비실험의 결과 내장 동결 건조물은 세포 RAW 264.7을 이용한 NO, TNF- α , IL-6 생성량 등의 기능성에 영향을 미치지 않는 것으로 나타나 본 실험에서는 육의 동결 건조물만을 시료로 사용하였다. 군소 육질의 일반성분 함량은 건조물 기준으로 조단백질 55.6±0.1%, 조지방 2.2±0.1%, 수분 3.5±0.0%, 회분 9.2±0.3%, 탄수화물 29.5%였다.

다당류의 추출에 미치는 효소와 항온조건의 영향

다당류 추출을 위한 최적의 단백질 분해효소를 선정하기 위하여 예비실험을 통해 설정한 pH 7.0에서 각 효소의 항온 시간과 온도에 따라 Flavourzyme 500 MG, Neutrase 및 papain을 사용하여 가수분해한 결과, 가장 높은 수율을 보이는 효소는 Flavourzyme 500 MG로 확인되었다(Table 1). Flavourzyme 500 MG를 사용해 60°C에서 15시간 동안 가수분해한 후의 수율은 12.5%로 papain을 사용한 것에 비해 약 3.5배, Neutrase를 사용한 것에 비해 약 2.5배 이상의 수율을 보였다. 다당류 추출을 위해 가수분해에 사용하는 효소는 일반적으로 papain으로 여러 가지 단백질 분해효소 중에서

Table 1. The optimum temperature and incubation time for the extraction of polysaccharide from sea hare muscle by proteases

Enzyme	Incubation (hr)	Temperature (°C)	Yield (%)
Flavourzyme 500 MG	15	60	12.8
Neutrase	6	60	8.1
Papain	24	40	5.5

Proteolytic reactions were performed at pH 7.0.

비교적 높은 가수분해 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다 (23). 그러나 본 실험 결과에서 papain은 같은 기질 농도비에 대해 가장 낮은 추출 수율을 나타냄으로써 효소의 기질특이성이 시료인 군소 육질에는 적합하지 않음을 확인하였다. 이 같은 결과는 다른 효소들이 endo형 단백질분해효소인 것에 비하여 Flavourzyme 500 MG는 exo형과 endo형을 동시에 구현할 수 있는 단백 분해효소이기 때문인 것으로 추정되며, 단백질 가수분해에 적합한 효소를 선택하기 위해서는 효소 선별 실험을 통해 적절한 효소의 선택이 선행되어야 함을 알 수 있었다.

Flavourzyme 500 MG를 사용하여 다당류 추출의 최적조건을 설정하기 위해 항온시간과 반응온도를 독립변수, 수율을 종속변수로 설정하고 표면반응 설계를 통해 다당류 추출의 최적조건을 예측하였다(Table 2). 다당류의 추출 수율은 반응온도 50°C 이상에서 온도의 상승과 더불어 증가하였고, 항온 15시간까지는 시간의 증가와 더불어 상승하였으나 이후부터는 감소하는 경향으로 나타났다(Fig. 2). 설정한 반응온도와 항온시간의 범위 내에서 반응온도는 60°C, 항온시간 15시간에서 가장 높은 12.8%의 수율을 보였다.

Table 2. Experimental design for the extraction of polysaccharide from sea hare muscle by Flavourzyme 500 MG

Row ¹⁾	Incubation (hr)	Temperature (°C)	Yield (%)
1	6	40	5.3
2	15	40	1.7
3	24	40	6.9
4	6	50	4.1
5	15	50	11.4
6	15	50	6.9
7	24	50	6.5
8	6	60	8.5
9	15	60	12.8
10	24	60	12.5

¹⁾Experimental number.

다당류의 침전에 미치는 당도(Brix)와 ethanol 함량의 영향

예비실험을 통해 ethanol을 이용한 다당류의 침전은 당 함량에 의존함을 확인하였다. 따라서 ethanol 사용량을 5배로 고정하고 Brix 농도 11부터 60까지 5개 구간을 설정하여 다당류의 침전에 미치는 당 함량의 영향을 측정된 결과 (Table 3), 다당류의 추출수율은 Brix가 증가할수록 당 농도에 대하여 선형적으로 증가하여 Brix 60에서의 수율이 Brix 11과 비교했을 때 약 20배 이상 증가하였다. 이와 같은 결과는 다당류를 추출하기 위한 가장 효과적이고 경제적인 ethanol 사용량을 구명할 수 있을 것으로 판단하였다. 지나치게 낮은 Brix는 당의 침전량이 적을 뿐만 아니라 ethanol의 사용량을 증가시켜 경제적 손실과 함께 처리 시간의 연장으로 비효율적인 공정이 될 수밖에 없으며, 지나치게 높은 농도의 Brix는 같은 부피 비에 대한 ethanol 사용량을 감소시켜 경제적인 것으로 판단할 수 있으나 농축 과정에 소요되는 시간과 Brix 60 이상에서는 추출물의 높은 점도로 인해 오히려 시료의 회수와 관련한 문제점과 수율의 손실을 초래하여 비효율적인 것으로 판단하였다. 따라서 군소 육으로부터 다당류를 추출하기 위한 최적 Brix 조건은 60으로 설정하였다.

Ethanol의 사용량에 따른 군소 다당류의 최적 추출 조건을 설정하기 위해 Brix 60으로 설정한 추출액에 ethanol을 3, 5, 7배량(v/v) 가한 후, 침전되는 다당류의 함량을 측정하여 수율로 나타내었다(Table 3). Ethanol 사용량이 증가할수록 다당류 추출 수율은 증가하였으며, ethanol 사용량의 증가에 따른 선형적인 의존성은 보이지 않았다. 7배량의 ethanol 첨가 시 5배량에 비하여 수율은 1.2배 증가하였으나, 수율 증가에 대비한 ethanol 사용량의 증가는 산업적 규모의 다당류 추출 시 단가를 상승시키는 요인이 되기 때문에 수율의 큰 손실 없이 적은 양의 ethanol을 사용할 수 있는 5배량

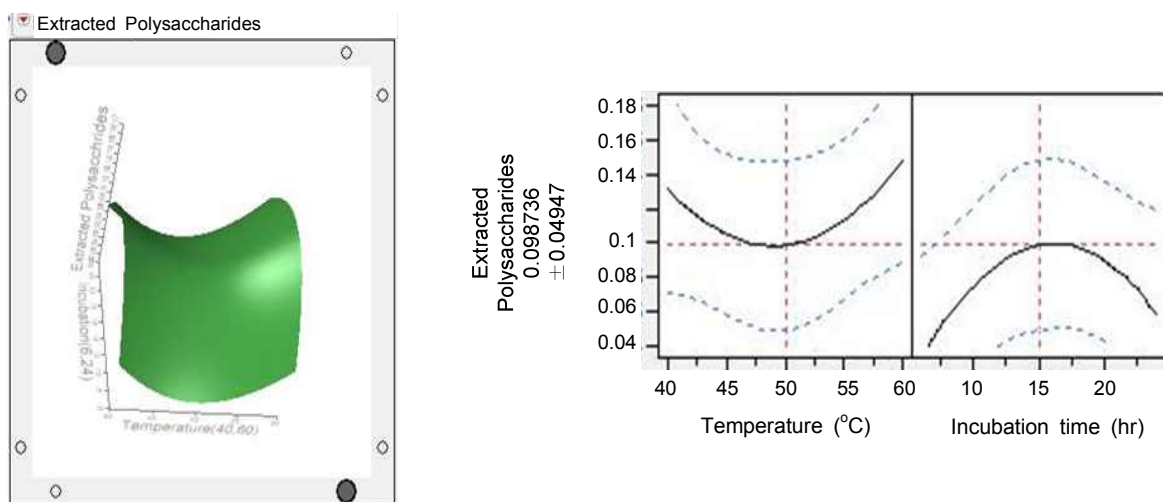


Fig. 2. Prediction profiler of incubation time (hr) and temperature (°C) on the extraction of polysaccharide from sea hare muscle by Flavourzyme 500 MG.

Table 3. Effect of Brix and ethanol concentration on the precipitation of polysaccharide extract from sea hare muscle

	Concentration	Yield (g)
Brix (°)	11.0	0.04±0.00 ¹⁾
	29.5	0.22±0.01
	42.0	0.49±0.05
	50.0	0.64±0.06
	60.0	0.83±0.03
Ethanol (v/v)	3	0.41±0.00
	5	0.80±0.06
	7	0.96±0.00

¹⁾Average±standard deviation.

이 적절한 것으로 평가하였다.

DEAE-Sephacrose에 의한 GAG의 정제와 분획물의 당 조성

DEAE-Sephacrose 칼럼 크로마토그래피의 결과 용출되는 peak의 형태는 매우 단순하였다(Fig. 3). GAG는 NaCl 농도 군배에 따른 특이적 용출 패턴을 나타내며, chondroitin, chondroitin sulfate A, dermatan sulfate, chondroitin sulfate C, hyaluronic acid, heparin, heparin sulfate, keratan sulfate는 이온교환 크로마토그래피 상에서 각기 다른 이온 강도 하에서 용출되기 때문에 용출 peak가 겹치는 일이 드물고 이에 따라 분획과 정제가 용이하다고 보고하였다(24). DEAE-Sephacrose 칼럼 크로마토그래피로 얻은 다당류 추출물의 크로마토그램 상의 전기전도도를 확인한 결과 0.5~0.75 M NaCl 상에서 용출되는 물질임을 확인하였다. 용출 부피가 약 72 mL인 단일 peak는 GAG의 특성상 순수한 단일 물질로 보기는 어려우나 chondroitin sulfate ABC 분해물과 heparinase I 분해물의 이당류 함량은 각각 22.1 g/100 g과 36.1 g/100 g으로서 이당류의 함량이 높은 것으로 나타났다. 다당류 추출물의 uronic acid와 hexosamine의 함

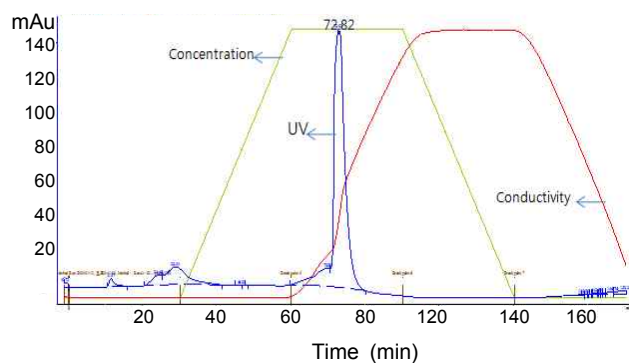


Fig. 3. DEAE-Sephacrose chromatogram of polysaccharide extract from sea hare muscle. The polysaccharide extract was eluted by 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) and linear gradient by 2 M NaCl at a flow rate of 1 mL/min on DEAE-Sephacrose column (1.6×15 cm), and detected at 254 nm. Fraction was collected with 5 mL from number to number 12 and with 2 mL from 13 to 26. The total carbohydrates, uronic acid and hexosamines of each fraction were assayed by the phenol-sulfuric, MBTH and the carbazole methods.

Table 4. Uronic acid and hexosamines contents in polysaccharide extract (ASE) and purified glycosaminoglycan (ASF) from sea hare muscle (unit: g/100 g)

	Uronic acid	Hexosamines
Polysaccharide extract (ASE)	1.0±0.0 ¹⁾	5.6±0.2
Purified glycosaminoglycan (ASF)	6.0±0.2	25.7±1.3

¹⁾Average±standard deviation.

량은 각각 1.0 g/100 g과 5.6 g/100 g이었으며(Table 4), DEAE-Sephacrose를 통한 정제물의 uronic acid와 hexosamine 함량은 각각 6.0 g/100 g과 25.7 g/100 g으로서 uronic acid 함량에 근거한 정제도는 약 6배였다.

정제 GAG의 전기영동 형태와 분자량의 측정

Agarose 겔 전기영동으로 정제한 GAG의 순도를 확인하였다(Fig. 4). 당 추출물과 정제한 GAG의 이동도를 확인한 전기영동상의 A에서는 chondroitin 4-sulfate 및 chondroitin 6-sulfate와 같은 이동도의 band가 나타났다. 그러나 정제한 GAG를 chondroitinase ABC lyase와 heparinase I로 각각 탈중합 처리하여 실시한 전기영동상의 B에서는 heparin의 이동도와 비슷한 위치에서 band가 나타났다.

Heparinase I를 이용해 탈중합한 정제 GAG의 전기영동 이동도는 탈중합 전의 형태와는 달리 heparin 효소 처리물과 같은 이동도에서 band가 나타나는 것을 확인할 수 있었으며, chondroitin sulfate ABC lyase로 처리한 탈중합물도 heparin 처리물의 이동도와 동일하였고 chondroitin sulfate와 이동도가 같은 band가 나타나지 않는 것에 미루어 낮은 농도로 포함되어 있던 chondroitin sulfate가 효소에 의해 탈

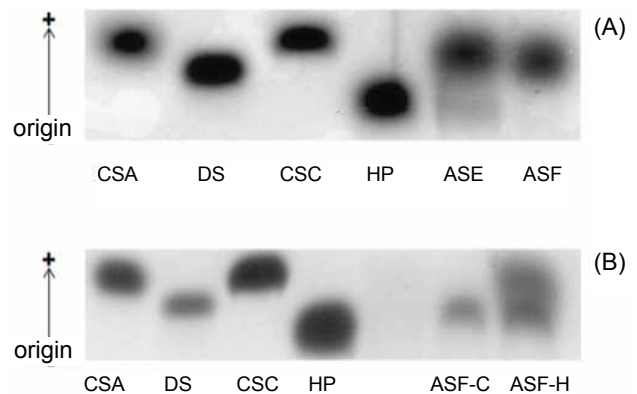


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of polysaccharide extract (ASE) and purified glycosaminoglycan (ASF) from sea hare muscle before (A) and after (B) treatment of chondroitinase ABC and heparinase I. CSA, DS, CSC and ASF-C were treated by chondroitinase ABC, but HP and ASF-H were treated by heparinase I. Electrophoresis of GAG standards (50 µg/well) and de-salted sample (0.5 mg/well) of ASE and ASF were performed on a 0.6% agarose gel for 4 hours, and the gel was stained with 0.1% toluidine blue. CSA, chondroitin 4-sulfate; DS, dermatan sulfate; CSC, chondroitin 6-sulfate; HP, heparin; ASF-C, purified GAG by treatment of chondroitinase ABC; ASF-H, purified GAG by treatment of heparinase I.

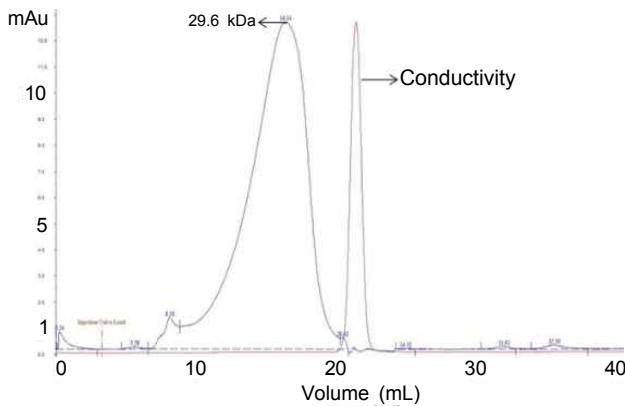


Fig. 5. Chromatogram of purified glycosaminoglycan from sea hare muscle on a Superdex 200 HR column (1.0×30 cm). Gel-filtration revealed one peak of 29.64 kDa. The column was eluted by 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0), at a flow rate of 0.3 mL/min.

중합한 것으로 판단되며, 본 연구의 GAG는 heparan sulfate 일 것으로 추정하였다.

DEAE-Sepharose에서 용출되는 heparan sulfate의 NaCl의 균배농도는 0.5~0.75 M이며(24) heparan sulfate는 추출 대상 및 추출 조건에 따라 다른 형태의 전기영동 band가 나타난다고 보고하였다(25). 그리고 대부분의 uronic acid는 GAG와 프로테오글리칸에서 발견된다는 보고(19)는 정제된 GAG가 heparan sulfate일 가능성을 더욱 높여준다.

정제 GAG의 분자량을 Superdex HR 200 칼럼으로 측정된 결과 29.6 kDa의 분자량을 가진 물질임을 확인하였다(Fig. 5). 약 30 kDa의 분자량을 가진 GAG는 heparin 또는 heparan sulfate가 가장 대표적인 GAG(26)로서 이 같은 보고는 군소에서 추출한 다당 정제물이 heparan sulfate일 가능성을 제시한다. 자연 상태에서 heparin/heparan sulfate family의 분자량은 약 3 kDa부터 50 kDa에 이르기까지 광범위한 분포를 가지는 고분자 중합체이다.

요 약

남해안에서 주로 여름철에 어획하여 부산 및 경남 지역을 위주로 소비하고 있는 군소에서 다당류 추출을 위한 최적 조건을 검토하였다. 군소 다당류 추출을 위한 단백질 가수분해 효소로는 Flavourzyme 500 MG가 가장 효과적이었고, 추출한 다당류의 회수를 위한 가장 효율적인 추출물의 농도와 ethanol 첨가량은 각각 Brix 60과 5배량이었다. DEAE-Sepharose 칼럼 크로마토그래피로 얻은 크로마토그램상의 전기전도도와 전기영동 이동도에 근거하여 0.5~0.75 M NaCl 상에서 용출되는 물질이 GAG임을 확인하였으며, heparan sulfate인 것으로 추정하였다. 다당추출물과 정제 GAG의 uronic acid 함량은 각각 1.0 g/100 g과 6.0 g/100 g이었고, GAG를 구성하는 성분으로 지표물질인 hexosamine의 함량은 당 추출물과 정제물에서 각각 5.6 g/100 g과 25.7 g/100

g이었다. 정제물은 agarose 겔 전기영동 상에서 heparan sulfate로 추정되었으며, 분자량은 겔 크로마토그래피에서 29.6 kDa으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2008년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업업(No. KRF-2008-313-F00089).

문 헌

1. Davies P, Roubin RH, Whitelock JM. 2008. Characterization and purification of glycosaminoglycans from crude biological samples. *J Agric Food Chem* 56: 343-348.
2. Woods RJ. 1998. Computational carbohydrate chemistry: what theoretical methods can tell us. *Glycoconj J* 15: 209-216.
3. Taylor ME, Drickamer K. 2006. *Introduction to Glycobiology*. 2nd ed. Oxford University Press, Oxford, UK. p 3-16.
4. Dinesh R, Garud VM, Mamoru K, Balagurunathan K. 2008. Inhibition of heparan sulfate and chondroitin sulfate proteoglycan biosynthesis. *J Biol Chem* 283: 28881-28887.
5. Volpi N. 2006. Therapeutic applications of glycosaminoglycans. *Current Medic Chem* 13: 1799-1810.
6. Stephen BMD. 2002. Glucosamine for arthritis. Health & Science Korea. http://hs.or.kr/a_glucosamine.html.
7. Day L, Seymour RB, Pitts KF, Konczak I, Lundin L. 2009. Incorporation of functional ingredients into foods. *Trends Food Sci Technol* 20: 388-395.
8. Iozzo RV. 1998. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* 67: 609-652.
9. Barsby T. 2006. Drug discovery and sea hares: bigger is better. *Trends Biotech* 24: 1-3.
10. Makoto O, Kigoshi H, Yoshid Y, Ishigaki T, Nisiwaki M, Tsukad I, Arakawa M, Ekimotod H, Yamada K. 2007. Aplyronine A, a potent antitumor macrolide of marine origin, and the congeners aplyronines B and C: isolation, structures, and bioactivities. *Tetrahedron* 63: 3138-3167.
11. Hirata K, Muraoka S, Suenaga K, Kuroda T, Kato T, Tanaka H, Yamamoto M, Taketa M, Yamada K, Kogoshi H. 2006. Structure basis for antitumor effect of aplyronine A. *J Mol Biol* 356: 945-954.
12. Kuroda T, Suenaga K, Sakakura A. 2006. Study of the interaction between actin and antitumor substance aplyronine A with a novel fluorescent photoaffinity probe. *Bioconjug Chem* 17: 524-529.
13. Butzke D, Machuy N, Thiede B, Hurwitz R, Goedert S, Rudel T. 2004. Hydrogen peroxide produced by *Aplysia* ink toxin kills tumor cells independent of apoptosis via peroxiredoxin I sensitive pathways. *Cell Death Differ* 11: 608-617.
14. Dawsar SM, Matsumoto R, Fujii Y. 2009. Purification and biochemical characterization of a D-galactose binding lectin from Japanese sea hare (*Aplysia kurodai*) eggs. *Biochemistry (Mosc)* 74: 709-716.
15. AOAC. 1990. *Official methods of analysis*. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA. p 868-931.
16. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.

17. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AI, Randall RJ. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 256-275.
18. Mauro SGP, Rodolpho M, Cludio A, Silva AV. 1998. Highly sulfated dermatan sulfates from ascidians. *J Biol Chem* 264: 9972-9979.
19. Bitter T, Muir HM. 1962. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal Biochem* 4: 330-334.
20. Frederik MA, Roger B, Robert EK, David DM. 2000. Preparation and analysis of glycoconjugate (Chapter 17). In *Current Protocols in Molecular Biology*. Hoboken NJ, ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. p 17.9.
21. SAS. 2002. *JMP statistics and graphics guide*. Version 5.0, SAS Institute, Cary, NC, USA. p 179-209.
22. Dietrich CP, Dietrich SM. 1976. Electrophoretic behavior of acidic mucopolysaccharides in diamine buffers. *Anal Biochem* 70: 645-647.
23. Mohamed BM. 2009. Polysaccharides from the skin of the ray *Raja radula*. Partial characterization and anticoagulant activity. *Thrombo Res* 123: 671-678.
24. Iozzo RV. 2001. Proteoglycan protocols. In *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA. Vol 2, p 171-184.
25. Peter H, Alfred L. 1981. An unusual heparan sulfate isolated from lobsters (*Homams americanus*). *J Biol Chem* 257: 9840-9844.
26. Sabrina B, Antonella B, Giangiacomo T. 2005. Molecular weight determination of heparin and dermatan sulfate by size exclusion chromatography with a triple detector array. *Biomacromolecules* 6: 168-173.

(2010년 9월 30일 접수; 2010년 11월 12일 채택)