

Isolation and Characteristics of Fucoïdan Degrading Bacterium from Marine

Yu-Ri Lee¹, Jong Min Lim³, Ki-Young Kim³, Sung-Bae Mun³, Inseok Kwak² and Jae Hak Sohn^{1*}

¹Department of Bio-Food Material, College of Medical & Life Sciences, Silla University, Busan 617-736, Korea

²Department of Bioscience, College of Medical & Life Sciences, Silla University, Busan 617-736, Korea

³Glucan Corp. Kijang-gun, Busan 619-912, Korea

Received November 15, 2012 / Revised December 20, 2012 / Accepted December 21, 2012

A marine bacterial strain that degraded fucoidan from *Ecklonia cava* was isolated from seawater. The crude fucoidanase of this strain efficiently degraded fucoidan at pH 8 and 50°C. The crude enzyme hydrolyzed 7.1% (w/w) fucoidan within 24 hrs from an 1% (w/v) fucoidan solution and produced oligosaccharides by endo-type hydrolysis as the reaction products. The results of 16S rRNA gene sequence analysis and biochemical tests permitted a tentative identification of strain SB 1493 as a *Pseudoalteromonas* species.

Key words : Fucoidan, fucoidanase, hydrolysis, marine bacterium, *Pseudoalteromonas*

서 론

Fucoidan은 다양한 갈조류의 세포벽에서 발견된다. Fucoidan과 저분자의 다양한 oligosacchride는 anticoagulant [18,31], antithrombotic/antithrombin activity [20], antiviral [10], anti-inflammation [12], immunomodulation [6] 등의 다양한 생리활성을 갖는다. Fucoidan의 생리활성은 2 또는 4번 위치에 황을 함유하고 있는 fucose로 구성되고 α-1,2 또는 α-1,3 배당결합을 갖는 homo 또는 hetero형 산성다당류로 구성되는 특이적인 구조에 의해 결정된다. Fucoidan은 fucose 뿐만 아니라 mannose, xylose, galactose, rhamnose 및 uronic acid를 구성할 수도 있다. 이러한 생리적인 특성은 전통적인 식품산업뿐만 아니라 항장 및 의약품산업에서 그 활용성에 관심이 집중되고 있다.

Fucoidan은 고분자량으로 구성되어있어 고부가가치 산업으로 발전하는데 제한요인으로 작용하고 있으며 생리활성을 증가시키기 위한 저분자량의 fucoidan (low molecular weight fucoidan (LMWF))에 더 관심이 집중되고 있다. 이러한 생리활성은 분자량, 황함량, 당조성비 등에 의존하고 있다[4,19]. LMWF는 산 및 효소 가수분해에 의해 얻을 수 있으나 전자의 경우 함량 정도와 크기 조절에 어려움을 가지고 있다. 반면 Fucoidan 가수분해효소는 가수분해 특성에 의해 함량의 변화 없이 LMWF를 생산하는 특징이 보고되고 있어 산가수분해 기술 보다 이점을 가진다.

Exo- 및 endo-fucoidanase는 척추동물의 간체장[8,16,22], 해양세균[2,5,9,13-14,24-28,30,33] 및 진균[21,32]이 생산하는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서는 저분자량의 fucoidan 생산을 목적으로 해양으로부터 fucoidan을 분해하는 해양세균을 분리하고 분류학적 특성과 함께 효소의 특성을 보고하고자 한다.

Fucoidan 분해미생물의 분리

Fucoidan 분해세균의 분리를 위해, 해수시료를 멸균해수로 희석하여 fucoidan-agar medium (FA; 0.4% (w/v) fucoidan (*Ecklonia cava*), 10 g Bacto-peptone, 1 g yeast extract, 1 mM ferrous solution, 1.6 mg ammonium nitrate, 8 mM disodium phosphate, 1 l aged seawater, 1.5% agar)에 평판도말하여 25°C에서 5일간 배양하였다. 성장된 집락들은 동일배지를 이용하여 순수배양한 후 fucoidan-liquid medium (FL)에 접종하여 25°C에서 2일간 150 rpm에서 진탕배양하였다. 원심분리 (10,000x g 10 min)한 배양액의 fucoidanase 활성은 Wu 등[32]의 방법에 의거하여 반응한 후 dinitrosalicylic acid 방법[17]에 의해 전환된 환원당을 정량하였다. 1% (w/v) fucoidan이 첨가된 0.1 M citric acid - sodium citric buffer (pH 6.0) 1 ml과 배양액 0.1 ml을 첨가하여 50°C에서 10분간 반응하였다. 환원당 정량을 위한 표준물질은 fucose (Sigma, USA)를 이용하였다. 효소의 활성은 1분에 1 μM의 fucose를 생산하는 효소의 양을 1 unit (IU)로 정하였다. 단백질의 정량은 Bradford 방법 [3]에 의해 분석하였다.

분리균주의 성장조건과 효소활성을 조사하기 위해 균주는 FL배지에 접종하여 25°C에서 1일간 전배양한 후 신선한 배지에 0.1% (v/v)를 접종하였다. 배양 온도는 25, 30, 35°C에서 진탕배양(150 rpm)하였다. pH에 따른 성장조사를 위한 FL배지는 1 N NaOH와 1 N HCl을 이용하여 pH 4~9로 조정하였으며 NaCl 농도에 따른 성장조사를 위한 FL배지는

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5629, Fax : +82-51-999-5458

E-mail : jhsohn@silla.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

숙성해수대신 증류수로 대체하였고 0~20% (w/v) NaCl로 조정하여 전배양액을 접종 후 25°C, 150 rpm에서 진탕배양 하였다. 성장은 흡광광도계를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. Fucoisanase 활성은 배양액을 원심분리 (12,000× g 10 min)한 후 상등액을 대상으로 상기에 기술된 방법에 따라 측정하였다.

해양으로부터 분리된 세균을 대상으로 FL 배지에서 2일간 배양한 후 fucoidanase 활성을 측정한 결과 SB 1493균주는 가장 높은 활성을 나타내었다. SB 1493균주의 성장조건에 따른 성장과 fucoidanase 활성을 검토한 결과 온도, pH 및 NaCl 요구성은 최적성장조건과 효소활성이 일치하였다(Fig. 1). 즉, 온도는 25°C, pH는 7.8 그리고 NaCl 요구성은 3%로 나타나 SB 1493균주는 fucoidan을 분해하는 전형적인 호염성의 해양 세균임을 확인할 수 있었다.

Fucoidan 분해특성

SB 1493균주로부터 생산된 fucoidanase 활성에 미치는 온도, pH에 대한 특성은 최적조건으로 2일간 배양한 후 원심분리한 상층액을 0.2 um pore size의 여과지로 여과한 여과액을 조효소액으로 하여 조사하였다. Fucoidanase 활성을 위한 온도는 1% fucoidan이 첨가된 0.1 M citric acid - sodium citric buffer (pH 6.0) 1 ml과 조효소액 0.1 ml을 첨가하여 30, 35, 40, 45, 50, 55°C에서 10분간 반응하였다. pH에 따른 조효소액의 활성은 pH 4, 5, 6 (0.1 mM acetate buffer), pH 7 (0.1 M phosphate buffer), pH 8과 9 (0.1 M Tris-HCl buffer)로 조정된 완충용액에 1% (w/v) fucoidan을 용해한 기질용액 1 ml과 조효소액 0.1 ml을 첨가하여 50°C에서 10분간 반응하였으며 이후 상기 기술된 방법에 의해 환원당을 정량하여 상대적 활성으로 표현하였다. SB 1493균주의 조효소액을 대상으로 시간에 따른 효소활성과 TLC를 이용한 분해산물을 분석하였다. 반응조건은 1% (w/v) fucoidan이 첨가된 0.1 M Tris-HCl buffer 용액 4 ml과 조효소액 1 ml를 첨가한 후 50°C에서 0, 1, 2, 4, 6, 12, 24시간 반응한 후 효소활성을 측정하였다. 반응액을

대상으로 한 산물의 확인을 위한 TLC분석은 Ryu 등[22]의 방법에 따라 silica gel plate에 시료를 점적한 후 전개용매(n-butanol:acetic acid:H₂O=2:1:1)로 전개하였다. 전개한 plate는 전개용매를 건조시킨 후 20% (v/v) H₂SO₄-methanol 용액으로 분무하여 150°C에서 10분간 건조한 후 나타나는 band를 비교하였다.

조효소액의 온도와 pH에 따른 fucoidanase 최적활성을 확인한 결과는 Fig. 2에 도식화하였다. 조효소액에서 fucoidanase 활성은 50°C (활성영역: 45~55°C), pH 8 (활성영역: pH 7~9)로 결정되었다. 기존보고에 따르면 endo- 또는 exo-fucoidanase의 주된 보고는 *Pseudalteromonas*, *Alteromonas*, *Vibrio*, *Sphinomomas*, *Fucobacteria*, *Gelidibacter*, *Vibrio*속 등으로 해양 세균에서 발견되어져 왔으며[2,5,9,13-14,24-28,30,33] 특히, *Pseudalteromonas*, *Gelidibacter*, *Sphinomomas* 및 *Alteromonas*가 생산하는 효소는 endo-type으로 fucoidan으로부터 다양한 형태의 저분자량인 oligosaccharide를 생산하는 것으로 보고하였다. SB 1493균주가 생산하는 조효소액과 fucoidan을 반응하였을 때 Fig. 3A에서 보는 것과 같이 fucoidanase에 의해 환원당은 4시간(0.54 mg/ml)까지 급격히 증가하였고 이후 24시간까지(0.71 mg/ml) 완만히 증가하였다. TLC 크로마토그램을

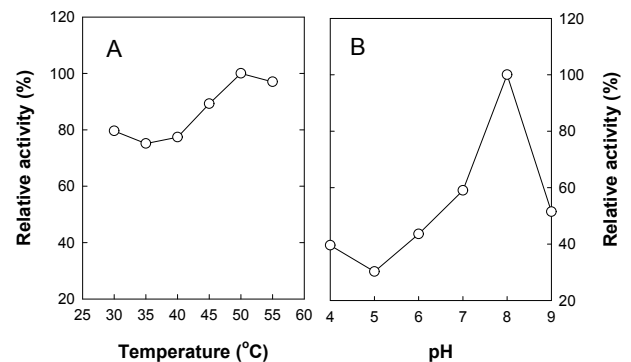


Fig. 2. Effect of temperature (A) and pH (B) on fucoidan hydrolysis by crude enzyme of strain SB 1493.

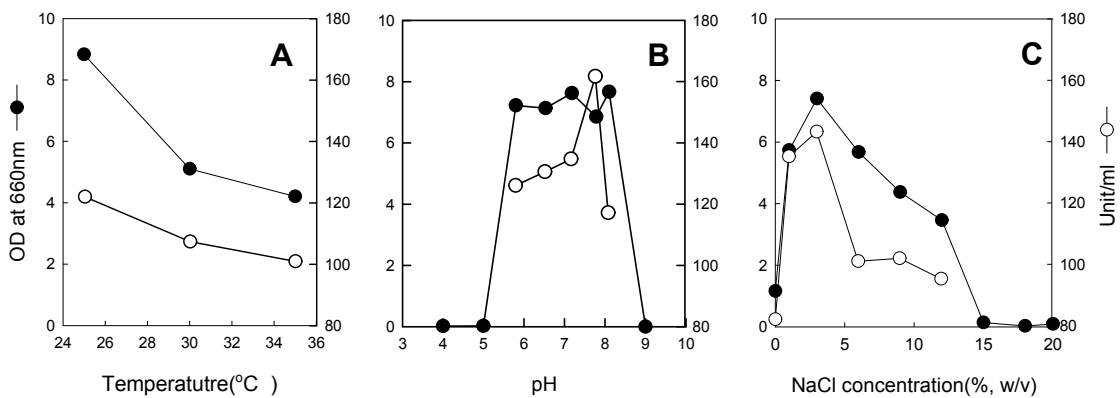


Fig. 1. Effect of temperature (A), pH (B) and NaCl concentration (C) on the growth and fucoidanase activity of strain SB 1493.

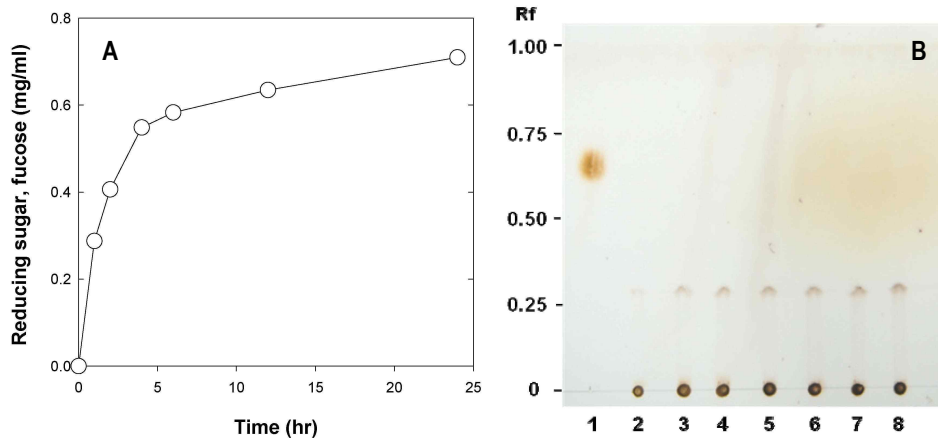


Fig. 3. Time courses of reducing sugar (A) and TLC chromatogram (B) in fucoidan hydrolyzates by crude enzyme (1: L-fucose, 2~8: hydrolyzate by crude enzyme with fucoidan for 0, 1, 2, 4, 6, 12 and 24 hr).

Table 1. Characteristics of strain SB 1493

Characteristic	Result	Characteristic	Result
Cell shape	rod	Enzyme activity (API 20NE) :	
Gram stain	-	Indol production	-
Color of colony	white	Fermentation (glucose)	-
Growth ranges in :		β-galactosidase	+
Temperature (°C)	5-35	Utilization of (Biolog) :	
pH	5.5-8.5	D-Fructose	+
NaCl (% , w/v) requirements	0-12	Mannose	-
Degradation of :		N-acetylglucosamine	-
Starch	+	Sucrose	+
Agar	+	Glycerol	-
Alginate	+	Citrate	-
Fucoïdan	+	Propionate	+
Catalase	+	Butyrate	-
Oxidase	+	Glycogen	+

통한 분해산물의 변화를 관찰한 결과 하나의 뚜렷한 oligo-saccharide (R_f 0.3)만이 관찰되었다(Fig. 3B). 이러한 결과로 SB 1493균주는 endo-type의 oligosaccharide로 가수분해된 반면 fucose는 검출되지 않았다.

Fucoïdan 분해 균주의 등정

API 20NE (biomerieux), Microlog GN2 plate (Biolog)은 제조사에서 제공된 지침서에 의거하여 생화학적 특성 및 기질 이용도를 분석하였다. 16S rRNA gene 염기서열 분석은 Kwon 등[15]의 방법에 따라 총 DNA를 추출한 후 universal primer (27f, 1492r)를 이용한 PCR을 수행하여 얻어진 산물을 대상으로 염기서열을 결정하였다. 확보된 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [1]에 등록되어 있는 database를 사용하여 검색하였으며, 높은 유사성을 가지는 염기서열을 기초로 하여 group별로 정리한 후, PHYDIT version 3.2

(<http://plaza.snu.ac.kr/~jchun/phydit/index.php?ver=3.1>) 운영 프로그램을 이용하여 CLUSTAL_X software, version 1.64b [29]에 의한 alignment를 수행하였다. 계통분석은 PHYLIP package [7]를 이용한 neighbour-joining [23]와 maximum-likelihood [7]방법에 의해 수행하였다. Neighbour-joining tree topology는 1000 resampling에 기초한 bootstrap 분석에 의해 평가되었다. DNA-DNA hybridization 실험은 Kaneko 등[11]의 방법에 의해 수행하였다.

SB 1493균주는 그람음성, 호기성 간균으로 효소 및 기질 이용성에서 다양한 특징을 보였으며(Table 1), 특히 fucoïdan 외에 전분, 한천 및 알긴산과 같은 고분자물질에 대한 분해능을 가지고 있었다. 16S rDNA 염기서열을 이용한 계통학적 분석에서 SB 1493균주(JX045665)는 *Pseudalteromonas atlantica* IAM 12927^T (X82134), *P. espejiana* NCIMB2127^T (X82143), *P. agarivorans* KMM 255^T (AJ417594)과 99.85, 99.78 및 99.70%의 유사도를 나타내었으며 Fig. 4와 같이 계통도를 작성하였다.

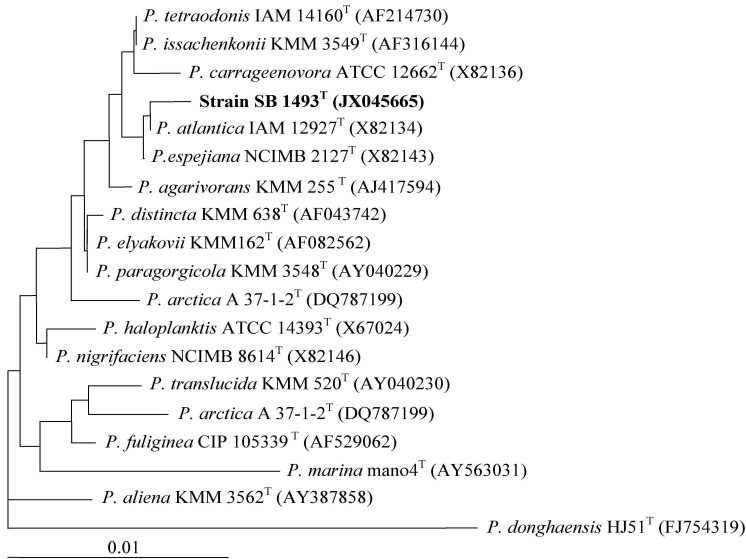


Fig. 4. Neighbour-joining tree showing the relationship of strain SB 1493 to other members of the genus *Pseudoalteromonas* based on 16S rRNA gene sequences. The sequence of *P. donghaensis* HJ51^T (FJ754319) was used as the out group. Bootstrap values $\geq 70\%$ based on 1000 resamplings are shown at nodes. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

DNA-DNA hybridization을 통하여 종 수준에서 상동성을 조사한 결과 *Pseudoalteromonas atlantica* IAM 12927^T (X82134)와 79.24% 그리고 *P. espejiana* NCIMB 2127^T (X82143)와 71.45%의 상동성을 나타내었다(자료미제시). 또한 SB 1493균주와 cluster를 이루고 있는 *Pseudoalteromonas* 종들은 16S rDNA 염기서열에 의한 유사성과 DNA-DNA 상동성이 매우 높은 그룹으로 향후 분류학적 특징의 조사가 필요할 것으로 판단된다. 이러한 결과로부터 SB 1493균주는 *Pseudoalteromonas* 속에 속하는 *Pseudoalteromonas* sp. SB 1493으로 명명하였다.

감사의 글

본 논문은 지식경제부 지역산업기술개발사업의 연구비 지원에 의해 연구되었으며 이에 감사드립니다.

References

- Altschul, S. F., Miller, G. W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Bakunina, I. Y., Nedashkovskaya, O. I., Alekseeva, S. A., Ivanova, E. P., Romanenko, L. A., Gorshkova, N. M. Sakov, V. V. Zvyagintseva, T. N. and Mikhailov, V. V. 2002. Degradation of fucoidan by the marine proteobacterium *Pseudoalteromonas citrea*. *Microbiology* **71**, 41-47.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Chevolot, L., Foucault, A., Chaubet, F., Kervarec, N., Sinquin, C., Fisher, A. and Boisson-Vidal, C. 1999. Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity. *Carbohydr. Res.* **319**, 154-165.
- Descamps, V., Colin, S., Lahaye, M., Jam, M., Richard, C., Potin, P., Barbeyron, T., Yvin, J. C. and Kloareg, B. 2004. Isolation and culture of a marine bacterium degrading the sulfated fucans from marine brown algae. *Mar. Biotech.* **8**, 1-13.
- Do, H., Kang, N. S., Pyo, S., Billiar, T. R. and Sohn, E. H. 2010. Differential regulation by fucoidan of IFN-induced NO production in glial cells and macrophages. *J. Cell. Biochem.* **111**, 1337-1345.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (phylogenetic interference package), version 3.2. University of Washington, Seattle.
- Fujikawa, T., Koyabu, K. and Wada, M. 1979. Enzymes in hepatopancreas of abalone active on fucoidan (1), crude enzyme and unabsorbed fraction on CM-cellulose. *Nippon Nogei Kagakukaishi* **53**, 87-95.
- Furukawa, S., Fujikawa, T. K. D. and Ide, A. 1992a. Production of fucoidan-degrading enzymes, fucoidanase, and fucoidan sulfatase by *Vibrio* sp. N-5. *Nippon Suisan Gakkaishi* **58**, 1499-1503.
- Hemmingson, J. A., Falshaw, R., Furneaux, R. H. and Thompson, K. 2006. Structure and antiviral activity of the galactofucan sulfates extracted from *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta). *J. Appl. Phycol.* **18**, 185-193.
- Kaneko, T., Nozaki, R. and Aizawa, K. 1978. Deoxyribonucleic acid relatedness of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Immunol.* **22**, 639-641.
- Kang, S.-M., Kim, K.-N., Lee, S.-H., Ahn, G., Cha, S.-H., Kim, A.-D., Yang, X.-D., Kang, M.-C. and Jeon, Y.-J. 2011. Antiinflammatory activity of polysaccharide purified from AMG-assistant extract of *Ecklonia cava* in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Carbohydrate Polymers* **85**, 80-85.
- Kim, W.-J., Kim, S.-M., Yoon, Y.-H., Kim, H. G., Kim, H.-K., Moon, S. H., Suh, H.-H., Jang, K.-H. and Park, Y.-I. 2008.

- Isolation and characterization of marine bacterial strain degrading fucoidan from Korean *Undaria pinnatifida* sporophylls. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 616-623.
14. Kim, D. S., Lim, D. J., Moon, S.-H., Suh, H.-H. and Park, Y.-I. 2004. Purification of fucoidan from Korean Sea Tangle (*Lacminaria religosa*) and isolation of fucoidan-degrading microorganisms. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 362-365.
 15. Kwon, S.-J., Ahn, T.-Y. and Sohn, J. H. 2011. Analysis of microbial diversity in Makgeolli fermentation using PCR-DGGE. *J. Life Sci.* **22**, 232-238.
 16. Kitamura, K., Masaru, M. and Yasui, T. 1992. Enzymic degradation of fucoidan by fucoidanase from the hepatopancreas of *Patinopecten yessoensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**, 490-494.
 17. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
 18. Mourao, P. A. S. 2004. Use of sulfated fucans as anticoagulant and antithrombotic agents: future perspectives. *Curr. Pharm. Des.* **10**, 967-981.
 19. Nishino, T., Nishioka, C., Ura, H. and Nagumo, T. 1994. Isolation and partial characterization of a novel amino sugar-containing fucan sulfate from commercial *Fucus vesiculosus* fucoidan. *Carbohydr. Res.* **255**, 213-224.
 20. Nishino, T., Yamauchi, T., Horie, M., Nagumo, T. and Suzuki, H. 2000. Effects of a fucoidan on the activation of plasminogen by u-PA and t-PA. *Thromb. Res.* **99**, 623-634.
 21. Rodríguez-Jasso, R. M., Mussatto, S. I., Pastrana, L., Aguilar, C. N. and Teixeira, J. A. 2010. Fucoidan-degrading fungal strains: screening, morphometric evaluation, and influence of medium composition. *Appl. Biochem Biotechnol.* **162**, 2177-2188.
 22. Ryu, B.-H., Kim, D. S. and Lee, Y. S. 1996. Characterization of fucoidanase screened from the Hepatopancreas of *Patinopecten yessoensis*. *J. Fd Hyg. Safety* **11**, 25-29.
 23. Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
 24. Sakai, T., Kimura, H. and Kato, I. 2002. A marine strain of flavobacteriaceae utilizes brown seaweed fucoidan. *Mar. Biotechnol.* **4**, 399-405.
 25. Sakai, T., Ishizuka, K. and Kato, I. 2003a. Isolation and characterization of a fucoidan-degrading marine bacterium. *Mar. Biotechnol.* **5**, 409-416.
 26. Sakai, T., Ishizuka, K., Shimanaka, K., Ikai, K. and Kato, I. 2003b. Structures of oligosaccharides derived from *Cladosiphon okamuranus* fucoidan by digestion with marine bacterial enzymes. *Mar. Biotechnol.* **5**, 536-544.
 27. Sakai, T., Kimura, H. and Kato, I. 2003c. Purification of sulfated fucoglucuronomannan lyase from bacterial strain of *Fucobacter marina* and study of appropriate conditions for its enzyme digestion. *Mar. Biotechnol.* **5**, 380-387.
 28. Sakai, T., Kawai, T. and Kato, I. 2004. Isolation and characterization of a fucoidan-degrading marine bacterial strain and its fucoidanase. *Mar. Biotechnol.* **6**, 335-346.
 29. Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876-4882.
 30. Urvantseva, A., Bakunina, I., Nedashkovskaya, O., Kim, S. and Zvyagintseva, T. 2006. Distribution of intracellular fucoidan hydrolases among marine bacteria of the family Flavobacteriaceae. *Appl. Biochem Microbiol.* **42**, 484-491.
 31. Wijesinghe, W. A. J. P., Athukorala, Y. and Jeon, Y. J. 2011. Effect of anticoagulative sulfated polysaccharide purified from enzyme-assistant extract of a brown seaweed *Ecklonia cava* on Wistar rats. *Carbohydrate Polymers* **86**, 917-921.
 32. Wu, Q., Zhang, M., Wu, K., Liu, B., Cai, J. and Pan, R. 2011. Purification and characteristics of fucoidanase obtained from *Dendryphiella arenaria* TM94. *J. Appl. Phycol.* **23**, 197-203.
 33. Yaphe, W. and Morgan, K. 1959. Enzymic hydrolysis of fucoidin by *Pseudomonas atlantica* and *Pseudomonas carrageenovora*. *Nature* **183**, 761-762.

초록 : 해양으로부터 fucoidan 분해세균의 분리 및 특성

이유리¹ · 임종민³ · 김기영³ · 문성배³ · 광인석² · 손재학^{1*}

(¹신라대학교 의생명과학대 바이오식품소재학과, ²신라대학교 의생명과학대 생물과학과, ³㈜글루칸)

*Ecklonia cava*로부터 얻어진 fucoidan을 분해하는 해양세균은 해수로부터 분리하였다. 이 균주의 조효소는 pH 8과 50℃에서 fucoidan을 효율적으로 분해하였다. Crude fucoidanase는 1% (w/v) fucoidan 반응액에서 24시간 내에 약 7.1%를 가수분해하였으며 반응산물로서 endo-type 가수분해에 의한 oligosaccharide를 생산하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열분석과 생화학적 시험의 결과로부터 SB 1493균주는 잠정적으로 *Pseudalteromonas* sp.로 동정하였다.