

Streptomyces violaceoruber 유래 Alginate Lyase의 정제 및 Sodium Alginate 가수분해 올리고당의 중합도별 *Bifidobacterium* spp.과 *Lactobacillus* spp.에 대한 생육활성

윤민 · 박영서 · 박귀근*

가천대학교 바이오나노대학 식품생물공학과

Purification of Alginate Lyase from *Streptomyces violaceoruber* and the Growth Activity of Intestinal Bacteria by Degree of Polymerization of Alginate Hydrolysates

Min Yoon, Young-Seo Park, and Gwi-Gun Park*

Department of Food Science & Biotechnology, Gachon University

Abstract

Alginate lyase from *Streptomyces violaceoruber* was purified by DEAE sephacel chromatography and SP sepharose chromatography. The specific activity of the purified enzyme was 14.6 units/mg protein, representing a 40.6-fold purification of the crude extract. The final preparation thus obtained showed a single band on Tricine-SDS polyacrylamide gel electrophoresis whose molecular weight was determined to be 23.3 kDa. The polyMG block of sodium alginate was hydrolyzed by the purified alginate lyase and then separated by activated carbon column chromatography and bio gel P-2 gel filtration. The main hydrolysates were composed of hetero type M/G-oligosaccharides with the degrees of polymerization (D.P.) being 6 and 8. To investigate the effects of hetero type M/G-oligosaccharides from the sodium alginate on the growth of some intestinal bacteria, cells were cultivated individually on the modified-MRS medium containing D.P. 6 and 8 M/G-oligosaccharides. *B. longum* grew 4.25-fold and 6.44-fold more effectively by the treatment of D.P. 6 and 8 M/G-oligosaccharides compared with those of standard MRS medium. In addition, *B. bifidum* grew 3.3-fold and 5.4-fold more effectively by the treatment of D.P. 6 and 8 M/G-oligosaccharides. In conclusion, D.P. 8 was more effective than D.P. 6 hetero M/G-oligosaccharides as regards the growth of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp.

Key words: hetero M/G-oligosaccharides, *Streptomyces violaceoruber*, Alginatelyase, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp.

서 론

알긴산은 기본 구성 성분이 uronic acid로 되어 있으며 (Atsuki et al., 1926), 주로 β -D-mannuronate (M)과 α -L-guluronate (G)가 2종류의 α -1,4 결합 또는 β -1,4 결합으로 이루어진 hetero형 다당류로 알려져 있다(Haug et al., 1966; Penman et al., 1972; Panikkar et al., 1996; Darget et al., 1997). 또, β -D-mannuronate (M)과 α -L-guluronate (G)의 결합은 측쇄가 아닌 직쇄상 polymer로, 1) mannuronate

만으로 구성된 homo-polymannuronate block (polyM-block), 2) guluronate만으로 구성된 homo-polyguluronate block (polyG-block) 및 3) mannuronate와 guluronate의 random배열인 hetero-random copolymer (polyMG-block)의 3종류의 블록구조로 존재한다(Haug et al., 1967; Skjak-Braek et al., 1989; Decho, 1999). 이러한 알긴산을 분해하는 alginate lyase는 작용양식에 따라 polyM-block을 분해하는 polyM-specific lyase (EC 4.2.2.3), polyG-block을 분해하는 polyG-specific lyase (EC 4.2.2.11) 및 특이적으로 polyMG-block을 분해하는 polyMG-specific lyase (EC 4.2.2.-)가 보고되고 있다. 대부분의 알긴산 분해효소에 관한 연구에서는, 알긴산을 부분산분해해서 얻어진 polyM 및 polyG에 대한 작용양식에 따라 알긴산 분해효소의 기질특이성이 정의되고 있다(Sutherland et al., 1995; Kim et al., 2011a). 또, 해양생물과 미생물에 의해 생산되는 알긴산 분해효소

*Corresponding author: Gwigun Park, Department of Food Science & Biotechnology, Gachon University, Seongnam 13120, Korea
Tel: +82-31-750-5383; Fax: +82-31-750-5383

E-mail: ggpark@gachon.ac.kr

Received November 2, 2015; revised January 2, 2016; accepted January 11, 2016

는 알긴산의 구조분석에 사용되고, 화학구성이 알긴산의 성질에 어떤 영향을 미치는지 검토되고 있다(Chitnis and Ohman, 1990; Ostgaard, 1992). 현재 알긴산은 식품가공시 안정제, 농후제, 유화제와 같은 식품첨가제로 사용되며, 실제로 아이스크림, 오렌지주스, 맥주, 치즈 등의 안정제로 이용되고 있다. 또한, 알긴산은 소화·흡수가 되지 않기 때문에 알긴산으로 만든 젤리가 다이어트 식품으로 이용되기도 한다. 동물실험에서는 유해 중금속을 흡착하여 체외로 배출시키고, 나트륨을 배설시켜 혈압을 낮추어 주는 것으로 알려져 있다(Lee et al., 2003). 최근에는 고부가가치 해조류 유래 기능성 신소재에 대한 관심이 깊어지면서 해조 다당류를 해조류로부터 효과적으로 추출할 수 있는 추출방법의 최적화와 해조 다당류의 저분자화를 통하여 해조 다당류 기능성 증진 방법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Kim et al., 2011b). 최근 알긴산 유래 올리고당의 항균/항암 작용, 면역 증강, 항 콜레스테롤 효과, 항 응고 등 다양한 생체조절 기능에 대한 보고들이 있어 알긴산을 이용한 올리고당 제조에 관한 연구가 있었다(Guven et al., 1991). 또, 올리고당은 *Bifidobacteria*의 활성 촉진 및 장내 세균균의 개선, 생체조절인자 등의 역할이 알려지면서 많은 연구가 이루어지고 있다(Joo et al., 1996). 올리고당은 난소 화성으로 분해되지 않고 대장에 존재하는 *Bifidobacterium*과 같은 유익균에 의해 acetate, propionate와 같은 휘발성 지방산(volatile fatty acid, VFA)으로 전환되므로 칼로리가 거의 없으며, *Bifidobacterium* 증식인자로 작용하는 반면 장내부패균의 증식을 억제한다(Colombel et al., 1987; Fuller, 1992; Ryu et al., 1998).

따라서, 본 연구는 hetero 구조적 특징을 가진 천연 유래 알긴산을 기질로 하여, 이를 다양하게 분해하는 미생물 효소를 이용하여 다양한 중합도를 이루는 올리고당을 제조하는데 목표를 두고 있다. 현재 알긴산은 알긴산 그 자체 또는 homo type 알긴산 올리고당으로써 이용되고 있으나, hetero type 알긴산 올리고당은 거의 이용되지 않고 있는 상황이다. 알긴산의 3개의 블록구조 중에는 불균일한 hetero-polymeric random sequence 구조(polyMG-block)가 존재하고 그것에 대한 분해효소가 아직 많이 발견되지 않은 것을 들 수 있다. 그렇기 때문에, 본 연구에서는 *Streptomyces violaceoruber* 균주의 polyMG-specific lyase를 이용한 hetero type oligosaccharides 조제 및 분리를 목표로 하고 있으며, 중합도를 규명하여 중합도별 hetero oligosaccharides의 장내세균에 대한 생육활성을 비교·검토하였다.

재료 및 방법

Streptomyces violaceoruber 유래 alginate lyase의 생산
Streptomyces violaceoruber IFO 15732는 일본 National In-

stitute of Technology and Evaluation Biological Resource Center (NBRC, Tokyo, Japan)에서 분양 받아 실험에 사용하였다. 효소생산의 배지조성은 sodium alginate (Junsei Co., Tokyo, Japan) 1.0%, peptone (Neogen Co., Lansing, MI, USA) 0.5%, yeast extract (Neogen Co., Lansing, MI, USA) 0.3%, KH_2PO_4 (Duksan Co., Seoul, Korea) 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Duksan Co., Seoul, Korea) 0.05%를 함유하는 액체배지 100 mL에 *Streptomyces violaceoruber* 균주를 접종하여 30°C, 125 rpm에서 96시간 배양하여 4°C, 11,000 rpm에서 15분간 원심분리(rotor 14, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA)한 후 상층액을 효소액으로 사용하였다.

Alginate lyase의 활성 측정

효소 활성 측정은 dinitrosalicylic acid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였고 alginate lyase의 활성은 DNS 환원당 정량법(Miller, 1959)에 의하여 수행하였다. 즉, 0.5% sodium alginate를 포함한 pH 8.0의 50 mM Tris-HCl 완충용액을 기질 용액으로 하여 알긴산 가수분해에 따른 환원당 생성량을 측정하였다. 효소활성은 0.9 mL의 기질 용액과 0.1 mL의 균체가 제거된 배양액을 혼합하여 30°C 항온조에서 30분간 반응시킨 후, 반응액 0.2 mL에 2.0 mL DNS 용액을 가하여 100°C에서 10분간 반응시켜 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 mannuronic acid을 이용하여 표준 검량선을 작성하였고 1 unit의 alginate lyase는 동일조건에서 1분당 생성되는 mannuronic acid에 해당하는 1 mg/mL의 환원당을 방출하는 효소의 양으로 정의하였다.

환원당의 정량

환원당은 DNS 정량법(Miller, 1959)에 의하여 수행하였다. 즉 가수분해물 0.1 mL와 DNS 시약 1.0 mL를 혼합하여 100°C 항온조에 10분간 물증탕을 하여 냉각시킨 후 희석하여 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 mannuronic acid를 0.1-1.0 mg/mL를 사용하였다.

효소의 정제

효소정제 수지로는 DEAE sephacel (GE-healthcare Co., Berkshire, England), SP sepharose FF (GE-healthcare Co., Berkshire, England)를 사용하였다. 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)로 평형화된 음이온 교환 수지인 DEAE sephacel (2.5×42 cm)에 packing하여 투석한 조효소를 60 mL/h의 유속으로 fraction collector에 나누어 받았고, 각 용출액은 단백질양과 효소의 활성을 측정하였다. 기질에 대해 활성이 강한 분획을 모아 농축하고, 다시 동일 완충용액으로 평형화시킨 양이온 교환 수지인 SP sepharose FF (2.5×42 cm)에 농축한 효소액을 0-0.3 M NaCl로 농도 구배법에 의해 60 mL/h 유속으로 fraction collector에 나누

어 수집하였고, 각 용출액은 단백질양과 효소의 활성을 측정하여 정제 효소액으로 사용하였다.

Tricine SDS 전기영동

정제효소를 가열하여 변성시킨 후 분자량은 protein size marker (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 결정하였고, Schägger (2006)에 의해 tricine SDS-PAGE를 수행하였다.

Sodium alginate 가수분해 올리고당의 분리

1차 activated carbon column chromatography; 정제 효소액 50 mL (10 units)에 대해 0.5% sodium alginate를 30°C에서 24시간 가수분해하여 TLC (Thin layer chromatography)와 FACE (Fluorophore Assisted Carbohydrate Electrophoresis)를 통해 pattern을 검토한 후 activated carbon column chromatography (3×120 cm)를 이용해 당을 1차 분리하였다.

2차 Bio gel P-2 gel filtration; Activated carbon column chromatography에서 분리한 분획 중 phenol-sulfuric acid법에 의해서 총 당함량을 측정하여 단일 spot이 나오지 않은 fraction을 다시 회수하여 bio gel P-2 gel filtration (3×120 cm)을 이용해 각 중합도별로 2차 분리하였다.

TLC와 FACE

TLC는 McCleary의 방법(McCleary, 1982)에 따라 다음과 같은 조건하에서 전개 후 UV 조사 및 분무시약으로 분무하여 140°C에서 5분간 가열하여 당을 분석하였다. TLC plate; 20×20 cm silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Germany), Developing Solvent; *n*-butyl alcohol/acetic acid/water (5:3:2 v/v), Spray Reagent; 30% sulfuric acid-ethanol.

FACE는 ANTS에 유도화된 당의 전기영동으로 Jackson의 방법(Jackson, 1996)에 따라 4-30%의 polyacrylamide gel을 사용하였다. 당용액 50 µL을 동결건조한 후 15% acetic acid에 0.15 M로 조제한 ANTS용액을 5 µL와 Dimethyl sulfoxide (DMSO)에 1.0 M로 조제한 Sodium cyanoborohydride (NaCNBH₃)용액 5 µL을 첨가하였다. 이 혼합액을 37°C에 15시간 반응시킨 후, 원심농축을 해서 20% glycerol 50 µL에 용해하였다.

Timell modification method에 따른 중합도 검토

시료의 중합도는 Timell's modification method (Hirst et al., 1964)에 따라 측정하였다. 분리된 oligosaccharide 용액 200 µL에 1.0% sodium borohydride 200 µL를 혼합하였다. 대조 실험으로는 1 N sulfuric acid로 만든 1.0% sodium borohydride를 200 µL를 혼합하였다. 이것을 상온에서 1시간 방치한 후 5% phenol 용액 1 mL를 첨가한 다음,

Conc.-H₂SO₄ 1 mL를 가하고 다시 상온에서 30분간 방치한 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 standard는 oligosaccharide 용액 대신에 증류수를 사용하여 측정하였으며, 흡광도로부터 아래 식에 의해 중합도를 계산하였다(Joo et al., 1996).

$$DP = \frac{Q}{Q-1}$$

(여기서, Q = non-reduced oligosaccharide의 O.D.값/reduced oligosaccharide의 O.D.값)

중합도별 가수분해 올리고당의 *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp.에 대한 생육활성

*Bifidobacterium*속 균주(*B. animalis* KCCM 11209, *B. bifidum* KCCM 12096, *B. breve* KCTC 3220, *B. infantis* KCCM 11207, *B. longum* KCCM 11953)와 *Lactobacillus*속 균주(*L. acidophilus* KCTC 3145, *L. casei* KCCM 12452, *L. reuteri* KCTC 3594)에 대한 생육 촉진 활성능을 측정하기 위해 MRS media에서 탄소원인 dextrose 대신에 조제·분리된 중합도별 M/G-oligosaccharides를 회수하여 진공농축시킨 후 DNS법(Miller, 1959)을 이용하여 dextrose와 동일한 환원당량으로 조절하였다. M/G-oligosaccharides를 탄소원으로 121°C에서 15분간 멸균한 modified MRS media를 조제하여, 초기균수 10⁷으로 희석하여 혐기적 조건하에서 37°C, 48시간 평판배양한 후 colony수를 비교하고(Deya et al., 1982), 동일한 조건으로 액체 배양하여 590 nm에서 흡광도를 측정하여 총균수를 비교하였다(Toba, 1985).

결과 및 고찰

DEAE sephacel anion chromatography 및 SP sepharose FF cation chromatography에 의한 정제

조효소액을 Cellu-Sep MWCO 12,000-14,000 (Membrane Filtration Products Inc., Seguin, TX, USA)에 처리하여 150 mM NaCl이 포함된 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)으로 4°C에서 하룻밤 투석하고 다시 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)으로 4°C에서 하룻밤 투석하였다. 투석한 효소액을 DEAE sephacel anion chromatography (2.5×42 cm)에 정제를 진행한 결과 분획 No. 19-64에서 효소 활성이 나타났다(data not shown).

분획별로 tube에 수집된 활성 효소액을 모은 후, 10K centric filter (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)를 이용하여 농축하였다. 농축한 효소액을 Cellu-Sep MWCO 12,000-14,000 (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)에 처리하여 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)으로 4°C에서 하룻밤 투석한 후, SP sepharose FF cation chromatography

(2.5×42 cm)에 loading한 결과 No. 95-105에서 효소 활성이 높은 peak가 나타났다(Fig. 1). 각 정제 단계별 정제도와 수율은 Table 1에 나타내었으며, DEAE sephacel chromatography 정제 결과, 비활성은 1.56 unit/mg, 정제도는 4.4배였다. SP sepharose FF chromatography 정제 결과 최종적으로 정제된 효소의 비활성은 14.59 units/mg, 정제도는 약 40.6배를 나타냈다.

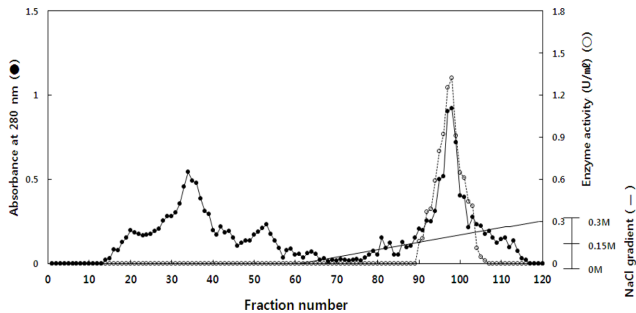


Fig. 1. Purification of the alginate lyase from *Streptomyces violaceoruber* by SP sepharose cation chromatography. Symbols; ○, alginate lyase activity; ●, absorbance at 280 nm; —, NaCl gradient.

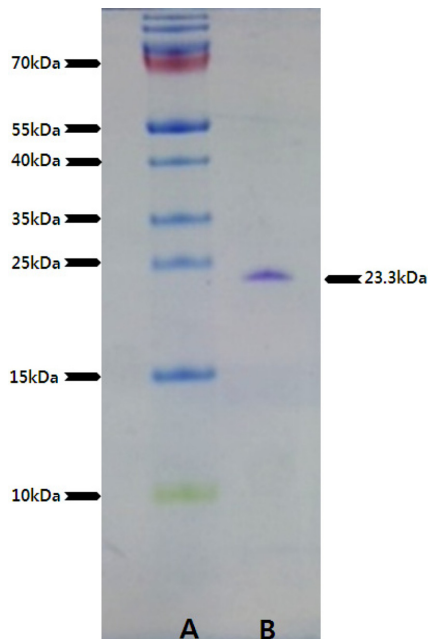


Fig. 2. Analysis of the purified polyMG-specific lyase by tricine SDS-PAGE. A, Marker; B, purified polyMG-specific lyase.

정제 alginate lyase의 분자량

정제효소는 tricine SDS-PAGE에 의해 단일밴드를 나타내었으며(Fig. 2), alginate lyase의 분자량은 23.3 kDa으로 계산되었다. *Alteromonas* sp. 272 유래 정제 alginate lyase에서는 33.9 kDa, *Streptomyces* sp. ALG-5에서는 28.2 kDa, *Vibrio* sp. AL-145에서는 23 kDa, *Pseudomonas aeruginosa*에서는 30 kDa의 분자량이 보고되고 있다(Kim et al., 2011b).

Sodium alginate 유래 M/G-oligosaccharides의 분리 및 중합도 결정

1차 activated carbon column chromatography에 의해 부분적으로 분리된 당용액의 TLC pattern을 검토하였으며(Fig. 3), 중합도별 M/G-oligosaccharides를 회수하여 2차 bio gel P-2 column (3×120 cm)를 이용한 gel filtration을 수행하였다. 60 mL/h 유속으로 tube당 10 mL씩 용출하여 동일한



Fig. 3. TLC of sodium alginate hydrolysates on 1st activated carbon column chromatography. M, mono-mannuronate, di-mannuronate, tri-mannuronate and tetra-mannuronate from top to bottom; G, mono-guluronate; From 21 to 170 are fraction numbers on 1st activated carbon column chromatography.

Table 1. Summary of purification of polyMG-specific lyase from *Streptomyces violaceoruber*

Step	Total activity (Unit)	Total protein (mg)	Specific activity (Units/mg)	Yield (%)	Purification fold
Crude enzyme	399.0	1110.0	0.36	100	1
DEAE sephacel	203.5	130.2	1.56	51	4.4
SP Sepharose FF	174.4	12.0	14.59	43.7	40.6

방법으로 흡광도를 측정한 후(data not shown), peak를 나타내는 각 분획을 회수하여 분리도 및 중합도를 확인하기 위하여 TLC (Fig. 4-A)와 FACE (Fig. 4-B)를 통해 Rf 값에 의한 pattern을 비교·검토한 결과, 분획 No. 20-80에서 중합도 8의 M/G-oligosaccharide를, fraction No. 86-120에서 중합도 6의 M/G-oligosaccharide를 회수하였다.

본 연구에서는 alginate 유래 M/G-oligosaccharides의 구조식은 동정되지 않은 상태이나 중합도를 정확하게 정의하기 위해 Timell's modification method (Hirst et al., 1964)에 따라 분석한 결과, 각각 분리·회수된 분획 No. 86-120 M/G-oligosaccharide의 Q는 1.194, Q-1는 0.194, Q/Q-1는 6.154로 분획 No. 20-80 M/G-oligosaccharide의 Q는 1.138, Q-1는 0.138, Q/Q-1는 8.246로 나타났다. 이에 분획 No. 86-120의 MG-oligosaccharide는 중합도 6, 분획 No. 20-80의 MG-oligosaccharide는 중합도 8로 규명하였다(Table 2).

중합도별 poly-MG 가수분해 올리고당의 *Bifidobacterium* spp.과 *Lactobacillus* spp.에 대한 생육활성

*Bifidobacterium*속 균주(*B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*)와 *Lactobacillus*속 균주(*L. acidophilus*,

L. casei, *L. reuteri*)에 대한 생육 촉진 활성능을 측정하기 위해 MRS media에서 탄소원인 dextrose 대신에 조제·분리된 중합도 6과 8 M/G-oligosaccharides를 첨가한 후 평판 배양을 하여 측정한 결과 올리고당이 첨가되지 않은 MRS broth에 비해 생육 촉진 활성을 보였다. 상기 방법으로 측정한 결과, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. longum* 그리고 *L. casei*에 있어서 D.P. 8의 경우 3배 이상의 상대 활성을 나타내었고, *B. bifidum*과 *B. longum*에 있어서도 D.P. 6의 경우 3배 이상의 상대 활성을 나타내었다. 특히 *B. longum*에서는 D.P. 6 M/G-oligosaccharide를 탄소원으로 대체한 경우 표준 MRS배지와 비교하여 4.25배, D.P. 8에서 6.44배의 상대 활성을 나타내어 가장 우수한 생육 활성을 나타내었으며, *B. bifidum*의 경우에서도 D.P. 6에서 3.27배, D.P. 8에서 5.4배의 상대 활성을 나타내었다. 반면에, *L. reuteri*에 대한 D.P. 8의 경우에는 표준 MRS media와 비교하여 0.29배로 감소하였다. 또한 D.P. 8의 올리고당이 D.P. 6의 올리고당보다 생육 활성에 크게 기여하는 것으로 나타났다(Table 3). 본 연구에서 사용된 *Streptomyces violaceoruber*의 alginate lyase는 polyMG block만을 특이적으로 가수분해 시키는 polyMG-specific lyase (EC 4.2.2.-)

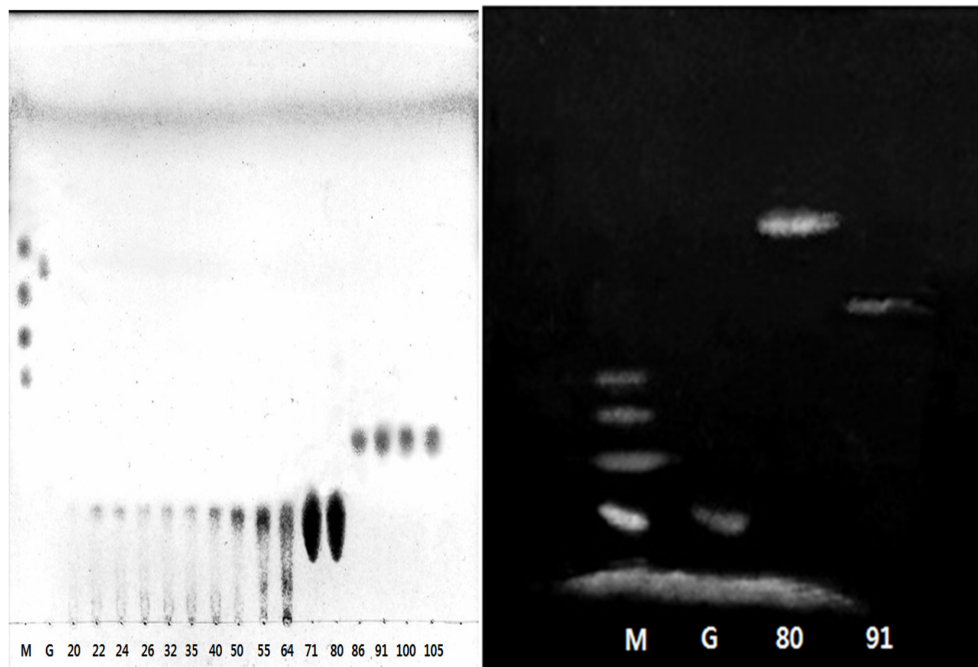


Fig. 4. TLC (A) and FACE (B) of sodium alginate hydrolysates on 2nd bio gel P-2 gel filtration. (A); M, mono-mannuronate, di-mannuronate, tri-mannuronate and tetra-mannuronate from top to bottom; G, mono-guluronate; From 20 to 105 are fraction numbers on 2nd bio gel P-2 gel filtration. (B); M, mono-mannuronate, di-mannuronate, tri-mannuronate and tetra-mannuronate from bottom to top; G, mono-guluronate; 80 and 91 are fraction numbers on 2nd bio gel P-2 gel filtration.

Table 2. Determination of D.P. value by the Timell's modification method

	D.P. value
Sodium alginate hydrolysates by <i>Streptomyces violaceoruber</i> purified polyMG-specific lyase fraction No. 86-120	6
Sodium alginate hydrolysates by <i>Streptomyces violaceoruber</i> purified polyMG-specific lyase fraction No. 20-80	8

Table 3. Summary of growth activity of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. by the D.Ps hetero M/G-oligosaccharides by *Streptomyces violaceoruber*

Microorganism	Culture medium	Viable cell number (CFU/mL)	Relative activity (%)
<i>B. animalis</i>	Standard MRS	6.5×10^9	100
	MRS + D.P 6	1.6×10^{10}	246
	MRS + D.P 8	1.95×10^{10}	300
<i>B. bifidum</i>	Standard MRS	7.5×10^9	100
	MRS + D.P 6	2.45×10^{10}	327
	MRS + D.P 8	4.05×10^{10}	540
<i>B. breve</i>	Standard MRS	6.5×10^9	100
	MRS + D.P 6	1.3×10^{10}	200
	MRS + D.P 8	2.05×10^{10}	315
<i>B. infantis</i>	Standard MRS	5.5×10^9	100
	MRS + D.P 6	1.15×10^{10}	209
	MRS + D.P 8	1.3×10^{10}	236
<i>B. longum</i>	Standard MRS	8×10^9	100
	MRS + D.P 6	3.4×10^{10}	425
	MRS + D.P 8	5.15×10^{10}	644
<i>L. acidophilus</i>	Standard MRS	2×10^9	100
	MRS + D.P 6	3×10^9	150
	MRS + D.P 8	3.5×10^9	175
<i>L. casei</i>	Standard MRS	2×10^9	100
	MRS + D.P 6	4.5×10^9	225
	MRS + D.P 8	6×10^9	300
<i>L. reuteri</i>	Standard MRS	3.5×10^9	100
	MRS + D.P 6	4×10^9	114
	MRS + D.P 8	2.5×10^9	71

으로 sodium alginate 유래 올리고당의 mannuronate와 guluronate 비율이 random한 hetero type M/G-oligosaccharides으로 생성하는 특징을 나타내고 있다. 동일 중합도를 갖는 homo type oligosaccharide와 hetero type oligosaccharide의 *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp.에 대한 생육활성의 차이는 구조적인 측면에서 hetero type oligosaccharide의 mannuronate와 guluronate random 배열 구성이 homo type oligosaccharide 보다 미생물 생육활성에 영향을 더 미치는 것으로 추론하고 있다. M/G-oligosaccharides의 mannuronate와 guluronate의 구성당비는 갈조류의 종류, 채취부위, 채취시기 그리고 지역에 따라 다르기 때문에, M/G비나 분자량에 의해 oligosaccharides의 물리화학적 역할도 다양하다. M/G구성비가 높은 저분자 올리고당의 경우, 세균감염에 대한 면역 활성을 증강시키고, 케라틴 성분 세포성장의 촉진효과와 피부섬유아세포 증식의 작용이 있다고 보고되고 있다(kawada et al., 1997; Tajima et al., 1999). 앞으로의 과제로서 본 연구에서 이용한 polyMG-specific lyase의 효율적 생산법 개발의 중요성과 다른 미생물 유래 polyMG-specific lyase를 이용한 효소분해법에 대해 다양한 중합도의 hetero type oligosaccharides의 수율 및 순도를 높이는 방법이 중요한 역할을 할 것

로 생각된다.

요 약

DEAE sephacel anion chromatography 및 SP sepharose cation chromatography에 의해 *Streptomyces violaceoruber* 유래 alginate lyase의 정제를 수행하여 비활성 14.59 units/mL 정제배율 40.64배를 나타내었다. Tricine SDS-PAGE에 의한 단일밴드를 확인하였고, 분자량은 23.3 kDa으로 결정되었다. 정제효소에 의해 sodium alginate를 가수분해하여 1차 activated carbon column chromatography와 2차 bio gel P-2 gel filtration에 의해 당가수분해물을 분리 회수하여 TLC와 FACE를 통해 중합도를 확인하고 Timell's method에 의해 hetero type M/G-oligosaccharide 중합도 6, 8로 결정되었다. *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*와 *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*에 생육활성에 대한 중합도 6, 8의 영향을 검토하기 위하여 modified-MRS media에 탄소원으로 중합도 6, 8를 대체하여 생육활성을 비교한 결과 *B. longum*에서는 D.P. 6 M/G-oligosaccharide를 탄소원으로 대체한 경우 표준 MRS배지와 비교하여 4.25배, D.P. 8에서 6.44배의 상대활성을 나타내어 가장 우수한 생육활성을 나타내었으며, *B. bifidum*의 경우에서도 D.P. 6에서 3.27배, D.P. 8에서 5.4배의 상대활성을 나타내었다. 이외에도 *B. animalis*, *B. breve* 그리고 *L. casei*에 있어서도 D.P. 8의 경우 3배의 상대활성을 나타내었으나, *L. reuteri*에 대한 D.P. 8의 경우에는 표준 MRS media와 비교하여 0.29배로 감소하였다. 결과적으로 D.P. 8의 올리고당이 D.P. 6의 올리고당보다 생육활성에 크게 기여하는 것으로 나타났다.

References

- Atsuki K, Tomoda Y. 1926. Studies on seaweeds of Japan I. The chemical constituents of *Laminaria*. J. Soc. Chem. Ind. Japan 29: 509-517.
- Chitnis CE, Ohman DE. 1990. Cloning of *Pseudomonas aeruginosa* G, which controls alginate structure. J. Bacteriol. 172: 2894-2900.
- Colombel JF, Cortot A, Neut C, Romond C. 1987. Yogurt with *Bifidobacterium longum* reduces erythromycin induced gastrointestinal effect. Lancet 2: 43-48.
- Darget KI, Skjak-Braek G, Smidsrød O. 1997. Alginate based new materials. Int. J. Biol. Macromol. 21: 47-55.
- Decho AW. 1999. Imaging on alginate polymer gel matrix using atomic force microscopy. Carbohydr. Res. 315: 330-333.
- Deya E, Amaya M, Nojiri K, Igarashi S. 1982. Studies on the application of galactosyl lactose for infant formula. Yukijirushi Nyugyo Gijyutsu Kenkyusho Hokoku 79: 19-26.
- Fuller R. 1992. Probiotics-The scientific Basis. Chapman & Hall, London, UK, pp. 355-376.
- Guven KC, Ozsoy Y, Ulutin ON. 1991. Anticoagulant, fibrinolytic

- and antiaggregant activity of carrageenans and glainic acid. *Botan. Marin.* 34: 429-435.
- Haug A, Larsen B, Smidsrød O. 1966. A study of the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis. *Acta Chem. Scand.* 20: 183-190.
- Haug A, Larsen B, Smidsrød O. 1967. Studies on the sequence of uronic acid residues in alginic acid. *Acta Chem. Scand.* 21: 691-704.
- Hirst EL, Percival E, Wold JK. 1964. The structure of alginic acid. Part IV. Partial hydrolysis of the reduced polysaccharide. *J. Chem. Soc.* 8: 1493.
- Jackson P. 1996. The analysis of fluorophore-labeled carbohydrates by polyacrylamide gel electrophoresis. *Mol. Biotechnol.* 5: 101-123.
- Joo DS, Lee JS, Park JJ, Cho SY, Kim HK, Lee EH. 1996. Preparation of oligosaccharides from alginic acid enzymatic hydrolysis. *Korean J. Food Sci. Technol.* 28: 146-151.
- Kawada A, Hiura N, Shiraiwa M, Tajima S, Hiruma M, Hara K, Ishibashi A, Takahara H. 1997. Stimulation of human keratinocyte growth by alginate oligosaccharides, a possible co-factor for epidermal growth factor in cell culture. *FEBS Letters* 408: 43-46.
- Kim HS, Lee CG, Lee EY. 2011a. Alginate lyase: structure, property, and application. *Biotechnol, Bioprocess, Eng.* 16: 843-851.
- Kim JH, Kim YH, Kim SK, Kim BW, Nam SW. 2011b. Properties and industrial applications of seaweed polysaccharides-degrading enzymes from the marine microorganisms. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 39: 189-199.
- Lee. JH, and Lee EY. 2003. Isolation of alginate degrading marine bacteria and characterization of alginase. *J. Life Sci.* 23: 718-722.
- McCleary BV. 1982. Purification and properties of a mannoside mannohydrolase from sugar. *Carbohydr. Res.* 101: 74-79.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
- Ostgaard K. 1992. Enzymatic microassay for the determination and characterization of alginates. *Carbohydr. Polym.* 19: 51-59.
- Panikkar R, Brasch D. 1996. Composition and block structure of alginates from New Zealand brown seaweeds. *Carbohydr. Res.* 293: 119-132.
- Penman A, Sanderson GR. 1972. A method for the determination of uronic acid sequence in alginates. *Carbohydr. Res.* 25: 273-282.
- Ryu BH, Cho SH, Ha SW, Park KM, Kang KH. 1998. Changes of the intestinal microflora and fecal properties by intake of yoghurt added capsulated or uncapsulated Bifidobacteria. *Kor. J. Appl. Microbiol, Biotechnol.* 26: 221-225.
- Schägger H. 2006. Tricine-SDS PAGE. *Nature Protocols* 1: 16-22.
- Skjak-Braek G, Grasdalen H, Smidsrød O. 1989. Inhomogeneous polysaccharide ionic gels. *Carbohydr. Polym.* 10: 31-54.
- Sutherland IW. 1995. Polysaccharide lyases. *Microbiol. Rev.* 16: 323-347.
- Tajima S, Inoue H, Kawada A, Ishibashi A, Takahara H, Hiura N. 1999. Alginate oligosaccharides modulate cell morphology, cell proliferation and collagen expression in human skin fibroblasts *in vitro*. *Arch. Dermatol. Res.* 291: 432-436.
- Toba T. 1985. β -galactosidase-its application to lactose hydrolysis and galacto-oligosaccharides product. *Japan. J. Dairy Food Sci.* 34: 169-182.