

단 신

이온화 방사선 조사에 의해 얻어진 저분자 laminarin의 분자구조 특성

최종일[†]

전남대학교 생물공학과
500-757 광주시 북구 용봉동 300
(2013년 7월 17일 접수, 2013년 9월 11일 수정본 접수, 2013년 9월 17일 채택)

Structural Characteristics of Low Molecular Weight Laminarin Prepared by Ionizing Irradiation

Jong-il Choi[†]

Department of Biotechnology and Bioengineering, Chonnam National University, 300 Yongbong-dong, Buk-gu, Gwangju 500-757, Korea
(Received 17 July 2013; Received in revised form 11 September 2013; accepted 17 September 2013)

요 약

저분자량의 laminarin은 항산화능과 같은 생물학적 물질이 고분자량의 laminarin과 비교하여 증가하였다는 최근의 연구 결과들이 보고되었다. 이러한 저분자화에 따른 laminarin 생물활성의 증가 원인을 밝히고자 본 논문에서는 이온화 방사선 조사를 통하여 얻어진 저분자량 laminarin의 분자구조에 관한 연구를 수행하였다. 15 kDa 크기의 분자량을 갖는 laminarin을 이온화 방사선 조사를 이용하여 13.5, 8.5, 7, 6 kDa 크기의 저분자량 laminarin 시료들을 얻었다. 얻어진 저분자량 laminarin은 고분자량 laminarin에 비하여 낮은 polydispersity 값을 가졌다. 방사선 조사에 의한 저분자화에 따른 laminarin 기능기들의 변화를 확인하기 위하여 Fourier-transform infrared 분석을 수행한 결과, 분자량 감소에 따라서 대부분의 기능기들의 변화는 관찰되지 않았지만, carbonyl group의 증가가 확인되었다. Laminarin 입자의 scanning electron microscopy 분석으로부터 저분자량 laminarin에서 glycosidic 결합의 분해에 의한 입자 균열이 확인되었다. 이러한 결과들은 laminarin과 같은 다당류의 저분자화에 따른 기능성 변화 연구에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

Abstract – Recently, it has been reported that low molecular weight laminarin had the enhanced biological activities. In this study, molecular structure of low molecular weight laminarin prepared by ionizing irradiation was studied. Low molecular weight laminarin samples of 13.5, 8.5, 7, and 6 kDa were obtained from 15 kDa laminarin by irradiation. From gel permeation chromatography data, low molecular weight laminarin was shown to have low polydispersity. To define the changes of functional groups in laminarin with different molecular weights, Fourier-transform infrared analysis was carried out. There was found no significant changes of functional groups in low molecular weight laminarin, except the increase of carbonyl group. The granular fissures from scanning electron microscopy showed the breakage of glycosidic bond in low molecular weight laminarin. These results could be utilized for the investigation of the enhanced biological activities of low molecular weight polysaccharides including laminarin.

Key words: Laminarin, Polydispersity, FT-IR, SEM

1. 서 론

Laminarin은 갈조류에 다량으로 존재하는 저장성 다당류로 단량체인 glucose가 β -1,3-glycosidic 또는 β -1,6-glycosidic 결합으로 이루어져 있다. 최근 laminarin에서 항산화와 면역력 증가를 통한 항미생물, 항종양 등의 활성이 보고되었다[1,2]. 또한 laminarin은 구조적 특성으로 인해 β -glucan과 유사한 활성을 나타내며, 특히 식물 및 동물의 면역 활성 증진효과, radioprotective, antitumor 및 antibacterial

activity에 관여한다고 보고되고 있다[3].

일반적으로, 다당류의 생물학적 활성은 분자량, 결합의 위치와 결합도, 기능기 등에 의존한다고 보고되어 있다[4]. 특히 laminarin의 경우 분자량에 따른 활성 영향에 관한 연구 결과들이 보고되고 있다. 최근, 저분자량의 laminarin이 면역관련 단백질의 발현을 유도하고, 세포자멸사 관련 단백질의 발현을 억제한다는 결과가 보고되었다[5]. Miyanishi 등 [6]은 고분자량의 laminarin에서는 활성이 거의 없는 TNF- α 의 생산 유도가 저분자량의 laminarin에서는 유도되어 leukemia cell의 증식을 억제하였다고 보고하였다. 이러한 연구에서 사용된 저분자량의 laminarin은 β -1,3 glucanase와 같은 효소를 이용하여 생산

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: choiji01@jnu.ac.kr

하였다. 하지만, 이러한 효소적 저분자화 방법은 높은 효소 비용, 효소반응을 위한 엄격한 조건, 긴 반응 시간, 반응 후 정제 공정의 필요, 그리고 효소의 특이성에 의한 부분적 분해 등과 같은 단점들을 가지고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위하여, 최근에는 이온화 방사선 조사를 이용한 다당류의 저분자화 연구 결과가 보고되고 있다 [3,7-9]. 이온화 방사선은 수용상에서 물분자의 이온화를 통해 hydrogen 라디칼($\cdot\text{H}$), hydroxyl 라디칼($\cdot\text{OH}$), hydroperoxyl 라디칼($\cdot\text{HO}_2$) 등을 생성하고, 이러한 반응성 높은 자유 라디칼들이 생물 분자와 반응함으로써 분해 또는 중합을 야기하는 것으로 알려져 있다. 이온화 방사선을 이용한 고분자 다당류의 분해는 공정의 단순화, 화학 시약의 불필요, 구조 변화의 최소화 및 결합 부위의 임의적 분해 등의 장점을 가지고 있다. 최근에 Choi 등 [3,10]은 laminarin의 이온화 방사선 조사를 이용한 저분자화 연구에서 저분자화에 따른 생물학적 활성의 증가를 보고하였다. 하지만, 방사선 조사에 의하여 얻어진 저분자량의 laminarin의 구조에 대해서는 평균 분자량에 대한 정보만이 보고되었다.

따라서 본 논문에서는 이온화 방사선 조사에 의하여 얻어진 다양한 분자량의 저분자 laminarin을 gel permeation chromatography, Fourier transform infrared 분석, scanning electron microscope 등을 이용하여 분자 구조 및 기능기들의 변화를 연구하였다.

2. 실험

*Eisenia bicyclis*에서 추출된 laminarin은 Tokyo Chemical Industry Co. Ltd. (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 구입된 laminarin의 평균 분자량은 15 kDa이었다. 감마선 조사에 의한 저분자량의 laminarin은 Choi 등의 방법[3]에 따라 준비하였다. 얻어진 laminarin 시료들의 분자량은 13.5, 8.5, 7, 그리고 6 kDa이었다.

Gel permeation chromatography (GPC) 분석은 다음과 같은 시스템을 이용하여 수행하였다. Separation module (Waters 2690, Waters Co., Milford, MA), refractive index detector (RI, Waters 2410, Waters Co.), Empower software (System Software, Empower option GPC, Waters Co.), PL aquagel-OH -60, -40, -30 columns (300×7.5 mm, 8 μm , Polymer laboratories Ltd., UK). 유동상은 0.1 M sodium nitrate를 1 mL/min의 속도로 흘려보냈으며, 분석은 40 °C에서 수행되었다. 시료의 분석 부피는 200 mL였으며, pullulan (Showa Denko K. K., Tokyo, Japan)을 분자량 기준 물질로 사용하였다. Polydispersity (PI)는 수평균 분자량에 대한 질량 평균 분자량의 값으로 나타내었다.

Fourier-transform infrared (FT-IR)를 이용한 분석은 Bruker Spectrometer VERTEX 70 (Billerica, MA)을 이용하여 455과 3996 cm^{-1} 파장 사이의 값을 측정하였다. 분석을 위한 시료는 KBr과 1:100 비율(laminarin/KBr, w/w)로 혼합하여 pellet을 준비하였다. 얻어진 스펙트럼은 24번의 scan의 결과값이다.

저분자량의 laminarin 입자 관찰을 위해서 scanning electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan)을 이용하였다. 시료는 금 박막으로 처리된 carbon strip에 고정되었으며 100배 확대되었다.

3. 결과 및 고찰

구입한 laminarin의 원래의 분자량은 약 15 kDa이었으며, 이온화 방사선 조사를 이용하여 13.5, 8.5, 7, 6 kDa의 저분자량의 laminarin을

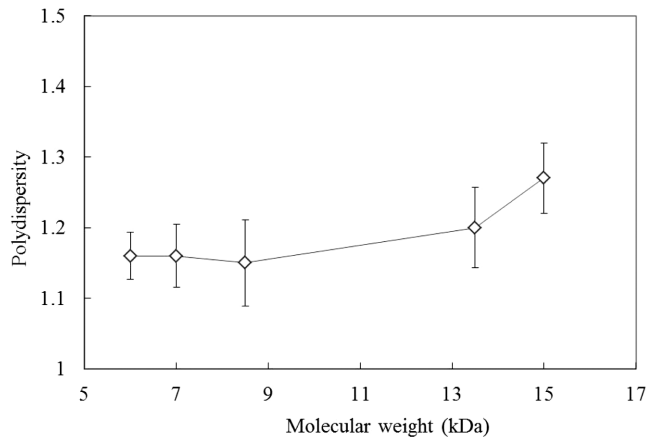


Fig. 1. Polydispersity of different molecular weight laminarin. Data are collected from at least three independent experiments.

준비하였다. Choi 등은 laminarin과 fucoidan의 평균 분자량이 방사선 조사에 따른 흡수 선량이 증가함에 따라 감소한다고 보고하였다 [10]. GPC를 이용하여 얻어진 laminarin 시료들의 분자량 분포 결과는 Fig. 1에서 보여진다. 15 kDa 크기의 laminarin의 polydispersity (PI)는 약 1.27의 값을 가졌으나, 방사선 조사를 이용하여 얻어진 저분자량의 laminarin 시료들에서는 분자량이 감소함에 따라 PI 값의 감소를 보이다가 일정한 값으로 유지되었다. 8.5 kDa 크기 이하의 저분자량 laminarin에서는 PI 값이 1.16으로 일정하였다. 이온화 방사선 조사에 의한 다당류의 분해에서 다당류의 분자량이 높을수록 더 많은 분해가 일어난다는 것이 밝혀졌다. Carboxymethylcellulose (CMC)의 분해 실험에서 방사선 조사에 의한 CMC의 분해도는 초기 분자량에 의존한다고 밝혀졌다[9,11]. 따라서 본 연구에서 저분자량의 laminarin을 얻기 위한 방사선 조사 과정에서 상대적으로 높은 분자량은 더 분해가 진행되어 PI 값이 낮아지는 결과를 보이게 되었다. 이러한 낮은 PI 값은 원하는 분자량 범위를 갖는 저분자량의 laminarin 생산 공정에서 분리 공정을 단순화할 수 있는 장점이 있다. 저분자량의 laminarin으로 분해하는 과정에서 PI 값이 높아진다면, 넓은 분자량대의 분해산물이 얻어진 것으로 이 경우 필요로 하는 분자량대의 laminarin을 얻기 위해서 분자량에 따른 분리과정을 거쳐야 하는 단점을 가지게 된다. 또한, Pang 등 [12]은 저분자 laminarin의 분해연구에서 laminarin 내에 존재하는 β -1,3-결합과 β -1,6-결합의 비율이 1.5:1이었으나, β -1,3-flucanase를 이용한 저분자화 결과 그 비율이 1.3:1로 감소하였다고 보고하였다. 이러한 결과는 사용된 효소의 특이성에 기인한다. 하지만, Choi 등 [13]은 이온화 방사선 조사에 의한 laminarin 이 저분자화 될 경우 방사선의 임의적인 분해기작으로 β -1,3-결합에 대한 β -1,6-결합의 비율은 일정한 값을 갖는다고 보고하였다.

Choi 등 [13]은 이온화 방사선에 의한 laminarin의 저분자화에서 흡수선량이 40, 100, 200 kGy일 경우 분해된 laminarin의 분자량은 각각 8.5, 7, 6 kDa이었으며, lipid peroxidation의 저해능으로 평가한 항산화능은 100 kGy 이상에서는 통계적으로 차이가 없다고 보고하였다. 이러한 결과와 본 실험에서 확인된 PI 값들로부터 laminarin 저분자화를 위한 적정 흡수선량은 100 kGy인 것으로 판단된다.

Fig. 2에서는 얻어진 저분자량의 laminarin에서의 기능기 변화를 확인하기 위하여 FT-IR 결과를 제시하였다. Laminarin 시료의 FT-IR

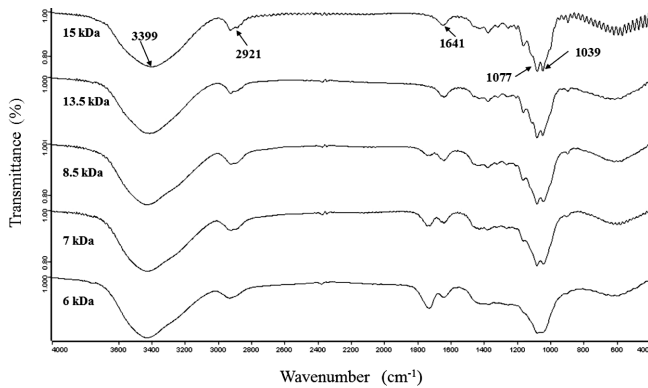


Fig. 2. FT-IR spectrum of different molecular weight laminarin samples; (a) laminarin with 15 kDa, (b) with 13.5 kDa, (c) with 8.5 kDa, (d) with 7 kDa, and (e) with 6 kDa.

스펙트럼에서 3399, 2921, 1641, 1077, 1039 cm^{-1} 에서 흡수파장을 나타냈다. 3399, 2921 및 1077과 1039 cm^{-1} 영역의 흡수파장은 각각 -OH, C-H 및 C-O 결합을 뜻한다. C-O 결합은 1200–950 cm^{-1} 파장에서 나타나는 기능기이며, 950–750 cm^{-1} 은 α -D-glucan 및 β -D-glucan 구조에서 나타나는 특정 파장이라고 보고된 바 있다[14]. 서로 다른 분자량의 Laminarin 시료들의 스펙트럼으로부터 방사선 조사에 의해 얻어진 저분자량의 laminarin에 존재하는 기능기 변화는 관찰되지 않았으나, 1641 cm^{-1} 영역에서의 변화가 관찰되었는데 이는 carbonyl group의 형성에 따른 것이라 사료된다. 이는 이온화 방사선 조사에 의해 glucan 내의 carboxyl 및 carbonyl group들이 영향을 받았다는 Huang 등 [15]의 연구결과와 일치하였다. Choi 등 [10]은 ultraviolet 스펙트럼 실험으로부터 laminarin의 방사선 조사에 따른 carbonyl group의 증가를 확인하였다. 이러한 laminarin 분자 내의 carbonyl groups의 증가는 carbonyl 기와 같은 이중결합이 항산화능에 관여한다는 선행 연구로부터 저분자량의 laminarin의 항산화능 증가에 대한 원인으로 해석될 수 있다[3].

이온화 방사선 조사를 이용하여 얻어진 저분자량의 laminarin 시료들을 주사전자현미경을 이용하여 관찰하였다(Fig. 3). 관찰 결과, 분자량이 낮은 laminarin 시료에서 분자량의 감소에 따라 입자의 균열이 발생하였음을 관찰할 수 있었다. 이온화 방사선 조사에 의해 탄수화물 입자 및 다당류가 균열이 발생하였다는 연구는 발표된 바 있

다[7]. Sokhey and Chinnaswamy [16]의 보고에 따르면 저선량의 방사선 조사는 전분 입자 구조에 영향을 주지 않으나, 고선량의 조사는 전분 입자 구조의 파괴 원인이 된다고 발표한 바 있다. 따라서, 이온화 방사선 조사에 의한 저분자화 과정에서 laminarin에 존재하는 glycosidic 결합이 분해가 되고 이러한 분해로부터 입자의 균열이 발생한 것으로 판단된다.

고분자량과 비교하여 저분자량 laminarin은 세포 외 방법으로 실험한 항산화 활성의 증가와 함께 세포 내 방법을 이용한 melanin 생합성의 저해능이 증가한 것으로 확인이 되었다[3,13]. 특히 세포 내 melanin 생합성의 저해능 증가는 본 실험의 결과에서 얻어진 항산화 작용에 관여하는 이중결합의 증가와 함께 분자량 감소에 따른 세포 투과능의 증대에 따른 것으로 판단되어, 기존에 보고된 laminarin의 macrophage에서의 면역활성, anti-tumor activity 등의 생물활성을 저분자화를 통하여 증가시킴으로써 laminarin의 활용성 증대를 이룰 수 있을 것으로 판단된다.

4. 결 론

본 논문에서는 이온화 방사선 조사를 이용하여 얻어진 저분자량의 laminarin의 분자구조에 관한 연구를 수행하였다. 분자량 분포에 관한 분석 결과 고분자량의 분자들이 방사선 조사에 의하여 더욱 분해가 되어 저분자량으로 얻어진 laminarin에서는 낮은 polydispersity 값을 가졌다. 이러한 낮은 PI 값은 방사선 분해를 이용한 laminarin 저분자화의 장점이 될 수 있다. 또한 FT-IR을 이용한 스펙트럼 분석에서 carbonyl group의 증가가 확인되었으며, 이중 결합이 항산화 활성에 미치는 선행 연구 결과들로부터 이러한 carbonyl group의 증가는 저분자량 laminarin의 높은 항산화 활성의 원인으로 생각된다. 이러한 실험 결과들은 기존에 보고된 laminarin의 다양한 활성들이 laminarin의 저분자화를 통하여 증가할 수 있다는 것을 보여준다.

감 사

본 연구는 농림축산식품부, 해양수산부, 농촌진흥청, 산림청 Golden Seed 프로젝트 사업에 지원으로 수행되었습니다.

References

1. Srinivastava, R. and Kulshrestha, D. K., "Bioactive Polysaccharides from Plants," *Phytochemistry*, **28**, 2877-2883(1989).
2. Park, H. K., Kim, I. H., Kim, J. and Nam, T. J., "Induction of Apoptosis by Laminarin, Regulating the Insulin-like Growth Factor-ir Signaling Pathways in HT-29 Human Colon Cells," *International Journal of Molecular Medicine*, **30**, 734-738(2012).
3. Choi, J., Kim, H. J., Kim, J. H. and Lee, J. W., "Enhanced Biological Activities of Laminarin Degraded by Gamma-ray Irradiation," *Journal of Food Biochemistry*, **36**, 465-469(2012).
4. Qi, H., Zhao, T., Zhang, Q., Li, Z., Zhao, Z. and Xing, R., "Antioxidant Activity of Different Molecular Weight Sulfated Polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (Chlorophyta)," *J. Appl. Phycol.*, **17**, 527-534(2005).
5. Kim, K. H., Kim, Y. W., Kim, H. B., Lee, B. J. and Lee, D. S., "Anti-apoptotic Activity of Laminarin Polysaccharides and Their Enzymatically Hydrolyzed Oligosaccharides from *Laminaria*

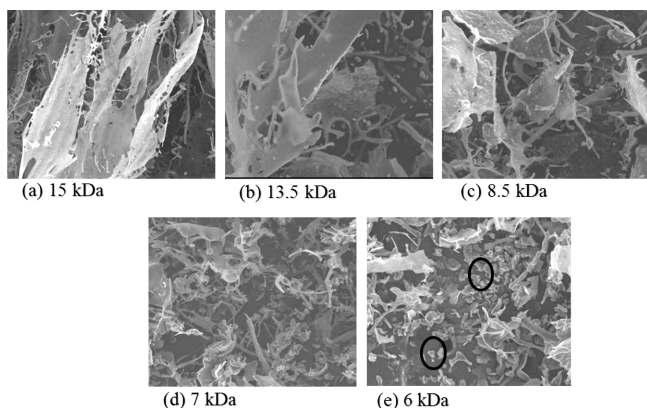


Fig. 3. SEM images of different molecular weight laminarin samples; (a) laminarin with 15 kDa, (b) with 13.5 kDa, (c) with 8.5 kDa, (d) with 7 kDa, and (e) with 6 kDa.

- japonica*", *Biotechnol. Lett.*, **28**, 439-446(2006).
6. Miyanishi, N., Iwamoto, Y., Watanabe, E. and Oda, T., "Induction of TNF- α Production from Human Peripheral Blood Monocytes with β -1,3-glucan Oligomer Prepared from Laminarin with β -1,3-glucanase from *Bacillus clausii* NM-1", *J. Biosci. Bioeng.*, **95**, 192-195(2003).
 7. Byun, E. H., Kim, J. H., Sung, N. Y., Choi, J. I., Lim, S. T., Kim, K. H., Yook, H. S., Byun, M. W. and Lee, J. W., "Effects of Gamma Irradiation on the Physical and Structural Properties of β -glucan", *Radiat. Phys. Chem.*, **77**, 781-786(2008).
 8. Yoshiga, A., Otaguro, H., Parra, D. F., Lima, L. F. C. P. and Lugao, A. B., "Controlled Degradation and Crosslinking of Polypropylene Induced by Gamma Radiation and Acetylene", *Polym. Bull.*, **63**, 397-409(2009).
 9. Choi, J. I., Lee, H. S., Kim, J. H., Lee, K. W., Lee, J. W., Seo, S. J., Kang, K. W. and Byun, M. W., "Controlling the Radiation Degradation of Carboxymethylcellulose Solution", *Polym. Degrad. Stabil.*, **93**, 310-315(2008).
 10. Choi, J., Kim, H. J., Kim, J. H., Byun, M. W., Chun, B. S., Ahn, D. H., Hwang, Y. J., Kim, D. J., Kim, G. H. and Lee, J. W., "Application of Gamma Irradiation for the Enhanced Physiological Properties of Polysaccharides from Seaweeds", *Appl. Radiat. Isot.*, **67**, 1277-1281(2009).
 11. Choi, J., Kim, J. H., Lee, K. W., Song, B. S., Yoon, Y. H., Byun, M. W. and Lee, J. W., "Comparison of Gamma Ray and Electron Beam Irradiations on the Degradation of Carboxymethylcellulose", *Korean J. Chem. Eng.*, **26**, 1825-1828(2009).
 12. Pang, Z., Otaka, K., Maoka, T., Hidaka, K., Ishijima, S., Oda, M. and Ohnishi, M., "Structure of β -glucan Oligomer from Laminarin and Its Effect on Human Monocytes to Inhibit the Proliferation of U937 Cells", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 553-558(2005).
 13. Choi, J., Kim, H. J. and Lee, J. W., "Structural Feature and Antioxidant Activity of Low Molecular Weight Laminarin Degraded by Gamma Irradiation", *Food Chem.*, **129**, 520-523(2011).
 14. Mathlouthi, M. and Koenig, J. L., "Vibrational Spectra of Carbohydrates", *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **44**, 7-89(1986).
 15. Huang, L., Zhai, M., Peng, J., Li, J. and Wei, G., "Radiation-Induced Degradation of Carboxymethylated Chitosan in Aqueous Solution", *Carbohydr. Polym.*, **67**, 305-312(2007).
 16. Sokhey, A. S. and Chinnaswamy, R., "Chemical and Molecular Properties of Irradiated Starch Extrudates", *Cereal Chem.*, **70**, 260-280(1993).