

## 곰피에서 정제한 Fucoidan Sulfate의 특성

이홍수\* · 진성현\*\* · 김희숙 · 류병호

\*부산사상구보건소, \*\*부산보건환경연구소, 경성대학교 식품공학과

### Characteristic Properties of Fucoidan Sulfate Purified from Gompi, *Ecklonia stolonifera*

Hong-Soo Lee\*, Sung-Hyun Jin\*\*, Hee-Sook Kim and Byung-Ho Ryu

\*Pusan Health center of Sasang-gu, Pusan,

\*\*Public Health Environment, Institute of Pusan,

Department of Food Science and Technology, Kyung Sung University

#### Abstract

The fucoidan purified from Korean brown seaweed, *Ecklonia stolonifera* was characterized on molecular structure and blood anticoagulant activities. Extraction was conducted at 100°C with water and repeated twice. The crude fucoidan was 151.1g out of 20.0 kg of *Ecklonia stolonifera*. The Fucoidan-1, which was purified from crude fucoidan using calcium chloride and cetyl pyridium chloride (CPC), was 35.2% against crude fucoidan. Fucoidan-5 was obtained approximately 28.1% from Fucoidan-1 through DEAE-Toyopearl 650 M ion-exchange column chromatography and showed one band by cellulose acetate electrophoresis. The molecular weight of Fucoidan-5 was estimated to be about 21,000~23,000 dalton by Sephacryl S-300 gel filtration chromatography. Fucoidan-5 consists of 35.7% of fucose and 4.3% of galactose and the molar ratio of fucose and sulfate was about one to one. IR spectrum of Fucoidan-5 showed absorption at 1240  $\text{cm}^{-1}$  and 850  $\text{cm}^{-1}$  and specific rotation value,  $[\alpha]$ , was  $-127.2^\circ$ . These results suggests that the sulfate maybe bind at C<sub>4</sub> carbon on  $\alpha$ -L-fucose. Gas chromatograph of methyl alditol acetate revealed that Fucoidan-5 is a fucose containing sulfated polysaccharide with  $\alpha(1-2)$  or  $\alpha(1-3)$  glycosidic linkage. Anti-thrombin activity of the Fucoidan-5 was estimated as 1.4 time stronger than heparin. From above results, the purification methods using CPC and ion exchange chromatography is effective tools for obtaining highly purified fucoidan from Gompi, *Ecklonia stolonifera*.

Key words: *Ecklonia stolonifera*, fucoidan sulfate, fucose containing sulfated polysaccharide, anti-thrombin activity

## 서 론

바다에서 자생하는 해조류는 육상과 전혀 다른 환경에서 자라기 때문에 물질대사의 경로도 특이하여 육상생물과는 다르게 새로운 구조를 갖는 생리활성 물질을 생산할 수 있을 것으로 기대된다<sup>(1)</sup>. 최근에는 해양생물의 특이성에 착안하여 새로운 생리활성 물질들이 탐색되고 있으며 항종양성<sup>(2)</sup> 및 항virus성<sup>(3)</sup>, 항혈액응고<sup>(4)</sup>, 면역력 증강<sup>(5,6)</sup> 등의 생리기능을 갖은 것으로 알려져 있다. 특히 해조류의 다당체 중에서도 황산을 함유한 fucoidan은 heparin과 같은 혈액응고활성 이외에 항암 및 항AIDS 등의 활성이 있다는 보고가 있다<sup>(7,8)</sup>.

일반적으로 fucoidan은 그 함유량이 낮고 갈조류의

종류에 따라 함유량이 다르며, 동일 해조류 일지라도 계절에 따라 또 생육장소에 따라 그 함량이 다르다. 지금까지 알려진 바에 의하면 갈조류에 존재하는 fucoidan의 함유량은 10% 정도이고, 많은 것은 10~40% 정도이다<sup>(2)</sup>. 지금까지 *Fucus vesiculosus* 등 12종류 이상의 갈조류에서 fucoidan이 분리정제되었으며<sup>(2,13)</sup> fucoidan에 함유된 황산기의 양은 26~31% 정도인 것으로 보고된 바 있다<sup>(14)</sup>.

갈조류로부터 정제된 fucoidan들의 분자량들을 비교해 보면 *Lessonia nigrescens*이나 *Ascoseira mirabilis*의 fucoidan은 670,000<sup>(15)</sup>과 500,000<sup>(16)</sup>으로 분자량이 비교적 크며, *Hizikia fusiforme*의 fucoidan은 95,000과 42,000<sup>(14)</sup>, *Ecklonia kurome*는 21,000과 32,000<sup>(17)</sup>으로 분자량이 비교적 작았다. *Pelvetia wrightii*<sup>(13)</sup>, *Ecklonia kurome*<sup>(9)</sup> 및 *Hizikia fusiforme*<sup>(14)</sup>에 함유되어 있는 fucoidan은 heparin과 같은 항혈액응고 활성이 있는 것으로 보고 되었으며 *Undaria pinnatifida*와 *Ecklonia kurome*<sup>(14)</sup>의 fucoidan

Corresponding author: Byung-Ho Ryu, Department of Food Science and Technology, Kyung Sung University, 110-1, Daeyeon-dong, Namgu, Pusan 608-736, Korea

dan은 heparinoid활성이 더욱 강하여 분자량과 황산기의 함유량에 상관성이 있는 것으로 보고되었다. 또한 항종양활성과 역전사(逆轉寫) 저해활성 등이 있는 것으로 알려져 있으나 이에 대한 메카니즘은 알려져 있지 않다<sup>(8)</sup>.

본 연구에서는 한국산 곰피로부터 열수추출법, ethanol침전법 및 이온교환 chromatography법등을 이용하여 fucoidan을 추출정제하고 정제된 fucoidan의 당구성성분, 당과 황산기의 구성비, 결합방식 및 항혈액 응고작용등 fucoidan의 특성을 연구함으로써 한국산 곰피 fucoidan의 특성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

곰피(*Ecklonia stolonifera*)는 부산 자갈치 시장에서 구입하여 사용하였다. 이미 보고된 fucoidan들과 비교하기 위하여 *Nemacystus decipiens*(미끈가지) fucoidan은 일본 동성화생제품을, *Fucus vesiculosus fucoidan*은 미국의 Sigma Co.제품을 구입하여 표준품으로 사용하였다.

### 곰피에서 crude fucoidan의 추출

곰피에서 crude fucoidan의 열수추출 과정은 곰피 50 g에 증류수 500 ml를 가하여 100°C에서 2시간 가열하고, 그 침전물을 2회 반복 추출하여 합한 가용성 용액에 2배 용량의 ethanol을 가하여 침전시켜 얻은 회분을 crude fucoidan으로 하였다.

### Crude fucoidan에서 Fucoidan-1의 정제

Crude fucoidan 50g을 증류수 600 ml에 녹이고 여기에 4.0 M CaCl<sub>2</sub>용액 320 ml를 가하여 생성되는 알긴산 칼슘을 8,000×g에서 20 min 동안 원심분리하여 제거하였다. 그 상등액에 5% cetyl pyridium chloride(CPC) 50 ml를 가하여 CPC 복합체를 형성시키고 CaCl<sub>2</sub> 농도를 0.5 M로 조정하여 30°C에서 하루동안 방치하였다. 침전된 CPC 복합체를 3.0 M CaCl<sub>2</sub>용액과 2배 용량의 에탄올로서 반복침전시킴으로써 CPC가 제거된 곰피 Fucoidan-1을 얻었다.

### 이온교환 Chromatography에 의한 fucoidan의 정제

음이온 교환수지인 DEAE-Toyopearl 650 M을 column (3.2×45 cm)에 충전시키고 증류수로 세척한 후 증류수에 용해시킨 crude fucoidan 400 mg 또는 Fucoidan-1 300 mg을 column에 흡착시켰다. 증류수로 column을 충분히 세척한 다음 0~2.0 M NaCl/0.01 N HCl 용액을 이용하여 단계별(step gradient)로 용출시켰다. 필요에 따라 이온교환 chromatography를 반복하였으며 용출용액의 조성 과 용출방법을 달리하면서 실험하였다.

### 당의 정량 및 중성당의 분석

총당(total sugar)은 phenol-sulfuric acid 방법<sup>(18)</sup>에 의

하여 측정하였으며 L-fucose를 표준품으로 사용하였다. 중성당을 분석하기 위하여 fucoidan시료 약 60 mg을 72% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.45 ml로 녹인 후 증류수 8 ml를 가하여 약 4% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 농도가 되도록 조정하고 100°C에서 2시간 가수분해시킨 후 10 ml를 취하였다. 가수분해된 시료에 내부 표준물질로서 0.1% methyl β-D-glucoside를 가하고 중화한 후 alditol acetate를 만들어 gas chromatography로 분석하였다<sup>(19)</sup>. Fucoidan의 선광도는 분광선광도계(DIP-SL, Japan)로 측정하였다.

### 황산기의 정량

시료(황산기로서 0~500 μg)를 1 N HCl 1.0 ml에 녹인 후 105°C에서 5시간 가수분해시켰다. 가수분해된 시료액 0.2 ml에 3%(v/v) trichloroacetic acid 3.8 ml와 BaCl<sub>2</sub>/0.5% gelatin 1.0 ml를 가하여 15분간 방치한 후에 360 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 곰피 fucoidan의 순도 확인 및 분자량 측정

전기영동 : 정제된 fucoidan의 순도는 cellulose-acetate 막 전기영동을 실시하여 확인하였다<sup>(20)</sup>. 즉, 시료를 1 mg/ml되게 조제하여 cellulose-acetate막인 Sepraphore III(57×127 mm)에 1 μl를 도포하고 다음과 같은 조건하에서 전기영동을 행한 다음 toluidine-blue로 염색하여 다당체를 확인하였다.

- (1) 1.0 M acetate-pyridine(pH 3.5), 20분, 0.5 mA/cm
- (2) 0.2 M Ca-acetate, 3시간, 1.0 mA/cm
- (3) 0.1 N HCl, 2.5시간, 1.0 mA/cm

Gel filtration chromatography : Fucoidan의 분자량을 측정하기 위하여 Sephacryl S-300(2.2×90 cm) gel filtration chromatography를 실시하였다. 표준품으로는 dextran(M.W. 66,300, 39,500, 10,400)을 사용하였고, 용출액은 0.1 M NaCl 용액이었으며 유속은 1.0 ml/min로 1 ml씩 분획하였다.

### 적외선 흡수 Spectrum

Fucoidan 중의 황산기의 확인 및 당과의 결합양식을 측정하기 위하여 적외선 흡수 spectrophotometer를 사용하였다. 시료제조는 KBr법을 사용하였고 시료 약 1 mg과 동량의 KBr분말을 혼합하여 투명한 정체를 형성하고 적외선 흡수 spectrum을 측정하였다.

### 당쇄의 결합양식의 결정

Fucoidan의 당쇄의 결합 양식을 결정하기 위하여 Slo-nerker의 방법<sup>(21)</sup>에 따라 시료를 methyl화시켰으며 표준당으로는 fucose, glucose, maltose를 사용하였다. 즉, 정제된 곰피 fucoidan을 소량의 DMSO에 녹인 후 NaOH와 CH<sub>3</sub>I를 가하여 3시간 반응시킴으로써 methyl화된 fucoidan을 72% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에서 1시간 방치하고 증류수를 가하여 4% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 조정한 후 100°C에서 5시간 산 가수분해 시켰다. 가수분해액을 중화한 후 1% NaBH<sub>4</sub>

용액으로 실온에서 2시간동안 환원시켜 methyl alditol을 만들고 무수  $\text{CH}_3\text{COOH}$ 를 가하여  $100^\circ\text{C}$ 에서 2시간동안 반응시킴으로써 methyl alditol acetate를 만들었으며 gas chromatography로 분석하였다. 이 때 사용된 column은 3% ECNSS-M on Gas Chrom Q( $3 \times 1,000$  mm)이었으며 내부 표준물질로는 2,3,4,6-tetra-O-methyl-O-acetyl-D-glucitol을 사용하였다.

### 항 thrombin의 활성 측정

Antithrombin 활성의 측정은 Lill과 Röschlau의 방법<sup>(22)</sup>에 따라 측정하였다. 세개의 시험관에 혈청과 thrombin 용액을 넣고 일정시간 정지한 후 대조군에는 fibrinogen을 가하고 fibrin형성에 소요되는 시간( $T_1$ )을 측정하였다. 다른 한 시험관에는  $0 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ 의 heparin을 가하여 fibrin형성에 소요되는 시간( $T_2$ )을 측정하고 시료 fucoidan에 대하여도  $0 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 fibrin형성에 소요되는 시간( $T_3$ )을 측정하였다. 시료의 항 thrombin활성치는  $T_3 - T_1 / T_2 - T_1$ 으로 계산하였다. 각각의 fibrinogen에서 fibrin형성까지의 시간은 5회 이상 측정하여 그 평균치를 구하였다.

## 결과 및 고찰

### 곰피 fucoidan의 조제

수용성인 fucoidan sulfate를 효율적으로 추출, 정제하기 위한 실험으로 건조 곰피를 여러 온도에서 열수추출한 후 ethanol로 침전시켜 crude fucoidan들을 얻었으며 그 수율과 조성을 실험한 결과는 Table 1와 같다.  $80^\circ\text{C}$ 와  $100^\circ\text{C}$ 의 열수에서 추출하였을 때 ethanol 침전물에는 fucose는 각각 29.0%, 22.4%로 높았고, 황산기의 함량도 각각 27.4% 및 33.6%로 높았다. 구성당은 fucose가 가장

높았으며 그 다음이 galactose 이었다. 추출온도가  $120^\circ\text{C}$ 와  $150^\circ\text{C}$ 일 때 에탄올의 침전 획득에는 fucoidan이 각각 3.2% 및 3.0%이었으며, 황산기는 각각 13.6% 및 8.8%이었다. 구성당은 fucose 이외에 galactose와 mannose의 순으로 검출되었다. Dobashi<sup>(44)</sup> 등에 의하면 황산기의 함량이 많은 fucoidan이 적은 것보다 항 thrombin활성이 높다고 하였으므로  $100^\circ\text{C}$ 에서 열수추출하기로 결정하였다.

$100^\circ\text{C}$ 로 열수추출한 경우 추출회수에 따른 ethanol 침전물의 fucoidan 수율 및 그 성분 조성을 Table 2에 나타내었다. 1회와 2회추출물에서는 fucoidan을 구성하는 fucose가 23.4% 및 20.2%, 황산기가 34.2% 및 30.6%로 추출함량이 높고 3회에서는 다소 낮았다. 이상의 결과에 따라 곰피를  $100^\circ\text{C}$ (고압솥 사용)에서 2회 열수추출하여 ethanol로 침전시키고 건조시키는 방법을 택하였으며 건조 곰피 20 kg으로부터 crude fucoidan 151.1g을 얻었다.

### 곰피 Fucoidan-1의 조제

Crude fucoidan 50g을 "재료 및 방법"에서 설명한 바와 같이 염화칼슘 및 CPC로 처리한 결과 얻은 획득분은 17.60g으로 수율은 35.2%이었고 곰피 Fucoidan-1이라 하였다. 그 성분의 조성은 Table 3와 같이 fucose가 28.6%, 황산기가 32.0%이었다. 그 구성당은 fucose 100에 대하여 mannose는 1%이었으며 galactose는 5%이었고 기타 다른 당은 검출되지 않았다.

### 이온교환 Chromatography에 의한 fucoidan의 정제

중류수에 녹인 곰피의 crude fucoidan 400 mg을 첫 번째 DEAE-Toyopearl 650 M를 충전시킨 column에 흡착시킨다음  $0 \sim 2.0$  M NaCl / 0.01 N HCl용액으로 용출

Table 1. Effects of temperature on the extraction of fucoidan from Gompi, *Ecklonia stolonifera*

Extracted Temperature( $^\circ\text{C}$ )	Fucoidan yield( $\%$ ) <sup>1)</sup>	Content( $\%$ )		Ratio of sugar composition					
		Fucose	$\text{SO}_4^{2-}$	Fuc <sup>2)</sup>	Ara <sup>3)</sup>	Xyl <sup>4)</sup>	Glc <sup>5)</sup>	Gal <sup>6)</sup>	Man <sup>7)</sup>
80	4.8	29.0	27.4	1.00	0.00	0.00	0.18	0.13	0.08
100	3.2	22.4	33.6	1.00	0.00	0.00	0.05	0.14	0.06
120	3.2	n.t. <sup>8)</sup>	13.6	1.00	0.02	0.04	0.09	0.19	0.23
150	3.0	n.t.	8.8	1.00	0.00	0.00	0.00	1.34	3.28

<sup>1)</sup>dry basis <sup>2)</sup>fucose <sup>3)</sup>arabinose <sup>4)</sup>xylose <sup>5)</sup>glucose <sup>6)</sup>galactose <sup>7)</sup>mannose <sup>8)</sup>not tested

Table 2. Effects of extraction frequencies fo fucoidan from Gompi, *Ecklonia stolonifera* at  $100^\circ\text{C}$

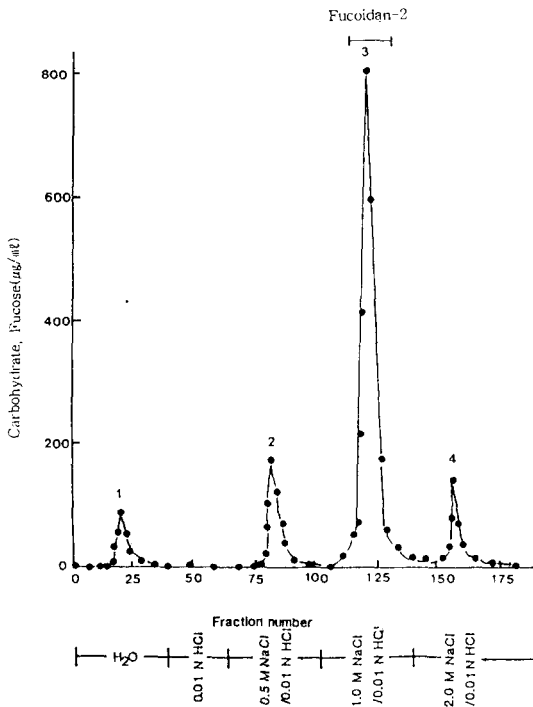
Number of extraction	Fucoidan yield( $\%$ ) <sup>1)</sup>	Content ( $\%$ )		Ratio of sugar composition		
		Fucose	$\text{SO}_4^{2-}$	Fucose	Galactose	Mannose
1	3.40	23.4	34.2	1.00	0.15	0.15
2	0.28	20.2	30.6	1.00	0.13	0.16
3	0.20	14.0	10.6	1.00	0.20	0.44

<sup>1)</sup>dry basis

**Table 3. Compositions of the main fucoidan fraction purified from Gompi, *Ecklonia stolonifera* and standard fucoidans**

Fucoidan	Content (%)		Composition of sugars (%)				Yields(%)
	Fucose	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Fuc	Man	Gal	Xyl	
Crude fucoidan	23.4	34.2	n.d. <sup>1)</sup>	n.d.	n.d.	n.d.	100
Fucoidan-1	28.6	32.0	100	1	5	0	35.2
Fucoidan-2	23.9	33.0	100	4	23	0	58.4
Fucoidan-3	29.0	29.8	100	0	8	0	32.3
Fucoidan-5	35.7	31.6	100	0	12	0	28.1
<i>N. decipiens</i>	35.3	36.0	100	0	3	0	
<i>F. vesiculosus</i>	34.2	28.0	100	0	5	1	

<sup>1)</sup>not determined

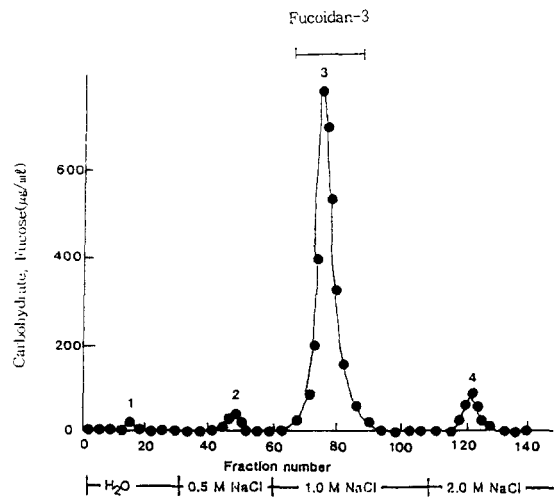


**Fig. 1. DEAE-Toyopearl 650M ion exchange chromatography of Gompi crude fucoidan**

Crude fucoidan obtained by ethanol precipitation was applied on DEAE-Toyopearl 650M column(3.2×45 cm) in distilled water, washed with water, then successively eluted with 0, 0.5, 1.0 and 2.0M NaCl in 0.01N HCl. The volume of each fraction was 20 ml.

(stepwise)시켜 얻은 결과는 Fig. 1과 같다. 당이 함유되어 있는 분획들을 각각 모아 증류수에 투석하고 동결건조한 후 fucoidan의 함량을 측정하고 수율을 계산하였다. Fig. 1에서와 같이 Peak 3획분이 fucoidan함량도 높고 수율도 좋았으므로 Fucoidan-2라 명명하였다.

300 mg의 곰피 Fucoidan-1을 증류수에 녹여 DEAE-Toyopearl 650M column 흡착시키고 0~2.0 M NaCl용

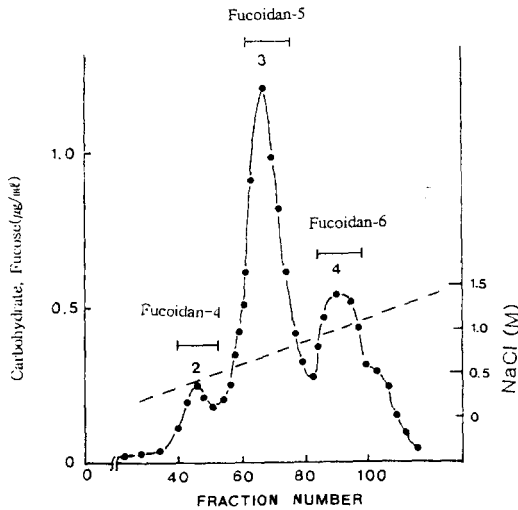


**Fig. 2. DEAE-Toyopearl 650M ion exchange chromatography of Fucoidan-1**

Fucoidan-1 purified by CaCl<sub>2</sub> and cetyl pyridium chloride was chromatographed on a ion exchange column(3.2×45 cm) equilibrated with distilled water and then successively eluted with 0, 0.5, 1.0 and 2.0M NaCl. The volume of each fraction was 20 ml.

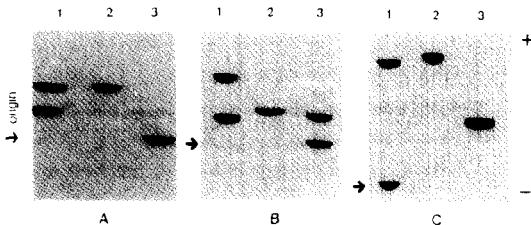
액으로 용출시킨 결과는 Fig. 2와 같았고 그 중 peak 3를 Fucoidan-3라 하였다. 새로운 300 mg의 곰피 Fucoidan-1을 증류수에 녹여 DEAE-Toyopearl 650 M에 흡착시키고 0.3~1.5 M NaCl용액을 이용하여 linear gradient법으로 용출시킨 결과는 Fig. 3와 같았다. Crude fucoidan 및 CPC법으로 얻은 Fucoidan-1과 DEAE-Toyopearl 650 M 음이온교환 chromatography법으로 얻은 Fucoidan-2, -3, -5 및 표준품 fucoidan의 당 및 황산기의 조성을 Table 3에 나타내었다.

곰피의 crude fucoidan을 직접 이온교환 chromatography를 거쳐 정제한 Fucoidan-2에는 fucose가 23.9%, 황산기가 33.0% 함유되어 있었으며 구성당으로는 fucose, galactose 및 mannose가 함유되어 있었다. 또한 crude



**Fig. 3. Second Ion exchange chromatography of Fucooidan-1**

Fucooidan-1 was applied on DEAE-Toyopearl 650M column (3.2×45cm) in distilled water and eluted by a linear gradient of 0.3-1.5 M NaCl. The volume of each fraction was 20 ml. Fraction tube numbers 43-44 (Peak 2), 61-63 (Peak 3) and 87-91 (Peak 4) were pooled.



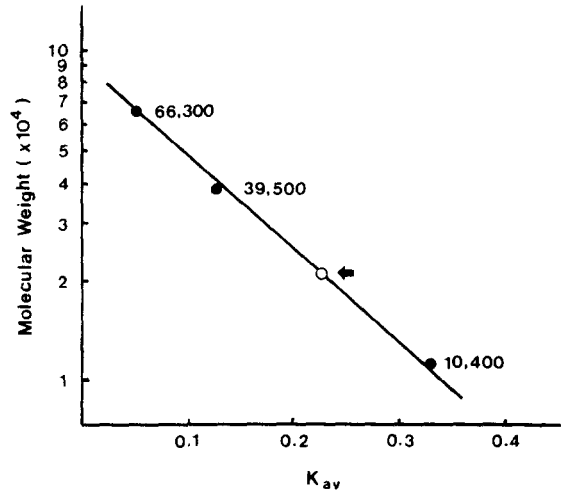
**Fig. 4. Electrophoresis of Fucooidan-4, Fucooidan-5, and Fucooidan-6 on a Cellulose Acetate Membrane**

Electrophoresis conditions were 1.0M acetic acid-pyridine buffer (pH 3.5) for 20 min at 0.5 mA/cm (A), 0.2M calcium acetate for 3 hr at 1.0 mA/cm (B) and 0.1N HCl for 2.5 hr at 1.0 mA/cm (C). Arrows indicate the origins of electrophoresis.

fucooidan을 염화칼슘과 CPC 처리한 후 이온교환 chromatography를 행한 경우 linear gradient로 용출하였을 때 얻은 Fucooidan-5는 step gradient로 얻은 다른 핵분보다 fucose와 황산기의 함량이 높았으며 fucose 외에 galactose도 함유되어 있으므로 엄격히 말하면 galactofucooidan sulfate라 할 수 있다.

#### Fucooidan의 순도 확인

Fucooidan-1을 음이온 교환 chromatography로 정제하여 얻은 Fucooidan-4, Fucooidan-5 및 Fucooidan-6을 3가지 조건하에서 cellulose-acetate막 전기영동을 행한 결과는



**Fig. 5. Gel filtration chromatogram of Fucooidan-5**

Fucooidan-5 (1.6 mg/0.2 ml) was applied on a column (2.2×90 cm) of Sephacryl S-300 and eluted by 0.1M NaCl. Fraction volume was 1 ml and carbohydrate in each fraction was measured by the phenol-sulfuric acid method. An arrow indicates the molecular weight of Fucooidan-5.

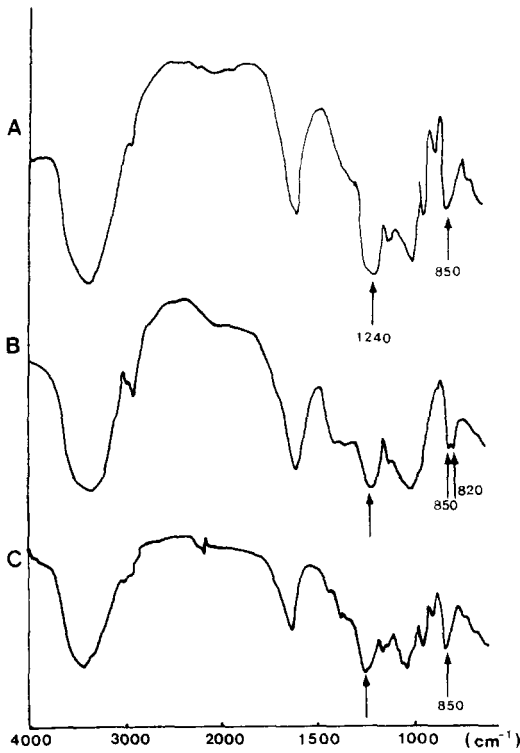
Fig. 4와 같았다. Fucooidan-4 및 -6과는 달리 Fucooidan-5는 모든 조건에서 단일 band가 나타났으므로 제일 순도가 높음을 알 수 있었다.

#### 분자량의 추정

곰피로부터 정제한 Fucooidan-5의 분자량을 측정하기 위하여 gel filtration chromatography를 행한 결과는 Fig. 5와 같다. 분자량이 10,400, 39,500 및 66,300인 dextran을 표준품으로 하여 얻은 표준곡선으로부터 계산한 Fucooidan-5의 분자량은 21,000~23,000이었다. 지금까지 보고된 fucooidan과 비교해 보면 곰피 Fucooidan-5는 *Lessonia nigrescens* (M.W. 670,000)<sup>(15)</sup>, *Ascoseira mirabilis* (M.W. 500,000)<sup>(16)</sup>, *Hizikia fusiforme* (M.W. 42,000과 95,000)<sup>(14,23)</sup>의 분자량보다 적으나 *Ecklonia kurome* (M.W. 32,000과 21,000)<sup>(19,24)</sup>의 fucooidan과는 비슷한 분자량을 가지는 것으로 나타났다. Nishino<sup>(9)</sup>는 *Ecklonia kurome*에서 정제한 fucooidan들의 분자량과 항thrombin 활성을 비교한 결과 heparin의 경우와 같이 분자량이 작은 fucooidan이 분자량 30,000이상인 fucooidan보다 활성이 높았으며 분자량 20,000에서 30,000 사이에는 활성에 차이가 없는 것으로 나타났다고 하였다.

#### 당쇄의 Anomer型

당쇄의 anomer형은 비선광도를 측정하여 추정한다. 표준품인 *N. decipiens* fucooidan과 *F. vesiculosus* fucooidan의  $[\alpha]_D^{20}$ 는  $-84.4^\circ$ 과  $-125.2^\circ$ 이었으며 곰피 Fucooidan-5의  $[\alpha]_D^{20}$ 는  $-127.2^\circ$ 이었다. 곰피 Fucooidan-5는 주요



**Fig. 6. IR spectrum of fucoidan**  
 A, fucoidan of *N. decipiens*; B, fucoidan of *F. vesiculosus*;  
 C, Gompfi Fucoidan-5.

구성당이 L-fucose이고 표준품  $\alpha$ -L-fucose와  $\beta$ -L-fucose의  $[\alpha]_D$ 는 각각  $-124.1^\circ$ 와  $-153.0^\circ$ 이므로 곰피 Fucoidan-5는  $\alpha$ -L-fucose로 이루어진 다당류라고 추정할 수 있다.

**곰피 fucoidan의 황산기의 결합위치**

황산기나 에스테르등 몇몇 중요한 원자단의 신축진동수가 IR spectrum의 지문영역(1500~700 cm<sup>-1</sup>)에서 나타나고 이 영역이 분자의 구조와 성분을 확인하는데 중요한 역할을 하기때문에 곰피에서 정제한 fucoidan의 fucose와 황산기사이의 결합구조를 알기위하여 표준품 fucoidan의 IR-spectrum과 비교하였다. 황산기중의 S=O 신축진동은 대략 1240 cm<sup>-1</sup>에서, C-O-S 신축진동의 경우 axial향배(向配)는 850 cm<sup>-1</sup>, equatorial향배는 820 cm<sup>-1</sup>에서 나타난다<sup>(25,26)</sup>. 황산기가  $\alpha$ -L-fucose의 C<sub>2</sub>와 C<sub>3</sub>의 위치에 결합한다면 equatorial향배로, C<sub>4</sub>위치의 경우에는 axial향배로 결합된다. 표준품 *N. decipiens* fucoidan과 *F. vesiculosus* fucoidan의 IR spectrum은 Fig.6A 및 6B와 같이 850 cm<sup>-1</sup> 부근에서 강한 흡수대를 나타내었으므로 주로 fucose의 C<sub>4</sub>의 위치에 결합되어 있다고 할 수 있다. 그러나 *F. vesiculosus* fucoidan의 경우 850 cm<sup>-1</sup>에서와 함께 820 cm<sup>-1</sup> 부근에서도 약한 흡수대가 나타난

**Table 4. Relative retention time of methyl alditol acetates from methylated Fucoidan-5**

Peak	Relative retention time <sup>1)</sup>	Content (area%)
1	0.55	10
2	0.82	11
3	1.18	8
4	2.09	48
5	3.02	23

<sup>1)</sup>Expressed relative value to the internal standard, 2,3,4,6-tetra-O-methyl-O-acetyl-D-glucitol(1.00)

것으로 보아 황산기의 일부는 fucose의 C<sub>2</sub>나 C<sub>3</sub> 위치에도 결합되어 있는 것으로 생각된다. 곰피로부터 CPC법과 이온교환 chromatography법으로 정제한 Fucoidan-5의 IR spectrum은 Fig. 6C에 나타낸 바와 같이 850 cm<sup>-1</sup> 부근의 강한 흡수가 있는 것으로 보아 곰피 Fucoidan-5의 황산기는 주로 fucose의 C<sub>4</sub>의 위치에 결합되어 있는 것으로 보인다.

**곰피 fucoidan의 당쇄의 결합양식**

Methyl화시킨 곰피 Fucoidan-5을 가수분해하여 얻은 구성당의 methyl alditol acetate들을 2, 3, 4, 6-tetra-O-methyl-O-acetyl-D-glucitol을 내부 표준물질로 하여 가스 chromatography를 행하고 상대 보유시간을 측정된 결과는 Table 4와 같이 3%의 ESNSS-M column상에서 5개의 peak로 분리되었다. 이들 peak의 상대보유시간과 Table 3에서 나타낸 곰피의 Fucoidan-5의 당 구성비율(fucose : galactose = 100 : 12)과 Fig.7에서 나타낸 Fucoidan-5의 IR-spectrum의 결과를 고려하여 Jansson의 측정치<sup>(27)</sup>와 비교함으로써 당쇄의 methyl화 위치를 추정하였다. 생성된 당의 48%를 점하고 있는 peak 4는 3-methyl fucose 또는 4-methyl fucose로 추정되며 peak 5는 2, 3, 5-methyl galactose로, peak 1, 2는 2, 3, 4-또는 2, 3, 5-methyl fucose로, peak 3은 2, 3- 또는 2, 4-methyl fucose로 추정된다. 이와 같은 결과로부터 곰피 Fucoidan-5은 황산기는 주로 C<sub>4</sub>위치에 결합되어 있고 fucose와 fucose사이에는 주로 1-2결합 및 1-3결합을 하며 galactose와는 1-4결합 또는 1-6결합을 하는 복잡한 구조를 가진 다당류임을 추정할 수 있었다.

항 thrombin 활성 : 곰피 Fucoidan-5의 항 thrombin 활성을 측정하였을 때 heparin(140 units/mg)에 대하여 약 1.4배의 활성을 가지는 것으로 나타났으며 *Lessonia nigrescens*<sup>(15)</sup>과 *Ecklonia kurome*<sup>(17)</sup> 및 *Hizikia fusiforme*<sup>(14)</sup>의 fucoidan들도 혈액응고를 저해하는 활성이 있다고 보고된 바 있다.

**요 약**

갈조류인 한국산 곰피(*Ecklonia stolonifera*)에서 fucoidan을 추출 정제하여 분자 구조적 특성을 조사하고 항

혈액 응고 활성을 측정하였다.

건조곰피 20.0 kg을 100°C에서 2시간동안 2회 열수 추출하고 ethanol로 침전시켜 crude fucoidan 151.1g을 얻었다. Crude fucoidan을 염화칼슘과 cetyl pyridium chloride(CPC)로서 정제하여 Fucoidan-1을 얻었고 수율은 35.2%였다. 이 Fucoidan-1을 여러조건하에서 DEAE-Toyopearl 650 M 이온교환 chromatography법을 이용하여 정제한 결과 cellulose acetate 막 전기영동상에서 하나의 band를 나타내는 순도가 높은 곰피 Fucoidan-5을 얻었으며 dextran을 표준품으로 gel filtration chromatography를 행한 결과 분자량은 21,000~23,000이었다. 곰피 Fucoidan-5의 구성당은 fucose 35.7%와 galactose 4.3%이었고, fucose와 황산기의 mole 비는 약 1:1이었다. 적외선 흡수 spectrum 에서 1240 cm<sup>-1</sup>와 850 cm<sup>-1</sup> 부근에서 흡수가 확인되었으며 비선광도가 -127.2°인 것으로 보아 황산기는 주로 α-L-fucose의 4번 위치의 탄소에 결합되어 있는 것으로 추정할 수 있었다. 또한 곰피 Fucoidan-5를 methyl화하여 가수분해하고 methyl alditol acetate를 만든 후 gas chromatography를 행한 결과 Fucoidan-5는 주로 황산기를 C4에 가진 fucose가 α-1,2결합 또는 α-1,3결합으로 이루어진 다당류를 추정할 수 있었다. 곰피 Fucoidan-5의 항 thrombin 활성은 heparin (140 units/mg)의 약 1.4배이었다.

이상의 결과에서 CPC법과 이온교환 chromatography법을 사용하여 갈조류인 곰피로부터 분리 정제한 곰피 Fucoidan-5는 순도가 높은 fucoidan임을 알 수 있었고 수율은 28.1%였다.

## 문 헌

1. 西出英一: 海藻多糖의 生理作用. 生化學, 61(7), 605 (1989)
2. 西澤一俊: 藻類의 酸性多糖類 と その 生理活性, 食品開發, 8, 28 (1979)
3. Percival, E. and McDowell, R.H.: Chemistry and Enzymology of Marine algae polysaccharides, Academic press, London, p.219 (1967)
4. 大東肇, 小清水弘一: 食品植物および海藻類の發癌プロモーション抑制と活性物質. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 67, 31 (1993)
5. 小菅卓夫, 糠谷東雄, 山本藤輔, 近邦郎: コンブ의 強心作用, 藥學雜誌, 103(6), 683 (1983)
6. 이영숙, 김동석, 류병호, 이성호: 파래와 곰피에서 추출한 당 단백질의 Sarcoma-180 cell에 대한 항암효과 및 면역활성. 한국영양식량학회지, 21, 544 (1992)
7. 조경자, 이영숙, 류병호: 청각과 김에서 추출한 당 단백질의 Sarcoma-180에 대한 항암효과 및 면역활성. 한국수산학회지, 23, 345 (1990)
8. Nakashima, H., Kido, Y., Kobayashi, N., Motoki, Y., Neushal, M. and Yamamoto, N.: Purification and characterization of an avian Myeloblastosis and human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor sulfated polysaccharide extracted from sea algae. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 31, 1524 (1987)
9. Nishino, T., Aizu, Y. and Nagumo, T.: The relationship between the molecular weight and the anticoagulant activity of two types of fucan sulfates from the Brown seaweed *Ecklonia kurome*, *Agric. Biol. Chem.*, 55, 791 (1991).
10. 官地遠, 松永是: マリハバイオテクノロジーの 展望. 化學工業, 604, 86 (1988)
11. 遠和夫: 化學刊, No.111, 海洋天然物, 化學同一, p.73 (1988)
12. Watanabe, I.: Current to topics in marine biotechnology, Tech. press, p.11 (1989)
13. Anno, K., Terahata, M., Hayashi, Y. and Seno, N.: Isolation and purification of fucoidan from brown seaweed *Pelvetia wrightii*, *Agr., Biol., Chem.*, 30, 495 (1966)
14. Dobashi, K., Nishino, T., Fujihara, M. and Nagumo, T.: Isolation and preliminary characterization of fucose containing sulfated polysaccharide with blood-anticoagulant activity from the brown seaweed *Hizikia fusiforme*, *Carbohydrate Res.*, 194, 315 (1989)
15. Percival, E., Venegasjara, M.F. and Weigel, H.: Structural studies of the water soluble fucan from *Lessonia nigrescens*, *Carbohydrate Res.*, 126, 283 (1984)
16. Finch, P., Percival, E., Slaiding, I.R. and Weigel, H.: Carbohydrates of the Antarctic Brown seaweed *Ascoseira mirabilis*, *Phytochem.*, 25, 443 (1986)
17. Nishino, T. and Nagumo, T.: Structural characterization of a new coagulant fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia Kurome*, *Carbohydrate Res.*, 211, 77 (1991)
18. Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, 28, 350 (1956)
19. Anastassiades, T., Puzic, R. and Puzic, O.: Modification of the simultaneous determination of alditol acetate of neutral and amino sugar by gas-chromatography, *J. Chromato.*, 225, 309 (1981)
20. 川合阿武: ムコ多糖實驗法1, 化學の 領域, 南江堂(東京, 日本), p.49 (1972)
21. Stoneker, J.H.: Gas-liquid chromatography of Alditol-Acetates, *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Academic press(New York, U.S.A.), Vol.VI, p.20 (1972)
22. Lill, H. and Röschlau, P.: Plasma proteins inhibitors, In *Methods of Enzymatic Analysis*(Third Edition), Verlag. Chemie, Vol.V, p.441 (1984)
23. Dobashi, K., Nishino, T., Fujihara, M. and Nagumo, T.: Isolation and preliminary characterization of fucose containing sulfated polysaccharides with blood anticoagulant activity from the brown seaweed, *Hizikia fusiforme*, *Carbohydrate Res.*, 194, 315 (1989)
24. Nishino, T., Yokoyama, G., Dohashi, K., Fujihara, M. and Nagumo, T.: Isolation, purification and characterization of fucose containing sulfated polysaccharides from the brown seaweed, *Ecklonia kurome* and their blood-anticoagulant activities, *Carbohydrate Res.*, 186, 119 (1989)
25. Fujihara, M., Iizima, N., Yamamoto, I. and Nagumo, T.: Purification and chemical and physical characterization of an antitumor polysaccharide from the brown

- seaweed, *Sargassum fulvellum*, *Carbohydrate Res.*, 125, 97 (1984)
26. Lloyd, A.G., Dodgson, K.S., Price, P.G. and Rose, F.A.: Infrared studies on sulfate esters. *Biochim. Biophys. Acta*, 46, 108 (1961)
27. 日本生化学會: 生化学 データブック1, 東京化学同人(東京, 日本), p.594 (1979)
- 
- (1995년 3월 27일 접수)