J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.
27(6), 1204~1210(1998)

한국식품영양과학회지

톳 열수추출물로부터 분리한 혈액 항응고성 다당류에 관한 연구

김경임 · 서혜덕 · 이현순 · 조홍연 · 양한철†

고려대학교 생명공학원

Studies on the Blood Anticoagulant Polysaccharide Isolated from Hot Water Extracts of *Hizikia fusiforme*

Kyung-Im Kim, Hae-Duk Seo, Hyun-Sun Lee, Hong-Yeon Jo and Han-Chul Yang†

Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract

This study was focused on the purification, characterization and promotion mode of an anticoagulant polysaccharide from *Hizikia fusiforme*. The anticoagulant crude polysaccharide(HF-0) was obtained by using hot water extraction at 100°C for 3 hrs after homogenizing desalted *Hizikia fusiforme*. The anticoagulant polysaccharide(HF-2-3-1a) was purified from the crude extract(HF-0) through stepwise gradient ethanol precipitation(HF-2), DEAE-Toyopearl 650C(HF-2-3), Sephadex G-75(HF-2-3-1), Sepharose CL-6B(HF-2-3-1a) chromatography and HPLC to homogeneity. HF-2-3-1a was estimated at 5.3×10^5 Da molecular weight and composed of fucose(51.92%), galactose(19.34%), mannose(13.92%), xylose (7.14%), arabinose(3.95%) and rhamnose(3.78%), and comprimised 29.7 % sulfate residue. The sulfated anticoagulant polysaccharide from HF-2-3-1a was proposed to inhibit *via* the intrinsic pathway and common pathway in the blood coagulation. The HF-2-3-1a exhibited the anticoagulant activity by activating an antithrombin III and the activity depended on the concentration of HF-2-3-1a. Acute toxicity of HF-2 in mice was not detected. Only 14 of 33 control mice(11.4%) that had taken saline survived for 30 min after injecting thrombin(100 NIH unit/ml).

Key words: anticoagulant, *Hizikia fusiforme*, polysaccharide

서 론

항응고 활성이란 혈액의 응고를 억제하는 활성으로 혈액의 응고는 혈전의 주성분인 불용성의 섬유소를 형성하는 과정으로 12단계 이상의 단백분해 과정이 cascade식으로 일어나는 복잡한 생화학적 반응이다. 또한 초기 활성화 경로에 따라 내인성 경로(intrinsic pathway)와 외인성 경로(extrinsic pathway)로 대별되는데 활성화된 factor Xa는 prothrombin을 thrombin으로 전환시키고 이 thrombin에 의해서 fibrinogen이 fibrin으로 전환되어 서로 불용성의 입체적 구조를 가진 3차원의 격자 중합체를 형성함으로써 혈전이 생성된다(1). 비정상적인 혈전생성은 혈류부전, 혈관상해, 고혈압, 지질침착 등의 이유로 혈관내에서 유발되며 뇌출혈, 뇌혈전, 심부전, 심근경색, 동맥경화증 등과 같은 중대한 성인병을 일으킨다(2). 현재까지 알려진 항응고제로는 소의 심장이나 돼지의 소장에서 추출한 heparin(3), 거머리에서 분리한 hirudin(4), 유기 합성제재인 coumarin과 warfarin(5), 미생물 기원성 surfactin과 leupeptin(6) 등이 있다. 항응고 작용에는 sulfate가 매우 중요한 역할을 하므로 fucan sulfate(7), semisynthetic β-1,3-glucan sulfate(8), 해조류 기원 sulfated polysaccharide(9) 등에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 면역활성과 더불어 다양한 생체조절기능 및 건강식품으로 보고되고 있는 해조류는 다당체를 다양하게 함유하고 있으며 특히 갈조류에는 중성다당인 laminaran과 함황산성다당인 fucoidan이 널리 알려져 있다(10). 이에 본 연구에서는 국내산 해조류 추출물들에 대하여 항응고 활성을 검색하였으며, 그 중 활성이 높은 톳(*Hizikia fusiforme*)의 열수추출물로부터 항응고 활성물질을 추출, 분리하여 그 특성을 검토하고자 하였다.

†To whom all correspondence should be addressed

재료 및 방법

재료

해조류는 서울 시내 백화점에서 원산지 표시가 된 해조류만을 구입하였으며 톳은 북제주군에서 구입하여 사용하였다.

일반 성분 분석 및 구성당 분석

총당 함량은 glucose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법(11)으로, 산성당 함량은 β-D-galacturonic acid를 표준물질로 하여 *m*-hydroxydiphenyl법(12)으로, 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 Lowry법(13)으로 정량하였으며 황산기 함량은 K_2SO_4를 표준물질로 하여 변형된 Dodgson과 Price의 방법(14)을 사용하였다. 구성당 분석은 Jones와 Albersheim의 방법(15)에 따라 중성당을 alditol acetate 유도체로 전환시켜 gas liquid chromatography(GLC)로 구성당을 분석하였으며 GLC의 분석조건은 SP2380 capillary column이 장착된 Young Lin M600D(column temp. 250°C, inject temp. 250°C, detect temp. 250°C)에서 실시하여 표준 구성당들의 retention time과 비교하여 시료 중의 구성당을 분석하였다. 구성당의 mole %는 각 peak들의 면적비와 구성당들의 alditol acetate 유도체의 분자량으로부터 계산하였다.

항응고 활성 측정

Activated partial thromboplastin time(aPTT)

시료를 함유한 100μl의 혈장(platelet pool plasma)을 aPTT 진단시약 100μl와 혼합한 후 37°C에서 정확히 3분간 예열한 다음 37°C에서 미리 예열된 20mM $CaCl_2$ 100μl를 가한 후 blood coagulation analyzer를 사용하여 응고가 될 때까지의 시간을 기록하였으며 대조구는 순수한 혈장 100μl를 이용하여 응고시간을 측정하였다(16).

Prothrombin time(PT)

시료를 함유한 100μl의 혈장을 37°C에서 정확히 3분간 예열한 다음, 37°C에서 미리 예열된 prothrombin time 진단시약을 100μl 가한 후 blood coagulation analyzer를 사용하여 응고가 될 때까지의 시간을 기록하였다(16).

Thrombin time(TT)

시료를 함유한 100μl의 혈장을 37°C에서 정확히 3분간 예열한 다음, 37°C에서 미리 예열된 thrombin time 진단시약 100μl 가한 후 blood coagulation analyzer를 사용하여 응고가 될 때까지의 시간을 기록하였다(16).

추출용매 및 추출온도에 따른 항응고 활성 검토

분쇄한 톳 2g에 hexane, acetone, ethanol, methanol, water를 150ml씩을 가해 2시간 or 온도별로 환류 추출하여 원심분리(7,000rpm, 20min)한 후 그 상등액을 동결 건조하여 aPTT법으로 항응고 활성을 측정하였다.

톳으로부터 항응고 다당의 추출 및 정제

염분을 제거한 톳 400g을 분쇄한 후 증류수를 가해 3시간, 100°C에서 환류 추출, 원심분리한 후 얻은 HF-0에 ethanol을 농도별(30%, 70%)로 첨가하여 4°C에서 12시간 침전(17), 원심분리, 투석, 농축, 동결 건조하여 HF-1(30% EtOH ppt.), HF-2(70% EtOH ppt.), HF-3(70% EtOH sup.)을 조제하였다. 그 후 ion exchange 및 gel permeation chromatography, HPLC 등을 이용하여 최종 정제시료인 HF-2-3-Ia를 얻었으며 이때 정제조건은 모두 4°C였다(Fig. 1).

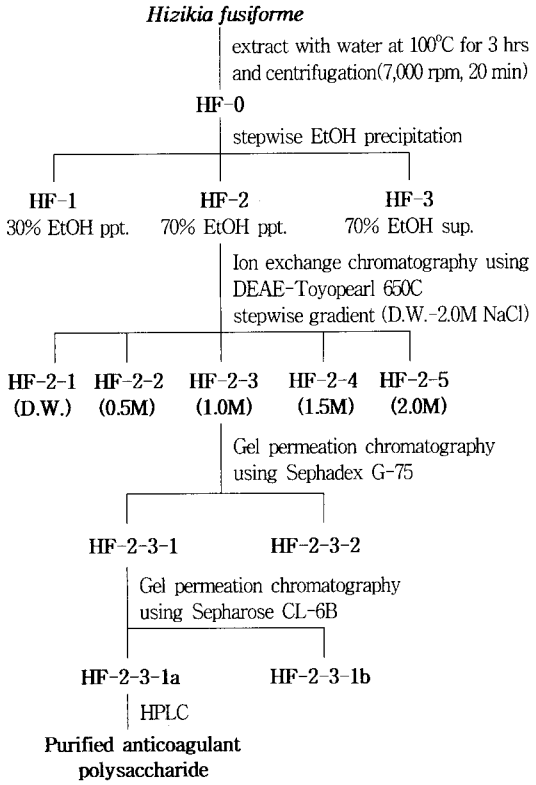

Fig. 1. Separation and purification procedure of blood anticoagulant polysaccharide from *Hizikia fusiforme*.

정제다당의 순도 및 분자량 측정

정제가 확인된 HF-2-3-Ia획분의 순도를 확인하기 위해서 HPLC(Waters2690/RI/Shodex ionpack OH-S805)를 1ml/min의 유속으로 실시하였으며 정제다당의 분자량은 Dextran T-2000(M.W. : 2×10^6), T-500 (M.W. : 5×10^5), T-70(M.W. : 7×10^4), T-40(M.W. : 4×10^4), T-10(M.W. : 1×10^4), 그리고 glucose를 표준물질로 사용하여 Sepharose CL-6B에서 표준곡선과 K_{av} 값을 비교하여 측정하였다(18).

혈액 응고계에서 항응고성 정제다당의 작용특성

Thrombin에 대한 저해 양식

순수 fibrinogen 1.0ml, thrombin 용액 0.1ml, 시료용액(HF-2-3-1a) 0.1ml을 함유한 혼합액을 37°C에서 5분간 반응시킨 후 350nm에서 흡광도를 측정하였다(19).

혈액 응고계에서의 활성 경로 측정

정제다당(HF-2-3-1a)을 각각의 농도에서 aPTT (대조구 24.3초), PT(대조구 10.8초), TT(대조구 10.3초)를 측정한 후 대조구의 % baseline으로 표시하여 항응고 활성 경로를 측정하였다(20).

In vivo 상에서의 항응고 활성

실험 동물

국립보건원에서 4주령 ICR계 mouse(웅성)를 분양받아 1일 12시간씩 점등하에 물(정제수)과 사료(삼성사료)를 자유로이 급식시키면서 1주를 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

항응고 효과의 *in vivo* test

Mouse를 2시간 절식시키고 시료를 꼬리정맥에 주입하여 15분이 경과하면 veronal buffer로 100 NIH unit/ml로 희석된 thrombin 0.12ml을 꼬리정맥에 주입한 후 15분 동안 사망, 전신마비, 회복상태를 판독하여 회복된 마리수를 생존 백분율로 표시하였다(21).

결과 및 고찰

톳(*Hizikia fusiforme*)으로부터 항응고 활성물질의 추출

해조류 중 345초의 높은 항응고 활성(control time: 45sec)을 나타낸 톳으로부터 활성물질을 분리하기 위하여 추출용매를 달리하여 항응고 활성과 수율을 검토하였다(Fig. 2). 그 결과 water(600초)>hexane(227초)>

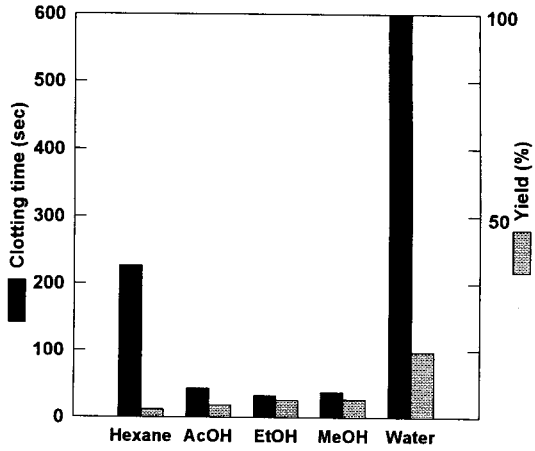

Fig. 2. Anticoagulant activity and yields of various solvent extracts from *Hizikia fusiforme*.
Anticoagulant activity of each sample(1mg/ml) was examined through the aPTT and 30 sec control time.

acetone(44.5초)>methanol(37.7초)>ethanol(33.5초) 순으로 유기용매보다 수추출물이 활성이 높게 나타났다. 수율은 water(16.23%)>methanol(4.49%)>ethanol(4.28%)>aceton(2.98%)>hexane(1.93%) 순으로 높았다. 추출용매 중 높은 활성과 수율을 나타낸 물추출물을 대상으로 추출온도에 따른 항응고 활성을 측정한 결과 추출온도가 높아질수록 항응고 활성과 수율이 증가하였다. 이것은 sulfated polysaccharide는 비교적 높은 온도에서 잘 추출된다는 기존의 보고와 일치함을 알 수 있었다. 특히 동일한 추출 온도일지라도 hand mixing만 실시한 후 100°C에서 추출한 시료보다 균질화한 후 동일온도에서 추출한 시료의 항응고 활성이 높았다. 또한 추출온도가 높아질수록 당의 함량과 단백질 함량 및 용해도가 증가됨을 알 수 있었다(Table 1).

염분을 제거한 톳 400g을 Fig. 1의 방법에 따라 100°C에서 3시간 추출 후 그 추출액(HF-0)을 농도별 에탄올 침전을 실시하였다. 에탄올 농도에 따른 용매 침전 획분(HF-1, -2, -3) 중 HF-2 획분의 항응고 활성은 (Fig. 3) 500μg/ml에서 397초, 250μg/ml 133초, 100μg/ml 78초로 가장 활성이 높았다. 각 획분의 총당함량은 HF-1 획분이 85.3%로 가장 높았으며 HF-2 획분이 79.8%였으며 단백질함량은 HF-3 획분이 34.7%로 가장 높았다. 항응고 활성이 가장 높았던 HF-2 획분의 주구성당은 fucose 42.7%, galactose 17.6%, glucose 17.2%로 HF-0 획분에 비해 fucose의 함량이 증가하였으며 HF-2를 다당의 선택적 산화제인 periodate로 산화시켰을 때 활성이 379초에서 110초로 낮아지는 것으로 보아 항응고 활성에 다당이 관여함을 추정할 수 있었다(Table 2).

Table 1. Chemical compositions and anticoagulant activities of the *Hizikia fusiforme* extracts obtained by various temperatures

Extraction temp.	Extraction time(hr)	Protein (%)	Total sugar(%)	Uronic acid(%)	Sulfate (%)	Clotting time(sec)	
						250μg/ml	500μg/ml
4°C	24	10.1	71.6	24.5	18.38	53.0	100.0
25°C	24	21.4	54.0	26.1	26.93	68.4	141.0
50°C	2	20.4	36.4	26.2	23.87	69.9	143.0
70°C	2	25.2	48.9	23.2	28.70	104.0	244.0
100°C	2	25.2	53.4	24.7	33.70	166.0	284.0
100°C after homogenizing	2	27.0	68.7	21.3	30.48	190.0	321.0

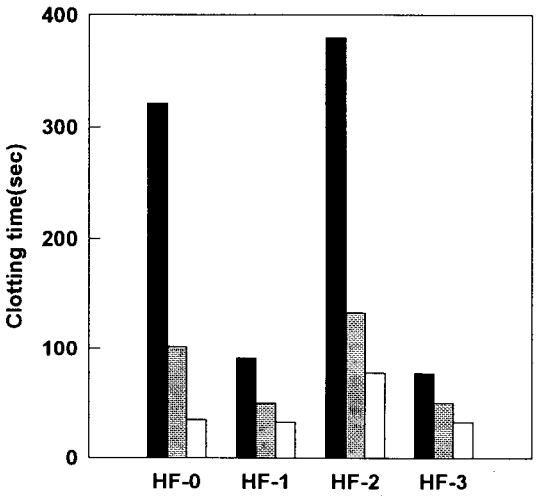

Fig. 3. Anticoagulant activity of subfractions by ethanol precipitation and HF-0 from *Hizikia fusiforme*.
HF-0: Hot water extract of *Hizikia fusiforme*
HF-1: 30% ethanol precipitate of HF-0
HF-2: 70% ethanol precipitate of HF-0
HF-3: 70% ethanol supernatant of HF-0
■: 500μg/ml, ▨: 250μg/ml, □: 100μg/ml

항응고 활성 다당의 정제

톳으로부터 추출한 항응고 조다당 HF-2 획분을 DEAE-Toyopearl 650C(Cl^- form)를 이용하여 NaCl 농도증가 ion exchange chromatography를 실시한 결과 1.0 M NaCl에서 용출된 HF-2-3 획분이 250μg/ml의 농도에서 242초로 가장 활성이 높았으며 구성당의 비율은 fucose 61.48%, galactose 20.0%, mannose 6.34%로 해조류로부터 추출한 항응고 물질이 대부분 fucoidan이라는 보고와 일치함을 알 수 있었다(Table 2). 이 획분을 Sephadex G-75 column을 이용하여 분자량별로 2개의 획분으로 나눈 결과(Fig. 4)활성이 더 높은 void volume 부분의 HF-2-3-1 획분을 Sepharose CL-6B에 용출시킨 후 다시 2개의 획분(HF-2-3-1a, -1b)으로 분획하였다(Fig. 5). 주성분이 다당인 HF-2-3-1a에서 항응고 활성이 높았으며 이 획분을 Sepharose CL-6B에 재분획한 결과 좌우가 대칭인 peak를 얻었다(Fig. 6). Table 2에서는 각 정제 단계에서의 주요 활성획분간의 항응고 활성을 비교하였으며 정제가 진행될수록 aPTT활성이 점차 증가하는 경향을 보였다. HF-2-3-

Table 2. Yield, chemical composition and anticoagulant activity of each fraction during the purification step from *Hizikia fusiforme*

	HF-0	HF-2	HF-2-3	HF-2-3-1	HF-2-3-1a
Anticoagulant activity at 100μg/ml(sec)	55	62	151	207	235
Yield(%)	16.2	11.5	19.7	1.5	1.2
Sulfate(%)	21.0	21.7	25.3	27.6	29.7
Protein(%)	27.0	14.2	10.3	8.1	8.1
Total sugar(%)	68.7	79.8	83.4	88.4	89.2
Uronic acid(%)	21.3	27.6	19.9	25.5	25.7
Sugar composition (mole %)					
Rhamnose	5.2	5.3	1.88	3.77	3.78
Fucose	29.5	33.7	61.48	55.06	51.92
Arabinose	2.1	3.3	2.27	3.11	3.95
Xylose	5.4	8.5	5.94	6.45	7.14
Mannose	27.1	11.9	6.34	10.12	13.92
Galactose	13.5	16.7	20.00	19.67	19.34
Glucose	17.2	20.6	2.04	-	-

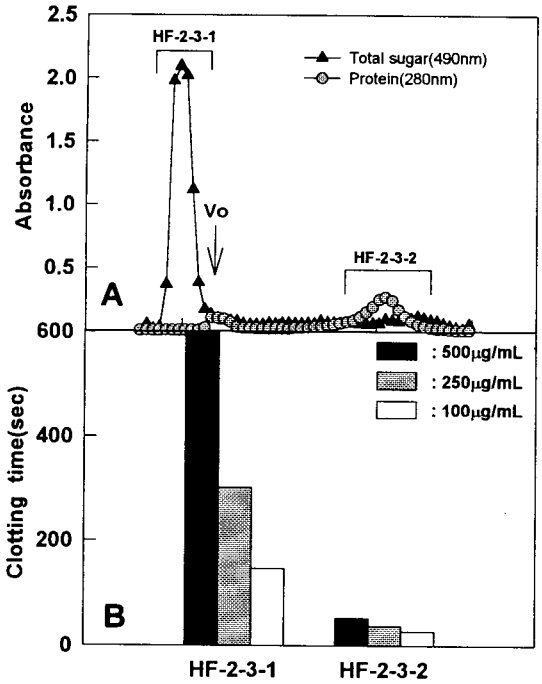

Fig. 4. GPC chromatogram(A) and anticoagulant activity (B) on Sephadex G-75 of HF-2-3.

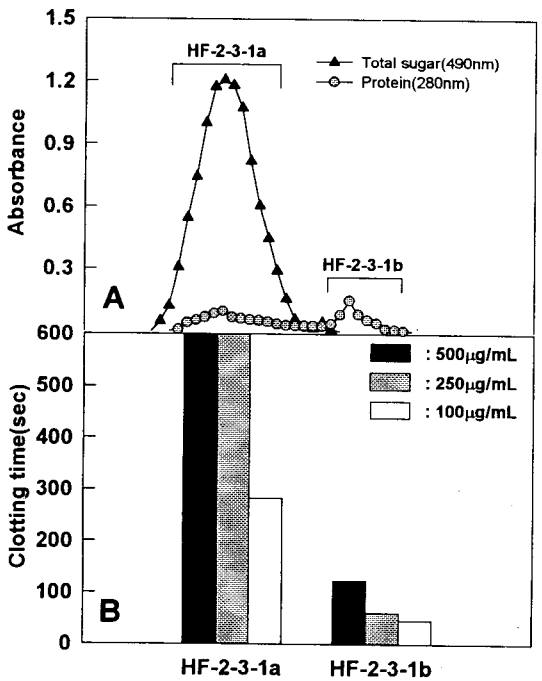

Fig. 5. GPC chromatogram(A) and anticoagulant activity (B) on sepharose CL-6B of HF-2-3-1.

1a를 GPC type의 HPLC를 행한 결과 순도가 높은 물질임을 확인하였으며 Sepharose CL-6B column을 이용하여 분자량을 표준 dextran과 비교 측정한 결과 분자량은 약 5.3×10^5 Da으로 측정되었다(Fig. 6).

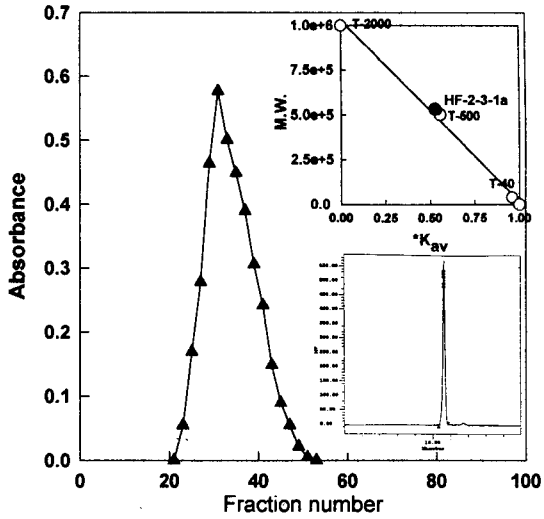

Fig. 6. GPC chromatogram and molecular weight determination of HF-2-3-1a.
The column(2.4×89cm) of sepharose CL-6B was eluted with 0.2M NaCl. T-2000, T-500, T-70 and T-40 are standard dextrans of 2×10^6, 5×10^5, 7×10^4 and 4×10^4 molecular weight.

$$*Kav=\frac{Ve-Vo}{Vt-Vo}$$ Vo: void volumn, Vt: total volumn, Ve: elution volumn

—▲—: Total sugar(490nm)

톳으로부터 분리정제한 항응고성 다당의 화학적 특성

톳으로부터 추출하여 최종 정제된 항응고성 정제 다당(HF-2-3-1a)의 수율은 1.2%였으며 항응고 활성은 HF-0 획분이 100μg/ml의 농도에서 55초인 반면 최종 정제된 HF-2-3-1a 획분은 235초였다(Table 2). HF-2-3-1a의 화학적 조성은 단백질 8.1%, 당 89.2%이고 이중 산성당의 함량은 25.7%로 구성당 잔기에 29.7%의 황산기를 함유하는 함황성다당으로 확인되었으며 정제가 진행됨에 따라 황산기의 함량이 증가됨을 알 수 있었다. 주구성당 조성은 fucose 51.92%, galactose 19.34%, mannose 13.92%, xylose 7.14%, arabinose 3.95%, rhamnose 3.78% 의 몰%로 함유되어 있었다(Table 2).

HF-2-3-1a획분의 혈액응고계에서 항응고성 정제 다당의 작용양식

Thrombin에 대한 저해 양식

Table 3에서 정제다당(HF-2-3-1a)은 heparin과 마찬가지로 시료 농도와 350nm에서의 흡광도 변화 사이에서 상관성이 없었다. 이것은 HF-2-3-1a 또한 heparin처럼 직접적으로는 thrombin에 작용하지 못하고 기존에 존재하는 antithrombin III나 heparin cofactor II

Table 3. Effect of heparin and HF-2-3-1a on fibrin formation

	Concentration (μg/ml)	Turbidity at 350nm
Heparin (167 NIH unit/mg)	25	0.12
	50	0.11
	100	0.11
HF-2-3-1a	100	0.248
	200	0.199
	300	0.188
	400	0.190

The turbidity was measured by using 0.5 unit of thrombin and 1.5mg/ml of pure fibrinogen.

의 활성을 증폭시켜 항응고 활성을 나타내는 물질임을 알 수 있었다(5).

혈액응고계에서 활성의 경로

항응고성 정제다당(HF-2-3-1a)을 농도를 달리하여 aPTT, PT, TT를 측정한 결과 aPTT와 TT는 농도에 따라 증가하나 PT는 증가하지 않는 것으로 보아 이 다당은 외인성 경로가 아닌 내인성 경로와 공통경로에 작용하여 항응고 활성을 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 7). 또한 HF-2-3-1a의 항응고 활성은 heparin처럼 농도의존성이 큼을 알 수 있었으며 TT의 활성보다 aPTT의 활성이 급격히 증가하는 것으로 공통경로보다 내인성 경로에 주로 작용하는 것으로 heparin cofactor II는 factor Xa에 별다른 효과를 보이지 않는 것으로 보고되어 있으므로(22) 정제다당은(HF-2-3-1a)은 antithrombin III와 결합하여 항응고 활성을 나타내는 것으로 추정된다.

항응고 효과의 *in vivo* test

톳 열수추출물의 *in vivo* 상에서의 항응고 활성을 측정한 결과 50mg/kg의 저농도에서는 대부분의 실험동물이 사망 또는 마비증상을 일으켜 항응고 활성을 나타내지 못하였으나 100mg/kg의 농도에서부터는 46.6%의 생존율을 보이며 항응고 활성을 나타내어 250mg/kg

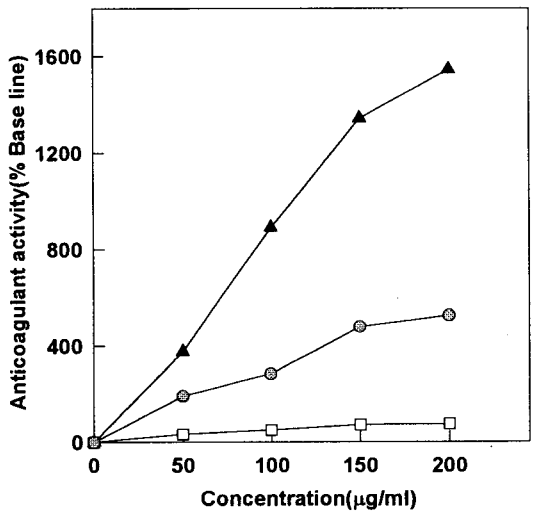

Fig. 7. Anticoagulant activity pathway of HF-2-3-1a from *Hizikia fusiforme*.
—▲—: Activated partial thromboplastin time(aPTT)
—□—: Prothrombin time(PT)
—○—: Thrombin time(TT)

투여시 100% 생존율을 나타내었다(Table 4).

요 약

국내산 해조류로부터 항혈전 제제의 개발을 위하여 해조류 열수추출물에 대하여 항응고 활성의 검색과정에서 높은 활성을 보였던 톳(*Hizikia fusiforme*)에서 항응고 활성 다당류를 분리, 정제하고 이 다당류의 화학적 특성과 항응고 활성 기작을 조사하였다. 분리, 정제는 톳(*Hizikia fusiforme*)의 열수추출물(HF-0)을 ethanol 농도별 침전을 실시한 결과 70% ethanol 온도에서 침전한 HF-2 획분이 가장 활성이 높았다. HF-2를 pronase와 periodate를 이용하여 단백질과 탄수화물을 선택 분해하여 활성을 비교한 결과 활성의 본체는 다당이었다. DEAE-Toyopearl 650C(Cl^- form)의 이온교환 크로마토그래프를 실시하여 5개의 획분으로 나누었으며 1.0M의 NaCl 농도에서 용출된 HF-2-3 획분이 가장

Table 4. Effects of HF-2 on thrombin-induced thrombosis in mice

Sample	Concentration(mg/kg)	Mice(no.)	Survival(no.)	Paralysis(no.)	Death(no.)	Rate of survival(%)
HF-2 from *H. fusiforme*	50	15	4	9	2	26.7
	100	15	7	5	3	46.6
	150	15	8	4	3	53.3
	200	15	13	1	1	86.7
	250	15	15	0	0	100
Saline		33	4	13	18	11.4

Each sample was dissolved in saline. Each value represents the survival at 30 min after administration of bovine thrombin 12 unit intravenously. Agents were administrated intravenously 10 min prior to the injection of thrombin.

활성이 높았다. HF-2-3 획분을 Sephadex G-75(HF-2-3-1)와 Sepharose CL-6B(HF-2-3-1a)로 겔여과 크로마토그래피를 실시하여 최종적으로 정제된 다당류 HF-2-3-1a 획분을 얻어 그 순도를 GPC와 HPLC를 이용하여 확인하였다. 정제다당(HF-2-3-1a)의 분자량은 5.3×10^5 Da이었으며 주구성당은 fucose(51.92%), galactose(19.34%), mannose(13.92%), xylose(7.14%), arabinose(3.95%) 및 rhamnose(3.78%) 등으로 정제된 다당은 29.7%의 황산기를 함유하는 함황성 fucoidan이었다. HF-2-3-1a의 항응고 활성은 내인성 경로를 억제하며 fibrin 형성능을 측정한 결과 직접적으로 thrombin에 작용하지는 못하고 antithrombin III의 활성을 증폭시켜 항응고 활성을 나타내며 농도 의존성 항응고 활성을 나타내었다. 톳 열수 추출물의 항응고 활성을 *in vivo*에서 측정한 결과 100mg/kg의 농도에서부터 활성이 나타나기 시작하여 250mg/kg의 농도에서는 100%의 항응고 활성이 나타났다.

문 헌

1. Kenneth, G. M., Richard, J. J. and Sriran, K. : Cofactor proteins the assembly and expression of blood clotting enzyme complexes. *Ann. Rev. Biochem.*, **57**, 915(1988)
2. 김용택 : 청국장에서 분리한 Bacillus sp.가 생산하는 혈전용해효소의 특성에 관한 연구. 세종대학교 농학박사 학위논문(1995)
3. Magnus, H., Ingemar, B., John, H. and Ulf, L. : Anticoagulant activity of heparin : Separation of high activity and low activity heparin spices by affinity chrihatigraphy on immobilozed antithrombin. *FEBS Letters*, **66**, (1976)
4. 이상권, 손정훈, 최의성, 이상기 : 한국산 거머리로부터 항혈전단백질의 검색과 분리 · 정제. 한국생화학회지, **26**, 3(1993)
5. Laurence, A. H. : Antiplatelet and anticoagulant therapy in blood : Principles and practice of hematology. J. B. Lippincott Company, Philadelphia(1995)
6. 이상화 : Streptomyces 균주가 생성하는 *Rhabdophis tigrinus* 맹독의 prothrombin 활성화 효소의 작용과 thrombin의 작용을 억제하는 물질. 경북대학교 이학박사 학위논문(1994)
7. Nishino, T., Aizu, Y. and Nagumo, T. : The influnce of sulfate content and molecular weight of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome* on its antithrombin activity. *Thrombosis Research*, **64**, 723 (1991)
8. Susanne, A., Walter, J., Dieter, W., Gerhard, F. and Jawed, F. : Anticoagulant and antithrombotic actions of a semisynthetic β-1,3-glucan sulfate. *Thrombosis Research*, **78**, 201(1995)
9. Takashi, N., Yuuzou, T. and Terukazu, N. : Isolation and partial characterization of a novel β-D-galactan sulfate from the brown seaweed Laminaria angustata Var. longissima. *Carbohydrate Polymers*, **23**, 165(1994)
10. Hurch, F. C., Meade, J. B., Treanor, R. E. and Whinna, H. C. : Antithrombitic activity of fucoidan with heparin cofactor II. antirhrombin III and thrombin. *J. Biol. Chem.*, **6**, 3618(1989)
11. Dubois, M. and K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Sonisth, F. : Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956)
12. Blumenkronz, N. and Asboe-Hansen, G. : New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.*, **54**, 484(1973)
13. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, L. and Rindall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 256(1951)
14. Dodgson, K. S. and Price, R. G. : A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochem. J.*, **84**, 106(1962)
15. Jones, T. M. and Albersheim, P. O. : A gas chromatographic method for the determinatin of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. *Plant Physiol.*, **49**, 926(1972)
16. Irving, F., Adrian, D., Peter, L., Jane, E., Kathleen, F., Elizabeth, L., Don, H., Tim, M., John, W. and John, M. : Anticoagulant activity of HirulogTM, a direct thrombin inhibitor, in humans. *Thrombosis and Haemostasis*, **69**, 157(1993)
17. Robert, K. S. : Protein purification-Principles and practice. Third ed., Springer-Verlag, p.85(1993)
18. Nasako, Y. : Some physicochemical properties of sulfated polysacchasides of serveral spcies of seaweeds. *Agric. Chem. Biol.*, **44**, 3, 673(1980)
19. 이현순 : 구름버섯으로부터 분리한 혈액 항응고성 다당에 관한 연구. 고려대학교 농학석사학위논문(1996)
20. 정헌영, 김영주, 노명희, 문홍만, 송재웅, 오헌숙, 정소웅, 조경진 : 혈액학 실습. 고려의학, p.282(1993)
21. Norihiko, S., Kenjikitazato, J. T. and Hidehiko, S. : Antithrombotic and anticoagulant activity of depolymerized fragment of the glycosaminoglycan extracted from *Stichopus japonica* selenka. *Thrombosis and Heamostasis*, **65**, 369(1991)
22. 김영식 : 헤파린 ; 구조와 활성. 생화학뉴스, **10**, 36(1990)

(1998년 8월 14일 접수)