

해조류의 항응고 활성 검색과 추출조건 최적화

윤진아 · 유광원* · 전우진* · 조홍연*[†] · 손용석 · 양한철*

고려대학교 응용동물피학과

*고려대학교 생명공학원

Screening of Anticoagulant Activity in the Extracts of Edible Seaweeds and Optimization of Extraction Condition

Jin-A Yoon, Kwang-Won Yu*, Woo-Jin Jun*, Hong-Yon Cho*[†],
Young-Suk Son and Han-Chul Yang*

Dept. of Animal Science, Korea University, Seoul 136-701, Korea

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

Abstract

Sixty extracts from edible seaweeds were screened to investigate the anticoagulant activity of blood. In general, the extracts from red seaweeds displayed the higher activities than those from green and brown seaweeds. Also, a relatively high anticoagulant activity was found in a hot water extracts over cold water, hexane, and methanol-solubles. Of all extracts, the hot water extract from *Pachymeniopsis elliptica* (PE) showed the highest anticoagulant activity and yield. The optimum extraction condition of *P. elliptica* was resulted when the extract was heated at 100°C for 3 hrs in the water. The hot water extract from *P. elliptica* was further separated by precipitation with 30% and 70% ethanol. PE-2, the precipitate by 70% ethanol, possessed higher blood anticoagulant activity than PE-1, the precipitate by 30% ethanol. This fraction contained 45.3 mol.% of galactose, 36.7 mol.% of 3, 6-anhydrogalactose and also 25.7% of sulfate which is known to be anticoagulant activity component. High percentage of sulfate in the fraction of PE-2 may be the cause for the activity of anticoagulant.

Key words: anticoagulant, seaweed, *Pachymeniopsis elliptica*

서 론

최근 우리 나라도 식생활의 서구화, 환경의 오염, 운동 부족 등에 의한 성인병의 발병율이 높아지고 있다. 그 중 혈관 내 생성된 혈전이 혈관 벽에 침착하거나 미세 혈관을 막아 혈류를 방해함으로써 야기되는 혈액 순환계 질환이 큰 비중을 차지하고 있다. 이러한 혈액응고는 혈전의 주성분인 불용성 섬유소를 형성하는 과정으로 12단계 이상의 단계 분해 과정이 cascade식으로 일어나는 복잡한 생화학적 반응이지만, 크게 3단계로 구분한다. 제 1 단계는 출혈 시 손상된 조직 또는 파괴된 혈소판에서 thromboplastin이라는 단백 분해 효소가 유리되는 과정이며, 제 2단계는 calcium 존재 하에서 thromboplastin에 의하여 혈장 중의 prothrombin이 thrombin으로 전환되는 과정, 마지막 단계는 thrombin에 의하여 혈장 중의 fibrinogen으로부터 불용성의 fibrin으로 전환되는 과정으로 간략히 요약할 수 있다(1). 최근의 혈전 치료에 관한 연구

는 혈액응고에 관여하는 주요인자의 작용을 억제하는 저해제의 개발, 혈관내피 세포의 항혈전 기능을 촉진하는 물질의 개발, streptokinase를 개선한 APSAC(Anisolyated Plasminogen-Streptokinase Activator Complex)의 개발, 그리고 제 2 세대 tPA의 개발 등에 집중되고 있다. Nishino 등(2,3)은 갈조류 *Ecklonia kurome*로부터는 fucan sulfate를, 갈조류 *Fucus vesiculosus*로부터는 fucoidan을 분리하였다. 이외에도 dextran, alginic acid, cellulose, xylan, chitosan, locust bean gum, guar gum 등에서도 항응고 활성에 대한 다수의 연구가 행하여졌지만 이들을 이용한 제품이 실용화된 바는 없다(4).

해조류는 육상식물에 비하여 비타민 및 미네랄, 특히 나그네슈, 칼슘, 요오드, 철 등의 함량이 높고, 해조류를 구성하고 있는 다당류의 독특한 구조적인 특성으로 생리활성이 강한 물질로 알려지고 있어 최근 건강식품으로 많이 이용되고 있다(5,6). 이러한 생리활성 중 특히 미역, 다시마, 파래 등은 항암활성과 고혈압 억제 활성을, 김은 콜레

[†]To whom all correspondence should be addressed

스테롤 강하작용 및 항 케양성 작용을 갖는 것으로 알려져 있다(7,8). 또한 갈조류 중에는 중성다당인 laminaran과 황산기를 함유한 산성다당이 다량 함유되어 있는데 그 대표적인 황산 산성다당이 fucooidan과 alginate이며(9), 특히 fucooidan은 heparin과 같은 혈액응고 활성 이외에 항암 및 항AIDS 등의 활성이 있다는 보고가 있다(10). 또한 홍조류의 다당류로는 agar 다당(J1), carrageenan(12) 및 porphyran(13) 등이 알려져 있으며, 특히 열록도박에는 항응고 활성을 나타내는 carrageenan 함량이 23.8% 정도 함유되어 있는 것으로 보고되었다(14). 이와 같이 몇 가지의 항응고 활성을 갖는 해조류가 보고는 되었지만 이 보고들은 이미 알려진 성분들에 국한되어 있을 뿐만 아니라 국내산 해조류를 대상으로 한 항응고 활성의 검색과 미지의 다당 성분들에 대한 항응고 활성 연구는 수행된 바 없다. 본 연구는 국내산 해조류를 대상으로 냉수, 메탄올 및 열수로 추출한 각각의 추출물에 대하여 항응고 활성을 검색하고 가장 높은 활성을 보인 시료를 선정하여 활성물질의 추출에 관한 최적조건을 검토하고자 본 연구를 행하였다

재료 및 방법

재료

검색에 사용한 60 여종의 해조류는 서울시내 백화점, 경동시장 및 해초마을에서 원산지 표시가 된 해조류만을 구입, 재공 또는 산지에서 채취하여 사용하였다. 항응고 활성측정 시약으로는 APTT(activated partial thromboplastin time) 진단시약인 Dade Actin Activated Cephaloplastin Reagent를 Dade사(New York, USA)로부터 구입하였고, 혈장(platelet pool plasma)은 고려대학교 부속 병원 혈액원에서 구입하였으며 그 외 기타 시약은 시판 일급 혹은 특급시약을 사용하였다.

일반 성분분석 및 구성당 분석

총당 함량은 galactose를, 산성당 함량은 β -D-galacturonic acid를 그리고 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 각각 phenol-sulfuric acid법(15), m-hydroxydiphenyl법(16) 및 Lowry 등(17)의 방법으로 정량하였다 항응고 활성에 중요하게 관여하는 황산기 함량은 변형된 Dodgson과 Price의 방법(18)으로 시료를 1.0 N HCl로 105~110°C에서 4시간 동안 가수분해한 후 가수분해액 0.2 mL에 4% TCA 용액 3.8 mL과 BaCl₂-gelatin reagent 1 mL을 첨가하고 20분간 방치한 후 360 nm에서 흡광도를 측정하여 K₂SO₄의 표준 검량선을 이용하여 정량하였다. 구성당 분석은 Jones와 Albersheim의 방법(19)에 따라 시료를 alditol acetate 유도체로 전환시켜 gas liquid chromatography(Young Lin 600D, Young Lin, Korea)로 측정하였다. GLC의 분석은 SP-2380 cap-

illary column(30 m×0.25 mm i.d., 0.25 μ m film thickness; Supelco Inc., USA)을 이용하여 측정하였으며 표준 구성당들과 retention time을 비교하여 시료 중의 구성당을 분석하였고 구성당의 mol.%는 각 peak들의 면적비와 각각의 유도체의 분자량으로부터 계산하였다. 한편 3, 6-anhydrogalactose는 Duckworth와 Yaphe의 방법(20)에 의해 분석한 후 전체구성당의 mol.%에 적용하여 정량하였다

해조류의 시료 조제 및 항응고 활성 검색

항응고 활성 시료의 선정을 위하여 해조류의 염분을 제거하고 건조한 각종 시료를 homogenizer(Ultra-turrax T-50, Janke & Kunkel IKA-Labortechniker, Germany)로 7,000 rpm에서 20분간 분쇄한 후 Fig 1에서와 같이 용매의 극성도에 따라 냉수(Fr. I), 헥산, 메탄올(Fr. II) 및 100°C의 열수(Fr. III)로 2시간씩 환류추출한 후 원심분리(8,000×g, 20분)하고 그 상등액을 동결건조하여 시료를 1,000 μ g/mL, 500 μ g/mL 및 250 μ g/mL의 농도로 plasma에 용해시킨 후 항응고 활성을 측정하였다

항응고 활성 측정

항응고의 활성은 APTT법으로 측정하였다(21). 즉 시

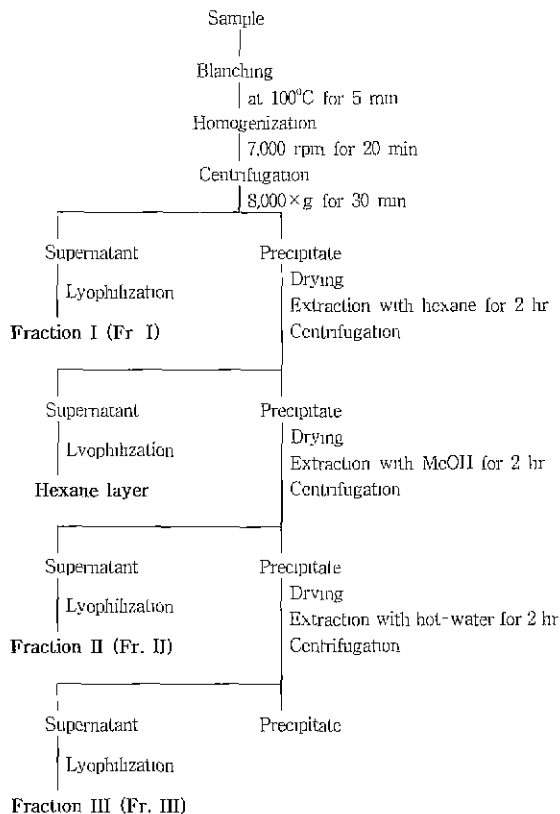


Fig. 1 Preparation of various extracts from seaweeds by different solvents.

료를 1 mg/mL의 농도로 혈장(platalet poor plasma)에 용해한 후 시료를 함유한 100 μ L의 혈장을 APTT 진단 시약 100 μ L와 혼합하고 37°C에서 정확히 3분간 예열한 다음 37°C에서 미리 예열된 20 mM CaCl₂ 100 μ L를 가해, 응고가 될 때까지의 시간으로 측정하였으며 대조군은 시료를 포함하지 않은 순수한 혈장 100 μ L를 사용하는 것 외에는 위의 방법과 동일하게 측정하였다. Blood coagulator(Clots 1A, HOSPITEX Diagnostics, Italy)에 의하여 3회 반복 실시하여 측정된 평균 응고시간을 항응고 활성으로 나타내었다.

항응고 활성 검색 후 선정된 시료의 항응고 물질 추출조건 최적화

해조류의 항응고 활성 검색에서 최대의 항응고 활성을 보여 선정된 참도박을 다음과 같은 추출용매, 추출 온도 그리고 추출시간 조건에 따라 추출하여 1,000 μ g/mL, 500 μ g/mL 및 250 μ g/mL의 농도로 plasma에 용해시켜 APTT법으로 항응고 활성을 측정하였다.

추출용매에 따른 항응고 활성 검토

건조 후 분쇄한 참도박 2 g에 헥산, 아세톤, 에탄올, 메탄올, 0.1 N HCl, 0.1 N NaOH, 냉수 및 열수를 가해 2시간 동안 환류추출한 후 원심분리하고 그 상등액을 동결건조하여 시료를 제조하였다.

추출온도에 따른 항응고 활성 검토

건조 후 분쇄한 참도박 2 g에 물을 가하고 4°C와 25°C에서는 24시간, 50°C, 70°C, 100°C 및 121°C에서는 2시간씩 교반하여 추출한 후 원심분리하고 그 상등액을 동결건조하여 시료를 제조하였다.

추출시간에 따른 항응고 활성 검토

건조 후 분쇄한 참도박 2 g에 물을 가하고 100°C에서 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간동안 환류추출하여 원심분리한 후 그 상등액을 동결건조하여 시료를 제조하였다.

항응고 활성 검색 후 선정된 시료의 활성 조다당 획분의 추출 및 조제

위에서 언급한 항응고 물질의 추출조건 실험결과, 100°C 열수를 이용하여 3시간 정도 추출하는 것이 항응고 물질의 수율이나 활성의 최적조건임을 확인하였다. 한편 저분자류의 함량이 높은 유기용매추출물의 경우에는 거의 활성을 가지지 않았으며 열수추출물의 경우에는 다당이나 단백질 등의 고분자류가 대부분일 것으로 생각되었기 때문에 일반적으로 고분자를 회수할 수 있는 에탄올 침전 방법을 이용하여 대량으로 항응고 활성 획분을 추출, 조제하였다. 또한 시료를 처음부터 열수추출을 하게 되는 경우에는 저분자류나 색소 등의 함량이 높을 수 있으므로 먼저 시료를 메탄올로 환류추출하여 제

거한 후에 잔사를 열수추출하는 방법을 사용하였다 즉, Fig. 2의 방법에 따라 염분을 제거한 참도박 1 kg을 blanching(100°C, 5 min)한 후 동결건조를 거쳐 homogenizer로 분쇄하고 메탄올(56°C, 1시간, 4 회)로 환류추출하여 메탄올 가용성 획분(PE-M, 수율; 71%)을 분리하였다 잔사에 다시 증류수를 첨가하고 100°C에서 환류추출한 후 원심분리하고 그 상등액을 동결건조하여 열수추출물 획분(PE-0, 수율: 38.8%)을 조제하였다. PE-0을 다시 증류수로 용해한 후 에탄올을 30% 및 70%의 농도별로 첨가하고 4°C에서 12시간 교반한 후 원심분리로 각각의 에탄올 농도에 따른 항응고 활성 획분인 PE-1(30% 에탄올 침전물, 수율; 2.6%)과 PE-2(70% 에탄올 침전물, 수율; 34.3%) 및 에탄올 가용성 획분인 PE-3(70% 에탄올 가용성 획분, 수율; 1.9%)을 분리하여 조제하였다. 이러한 항응고 활성 획분, PE-1과 PE-2의 성분 함량과 구성당을 분석한 결과 이들은 당의 함량이 상대적으로 단백질보다 높았기 때문에 이를 조다당 획분들로 하였다.

결과 및 고찰

해조류로부터 항응고 활성의 검색과 시료의 선정

60 여종의 국내산 해조류를 대상으로 냉수(Fr. I), 핵산, 메탄올(Fr. II) 및 열수(Fr. III) 등의 용매를 사용하여 Fig. 1에서와 같이 추출물을 조제하였다. 수율이 현저히

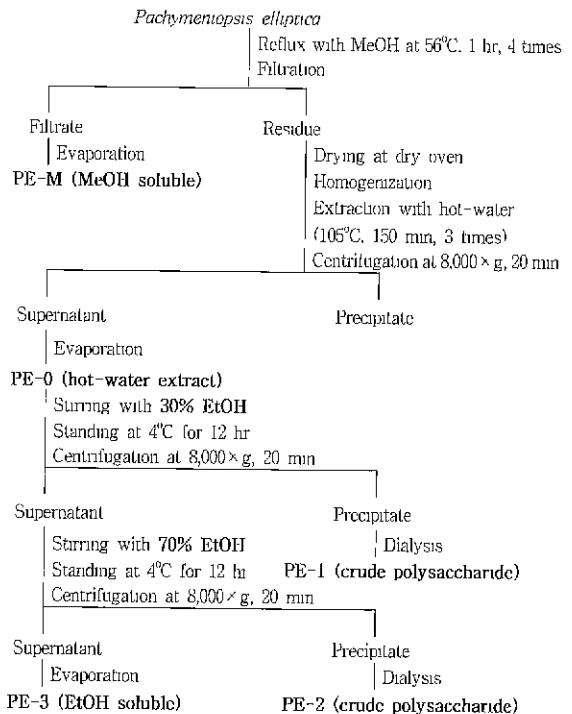


Fig. 2. Preparation of crude polysaccharides from hot water extract of *Pachymeniopsis elliptica*.

낮은 핵산 회분을 제외한 나머지 회분의 항응고 활성을 APTT법으로 측정한 결과, 갈조류 중에서는 18종의 시료 중, 주문진 다시마, 남제주와 북제주의 툃, 제주 감태 및 팔꽃햇 모자반의 열수추출물(Fr. III)이 1000 µg/mL의 농도에서 시료를 포함하지 않은 순수 혈장만으로 측정된 대조군의 응고시간이 평균 32초인 것에 비해 600초를 넘는 높은 항응고 활성을 보였다(Table 1) 검색된 9종의 녹조류 중에는 속초의 청자파래, 남작파래의 열수추출물, 완도 청각의 냉수추출물(Fr. I)과 열수추출물 및 제주 넙청각의 냉수추출물 등이 600초를 넘는 응고시간을 나타내었다(Table 2). 한편, 홍조류의 경우에는 20종 중, 특히 냉수추출물의 제주 플로카미움, 갈래곰보 및 갈

래잎과, 열수추출물의 속초 참도박, 제주 제발, 핑꼬리, 플로카미움 및 갈래잎의 경우에는 500 µg/mL의 시료의 농도에서도 600초를 넘는 높은 항응고 활성을 보였다(Table 3). 한편 Table 1~3의 검색 결과에서와 같이 해조류의 다양한 용매로 제조된 회분 중에서도 주로 냉수와 열수추출물 등의 수용성 회분에서 활성을 나타내었으며, 이러한 수용성 회분에는 단백질이나 다당 등의 고분자류의 함량이 높기 때문에 해조류의 항응고 활성의 경우에도 고분자류가 활성에 중요하게 관여하는 것으로 추정된다 또한 해조류의 경우, 황산기 함량이 높은 수용성 다당류가 항응고 활성에 중요하게 관여하고 있는 것으로 보고(10,14)되고 있기 때문에 본 연구에서도 이러한 황산

Table 1. Anticoagulant activities of Korean brown seaweeds

Korean name	Scientific name	Anticoagulant activity (sec) ¹⁾								
		Fr. I (µg/mL) ²⁾			Fr. II (µg/mL) ³⁾			Fr. III (µg/mL) ⁴⁾		
		1,000	500	250	1,000	500	250	1,000	500	250
곰피 (속초 産)	<i>Ecklonia stolonifera</i>	45	42	36	39	37	32	421	105	69
곰피 (삼척 産)	<i>Bcklonia stolonifera</i>	168	68	46	40	36	33	275	174	85
곰피 (목호 産)	<i>Ecklonia stolonifera</i>	198	85	51	42	40	37	226	164	94
미역 (진도 産)	<i>Undrania pinnatifida</i>	57	43	35	44	38	33	121	69	52
미역 (영덕 産)	<i>Undrania pinnatifida</i>	84	63	48	37	35	33	375	194	49
미역 (기장 産)	<i>Undrania pinnatifida</i>	84	63	51	48	45	39	262	154	109
다시마 (주문진 産)	<i>Laminaria japonica</i>	45	42	36	37	32	28	≥600 ⁵⁾	198	96
다시마 (완도 産)	<i>Laminaria japonica</i>	123	52	41	42	34	32	173	80	51
다시마 (진도 産)	<i>Laminaria japonica</i>	314	182	71	39	37	36	430	230	109
툃 (남제주 産)	<i>Hizilia fusiforme</i>	389	133	68	42	39	33	≥600	340	168
툃 (북제주 産)	<i>Hizilia fusiforme</i>	420	152	84	59	47	39	≥600	312	156
모자반 (남제주 産)	<i>Sargassum fulvellum</i>	211	101	65	43	40	37	389	132	73
모자반 (북제주 産)	<i>Sargassum fulvellum</i>	97	64	45	66	54	43	179	78	53
미역식 (속초 産)	<i>Endarachne binghamiae</i>	163	77	59	35	33	29	78	52	41
개미역식 (강릉 産)	<i>Petalonia fascia</i>	166	83	60	36	35	34	400	219	97
감태 (제주 産)	<i>Ecklonia cava</i>	174	85	68	38	37	33	≥600	362	165
팔꽃햇모자반 (제주 産)	<i>Gelidium hakoclatensis</i>	368	188	104	42	38	35	≥600	502	298
파매기모자반 (제주 産)	<i>Cystosiria hakoclatensis</i>	157	102	72	39	37	35	195	140	95

¹⁾Clotting time of activated partial thromboplastin time (APTT) and its control time was 32 sec
²⁾Fr. I: cold water extract fraction, ³⁾Fr. II: methanol-soluble fraction, ⁴⁾Fr. III: hot water extract fraction.
⁵⁾The activity value of ≥600 means over-range of coagulator

Table 2. Anticoagulant activities of Korean green seaweeds

Korean name	Scientific name	Anticoagulant activity (sec) ¹⁾								
		Fr. I (µg/mL) ²⁾			Fr. II (µg/mL) ³⁾			Fr. III (µg/mL) ⁴⁾		
		1,000	500	250	1,000	500	250	1,000	500	250
홀파래 (해남 産)	<i>Monastroma nitidum</i>	59	43	35	45	42	36	51	43	36
홀파래 (완도 産)	<i>Monastroma nitidum</i>	117	74	56	46	44	40	105	67	52
홀파래 (광천 産)	<i>Monastroma nitidum</i>	96	71	48	43	38	33	80	74	56
청자파래 (속초 産)	<i>Enteromorpha intestinalis</i>	524	315	119	39	34	33	≥600 ⁵⁾	149	78
남작파래 (속초 産)	<i>Enteromorpha compressa</i>	314	118	61	60	43	35	≥600	258	111
가시파래 (완도 産)	<i>Enteromorpha prolifera</i>	109	72	61	41	39	37	99	78	55
갈색대마디말 (제주 産)	<i>Cladophora wrightiana</i>	11	16	29	34	34	33	77	57	45
청각 (완도 産)	<i>Codium fragile</i>	≥600	458	261	49	47	40	≥600	386	271
넙청각 (제주 産)	<i>Codium latum</i>	≥600	352	105	36	33	31	412	266	203

¹⁾Clotting time of activated partial thromboplastin time (APTT) and its control time was 32 sec.
²⁾Fr. I: cold water extract fraction, ³⁾Fr. II: methanol-soluble fraction, ⁴⁾Fr. III: hot water extract fraction.
⁵⁾The activity value of ≥600 means over-range of coagulator.

Table 3. Anticoagulant activities of Korean red seaweeds

Korean name	Scientific name	Anticoagulant activity (sec) ¹⁾								
		Fr. I (µg/mL) ²⁾			Fr. II (µg/mL) ³⁾			Fr. III (µg/mL) ⁴⁾		
		1,000	500	250	1,000	500	250	1,000	500	250
참김 (신안 産)	<i>Porphyra tenera</i>	42	36	32	35	33	28	34	32	32
참김 (광천 産)	<i>Porphyra tenera</i>	83	51	47	42	35	31	54	41	36
참김 (사천 産)	<i>Porphyra tenera</i>	53	42	38	34	33	32	80	60	49
참도박 (속초 産)	<i>Pachymeniopsis elliptica</i>	≥600 ⁵⁾	269	121	35	34	33	≥600	≥600	261
참도박 (강릉 産)	<i>Pachymeniopsis elliptica</i>	428	200	92	40	33	30	≥600	418	154
참도박 (제주 産)	<i>Pachymeniopsis elliptica</i>	≥600	307	128	57	50	40	≥600	421	205
개도박 (강릉 産)	<i>Pachymeniopsis lanceolata</i>	≥600	475	290	49	47	42	≥600	460	198
개도박 (제주 産)	<i>Pachymeniopsis lanceolata</i>	≥600	275	146	37	36	33	≥600	364	192
얼룩도박 (강릉 産)	<i>Halymeniopsis dilatata</i>	≥600	368	184	49	43	36	≥600	412	254
붉은뼈까말살 (제주 産)	<i>Carpopeltis angusta</i>	51	41	38	41	40	33	≥600	308	129
개발 (제주 産)	<i>Amphyroa dilatata</i>	≥600	521	259	52	49	40	≥600	≥600	168
평꼬리 (제주 産)	<i>Phaceloearpus japonicus</i>	≥600	354	98	43	41	40	≥600	≥600	201
폴로카미움 (제주 産)	<i>Plocamium telfarreae</i>	≥600	≥600	295	53	43	40	≥600	≥600	184
뜸부기 (속초 産)	<i>Pelevetia wrightii</i>	380	170	88	47	37	30	≥600	315	95
꼬시래기 (강릉 産)	<i>Gracilaria verrucosa</i>	≥600	289	100	39	37	35	≥600	311	144
갈래곰보 (제주 産)	<i>Meristotheca angusta</i>	≥600	≥600	217	42	38	36	82	57	42
갈래잎 (제주 産)	<i>Schyzimenea dubi</i>	≥600	≥600	240	54	47	43	≥600	≥600	468
가시돌가사리 (제주 産)	<i>Gigartina tenella</i>	115	81	65	41	36	35	260	190	104
가시우무 (제주 産)	<i>Hypnea charoides</i>	136	94	78	38	38	35	251	127	103
사슬풀 (제주 産)	<i>Champia parvula</i>	246	127	76	39	37	35	304	196	88

¹⁾Clotting time of activated partial thromboplastin time (APTT) and its control time was 32 sec.

²⁾Fr. I' cold water extract fraction, ³⁾Fr II' methanol-soluble fraction. ⁴⁾Fr III: hot water extract fraction

⁵⁾The activity value of ≥600 means over-range of coagulator.

기 함유 수용성 다당류의 관여를 무시할 수 없는 것으로 생각된다. 또한 본 실험에서 검색된 해조류의 경우에는 냉수추출물(Fr. I)보다는 열수추출물(Fr. III)에서 더 많은 시료들이 항응고 활성을 가지고 있는 것으로 나타났으며 이러한 높은 활성을 갖는 여러 시료들 중에서도, 특히 속초산 참도박의 경우에는 500 µg/mL의 낮은 농도에서도 600초를 넘는 높은 활성을 보였고 구입이 용이하며 시료의 채취시기 등에 상관없이 일정하게 높은 활성을 보였기 때문에 본 연구의 실험재료로 선정하고 참도박으로부터 다양한 추출조건에 따른 항응고 활성 물질의 추출 최적화 실험을 진행하였다.

항응고 활성 검색 후 선정된 시료의 항응고 물질 추출조건 최적화

추출용매에 따른 항응고 활성 검토

해조류의 항응고 활성 검색 후 최대의 활성을 보였으며 구입이 용이하고 채취시기에 상관없이 일정하게 높은 항응고 활성을 보여 최적의 시료로 선정된 속초산 참도박의 추출용매에 따른 항응고 활성을 비교하기 위해 헥산, 아세톤, 에탄올, 메탄올, 0.1 N HCl, 0.1 N NaOH, 냉수 및 열수 등의 용매로 추출하여 활성을 검토한 결과(Fig. 3), 1,000 µg/mL의 시료 농도에서 냉수추출물과 열수추출물이 600초를 넘는 높은 활성을 보였으며, 특히 열수추출물의 경우에는 500 µg/mL의 농도에서도 600초를 넘는

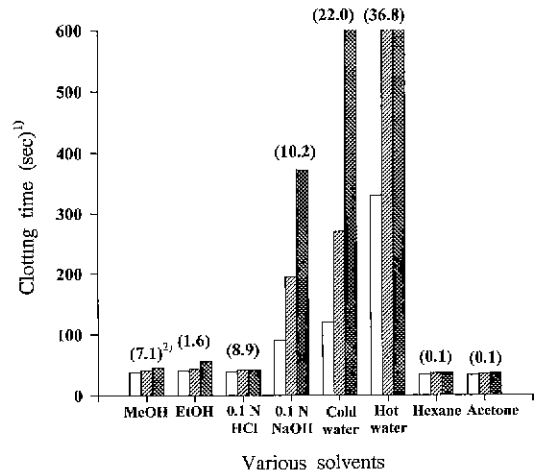


Fig. 3. Anticoagulant activities of fractions extracted by various solvents from *Pachymeniopsis elliptica*
¹⁾Clotting time of activated partial thromboplastin time (APTT) and its control time was 32 sec. ²⁾Values in parenthesis represent yield percentage over raw material. □, 250 µg/mL; ▨, 500 µg/mL; ▩, 1,000 µg/mL.

응고시간을 나타내었다. 한편, 0.1 N NaOH 추출물도 1,000 µg/mL의 농도에서 372초의 항응고 활성을 보였으나 그 외의 용매추출물은 시료를 포함하지 않은 순수 혈장만의 대조군과 거의 유사한(32초) 50초 내외의 응고시간을 보여 항응고 활성이 없었다. 수열에 있어서도 Fig.

3에서와 같이 열수추출물이 36.8%, 냉수추출물이 22%를 보인 반면, 그 외의 다른 용매추출물의 경우에는 10% 이하의 낮은 수율을 보여 참도박의 항응고 물질의 추출 용매는 냉수나 열수 등 다른 용매보다는 물이 최적조건 중 하나였으며 특히 항응고 활성이나 수율면에서는 냉수보다는 열수추출의 경우가 최적조건임을 알 수 있었다. 이러한 결과는 참도박으로부터 다양한 용매의 추출에 의해 조제된 획분 중에서도 수용성 물질, 특히 단백질이나 다당류 등이 항응고 활성에 관여하고 있음을 보여주고 있으며 따라서 냉수보다는 열수의 경우가 항응고 활성 물질의 수율이 높아 활성이 높았으리라 추정된다

추출온도에 따른 항응고 활성 검색

추출용매별 항응고 활성 검색 결과에서 물이 가장 높은 활성과 수율을 나타냄에 따라 물의 추출온도에 따른 항응고 활성과 수율을 검토하였다(Fig. 4) 추출온도가 50°C인 경우에도 항응고 활성은 1,000 µg/mL의 농도에서 600초를 넘는 높은 활성을 보였고 70°C에서는 500 µg/mL에서도 600초가 넘는 응고시간을 보였으며, 100°C 이상의 온도, 즉 121°C에서는 다른 농도에서는 차이를 보이지 않았으나 250 µg/mL의 농도에서는 항응고 시간이 330초에서 160초로 오히려 감소하는 경향을 보임으로써 활성 물질이 100°C보다 높은 온도에서는 구성분의 결합이나 구조가 영향을 받아 항응고 활성에 영향을 주는 것으로 추정된다. 특히 다당의 경우에는 높은 온도에서 당의 결합이 파괴되고 구조적으로 변화가 일어나 본래의 물질과는 다른 구조를 갖는다는 보고가 있다(22,23) 수

율의 경우에는 추출온도가 높아질수록 향상되는 경향을 보였으나 100°C 이상에서는 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 4). 이러한 추출온도에 따른 결과는 활성에 관여하는 황산기 함유 다당류가 비교적 높은 온도에서 추출된다는 보고(24)와도 일치함을 알 수 있었다.

추출시간에 따른 항응고 활성 검색

이상의 추출조건 검토와 함께 열수추출의 최적조건을 확립하기 위해 추출시간에 따른 항응고 활성과 수율을 측정된 결과(Fig. 5), 30분의 추출만으로도 1,000 µg/mL에서 600초를 넘는 높은 활성을 보였으며 1시간 이상의 추출 시에는 500 µg/mL에서도 응고시간이 600초를 넘는 활성을 나타내었다. 최적의 추출시간으로는 Fig. 5에서와 같이 250 µg/mL에서도 420초의 활성을 보인 3시간으로 확인되었으며, 4시간에서는 오히려 410초로 응고시간이 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 수율은 큰 차이를 보이지 않아 30분의 추출로도 30% 정도를 보였으나 역시 3시간 추출조건에서 39.4%로 가장 수율이 높아 최종적으로 3시간 추출에서 가장 높은 항응고 활성과 수율을 갖는 것으로 확인되었다(Fig. 5)

항응고 활성 검색 후 선정된 시료로부터 활성 조당 획분의 조제

염분을 제거한 참도박 1 kg을 Fig. 2에서와 같이 blanching(100°C, 5 min)한 후 동결건조를 거쳐 homogenizer로 분쇄하고 메탄올(56°C, 1 hr, 4 times)로 환류추출하여

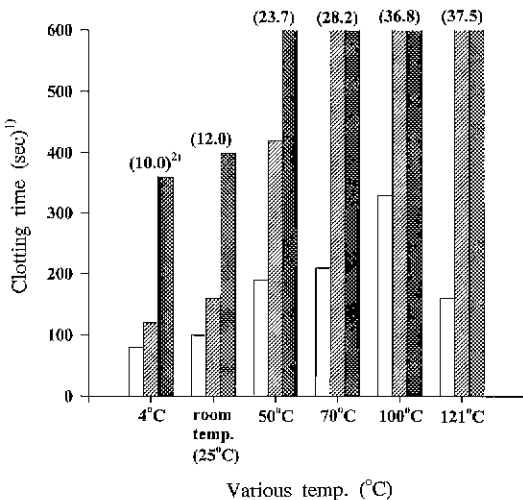


Fig. 4. Anticoagulant activities of fractions extracted by various temperatures with water from *Pachymeniopsis elliptica*
¹⁾Clotting time of activated partial thromboplastin time (APTT) and its control time was 32 sec. ²⁾Values in parenthesis represent yield percentage over raw material. □, 250 µg/mL; ▨, 500 µg/mL; ▩, 1,000 µg/mL.

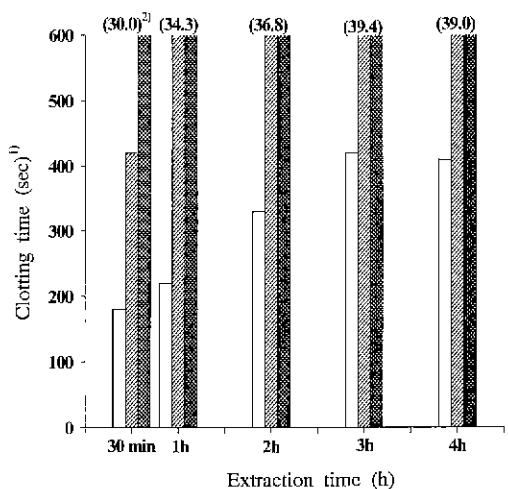


Fig. 5. Anticoagulant activities of fractions extracted by various extraction time with hot water from *Pachymeniopsis elliptica*.
¹⁾Clotting time of activated partial thromboplastin time (APTT) and its control time was 32 sec. ²⁾Values in parenthesis represent yield percentage over raw material. □, 250 µg/mL; ▨, 500 µg/mL; ▩, 1,000 µg/mL.

에탄올 가용성 획분인 PE-M을 분리하였다. 잔사에 다시 증류수를 첨가하고 100°C에서 3시간 추출한 후 추출액을 원심분리하여 얻은 상등액을 동결건조하여 열수추출물 획분(PE-0)을 조제하였다 PE-0을 다시 증류수로 용해한 후 30% 및 70%의 에탄올을 첨가하고 4°C에서 12시간 교반한 후 원심분리로 각각의 농도에 따른 에탄올침전 항응고 활성 조다당 획분인 PE-1과 PE-2를 조제하였다 에탄올 농도에 따라 조제된 조다당 획분의 항응고 활성을 측정할 결과, Fig. 6에서와 같이 70% 에탄올로 조제한 PE-2 획분의 항응고 활성은 500 µg/mL에서 600 초를 초과하였으며 250 µg/mL에서도 378초의 높은 활성을 보이면서 열수추출물 분획인 PE-0보다 활성(250 µg/mL에서 300초)이 증가된 반면, 30% 에탄올에 의해 조제된 조다당 획분인 PE-1은 500 µg/mL의 농도에서는 387초, 250 µg/mL에서는 172초이었고, 에탄올로 고분자류를 침전시킨 후의 상등액, 즉 에탄올 가용성 획분인 PE-3은 62초와 41초로 시료를 함유하지 않은 순수 혈장만의 대조군(32초)과 유사한 응고시간을 나타내 활성이 거의 없음을 본 연구를 통해 알 수 있었다. 이는 에탄올의 농도가 증가할수록 단백질이나 다당 등의 고분자류, 특히 성분 결과에 의하면 황산기 함유 수용성 다당으로 추정되는 물질의 침전량이 증가하게 되고 이러한 물질들이 항응고 활성에 중요하게 관여함으로써 항응고 활성이 높아지게 되는 것으로 생각된다. 따라서 항응고 활성 조다당 획분의 조제에 에탄올 분획이 효과적임을 알 수 있었는데 이러한 현상은 수율에서도 PE-1 2.6%에 비해 PE-2

가 34.3%로 현저히 높았을 뿐만 아니라 PE-0 38.3%에 비해 PE-2는 34.3%를 나타냄으로써 대부분의 항응고에 관여하는 열수추출물 성분이 70% EtOH에 의해 회수되어지는 것으로도 알 수 있었다(Table 4). 또한 PE-3의 경우 획분의 활성이 거의 없는 것으로 보아 저분자 등의 에탄올 가용성 성분은 항응고 활성에 관여하지 않는 것으로 추측된다. 열수추출물(PE-0)과 70% 에탄올 첨가에 의해 조제된 항응고 활성 조다당 획분(PE-2)은 Table 4에서와 같이 각각 53.6%와 54.8%로 당이 가장 많이 포함되어 있는 획분이었으며 구성당에는 각각 44.7 mol.%와 45.3 mol.%의 galactose와 34.5 mol.%와 36.7 mol.%의 3, 6-anhydrogalactose가 주된 당을 이루고 있다. 또한 당 이외의 구성물질로는 산성당, 즉 uronic acid content가 각각의 획분에 11.2%와 12.0%, 단백질은 5.6%와 4.9%를 함유함으로써 PE-0와 PE-2는 그 주된 당으로는 galactose와 3, 6-anhydrogalactose로 구성되어 있는 다당 획분임을 보여 주었다 또한 항응고 활성에 중요하게 관여하는 것으로 알려진 황산기의 함량은 PE-0와 PE-2 획분에 각각 24.9%와 25.7%의 높은 황 함량을 나타내어(Table 4) 참도박의 열수추출물과 70% 에탄올 첨가에 의해 조제된 항응고 활성을 가진 PE-2

Table 4. Physicochemical properties of the crude polysaccharide fraction (PE-2) prepared from hot water extract fraction (PE-0) of *Pachymeniopsis elliptica*

A) Chemical composition

Chemical composition (%)	PE-0 (hot water extract)	PE-2 (crude polysaccharide)
Carbohydrate content ¹⁾	53.6	54.8
Uronic acid content ²⁾	11.2	12.0
Protein content ³⁾	5.6	4.9
Sulfur content ⁴⁾	24.9	25.7
Yield (%)	38.8	34.3

¹⁾Carbohydrate content: Phenol-sulfuric acid method (as Gal).
²⁾Uronic acid content: *m*-hydroxydiphenyl method (as GalA).
³⁾Protein content: Lowry method (as BSA).
⁴⁾Sulfur content: Dodgson' modified method (as K₂SO₄).

B) Sugar component

Sugar component (mol %) ¹⁾	PE-0 (hot water extract)	PE-2 (crude polysaccharide)
Fructose	1.4	1.2
Arabinose	-	-
Xylose	5.9	4.5
Mannose	1.6	1.9
Galactose	44.7	45.3
3,6-Anhydrogalactose	34.5	36.7
Glucose	11.9	10.4

¹⁾Component sugar of polysaccharide was determined by GC as alditol acetate derivatives.

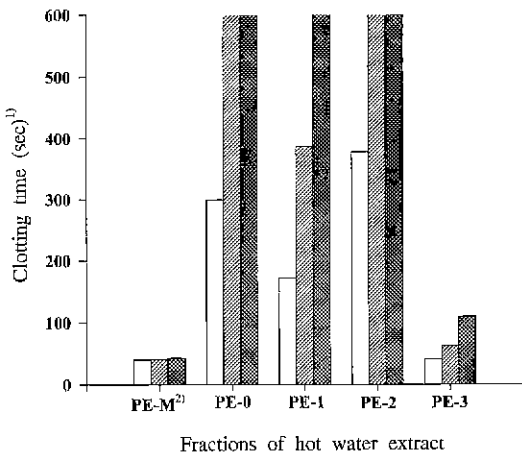


Fig. 6. Anticoagulant activities of fractions obtained from hot water extract of *Pachymeniopsis elliptica*. ¹⁾Clotting time of activated partial thromboplastin time (APTT) and its control time was 32 sec. ²⁾PE-M; MeOH-soluble, PE-0; hot water extract, PE-1, the crude polysaccharide fraction prepared by 30% EtOH, PE-2, the crude polysaccharide fraction prepared by 70% EtOH, PE-3; 70% EtOH-soluble □, 250 µg/mL, ▣, 500 µg/mL.

획분은 황산기 함량이 높은 조다당 획분인 것으로 추정되었다.

요 약

60여종의 국내산 해조류로부터 냉수, 핵산, 메탄올 및 열수별 계통 추출물의 항응고 활성을 검색한 결과, 갈조류나 녹조류보다는 홍조류에서 높은 항응고 활성을 나타내는 시료들이 많았으며 냉수와 열수의 추출조건하에서 조제된 획분들이 대부분 높은 활성을 갖고 있었으며, 특히 냉수추출보다는 열수추출물에서 높은 항응고 활성을 보인 반면, 메탄올 획분은 거의 활성을 보이지 않았다. 높은 활성을 보인 홍조류 중에서도 활성과 수율이 높고 구입도 용이한 속초산 참도박(*Pachymeniopsis elliptica*)을 항응고 활성 물질 함유 최적 시료로 선정한 후 추출에 대한 최적조건을 검토하였다. 추출조건 검토 결과, 항응고 활성은 교반 후 100°C에서 3시간 열수로 추출한 열수추출물(PE-0)이 가장 높은 활성과 수율을 보였다. 열수추출물에 30% 및 70%의 에탄올을 농도별로 첨가, 분획하여 조다당 획분을 조제하고 에탄올가용성 획분을 분리한 후 각각의 획분에 대한 항응고 활성을 측정된 결과, 70% 에탄올로 조제한 조다당 획분인 PE-2가 30% 에탄올로 조제한 PE-1보다 활성과 수율에서 모두 우수하였으며 에탄올 가용성 획분의 경우에는 유의적인 활성을 보이지 않았다. 또한 활성이 높은 PE-2 획분은 galactose와 3, 6-anhydrogalactose가 각각 45.3 mol.%와 36.7 mol.% 함유된 당을 주성분으로 하는 획분이 확인되었고 항응고 활성에 관여하는 것으로 알려진 황산기의 황 함량도 25.7%로, 참도박으로부터 열수추출과 에탄올 분획에 의해 조제된 항응고 활성 성분물질도 황산기를 포함하는 수용성 다당일 가능성을 보여 주었다.

감사의 글

본 연구는 1998년도 해양수산부의 연구비지원에 의해 수행된 결과의 일부로 연구비 지원에 감사드립니다.

문 헌

- 1 Jackson, C.M. and Nemerson, Y. : Blood cogulation. *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 765-811 (1980)
- 2 Nishino, T., Aizu, Y. and Nagumo, T. : Antithrombin activity of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Thromb. Res.*, **62**, 765-773 (1991)
- 3 Nishino, T., Nishioka, C., Ura, H. and Nagumo, T. : Isolation and partial characterization of a novel amino sugar-containing fucan sulfate from commercial *Fucus vesiculosus* fucoidan. *Carbohydr. Res.*, **255**, 213-224 (1994)
- 4 Doctor, V.M. and Sauls, V. : Isolation and anticoagulant properties of a new sulfated xylan: Comparison with heparin and a sodium pentosan polysulfate. *Thromb. Res.*

- 30**, 573-578 (1983)
- 5 Cho, D.M., Kim, D.S., Lee, D.S., Kim, H.R. and Pyeon, J.H. : Trace components and functional saccharides in seaweed-1. *J. Korean Fish. Soc.*, **28**, 49-59 (1995)
- 6 Cho, D.M., Kim, D.S., Lee, D.S., Kim, H.R. and Pyeon, J.H. : Trace components and functional saccharides in seaweed-2. *J. Korean Fish. Soc.*, **28**, 270-278 (1995)
- 7 Lee, Y.S., Kim, D.S., Ryu, B.H. and Lee, S.H. : Antitumor and immunomodulating effects of seaweeds toward Sarcoma-180 cell. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **21**, 544-550 (1992)
- 8 Cho, K.J., Lee, Y.S. and Ryu, B.H. : Antitumor effect and immunology activity of seaweeds toward Sarcoma-180. *J. Korean Fish. Soc.*, **23**, 345-352 (1990)
- 9 Kim, D.S. and Park, Y.H. : Uronic acid composition, block structure and some related properties of alginic acid. *J. Korean Fish. Soc.*, **18**, 29-36 (1985)
- 10 Collic, S., Fischer, A.M., Tapon-Breandiere, J., Boisson, C., Durand, P. and Jozefonvicz, J. : Anticoagulant properties of a fucoidan fraction. *Thromb. Res.*, **64**, 143-154 (1991)
- 11 Do, J.R. : Extraction and purification of agar from *Gelidium amansii*. *J. Korean Fish. Soc.*, **30**, 423-427 (1997)
- 12 Pintauro, S.J. and Gilbert, S.W. : The effects of carrageenan on drug-metabolizing enzyme system activities in the guinea pig. *Food Chem. Toxicol.*, **28**, 807-811 (1990)
- 13 Park, J.H., Koo, J.G., Do, J.R., Yang, C.B. and Woo, S.K. : Effect of extraction temperature and pH on the chemical properties of crude porphyran extracted from *Porphyra yezoensis*. *J. Korean Fish. Soc.*, **31**, 127-131 (1998)
- 14 Schwartz, H.J. and Kellermeyer, R.W. : Carrageenan and delayed hypersensitivity II. Activation of hageman factor by carrageenan and its possible significance. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **132**, 1021-1024 (1969)
- 15 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**, 350-356 (1956)
- 16 Blumenkrantz, N. and Asboe-Hansen, G. : New method for quantitative determination of uronic acid. *Anal. Biochem.*, **54**, 484-489 (1973)
- 17 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L. and Rindall, R.J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 256-275 (1951)
- 18 Dodgson, K.S. and Price, R.G. : A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochem. J.*, **84**, 106-110 (1962)
- 19 Jones, T.M. and Albersheim, P. : A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. *Plant Physiol.*, **49**, 926-936 (1972)
- 20 Duckworth, M. and Yaphe, W. : Preparation of agarose by fractionation from the spectrum of polysaccharides in agar. *Anal. Biochem.*, **44**, 636-641 (1971)
- 21 Casu, B., Oreste, P., Torri, G., Zoppetti, G., Choay, J., Lormeau, J.C., Petitou, M. and Smay, P. : The structure of heparin oligosaccharide fragments with high anti-(factor Xa) activity containing the minimal antithrombin III-binding sequence. Chemical and ¹³C nuclear-magnetic-resonance. *Biochem. J.*, **197**, 599-609 (1981)
- 22 Prescott, J.H., Enriquez, P., Jung, C., Menz, E. and Groman, E.V. : Larch arabinogalactan for hepatic drug deli-

- very: isolation and characterization of a 9 kDa arabinogalactan fragment. *Carbohydr. Res.*, **278**, 113-128 (1995)
23. Ponder, G.R. and Richards, G.N. ' Arabinogalactan from western larch, Part II; A reversible order-disorder transition *J. Carbohydr. Chem.*, **16**, 195-211 (1997)
24. Kim, K-I., Seo, H-D, Lee, H-S., Cho, H-Y. and Yang, H-C : Studies on the blood coagulant polysaccharides isolated from hot water extracts of *Hizikia fusiforme*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **27**, 1204-1210 (1998)

(2000년 7월 24일 접수)