

국내산 미역포자엽, 다시마, 툫, 모자반 fucoidan의 항혈액응고 특성

구재근⁺ · 최용석 · 곽중기*
군산대학교 식품공학과, *동서대학교 산업기술 센터

Blood-Anticoagulant Activity of Fucoidans from Sporophylls of *Undaria pinnatifida*, *Laminaria religiosa*, *Hizikia fusiforme* and *Sargassum fulvellum* in Korea

Jae-Geun KOO⁺, Yong-Seok CHOI and Jung-Ki, KWAK*

Department Science and Technology, Kunsan National University, Kunsan 573-702, Korea
*Engineering Reserch Center, Dongseo University, Pusan, 617-716, Korea

The anticoagulant activities of fucoidan fractions extracted from Sporophylls of *Undaria pinnatifida*, *Laminaria religiosa*, *Hizikia fusiforme* and *Sargassum fulvellum* were studied to assess the relationship between chemical characteristics and the activities. Crude fucoidans extracted with diluted HCl solution (pH 2.0) at 65°C were precipitated with cetylpyridinium chloride and then fractionated by dissolving the precipitated complex with increasing CaCl₂ concentrations (1.0 M, 1.5 M, 3.0 M). The anticoagulant activities of the fractions with respect to activated partial thromboplastin (APTT) increased with increase in their sulfate content and *Undaria pinnatifida* Fr-3.0 fraction, prepared by dissolving with 3.0 M CaCl₂ solution, exhibited the highest activity. The *Undaria pinnatifida* Fr-3.0 fraction was further modified with pronase and laminase. The pronase and laminase treatment decreased protein and glucose content and the APTT activity was higher than that of parent *Undaria pinnatifida* Fr-3.0 fraction. The pronase and laminase modified *Undaria pinnatifida* Fr-3.0 was composed of fucose, galactose, mannose, sulfate, uronic acid in the approximately molar ratio of 1.00 : 1.30 : 0.03 : 2.70 : 0.08.

Key words: Blood-anticoagulant, Fucoidan, Sporophylls of *Undaria pinnatifida*, *Laminaria religiosa*, *Hizikia fusiforme*, *Sargassum fulvellum*, Activated partial thromboplastin time

서 론

갈조류에는 알긴산, fucoidan, laminaran 등과 같은 생리활성이 우수한 다당이 함유되어 있다. 이중 fucoidan은 항혈액응고 활성이 잘 알려져 있고 다양한 갈조로부터 추출한 fucoidan의 항혈액응고 작용이 보고되고 있다 (Bernardi and Springer, 1962; Usui et al., 1980; Abdel-Fattah et al., 1974, 1978; Mori et al., 1982). Fucoidan의 항혈액응고 작용은 thrombin의 활성을 억제하여 혈액응고를 저지한다. 인체 혈액내에 존재하는 thrombin의 활성 저지 인자인 antithrombin III (AT III)와 heparin cofactor II (HC II)는 분자량이 각각 62,000, 65,600인 당단백이며 비슷한 아미노산 조성을 가지고 있으나, 그 저해 작용의 범위가 차이가 난다. Fucoidan의 thrombin억제 작용은 Church et al. (1989)에 의해 in vitro 및 ex vivo상에서 AT III와 HC II와의 관계를 실험한 결과 fucoidan은 HC II와 thrombin의 결합을 3,500배나 증가시키나 AT III을 통한 thrombin 및 혈액응고 저지 인자인 xa과의 결합은 fucoidan의 농도가 0.03 mg/mL, 0.5 mg/mL에서 각각 285배와 35배 증가하는 데 거쳐, 주 fucoidan의 혈액응고 저지 작용은 HC II를 통해 일어난다고 하였다. 또한 Fucoidan의 항혈액응고 활성은 갈조류의 종류, 화학적 조성 및 분자량에 따라 차이가 매우 커 Ni-shino and Nagumo (1987, 1991)는 9종의 갈조류로부터 각각 fu-

coidan을 추출하여 활성을 비교한 결과 *Ecklonia kurome*로부터 추출한 fucoidan이 가장 활성이 높으며, 황산기의 함량이 감소함에 따라 활성도 감소한다고 하였다.

본 연구는 국내 연안에서 대량 생산되고 있는 갈조류의 이용성 증진을 위한 연구의 일환으로 미역포자엽, 다시마, 툫, 모자반으로부터 fucoidan을 추출, 분획하여 갈조류의 종류 및 화학적 조성에 따른 항혈액응고 활성을 조사하고, 또한 효소 및 화학적 수식에 따른 활성 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

재 료

실험에 사용한 국내 연안산 미역포자엽 (Sporophylls of *Undaria pinnatifida*), 다시마 (*Laminaria religiosa*), 툫 (*Hizikia fusiformis*), 모자반 (*Sargassum fulvellum*)은 1998년 2월에서 4월에 걸쳐 전남 진도에서 생시료를 구입하여 건조하여 두고 실험에 사용하였다.

Fucoidan의 분획 및 수식

Fucoidan의 추출 및 분획을 위하여 분쇄한 시료에 5배량의 증류수를 가한 후 염산으로 pH를 2.0으로 조절하여 65°C에서 1시간 씩 3회 추출하였다. 여과 후 여액을 모아 농축한 후 3배의 에탄올을 가하여 crude fucoidan을 얻었다. 증류수에 재 용해한 crude

⁺Corresponding author : kseaweed@kunsan.ac.kr

fucooidan 용액에 cethylpyridium chloride (CPC)를 가하여 산성 획분을 침전시킨 후 1.0 M, 1.5 M, 3.0 M CaCl₂ 용액을 차례로 가하여 fucooidan의 산성도에 따라 분획하였다. 화학적 수식은 fucooidan을 1 N H₂SO₄에 녹인 후 60°C에서 90분간 분해한 후 MWCO가 각각 3,000, 10,000, 30,000, 50,000인 한외여과막을 이용하여 분자량 별로 분획하였다. 효소적 수식은 fucooidan 용액에 laminase (Sigma Co.)와 pronase (Sigma Co.)를 가하여 각각 pH 5.0, 37°C에서 1시간, pH 7.5, 37°C에서 1시간 반응시킨 후 100°C에서 20분간 가열하여 49,000 g에서 20분간 원심 분리하였다. 상등액을 모아 72시간 투석한 후 동결 건조하였다.

화학성분 및 methylation 분석

수분은 상압건조법, 조지방은 Soxhlet법, 조단백질은 Kjeldahl 정량법, 회분은 건식회화법에 따라 분석하였다 (AOAC, 1990). 황산기 함량은 Dodgson and Price (1962)의 방법에 따라 측정하였고, 우론산은 Knutson and Jeanes (1968)의 방법에 따라, 단백질은 Lowry et al. 방법 (1951)에 따라 측정하였다. 구성당의 조성은 Furneaux et al. (1990)의 방법에 따라 GC (HP 6890, HP Co, USA)로 분석하였다. 황산기 제거는 Nagasawa et al. (1977)과 Inoue and Nagasawa (1976)의 방법에 따라 methanol/DMSO를 사용하여 실시하였고 우론산의 환원은 York et al. (1985)과 Taylor and Conrad (1972)의 방법에 따라 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)-carbodiimide-metho-P-toluenesulfonate (CMC)를 사용하여 환원하였다. Methylation 분석은 Kvernheim (1987)과 Harris et al. (1984)의 방법에 따라 N-butyllithium (2.5 M in Hexan)과 methyl iodide로 methylation한 후 NaBD₄로 환원한 뒤 acetic anhydride와 pyridine을 가하여 acetylation하였다. Partially methylated alditol acetate의 분석은 SP-2330 (0.25 mm i.d. × 60 m; film thickness 0.2 μm) 칼럼을 부착한 GC (Hewlett Packard GC Model 6890)로 오븐 온도 160°C~2.0°C/min~210°C~5.0°C/min~240°C, 시료 주입구 및 검출기 온도 240°C 조건에서 실시하였다. 정량은 FID로 검출하여 피크 면적을 구한 뒤 response factor (Sweet et al., 1975)을 이용하여 mol%로 나타내었고, 동정은 MSD (HP 5973)를 이용하여 electron impact (EI) mode에서 70 eV로 이온화하여 retention time 및 mass fragment로 확인하였다. FT-IR의 측정은 Koo (1997)의 방법에 따라 실시하였다.

항 혈액 응고력 측정

활성트롬보 플라스틴 시간 (activated partial thromboplastin time, APTT)과 프로트롬빈 시간 (prothrombin time, PT)은 정상 혈장 (Sigma Co.)을 이용하여 Nishino and Nagumo (1991)의 방법에 따라 측정하였다.

결과 및 고찰

시료의 일반 조성

실험에 사용한 갈조류의 화학 조성은 Table 1과 같다. 전 시료 모두 탄수화물이 다시마 63.3%, 툿 52.5%, 모자반 51.7%, 미역포

Table 1. The Proximate composition of brown algae* (%)

Samples	Crude protein	Crude lipid	Crude ash	Total ^b carbohydrate
<i>Undaria pinnatifida</i>	12.8	9.3	27.1	50.8
<i>Laminaria religiosa</i>	9.7	4.6	22.3	63.4
<i>Sargassum fulvellum</i>	15.8	5.0	27.5	51.7
<i>Hizikia fusiformis</i>	9.8	4.6	33.2	52.4

a: Dry weight basis

b: 100 - (crude protein + crude ash + crude lipid)

c: Sporophylls of *U. pinnatifida*

자엽 50.8%로 가장 함량이 높았고, 다음으로 회분, 단백질, 지질의 순으로 함량이 높았다.

Crude fucooidan과 분획물의 특성

Crude fucooidan의 조성은 Table 2와 같다. Fucooidan의 주요 특성인 황산기의 함량은 미역포자엽 25.6%, 다시마 13.3%, 툿 12.2%, 모자반 9.8%의 순으로 함량이 높았고 우론산의 함량은 툿 53.0%, 다시마 52.7%, 모자반 44.5%, 미역포자엽 37.9% 순으로 함량이 높았다. 단백질의 함량은 툿 15.1%, 모자반 15.1%, 다시마 8.5%, 미역포자엽 7.9%였다. 미역포자엽은 다른 시료에 비해 우론산과 단백질이 혼입이 적은 반면에 툿, 다시마, 모자반은 전체 crude fucooidan의 50% 이상이 우론산과 단백질로 혼입되어 있음을 알 수 있었다. 본 실험의 crude fucooidan 추출 조건은 pH 2.0으로 조제내의 알긴산 염은 알긴산 형태로, 그리고 대부분의 단백질도 변성되어 불용화 되는 조건임에도 불구하고 crude fucooidan에 다량 함유되어 있음을 알 수 있었다. 이는 수용성 산성 다당인 fucooidan이 조제내에서 우론산과 단백질에 결합되어 존재하고 있어, 본 실험의 추출 조건 하에서 fucooidan이 추출될 때 함께 추출된 것으로 여겨진다. Larsen et al. (1970)은 *Ascophyllum nodosum*로부터 ascophyllan에 관한 연구를 통하여 ascophyllan은 (1-4)-linked D-glucofuranuronic acid로 이루어진 주사슬에 fucooidan이 glycosidic bond로 결합되어 있으며, polypeptide는 이 측쇄에 결합되어 있었다고 보고하였다. 구성당의 조성비는 fucose가 전 시료 모두 가장 높았고, 다음으로 galactose와 glucose가 전 시료 모두 비교적 높았다. Fucooidan의 조성은 현재까지 보고된 바에 의하면 fucose와 galactose가 대부분을 차지하고, 미량의 glucose, xylose,

Table 2. Chemical properties of crude fucooidans extracted from dried brown algae^a

Sample	Uronic acid (%)	Sulfate (%)	Total sugar (%)	Protein (%)	Proportion of monosaccharides (%) ^b				
					Fuc	Xyl	Man	Gal	Glu
<i>U. pinnatifida</i>	37.9	25.6	28.9	7.9	41.2	-	tra	29.2	29.6
<i>L. religiosa</i>	52.7	13.3	25.5	8.5	54.5	10.2	tra	23.0	12.9
<i>S. fulvellum</i>	44.5	9.8	30.5	15.1	51.4	8.0	tra	15.6	25.0
<i>H. fusiformis</i>	53.0	12.2	19.8	15.1	69.9	4.5	tra	16.6	9.0

a: Dry weight basis

b: Calculated from G.C analysis, considering the total amounts under the five monosaccharides as 100%

-: Not detected

mannose 등이 함유된 heteropolysaccharide로 알려져 있다. 또한 전시료 모두 glucose가 비교적 다량 존재하는 것은 갈조류의 저장 다당인 laminaran의 혼입 가능성이 높은 것으로 여겨진다.

Crude fucoidan에 CPC를 가하여 복합체를 형성한 후 0.5 M, 1.5 M, 3.0 M CaCl₂ 용액으로 단계적으로 증가시켜 얻은 Fr-0.5, Fr-1.5, Fr-3.0의 화학적 조성 및 항혈액응고 특성은 Table 3과 같다. 미역포자엽, 모자반, 툿은 염농도가 증가할수록 수율이 증가하여 3.0 M CaCl₂에 녹는 획분인 Fr-3.0이 각각 76.2%, 55.6%, 51.6%를 차지하였다. 반면에 다시마의 경우는 Fr-0.5가 41.4%로 가장 수율이 높았다. 전시료 모두 황산기는 CaCl₂ 농도가 증가할수록 증가한 반면에, 우론산과 단백질은 감소하는 경향을 나타내어, CaCl₂의 농도가 증가할수록 황산기 함량이 높고 우론산 및 단백질의 혼입이 적은 획분을 얻을 수 있었다. 따라서 CPC와 CaCl₂를 이용하여 비교적 간단히 fucoidan을 부분 정제할 수 있었다. 이는 carboxyl기를 많이 함유된 획분에 비하여 sulfate를 함유한 획분이 CPC와 강한 결합력을 가진 복합체를 형성하므로 복합체로부터 재용리를 위해서는 고농도의 염용액이 요구되기 때문이다. 또한 획분의 구성당 조성은 전시료 모두 염농도가 증가할수록 galactose의 함량이 증가하는 경향을 나타낸 반면에 xylose, mannose, glucose는 감소하는 경향을 나타내어 fucoidan의 주요 구성당 성분은 fucose와 galactose임을 알 수 있었다. 특히 미역포자엽의 Fr-3획분은 다른 시료와 달리 galactose의 함량이 fucose의 함량보다 많은 sulfated fucogalactan이었다. 항혈액 응고 활성은 PT값의 경우 전 시료 모두 16~23초로 활성이 없는 반면에, APTT저지 효과는 전시료 모두에 나타나 Collic et al. (1991)의 보고와 동일하게 fucoidan은 내인성 경로 (intrinsic pathway) 인자를 저해하기 때문에 항혈액 응고 작용이 일어나는 것으로 여겨진다. Fucoidan 분획물의 APTT 연장 효과는 전시료 모두 CaCl₂의 농도가 높은 획분일수록 증가하는 경향을 나타내었다. Nishino and Nagumo (1991)는

fucoidan의 항혈액 응고 작용은 황산기의 mole%가 증가할수록 증가한다고 보고하였는데, 본 실험의 결과도 유사한 경향을 나타내었다. 시료간에는 미역포자엽의 Fr-3이 520초로 가장 높았고, 다음으로 다시마, 모자반, 툿의 순이었다. 따라서, 이 후의 실험은 수율 및 항혈액 응고 특성이 가장 우수한 미역포자엽 분획물 (Fr-3)을 시료로 하여 수식 조건에 따른 항혈액응고 실험을 하였다. Fig. 1은 미역포자엽 fucoidan (Fr-3)의 농도에 따른 APTT 측정값을 나타낸 그림이다. Fucoidan의 농도가 500 µg/mL까지는 완만하게 증가를 하였으나 500 µg/mL 이후에는 급속히 증가하여 미역포자엽 fucoidan의 항혈액응고 활성은 농도 의존성을 알 수 있었다. Dobashi et al. (1989)도 툿에서 추출한 fucoidan의 항혈액응고 활성이 농도의존성을 나타낸다고 보고한 바 있었다.

화학적 및 효소적 수식 fucoidan의 특성

미역포자엽 fucoidan 분획물 (Fr-3)을 산 및 효소적으로 수식하여 얻은 획분의 특성을 Table 4에 나타내었다. 단백질 제거를 위해 pronase처리한 시료는 단백질의 함량이 감소하였고, laminase로 수식한 시료는 단백질의 함량은 변화가 없으나 glucose의 함량은 감소하였다. 따라서 미역포자엽 분획물 (Fr-3)에 존재하는 glucose는 laminaran으로부터 혼입되었음을 알 수 있었다. Pronase와 laminase를 동시에 처리한 시료의 fucose:galactose:mannose:sulfate:uronic acid의 mole%는 1:1.3:0.03:2.7:0.08이었다. 이는 Koo et al. (1995)의 이온교환크로마토그래피와 알콜분별침전법으로 정제한 미역포자엽 fucoidan의 fucose:galactose:sulfate mole%가 1:0.87:0.99였다는 보고에 비하여 galactose와 sulfate의 함량이 높았는데 정제방법, 미역포자엽의 채취시기 및 장소의 차이 때문으로 여겨진다. 효소 수식한 시료의 APTT활성은 미역포자엽 분획물 (Fr-3)이 520초 (Table 3)에 비하여 pronase처리 시료, laminase처리 시료 및 두 효소 동시처리 시료의 APTT 값이 각각 565,

Table 3. Properties of fractions of crude fucoidans by different CaCl₂ concentration

Samples	Fraction	Yield ¹ (%)	Uronic acid (%)	Sulfate (%)	Protein (%)	Total sugar (%)	Proportion of monosaccharides (%) ²					Clotting times (sec) ³	
							Fuc	Xyl	Man	Gal	Glu	PT	APTT
<i>Undaria pinnatifida</i>	Fr-0.5	4.4	37.8	19.1	11.7	51.4	74.8	12.2	3.2	2.6	7.2	16	220
	Fr-1.5	19.4	12.4	36.1	5.9	45.5	56.7	10.8	3.3	38.6	7.0	20	310
	Fr-3.0	76.2	10.7	42.6	3.4	43.3	31.8	tra	1.8	57.9	2.2	19	520
<i>Laminaria religiosa</i>	Fr-0.5	41.4	35.0	9.2	28.8	27.0	33.8	12.2	20.5	14.5	19.0	21	195
	Fr-1.5	25.3	31.1	19.6	14.9	34.3	48.5	4.0	14.2	22.7	10.6	22	385
	Fr-3.0	33.2	18.1	39.4	3.3	39.0	61.3	1.0	6.5	27.8	2.6	20	420
<i>Sagassium fulvellum</i>	Fr-0.5	35.1	23.2	12.6	21.0	43.3	37.9	22.7	6.4	25.9	7.0	19	240
	Fr-1.5	9.3	18.9	20.4	20.6	40.1	50.5	8.4	4.1	32.5	4.7	24	275
	Fr-3.0	55.6	4.4	55.2	7.6	32.7	43.6	6.3	3.5	43.0	3.6	20	319
<i>Hijikia fusiformis</i>	Fr-0.5	33.1	25.3	14.2	37.1	23.4	31.1	15.5	18.0	15.0	20.4	19	225
	Fr-1.5	15.3	23.6	24.7	16.6	35.1	47.1	12.7	8.3	28.9	5.1	19	310
	Fr-3.0	51.6	17.5	29.7	6.4	46.4	43.3	6.7	6.2	36.7	5.1	23	315

1: Yields of fractional fucoidans obtained from crude fucoidans, respectively

2: Calculated from G.C analysis, considering the total amounts under the five monosaccharides as 100%

3: Fucoidan concentration (200 µg/mL)

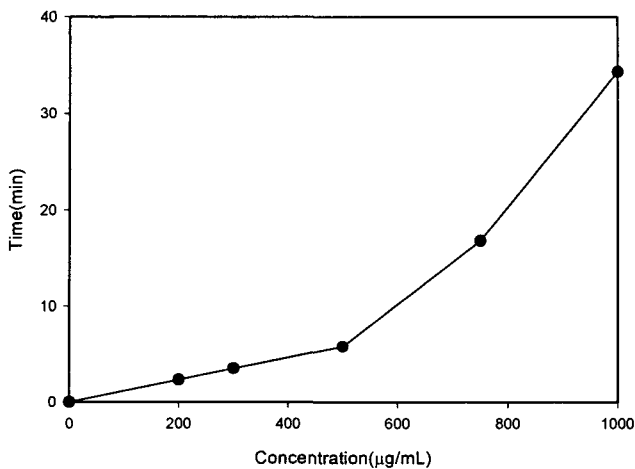


Fig. 1. Effect of concentration of *Undaria pinnatifida* fucoidan (Fr-3) on activated partial thromboplastin time (APTT).

560, 560초로 증가하여 protein과 glucose의 제거에 따른 항 혈액 응고 활성의 증가로 여겨진다. 또한 산 가수 분해하여 분자량 별로 분획한 fucoidan 시료의 경우 분자량 30,000~50,000 획분은 분획되지 않았으며, 그 외 분자량 획분에 있어서는 분자량이 증가할수

록 fucose의 함량은 줄어든 반면에 단백질과 galactose의 비율은 증가하였고, 황산기와 우론산은 일정한 경향을 나타내지 않았다. APTT값은 황산기의 mole 비율이 가장 높은 10,000~30,000 획분이 499초로 가장 높았으나 산 수식한 시료 모두 효소 수식 시료에 비하여 활성이 낮았다.

Methylation 분석

효소 수식에 따른 fucoidan의 주요 구성당 결합 구조의 변화를 조사하기 위해 methylation 분석한 결과를 Table 5에 나타냈다. 그리고 Fig. 2는 desulfated *Undaria pinnatifida* fucoidan (Fr-3)의 TIC chromatogram을 나타낸 그림이며, Fig. 3은 대표적으로 1,3,5-tri-O-acetyl-(1-deutrio)-2,3,4-tri-O-methyl-galactitol의 mass fragment를 나타낸 그림이다. 전 시료 모두 2,3,4-tri-O-methyl-galactose, 2,4-di-O-methyl-fucose, 2,4,6-tri-O-methyl-galactose의 순으로 함량이 높았고, 시료간의 partially methylated alditol acetate의 함량이 대체로 유사한 경향을 나타내었다. 즉, pronase 및 laminase 처리에 의한 fucoidan의 주요 구성당 결합 구조의 변화는 없어 효소 처리에 의해 제거된 protein과 glucose가 fucoidan의 구성 성분이 아니라 단순 혼합물일 것으로 추정되었다. 또한 pronase처리 시료를 FT-IR로 분석한 결과 (Data not shown) 850 cm⁻¹ 부근의 강

Table 4. Properties of the modified *Undaria pinnatifida* fucoidans by enzyme and acid treatment

Samples	Uronic acid (%)	Sulfate (%)	Protein (%)	Total sugar (%)	Proportion of monosaccharides (%) ¹					Clotting times (sec) ²	
					Fuc	Xyl	Man	Gal	Glu	PT	APTT
Enzyme modification											
Pronase	1.9	31.2	2.4	44.9	40.8	0.4	0.5	57.8	tra	23	585
Laminase	2.0	29.6	3.4	47.1	38.7	0.5	0.5	60.3	tra	20	580
Pronase+Laminase	1.9	30.5	3.0	52.4	40.1	0.6	1.0	57.4	0.8	21	555
Acid modification											
3,000~10,000 M.W.	2.6	29.4	1.1	60.6	25.5	tra	0.6	57.9	0.9	20	459
10,000~30,000 M.W.	2.1	33.7	4.2	55.9	26.2	0.7	2.3	69.1	1.6	21	499
>50,000 M.W.	4.2	27.1	7.8	58.8	13.2	1.3	2.5	83.3	1.3	17	464

1: Calculated from G.C analysis, considering the total amounts under the five monosaccharides as 100%

2: Fucoidan concentration (200 µg/mL)

Table 5. Partially methylated alditol acetate from enzymatically modified *Undaria pinnatifida* fucoidans

Partially methylated alditol acetate	Mole %					
	Fr-3-D ¹	Fr-3-D/R ²	Pronase modified Fr-3-D	Pronase modified Fr-3-D/R	Laminase modified Fr-3-D	Laminase modified Fr-3-D/R
2,3,4-Fuc	4.3	3.8	4.7	—	4.3	3.2
2,4-Fuc	20.0	17.3	21.9	9.6	21.7	19.2
2-Fuc	4.5	4.7	5.0	10.5	6.2	5.6
4-Fuc	2.6	4.1	2.7	—	2.7	3.4
2,3,4,6-Gal	14.0	13.4	13.7	14.9	13.1	13.1
2,4,6-Gal	8.1	7.5	8.8	6.7	8.8	8.0
2,3,6-Gal	0.9	0.8	1.0	2.3	1.1	0.8
2,3,4-Gal	38.5	40.5	35.4	47.3	35.1	38.9
2,3-Gal	7.1	7.9	6.9	8.6	7.0	7.7

1: Desulfated *Undaria pinnatifida* fraction (Fr-3)

2: Desulfated and reduced *Undaria pinnatifida* fraction (Fr-3)

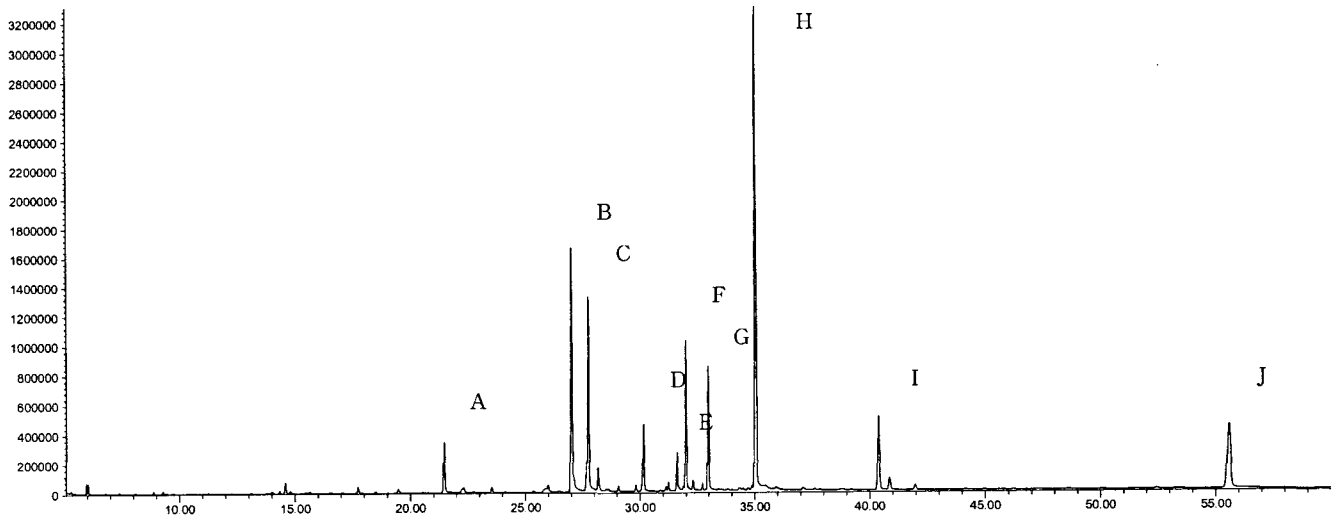


Fig. 2. Separation of partially methylated alditol acetates derived from desulfated *Undaria pinnatifida* fucoidan (Fr-3).

- A: 1,5-di-*O*-acetyl-(1-deuterio)-2,3,4-tri-*O*-methyl-fucitol, B: 1,3,5-tri-*O*-acetyl-(1-deuterio)-2,4-di-*O*-methyl-fucitol,
 C: 1,5-di-*O*-acetyl-(1-deuterio)-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-galacitol, D: 1,3,4,5-tetra-*O*-acetyl-(1-deuterio)-2-*O*-methyl-fucitol,
 E: 1,2,3,5-tetra-*O*-acetyl-(1-deuterio)-4-*O*-methyl-fucitol, F: 1,3,5-tri-*O*-acetyl-(1-deuterio)-2,4,6-tri-*O*-methyl-galacitol,
 G: 1,4,5-tri-*O*-acetyl-(1-deuterio)-2,3,6-tri-*O*-methyl-galacitol, H: 1,5,6-tri-*O*-acetyl-(1-deuterio)-2,3,4-tri-*O*-methyl-galacitol,
 I: 1,4,5,6-tetra-*O*-acetyl-(1-deuterio)-2,3-di-*O*-methyl-galacitol, J: *myo*-inositol hexaacetate.

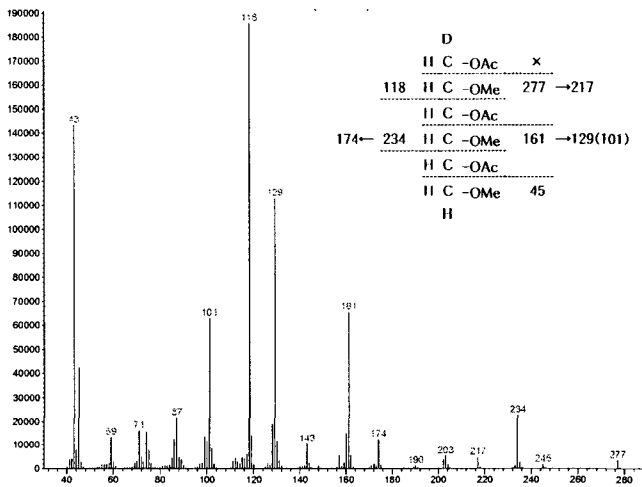


Fig. 3. Mass spectrum of 1,3,5-tri-*O*-acetyl-(1-deuterio)-2,4,6-tri-*O*-methyl-galacitol.

한 흡수 band로 미루어 볼 때 황산기의 대부분은 C-4 위치에 결합되어 있음을 알 수 있었다. 따라서, 본 효소 수식 fucoidan의 기본 구조는 Koo (1997)와 같이 (1→3)linked fucose와 (1→3)linked galactose에 C-4 위치에 황산기가 결합되어 있을 것으로 추정되나 전 시료 모두에서 다량 검출되는 2,3,4-tri-*O*-methyl-galactose는 desulfation 과정에서 과분해되어 생성된 것인지 (1→6)linked galactose인지 여부는 보다 정밀한 연구가 요구된다.

요 약

국내 연안에서 생산되고 있는 갈조류인 미역포자엽, 다시마, 툇, 모

자반을 묶은 염산 (pH 2.0)으로 65°C에서 추출한 crude fucoidan을 CPC처리하여 침전시킨 후 CaCl₂ 농도 (1.0 M, 1.5 M, 3.0 M)를 증가시키면서 분획하였다. APTT 활성으로 비교한 결과 분획물의 항 혈액응고 활성은 황산기의 함량이 증가할수록 증가하였으며, 분획물 시료중 미역포자엽을 3.0 M CaCl₂로 분획한 것이 가장 활성이 우수하였다. 이 획분을 다시 pronase와 laminase로 수식한 결과 각각 단백질과 glucose가 감소하였으나 수식 전에 비하여 APTT 활성이 증가하였다. Pronase와 laminase로 수식한 fucoidan의 fucose:galactose:mannose:sulfate:uronic acid의 mole%는 1:1.3:0.03:2.7:0.08이었으며, 효소 처리에 따른 미역 포자엽의 주 결합구조는 변화가 없었다.

감사의 글

이 논문은 1998년 한국학술진흥재단의 학술 연구비에 의하여 지원되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

Abdel-Fattah, A.F., M.M.D. Hussein and H.M. Salem. 1974. Some structural feature of sagassan, a sulphated heteropolysaccharide from *Sargassum linifolium*. Carbohydrate Research, 33, 19~24.
 Abdel-Fattah, A.F., M.M.D. Hussein and S.T. Fouad. 1978. Carbohydrates of the brown seaweed *Dictyota Dichothoma*. Phytochemistry, 17, 741~743.
 AOAC. 1990. "Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, 15th Edition", Edited by Kenneth Helrich, associaton of official analytical chemists, virginia, U.S.A.

- Bernardi, G. and G.F. Springer. 1962. Properties of highly purified fucan. *J. Biol. Chem.*, 237, 75~80.
- Church, F.C., J.B. Meade, R.E. Treanor and H.C. Whinna. 1989. Anti-thrombin activity of fucoidan. *J. Biol. Chem.*, 264, 3618~3623.
- Collic, S., A.M. Fischer, J. Tapon-Breaudiere, C. Boisson, P. Durand and J. Jozefonvicz. 1991. Anticoagulant of a fucoiden fraction. *Thrombosis Research*, 64, 143~154.
- Dobashi, K., T. Nishino, M. Fujihara and T. Nagumo. 1989. Isolation and preliminary characterization of fucose-containing sulfated polysaccharides with blood-anticoagulant activity from the brown seaweed *Hizikia fusiforme*. *Carbohydr. Res.*, 194, 315~320.
- Dogson, K.S. and R.G. Price. 1962. A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochem. J.*, 84, 106~110.
- Furneaux, R.H., I.J. Miller and T.T. Stevenson. 1990. Agaroid from New Zealand members of the Gracilariaceae (*Gracilariales Rhodophyta*)- a novel dimethylated agar. *Hydrobiologia*, 204/205, 645~654.
- Harris, P.J., R.J. Henny, A.B. Blakeney and B.A. Stone. 1984. An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides. *Carbohydr. Res.*, 127, 59~73.
- Inoue, Y. and K. Nagasawa. 1976. Selective N-desulfation of heparin with dimethyl sulfoxide containing water or methanol. *Carbohydrate Res.*, 45, 87~95.
- Knutson, C.A. and A. Jeanes. 1968. A New modification of the carbazole Analysis. *Anal. Biochem.*, 24, 470~481.
- Kvernheim, A.L. 1987. Methylation analysis of polysaccharides with butyllithium in dimethyl sulfoxide. *Acta. Chem. Scand. Ser. B*, 41, 150~155.
- Koo, J.G., K.S. Jo, J.R. Do and S.J. Woo. 1995. Isolation and purification of fucoidan from *Laminaria religiosa* and *Undaria pinnatifida* in Korea. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 28, 227~236 (in Korean).
- Koo, J.G. 1997. Structural characterization of purified fucoidan from *Laminaria religiosa*, Sporophylls of *Undaria pinnatifida*, *Hizikia fusiforme* and *Sargassum fulvellum* in Korea. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 30, 128~131 (in Korean).
- Larsen, B., A. Haug and T. Painter. 1970. Sulphated polysaccharides in brown Algae 3. The native state of fucoidan in *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. *Acta. chemica scandinavica*, 24, 3339~3352.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265~275.
- Mori, H., H. Kamei, H. Nishide and K. Nisizawa. 1982. Sugar constituents of some sulfated polysaccharides from the sporophylls of Wakkame (*Undaria pinnatifida*) and their biological activities. *Proc. 10th Intern. Seaweed Symp.*, 10, 109~121.
- Nagasawa, K., Y. Inoue and T. Kamata. 1977. Solvolytic desulfation of glycosaminoglycuronan sulfate with dimethyl sulfoxide containing water of methanol. *Carbohydrate Res.*, 58, 47~55.
- Nishino, T. and T. Nagumo. 1987. Sugar constituents and blood-anti coagulant activities of fucose-containing sulfated polysaccharides in nine brown seaweed species. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 61, 361~363.
- Nishino, T. and T. Nagumo. 1991. The sulfate-content dependence of the anticoagulant activity of fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia Kurome*. *Carbohydrate Research*, 314, 193~197.
- Sweet, D.P., R.H. Shapiro and P. Albersheim. 1975. Quantitative analysis by various G.L.C. response-factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates. *Carbohydrate Research*, 40, 217~225.
- Tayer, R.T. and H.E. Conrad. 1972. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl Groups. *Biochemistry*, 11, 1383~1388.
- Usui, T., K. Asari and T. Mizuno. 1980. Isolation of highly fucoidan from *Eisenia bicyclis* and its anticoagulant and antitumor activities. *Agric. Biol. Chem.*, 44, 1965~1966.
- York, W.S., A.G. Mac, M. Neil, T.T. Strevenson and P. Albersheim. 1985. Isolation and characterization of plant cell walls and cell wall components. *Methods in Enzymology*, 118, 3~40.

2001년 5월 29일 접수

2001년 9월 15일 수리