

## 구름버섯 알칼리 추출물에서 분리한 항응고성 다당류

이현순 · 권미향 · 임왕진 · 성하진\* · 양한철\*

고려대학교 생물공학연구소, \*고려대학교 생명공학원

### An Anticoagulant Polysaccharide Isolated from the Alkali Extracts of *Coriolus versicolor*

Hyun-Sun Lee, Mee-Hyang Kweon, Wang-Jin Lim, Ha-Chin Sung\*, Han-Chul Yang\*

Institute of Biotechnology, Korea University

\*Graduate School of Biotechnology, Korea University

#### Abstract

We have isolated an anticoagulant polysaccharide from the alkali extracts of *Coriolus versicolor*. The anticoagulant polysaccharide was purified through a gradual ethanol precipitation and three consecutive chromatography of DEAE-Toyopearl 650C, Sephadex G-100, and Sepharose CL-6B by measuring activated partial thromboplastin time (aPTT). The anticoagulant polysaccharide showed the homogeneity on HPLC using a gel permeation column and had about  $7.2 \times 10^5$  molecular weight. The polysaccharide consisted of fucose, glucose, and galactose in a molar ratio of 1.0:0.2:0.2:0.1, and also comprised 19.32% of sulfate at its constituent sugars. The polysaccharide showed the two typical bands of C-O-S ( $823 \text{ cm}^{-1}$ ) and S=O ( $1257 \text{ cm}^{-1}$ ) in the IR spectroscopy. The sulfated polysaccharide (CV-40-Va-1) inhibited the blood coagulation via the intrinsic pathway like heparin whose activity produced a concentration dependent effect in aPTT and thrombin time (TT).

Key words: anticoagulant, polysaccharide, *Coriolus versicolor*

#### 서 론

혈전 생성은 혈류부전, 혈관상해, 고혈압, 지질침착 등의 원인으로 혈관내에서 유발되어 혈장응고계, 혈소판, 혈관 내피 세포 및 허부 결체조직, fibrin 용해계의 총괄적이고도 복잡한 생화학적 반응을 통해 일어나며 생성된 혈전은 정맥 및 동맥에서 혈관의 순환을 방해하여 조직으로의 영양공급 및 산소공급을 차단함으로써 뇌출혈, 뇌혈전, 심부전, 심근경색, 동맥경화 등의 중대한 성인병을 일으킨다<sup>(1)</sup>. 혈액응고는 혈전의 주성분인 불용성 섬유소를 형성하는 과정으로 12단계 이상의 단백질분해과정이 cascade식으로 일어나는 복잡한 생화학반응이다<sup>(2)</sup>. 혈액응고인자의 활성화에 따라 내인성경로와 외인성경로로 생성된 factor Xa가 프로트롬빈을 트롬빈으로 전환시키고 트롬빈은 피브리노겐에 작용하여 피브린을 형성시켜 불용성의 피브린 폴리머로 전환시킴으로써 혈액응고가 일어난다<sup>(3)</sup>. 따

라서 혈관계 질환을 유도하는 혈전생성을 방지하는 항응고성물질(anticoagulant)에 관한 연구가 진행되어 왔는데, 현재까지 알려진 항응고제로서는 소의 심장이나 돼지의 소장에서 추출한 heparin<sup>(4,5)</sup>, 거머리에서 분리한 hirudin<sup>(6,7)</sup>, 유기 합성 제재인 coumarin<sup>(8)</sup>과 warfarin<sup>(9)</sup> 등이 있다. 이들 중 현재 임상적으로 널리 사용되고 있는 헤파린은 주로 내인성경로에 작용하여 강력한 항응고활성을 보이거나 정맥주사로만 사용될 수 있고, 반감기가 짧고, 주사시 출혈을 유발하는 부작용을 갖고 있다<sup>(10)</sup>.

따라서 이런 단점을 보완할 수 있는 새로운 항응고제에 대한 연구가 최근 활발히 진행되고 있다. 특히 해조류의 한 종류인 갈조류에 대한 연구가 많이 진행되었는데 예를 들어, *Sargassum linifolium*<sup>(11)</sup>, *Colpomenia sinuosa*<sup>(12)</sup>, *Padina pavonia*<sup>(13)</sup>, *Dictyota dichomia*<sup>(14)</sup>, *Ecklonia kurome*<sup>(15)</sup>, *Laminaria angustata* 등<sup>(16)</sup>의 갈조류에서 분리한 다당인 fucoidan들의 항응고 활성을 검토하였으며 그 외에도 dextran, alginic acid, cellulose, xylan, chitosan, locust bean gum, guar gum 등의 다당류에서도 항응고 활성에 대한 다수의 연구

Corresponding author: Han-Chul Yang, Graduate School of Biotechnology, Korea University, 1 Anam-dong, Sungbuk-gu, Seoul 136-701, Korea

가 행해지기도 하였다<sup>(17)</sup>.

저자들은 최근들어 항암활성<sup>(18)</sup>과 더불어 다양한 생체조절기능 성분<sup>(19)</sup>이 보고되고 있는 식용버섯으로부터 혈액응고 저해물질을 탐색하여 새로운 항혈전제제를 위한 소재화연구의 일환으로 버섯 자실체 및 균사체 추출물들의 항응고활성을 검색하였다<sup>(24)</sup>. 본 연구에서는 검색과정에서 우수한 활성을 나타낸 구름버섯 (*Coriolus versicolor*) 자실체로부터 항응고 활성 물질을 분리, 정제하였으며 이 물질의 화학적 특성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료 및 시약

본 실험에 사용한 한국산 구름버섯의 자실체는 경동시장에서 구입하였으며, 항응고 활성 측정시 이용되는 혈장(platelet pool plasma)은 고려대학교 부속병원에서 구입하여 사용하였으며 Dade<sup>®</sup> Actin<sup>®</sup> Activated Cephaloplastin Reagent, Dade<sup>®</sup> Thromboplastin C Plus, Dade<sup>®</sup> Data-Fi<sup>®</sup> Thrombin reagent (bovine)은 Dade사(USA) 제품을 사용하였다.

### 일반 성분 분석 및 구성당 분석

총당 함량은 glucose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법<sup>(22)</sup>으로, 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 Lowry법<sup>(23)</sup>으로 정량하였으며, 황산기 함량은 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 표준물질로하여 Dodgson의 방법을 변형하여 실시하였다. 구성당 분석은 Jones 등의 방법에 따라 중성당을 alditol acetate 유도체로 전환시켜 gas liquid chromatography (GLC)로 분석하였고 GLC의 분석조건은 3% OV-225 chromosorb WHP 100/120의 packed column이 장착된 Shimadzu GC-14A/FID/Shimadzu GC-R6A chromopac (column temp. 225°C, inject temp. 250°C, detect temp. 250°C)에서 실시하여 표준 구성당들과 retention time을 비교하여 시료 중의 구성당을 분석하였다. 구성당의 molar ratio는 각 peak들의 면적비와 구성당들의 alditol acetate 유도체의 분자량으로부터 계산하였다.

### 항응고 활성 측정

Activated partial thromboplastin time (aPTT): 시료를 함유한 100 μL의 혈장(platelet pool plasma)을 aPTT 진단시약 100 μL와 혼합한 후 37°C에서 3분간 예열한 다음 37°C에서 미리 예열된 20 mM CaCl<sub>2</sub> 100 μL를 가한 후 blood coagulation analyzer (BC 2210, (주)京都

第一科學, Japan)를 사용하여 응고가 될 때까지의 시간을 기록하였으며 대조구는 순수한 혈장 100 μL를 이용하여 응고시간을 측정하였다<sup>(7)</sup>.

Prothrombin time (PT): 시료를 함유한 100 μL의 혈장을 37°C에서 3분간 예열한 다음, 37°C에서 미리 예열된 prothrombin time 진단시약을 100 μL 가한 후 blood coagulation analyzer를 사용하여 응고가 될 때까지의 시간을 기록하였다<sup>(7)</sup>.

Thrombin time (TT): 시료를 함유한 100 μL의 혈장을 37°C에서 3분간 예열한 다음, 37°C에서 미리 예열된 thrombin time 진단시약 100 μL 가한 후 blood coagulation analyzer를 사용하여 응고가 될 때까지의 시간을 기록하였다<sup>(7)</sup>.

IC<sub>50</sub>: 정제 과정의 시료를 각각의 농도에서 항응고 활성을 aPTT법으로 측정한 후 상관 관계를 이용하여 혈액 응고를 50% 저해하는데 필요한 시료의 농도를 계산하였다.

### 추출용매 및 추출시간에 따른 항응고 활성 검토

분쇄한 구름버섯 2 g에 hot water (97°C), cold water (4°C), methanol (70°C), ethanol (70°C), acetone (50°C), hexane (50°C), 0.1 N NaOH (60°C) 및 0.1 N HCl (60°C)을 150 mL씩을 가해 2시간 혹은 시간별로 환류 추출하여(산 또는 알칼리 추출물의 경우 중화) 원심분리(6,500 rpm, 20분)한 후, 유기용매 추출물의 상등액은 감압건조하고 그 외 추출물의 상등액은 투석, 동결 건조하여 aPTT 법으로 항응고 활성을 측정하였다.

### 항응고성 다당의 추출 및 정제

분쇄한 구름버섯 420 g을 95~97°C에서 4시간 동안 0.1 N NaOH 용액으로 환류 추출한 후 Scheme 1과 같이 ethanol 농도별 침전을 실시하여 5개의획분으로 분획하였다. 이 중에서 활성이 가장 높았던 CV-40을 DEAE-Toyopearl 650C column (Cl form, 3.5×28.5 cm)에 흡착시킨 후 증류수로 세척하고 NaCl 농도를 증가시키면서 8개의 흡착획분 (CV-40-II→VIII)을 얻었다. 이 중 0.8 M NaCl에서 용출된 CV-40-V획분 (30 mg)을 0.2 M NaCl용액으로 평형화된 Sephadex G-100 column (3.0×82 cm)을 이용하여 0.12 mL/min의 유속으로 겔여과 크로마토그래피를 행하여 3개의 획분(CV-40-Va→c)을 얻었다. 이 중 주요 항응고 활성 획분 CV-40-Va (30 mg)를 0.2 M NaCl로 평형화된 Sepharose CL-6B column (2.4×89 cm)에서 0.2 mL/min의 유속으로 겔여과 크로마토그래피를 행하여 항응고활성 정제다당CV-40-Va-I을 분리하였다. 이 때

모든 정제과정은 4°C에서 실시하였다.

**정제다당의 순도 및 분자량 측정**

Sephrose CL-6B column에 의해서 단일 peak로 분리된 CV-40-Va-I획분의 순도를 확인하기 위하여 HPLC (SAMSUNG SLC-2000/RI/Shodex ionpack S-804)를 1 mL/min의 유속으로 실시하였으며, 정제다당의 분자량은 Dextran T-2000 (M.W.  $2 \times 10^6$ ), T-500 (M.W.  $5 \times 10^5$ ), T-70 (M.W.  $7 \times 10^4$ ), T-40 (M.W.  $4 \times 10^4$ ), T-10 (M.W.  $1 \times 10^4$ ), 그리고 glucose를 표준물질로 사용하여 Sepharose CL-6B (2.4×89 cm)에서 구한 표준곡선과 Kav값을 비교하여 측정하였다.

**Infrared spectroscopy**

정제된 시료 (CV-40-Va-1)와 임상적으로 사용되는 항응고성 다당인 heparin 1 mg씩을 KBr 200 mg (200

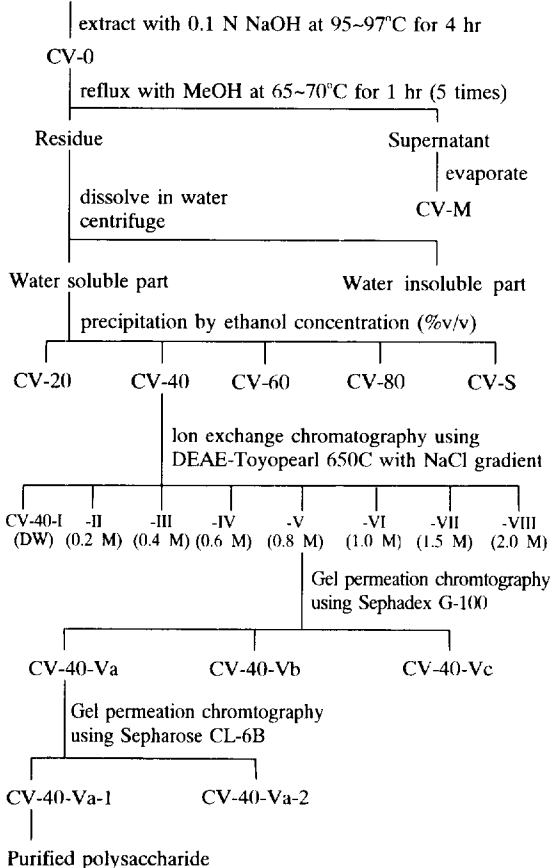
mesh)과 혼합하여 KBr pellet를 만들어 FT-IR spectrophotometer (BOMEM Michelson series MB 102-C15)를 사용하여 transmittance를 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**구름버섯(Coriolus versicolor)으로부터 항응고 활성 물질의 추출**

버섯 자실체 및 균사체 추출물들의 항응고활성을 검색과정<sup>(24)</sup>에서 높은 활성을 나타낸 구름버섯(Coriolus versicolor)으로부터 항응고 활성 물질을 분리하기 위하여 추출 용매에 따른 항응고 활성을 비교하였다. Table 1의 결과에서, 1 mg/mL의 농도에서 추출물들의 항응고활성은 0.1 N NaOH>0.1 N HCl>냉수>열수>유기용매의 순서로 산, 알칼리 추출에서 높게 나타났으며, 일반적으로 유기용매 추출이 수추출보다 낮게 나타났다. 추출 용매중 활성과 수율이 높았던 0.1 N NaOH 용액으로 시간을 달리하여 추출한 결과(Table 2) 0.1 N NaOH 추출물은 6시간 추출물이 수율 13.5%로 약간 높았으나 시간에 의한 수율의 변화는 거의 없었다. 항응고 활성은 추출 4시간이 123.6초로 대조구에 비해 3.53배의 가장 높은 활성을 보인 후 점차 감소하여 추출 8시간의 경우 1.66배의 낮은 활성을 보였다. 이것으로 알칼리 추출시 초기에는 항응고

**Coriolus versicolor**



**Scheme 1. Separation and purification procedure of blood anticoagulant polysaccharide from *Coriolus versicolor*.**

**Table 1. Comparison of anticoagulant activities among the different solvent extracts from *Coriolus versicolor***

Solvent	Extraction time (hr)	Yield (%)	Clotting time (sec)
Hot water	2	18.4	40.6
Cold water	24	10.4	42.4
Methanol	2	2.4	33.4
Ethanol	2	4.4	30.7
Aceton	2	3.7	26.3
Hexane	2	1.2	26.3
0.1 N HCl	2	10.7	62.1
0.1 N NaOH	2	11.4	72.1

**Table 2. Effect of alkali extraction time on anticoagulant activity**

Solvent	Extraction time (hr)	Yield (%)	Clotting time (sec) <sup>1)</sup>
0.1 N NaOH	2	11.4	72.1
	4	13.4	123.6
	6	13.5	73.9
	8	13.4	64.1

<sup>1)</sup>Anticoagulant activity of each sample (1,000 Mg/mL) was examined though the activated partial thromboplastin time (aPTT) and the control time was 35 sec.

물질의 추출율이 높으나 일정 시간 이후부터는 활성 물질이 알칼리에 의해 분해되면서 활성이 낮아지는 것으로 추정되었다. Table 1, 2의 결과에서 0.1 N NaOH 용액으로 4시간 추출시 가장 항응고 활성이 높았으므로 분쇄한 구름버섯(*Coriolus versicolor*) 자체 420 g을 0.1 N NaOH 용액에서 4시간동안 환류추출하였으며, 추출액을 증화, 투석, 및 동결건조하여 추출획분 CV-0 (49.79 g)를 얻었다(Scheme 1).

항응고성 다당류의 정제

구름버섯 알칼리 추출물인 CV-0 (43.79 g)를 항응고 활성이 낮았던 methanol 가용부(CV-M, 1.74 g)와 물에 불용성인 부분(3.90 g)을 제거후 얻어진 활성획분을 ethanol 농도별 침전(% v/v)을 실시하여 5개의 획분(CV-20,-40,-60,-80,-E)으로 분획하였다. 이 들 획분을 500 µg/mL의 농도에서 aPTT, PT, TT의 항응고활성을 측정한 결과 ethanol 농도 21~40%에서 침전한 획분인 CV-40이 가장 높은 활성을 보였다(Fig. 1). 주로 당과 단백질로 구성된 CV-40획분을 다당의 선택적 산화제인 periodate로 산화시켰을 때 활성이 급격히 감소하는 것으로 보아(결과생략) 항응고활성 물질은 다당성분으로 추정할 수 있었다. 따라서 CV-40 획분을 DEAE-Toyopaerl 650C (Cl form)를 이용하여 NaCl 농도증가 이온교환 크로마토그래피를 실시한 결과 0.8 M NaCl에서 용출된 CV-40-V 획분의 항응고 활성이 가장 높았다. 이 획분을 Sephadex G-100 column을 이용하여 분자량별로 3개의 획분으로 나눈 결과 활성이

가장 높은 void volume부분의 CV-40-Va 획분을 Sepharose CL-6B에 용출 시킨 후 2개의 획분 (CV-40-

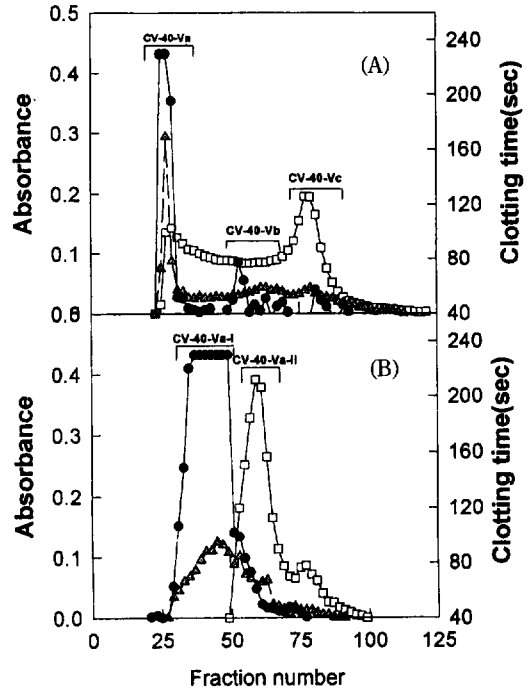


Fig. 2. Purification of the anticoagulant using Sephadex G-100(A) and Sepharose CL-6B(B). □—□: Protein (280 nm), ▲—▲: Total sugar (490 nm), ●—●: Anticoagulant activity.

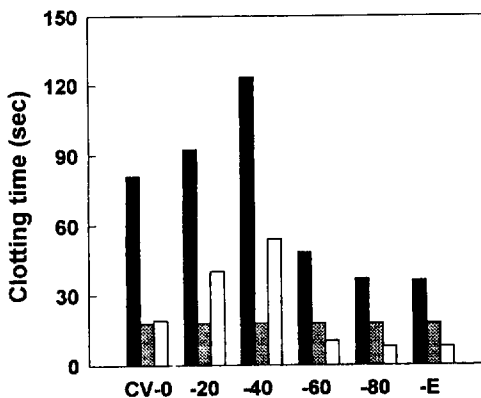


Fig. 1. Anticoagulant activities of the precipitates by stepwise ethanol addition from *Coriolus versicolor*. ■: Activated partial thromboplastin time, ▒: Prothrombin time, □: Thrombin time. Each fraction was assayed at a concentration of 500 µg/mL for the anticoagulant activities including aPTT, PT, and TT. The respective control time was 35 sec, 18 sec, and 8 sec.

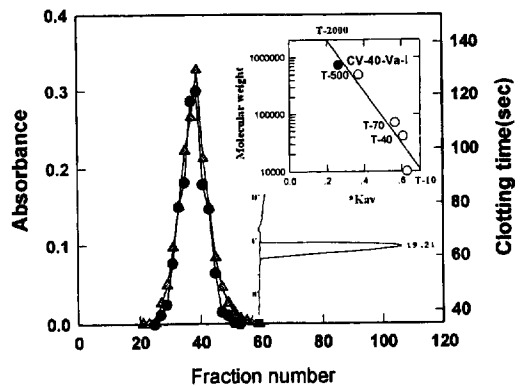
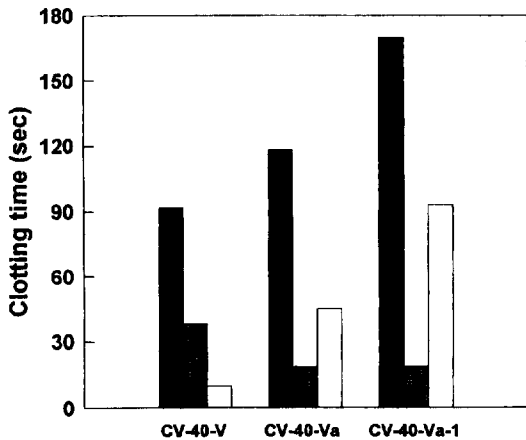


Fig. 3. GPC, HPLC profile, and molecular weight of anticoagulant CV-40-Va-1. ▲—▲: Total sugar (490 nm), ●—●: Anticoagulant activity. \*Kav=Ve-Vo/Vt-Vo, Vo: void volume, Vt: total volume, Ve: elution volume. The column (2.4×89 cm) of Sepharose CL-6B was eluted with 0.2 M NaCl. T-2000, T-500 T-70, and T-40 are standard dextrans of 2×10<sup>6</sup>, 5×10<sup>5</sup>, 7×10<sup>4</sup>, and 4×10<sup>4</sup> molecular weights, respectively.

Va-1, -2)으로 분획하였다(Fig. 2). 이 중 단백질이 함유되지 않은 CV-40-Va-1 에서항응고활성이 높았으며 이 획분을 Sepharose CL-6B에 재분획한 결과 좌우가 대칭인 단일 피크로 확인되었다(Fig. 3). Fig. 4에서는 각 정제단계에서의 주요 활성획분간의 항응고활성을 비교하였다. 정제가 진행될수록 aPTT와 TT의 활성은 점차 증가하지만 PT활성의 경우 오히려 감소하는 경향을 보여 구름버섯중의 항응고활성 물질이 혈액응고계에서 주로 내인성경로를 통하여 작용함을 추정할 수 있었다. CV-40-Va-I 획분을 겔여과 컬럼을 사용한 HPLC를 행한 결과 단일 피크로 나타나 거의 순수하



**Fig. 4.** Comparison of anticoagulant activities in the major fractions separated by ion exchange and gel permeation chromatographies. ■: Activated partial thromboplastin time, ▒: Prothrombin time, □: Thrombin time. Each fraction was assayed at a concentration of 500 µg/mL for the anticoagulant activities including aPTT, PT, and TT. The respective control time was 35 sec, 18 sec, and 8 sec.

게 정제되었음을 확인하였으며, Sepharose CL-6B column을 이용하여 분자량을 표준 dextran과 비교한 결과 분자량은 약  $7.2 \times 10^5$ 로 측정되었다 (Fig 3).

**구름버섯으로부터 분리 정제한 항응고성 다당의 화학적 특성**

구름버섯을 0.1 N NaOH 용액으로 추출하여 항응고성 다당을 분석한 결과, 최종 정제된 항응고성 정제다당(CV-40-Va-I)의 수율은 0.02%였으며 항응고 활성은 CV-0의 IC<sub>50</sub>이 590.76 µg/mL이었으나 최종 정제된 CV-40-Va-I은 약 4.8배 증가한 116.24 µg/mL이었다 (Table 3). 이것은 heparin 1.056 unit/mg에 해당하는 항응고활성으로서 Takashi 등이 보고한<sup>(10)</sup> *Laminaria angustata* var. *longissima*에서 추출한 β-D-galactan sulfate의 항응고 활성보다 다소 낮은 활성을 나타내었다. CV-40-Va-I은 단백질이 거의 함유되지 않았으나 구성당 잔기에 19.32%의 황산기를 함유하는 황함성다당으로 확인되었으며, 구성당으로서 fucose:mannose:glucose:galactose가 1.00:0.22:0.20:0.11의 몰 비율로 함유되어 있었다(Table 3).

**혈액응고계에서의 활성 경로 검색**

구름버섯에서 정제한 항응고성 다당(CV-40-Va-I)을 농도를 달리하여 aPTT, PT, TT를 측정하고 대조군에 대하여 상대활성(%)으로 나타낸 결과(Fig. 5), TT와 aPTT의 활성은 농도에 따라 증가하나 PT는 증가하지 않는 것으로 보아 CV-40-Va-I은 heparin 계통의 항응고 물질처럼<sup>(10)</sup> 외인성 경로가 아닌 내인성 경로와 공통경로에 작용하여 항응고 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 항응고 활성은 50 µg/mL의 농도에서는 aPTT와 TT 모두 활성은 낮으나 TT의 경우 50 µg/mL이후

**Table 3.** Purification outline of the anticoagulant polysaccharide from *Coriolus versicolor*

Fraction	CV-0	CV-40	CV-40-V	CV-40-Va	CV-40-Va-I
IC <sub>50</sub> (µg/mL)	590.76	337.64	179.71	166.70	116.24
Yield (%)	13.40	1.83	0.17	0.04	0.02
Sulfate (%)	5.22	13.40	18.92	19.24	19.32
Protein (%)	50.25	56.50	60.24	16.74	trace
Total sugar (%)	33.76	30.67	29.10	69.52	99.46
Uronic acid (%)	10.42	9.47	3.43	3.44	trace <sup>1)</sup>
<b>Sugar composition (molar ratio)</b>					
Fucose	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Arabinose	0.24	0.15	trace <sup>1)</sup>	0.11	trace
Xylose	0.44	0.55	0.17	0.17	trace
Mannose	0.92	1.10	0.26	0.28	0.22
Galactose	0.52	0.37	0.24	0.99	0.11
Glucose	8.03	3.88	1.55	1.63	0.20

<sup>1)</sup>Detected less than 0.05.

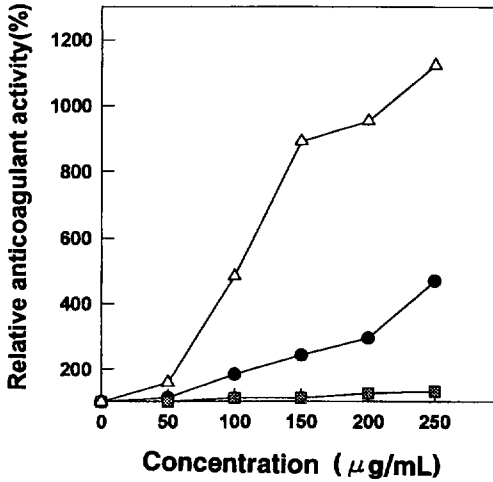


Fig. 5. Dose-response anticoagulant activity of CV-40-Va-1. ●—●: Activated partial thromboplastin time (aPTT), ■—■: Prothrombin time (PT), △—△: Thrombin time (TT). Relative anticoagulant activity means % activity against the control clotting time.

급격히 증가하였고 aPTT는 200 µg/mL의 이후 급격히 증가하는 것으로 보아 heparin처럼 농도 의존성이 큼을 알 수 있었으며 또한 TT가 급격히 증가하는 것으로 보아 thrombin에 의해 fibrinogen으로부터 fibrin이 형성되는 응고의 제 3단계가 강력하게 활성 저해 받음을 알 수 있었다.

#### Infrared spectroscopy

Heparin은 antithrombin III과 결합함으로써 antithrombin III의 항응고 활성을 증폭시켜 항응고 활성을 나타내는데 이 두 물질 사이의 결합 부위는 명확히 밝혀지지 않았으나 heparin의 negative charge 즉 황산기와 antithrombin III의 Lys/Arg 잔기 사이에서의 정전기적 상호결합(electrostatic interaction)이라고 보고되고 있다<sup>(5)</sup>. 따라서 heparin 계통의 항응고성 물질에 있어서 황산기는 필수적인 부분이다. 구름버섯의 항응고성 정제다당의 항응고 양식이 heparin과 유사하였으므로 CV-40-Va-1을 heparin과 함께 IR을 이용하여 황산기를 확인하였다(Fig. 6). CV-40-Va-1의 경우 1257과 857 cm<sup>-1</sup> 부근에 강한 흡수 band가 나타났는데 이는 각각 S=O와 C-O-S 결합의 황산기가 존재함을 알 수 있었다<sup>(21)</sup>. 특히 857 cm<sup>-1</sup>은 C-O-S가 axia 1 position에 결합되어 있음을 나타낸다. 또한 822 cm<sup>-1</sup> 부근에서의 흡수 band가 857 cm<sup>-1</sup> 흡수 band의 어깨에 약하게 나타났는데 이는 일부 황산기는 equatorial position에 결합되어 있음을 알 수 있었다. 따라서 heparin의 경우

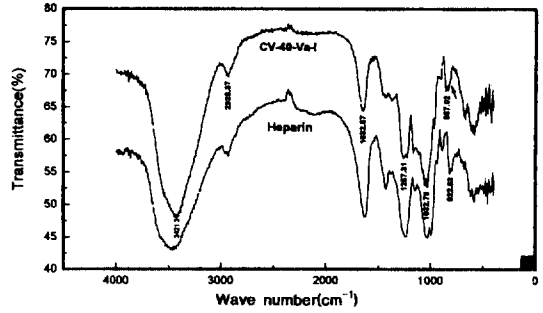


Fig. 6. IR spectra of anticoagulant CV-40-Va-1 and heparin.

대부분의 황산기가 822 cm<sup>-1</sup> 부근인 C-2 위치에 결합되어 있는 반면<sup>(10)</sup> 구름버섯에서 추출한 항응고성 다당의 경우 황산기의 대부분은 C-4 위치에 결합되어 있고 일부 황산기만이 C-2 위치에 결합되어 있는 것으로 사료되었다. 그러나 정제다당의 정확한 작용기작을 해명하기 위해서는 desulfation 등의 구조수식과 다당의 당쇄결합 분석 등 구조와 활성간의 관계를 조사하는 진전된 연구가 필요할 것이다.

#### 요 약

식용버섯으로부터 항혈전제 개발의 소재화연구로 항응고활성의 검색과정에서 높은 활성을 보였던 구름버섯에서 항응고성 다당류를 정제하여 정제다당의 화학적특성을 검토하였다. 정제는 구름버섯의 알칼리 추출물(CV-0)을 메탄올환류, 에탄올침전 후 3개의 연속적인 DEAE-Toyopearl 650C 이온교환, Sepadex G-100 및 Sepharose CL-6B 겔여과 크로마토그래피와 HPLC에 의하여 실시하였으며 정제다당 CV-40-Va-1의 분자량은 7.2×10<sup>5</sup>으로 측정되었다. CV-40-Va-1은 구성당 잔기에 19.32%의 황산기를 함유하는 함황성다당으로서 구성당조성은 fucose:mannose:glucose:galactose가 1.00:0.22:0.20:0.11의 물 비율로 존재하였다. CV-40-Va-1의 항응고활성은 농도 의존성을 보였으며 특히 내인성경로를 통하여 혈액응고를 저해하는 것으로 확인되었다.

#### 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청에서 시행한 '95년도 농업특정연구개발사업의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 문헌

1. 김용택 : 청국장에서 분리한 *Bacillus sp.*가 생산하는 혈전용해소의 특성에 관한 연구, 세종대학교 박사학위 논문, 서울 (1995)
2. Craog, M.J.: Blood coagulation. *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 765 (1980)
3. Kennrth, G., Mann, R.J.J. and Krishnaswamy, S.: Cofactor proteins the assembly and expression of blood clotting enzyme complexes. *Ann. Rev. Biochem.*, **57**, 915 (1988)
4. Richard, L. and Mueller, M.D.: History of drudgs for thrombotic disease. *Heparin Circulation*, **89**, 432 (1994)
5. Jack, H. and Valentin, F.: Guide to anticoagulation therapy part I. *Heparin Circulation*, **89**, 520 (1994)
6. 이상권, 손정훈, 최의성, 이상기 : 한국산 거머리로부터 항혈전단백질의 검색과 분리 정제, *한국생화학회지*, **26**, 3 (1993)
7. Irving, F., Adrian, D., Peter, L., Jane, E., Kathleen, F., Elizabeth, L., Don, H., Tim, M. and John, M.: Anticoagulant activity of Hirulog™, a direct thrombin inhibitor, in humans. *Blood Coagul. Fibro.*, **69**, 157 (1993)
8. Reider, W.: Vitamin K antagonism of coumarin anticoagulation. *Biochem. J.*, **236**, 685(1986)
9. Dzung, T., Robert, T., Weitert, B. K., Savilla, K. J. and Samnel, I. R.: The international normalized ratio (INR) for monitoring wafarin therapy. Reliability and relation to other monitoring methods. *Ann. Inter. Med.*, **120**, 552 (1994)
10. 김영식 : 헤파린 : 구조와 활성. *생화학뉴스*, **10**, 36 (1990)
11. Abel-Fattah, A.F., Hussein, M.M.D. and Salem,S.M.: Some structural feature of saggasan, a sulphated heteropolysaccharides from *Sagasssum linifolium*, *Carbohydr. Res.*, **33**, 19 (1974)
12. Hussein, M.M.: Two new polysaccharides from *Colpomenia sinuosa*, *Phytochemistry*, **14**, 1866 (1975)
13. Hussein, M.M., Abdel-Aziz, A. and Salem, H.M.: Sulphated heteropolysaccharides from *Padina pavonia*. *Phytochemistry*, **19**, 2131 (1980)
14. Abdel-Fattah, A.F. and Fouad, S. T.: Carbohydrates of the brown seaweed *Dictyota dichotoma*. *Phytochemistry*, **17**, 741 (1978)
15. Nishino, T., Kiyohara, H., Yamada, H., and Nagumo, T.: An anticoagulant fucoidan from brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Phytochemistry*, **30**, 535 (1991)
16. Takashi, N., Yuuzou, T. and Terukazu, N.: Isolation and partial characterization of a novel  $\beta$ -D-galactan sulfate from the brown seaweed *Laminaria angustata* Var. *longissima*. *Carbohydrate Polymers*, **23**, 165 (1994)
17. Doctor, M. and Sauls, V.: Isolation and anticoagulant properties of new sulfated xylan: Comparison with heparin and a sodium pentosan polysulfa (sp-54). *Thrombosis research*, **30**, 573 (1983)
18. Hiroshi, F., Katsui, O., Masanori, I., Shigeaki, M., Mikio, M. and Yoshio Kawai: Effect of PSK, A protein bound polysaccharide from *Coriolus versicolor*, on drug-metabolizing enzyme in sarcoma-180 bearing and normal mice. *Int. J. Immunopharmac.*, **10**, 445 (1988)
19. Shu, C., John, A.B. and Siu, C.: Mushroom biology and mushroom products. The Chinese University Press, HongKong, p.59 (1993)
20. 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)
21. Gerald O.A.: The polysaccharide(volumn 1), Academic press, New York, p.172 (1985)
22. Dubios, M.K.A., Hamilton, T.K., Rebers, P.A. and Sonisth, F.: Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956)
23. 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)
24. 권미향, 임왕진, 성하진, 양한철: 식용버섯으로부터 생체조절기능성분의 탐색. *고려대학교 생물공학논문집*, **8**, 6 (1996)

---

(1997년 1월 24일 접수)