

해조류 메탄올 추출물의 Prolyl Endopeptidase, Tyrosinase 저해 및 항응고 활성 스크리닝

이현진¹, 김진희¹, 이주현¹, 김종식², 곽상태³, 이경복³,
송경식¹, 최병욱, 이봉호*

대전산업대학교 공업화학과, ¹경북대학교 농화학과,
²건양대학교 화학과, ³건양대학교 의과대학 생화학교실

Inhibitory Activities of Sea Weeds on Prolyl Endopeptidase, Tyrosinase and Coagulation

Hyun-Jin Lee¹, Jin-Hui Kim¹, Chu-Hyun Lee¹, Jong-Sik Kim², Sang Tae Kwak³,
Kyung-Bok Lee³, Kyung-Sik Song¹, Byung Wook Choi and Bong Ho Lee*

*Department of Chemical Technology, Taejon National University of Technology,
Taejon 300-717, Korea*

¹*Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Kyungpook National
University, Taegu 702-701, Korea*

²*Department of Chemistry, and ³Department of Biochemistry, College of Medicine,
Konyang University. Nonsan 320-711, Chungnam, Korea*

Abstract – About forty sea weeds were screened for their inhibitory effects against prolyl endopeptidase, tyrosinase and thrombus coagulation. Out of them, methanolic extract of *Ecklonia cava*, *Sargassum patens*, *Sargassum hemiphyllum*, *Sargassum thunbergii*, *Sargassum singgildianum*, *Hizikia fusiformis*, and *Ishige okamurae* inhibited more than 90% of prolyl endopeptidase activity at 40 ppm. *Sargassum siliquastrum* and *Ecklonia cava* exhibited 51% and 76% of inhibitory activity against tyrosinase at 40 ppm, respectively. In APTT assay system, *Sargassum singgildianum*, *Pterocladia capilacea* and *Hizikia fusiformis* delayed coagulation of thrombus about two times (210, 211, and 198% over control at ca 367 ppm, respectively) and in TT assay, *Lomentaria catenata*, *Laurencia okamurae*, and *Hizikia fusiformis* did most effectively (216, 197, and 251% at ca 367 ppm, respectively).

Key words – Sea weeds; prolyl endopeptidase; tyrosinase; anticoagulation.

의약품, 향장품, 기능성 식품 등의 개발에 관한 연구는 세계적으로 광범위하게 수행되고 있으며 이 중 특히 의약품의 경우, 기존의 화합물에 대한 유도체 합성이 유용하게 사용되어왔다. 그러나 기존에 사용되는 화합물의 수가 한정되어 있어 단순한 drug design에 의한 신규 활성물질의 개발에는 한계가 있는 것으로 평가되고 있다. 따라서 다양한 화합물에

*교신저자 : Fax 042-622-9823

대한 무작위적인 검색과 특히 천연자원에서 생리활성물질을 개발하려는 시도는 새로운 골격의 선도물질 개발이라는 측면에서 매우 중요한 부분을 차지하고 있다.¹⁾

그러나 이와 같이 다수의 천연자원으로부터 유효성분을 분리하고 이들의 구조를 규명함과 동시에 생물활성에 대한 고찰을 하는 일련의 연구를 효과적으로 수행하기 위해서는 적절한 생물활성 target의 설

정과 더불어 새로운 천연자원을 확보하는 것이 선행되어야 한다고 생각된다.

지구상에 존재하는 생물 중 해양에 서식하는 생물은 약 80%를 웃도는 것으로 알려져 있다. 그러나 육상 식물에 비해 해양 생물은 수직 우세와 다양성을 가지고 있음에도 불구하고 채집에 따른 비용과 노력 등의 문제로 인하여 상대적으로 많은 연구가 이루어지지 않았다. 해양생물 중 특히 해조류에는 육상식물에서는 보기 어려운 생합성 경로를 가지고 있어 신규 생물활성 물질의 자원으로 이용할 수 있는 무한한 가능성을 가지고 있는 것으로 평가되고 있다.²⁾ 따라서 해양생물이 가지고 있는 생물활성을 검색하고 이를 바탕으로 의약품, 기능성 식품, 향장품 자원화 하는 것은 매우 의미 있는 일이라 할 수 있다.

한편 의료기술과 경제적인 발달에 힘입어 인류의 고령화가 가속되고 있으며 이에 따라 심장병, 고혈압, 암, 치매 등 성인병이 인류가 겪고 있는 가장 심각한 질병이 되었으며 통계청 자료에 의하면 우리나라에서도 이들이 전체 사망률의 60%를 넘고있는 것으로 보고되고 있다.³⁾

심장병, 고혈압 등의 원인이 되는 혈관 순환기계 질환은 혈관 내에 혈전 (thrombus)이 형성됨으로써 발생하는데, 혈관 내에 형성된 혈전은 뇌졸중, 심부전증, 심근경색 등을 일으켜 심각한 증상으로 발전하게되며 또한 미세한 혈전들은 각종 만성성인병 (고혈압, 당뇨병)의 원인이 될 수 있음이 밝혀지고 있다. 따라서 혈전생성을 방지하기 위한 항 혈전제 (antithrombotics) 및, 이미 생성된 혈전의 경우에는 혈전을 용해하여 혈전을 치료하는 혈전용해제 (thrombolytics)의 개발을 위한 연구가 국내외적으로 매우 활발히 진행되고 있다.⁴⁻⁶⁾

이와 함께 가장 심각한 성인병으로 지목되고 있는 것 중의 하나가 치매 (Alzheimer's disease: AD)이다. AD는 미국에서는 2,000년대 중반까지 1,500만 명에 이를 것으로 예측하고 있으며, 이웃 일본의 경우도 65세 이상의 약 5%, 80세 이상의 약 20%가 AD를 앓고 있는 것으로 알려져 있다.⁷⁾ 치매의 확실한 발병기전은 아직 알려져 있지 않으나 뇌 내의 β -amyloid가 이 병의 발병, 진행에 영향을 준다는, 소위 'amyloid 가설'이 현재로서는 가장 유력하다.^{7,8)} 또한 amyloid를 생성하는 데 관여하는 효소의 하나로 prolyl endopeptidase가 지목되고 있어 이 효소의 저해제가 치매의 예방, 치료제를 탐색하는 가장 큰 목표 중의 하나로 꼽히고 있다.^{9,10)}

또한 melanin은 동물, 식물, 미생물 등에서 발견되는 검은 색소로 생육이나 발달에 필수적이진 않지만 어떤 환경에 대한 생존력과 경쟁력을 높여주는 물질이며 특히 동물에서의 melanin은 피부병과 악성 melanomas와 관계가 있다. Melanin에는 tyrosinase에 의해 tyrosine으로부터 생성되는 DOPA melanin 외에 DHN melanin, GDHB melanin, catechol melanin 등이 보고되고 있다.¹¹⁾

Tyrosinase (monophenol, dihydroxy-L-phenylalanine: oxygen oxidoreductase, E.C. 1.14.18.1)는 구리를 함유한 효소로 melanin 합성의 초기단계인 L-tyrosine에서 L-3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) (cresolase activity)에 작용한다.¹²⁻¹⁴⁾ Tyrosinase 저해제인 4-hydroxyanisole, hydroquinone 등은 인체의 hyper-pigmentation 치료에 사용되고 있으며 melanoma cell의 증식억제에도 효과가 있는 것으로 보고되었으므로¹⁵⁾ 이 효소에 대한 저해제는 항암, 또는 항장풍의 원료로 이용될 수 있다.

이와 같은 배경에 따라 해조류로부터 성인병 예방, 치료 선도물질 개발을 위한 기초 자료를 얻기 위하여 사십여 종의 해조류를 메탄올로 추출하고 이들에 대하여 prolyl endopeptidase, tyrosinase 및 혈전 응고에 대한 저해효과를 탐색하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

실험방법

시약, 재료 및 기기 - 본 연구에 사용한 해조류들은 1996년도 3월에서 8월 사이에 제주 및 남해안 연안에서 채취하여 제주대학교 생물학과 이용필 교수 연구실에서 동정하였으며 수돗물을 이용하여 잘 세척한 다음 음건하였다. 건조된 해조류들은 믹서를 이용하여 세절 후 사용 전까지 -20°C 에서 보관하였으며 표본은 대전산업대학교 공업화학과에 보관하였다.

Prolyl endopeptidase (PEP, *Flavobacterium* 유래) 및 기질인 Z-Gly-Pro-p-NA은 일본 생화학공업 (Seikagaku Kougyo Co., Japan)으로부터 구입하여 사용하였으며 Z-Pro-prolinal은 Bakker¹⁶⁾ 등의 방법에 준하여 합성하였다. Tyrosinase (mushroom 유래), L-tyrosine, kojic acid, activated partial thromboplastin time 시약, plasma, thrombin (Bovine 유래), fibrinogen reference 및 heparin은 Sigma사 제품을 구입하여 이용하였다.

응고 시간의 측정은 KC 1 A micro coagulation

analyzer(Heinrich Amelung GmbH, Lemgo, Germany)를 이용하였으며 ELISA reader는 Microplate reader ELx808 (Bio-Tek Instruments, Inc.)를 사용하였다.

시료의 조제 - 채집한 해조류는 수돗물을 이용하여 소금기를 제거하였으며 통풍이 잘 되는 곳에서 음건하였다. 이 때 건조기간은 일주일을 넘지 않도록 하였다. 건조한 해조류들을 대상으로 시료 8g에 MeOH 120 ml를 넣은 다음 실온에서 12시간 진탕기로 교반하여 추출 후 여과하였다. 이와 같은 조작을 3회 반복한 다음 여액을 모아 감압, 농축하고 적당량의 용매를 가하여 PEP 및 tyrosinase의 경우에는 mg ml^{-1} , 혈전 응고 방지활성의 측정에는 3.3 mg ml^{-1} 의 농도로 맞추어 활성검정에 이용하였다.

PEP의 효소활성 측정 - PEP 활성 측정은 Toda 등¹⁷⁾이 이용한 방법을 변형하여 사용하였다. 즉, 0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.0) 210 μl , 2 mM Z-Gly-Pro-pNA (in 40% dioxane) 20 μl , sample 10 μl , 0.1 unit/ml PEP 10 μl 의 mixture 250 μl 를 30°C에서 30분간 incubation한 후 ELISA reader로 410nm에서 흡광도를 측정하고 (A) 따로 0.1M Tris-HCl (pH 7.0) 240 μl , sample 10 μl 의 mixture를 준비하여 역시 410nm에서 흡광도를 측정 한 후 (B)

$$\text{Inhibition(\%)} = \frac{A_{410} \text{ of Control} - (A - B)}{A_{410} \text{ of Control}} \times 100$$

로 나타내어 활성의 지표로 삼았다. Control은 sample 대신 증류수를 사용했을 때의 A_{410} 값이다. 이때의 positive control은 Z-Pro-prolinal을 사용하였으며 Z-Pro-prolinal의 $\text{IC}_{50} = 0.022 \text{ ppm}$ 이다. 실험은 2구 1반복하였고 결과는 평균치로 나타내었다.

Tyrosinase 활성 측정 - Tyrosinase 활성 측정은 이 등¹⁸⁾이 이용한 방법을 변형하여 사용하였다. 즉, 0.1M phosphate buffer (pH 6.5) 200 μl , 1.66 mM L-tyrosine 30 μl , sample 10 μl , 1,700unit/ml tyrosinase 10 μl 의 mixture 250 μl 를 25°C에서 70분간 incubation한 후 ELISA reader로 490nm에서 흡광도를 측정하고 (A) 따로 0.1M phosphate (pH 6.5) 240 μl , sample 10 μl 의 mixture를 준비하여 역시 490 nm에서 흡광도를 측정한 후 (B)

$$\text{Inhibition(\%)} = \frac{A_{490} \text{ of Control} - (A - B)}{A_{490} \text{ of Control}} \times 100$$

로 나타내어 활성의 지표로 삼았다. Control은 sample 대신 증류수를 사용했을 때의 A_{490} 값이며 이

때 positive control로는 kojic acid를 사용하였으며 kojic acid의 $\text{IC}_{50} = 5.1 \text{ ppm}$ 이다. 실험은 2구 3반복하였으며 결과는 평균치로 나타내었다.

Anti-coagulation 활성 측정¹⁹⁾ - 시료를 적당량의 DMSO에 녹인 후 증류수로 희석하여 3.3 mg/ml이 되도록 하였다. Activated partial thromboplastin times (APTT) test는 시료 50 μl 와 혈장 100 μl 를 잘 섞어 혼합한 후 이 중 50 μl 를 취하여 sample cup에 넣고 정확히 2분간 incubation한다. 여기에 상온 상태의 APTT 시약 (0.1 mM) 50 μl 를 넣어 정확히 3분간 37°C에서 incubation한 다음 20 mM CaCl₂ 50 μl 를 넣고 응고 시간을 측정한다 (분석시 최종 시료농도 약 367 ppm). 이 때 control은 54.6 초였으며 시료첨가시의 응고시간(초)을 control로 나눈 값에 100을 곱하여 항응고 활성을 %로 나타내었다. Positive control로는 heparin을 사용하였다. Thrombin times (TT) test는 thrombin 시약 1 vial (3~4 NIH Unit)을 5 mL 증류수에 녹이고 fibrinogen reference 시약 1vial (250 mg/dL) 를 4 mL 증류수에 녹인 후 thrombin 시약 50 μl 와 시료 50 μl 를 1:1로 섞어 혼합한 후 이 중 50 μl 를 취하여 정확히 2분간 incubation한 다음 fibrinogen reference 시약 100 μl 를 넣고 응고시간을 측정한다 (분석시 최종 시료농도 약 550 ppm). 이 때 sample 대신 증류수를 첨가한 control은 61.2초였으며 APTT assay와 같은 방법에 의하여 항응고 활성을 %로 나타내었다.

실험은 3회 반복하였으며 결과는 이들의 평균치로 나타내었다.

결과 및 고찰

현재까지 항 Alzheimer's disease (AD) 개발의 초점은 대부분 신경전달물질계에 작용하는 화합물들로 주로 choline성 기능을 향진시키는 것이 목적이었다. 이러한 화합물들은 노인성치매의 제 증상을 완화시키려는 목적으로 개발되었으며 이와 같은 약리학적 접근방법은 일시적으로 증세를 경감시키는 효과만을 기대할 수 있다. 이와 같이 노인성 치매에 대해 원인적 치료가 가능한 약물의 개발이 아직 이루어지지 않은 가장 큰 이유중의 하나는 아직까지 AD의 확실한 발병기전을 규명하지 못하였기 때문인 것으로 알려져 있다. 그러나 최근 뇌 내의 β -Amyloid protein이 이 병의 발생에 중요한 원인적 인자의 하나가 되는 것으로 주목을 받고 있으며 이

Table I. Biological activities of sea weeds

| Korean name | Sample Scientific name | Inhibition (%) | | | | | |
|------------------|----------------------------------|------------------|--------|------------|-------|-------------------|-----------------|
| | | PEP ^a | | Tyrosinase | | APTT ^b | TT ^c |
| | | 5ppm | 40ppm | 10ppm | 40ppm | | |
| 갈조류 | | | | | | | |
| 팽생이모자반 | <i>Sargassum horneri</i> | 29±1 | 45±1 | 14±0 | 15±1 | 134±7 | 73±8 |
| 파배기모자반 | <i>Sargassum siliquastrum</i> | 54±6 | 66±1 | 37±1 | 51±1 | 170±21 | 81±16 |
| 툽니모자반 | <i>Sargassum serratifolium</i> | 46±8 | 48±4 | 22±0 | 33±0 | 132±6 | 115±11 |
| 큰잎모자반 | <i>Sargassum singildianum</i> | 64±5 | 91±0 | 15±0 | 26±0 | 210±17 | 177±11 |
| 작잎모자반 | <i>Sargassum hemiphylum</i> | 71±3 | 98±2 | 18±0 | 31±0 | 143±10 | 144±5 |
| 쌍발이모자반 | <i>Sargassum patens</i> | 65±0 | 96±1 | 17±0 | 13±0 | 145±15 | 166±25 |
| 지층이 | <i>Sargassum thunbergii</i> | 56±4 | 90±0 | 13±0 | 14±0 | 144±12 | 111±11 |
| 열매의감말 | <i>Carponutra cabreræ</i> | 54±3 | 65±3 | - | - | 156±19 | 71±5 |
| 바위두릅 | <i>Leathesia difformis</i> | 35±0 | 33±2 | 18±0 | 21±0 | 155±14 | 102±15 |
| 바위수염 | <i>Myelophycus simplex</i> | 31±0 | 36±2 | 15±0 | 16±0 | 173±10 | 141±14 |
| 부챗말 ^d | <i>Podium contractum</i> | 51±3 | 49±0 | 15±0 | 34±0 | 137±15 | 96±7 |
| 부챗말 ^d | <i>Podium contractum</i> | | | | | 129±2 | 166±16 |
| 툽 | <i>Hizikia fusiformis</i> | 71±5 | 94±1 | 22±1 | 26±0 | 198±24 | 251±26 |
| 꽤 | <i>Ishige okamuræ</i> | 68±2 | 97±0 | 21±0 | 44±0 | 152±12 | 67±1 |
| 감태 ^d | <i>Ecklonia cava</i> | 60±2 | 99±0 | 35±0 | 76±0 | 160±13 | 118±3 |
| 감태 ^d | <i>Ecklonia cava</i> | | | | | 186±20 | 157±8 |
| 미역 | <i>Undaria pinnatifida</i> | 36±2 | 27±5 | 3±2 | 16±1 | 102±4 | 164±18 |
| 홍조류 | | | | | | | |
| 갈래잎 | <i>Achizymenia dubyi</i> | 48±2 | 52±1 | 16±0 | 10±0 | 110±7 | 111±10 |
| 개서실 | <i>Chondria crassicaulis</i> | 65±1 | 61±1 | 16±0 | 23±1 | 160±2 | 161±6 |
| 개우무 | <i>Pterocladia capilacea</i> | - | - | - | - | 211±30 | 92±8 |
| 깃꼴서실 | <i>Laurentia pinnata</i> | 57±2 | 45 ± 1 | 9±1 | 29±1 | 110±14 | 70±4 |
| 쌍발이서실 | <i>Laurentia okamuræ</i> | 58±4 | 67 ± 2 | 1±0 | 0±3 | 165±8 | 197±18 |
| 큰서실 | <i>Laurencia nipponica</i> | 46±2 | 56 ± 3 | 6±0 | 18±0 | 138±28 | 103±9 |
| 까막살 | <i>Carpopeltis affinis</i> | - | - | - | - | 165±6 | 102±4 |
| 꼬시래기 | <i>Gracilaria arcuata</i> | 33±0 | 44±7 | 24±0 | 34±0 | 124±16 | 68±7 |
| 나도평꼬리 | <i>Delisa fimbriata</i> | 31±1 | 32±3 | 13±0 | 33±0 | 135±9 | 97±4 |
| 마디잘록이 | <i>Lomentaria catenata</i> | 61±1 | 56±3 | 2±1 | 25±0 | 174±8 | 216±21 |
| 명주도발 | <i>Phyllyrnia oparia</i> | 51±0 | 53±0 | 1±1 | 14±0 | 158±6 | 128±17 |
| 불동풀가사리 | <i>Gilopeltis furcata</i> | 61±4 | 68±2 | 5±1 | 17±1 | 144±6 | 126±20 |
| 붉은부챗살 | <i>Zanardinula cornea</i> | 51±4 | 52±1 | 15±0 | 7±0 | 152±9 | 81±6 |
| 붉은뼈까막살 | <i>Carpopeltis angusta</i> | 24±1 | 26±2 | 14±0 | 17±0 | 110±5 | 133±17 |
| 우뭇가사리 | <i>Gelidium amansii</i> | 19±1 | 27±1 | 0±0 | 0±0 | 146±20 | 123±10 |
| 작은구슬산호말 | <i>Corallina officinalis</i> | 52±10 | 73±4 | 17±1 | 19±1 | 155±3 | 159±26 |
| 자루바다표고 | <i>Peyssonnelia caulifera</i> | 37±1 | 51±4 | - | - | 165±12 | 146±11 |
| 주름신두발 | <i>Chondrus crispus</i> | 43±6 | 39±1 | 8±1 | 18±0 | 178±4 | 151±15 |
| 비단풀 | <i>Ceramium kondoi</i> | 67±7 | 74±5 | 12±0 | 25±0 | 129±9 | 70±5 |
| 녹조류 | | | | | | | |
| 팔손이붉은잎 | <i>Callophylus pabnata</i> | 29±1 | 28±4 | 9±0 | 12±0 | 120±13 | 69±3 |
| 창자파래 | <i>Enteromorpha intestinalis</i> | 46±8 | 48±4 | 17±0 | 15±0 | - | - |

Table I. Continued

| Korean name | Sample Scientific name | Inhibition (%) | | | | | |
|-------------|-------------------------------|------------------|-------|------------|-------|-------------------|-----------------|
| | | PEP ^a | | Tyrosinase | | APTT ^b | TT ^c |
| | | 5ppm | 40ppm | 10ppm | 40ppm | | |
| 모자반 | <i>Enteromorpha compressa</i> | 53±6 | 72±0 | 2±1 | 16±1 | 189±22 | 110±4 |
| 옥덩쿨 | <i>Caulerpa okamuriae</i> | 59±7 | 69±4 | 0±1 | 10±0 | 110±7 | 117±4 |
| 청각 | <i>Codium fragile</i> | 62±2 | 68±7 | 0±0 | 20±0 | 132±15 | 87±11 |
| 누운청각 | <i>Codium coartum</i> | 51±5 | 60±3 | 3±0 | 20±0 | 139±12 | 145±10 |
| 몽우리청각 | <i>Codium contractum</i> | 39±2 | 37±1 | 8±0 | 17±0 | 120±7 | 103±9 |
| 갈색대마디말 | <i>Cladophora wrightiana</i> | 56±1 | 58±3 | 4±1 | 20±0 | 142±11 | 63±5 |
| 구멍갈파래 | <i>Ulva pertusa</i> | 50±6 | 51±1 | 16±0 | 29±1 | 150±10 | 166±10 |

^aPEP; prolyl endopeptidase

^bAPTT; activated partial thromboplastin time

^cTT; thrombin times

^dsamples at different spots

단백질의 생성에는 prolyl endopeptidase (PEP)가 관여하고 있는 것으로 알려져 있다.^{7,9)} 특히 Aoyagi 등¹⁰⁾은 AD 뇌 및 혈청중의 효소활성을 정상인의 그것과 비교한 결과 PEP의 현저한 활성 증가를 목격한 바 있어 이 효소에 대한 저해제를 탐색하는 것은 곧 치매의 원인치료가 가능한 의약품의 개발을 시사한다고 할 수 있으므로 항치매 활성의 지표로서 prolyl endopeptidase를 설정하였다. Table I에 나타난 바와 같이 40 ppm의 농도를 사용하였을 경우 쌍발이모자반, 짝잎모자반, 큰잎모자반, 지층이와 같은 모자반류에서 90%이상의 비교적 강한 활성이 나타났으며 그 외에도 감태, 패, 툫의 MeOH 추출물에서도 90% 이상의 PEP 활성이 저해되는 것으로 나타나 이들이 항치매제 개발의 천연자원으로서 유용한 것으로 판단되었다.

한편 항 혈전 응고 활성의 지표로는 외인계(extrinsic system)를 검색하는 activated prothrombin time assay (APTT)¹⁹⁾과 thrombin time (TT) assay^{20,21)}를 설정하였는데 전자는 tissue thromboplastin (혹은 tissue factor)과 Ca²⁺을 가하여 clotting에 소요되는 시간을 측정하는 방법으로 이 방법은 factor X, V, prothrombin, fibrinogen을 포함한 전반적인 응고계(clotting system)를 검색함으로써 경구용 항혈액응고제 monitor에 범용되는 것으로 알려져 있으며 후자는 fibrinogen에서 fibrin으로의 전환을 측정하는 검색방법으로 fibrin clot이 생성되는 시간을 측정하여 여러 농도의 트롬빈에 대한 clotting time

검량선을 작성하고 활성을 측정하고자 하는 시료를 동일한 방법으로 측정하여 역가를 측정하는 방법이다. 상기의 두 방법이 혈전 생성 억제제를 탐색하기 위한 초기 assay system으로 가장 유용할 것으로 생각되어 이 방법에 의하여 해조류의 활성을 측정된 결과 강력한 연장효과를 나타내는 해조류는 없었으나 APTT assay에서는 약 367 ppm의 시료농도에서 큰잎모자반, 개우무 및 툫이 혈전의 coagulation에 걸리는 시간을 대조구에 비해 각각 210, 211, 198% 연장하는 효과를 나타내었으며 TT assay에서는 마디잘록이, 쌍발이서실 및 툫이 각각 216, 197, 251%의 연장효과를 나타내었다.

또한 tyrosinase에 대한 해조류 추출물의 저해효과의 경우 positive control로 사용한 kojic acid가 10 ppm에서 90% 이상의 저해율을 나타내는 것에 비교하면 대체로 낮았으나, 이들 중 파배기모자반과 감태가 각각 40 ppm의 농도에서 51%와 76%의 저해효과를 나타내었다. Table I에서 나타난 해조류 추출물 중 일부는 최 등²²⁾에 의해 tyrosinase에 대한 저해효과가 이미 발표된 적이 있으나 파배기 모자반 등의 경우 본 연구결과가 이들과 다소 상이하였는데 이는 사용한 농도(300 ppm) 및 assay 방법(기질로서 dopachrome 사용)이 다른 데서 오는 오차로 추측된다.

해조류 추출물의 prolyl endopeptidase, tyrosinase 및 혈전응고 저해효과를 Table I에 정리하였다.

이상과 같은 결과를 종합하여 볼 때 모자반류가 대체적으로 본 실험에서 사용한 assay system에서

좋은 생리활성을 나타내었으며, 이들을 생물활성 천연자원으로 이용하기 위하여 계통적인 성분연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 톳의 경우에도 비교적 우수한 생리활성을 나타내었는데 톳은 입수가 용이하고 식용이라는 장점을 가지고 있어 앞으로 기능성 식품의 재료로서 이용할 가능성이 매우 클 것으로 기대된다. 현재 톳에 대하여 MeOH에 의한 대량추출 및 각종 유기용매에 대한 순차적 분배추출 후 PEP에 대한 활성을 지표로하여 활성물질을 추적하고 있는 중이며, 해조류를 이용한 생리활성물질의 개발에 필요한 기초 data를 확립하기 위해서는 보다 다양한 sample의 확보, 다각적인 bioassay의 target 설정 및 screening의 결과를 바탕으로 한 생리활성물질의 추출, 정제, 동정이 필요할 것이다.

결 론

해조류로부터 생리활성 선도물질을 획득하기 위한 기초조사를 위하여 총 40여종 해조류의 MeOH 추출물에 대하여 prolyl endopeptidase, tyrosinase 및 혈전응고에 대한 저해활성을 측정하였다. 항치매활성의 지표로 선정한 prolyl endopeptidase에 대하여는 40 ppm의 농도에서 쌍발이모자반, 짝잎모자반, 큰잎모자반, 지층이, 감태, 패, 톳이 90% 이상의 저해활성을 나타내었다.

항암 및 미백효과 활성의 지표로 선정한 tyrosinase에 대하여는 파베기모자반과 감태가 각각 40 ppm의 농도에서 51%와 76%의 저해효과를 나타내어 시료로 사용한 해조류 중에는 가장 강한 활성을 나타내었다.

한편 강력한 혈전 응고 저해작용을 나타낸 해조류는 없었으나 약 367 ppm의 시료농도에서 APTT assay에서는 큰잎모자반, 개우무 및 톳이 혈전의 coagulation에 걸리는 시간을 대조구에 비해 각각 210, 211, 198% 연장하는 효과를 나타내었으며 TT assay에서는 마디잘록이, 쌍발이서실 및 톳이 각각 216, 197, 251%의 연장효과를 나타내었다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술부·한국과학재단 지정 대전 산업대학교 환경개선형신소재개발센터와 수산특정 연구과제 연구비 지원으로 이루어졌음을 감사드립니다.

인용문헌

- Suffness, M. and Douros, J. (1982) Current status of the NCI plant and animal product program. *J. Nat. Prod.* 45: 1-14.
- 김영섭, 정현도 편 (1996) 수산과학의 하이테크. 219-220. 부산수산대학교 해양과학공동연구소.
- National Statistical Office of Korea (1995) Korea Statistical Yearbook.
- Verstraete, M. (1990) Heparin and thrombolysis: A seventy year long story, 4-11. suppl 1, Haemostasis, Basel.
- O'Kennedy, R. and Thornes, R. D. (1996) Coumarins, biology, application and mode of action. 1-22. Wiley, Chichester, UK.
- Hirsh, J. (1991) Oral anticoagulant drugs. *N. Eng. J. Med.* 324: 1865-1875
- Hardy, J. (1997) Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *TINS* 20: 154-158.
- Selkoe, J. D. (1990) Eciphering Alzheimer's disease: The amyloid precursor protein yields new clues. *Science* 245: 1508-1060.
- Ishiura, S., Tsukahara, T., Tabira T., Shimizu, T., Arahata, K. and Sugita, H. (1990) Identification of putative amyloid A-4-generating enzyme as a prolyl endopeptidase. *FEBS Lett.* 260: 131-134.
- Aoyagi, T., Wada, T., Nagai, M., Kojima, F., Harada, S., Takeuchi, T., Takahashi, H., Hirokawa, K. and Tsumita, T. (1990) Deficiency of kallikrein-like enzyme activities in cerebral tissue of patients with Alzheimer's disease. *Experientia* 46: 94-97.
- Bell, A. A. and Weeler, M. H. (1986) Biosynthesis and function of fungal melanin. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24: 411-451.
- Lerner, A. B. and Fitzpatrick, I. B. (1950) Biochemistry of melanin formation. *Physiol. Rev.* 30: 91-126.
- Korner, A. and Pawelek, J. (1982) Mammalian tyrosinase catalyses three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science* 217: 1163-1165.
- Swan, G. A. (1974) Structure, chemistry and biosynthesis of the melanins. *Fortscr. Chem. Org. Naturst.* 31: 521-582.

15. Tomit, K. N., Oda, N., Kamel, M., Miyaki, T. and Oki, T. (1990) A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using *Streptomyces bikiniensis*. *J. Antibiotics* 12: 1601-1605.
16. Bakker, A. V., Jung, S., Spencer, R. W., Vinick, F. J. and Faraci, W. S. (1990) Slow tight-binding of prolyl endopeptidase by benzyloxy-carbonyl-prolyl-prolinal. *Biochem. J.* 271: 559-562.
17. Toda, S., Obi, Y., Numata, K., Hamagishi, Y., Tomita, K., Komiyama, N., Kotake, C., Furumai, T. and Oki, T. (1992) Euristatin A and B, new prolyl endopeptidase inhibitors. *J. Antibiotics* 45: 1573-1579
18. 이충환, 전효근, 서영배, 고영희 (1993) *Streptomyces* sp. 20747이 생산하는 tyrosinase-inhibiting isoflavonoids. *응용미생물학회지* 21: 139-143.
19. Thompson, A. R. and Harker, L. A. (1983) *Manual of hemostasis and thrombosis*. 3rd ed., 178-185. F. A. Davis, Philadelphia.
20. Baughman, D. J. (1973) Thrombin assay. *Methods in Enzymology* 19: 145-151
21. Rupin, A., Mennecier, P., de Nanteuil G., Laubie, M, Verbeuren, T. J. (1995) A screening procedure to evaluate the anticoagulant activity and the kinetic behaviour of direct thrombin inhibitors. *Thromb. Res.* 78: 217-225.
22. 최병욱, 이봉호, 강기정, 이은석, 이남호 (1998) 해조류 및 생약의 tyrosinase 억제활성 검색. *생약학회지* 29: 237-242.

(1999년 6월 20일 접수)