

한국산 다시마 및 미역으로 부터 Fucoidan의 추출 및 정제

구재근 · 조길석 · 도정룡 · 우순자*
한국식품개발연구원, *고려대학교 식품공학과

Isolation and Purification of Fucoidans from *Laminaria religiosa* and *Undaria pinnatifida* in Korea

Jae-Geun KOO, Kil-Suk JO, Jeong-Ryong DO and Soon-Ja WOO*

Korea Food Research Institute, 46-1 Baekhyun Bundang, Kyunggi-Do 463-420, Korea

*Department of Food Technlogy, Korea University, Seoul 136-130, Korea

The objective of this research was to characterize fucoidans isolated from *Laminaria religiosa* and *Undaria pinnatifida* in Korea to obtain basic data for production of soluble dietary fiber materials with biological functionality.

Fucoidans were successively extracted 3 times at 65°C for 1hr with acid solution of pH 2.0, and cetylpyridinium chloride was used for partial purification. The yields of partially purified fucoidans were 2.71% for *L. religiosa*, 6.65% for sporophylls of *U. pinnatifida* and 0.40% for blade of *U. pinnatifida*. The yield from sporophylls of *U. pinnatifida* was highest among the sample tested, whereas the yield from blade of *U. pinnatifida* was lowest. It appeared that the fucoidans content in different parts of *U. pinnatifida* varied.

Partially purified fucoidans were separated into 3 fractions by DEAE-Sephadex A-25 ion exchange column and the major fractions were refractionated with fractional precipitation with ethanol. 60-70% ethanol precipitated fractions of *L. religiosa* and sporophylls of *U. pinnatifida* turned out to be homogeneous by cellulose acetate electrophoresis and gel filtration chromatography. The molar ratios of fucose, galactose, and sulfate in the purified fucoidans(ethanol precipitated fractions) were 1 : 0.31 : 2.43 for *L. religiosa* and 1 : 0.97 : 1.99 for sporophylls of *U. pinnatifida*. The averaged molecular weights of the purified fucoidans from *L. religiosa* and sporophylls of *U. pinnatifida* were 31,000 and 38,000, respectively.

Key words : fucoidan, purification, chemical properties.

서 론

최근 국내에서는 생활 수준의 향상에 따른 식생활의 다양화로 인하여 식이섬유의 수요가 증가하고 있다. 특히 건강음료등 새로운 가공식품의 개발에 따라 수용성 식이섬유의 수요가 급증하고 있으나 대부분의 수용성 식이섬유는 수입에 의존하고 있다. 한편으로 국내 연안에는 다양한 종의 갈조류가 서식하고 있을 뿐아니라 양식 기술의 발달로 인하여 미역, 다시마등이 매년 과잉 생산되고 있어 이를 이용한 새로운 가공제품의 개발이 요구되고 있다.

갈조류에는 Ca을 비롯한 무기질과 다당류가 다량 함유되어 있다. 알긴산은 그 대표적인 다당으로 현재 점증제등의 식품첨가물로 이용되고 있다. 또한 갈조에는 중성다당인 laminaran과 황산기를 함유한 산성다당이 다량 함유되어 있는 데 그 대표적인 함황 산성다당은 fucoidan이다.

Fucoidan은 모든 갈조류에 존재하는 수용성 다당류로 가수분해물 중에 L-fucose가 함유되어 있는 것이 밝혀짐에 따라 처음엔 fucoidin으로 명명되었다가 지금은 다당의 명명법에 따라 fucoidan으로 불리어지고 있다. Fucoidan은 혈액중에 존재하는 함황 산성다당

인 heparin과 생리적 특성이 유사하여 항혈액응고 작용을 나타낼 뿐 아니라 항암작용등 다양한 생리적 기능이 밝혀지고 있다. 이러한 생리적 기능성 이외에도 fucoidan은 점성이 낮고 용해성이 우수하여 수용성 식이섬유 소재로서의 이용 가능성이 매우 높다.

따라서 국내연안에서 과잉 생산되고 있는 갈조류의 수용성 다당을 이용하여 수용성 식이섬유 소재 개발을 위해서는 우선 국내 연안산 갈조류의 fucoidan등 수용성 다당에 관한 기초 연구가 매우 절실히 요구된다. 그러나 아직 국내산 갈조류의 수용성 다당, 특히 fucoidan에 관한 연구는 전무하다.

본 연구에서는 국내 연안의 대표적인 갈조류인 미역 및 다시마로부터 fucoidan을 추출, 정제하여 우선 화학적특성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시료

실험에 사용한 갈조는 국내 연안산 미역엽상체(줄기포함, *Undaria pinnatifida*), 미역 포자엽(미역귀: *Sporophylls*) 및 다시마(*Laminaria religiosa*)를 사용하였다. 미역 엽상체와 포자엽은 1993년 2월 20일 경남 양산군 기장읍 양식장에서, 다시마는 1993년 2월 22일 부산 공동어시장에서 각각 생시료를 구입하여 건조하여 두고 실험에 사용하였다.

2. Fucoidan의 추출

Fucoidan의 추출은 Anno et al.(1966)와 Iizima-Mizui et al.(1985)의 방법에 준하여 Fig. 1과 같이 실시

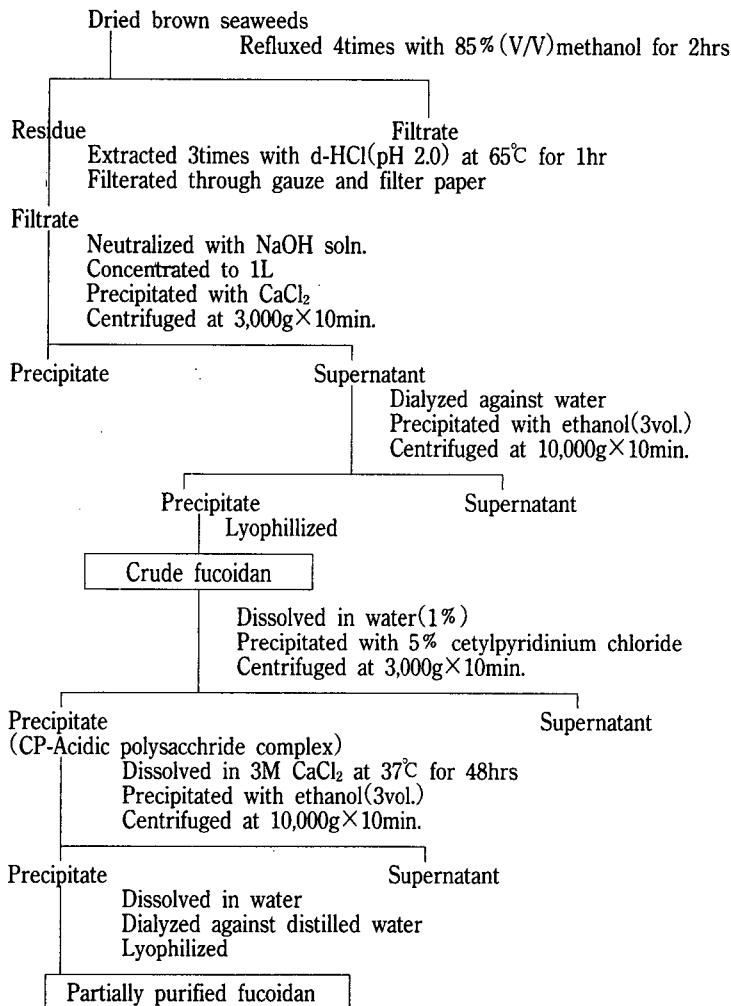


Fig. 1. Preparation procedure of partially purified fucoidans from dried brown algae.

하여 부분정제 fucoidan을 얻었다.

3. Fucoidan의 정제

1) 이온교환 크로마토그래피를 이용한 fucoidan의 정제

DEAE-Sephadex A-25 칼럼(20mm×700mm)에 부분 정제 fucoidan을 소량의 0.01N HCl에 녹여 칼럼에 주입하였다. 시료의 용출은 0.01N HCl에 NaCl을 0.5 M, 1.0M, 1.5M, 2.0M이 되게 각각 녹인 용출액으로 당이 검출 되지 않을 때까지 단계적으로 용출시켰다. 용출액을 fraction collector로 10ml씩 모은 후 페놀-황산법(Dubois et al., 1965)으로 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 fraction을 합쳐 증류수에 24시간 투석한 후 농축하여 동결 건조하였다.

2) 알콜 분별 침전법에 의한 fucoidan의 정제

이온교환 크로마토그래피 방법에 따라 분획한 각 시료별 주 fraction을 증류수에 녹여 1% 용액을 조제한 후 에틸알콜 농도가 40% (P-40), 50% (P-50), 60% (P-60), 70% (P-70), 80% (P-80)가 되도록 알콜을 단계적으로 첨가하여 원심분리(10,000g×10min)하였다. 각 알콜농도별로 얻은 알콜침전물을 증류수에 24시간 투석한 후 동결 건조하였다.

4. 구성성분 분석

수분은 105°C 상압건조법, 조지방은 Soxhlet 분석법, 조단백질은 Kjeldahl 정량법, 회분은 550°C 건식회화법에 따라 분석하였다(AOAC, 1990). 황산기의 함량은 Dodgson and Price (1962)의 방법에 따라 측정하였고 우론산은 Knutson and Jeanes (1968)의 방법에 따라 분석하였다. 구성당조성은 Blakeney et al. (1983)의 방법에 따라 gas chromatography (GC)로 분석하였고 우론산의 조성도 Lehrfeld (1987)의 방법에 따라 GC로 분석하였다.

5. 전기영동 및 젤 칼럼 크로마토그래피 분석

정제 fucoidan의 균일성을 확인하기 위하여 Seno et al. (1970)의 방법에 따라 cellulose acetate film을 이용하여 전기영동을 실시 하였다. 또한 정제된 fucoidan의 분자량 분산성을 측정하기 위해서는 Sepharose CL-6B 칼럼(1.2×99cm)에 정제된 fucoidan을 주입한 후 0.2M NaCl으로 용출시켰다. 당의 검출은 유속을 4.4ml/hr로

하여 tube당 2.2ml씩 fraction collector로 를 분취하여 페놀-황산법으로 측정하였다. 분자량 측정용 표준시약은 Blue dextran(type 2,000)과 Dexran T-500(5×10⁶ m.w.) T-70(7×10⁴m.w.), T-40(4×10⁴m.w.), T-10(1×10⁴m.w.)을 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 부분정제 fucoidan의 수율

Fig. 1의 방법에 따라 갈조류 시료에서 추출한 조fucoidan과 부분 정제 fucoidan의 수율은 Table 1과 같다. 조fucoidan의 수율은 미역 포자엽이 12.75%로 가장 높았고 다음은 다시마 4.76%, 미역엽상체 1.73% 순이었다. 부분정제 fucoidan의 수율은 미역 포자엽이 6.65%로 가장 높았으며, 다음으로 다시마 2.71%, 미역엽상체 0.40% 순이었다. 또한 조fucoidan내의 부분 정제 fucoidan의 함유 비율은 다시마, 미역포자엽, 미역엽상체 순으로 각각 56.93%, 52.16%, 23.19%였다. 시료별 함유 비율의 차이는 각각 시료별 조fucoidan 내에 함유되어 있는 단백질과 중성당인 laminaran등의 함량 차이 때문으로 여겨진다.

Table 1. Yields of crude fucoidans and partially purified fucoidans extracted from brown seaweeds^{1,2}

Species	Partially purified fucoidan		
	Crude fucoidan % of brown seaweed	% of brown seaweed	% of crude fucoidan
<i>L. religiosa</i>	4.76	2.71	56.93
<i>U. pinnatifida</i> I ³	1.73	0.40	23.19
<i>U. pinnatifida</i> II ⁴	12.75	6.65	52.16

¹ Mean of triplicate experiments

² Dry weight basis

³ Blade of *U. pinnatifida*

⁴ Sporophylls of *U. pinnatifida*

기준에 보고된 정제 fucoidan의 수율은 열수 추출시 다시마 3.32%, 미역포자엽 9.4%, 미역 엽상체가 0.7%였다(Nishide et al., 1987; 西澤, 1988; Fujikawa and Nakashima, 1975; Nishino et al., 1989). 본 실험의 결과가 기존의 보고에 비교하면 시료 종간의 경향은 유사하나 수율이 낮은 결과를 나타내었다. 이러한 수율

Table 2. Chemical properties of partially purified fucoidans extracted from brown seaweeds^{1,2}

Species	Uronic acids(%)	Sulfate (%)	Protein (%)	Proportion of monosaccharides(%) ³				
				Fuc	Gal	Glu	Man	Xyl
<i>L. religiosa</i>	10.28	32.63	6.30	80.43	11.32	tra ⁴	1.16	7.09
<i>U. pinnatifida</i>	7.21	32.45	2.44	57.11	42.17	tra ⁴	0.72	tra ⁴

¹ Mean of triplicate determinations

² Dry weight basis

³ Calculated from G.C. analysis, considering the total amounts under the five monosaccharides as 100%

⁴ Trace

차이는 시료의 서식장소, 채취시기, 추출방법 및 정제도에 따른 차이로 여겨진다.

특히, 미역의 부위에 따른 fucoidan의 함량 차이가 현저하여 미역포자엽은 6.65%, 미역 엽상체는 0.40%로 약 17배 차이가 났다. 따라서 이 후의 실험에 있어서는 fucoidan의 함량이 적은 미역 엽상체 부위는 제외하고 미역 포자엽만을 미역 시료로 하였다.

2. 부분정제 fucoidan의 구성성분

부분정제 fucoidan의 구성성분은 Table 2와 같다. Fucoidan의 주요 특성인 황산기의 함량은 다시마가 32.63%, 미역포자엽이 32.45%였으며 우른산의 함량은 다시마 10.28%, 미역포자엽 7.21%였다.

기존의 부분정제 fucoidan의 조성에 관한 보고로는 다시마의 경우 열수추출시 황산기와 우른산의 함량이 각각 53.0%, 13.8%였다(Nishino et al., 1987). 본 실험의 다시마 부분 정제 fucoidan의 황산기 함량은 기존의 보고에 비해 낮았으나 우른산의 함량은 유사하였다. 이는 fucoidan이 갈조내에서 알긴산 및 단백질과 결합된 형태로 존재한다는 Larsen et al.(1966)의 보고에 미루어 볼 때 추출 방법에 따른 분해 정도의 차이로 인해 조성이 달라지는 것으로 여겨진다.

구성당의 조성비는 fucose의 함량이 다시마 80.43%, 미역포자엽 57.11%로 가장 많이 함유되어 있다. 다음으로 galactose가 다시마 11.32%, 미역포자엽 42.17%로 fucose 다음으로 함량이 높았으며 다시마의 경우는 xylose의 함량이 7.09%로 비교적 많이 함유되어 있었다. 그의 미량으로 mannose가 1.16%에서 0.72% 정도 함유되어 있었고 glucose는 흔적량에 지나지 않았다. 특징적으로 미역 포자엽은 galactose의 함량이 높아 fucose와 galactose의 몰비가 1 : 0.66이었다. 이는 미역 엽상체 및 포자엽에서 추출한 산성다당은 galactose의

함량이 높다는 기존의 보고와 일치하였다(Fujikawa and Nakashima, 1975; Mori et al., 1982).

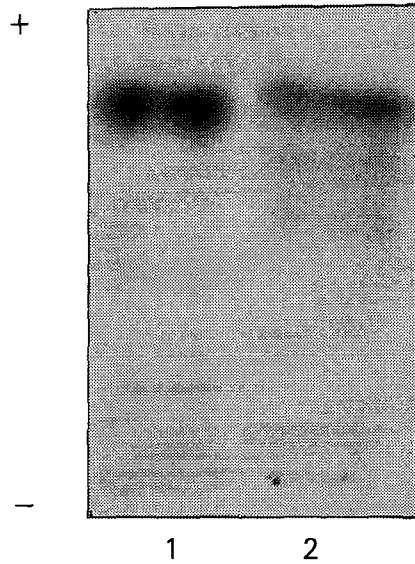


Fig. 2. Electrophoregram of the partially purified fucoidans from brown lagae.
1. *U. pinnatifida* 2. *L. religiosa*

3. 부분정제 fucoidan의 전기영동

부분정제 fucoidan의 cellulose acetate 전기영동 패턴은 Fig. 2와 같다. 다시마는 전기영동상 이동거리가 큰 주 band이외에 2종이상의 band가 비교적 뚜렷히 나타났다. 미역포자엽은 이동거리가 큰 주 band이외 비교적 미약한 band가 검출되었다. Cellulose acetate film상에서의 이동거리 차이는 다당의 backbond 구조 차이에 의해 좌우된다는 Anno et al.(1971)와 Seno et al.(1970)의 보고로 미루어 볼때, 미역포자엽, 다시마 모두 구조가 다른 다당들로 구성된 다분산성 다당임

을 알 수 있다. 이는 fucoidan이 여러 다당으로 구성된 다분산성(polydisperse)을 나타낸다는 기존의 보고와 일치한다(Mian and Percival, 1973).

4. 이온교환 크로마토그래피를 이용한 부분정제 fucoidan의 분획 및 조성

1) 부분정제 fucoidan의 분획

다시마 및 미역포자엽 부분정제 fucoidan을 DEAE-Sephadex A-25 칼럼(20mm×700mm)으로 분획한 크로마토그램은 각각 Fig. 3과 4와 같다. 다시마의 경우 fraction 1(Fr-1)은 0.5M NaCl에서, fraction 2(Fr-2)는 1.5M NaCl, fraction 3(Fr-3)은 2.0M NaCl에서 각각 용출되었다. 각 fraction의 함량은 Fr-1이 31mg, Fr-2가 66mg, Fr-3이 77mg으로 Fr-3이 주fraction이었다. 이는 *Sargassum ringgoldianum*, *Himanthalia lorea*, *Bifurcaria bifurcata*, *Padina pavonia*로 부터 추출한 fucoidan을 이온교환 크로마토그래피로 분획하여 3개의 뚜렷한 fraction을 얻었다는 보고와 일치하였다(Mian and Percival, 1973).

미역 포자엽도 다시마와 같이 Fr-1은 0.5M NaCl에서 Fr-2는 1.5M NaCl, Fr-3은 2.0M NaCl에서 각각 용출 되었으며 각 fraction의 양은 Fr-1이 26mg, Fr-2가 50mg, Fr-3이 113mg으로 Fr-3이 주 피크임을 알 수 있었다. Mori et al.(1982)도 미역포자엽에서 추출한 fucoidan을 DEAE-Sephadex A-25 칼럼으로 염농도를 0.5M, 1.0M, 2.0M로 단계적으로 증가시키면서 분획한 결과 0.5M, 1.0M, 2.0M에서 각각 피크가 용출되었다고 보고하였다.

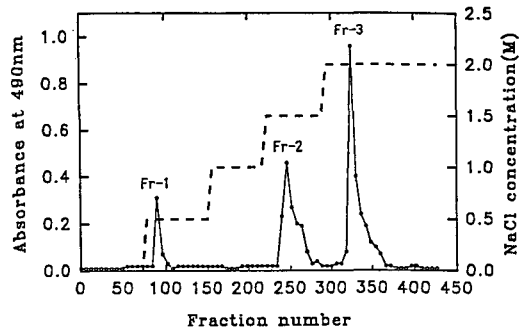


Fig. 3. Fractionation of partially purified fucoidans of *L. religiosa* on DEAE-Sephadex A-25.

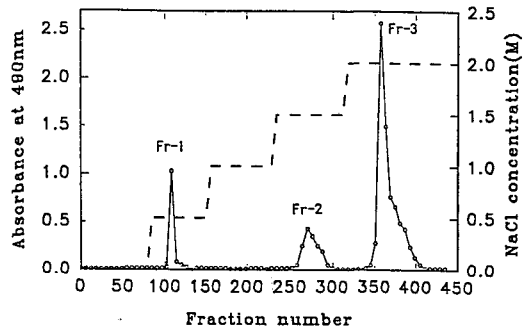


Fig. 4. Fractionation of partially purified fucoidans of *U. pinnatifida* on DEAE-Sephadex A-25.

2) 부분정제 fucoidan 분획물의 조성

부분정제 fucoidan의 분획 조성은 Table 3과 같다. 다시마의 경우 우론산의 함량은 Fr-1이 11.75%, Fr-2가 3.81%, Fr-3이 3.68%로 용출액의 염농도가 증가할

Table 3. Chemical composition of the fractions isolated from partially purified fucoidans of *L. religiosa* and *U. pinnatifida*¹

Species	Fraction	Uronic acid(%)	Sulfate (%)	Protein (%)	Proportion of monosaccharide(%) ²				
					Fuc	Gal	Glu	Man	Xyl
<i>L. religiosa</i>	Fr-1	11.75	5.60	2.33	28.13	7.03	tra ³	tra	64.84
	Fr-2	3.81	17.95	1.85	29.97	58.51	2.45	0.98	8.02
	Fr-3	3.68	24.90	1.68	69.76	27.80	0.82	1.61	tra
<i>U. pinnatifida</i>	Fr-1	10.77	6.89	0.08	71.82	12.47	1.26	12.09	2.36
	Fr-2	2.23	12.12	3.56	62.16	16.97	- ³	19.04	1.83
	Fr-3	1.92	22.17	1.00	59.34	40.66	-	-	-

¹ Mean of triplicate determinations

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

³ Trace

수목 감소한 반면에 황산기의 함량은 Fr-1이 5.6%, Fr-2가 17.95%, Fr-3이 24.90%로 용출액의 염농도가 증가할수록 증가하였다. 단백질도 용출액의 염농도가 증가할수록 함량이 감소하여 Fr-1이 2.33%, Fr-2가 1.85%, Fr-3이 1.68%였다. 단당의 구성비율은 Fr-1은 특이적으로 xylose의 함량이 높았고 Fr-2는 galactose, Fr-3은 fucose의 함량이 높았다. Mian and Percival (1973)은 fucoidan을 DE-cellulose로 분획하므로서 황산기와 fucose의 함량이 높은 fraction, 우론산이 많고 황산기의 함량이 적은 fraction, 그리고 이들 중간 형태의 fraction으로 분획할 수 있다고 하였다. 본 실험의 다시마 fucoidan도 이와 유사한 경향을 나타내었다.

미역포자엽 조성은. 황산기 함량은 Fr-1이 6.89%, Fr-2가 12.12%, Fr-3이 22.17%였다. 우론산의 함량은 Fr-1이 10.77%, Fr-2가 2.23%, Fr-3이 1.92%였다. 즉, 용출속도가 늦은 Fr-1은 황산기의 함량이 낮고 우론산의 함량이 높았으며 용출속도가 빠른 Fr-3은 황산기의 함량이 높고 우론산의 함량이 낮았다. Fr-2는 Fr-1과 Fr-3의 중간 조성을 나타내었다. 즉, 앞의 다시마와 동일한 경향을 나타내었다.

구성당의 조성비는 Fr-1은 fucose가 71.82%, galactose가 12.47%였으며 Fr-2는 fucose가 62.16%, galactose가 16.97%, Fr-3은 fucose가 59.34%, galactose가 40.66%였다. 즉, 염농도가 증가됨에 따라 galactose의 함량이 증가됨을 알수 있었는데 이는 Mori et al.(1982)의 보고와 같은 경향을 나타내었다.

3) 부분 정제 fucoidan 분획물의 전기영동

다시마 및 미역포자엽 fucoidan을 이온교환 크로마토그래피로 분획하여 얻은 각 fraction의 균일성(homogeneity)을 조사하기 위하여 cellulose acetate film을 이용하여 전기영동한 것은 각각 Fig. 5와 6과 같다. 다시마의 경우 Fr-1은 이동 거리가 가장 짧았다. 이는 황산기의 함량이 적기 때문으로 여겨지며 Table 3의 결과와 잘 일치되고 있다. Fr-2는 다시마의 부분정제 fucoidan과 거의 유사하게 3개 이상의 band로 이루어져 있었다. Fr-3은 비교적 균일하여 이동거리가 중간인 band는 검출되지 않았으나 2개의 band가 뚜렷히 검출되었다. 미역포자엽은 Fr-1은 검출되지 않았다. 이는 황산기 및 단당의 함량이 낮은 점(Table 3 참조)과 laminaran을 동일한 조건에서 전기 영동하여도 전계중 분산되어 검출되지 않는 점을 함께 고려해볼 때 하전량이 적고 분자량이 비교적 적은 다당으로 여겨진다. Fr-2는 부분 정제 fucoidan과 유사하게 주 band 아래에 희미한 band들이 분산되어 나타났다. Fr-3은 비교적 균일하였으나 이동거리가 큰 주 band 바로 밑에 희미한 band가 하나 더 검출되었다. 따라서 이온교환 크로마토그래피 방법으로는 다시마 fucoidan으로부터 단일 다당을 분획하기는 어려움을 알 수 있었다. 이는 *Pelvetia wrightii*와 *Ecklonia kurome*으로 부터 추출한 fucoidan을 이온교환 크로마토그래피로 분획한 결과 균일한 다당을 얻을 수 없었다고 한 기존의 보고와 일치한다(Anno et al., 1971; Nishino et al., 1989).

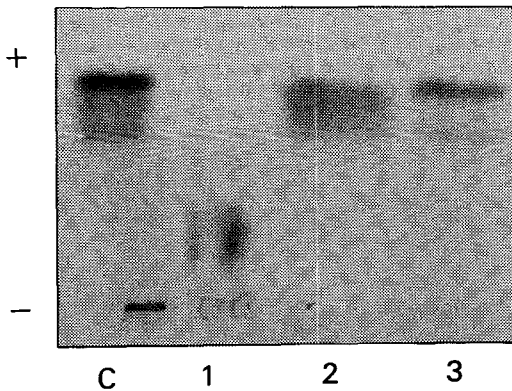


Fig. 5. Electrophoregram of the fractions separated from partially purified fucoidans of *L. religiosa*. C. Partially purified fucidan, 1. Fraction 1(FR-1) 2. Fraction 2(FR-2) 3. Fraction 3(FR-3)

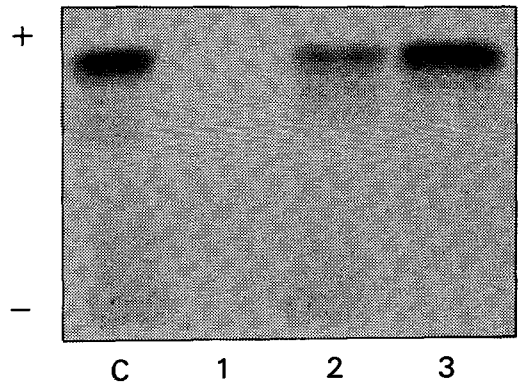


Fig. 6. Electrophoregram of the fractions separated from partially purified fucoidans of *U. pinnatifida*. C. Partially purified fucidan, 1. Fraction 1(FR-1) 2. Fraction 2(FR-2) 3. Fraction 3(FR-3)

한편 Mori et al.(1982)은 이온교환 크로마토그래피방법으로 분획한 미역포자엽의 fucoidan fraction이 전기영동상에서 단일 band로 나타났다고 보고하였다. 본 실험에서도 다시마에 비해 미역포자엽의 Fr-2와 Fr-3은 상당히 균일성을 나타내었으나 전기영동상에서 완전한 균일성을 나타내지는 못하였다. 이는 추출방법의 차이에 따른 fucoidan의 분산성 차이 및 전기영동의 방법의 차이로 인한 감도의 차이로 여겨진다.

5. 알콜분별침전법을 이용한 fucoidan의 정제 및 특성

1) 알콜분별침전법에 의한 fucoidan의 분획 및 전기영동

앞에서 나타낸 것처럼 이온교환 크로마토그래피방법 만으로는 균일한 fucoidan fraction을 얻을 수는 없었다. 따라서 DEAE-Sephadex A-25칼럼을 통해 분획한 fraction중 회수량 및 정제도를 고려하여 다시마와 미역포자엽의 Fr-3을 알콜분별 침전법으로 재분획하였다.

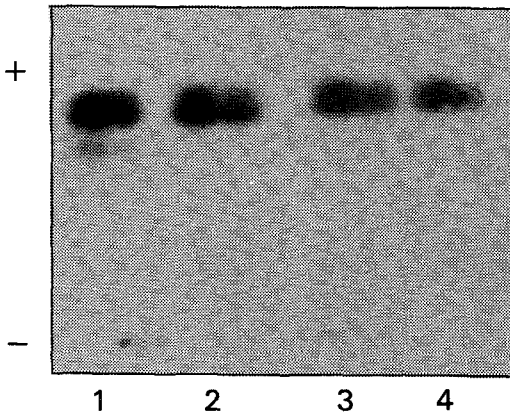


Fig. 7. Electrophoregram of the fractions obtained by ethanol precipitation of *L. religiosa* FR-3.

1. P-50; Fraction obtained by 40~50% ethanol concentration
2. P-60; Fraction obtained by 50~60% ethanol concentration
3. P-70; Fraction obtained by 60~70% ethanol concentration
4. P-80; Fraction obtained by 70~80% ethanol concentration

Fig. 7은 다시마의 전기영동 패턴을 나타낸 것이다. P-50과 P-60은 각각 3개 및 2개의 band가 검출되었으나 P-70과 P-80은 단일 band만 나타냈다. P-80은 수율이 극히 낮았으므로 P-70으로 다시마 fucoidan의 특성을 조사하였다.

Fig. 8은 미역포자엽의 전기영동 패턴을 나타낸 그림이다. 다시마와 동일하게 P-50과 P-60은 각각 3개 및 2개의 band가 검출되었으나 P-70과 P-80은 단일 band만 검출되었다. P-80은 다시마와 같이 수율이 낮아 P-70으로 미역 포자엽의 fucoidan 특성을 조사하였다.

2) 정제 fucoidan의 조성

알콜분별 침전법으로 정제한 다시마와 미역포자엽의 fucoidan의 조성은 Table 4와 같다. Fucoidan의 주요특성인 황산기의 함량은 다시마가 26.88%, 미역포자엽이 27.21%로 이온교환 크로마토그래피 분획 fraction에 비해 그 함량이 높았다. 이는 이온교환 크로마토그래피로 분획한 fucoidan이 정제됨에 따라 상대적으로 황산기의 함량이 증가되기 때문으로 여겨진다.

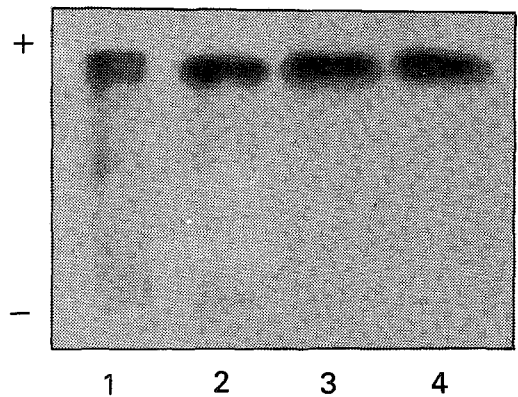


Fig. 8. Electrophoregram of the fractions obtained by ethanol precipitation of *U. pinnatifida* FR-3.

1. P-50; Fraction obtained by 40~50% ethanol concentration
2. P-60; Fraction obtained by 50~60% ethanol concentration
3. P-70; Fraction obtained by 60~70% ethanol concentration
4. P-80; Fraction obtained by 70~80% ethanol concentration

Table 4. Chemical composition of the purified fucoidans prepared by ion-exchange chromatography and alcohol precipitation¹

Species	Glucuronic acid (%) ²	Sulfate (%)	Protein (%)	Proportion of monosaccharides ³				
				Fuc	Gal	Glu	Man	Xyl
<i>L. religiosa</i>	1.49	26.88	1.18	69.04	23.43	2.85	4.69	tra ⁴
<i>U. pinnatifida</i>	1.34	27.21	0.21	50.24	47.91	1.01	-	0.84

¹ Mean of triplicate determination

² Determination by GC

³ Calculated from G.C. analysis, considering the total amounts under the five monosaccharides as 100%

⁴ Trace

우론산의 함량은 다시마가 1.49%, 미역포자엽이 1.34%였다. 또한 단백질 함량도 다시마가 1.18%, 미역포자엽이 0.21%로 정제도가 높아짐에 따라 상대적으로 함량이 감소하였다. 구성당의 조성은 다시마, 미역포자엽 모두 fucose가 각각 69.04%, 50.24%로 가장 많이 함유되어 있었다. Galactose의 함량은 미역포자엽의 경우 47.91%로 많이 함유되어 있었다. 그의 구성당으로 glucose, mannose, xylose가 검출되었다. 정제 fucoidan의 구성성분 mole비는 Table 5와 같다. 다시마, 미역포자엽의 fucose와 galactose의 mole비가 각각 1 : 0.31, 1 : 0.87로 미역포자엽의 경우 galactose의 mole비가 높음을 알 수 있다. Mori et al.(1982)은 미역포자엽으로 부터 추출한 정제 fucoidan의 fucose와 galactose의 mole비가 1 : 1.76으로 galactose가 오히려 더 많이 함유되어 있다고 하였다. 또한 전체당(우론산포함)에 대한 황산기의 mole비는 다시마가 1 : 1.6, 미역포자엽이 1 : 1로 다시마는 2 mole의 당에 3 mole의 황산기가 결합되어 있고 미역포자엽은 1 mole의 당에 1 mole의 황산기가 결합되어 있는 것으로 여겨진다. Dobashi et al.(1989)은 톱 정제 fucoidan의 전체당에 대한 황산기의 mole비가 fraction에 따라 1 : 0.6과 1 : 1.6이라고 하였고 Nishino et al.(1989)은 *E. kurome*의 정제 fucoidan의 mole비가 fraction에 따라 1 : 1.5, 1 : 1.7로 fraction에 따라 달라진다고 하였다. 또한 Mori et al.(1982)도 미역포자엽의 전체당에 대한 황산기의

mole비가 fraction에 따라 달라지며 1 : 1.1인 fraction의 항혈액응고능이 가장 우수하다고 하였다. 따라서 정제 fucoidan의 구성당에 대한 황산의 비율이 fraction에 따라 달라짐을 알 수 있다.

6. 젤 칼럼 크로마토그래피를 이용한 분자량 측정

다시마 및 미역포자엽 정제 fucoidan의 젤 칼럼 크로마토그램은 Fig. 9와 같다. 다시마 및 미역포자엽 모두 단일 피크를 나타내었으며 대체로 대칭성을 나타내었다. 따라서 분자량적으로 볼 때 균일함을 알 수 있다. 또한 다시마 정제 fucoidan의 분자량은 31,000이었고, 미역 포자엽은 38,000로 비교적 분자량이 적음을 알 수 있었다.

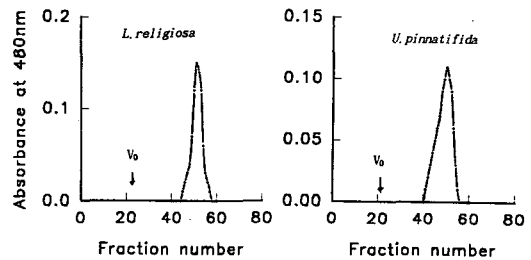


Fig. 9. Gel-filtration chromatography of purified fucoidans on Sepharose CL-6B; Fractions of 2.2ml were collected and assayed by the phenol-H₂SO₄ method.

Table 5. Molar ratios of the major constituents in purified fucoidans

Species	Molar ratio						
	Fuc	Gal	Glu	Man	Xyl	Sulfate	Glucuronic acid
<i>L. religiosa</i>	1	0.31	0.04	0.06	-	2.34	0.07
<i>U. pinnatifida</i>	1	0.87	0.02	-	0.02	1.99	0.05

요 약

국내산 갈조류로 부터 생리 기능이 우수한 수용성 식이섬유 소재를 개발하기 위한 기초자료를 얻기 위해 다시마와 미역(엽상체와 포자엽 각각)으로 부터 fucoidan을 추출, 정제하여 그 특성을 조사하였다.

Fucoidan의 추출 조건은 pH 2.0의 산성 추출액으로 65°C에서 1시간 씩 3회 추출을 하였고 cetylpyridinium chloride를 사용하여 부분 정제하였다. 부분 정제 fucoidan의 수율은 다시마 2.71%, 미역포자엽 6.65%, 미역 엽상체 0.40%였다. 특히 미역포자엽의 수율이 가장 높은 반면에 미역 엽상체는 가장 낮아 부위에 따른 차이가 매우 큼을 알 수 있었다.

DEAE-Sephadex A-25 이온 교환 칼럼으로 부분 정제 fucoidan을 분획한 결과 다시마, 미역포자엽 모두 3종의 fraction으로 분획되었고 각 fraction은 전기 영동상에서 2종 이상의 band가 검출되어 불균일함을 알 수 있었다. 이온 교환 칼럼으로 분획한 주fraction을 다시 알콜 분별 침전법으로 재분획한 결과 다시마와 미역포자엽은 에탄올농도 60~70%에서 침전된 fraction이 cellulose acetate 전기 영동 및 gel filtration chromatography상에서 균일성을 나타내었다. 균일하게 정제 된 fucoidan의 fucose : galactose : 황산기의 mole 조성비는 다시마, 미역포자엽이 각각 1 : 0.31 : 2.43, 1 : 0.87 : 1.99였다. 분자량은 다시마가 31,000, 미역포자엽이 38,000으로 비교적 적었다.

참 고 문 헌

Anno, K., Terahata, H., Hayashi, Y. and N. Seno. 1966. Isolation and Purification of Fucoidan from Brown Seaweed *Pelvetia wrightii*. Agr. Biol. Chem., 30, 495.
 AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th Edition. K. Helrich, ed. Association of Official Analytical Chemists, Virginia, U.S.A.
 Blakeney, A. B., Harris, P. J., Henry, R. J and B. A. Stone. 1983. A Simple and Rapid Preparation of Alditol Acetates for Monosaccharide Analysis.

Carbohydr. Res., 113, 291.
 Iizima-Mizui, N., Fujihara, M., Himeno, J., Komiyama, K., Umezawa, I. and T. Nagumo. 1985. Antitumor Activity of Polysaccharide Fractions. Kitassato Arch. of Exp. Med., 58, 59.
 Dobashi, K., Nishino, T., Fujihara, M. 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.
 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.
 Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and F. Smith. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Analysis Chem., 28, 350.
 Fujikawa, T. and K. Nakashima. 1975. Occurrence of Fucoidan Analogues in Brown Seaweed. Nippon Nogeikagaku Kaishi, 49, 455.
 Knutson, C. A. and A. Jeanes. 1968. A New Modification of the Carbazole Analysis. Anal. Biochem., 24, 470.
 Larsen, B., Haug, A. and T. J. Painter. 1966. Sulphated Polysaccharides in Brown Algae 1. Isolation and Preliminary Characterisation of Three Sulphated Polysaccharides from *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. Acta. chemica. scandinavica, 20, 219.
 Lehrfeld, J. 1987. Simultaneous Gas-Liquid chromatographic Determination of Aldoses and Alduronic Acids. J. Chromatography, 408, 245.
 Mori, H., Kamei, H., Nishide, H. 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.
 Mian, A. J. and E. Percival. 1973a. Carbohydrates of the Brown Seaweeds *Himantalia lorea*, *Bifucaria bifurcata*, and *Padina pavonia* Part II. Struc-

- tural Studies of the Fucan. Carbohydr. Res., 26, 147.
- Nishide, E., Anzai, H. and N. Uchida. 1987. A Comparative Investigation on the Contents of Fucose-Containing Polysaccharides from Various Japanese Brown Algae. Nippon Suisan Gakkaishi, 53, 1083.
- Nishino, T., Yokoyama, G., Dobashi, K., Fujihara, M. and T. Nagumo. 1989. Isolation, Purification, and Characterization of Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides from the Brown Seaweed *Ecklonia kurome* and their Blood-Acticoagulant activities. Carbohydr. Res., 186, 119.
- Nishino, T. and T. Nagumo. 1987. Sugar Constituents and Blood-anti coagulant Activities of Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides in Nine Brown Seaweed Species. Nippon Nogei-kagaku Kaishi, 61, 361.
- Seno, N., Anno, K., Kondo, K., S. Nagase and S. Saito. 1970. Improved Method for Electrophoretic Separation and Rapid Quantitation of Isomeric Chondroitin Sulfates on Cellulose Acetate Strips. Analytical. Biochem., 37, 197.
- 西澤一俊. 1988. 海藻の食物纖維. 月刊フドケミカル, 9, 47.
-
- 1994년 11월 7일 접수
1995년 1월 28일 수리