

홀파래에서 분리정제한 Rhamnan Sulfate의 특성

빈재훈 · 류병호*

부산시 보건환경연구원, *경성대학교 식품공학과

Characterization of Rhamnan Sulfate Purified from *Monostroma nitidum*

Jae Hoon Bin and Beung Ho Ryu

Pusan Health and Environment Institute

*Department of Food Science and Technology, Kyung Sung University

Abstract

The rhamnan sulfate extracted from green algae seaweed, *Monostroma nitidum* was characterized on sugars, sulfate compositions and molecular structure. Rhamnan sulfate was extracted with boiling water, and purified with two steps of cetylpyridinium chloride and ion exchange chromatography. The yield of crude rhamnan sulfate was about 2% from raw material. Rhamnan sulfate fraction, F-4 was composed of 30% rhamnose, 0.9% arabinose, 2.5% xylose, 2% glucose and 32.6% sulfate. Rhamnan sulfate F-4-3 obtained from F-4 fraction was composed of 36.8% rhamnose, 3.6% xylose, 2.7% glucose, 1.4% galactose and 30.8% sulfate. The molecular weight of F-4-3 fraction was estimated as 10,000-10,300 dalton with Sephacryl S-200 gel filtration chromatography.

Key words: Rhamnan sulfate, *Monostroma nitidum*, seaweed

서 론

해조류는 육상생물에 비하여 비타민 및 미네랄의 함량이 높고, 그 중에서 마그네슘, 칼슘, 요오드, 철 및 아연의 필수 미량원소가 함유되어 건강식품으로 많이 이용되고 있으며, 특히 해조류의 다당류는 그 특성이 독특하여 생리활성이 강한 물질로 알려지고 있다⁽¹⁾. 해조류 중에서도 미역, 다시마, 파래 등의 당류는 항암 및 면역활성^(2,3)과 고혈압 예방 및 항종양 활성이 있으며, 특히 김은 콜레스테롤 강하작용 및 항케양성 작용을 하는 것으로 알려져 있다⁽⁴⁾. 식용 해조류는 영양학적인 효과 뿐만 아니라 면역, 신경 및 내분비계에 생리적 효과가 있으며⁽⁵⁾ 해조류는 다당체를 다양하게 함유하고 있어 이들 중 alginate, fucoidan, carrageenan 및 agarose 등이 식품첨가물로 많이 이용되고 있고^(4,5), fucoidan은 항혈액응고 효과가 우수한 것으로 밝혀져 있다^(6,7). 또한 *Sargossum fulvellum*으로부터 추출된 알긴산과 *Sargossum kjellmanianum*으로부터 추출된 sul-

fated galactofucan은 이식한 murine tumor에 대한 숙주 매개형 항암작용이 알려져 있다⁽⁸⁾. 최근 몇 종류의 해조류 다당체, phospholipid 및 glycolipid 획분에서 숙주에 대한 면역기능은 아직 밝혀져 있지 않으나 쥐에 대한 항암효과가 있다고 보고된 바 있다⁽⁹⁾. 식용 해조류인 *porphyra*는 Ehrlich 및 Meth A fibrinosarcoma에 대하여 항암활성이 있으며⁽¹⁰⁾, *Laminaria angustata* von longissima는 열수로 추출한 sulfated polysaccharide가 쥐의 sarcoma-180 및 1210 leukemia에 대하여 항암효과가 있다고 보고된 바 있고⁽¹⁰⁾, sulfated polysaccharide는 구조와 그 조성비율에 따라 세포간, 세포와 간질 접착, 세포생장 및 유전자 발현등의 생물학적 기능을 갖는다⁽¹¹⁾. 이와 같이 해조류에 함유되어 있는 천연 다당체 중에는 생체의 기능을 조절할 수 있는 다양한 물질들이 함유되어 있으며, 해조류 다당체 중 5탄당의 함량이 높은 pentose sulfated polysaccharide는 구조적 특성이 있어 항혈액응고 효과 등 그 생리활성이 매우 높은 것으로 알려져 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다^(12,13).

본 연구는 항혈액응고 작용이 있다고 알려져 있는 sulfated polysaccharide를 홀파래로부터 분리 정제하여

Corresponding author: Beung Ho Ryu, Department of Food Science and Technology, Kyung Sung University, 110-1, Dae Yeun-dong, Nam-gu, Pusan 608-701, Korea

그 구조적 특성을 규명하고자 한다.

재료 및 방법

재 료

본 실험에 공시한 홉파래(*Monostroma nitidum*)는 진라남도 진도에서 1994년 6월에 구입하여 실험에 사용하였다.

Rhamnan sulfate의 분리

西澤一後의 방법⁽¹⁴⁾에 따라 분리하였다. 건조시킨 홉파래를 그 중량의 20배량의 증류수를 가하여 100°C에서 30분간 2회 반복하여 추출한 후 여포로 여과하여 감압 농축한 다음 4배 용량의 에탄올을 가하여 고분자 물질을 침전시켰다. 침전물을 10,000×g에서 30분간 원심분리시킨 후 다시 에탄올로 2회 세척하고 원심분리 후 건조하여 crude rhamnan sulfate를 얻었다.

총당의 정량

총당(total sugar)은 phenol sulfuric acid의 방법⁽¹⁵⁾에 의하여 실험하였으며, 표준품은 L-rhamnose (Sigma Co.)를 사용하였다. 0~200 µg의 당을 함유하는 시료 1 mg에 5% phenol-용액 1 ml를 가하고 여기에 5 ml의 진한 황산을 가한 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

당조성의 분석

시료 약 60 mg을 7%의 황산에 약 30분간 가용화한 후 약 4% 농도의 황산용액이 되도록 증류수를 가하고 이 용액을 고압솥에서 100°C로 2시간동안 산 가수분해하여 내부 표준물질로서 methyl β-D-glucoside를 가하고 탄산바리움으로 중화한 후 alditol acetate를 만들어 gas chromatography법으로 분석하였다⁽¹⁶⁾.

염산 처리에 의한 rhamnan sulfate의 분리

시료인 건조 홉파래를 열수 추출하기 전에 염산으로 탈색처리를 하였다. 건조 홉파래 50 g을 2%염산 600 ml를 함유한 50% 에탄올에 2시간 침지시켜 여과한 후 그 잔사를 다시 동일조작으로 염산함유 50% 에탄올로 1시간동안 침지시킨 다음 여과하였으며, 다시 물에 침지 후 잔류되어있는 산을 중화시키고 수세하여 건조한 후 rhamnan sulfate를 추출하였다⁽¹⁴⁾.

Amylase 처리에 의한 rhamnan sulfate의 분리

열수 추출한 조추출물 중의 α-glucan을 제거하기

위하여 α-amylase로 처리하였다. 건조시료 100 g에 2,000 ml의 증류수를 가하고 100°C에서 30분간 열수로 추출하였다. 여기에서 얻은 추출액을 3등분하여 pH 6.0으로 조정된 후 1% α-amylase (100,000 unit, Sigma Co.) 용액을 각각 0, 10 ml 및 30 ml씩 가하여 30°C에서 3일간 반응시켜 3종류의 rhamnan sulfate를 얻었다.

음이온 교환 크로마토그래피에 의한 rhamnan sulfate의 정제

추출한 rhamnan sulfate 약 500 mg을 50 ml의 증류수에 용해시키고 황산나트륨 100 mg을 가한 후 cetylpyridinium chloride (CPC) 1.5 g을 가하여 rhamnan sulfate와의 복합체를 침전시켰다. 이를 증류수에 녹인 다음 음이온 교환수지(DEAE TOYOPEARL 650M) column (3.2×50 cm)에 흡착시킨 후 0~2.0 M NaCl/0.01 N HCl (stepwise)로 1 ml/min씩 용출시켰다. 용출액 중의 총당 함량은 L-rhamnose를 표준품으로 한 phenol sulfuric acid 방법으로 측정하였으며, 당조성은 gas chromatography법으로 분석하였다⁽¹⁵⁾.

Gel filtration chromatography

Rhamnan sulfate의 분자량을 측정하기 위하여 Sephacryl S-200 (2.4×100 cm)을 사용한 gel filtration chromatography를 실시하였다. 표준품으로는 dextran (M. W. 10,000, 40,000, Sigma Co.)과 150,000, 480,000 (Pharmacia Co.)을 사용하였고, 용출액은 0.1 M NaCl 용액이었으며 유속은 1.0 ml/min로 5 ml씩 분획하였다.

전기영동

Rhamnan sulfate의 균일성은 cellulose-acetate막을 사용한 전기영동을 실시하여 확인하였다. 시료를 1 mg/ml-용액으로 조제하여 cellulose-acetate막 Sephaphore III (57×127 mm)에 1 µl를 점적하여 전기영동을 하였다. 이때의 전기 용매는 ① 1.0 M acetic acid-pyridine (pH 3.5), 20분, 0.5 mA/cm ② 0.2 M calcium acetate, 3시간, 1.0 mA/cm ③ 0.1 N HCl로서 2.5시간, 1.0 mA/cm를 각각 사용하였으며, toluidine-blue로 염색하여 확인하였다⁽¹⁷⁾.

적외선 흡수 Spectrum

Rhamnan sulfate 중 당쇄와 황산기의 결합을 확인하기 위하여 적외선흡수 spectrometer (Jasco FT-IR-5300, Japan)를 이용하였다. 시료 약 4 mg과 KBr 100 mg을 혼합하여 투명한 정제를 성형하여 적외선 흡수

Table 1. Composition of rhamnan sulfate standard and rhamnan sulfate M or rhamnan sulfate L-HCl extracted from *Monostroma nitidum*

Rhamnan sulfate	content (%)							
	Sulfate	Sugar ¹⁾	Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glu
Rhamnan sulfate standard	32.7	67.3	67.3	ND ²⁾	ND	ND	ND	ND
Rhamnan sulfate M	32.0	68.0	48.4	2.3	5.3	2.3	2.5	7.2
Rhamnan sulfate L-HCL	31.6	68.4	50.7	2.2	4.9	2.2	2.8	5.6

¹⁾Determined by phenol sulfuric acid method

²⁾Not detected

spectrum을 측정하였다.

결과 및 고찰

Rhamnan sulfate의 분리

해양 녹조류인 홀파래(*Monostroma nitidum*)에서 rhamnan sulfate를 열수(熱水)로 분리하는 방법을 채택하였다⁽¹³⁾.

홀파래(*Monostroma nitidum*) 건조시료 1 kg을 열수 처리하여 약 2.0%에 해당하는 rhamnan sulfate를 함유한 fraction으로부터 rhamnan sulfate M을 얻었고, 염산으로 탈색처리한 후 열수로서 추출하여 다당체를 얻은 것을 rhamnan sulfate L-HCl이라 하였다. 이때 홀파래를 열수추출하기 전에 염산으로 탈색처리한 후 중화하지 않고 추출하면 다당류는 산가수분해가 일어나 수율이 떨어질 염려가 있으므로 염산을 완전히 중화시킨 후 추출하면 수율에 큰 영향이 없이 다당체를 추출할 수 있었다.

그리고 rhamnan sulfate M 및 rhamnan sulfate L-HCl을 rhamnan sulfate 표준품(東和化成, 일본)과 비교 분석한 결과는 Table 1과 같다.

한편 rhamnan sulfate M 및 rhamnan sulfate L-HCl의 가수분해물에 대한 gas chromatogram은 Fig. 1과 같다.

Table 1에서 보는 바와 같이 열수로 추출한 rhamnan sulfate M은 염산으로 처리한 rhamnan sulfate L-HCl에 비하여 sulfate, rhamnose 및 glucose의 함량도 높았다. Rhamnan sulfate M은 rhamnose의 함량이 다른 구성당에 비하여 매우 높아 바람직하지만 glucose 함량이 다른 6탄 당에 비하여 약간 높아 glucose를 제거하기 위하여 분리정제가 요구된다. 따라서 glucose의 제거를 위하여 rhamnan sulfate M에 α -amylase용액을 가하여 가수분해하였다. Table 2는 glucose를 제거하기 위하여 rhamnan sulfate M을 1% amylase 10 ml로 처리한 rhamnan sulfate M-amyl-1 과 30 ml로 처리

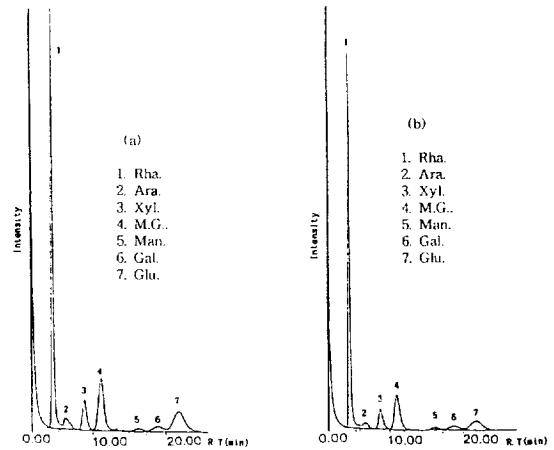


Fig. 1. Gas chromatograms of rhamnan sulfate M and rhamnan sulfate L-HCl obtained from *Monostroma nitidum* (a) Rhamnan sulfate M ; 4. M.G., Methyl β -D-glucoside, (b) Rhamnan sulfate L-HCl

한 rhamnan sulfate M-amyl-2에 대하여 다당체를 분석한 결과이다.

Rhamnan sulfate M-amyl-1 및 rhamnan sulfate M-amyl-2를 rhamnan sulfate M과 비교할 때 glucose의 함량이 감소하는 것을 볼 수있었으며, 구성당의 조성은 비슷하였으므로 이후의 실험에 사용되는 rhamnan sulfate는 rhamnan sulfate M을 사용하였다.

Rhamnan sulfate의 정제

산성물질을 음이온 교환체에 흡착시켜 염농도를 변화시키면서 용출하면 이온의 친화력이 약한 순으로 용출한다. 이 성질을 이용하여 rhamnan sulfate M을 정제하였다. 분자량이 큰 산성당은 암모늄 이온과 복합체를 형성하여 침전되는 성질을 이용하여 cetyl pyridinium chloride (CPC)로 정제하였다. 해조류에서 다당체의 CPC에 의한 정제는 fucoidan을 정제한 바와

Table 2. Content of sugars and sulfate of various rhamnan sulfate treated with α -amylase

Rhamnan sulfate	content (%)							
	Sulfate	Sugar	Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glu
Rhamnan sulfate M	32.0	68.0	48.4	2.3	5.3	2.3	2.5	7.2
Rhamnan sulfate M-amyl-1 ¹⁾	30.4	69.6	51.8	1.6	5.6	2.0	2.5	6.1
Rhamnan sulfate M-amyl-2 ²⁾	29.8	70.2	53	2.0	5.1	1.7	2.2	5.8

¹⁾rhamnan sulfate M hydrolyzed with 1% α -amylase (10 ml)

²⁾rhamnan sulfate M hydrolyzed with 1% α -amylase (30 ml)

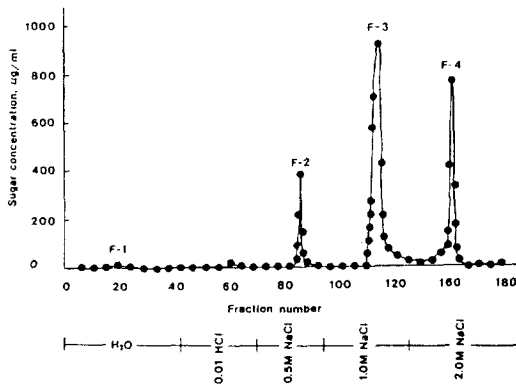


Fig. 2. Anion exchange chromatogram by elution of stepwise method

같이, fucoidan은 polymer의 fucose잔기에 황산이 에 스텔 결합을 하고 있다⁽¹⁹⁻²¹⁾. Rhamnan sulfate M의 CPC와의 복합체를 3.0 M CaCl₂ 용액에 용해시키고 2배 용량의 에탄올로서 황산 다당을 침전시키는 조작을 반복하고 이를 음이온 교환 크로마토그래피에 의하여 분리한 결과는 Fig. 2와 같다. 이때 증류수 및 0.5 M, 1.0 M, 2.0 M의 염화나트륨 용액으로 용출한 획분을 F-1, F-2, F-3 및 F-4로 명명하였다. 각 획분을 모아 투석막에 넣은 후 다시 증류수로 약 24시간 투석한 후 동결 건조하여 보관하면서 실험에 사용하였다. 이들 획분물의 gas chromatogram은 Fig. 3과 같다. F-1 및 F-2는 sulfate가 거의 함유되지 않았으며, rhamnose도 F-3 및 F-4에 비하여 매우 낮은 결과를 보였으나 F-1은 rhamnose가 7.0% 정도이며, F-2에서는 8.9%로서 F-1보다 F-2가 rhamnose의 함량이 다소 높았고, F-2에서는 glucose의 함량은 16.7%로서 매우 높았다. F-3 및 F-4는 rhamnose가 각각 26.2% 및 30.0%로서 많이 함유되어 있고, sulfate도 F-3이 32.3%, F-4이 32.6%로서 그 함량이 매우 높았다. 따라서 획분 중 F-4는 sulfate, rhamnose의 함량이 F-3보다 높기 때문에 앞으로

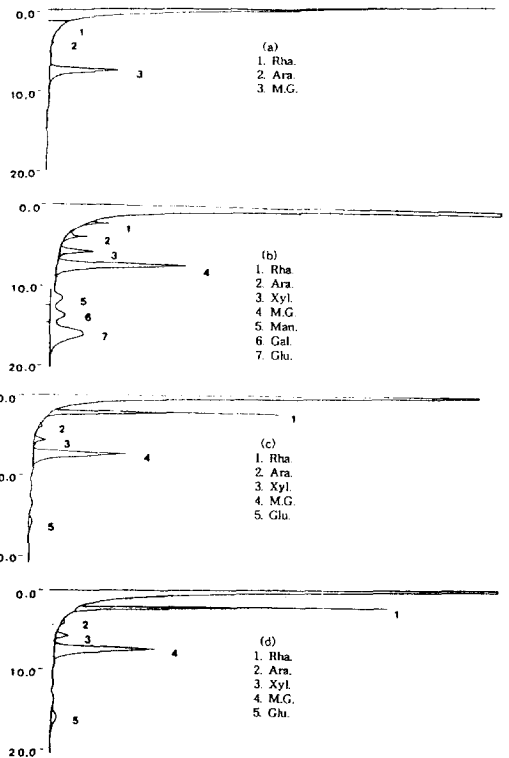


Fig. 3. Gas chromatogram of each fraction (a) Fraction F-1, (b) Fraction F-2, (c) Fraction F-3, (d) Fraction F-4; M.G. Methyl β -D-glucoside

의 실험을 F-4로 하였다. Rhamnan sulfate F-4를 더욱 분리 정제하기 위하여 용출조건으로 염화나트륨 용액을 0~1.5 M로 변화시키면서 음이온 교환 크로마토그래피를 시행한 결과는 Fig. 4와 같다.

한편 Table 3에서 보는 바와 같이 본 정제과정에서 나타난 peak F-4를 획분한 결과는 F-4-1, F-4-2 및 F-4-3로 나타내었다. 이들 획분에 대한 분석치는 F-4-1, F-4-2 및 F-4-3의 획분에서 rhamnose의 양은 각각 33.7%, 35.0%, 36.8%이었다. F-4의 획분인 F-4-1, F-4-2 및 F-

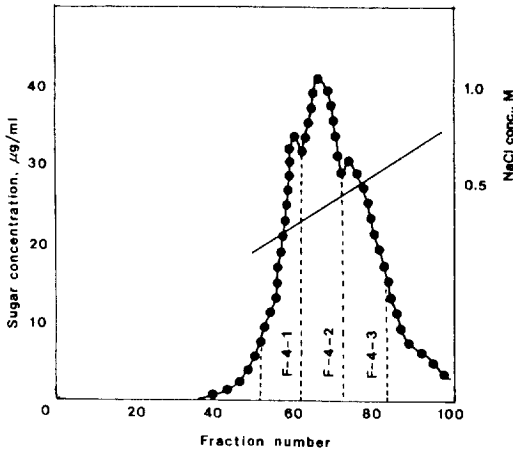


Fig. 4. Anion exchange chromatogram of rhamnan sulfate F-4 fraction by elution of linear gradient method

Table 3. Composition of fraction F-4-1, F-4-2 and F-4-3 obtained from rhamnan sulfate M

Fraction No	Content (%)						
	Sulfate	Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glu
F-4-1	26.0	33.7	1.1	4.0	0.5	1.2	1.6
F-4-2	28.2	35.0	1.0	2.9	0.4	1.4	2.2
F-4-3	30.8	36.8	0.8	3.6	0.8	1.4	2.7

4-3의 rhamnose는 전체당의 약 80%를 차지하였다. 이와같이 rhamnan sulfate을 정제한 결과 총당(total sugar)에 대한 구성당 비율의 변화는 Fig. 5에서와 같다. Rhamnan sulfate M은 rhamnose의 함량이 총당의 71.5%에 비하여 F-4-1, F-4-2 및 F-4-3의 총당은 각각 80.0%, 81.6% 및 79.8%로서 함량이 많았다. 이는 정제를 거듭할수록 rhamnose의 함량비율이 약간씩 증가하는 것을 볼 수 있다.

Rhamnan sulfate의 균일성

Rhamnan sulfate의 균일성 여부를 확인하기 위하여 rhamnan sulfate의 표준품을 대조로 하여 chondroitin sulfate, rhamnan sulfate M과 음이온교환 크로마토그래피로 얻은 fraction F-4-1 및 F-4-3을 cellulose acetate 막상에서 전기영동한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 이 결과에서 chondroitin sulfate와 각 fraction F-4-1, F-4-3를 rhamnan sulfate 표준품과 비교할 때 모두 단일 band를 나타내고 있어 순도가 높은 것으로 추정할 수 있었으나 rhamnan sulfate M은 rhamnan sulfate 표준품과 동일 R치에 band가 확인되었고 그 하단에 또 하나의 band가 확인되어 낮은 순도임을 알 수 있었다.

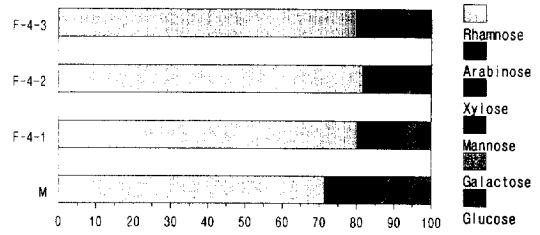


Fig. 5. Percentage of sugar composition of purified rhamnan sulfate

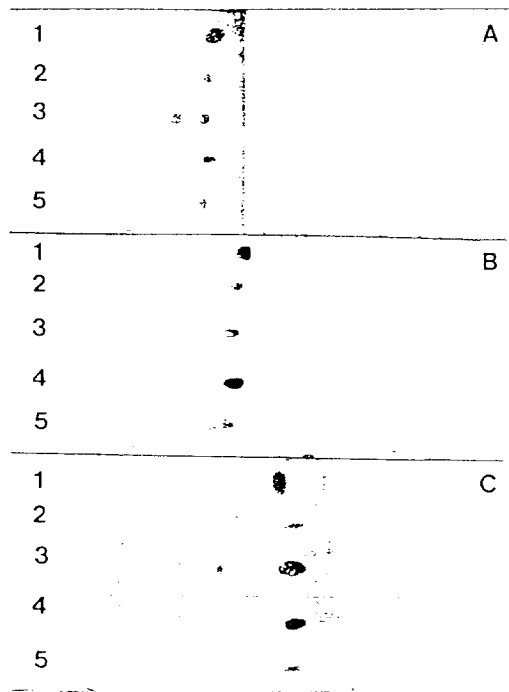


Fig. 6. Electrophoresis of rhamnan sulfate; rhamnan sulfate standard (1), chondroitin sulfate (2), rhamnan sulfate M (3), Fraction F-4-1 (4), Fraction F-4-3 (5) (a) 1.0 M acetic acid-pyridine (pH 3.5), (b) 0.2 M calcium acetate, (c) 0.1 M HCl

분자량의 추정

Rhamnan sulfate F-4-3 획분의 분자량을 추정하기 위하여 gel filtration chromatography한 결과는 Fig. 7과 같다. 분자량 10,000, 200,000 및 40,000의 dextran (Sigma Co.)과 분자량 150,000의 dextran (Pharmacia Co.)을 표준품으로 얻은 표준품곡선으로부터 F-4-3 획분 rhamnan sulfate의 분자량을 확인한 결과 10,100~10,300 정도이었다. 지금까지 보고된 해조 다당류의 분자량과 비교해 보면 *Lessonia nigrescens* (M.W. 670,000)⁽²²⁾, *Ascoseira mirabilis* (M.W. 500,000)⁽²⁰⁾, *Hizikia fusiforme* (M.W. 42,000과

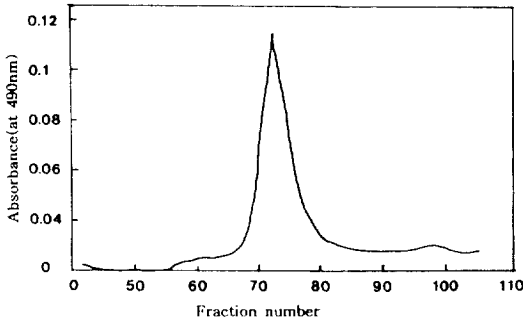


Fig. 7. Gel filtration chromatogram of rhamnan sulfate F-4-3 fraction

95,000)의 분자량⁽²⁰⁾보다 매우 적으나 곰피(M.W. 21, 000~23,000)⁽²¹⁾보다는 약간 적었다.

요 약

홀파래(*Monostroma nitidum*)로부터 sulfated polysaccharide를 분리정제하여 그 구조적 특성을 조사하였다. 홀파래로부터 유황 함유 다당체인 rhamnan sulfate를 열수에 의하여 추출하였고, 이를 음이온 교환 chromatography에 의하여 정제하였다. Rhamnan sulfate을 더 정제하기 위하여 음이온 교환 크로마토그래피에서의 rhamnan sulfate F-4의 획분에서 황산기와 rhamnose의 함량이 높은 것을 확인하였고, 당의 조성은 30% rhamnose, 0.9% arabinose, 2.5% xylose, 및 2.0% glucose이었고, sulfate도 32.6%로서 그 함량이 높았다. F-4를 다시 분획한 경로가 획분중 F-4-3은 당 조성이 36.8% rhamnose, 0.8% arabinose, 3.6% xylose, 0.8% mannose, 1.4% glucotose 및 2.7% glucose이었고, sulfate는 30.8% 정도이었다. 홀파래로부터 분리 정제한 rhamnose의 함량은 총당에 대하여 rhamnan sulfate M이 71.5%였고, 이의 획분인 F-4-1, F-4-2 및 F-4-3은 각각 80.0%, 81.6% 및 79.8%이었다. Rhamnan sulfate의 특성은 표준품과 비슷한 균일성을 나타내었으며, 분자량은 dextran을 표준품으로하여 Sephacryl S-300 gel filtration chromatography를 행한 결과 F-4-3 획분의 분자량이 10,000~10,300 정도이었다.

문 헌

1. Aleem, A. A.: Potential bioassay of natural seawaters and influence of certain trace elements on the growth of phytoplankton organisms. *Helgolander Wiss. Meeresunters.*, **20**, 229 (1970)
2. 이영숙, 김동석, 류병호, 이성호 : 파래와 곰피에서 추출

- 한 당단백질의 Sarcoma-180 cell에 대한 항암효과 및 면역활성. *한국영양식량학 회지*, **21**, 544 (1992)
3. 조경자, 이영숙, 류병호 : 청각과 김에서 추출한 당단백질의 Sarcoma-180에 대한 항암효과 및 면역활성. *한국수산학회지*, **23**, 345 (1990)
4. 岡見吉郎 : 海洋生物から醫藥品へツセン. *化學と工業*, 620 (1988)
5. Scheuer, P. J.: *Marine Natural Products*. Academic Press., P.251 (1978)
6. Hurch, F. C., Meade, J. B., Treanor R. E. and Whinna, H. C.: Antithrombotic activity of fucoidan with heparin cofactor II, antithrombin III and thrombin. *J. Biol. Chem.*, **6**, 3618 (1989)
7. Llier, S., Fischer, A. M., Tapon-Bretaudiere J., Boisson-Vidal C., Durand, P. and Jozefonvicz, J.: Anticoagulant Properties of a fucoidan fraction. *Thromb. Res.*, **64**, 143 (1991)
8. Yosgizawa, Y., Enomoto, A., Todoh, H., Anetani, A. and Kaminogawa, S.: Activation of marine macrophages by polysaccharide fraction from narine algae, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1862 (1993)
9. 大東肇, 小清水弘一 : 食品植物および海藻類の發癌フロモシヨ抑制と活性物質. *Nippon Nogekagaku Kaishi.*, **67**, 31 (1993)
10. Noda, H., Amano, H., Arashima, K., Hashimoto, S and Nisizawa, K.: *Nippon Suisan Gakkaishi.*, **55**, 1259 (1989)
11. Wight T. N, kinsella M. G and Qwamstrom, E.: The role of prote-oglycans in cell adhesion, migration and proliferation. *Cur. Op. Cell Biol.*, **4**, 793 (1992)
12. Watanabe, I.: Current to topics in marine biotechnology. *Tech Press*, **11** (1989)
13. Fujihara, M., Iizima, N., Yamanoto, I. and Nagumo, T.: Purification and chemical and physical characterization of an antitumor polysaccharide from the brown seaweed, *Sargassum fulvellum*. *Carbohydrate Res.*, **125**, 97 (1984)
14. 西澤 俊 : 海藻多糖の生理作用. *生化學*, **61**, 605 (1989)
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 (1956)
16. Sloneker, J. H.: Gas-liquid chromatography of alditol-acetates. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, Academic Press, New York, Vol. VI, p.20 (1972)
17. 川合阿武 : ムコ多糖實驗法 I (化學の領域増刊96號) p. 49. Japan (1986)
18. 日本分析化學會 北海道支部編 : 水の分析. 化學同人, p. 178 (1981)
19. Percival, E., Venegasjara, M. F. and Weigel, H.: Structural studies of the water soluble fucan from *Lessonia nigrescens*. *Carbohydrate Res.*, **126**, 283 (1984)
20. Finch, P., Percival, E., Slaiding, I.T. and Weigel, H.: Carbohydrates of the antarctic brown seaweed, *Ascoseira Mirabilis*. *Phytochem.*, **25**, 443 (1986)
21. 이홍수, 진성현, 김희숙, 류병호 : 곰피에서 정제된 fucoidan sulfate의 특성. *한국식품과학회지*. **27**, 716 (1995)
22. Percival, E., Venegasjara, M. F. and Weigel, H.: Structural studies of the water soluble fucan from *Lessonia nigrescens*. *Carbohydrate Res.*, **126**, 283 (1984)