

국내외기술정보

국내산 갈조류로부터 추출, 정제한
Fucoidan의 화학적 특성

구 재 근
수산물 이용 연구부

I. 서 론

갈조류에는 Ca을 비롯한 무기질과 다당류가 다량 함유되어 있다. 알긴산은 그 대표적인 다당으로 현재 점증제등의 식품첨가물로 이용되고 있으나 용해성이 낮고 또한 고점성으로 인하여 그 이용이 오히려 제한되고 있는 실정이다. 또한 갈조에는 중성 다당인 laminaran과 황산기를 함유한 산성다당이 다량 함유되어 있는데 그 대표적인 함황 산성다당은 fucoidan이다.

Fucoidan은 모든 갈조류에 존재하는 수용성 다당류로 가수분해물 중에 L-fucose가 함유되어 있는 것이 밝혀짐에 따라 처음엔 fucidin으로 명명되었다가 지금은 다당의 명명법에 따라 fucoidan으로 불리어지고 있다. Fucoidan은 혈액중에 존재하는 함황 산성다당인 heparin과 그 구조 및 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.

본 연구에서는 국내 연안의 대표적인 갈조류인 미역, 다시마, 툇 및 모자반으로부터 fucoidan을 추출, 정제하여 그 화학적 특성을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료

실험에 사용한 갈조는 국내 연안에서 다량으로 양식되고 있는 미역엽상체(줄기포함, *Undaria pinnatifida*), 미역 포자엽(일명, 미역귀 : Sporophylls of *Undaria pinnatifida*), 툇(*Hijikia fusiforme*), 모자반(*Sargassum fulvellum*) 및 다시마(*Laminaria religiosa*)를 사용하였다. 미역 엽상체와 포자엽은 1993년 2월 20일 경남 양산군 기장읍 양식장에서 구입하였고 툇, 모자반, 다시마는 1993년 2월 22일 부산 공동어시장에서 각각 생시료를 구입하였다. 현지에서 48시간 천일 건조시킨 후 실험실에 운반하여 40°C 열풍 건조기로 12시간 건조시켰다. 건조된 시료를 분쇄기로 분쇄한 후 20mesh 체로 걸러 통과한 분말을 데시케이타에 보관하여 두고 실험에 사용하였다.

2. Fucoidan의 추출

Fucoidan의 추출은 Anno(1966)와 Iizima-Mizui(1985)의 방법에 준하여 그림 1과 같이 실시하였다.

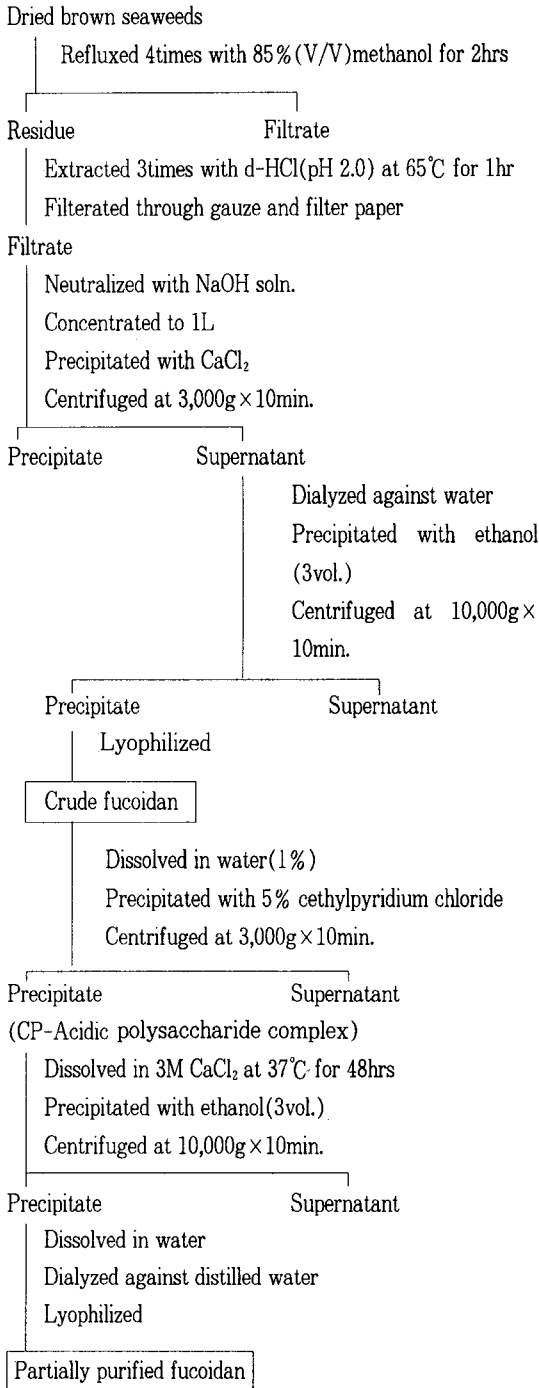


Fig.1. Preparation procedure of partially purified fucoidans from dried brown algae.

3. Fucoidan의 정제

DEAE-Sephadex A-25 칼럼 (20mm×700mm)을 이용하여 부분 정제 fucoidan을 분획한 후 각 시료의 주요 획분을 다시 알콜 분별 침전법으로 정제하였다(Nishino등, 1991).

4. 정제 Fucoidan의 구조적 특성

4.1 Methanolysis 및 methylation

정제 fucoidan의 황산기 결합위치 분석을 위해 Nishino등(1991)의 방법에 따라 methanolysis하였다(그림 2). 또한 fucoidan내의 구성당의 결합 위치를 결정하기 위해 Taylor와 Conrad(1987)와 Harris(1984)의 방법에 따라 methylation분석을 하였다.

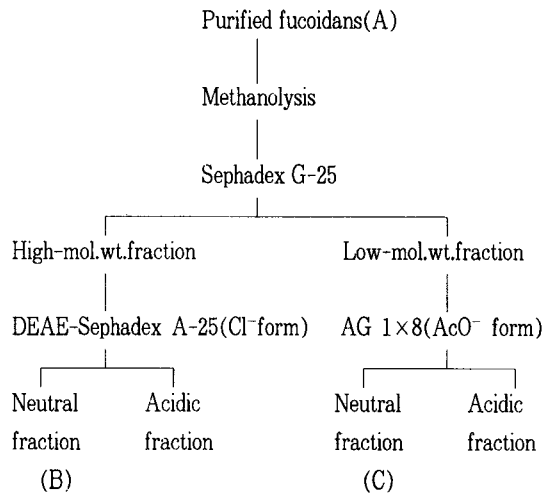


Fig.2. Fractionation of purified fucoidans by methanolysis.

4.2 정제 Fucoidan의 FT-IR(Fourier Transform Infrared Spectrophotometer) 측정

정제한 fucoidan의 황산기 결합 위치 및 주요 반응기의 특성을 조사하기 위하여 KBr pellet형태

로 시료를 조제하여 FT-IR(BRUKER사, IFS66)을 이용하여 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 부분정제 Fucoidan의 수율 및 그 조성

1.1 부분정제 Fucoidan의 수율

그림 1의 방법에 따라 갈조류 시료에서 추출한 조fucoidan과 부분 정제 fucoidan의 수율은 표 1과 같다. 조fucoidan의 수율은 미역 포자엽이 12.75%로 가장 높았고 다음은 툃 4.85%, 다시마 4.76%, 모자반 4.33%, 미역 1.73%순이었다. 미역 포자엽의 조fucoidan의 함량이 탄수화물의 함량이 가장 많은 다시마보다 높았다. Cellulose의 함량이 다시마는 7.6%, 미역이 4.0%로 다시마의 cellulose의 함량이 높다는 보고(西澤, 1998)로 미루어 볼때 미역포자엽에 상대적으로 수용성 다당의 함량이 높기 때문에 여겨진다. 부분정제 fucoidan의 수율은 미역 포자엽이 6.65%로 가장 높았으며, 다음으로 다시마 2.71%, 툃 2.51%, 모자반 1.56%, 미역엽상체 0.4% 순이었다. 또한 조fucoidan내의 부분 정제 fucoidan의 함유 비율은 다시마, 툃, 미역포자엽, 모자반, 미역엽상체 순으로 각각 56.93%, 52.29%, 52.16%, 36.13%, 23.19%였다. 시료별 함유 비율의 차이는 각각 시료별 조fucoidan내에 함유되어 있는 단백질과 중성당인 laminaran 등의 함량 차이 때문으로 여겨진다.

기준에 보고된 정제 fucoidan의 수율은 열수 추출시 다시마 3.32%, 툃 2.95%, 모자반 2.57%, 미역포자엽 9.4%, 미역 엽상체가 0.7%였고 산성 용액(pH 2.0) 추출시에 툃 4.0%, 모자반 0.3%였다(Nishide, 1987; 西澤, 1988; Fujikawa, 1975; Nishino, 1989). 본 실험의 결과가 기존의 보고에 비교하면 시료 종간의 경향은 유사하나 수율이 낮은 결과를 나타내었다. 이러한 수율 차이는 시료의

서식장소, 채취시기, 추출방법 및 정제도에 따른 차이로 여겨진다.

특히, 미역의 부위에 따른 fucoidan의 함량 차이가 현저하여 미역포자엽은 6.65%, 미역엽상체는 0.4%로 약 17배 차이가 났다. 따라서 이 후의 실험에 있어서는 fucoidan의 함량이 적은 미역 엽상체 부위는 제외하고 미역 포자엽만을 미역 시료로 하였다.

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

Species	Partially purified fucoidan		% of crude fucoidan
	Crude fucoidan % of brown seaweed	% of brown seaweed	
<i>L.religiosa</i>	4.76	2.71	56.93
<i>U.pinnatifida</i> I ^c	1.73	0.40	23.19
<i>U.pinnatifida</i> II ^d	12.75	6.65	52.16
<i>H.fursiforme</i>	4.85	2.51	52.29
<i>S.fulvellum</i>	4.33	1.56	36.13

a Mean of triplicate experiments

b Dry weight basis

c Blade of *U. pinnatifida*

d Sporophylls of *U.pinnatifida*

1.2 부분정제 Fucoidan의 구성성분

부분정제 fucoidan의 구성성분은 표 2와 같다. Fucoidan의 주요 특성인 sulfate의 함량이 다시마 32.63%, 미역포자엽 32.45%, 툃 25.44%, 모자반 20.49%순으로 그 함량이 높았으며, uronic acid의 함량은 모자반 17.84%, 툃 12.27%, 다시마 10.28%, 미역포자엽 7.21%순이었다.

기존의 정제 fucoidan의 조성에 관한 보고로는 열수추출시 sulfate와 uronic acid의 함량이 다시마가 각각 53.0%, 13.8%였으며 툃은 각각 30.0%, 10.0%였다(Nishide, 1987). 산성용액으로 추

출시 sulfate와 uronic acid의 함량은 톳이 각각 22.7%, 22.4%였으며 모자반은 17.0%, 21.3%였다(Nishino, 1987). 본 실험의 결과는 기존의 보고에 비해 sulfate함량은 열수추출한 경우에 비해 낮았으나 산성추출한 기존의 보고와는 비슷하였다. 그러나 uronic acid의 함량은 오히려 열추출한 기

존의 보고와 유사하였다. 이는 fucoidan이 갈조내에서 알긴산및 단백질과 결합된 형태로 존재한다는 Larsen등(1966)의 보고에 미루어 볼 때 추출 방법에 따른 분해 정도의 차이로 인해 조성이 달라지는 것으로 여겨진다.

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

Species	Uronic acids(%)	Sulfate (%)	Protein (%)	Proportion of monosaccharides(%) ^c				
				Fuc	Gal	Glu	Man	Xyl
<i>L.religiosa</i>	10.28	32.63	6.30	80.43	11.32	tra ^d	1.16	7.09
<i>U.pinnatifida</i>	7.21	32.45	2.44	57.11	42.17	tra ^d	0.72	tra ^d
<i>H.fursiforme</i>	12.27	25.44	5.47	74.68	11.29	0.54	0.69	12.79
<i>S.fulvellum</i>	17.84	20.49	1.79	64.29	21.00	0.70	0.93	13.08

a Mean of triplicate determinations

b Dry weight basis

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

d Trace

구성당의 조성비는 fucose가 종에 관계없이 57.11%에서 80.43%로 가장 많이 함유되어 있다. 미역포자엽, 모자반, 다시마는 galactose가 각각 42.17%, 21.00%, 11.32%로 fucose 다음으로 함량이 높았으나 톳은 xylose가 12.79%로 galactose보다 많이 함유되어 있었다. 그외 미량으로 mannose가 1.16%에서 0.69% 정도 함유되어 있었고 glucose는 다시마와 미역 포자엽, 미역에는 검출이 되지 않았으며 톳과 모자반에 각각 0.54%, 0.70% 함유되어 있었다. 특징적으로 미역 포자엽은 galactose의 함량이 높아 fucose와 galactose의 몰비가 1 : 0.66이었다. 이는 미역엽상체 및 포자엽에서 추출한 산성당당은 galactose의 함량이 높다는 기존의 보고와 일치하였다(Fujikawa, 1975; Mori, 1982).

2. 정제 Fucoidan의 조성

부분 정제 fucoidan을 ion-exchange chromatography 및 알콜분별 침전법으로 정제한 fucoidan의 조성은 표 3과 같고 정제 fucoidan의 구성성분 mole비는 표 4와 같다. 다시마, 미역포자엽, 톳, 모자반의 fucose와 galactose의 mole비가 각각 1 : 0.31, 1 : 0.87, 1 : 0.66, 1 : 0.24로 미역포자엽의 경우 galactose의 mole비가 높음을 알 수 있다. Mori등(1982)은 미역포자엽으로 부터 추출한 정제 fucoidan의 fucose와 galactose의 mole비가 1 : 1.76으로 galactose가 오히려 더 많이 함유되어 있다고 하였다. 또한 전체당(uronic acid포함)에 대한 황산기의 mole비는 다시마가 1 : 1.6, 미역포자엽이 1 : 1, 톳이 1 : 1.5, 모자반이 1 : 1.1로 다시마와 톳은 2 mole의 당에 3 mole의 황산

기가 결합되어 있고 미역포자엽과 모자반은 1 mole의 당에 1 mole의 황산기가 결합되어 있는 것으로 여겨진다.

Table 3. Chemical composition of the purified fucoidans prepared by ion-exchange chromatography and alcohol precipitation^a

Species	Glucuronic acid(%) ^b	Sulfate (%)	Protein (%)	Proportion of monosaccharides ^c				
				Fuc	Gal	Glu	Man	Xyl
<i>L.religiosa</i>	1.49	26.88	1.18	69.04	23.43	2.85	4.69	tra ^d
<i>U.pinnatifida</i>	1.34	27.21	0.21	34.88	56.69	4.30	1.39	2.30
<i>H.fursiforme</i>	2.24	23.93	0.62	52.73	38.11	tra	5.13	4.36
<i>S.fulvellum</i>	1.67	26.23	0.78	74.07	19.84	0.55	4.58	0.93

a Mean of triplicate determinations

b Determinated by GC

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

d Trace

Table 4. Molar ratio of the purified fucoidans^a

Species	Molar ratio						Glucuronic acid
	Fuc	Gal	Glu	Man	Xyl	Sulfate	
<i>L.religiosa</i>	1	0.31	0.04	0.06	—	2.43	0.07
<i>U.pinnatifida</i>	1	1.48	0.01	0.04	0.07	2.20	0.05
<i>H.fursiforme</i>	1	0.66	—	0.09	0.09	2.74	0.13
<i>S.fulvellum</i>	1	0.24	0.24	0.01	0.06	1.46	0.05

3. Gel column chromatography를 이용한 분자량 측정

정제 fucoidan의 gel filtration chromatography는 그림 3과 같다. 정제한 시료 fucoidan 모두 단일 피크를 나타내었으며 대체로 대칭성을 나타내었다. 따라서 분자량적으로 볼 때 균일함을 알 수 있다. 다시마 정제 fucoidan의 분자량은 31,000이었고, 미역 포자엽은 38,000, 툫은 26,000, 모자반

은 105,000이었다. 모자반 이외의 정제 fucoidan은 비교적 분자량이 적음을 알 수 있었다.

4. 정제 Fucoidan의 구조 특성

4.1 Methylation analysis

그림 4는 다시마, 미역포자엽, 툫, 모자반으로부터 앞의 방법에 따라 정제한 fucoidan을 각각 methylation한 뒤 가수분해하여 얻은 단당류 화합

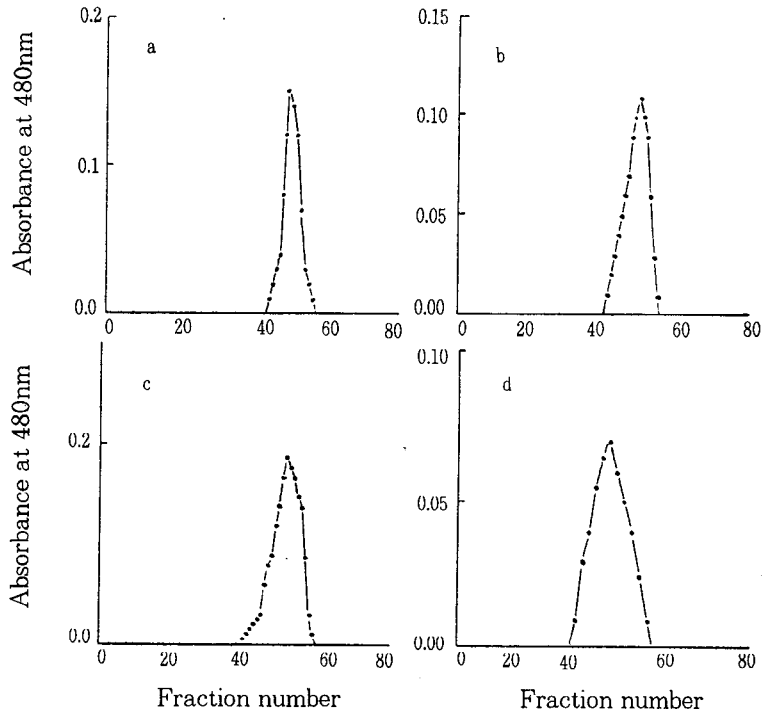


Fig.3. Gel-filtration chromatogram of purified fucoidans.

a. *L. religiosa* b. *U. pinnatifida*. C. *H. fusiforme* d. *S. fulvellum*

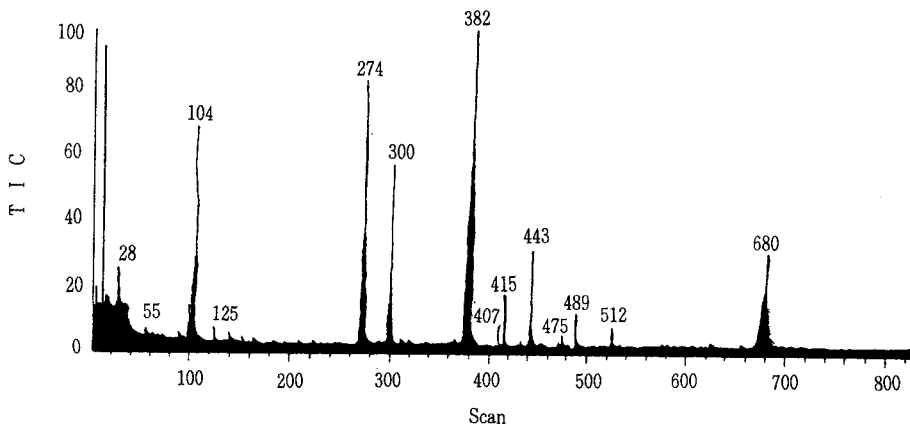


Fig.4. Total ion chromatogram of the alditol acetates of methylated sugars from purified fucoidans.

300. 2,3,4-methyl fucose,	382. 2,4-methyl fucose
407. 2,3,4,6-methyl galactose	415. 2-methyl fucose
443. 4-methyl fucose	475. 2,3,6-methyl galactose
489. 2,4,6-methyl galactose	512. 2,4-methyl galactose

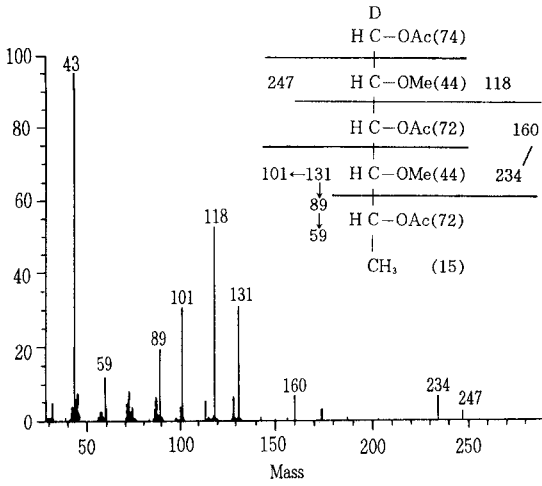


Fig.5. Mass spectrum of 1,3,5-tri-O-acetyl-(1-deuterio)-2,4-di-O-methyl-fucitol(scan number 382).

물을 혼합하여 GC-MS로 분석한 total ion chromatogram(TIC)이다. Retention time 및 mass

spectrum 해석을 통하여 8종의 피크가 동정되었다. 그림 5는 fucoidan의 주요성분인 1,3,5-tri-O-acetyl-(1-deuterio)-2,4-di-O-methyl-fucitol의 mass spectrum을 나타내었다. 정제 fucoidan의 methylation 분석 결과는 표 5와 같다. 다시마는 2,4-Me₂-Fuc가 38.8%로 가장 많았고, 다음으로 2-Me-Fuc가 17.78%, 2,3,6-Me₃-Gal가 16.3%였으며 미역포자엽은 2,4-Me₂-Fuc가 35.7%, 2,4,6-Me₃-Gal가 19.3%, 2,3,6-Me₃-Gal가 15.0%순으로 많았다. 툫은 2,4-Me₂-Fuc가 32.1%, 2-Me-Fuc가 16.9%, 4-Me-Fuc가 12.0%였고, 모자반은 2,4-Me₂-Fuc가 37.4%로 가장 많았고, 다음으로 2-Me-Fuc가 22.6%, 2,3,6-Me₃-Gal가 10.1% 순으로 함량이 높았다. 즉, 다시마, 툫, 모자반은 2,4-Me₂-Fuc, 2-Me-Fuc 순으로 많이 함유되어 있어 주 결합이 1,3-Fuc와 1,3,4-Fuc임을 알 수 있었다. 그리고 미역포자엽은 1,3-Fuc 결합이외에 1,3-Gal, 1,4-Gal 결합도 상당량 존재함을 알 수

Table 5. Methylation analysis of purified fucoidans

Methylated sugars	Mol. %				Major mass spectral fragment ions(m/z)	Linkages
	Lar ^a	Und ^b	Hij ^c	Sar ^d		
2,3,4-Me ₃ -Fuc	11.2	9.5	9.7	15.3	175, 162, 131, 118, 102, 89	Fuc p-(1→
2,4-Me ₂ -Fuc	38.8	35.7	32.1	37.4	247, 234, 160, 131, 118, 101, 89	→3)-Fuc-(1→
2-Me-Fuc	17.7	7.4	16.9	22.6	275, 173, 160, 129, 118, 113, 87	→3) } →4) } Fuc-(1→
4-Me-Fuc	7.7	9.5	12.0	4.2	262, 202, 188, 143, 131, 113, 87	→2) } →3) } Fuc-(1→
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	2.0	2.1	5.1	3.1	205, 161, 145, 129, 118, 102, 87	Gal p-(1→
2,3,6-Me ₃ -Gal	16.3	15.0	9.9	10.1	233, 162, 129, 118, 113, 102, 87	→4)-Gal-(1→
2,4,6-Me ₃ -Gal	5.3	19.3	8.5	4.5	234, 161, 143, 129, 118, 101, 86	→3)-Gal-(1→
2,4-Me ₂ -Gal	1.0	1.4	5.8	2.9	234, 189, 127, 118, 98, 87, 72	→3) } →6) } Gal-(1→

a. *L.religiosa* b. *U.pinnatifida*
c. *H.fusiforme* d. *S.fulvellum*

있었다. 표 6은 다시마와 미역포자엽 정제 fucoidan내의 황산기의 결합 위치를 조사하기 위해 그림 2에 따라 methanolysis를 하여 분획한 고분자 획분(B)의 methylation 분석 결과이다. 다시마, 모자반 모두 표 5의 정제 fucoidan에 비해 2,4-Me₂-Fuc의 함량이 증가한 반면 2-Me-Fuc가 감소하였다. 그리고 미역포자엽은 4-Me-Fuc가 9.5mole%에서 2.3mole%로 감소하였다. 이는 fucose의 C-4위치에 황산기가 결합되어 있음을 나타내고 미역포자엽에는 C-2에도 황산기가 결합되어 있음을 알 수 있다. 또한 galactose도 정제 fucoidan에 비해 2,3,6-Me₃-Gal의 함량이 감소한 반면 상대적으로 2,3,4,6-Me₄-Gal의 함량이 증가하였음을 알 수 있다. 따라서 methylation 분석 결과를 종합하여 보면 다시마, 툫, 모자반 모두 검출된 메칠화 당은 같으나 그 구성 비율에 차이가 있음을 알 수 있다. 그리고 시료 모두 주결합은 1,3-Fuc이며 1,3-Fuc의 대부분은 C-4위치에 황산기가 결합되어 있음을 알 수 있었다. 또한 미역포자엽에는 1,3-Fuc 이외에 1,3-Gal의 결합도 상당량 존재함을 알 수 있었다. 황산기는 주로 fucose와 galactose의 C-4위치에 결합되어 있고 미역포자엽에는 C-2에도 황산기가 결합되어 있음을 알 수 있었다. 이러한 결합 위치는 최근 *E.Kurume*에서 추출한 fucoidan을 methylation 분석한 결과 1,3-Fuc가 주 결합이고 황산기의 대부분은 4번 탄소위치에 결합되어 있다는 보고와 유사하였다(Nishino, 1991).

4.2 FT-IR 측정

정제 fucoidan은 그림 6과 같이 종에 관계 없이 유사한 패턴을 나타내었다. 전 시료 모두 1240과 850cm⁻¹ 부근에 강한 흡수 band가 나타났는데 이는 각각 S=O와 C-O-S 결합이 존재함을 나타내고 특히 850cm⁻¹은 C-O-S가 axial position에 결합되어 있음을 나타낸다. 미역포자엽과 툫에서는 820cm⁻¹에서의 흡수 band가 850cm⁻¹ 흡수 band의 어깨에 약하게 나타났는데 이는 툫과 미역포자엽

에서는 일부 황산기는 equatorial position에 결합되어 있음을 알 수 있다. 즉, 정제 fucoidan내의 황산기의 대부분은 C-4의 위치에 결합되어 있고 툫과 미역포자엽에는 일부 황산기가 C-2위치에 결합되어 있음을 알 수 있다.

Table 6. Methylation analysis of high molecular fractions obtained by methanolysis

Methylated sugars	Mole%		Linkages
	Lar ^a	Und ^b	
2,3,4-Me ₃ -Fuc	12.9	8.5	Fuc β -(1→
2,4-Me ₂ -Fuc	59.2	54.5	→3)-Fuc-(1→
2-Me-Fuc	3.0	1.5	→3) } Fuc-(1→
			→4) }
4-Me-Fuc	7.0	2.3	→2) } Fuc-(1→
			→3) }
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	6.3	5.3	Gal β -(1→
2,3,6-Me ₃ -Gal	10.5	9.9	→4)-Gal-(1→
2,4,6-Me ₃ -Gal	5.3	18.5	→3)-Gal-(1→
2,4-Me ₂ -Gal	0.2	4.6	→3) } Gal-(1→
			→6) }

a *L.religiosa* b *U.pinnatifida*

IV. 요약

국내산 갈조류로부터 생리 기능성이 우수한 수용성 식이섬유 소재를 개발하기 위한 기초자료를 얻기 위해 다시마, 미역(엽상체와 포자엽 각각), 툫, 모자반으로부터 fucoidan을 추출, 정제하여 그 특성을 조사하였다.

Fucoidan의 추출 조건은 pH 2.0의 산성 추출액으로 65°C에서 1시간 씩 3회 추출을 하였고 cethylpyridinum chloride를 사용하여 부분 정제하였다. 부분 정제 fucoidan의 수율은 다시마 2.71%, 미역포자엽 6.65%, 툫 2.51%, 모자반 1.56

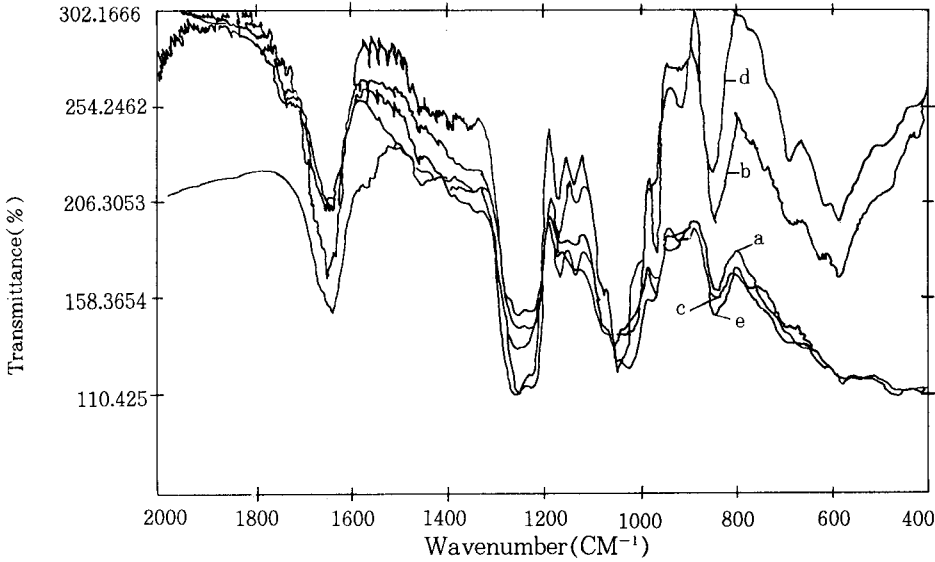


Fig 6. FT-IR spectra of purified fucoidans and commercial fucoidan.

- a. *U.pinnatifida*
- b. *L.religiosa*
- c. *H.fusiforme*
- d. *S.fulvellum*
- e. Commercial fucoidans(Sigma.Co.)

%, 미역포자엽 6.65%, 툫 2.51%, 모자반 1.56%, 미역 엽상체 0.40%였다. 특히 미역포자엽의 수율이 가장 높은 반면에 미역 엽상체는 가장 낮은 부위에 따른 차이가 매우 큼을 알 수 있었다.

DEAE-Sephadex A-25 이온 교환 칼럼 및 알콜 분별 침전법으로 정제한 fucoidan의 fucose : galactose : 황산기의 mole 조성비는 다시마, 미역포자엽, 툫, 모자반이 각각 1 : 0.31 : 2.43, 1 : 0.87 : 1.99, 1 : 0.66 : 2.74, 1 : 0.24 : 1.46이었다. 분자량은 다시마가 31,000, 미역포자엽이 38,000, 툫이 26,000, 모자반이 105,000이었다.

Methylation분석 및 FT-IR 측정을 통해 다시마, 미역포자엽, 툫, 모자반 정제 fucoidan의 구성당의 결합위치를 조사한 결과 다시마, 툫, 모자반의 주 결합은 1,3 fucose이었으며 미역포자엽은 1,3 fucose이외에 1,3 galactose도 상당량 존재하였

다. 황산기는 fucose 및 galactose의 C-4번에 주로 결합되어 있었고 미역포자엽과 툫에는 C-4탄소 이외에 fucose의 C-2번 탄소에도 결합되어 있었다.

V. 참고문헌

Anderson, M.A. and Stone, B.A. 1985. A Radiochemical Approach to the Determination of Carboxylic Acid Groups in Polysaccharides. *Carbohydr. Polym.*, 5, 115.

Anno, K., Terahata, H., Hayashi, Y., and Seno, N. 1966. Isolation and Purification of Fucoidan from Brown Seaweed *Pelvetia wrightii*. *Agr. Biol. Chem.*, 30, 495.

- Fujikawa, T. and Nakashima, K. 1975. Occurrence of Fucoidan Analogues in Brown Seaweed. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 49, 455.
- Harris, P.J., Henny, R.J., Blakeney, A.B., and Stone, B.A. 1984. An Improved Procedure for the Methylation Analysis of Oligosaccharides and Polysaccharides. *Carbohydr. Res.*, 127, 59.
- Iizima-Mizui, N., Fujihara, M., Himeno, J., Komiyama, K., Umezawa, I., and Nagumo, T. 1985. Antitumor Activity of Polysaccharide Fractions. *Kitassato Arch. of Exp. Med.*, 58, 59.
- Kvernheim, A.L. 1987. Methylation Analysis of Polysaccharides with Butyllithium in Dimethyl Sulfoxide. *Acta. Chem. Scand. Ser. B*, 41, 150.
- Larsen, B., Haug, A., and Painter, T.J. 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.
- Mori, H., Kamei, H., Nishide, H., and Nisizawa, K. 1982a. Sugar Constituents of some Sulphated Polysaccharides from the Sporophylls of Wakkame (*Undaria pinnatifida*) and their Biological Activities. *Proc. 10th Intern. Seaweed Symp.*, 10, 109.
- Nishide, E., Anzai, H., and Uchida, N. 1987. A Comparative investigation on the contents of Fucose-Containing Polysaccharides from Various Japanese Brown Algae. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, 1083.
- Nishino, T., Anzu, H., and Nogumo, T. 1991. The Relation Between the Molecular Weight and the Anticoagulant Activity of Fucan sulfates from the Brown Seaweed *Ecklonia kurome*. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 791.
- Nishino, T., Yokoyama, G., Dobashi, K., Fujihara, M., and Nagumo, T. 1989. Isolation, Purification, and Characterization of Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides from the Brown Seaweed *Ecklonia kurome* and their Blood-Anticoagulant activities. *Carbohydr. Res.*, 186, 119.
- 西澤一俊, 1988. 海藻の食物繊維, 月刊フードケミカル, 9, 47.
- Tayer, R.T., and Conrad, H.E. 1972. Stoichiometric Depolymerization of Polyuronides and Glycosaminoglycuronans to Monosaccharides Following Reduction of their Carbodiimide-activated Carboxyl Groups. *Biochemistry*, 11, 1383.