

Aloe saponaria 캘러스의 열수 추출물 유래 다당의 특성

백진홍¹ · 김명옥 · 강태수² · 허 원 · 이신영*

¹주) 김정문 알로에 과학연구소, ²충북과학대학 바이오식품생명과학과, *강원대학교 생물공학과

Polysaccharide Characteristics from Hot Water Extract of *Aloe saponaria* Callus

Jin-Hong Baek¹, Myung-Uk Kim, Tae-Su Kang², Won Hur, and Shin-Young Lee*

¹KJM Aloe R&D Center, ²Department of Biofood Science and Biotechnology, Chungbuk Provincial College of Science & Technology. *Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

Abstract The callus formation from inferior leaf of *Aloe saponaria* was induced in M & S medium supplemented with 10-30 μM NAA (α-naphthalene acetic acid) and 3-7 μM kinetin under incubation in the dark at 25°C for 6 weeks. The hot water extract (100°C, 24 hrs) from cultured callus was obtained and the components analysis for the extract were examined to determine the callus can synthesized the bioactive component such as Aloe polysaccharide. The freeze dried extract contained the sugar of 53.2%, protein of 7.3%, ash of 18.5% and water of 21% (w/w). Two fractions (Fr-I and Fr-II) were obtained by Sepharose CL-4B gel permeation chromatography and Fr-I, major fraction was further purified with dialysis. From sugar analysis by TLC and GC, the purified Fr-I fraction consisted of glucose (77.6%), galactose (17.7%), mannose (4.7%, w/w) and uronic acid (trace). The molecular weight of purified Fr-I fraction determined by GPC was about 110 kDa.

Keywords: *Aloe saponaria*, callus culture, hot water extract, GPC, polysaccharide

서 론

식물 유래의 다당류는 면역조절, 항종양, 항궤양 활성, 항염증 효과, 상처치료 등 다양한 생리활성을 나타내어 각종 기능성 식품, 의약품 및 화장품 소재로 널리 사용하며, 알로에는 이러한 식물유래 다당의 대표적 소재의 하나이다(1-3).

하지만 알로에는 자연 상태에서 잘 번식됨에도 불구하고 재배 기간이 3~5년이나 되어 매우 길고, 그 번식속도도 너무 느려서 현재 전세계적인 알로에 잎의 생산은 산업적 요구도를 충족시키기에 부족한 상황이다(4).

아울러, 종자번식이 아닌 삽목번식하여 여러 회 pruning 하며 3~5년간 키우는데, pruning 횟수에 따라서 성분의 변화가 심하므로 품질의 균일성을 확보하기가 어려운 상황이다(5).

또, 재배방법은 물론, 산지, 수확시기 및 수확 후 알로

에의 취급법, 사용부위, 가공방법 및 안정화 방법 등에 따라 품질의 차이가 현저하여 고 품질 식물체의 상업적인 요구도 충족에는 미흡한 점이 많다(6).

한편, 지금까지의 연구에 의하면 알로에는 200 여종의 광범위한 범위의 성분을 포함하지만 종에 따라 95-99%가 물로 구성되므로 유효 고형분 함량이 매우 낮으며, 특히, 유효 성분인 다당의 함량은 유효 고형분의 10~30%에 불과하므로 알로에 기반의 기능성 제품화를 위해서는 유효 다당 함량의 증가나 수율 향상이 필요한 실정이다(7).

따라서 식물체의 대량증식이나 품종개발, 기후나 재배 조건에 따른 각종 내성 식물체 개발 및 유용 유전자의 형질 개선 등과 더불어 유효 다당 성분의 획기적인 증가 방법이 절실히 요구되고 있다.

이러한 요구 충족을 위해 가장 적합하게 이용될 수 있는 기술수단의 하나로서 조직배양이 널리 이용되고 있지만 알로에의 경우는 폐놀성 물질의 분비로 세포 사멸율이 높아 다른 식물에 비해 상대적으로 널리 연구되지 못하였다(8).

그 동안 알로에의 조직배양 관련 연구는 몇몇 연구자들에 의해 보고되었다(4, 9-20).

*Corresponding author

Tel: +82-33-250-6273, Fax: +82-33-243-6350
e-mail: sylee@kangwon.ac.kr

하지만 이들 연구는 주로 식물체 대량 생산이나 anthraquinone 류와 같은 2차 대사산물에 관한 것이었고, 알로에 유효 성분인 1차~2차 대사산물로 볼 수 있는 다당의 생성에 관한 연구는 보고된 바 없었다.

Callus culture는 화학물질 생산을 위해서는 통상적으로 사용되지 않고 현탁배양 확립의 재료나 장기간 배양 등의 안정성 때문에 stock으로 사용된다. 하지만 callus는 완전한 식물체와는 달리, 주로 대부분이 다당류로 이루어진 1차 세포벽을 갖는 세포로 구성된 균일계를 나타내어 다당류의 합성에 매우 생산적이다(10, 21). 실제로 callus로부터의 다당 생산에 관한 연구는 *Silene vulgaris*에서 널리 이루어졌고, *Lemna minor*에서도 보고된 바 있다(22-27).

알로에의 경우도 오랜 재배기간과 낮은 다당 함유량 때문에 이의 검토 필요성이 있지만 callus 배양에 의한 다당 생성에 관하여는 보고되지 않고 있다.

*Aloe saponaria*는 화상, 상처, 위궤양, 및 위장장애 등의 민간치료제로 널리 사용되어왔고, 400여종 알로에 중에서 가장 약성이 약하여 알로에 알레르기의 위험성이 적으며, 예외적으로 유일하게 -7°C 하에서도 생육할 수 있는 것으로 알려졌다(28, 29). 이의 겔은 *Aloe vera*와 비슷하게 glucomannan이나 pectic acid와 같은 탄수화물 고분자를 더 높은 함량 함유하는 것으로 알려져 있고, 비슷한 생리활성을 나타낸다(29, 30). 또, 그동안 *Aloe saponaria*의 다당체는 4종 정도가 보고되었는데(31, 32), 이 중 mannan은 중앙세포의 활성화를 억제하면서 정상세포의 증식을 촉진하는 것으로 알려져서 그동안 상업적인 관심이 큰 알로에 종의 하나로 인식되어 왔다. 하지만 다당의 수율은 0.032~0.070%에 불과하여 수율의 획기적 향상 수단이 절실하다(32).

따라서 본 연구에서는 *Aloe saponaria*의 callus를 유도하였고, 아직 보고된 바 없는 callus의 열수추출에 의해 다당을 분리정제하여 그 특성을 조사, 규명하였으며, 이로부터 알로에 다당의 효율적 생산 수단으로서의 가능성을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

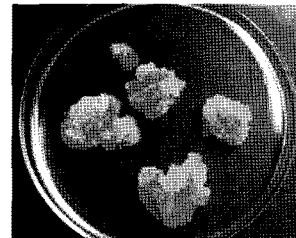
재료

본 실험의 재료는 *Aloe saponaria*의 조직배양으로 얻은 callus이었다. Callus는 Cho와 Lee의 방법(13)에 따라 다음과 같이 유도, 배양하였다. 즉, K사의 제주산 3년생 *Aloe saponaria*의 조직 (inferior leaf)을 흐르는 물에 깨끗이 씻고 2-3 방울의 Tween 80을 넣은 증류수로 20분 동안 교반하여 70% ethanol로 1분간 표면살균 후 이를 2% sodium hyperchlorite 용액에서 30분간 교반하였다. 이것을 clean bench에서 멸균된 증류수로 4회 반복 세척 후 조직배양 재료로 사용하였다. 조직배양의 배지는 M & S

배지(33)이었고, 여기에 phytoigel (Sigma) 0.25% (w/w)와 glucose 3% (w/w), 식물성장조절 호르몬으로 NAA (α -naphthalene acetic acid) 10 μM 및 Kinetin 5 μM 을 조합하여 사용하였다. pH는 1 N NaOH 용액으로 5.7로 맞추었으며, callus 유도는 25°C dark room에서 6주간 배양하였다.

시료 추출 및 분리, 정제

시료의 추출 및 분리정제는 Fig. 1에서와 같은 방법으로 실시하였다. 즉, *Aloe saponaria*의 조직배양으로 얻은 callus (10 g)에 일정용량의 증류수 (100 mL)를 가하고 100°C 에서 24시간 동안 환류 추출하였다. 2500 x g로 30분간 원심분리한 다음 상등액을 회수하여 회전증발기로 농축하였고, 이를 동결건조하여 추출 시료로 사용하였다. 농축된 추출 시료로부터 Sepharose CL-4B (Sigma-Aldrich, USA)를 사용한 gel permeation chromatography에 의해 다당 분획을 얻었으며, 이 때, column은 $2.5 \times 65\text{cm}$, flow rate는 16 mL/hr이었고, 0.1 M NaOH용액으로 용출하여 4 mL씩 분획하였다. 각 분획의 당 및 단백질함량은 phenol-sulfuric acid 법(34)과 Lowry-Folin 법(35)으로 각각 측정하였다.



Cultivation in the dark at 25°C for 6 weeks

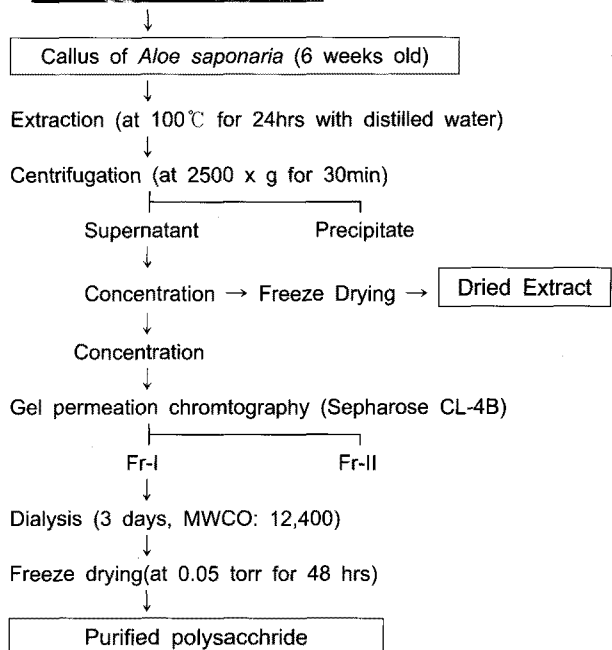


Fig. 1. Purification of callus extract from *Aloe saponaria*.

한편, 고분자 다당 분획은 다시 투석막 (Sigma, MWCO : 12,400)으로 투석한 다음 동결건조하였고, 이를 정제 다당 시료로 하였다.

일반성분 분석

시료의 일반성분 (수분, 당, 단백질, 회분)을 분석하기 위해 수분과 회분 함량은 AOAC 법(36)으로 구하였으며, 당 함량은 phenol-sulfuric acid 법(34), 단백질은 Lowry-Folin 법(35)에 따라 각각 정량하였다.

분자량 측정

정제 다당 시료의 분자량은 Sepharose CL-4B를 column (2.5 × 65cm)에 충전하고, 0.1 M의 NaOH 용액으로 평형시켰다. 여기에 정제시료 및 표준당 [dextran (Sigma), Mw : 2,000,000, 515,000, 162,000] 용액을 각각 충전한 후 0.1 M의 NaOH 용액으로 16 mL/hr의 속도로 용출하여 4 mL 씩 분획하였다. 각 분획의 당 함량을 phenol-sulfuric acid 법(34)으로 정량하였고, 분자량과 용출부피를 도시하여 표준직선을 얻었으며, 이로부터 정제 다당 시료의 분자량을 산출하였다.

구성당의 분석

구성당을 확인하기 위해 TLC 분석하였다. 즉, 소량의 시료를 1N H₂SO₄ 용액에 용해하고 질소가스를 주입하여 밀봉한 다음, 100°C에서 10시간 동안 가수분해하였다. 가수분해 후 Ba(OH)₂로 중화하여 원심분리하였으며, 상등액을 회수한 후 회전증발기로 농축하여 TLC 시료로 사용하였다. TLC는 silica 처리된 plate (Merck)를 사용하였으며, 시료의 용출용매는 n-butanol, pyridine 및 0.1 N HCl (5:3:2, v/v)을 이용하였고, 발색제는 naphtho-resorcinol 용액을 사용하였다. 이 때, 표준물질로는 glucose를 비롯한 6종의 당류와 glucoseamine, glucuronic acid 및 galacturonic acid (Sigma)를 각각 사용하였다.

한편, 정제한 고분자 분획의 구성당 조성은 다음과 같이, gas chromatography하여 분석하였다. 즉, 시료의 소량을 0.1 N HCl 용액에 용해하고 질소가스를 충전한 다음 밀봉하여 100°C에서 5시간 동안 가수분해하였다. 가수분해 후 Ba(OH)₂로 중화하여 원심분리하고 상등액을 회수한 후 회전증발기에서 농축하고 동결건조하였다. 동결건조한 시료에 1 mL의 pyridine, 0.2 mL hexamethyl disilazane과 0.1 mL의 trimethyl chlorosilane을 차례로 가하고 80°C에서 30분간 반응시켜 TMS화 시킨 다음, 원심분리하여 상등액을 얻어 GC 분석용 시료로 사용하였다. Gas chromatograph (Varian Star 3400CX)의 column은 3% OV-101 packed column, detector temp. 200°C, column temp. 150-175°C, carrier gas는 He (30 mL/min.)

과 H₂ (50 mL/min.), flow rate는 air (50 mL/min.), chart speed는 0.2 cm/min.이었으며, FID detector로 분석하였다.

결과 및 고찰

Callus 열수 추출물의 일반성분

일반적으로 알로에의 성분은 200여종이 되는 것으로 알려져 있지만 고형분의 주요 일반성분은 다당, 섬유질을 중심으로 한 당류, 미네랄 등을 주로 한 회분 등이다(7). 따라서 알로에 callus 열수 추출물 (약 20% 수율)을 건조하여 얻은 시료의 일반성분을 분석하였으며, 그 결과는 Table 1과 같다.

Table 1. Proximate compositions of callus extract

Ingredient	Concentration (% w/w)
Sugar	53.2±1.3
Protein	7.3±0.3
Moisture	21.0±0.4
Ash	18.5±0.5

Values are expressed as mean ± SD (n=3).

수분함량은 약 21%이었으며, 당의 함량이 53.2%로 가장 높았고, 다음으로 회분의 함량이 18.5%로 매우 높은 특징을 보였다. 건물 중량으로 환산하면 당의 함량은 약 67.4%, 회분 함량은 23.4%로 알로에 vera gel에 대한 보고 값과 비슷하였다(37). 실제로 *Aloe saponaria*는 잎이 두텁고 커서 vera 종과 매우 비슷한 것으로 잘 알려져 있다.

한편, 높은 회분량은 주로 미네랄 성분에 기인하며, 알로에의 경우 20여종의 mineral이 풍부하게 존재하는 것으로 알려졌다(37). 또 *Aloe saponaria*의 경우 겔의 수분 함량은 98.5%이고 나머지 고형분의 60% 이상이 다당으로 알려져 있으므로(7, 29, 30), callus 열수 추출물의 당은 주로 다당과 같은 탄수화물 고분자라 생각되었다. 그러므로 이하에서는 건물 중량으로 추출물 고형분의 약 2/3를 차지하는 당에 대하여 검토하였다.

Gel chromatography에 의한 분획 및 분자량

높은 당 함량을 함유하는 callus 열수 추출물로부터 탄수화물 고분자 분획을 얻기 위해 Sepharose CL-4B를 사용하여 gel chromatography를 실시하였으며, 그 결과는 Fig. 2와 같다.

용출액에서의 총 당 및 단백질의 농도를 측정하여 서로 다른 분자량을 갖는 2개의 분획 (Fr-I 및 Fr-II)을 얻었다. Fr I분획은 고분자 분획으로 소량의 단백질을 함유한 다당이었으며, 이후의 실험을 위해 Fr I 분획을 수집하였다.

한편, 이 고분자 다당 분획의 분자량을 GPC로 구한

결과는 Fig. 3과 같고, 이로부터 구한 분자량은 약 110 kDa 이었다.

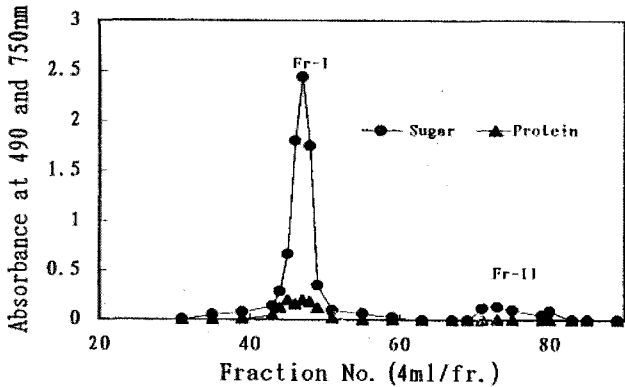


Fig. 2. Gel permeation chromatogram of callus extract.

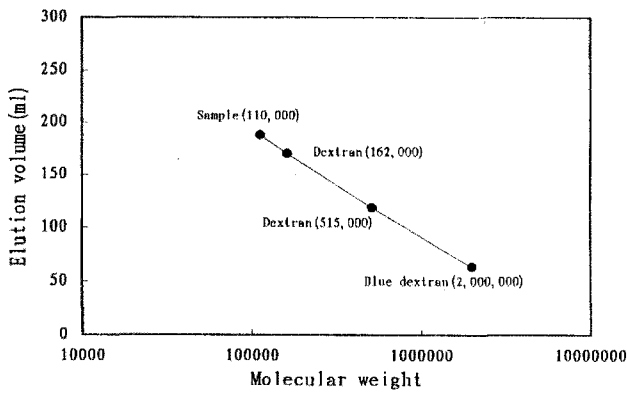


Fig. 3. Determination of molecular weight of Fr-I.

다당 분획의 구성 당과 조성

정제한 고분자 분획 Fr-I의 구성당을 조사하기 위해 산 가수분해하고, 각종 당, 아미노당 및 우론산을 표준물질로 TLC 하였으며, 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

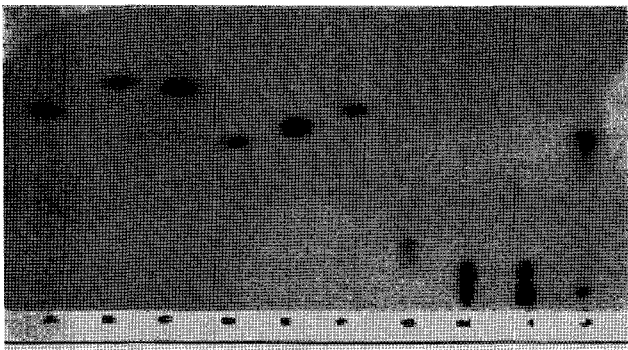


Fig. 4. Thin layer chromatogram of Fr-I. A: arabinose, B: xylose, C: fucose, D: galactose, E: glucose, F: mannose, G: glucosamine, H: glucuronic acid, I: galacturonic acid, J: sample.

알로에 다당의 구성 당으로는 glucose, galactose, mannose, rhamose 및 xylose가 널리 알려져 있는데 본 시료의 경우는 glucose, galactose 및 mannose만 검출되었으며, 따라서 이들이 구성당인 것으로 판단하였다.

또, 이를 보다 더 명확히 확인하기 위해 GC 분석한 결과에서도 Fig. 5에서와 같이, 역시 glucose, galactose 및 mannose가 검출되었으며, uronic acid도 미량 검출되었다. Gas liquid chromatogram의 면적으로부터 각 당의 함량비를 구한 결과는 Table 2와 같다. 표에서 보는 바와 같이, glucose가 77.6%로 대부분을 차지하였고, galactose와 mannose도 각각 17.7 및 4.7% 함유하였으며, glucose, galactose 및 mannose의 비는 1 : 0.23 : 0.06이이었다.

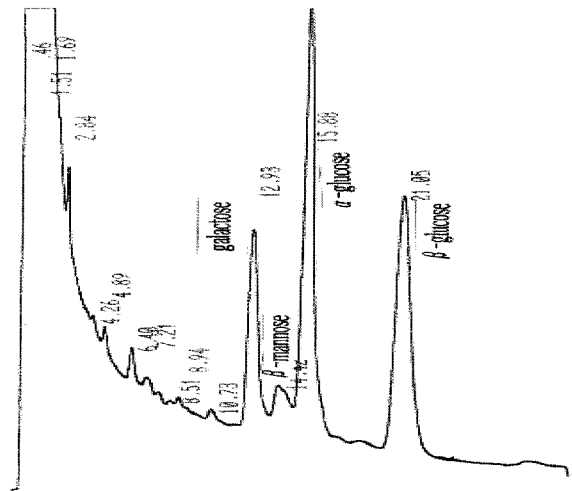


Fig. 5. Gas liquid chromatogram pattern of Fr-I.

알로에 잎의 펄프 유래 겔은 glucomanнан이나 pectic acid와 같은 탄수화물 고분자를 함유하며, *Aloe saponaria*에서는 Gowda(31)에 의해 glucan, glucogalactomannan (Glc : Gal : Man = 1 : 0.25 : 1.25) 및 acetylated mannan이 분리되었다. 또 Yagi 등(32)은 분자량 15,000의 acetylated mannan과 분자량 66,000의 acetylated glucomannan (Glc:Man = 5 : 9.5)을 보고한 바 있다.

Table 2. Sugar composition

Component	Concentration (Area %)
Glucose	77.6
Galactose	17.7
Mannose	4.7
Uronic acid	Trace

따라서 *Aloe saponaria*의 callus 유래 다당은 구성당비로 보면 mannan보다는 Gowda(32)가 보고한 glucan에 가까우며 분자량도 더 커서 전 잎 (whole leaf) 유래의 다당과는 차이를 보였다. 따라서 intact *Aloe saponaria* 유래의 다당과는 다른 신규한 다당으로 생각되었으며,

*Silene vulgaris*의 callus 유도시 배지조성이나 효소처리 에 따라 다당의 조성이 변하거나 수식 (modification)된다는 보고(22, 24, 26) 사실을 고려할 때 추가 검토의 필요성이 있다고 판단되었다.

이상으로부터 *Aloe saponaria*의 callus 배양에 의해 다당의 생성을 확인할 수 있었다. 또 이에 의한 다당의 생산은 식물체 분화나 callus의 현탁배양을 통한 대사산물의 생산에 비하면 상대적으로 배양기간이 짧고, 생산시설이 간편하며 또, 운전비용의 절감 등 경제적이므로 이의 현탁배양과 함께 알로에 다당 생산의 효율적인 수단으로서 차후 검토의 필요성이 매우 높다고 생각되었다.

결 론

*Aloe saponaria*로부터 유용물질 생산연구의 일환으로 callus 배양하여 얻은 callus를 열수로 추출 (100°C, 24 hrs)한 다음, 원심분리하고 상등액으로부터 callus 추출물을 얻었다.

Callus 추출물의 일반성분을 검토한 결과, 다당 53.2% (w/w), 단백질 7.3% (w/w), 회분 18.5% (w/w) 및 수분 21%를 함유하였다. Callus 추출물을 Sepharose CL-4B gel permeation chromatography 하여 Fr-I 및 Fr-II의 두 가지 당 분획을 얻었으며, 고분자 분획인 Fr-I은 소량의 단백질을 함유하는 다당이었다. Fr-I 분획을 다시 투석하여 정제하였고, 이의 구성 단당 및 그 조성비를 각각 TLC 및 GC로 조사한 결과, glucose (77.6%), galactose (17.7%), mannose (4.7%)를 함유하였으며, *Aloe saponaria* 잎의 gel과 비교하여 mannose 함량이 매우 낮은 특성을 보였다. Fr-I 분획의 정제 다당을 Sepharose CL-4B gel permeation chromatography하여 분자량을 측정된 결과, 분자량은 약 110 kDa이었다.

감 사

본 연구는 (주)김정문알로에의 연구비지원에 의하여 이루어진 바, 이에 감사드립니다.

접수 : 2008년 7월 23일, 게재승인 : 2009년 1월 14일

REFERENCES

1. Leung M. Y. K., C. Liu, J. C. M. Koon, and K. P. Fung (2006), Polysaccharide biological response modifiers, *Immunology Letters* **105**, 101-114.
2. Talmadge J, J. Chavez, L. Jacobs, C. Munger, T. Chinnah, J. T. Chow, D. Williamson, and K. Yates (2004), Fractionation of *Aloe vera* L. inner gel, purification and molecular profiling of activity, *International Immunopharmacology* **4**, 1757-1773.
3. Reynolds, T. and A. C. Dweck (1999), Aloe vera leaf gel: a review update, *J. Ethnopharmacol.* **68**, 3-37.
4. Aggarwal D. and K. Barna (2004), Tissue culture propagation of elite plant of *Aloe vera* Linn., *J Plant Biochemistry & Biotechnology* **13**, 77-79.
5. Chauser-Volfson E. and Y. Gutterman (2004), Using *Aloe* plants growing in Israel as a source for the cosmetic and medicinal industries and as ornamental plants, *Biochemical Systematics and Ecology* **28**, 825-828.
6. Nancy K. Brown (NKB) Aesthetic, Inc., 26 May, 2008 <www.nancykbrown.com>.
7. Esua M. F. and J. W. Rauwald (2006), Novel bioactive maloyl glucans from *Aloe vera* gel: Isolation, structure elucidation and *in vitro* bioassays, *Carbohydrate Research* **341**, 355-364.
8. Vanisree M. and H. S. Tsay (2004), Plant cell cultures-An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites, *International Journal of Applied Science and Engineering* **1**, 29-48.
9. Baksha R., M. A. A. Jahan, R. Khatun, and J. L. Munshi (2005), Micropropagation of *Aloe barbadensis* Mill. through *in vitro* culture of shoot tip explants, *Plant Tissue Cult. & Biotech.* **15**(2), 121-126.
10. Chukwujekwu J. C., C. W. Fennell, and J. van Staden (2002), Optimization of the tissue culture protocol for the endangered *Aloe polyphylla*, *South Afr. J. Botany* **68**, 424-429.
11. Abrie A. L. and J. van Staden (2001), Micropropagation of the endangered *Aloe polyphylla*, *Plant Growth Regulation* **33**, 19-23.
12. Chaudhuri S. and U. Mukundan (2001), *Aloe barbadensis* L. micropropagation and characterization of its gel, *Phytomorphology* **51**(2), 155-157.
13. Cho K. H. and J. H. Lee (1998), Preparation process of anthraquinone by culturing *Aloe saponaria*, Korea Patent No. 10-0148313-0000.
14. Yu C. Y., I. S. Jeon, S. D. Ahn, D. H. Cho, and I. M. Choung (1994), Rapid micropropagation of *Aloe arborescens* Mill. by meristem culture, *J. Oriental Bot. Res.* **7**(1), 17-22.
15. Kawai K., H. Beppu, T. Koike, K. Fujita, and T. Marunuchi (1993), Tissue culture of *Aloe arborescens* Miller var. *natoalensis* Berger, *Phytotherapy Research* **7**, 5-10.
16. Meyer HJ, and J. van Staden (1991). Rapid *in vitro* propagation of *Aloe barbadensis* Mill., *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **26**, 167-171.
17. Natali, L., I. C. Sanchez, and A. Cavallini (1990),

- In vitro* culture of *Aloe barbadensis* Mill. : Micropropagation from vegetative meristems, *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **20**, 71-74.
18. Sanchez I. C., Natali L., and A. Cavallini (1988), *In vitro* culture of *Aloe barbadensis* Mill.: Morphogenic ability and nuclear DNA content, *Plant Sci.* **55**, 53-59.
 19. Konishi T. and M. Amano (1985), Callus formation in stamens of *Aloe bellatura*. *Ann. Tsukuba Bot. Garden.* **3**, 19-26.
 20. Yagi A., Y. Shoyama, and I. Nishioka (1983), Formation of tetrahydroanthracene glycosides by callus tissue of *Aloe saponaria*, *Phytochemistry* **22**, 1483-1484.
 21. Talmadge K. W., K. Keegstra, W. D. Bauer, and P. Albersheim (1973), The structure of plant cell walls. 1. The macromolecular components of the walls of suspension-cultured sycamore cells with a detailed analysis of the pectic polysaccharides, *Plant Physiol.* **51**, 158-173.
 22. Günter E. A. and Yu S. Ovodov (2002), An alternate carbon source for enhancing production of polysaccharides by *Silene vulgaris* callus, *Carbohydrate Research* **337**, 1641-1645.
 23. Günter E. A. and Yu S. Ovodov (2002), Changes in cell wall polysaccharides of *Silene vulgaris* callus during culture, *Phytochemistry* **59**, 703-708.
 24. Günter E. A., and Yu S. Ovodov (2003), Production of polysaccharides by *Silene vulgaris* callus culture of depending on carbohydrates of the medium, *Bochemistry* (Moscow) **68**(8), 882-889.
 25. Günter E. A., O. V. Popeiko, and Yu S. Ovodov (2004), Isolation of polysaccharides from the callus culture of *Lemna minor* L., *Applied Biochemistry and Microbiology* **40**(1), 80-83.
 26. Günter E. A., O. V. Popeiko, and Yu S. Ovodov (2007), Modification of polysaccharides from callus culture of *Silene vulgaris* (M.) G. using carbohydrases *in vitro*. *Bochemistry* (Moscow) **72**(9), 1008-1015.
 27. Bushneva O. A., R. G. Ovodova, A. S. Shashkov, A. O. Chizhov, Günter E. A., and Yu S. Ovodov (2006), Structural studies of arabinogalactan and pectin from *Silene vulgaris* (M.) G. callus, *Bochemistry* (Moscow) **71**(6), 644-651.
 28. Yagi A., S. J. Shibata, I. Nishioka, S. Iwadare, and Y. Ishida (1982), Cardiac stimulant action of constituents of *Aloe saponaria*. *J. Pharmaceut. Sci.* **71**(7), 739-741.
 29. Sampedroa M. C., R. L. Artolab, M. Muraturec, D. Muratureb, Y. Ditamo, G. A. Rotha, and S. Kivatinitza (2004), Mannan from *Aloe saponaria* inhibits tumoral cell activation and proliferation, *International Immunopharmacology* **4**, 411-418.
 30. McAnalley, B. H. and G. Prairie (1990), Process for preparation of aloe products. US patent 4,957,907.
 31. Gowda, D., B. Neelisiddaiah, and Y. Anjaneyalo (1980), Structural studies of polysaccharides from *Aloe saponaria* and *Aloe vanbalenii*, *Carbohydrate Res.* **83**, 402-405.
 32. Murashige, T. and F. Skoog (1962), A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture, *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
 33. Dubois M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith (1956), Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* **28**, 350-356.
 34. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall (1951), Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
 35. AOAC. (1995), *Official methods of analysis*. 16 th(ed). Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C., USA.
 36. Femenia A., E. S. Sanchez, S. Simal, and C. Rossello (1999), Compositional features of polysaccharides from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues, *Carbohydr. Polym.* **39**, 109-117.