목재공학 42(6): 740~746, 2014
J. Korean Wood Sci. Technol. 42(6): 740~746, 2014
http://dx.doi.org/DOI : 10.5658/WOOD.2014.42.6.740

꾸지뽕나무 열매에서 추출한 수용성 다당류의 구조분석[1]

김 석 주[2,†] · 이 경 태[2] · 유 원 재[2] · 이 성 숙[2] · 김 용 식[2]

Structure Analysis of Water-soluble Polysaccharides Extracted from The Unripe Fruit of *Cudrania tricuspidata*[1]

Seok Ju Kim[2,†] · Kyung-Tae Lee[2] · Won-Jae youe[2] · Sung-Suk Lee[2] · Yong Sik Kim[2]

요 약

꾸지뽕나무 미숙과를 50% 발효주정으로 추출하고, 농축한 추출용액을 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol로 순차적으로 분액하여 수용성 조추출물을 얻었다. 수용성 조추출물을 분취용 겔 투과 크로마토그래피(Gel Permeation Chromatography, GPC)를 실시하여 다당류(F1)를 분리하였다. F1을 가수분해하여 단당 성분 분석을 실시한 결과 glucose, galactose, arabinose, xylose 등 4가지로 구성되어 있었으며, 그 조성비는 6.1 : 1.8 : 3.1 : 1.0이었다. F1에 acetyl기의 치환여부와 uronic acid의 존재 유무를 확인하기 위해 FT-IR로 측정하고 염산 가수분해 한 다음 HPLC 분석을 실시한 결과, 두 가지 모두 없는 것으로 분석되었다. 결합 위치 확인을 위해 permethylation, 산 가수분해, 환원, silylation을 순차적으로 실시하여 얻은 partially methylated alditol silylate (PMAS)들을 GC-MS 분석을 실시한 결과, 1,5-di-*O*-trimethylsilyl-2,3,4-tri-*O*-methyl xylose, 1,5-di-*O*-trimethylsily-2,3,4-tri-*O*-methyl arabinose, 1,4,5-tri-*O*-trimethylsily-2,3-di-*O*-methy arabinose, 1,3,5-tri-*O*-trimethylsily-2,4,6-tri-*O*-methyl glucose, 1,4,5-tri-*O*-trimethylsily-2,3,6-tri-*O*-methyl galactose, 1,4,5-tri-*O*-trimethylsily-2,3,6-tri-*O*-methyl glucose, 1,3,5,6-tetra-*O*-trimethylsily-2,4-di-*O*-methyl galactose, 1,3,5,6-tetra-*O*-trimethylsily-2,4-di-*O*-methyl glucose로 구성되어 있었고 그 조성비는 1.1 : 1.0 : 4.9 : 7.5 : 3.0 : 3.1 : 1.4 : 1.5였다.

ABSTRACT

The unripe fruit of *cudrania tricuspidata* was extracted with 50% ethanol. The crude water-soluble extracts were separated by liquid-liquid separation with n-hexane, ethyl acetate and butanol followed by precipitation with ethanol, and then the water-soluble polysaccharide (F1) was isolated by the fractionation through gel permeation chromatography using preparative PLaquagel-OH column with water. The structure was characterized by monosaccharide composition with HPAEC-PAD, methylation analysis with GC-MS, FT-IR and HPLC. According to the data, F1 was com posed of glucose (22.84 mM), galactose (13.75 mM), arabinose (45.87 mM), xylose (7.49 mM). It was revealed which

[1] Date Received September 29, 2014, Date Accepted October 20, 2014
[2] 국립산림과학원 화학미생물과. Division of Wood Chemistry & Microbiology, Department of Forest Products, Korea Forest Research Institute, Seoul, 130-712, Korea
[†] 교신저자(corresponding author): 김석주(e-mail: timberusing@forest.go.kr)

uronic acid and acetyl group were not attached in F1. And it is constituted of 1-linked arabinose, 1,4-linked arabinose, 1,3-linked glucose, 1,4-linked galactose, 1,4-linked glucose, 1,3,6-linked galactose, 1,3,6-linked glucose and the ratio was showed 1.1 : 1.0 : 4.9 : 7.5 : 3.0 : 3.1 : 1.4 : 1.5.

Keywords : *Cudrania tricuspidata* unripe fruit, water-soluble polysaccharides, Gel Permeation Chromatography, Gas Chromatography-Mass Spectroscopy, methylation analysis

1. 서 론

꾸지뽕나무(*Cudrania tricuspidata*)는 뽕나무과(Moraceae)에 속한 낙엽교목으로 한국, 중국, 일본 등 동아시아 전역에 널리 분포되어 있다. 열매는 자수과라고 부르며 열매들이 모여 덩어리를 이루는데 지름이 2～3 cm로 둥글고 9～10월에 붉게 익는다. 또한 열매는 동아시아에서 전통적으로 약재로도 쓰였는데, 한방에서는 해열, 양혈, 서근활락(근육이완)에 효능이 있어 약제로 사용되어 왔다(Jung 등 2013).

꾸지뽕나무 열매의 연구로는 Choi 등(2009)이 메탄올 추출물의 항산화 활성을 보고하였고 Youn과 Kim (2012)이 열매를 적외선 건조 처리하여 에탄올 추출물이 기타 다른 방법으로 건조한 추출물에 비해 polyphenol과 flavonoid들의 함량이 높고 항산화 및 아질산염 소거능이 좋다고 보고하였다. Bajpai 등(2013)은 꾸지뽕나무 열매에서 마이크로파를 이용하여 추출한 정유성분이 식품 매개 병원성 세균에 대한 억제 효과가 있다고 보고하였고, Xiang 등(2005)은 methylene chloride로 추출한 flavonoids들이 뇌에서 monoamine 산화를 억제한다고 보고하였다. 또한 Xiang 등(2008)이 꾸지뽕나무 열매에서 12가지의 prenyl화 및 benzyl화 flavonoids들을 분리 및 동정하였다. Seo 등(2013)은 꾸지뽕나무 열매를 발효시켜 생성된 polyphenol이 면역 증강 효과가 있다고 보고하는 등 꾸지뽕나무 열매 추출 성분들의 동정 및 의약・식품 이용에 관한 연구는 활발하게 진행되고 있으나 대부분 polyphenol이나 flavonoid들에 초점이 맞춰지고 있다. Jung 등(2013)이 꾸지뽕나무 열매에서 유리당과 불용성 및 수용성 다당류가 약 50～66%를 차지하고 있다고 보고한 이후 당류에 대한 연구는 미진한 실정이다. 따라서 본 연구의 목적은 수용성 다당류를 분리하고 이 화합물의 화학구조를 다당류의 분석 기법 중 methylation 분석법을 중심으로 조사하여 그 기초자료를 얻는 것이다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료

실험에 사용된 꾸지뽕나무 열매는 전남 함평에서 2013년 9월 초에 채취한 것을 사용하였다. 열매는 채집한 직후 물로 세척한 다음 동결 건조 후 분쇄기로 분쇄하였다.

실험에 사용된 모든 시약은 analytical 등급을 사용하였다.

2.2. 추출물의 분리

분쇄한 꾸지뽕나무 미숙 열매 약 700 g을 50% 발효주정에 상온에서 7일간 침지하고 추출용액을 회수하는 것을 3회 반복하였다. 추출물은 감압농축기를 이용하여 에탄올을 제거함과 동시에 농축하고, 분액여두깔때기를 사용하여 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 순으로 분액하고 남은 수용액을 동결건조하여 수용성 조추출물을 얻었다. 조추출물은 물로 용해한 후 차가운 에탄올에 넣어 침전시키고 원심분리한 다음 에탄올을 제거하고 데시케이터에서 보관하였다.

2.3. 다당류의 단리 및 정제

수용성 다당류들은 분취용 GPC를 사용하여 단리 및 정제하였다. 분취용 GPC는 Waters delta 600 pump (Waters, USA)와 Waters fraction collector II (Waters, USA)를 사용하였다. 컬럼은 2개의 PLacuagel-OH mixed-H (300 × 25 mm, Agilent, UK) 컬럼을 연결하였고, 이동상 용매는 water를 사용하여 7 mℓ/min의 유속, 1 min/tube로 수집하였다. 시료주입은 조추출물 10 g을 농도가 5%가 넘지 않도록 물에 녹이고 0.45 μm nylon syringe 필터로 거른 다음 1 mℓ를 주입하였으며, 다당류의 검출은 Molisch test를 사용하였다. 분획물 1(F1, test tube 19～20, 186 mg), 분획물 2(F2, test tube 21～22), 분획물 3(F3, test tube 23～26)으로 분리하였다.

2.4. 단당 분석

산 가수분해는 Seaman 등(1963)의 방법으로 수행하였다. F1 5 mg을 실온에서 12 M의 황산 50 μℓ를 넣어 저어준 뒤에 2 M로 희석한 다음 1 h 동안 100℃에서 reflux하여 반응시켰다. 포화 $Ba(OH)_2$을 사용하여 중화하고 생성된 $BaSO_4$염은 0.2 μm syringe filter로 제거하였다. 여과된 시료 용액은 동결건조하고 고성능 음이온 교환 크로마토그래피(High Performance Anion Exchange Chromatography-Pulsed Amperometric Detection, HPAEC-PAD, Dionex, USA)를 사용하여 단당 성분 분석을 실시하였다. 내부 표준 물질은 2-Deoxy-D-galactose를 사용하였다.

2.5. FT-IR 분석

F1의 uronic acid의 존재 유무 확인은 Nicolet iS10 FT-IR spectrometer (Thermo scientific, USA)를 사용하여 ATR 방식으로 측정하였다.

2.6. *O*-acetyl기의 측정

O-acetyl기 분석을 위한 가수분해 반응은 Tomoda 등(1985)의 방법을 사용하였고, HPLC 분석 조건은 Mcfeeters 등(1984)의 방법을 참고하였다. F1 3 mg을 vial에 넣고 0.2 N 염산 0.05 mℓ를 첨가한 다음 밀봉한 상태에서 100℃에서 2 h 동안 가수분해하였다. 가수분해물은 Waters Delta 600 HPLC system으로, 이동상으로는 암모니아 수를 사용하여 pH를 2.5로 맞춘 0.05 M H_3PO_4 용액을 1 mℓ/min의 유속으로 사용하였고, 컬럼은 Optimapak C18 (250 × 25 mm, RStech, Korea)을 25℃에서, 검출기는 Waters 2487 UV 검출기(Waters, USA)를 사용하여 230 nm에서 아세트산을 측정하였다. 내부 표준 물질은 propionic acid를 사용하였다.

2.7. Methylation 분석

F1의 permethylation은 Ciucanu와 Kerek (1984)의 방법을 참고하여 일부 조건을 달리하여 실시하였다. F1 5 mg을 0.5 mℓ의 anhydrous DMSO에 넣고 밀봉하고 2시간 이상 80℃ 건조기에 넣어 가열한 다음 2시간 이상 초음파 처리를 하였다. 시료가 용해되면 20 mg의 ground NaOH와 0.3 mℓ의 CH_3I를 첨가한 뒤, 30분간 초음파로 반응시켰다. 물을 첨가하여 반응을 종료시키고 dichloromethane으로 추출한 다음 N_2 기류로 건조하였다. 이 과정을 2～3번 반복하여 실행하여 만들어진 permethylated sample을 2 M의 황산용액으로 100℃에서 1.5 h 동안 가수분해하였다. 반응물은 포화 $Ba(OH)_2$로 중화하고 0.45 μm nylon syringe 필터로 여과한 다음 동결건조하였다. 환원 반응은 동결건조 한 시료(partial methylated sample)에 0.2 mℓ 물, 1～5 mg $NaBH_4$, 1% NH_3OH 1방울을 넣고 실온에서 1 h 동안 교반하여 실시하였다. 5% acetic acid/MeOH 용액을 첨가하여 반응을 종료시킨 후에 3번 이상 반복해서 MeOH 1 mℓ를 넣고 N_2 기류로 건조하였다. 이 시료(partially methylated alditol)에 anhydrous pyridine과 Bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA)를 각각 0.15 mℓ를 첨가한 다음 60℃에서 20분간 가열하고 GC-MS 분석하였다. GC-MS 분석은 Agilent 5975C MSD와 FID를 병렬로 연결한 Agilent 7890A GC (USA)를 이용

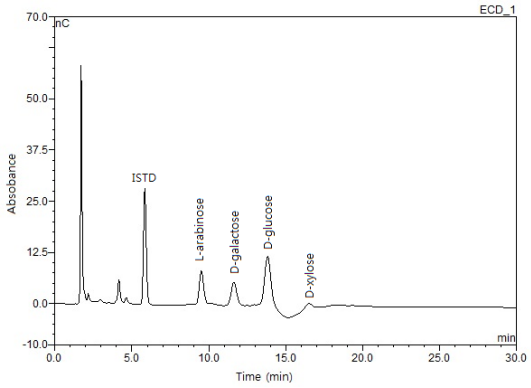

Fig. 1. HPAEC-PAD chromatogram of acid hydrolyzed F1.

하였으며, 분석 컬럼은 DB-5ms (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm), carrier gas (Helium)의 유속은 0.3 mℓ/min, 온도 조건은 100℃에서 3분 유지 후 3℃/min의 승온속도로 220℃까지 승온한 후 10분 유지하고 15℃/min의 승온속도로 240℃까지 승온한 후 10분을 유지하였다. Injector는 270℃, auxiliary line과 FID는 250℃, 질량분석기는 EI 방식으로 source는 70eV, split ratio는 1 : 50으로 하였다. Reference 물질로 사용한 pullulan, 1,3-glucan, arabinogalactan, xylan은 위와 같은 방법으로 실험하였다.

3. 결과 및 고찰

700 g의 꾸지뽕나무 열매로부터 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 및 ethanol 추출분을 제거하고 얻은 수용성 조추출물은 약 22.5 g으로 측정되었다. 이는 약 3.2%로써 정 등(2013)이 미숙과에 수용성 다당류가 약 1.4～4.6% 포함되어 있다고 보고된 수치와 유사하였다. 또한 수용성 조추출물 10 g으로부터 분취용 GPC를 이용하여 3개(F1, F2, F3)로 분획하였다. F1은 186 mg을 얻었으나 F2와 F3는 미량 저울에 올려놓기도 전에 끈적끈적하게 변할 정도로 흡습성이 높아서 측정이 불가능하였다. 이런 이유로 F1만 분석을 진행하였다.

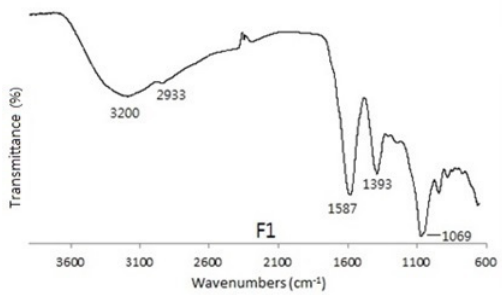

Fig. 2. FT-IR spectra of F1.

3.1. 단당 분석

F1을 산 가수분해하여 HPAEC-PAD를 이용하여 분석한 결과, Fig. 1의 크로마토그램에서 보는 바와 같이 glucose, galactose, arabinose, xylose로 구성되어 각각 22.84 mM, 13.75 mM, 45.87 mM, 7.49 mM이었고, 그 몰 비는 Glc : Gal : Ara : Xyl = 6.1 : 1.8 : 3.1 : 1.0이었다. (D-glucose, R2 = 0.985; D-galactose, R^2 = 0.998; L-arabinose, R^2 = 0.997; D-xylose, R^2 = 0.996)

3.2. FT-IR 분석

F1의 FT-IR 분석 스펙트럼을 Fig. 2에 나타내었다. Uronic acid의 C=O 흡수 피크는 1700～1730 cm^{-1}(glucuronic acid의 경우는 1703 cm^{-1}에서 흡수피크가 나타난다.)에서 나타나지만 F1의 스펙트럼에서는 관찰되지 않았으므로 uronic acid가 함유되어 있지 않다고 판단된다. 3200 cm^{-1}을 중심으로 한 넓은 영역에서의 흡수피크는 -OH이고, 2933 cm^{-1}는 C-H 흡수피크이다. 1587 cm^{-1}는 F1의 OH기와 물의 상호작용(hydrated water)의 결과로서 나타난 흡수피크이다(Zhang, 1999). 1200～1000 cm^{-1}의 흡수 영역에서 보이는 피크는 C-O 결합의 흡수피크이다.

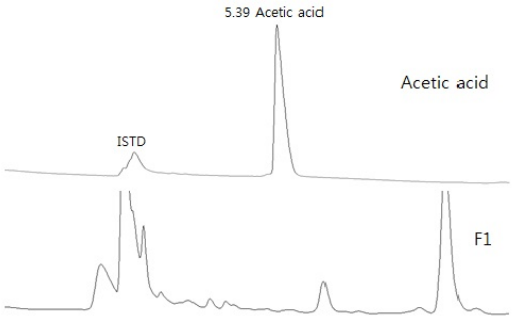

Fig. 3. HPLC chromatogram of 0.2 N HCl hydrolysed F1 and 80 mM acetic acid.

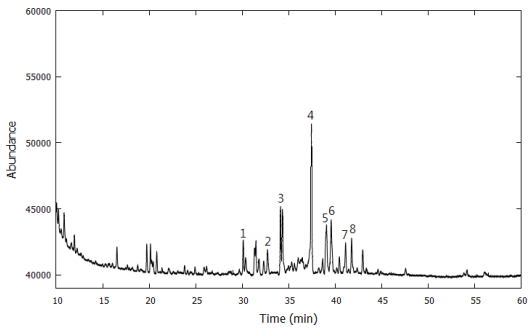

Fig. 4. GC chromatogram of PMAS derived from F1 prepared by permethylation, hydrolysis, reduction and silylation.
1. 1,5-di-*O*-TMS-2,3,4-tri-*O*-Me-xylose; 2. 1,5-di-*O*-TMS-2,3,4-tri-*O*-Me-arabinose; 3. 1,4,5-tri-*O*-TMS-2,3-di-*O*-Me-arabinose; 4. 1,3,5-tri-*O*-TMS-2,4,6-tri-*O*-Me-glucose; 5. 1,4,5-tri-*O*-TMS-2,3,6-tri-*O*-Me-galactose; 6. 1,4,5-tri-*O*-TMS-2,3,6-tri-*O*-Me-glucose; 7. 1,3,5,6-tetra-*O*-TMS-2,4-di-*O*-Me-galactose; 8. 1,3,5,6-tetera-*O*-TMS-2,4-di-*O*-Me-glucose

3.3. *O*-acetyl기의 측정

Acetyl기를 함유하고 있는 다당류를 염산으로 가수분해하면 아세트산이 생성되는 반응(Tomoda 등, 1985)을 이용하여 HPLC로 분석하였고 Fig. 3에 나타내었다. 아세트산의 피크는 5.4분에 나타나지만 F1의 염산 가수분해물에서는 아세트산이 검출되지 않았다. 따라서 F1은 acetyl기가 없는 것으로 나타났다.

3.4. Methylation 분석

F1을 permethylation, 산 가수분해, 환원, silylation 과정을 거쳐서 부분적으로 메틸화된 알디톨 실릴레이트(Partially methylated alditol silylates, PMAS)의 형태로 만든 다음 GC-MS 분석을 실시하였다.

본 실험에서 사용한 Ciucanu와 Kerek (1984)의 methylation 방법은 간단하게 수행할 수 있어서 다당류의 methylation 분석에 광범위하게 사용된다. 이 방법은 시료의 DMSO에 대한 용해도에 크게 영향을 받기 때문에 시료가 DMSO에 완전히 용해되지 않거나 잘 용해되지 않으면 permethylation이 되지 않으므로 반복해서 반응해주어야 한다. 특히, arabinogalactan류는 DMSO에 잘 용해되지 않아서 3번 이상 반복하여도 95%에서 더 이상 methylation되지 않는다는 보고도 있다(Laine 2004). 또한 반복해서 반응을 수행할 때마다 시료의 손실이 생기기 때문에 여러 번 반복할 경우에는 GC-MS 분석이 어려워질 수도 있다. 따라서 시료를 충분히 용해시키기 위해서 각각 2 h 이상 80℃로 가열하고 초음파 처리를 하였다.

DB-5ms 컬럼을 사용한 GC-MS 분석에서 PMAS의 분리는 5탄당에서 유도된 PMAS가 6탄당에서 유도된 PMAS보다 머무름 시간(retention time, RT)이 짧고, 이성질체 사이에서는 치환된 trimethylsilyl (TMS)기의 수가 적은 PMAS의 RT가 짧다. 치환된 TMS기의 수가 같은 경우, 예를 들면 xylose에서 유도된 PMAS가 arabinose에서 유도된 PMAS보다 RT가 짧고 galactose에서 유도된 PMAS가 glucose에서 유도된 PMAS보다 RT가 짧다. 또한 같은 당에서 유도된 PMAS의 경우에 1,3,5-tri-*O*-TMS기를 가진 PMAS가 1,5,6-tri-*O*-TMS기를 가진 PMAS보다 RT가 짧다. MS data의 fragmentation ion의 분석은 Björndal 등(1970)과 Wong 등(1980)의 fragmentation pattern을 참고하였다. F1의 methylation 분석 결과 8개 타입의 PMAS가 확인되었고, Table 1과 Fig. 4에 나타내었다. F1의 주쇄(backbone)는 1,3-linked glucose이었고 6번 탄소에서 측쇄(branch)가 붙는 것으로 나타났다. 측쇄는 arabinose, galactose, glucose으

Table 1. GC-MS data of PMASs derived from F1 prepared by permethylation, hydrolysis, reduction and silylation

PN	Methylated linkage	TMS	RT	Ratio	MS data of main fragments (m/z)	Linkage type
1	2,3,4-tri-*O*-Me-Xyl	1,5	30.1	1.1	147, 89, 159, 103 131, 117	→ 1-Xyl
2	2,3,4-tri-*O*-Me-Ara	1,5	32.7	1.0	103, 147, 159, 219, 89, 133	→ 1-Ara
3	2,3-di-*O*-Me-Ara	1,4,5	34.3	4.9	159, 147, 205, 103, 89, 117	→ 1-Ara-4 →
4	2,4,6-tri-*O*-Me-Glc	1,3,5	37.4	7.5	159, 147, 103, 205, 89, 133	→ 1-Glu-3 →
5	2,3,6-tri-*O*-Me-Gal	1,4,5	39.0	3.0	147, 161, 89, 103, 131, 191	→ 1-Gal-4 →
6	2,3,6-tri-*O*-Me-Glc	1,4,5	39.5	3.1	147, 159, 103, 89, 249, 133	→ 1-Glu-4 →
7	2,4-tri-*O*-Me-Gal	1,3,5,6	41.1	1.4	147, 103, 159, 89, 249, 219	→ 1,6-Gal-3 →
8	2,4-di-*O*-Me-Glc	1,3,5,6	41.7	1.5	147, 103, 205, 159, 89, 249	→ 1,6-Glc-3 → ;

PN = Peak number, TMS = trimethylsilyl group, RT = retention time, Ratio = peak area% ratio calculated from FID profile, Xyl = Xylose, Ara = Arabinose, Glc = Glucose, Gal = Galactose

로 구성되고 소수의 측쇄가 1,3-linked galactose의 6번 탄소에 연결되는 것으로 판단된다. 측쇄의 terminal은 xylose 또는 arabinose였다. 크로마토그램에서 확인할 수 없는 피크들이 있는데 이들은 기본적으로 PMAS에서는 나타날 수 없는 fragmentation ion들이 포함되어 있기 때문에 PMAS가 아닌 불순물으로 판단되며, 주쇄의 terminal (1,5-di-*O*-trimethylsilyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl glucose)이 검출되지 않았는데 이것은 가수분해과정에서 손실되어 GC-MS에서 분석 가능한 양이 부족하거나 확인이 불가능한 피크들 중에 겹쳐져 있을 것으로 판단된다. 그러므로 terminal로 galactose가 존재할 가능성이 있으며, 이것은 상기한 구조 외에 F1을 구성하는 다당류가 비슷한 분자량을 갖는 xyloglucan류와 arabinogalactan류 등이 혼재되어 있을 가능성이 있음을 의미한다. 따라서 앞으로 더 세밀한 조건에서 분리 및 분석이 필요할 것으로 판단된다.

4. 결 론

꾸지뽕나무 미숙과에서 추출한 수용성 조추출물을 GPC를 실시하여 다당류를 분리하였다. 이 다당체는 glucose, galactose, arabinose, xylose 등 4가지로 구성되어 있으며 그 조성비는 6.1 : 1.8 : 3.1 : 1.0이었다. 또한 다당체에 acetyl기의 치환여부와 uronic acid의 존재 유무를 확인하기 위해 FT-IR 분석과 염산 가수분해물의 HPLC 분석을 실시한 결과 두 가지 모두 없는 것으로 분석되었다. 결합 위치 확인을 위해 permethylation, acid hydrolysis, reduction, silylation을 순차적으로 실시하여 얻어진 PMAS들에 대한 GC-MS 분석을 실시한 결과, F1은 1,5-di-*O*-trimethylsilyl-2,3,4-tri-*O*-methyl xylose, 1,5-di-*O*-trimethylsily-2,3,4-tri-*O*-methyl arabinose, 1,4,5-tri-*O*-trimethylsily-2,3-di-*O*-methy arabinose, 1,3,5-tri-*O*-trimethylsily-2,4,6-tri-*O*-methyl glucose, 1,4,5-tri-*O*-trimethylsily-2,3,6-tri-*O*-methyl galactose, 1,4,5-tri-*O*-trimethylsily-2,3,6-tri-*O*-methyl glucose, 1,3,5,6-tetra-*O*-trimethylsily-2,4-di-*O*-methyl galactose, 1,3,5,6-tetra-*O*-trimethylsily-2,4-di-*O*-methyl glucose로 구성되어 있었고 그 조성비는 1.1 : 1.0 : 4.9 : 7.5 : 3.0 : 3.1 : 1.4 : 1.5였다.

REFERENCES

Bajpai, V.K., Sharma, A., Baek, K.H. 2013. Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of

food-borne pathogens. Food Control, 32(2): 582-590.

Björndal, H., Hellerqvist, C.G., Lindberg, B., Svensson, S. 1970. Gas-liquid chromatography and mass spectrometry in methylation analysis of polysaccharides. Angewandte Chemie International Edition in English. 9(8): 610-619.

Choi, S.R., You, D.H., Kim, J.Y., Park, C.B., Kim, D.H., Ryu, J. 2009. Antioxidant activity of methanol extracts from *Cudrania tricuspidata* bureau according to harvesting parts and time. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 17(2): 115-120.

Ciucanu, I., Kerek, F. 1984. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. Carbohydrate Research. 131: 1021-1037.

Jung, G.T., Ju, I.O., Choi, S.R., You, D.H., Noh, J.J. 2013. Food nutritional characteristics of fruit of *Cudrania tricuspidata* in its various maturation stages. The Korean Society of Food Preservation. 20(3): 330-335.

Laine, C., Tamminen, T., Horling, B. 2004. Carbohydrate structures in residual lignin-carbohydrate complexes of spruce and pine pulp. Holzforschung. 58(6): 611-621.

Mcfeeters, R.F., Thompson, R.L., Fleming, H.P. 1984. Liquid chromatographic analysis of sugars, acids, and ethanol in lactic acid vegetable fermentation. Journal of the Association of Official Analytical Chemists. 67(4): 710-714.

Seaman, J.F., Moore, W.E., Mitchell, R.L. 1963. Hydrolysis and quantitative paper chromatography, In: Method in carbohydrate chemistry. Eds. R. L. Whistler and J. N. Bemiller. Vol III. New York Academic press. p. 54-69.

Seo, M.J., Kang, B.W., Park, J.U., Kim, M.J., Lee, H.H., Kim, N.H., Kim, K.H., Rhu, E.J., Jeong, Y.K. 2013. Effect of fermented *Cudrania tricuspidata* fruit extracts on the generation of the cytokines in mouse spleen cells. Journal of Life Science. 23(5): 682-688.

Tomoda, M., Shimizu, N., Shimada, K., Suga, M. 1985. Isolation and structural features of two glucans from the rhizomes of *Crinum latifolium*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 33(1): 16-21.

Wong, C.G., Sung, S.J., Sweeley, C.C. 1980. Analysis and structural characterization of amino sugars by gas-liquid chromatography and mass spectrometry, In: Methods in carbohydrate chemistry, Eds. R. L. Whistler and J. N. Bemller. Vol. VIII. New York Academic Press, p. 55-65.

Xiang, H.H., Hong, S.S., Hwang, J.S., Heong, S.H., Hwang, J.H., Lee, M.H., Lee, M.K., Lee, D.H., Ro, J.S., Hwang, B.Y. 2005. Monoamine oxidase inhibitory constituents from the fruits of *Cudrania tricuspidata*. Archives of Pharmacal Research. 28(12): 1324-1327.

Xiang, H.H., Hong, S.S., Qinghao, J., Dayu, L., Kim, H.K., Lee, J., Kwon, S.H., Lee, D.H., Lee, C.K., Lee, M.K., Hwang, B.Y. 2009. Prenylated and benzylated flavonoids from the fruits of *Cudrania tricuspidata*, Journal of Natural Products. 72(1): 164-167.

Youn, K.S., Kim, J.W. 2012. Antioxidant and angiotensin converting enzyme I inhibitory activities of extracts from mulberry (*Cudrania tricuspidata*) fruit subjected to different drying methods. Journal of the Korean society of food science and nutrition. 41(10): 1388-1394.

Zhang, W.J. 1999. Biochemistry research and technology of glycoconjugates. 2nd Editon. Zhejiang University Press. Hangzhou, p. 12-13; 196-197.