

해산 극피동물 중의 당단백질의 특성과 이용 I. 해삼 당단백질 및 황산콘드로이친의 화학조성과 특성

류홍수[†] · 문정혜 · 서재수*

부경대학교 식품생명과학과

*고신대학교 식품영양학과

Chemical Compositions of Glycoprotein and Chondroitin Sulfates from Sea Cucumber(*Stichopus japonicus*)

Hong-Soo Ryu[†], Jeung-Hye Moon and Jae-Soo Suh*

Dept. of Food and Life Science, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

*Dept. of Food and Nutrition, Kosin University, Pusan 606-701, Korea

Abstract

To elucidate food value and medicinal effect of sea cucumbers, sugar composition of those glycoprotein and chondroitin sulfate was studied. The contents of sulfate esters in sea cucumbers were 1.21%(blue), 0.90%(red) and 1.19%(black). Predominant carbohydrates were identified as fucose, glucose, D-mannuronic acid and N-acetylglucosamine, and those amount was more than 80% to total carbohydrate, while the minor sugar composition was ribose, mannose, galactose, N-acetylgalactosamine and D-glucuronic acid. Also, the major carbohydrate moiety of glycoproteins of sea cucumbers was revealed as fucose, mannose, N-acetylglucosamine, glucose and ribose, and those amount was more than 86% to total carbohydrate. Galactose, N-acetylgalactosamine, D-glucuronic acid and mannuronic acid were minor carbohydrate moiety. The contents of sulfate esters in glycoproteins were 0.96% for blue sea cucumber, 1.15% for red sea cucumber and 1.13% for black sea cucumber, while those in chondroitin sulfates were 3.52%(blue), 3.60%(red) and 3.72%(black). The carbohydrate moiety of chondroitin sulfate was identified as N-acetylgalactosamine(73~87%), fucose(7~15%) and D-glucuronic acid(5~12%). As the base on the IR spectrum of strong absorption appeared in 1240cm^{-1} for stretching vibrations in S=O group and weak absorptions in 850cm^{-1} and 820cm^{-1} for stretching vibrations in C-O-S group, chondroitin sulfates had sulfate group which was bound to C₄ in fucose.

Key words: sea cucumber, glycoprotein, chondroitin sulfate, sugar composition

서 론

세계적으로 100여종이 분포하는 것으로 알려져 있는 해삼은 성게, 불가사리 등과 같이 극피동물에 속하며 횡감으로 날로 이용되거나 식초 절임 및 건제품으로 가공되어 식용되거나 여름철의 기력상실과 허탈상태의 회복에 효과가 있는 것으로 전래되고 있다. 한방과 민간요법에서는 인체의 단핵세포와 거식세포의 담식능력을 제고시켜 면역기능을 왕성하게 하여 당뇨병과 천식 치료에 효과가 있는 것으로 권장되고 있다. 이렇게 식용과 약용으로 애용되고 있음에도 불구하고 이에 관

한 연구는 해삼고유의 연체조직을 구성하는 성분의 확인(1,2) 및 다당류의 특성 연구 등이 있을 뿐이다(3). 또한 특수기능성을 가지는 해삼의 구성성분에 관한 연구로는 Li와 Lian(4)의 혈소판 응집에 주요인이 되는 산성 접액성 다당류(acidic mucopolysaccharide)에 관한 연구 및 chondroitin sulfate와 같은 구조를 가지는 sulfated polysaccharide의 구조 특성에 관한 연구를 들수 있다(5). 한편 Kariya 등(6)은 해삼의 체벽에서 분리한 glycosaminoglycan의 구성성분과 함량을 보고하고 있으며, Vieira 등(7,8)은 해삼 체벽에서 추출한 chondroitin sulfate의 구조를 일부 밝히고 있는 실정이다.

[†]To whom all correspondence should be addressed

이 논문은 1995년도 교육부 해양/수산과학분야 학술연구 조성비의 지원에 의해 연구되었음.

본 연구에서는 한국산 3종 식용해삼의 생리활성 특성을 구명하기 위하여 이의 주요성분인 당단백질과 황산콘드로이친의 조성과 특성을 GC, MS와 IR등의 분석법을 이용하여 해양생물자원의 효율적인 이용의 기초자료로 삼고자 하였다.

재료 및 방법

재료

실험재료인 동결건조해삼, 당단백질 및 황산 콘드로이친은 전보(9)와 동일한 것을 사용하였다.

Sulfate esters 분석

황산에스테르의 함량은 Nishino 등(10)의 방법에 따

Table 1. Operating conditions of the GC used for analysis of ChS¹⁾ and monosaccharides in sea cucumbers

Instrument: DS6200
Column: DB-I
Oven temp.: 280°C
Injection temp.: 250°C
Detector temp.: 250°C
Injection volume: 2µl
Split ratio 50 : 1
Carrier gas: He
Make up gas: N ₂
Detector: Flame Ionization Detector

¹⁾Chondroitin 4-sulfate

라 가수분해하여 Dodgson(11)과 Dodgson과 Price(12)의 방법으로 측정하였고, 표준검량선은 K₂SO₄를 이용하여 작성한 결과 표준직선은 Y=0.01857+126.62268X(r²=0.9993)이며, 이 때 X는 360nm에서의 흡광도이다.

다당류 함량과 구성당의 조성분석

다당류의 함량은 Dubois 등(13)의 방법에 따라 정량하였는데, 포도당을 표준으로 phenol-sulfuric acid와 반응하여 발색된 색도를 470nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였고(Y=139.643X-2.29929, X는 470nm에서의 흡광도, r²=0.9975) 구성당 조성분석은 Chaplin(14)의 방법에 따라 methanolysis 및 trimethylsilylation 시켜 휘발성 유도체를 만들어 이를 gas chromatography로 분석하였으며 이 때의 분석조건은 Table 1과 같다. 구성당은 표준시약(D-arabinose, D-ribose, D-fucose, D-xylose, D-mannose, D-galactose, D-glucose, N-acetyl-D-glucosamine, N-acetyl-D-galactosamine, N-acetyl-D-mannosamine, D-mannuronic acid lactone, D-galacturonic acid, D-glucuronic acid, N-acetylneuraminic acid)과 내부표준물질(myo-inositol)을 시료와 동일하게 TMS화하여 농도별로 상대적 면적비를 구하여 환산하였으며 표준 단당류의 크로마토그램은 Fig. 1에 나타내었다.

황산 콘드로이친 함량 및 조성분석

전보(9)의 gas chromatography에 의한 정량방법에 준

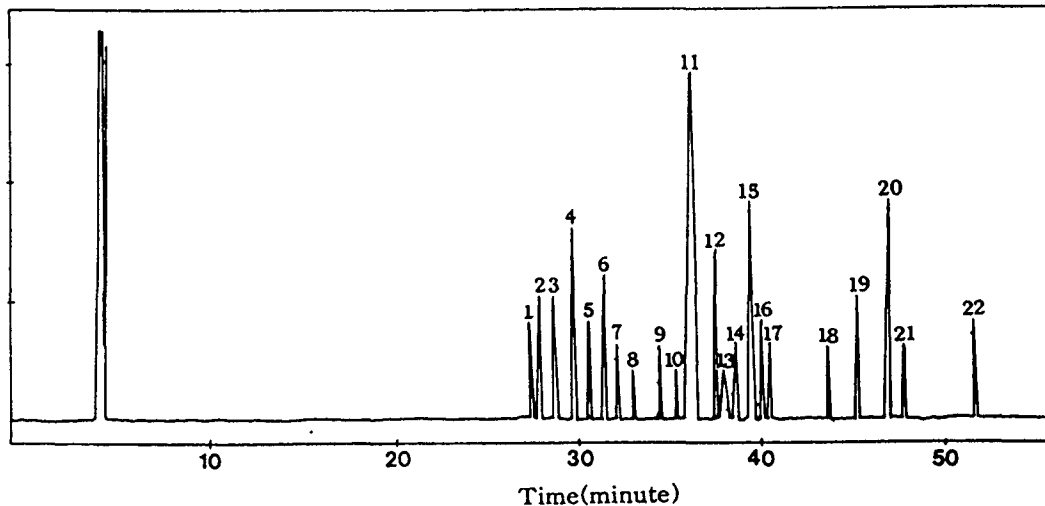


Fig. 1. Gas chromatograms of trimethylsilylated standard monosaccharides.

Peak 1,2: arabinose 3: ribose 4,5: fucose 6,7: xylose 8,14: galacturonic acid 9,10: mannuronic acid 11: mannose 12,13: galactose 15,16: glucose 17: glucuronic acid 18: N-acetylmannosamine 19: N-acetylgalactosamine 20: N-acetylglucosamine 21: myo-inositol 22: N-acetylneuraminic acid

Table 2. GC/MS conditions for chondroitin sulfate analysis

Instrument: Kratos profile HV-3 Shimadzu GC 14B
Gas chromatography Column: HP-Ultra 1(dimethylpolysiloxane) 50m×0.2mm×0.11µm film thickness Head pressure : 100kPa Injection temperature : 260°C Oven temperature : 100°C(5°C/min)→250°C(5min)→ 280°C(20min)
Carrier gas : 1ml He/min Split ratio : 2 : 1
Mass Spectrometer Magnetic sector type Analyzer electron impact Ionization voltage : 70eV Filament limit : 5.5A Source temperature : 200°C Mass range : 600 amu

하여 얻은 침전을 methanolysis시킨 후 pyridine과 TMS 화제(N-trimethylsilylimidazole)로 TMS화 시켜 잔류물은 hexane층에 녹여 분취하여 -20°C에 저장하여 두고 시험용액으로 하였으며 gas chromatography와 GC/MS의 분석조건은 Table 1, 2와 같다. 구성성분의 확인은 크로마토그램상의 retention time과 mass spectrum을 비교하여 확인하였으며 함량은 내부표준물질(myo-inositol)을 표준시약(chondroitin sulfate A)과 시료에 동일하게 처리하여 구한 상대면적비로써 환산하였다.

Infrared spectrum 분석

동결건조해삼분말에서 추출한 황산콘드로이친의 주요 반응기의 특성 및 황산기 결합위치를 조사하기 위하여 KBr pellet 형태로 시료를 조제하여 FT-IR(BRUKER IFS 48)을 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

동결건조해삼분말의 sulfate esters, 다당류 함량 및 구성당의 조성

시료로 사용한 동결건조 해삼분말의 다당류를 구성하고 있는 구성성분의 GC chromatogram은 Fig. 2와 같고 sulfate esters와 다당류 함량은 Table 3에 나타내었다. Sulfate esters의 함량은 0.9~1.21%로 시료에 따른 차이는 발견되지 않았으며, 다당류 함량은 청삼, 홍삼 및 흑삼이 25.25%, 26.97% 및 23.08%로 나타났으며 다당류를 구성하고 있는 구성 당류들은 시료에 따라 조성비는 차이가 있으나 3가지 해삼 모두 fucose, glucose,

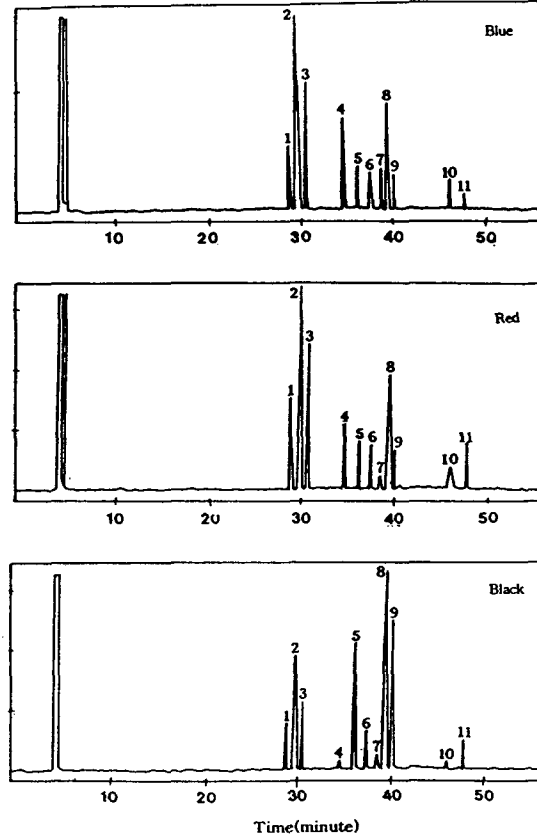


Fig. 2. GLC patterns of trimethylsilylated monosaccharides and those derivatives in sea cucumbers.
Peak 1: ribose 2,3: fucose 4: mannuronic acid
5: mannose

mannuronic acid, N-acetylglucosamine 등이 주요 구성성분으로 다당류를 구성하고 있는 당류 전체의 80% 이상을 차지하였고 ribose, mannose, galactose, N-acetylgalactosamine, D-glucuronic acid 등은 미량 구성성분으로 나타났다. 그러나 홍삼일 경우에는 ribose의 구성비율이 다른 해삼들에 비해 월등히 높아 다른 해삼들과 차별성을 보였다.

당단백질의 sulfate esters, 다당류 함량 및 구성당의 조성

동결건조해삼분말에서 DEAE-cellulose ion exchange chromatography로 분획한 획분을 동결건조시킨 당단백질의 구성당류의 chromatogram과 sulfate esters, 다당류 함량을 Fig. 3과 Table 4에 나타내었다. Sulfate esters의 함량은 동결건조해삼분말에서 청삼, 홍삼 및 흑삼이 각각 0.96%, 1.15% 및 1.13%로 나타났고, 다당류

Table 3. Contents of sulfate esters and polysaccharides in sea cucumbers and sugar composition of those polysaccharides¹⁾

Items	Blue	Red	Black
Sulfate esters(%)	1.21	0.90	1.19
Polysaccharide(%)	25.25	26.97	23.08
Sugar moieties in polysaccharide(%) ²⁾			
Ribose	7.80	13.06	5.53
Fucose	31.19	30.84	29.81
Mannose	2.81	4.72	6.20
Galactose	3.21	3.35	3.56
Glucose	23.18	16.35	25.30
D-Mannuronic acid	14.82	13.12	13.16
N-Acetylgalactosamine	1.75	1.10	1.43
D-Glucuronic acid	1.40	2.72	1.12
N-Acetylglucosamine	13.84	14.74	13.89

¹⁾ Dry weight basis

²⁾ Calculated from GC analysis, considering the total amounts under the nine monosaccharides and those derivatives as 100%

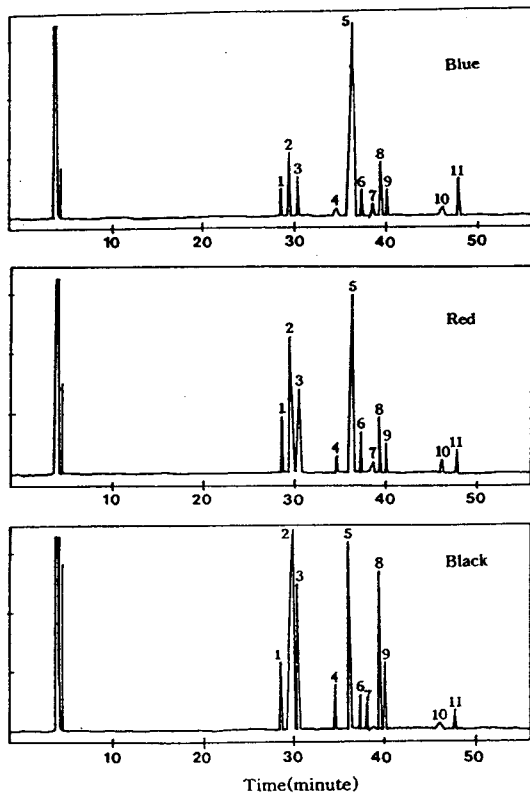


Fig. 3. Gas chromatograms of carbohydrate component in trimethylsilylated derivatives of glycoprotein from sea cucumbers by DEAE cellulose ion exchange chromatography. Peaks are same as Fig. 2.

의 함량은 61.20%(청삼), 58.70%(홍삼) 및 62.70%(흑삼)가 나타나 해삼건조분말에서보다 평균 2.4배 정도

높은 함량을 보였다. 다당류를 구성하고 있는 구성당은 해삼의 종류에 관계없이 fucose의 함량이 가장 많았으며 mannose, N-acetylglucosamine의 순으로 많아 이들 3종의 당이 전체의 70%를 차지하였다. 전체적인 당단백질의 당조성은 해삼건조분말에 비하여(Table 3) mannose, N-acetylglucosamine은 높아진 반면 glucose, mannuronic acid가 상당량 감소된 결과를 나타내었다. 흑삼에서 추출한 당단백질에는 다른 종류 해삼의 당단백질에서 보다 상대적으로 glucose함량이 높음을 알 수 있었다. 뱀장어에서 추출한 당단백질에는 N-acetylneuraminic acid(sialic acid)와 N-acetylgalactosamine의 함량이 galactose와 mannose의 함량보다 10배이상 높은 반면 fucose는 미량 함유되고 있으며(15,16), 해조류(미역, 다시마, 툇 및 모자반)에서 추출한 당단백질에는 galactose의 함량이 구성당의 50% 이상을 차지하고, xylose, mannose와 fructose가 소량 포함되어 있다고 보고되고 있다(17). 또한, 영지버섯에서 분리한 항암성다당체(18)의 조성은 glucose의 함량이 월등이 높고, fucose, galactose와 mannose의 함량은 아주 적은 것으로 보고되어 구성당 조성은 생물 종류에 따른 차이를 알 수 있었다.

황산콘드로이친의 조성

황산콘드로이친은 척추동물조직에 널리 분포하고 있는 glycosaminoglycan(GAG)으로 C-4와 C-6에 각각 황산기가 결합된 종류, C-4와 C-6에 동시에 결합된 종류로 대별되는데, 극피동물인 해삼에서 추출한 황산콘드로이친의 sulfate esters와 다당류 함량 및 이를 구성하고 있는 당류의 chromatogram과 조성은 Fig. 4와 5 및 Table 5에 나타내었다. 해삼의 ChS에는 3.5~3.7%

Table 4. Contents of sulfate esters and polysaccharide in glycoprotein¹⁾ from sea cucumbers fractionated by DEAE cellulose ion exchange chromatography and sugar composition of those polysaccharides

Items	Blue	Red	Black
Sulfate esters(%)	0.96	1.15	1.13
Polysaccharide(%)	61.20	58.70	62.70
Sugar moieties in polysaccharide(%) ²⁾			
Ribose	6.91	9.69	5.96
Fucose	25.14	28.51	25.68
Mannose	24.90	21.77	18.46
Galactose	2.08	5.04	1.07
Glucose	9.20	5.87	12.87
D-Mannuronic acid	2.77	3.02	6.53
N-Acetylgalactosamine	5.53	3.42	10.49
D-Glucuronic acid	2.60	2.24	3.39
N-Acetylglucosamine	20.87	20.44	15.55

¹⁾Glycoproteins were prepared using DEAE cellulose ion exchange chromatography

²⁾Calculated from GC analysis, considering the total amounts under the nine monosaccharides and those derivatives as 100%

정도의 sulfate esters와 72~75%범위의 다당류가 포함되어 있는데, 이 다당류는 glucuronic acid(GlcA), N-acetylgalactosamine(GalNAc)과 fucose가 포함되어 있으며, 황산콘드로이친의 표준품(chondroitin 4-sulfate,

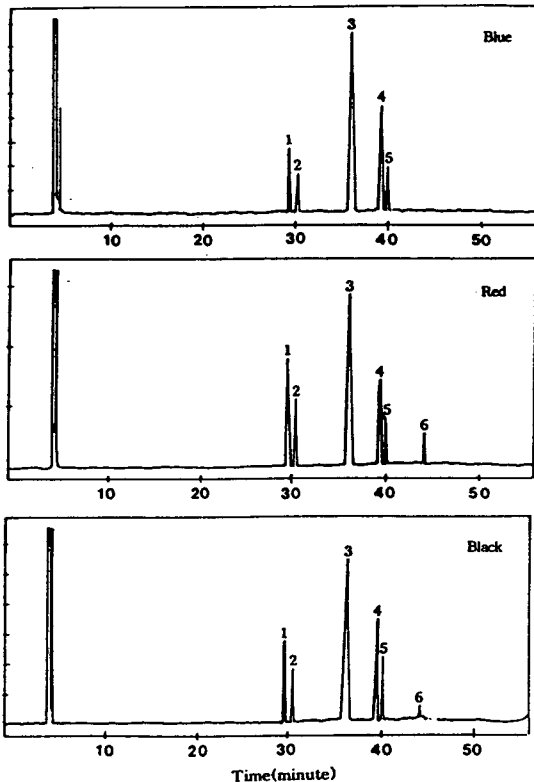


Fig. 4. GLC patterns of trimethylsilylated chondroitin sulfate from various sea cucumbers.

Peak 1,2: fucose, 3,6: N-acetylgalactosamine, 4,5: D-glucuronic acid

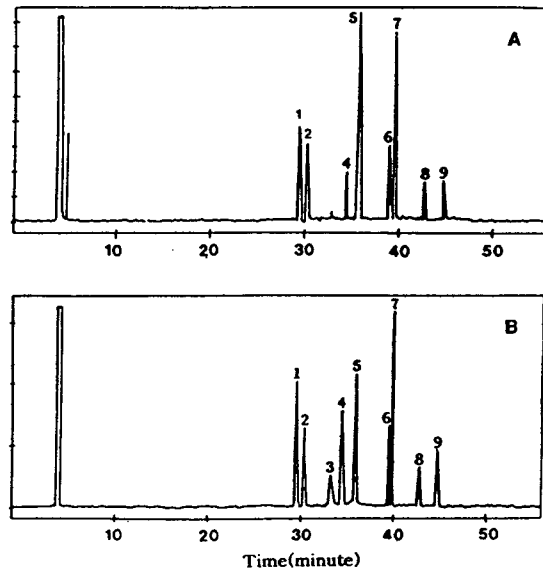


Fig. 5. GC chromatograms of trimethylsilylated chondroitin sulfate(ChS) standard.

(A) Chondroitin 4-sulfate(standard)

(B) Mixture of fucose, N-acetylgalactosamine and D-glucuronic acid

Peak 1, 2: fucose

3, 4, 6, 7: D-glucuronic acid

5, 8, 9: N-acetylgalactosamine

Sigma社)의 조성(Fig. 4)과 거의 비슷하였으므로 fucose branched chondroitin sulfate라고 할 수 있다(1). 이것은 척추동물조직의 glycosaminoglycan(19), marine algae (2) 및 성게알의 jelly coat에서 분리한 fucose rich sulfated polysaccharide(20)와는 구조적인 면에서 다르다. 한편, 오징어 연골에서 발견되는 황산콘드로이친(21)은 N-acetyl-D-galactosamine 분자의 6번 탄소위치에 fucose 대신에 glucose가 결합되어 있는 것이 특징이나, 오징

Table 5. Yields, sulfate esters content and carbohydrate profiles of chondroitin sulfates from sea cucumbers^{1,2)}

Items	Blue	Red	Black
Yields(%)	2.81±0.3	2.62±0.2	2.63±0.5
Sulfate esters(%)	3.52±0.3	3.60±0.1	3.72±0.2
Polysaccharide(%)	75.40±1.7	72.17±1.3	73.10±1.5
Monosaccharide(%) ³⁾			
Fucose	6.95±0.4	10.01±0.7	14.92±0.8
D-Glucuronic acid	6.23±0.5	5.13±0.1	12.01±0.3
N-Acetylgalactosamine	86.72±6.2	84.86±5.8	73.07±5.7

¹⁾Mean±S.D.

²⁾Dry weight basis

³⁾Calculated from GC analysis, considering the total amounts under the three monosaccharides as 100%

어 먹물에서는 연골과는 달리 fucose가 다량 결합되어 있는 glycosaminoglycan이 함유되어 있는 것으로 보아 해삼 ChS는 오징어 ChS와는 구조나 성분상으로 서로 다를 수 있었다. 또한 Table 5에 나타난 바와 같이 해삼의 황산콘드로이친의 구성성분의 조성이 청삼의 경우 fucose : D-glucuronic acid : N-acetylgalactosamine=1 : 0.9 : 12.5, 홍삼이 1 : 0.5 : 8.5 및 흑삼이 1 : 0.8 : 4.9의 비율로 되어 있어 Kariya 등(6)이 조사한 일본산 해삼의 ChS 조성(1 : 0.3 : 0.3)과는 아주 달랐는데, 이것은 화학성분조성이 다른 3가지 획분 중 제3의 획분만 조사한 것이기 때문에, 본 실험에서는 그들의 결과보다

상대적으로 높은 비율로 fucose함량이 나타난 결과라고 생각된다(3,5,8,22).

황산콘드로이친의 특성

황산콘드로이친 표준품(chondroitin 4-sulfate, Sigma社)에 함유된 구성성분을 GC/MS로 분석한 total ion chromatogram(TIC)와 동결건조해삼분말에서 추출한 황산콘드로이친을 GC/MS로 분석한 total ion chromatogram(TIC)을 Fig. 6, 7과 8에 나타내었다. 이 결과 황산콘드로이친의 표준품과 같은 양상의 spectrum이 얻

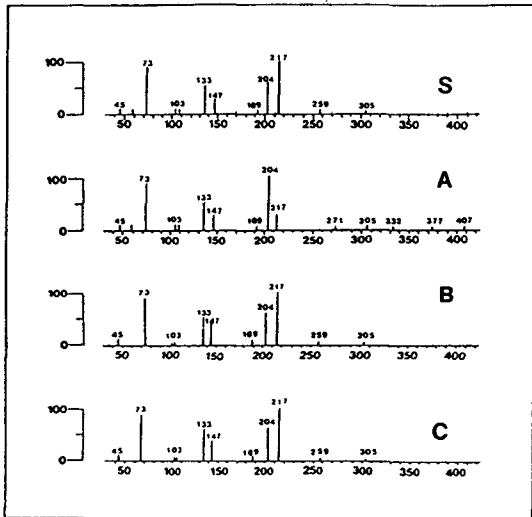


Fig. 6. Mass spectrum of β -L-galactopyranoside, methyl-6-deoxy-2,3,4-tris-O-(trimethyl) from ChS standard and chondroitin sulfates of sea cucumbers.

- S: Derivative from chondroitin sulfate standard (Sigma Co.)
- A: Derivative from chondroitin sulfate in blue sea cucumber
- B: Derivative from chondroitin sulfate in red sea cucumber
- C: Derivative from chondroitin sulfate in black sea cucumber

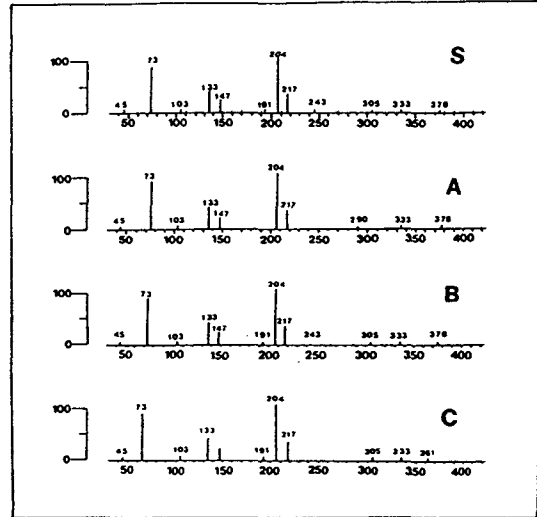


Fig. 7. Mass spectrum of β -D-galactopyranoside, methyl-2,3,4,6-tetrakis-O-(trimethyl) from ChS standard and chondroitin sulfates of sea cucumbers.

- S: Derivative from chondroitin sulfate standard (Sigma Co.)
- A: Derivative from chondroitin sulfate in blue sea cucumber
- B: Derivative from chondroitin sulfate in red sea cucumber
- C: Derivative from chondroitin sulfate in black sea cucumber

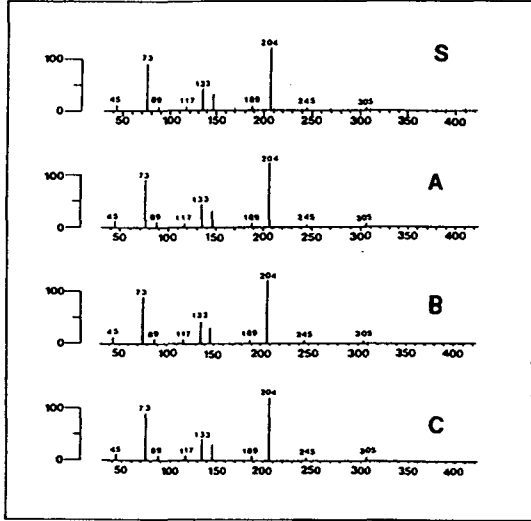


Fig. 8. Mass spectrum of α -L-glucopyranoside, methyl-2,3,4,6-tetrakis-O-(trimethyl) from ChS standard and chondroitin sulfates of sea cucumbers.

S: Derivative from chondroitin sulfate standard (Sigma Co.)

A: Derivative from chondroitin sulfate in blue sea cucumber

B: Derivative from chondroitin sulfate in red sea cucumber

C: Derivative from chondroitin sulfate in black sea cucumber

어져, D-glucuronic acid와 N-acetylgalactosamine으로 동정하였다. 또한 IR spectrum에서 황산기나 에스테르 등 몇몇 중요한 원자단의 신축진동에 의한 흡수가 $1500\sim 700\text{cm}^{-1}$ 에서 나타났으며, 이 영역이 분자의 구조와 성분을 확인하는데 중요한 역할을 하기 때문에 동결건조 해삼에서 추출한 황산콘드로이친의 fucose와 황산기 사이의 결합구조를 알기 위하여 황산콘드로이친 표준품(chondroitin 4-sulfate, Sigma社)의 IR spectrum과 비교하였다(Fig. 9). Fig. 10, 11과 나타난 바와 같이 황산기 중의 S=O stretching vibration (신축진동)은 대략 1240cm^{-1} 에서, C-O-S 신축진동의 경우 axial 항배는 850cm^{-1} , equatorial 항배는 820cm^{-1} 에서 나타나는데(23,24), 황산기가 fucose의 C₂와 C₃의 위치에 결합한다면 equatorial 항배로, C₄ 위치의 경우에는 axial 항배로 결합된다. 표준품과 해삼에서 추출한 황산콘드로이친의 IR spectrum은 3가지 시료에서 얻어진 흡수 pattern이 표준품과 거의 비슷하였다. 또한 850cm^{-1} 부근에서 강한 흡수대를 나타내었으므로 주로 fucose의 C₄위치에 결합되어 있다고 할 수 있다. 그러나 해삼에서 추출한 황산콘드로이친의 경우 850cm^{-1} 에서의와 함께 820cm^{-1} 에서도 약한 흡수대가 나타난 것으로 보아 황산기의 일부는 fucose의 C-2나 C-3위치에도

결합되어 있는 것으로 생각된다. 이러한 것으로 부터 ester결합을 기초로 하는 황산기가 있다고 추정되었으며, $3,400\text{cm}^{-1}$ 부근의 O-H 신축진동, $2,900\text{cm}^{-1}$ 부근의 C-H 신축진동, $1,650\text{cm}^{-1}$ 부근의 C=O결합의 신축진동, $1,000\sim 1,100\text{cm}^{-1}$ 부근에서의 C-H, C-O 변각운동 등 다

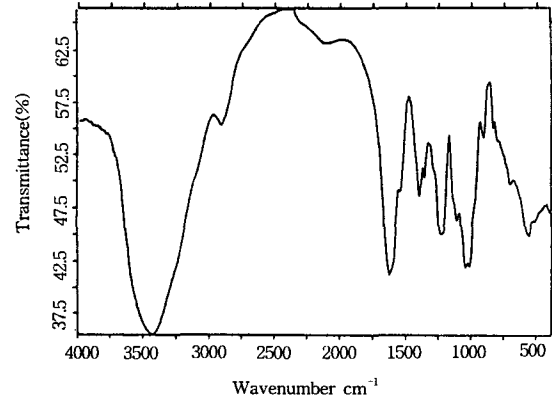


Fig. 9. IR spectrum of the chondroitin sulfate standard.

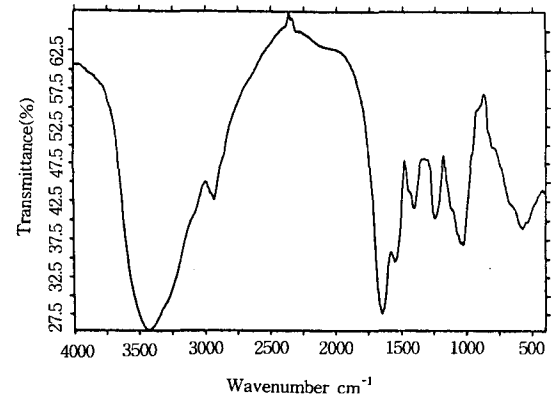


Fig. 10. IR spectrum of the chondroitin sulfate from blue sea cucumber.

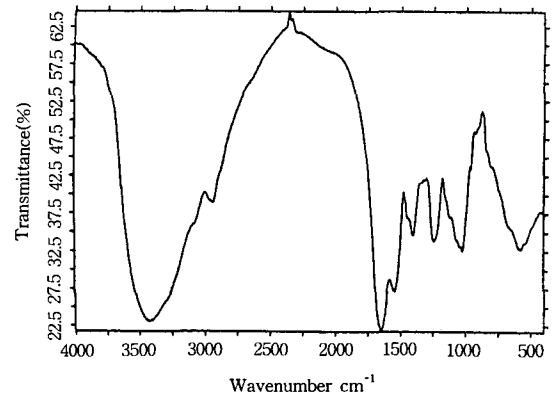


Fig. 11. IR spectrum of the chondroitin sulfate from red sea cucumber.

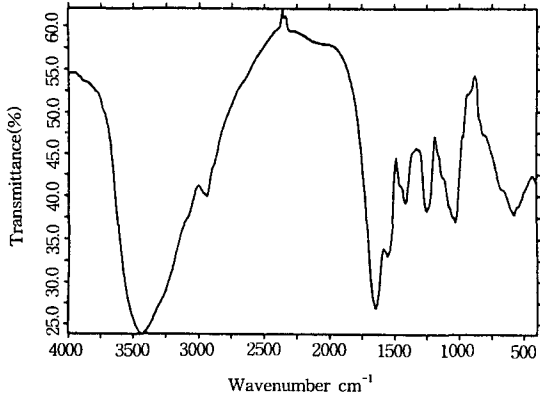


Fig. 12. IR spectrum of the chondroitin sulfate from black sea cucumber.

른 다당류의 일반적인 특징도 함께 관찰할 수 있었다.

요 약

식용 및 약용으로 이용한 역사가 오래인데도 불구하고 구성성분의 조성에 대하여 충분한 연구가 되어 있지 않은 해삼에서 당단백질과 황산콘드로이친을 추출정량하여 이들의 화학적 조성과 구조적 특성을 GC, MS 및 IR로 검토하였다. 동결건조 해삼분말의 화학적인 조성은 sulfate esters 함량이 0.90~1.21%, 다당류 함량이 23.08~26.97%였고 이를 구성하고 있는 구성다당류는 fucose의 함량이 30% 이상을 차지하는 것을 비롯하여 glucose, N-acetylglucosamine, mannuronic acid, ribose의 5종이 거의 88% 이상을 차지하고 있었고 그외 mannose, galactose, N-acetylgalactosamine, D-glucuronic acid도 소량 검출되었다. 추출당단백질의 sulfate esters의 함량은 0.96~1.13%, 다당류의 함량은 58.7%~62.7%로 나타나고 주요 구성당은 fucose가 30%내외로 가장 많았으며 mannose, glucose와 ribose가 86% 이상을 차지하며 galactose, N-acetylgalactosamine, D-glucuronic acid, N-acetylglucosamine도 소량 함유하고 있었다. 동결건조 해삼분말에서 추출한 황산콘드로이친의 황산기의 함량은 3.52~3.72%이었다. 이들의 구성성분은 fucose, N-acetylgalactosamine 및 D-glucuronic acid이며 IR spectrum에서 1240cm⁻¹의 S=O 신축진동과 850cm⁻¹나 820cm⁻¹의 C-O-S 신축진동이 나타나 fucose의 C₄의 결합위치를 나타내고 있었다.

문 헌

1. 元廣輝重 : 水産物の糖蛋白に関する研究-I. ナマコおよびフジコより糖蛋白の分離抽出について. 日本水産

學會誌, 26, 1171(1960)
 2. Albano, R. M. and Mourão, P. A. S. : Presence of sulfated glycans in ascidian tunic and in the body wall of a sea cucumber. *Biochim. Biophys. Acta*, 760, 192 (1983)
 3. Mourao, P. A. S. and Bastos, I. G. : Highly acidic glycans from sea cucumbers. Isolation and fractionation of fucose-rich sulfated polysaccharides from the body wall of *Ludwigothurea grisea*. *Eur. J. Biochem.*, 166, 639(1987)
 4. Li, J. Z. and Lian, E. C. : Aggregation of human plates by acidic mucopolysaccharide extracted from *Stichopus japonicus* Selenka. *Thrombosis & Haemostasis*, 59, 435(1988)
 5. Vieira, R. P. and Mourao, P. A. S. : Occurrence of a unique fucose-branched chondroitin sulfate in the body wall of a sea cucumber. *J. Biol. Chem.*, 263, 18176(1988)
 6. Kariya, Y., Watabe, S., Hashimoto, K. and Yoshida, K. : Occurrence of chondroitin sulfate E in glycosaminoglycan isolated from the body wall of sea cucumber (*Stichopus japonicus*). *J. Biol. Chem.* 265, 5081(1990)
 7. Vieira, R. P., Mulloy, B. and Mourao, P. A. S. : Structure of a fucose-branched chondroitin sulfate from sea cucumber. *J. Biol. Chem.*, 266, 13530(1991)
 8. Vieira, R. P., Pedrosa, C. and Mourao, P. A. S. : Extensive heterogeneity of proteoglycans bearing fucose-branched chondroitin sulfate extracted from the connective tissue of sea cucumber. *Biochemistry*, 32, 2254(1993)
 9. 문정혜, 류홍수, 유병진, 문수경 : 해삼 당단백질의 물리 화학적 특성과 식이효과. *한국영양식량학회지*, 25, 240 (1996)
 10. Nishino, T., Yokoyama, G., Dobashi, K., Fujihara, M. and Nagumo, T. : Isolation, purification and characterization of fucose-containing sulfated polysaccharides from the brown seaweed *Ecklonia Kurome* and their blood-anticoagulant activities. *Carbohydr. Res.*, 186, 119(1989)
 11. Dodgson, K. S. : Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. *Biochem. J.*, 78, 312(1961)
 12. Dodgson, K. S. and Price, R. G. : A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochem. J.*, 84, 106(1962)
 13. Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P. and Smith, F. : Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28, 350(1956)
 14. Chaplin, M. F. : A rapid and sensitive method for the Analysis of carbohydrate components in glycoproteins using gas-liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 123, 336(1982)
 15. Asakawa, M. : Sialic acid-containing glycoprotein in the external mucus of eel, *Anguilla japonica* Temminck et Schlegel- I. Separation and purification of sialic acid-containing glycoprotein. *Memoirs of the Faculty of Education, Kumamoto University*, 21, 53(1972)
 16. Asakawa, M. : Sialic acid-containing glycoprotein in the external mucus of eel, *Anguilla japonica* Temminck et Schlegel- II. Carbohydrate and amino acid com-

- position. *Bull. Jpn. Soc. Fisheries*, **40**, 303(1974)
17. Ryu, B. H., Kim, D. S., Cho, K. J. and Sin, D. B. : Antitumor activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **21**, 595(1989)
 18. 김성환, 김을상, 김영식 : 영지버섯에서 분리한 항암성 다당체에 관한 연구. *한국영양식량학회지*, **24**, 147(1995)
 19. Mathews, M. B. : *Connective Tissue : Macromolecular Structure and Evolution*. Springer-Verday, Berlin(1975)
 20. Hotta, K., Hamazaki, H. and Kurokawa, M. : Isolation and properties of a new type of sialopolysaccharide-protein complex from the jelly coat of sea urchin eggs. *J. Biol. Chem.*, **245**, 5434(1970)
 21. Habuchi, O., Sugiura, K. and Kawai, N. : Glucose branches in chondroitin sulfates from squid cartilage. *J. Biol. Chem.*, **252**, 4570(1977)
 22. Mourao, P. A. S. and Vieira, R. P. : Sulfated polysaccharides from Echinoderms reveal unique structures and new potential as bioactive polymers. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, **7**, 235(1995)
 23. 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)
 24. Lloyd, A. G., Dodgson, K. S., Price, P. G. and Rose, F. A. : Infrared studies on sulfate esters. *Biochim. Biophys. Acta*, **46**, 108(1961)

(1996년 11월 20일 접수)