

대황(*Eisenia bicyclis*)으로부터 Laminaran의 정제 및 화학적 특성

김영명[†] · 최용석 · 박종혁

한국식품연구원

Purification and Chemical Characterisation of Laminaran from *Eisenia bicyclis* in Korea

Young-Myoung Kim[†], Yong-Seok Choi and Jong-Hyuk Park

Korea Food Research Institute, Gyeonggi 463-746, Korea

Abstract

Laminarans with different purity were prepared from *Eisenia bicyclis* and their structures were characterized. Crude laminaran was successively extracted two times at room temperature for 2 hr with 0.09 N HCl, and partially purified laminaran was isolated using cetylpyridinium chloride (CPC). Crude laminaran accounted for 14.5% of the dry seaweed weight and contained 8.4% protein, 7.6% sulfate and 68.2% polysaccharide. Partially purified laminaran accounted for 6.5% of the dry algal weight and composed of 3.8% protein, 3.2% sulfate and 74.7% total sugar, which is mainly composed of glucose (83.3%), indicating that partially purified laminaran was more purified polysaccharide than crude laminaran. Purified laminaran was fractionated into one fractions by Sephacryl S-300 HR column chromatography and this fraction was analysed by FT-IR, ¹³C NMR, methylation and gel filtration chromatography. Purified laminaran showed β -configuration (¹³C: 103.0 ppm, FT-IR: 888 cm⁻¹) in the anomerization of the glycosidic linkages and was (1→3), (1→6) linked β -glucan. The average molecular weight of purified laminaran was 12,600 dalton.

Key words: *Eisenia bicyclis*, laminaran, purification, structure

서 론

갈조류는 건물기준으로 탄수화물을 약 30~67%까지 함유하고 있으며, 갈조류가 함유하는 다당류는 대부분이 알긴산, 라미나란 및 fucoidan 등으로 구성되어 있다(1). 알긴산은 갈조류의 세포막 또는 세포간 물질을 구성하는 주성분으로 β -D-mannuronic acid와 α -L-glucuronic acid가 α -1, 4 결합 또는 β -1, 4 결합한 hetero형 다당류로 알려져 있고 식품, 화장품 및 의약품 산업에 광범위하게 이용되어지고 있다(2). Fucoidan은 모든 갈조류에 존재하는 수용성 다당류로 주 결합이 α -(1→2)-linked L-fucose 또는 α -(1→3)-linked L-fucose로 황산기는 C-4에 결합되어 있으며(3), Cote(4)는 acetolysis를 통해 fucoidan 내에 (1→2) linked fucose 이외에 (1→3) 및 (1→4) linked fucose도 존재한다고 보고하였으며, Mian과 Percival은 *Himanthalia lorea*와 *Bifurcaria bifurcata*로부터 추출한 fucoidan을 methylation, periodate oxidation 및 partial hydrolysis를 통하여 주 결합이 (1→2) 및 (1→3) linked fucose이며 황산기는 C-4에 결합되어 있다고 하였다(5). 또한 Koo(6)는 국내산 다시마, 톳, 모자반 및 미역포자엽에서 추출한 fucoidan은 주 결합이 (1

→3) linked fucose였으며 미역포자엽에는 (1→3) linked galactose도 존재하며, 황산기의 대부분은 fucose와 galactose의 C-4 위치에 결합되어 있다고 보고하였다. Fucoidan은 합황 산성다당류인 heparin과 생리적 특성이 유사하여 anticoagulant 뿐 아니라 antitumor, immun-suppressive activities 등 다양한 생리적 기능이 밝혀지고 있다(7-10). Laminaran은 갈조류에 다량 함유되어 있는 저장다당류로 Painter(11) 및 Percival과 McDowell(12)은 갈조류로부터 저분자 라미나란을 분리, 정제하여 구조분석한 결과 주로 β -1,3 결합으로 구성된 glucan이었으며, β -1,6 결합을 35% 정도 함유하였다고 보고하였다. 라미나란과 유사한 다당류로는 일본에서 항암제의 보조제로 사용하고 있는 schizophyllan이 있으며 강한 면역 증진 작용이 보고되고 있으며(13), 정제도, 용해도 및 분자량의 크기 등에 따라 생리활성이 달라진다고 보고하였다(14). 라미나란은 구조적 특성으로 인해 β -glucan과 유사한 생리활성을 나타내며, 특히 식물 및 동물의 면역활성 증진효과, radioprotective, antitumor 및 antibacterial activity에 관여한다고 보고되고 있다(15-17). 최근 해조류로부터 추출한 fucoidan 및 알긴산은 여러 가지 생리활성이 있다는 연구들이 발표되면서 화학적 조성 및 구

[†]Corresponding author. E-mail: ymkim@kfri.re.kr
Phone: 82-31-780-9009. Fax: 82-31-780-9099

조분석이 검토된 반면, 라미나란의 화학적 조성 및 구조분석에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 국내 연안에 자생하는 대황(*Eisenia bicyclis*, 大荒)에서 라미나란을 추출, 정제, 분획하여 화학적 특성을 검토하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에 사용한 대황(*E. bicyclis*, 大荒)은 2002년 8월 울릉도 연안에서 채취한 생 시료를 담수로 2~3회 수세한 후 50°C 열풍건조기로 24시간 건조하였다. 그리고 분쇄기로 분쇄한 후 -20°C에 밀봉 보관하면서 실험에 사용하였다.

실험에 사용된 시약들 중에서 cetylpyridinium chloride (CPC), bovine serum albumin(BSA), *myo*-inositol, rhamnose, fucose, ribose, arabinose, xylose, mannose, galactose, glucose, dimethylsulfoxide(DMSO), 2.5 M butyllithium solution(in hexane), iodomethane, chloroform, methanol, trifluoroacetic acid(TFA), sodium borodeuteride, acetic acid, acetic anhydride, pyridine, dichloromethane, DMSD- d_6 등은 Sigma사 제품을 사용하였고, 그 외의 시약들은 특급시약을 사용하였다.

일반성분 분석

대황의 일반성분은 AOAC법(18)에 따라 수분함량은 상압건조법, 조지방은 Soxhelt 추출법, 조단백질은 Kjeldahl법, 조회분은 건식회화법으로 분석하였다. 그리고 탄수화물은 무수물로 환산하여 조단백질, 조지방, 조회분을 뺀 나머지 값으로 환산하였다.

조 라미나란의 추출 및 정제

조 라미나란(crude laminaran)의 추출은 Zvyagintseva 등(19)의 방법을 수정하여 추출하였다. 즉 대황 분말 시료에 20배량의 0.09 N HCl을 가한 후 실온에서 2시간 교반 추출한 후 3겹의 가아제와 여과지(Whatman No. 41)로 여과하였다. 잔사는 동일하게 한번 더 추출 여과한 후 여액을 취하였다. 여액은 3배의 에탄올을 가하여 수용성 다당을 침전시켰다. 침전된 수용성 다당은 원심분리(4,000×g, 15 min)한 후 증류수로 24시간 투석(MWCO 3,500, MEMBRANE FILTRATION Inc., USA)한 후 동결건조하여 조 라미나란(crude laminaran)을 얻었다.

조 라미나란으로부터 라미나란의 정제는 Scott(20)의 방법에 따라 cetylpyridinium chloride(CPC, Sigma Co., USA)를 사용하여 CPC에 침전되는 산성다당을 제거하여 부분정제 라미나란(partially purified laminaran, PPL)을 분리하였다. 즉, 1%(w/v) 조 라미나란 용액에 일정량의 무수 황산나트륨을 가한 다음 5% CPC를 첨가하여, 37°C에서 4시간 교반하여 침전물인 산성 다당과 상층액인 중성 다당으로 나누

었다. 이 분획물은 원심분리한 후 상층액을 3배량의 에탄올에 침전시키고 원심분리 후 투석, 동결 건조하여 부분정제된 라미나란을 얻었다. 원심분리하여 얻은 CPC 침전물은 소량의 증류수에 용해, 투석한 다음 동결건조하여 산성다당(sulfated polysaccharide, SP)을 얻었다(Fig. 1).

라미나란 정제

라미나란의 정제는 Sephacryl S-300 High Resolution column(2.6×60 cm, Amersham Pharmacia, Sweden)을 사용하여 정제하였다. 부분정제 라미나란을 Tris-HCl buffer (pH 7.0)에 용해시킨 후 0.2 μm filter로 여과하였다. 그리고 Tris-HCl buffer로 미리 안정화된 Sephacryl S-300 HR 칼럼에 시료를 가한 후 0.3 mL/min로 용출하였다. 용출액은 fraction collector로 6 mL씩 모은 후 페놀-황산법(21)으로 490 nm에서 흡광도를 측정하여 라미나란 분획물을 얻었으며, 분획은 모아서 증류수에 24시간 투석, 농축한 후 동결건조하여 라미나란 정제물(purified laminaran)을 얻었다.

화학적 조성 분석

추출한 다당의 총당 함량은 페놀-황산법으로, 단백질의 함량은 Lowry법(22)으로, 황산기의 함량은 Dodgson과 Price(23)의 방법으로 측정하였고, 구성당 조성 분석은 Fур-neaux 등(24)의 방법에 따라 gas chromatography(HP-6890, Hewlett Packard, USA)로 분석하였다. 칼럼으로 SP-2330 칼럼(0.25 mm I.d.×30 m, film thickness: 0.2 μm, Supelco, USA)을 사용하였고, 230°C에서 등은 분석하였다. 구성당의 확인은 표준시약의 크로마토그램과 retention time을 비교하여 확인하였으며, 정량은 내부표준물질(*myo*-inositol)과 표준당(rhamnose, fucose, ribose, arabinose, xylose, mannose, galactose, glucose)을 시료와 동일하게 acetylation시켜 검량 곡선을 작성하여 환산하였다.

분자량 측정 및 FT-IR

정제 라미나란의 분자량을 측정하기 위해서 HPLC(908 pump, 930; Jasco Co., Japan)를 사용하여 측정하였다. Ultrahydrogel 1000 칼럼(300×7.8 mm I.D., Waters, USA)에 0.25%로 녹인 정제 라미나란을 20 μL를 주입한 후 증류수(0.8 mL/min)로 용리하였고, refractive index(RI) detector(930 RI, Jasco Co., Japan)로 측정하였다. 분자량 측정용 표준시약은 dextran(Sigma Co., USA)을 사용하였고, 표준 dextran의 평균 분자량은 T-70은 71,900, T-40은 39,200, T-10은 9,300 dalton이었으며, 이들로부터 분자량 검량선을 작성하고 정제 라미나란의 평균 분자량을 측정하였다. 그리고 분획 다당의 α, β-configuration 확인은 시료 1 mg을 동량의 KBr분말과 혼합하여 pellet 형태로 성형하고 FT-IR spectrometer(FTIR-300E spectrometer, Jasco, Japan)을 이용하여 적외선 흡수 spectrum을 측정하였다.

Methylation-acetylation 및 ¹³C NMR 분석

정제 라미나란의 methylation은 Harris 등(25)과 Carpita

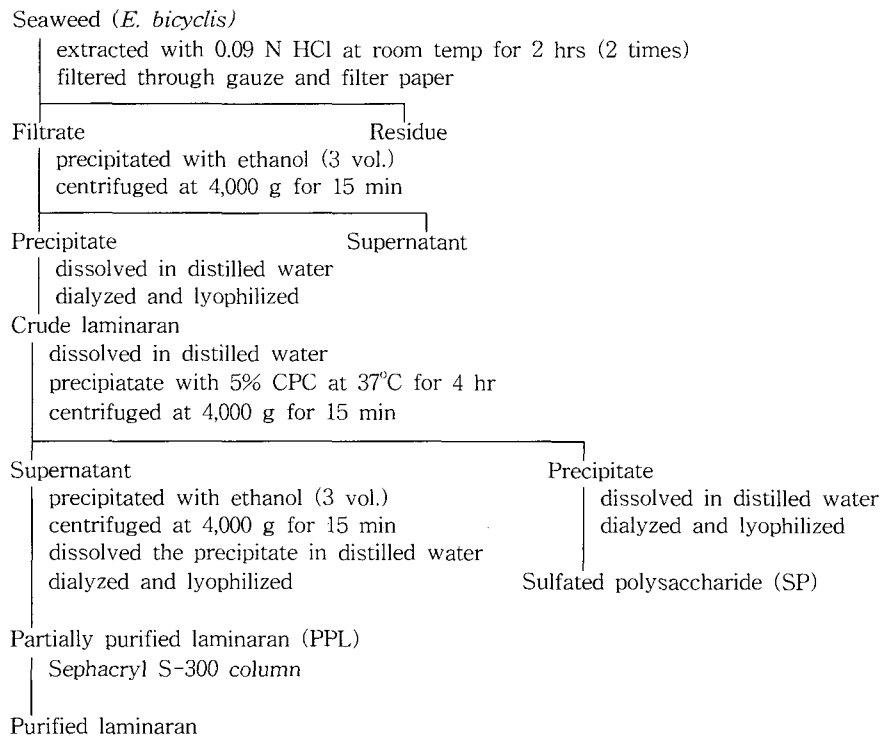


Fig. 1. Scheme for the isolation of laminaran from *E. bicyclis*.

와 Shea(26)의 방법에 의하여 분석하였다. 즉, 시료 5 mg을 뚜껑이 있는 pyrex tube에 취하고 DMSO 1 mL를 가해서 50°C에서 시료를 녹였다. 이 시료 용액에 2.5 M butyllithium solution(in hexane) 0.5 mL를 가하고 40°C에서 1시간 반응시켜 hydroxyl기를 polyalkoxide 이온으로 전환시킨 후 0°C로 냉각하였다. 냉각된 용액에 iodomethane 0.5 mL를 가하고 N₂로 치환 후 실온에서 1시간 교반하면서 methylation시켰다. Methylation된 시료에 chloroform:methanol(2:1) 용액 3 mL와 증류수를 가하고 교반한 후 원심분리(200×g, 60 sec)한 다음 상층액을 제거하였다. 다시 증류수 2 mL를 가하여 교반, 원심분리, 상층액 제거 조작을 4회 더 반복한 후 N₂로 건조시켰다. 그리고 내부 표준물질로서 myo-inositol을 함유한 2 M TFA 0.5 mL를 가하고 120°C에서 75분간 가수분해하였다. Air로 TFA를 휘발시킨 후 0.26 M sodium borodeuteride 용액 0.2 mL 가하고 약하게 교반 후 40°C에서 90분간 환원하였다. 과잉의 borodeuteride는 acetic acid 0.2 mL를 가하여 반응을 정지시키고 40°C 공기로 건조시켰다. 그리고 methanol 0.5 mL를 가하여 교반 후 건조시켜 잔존하는 borate 제거 조작을 2번 더 반복하였다. Acetic anhydride 0.3 mL와 pyridine 0.3 mL를 가하고 교반 후 120°C에서 20분간 acetylation시키고 40°C 공기로 건조하였다. 건조된 시료에 dichloromethane 1.0 mL를 가하고 교반한 후 증류수 0.5 mL를 가하여 교반한 다음 상층액을 제거하고 다시 증류수 1.0 mL를 가하였다. 그리고 다시 교반한 후 dichloromethane 층을 -20°C에서 저장해두고 GC-MSD(HP-5973, Hewlett

Packard, USA)로 분석하였다. Partially *O*-methylated alditol acetate의 동정은 GC-MSD fragment와 retention time을 비교하여 확인하였다. 그리고 분석용 칼럼은 SP-2330으로 160°C에서 210°C까지 2°C/min, 210°C에서 240°C까지 5°C/min로 승온 분석 후 240°C에서 10분 동안 등온 분석하였다.

¹³C-NMR 분석은 정제 라미나란을 DMSO-*d*₆에 용해하여 300 MHz NMR spectrometer(Bruker AMX 500, Germany)을 이용하여 50°C에서 측정하였으며, 핵자기공명 흡수 위치-화학적 이동가(chemical shift value)는 tetramethylsilane(TMS)를 0.0 ppm으로 환산하여 나타내었다.

결과 및 고찰

일반성분

본 실험에 사용한 대황의 일반 성분 조성은 Table 1과 같다. 주요 갈조류의 건물 당 탄수화물의 함량은 75.4%로 주성분이었으며, 회분함량이 14.0%였으며, 다음으로 단백질 9.4%, 조지방 1.2%의 순으로 함량이 높았다. Koo 등(27)은 국내산 주요 갈조류인 미역포자엽, 다시마, 툯, 모자반의 일

Table 1. Proximate composition of *E. bicyclis* (% dry basis)

Crude protein	Crude lipid	Carbohydrate ¹⁾	Ash
9.4	1.2	75.4	14.0

¹⁾100 - (protein + crude lipid + ash).

반성분을 측정하였는데 주요 성분은 탄수화물로 50.8%~63.4%였으며, 회분(22.3%~33.2%), 조단백질(9.7%~15.8%) 그리고 조지방(4.1%~9.3%)의 순으로 함량이 높아 본 실험의 결과와 유사한 경향을 나타내었으며, 본 실험에서 탄수화물의 함량이 높고 회분의 함량이 낮은 이유는 담수 수세 정도에 따라 NaCl의 함량 및 해수의 무기염과 해조 자체의 무기염이 제거되었기 때문으로 여겨진다(28).

조 라미나란의 추출 및 정제 다당의 화학적 조성

대황을 Zvyagintseva 등(19)의 방법에 따라서 추출한 조 라미나란과 CPC를 사용하여 정제한 라미나란의 화학적 조성은 Table 2에 나타내었다. 대황을 분말화한 후 0.09 N HCl로 실온에서 2시간 2회 반복 추출한 조 라미나란의 수율은 14.5%였으며, 그 화학적 조성을 살펴보면 총당의 함량이 68.2%로 주요 성분이었으며, 그 외에 단백질이 8.4% 그리고 황산기의 함량이 7.6%이었다. 주요 구성당의 조성을 살펴

보면 glucose의 함량이 55.0%이었으며, 기타 fucose, mannose, galactose가 각각 28.6, 7.9, 8.5%이었다. 대황에서 추출한 다당은 다른 갈조류에서 추출되는 다당보다 산성도가 적은 중성다당으로 glucose가 주요성분인 glucan임을 알 수 있었다.

Fig. 2는 CPC를 사용하여 부분 정제한 라미나란과 산성다당의 크로마토그램을 나타낸 것이다. CPC를 사용하여 부분 정제한 라미나란의 조성은 총당, 단백질 및 황산기의 함량이 각각 74.7, 3.8, 3.2%로 조 라미나란에 비하여 총당의 함량이 증가(68.2%→74.7%)하였고, 단백질(8.4%→3.8%) 및 황산기의 함량(7.6%→3.2%)이 감소하였다. 그리고 구성당의 glucose 함량이 55.0%에서 83.3%로 증가하여 더욱 정제되었음을 알 수 있었다. CPC로 정제한 침전물인 산성다당의 조성을 보면, 주요 성분은 총당으로 42.4%를 함유하고 있으며, 산성기를 나타내는 황산기의 함량이 11.5%이었다. 그리고 주요 구성당은 fucose(51.0%)로 산성다당의 주요 성분은 황

Table 2. Yields and chemical compositions of crude laminaran, partially purified laminaran and sulfated polysaccharide extracted from *E. bicyclis*^{1),2)}

Sample	Yield	Protein	Total sugars	Sulfate	Proportion of monosaccharides (%) ³⁾					
					Fucose	Ribose	Xylose	Mannose	Galactose	Glucose
Crude laminaran	14.5	8.4	68.2	7.6	28.6	tr ⁴⁾	tr	7.9	8.5	55.0
PPL ⁵⁾	6.5	3.8	74.7	3.2	10.0	tr	tr	3.1	3.6	83.3
SP ⁵⁾	5.1	11.2	42.4	11.5	51.0	2.2	4.3	13.9	8.1	20.5

¹⁾Mean of triplicate determinations.

²⁾Dry weight basis.

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

⁴⁾Trace.

⁵⁾Partially purified laminaran (PPL) and sulfated polysaccharide (SP) from CPC precipitation.

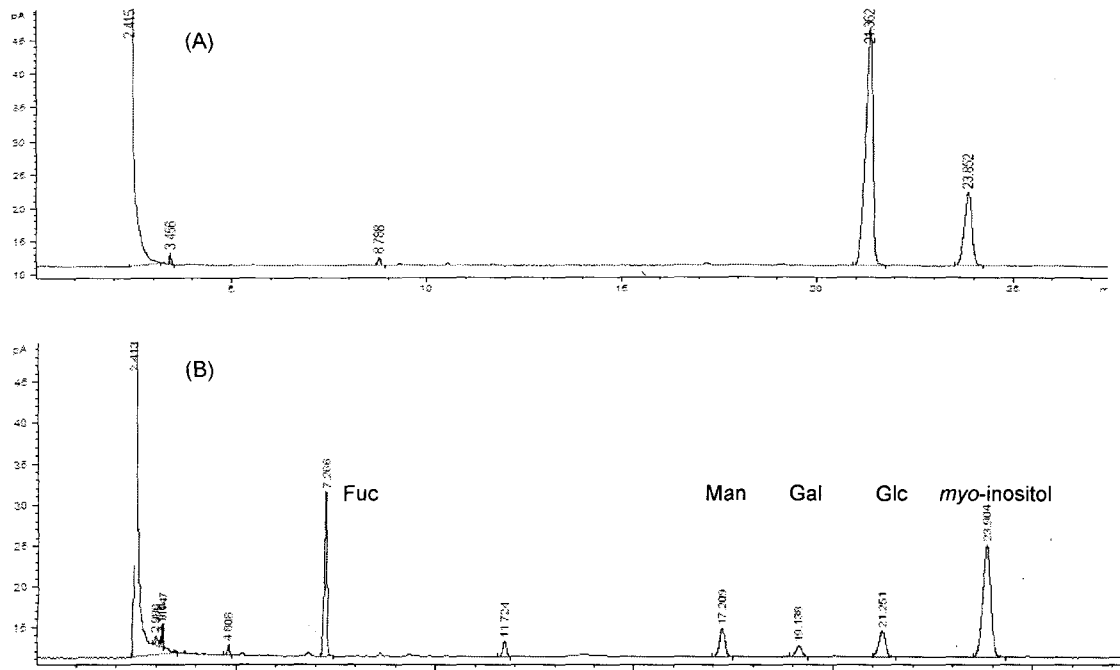


Fig. 2. Gas chromatograms of partially purified laminaran (A) and sulfated polysaccharide (B) of *E. bicyclis* obtained by CPC purification.

산기를 함유한 fucose 중합체인 fucoidan 물질로 보인다.

Zvyagintseva 등(10)은 *Laminaria cichorioides*, *L. japonica* 및 *Fucus evanescens*에서 분리, 정제한 라미나란의 특성에 관한 연구에서 정제도가 증가할수록 glucose 함량은 증가한다고 하였으며, *L. cichorioides*에서 분획한 라미나란은 glucose가 100%, *L. japonica*에서 분획한 라미나란은 glucose 82%, fucose 10%, galctose 8% 순이었으며, *F. evanescens*에서 분획한 라미나란은 glucose 81%, fucose 13%, galactose 2%, mannose 4% 순으로 구성되었고, 갈조류의 종류 및 정제 방법에 따라 그 조성이 달라진다고 보고하였다.

라미나란 분획물의 화학적 조성

라미나란의 분자량 측정 및 당결합 구조를 밝히기 위해서 Sephacryl S-300 HR-칼럼으로 분획하여 정제 라미나란 분획물을 얻었으며(Fig. 3), 이 분획물의 화학적 조성을 분석하였다(Table 3).

라미나란 정제물의 총당, 단백질 및 황산기의 함량은 각각 89.9, 1.1 및 0.8%이었으며, glucose의 함량이 구성당의 98.3%로 분획된 다당은 glucan임을 알 수 있었으며, 라미나란 분획물의 평균 분자량은 12,500 kDa이었다(Fig. 4).

*L. cichorioides*에서 정제한 라미나란은 정제도가 증가할수록 glucose 함량은 98~99%까지 증가하며, 이때 분자량은 3~5 kDa이었고, *L. guryanovae*에서 정제한 라미나란은 5~50 kDa, *F. evanescens*에서 정제한 라미나란은 5 kDa이라고 보고하여(10), 본 실험의 결과 대항에서 분획한 라미나란은 *L. guryanovae*에서 정제한 라미나란과는 유사한 경향을 나타내었고, 그 외 갈조류에서 정제한 라미나란에 비해

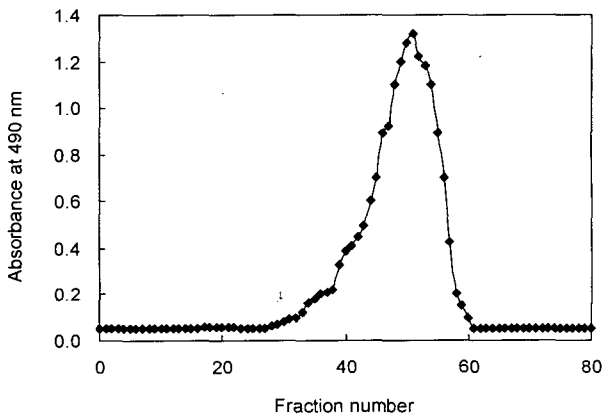


Fig. 3. Purification of laminaran from *E. bicyclis* on Sephacryl S-300 HR column chromatography.

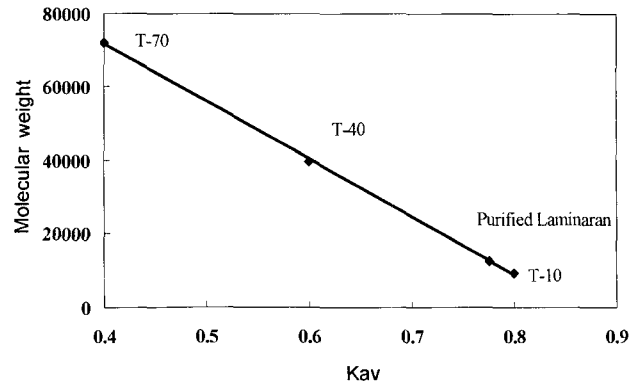


Fig. 4. Gel filtration chromatogram of purified laminaran from *E. bicyclis*.

The column (7.8×300 mm) of ultrahydrogel 1000 was eluted with distilled water at flow rate of 0.8 mL/min and T-70, T-40 and T-10 are standard dextrans of 71,900, 39,200 and 9,300 dalton.

다소 높은 분자임을 확인하였으며, 이는 갈조류 종류 및 정제 방법에 따른 차이로 보여진다.

다당의 구조

정제 라미나란의 당쇄 결합 양식을 분석하기 위하여 FT-IR, methylation 및 ¹³C-NMR 분석을 행하였다. 정제 라미나란을 FT-IR로 분석한 결과(Fig. 5) 888 cm⁻¹에서 강한 흡수 peak를 나타내었으며, 841 cm⁻¹에서는 흡수 peak가 없었다. 888 cm⁻¹은 β-glucosidic linkage를 나타내는 peak이며, 841 cm⁻¹은 α-결합을 나타내는 peak로서 분획물의 glucan은 β-glucan의 형태로 결합되어 있음을 알 수 있다(29).

Fig. 6은 정제 라미나란의 methylation을 분석한 total ion chromatogram이며, 주요 물질인 2,4,6-tri-O-methyl-glucose의 mass spectrum은 Fig. 7과 같다. 그리고 분석 결과는

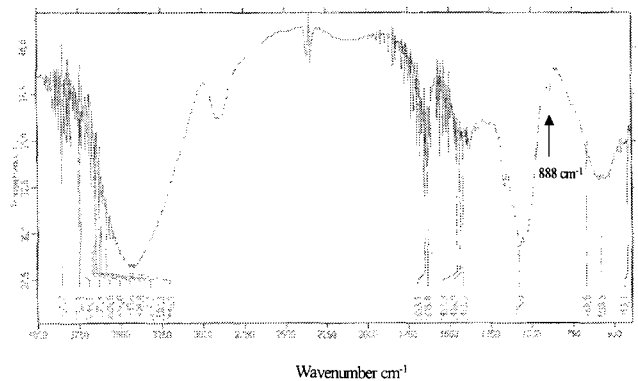


Fig. 5. FT-IR spectrum of purified laminaran of *E. bicyclis*.

Table 3. Yields and chemical compositions of purified laminaran extracted from *E. bicyclis*¹⁾

Sample	Protein	Total sugars	Sulfate	Proportion of monosaccharides (%)					
				Fucose	Ribose	Xylose	Mannose	Galactose	Glucose
Purified laminaran	1.1	89.9	0.8	- ²⁾	-	-	tr	1.7	98.3

¹⁾Refer to Table 2. ²⁾Not detected.

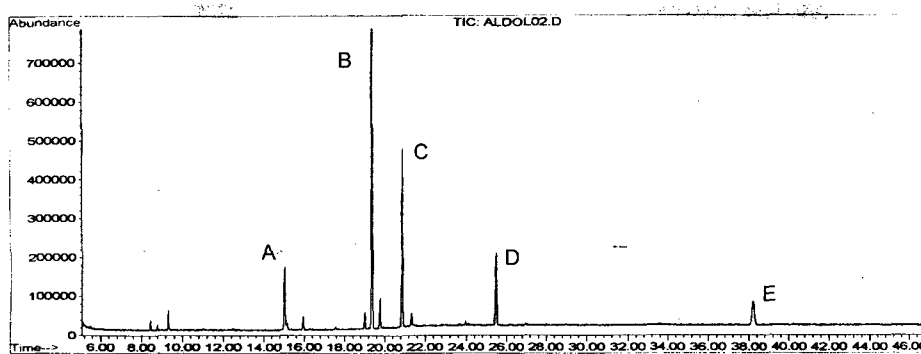


Fig. 6. Total ion chromatogram of the partially methylated alditol acetates from purified laminaran. A: 2,3,4,6-Me₄-Glc, B: 2,4,6-Me₃-Glc, C: 2,3,4-Me₃-Glc, D: 2,4-Me₂-Glc, E: *myo*-inositol-(OAc)₆.

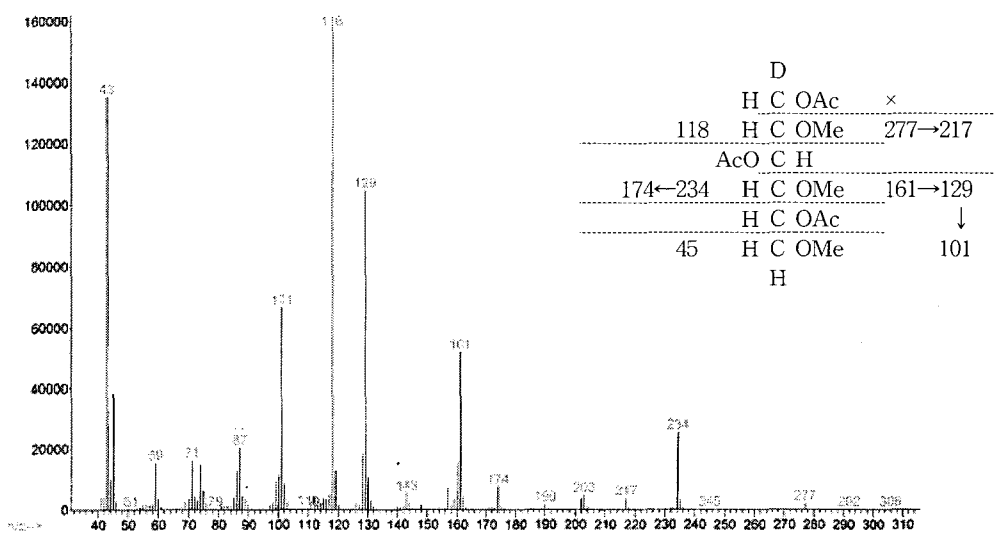


Fig. 7. Mass spectrum of 1,3,5-tri-O-acetyl-(1-deuterio)-2,4,6-tri-O-methyl-glucitol.

Table 4에 나타냈다. Fig. 7에서 m/z 43 peak는 대부분 당의 mass spectrum에서 나타나는 base peak로 acetylium ion(CH₃CO⁺)을 나타내고, m/z 118, m/z 161, 129, 101 그리고 m/z 234, 174 peak는 각각 C₂-C₃, C₃-C₄ 그리고 C₄-C₅가 분해되어 생성된 2,4,6-tri-O-methyl-glucose의 primary fragment이다.

라미나란 정제물의 주요 성분은 2,4,6-tri-O-methyl-glucose로 48.6%였으며, 2,3,4-tri-O-methyl-glucose가 29.2%, 2,4-di-O-methyl-glucose가 11.7%, 2,3,4,6-tetra-O-methyl-glucose가 10.5% 순으로 함량이 높았다. 라미나란 정제물은 2,4,6-tri-O-methyl-glucose의 함량으로 보아 β-1,3 결합된 다당이 주된 결합이었으며, 2,4-di-O-methyl-glucose로 보

아 β-1,3 결합에 잔기가 β-1,6결합으로 존재하였고, 또한 2,3,6-tri-O-methyl-glucose는 존재하지 않는 것으로 보아 1,4 결합은 없는 것을 알 수 있다. 그리고 2,3,4,6-tetra-O-methyl-glucose와 2,4,6-tri-O-methyl-glucose 및 2,4-di-O-methyl-glucose의 mol%비가 1 : 4.8 : 1.1로 약 6 mol의 β-1,3 결합에 한분자의 glucose가 β-1,6 결합하고 있는 것으로 추정할 수 있다.

정제 라미나란의 ¹³C NMR 분석 결과를 Fig. 8과 Table 5에 나타내었다. 일반적인 당의 ¹³C NMR peak 경향은 다음과 같다. Anomeric 탄소의 peak는 100~104.0 ppm이며, α-glucose의 anomeric 탄소의 peak는 약 100 ppm이다. 그리고 β-glucose의 anomeric 탄소의 peak는 이보다 더 작은장

Methylated sugar ¹⁾	Purified laminaran	Deduced linkage	Primary fragment (m/z)	(mol%)
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	10.2	Glc(1→	43, 102, 118, 129, 145, 161, 162, 205	
2,4,6-Me ₃ -Glc	48.6	→3)Glc(1→	43, 101, 118, 129, 161, 234	
2,3,4-Me ₃ -Glc	29.2	→6)Glc(1→	43, 102, 118, 129, 162, 189, 233	
2,4-Me ₂ -Glc	11.7	→3,6)Glc(1→	43, 87, 101, 118, 129, 189, 234	

¹⁾2,3,4,6-Me₄-Glc: 1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-glucitol etc.

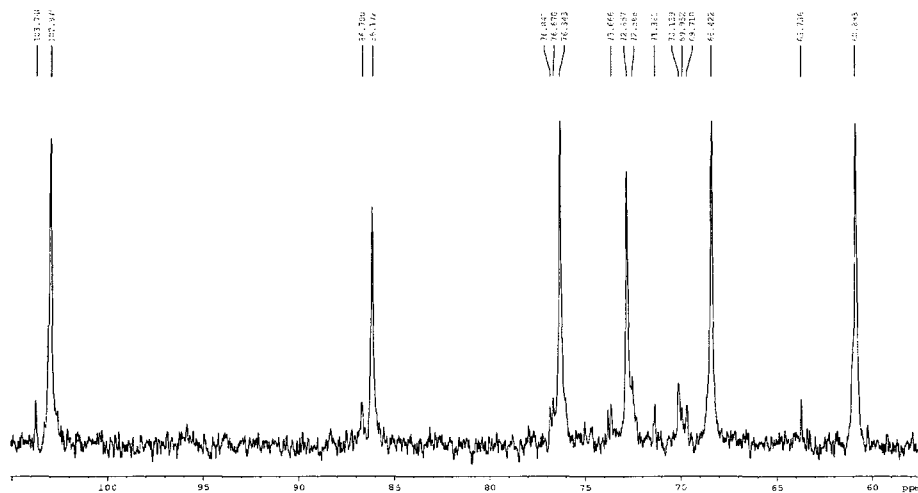


Fig. 8. ^{13}C -NMR spectra at 300 MHz of the purified laminaran from *E. bicyclis* in deuterated dimethylsulfoxide at 85°C.

Table 5. ^{13}C NMR spectral assignment at 300 MHz for laminaran from by *E. bicyclis* in $\text{DMSO}-d_6$ at 50°C

Configuration	Chemical shift (ppm)					
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
$\rightarrow 3$ - β -Glc-(1 \rightarrow)	103.0	72.8	86.2	68.4	76.3	60.9

(downfield)인 약 104 ppm이며 α -glucose의 anomeric 탄소보다 상대적으로 강한 강도(intensity)를 갖는다. C2, C3, C4, C5 그리고 C6는 60~80 ppm에 peak를 형성한다. 정제 라미나란의 경우 103.0 ppm의 peak를 볼 수 있었으며, α -형의 99~101 ppm 사이의 peak는 없었다. 이는 FT-IR 분석한 결과와 같이 β -anomeric 탄소가 존재하는 β -glucan임을 알 수 있다(30).

β -glucan의 각각의 major peak들을 살펴보면, 103.0, 72.8, 86.2, 68.4, 76.3 그리고 60.9 ppm은 각각 β -(1-3) 결합의 C1, C2, C3, C4, C5 그리고 C6의 peak들이며, 그리고 β -(1-4)-glucan의 전형적인 peak인 80.3~80.4 ppm(C4)의 peak는 동정되지 않았다. 위 결과는 Dilip 등(31)이 분석한 β -(1-3)-glucan 결합의 data, C1(103.4 ppm), C2(73.2 ppm), C3(86.6 ppm), C4(68.8 ppm), C5(76.7 ppm) 그리고 C6(61.2 ppm)와 비교해볼 때, 0.3~0.4 ppm이 upfield 쪽으로 이동하였으며, 이 값을 더해주면 본 실험한 data와 잘 일치하였다. 그리고 다당은 동일한 구성성분이라도 chemical shift 값이 약간 차이가 나는데 이는 분석 온도, 용매, reference compound와 그 자성의 균질성, 분석 방법의 차이 때문에 일어나는 것으로 생각된다(32).

Laminaria cichorioides 및 *Laminaria japonica*에서 정제한 라미나란들의 ^{13}C NMR 분석했을 때 103~104 ppm(C1, 1,3- 및 1,6 linked glucose), 85~87 ppm(C3, 1,3-linked-glucose), 75~76 ppm(C5, 1,6-linked-glucose), 70 ppm(C6, 1,6-linked-glucose), 69.5 ppm(C4, 1,3-linked-glucose)을 나타낸다고 하였다(33). Stuelp 등(34)은 *Ramalina celastri*에서 정제한 lichen을 가지고 NMR 분석시 β -(1-3)-glucan

의 전형적인 peak는 103.2 ppm(C1), 86.4 ppm(C3), 76.6 ppm(C5), 73.2 ppm(C2), 68.7 ppm(C4) 그리고 61.1 ppm(C6)이었다고 하였으며, Kwak(29)은 치마버섯 균사체(*Schizophyllum commune*)에서 β -1,3 결합에 β -1,6 분지를 갖는 schizophyllan 정제하여 NMR 분석시 103 ppm은 C1이 1,3-, 1,6-결합하는 peak이며, 86 ppm은 C3가 1,3-결합, 74 ppm은 C3가 1,6-결합, 73 ppm은 C2가 1,6-결합, 72 ppm은 C2가 1,3-결합, 70 ppm은 C6이 1,3,6-결합 그리고 61 ppm은 C6가 1,3-, 1,6-결합하는 peak라고 하여 본 결과와 유사하였다.

따라서 위의 FT-IR, methylation 분석 및 NMR 분석을 토대로 검토해 볼 때, 라미나란 정제물은 주로 β -1,3 결합에 β -1,6 분지를 갖는 glucan임을 확인하였다.

요 약

국내 울릉도 연안에서 자생하는 대황에서 라미나란을 분리, 정제 분획하여 구조적 특성을 비교하였다. 분쇄한 대황을 0.09 N HCl로 추출한 조 라미나란과 이를 CPC로 정제한 부분 정제 라미나란의 수율은 각각 14.5%, 6.5%였으며, 그 화학적 조성을 비교해 보면, 총당의 함량이 68.2%에서 74.7%로 증가하였고, 단백질의 함량(8.4%→3.8%) 및 황산기의 함량(7.6%→3.2%)로 감소하였으며, 주요 구성당인 glucose의 함량이 55.0%에서 83.3%로 증가하여 CPC를 사용하여 라미나란을 간단히 정제할 수 있었다. 라미나란의 분자량 및 당 구조 분석을 위하여 부분정제 라미나란을 Sephacryl S-300 HR 칼럼으로 정제하였으며, 이 정제물의 평균 분자량은 12,500 dalton이었다. 그리고 총당의 함량이 89.9%, 단백질

함량은 1.1%, 그리고 황산기 함량 0.8%이었으며, 주요 구성당인 glucose의 함량이 98.3%였다. 그리고 FT-IR 분석 결과 glucose는 대부분 β -결합(888 cm^{-1})의 형태로 존재하는 것을 확인하였다. 그리고 ^{13}C NMR 분석 및 methylation 분석을 해본 결과 라미나란은 주로 β -1,3 결합에 β -1,6 분지를 갖는 glucan임을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 해양수산부 수산특정연구개발과제의 연구비 지원에 의하여 수행된 연구 결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

문헌

1. Cho DM, Kim DS, Lee DS, Kim HR, Pyeun JH. 1995. Trace components and functional saccharides in marine algae. 1. Changes in proximate composition and trace elements according to the harvest season and places. *J Korean Fish Soc* 28: 49-59.
2. Nishide E, Kinoshita Y, Anzai H, Uchida N. 1988. Distribution of hot-water alginate in different parts of *Undaria pinnatifida*. *Nippon Suisan Gakkaihi* 54: 1619-1622.
3. Conchie J, Percival EGV. 1950. Fucoidin. Part II. The hydrolysis of a methylated fucoidan prepared from *Fucus vesiculosus*. *J Chem Soc* 827-832.
4. Cote RH. 1959. Disaccharides from fucoidin. *J Chem Soc* 2248-2258.
5. Mian AJ, Percival E. 1973. Carbohydrates of the brown seaweeds *himanthalia lorea*, and *bifurcaria bifurcata*: Part II. structural studies of the "fucans". *Carbohydr Res* 26: 147-161.
6. Koo JG. 1997. Structural characterization of purified fucoidan from *Laminaria religiosa*, sporophylls of *Undaria pinnatifida*, *Hizikia pinnatifida* and *Sargassum fulvellum* in Korea. *J Korean Fish Soc* 30: 128-131.
7. McClure MO, Moore JP, Blanc DF, Scotting P, Cook GM, Keynes RJ, Weber JN, Davies D, Weiss RA. 1992. Investigation into the mechanism by which sulfated polysaccharides inhibit HIV-infection in vitro. *AIDS Res Hum Retrovir* 8: 19-26.
8. Nagumo T, Nishino T. 1996. Fucan sulfates and their anticoagular activities. In *Polysaccharides in Medicinal Applications*. Dumitriu S, ed. Marcel Dekker, New York. p 545-574.
9. Witvrouw M, DeClercq E. 1997. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *Gen Pharmacol* 29: 497-511.
10. Zvyagintseva TN, Shevchenko NM, Nazarova IV, Scobun AS, Luk'yanov PA, Elyakova LA. 2000. Inhibition of complement activation by water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. *Comp Biochem Physiol* 126C: 209-215.
11. Painter TJ. 1997. Algal polysaccharide. In *The polysaccharides*. Aspinall GO, ed. Academic Press, New York. p 195-285.
12. Percival MS, McDowell RH. 1967. *Chemistry and enzymology of marine algae polysaccharides*. Academic Press, New York. p 53-71.
13. Matsuyama H, Magindaan REP, Yano T. 1992. Protective effect of schizophyllan and scleroglucan against *Streptococcus* sp. infection in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture* 10: 197-203.
14. Usui T, Iwasaki Y, Hayashi K, Mizunno T, Tanaka M, Shinkai K, Arakawa M. 1981. Antitumor activity of water-soluble β -D-glucan elaborated by *Ganoderma applanatum*. *Agric Biol Chem* 45: 323-326.
15. Albersheim P, Darvill A, Augur C, Cheong JJ, Eberhard S, Hahn MG, Marfa V, Mohnen D, O'Neill MA, Spiro MD, York WS. 1992. Oligosaccharins-oiligosaccharide regulatory molecules. *Acc Chem Res* 25: 77-83.
16. Bohn JS, BeMiller JN. 1995. 1,3- β -D-glucan as biological response modifiers: a review of structure functional activity relationships. *Carbohydr Polymers* 28: 3-14.
17. Zvyagintseva TN, Sundukova EV, Shevchenko NM, Popivnich IB, Stechova SI, Yudakova ZS, Elyakova LA. 1997. The effects of 1,3:1,6- β -D-glucan on the phytoalexin and the activity of carbohydrases in the soybean callus cultures and shoots. *Acta Phytopathol Entomol Hungarica* 32: 59-67.
18. AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th ed. Association of official analytical chemists, Virginia, USA.
19. Zvyagintseva TN, Shevchenko NM, Popivnich IB, Isakov VV, Scobun AS, Sundukova EV, Elyakova LA. 1999. A new procedure for the separation of water-soluble polysaccharides from brown seaweeds. *Carbohydr Res* 322: 32-39.
20. Scott JE. 1965. Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts. In *Methods in carbohydrate chemistry*. Whistler RL, ed. Academic press, New York. Vol 5, p 38-44.
21. Dubois M, Gills KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28: 350-356.
22. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr L, Rindall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 256-275.
23. Dodgson KS, Price RG. 1962. A note on the determination of the ester sulfate content of sulfated polysaccharides. *J Biochem* 84: 106-110.
24. Furneaux RH, Miller IJ, Stevenson TT. 1990. Agaroids from Newzealand members of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) a novel dimethylated agar. *Hydrobiologia* 205: 645-654.
25. Harris PJ, Henny RJ, Blakeney AB, Stone BA. 1984. An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysaccharides. *Carbohydr Res* 127: 59-73.
26. Carpita NC, Shea EM. 1987. Linkage structure of carbohydrates by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of partially methylated alditol acetates. In *Analysis of Carbohydrates by GLC and MS*. Biermann CJ, McGinnis GD, eds. CRC Press, Boca Raton. p 157-216.
27. Koo JG, Choi YS, Kwak JK. 2001. Blood-anticoagulant activity of fucoidans from sporophylls of *Undaria pinnatifida*, *Laminaria religiosa*, *Hizikia fusiforme* and *Sargassum fulvellum* in Korea. *J Korean Fish Soc* 34: 515-520.
28. Ito K, Hori K. 1989. Seaweed: chemical composition and potential food uses. *Food Rev Int* 5: 101-144.
29. Kwak JK. 2002. Production of non-specific immuno-stimulative polysaccharide and its application to aquaculture. *PhD Dissertation*. Berlin University, Germany.
30. Kim BH, Kweon MH, Lim WJ, Sung HC, Yang HC. 1998. Structural characterization of the anti-complementary and macrophage activating polysaccharides isolated from *Agaricus bisporus*. *Korean J Food Sci Technol* 30: 709-716.
31. Dilip R, Soumitra M, Indranil C, Malay P, Syed SI. 2005.

- Chemical analysis of a new (1→3)-, (1→6)-branched glucan from an edible mushroom, *Pleurotus florida*. *Carbohydr Res* 340: 2533-2539.
32. Park JH. 1996. Studies on the isolation and characterization of porphyran from *Porphyra yezoensis*. *PhD Dissertation*. Hanyang University, Korea.
33. Zvyagintseva TN, Shevcheko NM, Chizhov AO, Krupnova TN, Sundukova EV, Isakov, VV. 2003. Water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. Distribution, structure, and their dependence on the developmental conditions. *J Marine Biol Ecology* 294: 1-13.
34. Stuelp PM, Carneiro Leao AMA, Gorin PAJ, Iacomini M. 1999. The glucans of *Ramalina celastri* relation with chemotypes of other lichens. *Carbohydrate Polymers* 40: 101-106.

(2005년 10월 7일 접수; 2005년 12월 5일 채택)