

다시마 뿌리로부터 유기산을 이용한 다당과 미네랄 추출

천지연* · 차성한 · 이정식** · 김영숙** · 박권필†

순천대학교 화학공학과
540-742 전남 순천시 매곡동 315

*순천대학교 식품공학과
540-742 전남 순천시 매곡동 315

**(주)해림후코이단
537-801 전남 완도군 완도읍 가용리 1088-8
(2011년 9월 2일 접수, 2011년 9월 24일 채택)

Extraction of Carbohydrates and Minerals from Laminaria Using Organic Acid

Ji Yeon Chun*, Cha Seong Han, Jung Shik Lee**, Young Suk Kim** and Kwon Pil Park†

Department of Chemical Engineering, Sunchon National University, 315 Maegok-dong, Suncheon-si, Jeonnam 540-742, Korea

*Department of Food Engineering, Sunchon National University, 315 Maegok-dong, Suncheon-si, Jeonnam 540-742, Korea

**Haerim Fucoidan Ltd, 1088-8 Gayong-ri, Wando-eup, Wando-gun, Jeonnam 537-801, Korea

(Received 2 September 2011; accepted 24 September 2011)

요 약

국내에서는 다시마 뿌리가 아직 활용되지 않고 있다. 본 연구에서는 다시마 뿌리에서 탄수화물과 미네랄 등을 추출하는 공정을 개발하고 이들의 특성을 측정하였다. 해조류의 다당류 추출은 수율을 높이기 위해서 염산을 많이 사용하는데 본 연구에서는 기능성 식품에 이용하기 위해 구연산과 같은 유기산을 사용해 추출하였다. 유기산은 추출 효율이 강산에 비해 낮으므로 최적의 추출 조건을 찾는 연구를 하였다. 추출온도, 추출시간, 유기산의 농도, 시료 입자 크기 등을 변화시키며 다당 수율을 측정하는 실험을 하였다. 시료 입자가 작을수록 추출 온도가 높을수록 수율은 증가하였다. 100 °C에서 구연산 농도 0.2 wt%로 4.0시간 추출했을 때 수율은 19%였다. 다시마뿌리 추출액의 K/Na 비가 약 3으로 칼륨이 많이 함유되어 있었다. 다시마 뿌리에서 추출한 후코이단은 미역에서 추출한 후코이단과 비교해 당의 조성은 비슷하였으나, 분자량은 더 작았다.

Abstract – *Laminaria* roots have not been practically used in Korea. In this study, the extraction process of carbohydrates and minerals from *Laminaria* roots was investigated and the properties of extracted components were measured. Hydrochloric acid generally used in carbohydrate extraction from seaweeds in order to obtain high extraction yield. But in this work, to utilize extracted components as a functional food material, organic acids such as citric acid were used. Organic acid as extraction solvent has low extraction yield compared to strong acids. Therefore optimum condition for maximum yield was investigated in carbohydrate extraction from *Laminaria* roots using organic acid. We measured the extraction yields of carbohydrate with variation of extraction temperature, extraction time, concentration of organic acid and particle size of samples. The extraction yield increased as the particle size decreased and temperature became high. The extraction yield was 19.0 wt% after 4.0 hours extraction with 0.2 wt% citric acid at 100 °C. Potassium concentration was high compared other minerals in extraction solution, that is, the ratio of K/Na was about 3.0. Fucoidan from *Laminaria* roots had same carbohydrate composition and lower molecular weight compared that of *Undaria pinnatifida*.

Key words: Laminaria Roots, Carbohydrates, Fucoidan, Organic Acid, Minerals, Extraction

1. 서 론

우리나라 연안에 생육하는 해조의 종류는 약 1천 종이 넘는 것으로 추정되고 있으며 한국은 일본과 더불어 세계 최대의 해조 이용국으로서 해조류를 식품, 효료, 사료, 비료, 공업원료 등으로 이용하여

왔다.

해조류 생산은 미역, 김, 다시마가 대부분인데 다시마와 미역은 채취과정에서 바다에 폐기되는 부분이 많아 환경오염을 유발할 가능성이 다른 해조류보다 높다. 다시마와 미역을 바다에서 채취할 때 밑부분을 잘라서 그대로 바다에 버리고 또 육상에서 가공 중에도 많은 부분이 폐기물로 버려지고 있다. 바다에 폐기되는 양은 전체미역의 약 40~60%로 우리나라에서만 13~20만 톤이 매년 남해안에 폐기되

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: parkkp@sunchon.ac.kr

어 다양한 종류의 해양 오염과 미역의 쯤썰병 등을 발생시키는 원인이 되고 있다. 미역폐기물을 바다에서 수거하지 않고 바다에 버리는 것은 미역폐기물을 수거해 와도 육상에서 활용할 방법이 없어 또 다른 환경오염을 만들기 때문이다. 폐기되는 미역의 밑 부분은 줄기와 약간의 포자엽, 뿌리, 잎들을 포함하고 다시마는 뿌리를 포함하는데 식용으로 이용되는 잎과 그 조성이 비슷하다. 다시마 뿌리에는 식이 섬유와 알긴산과 후코이단 등 다당이 다량 함유되어 있을 뿐만 아니라 미네랄이 함유되어 있는데 특히 칼륨이 많이 함유되어 있다. 식이 섬유와 칼륨은 배변에 효과적일 뿐 아니라 glucose의 흡수량을 감소시키고 포만감을 주어 다이어트에 도움이 된다.

후코이단은 라미나란(laminaran)과 알긴산(alginic acid)과 함께 갈조류를 형성하는 주요 다당으로 다시마와 미역에 3~5% 함유되어 있다. 후코이단은 황황(sulfated) 헤테로 다당으로 주로 L-fucose가 α -1,2 또는 α -1,3 결합으로 된 골격을 갖고면서 갈락토오스, 만노스, 자일로스, 글루쿠로닉 산 등을 함유할 수 있다. 후코이단은 음이온 전하를 띠는 고분자(polyanionic charge) 성질과 관련된 것으로 알려진 여러 약물학적인 효과들이 보고되고 있다. 예를 들어 항혈액응고성(anticoagulant), 자살세포(apoptosis) 유도에 의한 항암효과, 항바이러스(항-HIV 포함), 항종양성, 항산화작용, 항알레르기[1-6] 등이 있다.

알긴산은 β -1,4-D-mannuronic acid와 β -1,4-D-guluronic acid가 1,4-glycoside 결합으로 이루어진 복합 다당류로서 미역이나 다시마 등 해조류 성분의 20~30%를 차지하는 성분이다. 알긴산은 중금속의 체외배출 작용, 이온교환반응에 의한 혈압상승 억제 작용, 혈중 콜레스테롤 저하작용, 혈당강화작용, 정장 및 변비개선작용, 장내 유해 미생물의 증식 억제 작용과 같은 다양한 생리효과[7-21]를 내고 있어 식품산업에 많이 사용되고 있다.

해조류의 다당은 보통 열수나 산수용액에 의해 추출한다. 추출수율을 높이기 위해서 염산 등 강산을 많이 사용하는데, 본 연구에서는 식품에 이용할 수 있는 유기산을 이용하였다. 약산인 유기산은 추출 수율이 강산에 비해 낮으므로 본 연구에서 다시마뿌리로부터 다당과 미네랄 추출의 최적조건을 찾음으로써 해조폐기물 활용도를 높이하고자 하였다. 추출한 용액 중 다당과 미네랄의 성질을 분석하고 저장 중 안정성에 대하여도 연구하였다.

2. 실험

2-1. 추출 및 분리

다시마 뿌리에서 다당과 미네랄의 추출 과정은 세척, 건조, 분쇄, 체질, 추출, 여과, 농축과정으로 이뤄진다. 다시마 뿌리에 붙은 펄이나 다른 이물질들이 제거되게 증류수로 세척하였는데, 뒤엎겨 있는 다시마 뿌리 때문에 세척이 잘 안될 수 있으므로 1~2 cm 길이로 절단 후 세척하였다.

세척 후 수분 함량이 10% 이하가 되게 건조시켜 보관과 분쇄가 용이하게 하였다. 다시마 뿌리는 다른 부위에 비해 매우 단단하므로 다당과 미네랄을 추출하는 것이 쉽지 않다. 그래서 산과 열수가 침투하기 쉽게 작은 입자로 분쇄하는 것이 추출 수율을 향상시키고 추출시간을 단축시키는데 중요한 역할을 한다. 분쇄 후 체질하여 작은 입자만을 분리수거하였다. 입자가 작으면 작을수록 좋지만 분쇄의 어려움 등을 고려해 입자크기가 390 μ m 이하인 다시마 뿌리를 체질에 의해 분리해 사용하였다.

준비한 다시마 뿌리 분말을 이용하여 최적의 다당 수율을 얻는 조

건에 관하여 실험하였다. 입자크기(390이하 ~ 2,000 μ m), 추출온도(25~110 $^{\circ}$ C), 추출시간(0.5~4.0 hr), 추출용매 농도(0.05~0.3 wt%) 등 추출조건에 따른 다당의 수율을 측정하였다.

추출 후 여과액에는 알긴산과 후코이단 등 다당이 혼합되어 있어서 후코이단을 분석하기 위해 알긴산을 여과액에서 먼저 분리·제거하였다. 알긴산만 선택적으로 제거하기 위해 여과액에 50 mM CaCl_2 용액을 가해 겔화된 알긴산을 원심분리기(Hanil, Mega 117R)로 제거하였다. 알긴산을 제거하고 남은 여과액을 한외여과장치(Pall, SLP-3053)에서 탈염처리하고 이 용액을 동결건조한 후 분석하였다.

2-2. 분석

총당 분석은 페놀과 황산을 사용하는 일반적인 방법[22]을 사용하였다. 시료를 5% 페놀 용액과 진한 황산으로 반응시킨 후 UV/VIS spectrophotometer(Shimadzu, UV-1650PC)를 이용하여 파장 480에서 흡광도를 측정하여 표준 시약(Fucose, Sigma)으로 작성한 검량곡선으로부터 총당 함량을 산출하였다.

후코이단의 분자량은 GPC(Gel Permeation Chromatograph, Waters)로 측정하였다. 칼럼은 Phenomenex 13 biosep-sec-s 2000,3000(300 \times 7.80 mm)을 사용하였고, 유동상은 0.1 M NaNO_3 , 유속은 1.0 ml/min 하고 검량곡선은 Pulluran으로부터 얻었다.

후코이단의 당 분석은 HPLC(Waters)로 분석하였다. 칼럼은 Dionex사의 Dionex carboxpac PA10(4 \times 250 mm)를 사용하였고, 용매는 18 mM NaOH, 유속은 0.4 ml/min, 검량곡선은 Sigma사의 Fucose, Galactose, Glucose, Mannose를 이용하였다.

추출용액 중의 미네랄 함량은 ICP(Shimadzu, ICPE-9000)로 분석하였다. 시료를 질산용액에 용해시킨 후 ICP 분석을 통해 Ca^{2+} , K^{+} , Mg^{2+} , Na^{+} 이온 농도를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 시료 입자크기 및 추출 온도와 시간 영향

다시마 뿌리를 분쇄하여 입자크기별로 분리한 후 시료 무게의 20 배 물을 투입 후 90 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 당을 추출하고 추출수율 변화를 Fig. 1에 나타냈다. 2000 μ m 이상의 입자크기의 수율은 4.35%,

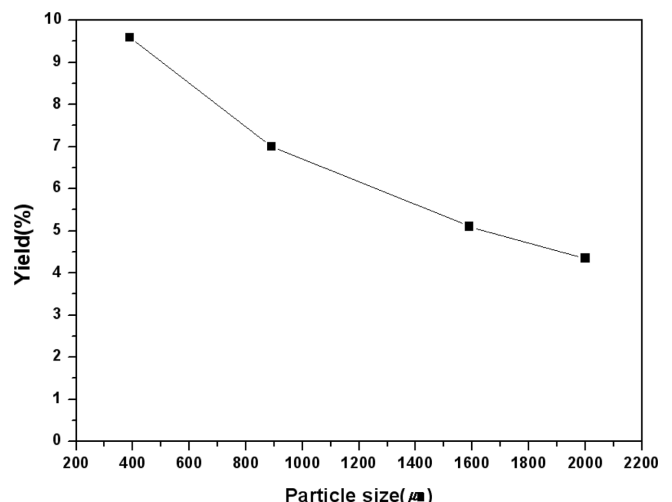


Fig. 1. Effect of particle size on the extraction yield of carbohydrates from Laminaria roots at 90 $^{\circ}$ C for 2 hours.

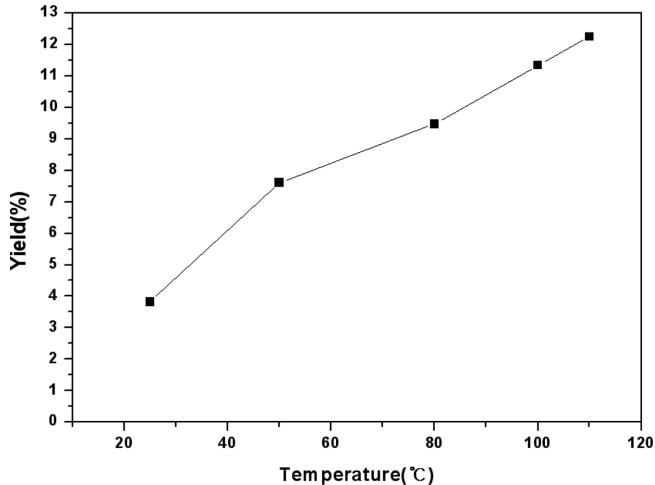


Fig. 2. Effect of temperature on the extraction yield of carbohydrates from Laminaria roots.

390 μm 이하의 시료에서는 9.6%로 2배 이상의 수율 차이를 보였다. 다시마 뿌리는 다른 해조류의 조직에 비해 매우 단단해 용매가 내부로 확산하기가 쉽지 않으므로 시료의 크기가 작을수록 용매가 시료에 침투하는 속도가 빨라 추출수율이 증가함을 보였다.

다음은 당의 추출에 미치는 온도 영향을 알아보기 위한 실험을 하였다. 각 온도에서 2시간 동안 390 μm 이하의 시료에서 당을 추출하고 수율 변화를 Fig. 2에 나타냈다. 상온에서 추출한 경우 수율은 3.8%로 나왔으며 110 °C에서는 12%의 수율을 얻어 85 °C 온도 차이에 의해 추출수율이 3배 이상 차이를 보였다. 추출 시 온도가 증가함에 따라 다시마내부에서 물의 확산계수의 증가에 따라 당의 추출 수율이 증가함을 보인 것이다.

추출시간에 따른 수율변화를 알아보기 100 °C에서 390 μm 이하의 시료로부터 당을 추출하고 수율 변화를 Fig. 3에 나타냈다. 시료를 30분간 추출하는 경우 7.7%의 수율을 보였으며 4시간 동안 추출한 경우 13.3%의 수율을 얻었다. 추출 시간이 증가할수록 수율이 증가함을 보였으나 4시간 이상에서는 수율의 변화는 보이지 않고 일정하여, 약 4시간이 100 °C에서 최적의 추출시간임을 확인하였다.

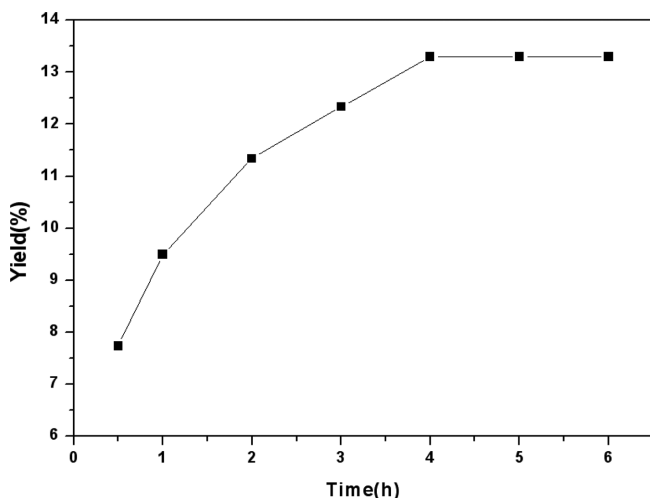


Fig. 3. Effect of extraction time on the yield of carbohydrates from Laminaria roots at 100 °C.

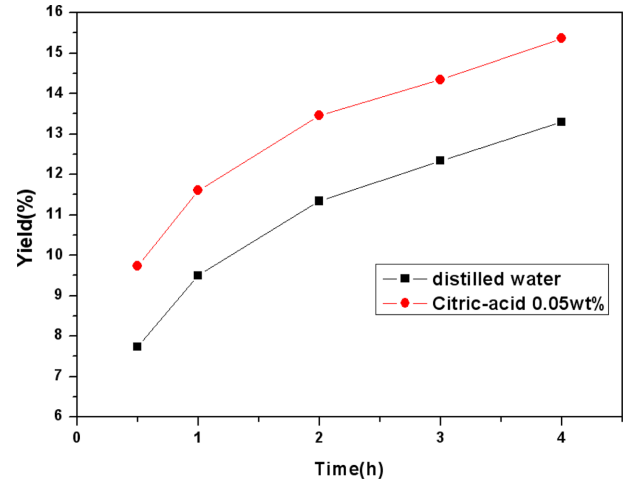


Fig. 4. Effect of extraction solvent on the yield of carbohydrates from Laminaria roots at 100 °C.

3-2. 추출 용매 영향

다시마뿌리에서 당을 추출할 때 용매의 영향을 파악하기 위해 용매로 증류수와 0.05 wt% 구연산을 사용하여 100 °C에서 당을 추출하였다. Fig. 4에 추출시간에 따른 당 추출 수율을 비교하였는데 구연산에 의한 추출수율 증가를 확인할 수 있다. 증류수로 4시간동안 추출했을 때 13.3%의 수율을 얻었으나 구연산 투입 시 15.4%의 수율을 얻어 구연산을 사용함으로써 추출수율을 2.1% 증가시킬 수 있었다.

Fig. 5에 다시마 뿌리 추출 용매의 농도에 따른 추출 수율변화를 나타냈다.

구연산과 말산 수용액 각 농도에서 100 °C, 4시간 동안 추출한 결과다. 유기산 농도가 증가할수록 수율이 증가하여 최고점에 도달한 다음 농도를 증가시켜도 더 이상 수율 증가는 없이 일정한 수율을 보이고 있다. 구연산을 0.2 wt% 첨가하였을 때 최고 수율 19%에 도달하여 100 °C, 4시간 추출 시 최적 구연산 농도는 0.2 wt%였다.

말산은 구연산보다 낮은 농도 0.1 wt%에서 일정한 수율에 도달하였으나 말산이 구연산보다 최고 수율은 약 2.0% 낮아 구연산이 추출용매로 더 적합함을 보이고 있다.

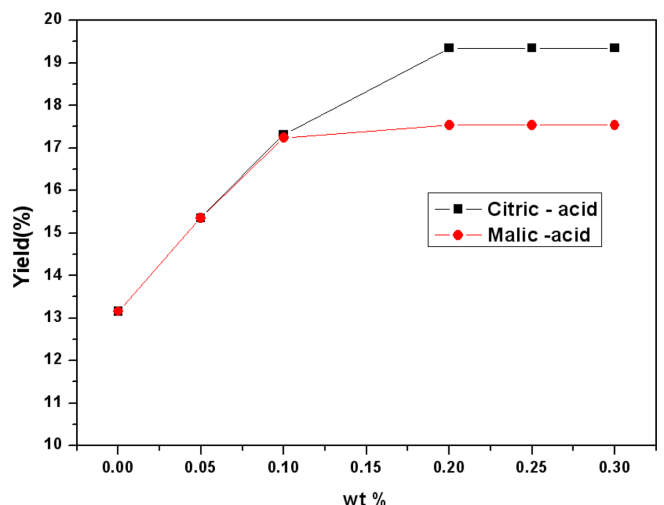


Fig. 5. Extraction yield as a function of concentration of organic acids in extraction process of Laminaria roots at 100 °C, 4.0 hours.

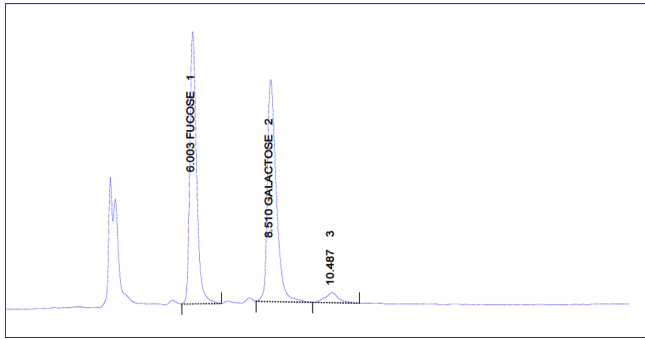


Fig. 6. Sugar composition of fucoidan extracted from Laminaria roots.

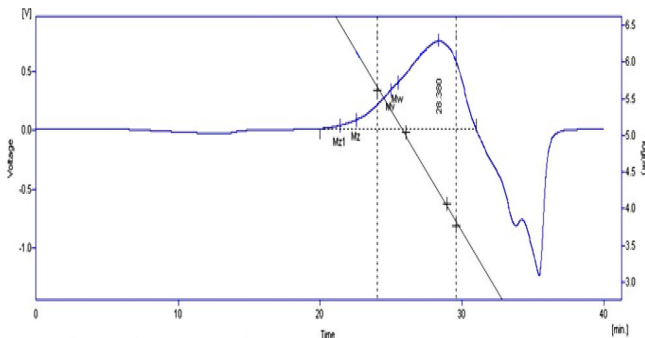


Fig. 7. GPC graph of fucoidan extracted from Laminaria roots.

3-3. 추출용액 중 후코이단과 미네랄

추출 용액 중에는 알긴산과 후코이단 등 다당이 혼합되어 있어서 이 중후코이단이 얼마나 함유되어 있는지를 확인하기 위해 알긴산을 먼저 분리·제거하였다. 알긴산 분리제거 후 한외여과로 탈염하고 동결 건조하여 무게를 측정하였다. UV로 측정한 총당 양을 기준으로 다시마 뿌리에서 추출한 용액 중 후코이단은 16.4%이고 나머지는 주로 알긴산이 많이 함유되어 있었다. 후코이단의 당 분석한 결과 Fig. 6과 같고 Fucose 46.8%, Galactose 49.9%와 Mannose 3.3%로 구성되어 있어 미역에서 추출한 후코이단과 비슷하였다. 후코이단의 분자량을 측정할 결과 Fig. 7에 나타난 것처럼 중량 평균 분자량 146,606으로 미역에 비해 비교적 낮은 분자량의 후코이단이 함유되어 있음을 보였다[23].

구연산 0.2 wt% 첨가, 100 °C, 4시간 추출한 추출액의 미네랄 함량을 ICP로 분석한 결과 Table 1과 같다. 다시마 뿌리 추출액의 K/Na 비가 약 3으로 칼륨이 많이 함유되어 있음을 확인하였다.

3-4. 추출용액의 안정성

추출용액을 멸균하기 위해 90 °C에서 30분 가열하고 멸균 여부를 고체배지 배양으로 확인하였다. 고체배지는 PDA와 YEA 배지를 사용하였는데 7일 배양 후 세균이 관찰되지 않았다. 멸균한 추출액을 각 온도에서 12주 동안 당도와 pH 변화 및 색변화를 측정하였다.

Table 1. Mineral contents in Laminaria roots extracted at 100 °C, 4 hours with citric acid 0.2 wt%

Minerals	Contents (mg/100 g)
Mg	231.9
Ca	246.8
K	1028.7
Na	343

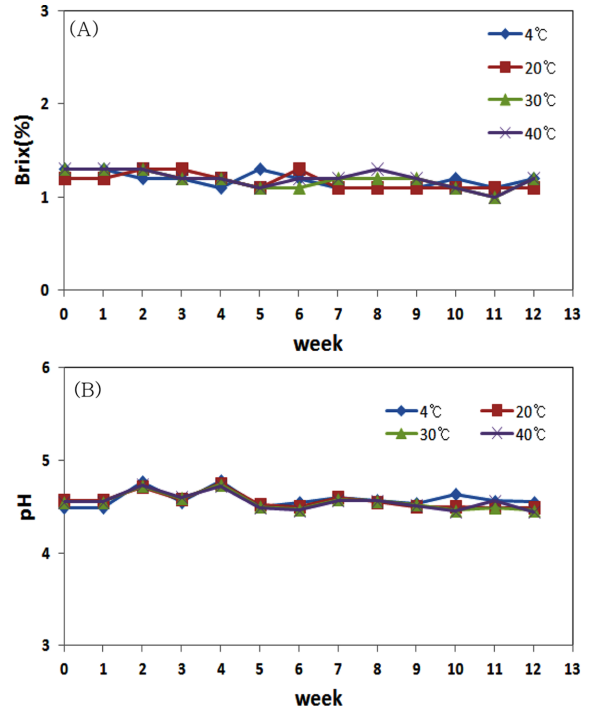


Fig. 8. Variation of sugar concentration and pH of extraction solution during storage. (A): sugar concentration, (B): pH.

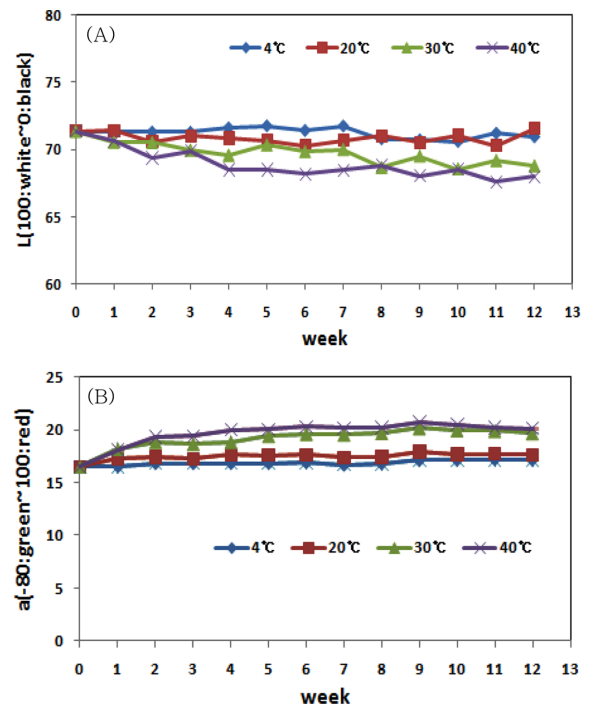


Fig. 9. Variation of color value in extraction solution during storage. (A): L (lightness), (B): a (redness)

Fig. 8에서 pH와 당도는 12주 동안 거의 변화가 없었다. 당제품이 발효되거나 고온에서 고분자가 저분자화되면서 pH가 낮아질 수 있다. 후코이단의 경우 90 °C 이상에서 가열하면 저분자화되면서 pH가 감소한다. 40 °C 정도의 온도에서는 12주간 저장해도 저분자화되지 않음을 보인 것이다.

추출용액의 각 온도에서 저장기간 중 색 변화를 Fig. 9에 나타냈

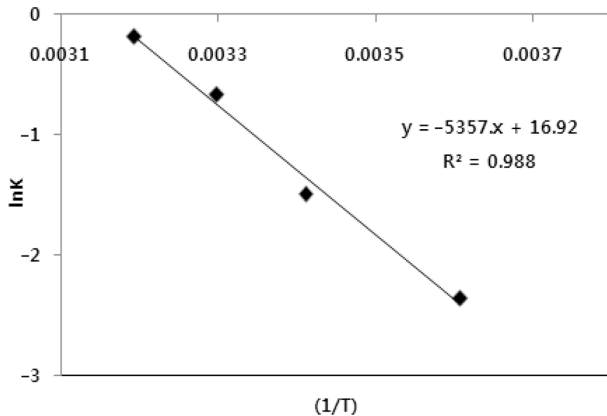


Fig. 10. Arrhenius plot of L value of extraction solution during storage.

다. 당의 갈변현상에 의해 저장 기간 중 L값(100:white ~ 0:black)이 감소해 약간 불투명해지면서 a 값(-80:green ~ 100: red)이 증가하는 현상을 나타냈다. 온도가 높을수록 색변화가 심하였다. L 값이 일정한 값에 도달하기 전의 L값의 변화를 식 (1)과 같이 쓸 수 있다.

$$L = L_0 + kt \quad (1)$$

여기서 L_0 는 초기 L 값이고 k는 속도상수, t는 시간이다. 4주 동안의 L 값 변화의 온도 의존성을 Fig. 9의 Arrhenius plot에 의해 구하였다. 기울기에 의해 구한 활성화 에너지(Activation energy)는 10.6 kcal/mol이다.

추출용액의 유통기한(shelf-life)을 계산하기 위한 Q_{10} value를 활성화에너지에 의해 식 (2)처럼 구했다[24].

$$\ln Q_{10} = \frac{10E_a}{RT(T+10)} \quad (2)$$

실제 냉장저장하는 온도보다 높은 기온인 10 °C와 16 °C에서의 저장기간을 산출하면 약 6.7~9달 동안 갈변 없이 유통이 가능한 것으로 예측되었다.

4. 결 론

다시마 뿌리에서 다당과 미네랄을 추출하는 공정과 추출한 다당과 미네랄의 특성을 정리하면 다음과 같다.

다시마 뿌리 입자크기에 따른 추출수율은 입자가 작아질수록 용매가 시료에 침투하는 효과가 커져 수율이 증가하였다. 추출온도가 올라갈수록 수율이 증가하였으며 추출시간 4시간이 되면 일정한 수율에 도달하였다.

유기산의 농도 영향을 알아보기 위해 유기산 첨가량을 변화시켜 실험한 결과 100 °C에서 4시간 추출시 구연산을 0.2 wt% 첨가하였을 때 수율은 19%가 되었으며, 구연산 첨가량을 0.2% 이상 증가시켜도 수율은 더 이상 증가하지 않았다. 말산은 구연산보다 낮은 농도 0.1 wt%에서 일정한 수율에 도달하였으나 구연산보다 약 1.5% 수율이 낮음을 보였다.

다시마 뿌리 추출액의 K/Na 비가 약 3으로 칼륨이 많이 함유되어 있었다. 추출 용액 중 후코이당은 함량은 16.4%이고, 다당 중에 주로 알긴산이 많이 함유되어 있었다. 다시마 뿌리에서 추출한 후코이

당은 미역에서 추출한 후코이당과 비교해 당의 조성은 비슷하였으나, 분자량은 약 146,000으로 더 작았다. 추출액의 안정성을 측정한 결과 40 °C에서 12주간 보관 중에도 당도와 pH 변화는 없었으나, 색 변화는 있었다. L값 변화로부터 계산한 활성화에너지는 10.6 kcal/mol이었고, 이 활성화에너지를 이용해 유통기간을 계산한 결과 10 °C에서 9.0달이었다.

감 사

본 연구는 중소기업청에서 지원하는 2010년도 산학연공동기술개발사업(No. 00041976-2)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

참고문헌

1. Tatiana, N. Z., Nataliia, M. S., Irina, B. P., Vladimir, V. I., Andrey, S. S., Elena, V. S. and Lyudmila, A. E., "A New Procedure for the Separation of Water-soluble Polysaccharides from Brown Seaweeds," *Carbohydr. Res.*, **322**, 32-39(1999).
2. Fortun, A., Khalil, A., Gagne, D., Douziech, N., Kuntz, C. and Dupuis, G., "Monocytes Influence the Fate of T Cells Challenged with Oxidised Low Density Lipoproteins Towards Apoptosis or MHC-restricted Proliferation," *Atherosclerosis*, **156**, 11-21(2001).
3. Collis, S., Fisher, A. M., Tapon-Brethaudiere, J., Boisson, C., Durand, P. and Jozefonvicz, J., "Anticoagulant Properties of a Fucoidan Fraction," *Thrombosis Res.*, **64**(2), 143-154(1991).
4. Mauray, S., Raucourt, E., Talbot, J., Jozefowicz, M. and Fischer, A., "Mechanism of Factor IXa Inhibition by Antithrombin in the Presence of Unfractionated and Low Molecular Weight Heparins and Fucoidan," *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1387**(1-2), 184-194(1998).
5. Saito, A., Yoneda, M., Yokohama, S., Okada, M., Haneda, M. and Nakamura, K., "Fucoidan Prevents Concanavalin A-Induced Liver Injury Through Induction of Endogenous IL-10 in Mice," *Hepatol. Res.*, **35**(3), 190-198(2006).
6. Oomizu, S., "Fucoidan Prevents Cerebral Transcription and NFκB p52 Trans Location for IgE Production in B Cells," *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **350**(3), 501(2006).
7. Haug, A., "Ion Exchange Properties of Alginate Fractions," *Acta Chem. Scand.*, **13**, 1250-1251(1959).
8. Haug, A., "The Affinity of Divalent Metals to Different Types of Alginates," *Acta Chem. Scand.*, **15**, 1794-1795(1961).
9. Harrison, G. E., Humphreys, E. R., Sutton, A. and Shephard, H., "Strontium Uptake in Rats on Alginate Supplemented Diet," *Science*, **152**, 655-656(1966).
10. Armstrong, B., Van Merwyk, A. J. and Coates, H., "Blood Pressure in Seventh-day Adventist Vegetarians," *Am. J. Epidemiol.*, **105**, 444-449(1977).
11. Gardey, T., Burstyn, P. G. and Taylor, T. G., "Fat Induced Hypertension in Rabbits. I. The Effects of Fiber on the Blood Pressure Increase Induced by Coconut Oil," *Proc. Nutr. Soc.*, **37**, 97A(1978).
12. Kennedy, M., Burstyn, P. G. and Husbands, D. R., "Fat Induced Hypertension in Rabbits. 2. The Effects of Feeding Diets Containing High Concentrations of Safflower Oil & Palm Oil," *Proc. Nutr. Soc.*, **37**, 98A(1978).
13. Wright, A., Burstyn, P. G. and Gibney, M. J., "Dietary Fiber and

- Blood Pressure," *Br. Med. J.*, **2**, 1541-1543(1979).
14. Brussard, J. H., Van Raaij, J. M. A., Stasse-Wolthuis, M., Katan, M. B. and Hautvast, J. G. A. J., "Blood Pressure and Diet in Normotensive Volunteers: Absence of an Effect of Dietary Fiber, Protein, or Fat," *Am. J. Clin. Nutr.*, **34**, 2023-2029(1981).
 15. Kimmura, T., Takahashi, K., Ueda, Y., Obika, H., Kobayashi, Y. and Tsuji, K., "Effects of the Primary Structure of Alginate on Fecal Excretion of Sodium in Rats," *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **67**, 1177-1183(1993).
 16. Hedeki, O., Jitsuo, S. and Yoshinari, K., "Direct Control of the Constituents Ratio in a Wide Range in Alginate Produced by *Azobacter Vinelandii*," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 332-336(1993).
 17. Kobayashi, N., Kanazawa, Y., Yamabe, S., Iwata, K., Nishizawa, M., Yamagishi, T., Nishikaze, O. and Tsuji, K., "Effects of Depolymerized Sodium Alginate on Serum Total Cholesterol in Healthy Women with a High Cholesterol Intake," *J. Home Econ. Japan*, **48**, 255-230(1997).
 18. Hajime, O., Yasushi, S., Kanto, Y., Isamu, U. and Koichi, K., "Possible Antitumor Promoting Properties of Marine Algae and in Vitro Activity of Wakame Seaweed Extract," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 994-999(1994).
 19. Fujiki, K., Matsuyama, H. and Yano, T., "Protective Effect of Sodium Alginates Against Bacterial Infection in Common Carp, *Cyprinus Carpio*," *L. J. Fish Dis.*, **17**, 349-354(1994).
 20. Suzuki, T., Nakai, K., Yoshie, Y., Shirai, T. and Hirano, T., "Digestibility of Dietary Fiber in Brown Alga, Kombu, by Rats," *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 879-884(1993).
 21. Hidaka, H., Eida, T., Takizawa, T., Tokuzawa, T. and Tashiro, Y., "Effect of Fructooligosaccharide on Intestinal Flora and Human Health," *Bifido. Microbiol.*, **5**, 37-50(1986).
 22. Dubois, "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances," *Analysis Chem.*, **28**, 350(1956).
 23. Bae, J. S., Lee, J. S., Kim, Y. S., Sim, W. J., Lee, H., Chun, J. Y. and Park, K. P., "Depolymerization of Fucoidan by Contact Glow Discharge Electrolysis(CGDE)," *Korean Chem. Eng. Res. (HWAHAK KONGHAK)*, **46(5)**, 886-891(2008).
 24. Lee, G. D., Kim, J. O., Kim, M. S. and Lee, K. P., "The Prediction of Self-life on Functional Beverage," *Korean J. Food Preserv.*, **13(2)**, 154-160(2006).