
해조류를 이용한 효소적
추출물의 기능성

전 유 진 · 안 긴 내

제주대학교

해조류를 이용한 효소적 추출물의 기능성

전 유 진 · 안 긴 내

제주대학교

서 론

제주도에 서식하고 있는 해조류는 지형 특성에 따라 제주도 연안에 많이 분포하고 있으며, 녹조류가 약 60종, 갈조류가 약 120종 그리고 홍조류가 약 340종이 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 해조류는 식량자원으로서 뿐만 아니라 의약품 원료, 비료 공업, 사료 원료, 화장품 원료 등으로 다양하게 이용되고 그 실용적 가치가 증대되고 있는 가운데 향후 예측되는 에너지 또는 식량 위기에 대체될 수 있는 자원으로서 그 중요성이 새로이 인식되고 있다. 이것은 육상 식물과는 다른 구조 형태를 가지고 있고, 혈관 내 콜레스테롤 침착 방지 및 장관 운동 활성화, 중금속 배출 촉진, 고지혈증 개선, anti-Plasmin 억제 활성화, 항돌연변이 활성화, 항균 활성화, HIV-1 transcriptase와 protease 억제 활성화, tyrosinase 억제 활성화 등이 확인되면서 기능성 식품으로서의 개발에 관심이 모아지고 있기도 하다(Ebihara *et al* 1990, Kim *et al* 1998, Kang *et al* 2004a, b, Kang *et al* 2003, Fukuyama *et al* 1989, 1990, Lee *et al* 1998, Nagayama *et al* 2002, Ahn *et al* 2004). 또한 많은 연구자들은 그와 같은 활성은 해조류가 많은 식이섬유와 생리 활성 성분으로 알려진 alginate, 한천, caraginan, fucoidan 등과 같은 다당류, vitamin, mineral, phloroglucinol이나 eckol 등과 같은 polyphenol 성분을 다량 함유하고 있는 것과 연관되어진다고 보고하였다(Kim *et al* 1998, Nagai *et al* 2003, Lkai *et al* 1998, Yan *et al* 1999, Yoshie *et al* 2002, Jensen *et al* 1969, 1972, Gonzales *et al* 1983). 따라서, 현재 전 세계의 많은 연구자들은 해조류가 육상 생물과는 다른 특이한 생합성 경로를 가지면서 다양한 생리 활성 성분을 함유하고 있는 천연 물질이라는 점에서 다양한 생리 활성인 항산화, 항암, 항응고, 항고혈압 등의 생리 활성 등의 다양한 측면에서 접근을 시도하고 있다.

이전 연구는 혈액 응고가 혈관 내 생성된 혈전이 혈관벽에 점착하거나 미세 혈관을 막아 혈류를 방해함으로써 야기되는 혈액 순환계 질환으로 최근 우리나라에서도 식생활의 서구화, 환경의 오염, 운동 부족 등에 의해 발병률이 높아지고 있다는 것을 제시하였고, 이에 따라 우리나라에서 생산되어지고 있는 60여종의 해조류로부터 다당류를 분리하여 항응고 활성을 측정된 결과, 참도박의 수용성 추출물이 높은 항응고 활성을 보였고, 이것은 황산기를 가지는 다당류와 연관되어진다고 보고하였다(Yoon *et al* 2000a, b). 뿐만 아니라, 갈조류의 한 종류인 톳을 이용하여 얻은 열수 추출물이 혈액에 대한 높은 항응고 활성을 가지고, 이것은 단백질과 탄수화물 중 탄수화물의 함량이 높은 경우, 그 활성이 증가하는 것으로 보아 그 활성은 탄수화물과 연관되어진다고도 보고하였다(Kim *et al* 1998).

이처럼 해조류를 가지고 많은 연구자들에 의해 다양한 생리 활성이 밝혀졌고, 지금도 해조류가 가지는

잠재적 가치에 의해 많은 연구자들은 그들이 가지는 다양한 생리 활성과 그 활성 성분을 밝히고자 노력하고 있다.

따라서 본 연구에서는 수용성 추출물을 높은 수율로 얻을 수 있고, 독성이 없이 친환경적인 추출 방법으로 당 분해 효소와 단백질 분해 효소를 이용하는 효소적 가수 분해 방법을 이용하여 해조류로부터 수용성의 활성 성분을 추출하고, 그 중, 좋은 활성이 예상되어지는 해조류 효소 추출물을 선별하여, 활성 산소종에 대한 *in vitro*상과 세포내의 항산화 활성과 항응고 활성, 면역 조절 및 항염증 활성, 항암 활성을 알아보도록 하겠다.

재료 및 방법

제주지역에서 서식하고 있는 다양한 해조류를 채집하여 수세한 후, 동결 건조하여 분말로 만들었다. 이렇게 얻어진 해조류는 AOAC법(1990)에 따라 수분, 지방, 조단백질, 회분 그리고 탄수화물과 같은 일반 성분 함량을 상압 105℃ 가열 건조법, Soxhlet법, semi-micro Kjeldahl법, 건식 회화법과 phenol sulfuric acid 법으로 각각 측정하였다.

분말된 건조 해조류 원료는 Novo. Co.에서 생산되고 있는 효소들 중, 당분해 효소 5종(Viscozyme, Celluclast, AMG, Termamyl, Ultraflo)과 단백질 분해 효소 5종(Protamex, Kojizyme, Neutrase, Flavourzyme, Alcalase)을 이용하여 Heo 등(2003)의 방법에 의해 효소적 추출물을 제조하였다.

이렇게 제조된 해조류 추출물은 항산화 효과, 지질과산화 억제 효과, 세포 손상 억제 효과, 항응고 효과, 면역 조절 효과, 항염증 효과의 측정을 위해 사용되었다.

먼저, 항산화 효과의 측정을 위해, 대표적인 유해 산소종인 과산화 음이온, 수산기 라디칼, 과산화수소, DPPH 자유 라디칼에 대한 소거 활성을 측정하였다. 과산화 음이온에 대한 소거 활성은 pyrogallol의 자동 산화로 인한 과산화 음이온의 저해 정도를 측정하는 것, 수산기 라디칼 소거 활성은 Fenton reaction에 의해 발생하는 수산기 라디칼을 변형된 2-deoxyribose oxidation 방법을 사용하여 측정하였다. 그리고 과산화수소 소거 활성은 ABTS와 peroxidase의 반응을 이용하는 방법에 따라 수행하였고, DPPH 라디칼의 소거 활성은 전자 공여능(Electron donating ability, EDA)을 측정하는 방법을 가지고 측정하였다.

이렇게 시험관내에서 유해 산소종에 대한 소거 활성을 측정 한 후, 세포내의 항산화 효과를 확인하기 위해, 세포내에 유해 산소종인 과산화수소에 의한 인위적인 세포 손상을 감태의 효소적 추출물이 얼마나 저해할 수 있는지를 확인하였다. 우선, 임파구 세포 내 oxidative DNA 손상 억제 활성을 확인하기 위해, Singh(1988)의 방법을 수정, 보완한 alkaline comet assay를 수행하였다. 또한, Hoechst 33342 형광 염색약이 H₂O₂에 의해 손상된 세포핵의 파편을 염색시키는 것을 형광 현미경하에서 관찰하는 것에 의해 형태학적인 세포 손상 억제를 측정하였다. 더 정확한 apoptosis를 확인하기 위해, flow cytometry assay를 수행하였는데, 이것은 한 세포가 성장하여 분열되는 과정인 cell cycle내에서 세포가 apoptosis를 유발하면 replication이 멈추고 cell의 고사가 일어난 DNA를 propidium iodide PI 염색시키는 것을 이용하여 측정하는 것이다. 뿐만 아니라, Cell 상에서와 당뇨가 유발된 쥐에서의 지질과산화 억제 활성을 측정하기 위해, thiobarbituric acid(TBA)와 반응하여 생성된 malondialdehyde(MDA)의 양을 측정하는 Wilber법을 변형하여 이용하였다.

두 번째로, 감태를 포함한 해조류 효소적 추출물이 항혈액 응고 활성을 가지는지를 결정하기 위해, 혈청에 sample을 처리하고 APTT와 PT 그리고 TT reagent를 혼합시켜 coagulation machine을 이용해 트롬빈이 응고되는 시간을 측정하는 것에 따라 측정하였다. 그 중, 가장 활성이 좋은 것으로 확인된 효소적 추출물로부터 분자량별 분획물, 후코이단을 각각 순차적으로 분리하여 항응고 활성을 위와 같은 방법으로 수행하였다.

세 번째로, 마우스의 비장 조직으로부터 얻어진 세포에 있어 감태의 효소적 추출물이 면역학적 활성을

가지는 지를 확인하였다. 먼저, 세포의 증식능을 검색하기 위하여, DNA의 T 염기에 ^3H -thymidine과 같은 방사능 동위 원소를 라벨링하여 세포가 분화 증식한 후, 방사능 동위 원소의 양을 측정하는 T cell proliferation assay(^3H -thymidine incorporation)를 이용하였다. 이렇게 증식이 확인된 후, 증식된 세포의 표면 타입을 검색하기 위하여, CD3, CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD45R/B220와 같은 T, B 세포, 대식 세포와 단핵구에 해당하는 항체와 반응시켜 세포의 크기와 형광 광도를 이용한 BD FACSCalibur™ flow cytometer와 CellQuest 소프트웨어로 세포의 표면 타입을 분석하였다.

또한, 이렇게 증식된 세포에서 전사인자의 단백질 발현 양상 검색하기 위해, NFkB p65, phospho-ikB, Ikb에 대한 단백질 발현량을 Western blot에 의해 측정하였고, EMSA에 의해 NFkB와 DNA 결합능을 확인하였다. 뿐만 아니라, 샘플의 항염증 효과를 확인하기 위해, *in vivo* 상에서 동물 모델을 사용하여 귀에 유도되는 염증을 감태 효소 추출물이 얼마나 억제할 수 있는지를 측정하였다. 이것으로 부터 TPA가 유도하는 귀의 부종에 대한 억제 활성 정도를 계산하였고, 염증이 유도되었던 마우스 귀 일부 조직의 조직학적 평가를 Hematoxylin & Eosin 염색법을 수행하여 항염증 효과를 확인하였다.

결 과

이 연구에서 제주지역에서 채집한 여러 종의 해조류로부터 일반 성분을 분석한 결과, 대부분의 해조류 내 탄수화물의 함량이 전체의 약 60%, 회분 함량은 거의 10% 이상, 수분은 약 5%, 지방은 1~2% 내외를 차지한 것으로 확인하였다.

일반적으로, 생체 내에서 산화 현상으로 세포막에 존재하는 지질은 산소에서 유래되는 superoxide anion radical, hydroxyl radical, singlet oxygen 및 H_2O_2 등의 활성 산소와 결합하여 과산화물을 만들고, 이들의 연속 반응에 의하여 생체 내에서 DNA를 손상시켜 암을 유발할 뿐만 아니라, 세포 노화, 세포막 분해, 지방 산화 등 심각한 생리적인 장애를 일으킨다. 따라서 이러한 유해 산소인 superoxide anion radical, hydroxyl radical, H_2O_2 , DPPH free radical에 대한 감태 효소 추출물의 소거 활성을 측정된 결과, 대부분의 효소 추출물에서 유해 산소종 소거 활성을 확인할 수 있었는데, 그 중에서 감태의 효소 추출물은 약 60~90%의 우수한 hydrogen peroxide 소거 활성과 우수한 60~70%의 DPPH free radical 소거 활성을 나타내었다. 게다가 감태의 Termamyl 효소 추출물은 67%의 가장 우수한 superoxide anion radical 소거 활성을 나타내었고, hydroxyl radical의 경우에는 모자반의 Acalase 효소 추출물의 47% 소거율을 제외하고는 40% 미만의 낮은 소거율을 나타내었다. 뿐만 아니라, 감태가 과산화수소를 인위적으로 처리하였을 경우, 얼마나 세포 손상을 얼마나 억제할 수 있을 지를 확인한 결과, 이 감태의 모든 효소 추출물에서 대부분 약 50~90%의 세포 손상 억제 활성을 나타내었고, 그 중, AMG 효소 추출물은 $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 에서도 약 70% 이상의 대체적으로 높은 활성을 나타내었다(그림 1). 또한, 형광 현미경하에서 DNA 형상을 관찰한 결과로부터 과산화수소만 처리한 경우보다, 감태의 모든 효소 추출물을 농도별로 처리하였을 때, DNA 손상이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 유해 산소 종에 의한 세포 내 핵의 손상 정도를 형광 현미경으로 관찰한 결과, H_2O_2 를 첨가하지 않은 경우에는 cell이 손상 받지 않은 원형의 형태를 하고 있지만, H_2O_2 를 첨가시킨 경우에는 세포가 손상을 받아 apoptotic body가 많이 생성된 것을 확인할 수 있다. 하지만 감태 효소 추출물을 첨가시킨 경우에는 apoptotic body와 세포의 손상이 줄어든 것을 확인할 수 있었다. 또한, apoptosis를 가장 정확하게 정량할 수 있는 법인 flow cytometry는 cell에 apoptosis가 유발되게 되면 replication이 멈추고 cell의 고사가 일어나 세포주기 중, sub-G1기의 DNA %가 증가하게 되는 원리를 이용한 것이다. 그림 2에서 보는 바와 같이, sub-G1기의 DNA가 22%에서 12%로 감소한 것을 확인하였고, 이것은 감태의 효소 추출물이 apoptosis의 유발을 효과적으로 억제한다는 것을 제시하였다.

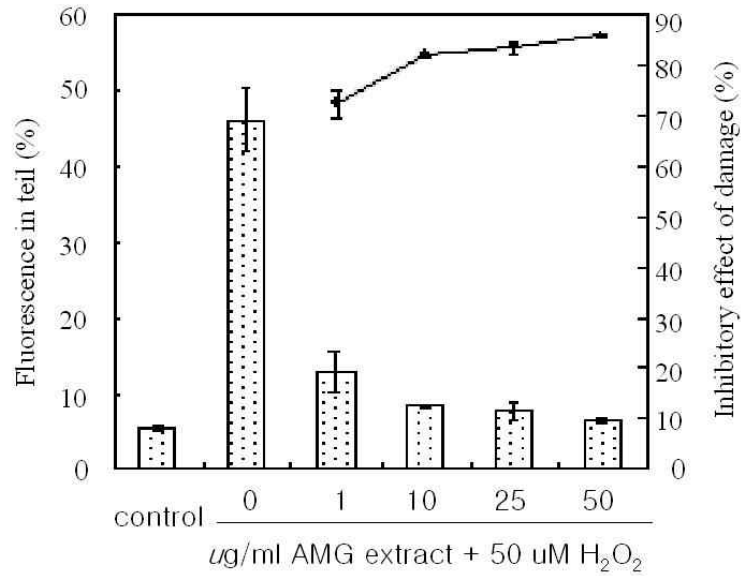


그림 1. 감태 AMG 효소 추출물을 처리했을 때 보이는 DNA 손상 억제 활성.
 ▨ : % Fluorescence in tail DNA, ●- : 세포 손상 억제 활성.

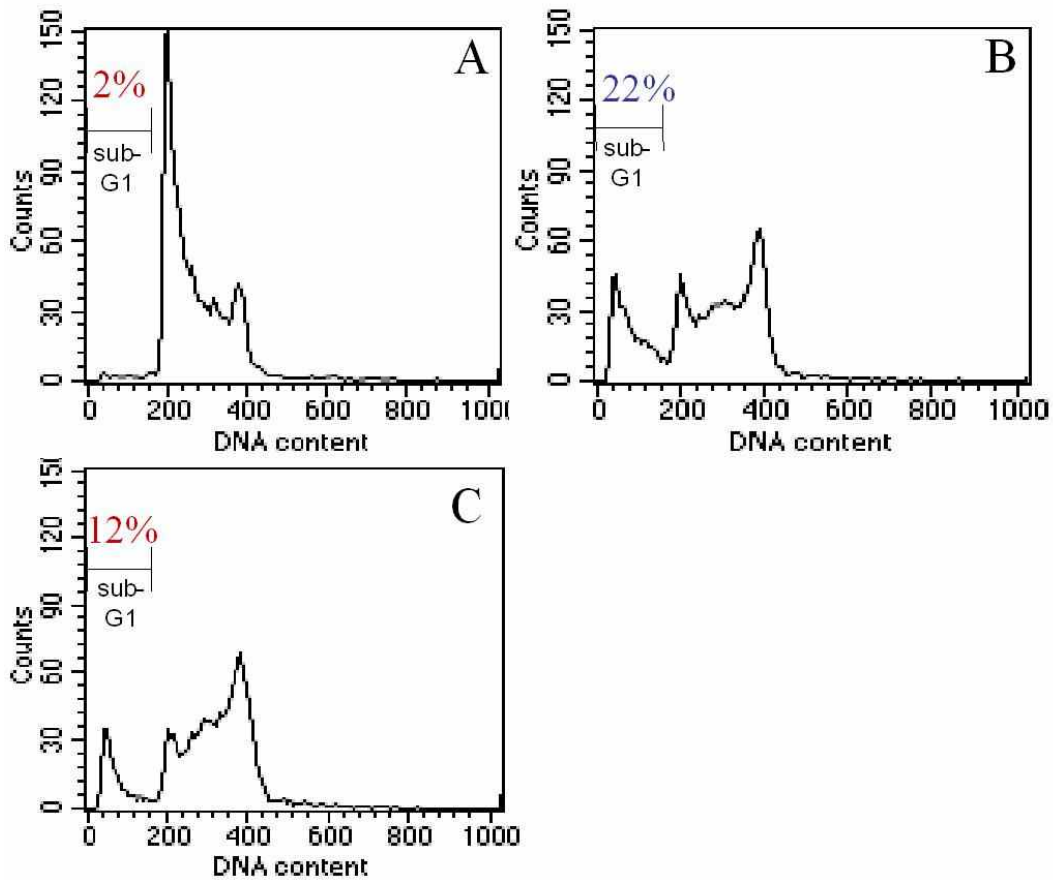


그림 2. Flow cytometry를 이용한 세포 보호 효과 측정.
 (a) H₂O₂를 첨가하지 않음, (b) H₂O₂를 첨가함, (c) 30 KDa 이상의 감태 효소 추출물을 처리해 준 후, H₂O₂를 첨가함.

일반적으로, 대기 중에 존재하는 산소는 여러 유기물질에 대해 산화 반응을 유발시켜 많은 부작용을 유발한다. 특히, 반응성이 강한 산소는 linoleic acid 등과 같은 불포화 지방산과 쉽게 반응하여 말론알데히드(malondialdehyde) 등과 같은 발암성 물질, 과산화 지방질 혹은 반응성이 매우 강력한 자유라디칼을 생성시키는 것으로 보고되었다. 따라서 본 실험에서는 지질을 산화시켰을 때 감태의 효소적 가수 분해물이 얼마만큼의 지질과산화 저해 효과를 갖는지를 측정하였다. 그 결과, 당 분해 효소 추출물에서는 Ultraflo 효소 추출물이 가장 우수한 지질과산화 억제 효과를 갖는 것을 확인하였고, 단백질 분해 효소 추출물에서는 Flavourzyme과 Alcalase 효소 추출물이 유의적으로 지질과산화를 줄여주는 것을 확인하였다. 뿐만 아니라, 당뇨병이 유발된 쥐에서 지질과산화를 억제하는 정도를 측정한 결과, 효소 추출물을 처리한 경우, 지질과산화량이 줄어든 것을 확인할 수 있었다.

두 번째로, 항응고 활성이란 혈전의 주성분인 불용성의 섬유소를 형성하는 혈액의 응고를 억제하는 활성으로 복잡한 생화학적 반응이다. 게다가 혈관 내 생성된 혈전이 혈관벽에 점착하여 미세 혈관을 막아 혈류를 방해함으로써 혈액 순환계 질환인 동맥경화증, 심부전, 심근경색, 뇌출혈, 뇌혈전 등과 같은 중대한 성인병을 일으킨다. 이에 본 연구에서 감태의 효소적 추출물의 항응고 활성을 측정한 결과, 감태의 효소적 추출물들은 높은 APTT와 TT의 활성을 보였고, PT는 control과 유사한 활성을 나타내었다. 특히, 그 중에서 AMG 추출물이 가장 좋은 항응고 활성을 나타내었다. 더 나아가 AMG 추출물을 가지고 분자량별 분획물을 제조하여 측정한 결과에서, 30 KDa 미만의 분자량에서는 control과 별 차이를 나타내지 않았으나 30 KDa 이상의 고분자 물질에서는 아주 뛰어난 항응고 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 또한 고분자 물질로부터 분리된 다당류에서도 헤파린과 유사한 항응고 활성을 가진다는 것을 확인하였다(표 1).

세 번째로, 감태 효소 추출물의 면역학적 활성이나 항염증 활성을 평가하기 위해 수행한 실험으로부터, 조혈 기관으로 알려진 마우스의 비장 조직부터 얻어진 세포들을 가지고 수행하였다. 일반적으로 비장 조직은 면역에 관여하는 많은 면역 세포들을 가지고 있는 것으로 알려져 있어, 감태 효소 추출물의 세포 증식능을 확인하는데 사용하였다. 그 결과, 세포의 증식능은 농도 의존적으로 그 수가 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 그 분자량별 분획물을 가지고 수행한 결과도 농도 의존적으로 증가한 것을 확인하였다. 흥미롭게도, 저분자량의 분획물보다 고분자량의 분획물이 더 좋은 세포 증식능을 가진다는 것을 확인할 수 있었다(그림 3). 이렇게 증식이 된 세포에서 어떤 특정한 세포 타입이 증가되었는지를 확인하기 위해 실시한 FACS에 의한 결과로부터, helper T cell 마커인 CD4+ T 세포, cytolytic T cell 마커인 CD8+ T 세포와 pan B 세포 마커인 CD45R/B220+ 세포들의 수가 유의성 있게 감태 효소 추출물에 의해 증가한 것을 확인하였다. 특히, CD8+ T 세포의 수는 약 두 배 정도 증가되었다. 세포의 표면 타입을 확인한 후, 그 증식이 어떠한 전사인자에 의해 유도되어지는 지를 확인한 결과, 사이토카인의 분비를 유도하거나, T 세포의 활성화, 분화, 증식을 유도한다고 알려진 핵 내 NFκB는 단시간과 장시간에 걸쳐 각각 15분에 활성화 되었고, 3시간 이후에는 그 발현이 상당히 시간 의존적으로 증가되었다(그림 4). 흥미롭게도, 이것은 NFκB와 DNA 결합력이 증가한 시간대와 일치하였다.

마지막으로 항염증 평가를 위해 수행한 실험에서, 그림 5에서 보이는 바와 같이 TPA 만을 단독 처리한 경우 증가된 염증 세포나 귀의 부종을 관찰할 수 있으나, 효소 추출물과 같이 처리한 경우, 염증세포의 수는 감소하고 귀의 부종도 줄었다는 것을 확인하였다. 이것은 귀의 두께에 대하여 측정한 염증 억제 활성과도 그 결과가 일치함을 알 수 있었다.

표 1. 감태의 효소적 추출물로부터 분리된 다당류의 항응고 활성

농도(μg/mL PPP)	0.7	1.4	2.8
다당류의 응고 시간	60	110	> 300
헤파린의 응고 시간	70	170	> 300

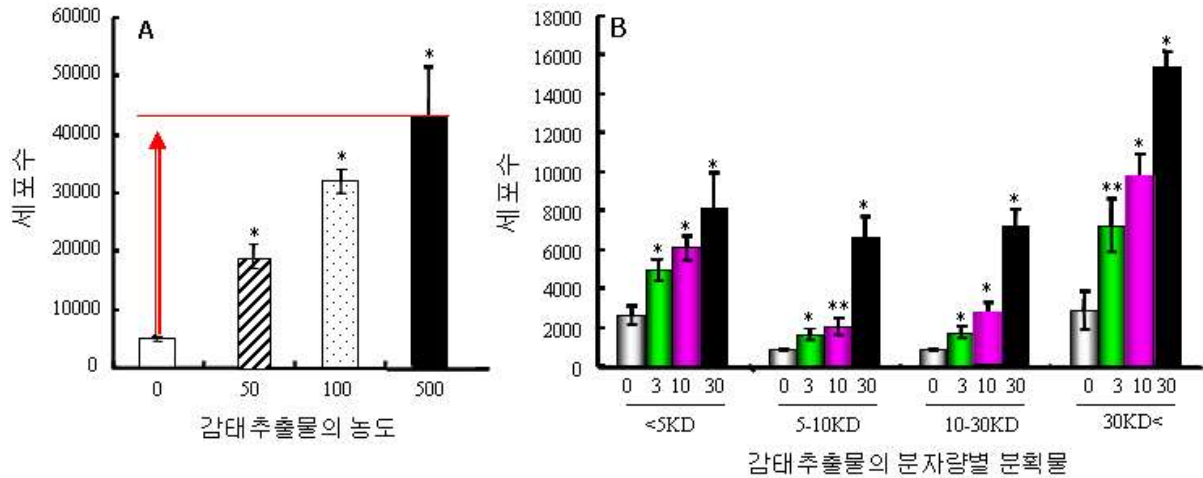


그림 3. 감태 Kojizyme 추출물(A)과 그 분자량별 분획물(B)의 splenocytes에 대한 증식능.

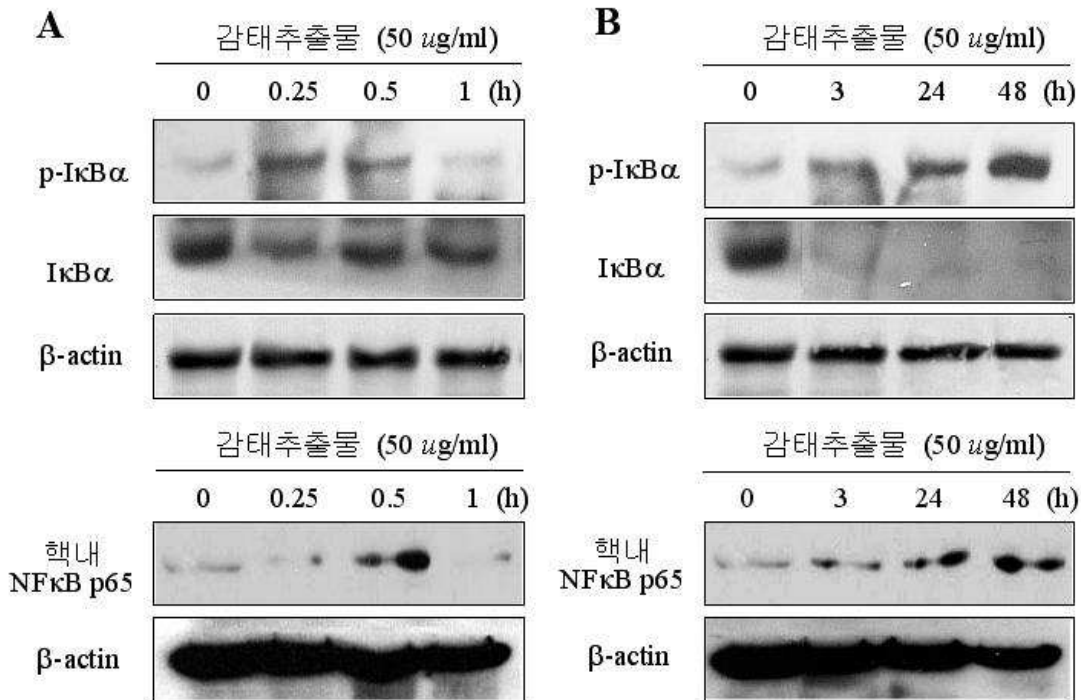


그림 4. 감태 Kojizyme 추출물에 의해 증식된 마우스 비장 세포에서의 NFκB 전사인자와 IκB, p-IκB의 단기(A)와 장기(B) 발현.

결론

현재 이 연구에서, 다양한 해조류로부터 효소적 추출물을 제조하여 다양한 생리 활성을 검색하였다. 이 모든 결과로부터 항산화 효과, 지질 과산화 효과, 세포 손상 억제 효과, 항응고 효과, 면역 조절 및 항염증 효과를 다양한 해조류 추출물들이 가진다는 것을 확인하였고, 그 중 감태로부터 분리된 효소 추출물이 가장 좋은 효과들을 보였다는 것을 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라, 항산화 효과, 지질 과산화 효과, 세포

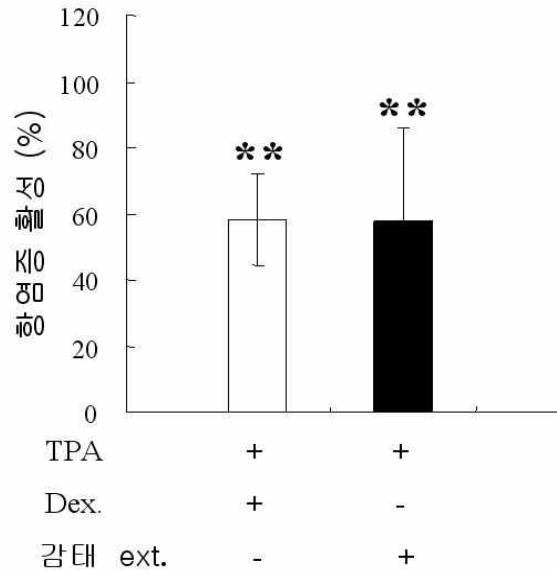


그림 5. 감태 Kojizyme 추출물의 항염증 활성.
 Dex.: Dexamethasone, 감태 ext.: 감태 kojizyme 추출물.

손상 억제 측면에서, 추출물 내에 함유된 폴리페놀릭 성분의 함량이 활성 증가와 함께 증가되는 것을 확인 하였기에 아마도 폴리페놀릭 계통의 물질이 그 활성과 연관된다고 사료된다. 또한, 항응고나 면역 조절, 항염증 측면에서는 분자량별 분획에 의한 분획물에 따른 활성 비교 시, 저분자량의 효소 추출물 성분보다 고분자량의 효소 추출물 성분이 더 좋은 항응고나 면역 조절, 항염증 효과를 가졌기에 이것으로부터, 30KD 이상에 해당하는 고분자 물질인 후코이단과 같은 다당류 성분이 그러한 좋은 효과를 이끄는 것이라고 사료된다.

또한, 현재까지 일반적으로 사용하고 있는 유기 용매 추출법이 아닌 효소를 이용한 가수분해적인 방법에 의해 천연 물질로부터 제조한 해조류 수용성 추출물이기에, 비독성과 친환경 측면을 고려할 때, 보다 더 다양한 측면에서 많은 부가가치가 있다고 사료되고, 더 나아가서 각 활성에 대한 활성 성분을 정제·분리 하여 그 메커니즘을 파악하는 것이 요구된다.

참 고 문 헌

- Ahn MJ, Yoon KD, Min SY, Lee JS, Kim JH, Kim TG, Kim SH, Kim NG, Huh H, Kim J (2004) Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and protease by phlorotannins from the brown alga *Ecklonia cava*. *Bio Pharm Bull* 27: 544-547.
- Ebihara K, Kiriya S (1990) Physicochemical property and physiological function of dietary fiber. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 37: 916-925.
- Fukuyama Y, Kodama M, Miura I, Kinzyo Z, Kido M, Nakayama Y, Takahashi H (1989) Structure of an anti-plasmin inhibitor, eckol, isolated from the brown alga *Ecklonia kurome* Okamura and inhibitory activities of its derivatives on plasma plasmin inhibitors. *Chem Pharm Bull* 37: 349-353.
- Fukuyama Y, Kodama M, Miura I, Kinzyo Z, Mori H, Nakayama Y, Takahashi H (1990) Anti-plasmin inhibitor. VI. Structure of phlorofucofuroeckol A, a novel phlorotannin with both dibenzo-1,4-dioxin and

- dibenzofuran elements, from *Ecklonia kurome* Okamura. *Chem Pharm Bull* 38: 133-135.
- Gonzales AG, Martin JD, Norte M, Perez R, Rivera P, Ruano JZ (1983) X-ray structure determination of new brominated metabolites isolated from the red seaweeds *Laurencia obtuse*. *Tetrahedron Lett* 24: 4143-4146.
- Heo SJ, Lee KW, Song CB, Jeon YJ (2003) Antioxidant Activity of Enzymatic Extracts from Brown Seaweeds. *Algae* 18(1): 71-81.
- Jensen A (1969) Tocopherol content of seaweed and seaweed meal. II. Individual, diurnal and seasonal variation in some Fucaceae. *J Sci Food Agric* 20: 454-458.
- Jensen A (1972) The nutritive value of seaweed meal for domestic animals, in Proc 7th Int Symposium Seaweed Res, Sapporo, Japan. p 7.
- Kang HS, Chung HY, Kim JY, Son BW, Jung HA, Choi JS (2004a). Inhibitory phlorotannins from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on total reactive oxygen species (ROS) generation. *Arch Pharm Res* 27: 194-198.
- Kang HS, Kim HR, Byun DS, Son BW, Nam TJ, Choi JS (2004b) Tyrosinase inhibitors isolated from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera*. *Arch Pharm Res* 27: 1226-1232.
- Kang K, Park Y, Hwang H J, Kim SH, Lee JG, Shin HC (2003) Antioxidative properties of brown algae polyphenolics and their perspectives as chemopreventive agents against vascular risk factors. *Arch Pharm Res* 26: 286-293.
- Kim HS, Kim GJ (1998). Effects of the feeding *Hizikia fusiforme* (Harvey) Okamura on lipid composition of serum in dietary hyperlipidemic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 718-723.
- Kim KI, Seo HD, Lee HS, Cho HY, Yang HC (1998) Studies on the blood anticoagulant polysaccharide isolated from hot water extracts of *Hizikia fusiforme*. *Korean J Food Sci Nutr* 27:1204-1210.
- Kim KI, Seo HD, Lee HS, Jo HY, Yang HC (1998) Studies on the blood anticoagulant polysaccharide isolated from hot water extracts of *Hizikia fusiforme*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27(6): 1204-1210.
- Lee JH, Kim ND, Choi JS, Kim YJ, Moon YH, Lim SY, Park KY (1998) Inhibitory effects of the methanolic extract of an edible brown alga, *Ecklonia stolonifera* and its component, phloroglucinol on aflatoxin B1 mutagenicity *in vitro* (Ames test) and on benzo(a)pyrene or N-methyl N-nitrosourea clastogenicity *in vivo* (mouse micronucleus test). *Nat Pro Sci* 4: 105-114.
- Nagai T, Yukimoto T (2003) Preparation and functional properties of beverages made from algae. *Food Chem* 81: 327-332.
- Nagayama K, Iwamura Y, Shibata T, Hirayama I, Nakamura T (2002) Bactericidal activity of phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome*. *J Antimicrob Chemother* 50: 889-893.
- Okai Y, Okai KH, Ishizaka S, Ohtani K, Yuasa IS, Yamashita U (1998) possible immunomodulating activities in extract of edible brown alga *Hizikia fusiforme* (Hiziki). *J Food Agric* 76: 56-62.
- Yan X, Chuda Y, Suzuki M, Nagata T (1999) Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hizikia fusiformis*, a common edible seaweed. *Biosci Biotechnol Biochem* 63: 605-607.
- Yoon JA, Yu KW, Jun WJ, Cho HY, Son YS, Yang HC (2000a) Screening of anticoagulant activity in the extracts of edible seaweeds and optimization of extraction condition. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29(6): 1098-1106.
- Yoon JA, Yu KW, Jun WJ, Cho HY, Son YS, Yang HC (2000b) Purification of blood anticoagulant polysaccharide from *Pachymeniopsis elliptica*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29(5): 908-916.
- Yoshie Y, Wang YP, Suzuki T (2002) Compositional difference of phenolic compounds between two seaweeds, *Halimeda* spp. *Journal Tokyo University of Fisheries* 88: 21-24.