

Eisenia bicyclis 에탄올 추출물로부터 분리한 Dieckol의 Lipase 저해 Mode

정슬아¹, 김꽃봉우리², 김동현¹, 조지영³, 김태완⁴, 안동현^{1*}

¹부경대학교 식품공학과/식품연구소

²부경대학교 수산과학 연구소

³순천향대학교 해양생명공학과

⁴안동대학교 식품생명공학과

Received : October 11, 2012 / Revised : November 30, 2012 / Accepted : December 1, 2012

Lipase Inhibitory Mode of Dieckol Isolated from *Eisenia bicyclis* Ethanol Extract. Jung, Seul-A¹, Koth-Bong-Woo-Ri Kim², Dong-Hyun Kim¹, Ji-Young Cho³, Tae-Wan Kim⁴, and Dong-Hyun Ahn¹. ¹Department of Food Science and Technology / Institute of Food Science, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea, ²Institute of Fisheries Sciences, Pukyong National University, Busan 619-911, Korea, ³Department of marine biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea, ⁴Department of Food Science and Biotechnology, Andong National University, Daegu 702-701, Korea

This study was performed to investigate the possible use of *Eisenia bicyclis* (EB) ethanol extract to inhibit activity against lipase. In tests, the lipase inhibitory activity of EB ethanol extract was noted as being 43, 27, and 24% at concentrations of 5, 2.5, and 1 mg/ml, respectively. Isolation was carried out by liquid and liquid extraction, silica-gel column chromatography, and HPLC. The results showed that the lipase inhibitory activity of the ethyl acetate (EA) fraction from EB ethanol extract exhibited the strongest lipase inhibitory activity with an IC₅₀ value of 1.31 mg/ml. The EA fraction was separated using silica-gel column chromatography and we obtained 22 sub-fractions. Amongst them, the EA1 fraction showed the highest lipase inhibitory activity with an IC₅₀ value of 0.54 mg/ml. Eight peaks were obtained from the EA1 fraction by HPLC. Fraction 5 also showed a strong lipase inhibitory activity with an IC₅₀ value of 0.37 mg/ml. The fraction 5 was identified as dieckol and the inhibition pattern analyzed from Lineweaver-Burk plots revealed a non-competitive inhibitor. These results suggest that EB has potential as a natural anti-obesity agent.

Keywords: *Eisenia bicyclis*, lipase inhibitory, dieckol, anti-obesity agent

서 론

비만은 에너지 대사의 불균형에 의해 지방조직에서 지방의 합성량이 분해량보다 많아 체내에 체지방이 과다하게 축적된 상태로 고에너지나 고지방을 함유한 음식의 섭취 및 운동 부족, 신경내분비 계통의 이상, 유전적인 요인 등에 의해서 발생된다[5, 7]. 비만은 자체가 갖는 문제점 뿐만 아니라 당뇨, 고혈압, 심혈관 관계 질환 및 암 등의 합병증을 유발하기 때문에 세계보건기구(WHO)에서는 비만을 세계적인 영양문제로 다루어 건강을 해치는 단순 위험 인자가 아닌

치료해야 할 질병으로 인식하고 있다[32, 33]. 비만의 치료 방법으로는 식이요법 및 운동이 가장 적절한 방법이나 최근에는 식욕억제제, 열 생산 촉진제, 흡수억제제 등이 이용되고 있다[25, 29, 35]. 그 중에서 지질을 분해하는 lipase를 저해하여 지질의 소화 및 흡수를 저해하는 pancreatic lipase 저해제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. Pancreatic lipase는 식품을 섭취했을 때 지방인 triacylglycerol를 2-monoacylglycerol과 fatty acid로 가수분해하는 효소이다. 일부의 2-monoacylglycerol과 fatty acid는 소장의 점막 세포에서 흡수되어 에너지원과 인체 내 구성성분으로 사용되며 대부분은 다시 triacylglycerol로 합성되어 체내의 지방 세포에 축적되어 비만을 유발한다[12]. 대표적인 pancreatic lipase inhibitor는 *Streptomyces toxitricini*로부터 유래된 lipstatin의 유도체인 tetrahydrolipstatin(orlistat)로서 구

*Corresponding author

Tel: +82-51-629-5831, Fax: +82-51-629-5824

E-mail: dhahn@pknu.ac.kr

조적으로 중성지방과 비슷하여 pancreatic lipase의 활성 부위와 공유결합을 형성하여 지질의 가수분해를 방해한다 [10, 13]. 섭취된 지방의 약 30%를 저해할 정도로 효능이 우수한 것으로 알려져 있으나 orlistat는 위장장애, 과민증, 담즙분비장애, 지용성 비타민 흡수억제 등의 부작용[18]을 지니는 것으로 알려져 있어 최근에는 부작용이 없는 천연물로부터 pancreatic lipase inhibitor를 개발하고자하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 주로 식물의 잎 및 뿌리의 주요 성분인 saponin 화합물, 항산화 작용이 뛰어난 polyphenol 화합물 및 terpene 화합물 등이 lipase 저해활성을 나타낸다는 육상식물에 대한 연구가 주를 이루어왔으며 해양식물에 대한 연구는 미흡한 실정이다[3]. 해양식물인 해조류는 각종 미네랄과 비타민 및 섬유소, 단백질 등이 풍부하게 함유되어 있을 뿐만 아니라 고압, 저온, 저산소, 고염 등의 독특한 환경 속에서 서식하기 때문에 육상생물과는 다른 대사계나 생체방어계를 가지고 있는 것으로 알려져 있어 항암[26], 항돌연변이[23], 항염증[16], 고지혈증 및 고혈압 예방[14, 27] 및 멜라닌 생성 억제[16] 등과 같은 다양한 생리활성을 갖는 물질들을 함유하고 있다. 대황(*Eisenia bicyclis*)은 다시마목(Laminariales) 미역과(Alariaceae)에 속하는 다년생 식물로 주로 한국과 일본의 태평양 연안에서 널리 서식하고 있다. 대황은 다른 갈조류의 알긴산이나 fucoidan과 달리 함황당류인 laminaran을 함유하고 있으며 주된 이차 대사산물인 phlorotannin derivatives은 antioxidant[6], antiallergic[34], α -glucosidase inhibitor[30], anti-hypercholesterolemia[24] 및 anti-virus [36] 등 여러 가지 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있어 새로운 기능성 소재로서 충분한 가치가 있다. 본 연구에서는 대황 에탄올 추출물이 가지는 lipase 저해 효과를 측정하고 물질을 분리, 동정하여 이 화합물이 가지는 pancreatic lipase 저해 타입을 확인하여 식품 산업에 천

연 기능성 소재로서의 응용 가능성에 대해 살펴보았다.

재료 및 방법

재료

대황(*Eisenia bicyclis*)는 동해안에서 채취하여 담수로 깨끗이 세척한 후 동결건조 하여 분쇄기(DA282-2, Deasungatron, Seoul, Korea)로 잘게 분쇄시킨 뒤 -20°C에서 저장하면서 실험에 사용하였다.

추출

분말상태의 시료에 10배량의 에탄올을 가하여 실온에서 24시간 동안 진탕 추출하였다. 추출물은 원심분리기(UNION 32R, Hanil Co., Incheon, Korea)로 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액만 취하였다. 잔사는 이와 동일한 방법으로 2회 반복 추출하였다. 이를 여과지(Advantec 5A, Toyo Roshi Kaisha, Tokyo, Japan)로 여과한 후 rotary evaporator(RE200, Yamato Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 감압 농축하고 37°C에서 건조하였다. 이를 -20°C에서 보관하며 실험에 사용하였다. 대황 에탄올 추출물을 10배량의 증류수에 현탁한 후, 동량의 *n*-hexane을 가하여 180 rpm으로 2시간동안 shaker(Dongwon Science Co., Busan, Korea)에서 교반하였다. 이를 정치시켜 상층액을 취하고 여과, 감압 농축하여 *n*-hexane층을 얻었다. 같은 방법으로 수층을 chloroform, ethyl acetate, butanol로 용매분획한 다음, 농축하여 각각 분획물을 얻었으며 최종적으로 물 분획물을 얻었다(Fig. 1).

Lipase inhibitor 분리

대황 에탄올 추출물의 ethyl acetate 분획물을 ethyl

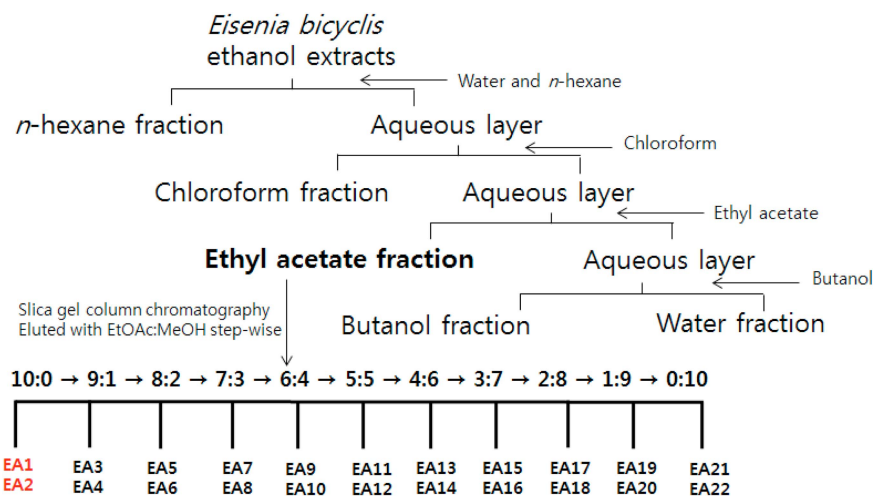


Fig. 1. Solvent fractionation of *Eisenia bicyclis* ethanol extract.

Table 1. Operating conditions of HPLC for analysis of lipase inhibitor compounds from *Eisenia bicyclis*.

Instrument	Glison 321 pump
Column	μBondapak C18(3.9300 mm), 125 A, 10 μm
Solvent	Eluted from 20% ACN to 50% ACN for 10 min
Injection Volume	20 μl
Flow rate	1.3 ml/min
Detector	Glison UV/VIS 151

acetate에서 methanol로 용매계를 단계적으로 극성을 높여 가며 silica gel column chromatography를 실시하여 분획물을 얻었다. 활성화된 silica gel(230-400 mesh, Merck Co., Germany) 50 g에 ethyl acetate를 가하여 slurry로 만들고 glass column(5065 mm, 120 ml)에 충전한 후 이를 3배의 ethyl acetate로 세척하였다. 대항 ethyl acetate 분획물 1 g을 methanol로 농도가 500 mg/ml이 되도록 녹이고 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 column에 loading하였다. Ethyl acetate와 methanol을 용매로 하여 (10:0→9:1→8:2→7:3→6:4→5:5→4:6→3:7→2:8→1:9→0:10) 순차적으로 100 ml씩 분획하여 22개의 분획물을 얻었다(Fig. 1). Silica gel column chromatography를 이용하여 분리된 EA1 획분을 희석하고 0.45 μm membrane filter로 여과한 후 20 μl을 취하여 Table 1과 같은 조건으로 HPLC를 실시하였다. HPLC로 분리한 분획을 LC/ESI-MS(Nanospace SI-2, Shiseido, Tokyo, Japan)에서 C18 column(LUNA 5 micron-C-18, 1501 mm, Phenomenex, Torrance, Canada)을 이용하여 분자량을 측정하였으며 결과는 LCQ Deca XP mass spectrometer(Thermo finnigan San Jose, CA, USA)로부터 얻었다. NMR 측정의 경우, ¹H spectra는 JNM-ECP400(500 MHz, JEOL Co., Tokyo, Japan), ¹³C spectra는 Avance II 900(900 MHz, Bruker, Karlsruhe, Germany) spectrometer를 각각 이용하여 측정하였다.

Pancreatic lipase 저해 활성

Lipase 저해활성 측정은 Kim 등[20]의 방법을 사용하여 측정하였다. Porcine pancreatic lipase(triacylglycerol acylhydrolase, EC 3.1.1.3, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 0.3 mg에 10 mM MOPS(3-[N-morpholino]propanesulfonic acid)와 1 mM EDTA(pH 6.8)를 포함하는 buffer를 30 μl를 넣고, Tris buffer(100 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂, pH 7.0)를 850 μl 첨가하여 enzyme buffer를 준비하였다. Enzyme buffer에 시료 100 μl를 첨가하여 37°C에서 15분간 반응시켰다. 반응 후 10 mM p-nitrophenyl butyrate(Sigma Chemical Co.) 20 μl를 첨가하여 다시 37°C

에서 15분간 반응시켰다. p-Nitrophenyl butyrate가 p-nitrophenol로 가수분해된 정도를 UV/visible spectrophotometer(GENESYS 10 UV, Rochester, NY, USA)로 400 nm에서 흡광도를 측정하였다. Lipase 저해활성(%)은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Lipase 저해활성(\%)} = [1 - (B-C)/A] \times 100$$

- A: 시료를 첨가하지 않은 흡광도
- B: 시료를 첨가한 흡광도
- C: 효소를 첨가하지 않은 흡광도

Lipase 저해 타입

Lipase에 대한 저해 기작을 알아보기 위해 기질의 농도를 5, 10, 20 mM(Stock concentration)로 달리하였으며 시료의 농도를 0, 0.4 및 0.6 mM(Stock concentration, 몰 농도는 LC/ESI-MS를 통해 얻은 분자량을 이용하여 계산)로 하여 위의 실험방법으로 실험을 진행 한 후 Lineweaver-Burk plot을 이용하여 분석하였다.

통계 처리

각 실험에 대한 유의차 검정은 SAS software(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)에서 프로그램 된 general linear procedures, least square 평균값을 분산분석 한 후 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test법에 따라 분석하였다.

결과 및 고찰

E. bicyclis 에탄올 추출물의 lipase 저해 활성

활성물질을 분리하기 위하여 대항 에탄올 추출물을 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 및 water의 극성치를 이용하여 순차적 분획하였다. 그 중 ethyl acetate 층이 1, 2.5 및 5 mg/ml 농도에서 각각 38.35%, 58.54% 및 65.91%로 1.31 mg/ml의 IC₅₀ 값을 보여 높은 lipase 저해활성을 보였다(Table 2). Ethyl acetate 분획을 silica-gel column chromatography를 이용하여 분리하여 22개의 sub-fraction을 얻었다. 22개 sub-fraction의 lipase 저해활성을 측정한 결과, EA1, 2 에탄올-fraction 이 높은 lipase 저해활성을 나타내었으며 그 중 EA1 sub-fraction이 2.5 mg/ml에서 82.55%로 0.54 mg/ml의 IC₅₀ 값을 보여 가장 높은 lipase 저해활성을 나타냈다. 갈조류인 *Ascophyllum nodosum* [2]와 *Ecklonia cava* [21]의 에탄올 추출물로부터 분리한 ethyl acetate 분획 역시 에탄올보다 높은 lipase 저해활성을 나타내었고 이를 silica-gel column chromatography를 실시한 결과, crude ethyl acetate 분획보다 활성이 높음을 확인하

Table 2. Lipase inhibitory activity of solvent extraction fractions from *Eisenia bicyclis* ethanol extract.

	Yield (%)	Inhibitory activity (%)			IC ₅₀ (mg/ml)
		5 mg/ml	2.5 mg/ml	1 mg/ml	
Ethyl acetate	8.41	65.91 ± 2.52	58.54 ± 1.73	38.35 ± 2.41	1.31 ± 0.09
Ethanol	18.95	43.48 ± 2.35	27.58 ± 0.55	24.89 ± 0.99	5.76 ± 0.31
Orlistat		100.00 ± 0.23	99.23 ± 0.85	96.39 ± 1.18	0.0001 ± 0.00

여 본 연구와 유사한 결과를 나타내었다. 따라서 ethyl acetate 분획의 EA1 sub-fraction이 잠재적인 lipase 저해 물질을 포함하고 있을 것으로 사료되어진다. Bitou 등[4]은 해조류의 ethyl acetate 분획은 tannin과 같은 polyphenol의 함량이 높다고 하였으며 이는 효소단백질과 강하게 결합하여 효소의 활성을 저해한다고 보고하였다. Moon 등[30]은 대항 ethyl acetate 분획이 높은 protein tyrosine phosphatase 1B 저해활성을 가지며 α -glucosidase 저해활성도 나타낸다고 하였으며 이는 대항이 가지는 phlorotannin 유래 물질인 것으로 밝혀졌다. 이를 통해 대항의 EA1 sub-fraction이 나타내는 lipase 저해활성은 갈조류 유래의 phlorotannin derivatives 또는 ethyl acetate에 용출이 잘되는 소수성 물질일 것으로 사료된다.

Lipase inhibitor의 분리

높은 lipase 저해활성을 보인 EA1 sub-fraction으로부터 유효물질을 분리하기 위하여 HPLC를 실시하였다. 분석을 통해 8개의 주요 peak를 분리하였으며 각 peak의 lipase 저해활성을 측정한 결과는 Table 3과 같다. 5, 7 및 8 fraction이 0.5 mg/ml에서 각각 66.85%, 62.77% 및 61.93%의 높은 lipase 저해활성을 보였으며 그 중 fraction 5의 IC₅₀ 값이 0.37 mg/ml로 EA1 분획보다 높은 lipase 저해활성을 보였다(Table 4). 그러나 positive control인 orlistat(IC₅₀ = 0.1 μ g/ml)보다는 낮은 저해활성을 나타내었다. 높은 저해활성을 보인 fraction 5에 대해 LC/ESI-MS와 NMR를 실시하여 구조를 구명하였다. LC/ESI-MS(negative mode, [M-H]⁺ at m/z 741.1)에 의한 분자 조성은 C₃₆H₂₂O₁₈로 나타났다. ¹H-NMR spectrum은 δ 6.14 (1H, s), 6.12 (1H, s), 6.07 (2H, s), 6.06 (1H, d), 6.03 (1H, d), 5.97 (1H, d), 5.94 (1H, d), 5.91 (3H, m)의 signal을 나타내었고 반면 ¹³C-NMR은 δ 162.03, 160.30, 157.96, 156.15, 154.68, 152.55, 147.50, 147.45, 147.28, 147.06, 144.45, 144.29, 143.56, 143.46, 138.79, 138.62, 126.61, 126.34, 125.80, 125.74, 125.02, 124.78, 124.72, 100.01, 99.89, 99.63, 99.53, 97.80, 96.36, 95.98, 95.90, 95.50 signal을 나타내었다. 이러한 결과를 통해 fraction 5의 구조는 dieckol로 확인하였다(Fig. 2). Dieckol은 대표적인 phlorotannin 화합물로서 phloroglucinol을 기본구성단위로 하는 폴리페놀 화합물이며

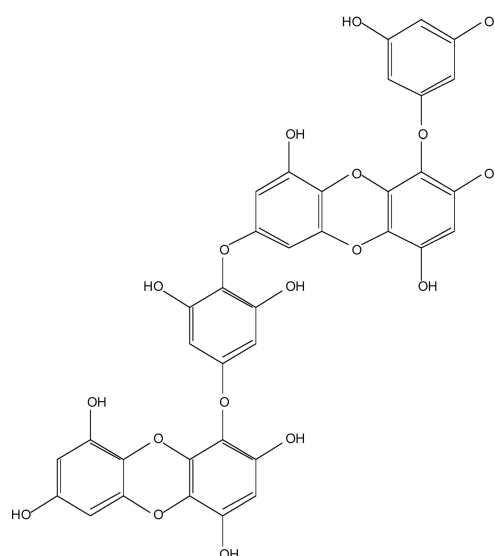
Table 3. Lipase inhibitory activity of HPLC fractions of EA1 isolated from ethyl acetate fraction of *Eisenia bicyclis* ethanol extract.

	Yield (%)	Inhibitory activity
fraction 1	7.00	25.14 ± 3.85
fraction 2	10.00	20.84 ± 3.31
fraction 3	5.00	31.64 ± 1.99
fraction 4	11.00	37.68 ± 2.65
fraction 5	5.00	66.85 ± 2.52
fraction 6	3.00	51.50 ± 0.11
fraction 7	4.00	62.77 ± 1.71
fraction 8	4.00	61.93 ± 2.36
EA1	14.43	46.06 ± 3.97

*Concentration : 0.5 mg/ml

Table 4. Lipase inhibitory activity of fraction 5 from ethyl acetate fraction of *Eisenia bicyclis* ethanol extracts by HPLC.

	Inhibitory activity		IC ₅₀ (mg/ml)
	0.5 mg/ml	0.1 mg/ml	
Fraction 5	66.85 ± 2.52	20.26 ± 1.58	0.37 ± 0.00
EA1	46.60 ± 2.96	19.34 ± 2.10	0.54 ± 0.04

**Fig. 2. Structure of dieckol isolated from *Eisenia bicyclis* ethanol extract.**

자연계에서 해양식물, 특히 갈조류에서 발견되고 있다. 해조류 유래 phlorotannin은 항산화[19, 31], 심혈관 질환 보호 [15], 항바이러스[1] 및 tyrosinase 저해활성[19] 등 다양한 기능성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. Polyphenol 화합물은 단백질과 착물을 이루는 친화력이 뛰어난 것으로 알려져 있어 이 물질의 hydroxyl group과 효소의 결합부위가 수소 및 이온결합을 통해 효소와 강한 복합체를 형성함으로써 효소들과 비선택적 침전반응을 통하여 효소의 활성을 저해한 것으로 사료되어진다[9, 28].

Lipase inhibitor의 저해 타입

효소는 활성부위에 기질이 가역적으로 결합하여 반응을 일으키는 기질특이성을 가진다. 저해제는 효소가 작용하기 위한 활성부위에 결합하여 반응을 저해하며 저해제를 통해 효소의 특이성, 효소의 활성 부위나 결합 부위에 저해제와의 결합특성을 예측할 수 있다[8]. Dieckol의 lipase 저해 타입을 설명하기 위하여 다른 기질 농도(5, 10, 20 mM)와 저해제 농도(0, 0.4, 0.6 mM)에서 Lineweaver-Burk plots를 이용하여 실시하였다. 그 결과(Fig. 3), Lipase에 대한 dieckol의 저해 kinetic은 non-competitive 저해제로 나타났다 ($V_{max} = 2 \mu\text{M}/\text{min}$, $K_m = 0.2 \text{ mM}$, $K_i = 0.04 \text{ mM}$). Non-competitive 저해제는 효소와 기질의 결합을 방해하지는 않지만 반응속도에 영향을 줌으로써 활성을 저해하는 타입이다. 저해제가 활성부위가 아닌 다른 자리에 결합함으로써 효소활성부위의 구조를 변형시켜 기질은 효소의 활성부위에 결합할 수는 있으나 정상적으로 작용하지는 못하게 된다. 따라서 저해제와 기질이 동시에 효소와 결합하는 것으로 효

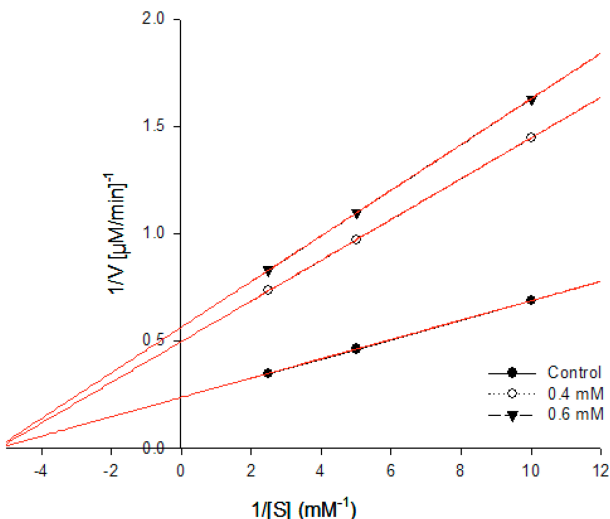


Fig. 3. Lineweaver-Burk plot for the inhibition of the pancreatic lipase by dieckol. The reaction was done in the presence of dieckol [stock concentration of 0 (●), 0.4 (○) and 0.6 mM (▲)].

소기질복합체가 저해제와 결합할 수도 있고 혹은 저해제가 효소와 결합된 상태에서 기질과도 결합이 가능한 형태의 저해제이다. 감태로부터 분리한 dieckol이 tyrosinase저해활성에 대해 저해 기작으로 비경쟁적 저해타입을 가지는 것으로 밝혀졌으며[17], α -glucosidase에 대한 저해 기작 역시 비경쟁적 저해타입을 나타내 본 연구와 유사한 결과를 보였다[28]. 식물이나 해양 조류로부터 분리된 tannin, phlorotannin과 같은 polyphenol 화합물은 complex의 형태로 다양한 단백질과 연관되어 있는 것으로 알려져 있는데 phlorotannin derivative의 hydroxyl group은 inhibitory activity을 촉진시키는데 중요한 역할을 한다. 예를 들어 catechol로부터 유도된 *o*-quinone은 단백질의 amino acid와 thiol group과 공유결합을 하게 된다. 따라서 phlorotannin인 dieckol은 효소의 특이 부위에 결합을 함으로써 ESI복합체를 형성하여 효소의 활성을 저해하여 반응속도를 저하시킨 것으로 사료되어진다[22, 28]. 대황으로부터 분리한 phloroglucinol 유도체가 lipase 저해활성을 가진다고 보고되었으나[11], 저해기작에 대한 연구는 아직 진행되지 않았다. 따라서 대황으로부터 lipase 저해활성을 가진 dieckol 화합물의 분리 및 저해기작 확인은 그 가치가 높을 것으로 판단된다.

요약

대황 ethyl acetate 분획은 IC_{50} 값이 1.31 mg/ml로 에탄올 추출물보다 높은 lipase 저해활성을 나타내었다. Silica-gel column chromatography를 이용하여 ethyl acetate 분획으로부터 얻은 sub-fraction 중 EA1 fraction이 IC_{50} 값 0.54 mg/ml로 가장 높은 저해활성을 보였으며 더 나아가 HPLC를 이용하여 8개의 sub-fraction으로 분리하였다. HPLC fraction 중 fraction 5가 IC_{50} 값 0.37 mg/ml로 높은 lipase 저해활성을 보였다. 이 fraction 5는 분자량 741.1로 $C_{36}H_{22}O_{18}$ 화합물인 phlorotannin derivative dieckol로 확인되었으며 lipase에 대해 비경쟁적 저해타입을 나타내었다. 이상의 결과로, 대황 에탄올 추출물로부터 분리한 dieckol의 lipase 저해 활성 및 저해 타입 확인을 통해 식품 산업에 항비만 소재로서 응용할 수 있을 것으로 사료되어진다.

Acknowledgments

This research was financially supported by a grant from the Ministry of Knowledge and Economy, Korea Institute for Advancement of Technology (KIAT).

References

1. Ahn, M. J., K. D. Yoon, S. Y. Min, J. S. Lee, J. H. Kim, T. G.

- Kim, S. H. Kim, N. K. Kim, H. Huh, and J. W. Kim. 2004. Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase and protease by phlorotannins from the brown alga *Ecklonia cava*. *Biol. Pharm. Bull.* **27**: 544-547.
2. Barwell, C. J., G. Blunden, and P. D. Manandhar. 1989. Isolation and characterization of brown algal polyphenols as inhibitors of α -amylase, lipase and trypsin. *J. Appl. Phycol.* **1**: 319-323.
3. Birari, R. B. and K. K. Bhutani. 2007. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discov. Today* **12**: 879-889.
4. Bitou, N., M. Ninomiya, T. Tsujita, and H. Okuda. 1999. Screening of inhibitors from marine algae. *Lipids* **34**: 441-445.
5. Bray, G. A. and B. M. Popkin. 1998. Dietary fat intake dose affect obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**: 1157-1173.
6. Cahyana, A. H., Y. Shuto, and Y. Kinoshita. 1992. Pyropheophytin a as an antioxidative substance from the marine alga, Arame (*Eisenia bicyclis*). *Biosci. Biotech. Bioch.* **56**: 1533-1535.
7. Chu, M. A. and B. H. Choe. 2010. Obesity and metabolic syndrome among children and adolescents in Korea. *J. Korean Med. Assoc.* **53**: 142-152.
8. Cleland, W. W. 1967. Enzyme Kinetics. *Annu. Rev. Biochem.* **36**: 77-112.
9. Deavile, E. R., R. J. Green, I. Muller-Harvey, I. Willoughby, and R. A. Frazier. 2007. Hydrolyzable tannin structures influence relative globular and random coil protein binding strengths. *J. Agr. Food Chem.* **55**: 4554-4561.
10. Drent, M. L., I. Larsson, T. William-Olsson, F. Quaade, F. Czubayko, K. Von Bergmann, W. Strobel, L. Sjotro, and E. A. Van der Veen. 1995. Orlistat (RO 18-0647), a lipase inhibitor, in the treatment of human obesity: a multiple dose study. *Int. J. Obesity.* **19**: 221-226.
11. Eom, S. H., M. S. Lee, E. W. Lee, Y. M. Kim, and T. H. Kim. 2012. Pancreatic lipase inhibitory activity of phlorotannins isolated from *Eisenia bicyclis*. *Phytother. Res.* DOI: 10.1002/ptr.4696.
12. Gibbons, G. F. and D. Wiggins. 1995. Intracellular triacylglycerol lipase: Its role in the assembly of hepatic very low density lipoprotein (VLDL). *Adv. Enzyme Regul.* **35**: 179-198.
13. Hadvay, P., H. Lengsfeld, and H. Wolter. 1988. Inhibition of pancreatic lipase in vitro by covalent inhibitor tetrahydrolipstatin. *Biochem. J.* **256**: 357-361.
14. Joo, D. S., J. K. Lee, Y. S. Choi, S.Y. Cho, Y. K. Je, and J. W. Choi. 2003. Effect of sea tangle oligosaccharide drink on serum and hepatic lipids in rats fed a hyperlipidemic diet. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **32**: 1364-1369.
15. Kang, K., Y. Park, H. J. Hwang, S. H. Kim, J. G. Lee, and H. C. Shin. 2003. Antioxidative properties of brown algae polyphenolics and their perspectives as chemopreventive agents against vascular risk factors. *Arch. Pharm. Res.* **26**: 286-293.
16. Kang, M. C., Y. J. Lee, R. K. Ko, H. B. Kim, S. H. Hong, and G. O. Kim. 2008. Melanin inhibitory effect and anti-inflammatory effects of *Dietyota coriacea* extracts derived from adjacent sea of the Jeju island. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **23**: 311-316.
17. Kang, S. M., S. J. Heo, K. N. Kim, S. H. Lee, H. M. Yang, A. D. Kim, and Y. J. Jeon. 2012. Molecular docking studies of a phlorotannin, dieckol isolated from *Ecklonia cava* with tyrosinase inhibitory activity. *Bioorgan. Med. Chem.* **20**: 311-316.
18. Kim, D. H., E. H. Lee, J. C. Hwang, J. H. Jeung, D. H. Kim, J. Y. Cheong, S. W. Cho, and Y. B. Kim. 2002. A case of acute cholestatic hepatitis associated with orlistat. *Korean J. Hepatol.* **8**: 317-320.
19. Kim, J. A., J. M. Lee, D. B. Shin, and N. H. Lee. 2004. The antioxidant activity and tyrosinase inhibitory of phlorotannin in *Ecklonia cava*. *Food Sci. Biotechnol.* **13**: 476-480.
20. Kim, J. H., H. J. Kim, C. Y. Kim, H. Y. Jung, Y. O. Kim, J. Y. Ju, and C. S. Shin. 2007. Development of lipase inhibitors from various derivatives of monascus pigment produced by *Monascus* fermentation. *Food Chem.* **101**: 357-364.
21. Kim, K. B. W. R., J. Y. Jung, J. Y. Cho, and D. H. Ahn. 2012. Lipase inhibitory activity of ethyl acetate fraction from *Ecklonia cava* extracts. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **17**: 739-745.
22. Kim, K. Y., K. A. Nama, H. Kurihara, and S. M. Kim. 2008. Potent α -glucosidase inhibitors purified from the red alga *Grateloupia elliptica*. *Phytochemistry* **69**: 2820-2825.
23. Kim, S. A., J. Kim, M. K. Woo, C. S. Kwak, and M. S. Lee. 2005. Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extracts from five kinds of seaweeds. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**: 451-459.
24. Kim, Y. M., C. K. Han, S. J. Bang, and J. H. Park. 2006. Effect of laminaran from *Eisenia bicyclis* on serum lipids in rats fed high cholesterol diet. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **36**: 841-846.
25. Kobayashi, A., T. Osaka, Y. Namba, S. Inoue, T. H. Lee, and S. Kimura. 1998. Capsaicin activates heat loss and heat production simultaneously and independently in rats. *Am. J. Physiol.* **275**: 92-98.
26. Kong, C. S., Y. R. Um, J. I. Lee, Y. A. Kim, J. S. Lee, and Y. W. Seo. 2008. Inhibition effects of extracts and its solvent fractions isolated from *Limonium tetragonum* on growth of human cancer cells. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **23**: 177-182.
27. Lee, H. O., D. S. Kim, J. R. Do, and Y. S. Ko. 1999. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of algae. *J. Korean Fish Soc.* **32**: 427-431.
28. Lee, S. H., Y. Li, F. Karadeniz, M. M. Kim, and S. K. Kim. 2009. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of phloroglucinal derivatives from edible marine brown alga, *Ecklonia cava*. *J. Sci. Food Agric.* **89**: 1552-1558.
29. Mattes, R. D. and L. Bormann. 2000. Effects of hydroxycitric acid on appetitive variables. *Physiol. Behav.* **71**: 87-94.
30. Moon, H. E., M. N. Islam, B. R. Ahn, S. S. Chowdhury, H. S. Sohn, H. A. Jung, and J. S. Choi. 2011. Protein tyrosine phosphatase 1B and α -glucosidase inhibitory phlorotannins from edible brown algae, *Ecklonia stolonifera* and *Eisenia bicyclis*.

- Biosci. Biotech. Bioch.* **75**: 1472-1480.
31. Nakamura, T., K. Nagayama, K. Uchida, and R. Tanaka. 1996. Antioxidant activity of phlorotannins isolated from the brown alga *Eisenia bicylis*. *Fisheries Sci.* **62**: 923-926.
 32. Pi-Sunyer, F. X. 1991. Health implications of obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* **5**: 1595S-1603S.
 33. Prpkins, B. M. and C. M. Doak. 1998. The obesity prevalence is a worldwide phenomenon. *Nutr. Rev.* **56**: 104-114.
 34. Sugiura, Y., K. Matsuda, Y. Yamada, M. Nishikawa, K. Shioya, H. Katsuzaki, K. Imai, and H. Amano. 2006. Isolation of a new anti-allergic phlorotannin, phlorofuocufuroeckol-B, from an edible brown alga, *Eisenia arborea*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **70**: 2807-2811.
 35. Westerterp-Plantenga, M. S., A. Smeets, and M. P. G. Lejeune. 2005. Sensory and gastrointestinal satiety effects of capsaicin on food intake. *Int. J. Obesity*. **29**: 682-688.
 36. Witvrouw, M. and E. De Clercq. 1997. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *Gen. Pharmacol.* **29**: 497-511.