

# 매생이 유래 올리고당의 추출 분리 및 Angiotensin I Converting Enzyme 저해능 분석

김현우, 이중헌\*

## Analysis of Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Activity of Oligosacchride Extracted from *Capsosiphon fulvescens*

Hyun-Woo Kim and Jung-Heon Lee\*

접수: 2013년 3월 26일 / 게재승인: 2013년 4월 26일  
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** The hydrolysates prepared with various enzyme digestion of *Capsosiphon fulvescens* were used to measure the inhibitory effects against angiotensin I converting enzyme (ACE). The commercially available enzymes such as Cellulast, Viscozyme, Lysing enzyme, Flavourzyme, Alcalase and Pectinex were used to digest *C. fulvescens* and produce hydrolysates. The maximum ACE inhibitory activity was observed using Alcalase hydrolysis (72.9%). The optimal conditions of Alcalase extraction were pH 8.0 and extraction time for 12 hr. The hydrolysates were fractionated using preparative-LC and anion-exchange chromatography on DEAE-cellulose and the fraction B and B-2 were isolated. The ACE inhibitory activity of fraction B-2 by anion-exchange chromatography was 82.6%. The molecular weight of fraction B-2 estimated using size exclusion chromatography was about 1 kDa. The monosaccharide composition of the fraction B-2 was determined to be mannose (1.1%), glucuronic acid (1.3%), galactose (1.3%) and glucose (96.3%).

**Keywords:** *Capsosiphon fulvescens*, ACE Inhibition, Hypertension, Enzyme Hydrolysate

### 1. 서론

고혈압 (Hypertension)은 성인의 15~20%에 달하며 동맥경화, 뇌졸중, 심근경색 및 당뇨병 등 심각한 만성 질병을 유발한다. 고혈압과 연관되는 angiotensin converting enzyme (ACE)는 10개의 아미노산으로 이루어진 angiotensin I의 C말단의 dipeptide (His-Leu)를 절단하여 8개의 펩타이드를 가진 강력한 혈관 수축물질인 angiotensin II가 생성된다. 이렇게 생성된 angiotensin II는 동맥혈관을 수축시키고 혈압을 상승시켜, 아드레날린에서의 aldosterone의 분비를 촉진하여 신장의 sodium 및 수분의 재흡수를 증가시키는 역할을 한다. 또한 ACE는 혈관확장, 장의 운동성 증대 등의 작용을 가진 bradykinin을 분해하여 불활성화시킴으로서 결과적으로 혈압을 상승시키는 역할을 한다 [1,2]. 대표적인 ACE 저해제로 화학합성제인 에날라프릴 (enalapril)이 개발되어 현재 고혈압 치료제로 사용중이나 두통, 안면홍조, 식욕부진, 백혈구 감소 등의 부작용이 많다. 따라서 최근 부작용이 없는 천연물유래 ACE 저해제의 개발이 중요시되고 있다 [3].

해양생물에는 육상자원과는 다르게 특유의 대사양식을 지니고 있어 새로운 생리활성 물질을 함유하고 있으며, 다당류와 미네랄 및 비타민이 풍부하게 함유하고 있어 식·의약용으로 이용되어 왔다. 최근에는 해양생물의 새로운 생리활성 물질들이 탐색되고 있으며, 항산화, 항바이러스, 항혈액응고, 항암활성 등의 생리활성을 갖는 것으로 보고되고 있다 [4-7].

매생이 (*Capsosiphon fulvescens*)는 갈파래목 갈파래과에 속하는 녹조식물로 전 세계에 분포하고 있으며 한국의 남해안 일대에 서식하고, 탄수화물, 단백질, 무기질, 회분, 비타민

조선대학교 생명화학공학과  
Department of Chemical & Biochemical Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea  
Tel: +82-62-230-7159, Fax: +82-62-230-7259  
e-mail: leejh@chosun.ac.kr

을 풍부하게 함유하고 있으며 식용으로 이용되고 있다 [8-10]. 매생이는 11월 중순부터 4-5월까지만 번식하며 환경오염에 민감한 해조류로 오염물질에 의해 생육이 저하되고 보관도 용이하지 않아 전국적인 공급이 어려워 대부분 생산지역에서 소비되고 있다 [11-13].

해조류에서 유용성분을 추출하기 위하여 여러 가지 방법이 시도되고 있는데, 대부분이 물리적인 조작이나 화학물질을 이용한 산분해를 하기 때문에 제조에 많은 비용과 안전성이 문제가 되고 있다. 한편 생분해 또는 가수분해에 대한 기술개발도 시도되고 있다. 따라서 효소를 이용하여 가수분해 또는 저분자화시켜 물성을 개량하면 다양한 용도로 이용성이 크게 확대될 것으로 예상된다 [14,15].

본 연구에서는 기존의 열수 및 유기용매 추출방법보다 효과적인 효소를 이용한 추출물로부터 ACE 저해활성을 조사하여 매생이가 기능성 소재로서의 활용 가능성을 확인하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험 재료

실험에 사용된 매생이는 전라남도 장흥 및 강진군 일대에서 생산된 것으로 깨끗이 씻은 후 동결 건조(SFDSM06, SAM-WON)하여 분쇄기(FM-681(C), HANIL)로 분쇄한 후 200 mesh 이하의 것을 시료로 사용하였다.

### 2.2. 산, 알칼리, 열수 및 유기용매 추출물의 제조

산, 알칼리 추출물은 매생이 분말 200 mg에 0.1 N HCl (0.1 M NaOH)를 20 ml 첨가하여 150 rpm, 실온에서 12시간 추출하고 중화시켜 여과지 (Whatman NO.2)를 이용하여 잔류물을 제거하고 여액은 동결 건조하여 시료로 사용하였으며 열수 추출은 냉각장치가 포함된 환류추출장치를 이용하여 100°C에서 6시간 추출하였으며, 유기용매 추출은 매생이 분말 2 g에 70% 에탄올을 200 ml 첨가하여 실온에서 3시간 추출하고 여과하여 여액만을 취하고 여기에 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol을 순차적으로 첨가하여 분획 추출하고 각각의 가용부를 동결 건조하여 시료로 사용하였다.

### 2.3. 효소 가수분해물 제조

당 분해효소 (Viscozyme, Celluclast, Pectinex, Lysing enzyme)와 단백질 분해효소 (Alcalase, Flavourzyme)를 사용한 효소

는 Table 1의 조건으로 가수분해하였다. 동결 건조 후 분말화한 매생이 1 g을 각각의 완충용액 100 ml와 혼합한 후 100  $\mu$ l의 효소를 첨가하여 150 rpm, 50°C에서 12시간 동안 가수분해하였다. 효소를 불활성화하기 위해 100°C에서 15분간 가열하여 원심분리기 (Mega 17R, Hanil CO. Korea)로 15,600 $\times$ g에서 20분간 원심분리하고 잔사를 제거한 상등액을 취하여 동결 건조한 후 분리용 시료로 사용하였다.

### 2.4. 최적 추출조건 측정

매생이로부터 ACE 저해능을 갖는 올리고당을 추출하기 위해 사용된 Alcalase 효소의 pH 및 추출시간에 따른 최적 추출조건을 측정하였다. 사용된 완충용액은 0.1 M sodium acetate pH 5.0, 0.1 M sodium phosphate pH 6.0~8.0을 사용하였으며 추출시간은 1, 6, 12시간 반응시켰다. 효소를 불활성화하기 위해 100°C에서 15분간 가열하여 원심분리기로 15,600 $\times$ g에서 20분간 원심분리하고 잔사를 제거한 상등액을 취하여 ACE 저해활성을 측정하였다.

### 2.5. 분취용 크로마토그래피를 이용한 올리고당 분리

매생이 유래 올리고당 분리를 위해 분취용 크로마토그래피 (LC-9104, JAI, Japan)를 이용하여 분리하였다. 즉, 효소 추출물 1 g를 증류수에 용해한 후 분취용 칼럼 W-252와 W-253 (20 $\times$ 500 mm)에 10 ml 주입하고 유속 3.5 ml/min으로 용출시킨 후 RI (Refractive index) 검출기로 peak를 분석하였으며 주요 peak는 fraction collector (JAI, Japan)를 이용하여 분획하고 동결 건조하였다.

### 2.6. Anion exchange chromatography를 이용한 올리고당 분리

분취용 크로마토그래피로 분리한 시료 10 mg를 증류수에 용해시킨 후 증류수로 평형화된 DEAE-cellulose (1.6 $\times$ 20 cm) 칼럼에 흡착시키고 0~3.0 M NaCl 용액을 단계적으로 0.8 ml/min으로 용출시키고 fraction collector를 이용하여 분획한 후 phenol-sulfuric acid법으로 당의 농도를 계산하였다 [16].

### 2.7. HPLC에 의한 분자량 측정

매생이 유래 올리고당의 분자량은 HPLC (Shimadzu, Japan)를 이용하여 측정하였다. HPLC 분석 조건은 칼럼 Suprema 1,000 Å (8 $\times$ 300 mm, PSS, U.S.A.)을 사용하여 0.05% NaN<sub>3</sub> 용액으로 1.0 ml/min으로 용출시켰으며 RI 검출기로 분석하였다. 상대적인 분자량을 측정하기 위하여 표준물질로 Dextran

**Table 1.** Optimum hydrolytic conditions of particular enzyme

Enzyme	Buffer	pH	Temperature (°C)	Enzyme characteristics
Celluclast	0.1 M sodium acetate	4.5	50	cellulase
Viscozyme	0.1 M sodium acetate	4.5	50	arabanase, cellulase, glucanase, hemi-cellulase, xylanase
Lysing enzyme	0.1 M sodium acetate	4.5	50	glucanase, cellulase, protease, chitinase
Flavourzyme	0.1 M sodium phosphate	7.0	50	endoprotease, exopeptidase
Alcalase	0.1 M sodium phosphate	8.0	50	endoprotease
pectinex	0.1 M sodium acetate	5.5	50	polygalacturonase, pectinase

(670, 150, 50, 12, 5, 1 kDa, Sigma, U.S.A.)을 사용하였다.

### 2.8. 구성당 성분분석

ACE 저해 활성을 보인 분획에 2.0 M TFA를 처리하여 120°C에서 6시간 처리 후 중화시키고, 원심분리하고 상등액 60 µl와 75 µl의 PMP 용액 (0.5 M PMP in methanol)과 15 µl의 NaOH 용액 (1.5 M NaOH)를 섞어 70°C에서 2시간 반응을 시켰다. 반응 혼합물을 50 µl의 0.5 M HCl로 중화시킨 후 chloroform을 넣어 상등액을 여러 번 분리하고 상등액을 증류수에 일정량 희석하여 HPLC로 분석하였다. HPLC 분석 조건은 칼럼 Eclipse XDB-C<sub>8</sub> (4.6×150 mm)을 사용하여 20 mM ammonium acetate (pH 4.5)와 acetonitrile의 용매로 1.0 ml/min으로 용출하고 흡광도 254 nm에서 peak를 분석하였다. 여러 가지 표준 당 (mannose, glucuronic acid, rhamnose, glucose, galactose, arabinose, xylose, fucose)을 활용하여 PMP-Labeling하여 구성당을 분석하였다.

### 2.9. ACE 저해 활성 측정

ACE 저해활성 측정은 HHL (Hippuryl-His-Leu)로부터 유리되는 HA (Hippuric acid)만을 HPLC (Shimadzu, Japan)로 분리하여 측정하였다. 즉, 0.1 M sodium borate buffer (pH 8.3) 50 µl에 2.5 mM HHL 150 µl와 시료용액 (10 mg/ml) 50 µl를 가하여 교반한 후 37°C에서 10분간 pre-incubation한다. 여기에 ACE (100 mU) 50 µl를 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 1 N HCl 200 µl를 가하여 반응을 중지시켰다. 대조구는 시료 대신 증류수를 사용하였다. 반응액은 0.2 µm syringe filter로 필터링하여 분석용 칼럼 (Xterra RP 15 (4.6×100 mm), Waters, U.S.A.)으로 분석하였으며, 용매는 0.05% TFA (Trifluoroacetic acid)를 함유한 증류수와 0.05% TFA를 함유한 Acetonitrile의 조성을 변화시켜 흡광도 228 nm에서 분석하였다. ACE 저해 활성은 대조구의 HA peak 면적 값과 시료의 peak 면적 값의 차이를 백분율로 계산하였다.

### 2.10. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 측정하였고, 얻어진 실험결과는 SPSS (ver. 12.0)프로그램을 이용하여 one-way ANOVA를 실시하였고 다 군간의 차이는  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test로 검증하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 추출 수율

매생이로부터 유용성분을 추출하기 위해 다양한 용매 및 추출법으로 추출한 결과 산, 알칼리 및 열수 추출물의 수율은 각각 32.1, 22.7, 27.8% (w/w)로 나타났으며, 유기용매 추출물의 수율은 에탄올 추출물이 10.8% (w/w)로 나타났으며 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 용매 분획한 결과 각각 5.3, 1.4, 0.72, 3.1% (w/w)의 수율을 보였다. 또한 Visco-

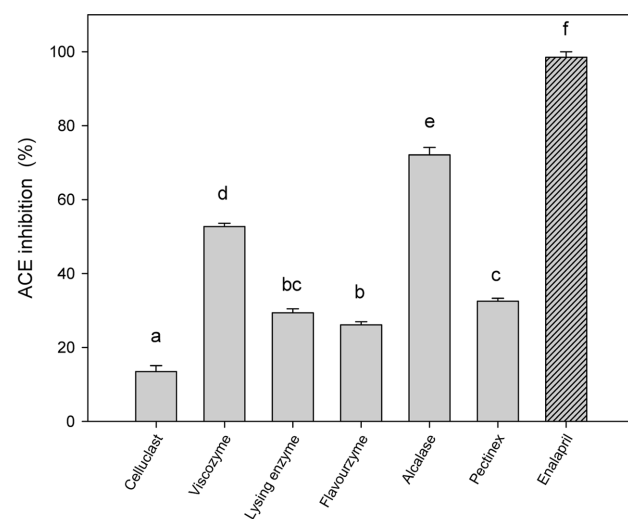
zyme, Celluclast, Pectinex, Lysing enzyme, Alcalase, Flavourzyme를 이용한 추출물의 수율은 각각 44.3, 38.3, 31.2, 28.9, 42.0, 36.5% (w/w)로 나타났다. Viscozyme와 Alcalase 추출물에서 가장 높은 수율을 보였다.

### 3.2. 매생이 추출물의 ACE 저해활성

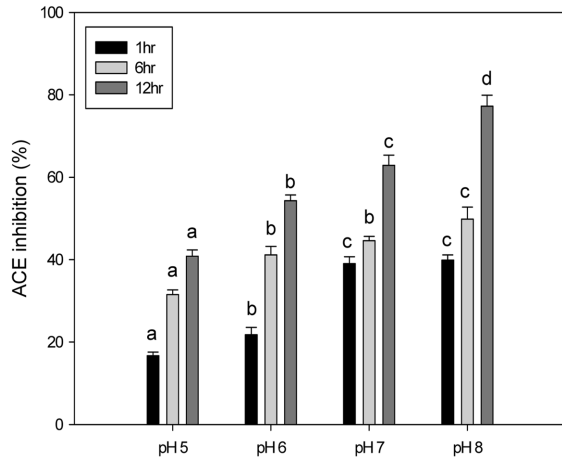
매생이로부터 다양한 용매로 추출된 추출물의 ACE 저해 활성을 측정된 결과 산, 알칼리, 열수 추출물의 ACE저해 활성은 각각 27.7, 10.2, 22.1%로 나타났으며 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 분획물은 각각 8.2, 0.2, 11.4, 6.5%로 나타났다. 이는 ACE 저해능을 보이는 성분들은 기존의 추출방법으로는 한계가 있음을 알 수 있다. 매생이 효소 추출물에서는 Viscozyme 추출물과 Alcalase 추출물에서 50% 이상의 ACE 저해 활성을 보였으며, 특히 Alcalase 처리 시 70% 이상의 저해 활성을 보였다. 이는 Kim 등 [17]이 연구한 김 단백질 가수분해물의 ACE 저해 활성 결과와 비교하면 김에 Alcalase 처리 시 ACE 저해활성이 43.6%를 보여 본 연구에 비해 낮은 수치를 보였으며, 또한 Lee 등 [18]이 연구한 해조류 효소가수분해물의 ACE 저해 활성과 비교하면 쇠미역, 김, 파래, 지아누리에 pepsin 처리하여 ACE 저해 활성을 측정된 결과 20%의 낮은 결과를 보였다. 그에 비해 본 연구의 매생이 효소가수분해물의 ACE 저해활성은 70% 이상의 높은 저해 활성을 보였다. 이는 매생이 유래 다양한 분자량의 올리고당에 의한 것으로 사료된다 (Fig. 1).

### 3.3. 최적 추출조건 측정

다른 효소에 비해 높은 ACE 저해능을 보인 Alcalase 추출의 최적 조건 (pH, 추출시간)을 측정된 결과 pH 8.0에서 가장 높은 ACE 저해활성을 보였으며 반응시간이 증가할수록 높은



**Fig. 1.** Inhibitory activity of *Capsosiphon fulvescens* extracts (10 mg/ml) on angiotensin I converting enzyme (ACE) activity. Enalapril (20 µg/ml) is an inhibitor of ACE. Data represents the mean values of three replicates. Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

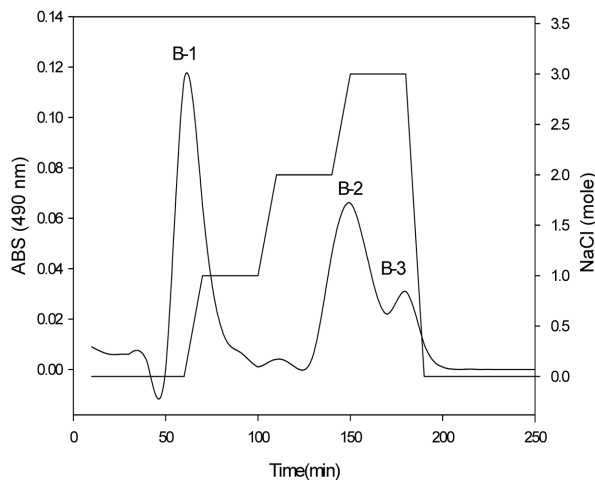


**Fig. 2.** The optimal conditions of ACE inhibitory activities for the various pHs and digestion times. Data represents the mean values of three replicates. Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

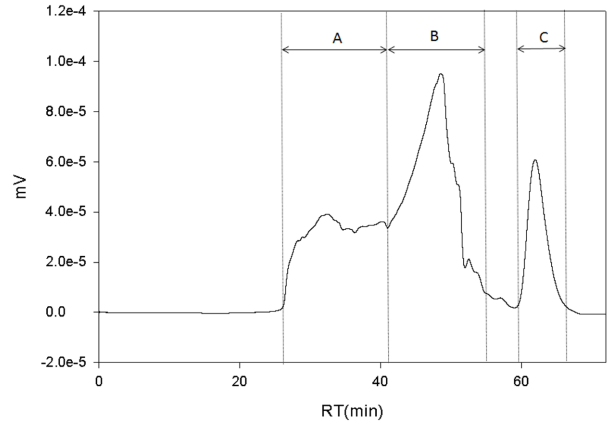
ACE 저해 활성을 보여, Alcalase 효소 처리시 pH 8.0과 반응 시간 12시간이 최적조건으로 나타났다 (Fig. 2).

**3.4. 매생이 유래 올리고당 분리**

높은 ACE 저해 활성 보인 Alcalase 추출물을 prep-LC를 통해 분리하였다. 유속 3.5 ml/min으로 용출시켰으며 RI (Refractive index) 검출기로 peak를 분석하였다. 그 결과 3개의 주요 peak를 얻었으며 (Fig. 3), 그중 ACE 저해활성을 보인 B 분획을 DEAE-cellulose 칼럼으로 분리한 결과 3개의 주요 peak를 얻었으며 (Fig. 4), 그 분획의 ACE 저해활성을 측정된 결과 B 분획에서 78.3%의 ACE 저해활성을 보였으며, B-2분획에서는 82.6%의 ACE 저해활성을 보였다 (Fig. 5). 이는 pepsin 처리한 김 분획의 ACE 저해활성을 측정된 Kim 등 [17]의 연구



**Fig. 4.** Anion exchange chromatogram of Alcalase extract B. Fraction B isolated from Prep-LC was separated using anion exchange column (1.6×20 mm) equilibrated with distilled water and then gradient eluted with 0~3.0 M NaCl.



**Fig. 3.** Preparative-LC chromatogram of *C. fulvescens* extract using Alcalase. An extract (1 g) was applied to a W-252 and W-253 column (20×500 mm) equilibrated in distilled water.

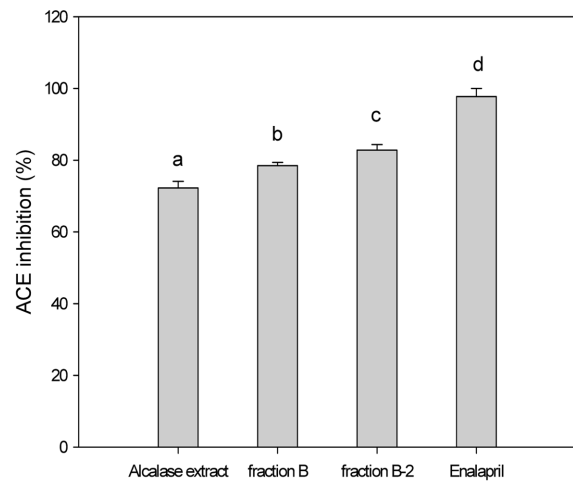
중 3 kDa 이하의 저분자 분획에서 60.8%의 ACE 저해활성을 보여 본연구와 유사한 결과를 보였다.

**3.5. 올리고당의 분자량 측정**

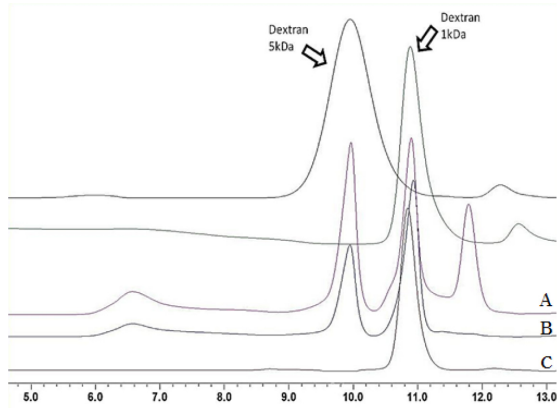
Alcalase 추출물은 4개의 peak를 보였으며 각각 약 730 kDa, 8 kDa, 1 kDa, 180 Da 등의 분자량 분포를 나타내었다. prep-LC로 분리한 분획 B의 분자량 측정 시 약 8 kDa, 1 kDa 등의 분자량 분포를 보였으며, DEAE-cellulose 칼럼으로 분리한 B-2 분획은 약 1 kDa의 분자량을 보였다. 이는 ACE 저해활성을 보인 B-2 분획은 약 1 kDa의 분자량을 갖는 올리고당인 것으로 나타났다 (Fig. 6).

**3.6. 구성당 성분분석**

Alcalase 추출물의 구성당의 조성은 mannose 21.5%, glucuro-

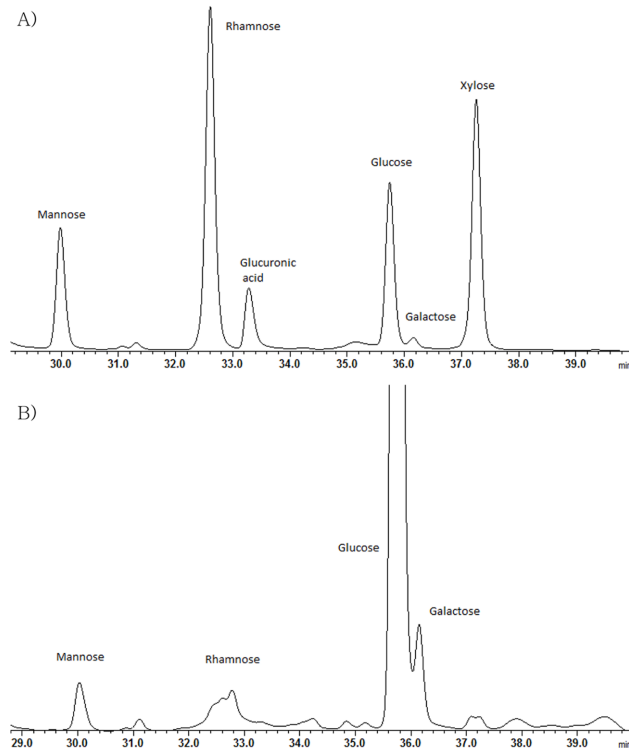


**Fig. 5.** Inhibitory activity of Alcalase extracts, fraction B and fraction B-2 on angiotensin I converting enzyme(ACE) activity. Enalapril (20 ug/ml) is an inhibitor of ACE. Data represents the mean values of three replicates. Means with the different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



**Fig. 6.** High performance size exclusion chromatograms (Suprema 1,000 column, flow rate 1.0 ml/min) of Alcalase extract (A), fraction B by prep-LC (B) and fraction B-2 on DEAE-cellulose (C). Arrows indicate the positions of elution of molecular weight standards (Dextran).

nic acid 6.9%, rhamnose 23.0%, glucose 23.5%, xylose 25.1% 으로 함유되었으며, prep-LC와 DEAE-cellulose 칼럼을 통해 분리한 분획 B-2의 구성당 조성은 mannose 1.1%, glucuronic acid 1.3%, galactose 1.3%, glucose 96.3%로 함유되어 있어 glucose를 주성분으로 이루어진 올리고당인 것으로 보인다 (Fig. 7). 이는 갈조류의 저장성 다당류인 라미나란(Laminaran)과 유사한 구조를 가질 것으로 보인다. 라미나란은 glucose가  $\beta$ -1,3 결합을 이루며 소수의  $\beta$ -1,6 결합을 가진다



**Fig. 7.** HPLC chromatogram to determine monosaccharide compositions. Alcalase extract (A) and fraction B-2 (B).

[19]. 본 연구에서 추출 분리한 올리고당은 glucose의 5~7개 정도 연결된 저분자의 라미나란으로 예상되나 정확한 성분을 분석하기 위해서는 추가적으로 연구가 진행되어야 할 것으로 보인다.

**4. 결론**

친환경적인 효소 추출방법을 이용하여 매생이 유래 올리고당을 prep-LC와 Anion exchange 크로마토그래피로 분리하고 그 분획의 ACE 저해활성을 알아보았다. Alcalase 추출물에서 72.9%의 ACE 저해활성을 보였으며 Alcalase 효소 추출방법의 최적 조건 (pH, 추출시간)을 측정한 결과 pH 8.0 및 추출시간 12시간에서 최적 조건으로 나타났다. 이를 prep-LC와 DEAE-cellulose 칼럼으로 분리하여 분자량 약 1 kDa의 올리고당 분획을 얻었으며, 분획 B-2의 ACE 저해활성은 82.6%로 높은 활성을 보였다. 분획 B-2의 구성당 조성은 mannose 1.1%, glucuronic acid 1.3%, galactose 1.3%, glucose 96.3%로 나타났다. 이를 통해 매생이 유래 올리고당의 기능성 소재로서의 개발 가능성을 보였으며 분리정제 및 구조 분석등의 연구가 진행되어야 할 것으로 여겨진다.

**REFERENCES**

1. Kannel, W. B., T. R. Dawber, and P. Sorlic (1976) Components of blood pressure and risk of atherothrombotic brain infarction. *Stroke* 7: 327-331.
2. Kirkendall, W. M. and G. A. Nottebohm (1977) *Hypertension physiopathology and treatment*. pp. 674-692. In Essential Hypertension. McGraw-Hill, New-York, USA.
3. Hong, J. H., B. S. Son, B. K. Kim, H. Y. Chee, K. S. Song, B. H. Lee, H. C. Shin, and K. B. Lee (2006) Antihypertensive effect of *Ecklonia cava* extract. *Korean J. Pharmacogn.* 37: 200-205.
4. Ebihara, K. and S. Kiritama (1990) Physiochemical property and physiological function of dietary fiber. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 37: 916-925.
5. Kim, K. S. and G. J. Kim (1998) Effects of the feeding *Hijikia fusiforme* (Harvey) Okamura on lipid composition of serum in dietary hyperlipidemic rats. *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.* 27: 718-723.
6. Noda, H., H. Amano, K. Arashima, and K. Nisizawa (1990) Antitumor activity of marine algae. *Hydrobiologia* 204/205: 577-584.
7. Collic, S., A. M. Fischer, B. J. Tapon, C. Boisson, P. Durand, and J. Jozefonvicz (1991) Anticoagulant properties of a fucoidan fraction. *Thromb. Res.* 64: 143-154.
8. Jung, K. J., C. H. Jung, J. H. Pyeun, and Y. J. Choi (2005) Changes of food components in Mesangi (*Capsosiphon fulvecense*), Gashiparae (*Enteromorpha prolifera*), and Cheonggak (*Codium fragile*) depending on harvest times. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34: 687-693.
9. Kwon, M. J. and T. J. Nam (2006) Effects of Mesangi (*Capsosiphon fulvecens*) power on lipid metabolism in high cholesterol fed

- rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 35: 530-535.
10. Jeong, K. S. and N. G. Lee (2010) A study on physiological activity and antioxidative activity of Maesangi (*Capsosiphon fulvescens*) extract. *J. Environmental Sci.* 19: 407-414.
  11. Cho, M., I. J. Kang, M. H. Won, H. S. Lee, and S. You (2010) The antioxidant properties of ethanol extracts and their solvent-partitioned fractions from various green seaweeds. *J. Med. Food.* 13: 1232-1239
  12. Kim, M. H., Y. T. Chung, J. H. Lee, Y. S. Park, M. K. Shin, H. S. Kim, D. H. Kim, and H. Y. Lee (2000) Hepatic detoxification activity and reduction of serum alcohol concentration of *Hovenia dulcis* T<sub>HUNB</sub> from Korea and China. *Korean J. Medicinal Crop. Sci.* 8: 225-233.
  13. Lee, J. H., Y. M. Lee, J. J. Lee, and M. Y. Lee (2006) Effects of *Capsosiphon fulvescens* extract on lipid metabolism in rats fed high cholesterol diet. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 35: 402-409.
  14. Na, Y. S., W. J. Kim, S. M. Kim, J. K. Park, S. M. Lee, S. O. Kim, A. Synytsya, and Y. I. Park (2010) Purification, characterization and immunostimulating activity of water soluble polysaccharide isolated from *Capsosiphon fulvescens*. *Int. Immunopharmacol.* 10: 364-370.
  15. Yang, H. C., K. M. Jung, K. S. Gang, B. J. Song, H. C. Lim, H. S. Na, H. Mun, and N. C. Heo (2005) Physicochemical composition of seaweed (*Capsosiphon fulvescens*). *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 912-917.
  16. Dubois, M., K. A. Gills, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith (1956) Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
  17. Kim, Y. M., J. R. Do, J. P. In, and J. H. Park (2005) Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of laver (*Porphyra tenera*) protein hydrolysates. *Korean J. Food Nutr.* 18: 11-18.
  18. Lee, J. M., S. G. You, and S. M. Kim (2005) Functional activities of low molecular weight peptides purified from enzymatic hydrolysates of seaweeds. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34: 1124-1129.
  19. Painter, T. J. (1983) *Algal polysaccharide*. p. 195-285. In: Aspinnall GO, ed. *The polysaccharides*. Academic Press, New York, USA.