

# 효소 가수분해를 통한 매생이 유래 $\beta$ -Glucan 형태의 Oligomer 생산 및 분석

김현우, 이중헌\*

## Production and Characterization of $\beta$ -Glucan Type Oligomer Produced with Enzymatic Hydrolysis of *Capsosiphon fulvescens*

Hyun-Woo Kim and Jung-Heon Lee\*

접수: 2013년 3월 26일 / 게재승인: 2013년 4월 30일  
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:**  $\beta$ -Glucan type oligomers which have angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity were isolated and characterized from *Capsosiphon fulvescens*. After *C. fulvescens* was hydrolysis with Alcalase at 50°C, supernatant was harvested and separated with ultrafiltration membrane (MWCO 2 kDa). Oligomers which were less than 2 kDa of molecular weight were harvested for characterization. The nutrient composition of Alcalase hydrolysate was 89.9% carbohydrate, 4.2% protein and 5.9% sulfate. After ultrafiltration, the nutrient composition of oligomers was changed to 99.88% carbohydrate, 0.07% protein and 0.05% sulfate. The carbohydrate composition of oligomer was glucose (97.2%) and mannose (1.5%). The ACE inhibitory activities of Alcalase hydrolysate and oligomer were 72.1% and 82%, respectively. The molecular weight of oligomer was about 1 kDa. The oligomer was analyzed with FT-IR, <sup>1</sup>H-NMR and methylation. The oligomers were  $\beta$ -1,3-glucans with  $\beta$ -(1,3)-linked glucose units.

**Keywords:** *Capsosiphon fulvescens*,  $\beta$ -glucan, Hypertension, Oligomers

### 1. 서론

해조류는 육상식물에 비해 구성성분이 다르며, 풍부한 다당류, 미네랄 및 비타민이 다량 함유되어 있고 항암, 항산화, 항균 및 항바이러스에 활성이 있으며, 심근경색, 동맥경화 및 고혈압 등의 예방 효과도 있는 것으로 보고되고 있다 [1-4].

매생이 (*Capsosiphon fulvescens* 별명: 매산, 매산테)는 녹조 식물 문 (Chlorophyta) 갈파래 과에 속하고 전 세계에 분포하며 한국에서는 남해안 청정해역의 조간대 상부바위에서 서식한다. 매년 12월에서 2월까지만 생산되는 식품으로서 특유한 향기와 맛을 지니고 있어 오래 전부터 식용으로 애용되어 왔다. 매생이는 콜레스테롤을 저하하고 고혈압도 효과적으로 예방하는 해조류로 알려져 있어 그 수요량이 늘어나고 있다 [5-7]. 한편 해조류에서 유용성분을 추출하기 위하여 여러 가지 방법이 시도되고 있는데, 대부분이 물리적인 조작이나 화학물질을 이용한 산 분해를 하기 때문에 제조에 많은 비용과 안전성이 문제가 되고 있다. 한편 생분해 또는 가수분해에 대한 기술개발도 시도되고 있다. 따라서 효소를 이용하여 가수분해 또는 저분자화하여 물성을 개량하면 다양한 용도로 이용성이 크게 확대될 것으로 예상된다.

최근 미생물을 이용하여 매생이를 분해하는 연구결과가 보고되고 있으며 추출된 물질은 복합 다당류로 알려져 있다. 효소를 이용하여 매생이를 가수분해시켜 다당류를 제조하면 산업적인 활용도가 크게 증가할 것으로 예상된다 [8,9]. 해조류 유래 다당류의 일종인  $\beta$ -glucan은 glucose 단위체가 1→3 위치에  $\beta$ -glycoside 결합으로 연결된 기본 골격을 가지며 추출하는 방법에 따라 구조적인 차이와 물리·화학적 성

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

질이 달라지는 것으로 알려져 있다.  $\beta$ -Glucan은 암세포를 직접 공격하지 않고 비 특이적 면역반응으로 인간의 정상 세포의 면역기능을 활성화시켜 암세포의 증식과 재발을 억제하며, 대식세포를 활성화시켜 암세포가 있는 체내로 들어가 여러 가지 cytokine의 분비를 촉진시킴으로써 면역세포인 T세포와 B세포의 면역기능을 활성화시켜준다. 또한 혈당강화 및 혈중 콜레스테롤 감소 효과가 우수하며, 지질대사를 개선하여 체지방 형성과 축적을 억제함으로써 항비만 효과를 가지고 있는 것으로 보고되고 있다 [10-12].

최근 매생이 추출물의 생리활성 효과에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔으나 [13-15], 추출물에 성분에 대한 체계적인 물질규명이 이루어지지 않고 있다. 본 연구에서는 효소를 이용하여 매생이를 가수분해하여 상등액에 함유되어 있는 다당류를 ultrafiltration membrane으로 분리하고 HPLC, FT-IR,  $^1\text{H-NMR}$ 와 화학적인 methylation 방법을 사용하여 분리된 다당류의 분자량 및 구조를 분석하고자 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, SAMWON)하여 분쇄기 (FM-681(C), HANIL)로 분쇄한 후 200 mesh 이하의 것을 시료로 사용하였다.

### 2.2. 효소 추출물 제조

효소 추출물 제조는 단백질 분해효소 (Alcalase, Novozyme, Denmark)를 사용하여 효소 추출물을 제조하였다 [16]. 동결 건조 후 분말화한 매생이 1 g을 0.1 M sodium phosphate (pH 8.0) 용액 100 mL와 혼합한 후 100  $\mu\text{L}$ 의 Alcalase를 첨가하여 150 rpm에서 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 동결건조 후 분리용 시료로 사용하였다.

### 2.3. ACE 저해 활성 측정

ACE 저해활성 측정은 HHL (hippuryl-His-Leu)로부터 유리되는 HA (hippuric acid)만을 HPLC (Shimadzu, Japan)로 분리하여 측정하였다. 0.1 M sodium borate buffer (pH 8.3) 50  $\mu\text{L}$ 에 2.5 mM HHL 150  $\mu\text{L}$ 와 시료용액 (10 mg/mL) 50  $\mu\text{L}$ 를 가하여 교반한 후 37°C에서 10분간 pre-incubation한다. 여기에 ACE (100 mU) 50  $\mu\text{L}$ 를 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 1 N HCl 200  $\mu\text{L}$ 를 가하여 반응을 중지시켰다. 대조구는 시료대신 증류수를 사용하였다. 반응액은 0.2  $\mu\text{m}$  syringe filter로 필터링하여 분석용 칼럼 (Xterra RP 15 (4.6 $\times$ 100 mm), Waters, USA)으로 분석하였으며, 용매는 0.05% TFA (trifluoroacetic acid)를 함유한 증류수와 0.05% TFA를 함유한 Ace-

tonitrile의 조성을 변화시켜 흡광도 228 nm에서 분석하였다. ACE 저해 활성은 대조구의 HA peak 면적 값과 시료의 peak 면적 값의 차이를 백분율로 계산하였다.

### 2.4. 한외여과막 시스템을 이용한 분리

효소 추출물을 분리하기 위해 한외여과막 시스템 (Hydrosart, MWCO 2,000 Da, Sartorius, Germany)을 이용하여 분리하였다. 효소 불활성화 시킨 추출물을 적당히 증류수에 희석하고 정량펌프 (S600, LAB24, Korea)를 이용하여 유속 400 rpm으로 한외여과막으로 주입하였다. 한외여과막에 걸리는 압력은 outlet pressure valve를 조절하여 일정하게 유지하였으며 2,000 Da 이상의 물질은 저장조 (retentate)에 모여 농축되고, 2,000 Da 이하의 물질은 한외여과막을 통과하여 여과조 (permeate)로 수집하였다. 여과조의 시료는 순도를 높이기 위하여 3회 반복하여 분리하였다. 각각의 분획을 모아 동결 건조 후 시료로 사용하였다 (Fig. 1).

### 2.5. HPLC에 의한 분자량 측정

효소 추출물 및 한외여과 분획의 분자량은 HPLC (Shimadzu)를 이용하여 측정하였다. HPLC 분석 조건은 칼럼 Suprema 1,000 (8 $\times$ 300 mm, PSS, USA)을 사용하여 0.05%  $\text{NaN}_3$  용액으로 1.0 mL/min으로 용출시켰으며 RI (refractive index) 검출기로 분석하였다. 상대적인 분자량을 측정하기 위하여 표준물질로 Dextran (670, 150, 50, 12, 5 kDa, Sigma, USA)을 사용하였다.

### 2.6. 화학적 조성 분석

효소 추출물 및 한외여과 분획의 총당 함량은 Dubois 등 [17]의 phenol sulfuric acid 법으로 측정하였으며, 단백질 함량은 Bradford [18] 법으로, 황산기의 함량은 Dodgson [19] 방법으로 측정하였다.

### 2.7. 구성당 성분분석

ACE 저해 활성을 보인 분획에 2.0 M TFA를 처리하여 120°C에서 6시간 처리 후 중화시키고  $\text{N}_2$  gas로 건조하여 pyridine 0.5 mL에 녹여 10 mg의 hydroxylamine hydrochloride를 혼합

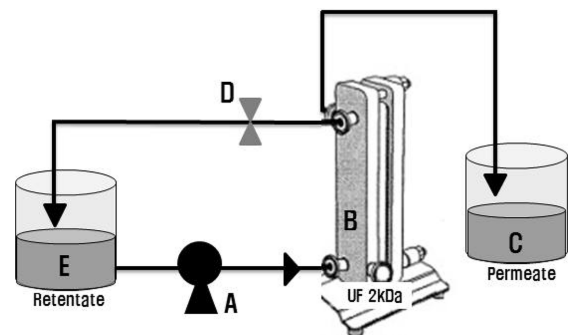


Fig. 1. Flow diagram of ultra filtration membrane process. A; metering pump, B; UF-membrane (MWCO 2 kDa), C; permeate tank, D; pressure control valve, E; retentate tank.

후 90°C에서 30분 반응시킨다. 실온까지 냉각하여 acetic anhydride 0.5 mL을 혼합하여 90°C에서 30분 반응시켜 alditol acetate로 전환하여 gas chromatography (GC-2010, Shimadzu, Japan)로 분석하였다. Alditol acetate 유도체의 GC 분석조건은 칼럼 DB-5MS (60 m×0.25 mm I.D., film thickness 0.25 μm, Agilent)을 사용하였고, 여러 가지 표준 당 (rhamnose, arabinose, fucose, mannose, glucose, galactose)을 활용하여 각 당이 검출되는 시간을 측정하였다.

**2.8. FT-IR 및 NMR 분석**

한외여과막에 의해 분리된 분획의 작용기를 분석하기 위해 시료제조는 KBr법을 사용하였고 시료 약 1 mg과 동량의 KBr 분말을 혼합하여 투명한 정제를 성형하고 적외선 흡수 spectrum을 FT-IR (Win FTS 165, Bio-Rad)을 이용하여 측정하였으며, 구조분석을 위한 <sup>1</sup>H-NMR의 분석은 300 MHz FT-NMR (Unity Plus 300, Varian, U.S.A.)를 이용하여 D<sub>2</sub>O에 녹여 분석하였다.

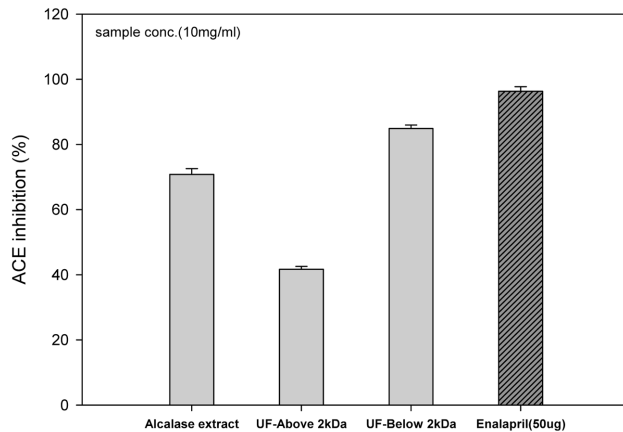
**2.9. Methylation-acetylation 분석**

시료의 결합위치 결정을 위해 methylation하여 GC/MS (GCMS-2010, Shimadzu)로 분석하였다. 동결 건조된 분획 시료에 DMSO를 첨가하여 용해한 후 NaOH 20 mg과 CH<sub>3</sub>I 0.2 mL를 가하여 methylation하였다. Methylation된 시료는 chloroform과 methanol의 혼합용액 (2:1)으로부터 분리하고 2 M TFA로 121°C에서 6시간 가수분해한 후, NaBH<sub>4</sub>로 환원시키고 및 acetyl화 과정을 거쳐 partially methylated alditol acetate로 전환하고 GC/MS로 분석하였다. GC/MS 분석은 DB-5MS 칼럼을 이용하여 분석하였다.

**3. 결과 및 고찰**

**3.1. Alcalase 추출물의 ACE 저해활성**

매생이로부터 유용성분을 추출하기 위해 Alcalase 효소를 이용하여 추출한 결과 42.0% (w/w)의 추출 수율을 보였으며, ACE 저해활성을 측정한 결과 Alcalase 추출물에서 72.1%의 저해활성을 보였다. 이는 Lee 등 [20]이 연구한 해조류 효소 가수분해물의 ACE 저해활성을 측정한 결과와 비교하면 쇠미역, 김, 파래, 지아누리의 pepsin 가수분해물의 ACE 저해활성은 20% 이하 보여 본 연구의 매생이 Alcalase 추출물에 비해 낮은 ACE 저해활성을 보였으며, Kim 등 [21]이 연구한 김 Alcalase 가수분해물의 ACE 저해활성이 43.6%를 보여 본 연구에 비해 낮은 저해활성을 보였다. 또한, Cho 등 [8]이 연구한 매생이 열수 추출물 및 에탄올 추출물의 ACE 저해활성과 비교하면 열수 추출물 33.8%로 본 연구 결과보다 낮은 결과를 보였으며, 에탄올 추출물은 85%로 본 연구 결과와 유사한 결과를 보였으나 에탄올 추출은 유기용매의 사용으로 잔류독성 및 폐수 처리 등의 문제를 가지고 있다. 하지만 본 연구에서 사용한 효소추출법은 친환경적인 추출공정으



**Fig. 2.** Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of Alcalase extract and fraction by UF-membrane from *Capsosiphon fulvescens*. Each value is expressed as mean±standard deviation (n=3).

로 유기용매 추출법보다 경제적이어서 유용성분의 대량 생산 및 산업용 공정에 적용가능하다.

**3.2. 한외여과막로 분리한 분획물의 ACE 저해활성**

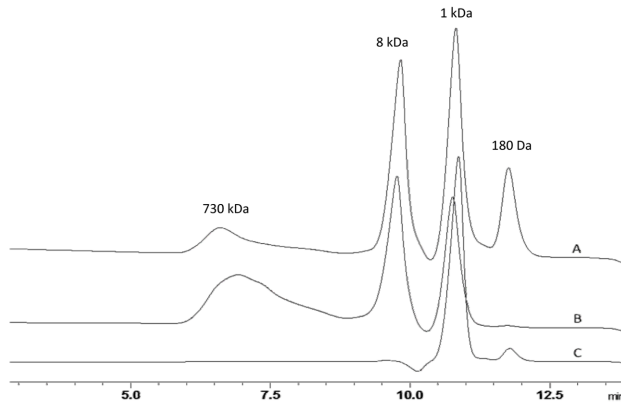
매생이 Alcalase 추출물의 유용성분의 분리를 위하여 한외여과막을 이용하여 분리하였다. 분리된 분획을 동결 건조하여 ACE 저해활성을 측정된 결과, 2 kDa 이상의 분획에서는 40%의 ACE 저해활성을 보였으며 2 kDa 이하의 분획에서는 82%의 높은 ACE 저해활성을 보였다 (Fig. 2). 이는 Kim 등 [21]이 연구한 김 pepsin 가수분해물의 분자량별 ACE 저해활성과 비교하면 3 kDa 이하의 분획에서 60.8%로 본 연구의 2 kDa 이하의 분획보다 낮은 결과를 보였으나 저분자량의 분획에서 ACE 저해활성이 높다는 결과와 유사한 경향을 보였다.

**3.3. 올리고머의 분자량 측정**

매생이 효소 추출물 및 분획물의 분자량은 표준물질인 dextran을 사용하여 상대적인 분자량을 측정하였다. Alcalase 추출물은 4개의 peak를 보였으며 각각 약 730 kDa, 8 kDa, 1 kDa, 180 Da 등의 분자량 분포를 나타내었다 (Fig. 3). 한외여과막 2 kDa 이상 분획의 분자량 측정 시 약 730 kDa, 8 kDa, 1 kDa 등의 분자량 분포를 보였으며, 한외여과막 2 kDa 이하 분획의 분자량은 약 1 kDa의 분자량을 보였으며 2 kDa 이하 분획물은 단위체인 glucose가 5-8개가 결합된 oligomer 형태로 생각된다. 이는 Kim 등 [22]이 대항으로부터 추출한 glucan (12 kDa)보다 작고, Tredwell 등 [23]이 연구한 *K. marxianus*이 생산하는 glucan보다 작은 분자량을 보였다.

**3.4. 화학적 조성 및 구성당 성분분석**

Alcalase 추출물 및 한외여과막 2 kDa 이하 분획물의 화학적 조성을 분석한 결과 Alcalase 추출물은 총당의 함량은 89.9%로 주요 성분이었으며, 단백질이 4.2% 그리고 황산기의 함



**Fig. 3.** High performance size exclusion chromatograms (Suprema 1,000 column, flow rate 1.0 mL/min) of Alcalase extract (A), above 2 kDa fraction by UF-membrane (B) and blow 2 kDa fraction by UF-membrane (C).

량이 5.9%이었다. 이는 Na 등 [24]이 연구한 매생이 열수추출물의 화학적 조성을 분석한 결과 총당 함량 49.8%, 황산기 5.7%, 단백질 함량이 0%로 본 연구결과와는 상이한 결과를 보였다. Alcalase 추출물을 한외여과막으로 분리한 분획물의 화학적 조성을 분석한 결과 2 kDa 이하 분획은 총당의 함량이 99.88%로 주요 성분이었으며, 단백질 0.07%, 황산기의 함량이 0.05%로 낮은 함량을 보였다 (Table 1). 이는 한외여과막으로 분리한 2 kDa 이하 분획물은 주성분이 당으로 이루어진 올리고당으로 나타났다. 한외여과막으로 분리한 2 kDa 이하 분획물의 구성당을 분석하기 위해 alditol acetate로 전환하여 GC로 분석하였다. 그 결과 2 kDa 이하 분획물의 구성당 조성은 mannose 1.5%, glucose 97.2%로 함유되어있는 glucose를 주성분으로 이루어진 분자량 약 1 kDa의 oligo-glucan인 것으로 추정된다 (Fig. 4). 이는 Zvyagintseva 등 [25]이 연구한 *L. cichorioides*에서 분리한 laminaran이 98%의 glucose 함량을 보였으며, *L. japonica*에서 분리한 laminaran은 glucose 82%, fucose 10%, galactose 8% 등의 함량을 보인 결과와 유사하며, 추출 및 분리 정제 방법에 따라 함량의 차이를 보인다고 보고한 바 있다.

**Table 1.** Chemical compositions of Alcalase extract and UF below 2 kDa from *C. fulvescens*

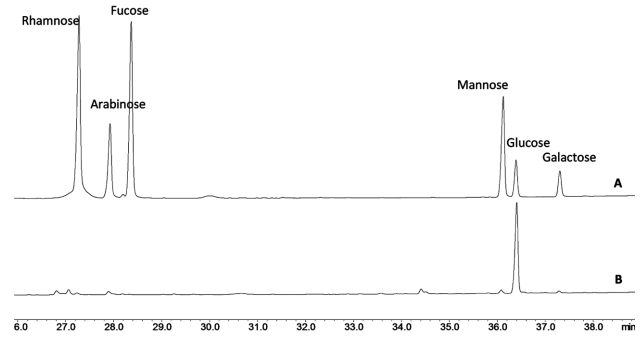
Chemical compositions (%) <sup>1)</sup>	Alcalase extract	UF below 2 kDa
Carbohydrate	89.9	99.88
Protein	4.2	0.07
Sulfate	5.9	0.05

<sup>1)</sup> Dry weight basis.

**Table 2.** Methylation analysis of below 2 kDa fraction by UF-membrane

Methylated sugar <sup>1)</sup>	Mol %	Deduced linkage	Mass spectral fragment ions (m/z)
Glucose	3.3		43, 58, 71, 87, 101, 117, 129, 161, 189
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Glucose	94.1	→3)Glc(1→	43, 71, 101, 117, 143, 161, 189, 233
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glucose	2.6	Glc(1→	45, 59, 71, 88, 101, 118, 145, 187, 205

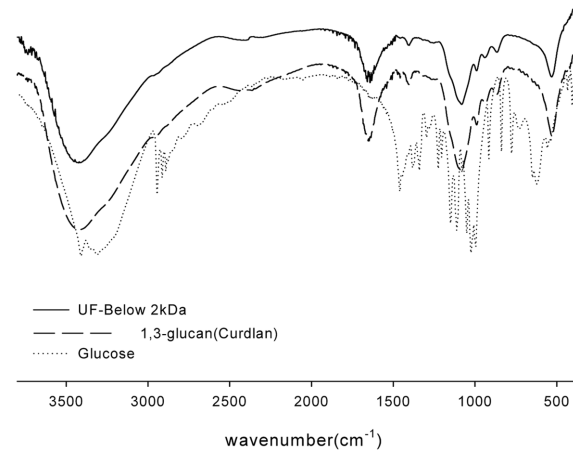
<sup>1)</sup>2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Glucose: 1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-O-methyl-glucitol



**Fig. 4.** Gas chromatograms analysis for monosaccharide composition of the standard monosacchride (A) and below 2 kDa fraction by UF-membrane (B).

### 3.5. 분획의 구조 분석

한외여과 2 kDa 이하 분획물의 구조 및 당쇄 결합 형태를 분석하기 위해 FT-IR, <sup>1</sup>H-NMR, methylation 분석을 하였다. FT-IR 분석한 결과 각 peak의 작용기는 3300~3400 cm<sup>-1</sup>에서 당 고리의 전형적인 O-H의 stretching 진동이 보였으며, 1650 cm<sup>-1</sup>에서 C=O stretching 진동이, 1000~1200 cm<sup>-1</sup>에서는 C-H와 C-O bending 진동이 나타났으며 (Fig. 5), 890 cm<sup>-1</sup>영역은 β-glycosidic linkage를 나타내며, 930 cm<sup>-1</sup>영역은 α-glycosidic linkage를 나타낸다고 보고되고 있다 [26]. 본 연구에서 분획된 2 kDa 이하의 분획물은 890 cm<sup>-1</sup>영역에서 peak를 보여 β-glycosidic linkage을 갖는 것으로 보인다. 또한, 한외여과 2 kDa 이하 분획물의 methylation을 분석한 결과 주요 성분은 2,4,6-tri-O-methyl-glucose로 94.1% 함량을 보였으며 2,3,4,6-tetra-O-methyl-glucose가 2.6%의 함량을 보였다 (Table 2).



**Fig. 5.** FT-IR spectrum of below 2 kDa fraction by UF-membrane, Curdlan (1,3-glucan) and glucose.

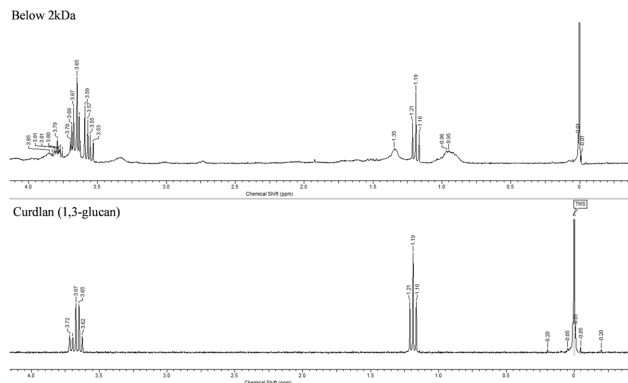


Fig. 6. <sup>1</sup>H-NMR spectra of below 2 kDa fraction by UF-membrane and Curdlan (1,3-glucan).

2,4,6-tri-O-methyl-glucose의 함량으로 보아 β-1,3 결합된 당이 주된 결합이었으며, 2,3,6-tri-O-methyl-glucose는 존재하지 않는 것으로 보아 1,4 결합은 없는 것으로 보이며, β-1,3-glucan으로 추정된다. 또한, <sup>1</sup>H-NMR 분석한 결과 3.53, 3.59, 3.65, 3.70, 3.80 ppm은 각각 glucan의 H1, H2, H3, H4, H5의 peak들이며 표준물질인 Curdlan (1,3-glucan)과 같은 peak를 보여 한외여과 2 kDa 이하 분획물은 β-glucan임을 알 수 있었다 (Fig. 6).

#### 4. 결론

매생이로부터 유용성분을 추출하기 위해 Alcalase 효소를 이용하여 추출하고 ACE 저해 활성을 측정한 결과 Alcalase 추출물에서 72.1% 이상의 ACE 저해 활성을 보였으며, 한외여과막 (UF membrane)을 이용하여 분리한 2 kDa 이하의 분획에서는 82%의 높은 ACE 저해활성을 보였다. Alcalase 추출물은 4개의 peak를 보였으며 각각 약 730 kDa, 8 kDa, 1 kDa, 180 Da 등의 분자량 분포를 나타내었으며, 한외여과막 2 kDa 이하 분획의 분자량은 약 1 kDa의 분자량을 보였다. 한외여과막 2 kDa 이하 분획의 화학적 조성은 총당 99.88%, 단백질 0.07%, 황산기 함량이 0.05%로 나타났으며, 구성당의 조성은 mannose 1.5%, glucose 97.2%로 주로 glucose로 구성되어 있었다. 또한 FT-IR 분석한 결과 890 cm<sup>-1</sup>영역에서 peak를 보여 β-glycosidic linkage을 갖는 것으로 보이며, methylation 분석한 결과 2,4,6-tri-O-methyl-glucose로 94.1%였으며 <sup>1</sup>H-NMR 분석한 결과 표준물질인 Curdlan (1,3-glucan)과 같은 peak를 보여 한외여과 2 kDa 이하 분획물은 β-1,3-glucan임을 알 수 있었다.

#### REFERENCES

1. Nagayama, K., Y. Iwamura, T. Shibata, I. Hirayama, and T. Nakamura (2002) Bactericidal activity of phlorotannins from the brown

alga *Ecklonia kurome*. *J. Antimicrob. Chemother.* 50: 889-893.  
 2. Okai, Y., K. H. Okai, S. Ishizaka, K. Ohtani, I. M. Yuasa, and U. Yamashita (1998) Possible immunomodulating activities in an extract of edible brown alga, *Hijikia fusiforme* (Hijiki). *J. Sci. Food Agric.* 76: 56-62.  
 3. Chen, C. Y. and H. N. Chou (2002) Screening of red algae filaments as a potential alternative source of eicosapentaenoic acid. *Mar. Biotechnol.* 4: 189-192.  
 4. Frolich, L. and P. Riederer (1995) Free radical mechanisms in dementia of Alzheimer type and the potential for antioxidative treatment. *Drug Res.* 45: 443-449.  
 5. 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.  
 6. Kwon, M. J. and T. J. Nam (2006) Effects of Mesangi (*Capsosiphon fulvecens*) powder on lipid metabolism in high cholesterol fed rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 35: 530-535.  
 7. Jeong, K. S. and N. G. Lee (2010) A study on physiological activity and antioxidative activity of Maesangi (*Capsosiphon fulvecens*) extract. *J. Environ. Sci.* 19: 407-414.  
 8. 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.  
 9. 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.  
 10. Misuno, T., T. Hagiwara, T. Nakamura, H. Ito, K. Shimura, T. Sumiya, and A. Asakura (1990) Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "Himematsutake," the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agric. Biol. Chem.* 54: 2889-2896.  
 11. Hwang, Y. J., G. W. Noh, and S. H. Kim (2003) Effect of *Inonotus obliquus* extracts on proliferation and caspase-3 activity in human gastro-intestinal cancer cell lines. *J. Korean Nutr. Soc.* 36: 18-30.  
 12. Komatsu, N., S. Okubo, S. Kikumoto, K. Kimura, G. Saito, and S. Sasaki (1969) Host mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. *Gann.* 60: 137-144.  
 13. Kim, S. M., S. H. Kang, J. Y. Ma, and J. H. Kim (2006) A study on the extract and efficacy of bioactive compound from *Hovenia dulcis*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 21: 11-15.  
 14. Kim, Y. M., I. H. Kim, and T. J. Nam (2011) Induction of apoptosis signaling by a glycoprotein of *Capsosiphon fulvecens* in AGS cell. *Korean J. Fish Sci.* 44: 216-224.  
 15. Lee, J. H., Y. M. Lee, J. J. Lee, and M. Y. Lee (2006) Effects of *Capsosiphon fulvecens* extract on lipid metabolism in rats fed high cholesterol diet. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 35: 402-409.  
 16. Heo, S. J., K. W. Lee, C. B. Song, and Y. J. Jeon (2003) Antioxidant activity of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Algae* 18: 71-81.  
 17. 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.
18. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
19. Dodgson, K. S. and R. G. Price (1962) A note on the determination of the ester sulfate content of sulfated polysaccharides. *J. Biochem.* 84: 106-110.
20. 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.
21. 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.
22. Kim, Y. M., Y. S. Choi, and J. H. Park (2006) Purification and chemical characterisation of Laminaran from *Eisenia bicyclis* in Korea. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 35: 78-86.
23. Tredwell, L., J. A. Nicholas, L. R. Peter, and M. H. James (2003) NMR confirmation of an alkali-insoluble glucan from *Kluyveromyces marxianus* cultivated on a lactose-based medium. *World J. Microbiology Biotechnology.* 19: 349-355.
24. 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.
25. Zvyagintseva, T. N., N. M. Shevchenko, I. V. Nazarova, A. S. Scobum, P. A. Luk'yanov, L. A. Elyakova (2000) Inhibition of complement activation by water soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 126: 209-215.
26. Vlasta, M. G., B. Romano, and J. P. Gerwin (2001) Vibrational spectroscopic characterization of wild growing mushrooms and toadstools. *Spectrochimica. Acta Part A* 57: 2815-2829.