

GOVP1200711611

최 종  
연구보고서

GA 0630-060103

## 갈조류로부터 혈액순환 개선 및 항종양활성 소재개발

Development of biologically active materials from brown seaweeds  
for the improvement of blood circulation and antitumor activity

연 구 기 관  
한 국 식 품 연 구 원

해 양 수 산 부

# 제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “갈조류로부터 혈액순환 개선 및 항종양활성 소재개발에 관한 연구”

과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 10월 19일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

총괄연구책임자 : 김 영 명

연 구 원 : 도 정 룡

연 구 원 : 김 동 수

연 구 원 : 한 찬 규

연 구 원 : 하 태 열

연 구 원 : 성 기 승

연 구 원 : 방 상 진

연 구 원 : 변 지 영

연 구 원 : 유 승 철

연 구 원 : 박 미 라

참 여 기 업 명 : 정산생명공학(주)

여 백

# 요 약 문

## I. 제목

갈조류로부터 혈액순환개선 및 항종양활성 소재개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

소득수준의 향상 및 사회 환경의 변화에 따라 우리 식생활은 균형있는 영양섭취가 점점 어려워지고 과도한 스트레스 및 운동부족 등에 기인하여 비만, 고혈압, 심장병, 당뇨병 등 각종 성인병이 급격히 증가함에 따라 이들 질병의 예방이나 발병 지연 및 치료에 많은 관심이 집중되고 있다.

최근 들어 이러한 질병의 예방 및 치료용 생리활성 물질을 천연물에서 찾고자 하는 노력이 전 세계적으로 활발하게 이루어지고 있는 가운데 아직까지 육상생물 자원에 비해 생리활성 물질에 대한 충분한 연구가 이루어지지 못한 해양생물 자원으로부터 새로운 생리활성 물질의 탐색 및 활용을 위한 연구개발 노력이 급격히 증대되고 있다.

해양 생태계는 기초 생물자원이 육지와 마찬가지로 광합성에 의해 생산되지만 염분 함량이 높고 빈 산소 환경이라는 특성 때문에 생물들의 생체 방어기작 자체가 육상 생물과는 크게 다를 수밖에 없으며 이 때문에 다종다양한 생리적 기능활성 물질의 원료 소재로서 관심의 대상이 되고 있고 최근 들어 일부 선진국을 중심으로 신소재의 탐색 및 생산을 위한 연구개발이 경쟁적으로 이루어지고 있는 추세에 있다.

최근 급격히 증가하고 있는 고혈압은 모든 순환기계 질병의 원인이 되는 동시에 뇌출혈, 심장병 및 신장병 등과 함께 합병증으로 나타날 경우 치사율이 매우 높은 만성퇴행성 질환으로 40대 이후의 중·노년층의 발병률이 15-20%인 것으로 의학계에서는 추정하고 있다.

이미 고령화 사회에 접어든 우리나라에서도 건강에 대한 관심이 고조되고 있으며 건강식품의 시장규모도 매년 증가되고 있어 향후 관련 제품의 시장성이 매우 클 것이다. 특히 기능성 식품을 필두로 예방의학의 중요성이 부각되고 있는 바 관련 제품들에 대한 잠재적 수요는 폭발적으로 증가할 것으로 사료된다.

이러한 여건과 관련하여 해조류는 해양생물 자원 중에서 기술적, 경제적 및 사회문화적 측면 등 여러 관점에서 기능성 식품소재로서의 연구개발의 기대치가 큰 것으로 평가되고 있다.

먼저 기술적 측면에서 살펴보면, 다시마, 미역, 툇과 같은 갈조류에는 다양한 생리기능성 물질이 풍부하게 존재하여 기능성 식품소재 및 의약품 소재로의 고도 이용이 기대되는 것으로 최근의 연구에 의해 속속 밝혀지고 있다.

갈조류의 특수 영양성분 중 fucosterol은 혈중 콜레스테롤을 감소시키는 기능을 갖고 있는 스테로이드 물질 군에 속하는 물질중의 하나로서 일부 선행 기초연구 결과 혈중 콜레스테롤 억제 작용, 간장에서의 콜레스테롤 합성조절 기능, 혈전생성 억제 및 기 형성된 혈전의 조기용해 가능성 등이 보고되고 있다.

Laminaran은 갈조 특히 다시마에 다량 함유된 저장 다당류의 하나로서 육상식물의 전분에 상당한다. 대부분이 D-glucose 잔기로 되어 있으며 주체는  $\beta$ -1,3결합으로, 거기에  $\beta$ -1,6결합이 소량 혼합되어 있으며 구성 glucose 분자의 수가 냉수 가용성 laminaran은 16개, 냉수 불용성 laminaran은 22개 정도의 소형 다당이라는 사실이 밝혀졌다.

Laminaran의 생리활성에 관한 연구들은 대부분 laminaran 황산 에스테르 유도체를 중심으로 항종양활성, 항혈액응고작용 및 항고지혈증 활성 등을 검토한 결과 현행 혈전용해제로 사용되는 heparin과 유사한 강도의 항혈액응고 및 항고지혈증 활성이 있는 것으로 보고된 바 있으며 동맥경화의 억제 기능성에 대해서도 크게 기대되는 물질로 알려지고 있으나 천연상태의 laminaran 자체에 대한 기능활성은 아직 밝혀진 바가 많지 않으나 분자구조 특성상 기능활성 잠재력이 매우 클 것으로 기대된다.

이처럼 갈조류 함유 다당 중 laminaran 및 지용성 물질인 fucosterol의 생리기능성이 일부 선진국의 선행 기초연구로서 부분적으로 밝혀지고 있으나 객관적 기능성과 경제성을 갖춘 기능성 식품 신소재화를 위한 연구 및 기술개발은 아직 본격적으로 이루어지지 못하고 있어 이들 기능성분 제제의 수요가 많고 함유 원료인 갈조류의 생산여건이 좋은 국내 여건을 감안할 때 정책 지원을 받는 기술개발 기획과제로서 집중적 연구개발의 필요성이 클 것으로 사료되었다.

또한 경제·산업적 측면에서도 해조류로부터 고부가가치 생리활성 물질의 분리 이용에 관한 연구는 긴요한 것으로 평가되어 왔다. 즉, 국내 연근해 수산물 중 해조류의 생산비중, 특히 양식 생산 비중이 높아 지선 어민의 주요 소득원일 뿐 아니라 주요 식품소재로서의 위치를 점하고 있다. 해조류 중 다시마, 미역, 툇 등 갈조류는 대부분이 인공 양식되어 식용으로서 내수 소비 또는

가공품으로서 수출되어왔으나 인근 중국 등과의 수출경쟁력 약화, 내수 소비의 정체에 따른 과잉 생산 등의 문제 때문에 고부가가치 활용이 긴요한 실정이다.

뿐만 아니라, 해조류는 대부분 단기간에 생육되어 대량생산되며 수분이 많아 신선한 상태로 장기저장이 어려운 문제점이 있어 주로 식용소비에 국한된 특성 때문에 현재와 같은 기존 단순 가공 제품 위주의 소비정체 상황에서는 새로운 부가가치 창출이 가능한 이용기술의 개발이 긴요한 원료적 특성을 갖고 있다. 해조류 중 다시마 등의 갈조류에는 다양하고 강력한 생리활성 성분을 다량함유하고 있어 이들 유효성분의 개발 여부에 의해 획기적인 부가가치 창출을 기대할 수 있을 것으로 보이나 관련 기술개발은 이루어지지 못하고 있는 실정이다.

이와 같은 해조류의 고부가가치 활용을 위해서는 기존의 식용 위주의 소비를 탈피하여 질병의 예방치료에 도움을 줄 수 있는 새로운 기능성 식품 소재화 기술을 적극 개발하여 관련 산업을 육성 발전시킴으로서 인류 건강 증진에 크게 기여하고 해조 자원 부가가치의 획기적 증대를 동시에 추구하는 방향으로 기술개발이 이루어질 필요가 있다.

사회·문화적 측면에서도 해조류는 고부가가치 활용 소재로서의 기대를 모아왔다. 우리나라는 국민 1인당 연간 해조류 소비량이 12 kg 수준으로서 일본을 제외한 대부분의 국가에 비해 식용 소비량이 많으며 이 때문에 해조류의 생산기반도 튼튼한 실정이다. 전통적으로 미반을 주로 하는 한국인의 식생활에서 해조류는 탕류 및 반찬류의 소재로서 주로 이용되어 왔으며 산후 조리 식으로서도 애용되어온 주요 식품소재의 위치를 점하여왔다.

이러한 해조류는 저열량의 성분특성 때문에 다이어트 식품소재로서 보편적으로 인식되고 있는 것 외에 주로 순환기계 성인병의 예방 및 치료효과가 기대되는 생리기능성분의 함유가 알려지면서 기능성 식품소재로서 개발 필요성이 최근 강조되고 있는데, 이는 육지와 달리 고 염분, 빈 산소 및 광합성 제한 환경에서도 단기간에 왕성한 생육특성을 보이며 해양생태계 내에서 어패류의 중요한 먹이사슬의 중요한 구성요소로서의 역할을 하는 해조류의 조체성분 특이성 때문에 조체에 함유된 생리기능성분은 특별한 관심의 대상이 되어왔기 때문이다. 뿐만 아니라 지표면의 70% 이상을 점하는 해양 수계를 토대로 한 인류의 미개발 자원으로서의 육상자원의 한계와 비례하여 수산자원의 이용에 대한 기대가치도 그 만큼 증대되어 옴으로서 기존의 단순가공 식품소재화 차원에서 기술위주의 새로운 고부가가치 활용 필요성이 강조되어 왔다.

이러한 제반 여건을 감안하여 본 연구에서는 갈조류로부터 주요 성인병의 예방과 관련한 생리활성 중 항콜레스테롤, 항고지혈증, 면역활성 및 항종양활성 등이 우수한 것으로 알려진 fucosterol과 laminaran의 효과적 분리, 정제 및 산업적 생산공정 기술을 개발하고자 하였다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 적정 원료갈조류의 선정

국내 연안에서 자생하거나 인공 양식방법으로 생산되는 주요 갈조류 23종(다시마 및 미역의 경우 산지 및 생산시기별 시료 포함)을 전국 연안에서 수집하였으며, 안정적으로 원료 공급이 가능한 원료해조류를 검토하였다.

#### 2. 기능성 물질(Laminaran, Fucoidan, Fucosterol)의 정제 및 구조분석

원료해조류로부터 laminaran을 비롯한 기능성 다당류와 fucosterol의 적정 추출 분리 조건을 실험 검토하고 정제물의 화학적 구조를 GC/MS 및 NMR 분석 등을 통해 확인하였다.

#### 3. 기능성 물질의 효능 평가

Laminaran, fucoidan 및 fucosterol을 시료로 하여 위암, 대장암 및 간암세포주에 대한 세포독성, 암세포에 대한 면역활성, apoptosis 활성 및 quinone reductase 유도효과 등의 *in vitro* 및 *in vivo* 항암활성을 조사하였으며, 혈류개선 및 항고지혈증 활성도 측정하였다.

#### 4. 기능성 물질의 안전성 검토

SD rat를 실험동물로 하여 laminaran과 fucosterol을 다양한 농도로 단회 경구 투여하여 독성발현 여부( LD<sub>50</sub>)를 정밀 검토하였다.

#### 5. 항암 및 콜레스테롤 대사개선 기능성식품 소재화

Laminaran이나 fucosterol을 주원료로 하고 기존의 유력한 항암 및 콜레스테롤 대사개선 기능성 천연소재들을 부재료로 하여 항암 및 콜레스테롤 대사개선 기능성 식품의 소재화를 위한 적정 원부재료 배합비를 실험설정하였다. 즉, laminaran과 fucosterol 및 시너지물질들의 혼합비율을 달리한 음료타입 혼합조성물을 제조한 후 항암 및 콜레스테롤 생합성 관련 효소인 HMG-CoA reductase의 저해활성을 측정하고 반응표면(RSM) 통계분석 방법으로 검토하여 음료타입의 항암기능성 식품 및 콜레스테롤 대사개선(항고지혈증) 기능성식품 시제품(캡슐)을 개발하였다.

#### 6. 해조 기능성분의 산업소재화를 위한 경제성 검토

Laminaran, fucosterol 및 fucoidan의 산업소재화를 위한 경제성을 검토하였다. 즉, 목표로 하는 각 물질의 추정 생산원가 및 경제성을 물질별 단일 생산공정 및 목표물질의 단계별 일괄 생산공정인 복합공정 조건에서 검토 분석하였다.

## IV. 연구개발 결과

### 1. 적정 원료갈조류의 선정

국내 연안에서 자생하거나 인공 양식방법으로 생산되는 주요 갈조류 23종의 원료(다시마 및 미역의 경우 산지 및 생산시기별 시료 포함)를 전국 연안에서 수집하여 일반성분과 16종의 무기성분 함량, 생리활성 성분으로서 fucosterol과 fucoidan, laminaran 및 alginic acid 등의 기능성 다당, 식이섬유, betaine 및 총 phenol 함량 등을 분석하였다. 이들 원료 중에서 항암 및 콜레스테롤 대사개선 기능성분으로서 기대되는 laminaran 등 기능성 다당과 fucosterol의 함량이 높으면서 안정적 원료공급이 가능할 것으로 검토된 7종의 원료해조류(대황, 감태, 다시마, 미역, 툇, 팽생이모자반)를 잠재적 원료해조류로 정밀검토 하였으며 기능성분의 대량추출 및 공정분석 등을 위해서는 안정적 원료공급 특성이 우수한 다시마를 대상으로 실험하였다.

### 2. Fucosterol, fucoidan 및 laminaran의 정제 및 분석

#### 가. 기능성 해조다당의 추출조건 설정

원료 해조류로부터 laminaran을 비롯한 기능성 다당류(fucoidan, alginic acid) 성분의 적정 추출조건 검토를 위해 물과 에틸알콜을 용매로하여 추출온도와 시간, pH 등 추출조건에 따른 수율을 검토하여 각 성분별 적정 추출조건을 설정하였다.

#### 나. Fucosterol의 추출조건 설정

지용성 성분인 fucosterol의 적정 추출조건은 극성도를 달리한 에탄올을 용매로 하여 추출온도와 시간별로 추출수율을 검토하였으며, 추출수율의 개선 및 공정비용의 절약을 위해 탄산가스(CO<sub>2</sub>)를 용매로 하는 초임계추출조건을 동시에 검토하였다.

#### 다. 기능성 다당의 정제 및 구조 확인

원료 해조류의 열수추출물에 공존하는 알긴산을 염화칼슘을 가하여 알긴산칼슘 형태로 응고 제거시킨 후 에탄올 침전방법으로 잔존하는 해조다당류를 회수한 후 탈염, 이온교환수지 정제공정을 거쳐 산성다당인 crude fucoidan과 중성 다당인 crude laminaran을 얻었으며, Miyazaki(1981)등의 방법에 따라 separose gel chromatography 방법으로 각각의 당을 정제하고 정제한 당의 구조를 구성당 성분조성, 우론산 및 황산기 등의 화학분석과 GC/MS 및 NMR 분석을 통해 밝혔다.



#### 라. 기능성 다당의 분획

Crude laminaran 및 crude fucoidan을 가압가열처리, 산가수분해 및 효소가수분해 방법으로 가수분해 한 후 ultrafiltration 하여 MWCO 10 kDa, 10-50 kDa, 50-100 kDa, 100 kDa 이상의 획분으로 각각 분획하여 실험연구에 사용하였다.

#### 마. Fucosterol의 정제 및 구조 확인

원료해조류의 에탄올 추출물을 알칼리 가수분해한 후 물과 Hexane으로 액-액분리하여 순도 약 35% 수준의 crude fucosterol을 얻은 후 Franz(1989)등의 방법을 참고하여 silica gel 및 활성알미늄 gel column 정제법으로 순도 95% 이상의 fucosterol을 얻었으며 정제 fucosterol의 구조는 GC/MS 및 NMR 분석을 통해 확인하였다.

### 3. Laminaran, fucoidan 및 fucosterol의 *in vitro* 기능성

#### 가. *in vitro* 항암활성

Laminaran과 fucoidan을 시료로 하여 위암, 대장암, 간암세포주에 대한 세포독성, 암세포에 대한 면역활성, apoptosis 활성 및 quinone reductase 유도활성 등의 *in vitro* 항암활성을 조사하였다.

#### 나. *in vitro* 혈류개선 관련 기능성

Laminaran, fucoidan 및 fucosterol의 *in vitro* 혈류개선 기능활성 조사를 위해 혈액순환과 관련되는 기능활성 중 rat 혈액에 대한 혈소판응집억제활성(antiplatelet activity), ACE 저해활성 및 혈전용해활성(fibrinolysis)과 human blood에 대한 항혈액응고활성(anticoagulation activity)을 각각 조사하였으며, 식이콜레스테롤의 흡수억제와 관련한 기능성 요인으로서 *in vitro* 담즙산 흡착특성(Bile acid binding capacity)과 콜레스테롤의 생합성 억제 기능성과 관련하여 rat의 liver microsome을 대상으로 한 HMG-CoA reductase 저해활성을 각각 조사하여 우수한 기능활성을 확인하였다.

### 4. Laminaran 및 fucoidan의 *in vivo* 항암활성

#### 가. 전암단계의 항암활성 조사

갈조류 유래 laminaran과 fucoidan의 전암단계 항암활성을 조사하기 위해 적정 발암동물모델(F344, SD rat)을 이용하여 DMH로 대장암을 유발시킨 뒤 laminaran과 fucoidan의 투여가 rat의 대장 상피세포중의 이상선화소(ACF) 발생에 미치는 영향을 조사하는 방법으로 전암단계의 항암활성을 조사하여 양호한 항암활성을 확인하였다.

#### 나. 중기발암성 조사

Laminaran과 fucoidan의 중기발암성에 미치는 영향을 조사하기 위해 적정 발암동물모델(F344 SD rat)을 이용하여 DMH와 Diethyl nitrosoamine으로 각각 대장암과 간암을 유발시킨 다음 laminaran과 fucoidan을 28-32주간 투여하여 발암성에 미치는 영향을 조사하여 비교적 양호한 항암활성을 확인하였다.

### 5. Laminaran과 fucosterol의 *in vivo* 항고지혈활성

#### 가. Rat를 실험동물로 한 항고지혈 활성 조사

인위적으로 고지혈증을 유도한 SD rat의 혈액조성 및 HMG-CoA reductase 저해활성에 미치는 laminaran과 fucosterol의 투여효과를 6주 동안 조사하여 양호한 혈중 총 콜레스테롤 저하, HDL 콜레스테롤의 상승, LDL 콜레스테롤 및 중성지질(Triglyceride)의 감소효과를 확인하였으며 유의한 HMG-CoA reductase 저해활성을 확인함으로써 생체 내에서의 콜레스테롤 생합성 저해에도 유효함을 확인하였다.

#### 나. Hamster를 실험동물로 한 항고지혈증 활성 조사

지질 대사실험 적정 동물모델인 hamster를 실험동물로 하여 SD rat의 경우와 같은 요령으로 인위적으로 고지혈증을 유도시킨 다음 laminaran과 fucosterol을 6주 동안 투여하여 혈중 지질조성 및 HMG-CoA reductase 저해활성에 미치는 영향을 조사하여 양호한 혈중 총 콜레스테롤저하, HDL 콜레스테롤의 상승, LDL 콜레스테롤 및 중성지질(Triglyceride)의 감소효과를 확인하였으며 우수한 HMG-CoA reductase 저해활성을 확인함으로써 생체 내에서의 콜레스테롤 생합성 저해에도 유효함을 확인하였다.

#### 다. 혈액유동성 개선효과 조사

Laminaran과 fucosterol의 *in vivo* 혈류개선 기능성 확인의 일환으로 SD rat를 대상으로 하여 인위적으로 고지혈증을 유발시킨 다음 laminaran과 fucosterol을 2주간 경구투여한 후 혈액의 유동특성을 micro channel array 분석방법으로 조사하고 혈액의 지질성분 조성을 분석하여 laminaran과 fucosterol의 투여가 모두 우수한 혈액유동성 개선효과를 보여주었으며 혈중 지질조성 또한 유의하게 개선되는 효과를 확인하였다.

### 6. Laminaran과 fucosterol의 안전성

SD rat를 실험동물로 하여 기능성분을 다양한 농도로 경구 투여하여 2주간 사육하면서 투여농도에 따른 독성발현 여부를 외관, 장기 및 혈액검사 방법으로 검토한 결과 4,000-8,000 mg/kg/bw 수준에서도 독성발현 징후가 관찰되지 않음으로서 안전한 물질임을 확인하였다.

## 7. Laminaran의 항암기능성식품 소재화 가능성 검토

Laminaran을 주원료로 하고 기존의 유력한 항암 천연소재(마늘, 녹차 등)들을 synergy 효과를 갖는 부재료로 하여 항암기능성 식품의 소재화 가능성을 검토하기 위해 laminaran과 시너지물질들의 혼합비율을 달리한 음료타입 혼합조성물을 제조한 후 암세포에 대한 독성을 반응표면(RSM) 통계분석방법으로 검토하여 음료타입의 항암기능성식품 개발이 가능함을 확인하였다.

## 8. Laminaran과 fucosterol의 콜레스테롤 대사개선 기능성식품 소재화

Laminaran이나 fucosterol을 주원료로 하고 기존의 유력한 콜레스테롤 대사개선 기능성 천연소재들(마늘, 녹차 등)을 synergy 효과를 갖는 부재료로 하여 콜레스테롤 대사개선 기능성 식품의 소재화 가능성을 검토하기 위해 laminaran과 fucosterol 및 시너지물질들의 혼합비율을 달리한 음료타입 혼합조성물을 제조한 후 콜레스테롤 생합성 관련 효소인 HMG-CoA reductase의 저해활성을 측정하고 반응표면(RSM) 통계분석 방법으로 검토하여 음료타입의 콜레스테롤 대사개선 특성을 갖는 항고지혈 기능성식품 개발이 가능함을 확인하였다.

## 9. 기능성분의 대량생산공정 검토

기능성분의 산업적 생산을 위한 기초공정 검토의 일환으로 다시마를 원료로 하고 제약 산업의 대형 생약제 추출설비를 이용하여 건조중량 100kg 규모에서 에탄올 추출공정으로 지용성분(fucosterol 함유)을 1차적으로 추출한 다음 열탕추출 공정으로 잔존하는 기능성 다당을 추출한 후 fucosterol, alginate, laminaran 및 fucoidan의 계통적 분리공정을 실험 검토하였다. 기능성분별로는 에탄올 추출물로부터 알칼리가수분해, 물-핵산 액-액분리 및 실리카겔-알미늄 겔 컬럼 정제 과정을 거쳐 crude fucosterol 및 정제 fucosterol의 생산공정을 검토하였다. 또한 열수추출물로부터는 염화칼슘 첨가에 의한 알긴산 칼슘염의 응고분리, 알긴산 제거 다당수용액의 농축 회수 및 이온교환수지 정제에 의한 산성다당(Fucoidan)과 중성다당(Laminaran)의 분리정제공정을 검토하였다.

## 10. 해조 기능성분의 산업소재화를 위한 경제성 검토

Laminaran과 fucosterol 및 fucoidan의 산업소재화를 위한 경제성 검토를 위해 다시마, 팽생이모자반, 대황 및 알긴산제조 부산물을 원료로 한 생산공정을 검토하고 각 공정의 처리수율을 분석하여 추정 생산원가를 비교분석 하였다. 이때 단일 기능성분의 추출·정제수율 저하에 따른 경제성 악화문제에 대한 대응방안으로서 동일한 원료로부터 생산되는 부산물의 경제적 가치도 경제성 분석에 반영하였다.

#### IV. 연구개발 결과의 활용계획

연구과정에서 발생한 know how는 국내·외 기술권 확보를 추진하며 개발된 기술 및 제품은 관련 산업계에 홍보하여 산업적 실용화를 적극 추진하되 참여기업에 대한 기술이전을 우선적으로 고려할 예정이다.

개발제품의 생리기능성 및 임상효과는 개발제품의 설명회, 매스컴 홍보, 식품기술전 출품 등의 방법으로 소비자에게 홍보하며 학술적 가치가 있는 연구결과는 국내·외 전문 학술잡지에 발표함으로써 관련 학술발전에 기여함은 물론 산업적 실용화의 과학적 지원 기반을 구축하고, 또한 원료해조의 품질특성 요건 및 전처리 방법 등을 생산어민, 유관기관 및 단체에 홍보 보급함으로써 해조 원료의 계획적 생산 및 고부가가치 이용을 도모할 계획이다.

여 백

# Summary

## I . Title

Development of biologically active materials from brown seaweeds for the improvement of blood circulation and anti-tumor activity.

## II . Objectives and significances

Seaweeds are generally considered to be a good dietary source for health, for it contain a variety of biologically active materials as acid-polysaccharides, betaglucons and sterols, most of which are expected to be useful for the prevention of adult disease related to tumors, blood circulation, hypertension, hyperlipemia, hypercholesterolemia, etc.

In this connection, objectives of this study were focused on development of practical process for the isolation and purification of biologically active materials as laminaran and fucosterol from brown seaweeds for the end use of raw material of functional supplements or nutraceuticals for prevention of tumors prorigation and enhancement of blood circulation, control of hypertension, hypercholesterolemia.

## III . Contents and Scope

Major contents and research scope of this study could be summarized as follows;

1. Screening of potent raw material(seaweeds) by chemical analysis
2. Development of practical process for the extraction, isolation and purification of laminaran, fucoidan and fucosterol from seaweed
3. Evaluation of biological activities of laminaran, fucoidan and fucosterol by *in vitro* and *in vivo* assay
4. Evaluation of safety of laminaran and fucosterol in terms of LD<sub>50</sub>
5. Formulation of proto-type health supplements as beverage and capsule aiming for tumor prevention and control of hyperlipemia and hypercholesterolemia
6. Considerations for the industrial production and economic feasibility

## **IV. Results**

### **1. Screening of potent raw material by chemical analysis**

23 kinds of brown seaweeds were analysed for the general composition, dietary fiber, betain, polyphenol, minerals, and 7 kinds of which were selected as potent raw materials for their stability in production and chemical compositions including biologically active polysaccharides as laminaran, alginate, fucoidan and fucosterol.

### **2. Extraction and purification of fucosterol, fucoidan and laminaran**

Optimum process for the extraction and purification of fucosterol from seaweeds were established by use of legally allowed solvents as ethanol, hexane and alkali and column chromatography, and chemical structures of which were confirmed by GC/MS, TLC and NMR analysis. Practical process for the extraction and purification of fucoidan and laminaran from seaweeds were also established by combination of water extraction, removal of alginate by application of calcium chloride, ion-exchange treatment, dialyze, and their chemical structures were also determined by GC/MS, FT-IR and NMR analysis.

### **3. Biological activities of fucosterol, fucoidan and laminaran**

Anti-tumor activities of laminaran, fucoidan and fucosterol were investigated both *in vitro* assay as MTT assay against major 3 human cancer cell lines including stomach cancer, nitric oxide production, apoptosis, quinone reductase(QR) induction and *in vivo* assay. As a results of *in vitro* assay, significant tumor prevention activities approximately 60-75% were confirmed in laminaran and fucoidan, but lower effect from animal test were obtained.

Biological activities of lamianaran, fucoidan and fucosterol were also investigated *in vitro* and *in vivo* assay. Anticoagulant activity, anti-platelet aggregation activity, ACE inhibition activity, electron donating ability, fibrinolysis activity, HMG-CoA reductase activity and bile acid binding capacities of laminaran, fucoidan and fucosterol were investigated *in vitro*, and relevant animal test to confirm the activities for hyperlipemia, hypercholesterolemia and blood circulation problem were also conducted using approved animal(SD Rat F344, hamster) model and protocol, by which significant effects as elevation of HDL cholesterol, decrease in triglycerides and LDL cholesterol, enhancement

of blood flow and inhibition of HMG CoA reductase activity, were obtained.

#### **4. Safety estimation of fucosterol, fucoidan and laminaran**

Fucosterol, fucoidan and laminaran were analyzed for determination of single dose toxicity (LD<sub>50</sub>) using male and female SD rat. As a result of animal test, no significant toxicity to die were observed at medication level up to 2,000–8,000 mg/kg/bw in laminaran and fucoidan, and at medication level of 4,000 mg/kg/bw in fucosterol, by which reveals the safety of fucosterol, fucoidan and laminaran.

#### **5. Formulation of functional food using laminaran and fucosterol**

Health supplement for cancer prevention were experimentally formulated consist of crude laminaran(1%), onion extract(1.96%), garlic concentrate(2.1%), green tea catechin (2.11%), plum extract(2.36%) and water using optimum formula obtained from the result of RSM analysis on the MTT assay of experimental formulation. In addition, health supplement capsule for control of hyperlipemia and hypercholesterolemia were also formulated as crude fucosterol(0.02%), garlic concentrate(2.12%), green tea catechin (2.41%), phytosterol powder(1.98%), mushroom extract(2.44%) and water(91.03%) using optimum formula obtained from the result of RSM analysis on the HMG CoA reductase inhibition activity of experimental formulation.

#### **6. Consideration of industrial process**

Practical process consist of systematic extraction and individual purification of fucosterol, fucoidan and laminaran were experimentally devised. For the extraction of active materials, ethanolic extraction followed by water extraction of dried kelp using commercial facilities to obtain non polar and polar extracts were conducted as large as 100kg per batch scale. Purification of each materials were carried out at a scale-up level as 100 times larger than experimental lab scale.

#### **7. Cost analysis for the production of active materials**

Approximate cost for commercial production of fucosterol, fucoidan and laminaran for the use of health supplements were estimated on the basis of single process and multi processing. As a result of estimation, multiprocessing were considered to be significantly beneficial compare to single process, especially for the merit of total use of by-products



and economic supply of raw materials.

## **V. Recommendations**

All the results obtained from this study could be applicable to the health food industry by transfer of specified & patented technologies as extraction process, purification and formulation technologies. It is also expected that general and wide application of basic data for the scientific and educational purposes.

# CONTENTS

<b>Summary</b>	<b>3</b>
<b>I Overview</b>	<b>33</b>
1 Objectives	33
2 Significance	33
<b>II Present status of related research and developments</b>	<b>36</b>
<b>III Materials and methods</b>	<b>40</b>
1 Materials	40
2 Experimental methods	43
2.1 General composition	43
2.2 Mineral	43
2.3 Dietary fiber	43
2.4 Betain	43
2.5 Total sugars	44
2.6 Total phenol	44
2.7 Sulfate	44
2.8 Uronic acid	44
2.9 Extraction and purification of fucoesterol	45
2.9.1 Analysis of fucoesterol content	45
2.9.2 Extraction of crude fucoesterol	45
2.9.3 Purification of fucoesterol	45
2.9.4 Structure analysis of fucoesterol	45
2.10 Extraction and purification of fucoidan	45
2.10.1 Extraction of crude fucoidan	45
2.10.2 Purification of fucoidan	47
2.11 Extraction and purification of laminaran	49
2.11.1 Extraction of crude laminaran	49
(1) Method of Black et al	49
(2) Water extraction method	49
2.11.2 Purification of laminaran	49

2.12. Modification of laminaran and fucoidan .....	51
2.12.1 Chemical modification .....	51
(1) Modification of sulfate .....	51
(2) Reduction of uronic acid .....	51
2.12.2 Enzymatic modification .....	51
2.12.3 Methylation of laminaran and fucoidan .....	51
2.13 <i>in vitro</i> test for anti-tumor activity .....	52
2.13.1 MTT assay .....	52
(1) Incubation of cell line .....	52
(2) MTT assay .....	52
2.13.2 Nitric oxide production .....	53
2.13.3 Apoptosis .....	53
2.13.4 Quinone reductase(QR) induction activity .....	53
2.14 <i>in vivo</i> anti-tumor activity .....	54
2.14.1 Animal model .....	54
2.14.2 DMH medication for inducement of colon carcinogenesis .....	55
2.14.3 DEN medication for inducement of hepatocarcinogenesis .....	55
2.14.4 Treatments of animal .....	55
2.14.5 Investigation of colonic aberrant crypt, a pre-cancer indicator .....	55
2.14.6 Clinical investigation of colon carcinoma and hepatocarcinogenesis .....	55
2.15 Anti-coagulation activity .....	56
2.16 Anti-platelet aggregation activity .....	56
2.17 ACE inhibition activity .....	56
2.18 Electron donating ability .....	56
2.19 Fibrinolysis .....	57
2.20 HMG-CoA reductase activity .....	57
2.21 <i>in vivo</i> anti-hyperlipidemic activity .....	57
2.21.1 Animal model and experimental design .....	57
2.21.2 Treatments of animal .....	58
2.21.3 Analysis of serum components .....	58
2.22 Bile acid binding capacity .....	58
2.23 Micro channel array .....	58
2.23.1 Animal model and experimental design .....	58
2.23.2 Treatments of animal .....	59

2.24	Immobilization of laminaranase .....	59
2.25	Single dose toxicity (LD <sub>50</sub> ) of laminaran and fucoidan .....	59
2.26	Formulation of anti-tumor beverage .....	59
2.27	Formulation of anti-hyperlipidemic beverage .....	59
2.28	Consideration of industrial process .....	60
2.29	Development of biological material for functional food .....	60
2.30	Cost analysis for production .....	60
<b>IV.</b>	<b>Results and discussions .....</b>	<b>61</b>
1	Chemical analysis of raw material .....	61
1.1.1	General composition .....	61
1.1.2	Mineral .....	63
1.1.3	Diet fiber .....	64
1.1.4	Betain .....	64
1.1.5	Total phenol .....	66
2	Biologically active materials .....	68
2.1	Laminaran .....	68
2.2	Fucoidan .....	69
2.3	Fucosterol .....	70
3	Purification and structure analysis of biologically active materials .....	71
3.1	Laminaran .....	71
3.1.1	Conventional process .....	71
	(1) Extraction of crude laminaran .....	71
	(2) Purification of laminaran .....	72
3.1.2	Experimental process .....	74
	(1) Extraction of crude laminaran .....	74
	(2) Purification of laminaran .....	77
	(3) Structure analysis of laminaran .....	77
	(4) Fractionation and chemical analysis .....	83
	(5) Measurement of molecular weight .....	84
	(6) Modification and analysis of functionality .....	84
3.2	Fucoidan .....	88
3.2.1	Conventional process .....	88
	(1) Extraction of crude fucoidan .....	88

(2) Purification of fucoïdan .....	90
3.2.2 Experimental process .....	92
(1) Extraction of crude fucoïdan .....	92
(2) Chemical composition of fucoïdan .....	92
(3) Purification of fucoïdan .....	93
(4) Fractionation by ultrafiltration .....	94
(5) Fractionation and structure analysis .....	95
(6) Measurement of molecular weight .....	101
3.3 Fucosterol .....	101
3.3.1 Conventional process .....	101
(1) Extraction of crude fucosterol .....	101
(2) Purification of fucosterol .....	103
3.3.2 Experimental process .....	103
(1) Practical solvent for the extraction of crude fucosterol .....	103
(2) Purification and chemical analysis of fucosterol .....	104
(3) Structure analysis of fucosterol .....	109
(4) Yield of fucosterol by extraction condition .....	113
(5) SFE characteristics of fucosterol .....	114
3.4 Process improvement for the increment of activity and yield of laminaran and fucosterol .....	116
3.4.1 Hydrolysis effect .....	116
(1) Acid hydrolysis .....	116
(2) Enzymatic hydrolysis .....	117
(3) Thermal degradation effect .....	118
3.4.2 Fractionation by ultrafiltration .....	119
3.4.3 Application of immobilized enzymes .....	121
(1) Screening and immobilization of laminaranase .....	121
1) Separation and purification of seaweed originated laminaranase .....	121
2) Laminaranase from sea-urchin and viscera of abalone .....	129
3) Fractionation yield of laminaran affected by laminaranase .....	136
(2) Activity of immobilized laminaranase from unfertilized sea-urchin .....	140
1) Adsorption ratio and activity of immobilized laminaranase .....	140
2) Optimal pH and temperature of immobilized laminaranase .....	142
3.4.4 Consideration of decoloration process .....	143

3.5	Analysis of biological activities .....	145
3.5.1	Laminaran .....	145
(1)	Anti-tumor activity .....	145
1)	<i>in vitro</i> activity .....	145
(a)	MTT assay of modified laminaran on human cancer cell .....	145
(b)	NO production .....	146
(c)	Apoptosis .....	147
(d)	Quinone reductase induction activity .....	149
2)	<i>in vivo</i> activity .....	150
(a)	Anti colon-carcinogenesis activity at precancer stage .....	150
(b)	Anti colon-carcinogenesis activity .....	156
(c)	Anti hepatocarcinogenesis activity .....	158
(2)	Anti-hypercholesterolemic activity .....	161
1)	<i>in vitro</i> activity .....	161
(a)	ACE inhibition .....	161
(b)	HMG-CoA reductase inhibition .....	163
(c)	Bile acid binding activity .....	165
2)	<i>in vivo</i> activity .....	167
(a)	HMG-CoA reductase inhibition of laminaran .....	167
(b)	Antihyperlipidemic activity of laminaran .....	170
(3)	Improvement of blood circulation .....	172
1)	<i>in vitro</i> activity .....	172
(a)	Anti blood-coagulation activity .....	172
(b)	Anti-platelet aggregation activity .....	174
2)	<i>in vivo</i> activity .....	176
(a)	Animal model and experimental design .....	176
(b)	Weight gain, feed intake and PER .....	177
(c)	Lipid composition of blood .....	180
(d)	Effect on blood circulation .....	182
3.5.2	Fucoidan .....	184
(1)	Anti-tumor activity .....	184
1)	<i>in vitro</i> activity .....	184
(a)	MTT assay of modified laminaran on human cancer cell .....	184
(b)	Quinone reductase induction activity .....	185

2) <i>in vivo</i> activity .....	186
(a) Anti colon-carcinogenesis activity at precancer stage .....	186
(b) Weight gain, feed intake and PER of animal .....	186
(c) Effect of fucoidan on formation of colonic aberrant crypt foci .....	187
(2) Anti-hypercholesterolemic activity .....	189
1) <i>in vitro</i> activity .....	189
(a) ACE inhibition .....	189
(b) Anti-blood coagulation activity .....	191
(c) Anti-platelet aggregation activity .....	194
2) <i>in vivo</i> activity .....	197
(a) HMG-CoA reductase inhibition .....	199
3.5.3 Fucosterol .....	199
(1) Anti-hypercholesterolemic activity .....	199
1) <i>in vivo</i> activity .....	199
(a) HMG-CoA reductase inhibition .....	199
(b) Anti-hyperlipidemic activity .....	201
(2) Improvement of blood circulation .....	202
1) <i>in vivo</i> activity .....	202
(a) Animal model .....	202
(b) Weight gain, feed intake and PER .....	203
(c) Effect on serum lipid composition .....	204
(d) Effect on blood circulation .....	207
3.6 Evaluation of safety .....	209
3.6.1 Single dose toxicity(LD <sub>50</sub> ) of laminaran and fucoidan .....	209
(1) Dead animal and clinical investigation .....	209
(2) Weight changes and clinical investigation .....	209
3.6.2 Toxicity of laminaran at maximum level of single oral dose .....	213
3.7 Formulation of functional food using laminaran and fucosterol .....	215
3.7.1 Formulation of anti-tumor food using laminaran .....	215
(1) Anti-tumor beverage .....	215
(2) Anti-tumor capsule .....	219
3.7.2 Formulation of antihyperlipidemic food using fucosterol .....	220
(1) Anti-hyperlipidemic beverage .....	220
(2) Anti-hyperlipidemic capsule .....	226

3.8	Consideration of industrial process .....	226
3.8.1	Single process .....	226
	(1) Process for laminaran production .....	226
	1) Manufacturing process .....	226
	2) Process specification .....	227
	3) Consideration for industrial application .....	228
	(2) Process for fucoidan production .....	229
	1) Manufacturing process .....	229
	2) Process specification .....	230
	3) Consideration for industrial application .....	230
	(3) Process for fucoesterol production .....	231
	1) Manufacturing process .....	231
	2) Process specification .....	231
	3) Consideration for industrial application .....	231
3.8.2	Multi-process .....	232
	(1) System process for the separation of active materials .....	232
	1) Manufacturing process .....	232
	2) Process specification .....	232
	3) Consideration for industrial application .....	233
3.9	Cost analysis for the production of active materials .....	235
<b>V.</b>	<b>Achievement and contribution .....</b>	<b>239</b>
<b>VI.</b>	<b>Recommendation for application of results .....</b>	<b>242</b>
<b>VII</b>	<b>References .....</b>	<b>243</b>



여 백

# 목 차

요약문 .....	3
<b>제 1 장 연구개발 과제 개요 .....</b>	<b>33</b>
제 1 절 연구개발의 목적 .....	33
제 2 절 연구개발의 필요성 .....	33
<b>제 2 장 국내·외 기술개발 현황 .....</b>	<b>36</b>
<b>제 3 장 재료 및 방법 .....</b>	<b>40</b>
제 1 절 실험재료 .....	40
제 2 절 실험방법 .....	43
1. 일반성분 .....	43
2. 무기질 .....	43
3. 식이섬유 .....	43
4. Betain .....	43
5. 총당의 정량 .....	44
6. 총 phenol의 정량 .....	44
7. 황산기의 정량 .....	44
8. 우론산(Uronic acid)의 정량 .....	44
9. Fucosterol 추출 및 정제 .....	45
가. Crude fucosterol의 함량 분석 .....	45
나. Crude fucosterol의 추출특성 .....	45
다. Fucosterol 정제 .....	45
라. Fucosterol의 구조분석 .....	45
10. Crude fucoidan의 추출 및 정제 .....	45
가. Crude fucoidan의 추출 .....	45
나. Crude fucoidan 정제 및 분획 .....	47
11. Laminaran의 추출 및 분리정제 .....	49
가. Crude laminaran 추출 .....	49
(1) Black et al(1951)의 방법 .....	49
(2) 열수추출법 .....	49
나. Crude laminaran 정제 및 분획 .....	49

12. Laminaran 및 fucoidan의 수식 .....	51
가. 화학적 수식 .....	51
(1) 황산기 제거 .....	51
(2) 우론산의 환원 .....	51
나. 효소적 수식 .....	51
다. 정제 및 수식처리 다당(Laminaran, Fucoidan)의 methylation .....	51
13. <i>in vitro</i> 항암활성의 측정 .....	52
가. 암세포독성의 측정(MTT) .....	52
(1) 암세포주 배양 .....	52
(2) MTT assay에 의한 암세포독성 측정 .....	52
나. NO 생성능 .....	53
다. 세포자멸사(Apoptosis) .....	53
라. Quinone reductase(QR) 유도효과 .....	53
14. <i>in vivo</i> 항암활성 조사 .....	54
가. 실험동물 .....	54
나. 대장암 발생유도를 위한 발암물질의 투여 .....	55
다. 간암 발암물질의 투여 .....	55
라. 실험동물의 처리 .....	55
마. 대장암 전암 병변의 검사 .....	55
바. 대장암 및 간암 병변의 검사 .....	55
15. 항혈액응고활성의 측정 .....	56
16. 항혈소판응집 활성(Anti-platelet aggregation activity)의 측정 .....	56
17. ACE 저해활성의 측정 .....	56
18. 전자공여능의 측정 .....	56
19. 혈전용해 (Fibrinolysis) 활성 .....	57
20. HMG-CoA reductase 저해활성 .....	57
21. <i>in vivo</i> 항고지혈증 활성의 조사 .....	57
가. 실험동물과 실험방법 개요 .....	57
나. 실험동물의 처리 .....	58
다. 혈청 중의 지질 농도 분석 .....	58
22. 담즙산(Bile acid) 흡착능 .....	58
23. 혈류 유동성 측정(Micro channel array) .....	58
가. 실험동물 .....	58
나. 실험동물의 처리 .....	59

24. Laminaran의 생산성 증진을 위한 laminaranase 탐색 및 고정화 활용 .....	59
25. Fucoidan 및 laminaran의 급성 독성평가(LD <sub>50</sub> ) .....	59
26. 항암기능성 음료의 개발 .....	59
27. 항고지혈증 기능성음료의 개발 .....	59
28. 갈조류 기능성분의 대량생산공정 .....	60
29. 기능성식품 소재화 .....	60
30. 기능성 물질의 경제성 .....	60
<b>제 4 장 연구결과 및 고찰 .....</b>	<b>61</b>
제 1 절 원료의 특성 연구 .....	61
1. 일반성분 .....	61
2. 무기질 성분 .....	63
3. 식이섬유 함량 .....	64
4. Betaine .....	65
5. 총 Phenol의 함량 .....	66
제 2 절 해조류의 기능성분 .....	68
1. Laminaran의 함량 .....	68
2. Fucoidan의 함량 .....	69
3. Fucosterol 함량 .....	70
제 3 절 기능성분의 분리 정제 및 구조확인 .....	71
1. Laminaran .....	71
가. 기존 Process .....	71
(1) Crude laminaran의 추출 .....	71
(2) Laminaran의 정제 .....	72
나. 실험공정(Experimental process) .....	74
(1) Crude laminaran 추출 .....	74
(2) Laminaran의 정제 .....	77
(3) Laminaran의 구조분석 .....	77
(4) Laminaran의 분획 및 화학적 조성 .....	83
(5) HPLC에 의한 분자량 측정 .....	84
(6) 정제분획물의 수식 및 특성 분석 .....	84
(가) 화학적 수식 .....	84
(나) 효소적 수식 .....	85
(다) Laminaran의 methylation .....	86

2. Fucoidan .....	88
가. 기존 Process .....	88
(1) Crude fucoidan의 추출 .....	88
(2) Crude fucoidan 정제 및 분획 .....	90
나. 실험공정(Experimental process) .....	92
(1) Crude fucoidan의 추출 .....	92
(2) Crude fucoidan의 이화학적 조성 .....	92
(3) Fucoidan의 정제 .....	93
(4) 한외여과에 의한 분획 .....	94
(5) 음이온 교환수지에 의한 분획 및 구조 분석 .....	95
(6) HPLC에 의한 분자량 측정 .....	101
3. Fucosterol .....	101
가. 기존 공정 .....	101
(1) Crude fucosterol의 추출 .....	101
(2) Fucosterol 정제 .....	103
나. 실험공정(Experimental process) .....	103
(1) Fucosterol의 적정 추출용매 조건 검토 .....	103
(2) Fucosterol의 분리·정제 및 이화학적 분석 .....	104
(3) Fucosterol의 구조분석 .....	109
(4) Crude fucosterol의 수율에 미치는 추출온도 및 가수분해 조건의 영향 .....	113
(5) 초임계 이산화탄소를 이용한 감태로부터 fucosterol의 분리 .....	114
제 4 절 Laminaran과 fucosterol의 기능성개선 및 수율증대 기술 검토 .....	116
1. 가수분해 효과 .....	116
가. 산 처리 효과 .....	116
나. 효소처리 효과 .....	117
다. 고온·가압 처리 효과 .....	118
2. 한외여과에 의한 분획 .....	119
3. 고정화 효소 처리 .....	121
가. Laminaran의 생리활성 증진을 위한 laminaranase 탐색 및 고정화 .....	121
(1) 해조류 유래 미생물이 생산하는 laminaranase 분리·정제 .....	121
(2) 성게알 및 전복내장으로부터 laminaranase 분리·정제 .....	129
(3) 해조류, 성게알, 전복내장 유래 laminaranase로 처리한 laminaran 수율 .....	136
나. 성게알 유래 laminaranase의 고정화 방법 및 그 활성 검토 .....	140
(1) 고정화 효소의 흡착율 및 그 활성 .....	140

(2) 온도 및 pH에 대한 고정화 효소의 활성 .....	142
4. 탈색처리 효과 .....	143
제 5 절 기능성분의 효능평가 .....	145
1. Laminaran .....	145
가. 항암활성 .....	145
(1) <i>in vitro</i> 항암활성 .....	145
(가) 수식 laminaran의 cytotoxicity .....	145
(나) NO 생성능 .....	146
(다) 세포자멸사(Apoptosis) .....	147
(라) Quinone reductase 유도활성 .....	149
(2) <i>in vivo</i> 항암활성 .....	150
(가) 전암단계의 <i>in vivo</i> 항암활성 .....	150
(나) Laminaran의 <i>in vivo</i> 대장암 발암억제 활성 .....	156
(다) Laminaran의 <i>in vivo</i> 간암 발암억제 활성 .....	158
나. 콜레스테롤 대사 개선 .....	161
(1) <i>in vitro</i> 콜레스테롤 대사 개선 .....	161
(가) ACE 저해활성 .....	161
(나) HMG-CoA reductase 저해활성 .....	163
(다) 담즙산(Bile acid) 흡착능 .....	165
(2) <i>in vivo</i> 콜레스테롤 대사 개선 .....	167
(가) Laminaran의 HMG-CoA reductase 저해활성 .....	167
(나) Laminaran의 <i>in vivo</i> 항고지혈증 활성 .....	170
다. 혈류 개선 .....	172
(1) <i>in vitro</i> 혈류 개선 효과 .....	172
(가) 항혈액응고 활성 .....	172
(나) 혈소판응집 억제 활성 .....	174
(2) <i>in vivo</i> 혈류개선 효과 .....	176
(가) 실험동물 및 처리 .....	176
(나) 체중 증가량, 사료 섭취량 및 식이효율 .....	177
(다) 혈청지질 농도 .....	180
(라) 혈류개선 효과 .....	182
2. Fucoidan .....	184
가. 항암활성 .....	184
(1) <i>in vitro</i> 항암활성 .....	184

(가) 수식 fucoidan의 cytotoxicity .....	184
(나) Quinone reductase 유도활성 .....	185
(2) <i>in vivo</i> 항암활성 .....	186
(가) Fucoidan의 전암단계 <i>in vivo</i> 항암활성 .....	186
(나) 실험동물의 체중증가량, 사료 섭취량 및 식이효율 .....	186
(다) 대장 이상선화소(ACF) 및 종양 발생 억제율 .....	187
나. 콜레스테롤 대사 개선 .....	189
(1) <i>in vitro</i> 콜레스테롤 대사 개선 .....	189
(가) ACE 저해활성 .....	189
(나) 항혈액응고 활성 .....	191
(다) 혈소판응집 억제 활성 .....	194
(2) <i>in vivo</i> 콜레스테롤 대사 개선 .....	197
(가) HMG-CoA reductase 저해활성 .....	197
3. Fucosterol .....	199
가. 콜레스테롤 대사 개선 .....	199
(1) <i>in vivo</i> 활성 .....	199
(가) HMG-CoA reductase 저해활성 .....	199
(나) 항고지혈증 활성 .....	201
나. 혈류개선 .....	202
(1) Fucosterol의 <i>in vivo</i> 혈류개선 효과 .....	202
(가) 실험동물 .....	202
(나) 체중 증가량, 사료 섭취량 및 식이효율 .....	203
(다) 혈청지질 농도 .....	204
(라) 혈류개선 효과 .....	207
제 6 절 안전성 평가 .....	209
1. Laminaran 및 fucoidan의 급성독성평가(LD <sub>50</sub> ) .....	209
가. 사망동물 및 임상증상 .....	209
나. 체중변화 및 육안적 해부소견 .....	209
2. Laminaran 및 fucosterol 최고용량 초과 경구투여 독성 .....	213
제 7 절 Laminaran과 fucosterol의 기능성식품 소재화 .....	215
1. Laminaran을 주원료로 한 항암 활성 소재화 .....	215
가. Laminaran을 주원료로 한 항암기능성 음료의 가공 .....	215
나. Laminaran을 주성분으로 하는 항암기능성 캡슐제품의 가공 .....	219
2. Fucosterol을 주원료로 한 항고지혈활성 소재화 .....	220

가. Fucosterol을 주원료로 한 항고지혈활성 음료의 가공 .....	220
나. Fucosterol을 주성분으로 하는 항고지혈증 캡슐제품의 가공 .....	224
제 8 절 기능성분의 대량생산공정 .....	226
1. Single process 공정 .....	226
가. Laminaran의 대량생산공정 .....	226
(1) 생산공정 .....	226
(2) 공정요건 및 특성 .....	227
(3) 대량생산공정의 산업 적용성 .....	228
나. Fucoidan의 대량생산공정 .....	229
(1) 생산공정 .....	229
(2) 공정요건 및 특성 .....	230
(3) 대량생산공정의 산업 적용성 .....	230
다. Fucosterol의 대량생산공정 .....	231
(1) 생산공정 .....	231
(2) 공정요건 또는 특성 .....	231
(3) 대량생산공정의 산업 적용성 .....	231
2. Multiple process 공정 .....	232
가. Laminaran, fucoidan, alginate, fucosterol의 일괄분리 공정 .....	232
(1) 생산공정 .....	232
(2) 공정요건 및 특성 .....	232
(3) 대량생산공정의 산업 적용성 .....	233
제 9 절 해조 기능성물질 생산의 경제성 검토 .....	235
<b>제 5 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....</b>	<b>239</b>
<b>제 6 장 연구개발결과의 활용계획 .....</b>	<b>242</b>
<b>제 7 장 참고문헌 .....</b>	<b>243</b>



여 백

# 제 1 장 연구개발 과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

갈조류로부터 항콜레스테롤, 항고지혈증, 면역 및 항종양활성을 갖는 fucosterol 및 laminaran의 효과적 분리, 정제 및 산업적 생산공정 기술의 개발

## 제 2 절 연구개발의 필요성

소득수준의 향상 및 사회 환경의 변화에 따라 우리 식생활은 균형있는 영양섭취가 점점 어려워지고 과도한 스트레스 및 운동부족 등에 기인하여 비만, 고혈압, 심장병, 당뇨병 등 각종 성인병이 급격히 증가함에 따라 이들 질병의 예방이나 발병 지연 및 치료에 많은 관심이 집중되고 있다.

최근 들어 이러한 질병의 예방 및 치료용 생리활성 물질을 천연물에서 찾고자 하는 노력이 전 세계적으로 활발하게 이루어지고 있는 가운데 아직까지 육상생물 자원에 비해 생리활성 물질에 대한 충분한 연구가 이루어지지 못한 해양생물 자원으로부터 새로운 생리활성 물질의 탐색 및 활용을 위한 연구개발 노력이 급격히 증대되고 있다.

해양 생태계는 기초 생물자원이 육지와 마찬가지로 광합성에 의해 생산되지만 염분 함량이 높고 빈 산소 환경이라는 특성 때문에 생물들의 생체 방어기작 자체가 육상 생물과는 크게 다를 수밖에 없으며 이 때문에 다종다양한 생리적 기능활성 물질의 원료 소재로서 관심의 대상이 되고 있고 최근 들어 일부 선진국을 중심으로 신소재의 탐색 및 생산을 위한 연구개발이 경쟁적으로 이루어지고 있는 추세에 있다.

최근 급격히 증가하고 있는 고혈압은 모든 순환기계 질병의 원인이 되는 동시에 뇌출혈, 심장병 및 신장병 등과 함께 합병증으로 나타날 경우 치사율이 매우 높은 만성퇴행성 질환으로 40대 이후의 중·노년층의 발병률이 15-20%인 것으로 의학계에서는 추정하고 있다.

이미 고령화 사회에 접어든 우리나라에서도 건강에 대한 관심이 고조되고 있으며 건강식품의 시장규모도 매년 증가되고 있어 향후 관련 제품의 시장성이 매우 클 것이다. 특히 기능성 식품을 필두로 예방의학의 중요성이 부각되고 있는 바 관련 제품들에 대한 잠재적 수요는 폭발적으로 증가할 것으로 사료된다.

이러한 여건과 관련하여 해조류는 해양생물 자원 중에서 기술적, 경제적 및 사회문화적 측면 등 여러 관점에서 기능성 식품소재로서의 연구개발의 기대치가 큰 것으로 평가되고 있다.

먼저 기술적 측면에서 살펴보면, 다시마, 미역, 툇과 같은 갈조류에는 다양한 생리기능성 물질이 풍부하게 존재하여 기능성 식품소재 및 의약품 소재로의 고도 이용이 기대되는 것으로 최근의 연구에 의해 속속 밝혀지고 있다.

갈조류의 특수 영양성분 중 fucosterol은 혈중 콜레스테롤을 감소시키는 기능을 갖고 있는 스테로이드 물질 군에 속하는 물질중의 하나로서 일부 선행 기초연구 결과 혈중 콜레스테롤 억제 작용, 간장에서의 콜레스테롤 합성조절 기능, 혈전생성 억제 및 기 형성된 혈전의 조기 용해 가능성 등이 보고되고 있다.

Laminaran은 갈조 특히 다시마에 다량 함유된 저장 다당류의 하나로서 육상식물의 전분에 상당한다. 대부분이 D-glucose 잔기로 되어 있으며 주체는  $\beta$ -1,3결합으로, 거기에  $\beta$ -1,6결합이 소량 혼합되어 있으며 구성 glucose 분자의 수가 냉수 가용성 laminaran은 16개, 냉수 불용성 laminaran은 22개 정도의 소형 다당이라는 사실이 밝혀졌다.

Laminaran의 생리활성에 관한 연구들은 대부분 laminaran 황산 에스테르 유도체를 중심으로 항종양활성, 항혈액응고작용 및 항고지혈증 활성 등을 검토한 결과 현행 혈전용해제로 사용되는heparin과 유사한 강도의 항혈액응고 및 항고지혈증 활성이 있는 것으로 보고된 바 있으며 동맥경화의 억제 기능성에 대해서도 크게 기대되는 물질로 알려지고 있으나 천연상태의 laminaran 자체에 대한 기능활성은 아직 밝혀진 바가 많지 않으나 분자구조 특성상 기능활성 잠재력이 매우 클 것으로 기대된다.

이처럼 갈조류 함유 다당 중 laminaran 및 지용성 물질인 fucosterol의 생리기능성이 일부 선진국의 선행 기초연구로서 부분적으로 밝혀지고 있으나 객관적 기능성과 경제성을 갖춘 기능성 식품 신소재화를 위한 연구 및 기술개발은 아직 본격적으로 이루어지지 못하고 있어 이들 기능성분 제제의 수요가 많고 함유 원료인 갈조류의 생산여건이 좋은 국내 여건을 감안할 때 정책지원을 받는 기술개발 기획과제로서 집중적 연구개발의 필요성이 클 것으로 사료되었다.

또한 경제·산업적 측면에서도 해조류로부터 고부가가치 생리활성 물질의 분리 이용에 관한 연구는 긴요한 것으로 평가되어 왔다. 즉, 국내 연근해 수산물 중 해조류의 생산비중, 특히 양식생산 비중이 높아 지선 어민의 주요 소득원일 뿐 아니라 주요 식품소재로서의 위치를 점하고 있다. 해조류 중 다시마, 미역, 툇 등 갈조류는 대부분이 인공 양식되어 식용으로서 내수 소비

또는 가공품으로서 수출되어왔으나 인근 중국 등과의 수출경쟁력 약화, 내수 소비의 정체에 따른 과잉생산 등의 문제 때문에 고부가가치 활용이 긴요한 실정이다.

뿐만 아니라, 해조류는 대부분 단기간에 생육되어 대량생산되며 수분이 많아 신선한 상태로 장기저장이 어려운 문제점이 있어 주로 식용소비에 국한된 특성 때문에 현재와 같은 기존 단순가공 제품 위주의 소비정체 상황에서는 새로운 부가가치 창출이 가능한 이용기술의 개발이 긴요한 원료적 특성을 갖고 있다. 해조류 중 다시마 등의 갈조류에는 다양하고 강력한 생리활성 성분을 다량함유하고 있어 이들 유효성분의 개발 여부에 의해 획기적인 부가가치 창출을 기대할 수 있을 것으로 보이나 관련 기술개발은 이루어지지 못하고 있는 실정이다.

이와 같은 해조류의 고부가가치 활용을 위해서는 기존의 식용 위주의 소비를 탈피하여 질병의 예방치료에 도움을 줄 수 있는 새로운 기능성 식품 소재화 기술을 적극 개발하여 관련 산업을 육성 발전시킴으로서 인류 건강 증진에 크게 기여하고 해조 자원 부가가치의 획기적 증대를 동시에 추구하는 방향으로 기술개발이 이루어질 필요가 있다.

사회·문화적 측면에서도 해조류는 고부가가치 활용 소재로서의 기대를 모아왔다. 우리나라는 국민 1인당 연간 해조류 소비량이 12 kg 수준으로서 일본을 제외한 대부분의 국가에 비해 식용 소비량이 많으며 이 때문에 해조류의 생산기반도 튼튼한 실정이다. 전통적으로 미반을 주로 하는 한국인의 식생활에서 해조류는 탕류 및 반찬류의 소재로서 주로 이용되어 왔으며 산후 조리 식으로서도 애용되어온 주요 식품소재의 위치를 점하여왔다.

이러한 해조류는 저열량의 성분특성 때문에 다이어트 식품소재로서 보편적으로 인식되고 있는 것 외에 주로 순환기계 성인병의 예방 및 치료효과가 기대되는 생리기능성분의 함유가 알려지면서 기능성 식품소재로서 개발 필요성이 최근 강조되고 있는데, 이는 육지와 달리 고 염분, 빈 산소 및 광합성 제한 환경에서도 단기간에 왕성한 생육특성을 보이며 해양생태계 내에서 어패류의 중요한 먹이사슬의 중요한 구성요소로서의 역할을 하는 해조류의 조체성분 특이성 때문에 조체에 함유된 생리기능성분은 특별한 관심의 대상이 되어왔기 때문이다. 뿐만 아니라 지표면의 70% 이상을 점하는 해양 수계를 토대로 한 인류의 미개발 자원으로서의 육상자원의 한계와 비례하여 수산자원의 이용에 대한 기대가치도 그 만큼 증대되어 옴으로서 기존의 단순가공 식품소재화 차원에서 기술위주의 새로운 고부가가치 활용 필요성이 강조되어 왔다.

이러한 제반 여건을 감안하여 본 연구에서는 갈조류로부터 주요 성인병의 예방과 관련한 생리활성 중 항콜레스테롤, 항고지혈증, 면역활성 및 항종양활성 등이 우수한 것으로 알려진 fucosterol과 laminaran의 효과적 분리, 정제 및 산업적 생산공정 기술을 개발하고자 하였다.

## 제 2 장 국내·외 기술개발 현황

### 1. 외국의 경우

본 연구과제에서 연구개발 대상으로 한 해조류 유래 기능성 물질들에 관한 국내·외 연구개발 동향을 살펴보면 다음과 같다.

우선, 외국의 연구개발 사례 중 laminaran에 관한 연구사례를 살펴보면 다음과 같다. Laminaran의 미세구조에 관한 것으로서는 다시마속과 대황속 laminaran에 관한 연구결과들이 일부 보고되어 있다. Laminaran의 생합성에 관해서는 지금까지 잘 알려져 있지 않으나 색소체 기원의 소포체 중에 저장되어 있는 것으로 알려져 있다.

Laminaran은  $\beta$ -1,3-glucan을 기본구조로 1,6사슬 결합을 함유하고 있는 직쇄상의 다당으로서 다시마 등 갈조류에 다량 함유되어 있으며 물에 쉽게 용해되는 가용성 laminaran과 냉수에서는 용해되지 않는 불용성 laminaran으로 분류되고 현재 어류의 면역활성 인자로 활발히 연구되고 있으나 식품으로의 연구는 거의 전무한 실정이다.

Laminaran과 유사한 다당으로는 현재 일본에서 항암제 보조제로 사용하고 있는 Schizophyllan 등이 있는데 강한 면역 증진 작용이 보고되고 있다. 또한 효모 및 버섯류에도 알려져 있는 강한 면역 활성 성분작용이  $\beta$ -glucan에 기인한다는 것이 알려져 있다.

현재까지 보고된 바에 의하면  $\beta$ -1,3-glucan(1,6사슬함유) 다당의 사슬이 3중 helix 구조 여부 및 1,6결합 사슬의 취환 위치와 분자량 크기에 따라 활성의 차이가 매우 크며 이들 다당의 면역 활성은 비특이 면역세포인 macrophage의 활성이 주 요인인 것으로 알려지고 있다.

Laminaran의 분자구조와 관련해서는 구성 glucose의 잔기수(DP)는 모두 20-30 이지만, 가용성 laminaran 은  $\beta$ -1,3 결합을 하는 glucose 잔기 가운데 2-3곳에  $\beta$ -1, 6 결합으로 되어 있고, 불용성 laminaran은  $\beta$ -1,6 결합이 없는 것으로 알려져 있다.

또한 가용성 laminaran분자 가운데 약 75%가 환원말단에 1분자의 mannitol이 결합하고 있지만, 불용성 laminaran은 약 46%가 분자의 환원말단에 mannitol이 존재하고 있다. 이에 반해 일본산 대황에 함유되어있는 laminaran은 DP가 22개 전후이며 대부분이 가용성이다. 일부 선행연구에 의하면 laminaran이 전분 등과 같은 저장성 다당이라는 것은 탄소동위원소를 이용하여 증명된 바 있다.

이와 같은 특성을 갖는 laminaran의 추출 및 정제에 관한 선행연구에 의하면 1년 중에 조체성분의 축적량이 가장 높은 8월에 채취한 대황조체를 가열 추출한 후 염기성초산염을 가하여 침전시키고 그 여액 중에 남아있는 아연을 황화수소를 이용하여 제거한 후 저온 감압하고 셀로판막 투석 및 methanol 첨가 침전생성법에 의한 crude laminaran의 제조법이 보고된 바 있으나 원료의 수확시기에 따른 영향이 크며 수율이 높지 않고 생산비용 및 안전성 등에서 문제점이 있는 것으로 알려져 있다.

다시마로부터 불용성 laminaran의 추출과 정제방법도 일부 알려져 있는 바, 건조 다시마를 원료로 하여 묽은 염산과 formaldehyde 혼합액으로 가온 추출한 다음 실온 정치하여 형성된 냉수 불용성 crude laminaran 침전을 원심분리 하여 취하고, ethanol과 ether로 처리하고, 감압건조하고 다시 열수용해 및 냉수 침전 과정을 반복하여 정제된 crude laminaran을 얻을 수 있다는 선행 기술이 보고되어 있으나 정제도, 수율, 안전성 측면에서 문제가 있는 것으로 알려지고 있다.

영국 옥스퍼드대학에서는 황산 laminaran을 이용하여 혈액응고 억제활성을 조사하였고, 이스라엘의 한 대학병원에서는 황산 laminaran을 이용하여 혈액응고제인 헤파린과의 상승작용 및 항종양활성을 연구하였다. 러시아에서는 해조로부터 laminaran을 제조하는 효과적인 방법을 개발하였는데, 이 방법은 산용액으로 2단계 추출하고, 산성다당류를 침전시켜 원심분리로 제거한 후 ethanol로 laminaran을 침전시켜 여과하여 crude laminaran을 제조하였다. 위에서 살펴본 바와 같이 세계 각국에서 laminaran에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있음을 알 수 있다.

또한, fucoidan은 L-fucose와 에스테르 황산을 주체로 하는 황산다당류로 역시 갈조류에 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있으며 항종양, 항혈액응고, 항염증 활성 등의 생리 기능성이 알려지면서 일본 등 몇몇 기술 선진국에서 다양한 형태로 제품화되고 있다. 일본에서는 최근 몇 년 사이 산업적인 면에서 급격한 성장을 보여주고 있으며, 특히 2003년 이후 fucoidan을 이용한 특정 보건용 식품 신청 및 정제, 과립, 캡슐, 드링크를 포함하여 차, 유제품, 화장품까지 다양한 제품개발이 이루어지고 있다.

또한 fucosterol에 관한 선행연구도 일부 알려져 있으나 다양한 연구개발 결과는 접하기 어려운 실정이다. Fucosterol은 관련 기초 생리작용 연구 결과 혈전용해효소와 활성인자의 생성을 촉진한다는 사실이 알려져 있다. 세포배양액에 해조 Sterol을 첨가하면 Plasminogen활성화 인자의 양이 sitosterol에서는 대조구의 약 3배, fucosterol에서는 약 7.2배로 증가 하였다는 선행 연구결과가 알려져 있다.

이러한 특성을 갖는 fucosterol은 선행 연구에서 그 함량과 특성을 살펴보면 해조류 중 미역과 툇에 50-80 mg/100g 함유되어 있으며, 혈전용해작용이 있는 것으로 보고되고 있다. Fucosterol은 대부분의 유기용매에 용해되고 분자량 412.70으로 혈중 콜레스테롤 함량을 떨어뜨리는 작용을 한다고 보고된 바 있다.

## 2. 국내의 경우

국내의 경우는 기존 식품첨가물로 이용되고 있는 알긴산, 카라기난 및 한천을 이용한 생리기능성의 연구와 함께 최근부터 fucoidan 등 기능성 해조성분에 관한 기초연구가 활발해지고 있는 가운데 다양한 연구개발이 이루어지고 있는 실정이나 본 연구에서 추구하는 laminaran이나 fucosterol의 분리 이용에 관한 연구는 극히 일부의 단편적인 기초연구 외에 찾아볼 수 없는 실정이다.

국내의 해조류 관련 기능성 식품 연구와 관련하여 주요 선행연구로서는 미역 및 다시마 등의 갈조류에서 추출한 알긴산을 저분자화 하여 콜레스테롤 저하기능의 건강기능식품 형태로 산업화 된 바 있으며, 비만, 지질대사 개선, 항암, 혈액순환 개선 등의 기능성 발현을 목표로 한 다양한 연구개발이 진행 중에 있으나 아직까지 획기적인 연구개발 결과는 알려지지 않고 있는 실정이다.

이외에 fucoidan을 이용한 기능성 식품으로는 다시마 및 미역을 이용한 기능성 건강음료의 제법 [출원번호: 2003-0006112; 2003-0006111], 다시마와 후코이단을 함유한 스트레스 해소음료의 제법 [출원번호: 1999-0035525]등이 특허출원 되어있으나 상업적으로 이용되고 있지 못하고 있으며, 최근에 정책지원에 의한 fucoidan의 대량생산을 목표로 하는 민간부문의 상업적 생산시설이 갖추어져 있으나 fucoidan의 효율적인 추출 및 제조에 관한 독자적 생산공정 기술(선진국의 기존 특허기술 감안)의 확보 문제, 전임상 및 임상실험 등 객관적인 효능평가, 건강기능식품 관련 법규에 부합한 Health claim 가능 식품 또는 소재화 관련 문제, 건강기능식품화를 위한 Formulation 기술 등 향후에도 해결해야 할 문제들이 있는 것으로 사료되고 있는 실정이다.

이러한 제반 여건을 감안할 때 국내에서 다량 생산되고 있는 갈조류에서 다양한 생리기능 특성을 보유하고 있는 것으로 알려진  $\beta$ -Glucna 성분의 laminaran과 인체내에서 Cholesterol과 길항작용이 있는 fucosterol을 추출, 분리 및 수식을 통하여 생리활성이 우수한 성분을 생산하여 기능성 식품 소재로 활용하는 것은 학술, 산업 및 경제적 차원에서 연구개발의 시의성 및 의의가 클 것으로 사료된다.

이는 육지와는 달리 넓은 바다에서의 생산 잠재력이 클 뿐만 아니라 질병의 예방과 치료 효과를 식품소재에서 추구하는 새로운 생리활성 식품소재에 대한 소비수요가 국내외에서 급증하고 있어 해조류로부터의 생리활성물질 생산에 따른 고부가가치의 실현이 기대되기 때문이다.



## 제 3 장 재료 및 방법

### 제 1 절 실험재료

실험에 사용한 시료는 종별 및 산지별 미역류 4종과 다시마류 5종을 비롯하여 미역포자엽, 미역 줄기, 툇, 곰피, 쌍발이모자반, 대황, 감태, 지충이, 팽생이모자반 등 주요 갈조류와 참고용 시료로서 청각, 파래, 진두발, 함초 등 총 23점의 시료를 대상으로 하였다. 생 원료는 산지에서 직접 구입 확보하거나, 시장에서 신선한 상태 또는 건제품 형태로 구매한 다음 (필요한 경우 수돗물로 가볍게 수세하여 조체 표면의 염을 제거하였음) 함수량 5% 이하까지 열풍건조(40℃에서)하고 40 mesh 전후로 분쇄한 것을 방습포장 하여 실온 보관하였다.

Table 1. 시료의 세부 내역

시 료		시료의 내역		
일반명	학 명	생산시기	산지	비 고
미역 1	<i>U. pinnatifida</i> 1	2001년 12월	완 도	자연산 열풍(40℃)건조
미역 2	<i>U. pinnatifida</i> 2	2001년 3월	기 장	자연산 건조품
미역 3	<i>U. pinnatifida</i> 3	2001년 3월	울 산	자연산 건조품
쇠미역	<i>C. costata</i>	2001년 5월	강 룡	자연산 건조품
미역 포자엽	<i>U. pinnatifida</i> *	2001년 4월	강 룡	자연산 건조품
미역 줄기	<i>U. pinnatifida</i> **	2001년 12월	완 도	자연산 열풍(40℃)건조
툇	<i>H. fusiformis</i>	2001년 12월	완 도	자연산 열풍(40℃)건조
다시마 1	<i>L. japonica</i> 1	2001년 4월	강 룡	자연산, 자연건조품
다시마 2	<i>L. japonica</i> 2	2001년 9월	백령도	자연산, 자연건조품
다시마 3	<i>L. japonica</i> 3	2001년 8월	백령도	자연산, 자연건조품
다시마 4	<i>L. japonica</i> 4	2001년 7월	완 도	양식산, 자연건조품
개다시마	<i>K. crassifolia</i>	2000년 10월	강 룡	자연산, 자연건조품
곰 피	<i>E. stolonifera</i>	2001년 11월	부 산	자연산, 자연건조품
쌍발이모자반	<i>S. patens</i>	2001년 11월	여 수	자연산, 열풍(40℃)건조
붉은 땀띠	<i>K. perforata</i>	2001년 12월	고 성	자연산, 열풍(40℃)건조
청 각	<i>C. fragile</i>	2001년 12월	완 도	자연산, 열풍(40℃)건조
파 래	<i>U. lactuca</i>	2001년 12월	완 도	자연산, 열풍(40℃)건조
대 황	<i>E. bicyclis</i>	2001년 4월	울릉도	자연산, 자연건조품
감 태	<i>E. cava</i>	2001년 12월	여 수	자연산, 자연건조품
지 충 이	<i>S. thunbergii</i>	2001년 12월	여 수	자연산, 자연건조품
팽생이모자반	<i>S. horneri</i>	2001년 12월	여 수	자연산, 자연건조품
진 두 발	<i>C. pinnulatus</i>	2001년 12월	여 수	자연산, 자연건조품
합 초	<i>S. herbacea</i> L.	2001년 12월	백령도	자연산, 열풍(40℃)건조

\* : *U. pinnatifida* (sporophyte), \*\* : *U. pinnatifida* (stalks)

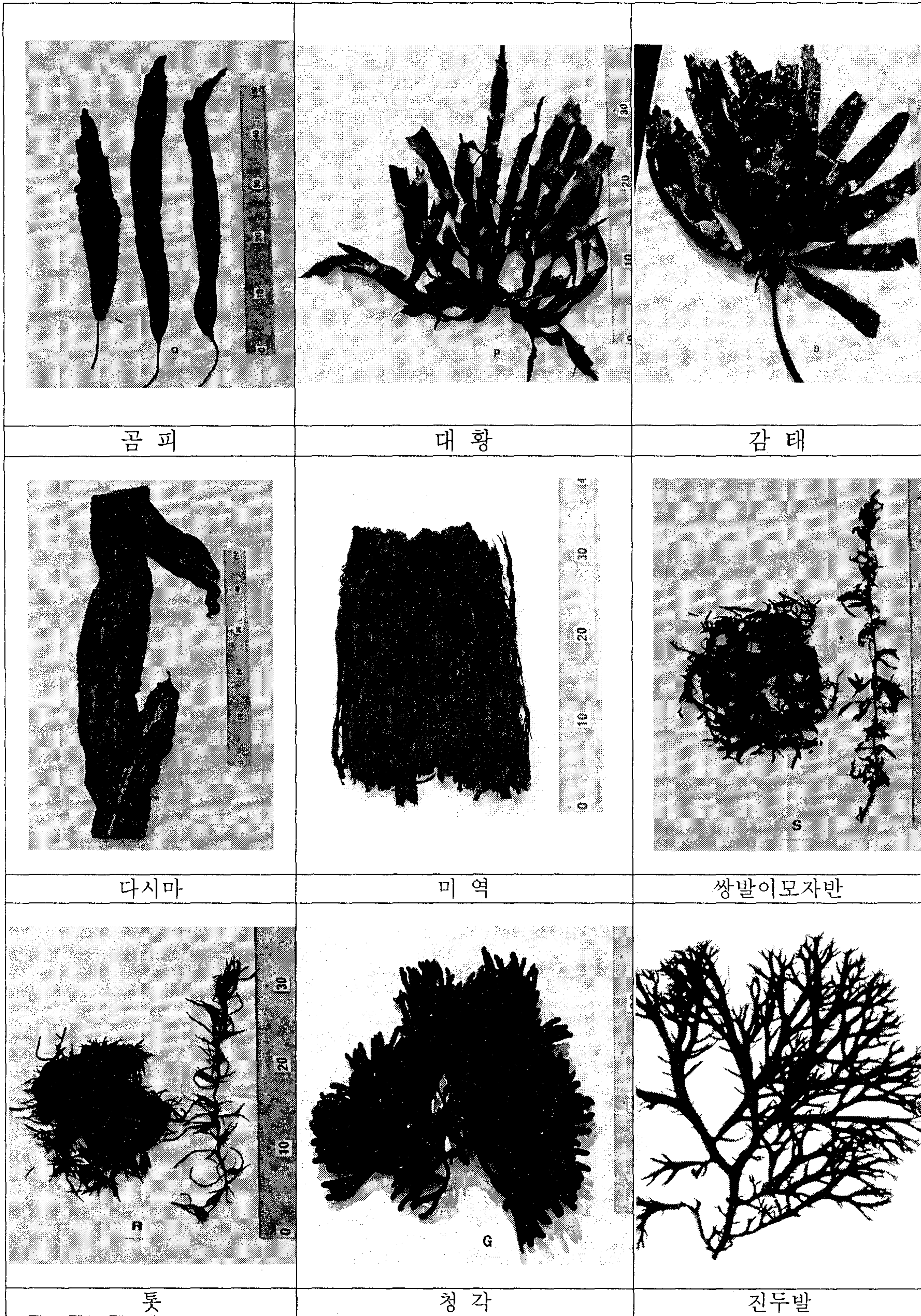


Fig. 1. 주요 원료 해조류의 모양

## 제 2 절 실험방법

### 1. 일반성분

일반성분은 AOAC(1996)의 방법에 따라 측정 하였다. 즉, 수분은 상압가열건조법, 조지방은 Soxhlet 추출법, 조단백질은 Kjeldahl법, 회분은 건식회화법으로 각각 측정하였다.

### 2. 무기질

무기질성분은 시료를 완전히 건조시킨 뒤 110°C에서 24시간 산 가수분해한 다음 유도 결합플라즈마 방출분광기(ICP Atomic Emission Spectrometer, Thermo Jallell Ash ICP-IRIS)를 사용하여 정량하였다(Ruperez(2002)).

### 3. 식이섬유

식이섬유 함량은 Prosky 등(1988) 및 Lee(2001)의 방법으로 정량하였다. 즉 건조 시료 1 g을 500 mL tall beaker에 취하고 MES [2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid] - Tris [Tris (hydroxymethyl) aminomethane] buffer solution (0.05 M MES, 0.05 M TRIS, pH 8.2, 24°C) 40 mL에 완전히 분산시킨 다음 heat-stable  $\alpha$ -amylase solution 50  $\mu$ L를 넣고 water bath(95-100°C)에서 15분간 가열교반하고 냉각(60°C)하였다. 여기에 protease [50 mg protease/mL MES-TRIS buffer] 100  $\mu$ L를 가해 incubation(60°C, 30 min)하고 pH조정 후 (4.0-4.7) amyloglucosidase 300  $\mu$ L를 넣고 다시 incubation(60°C, 30 min)한 다음 filtering crucible로 거른 것을 10 mL 증류수(70°C)로 세척, 78% ethanol, 95% ethanol 및 acetone 15 mL로 2회 세척하였다. Crucible에 남은 잔사 105°C에서 건조 후 칭량하여 불용성 식이섬유 (insoluble dietary fiber, IDF)로 하고 여액은 60°C ethanol을 여액의 4 배(v/v)만큼 가하여 실온에서 1시간 침전시킨 후 재여과하였으며 이때 침전물을 78% ethanol, 95% ethanol 및 acetone 15 mL로 2회 세척하고 105°C에서 건조 후 칭량하여 수용성 식이섬유(insoluble dietary fiber, IDF)로 하였다. 총 식이섬유는(total dietary fibers, TDF) 상기 IDF와 SDF의 합으로 하였다.

### 4. Betaine

Betaine의 함량 분석은 Kim 등(2004)의 방법으로 분석하였다. 즉, 건조분말 시료 5 g에 100 mL의 증류수를 가한 후 교반과 함께 24시간 추출하고 여과한 여액을 분석 대상으로 하였다. 여과한 추출액은 15 mL 정도가 되게 한 후 이 농축물을 양이온과 음이온의 이온교환수지에 통과시켰다. 각각의 starter buffer는 50 mM acetic acid와 20 mM ethanolamine을, regeneration buffer는 50 mM acetic acid + 1 M NaCl과 20 mM ethanolamine + 1 M NaCl을 사용하였으며, 각각의 buffer용 시약은 1 급용(Sigma, USA) 시약을 사용하였다. 이온교환 후 감압 농축하여 10 mL가 되도록 하였고, 0.7% 내외의 묽은 염산과 3차 증류수를 이용하여

최종부피를 15 mL, pH 1로 맞추었다. 여기에 Reinecke salt(Sigma, USA) 용액 5 mL을 혼합하였다. Reinecke salt용액은 Reinecke salt를 이용하여 1.5 mg/100 mL의 농도로 용해시켰으며, 염산을 이용하여 pH 1로 맞추었다. 혼합액을 3시간 동안 4°C에서 냉장 보관하였다. 이후 침전물을 사이즈 2G2 유리여과기를 사용하여 침전물 여과를 실시하였다. 이 침전물을 95% EtOH에 녹여서 50 mL conical tube에 담은 후, 감압농축기(50°C)로 수분을 완전히 제거하였다. 여기에 70%(v/v) acetone 25 mL을 넣어 침전물을 용해시켰으며, 이 용액을 O.D. 525 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 5. 총당의 정량

총당의 함량은 glucose를 표준품으로 하여 페놀-황산 법(Dubois et al.(1956))으로 측정하였다.

## 6. 총 phenol의 정량

Phenol성 물질은 항산화 및 항종양 활성 등이 기대되는 기능성분으로서 해조류 중의 총 phenol 함량을 측정하였다. 즉, 각 해조의 1% 메탄올 추출물의 총 phenol 함량을 tannic acid를 사용한 검량선을 기준으로 660nm에서 흡광도를 측정하여 나타내었다.

## 7. 황산기의 정량

황산기의 함량은 Dodgson과 Price(1962)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 시료 10 mg을 취한 후 1 N HCl을 가하여 110°C에서 5시간 가수분해하고 시료용액 0.2 mL에 3% TCA 용액 3.8 mL와 BaCl<sub>2</sub>-젤라틴 용액(젤라틴 1 g을 60-70°C의 증류수 200 mL에 녹여 12시간 냉장 보존한 젤라틴 용액에 1 g의 BaCl<sub>2</sub>를 용해시켜 2-3시간 방치) 1 mL를 가하고 교반하여 실온에서 20분간 방치한 후 360nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량선은 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용하여 작성하였다.

## 8. 우론산(Uronic acid)의 정량

우론산의 함량은 Knutson과 Jeanes(1968)의 방법에 따라 가수분해하여 측정하였다. 즉, 시료 5 mg에 90% formic acid 0.5 mL를 가한 후 N<sub>2</sub>치환하여 100°C에서 6시간 1차 가수분해하고, 다시 2.5 mL의 증류수를 가한 후 N<sub>2</sub>치환하여 100°C에서 2시간 2차 가수분해하였다. 가수분해한 시료용액 0.35 mL에 냉 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-borate 시약(H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 24.74 g을 4 M KOH 용액 45 mL에 녹인 후 증류수로 100 mL 정용하고 2.5 mL를 취하여 농 황산용액으로 100 mL 정용) 3 mL를 가하고 4초간 교반하여 냉각하였다. 냉각된 용액에 carbazole용액(carbazole을 에탄올에 녹인 0.1% 용액) 0.1 mL를 가하여 교반한 후 55°C 수욕조 상에서 30분 동안 발색시키고 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량선은 D-glucuronic acid를 사용하였다.

## 9. Fucosterol 추출 및 정제

### 가. Crude fucosterol의 함량 분석

시료 10 g을 round flask에 취하고 Soxhlet 장치에서 에탄올 100 mL(1 M KOH 함유)로 추출하였다(90°C, 2 hr). 추출액을 분액깔대기에 옮겨 70 mL 헥산을 가해 3분간 진탕하여 층분리 후 상층액을 취하고 하부의 액을 30 mL 헥산으로 재분획하여 이전의 상층액과 합한 다음 헥산층이 중성이 될 때까지 수세, 농축한 후 2 mL로 정용하여 GC 분석용 시료로 하였다. Fucosterol 분석시 표준품은 95% fucosterol을 사용했으며, fucosterol 함량은 표준품과 시료의 면적비로 산출하였다.

### 나. Crude fucosterol의 추출특성

원료 해조류에 대하여 1차적으로 에탄올추출(1 M KOH함유) 시간을 1-5시간으로 달리하여 적정 추출시간을 설정한 후 2차적으로 실온 ~ 60°C 범위에서의 추출수율을 조사하여 적정 추출조건을 설정하였다.

### 다. Fucosterol 정제

Crude fucosterol 4 g을 벤젠에 용해시킨 다음 neutral alumina 칼럼으로 분리하였다. 여액중 fucosterol(0.6-2.5 L) 분획을 분취하여 농축하여 건조시켰다. 그리고 이 건조물을 다시 fresh alumina로 크로마토그래피하여 여액을 아세톤으로 결정화하여 부분정제 fucosterol을 얻었다. 부분정제 fucosterol은 다시 10 mL acetic anhydride로 acetylation 시키고 20 mL의 벤젠으로 용해시켰다. 그리고 20% AgNO<sub>3</sub>-silica gel 칼럼으로 크로마토그래피하여 fucosterol acetate 획분을 methanol-benzene 용액으로 결정화하여 순수한 fucosteryl acetate를 얻었다.

### 라. Fucosterol의 구조분석

해조류에서 추출 정제한 fucosterol의 화학적 구조는 TLC, GC/MSD, H-NMR, C-NMR 분석법에 의해 표준품과의 구조의 일치성 여부를 확인하였다.

## 10. Crude fucoidan의 추출 및 정제

### 가. Crude fucoidan의 추출

Crude fucoidan 추출은 Fig. 2와 같이 추출하였다. 즉, 건조 해조분말에 15배의 증류수를 용매로 하여 85°C에서 1시간 추출조작을 3번 반복하였다. 이 추출액을 여과지(whatman No. 41)로 여과한 다음 여액을 중화후 감압 농축하였다. 이어서 CaCl<sub>2</sub>를 가하여 Ca-alginate를 형성시켜 여과 또는 원심분리방법으로 제거하였다. 알긴산을 제거한 추출액에 3배량의 에탄올을 가하여 crude fucoidan을 침전시킨 다음 원심분리(10,000 g×10 min)하고 투석하여 공존하는 염분 등 불순물을 제거한 후 농축 및 동결건조과정을 거쳐 crude fucoidan을 얻었다.

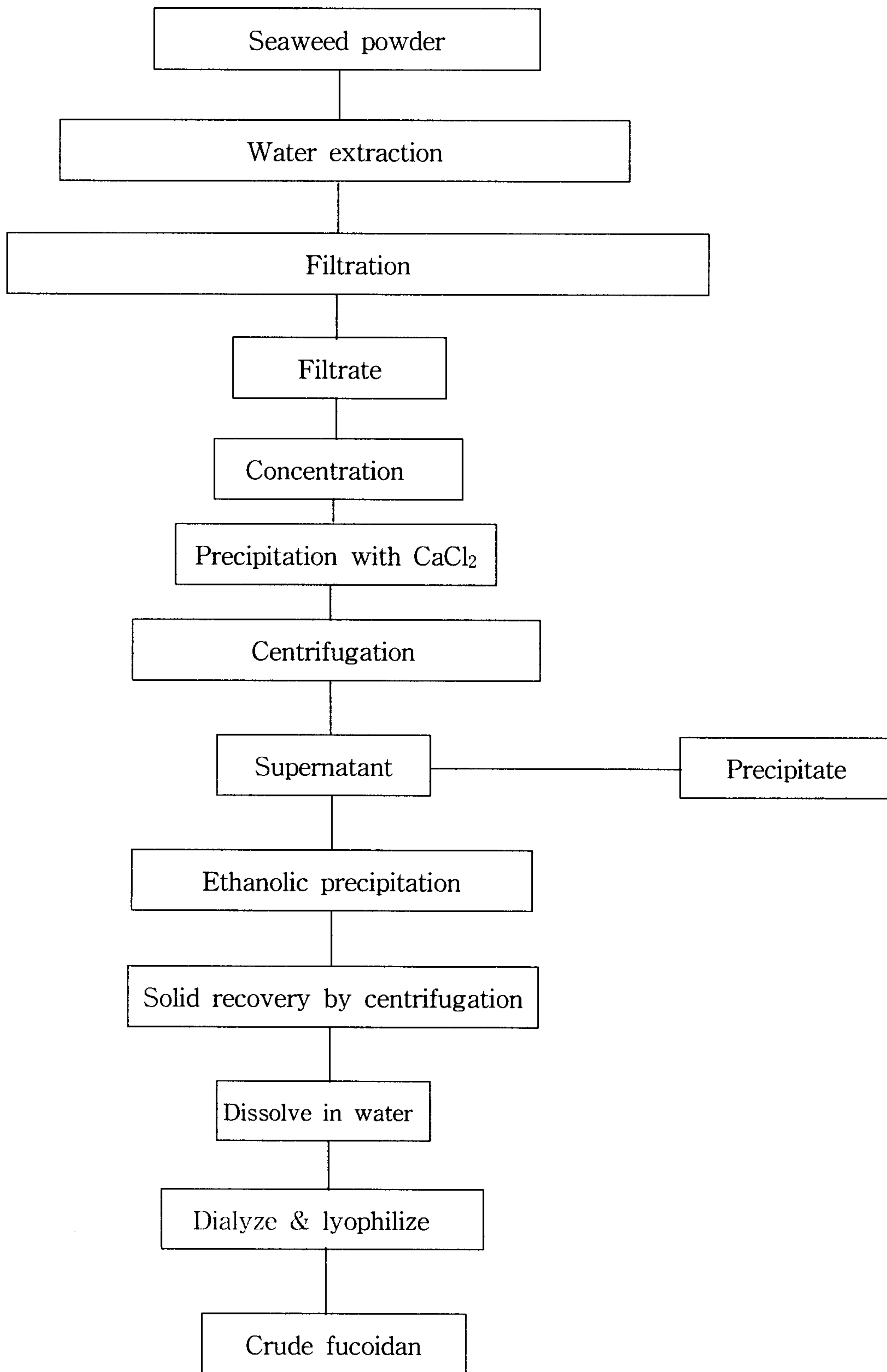


Fig. 2. Extraction procedure of crude fucoidan.

#### 나. Crude fucoidan 정제 및 분획

Crude fucoidan의 정제는 Scot(1987)의 방법에 따라 산성다당과 특이적으로 결합하는 CPC(Cetypyridinium chloride)를 사용하여 Fig. 3과 같이 정제하였다. 즉, 1%의 crude fucoidan 용액에 0.02 M의 황산나트륨( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )을 가하고 5% CPC를 침전이 형성되지 않을 때까지 서서히 첨가한 후 35°C에서 하룻밤 정치시켰다. 그리고 원심분리(4,000 g×15 min)하여 산성 다당 복합체를 얻었다. 이 산성 다당 복합체에 3 M NaCl 용액을 가한 후 35°C에서 48시간 교반하여 산성 다당 복합체에서 CPC를 유리시킨 후 3배량의 E-OH를 가한 다음 원심분리(4,000 g×15 min)한 침전물을 증류수로 투석(MWCO 12,000)한 후 동결 건조하여 fucoidan을 얻었다.

Fucoidan의 분획은 한외여과기를 이용하여 분자량별로 분획하였다. 즉, fucoidan은 대부분이 고분자이기 때문에 1 N HCl을 용매로 사용하여 시료농도를 1%로 용해한 후 60°C에서 90분간 가수분해 후 중화하였다. 그리고 filter paper로 여과한 후 ultrafiltration하였다. 활성이 높았던 ep1 분획은 재차 음이온교환수지(DIAON PA312,  $-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$  (Trimethylammonium))를 이용하여 분획하였다. 먼저 DEAE Sepharose FF( $\text{Cl}^-$  form, Pharmacia)로 충전한 칼럼(5.0×30 cm)을 증류수로 충분히 흘린 후  $\text{Cl}^-$  이온이 검출되지 않도록 수지를  $\text{Cl}^-$  form으로 안정화 시키고, 소량의 증류수에 녹인 시료를 칼럼에 주입하였다. 시료의 용출(60 mL/hr)은 염의 농도를 0.0 M( $\text{H}_2\text{O}$ ), 0.25 M, 0.5 M, 0.75 M, 1.0 M 및 1.5 M이 되게 단계적으로 높여가면서 용출하였고, 용출액을 fraction collector로 12 mL 씩 취하여 황산기와 총당의 함량을 측정하였다. 분획된 획분을 합쳐 염소 이온이 검출되지 않을 때까지 증류수로 투석(MWCO 12,000)한 후 농축, 동결건조하여 정제 fucoidan을 분획하였다.



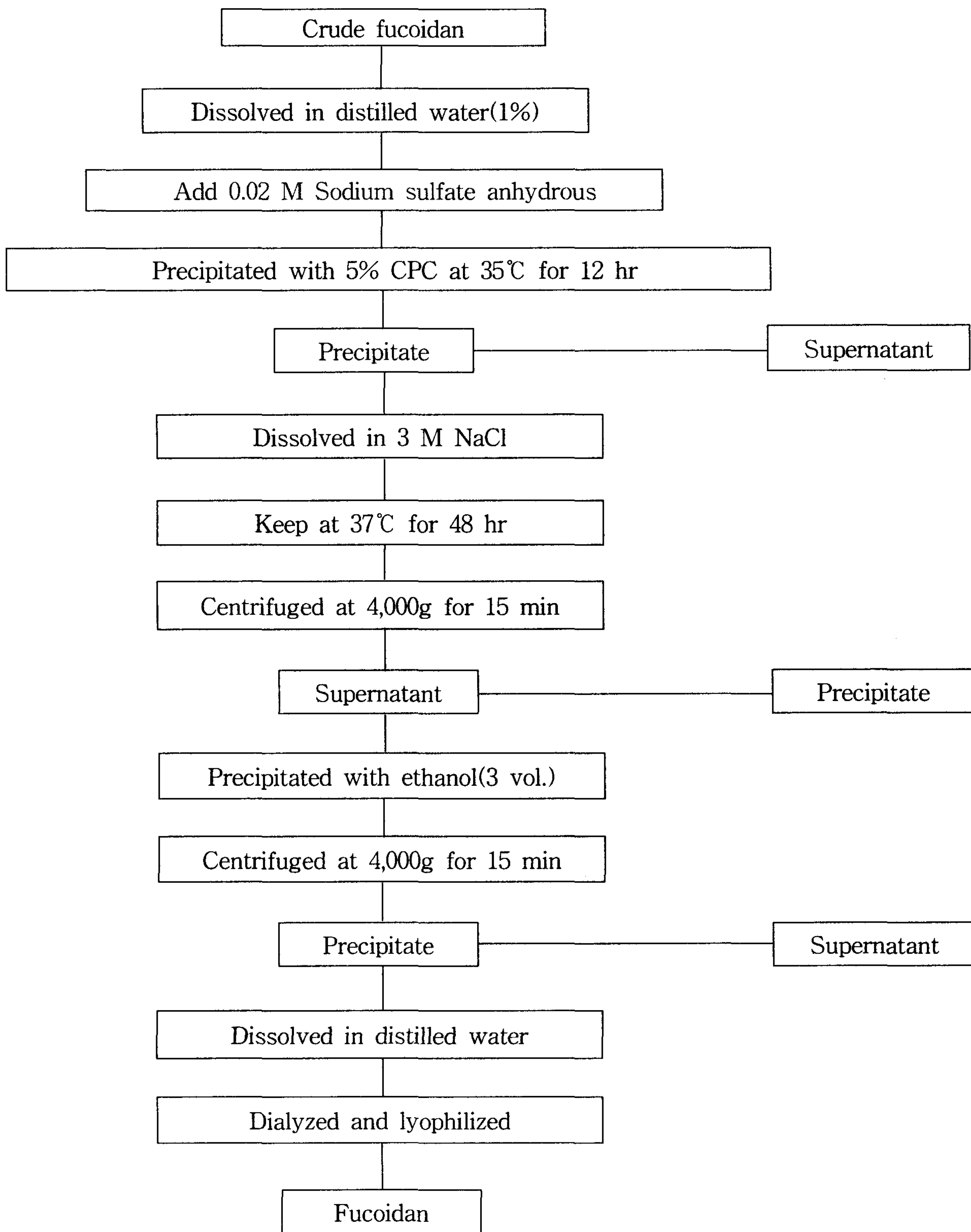


Fig. 3. Purification procedure of fucoidan.

## 11. Laminaran의 추출 및 분리정제

### 가. Crude laminaran 추출

원료해조류로부터 Crude laminaran의 추출은 ① Black et al.(1951)의 방법과 ②열수 추출법으로 구별하여 수율 및 이화학적 조성을 비교하였다.

#### (1) Black et al.(1951)의 방법

Crude laminaran의 추출은 Black et al.(1951)과 같은 방법으로 추출하였다. 즉, 건조 분말시료에 0.09 N HCl을 가한 다음 20℃에서 2시간 교반한 후 원심분리하여 상층액과 잔사로 분리하였다. 잔사는 한 번 더 추출조작을 반복한 다음 상층액을 모아서 에탄올을 85% 되게 가하여 crude laminaran을 얻었다.

#### (2) 열수추출법

열수추출법에 의한 crude laminaran의 추출은 Fig. 4와 같은 실험공정에 의하였다. 즉, 건조 분쇄시료에 증류수를 가한 후 100℃에서 2시간 교반 추출한 다음 sieve(200 mesh)와 거르로 여과 후 잔사는 다시 소량의 증류수를 가하여 여과한 다음 한외여과기(UF, MWCO 10,000)로 농축한 후 투석하였다. 이 투석액을 3배량의 에탄올로 침전하여 crude laminaran을 얻었다.

### 나. Crude laminaran 정제 및 분획

Crude laminaran의 정제 및 분획은 다음과 같이 정제·분획하였다. 먼저 1% crude laminaran 용액에 무수 황산나트륨을 가한 후, 5% CPC를 가하여 37℃에서 2시간 교반하여 침전물인 산성다당과 상층액인 중성다당으로 나누었다. 이 용액을 원심분리(4,000 g×10 min)한 후 상층액을 알콜침전한 다음 다시 원심분리 후 투석, 동결건조하여 laminaran을 얻었다. CPC 침전물인 산성다당은 3 M NaCl 용액으로 용해시킨 후 37℃에서 교반하여 CPC를 제거한 다음 알콜침전 후 원심분리하였다. 원심분리 침전물은 소량의 증류수에 용해한 후 투석한 다음 동결 건조하였다.

Laminaran 정제물의 분획은 Sephacryl S-300 HR 칼럼을 사용하여 분획하였다. 시료를 Tris-HCl buffer(pH 7.0)에 용해시킨 후 0.2 μm filter로 여과하였다. 그리고 Sephacryl S-300 HR column(2.6×60 cm)에 가한 후 각 fraction의 총당 함량을 측정하였다. 그리고 같은 fraction을 모아서 투석(MWCO 5,000)한 다음 동결건조하여 laminaran의 분획물을 얻었다.

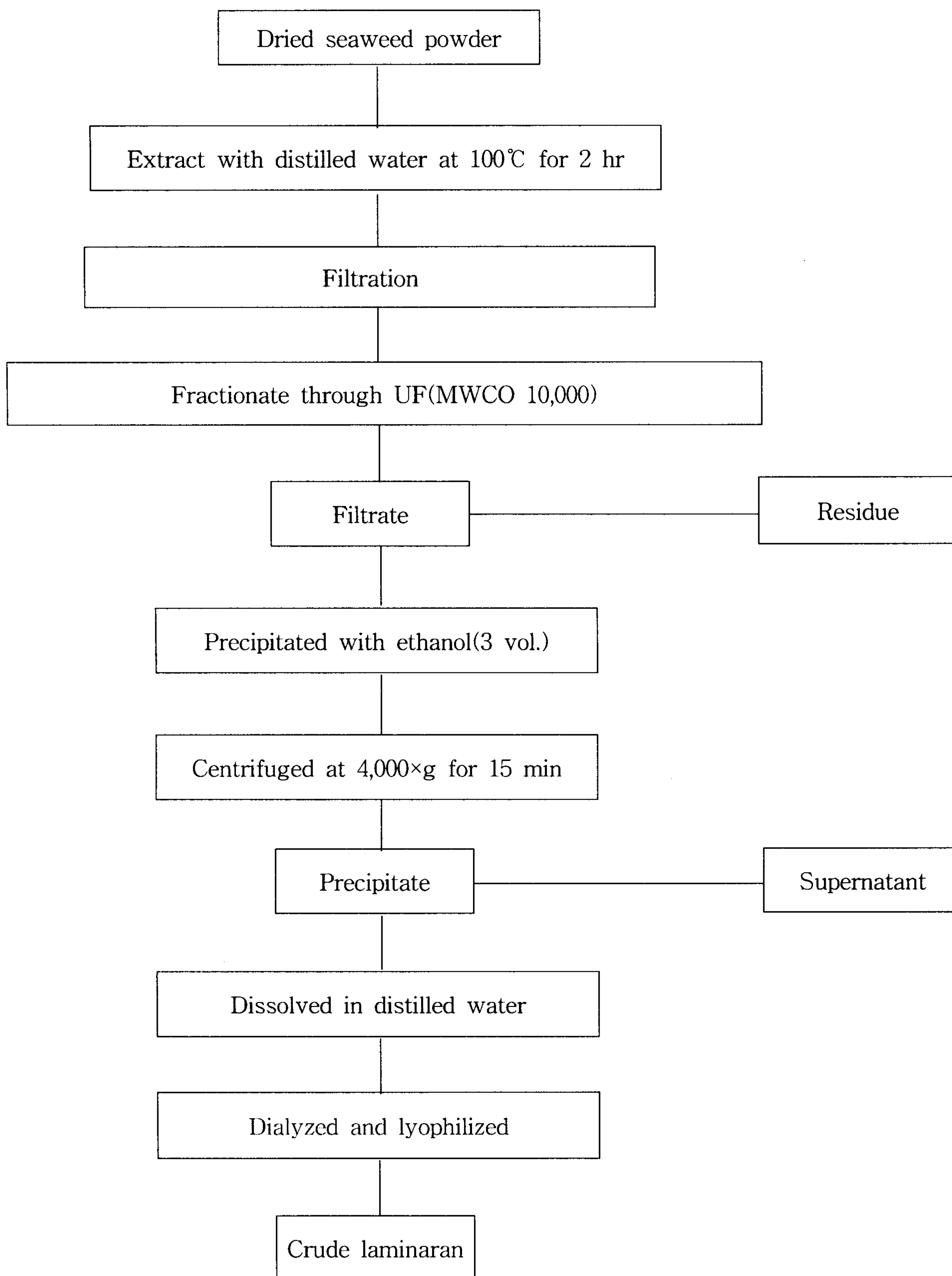


Fig. 4. Extraction and fractionation procedure of crude laminaran.

## 12. Laminaran 및 fucoidan의 수식

### 가. 화학적 수식

#### (1) 황산기 제거

정제 다당의 황산기 제거는 Nagasawa 등(1977)과 Inoue와 Nagasawa(1976)의 방법에 따라 methanol/DMSO로 황산기를 제거하였다. 정제 다당을 소량의 증류수에 녹여 Dowex 50W(X-8, H<sup>+</sup> form, 50-100 mesh)로 충전된 칼럼을 통과시킨 후 용리액을 pyridine으로 중화, 동결건조하여 pyridinium염으로 만들었다. 이 pyridinium염에 10% methanol을 함유한 dimethyl sulfoxide(DMSO) 60 mL를 가하고 100°C 2시간 가열한 다음 동량의 증류수로 희석하였다. 그리고 0.1 M NaOH를 가하여 pH를 9.14로 조정한 후 투석, 동결 건조하였다. 황산기 제거 처리를 하여 황산기 제거 시료를 얻었다.

#### (2) 우론산의 환원

정제 다당의 환원처리는 York 등(1985)과 Taylor 등(1972)의 방법에 의하여 분석하였다. 즉, 시료 25 mg을 deuterium oxide(10 mL)에 녹인 후 250 mg의 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl)-carbodiimidemetho-p-toluenesulfonate (CMC, Sigma)을 가하고 0.1 M HCl 용액(HCl 원액을 희석하여 D<sub>2</sub>O에 녹여서 0.1 M로 조제)으로 pH를 4.75로 유지하였다. 1시간 후 NaBD<sub>4</sub> 용액(D<sub>2</sub>O 5 mL에 NaBD<sub>4</sub> 800 mg을 녹인 용액)을 서서히 가하면서 2.0 M HCl 용액(0.1 M HCl과 동일하게 조제)으로 pH를 7.0으로 유지하고, NaBD<sub>4</sub> 용액을 다 가한 후 30분간 더 반응시켰다. NaBD<sub>4</sub> 용액을 가할 때 거품이 생김으로 octanol을 2-3방울을 가하였다. pH 4.0으로 조정하고 환원된 다당을 하룻밤 투석, 농축한 후 동결 건조하여 우론산 환원 시료를 얻었다.

### 나. 효소적 수식

효소적 수식은 Lee 등(1994)의 방법으로 대황과 다시마에서 각각 추출 및 부분 정제한 laminaran과 fucoidan의 1% 용액에 pronase(Sigma Co.)와 laminase(Sigma Co.)를 가하여 각각 pH 7.5, 37°C에서 1시간, pH 5.0, 37°C에서 한 시간 반응시킨 후 100°C에서 20분간 가열하여 49,000×g에서 20분간 원심분리하였으며, 그 상등액을 모아 72시간 투석한 후 동결 건조하여 효소수식 laminaran 및 fucoidan 시료를 얻었다.

### 다. 정제 및 수식처리 다당(Laminaran, Fucoidan)의 methylation

정제한 다당 및 화학적으로 수식한 시료는 GC/MSD 구조분석을 위해 methylation 하였다. 즉, 시료 5 mg을 teflon-lined 뚜껑이 있는 시험관에 취하고 DMSO 1 mL를 가해서 50°C에서 시료 다당을 녹였다. 극성이 높은 산성다당은 Stevenson 등(1991)의 방법에 따라 다당을 triethylammonium salt 형태로 전환시킨 후 DMSO에 녹였다. 이 시료 용액에 2.5 M

butyllithium solution(in hexane) 0.5 mL를 가하고 40°C에서 1시간 반응시켜 hydroxyl기를 polyalkoxide 이온으로 전환시킨 후 0°C로 냉각하였다. 냉각된 용액에 iodomethane 0.5 mL를 가하고 N<sub>2</sub>로 치환 후 실온에서 1시간 교반하면서 methylation시켰다. methylation된 시료에 chloroform : methanol(2:1)용액 3 mL와 증류수 2 mL를 가하고 교반한 후 원심분리(200 g×60 sec)한 다음 상층액을 제거하였다. 다시 증류수 2 mL를 가하여 교반, 원심분리, 상층액 제거 조작을 4번 더 반복한 후 N<sub>2</sub>로 건조시켰다. 내부 표준물질 myo-inositol을 함유한 2 M TFA(0.2 mg함유) 0.5 mL를 가하고 120°C에서 75분간 가수분해하였다. 40°C 공기로 TFA를 휘발시킨 후 0.26 M sodium borodeuteride 용액(1.0 M 암모니아 용액 5 mL에 NaBD<sub>4</sub> 55.53 mg을 녹인 용액) 0.2 mL 가하고 약하게 교반 후 40°C에서 90분간 환원하였다. 과잉의 borodeuteride는 acetic acid glacial 0.2 mL를 가하여 반응을 정지시키고 40°C 공기로 건조시켰다. 그리고 methanol 0.5 mL를 가하여 교반 후 건조시켜 잔존하는 borate 제거 조작을 2번 더 반복하였다. Acetic anhydride 0.3 mL와 pyridine 0.3 mL를 가하고 교반 후 120°C에서 20 분간 acetylation 시키고 40°C 공기로 건조시켰다. 건조된 시료에 dichloromethane 1.0 mL를 가하고 교반한 후 증류수 0.5 mL를 가하여 교반한 다음 상층액을 제거하고 다시 증류수 1.0 mL를 가하였다. 그리고 다시 교반한 후 dichloromethane 층을 -20°C에서 저장해두고 GC/MSD(HP 5973)로 분석하였다. Partially O-methylated alditol acetate의 동정은 GC-MSD fragment와 retention time을 비교하여 확인하였다.

### 13. *in vitro* 항암활성의 측정

#### 가. 암세포독성의 측정(MTT)

##### (1) 암세포주 배양

실험에 사용한 세포주는 성장 속도가 빠르고 비교적 항암제 감수성이 예민한 위암 세포주 SNU-1, 대장암 세포주 SW 및 자궁암 세포주 HeLa를 서울대학교 의대 암연구소 내의 한국세포주은행(KCLB)에서 분양 받아 -196°C 액체질소 탱크에 보관하여 사용하였다. SNU-1은 RPMI-1640(Life Technologies Inc., USA) 배지에 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco)과 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 72시간 동안 배양하여 실험에 사용하였다(Sugiura et al.(1977)).

##### (2) MTT assay에 의한 암세포독성 측정

SNU-1, SW 및 HeLa에 대한 시료의 세포 독성을 측정하기 위하여 Blois(1958) 방법의 MTT assay를 실시하였다. SNU-1을 7.5×10<sup>3</sup> cells/well 농도로 96 well plate에 130μL 씩 분주하고, 일정농도(1 mg/mL)로 조정된 시료를 well plate에 14.5 μL 씩 첨가한 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 72시간 동안 배양하였다. 72시간 배양 후 인산 생리식염수에 5 mg/mL 농도로 제조한 MTT용액을 한 well 당 14.5 μL 씩 첨가하여 MTT가 생존 암세포의

효소 작용에 의해 환원되도록 4시간 더 배양하였다. 배양 후 각 well 당 DMSO 108.5  $\mu$ L를 첨가해 생성된 formazan 결정을 용해시키고 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 열수 추출물에 대한 대조구는 시료 대신 PBS-buffer 용액을 사용하여 동일하게 실험 하였으며, methanol 및 ethanol 추출물에 대한 대조구는 10% DMSO를 사용하였다. Blank로서는 각 시료에 SNU-1 대신에 배지만을 넣은 후 동일하게 실험하여 측정하였다.

$$\text{Cytotoxicity}(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료의 흡광도} - \text{blank의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}}\right) \times 100$$

#### 나. NO 생성능

NO 생성능은 96-well plate에 시료 및 RAW 264.7( $2 \times 10^5$  cell)을 넣고 48시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 37°C를 유지하면서 배양하였다. 배양액 중의 nitrite 농도는 microplate assay를 이용하여 측정하였다. 먼저 48시간 동안 배양한 후 상정액 50  $\mu$ L aliquots를 취하여 같은 용량의 Griess 시약(1% sulfanilamide/0.1% naphthylethylene diamine dihydrochloride in 2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)을 넣고 실온에서 10분간 반응시켰다(Purnell et al.(1977)). 이때 ELISA reader(Molecular Device, USA)로 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 표준물질로는 sodium nitrite를 사용하였다.

#### 다. 세포자멸사(Apoptosis)

Bcl-2 family에 속하는 여러 단백질들은 apoptosis에서 중요한 역할을 하는데 이들 중 Bax 등은 apoptosis를 촉진하는 역할을 하며, Bcl-2 등은 apoptosis를 억제하는 기능을 가진다고 알려져 있다(Bjorsson and Takida(1978)). 세포자멸사는 Suzuki 등(1980)의 방법으로 측정하였다. 즉, SNU-1 세포주를 6-well에  $1 \times 10^6$  cells/5 mL로 분주하고 laminaran을 농도별로 처리한 후 24시간 배양하였다. 배양한 세포를 120 $\times$ g에서 1분 간 원심분리하여 상등액을 제거한 다음 lysis buffer(50 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.16  $\mu$ M PMSF) 50  $\mu$ L를 첨가하여 -70°C에서 lysis 시킨다. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 위하여 먼저 10% running gel과 4.5% stacking gel을 제조하였다. 이때 분리한 단백질의 농도를 50  $\mu$ g으로 조정하고 95°C에서 5분간 가열한 후 준비된 gel에 분주하여 20 mA에서 전기영동 하였다.

#### 라. Quinone reductase(QR) 유도효과

Quinone reductase(QR)는 phase II 무독화 효소 중의 하나로 돌연변이 또는 발암물질 등에 의한 DNA와의 상호 작용을 차단하는 효소이며, NAD(P)H를 이용하여 quinone류의 환원을 촉매하는 flavoprotein이다. Quinone reductase 활성측정(nmol/min/mg protein)은 다음

과 같이 하였다.

$$* \text{ Specific QR activity} = \frac{\text{absorbance change of MTT/min}}{\text{absorbance of crystal violet}} \times 3345 \text{ nmol/mg}$$

#### 14. *in vivo* 항암활성 조사

##### 가. 실험동물

실험동물은 5주령의 Fisch 344 수컷 흰쥐를 미국 Harlan Sprague Dawley Inc.로부터 구입하여 실험시작 전 1주일동안 대조군식이(CRF-1, Charles River Japan Inc. Co., Tokyo, Japan)로 적응시킨 후 동물의 체중에 따라 난괴법으로 7군[발암유도물질 투여 + 실험대조군(Control), 발암유도물질 투여 + Fucoidan 0.5% diet 혼합실험군(FL), 발암유도물질 투여 + Fucoidan 1% diet 혼합실험군(FH), 발암유도물질 투여 + Laminaran 0.5% diet 혼합실험군(LL), 발암유도물질 투여 + Laminaran 1% diet 혼합실험군(LH), 발암유도물질 비투여 + Fucoidan 1% diet 혼합실험군(TFH), 발암유도물질 비투여 + Laminaran 1% diet 혼합실험군(TLH)]으로 나누어 전암단계의 대장암 항암활성 실험은 8주간, 대장암 중기발암성 실험은 32주간, 간암 중기발암성 실험은 28주간 각각 실험하였다. 실험동물의 체중은 실험사육기간 중 주 2회 오전 중에 측정하였으며, 식이섭취량은 매일 잔량을 측정하여 산출하였다. 동물실험실의 사육조건은 온도 24±2℃, 습도 55-60%를 유지시켰으며 물은 자유공급 하였다(Table 2).

Table 2. *in vivo* 항암활성 실험처리군

Group	Supplement
Control	발암유도물질 투여 + 일반식이 실험 대조군
FL	발암유도물질 <sup>1)</sup> 투여 + Fucoidan 0.5% diet 혼합 실험군
FH	발암유도물질 투여 +Fucoidan 1% diet 혼합 실험군
LL	발암유도물질 투여 +Laminaran 0.5% diet 혼합 실험군
LH	발암유도물질 투여 +Laminaran 1% diet 혼합 실험군
TFH	발암유도물질 비투여 +Fucoidan 1% diet 혼합 실험군
TLH	발암유도물질 비투여+Laminaran 1% diet 혼합 실험군

<sup>1)</sup> DMH or DEN

#### 나. 대장암 발생유도를 위한 발암물질의 투여

대장 발암물질인 DMH(2,6-dimethylhydrazine)를 30 mg/kg/bw로 Buffer (0.9% saline, 1 mM EDTA, 10 mM sodium citrate : pH 6.5)에 용해하여 두경부 피하로 주 2회씩 총 5회 투여하였다.

#### 다. 간암 발암물질의 투여

간암 발생을 유발시키기 위해 diethylnitrosomin(DEN; N0756, Sigma, USA)을 처리하였다. DEN을 DMSO에 용해하여 mini-osmotic pump(Alzet, ML2002; 14day, 0.5  $\mu$ L/hour, reservoir volume 200  $\mu$ L; ALZA Scientific Product, Palo Alto, CA)에 168  $\mu$ g/pump 용량으로 충전한 후 실험동물 복강에 외과적으로 삽입하였다. Osmotic pump는 2주간 삼투압에 의해 지속적으로 충전된 발암물질을 체내로 방출시켜 이전의 발암모델에서처럼 다른 promoter나 initiator를 필요로 하지 않고 효과적으로 간암을 유발하는 것으로 알려져 있다.

#### 라. 실험동물의 처리

실험사육 최종일에 24시간 절식시킨 후 Ethyl ether 마취 하에서 개복한 후 정맥에서 채혈하여 실온에 30분 방치 한 후 3,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였고, 장기들은 혈액채취 후 즉시 적출하여 생리식염수로 세척하고 여과지로 표면의 수분을 제거한 후 무게를 측정하였다. 장기 및 혈청시료는 분석실험 전까지 -70 $^{\circ}$ C 냉동고에 보관하였다.

#### 마. 대장암 전암 병변의 검사

실험사육기간 종료 후 대장의 ACF(aberrant crypt foci)검색을 위한 부검을 실시하여 직장과 결장을 포함한 대장을 적출하여 10% 중성완충 포르말린으로 고정하였고, 고정이 끝난 대장을 펼쳐 0.25% 메틸렌 블루로 염색하여 대장 이상선와소(Total number of aberrant crypt foci : ACF) 및 대장 이상선와(Total number of aberrant crypts : AC)의 마리당 총수를 광학현미경( $\times 10$ )으로 측정하였다.

#### 바. 대장암 및 간암 병변의 검사

실험사육기간 종료 후 혈액채취 후 주요 장기(간장, 위장, 췌장, 대장, 신장)에 대한 병변 유무의 관찰, 대장 및 간장의 암종양 발생상태 관찰 및 종양의 크기와 수의 측정, 장기의 중성 완충 포르말린용액 고정 및 현미경 조직관찰(슬라이드 제작과 현미경 조직관찰에 의한 암종양 판정 등은 외부 전문기관 의뢰) 방법으로 암병변을 검사하였다.



### 15. 항혈액응고활성의 측정

해조유래 기능성물질의 항혈액응고활성은 정상인의 정맥혈에 기능성물질을 혼합하여 자동혈액응고분석장치(CA-540, Japan)에 의한 Activated Partial Thromboplastin Time(APTT)과 Prothrombin Time(PT)을 측정하였으며 이때 대조물질로는 의료용 항혈액응고제 Heparin으로 하였다. 실험에 사용한 혈장은 정상인의 정맥혈 4.5 mL를 취하여 3.2% sodium citrate 용액과 혼합한 다음 원심분리(3,000 rpm, 10 min)하여 분리하였다.

### 16. 항혈소판응집활성(Anti-platelet aggregation activity)의 측정

에테르로 마취시킨 S.D.(Spague-Dawley)계 웅성 쥐(rat: 200±20 g)로부터 채혈한 후 2.2% trisodium citrate를 10% 수준으로 첨가한 후 원심분리(800 rpm, 10 min)하여 상층의 혈소판함유 혈장 (PRP ; Platelet Rich Plasma)을 분리하였다. 다시 2차 원심분리(2000 rpm, 30 min)하여 혈소판제거 혈장(PPP ; Platelet Poor Plasma)을 분리하였다. 항혈소판응집 활성은 aggregometer를 사용하여 37°C에서 혈소판의 응집시 일어나는 탁도의 변화를 측정하였는데 PRP 450 µL에 시료 10 µL를 가하고 37°C에서 안정화시킨 다음 응집촉진제로 collagen 5 µL를 가한 때부터 약 7분간 혈소판 응집에 의한 탁도 변화를 측정하였다. 대조구로는 메탄올 추출물은 DMSO를, 열수추출물은 증류수로 하였으며 항혈소판 응집활성은 collagen만 가했을 때의 응집률을 100으로 했을 때 시료 첨가구의 응집율의 비율로부터 구하였다.

### 17. ACE 저해활성의 측정

Angiotensin- I 전환효소(ACE) 활성은 Cushman과 Cheung(1971)의 방법을 개량한 Yamamoto et al. (1981)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 소정농도의 시료 100 µL에 ACE 조효소액 100 µL 및 붕산완충액(pH 8.3, containing 400 mM NaCl) 200 µL를 가한 후, 37°C에서 preincubation 시켰다. 여기에 기질로써 12.5 mM의 hippuryl-histidyl-leucine 용액 100 µL를 가하여 다시 37°C에서 1시간 반응시킨 후 1N HCl 300 µL를 가하여 반응을 정지시켰다(공시험은 시료 용액 대신에 붕산완충액 100 µL를 사용하였으며, 대조구는 1N HCl 300 µL를 가한 다음 ACE 조효소액 100 µL를 가하였다). 여기에 ethyl acetate 1.5 mL를 가하여 15초간 교반한 후, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리시켜 상층액 1 mL를 취하였다. 이 상층액을 140°C에서 20분간 건조시킨 다음 실온에서 5분간 방치한 후 1M NaCl 3 mL를 가하여 15초간 교반하여 용해시키고 228 nm에서 흡광도를 측정하여 시료 첨가 전 후 활성의 백분율로써 ACE 저해율을 나타내었다.

### 18. 전자공여능의 측정

생체내에서 에너지 공급을 위해 끊임없이 일어나는 산화작용 과정 중 상당량의 free radical이 생성되며, 이는 생체 내 제거기작에 의해 대부분 소멸되나 생성과 소멸의 균형이 깨

질 때 각종 질환이 나타난다. 즉 류마티스성 관절염, 세균성이나 바이러스성 감염, 심장병, 파킨슨씨병, 암 등이 유발된다고 알려져 있다(Eller and Payne(1960)). 이에 본 연구에서는 해조류 유래 다당의 항산화활성을 측정하였다. 전자공여능은 각 시료의 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)에 대한 전자공여 효과로써 시료의 환원력을 측정하였는데 Jo 등(1996)의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 소정 농도로 조제된 시료 0.1 mL에 100 µM의 DPPH 용액 (99.9% EtOH 용해) 1.0 mL를 가하고, vortex에서 10초간 진탕한 후 37°C에서 30분간 반응시킨 다음, 이 반응액을 spectrophotometer를 사용하여 516 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 19. 혈전용해 (Fibrinolysis) 활성

혈전용해 활성은 fibrin plate법을 사용하였다. 먼저 0.6% bovine fibrinogen 10 mL를 10 cm petri dish에 조심스럽게 부은 후 bovine thrombin(T-3399, 20U/mL, in same buffer, Sigma, MO, USA) 0.5 mL를 첨가하여 1시간 동안 실온에서 응고시켰다. 응고된 plate 위에 시료 30 µL를 조심스럽게 점적하였다. 이때 사용된 시료는 100 mg/mL DMSO의 농도로 사용하였다. 이 plate를 37°C에서 18시간 동안 배양한 후 lytic circle의 크기를 측정하였다. Fibrin plate법에서는 fibrin이 가수분해됨에 따라서 생기는 투명한 면적을 관찰할 수 있으며 이는 혈전용해능과 비례관계에 있다.

### 20. HMG-CoA reductase 저해활성

HMG-CoA reductase억제활성은 Kleinsek 등(1989)의 방법에 따라 측정하였다. 1 mL Cuvette에 각 시료 20 uL, 0.5 uM 인산완충용액 pH 7.0 100 uL, DTT(20 mM)100 uL, NADPH(3 mM) 100 uL, 효소원 100 uL을 가하고 반응액의 온도를 37°C로 일정하게 한 후 HMG-CoA(3 mM)를 100 uL 가하여 효소반응을 시작하면서 340 nm에서 5분간의 흡광도 변화를 기록하였다. 각 시료는 DMSO에 용해시켜 반응액에 첨가하였다.

$$\text{억제활성(\%)} = 1 - \frac{(\text{control의 흡광도 변화} - \text{control blank의 흡광도})}{(\text{sample의 흡광도 변화} - \text{sample의 blank의 흡광도 변화})} \times 100$$

### 21. *in vivo* 항고지혈증 활성의 조사

#### 가. 실험동물과 실험방법 개요

실험동물로는 5주령의 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐나 hamster를 고지혈증 동물모델로 하여 고지방식이(1% cholesterol, 2% corn oil, 10% lard)에 의한 고지혈증 (Hyperlipidemia)을 유발시킨 후 기능성물질의 항고지혈증 활성을 조사하였다(Kim et al.(1996), Yoon et al.(2000)). 기능성 물질로는 실험적으로 분리 정제한 기능성 해조다당

(laminaran, fucoidan, 열수추출물)과 fucosterol을 사용하였으며, 섭취방법으로는 식이혼합 섭취, 구강투여, 음용수 첨가섭취 방법 등을 사용하였다. 해조유래 기능성 물질의 대조물질로는 고지혈증의 치료약물인 Lovastatin을 사용하였다. 식이섭취량은 매일 잔량을 측정하여 산출하였으며 동물실험실의 사육조건은 온도  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 습도 55-60%를 유지시켰으며, 체중은 실험 사육기간 중 주 2회로 오전 중에 측정하였다.

#### 나. 실험동물의 처리

실험사육 최종일에 24시간 절식시킨 후 Ethyl ether 마취하에서 개복한 후 정맥에서 채혈하여 실온에 30분 방치 한 후 3000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였고, 장기들은 혈액채취 후 즉시 적출 하여 생리식염수로 세척하고 여과지로 표면의 수분을 제거한 후 무게를 측정하였다. 장기 및 혈청시료는 분석실험 전까지  $-70^{\circ}\text{C}$  냉동고에 보관하였다 (Cui et al.(2002), Kim et al.(2005)).

#### 다. 혈청 중의 지질 농도 분석

Total-cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, 중성지질 등 혈청지질 성분은 전문 의료분석기관(녹십자의료재단 및 네오딘)에 의뢰하여 분석하였으며 분석결과의 유의성검정 등 통계처리는 SAS 프로그램의 Duncan's multiple range test에 의해 검정하였다 (Hebert et al.(1990)).

## 22. 담즙산(Bile acid) 흡착능

Bile acid binding capacity는 Xianyong 등(2000)의 방법에 기초하여 측정하였다.

## 23. 혈류 유동성 측정(Micro channel array)

### 가. 실험동물

4주령의 Sprague-Dawley계 수컷흰쥐를 오리엔트에서 구입하여 실험 시작 1주일 동안 적응시킨 후 동물의 체중에 따라 각 군의 평균체중을  $137.5\pm 2.9$  g이 되도록 플라스틱 케이지에 2마리씩 넣어 5군[정상식이대조군(Normal), 고지방식이대조군(Control), 고지방식이 실험대조군(FC), 저농도 실험군(FL) 및 고농도실험군(FH)]사육하였다. 고지혈증(Hyperlipidemia)을 유발시키기 위해 1% cholesterol, 2% corn oil, 10% lard를 혼합한 고지방 식이를 2주간 섭취시키면서 rat에게 1 mg/kg/bw 및 10 mg/kg/bw의 fucosterol을 corn oil에 용해하여 매일 1 mL씩 같은 시간에 경구 투여하였고, 실험 대조군(FC)은 동일 용량의 corn oil을 매일 경구 투여하였다. 체중은 사육 기간 동안 격일로 오전 중에 측정하고, 식이 섭취량은 매일 식이 잔량을 측정하여 산출하였다. 실험기간동안의 사육 환경은  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $55\pm 10\%$ 를 유지하였고 인공조명(12시간 점등, 12시간 소등) 하에서 사육하며 물과 식이는 자유 공급하였다.

#### 나. 실험동물의 처리

모든 실험동물은 부검 전 24시간 동안 절식시킨 다음 Ethyl ether로 마취 하여 복대 동맥으로 혈액을 채취한 다음 실온에서 30분 방치 한 후 3,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리에 의해 혈청을 분리하였다.

### 24. Laminaran의 생산성 증진을 위한 laminaranase 탐색 및 고정화 활용

대황에서 분리한 laminaran의 활성획분 분리수율 증대를 위한 효소개발의 일환으로 해조류 4종(다시마, 대황, 감태 및 미역)으로부터 laminaranase 활성을 갖는 미생물을 분리하였다. 또한 해산 조식동물(藻食動物)의 소화효소는 해조의 원형질체를 효과적으로 가수분해하며, 특히 성게알 및 전복내장에는 다양한 cellulase가 존재 할 것으로 생각되어 이들로부터 laminaran을 가수분해하는 효소를 분리·정제한 후 이 효소를 고정화하였다.

### 25. Fucoidan 및 laminaran의 급성 독성평가(LD<sub>50</sub>)

Fucoidan 및 laminaran에 대한 안전성평가의 일환으로 단회 경구 투여시 발현될 수 있는 급성독성 잠재력을 평가하기 위해 식품의약품안전청(KFDA) 고시 의약품 등의 독성검사기준(99-61) 중 단회투여독성시험 방법으로 실험하였다.

### 26. 항암기능성 음료의 개발

다시마에서 분리한 crude laminaran을 성게알 유래 laminaranase로 처리한 후 음이온교환수지(DIAON PA312, -N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Cl (Trimethylammonium)) column으로 흡착하여 1차 정제한 후 분자량을 10-50 kDa으로 분획하여 동결건조 하였으며, 마늘, 매실, 양파 및 녹차 추출물을 Synergy 물질로 하여 혼합조성물의 MTT 분석값을 반응표면분석(Response surface methodology)하여 적정 혼합비율을 결정하였다(Goldin et al.(1980)). 자료의 통계처리는 SAS 통계분석 프로그램을 사용하였으며, formulation 디자인은 중심합성계획에 의하여 설계하였고, 이때의 독립변수들은 마늘, 양파, 매실, 녹차의 함유농도로, 종속변수는 기능성 혼합물의 MTT assay에 의한 세포독성 값으로 하였으며 혼합물의 농도는 예비실험을 거쳐 laminaran은 1%로 고정하였으며, 마늘, 매실, 양파 및 녹차는 1-3% 범위로 하였다(Kamiya et al.(1987)).

### 27. 항고지혈증 기능성음료의 개발

*in vitro* 및 *in vivo* 항고지혈 활성이 우수한 것으로 나타난 crude fucosterol을 주원료로 하고 마늘, 녹차, 식물성스테롤, 표고버섯추출물 등을 Synergy 물질로하여 적정 음료배합비를 결정하였다. 주원료와 synergy 물질의 적정 배합비 결정을 위한 RSM 분석조건은 항암기능성 음료 개발 실험방법과 동일한 조건으로 하였으며, 다만 종속 변수는 HMG-CoA reductase 저해활성으로 하였고, fucosterol의 농도는 예비 실험을 거쳐 0.02%로 고정하였으며

마늘, 녹차, 식물성스테롤, 표고버섯추출물은 1-3% 범위로 하였다.

## 28. 갈조류 기능성분의 대량생산공정

건조다시마를 원료 해조류로 하여 fucosterol과 laminaran 및 fucoidan의 단계적 분리 공정을 산업적 천연물 추출설비공정을 이용하여 건조해조류 100 kg scale로 검토하였다. 이때 지용성물질(Fucosterol 등)의 추출에는 60℃ 에탄올 추출공정을 1차적으로 적용하였으며, 추출 잔사에 대하여 비등온도에서 열수추출 공정에 의한 수용성분의 추출공정을 2차 공정으로 적용하였으며 추출물은 각각 50-60 °brix로 감압 농축한 다음 다음단계의 기능성분 분리정제공정을 적용하였다.

## 29. 기능성식품 소재화

해조류로부터 추출 분리한 기능성 다당(Laminaran, Fucoidan)은 분말형태의 소재화 또는 첨가물과의 혼합 후 캡슐형태의 제제화 방법을 검토하였으며, Fucosterol은 에탄올농축액 형태의 소재화 또는 식물성 유지에 용해시킨 다음 soft capsule 제제화 방법을 검토하였다.

## 30. 기능성 물질의 경제성

기능성물질 소재(Laminaran, Fucoidan, Fucosterol)의 추정 생산원가를 주요 대상원료 및 실험공정에 의한 제조수율을 토대로 검토하였다.

## 제 4 장 연구결과 및 고찰

### 제 1 절 원료의 특성 연구

#### 1. 일반성분

해조시료의 건조분말에 대한 일반성분을 분석한 결과는 Table 3과 같다. 원료해조류의 수분함량은 종류에 따라 약 4-12%의 범위를 보였다. 조단백질은 미역 2 시료(22.9%) 및 미역 3시료(22.5%)가 비교적 높은 함량을 보였으나 다시마 1시료(8.9%), 다시마 2시료(9.3%) 및 대황(9.4%)은 다소 낮은 함량을 보였다. 조지방은 시료에 따라 적게는 미역 2 시료가 0.7%에서 미역포자엽이 6.3%의 함량을 보였으나 여타 시료들의 경우 대체로 1-3%의 낮은 수준이었다. 탄수화물은 대황(75.4%), 다시마 4시료(69.1%) 및 다시마 2시료(65.1%)가 비교적 높은 함량을 보이면서 종류에 따라 대체로 30-50%의 함량을 보였다. 조회분은 청각(35.5%)과 미역줄기(32.5%), 파래(36.1%) 및 톳(45.7%)이 비교적 높게 나타났고 기타 시료에서는 대체로 20-30%의 함량을 보였다. 이 밖에 염은 최소 0.3% 내지 최대 약 8%의 함량으로 나타났다. 이상의 결과로부터, 탄수화물 함량으로는 다시마류(다시마 2시료, 다시마 4시료 및 개다시마)와 대황이 높아 잠재적인 기능성당류 함량도 비교적 높을 것으로 검토되었다.

Table 3. 해조류의 일반성분

시료의 종류	함 량 (%)					
	수분	단백질 <sup>1)</sup>	지방 <sup>1)</sup>	당질 <sup>1)</sup>	회분 <sup>1)</sup>	염 <sup>1)</sup>
<i>U. pinnatifida</i> 1	7.81	15.36	2.87	50.06	31.71	7.89
<i>U. pinnatifida</i> 2	11.08	22.85	0.69	44.99	31.47	0.75
<i>U. pinnatifida</i> 3	11.35	22.49	0.78	49.72	27.01	1.35
<i>C. costata</i>	8.43	13.33	1.45	47.60	37.01	5.92
<i>U. pinnatifida</i> *	6.57	14.32	6.34	55.11	24.23	1.02
<i>U. pinnatifida</i> **	8.37	9.63	1.20	56.72	32.46	7.75
<i>H. fusiformis</i>	6.61	9.55	3.45	41.32	45.68	2.69
<i>L. japonica</i> 1	9.92	8.90	1.37	57.28	32.45	3.94
<i>L. japonica</i> 2	7.48	9.28	1.49	65.14	24.08	2.64
<i>L. japonica</i> 3	7.86	10.55	1.28	63.03	25.14	2.82
<i>L. japonica</i> 4	7.75	9.75	1.85	69.06	19.34	0.75
<i>K. crassifolia</i>	10.39	11.78	2.93	68.91	16.37	0.37
<i>E. stolonifera</i>	9.29	10.27	1.98	60.11	27.63	1.33
<i>S. patens</i>	9.93	12.83	1.70	52.05	33.42	1.80
<i>K. perforata</i>	7.12	11.30	1.39	56.31	31.00	1.17
<i>C. fragile</i>	3.88	9.37	2.35	52.82	35.46	5.93
<i>U. lactuca</i>	4.84	22.66	1.48	39.73	36.13	7.39
<i>E. bicyclis</i>	11.85	9.38	1.21	75.41	14.00	0.29
<i>E. cava</i>	9.34	11.99	5.33	52.63	30.06	1.43
<i>S. thunbergii</i>	5.23	13.35	2.67	45.72	38.26	1.77
<i>S. horneri</i>	8.06	12.66	5.95	54.93	27.01	1.30
<i>C. pinnulatus</i>	7.95	18.22	0.90	47.50	33.38	0.78
<i>S. herbacea</i> L.	3.43	13.72	2.44	49.19	31.65	2.23

\* : *U. pinnatifida*(sporophyte) \*\* : *U. pinnatifida*(stalks)

<sup>1)</sup> 무수물 기준(수분함량은 풍건물 기준), 당질: 100-(단백질+지방+회분)

## 2. 무기질 성분

건조 해조분말의 무기질성분을 유도결합플라즈마 방출분광기(ICP Atomic Emission Spectrometer, Thermo Jallell Ash ICP-IRIS)를 사용하여 정량분석 하였다(Table 4).

Table 4. 해조류의 무기질 함량 (wet base)

시 료	무기질 함량 (mg%)														
	Fe	Ca	Mg	Na <sup>1)</sup>	K <sup>2)</sup>	P	Zn	Cu	Mn	Al	Ni	Cr	Cd	Pb	Se
<i>U. pinnatifida</i> 1	32.2	684.2	498.2	8.44	11.56	443.9	1.61	0.26	0.54	46.90	1.53	0.12	0.04	0.00	0.00
<i>U. pinnatifida</i> 2	12.1	725.1	913.7	7.01	4.61	478.9	1.34	0.99	0.87	8.32	2.11	0.12	0.00	0.00	0.00
<i>U. pinnatifida</i> 3	5.7	984.1	1007.0	5.98	2.43	444.3	2.85	0.21	0.52	5.99	1.33	0.03	0.00	0.00	0.00
<i>C. costata</i>	7.8	576.8	118.7	12.44	2.23	169.1	2.73	1.18	0.22	7.61	1.99	0.07	0.00	0.00	0.00
<i>U. pinnatifida</i> *	19.5	1034.9	498.2	3.84	5.29	850.6	1.94	1.01	0.54	16.85	3.94	0.27	0.15	0.00	0.00
<i>U. pinnatifida</i> **	85.8	900.7	449.5	6.60	16.9	357.3	1.22	0.88	2.08	111.99	2.69	0.32	0.04	0.00	0.00
<i>H. fusiformis</i>	31.5	1192.7	590.4	5.11	16.25	225.1	2.89	1.22	1.97	47.98	2.68	0.20	0.00	0.00	0.00
<i>L. japonica</i> 1	5.7	863.0	589.0	4.37	10.63	199.0	0.82	0.83	0.32	7.76	1.93	0.10	0.00	0.00	0.00
<i>L. japonica</i> 2	7.2	960.4	536.0	3.28	7.07	178.2	0.87	0.38	0.50	12.28	0.90	0.07	0.00	0.00	0.00
<i>L. japonica</i> 3	3.9	894.0	516.9	3.33	8.26	199.4	0.94	0.45	0.35	11.12	1.02	0.06	0.00	0.00	0.00
<i>L. japonica</i> 4	4.4	733.9	492.7	3.01	5.75	215.8	0.49	0.51	0.332	8.77	0.54	0.05	0.00	0.00	0.00
<i>K. crassifolia</i>	10.8	1214.8	915.7	3.00	2.34	182.2	0.88	0.67	0.40	17.06	1.10	0.10	0.00	0.00	0.00
<i>E. stolonifera</i>	6.0	1005.5	636.1	4.56	6.66	142.5	9.35	0.67	0.34	6.49	0.89	0.06	0.00	0.00	0.00
<i>S. patens</i>	21.9	1484.5	2170.2	3.22	9.30	195.4	1.25	2.06	4.22	22.44	2.68	0.19	0.09	0.00	0.00
<i>K. perforata</i>	80.1	3451.4	582.5	2.45	5.77	244.6	7.89	5.36	10.94	70.68	9.71	0.99	0.00	4.50	0.00
<i>C. fragile</i>	164.1	1309.8	1618.4	15.83	2.95	122.5	4.35	0.24	4.91	188.85	0.00	0.31	0.03	0.27	0.00
<i>U. lactuca</i>	157.1	444.6	1267.6	10.00	7.82	345.6	3.23	0.61	2.43	186.50	0.00	0.30	0.09	0.00	0.00
<i>E. bicyclis</i>	9.0	975.5	504.9	2.10	3.08	121.9	1.93	1.34	0.39	10.60	2.97	0.10	0.00	0.00	0.00
<i>E. cava</i>	21.3	1062.6	600.9	4.15	8.06	190.7	1.73	1.27	0.97	24.08	2.74	0.25	0.00	0.00	0.00
<i>S. thunbergii</i>	80.9	2110.5	967.7	5.17	9.10	333.7	1.79	1.05	15.05	116.18	2.78	0.21	0.09	0.18	0.00
<i>S. horneri</i>	47.8	1365.3	1195.6	3.27	6.17	177.3	1.27	3.28	3.03	60.61	2.21	0.27	0.07	0.22	0.00
<i>C. pinnulatus</i>	64.6	918.2	889.7	6.08	3.88	239.7	4.01	0.38	8.04	78.04	0.00	0.28	0.19	0.00	0.00
<i>S. herbacea</i> L.	54.7	773.5	1483.7	8.01	4.08	246.1	4.08	0.91	4.09	62.65	0.00	0.44	0.03	0.00	0.00

<sup>1), 2)</sup> : %, \* : *U. pinnatifida* (sporophyte), \*\* : *U. pinnatifida* (stalks)



갈조류 시료의 무기질 분석 결과, 나트륨(Na)과 칼륨(K)이 전 시료에서 비교적 다량 검출되었으며 다음으로 칼슘(Ca), 마그네슘(Mg) 및 인(P)의 순으로 높은 함량을 보였다. 반면, 납(Pb)과 카드뮴(Cd) 등 중금속은 일부 시료에서 극미량 검출되기는 하였으나 대부분은 검출되지 않았고, 셀레늄(Se)은 전 시료에서 검출되지 않았다. 이는 해조류에서 나트륨(Na)과 칼륨(K)이 가장 많은 함량을 차지하였다고 보고한 Choi 등(1995)의 연구결과와 유사하였다.

### 3. 식이섬유 함량

해조시료의 조섬유 함량을 분석하여 Table 5에 나타내었다. 그 결과, 해조류의 식이섬유소량은 20-54%정도 함유되어 있었으며 불용성 식이섬유보다는 수용성 식이섬유소 함량이 대체로 10-15% 정도 많은 것으로 조사되었다.

Table 5. 해조의 식이섬유 함량 (% , dry basis)

Sample	Insoluble	Soluble	Total
<i>U. pinnatifida</i> 1	12.22±0.61	13.85±0.33	26.07±0.94
<i>U. pinnatifida</i> 2	11.50±1.91	22.28±3.71	33.79±1.80
<i>U. pinnatifida</i> 3	15.40±1.60	21.50±0.65	36.90±0.40
<i>C. costata</i>	15.59±1.32	22.09±2.02	37.69±3.34
<i>U. pinnatifida</i> *	19.95±1.02	23.17±1.43	43.11±0.41
<i>U. pinnatifida</i> **	12.69±2.07	18.12±2.15	30.81±0.08
<i>H. fusiformis</i>	9.07±0.48	20.63±1.02	29.70±1.07
<i>L. japonica</i> 1	20.60±0.37	27.23±1.84	47.82±1.47
<i>L. japonica</i> 2	18.85±0.71	22.57±1.16	41.42±1.86
<i>L. japonica</i> 3	18.51±1.41	26.07±1.02	44.58±0.40
<i>L. japonica</i> 4	20.07±2.50	34.75±1.82	54.82±0.68
<i>K. crassifolia</i>	14.22±0.25	32.38±1.56	46.60±1.81
<i>E. stolonifera</i>	15.20±0.67	30.05±1.07	45.25±1.74
<i>S. patens</i>	20.11±0.21	16.75±1.26	36.86±1.05
<i>K. perforata</i>	23.20±1.58	17.55±0.43	40.75±1.16
<i>C. fragile</i>	13.03±0.73	7.80±0.18	20.83±0.55
<i>U. lactuca</i>	13.90±1.44	6.91±1.03	20.82±0.40
<i>E. bicyclis</i>	22.81±1.08	29.04±1.77	51.85±0.70
<i>E. cava</i>	16.09±0.88	22.76±1.83	38.85±0.96
<i>S. thunbergii</i>	23.09±1.26	11.05±0.41	34.14±1.67
<i>S. horneri</i>	22.59±1.89	23.91±0.59	46.50±1.30
<i>C. pinnulatus</i>	17.01±3.73	18.21±0.41	35.22±3.32
<i>S. herbacea</i> L.	14.45±0.77	18.97±0.80	33.42±1.57

\* : *U. pinnatifida*(sporophyte), \*\* : *U. pinnatifida*(stalks)

주요 식용해조류는 우리나라 식생활에서 오랜 식용의 역사를 갖고 있으며 식용 소비빈도도 높아 주요 식이섬유 급원으로서의 역할을 하고 있는 식품자원이라 할 수 있다(Han et al.(2002)). 일반적으로 불용성 식이섬유소는 소화기관을 통과할 때 다량의 수분흡수에 따라 대변용적의 증가, 장내 흡수시간 단축, 전분의 가수분해 억제 및 포도당의 흡수 지연 등 다양한 생리작용 효과가 있는 것으로 알려지고 있다. 반면에 수용성 식이섬유는 3차원 구조의 겔형태로 영양분과 포도당의 흡수를 저해하고, 혈중 콜레스테롤 함량을 저하시키며 담즙산이나 무기질 등과 결합하거나 또는 장의 pH를 변화시켜 생리적으로 유리한 조건을 형성시켜 주는 것으로 보고되고 있다(Kim and Kang(1998), Kwon et al.(2003)).

해조류는 육상식물 유래 식이섬유에 비해 상대적으로 생리적 기능활성이 우수한 수용성 식이섬유 함량비율이 높아 건강기능성 식품소재로서의 가치가 점차 증가하고 있다(Park et al.(1991), Hiroyuki et al.(1990)). 해조류의 식이섬유소는 품종과 부위에 따른 함량 차이가 인정되었는데, 대체적으로 다시마의 식이섬유 함량이 미역보다 높으며 미역의 경우 포자엽이 엽상부보다 다량의 수용성 식이섬유를 함유하는 특성을 나타내었다(Ferial et al.(2000)). 또한 laminaran이나 fucoidan, 알긴산 등의 해조유래 기능성 다당류 성분도 본질적으로는 수용성 식이섬유에 포함됨으로서 수용성식이섬유 함량은 식용안전성 및 생산잠재력 등과 함께 본 연구개발 원료 적합성 판단의 중요한 기준이 될 수 있을 것으로 판단되었다.

#### 4. Betaine

다시마과의 해조류에서 혈압강하 효과를 나타내는 betaine의 일종인 laminine이 분리되는 것으로 알려지고 있다. 해조류 중의 항암효과 등 기능활성이 기대되는 betaine 함량 분석결과는 Table 6에 나타내었다.

Betaine 분석 결과, 감태가 101.9 mg%로 비교적 높은 함량이었으며 다음으로 다시마류가 84.5-92.6 mg%, 곰피 87.3 mg% 및 붉은 팍띠가 81.5 mg%의 순이었다. 나머지 시료에서는 대체로 40-70 mg%의 함량을 보였다.

Table 6. 해조의 betaine 함량 (mg%, dry basis)

Sample	Content	Sample	Content
<i>U. pinnatifida</i> 1	45.50	<i>K. crassifolia</i>	76.49
<i>U. pinnatifida</i> 2	37.67	<i>E. stolonifera</i>	87.27
<i>U. pinnatifida</i> 3	41.83	<i>S. patens</i>	73.82
<i>C. costata</i>	70.46	<i>K. perforata</i>	81.53
<i>U. pinnatifida</i> *	77.57	<i>C. fragile</i>	32.53
<i>U. pinnatifida</i> **	45.10	<i>U. lactuca</i>	70.69
<i>H. fusiformis</i>	62.35	<i>E. bicyclis</i>	64.35
<i>L. japonica</i> 1	92.62	<i>E. cava</i>	101.92
<i>L. japonica</i> 2	53.83	<i>S. thunbergii</i>	69.08
<i>L. japonica</i> 3	84.51	<i>S. horneri</i>	70.31
<i>L. japonica</i> 4	48.79		

\* : *U. pinnatifida*(sporophyte), \*\* : *U. pinnatifida*(stalks)

### 5. 총 Phenol의 함량

항산화 및 항균활성과 관련되는 원료해조류 중의 phenol 함량 측정결과는 Table 7에 제시한 바와 같다. 총 phenol의 측정 결과, 미역 1이 24.4 mg%로 비교적 높은 phenol 함량을 보였고 다음으로 함초, 16.7 mg%, 대황, 14.0 mg%, 미역2, 13.3 mg% 및 다시마 1, 12.7 mg%의 순이었다. 또한, 다시마류에서는 전반적으로 10 mg% 내외의 함량을 보여 대체로 고른 경향을 보였다. 이는 Lee 등(1996)과 같은 결과를 나타내었다.

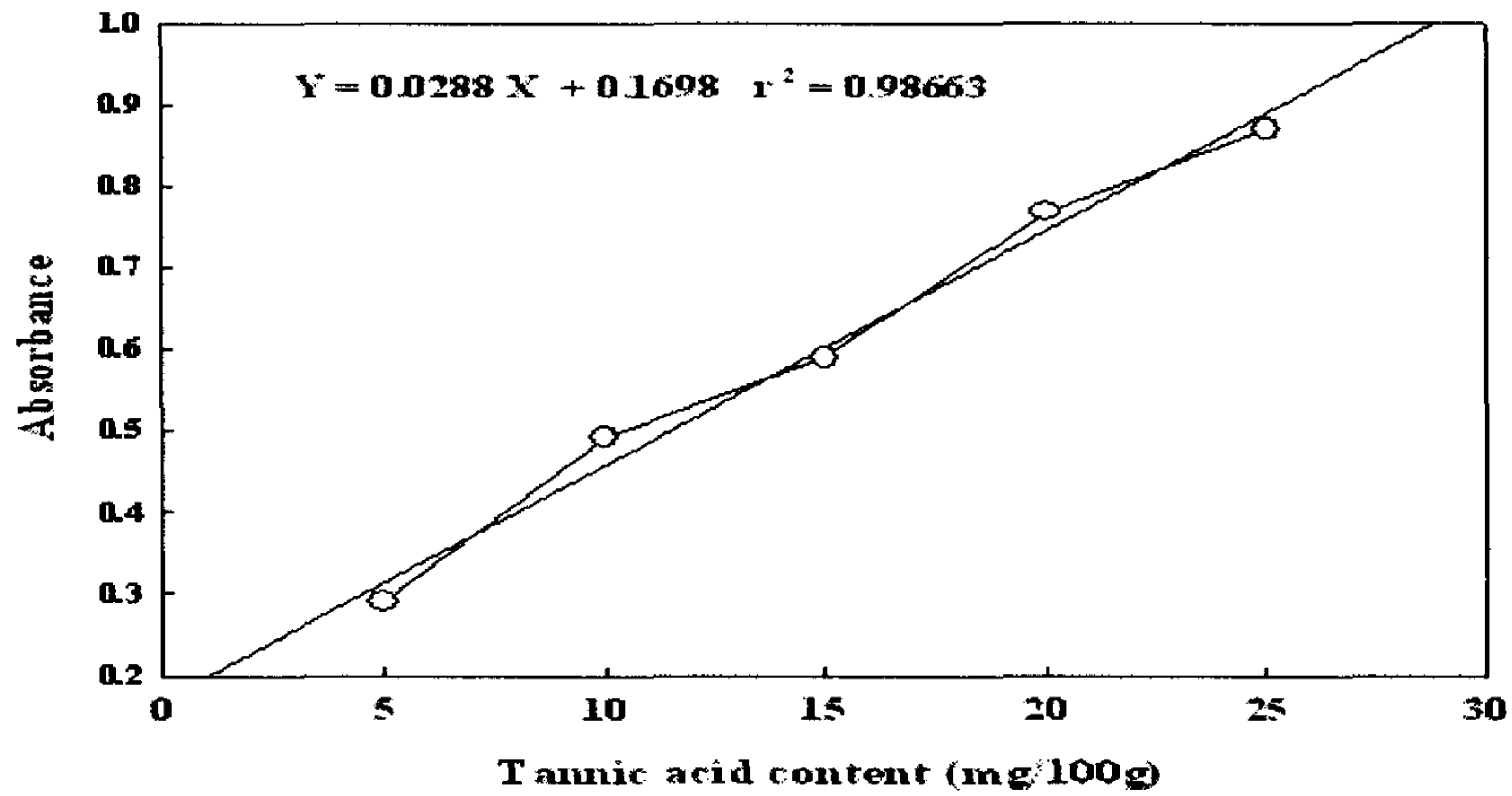


Fig 5. 총 phenol 함량 분석을 위한 tannic acid 검량선

Table 7. 해조 중의 총 phenol 함량 (mg%, dry basis)

시 료	총 phenol 함량	시 료	총 phenol 함량
<i>U. pinnatifida</i> 1	24.40±2.20	<i>E. stolonifera</i>	22.0±0.06
<i>U. pinnatifida</i> 2	13.27±2.13	<i>S. patens</i>	12.13±1.80
<i>U. pinnatifida</i> 3	3.73±1.33	<i>K. perforata</i>	7.67±0.93
<i>C. costata</i>	12.27±1.00	<i>C. fragile</i>	3.93±1.87
<i>U. pinnatifida</i> *	8.80±1.13	<i>U. lactuca</i>	7.00±1.13
<i>U. pinnatifida</i> **	4.33±0.07	<i>E. bicyclis</i>	14.00±1.07
<i>H. fusiformis</i>	6.33±0.67	<i>E. cava</i>	8.80±0.80
<i>L. japonica</i> 1	12.67±0.08	<i>S. thunbergii</i>	9.40±1.00
<i>L. japonica</i> 2	10.67±0.33	<i>S. horneri</i>	2.27±0.47
<i>L. japonica</i> 3	10.53±0.40	<i>C. pinnulatus</i>	1.33±0.13
<i>L. japonica</i> 4	6.93±0.07	<i>S. herbacea</i> L.	16.73±2.27
<i>K. crassifolia</i>	2.67±0.20		

\*: *U. pinnatifida*(sporophyte), \*\*: *U. pinnatifida*(stalks)

## 제 2 절 해조류의 기능성분

### 1. Laminaran의 함량

항혈액응고, 항혈전, 혈압조절 및 항고지혈 기능성 등 혈액순환개선 기능성이 기대되는 laminaran의 함량을 측정하여 Table 8에 나타내었다. 즉, 시료 15 g을 산성조건 (0.125 N HCl, pH 2.2±0.2)에서 추출(70℃, 1시간) 및 여과하고 여액을 3시간 교반한 다음 5℃에서 2일간 방치하여 insoluble laminaran을 침전물의 형태로 분리하였다. 또한, 상층액에 에탄올을 85%(v/v)되게 첨가하여 soluble laminaran을 분리하였다. 그 결과, 붉은 띠를 제외한 모든 시료에서 insoluble laminaran보다 soluble laminaran의 함량이 높았다. 즉, 건조물로서 insoluble laminaran은 약 1-7.6%의 함량을 보였으며, soluble laminaran은 약 2-12.8%의 함량을 보였다. soluble laminaran 함량은 실험에 사용한 해조시료 중 다시마 4는 12.8%, 다시마 3은 10.8% 및 청각 9.9%, 미역 1은 8.4%의 순으로 높게 나타났다. 단, 다시마 4와 청각을 비롯한 많은 시료들에서 만니톨과 염으로 추정되는 침상(針狀)의 불순물들이 함께 추출됨으로서 이들 성분을 제거한 crude laminaran의 함량은 다소 낮아질 것으로 판단되었다.

Table 8. 해조류의 crude laminaran 함량 (% , dry basis)

시 료	Laminaran		시 료	Laminaran	
	Insoluble	Soluble		Insoluble	Soluble
<i>U. pinnatifida</i> 1	2.72	8.35	<i>E. stolonifera</i>	1.70	4.91
<i>U. pinnatifida</i> 2	0.73	3.87	<i>S. patens</i>	0.87	5.96
<i>U. pinnatifida</i> 3	0.91	2.83	<i>K. perforata</i>	2.55	1.99
<i>C. costata</i>	1.11	5.09	<i>C. fragile</i>	7.55	9.85
<i>U. pinnatifida</i> *	1.64	5.79	<i>U. lactuca</i>	4.63	9.69
<i>U. pinnatifida</i> **	1.52	6.55	<i>E. bicyclis</i>	1.01	9.43
<i>H. fusiformis</i>	1.21	9.44	<i>E. cava</i>	0.68	4.94
<i>L. japonica</i> 1	2.33	9.87	<i>S. thunbergii</i>	1.47	7.87
<i>L. japonica</i> 2	1.87	13.05	<i>S. horneri</i>	2.86	4.59
<i>L. japonica</i> 3	2.45	10.83	<i>C. pinnulatus</i>	0.96	8.68
<i>L. japonica</i> 4	2.79	12.78	<i>S. herbacea</i> L.	3.52	5.34
<i>K. crassifolia</i>	1.72	10.20			

\*: *U. pinnatifida*(sporophyte), \*\*: *U. pinnatifida*(stalks)

## 2. Fucoidan의 함량

해조 시료로부터 항혈액응고, 항콜레스테롤, 항종양활성이 강한 것으로 보고되고 있는 fucoidan의 함량을 조사하기 위해 crude fucoidan을 추출하여 함량을 측정하였다(Table 9).

Table 9. 해조류의 crude fucoidan 함량 (% , dry basis)

시 료	함량	시 료	함량	시 료	함량
<i>U. pinnatifida</i> 1	5.03	<i>L. japonica</i> 2	6.19	<i>U. lactuca</i>	2.52
<i>U. pinnatifida</i> 2	5.35	<i>L. japonica</i> 3	5.87	<i>E. bicyclis</i>	1.50
<i>U. pinnatifida</i> 3	4.87	<i>L. japonica</i> 4	7.15	<i>E. cava</i>	7.87
<i>C. costata</i>	4.50	<i>K. crassifolia</i>	8.27	<i>S. thunbergii</i>	2.75
<i>U. pinnatifida</i> *	4.62	<i>E. stolonifera</i>	12.29	<i>S. horneri</i>	3.24
<i>U. pinnatifida</i> **	4.10	<i>S. patens</i>	7.16	<i>C. pinnulatus</i>	3.95
<i>H. fusiformis</i>	3.48	<i>K. perforata</i>	6.80	<i>S. herbacea</i> L.	0.50
<i>L. japonica</i> 1	6.06	<i>C. fragile</i>	1.27		

\*: *U. pinnatifida*(Sporophyte), \*\*: *U. pinnatifida*(Stalks)

즉, 시료 15 g을 메탄올로 3회 추출하여 색소를 제거한 후 잔사를 85°C, pH 2.0에서 2시간 추출하고 CaCl<sub>2</sub>로 침전하여 산가용성 alginate를 제거한 다음 투석하여 탈염하고 알콜침전시켜 crude fucoidan을 분리하였다. 그 결과, 곰피가 12.29%의 가장 높은 함량을 보였으며, 개다시마 8.3%, 감태 7.9%, 다시마 4는 7.2%, 곰보풀 6.8% 및 천연 다시마류로서 다시마 2 및 다시마 1이 각각 6.2%와 6.1%의 함량 순을 보였다. 그 밖에 미역류에서는 대체로 4-5%의 함량을 보이는 등 대체로 4% 내외의 함량을 보였다. 이상의 결과로부터, 실험에 사용한 해조류 중에서 곰피가 fucoidan 함량이 10% 이상으로 비교적 높아 활용가치가 높을 것으로 판단되었다. 또한, 양식으로 원료가 풍부하고 비교적 손쉽게 얻을 수 있는 다시마류도 6% 이상으로 fucoidan의 원료로서 활용가치가 있을 것으로 사료되었다(Ando and Inoue(1961)).

### 3. Fucosterol 함량

혈전용해, 항콜레스테롤 기능성이 기대되는 fucosterol의 분석에 사용한 시료는 표준물질의 확보가 어렵고 기존 분석방법이 확립되어 있지 않은 문제점 때문에 1차적으로 전체 실험대상 시료 중 생산시기와 산지 등의 요인을 감안하여 주요 종류별로 1종씩을 선정하여 다시마2, 미역1, 툇, 곰피, 대황, 감태, 쇠미역, 미역포자엽, 개다시마, 쌍발이모자반, 청각 및 팽생이모자반 등을 대상으로 가스크로마토그래피(GC)로 분석하였다(Table 10).

Table 10. 원료 해조류 중 fucosterol의 함량 (dry basis)

Sample	Content (mg/100g)
<i>L. japonica</i> 2	14.3
<i>U. pinnatifida</i> 1	49.6
<i>H. fusiformis</i>	35.4
<i>E. stolonifera</i>	21.9
<i>E. bicyclis</i>	26.5
<i>E. cava</i>	53.3
<i>C. costata</i>	27.3
<i>U. pinnatifida</i>	38.8
<i>K. crassifolia</i>	18.9
<i>S. patens</i>	85.0
<i>C. fragile</i>	49.4
<i>S. horneri</i>	98.3

그 결과, 분석에 사용한 12종의 해조류 중의 fucosterol 함량은 적게는 다시마 2의 14.3 mg%에서 많게는 팽생이모자반의 98.3 mg%까지 원료에 따른 폭넓은 함유량 차이를 나타내었는데 이중 모자반이나 미역 및 다시마의 경우 인공양식에 의한 대량생산이 가능함에 따라 이의 고부가가치 창출을 위한 원료해조류로서의 활용가치를 기대할 수 있을 것으로 사료되었다.

### 제 3 절 기능성분의 분리 정제 및 구조 확인

#### 1. Laminaran

가. 기존 process

(1) Crude laminaran의 추출

Laminaran의 추출은 그림 3 에서와 같이 하였다. 즉, acid soluble laminaran은 건조 해조분말(60 mesh) 15 g에 10배(v/v)량의 0.1 N HCl을 가하여 실온(20°C)에서 2시간 교반 추출하고 여과(5A)하였다. 여액에 최종농도 85%(v/v)되게 에탄올 침전시켜 동결 건조하였다. Acid insoluble laminaran은 상기 해조분말에 10배(v/v) 량의 0.1 N HCl로 가열추출(85°C, 60 min)하고 여과(5A)하였다. 여과 잔사는 적당량의 온수로 수세하여 합하고 여액을 3시간 교반하고 5°C에서 overnight한 후 침전물을 여과, 건조하여 acid insoluble laminaran으로 하였다.

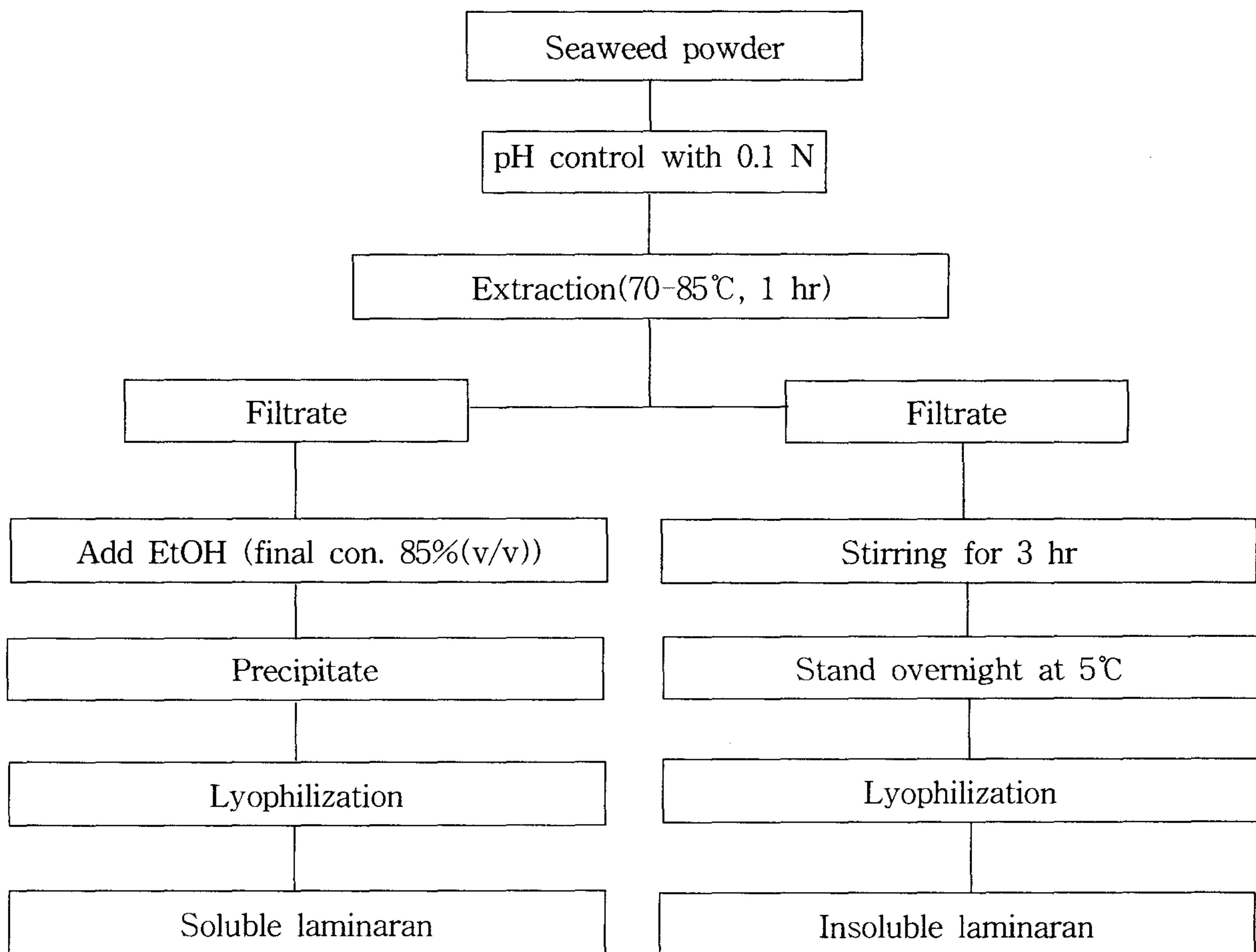


Fig. 6. Process for extraction of soluble and insoluble laminaran from seaweed



Laminaran의 적정 추출조건 설정을 위해 다시마를 원료로 하여 추출온도, 시간 및 여과방법에 따른 laminaran의 추출수율을 비교하였다. 즉, 기존방법(Whistler and Bemiller,(1973))의 추출온도인 70℃ 및 새로운 실험 추출온도 85℃ 조건에서 각 1시간 추출하고 여과시 filter paper 혹은 filter pad로 각각 여과한 다음 농축, 알콜침전 및 동결건조하여 각 방법에 따른 crude laminaran의 수율을 측정하여 비교하였다(Table 11). 추출 온도별 수율에 있어서는 85℃의 추출수율이 상대적으로 높았으며, 추출물은 filter pad 보다 filter paper로 여과했을 때 더 높은 수율을 보였다. 따라서 다시마로부터 laminaran의 적정 추출조건은 추출 온도 85℃에서 1-2시간, 2-3회 추출한 후 filter paper로 여과하는 것이 효과적이었다(Kitamikado and Tseng(1989)).

Table 11. 추출온도 및 여과방법에 따른 가용성 laminaran의 수율

Sample	Extract Temp. (℃)	Filtering methods	Yield (%)
<i>L. japonica</i> 2 *	85	Filter pad	10.6
<i>L. japonica</i> 2	85	Filter paper	17.6
<i>L. japonica</i> 2	70	Filter pad	4.7
<i>L. japonica</i> 2	70	Filter paper	15.1

\* refer to Table 1.

## (2) Laminaran의 정제

Crude laminaran의 정제 및 분획은 다음과 같이 정제 분획하였다. 먼저 1% crude laminaran 용액에 무수 황산나트륨을 가한 후, 5% CPC(cetylpyridinium chloride)를 가하여 37℃에서 2시간 교반하여 침전물인 산성다당과 상층액인 중성다당으로 나누었다. 이 용액을 원심분리(4,000 g×10 min)한 후 상층액을 알콜침전 한 다음 다시 원심분리 후 투석, 동결건조하여 laminaran을 얻었다. CPC 침전물인 산성다당은 3 M NaCl 용액으로 용해시킨 후 37℃에서 교반하여 CPC를 제거한 다음 알콜침전 후 원심분리하였다. 원심분리 침전물은 소량의 증류수에 용해한 후 투석한 다음 동결 건조하였다.

Laminaran 정제물의 분획은 Sephacryl S-300 HR 칼럼을 사용하여 분획하였다. 시료를 Tris-HCl buffer(pH 7.0)에 용해시킨 후 0.2 μm filter로 여과하였다. 그리고 sephacryl S-300 HR column(2.6×60 cm)에 가한 후 각 fraction의 총당 함량을 측정하였다. 그리고

fraction별로 모아 투석(MWCO 5,000)한 다음 동결건조하여 laminaran 분획물을 얻었다.

Crude laminaran의 정제를 위하여 산성다당과 특이적으로 결합하는 CPC를 사용하여 CPC 침전물인 EBU-cp와 중성다당인 EBU-cs로 나누었다(Dubois et al.(1956)). 그리고 그 화학적 조성 및 구성당 크로마토그램은 Table 12 및 Fig. 7과 같다. 중성다당인 EBU-cs의 glucose 함량이 93.3%로 CPC 침전물인 EBU-cp의 함량 20.5% 보다 4.5배 이상 높았다. 총당의 함량 역시 EBU-cs의 함량이 88.7%로 EBU-cp의 함량 32.4% 보다 더 높았다. EBU-cp는 상대적으로 총당을 제외한 단백질(11.2%), uronic acid(27.6%) 및 sulfate(11.5%)의 함량이 EBU-cs의 함량보다 높았다. 구성당 크로마토그램 결과 EBU-cp는 fucose의 함량이 51.0%로 나타난 반면, EBU-cs는 fucose는 나타나지 않았다(Kim and Park(1985)).

Table 12. Yields and chemical compositions of laminaran obtained by CPC precipitation from EBU-sp (% , dry basis)

Sample	Yield <sup>1)</sup>	Protein	Total sugar	Uronic acid	Sulfate	Proportion of monosaccharide(%) <sup>2)</sup>							
						Rhm	Fuc	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
EBU-cs <sup>4)</sup>	45.0	1.8	88.7	1.5	1.2	- <sup>3)</sup>	-	3.2	1.0	-	2.5	-	93.3
EBU-cp <sup>5)</sup>	35.0	11.2	32.4	27.6	11.5	1.4	51.0	-	-	5.2	13.9	8.1	20.5

<sup>1)</sup> % of EBU-sp,

<sup>2)</sup> Calculated from GC analysis, considering the total amounts under the six monosaccharide as 100%

<sup>3)</sup> Not detected, <sup>4)</sup> cs : CPC supernatant, <sup>5)</sup> cp : CPC precipitate

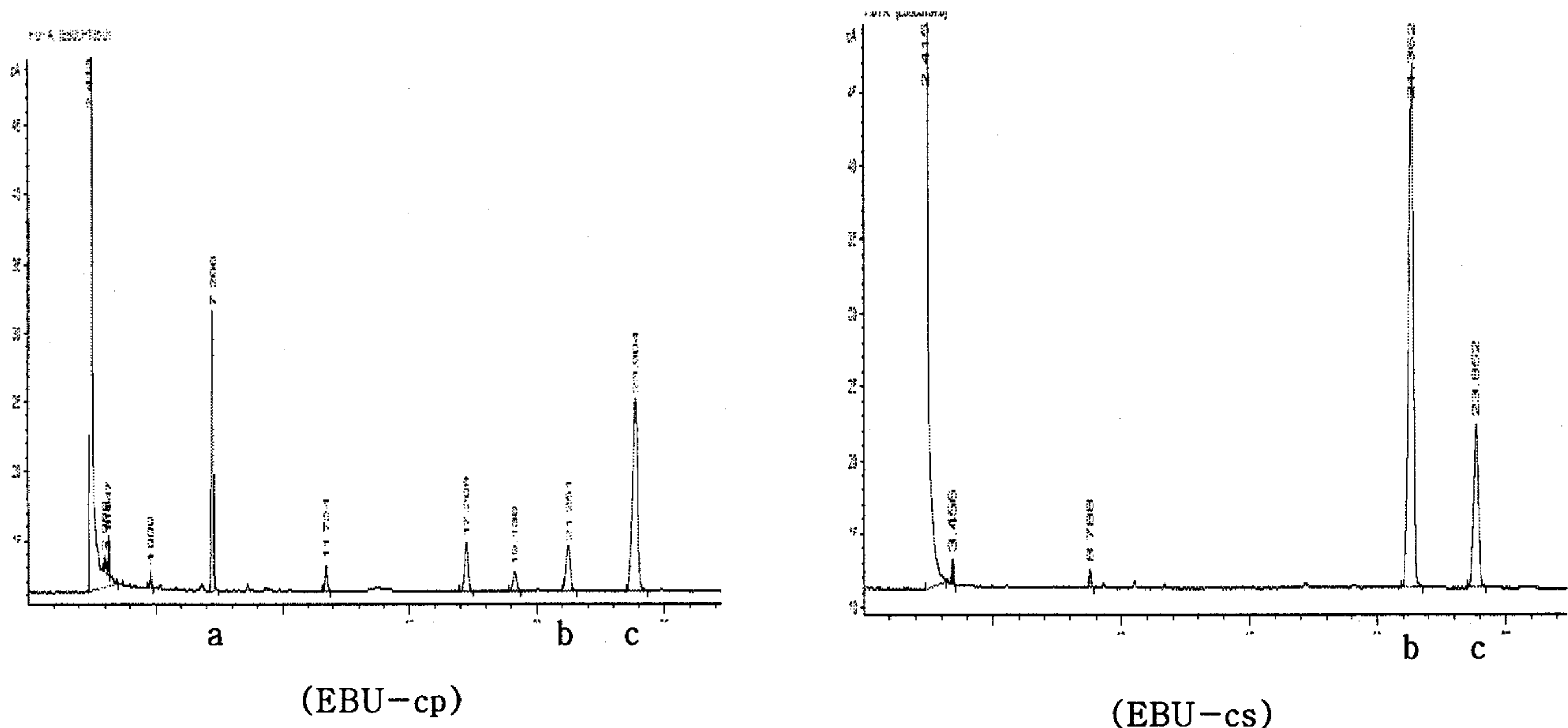


Fig. 7. GC chromatogram of alditol acetate of EBU-cs and EBU-cp  
 a: fucose, b: glucose, c: *myo*-inositol

#### 나. 실험공정(Experimental process)

##### (1) Crude laminaran 추출

기존 laminaran의 추출방법을 개선한 새로운 공정을 검토하였다. 기존의 추출방법은 높은 추출수율을 얻기 위하여 유기용매 및 식품에 사용할 수 없는 용매(CPC) 등을 사용하였으나, 새롭게 개선한 추출공정은 추출수율은 다소 떨어지나 직접 식품에 적용할 수 있는 식품첨가물급 용매 등을 사용하여 산업화소재 개발을 위한 처리공정 개발에 초점을 두었다(Furneaux et al.(1990)).

원료 해조류로부터 crude laminaran의 추출은 Fig. 8과 같은 방법으로 추출하였다. 즉, 건조 분쇄시료에 증류수를 가한 후 100℃에서 2시간 교반 추출한 다음 sieve, filter 등 통상의 여과방법으로 여과 후 잔사는 다시 소량의 증류수를 가하여 여과하고 한외여과기(UF, MWCO 10,000)로 농축한 후 투석하였다. 이 투석액에 3배량의 에탄올을 가하여 고분자 crude laminaran을 침전물 형태로 분리하였다(Tatiana et al.(1999) 등의 방법 참조).

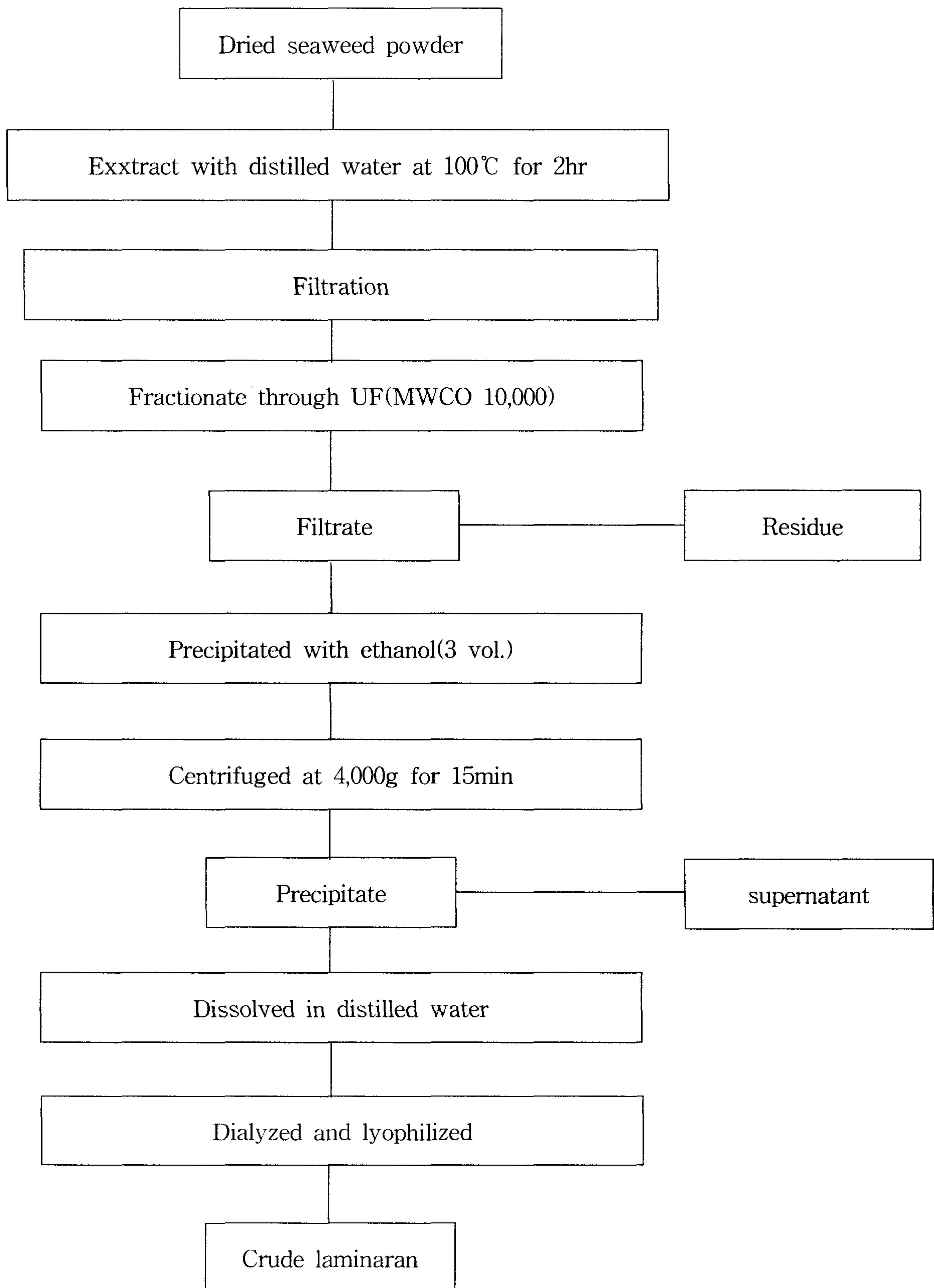


Fig. 8. Extraction and fractionation procedure of crude laminaran.

Crude laminaran의 수율 및 화학적 조성은 Table 13과 같다. 수율은 대황이 14.5%로 가장 높았으며 다음으로 다시마, 곰피, 툫, 미역 순이었다. 화학적 조성은 미역, 다시마, 곰피, 툫은 해조에서 추출되는 산성다당의 조성을 갖고 있었으며, 대황은 총당의 함량이 72.3%, 단백질 14.0%, 황산기가 3.5%이고, 그 구성당은 주로 glucose로 구성된 다당으로서, 대황유래 추출다당이 수율이나 구성당의 조성면에서 laminaran 표준품과 유사하였다. Laminaran의 수율과 조성은 해조 채취지역의 수온이나 서식조건 등에 의해 달라지는데, 본 연구에 사용된 울릉도산 대황 및 동해안 산 양식대황의 경우 성분조성에 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

대황으로부터 열수 추출한 다당(EBU-sp)의 조성과 수율은 총당의 함량은 68.2%이고, 황산기와 단백질의 함량은 7.6%, 8.4%였으며, 주요 구성당은 glucose 80.9%, fucose 12.2%로 나타났다.

Table 13 . Yields and chemical compositions of crude laminaran

	UPU-cl <sup>4)</sup>	LJW-cl	ESB-cl	EBU-cl	HFV-cl
Yield <sup>1)</sup>	2.6	11.3	11.0	14.5	9.4
Protein	1.7	2.5	17.2	14.0	12.6
Total sugars	14.2	19.2	36.2	72.3	16.0
Uronic acid	17.2	21.3	11.9	8.9	9.9
Sulfate	9.1	9.7	17.5	3.5	11.4
Fucose <sup>2)</sup>	25.0	22.1	28.7	3.1	27.3
Ribose <sup>2)</sup>	— <sup>3)</sup>	—	—	—	—
Xylose <sup>2)</sup>	—	3.2	3.7	—	—
Mannose <sup>2)</sup>	58.8	59.7	16.5	4.9	7.4
Galactose <sup>2)</sup>	16.2	9.1	8.8	8.5	49.6
Glucose <sup>2)</sup>	—	5.8	42.4	83.5	15.7

<sup>1)</sup> % of seaweed, <sup>2)</sup> Calculated from GC analysis, considering the total amounts under the six monosaccharide as 100%

<sup>3)</sup> Not detected, <sup>4)</sup> cl: crude laminaran

## (2) Laminaran의 정제

기존 laminaran의 정제는 CPC(cetylpyridinium chloride)를 사용하여 정제하였으나 CPC(cetylpyridinium chloride)는 4원소 암모늄화합물질로서 구강청결제로 사용되고 있으며 살모넬라균에 대하여 살균작용이 있고, 그람양성 및 음성균 등에 광범위한 항균스펙트럼을 갖고 있는 양이온성 계면활성제이다(Lattin et al.(1994), Kim et al.(1996), Li et al.(1995)). CPC(cetylpyridinium chloride)는 항균성 및 구강청정 효과는 있으나 식품에 직접 사용할 수 없다. 직접 흡입시 매우 강한 독성을 나타내며 흰쥐의 경구투여시 LD<sub>50</sub> 값은 200 mg/kg이다.

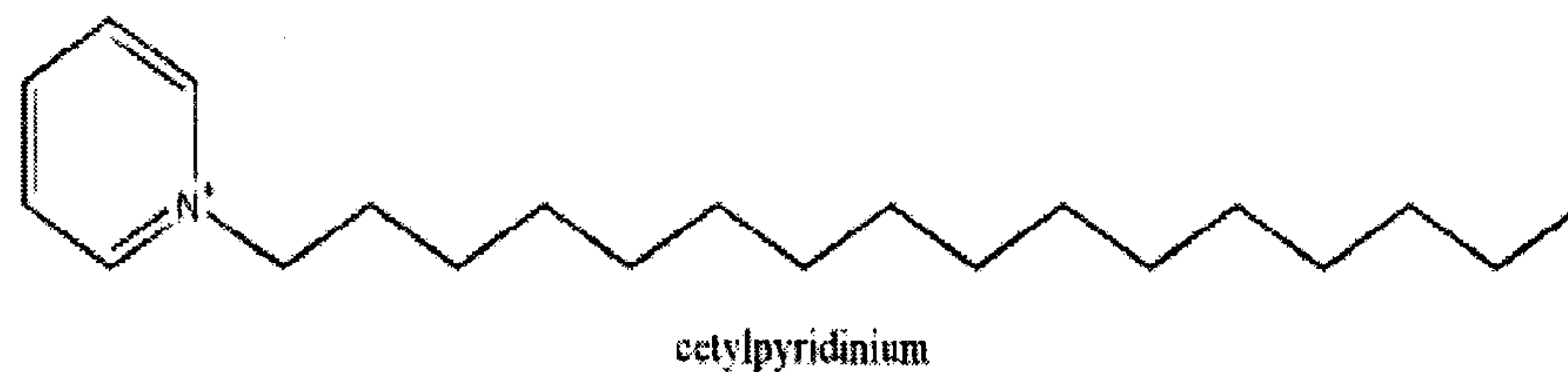


Fig. 9. CPC(cetylpyridinium chloride)의 구조

이와 같은 CPC에 의한 기존의 laminaran 정제공정은 안전성 문제 때문에 기능성 식품소재의 처리 가공 공정으로서는 사용될 수 없는 문제점이 있다. 이러한 문제점 개선의 일환으로 기능성 식품소재용 laminaran의 새로운 추출분리공정을 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 즉, CPC 사용을 배제한 laminaran의 정제공정은 크로마토그래피 정제공정으로, DEAE Sepharose FF(Cl<sup>-</sup> form, Pharmacia)를 충전한 칼럼(5.0×30 cm)에 소량의 증류수에 녹인 시료를 칼럼에 주입하였다.

시료의 용출은 60 mL/hr의 속도로 하였고 산성다당만이 수지에 흡착되며 중성다당인 laminaran은 수지에 흡착되지 않고 즉시 용출되었다. 이 중성 다당을 다시 Sephadex G-75(Sigma)로 충전한 칼럼에 60 mL/hr의 속도로 통과시켜 peak 별로 분획한 후 투석 및 동결건조하여 최종 정제 laminaran을 얻었다.

## (3) Laminaran의 구조분석

정제 laminaran을 FT-IR로 분석한 결과 888 cm<sup>-1</sup>에서 강한 흡수 peak를 나타내었으며, 841 cm<sup>-1</sup>에서는 흡수 peak가 없었다(Fig. 10). 888 cm<sup>-1</sup>은 β-glucosidic linkage를 나타내는 peak이며, 841 cm<sup>-1</sup>은 α-결합을 나타내는 peak로서 분획물의 glucan은 β-glucan의 형태로 결합되어 있음을 알 수 있었다(Davidson et al.(1976), Boyd and Turvey(1977)).

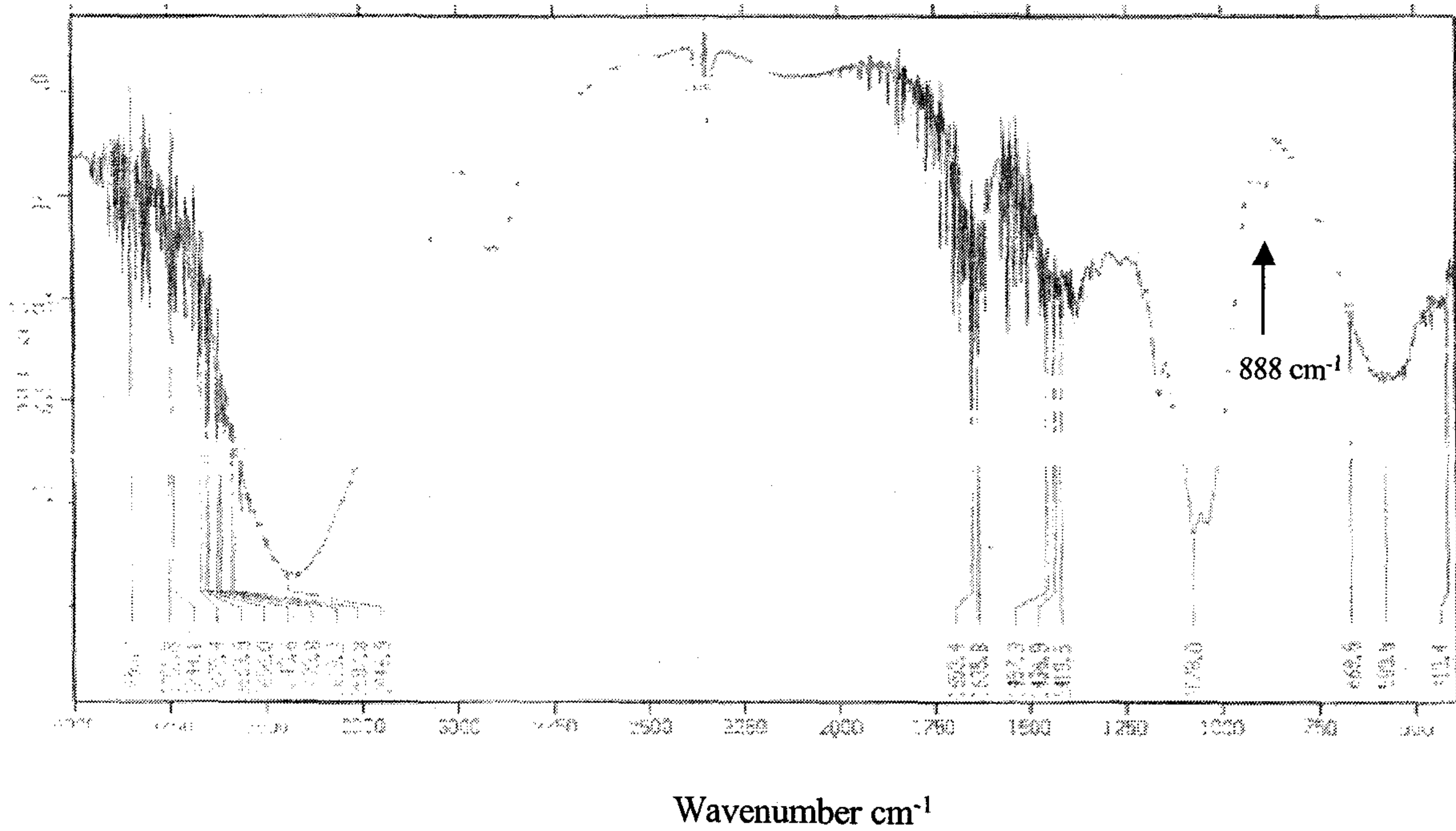


Fig. 10. 정제 Laminaran의 FT-IR 스펙트럼

Fig. 11은 정제 laminaran의 methylation을 분석한 total ion chromatogram이며, 주요 물질인 2,4,6-tri-O-methyl-glucose의 mass spectrum은 Fig. 12와 같다.

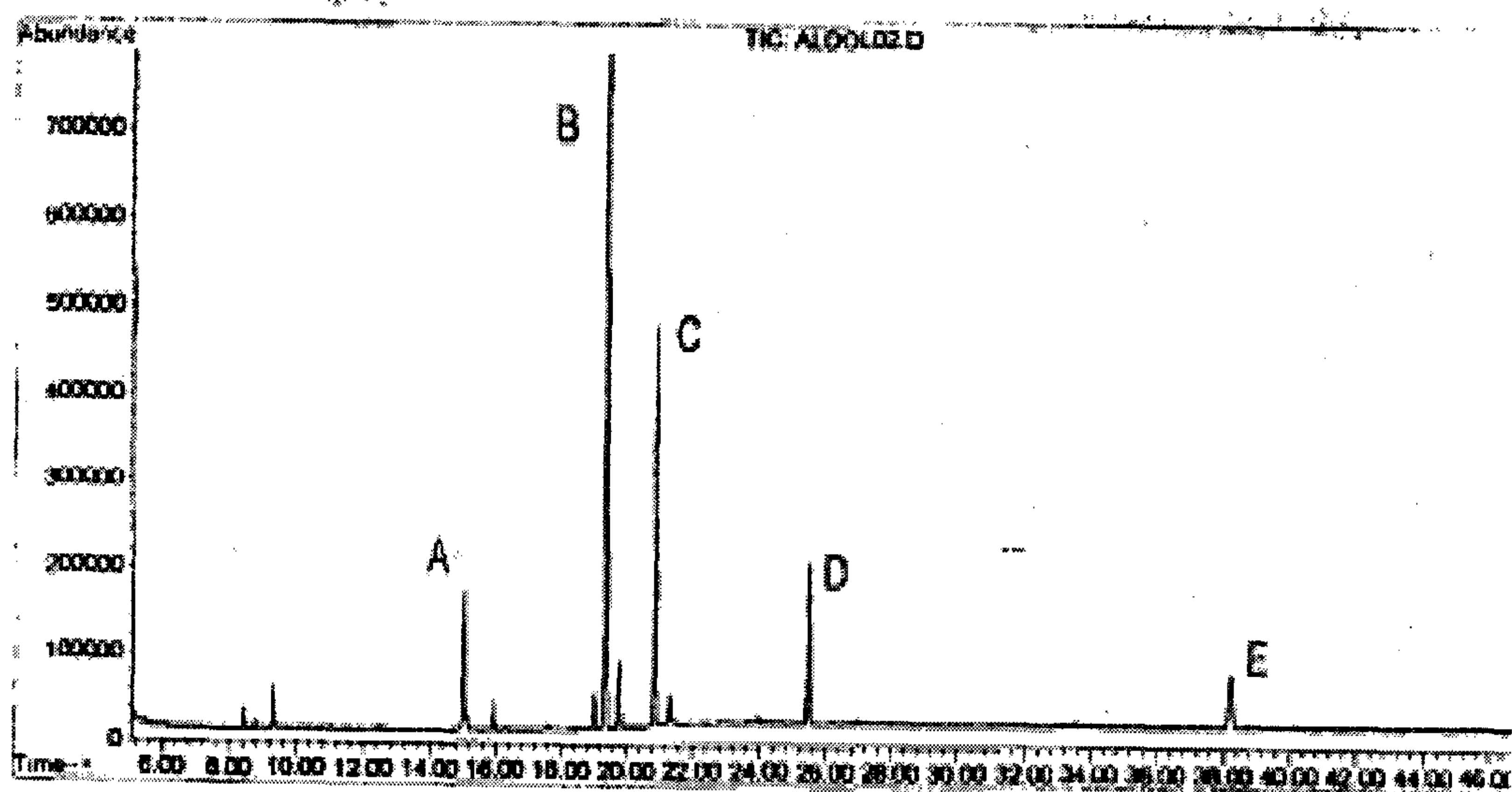


Fig. 11. 정제 laminaran의 total ion chromatogram 분석

[A : 2,3,4,6-Me4-Glc, B : 2,4,6-Me3-Glc, C : 2,3,4-Me3-Glc, D : 2,4-Me2-Glc, E: myo-inositol-(OAc)6]

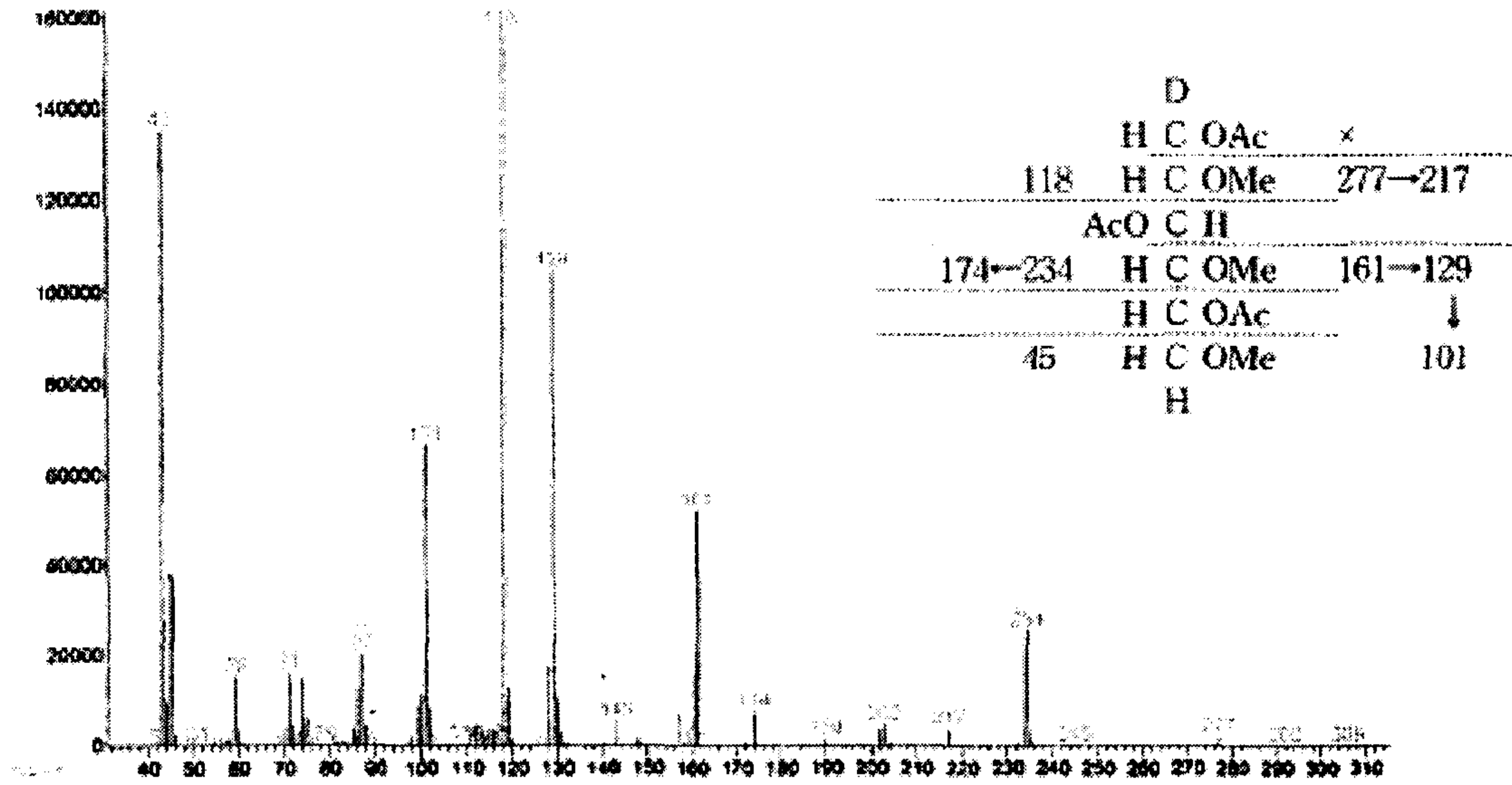


Fig. 12. 2,4,6-tri-O-methyl-glucose의 mass spectrum

m/z 43 peak는 대부분 당의 mass spectrum에서 나타나는 base peak로 acetylium ion(CH<sub>3</sub>CO<sup>+</sup>)을 나타내고, m/z 118, m/z 161, 129, 101 그리고 m/z 234, 174 peak는 각각 C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>, C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 그리고 C<sub>4</sub>-C<sub>5</sub>가 분해되어 생성된 2,4,6-tri-O-methyl-glucose의 primary fragement이다(Choi et al.(1985)).

정제 laminaran의 <sup>13</sup>C NMR 분석 결과를 Fig. 13 및 Table 14에 나타내었으며 laminaran의 구조는 Fig 14에 나타내었다. 일반적인 당의 <sup>13</sup>C NMR peak 경향은 다음과 같다. Anomeric 탄소의 peak는 100-104.0 ppm이며, α-glucose의 anomeric 탄소의 peak는 약 100 ppm이다. 그리고 β-glucose의 anomeric 탄소의 peak는 이보다 더 작은 장(downfield)인 약 104 ppm이며 α-glucose의 anomeric 탄소보다 상대적으로 강한 강도(intensity)를 갖는다. C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>가 그리고 C<sub>6</sub>는 60-80 ppm에서 peak를 형성한다. 정제 laminaran의 경우 103.0 ppm의 peak를 볼 수 있었으며, α-형의 99-101 ppm 사이의 peak는 없었다. 이는 FT-IR 분석한 결과와 같이 β-anomeric 탄소만이 존재하는 β-glucan임을 알 수 있었다.



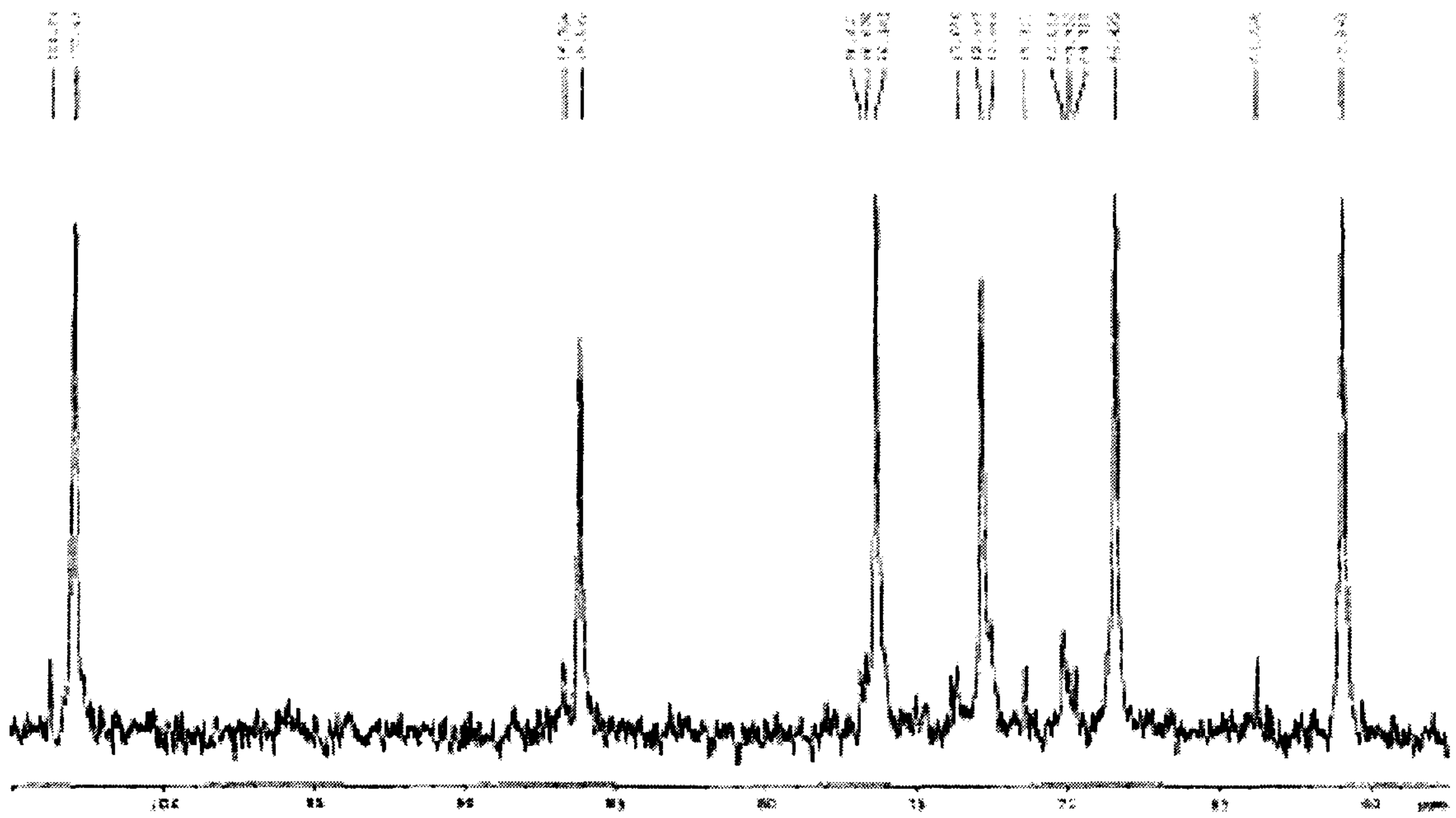


Fig. 13. Laminaran의  $^{13}\text{C}$  NMR Pattern

Table 14.  $^{13}\text{C}$  NMR spectral assignment at 300 MHz for *E. bicyclis* in  $\text{DMSO-}d_6$  at  $50^\circ\text{C}$

Configuration	Chemical shift(ppm)					
	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>
$\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-Glc-(1}\rightarrow$	103.0	72.8	86.2	68.4	76.3	60.9

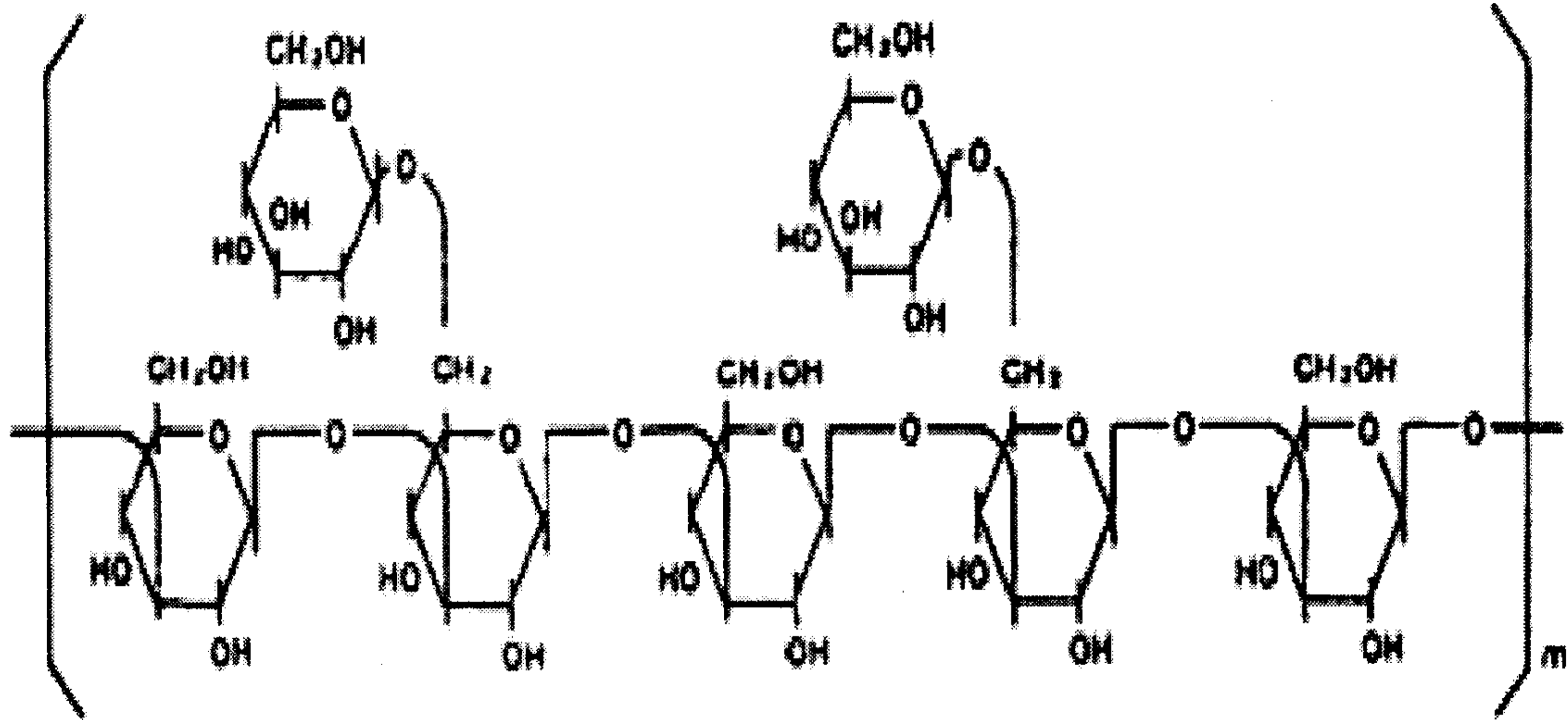


Fig 14. Laminaran의 구조

$\beta$ -glucan의 각각의 major peak들을 살펴보면, 103.0, 72.8, 86.2, 68.4, 76.3 및 60.9 ppm은 각각 $\beta$ -(1-3) 결합의 C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> 그리고 C<sub>6</sub>의 peak들이며, 그리고  $\beta$ -(1-4)-glucan의 전형적인 peak인 80.3-80.4 ppm(C<sub>4</sub>)의 peak는 동정되지 않았다. 위 결과는 Dilip 등(2005)이 분석한  $\beta$ -(1-3)-glucan 결합의 data, C<sub>1</sub>(103.4 ppm), C<sub>2</sub>(73.2 ppm), C<sub>3</sub>(86.6 ppm), C<sub>4</sub>(68.8 ppm), C<sub>5</sub>(76.7 ppm) 그리고 C<sub>6</sub>(61.2 ppm)와 비교해 볼 때, 0.3-0.4 ppm이 upfield 쪽으로 이동하였으며, 이 값을 더해주면 본 실험의 결과와 잘 일치하였다. 그리고 다당은 동일한 구성성분이라도 Chemical shift 값이 약간 차이가 나는데 이는 분석온도, 용매 및 reference compound와 그 자성의 균질성, 분석방법의 차이 때문에 일어나는 것으로 판단된다.

*Laminaria cichorioides* 및 *Laminaria japonica*에서 정제한 laminaran들의 <sup>13</sup>C NMR 분석시 103-104 ppm(C<sub>1</sub>, 1,3- 및 1,6-linked-glucose), 85-87 ppm(C<sub>3</sub>, 1,3-linked-glucose), 75-76 ppm(C<sub>5</sub>, 1,6-linked-glucose), 70 ppm(C<sub>6</sub>, 1,6-linked-glucose), 69.5 ppm(C<sub>4</sub>, 1,3-linked-glucose)을 나타낸다고 하였다(Zvyagintseva et al.(2003)). Stuelp 등(2001)은 *Ramalina celastri*에서 정제한 lichen을 가지고 NMR 분석시  $\beta$ -(1-3)-glucan의 전형적인 peak는 103.2 ppm(C<sub>1</sub>), 86.4 ppm(C<sub>3</sub>), 76.6 ppm(C<sub>5</sub>), 73.2 ppm(C<sub>2</sub>), 68.6 ppm(C<sub>4</sub>) 및 61.1 ppm(C<sub>6</sub>)이었다고 하였으며, Kwak은 치마버섯 균사체(*Schizophyllum commune*)에서  $\beta$ -1,3 결합에서  $\beta$ -1,6 분지를 갖는 schizophyllan을 정제하여 NMR 분석시 103 ppm은 C<sub>1</sub>이 1,3-, 1,6-결합하는 peak이며, 86 ppm은 C<sub>3</sub>가 1,3-결합, 74 ppm은 C<sub>3</sub>가 1,6-결합, 73 ppm은 C<sub>2</sub>가 1,6-결합, 72 ppm은 C<sub>2</sub>가 1,3-결합, 70 ppm은 C<sub>6</sub>이 1,3 및 1,6-결합, 그리고 61 ppm은 C<sub>6</sub>가 1,3 및 1,6-결합하는 peak라고 하여 본 결과와 유사하였다. FT-IR, methylation 분석 및 NMR 분석을 토대로 하여 검토한 결과, laminaran 정제물은 주로  $\beta$ -1,3 결합에  $\beta$ -1,6 분자를 갖는 glucan임을 확인할 수 있었다.(Fig. 15, 16)

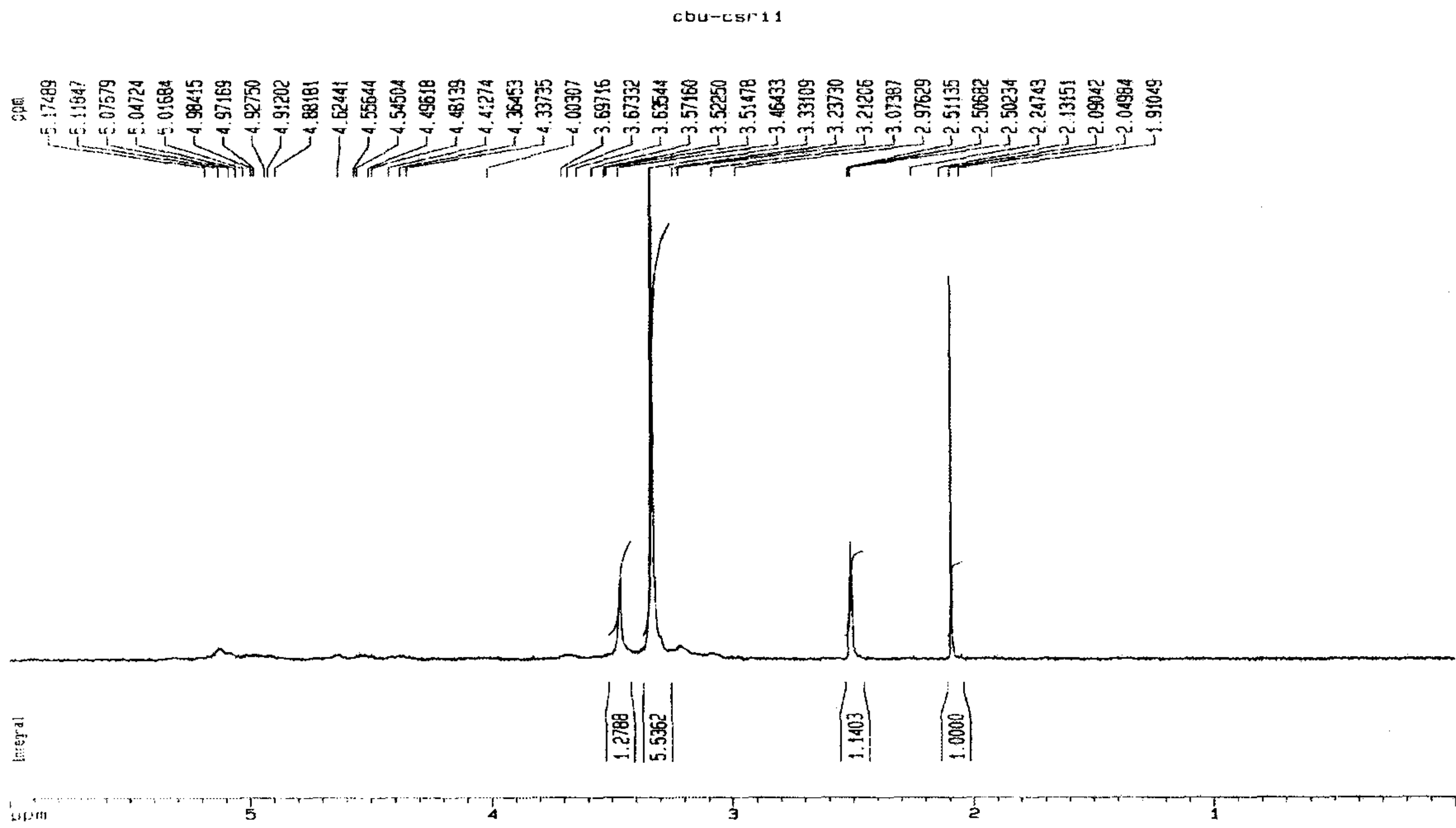


Fig. 15. EBU-cs-Fr1의  $^1\text{H}$  NMR

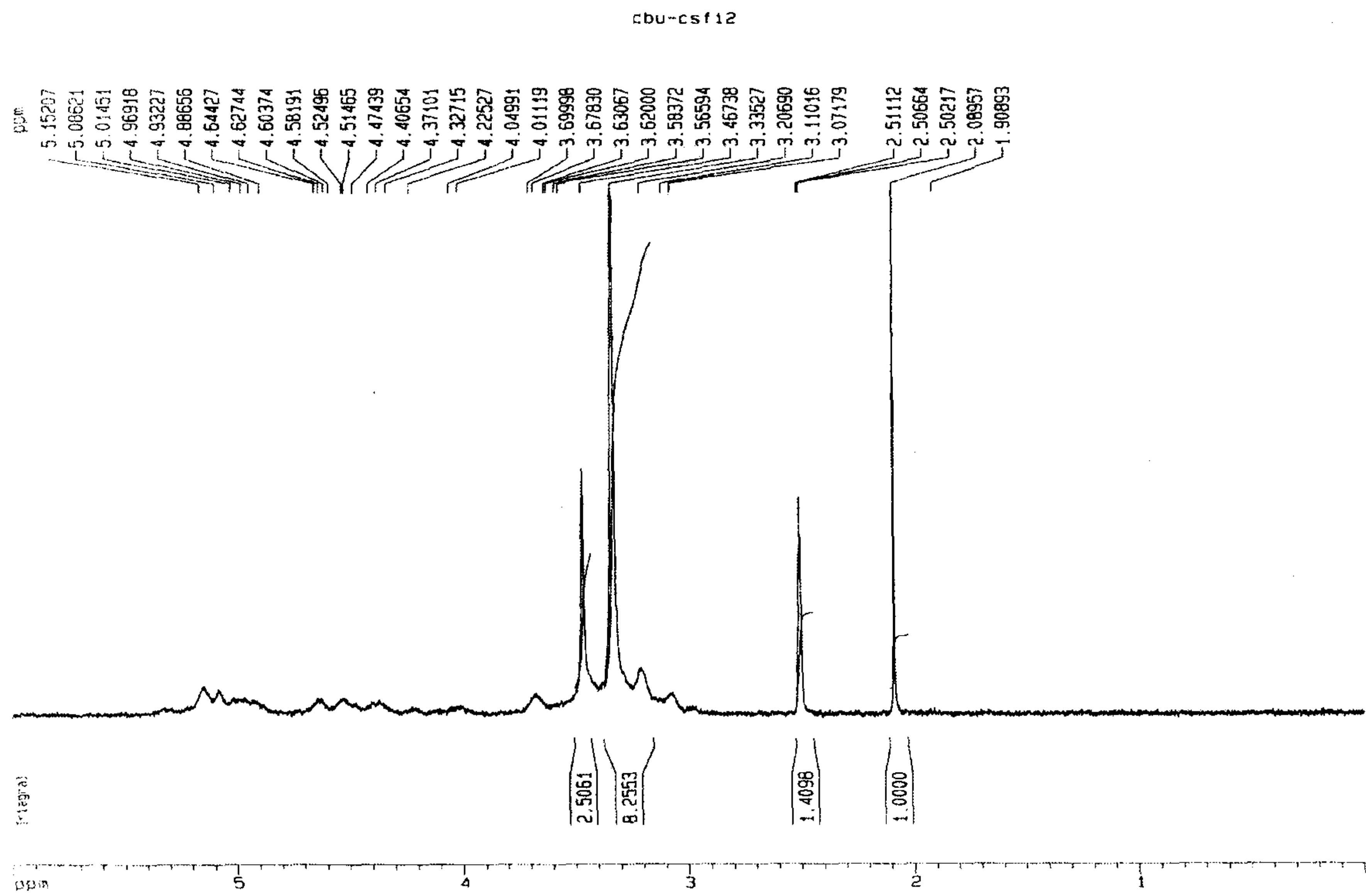


Fig. 16. EBU-cs-Fr2의  $^1\text{H}$  NMR

(4) Laminaran의 분획 및 화학적 조성

대항(*E. bicyclis*)유래 laminaran(EBU-cs)의 분획은 Sephacryl S-300 HR 칼럼을 사용하여 2개로 분획(EBU-cs-Fr1, EBU-cs-Fr2)하였으며, 그 조성 및 크로마토그램은 Table 15 및 Fig. 17과 같다. EBU-cs-Fr1, Fr2 모두 glucose 함량이 96.8%, 97.7%로 다당은 주로 glucose로 이루어진 glucan임을 알 수 있었다.

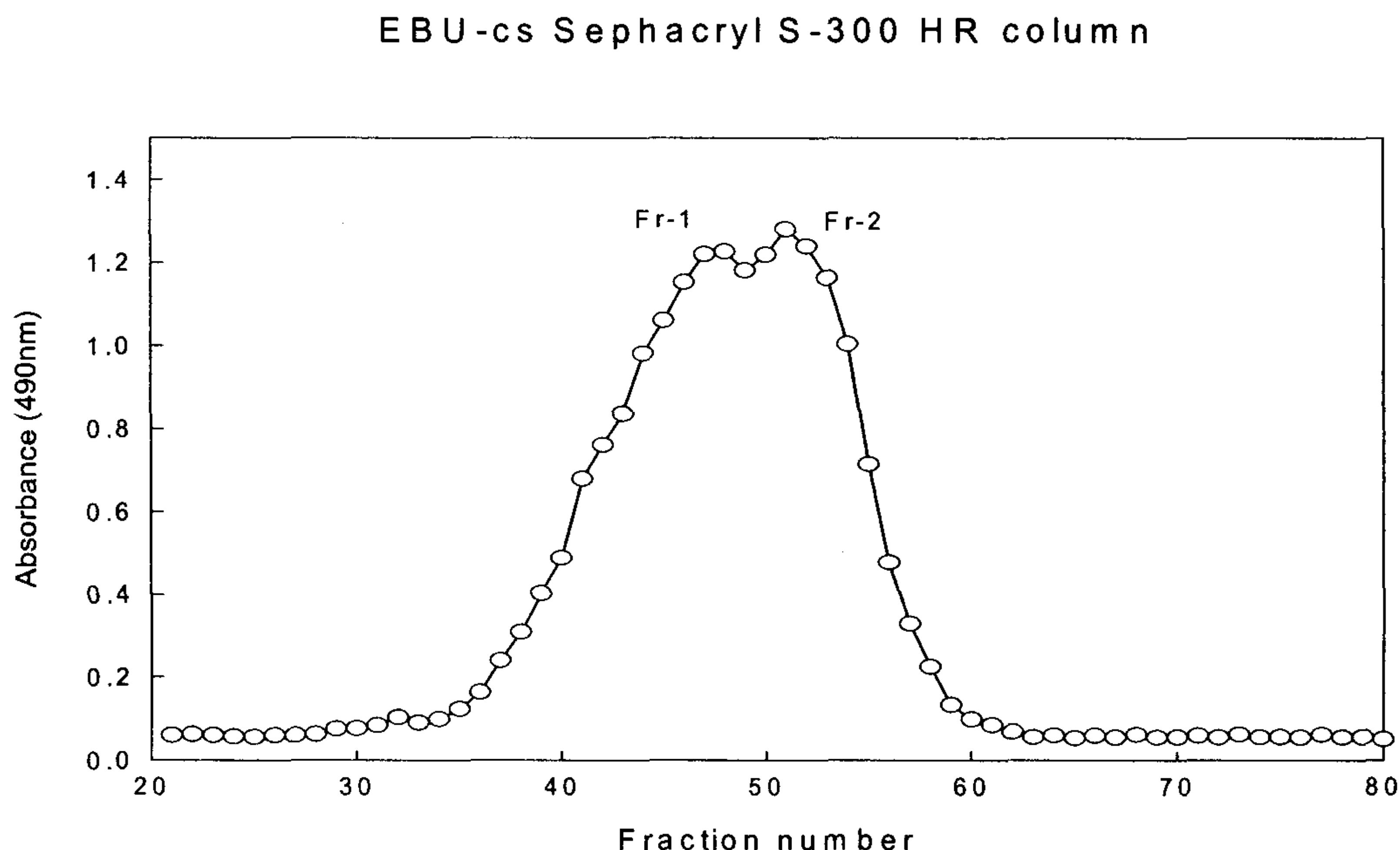


Fig. 17. Gel filtration chromatography of EBU-cs using Sephacryl S-300 HR.

o Fraction ; 150drop/tube, o Flow rate ; 0.3 mL/min, o Eluent ; 0.1M Tris-HCl buffer(pH 7.0)  
o Fraction ; Fr-1 : tube No. 35-48, o Fr-2 : tube No. 50-59

Table 15. Yields and chemical compositions of fractions recovered from Sephacryl S-300 HR chromatography (% , dry basis)

Sample	Yield <sup>1)</sup>	Protein	Total sugar	Uronic acid	Sulfate	Proportion of monosaccharide(%)							
						Rhm	Fuc	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
EBU-cs-Fr1	43.2	3.1	74.7	1.5	1.4	-	-	3.1	trace	-	trace	-	96.8
EBU-cs-Fr2	45.2	11.2	79.9	1.2	1.1	-	-	1.0	trace	trace	1.3	trace	97.7

<sup>1)</sup> % of EBU-cs

#### (5) HPLC에 의한 분자량 측정

EBU-cs 분획들의 분자량 분산성 및 분자량 측정을 위하여 Ultrahydrogel 1000을 이용하여 HPLC로 측정한 결과 Fig. 18과 같았다. EBU-cs의 분자량은 19,700 dalton이었으며, Fr-1은 26,000 dalton, Fr-2는 12,900 dalton이었고, 두 fraction 모두 대체로 단일피크로 대칭성을 나타내어 분자량이 균일하고 정제된 다당을 얻을 수 있었다. 즉, 대황을 열수추출한 후 CPC로 정제하고, gel filtration chromatography 하여 분자량이 26,000 dalton이고 주로 glucan으로 구성된 glucan인 EBU-cs-Fr1와 분자량이 12,500 dalton이고 주로 glucose와 단백질로 구성된 EBU-cs-Fr2인 정제 다당을 얻을 수 있었다.

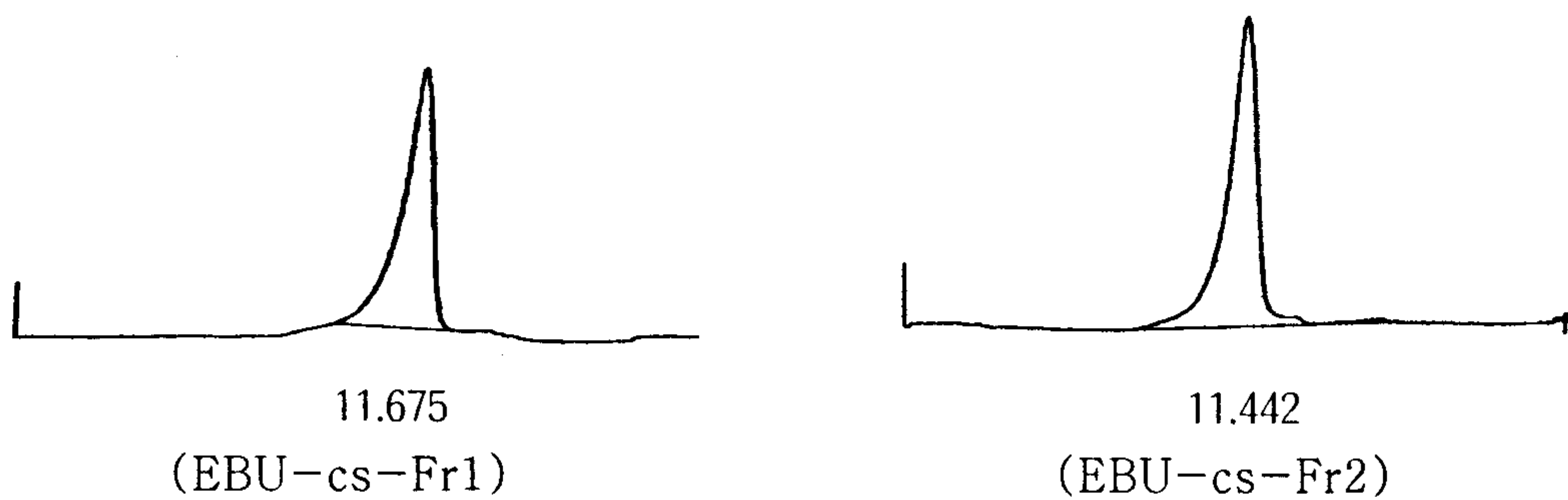


Fig. 18. HPLC chromatogram of fractions recovered from Sephacryl S-300 HR chromatography.

#### (6) 정제분획물의 수식 및 특성 분석

Laminaran 및 부분정제한 fucoidan(감태유래 fucoidan, EKJ-ppf; 다시마 유래 fucoidan, LJW-ppf)을 이용하여 화학적 수식(황산기 제거, 우론산 환원) 및 효소적 수식(pronase 처리, laminase 처리)을 통해 당조성을 분석하였고, 각종 수식한 다당을 methylation 하여 당 결합구조를 알아보았다(Kashiwabara et al.(1969)).

##### (가) 화학적 수식

정제다당 중 EKJ-ppf와 LJW-ppf를 화학적으로 수식하여 다당의 이화학적 조성을 살펴보았다(Table 16). LJW-ppf에서 수식과정을 통해 황산기를 제거했을 때 황산기의 함량은 32.2%에서 1.7%로 감소하였으며 상대적으로 총당, 우론산, 단백질의 함량이 증가하였다. 또한 LJW-ppf-D를 환원시켰을 때 우론산 함량이 17.5%에서 9.0%로 감소하여 우론산이 어느 정도 환원되었음을 알 수 있었으며, fucose의 함량은 53.1%에서 24.6%로 감소하였고, glucose 함량은 미량에서 19.3%로 증가하였는데 이는 다시마 fucoidan의 우론산은 대부분 glucuronic acid인 데 기인한 것으로 보인다.

Table 16. Chemical composition of chemically modified polysaccharides (dry basis)

Fractions	Sulfate	Protein	Uronic acid	Total sugar	Sugar composition							
					Rhm	Fuc	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
EKJ-ppf <sup>1)</sup>	27.6	12.2	13.8	37.1	-	72.1	-	-	5.1	7.5	10.5	4.8
EKJ-ppf-D <sup>2)</sup>	7.3	23.5	19.4	41.4	tr	53.4	-	tr	9.9	8.9	19.5	8.2
EKJ-ppf-D/R <sup>3)</sup>	7.3	24.6	9.2	47.4	tr	34.6	tr	tr	11.9	23.1	tr	30.0
LJW-ppf <sup>4)</sup>	32.2	3.8	6.3	36.6	-	94.0	-	-	tr	tr	6.0	tr
LJW-ppf-D	1.7	8.8	17.5	41.8	tr	53.1	0	tr	5.1	7.6	34.0	tr
LJW-ppf-D/R	1.9	9.2	9.0	51.7	tr	24.6	0	0	tr	10.6	35.3	19.3

<sup>1)</sup> 감태유래 partially purified fuoidan, <sup>2)</sup> desulfation, <sup>3)</sup> desulfation and reduction,

<sup>4)</sup> 다시마 유래 partially purified fucoidan

EKJ-ppf에서 황산기를 제거함으로써 황산기 함량이 27.6%에서 7.3%로 감소한 반면, 단백질(12.2%→23.5%), 우론산(13.8%→19.4%) 및 총당(37.1%→41.4%)이 증가하였다. 또한, EKJ-ppf-D를 환원시켰을 때 우론산의 함량은 19.4%에서 9.2%로 감소하였으나 다른 화학적 조성의 변화는 거의 없는 것으로 나타났으며 이때 당조성은 mannose(8.9%→23.1%)와 glucose(8.2%→30.0%)의 함량이 증가하는 것으로 나타났다. 이로써 감태 fucoidan의 우론산은 mannuronic acid와 glucuronic acid임을 알 수 있었다.

#### (나) 효소적 수식

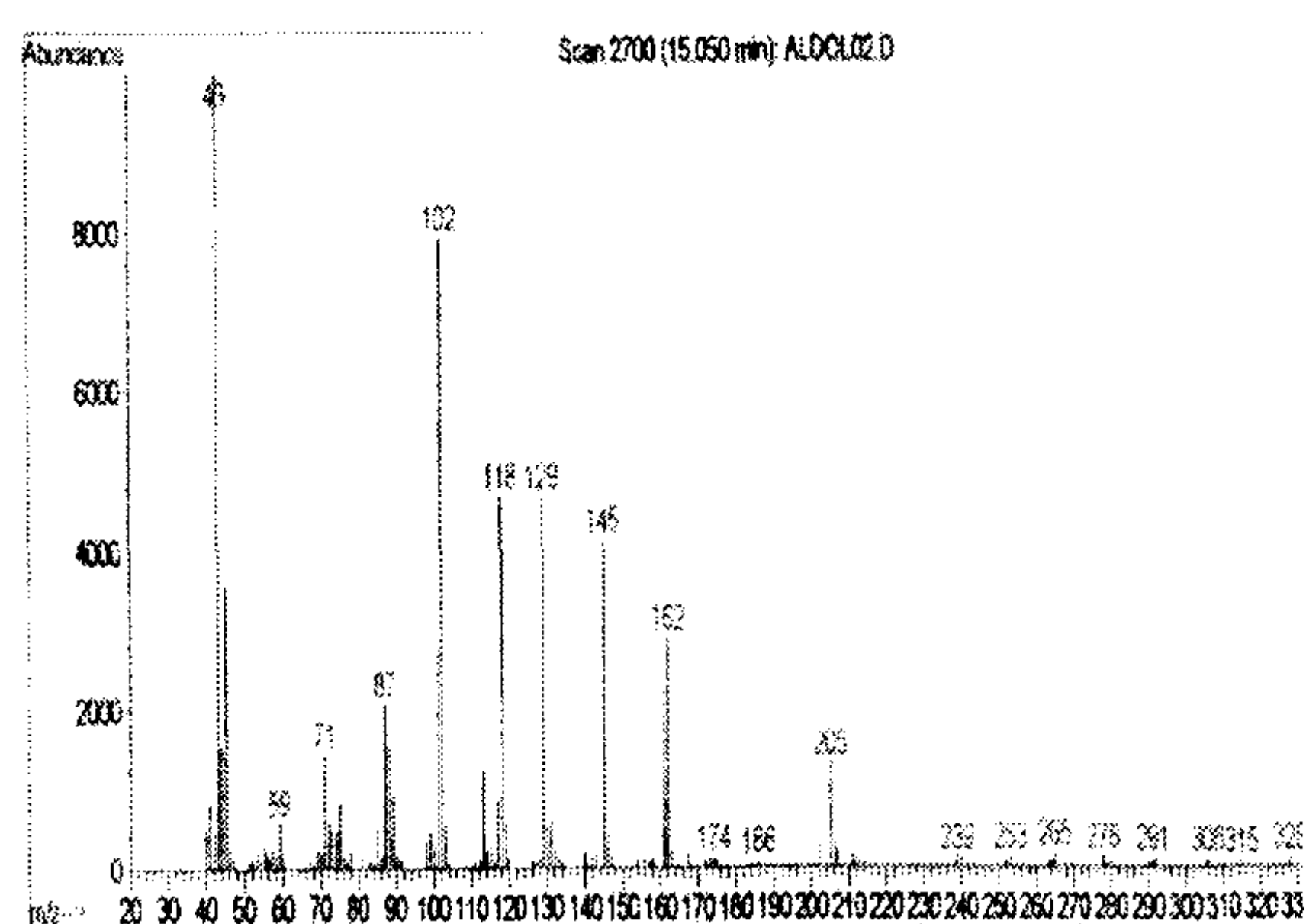
EKJ-ppf와 LJW-ppf을 효소적으로 수식한 후 다당의 화학적 조성을 살펴보았다(Table 17). 단백질 제거를 위해 pronase로 가수분해한 다당(부분정제 fucoidan, EKJ-ppf, LJW-ppf)은 단백질의 함량이 감소하였고, laminaranase로 수식하였을 경우 단백질의 함량에는 큰변화가 없었으나 glucose의 함량이 감소하였다. 이로써 다시마와 감태유래 부분정제 fucoidan에는 glucose를 주성분으로 하는 중성다당체인 laminaran이 일부 함유되어 있음을 알 수 있었다.

Table 17. Chemical composition of enzymatically modified fucoidans (% , dry basis)

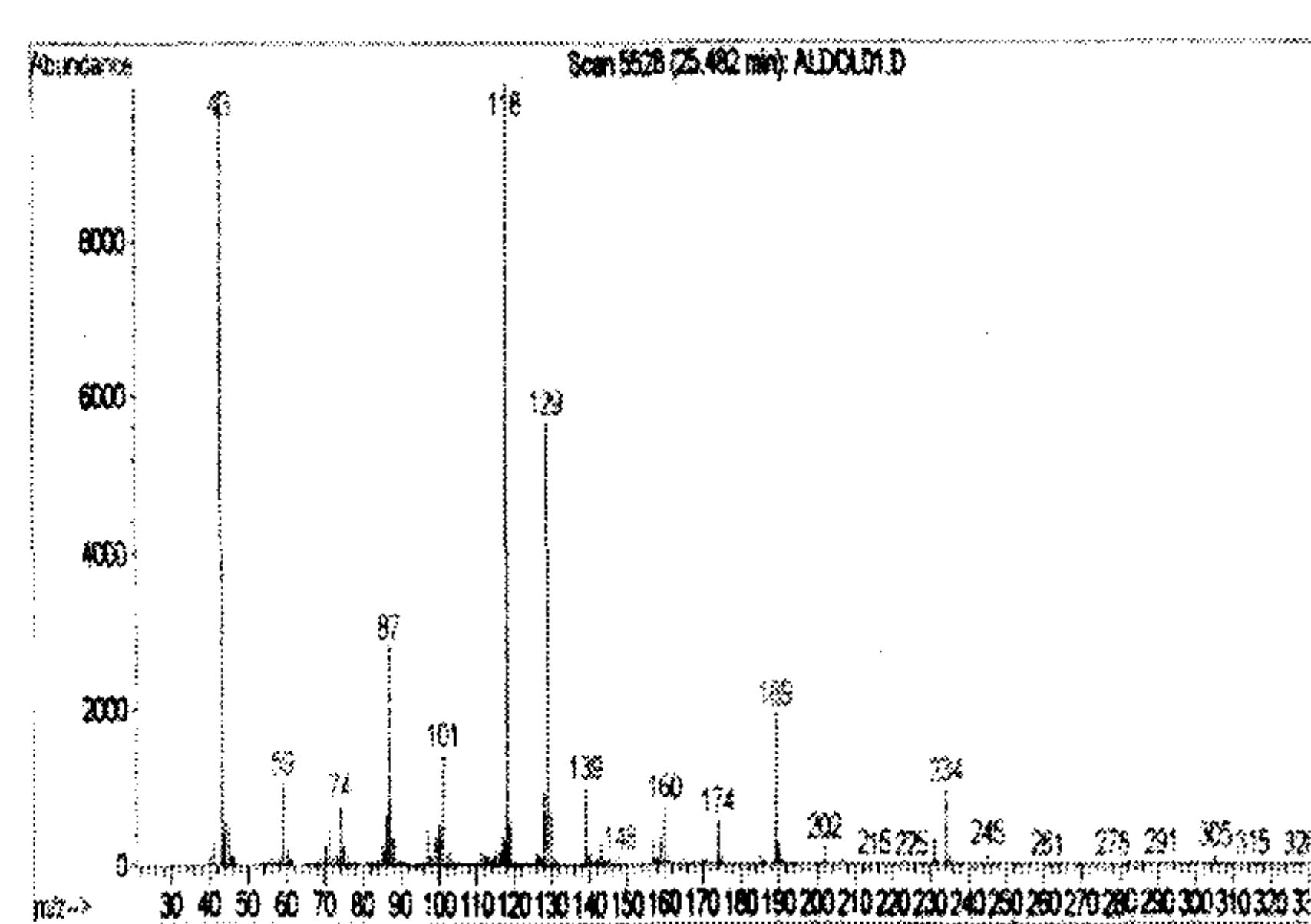
Fractions	Sulfate	Protein	Uronic acid	Total sugar	Sugar composition <sup>3)</sup>							
					Rhm	Fuc	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
EKJ-ppf												
Pronase	26.9	4.3	8.1	39.6	tr	77.4	tr	-	3.8	5.4	10.5	2.9
Fucoidan	26.0	11.1	7.4	41.1	tr	80.1	-	-	3.3	4.9	11.7	tr
LJW-ppf												
pronase	30.1	0.5	3.3	40.0	tr	91.0	-	-	1.1	1.6	4.8	1.5
Fucoidan	31.6	2.0	2.8	43.5	-	90.5	-	-	2.1	2.0	5.4	tr

(다) Laminaran의 methylation

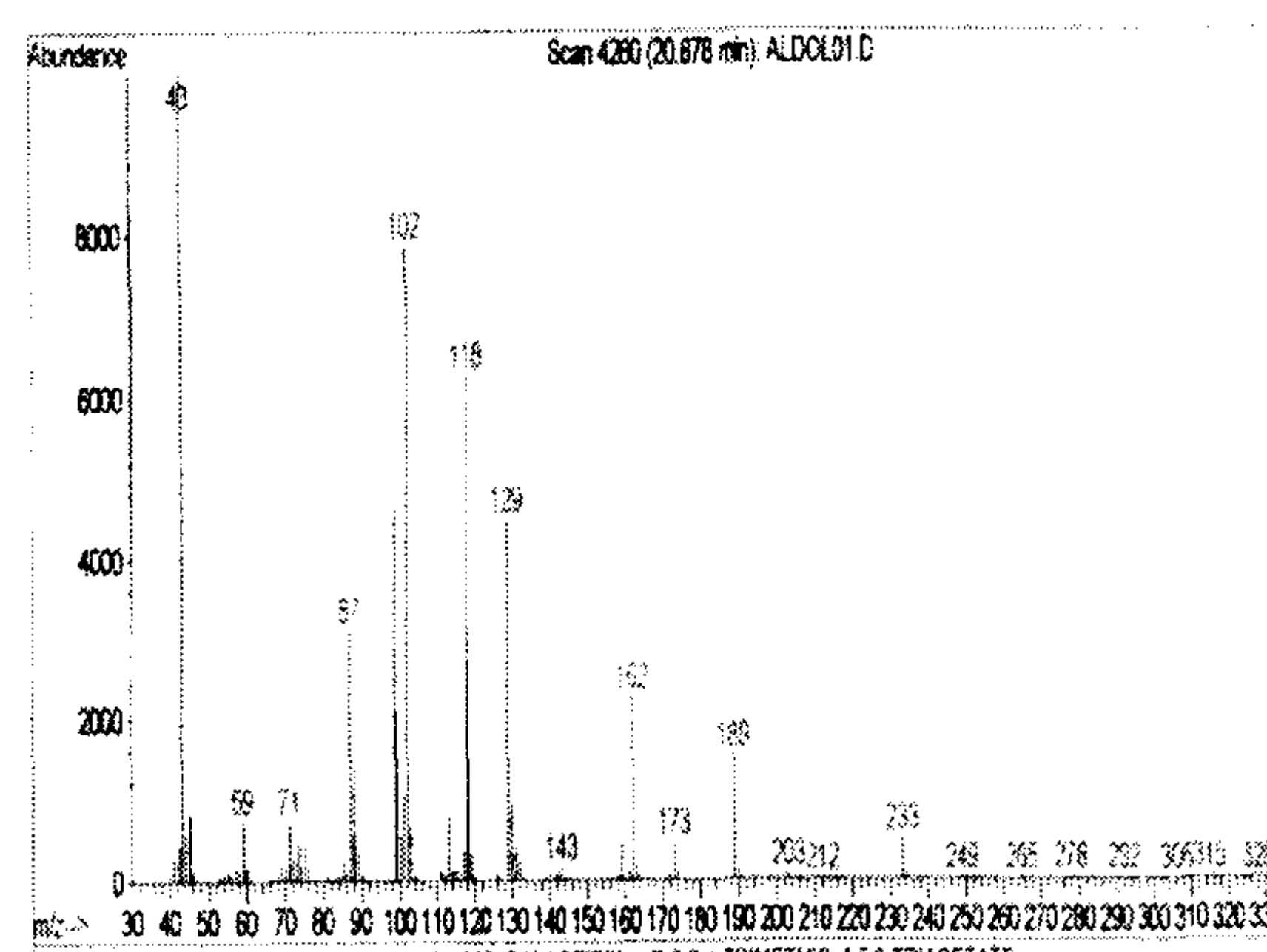
Laminaran의 구성당 결합 위치를 조사하기 위하여 methylation 분석을 행하였다. Retention time과 mass spectrum 해석을 통하여 구성당을 확인하였다. Fig. 19는 대황유래 laminaran 획분 EBU-cs-Fr1의 주요 peak인 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Glc, 2,4,6-Me<sub>3</sub>-Glc, 2,3,4-Me<sub>3</sub>-Glc, 2,4-Me<sub>2</sub>-Glc의 mass spectrum을 각각 나타내었고, 분석 결과는 Table 18과 같다.



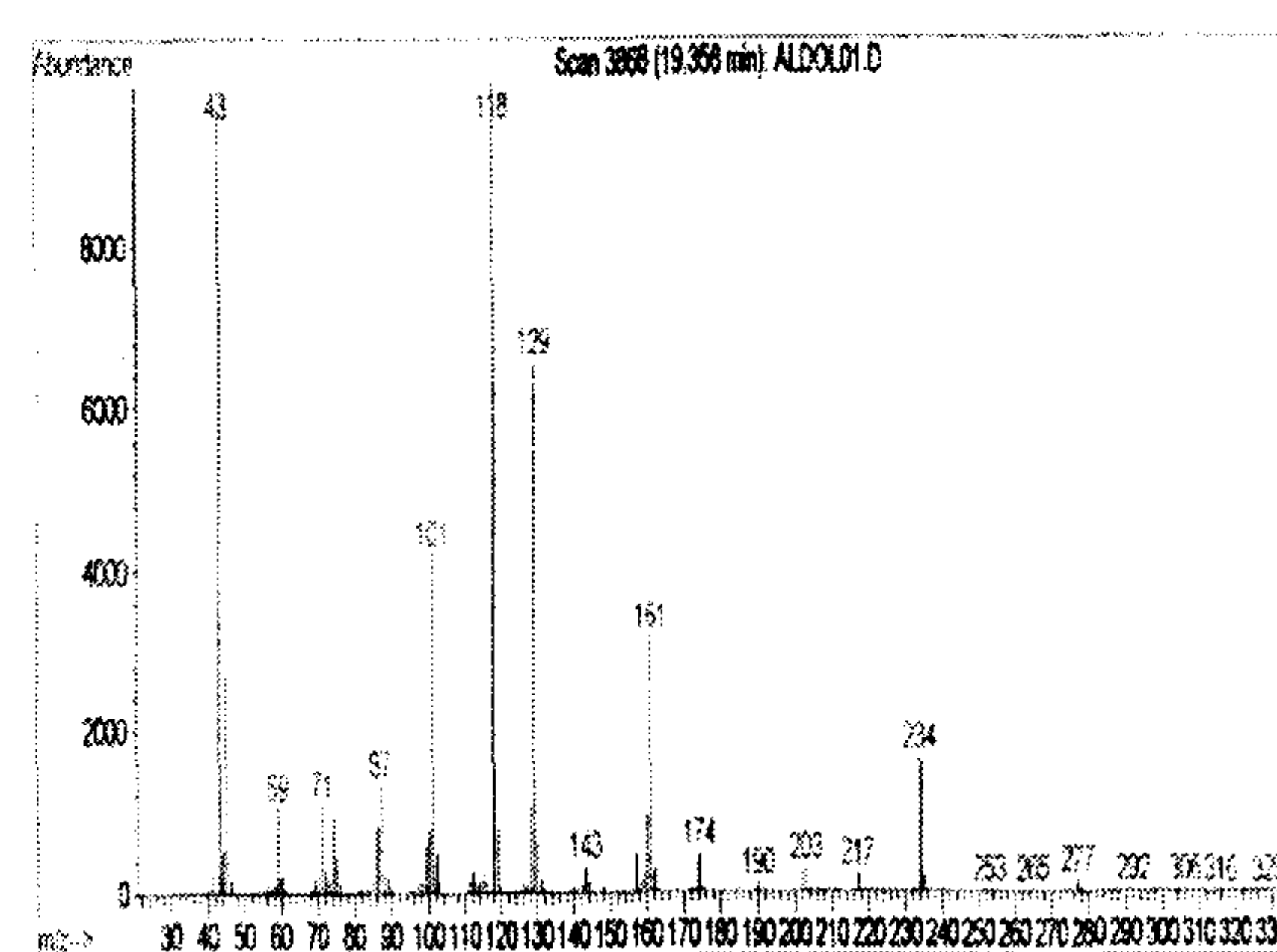
A: 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Glc



B: 2,4,6-Me<sub>3</sub>-Glc



C: 2,3,4-Me<sub>3</sub>-Glc



D: 2,4-Me<sub>2</sub>-Glc

Fig. 19. Mass spectrum of major linkage from EBU-cs-Fr1.

Table 18. Methylation analysis of EBU-cs and its fractions. (Mol.%)

Methylated sugar	Deduced linkage	EBU-cs	EBU-cs-Fr1	EBU-cs-Fr2
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	t-Glcp	8.1	10.5	11.1
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Glc	3-Glcp	41.8	48.6	46.7
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Glc	6-Glcp	28.1	29.2	30.0
2,4-Me <sub>2</sub> -Glc	3,6-Glcp	21.0	11.7	12.3



## 2. Fucoïdan

### 가. 기존 process

#### (1) Crude fucoïdan의 추출

Crude fucoïdan 추출은 Fig. 20과 같이 추출하였다. 즉, 선정된 7종의 건조 해조분말에 15배량의 증류수를 가한 후 염산으로 pH 2.0으로 조정한 다음 85℃에서 1시간 추출조작을 3번 반복하였다. 이 추출액을 여과지(whatman No. 41)로 여과하고 중화 후 감압 농축하였다. 이 농축액에 CaCl<sub>2</sub>를 가하여 응고 침전된 Ca-alginate를 제거한 후 원심분리하고 상층액을 증류수로 투석한 후 3배량의 에탄올을 가하여 생성된 crude fucoïdan을 침전 및 원심분리(10,000 g×10 min)하고 투석 후 동결건조하여 crude fucoïdan을 얻었다.

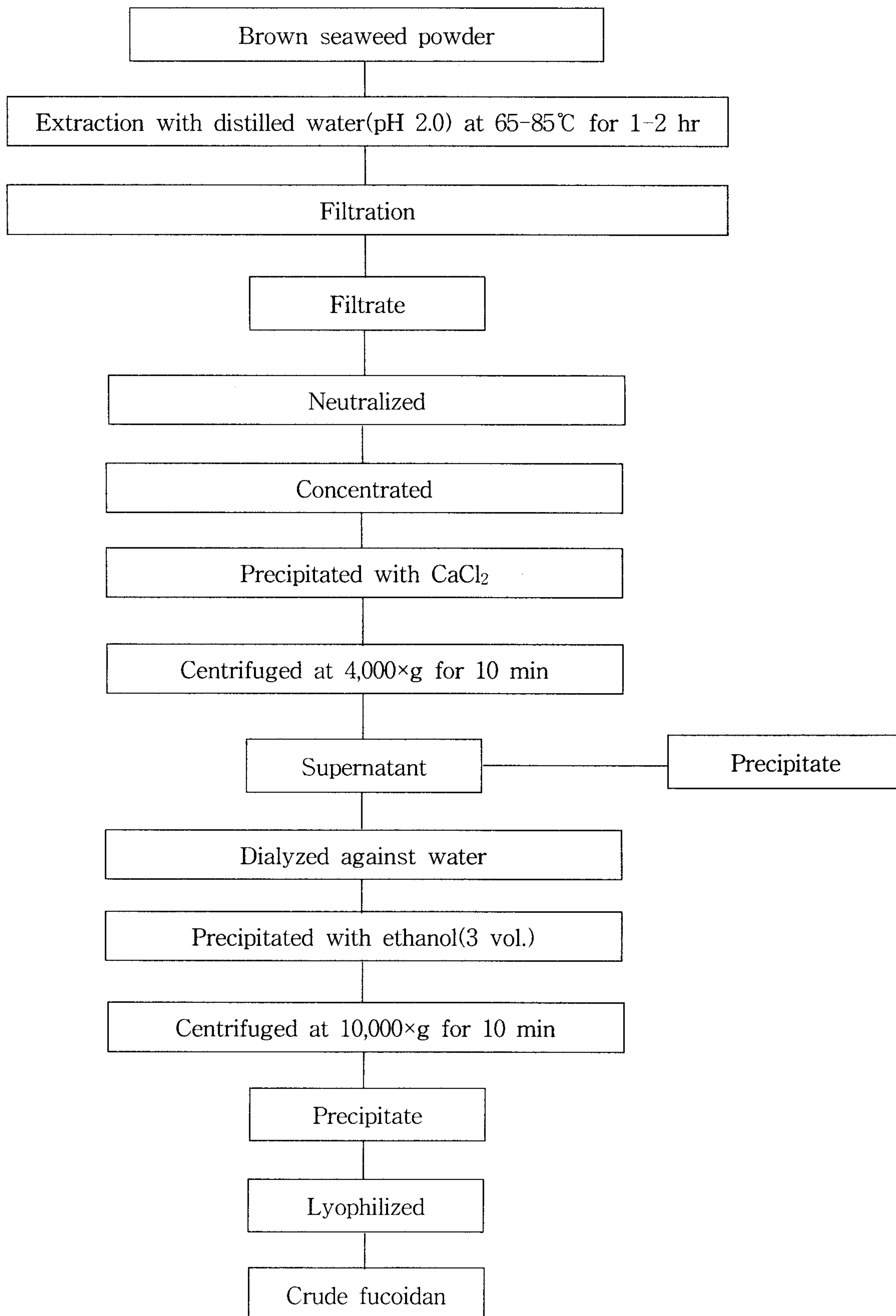


Fig. 20. Extraction procedure of crude fucoidan.

다시마로부터 fucoidan의 추출온도 및 시간에 따른 fucoidan의 추출수율을 비교하였다. 즉, 기존의 방법(Jo et al.(1996))의 추출온도인 65°C와 실험적 추출온도 85°C조건으로 구분하여 1시간 및 2시간 열수 추출하고 filter paper로 여과한 다음 농축, 알콜침전 및 동결건조하여 추출조건별 crude fucoidan의 수율을 측정 비교하였다(Table 19). 추출온도 조건에 따라서는 85°C에서 2시간 추출하였을 때 상대적으로 높은 추출수율을 보임으로서 동일 조건에서 2-3회 반복 추출하는 공정을 실험공정으로 검토하였다.

Table 19. 추출온도 조건에 따른 crude fucoidan의 수율

Sample	Extract Temp. (°C)	Extraction time (hr)	Yield (%)
<i>L. japonica</i> 2*	85	2	6.2
<i>L. japonica</i> 2	85	1	5.5
<i>L. japonica</i> 2	65	2	4.6
<i>L. japonica</i> 2	65	1	4.0

\* refer to Table 1

## (2) Fucoidan의 정제 및 분획

Fucoidan의 정제는 Scot(1987)의 방법에 따라 산성다당과 특이적으로 결합하는 CPC(Cetypyridinium chloride)를 사용하여 Fig. 21 같이 정제하였다. 즉, 1%의 crude fucoidan 용액에 0.02 M의 황산나트륨( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )을 가하고 5% CPC를 침전이 형성되지 않을 때까지 서서히 첨가한 후 35°C에서 하룻밤 정치시켰다. 그리고 원심분리(4,000 g×15 min.)하여 산성 다당 복합체를 얻었다. 이 산성 다당 복합체에 3 M NaCl 용액을 가한 후 35°C에서 48시간 교반하여 산성 다당 복합체에서 CPC를 유리시킨 후 3배량의 E-OH를 가한 다음 원심분리(4,000 g×15 min)한 침전물을 증류수로 투석(MWCO 12,000)한 후 동결건조하여 fucoidan을 얻었다.

Fucoidan의 분획은 한외여과기를 이용하여 분자량별로 분획하였다. 즉, fucoidan은 대부분이 고분자이기 때문에 1 N HCl을 용매로 사용하여 시료농도를 1%로 용해한 후 60°C에서 90분간 가수분해 후 중화하였다. 그리고 filter paper로 여과한 후 ultrafiltration하였다.

그리고 재차 음이온교환수지(DEAE Sepharose Fast Flow)를 이용하여 분획하였다. 먼저 DEAE Sepharose FF( $\text{Cl}^-$  form, Pharmacia)로 충전한 칼럼(5.0×30 cm)을 증류수로 충분히 흘린 후  $\text{Cl}^-$  이온이 검출되지 않도록 수지를  $\text{Cl}^-$  form으로 안정화 시키고, 소량의 증류

수에 녹인 시료를 칼럼에 주입하였다. 시료의 용출(60 mL/hr)은 염의 농도를 0.0 M(H<sub>2</sub>O), 0.25 M, 0.5 M, 0.75 M, 1.0 M, 1.5 M이 되게 단계적으로 높여가면서 용출하였고, 용출액을 fraction collector로 12 mL 씩 취하여 황산기와 총당의 함량을 측정하였다. 분획된 획분을 합쳐 염소 이온이 검출되지 않을 때까지 증류수로 투석(MWCO 12,000)한 후 농축, 동결건조하여 정제 fucoidan을 분획하였다.

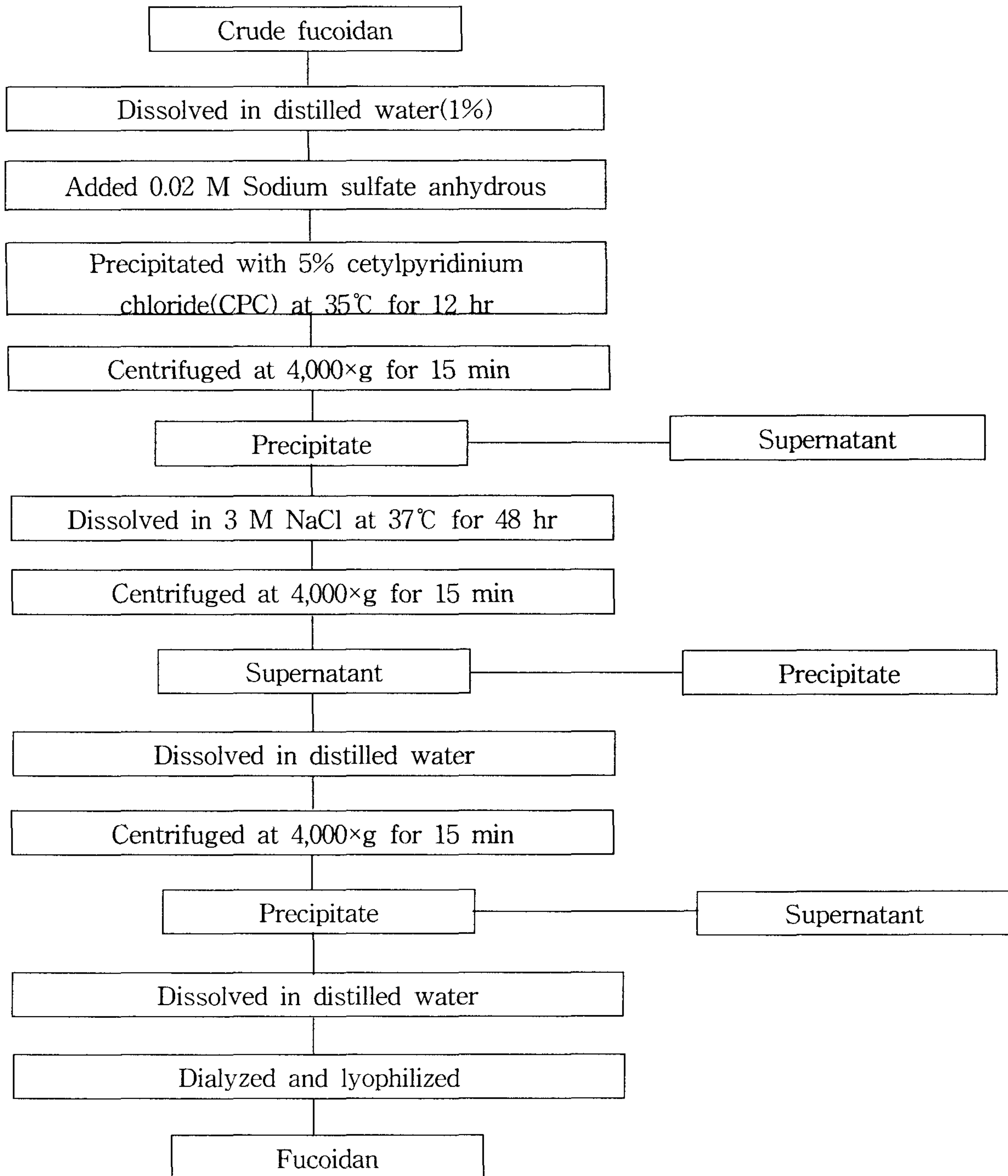


Fig. 21. Purification procedure of crude fucoidan.

나. 실험과정(Experimental process)

(1) Crude fucoidan의 추출

분말상태의 해조 건조시료 2.5 kg에 물 50 L을 가하여 100℃에서 3시간 동안 추출한 후 CaCl<sub>2</sub>를 가하여 생성된 불용성의 Ca-alginate를 제거하고 남은 추출액을 농축하고, 이어서 주정을 가하여 응고된 고분자 산성다당을 여과 또는 원심분리법으로 분리한 후 알콜을 제거하고 투석하여 염류 등 불순물을 제거한 후 동결건조하여 crude fucoidan을 얻었다.

(2) Crude fucoidan의 이화학적 조성

미역, 다시마, 곰피, 대황, 톳, 팽생이모자반으로부터 추출한 crude fucoidan의 이화학적 조성은 Table 20과 같다. 수율은 팽생이모자반이 4.7%로 가장 높았으며 다음으로 감태(2.0%), 다시마(1.7%), 곰피(1.5%) 순이었다. 전체적으로 수율이 낮은 것은 농축시 한외여과기(MWCO 10,000)로 농축하여 농축과 동시에 탈염과 저분자가 소실되었기 때문이다. 해조에서 추출한 crude fucoidan은 주로 황산기와 총당으로 구성되어 있으며, 당은 주로 fucose로 이루어진 다당이었다.

Table 20. Yields and chemical compositions of crude fucoidans extracted from selected brown seaweeds (% , dry basis)

	LJW-cf <sup>3)</sup>	ESB-cf	EKJ-cf	HFW-cf	UPU-cf	SHY-cf
yield <sup>1)</sup>	1.7	1.5	2.0	0.7	0.5	4.7
protein	7.2	15.9	15.6	6.9	1.7	7.0
total sugar	29.5	37.5	39.1	41.9	14.2	35.6
uronic acid	9.4	18.1	12.6	17.3	17.2	9.7
sulfate	28.2	18.0	22.5	18.1	9.1	26.5
Fucose <sup>2)</sup>	88.1	51.0	67.6	97.5	25.0	97.4
Ribose	0	0	0	0	0.0	0
Xylose	tr	7.6	6.0	0	0.0	0
Mannose	tr	0	tr	0	58.8	tr
Galactose	11.8	16.5	11.8	2.5	16.2	1.2
Glucose	tr	24.8	14.7	0	0.0	1.0

<sup>1)</sup> % of seaweed

<sup>2)</sup> Calculated from GC analysis, considering the total amounts under the six monosaccharide as 100%

<sup>3)</sup> cf ; crude fucoidan

(3) Fucoidan의 정제

Fucoidan은 DEAE Sepharose FF(Cl<sup>-</sup> form, Pharmacia)로 충전한 칼럼(5.0×30 cm) 크로마토그래피 방법으로 정제하였다. 즉, DEAE Sepharose FF(Cl<sup>-</sup> form, Pharmacia)를 충전한 칼럼(5.0×30 cm)에 수지를 Cl<sup>-</sup> form으로 안정화 시키고, 소량의 증류수에 녹인 시료를 칼럼에 주입한 다음 NaCl 용액을 사용하여 농도 0.0 M(H<sub>2</sub>O), 0.25 M, 0.5 M, 0.75 M, 1.0 M, 1.5 M이 되도록 단계적으로 높여가면서 60 mL/hr 속도로 주입하여 수지에 흡착된 fucoidan을 용리시켰으며 용리액은 fraction collector로 분획하였다. 이 fraction을 다시 이온교환수지(DIAON PA312, -N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Cl<sup>-</sup>(Trimethyl -ammonium))를 이용하여 분획하였으며, 이 분획물을 다시 Sephadex G-75(Sigma)로 충전한 칼럼에 60 mL/hr의 속도로 gel permeation chromatography하였다. 분획물은 peak 별로 모아 투석 및 동결건조하여 최종 fucoidan을 얻었다.

해조에서 추출한 정제 fucoidan의 구성당 조성은 Table 21과 같다. 정제한 fucoidan 모두 총당의 함량은 증가하였고, 단백질의 함량은 감소하였으며 구성당 비율도 fucose 함량은 증가하였고, 기타 불순물은 감소하여 더욱 정제되었다.

Table 21. Yields and chemical compositions of partially purified fucoidans from brown seaweeds

Components	원료 해조류					
	다시마	대황	감태	툃	미역	팽생이 모자반
yield <sup>1)</sup>	5.87	1.50	7.87	3.48	5.03	3.24
protein	3.8	8.8	12.2	5.3	4.4	4.4
total sugar	36.3	39.5	37.1	42.0	31.0	39.1
uronic acid	6.3	14.1	13.8	16.6	26.1	6.0
sulfate	32.2	22.5	27.6	17.4	6.8	26.7
Fucose	94.0	77.7	72.1	62.1	70.5	98.4
Ribose	0	0	0	0	0	0
Xylose	tr	7.8	5.1	7.1	2.3	tr
Mannose	tr	3.4	7.5	9.9	18.5	tr
Galactose	6.0	11.2	10.5	16.1	3.9	1.2
Glucose	tr	tr	4.8	4.7	3.2	0

<sup>1)</sup> % of crude fucoidans. dry basis, %

(4) 한외여과에 의한 분획

Table 22, 23은 감태와 다시마에서 추출 분리한 fucoidan의 분자량 분획별 수율 및 성분조성을 알아본 결과이다. 감태에서 추출한 fucoidan을 1 N-HCl로 가수분해 후 중화하고 분자량별로 한외여과한 fucoidan의 수율은 100 kDa 이상이 50.5%로 주 분획이었고, 10 kDa 이하가 24.1%, 100-50 kDa가 2.2%였다. 주 분획의 성분조성은 총당이 28.2%이고 황산기의 함량이 18.3%였으며, 단백질과 우론산이 각각 17.3% 및 11.7%였다. 주 구성당은 fucose로 51.3%였으며 기타 galactose, mannose, xylose, glucose로 이루어진 다당이였다. 가수분해에 의해 저분자화 되면서 단백질과 우론산의 함량이 감소하였고 fucose의 함량은 증가한 반면, 다른 당들의 함량은 감소하였다.

다시마에서 추출한 fucoidan의 분획수율은 10 kDa 이하가 43.0%였으며, 다음으로 100 kDa 이상인 LJW-ppf-ep1 분획이 25.4%였으며, 주 분획인 LJW-ppf-ep4는 황산기와 fucose로 이루어진 sulfated fucose이였다. LJW-ppf-ep1의 이화학적 조성은 총당의 함량이 31.3%이고, 황산기의 함량이 17.7%였으며, galactose와 glucose로 이루어진 다당이였다.

Table 22. Yields and chemical compositions of fractions obtained by ultrafiltration of partially purified fucoidan from *Ecklonia kurome* (% , dry basis)

Fractions	Yield <sup>1)</sup>	Sulfate	Protein	Uronic acid	Total sugar	Sugar composition							
						Rhm	Fuc	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
EKJ-ppf-ep1	50.5	18.3	17.3	11.7	28.2	2.5	51.3	-	-	6.5	13.6	22.7	3.3
EKJ-ppf-ep2	2.2	9.6	1.8	7.2	22.2	tr	78.1	-	-	1.2	6.5	12.7	1.5
EKJ-ppf-ep4	24.1	21.0	1.3	3.8	31.0	tr	93.1	-	-	tr	1.9	5.0	tr

<sup>1)</sup> Percent of EKJ-ppf

Table 23. Yields and chemical compositions of fractions obtained by ultrafiltration of partially purified fucoidan from *Laminaria japonica* (% , dry basis)

Fractions	Yield <sup>1)</sup>	Sulfate	Protein	Uronic acid	Total sugar	Sugar composition							
						Rhm	Fuc	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
LJW-ppf-ep1	25.4	17.7	8.9	26.6	31.3	2.9	33.1	0.0	0.0	3.2	12.9	45.5	2.4
LJW-ppf-ep2	1.7	9.7	2.4	7.1	18.4	tr	59.2	-	tr	3.2	4.2	33.4	tr
LJW-ppf-ep3	1.6	6.9	1.8	2.2	8.6	-	87.1	-	tr	tr	tr	12.7	tr
LJW-ppf-ep4	43.0	28.0	1.1	1.7	28.6	-	99.9	-	tr	-	tr	tr	tr

<sup>1)</sup> % of LJW-ppf

(5) 음이온 교환수지에 의한 분획 및 구조 분석

분자량별로 분획한 fucoidan을 음이온교환수지(DEAE Sepharose Fast Flow)로 재차 분획하여 다당의 화학적 조성 및 크로마토그램을 Table 24, 25와 Fig. 22, 23에 나타내었으며 fucoidan의 구조를 Fig. 24에 나타내었다. LJW-ppf-ep1은 3개의 fraction으로 분획되었다. EKJ-ppf-ep1 역시 3개의 분획으로 분리되었으며 주분획은 0.5 M NaCl 농도에서 분획된 EKJ-ppf-ep1-Fr2로 주로 fucose와 galactose로 구성된 다당이였다.



Table 24. Yields and chemical compositions of fractions recovered from DEAE Sepharose Fast Flow chromatography of LJW-ppf-ep1 (% dry basis)

Fractions	Yield <sup>1)</sup>	Sulfate	Protein	Uronic acid	Total sugar	Sugar composition							
						Rhm	Fuc	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
LJW-ppf-ep1													
Fr-1	10.2	15.7	13.2	18.2	35.4	3.2	28.6	-	-	5.7	13.4	29.1	10.1
Fr-2	38.2	9.7	6.0	29.2	36.5	2.0	42.6	-	tr	11.4	19.6	12.7	11.8
Fr-3	32.7	25.6	3.7	9.8	44.6	3.6	20.2	-	tr	1.5	7.4	63.4	3.1

<sup>1)</sup> % of LJW-ppf-ep1

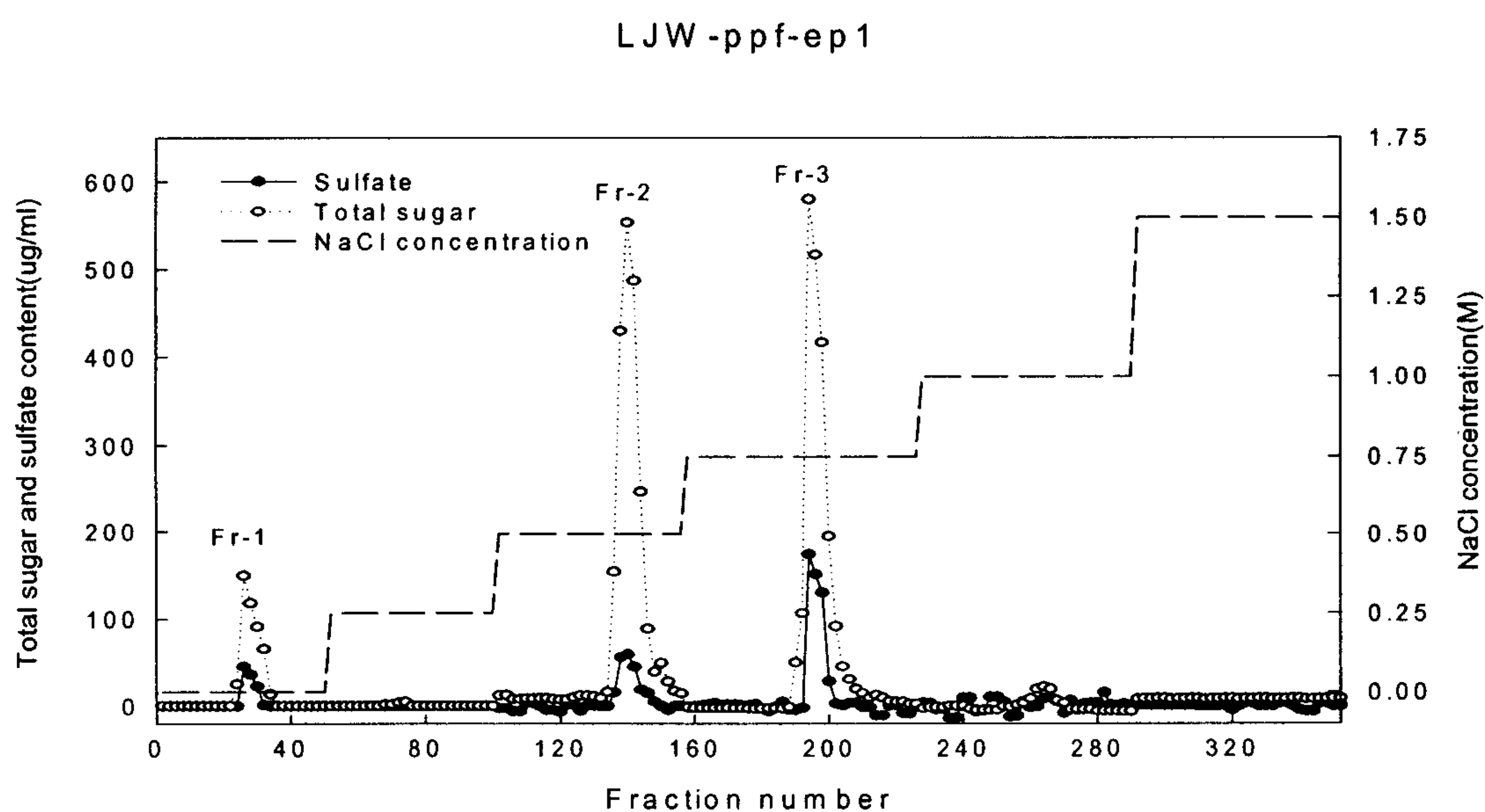


Fig. 22. Fractionation of LJW-ppf-ep1 on DEAE Sepharose Fast flow.

- o Fraction : 12.5 mL/tube, Flow rate : 60 mL/hr,
- o Eluent : distilled water with a step-wise salt gradient,
- o Fractionation : Fr-1(tube No.24-36), Fr-2(69-75), Fr-3(132-152), Fr-4(190-210), Fr-5(25-270)

EKJ-ppf-ep1

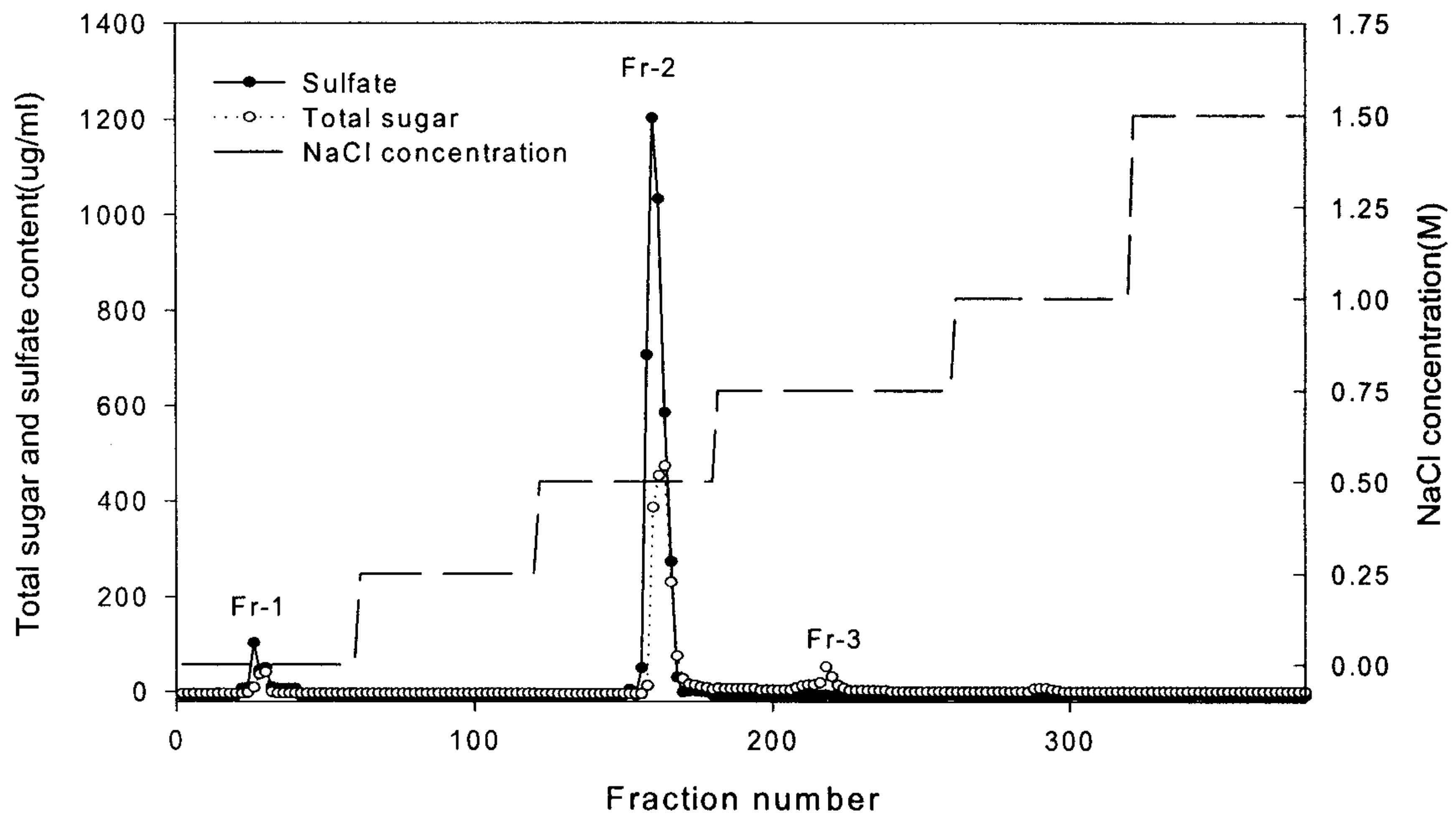


Fig. 23. Fractionation of EKJ-ppf-ep1 on DEAE Sepharose Fast Flow.

- o Fraction : 12.5 mL/tube, Flow rate : 60 mL/hr,
- o Eluent : distilled water with a step-wise salt gradient,
- o Fractionation : Fr-1(tube No.25-32), Fr-2(158-168), Fr-3(212-222)

Table 25. Yields and chemical compositions of fractions recovered from DEAE sepharose fast flow chromatography of EKJ-ppf-ep1 (% , dry basis)

Fractions	Yield <sup>1)</sup>	Sulfate	Protein	Uronic acid	Total sugar	Sugar composition							
						Rhm	Fuc	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
Fr-1	8.4	6.2	15.9	7.0	10.0	-	32.9	-	-	17.0	20.4	tr	29.5
Fr-2	38.4	13.9	5.7	16.0	30.7	tr	49.0	-	-	14.6	14.6	21.4	tr
Fr-3	3.0	9.6	2.0	2.8	12.5	tr	19.3	-	-	tr	tr	59.3	21.0

<sup>1)</sup> % of EKJ-ppf-ep1

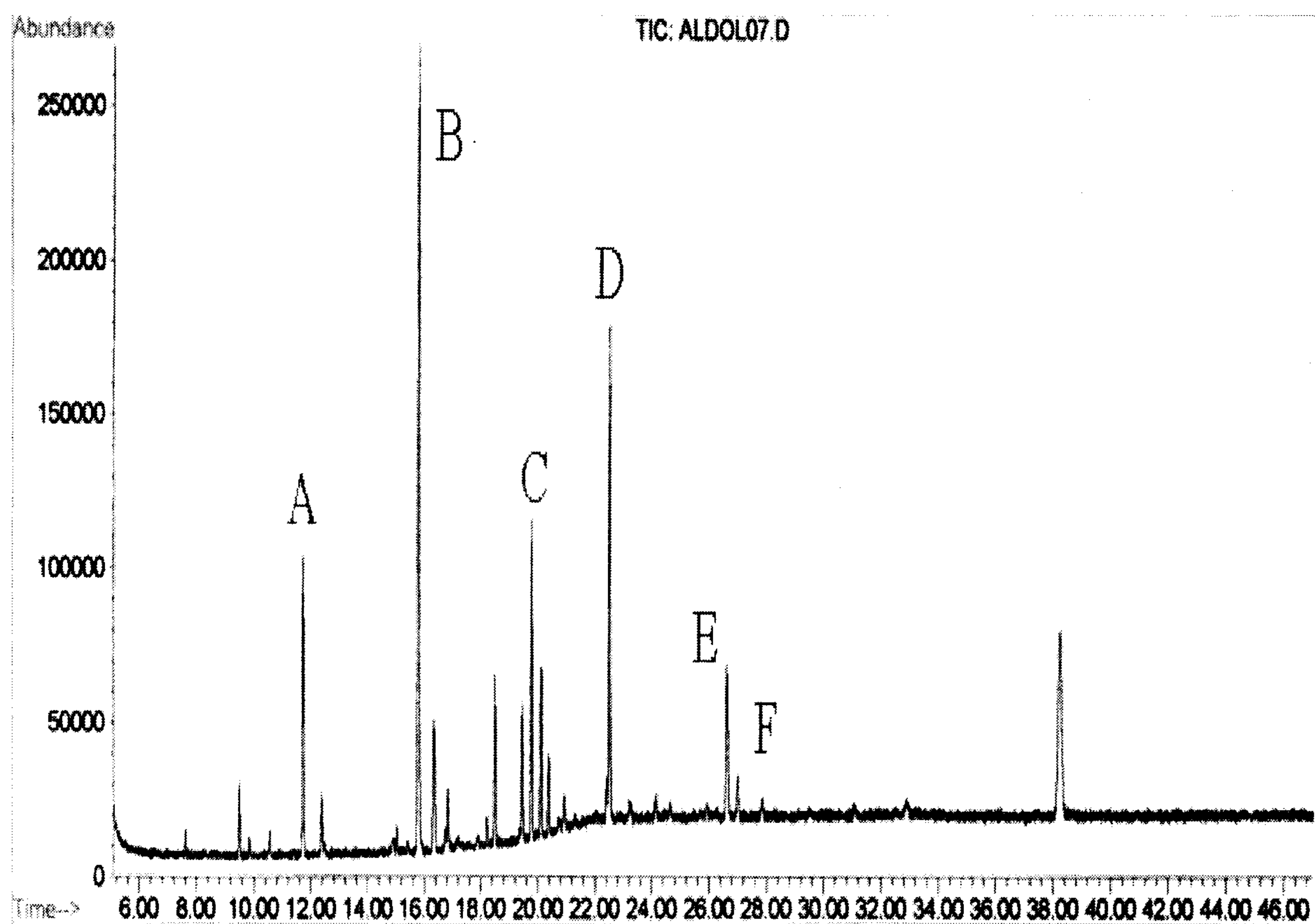


Fig. 24. Total ion chromatogram of methylated alditol acetate from fucoidan of EKJ

A: 2,3,4-Me-Fuc; B: 2,4-Me-Fuc; C: 2-Me-Fuc; D: 2,4,6-Me-Gal; E: 4,6-Me-Gal; F: 2,3,6-Me-GlcA

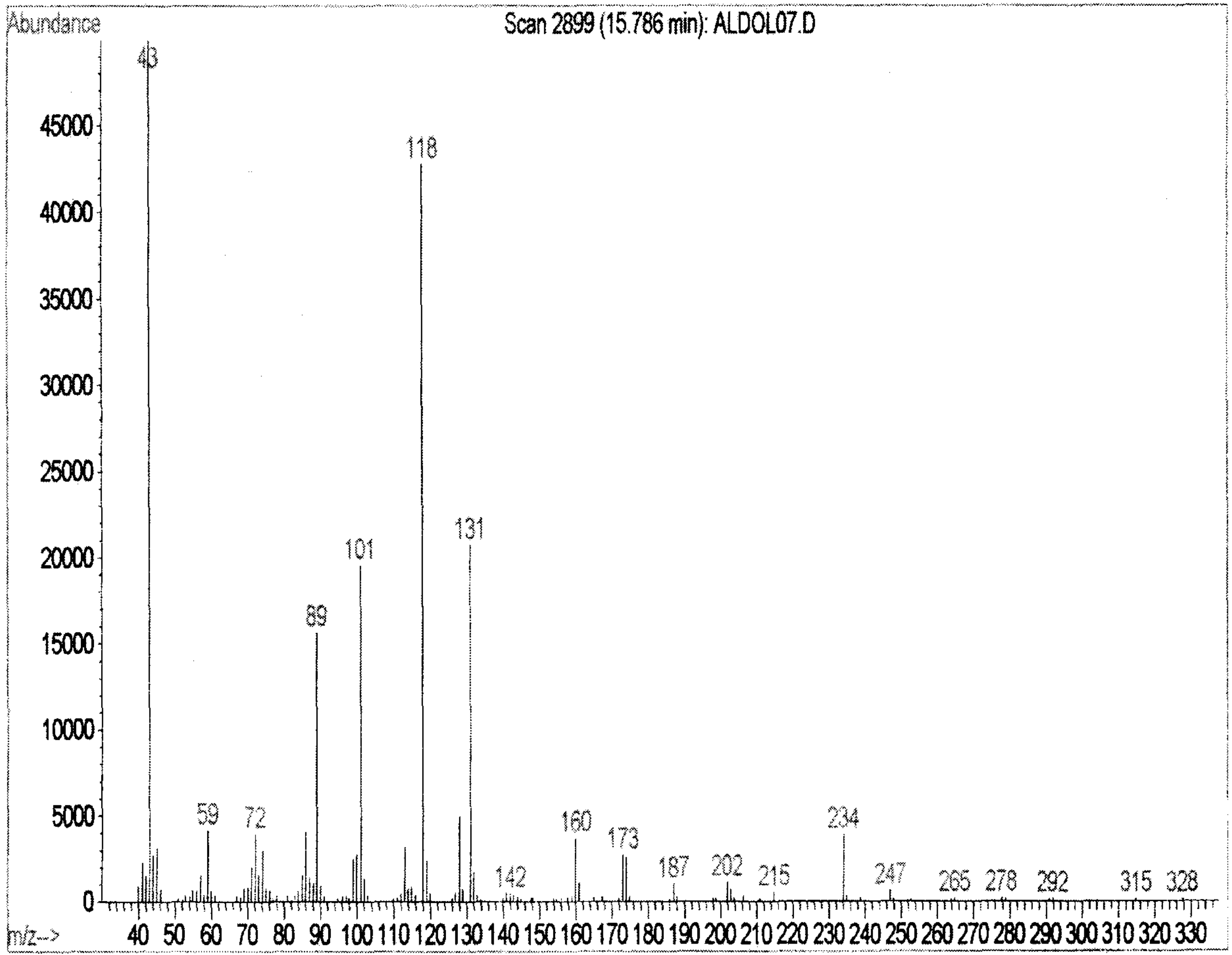


Fig. 25. Mass spectrum에 의한 fucoidan의 구조(2,4-Me-Fuc(1,3결합ucose))

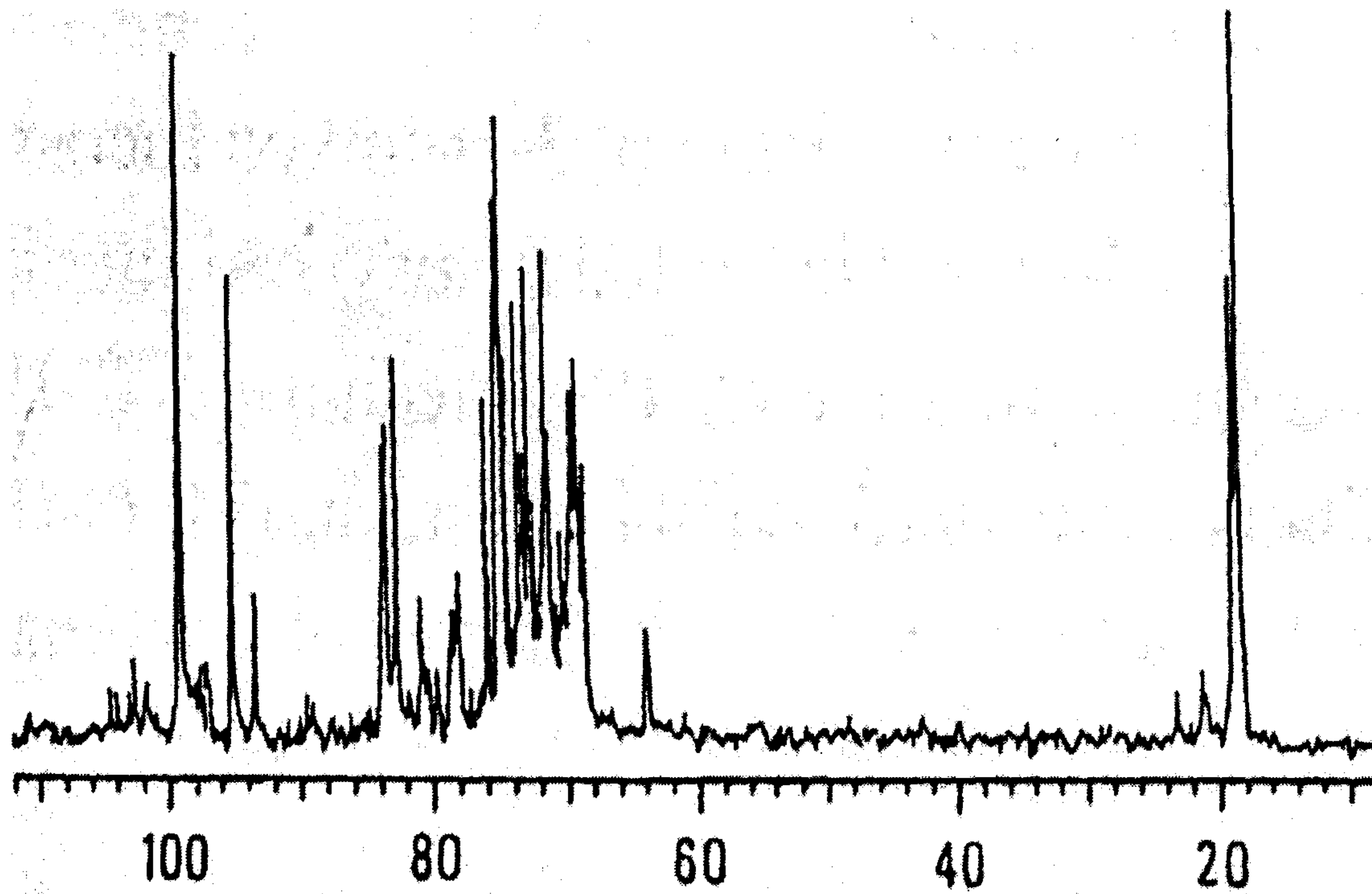


Fig. 26. Fucoidan의  $^{13}\text{C}$  NMR 분석

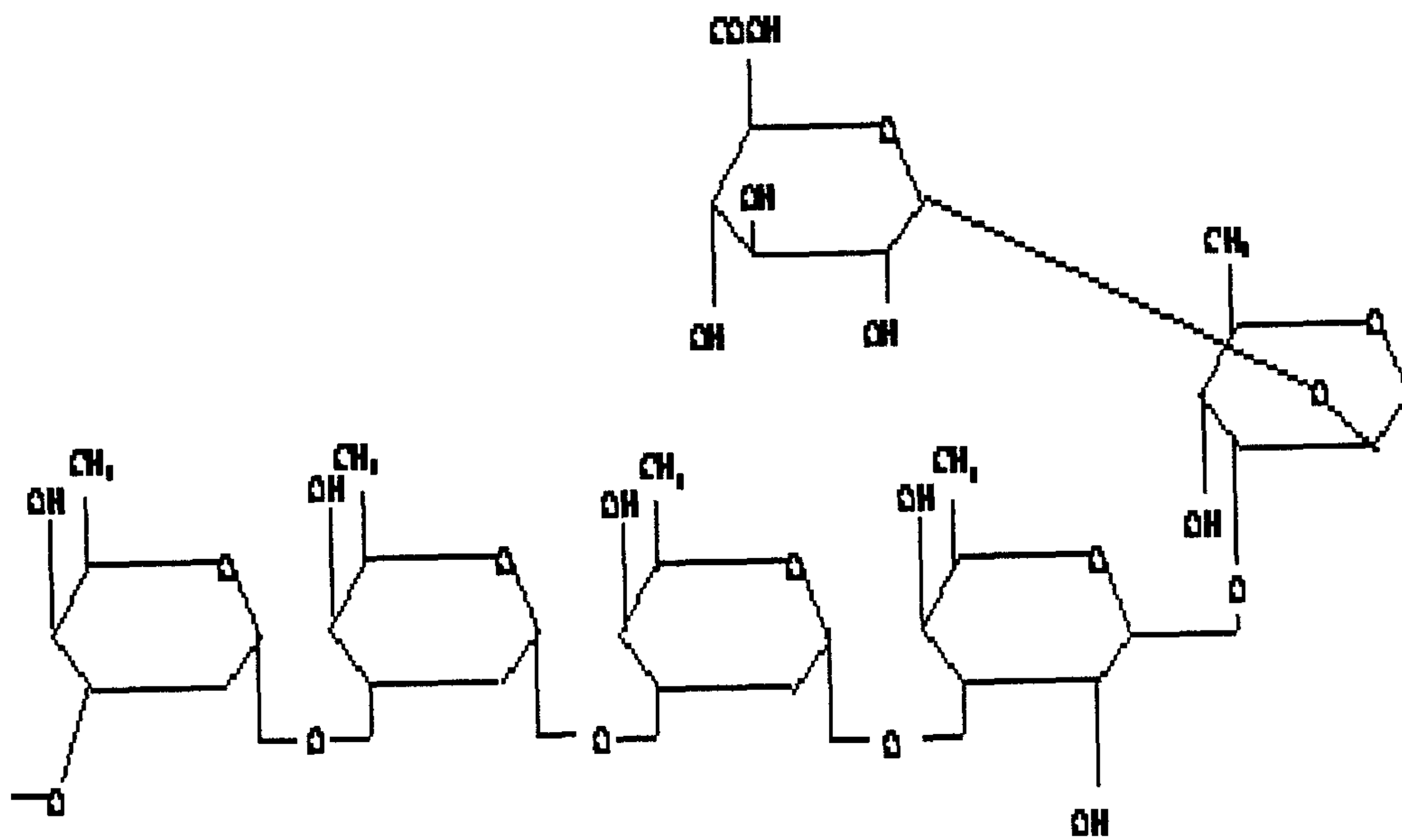


Fig. 27. Fcoidan의 구조

### (6) HPLC에 의한 분자량 측정

Fucoidan의 분자량 분산성을 측정하기 위해서 HPLC를 사용하였다. Ultrahydrogel 1000 칼럼(300×7.8 mm I.D.)에 0.25%로 녹인 정제다당을 2 µL를 주입한 후 증류수(0.8 mL/min.)로 용리하였고, RI detector(Jasco RI 930)로 측정하였다. 분자량 측정용 표준시약은 dextran을 사용하였고, 표준 dextran의 분자량은 T-500은 520,000, T-70이 71,900, T-40이 39,200, T-10은 9,300이었으며, 표준 dextran을 이용한 분자량 검량선은 Fig. 28과 같다. 그 결과 fucoidan의 분자량은 50,000 Da 이상으로 나타났다.

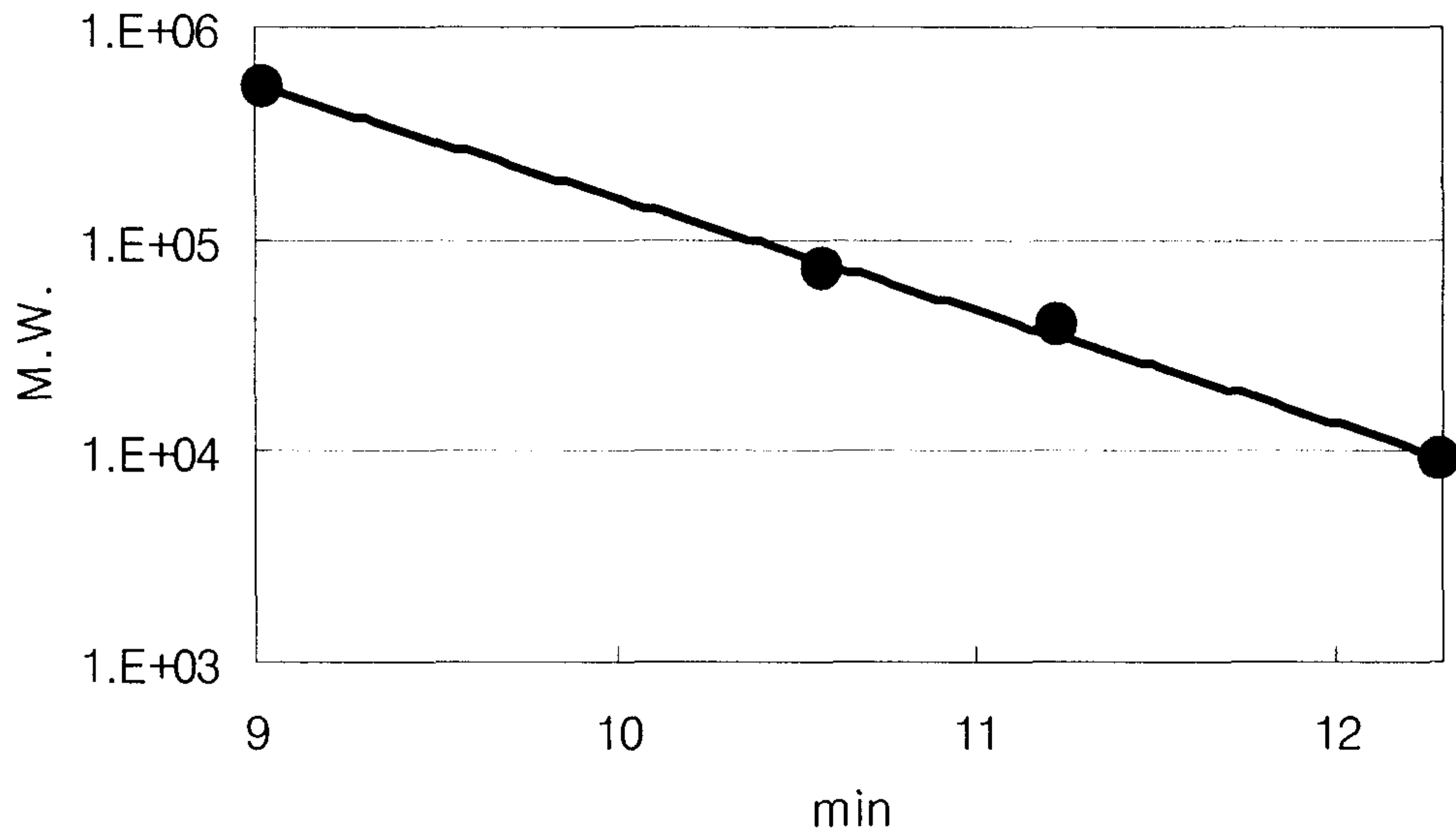


Fig. 28. Calibration curve of standard dextran by HPLC.

T-500: 520,000 MW. T-70: 71,900 MW.

T-40: 39,200 MW. T-10: 9,300 MW.

Column: Ultrahydrogel 1000, Detector: RI, Elution: water, Flow rate: 0.8 mL/min.

## 3. Fucosterol

### 가. 기존 공정

#### (1) Crude fucosterol의 추출

시료 10 g을 Round flask에 취하여 soxhlet 추출장치를 이용하여 물, 에탄올, 메탄올, 에칠아세테이트, 클로로포름, 디에칠에테르 및 헥산 등의 여러 용매를 이용하여 90°C에서 2hr 환류추출하였다. 이 추출물에 95% 에탄올에 녹인 10% KOH 100ml을 혼합하고 90°C의

steam bath 상에서 4시간 가수분해하여 추출물중의 검화물을 제거한 다음 분액깔때기에 옮겨 70 mL 헥산을 가해 3분간 진탕하여 층분리 후 상층액을 취하고 하부의 액을 30 mL 헥산으로 재 분획하여 이전의 상층액과 합했다. 헥산층이 중성이 될 때까지 수세, 농축한 후 2 mL로 정용하여 GC 분석용 시료로 하였다. Fucosterol의 GC분석 조건은 Table 26과 같다. Fucosterol 분석시 표준품은 95% fucosterol을 사용했으며, fucosterol 함량은 표준품과 시료의 면적비로 산출하였다.

Table 26. G/C conditions for analysis of fucosterol

Instrument	Hewlett Packard GC Model 5890
Column	HP-1 (0.32 mm I.D. × 30 m)
Oven temp.	220°C/3min, 3°C/min, 250°C/10min
Carrier gas	H <sub>2</sub> gas 10 psi
Make up gas	Nitrogen (25 mL/min)
Detector	Flame ionizing detector
Injection temp.	260°C
Detector temp.	280°C

Table 27에서는 추출용매별 fucosterol의 용해도를 조사한 결과로서 물과 메탄올에는 불용이었고, 에탄올과 헥산에서는 상당량이 용해되었다. 에칠아세테이트, 클로로포름 및 디에칠에테르에는 매우 잘 용해되므로 고농도 농축시에는 이들 용매를 사용할 수 있음을 확인하였다. 추출온도는 에탄올의 boiling point(78°C)와 시료중의 수분을 고려하여 90°C에서 2시간 동안 환류 추출하였다.

Table 27. 추출용매에 따른 해조류로부터의 fucosterol 추출 특성

추출용매	Dielectricconstants	Fucosterol의 용해도
물	81	극히 불량
메탄올	31	극히 불량
에탄올	26	비교적 양호
에칠아세테이트	6.5	극히 양호
클로로포름	5.2	극히 양호
디에칠에테르	4.3	극히 양호
헥산	1.9	비교적 양호

(2) Fucosterol 정제

Crude fucosterol 4 g을 벤젠에 용해시킨 다음 neutral alumina 칼럼으로 분리하였다. 여액 중 fucosterol(0.6-2.5 L) 분획을 분취·농축·건조하였다. 그리고 이 건조물을 다시 fresh alumina로 크로마토그래피하여 여액을 아세톤으로 결정화하여 부분정제 fucosterol을 얻었다. 부분정제 fucosterol은 다시 10 mL acetic anhydride로 acetylation 시키고 20 mL의 벤젠으로 용해시켰다. 그리고 20% AgNO<sub>3</sub>-silica gel 칼럼으로 크로마토그래피하여 fucosterol acetate 획분을 methanol-benzene 용액으로 결정화하여 순수한 fucosteryl acetate를 얻었다.

나. 실험공정(Experimental process)

(1) Fucosterol의 적정 추출용매 조건 검토

유기용매의 종류에 따른 해조류 유래 fucosterol의 추출 및 분획수율을 Table 28에 나타내었다. 선행연구 결과 fucosterol의 추출분리에 사용된 유기용매로서 1차적으로 원료 해조류로부터 지용성 성분의 추출용매인 chloroform : methanol 혼합용매 대신에 관련 법규상 사용이 허용된 ethanol을 사용하였으며, 추출 지용성분의 가수분해 후 sterol 함량이 풍부한 non-saponifiable fraction 분획용 용매로서 ether 대신에 hexane을 사용하였다. chloroform + methanol에 비해 ethanol 추출 수율은 팽생이모자반이 21.4%, *L. japonica*는 31.5 및 47.35%, *E. kurome*는 12.5%, 분획용매로서 ether 대신 hexane을 사용한 경우 분획수율은 ether 사용에 비해 38.0%(팽생이모자반), 37.5%(*L. japonica*), 15.8%(*E. kurome*) 수준으로 각각 감소한 것으로 나타났으나 식품처리용으로서의 합법성 때문에 해조류로부터 fucosterol의 추출 및 분



획 용매 시스템으로서는 ethanol 추출 및 hexane 분획 용매시스템의 적용이 가능할 것으로 사료되었다. 이때 원료 종류별 추출수율은 *E. kurome*가 팽생이모자반 및 *L. japonica*에 비해 상대적으로 높게 나타났다.

Table 28. Yields of fucosterol extraction and fraction in seaweed with solvents

Sample	추출용매	수율 (%)	분획용매	수율 (%)
팽생이모자반	Chloroform+Methanol	4.2	Ether	0.40
	95% Ethanol	3.3	Hexane	0.32
<i>L. japonica</i>	Chloroform+Methanol	3.8	Ether	0.32
	95% Ethanol	2.6	Hexane	0.20
<i>E. kurome</i>	Chloroform+Methanol	4.0	Ether	0.38
	95% Ethanol	3.5	Hexane	0.32

(2) Fucosterol의 분리·정제 및 이화학적 분석

*E. kurome* 160 g/1000 mL(ethanol)을 shaking water bath에서 24시간 교반한 후 1 M KOH로 4시간 가수분해한 후 hexane층을 분리하고 감압·농축하여 crude fucosterol을 얻었다. Crude fucosterol을 활성화시킨 neutral alumina를 column (3×60 cm)에 2 mg/mL 농도로 주입한 다음 benzene 용액을 사용하여 1 mL/min 속도로 용출시키면서 fucosterol rich fraction을 분취하였으며, 각각의 fraction은 TLC (cyclohexane : ethyl acetate = 80 : 20)로 확인하였다. Fraction number 50-60 사이에서 표준품과 동일한 Rf 값을 갖는 분획물 purified-I-Fucosterol을 분리하였으며(Fig. 30), 활성화시킨 neutral alumina column에 2 mg/mL를 주입하여 동일한 조건하에서 purified-II-Fucosterol을 분리하였으며(Fig. 31), GC

분석결과 RT:15.45 min에서 표준 fucosterol(15.30 min)과 유사한 pattern을 나타내었다. Purified-II-Fucosterol을 감압·농축하여 acetone으로 결정화하였으며, acetic anhydride를 넣고 steam bath에서 24 시간동안 반응시킨 후 반응물을 20% AgNO<sub>3</sub>-Silica gel column에 주입하여 hexane-benzene (10:1)을 1 mL/min로 흘려주면서 fucosteryl acetate 획분을 분취하였다. 이를 methanol-benzene(1:1)으로 결정화하였고, 결정화된 pure fucosteryl acetate는 TLC (chloroform : CCl<sub>4</sub> : acetic acid = 50 : 50 : 1)로 확인하였다(Fig. 32). GC 분석결과 불순물이 상당이 제거되었으며, 표준품과 비교시 90%이상 일치하였다(Fig. 33).

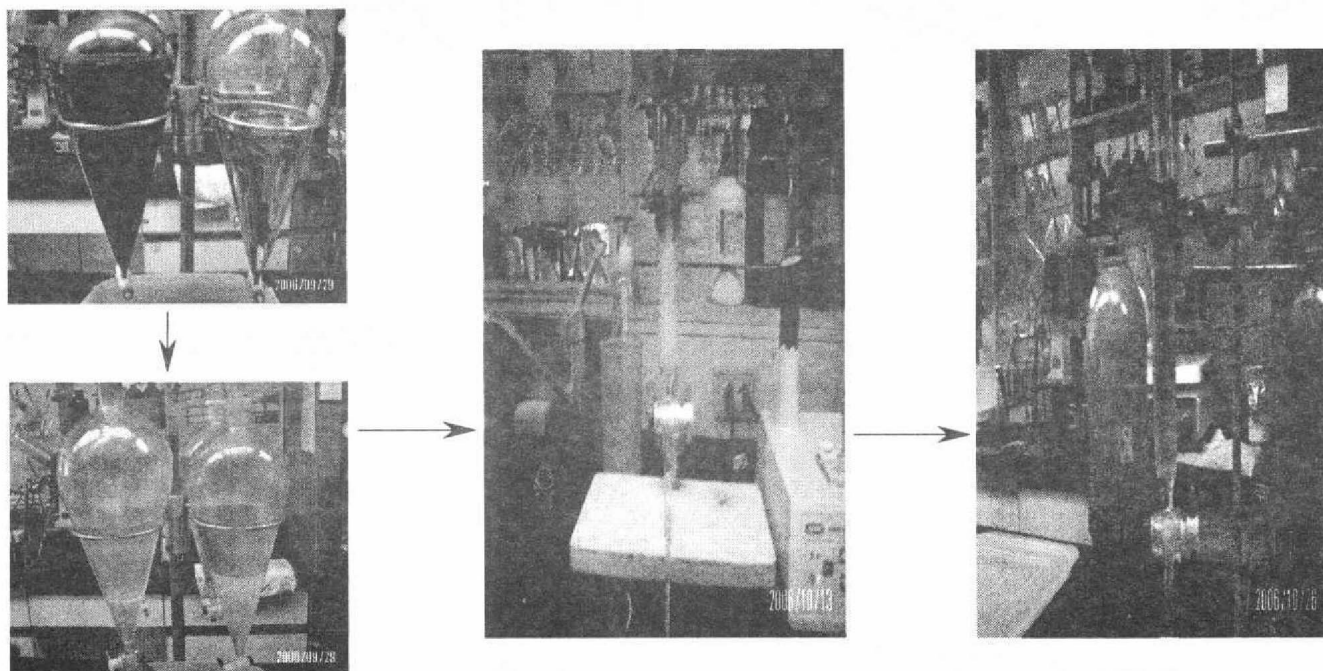


Fig. 29. Fucosterol의 추출 및 정제과정

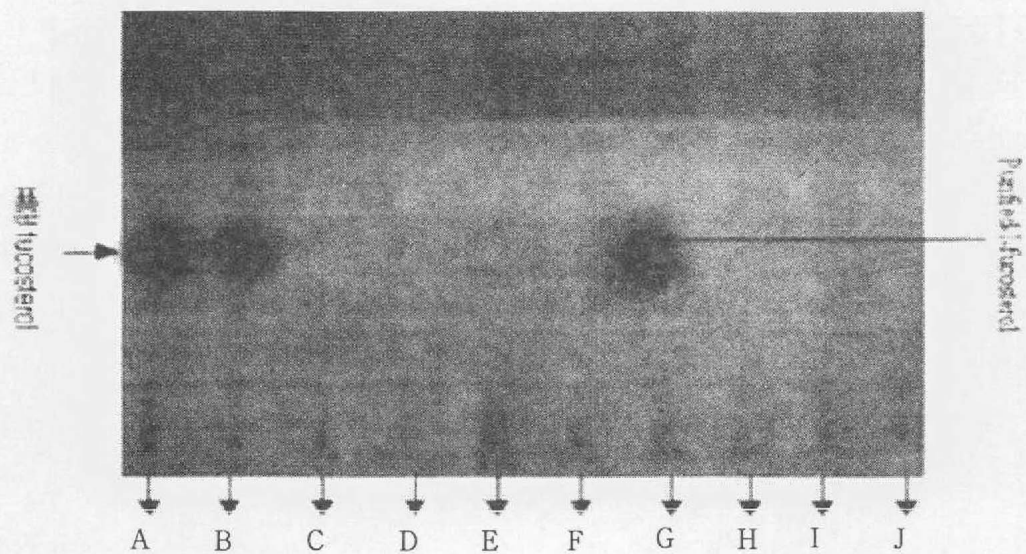


Fig. 30. TLC patterns of purified-I-fucosterol extracted from *E. kurome*.

A: Standard fucosterol; B: Crude fucosterol; C: Fraction number(10-20);  
 D(20-30); E(30-40); F(40-50); G(50-60); H(60-70); I(70-80); J(80-90)

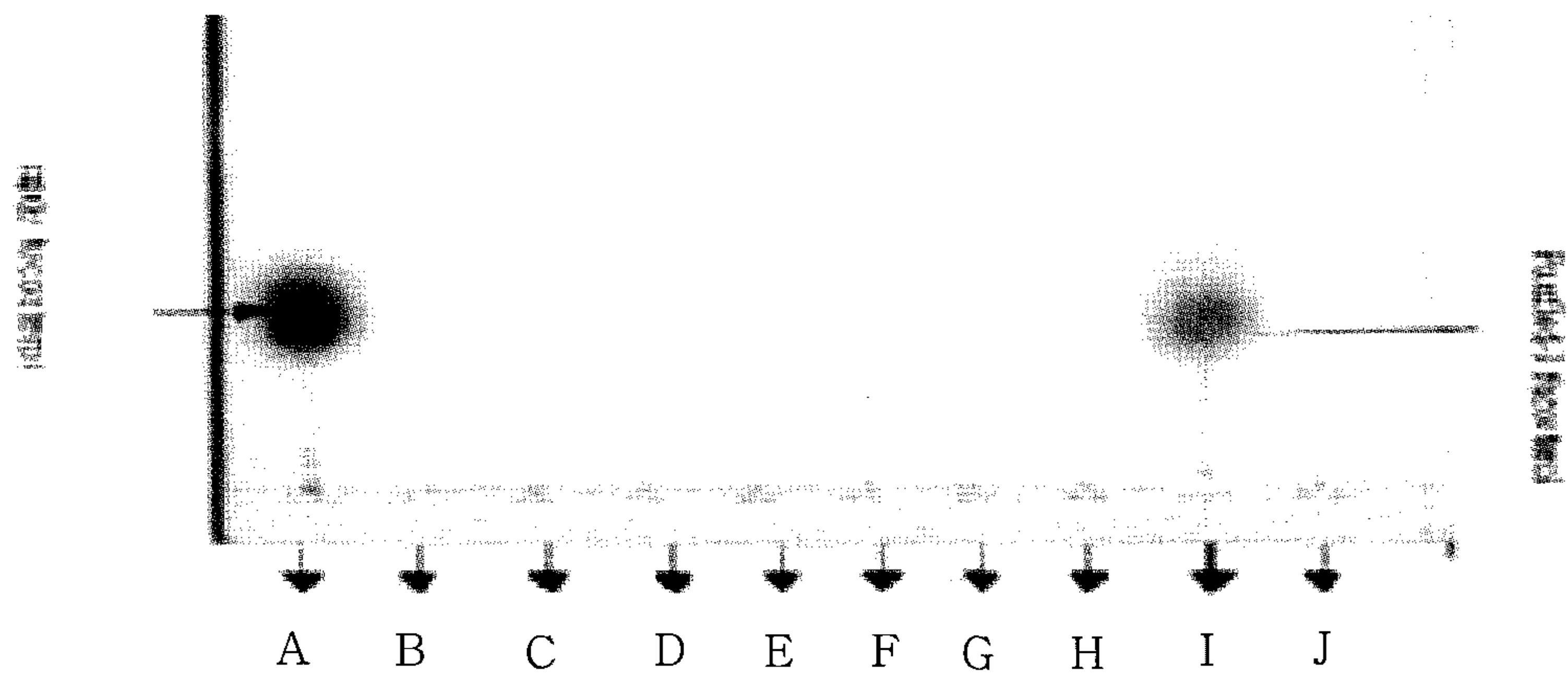


Fig. 31. TLC patterns of purified-II-fucoesterol extracted from *E. kurome*

A: Standard fucoesterol; B: Crude fucoesterol; C: Fraction number(10-20);  
 D(20-30); E(30-40); F(40-50); G(50-60); H(60-70); I(70-80); J(80-90)

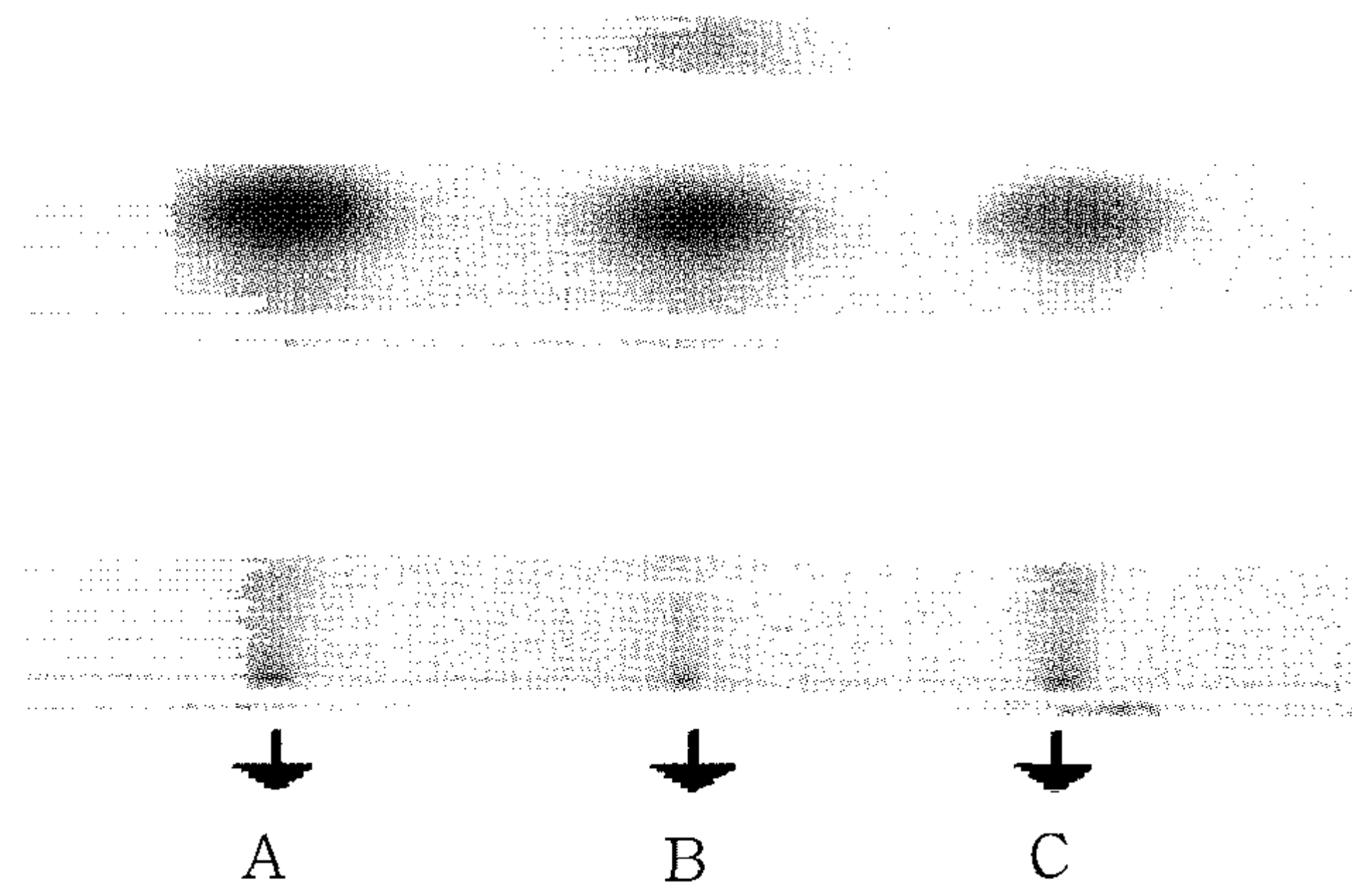


Fig. 32. TLC patterns of purified-III-fucoesterol extracted from *E. kurome*.

A: Standard fucoesterol; B: Crude fucoesterol; C: Purified-III-fucoesterol

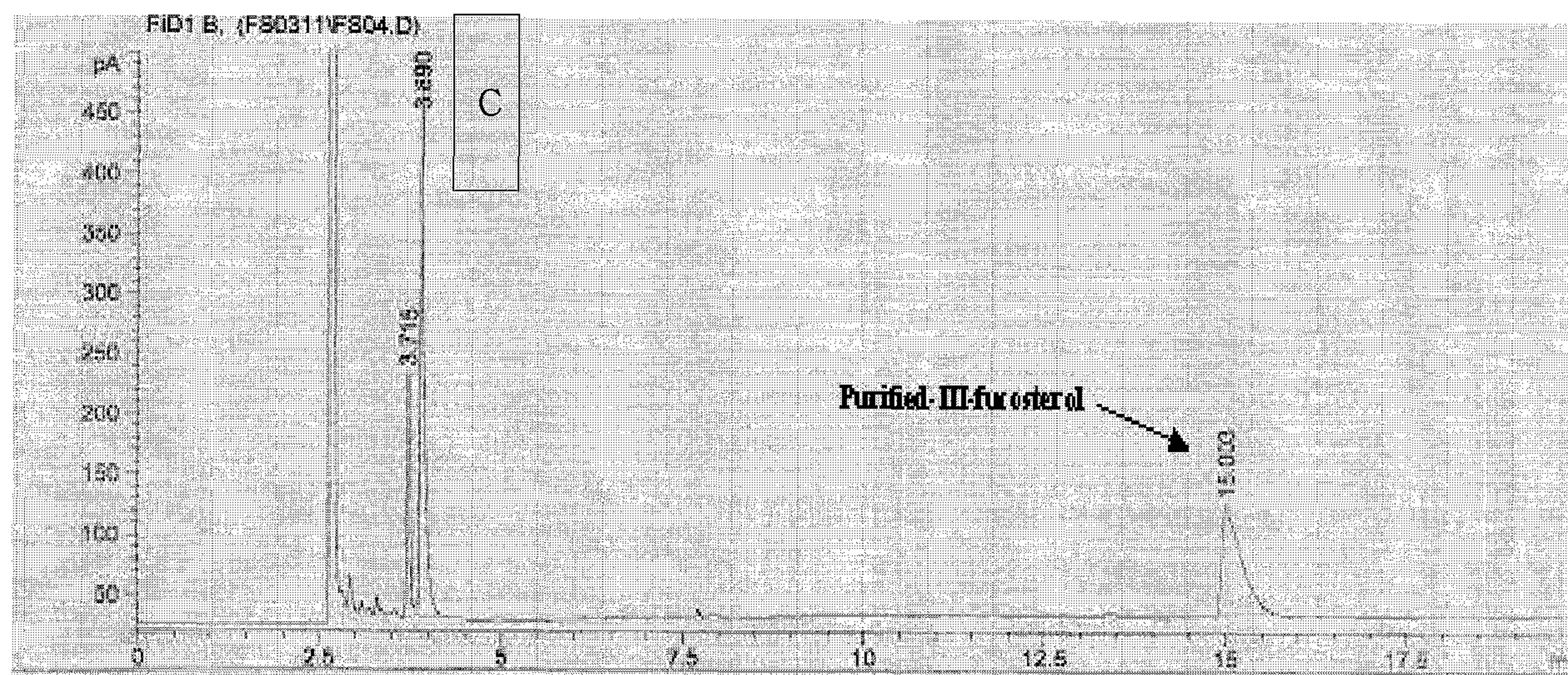
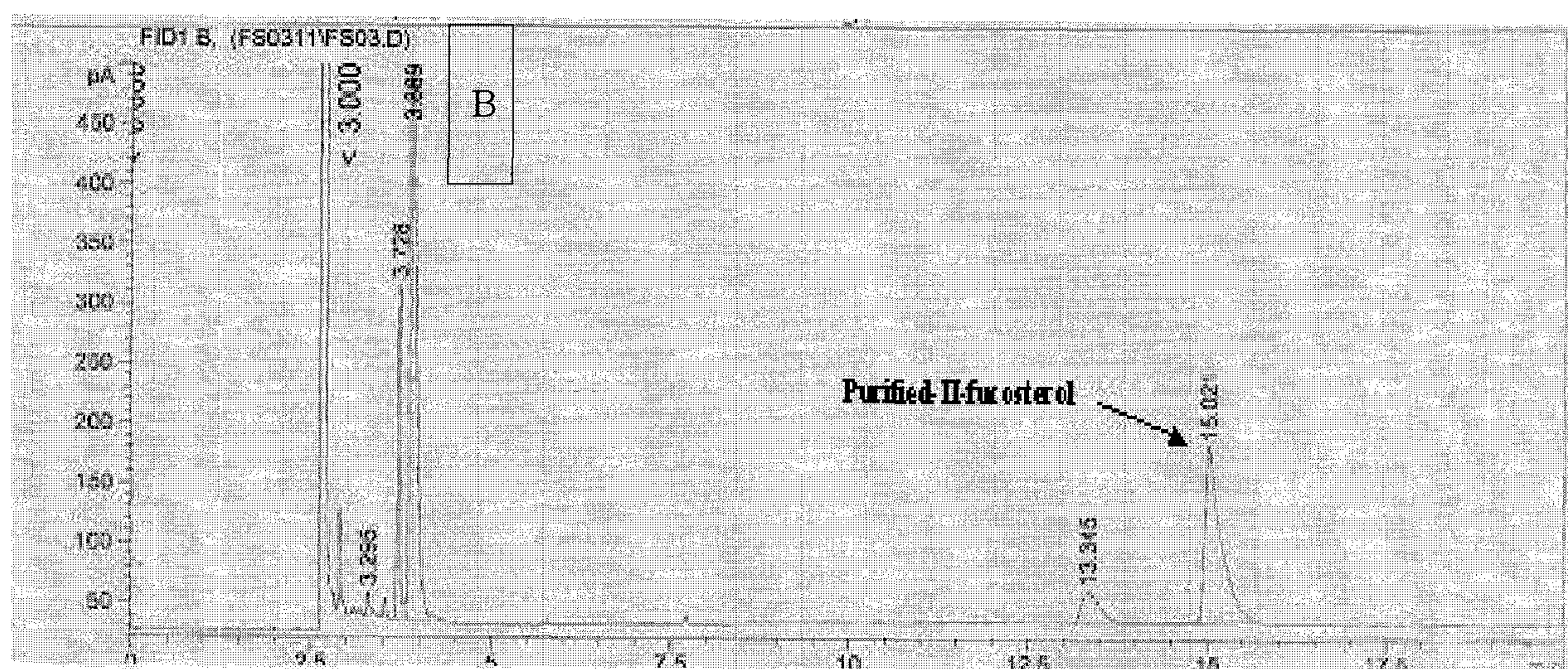
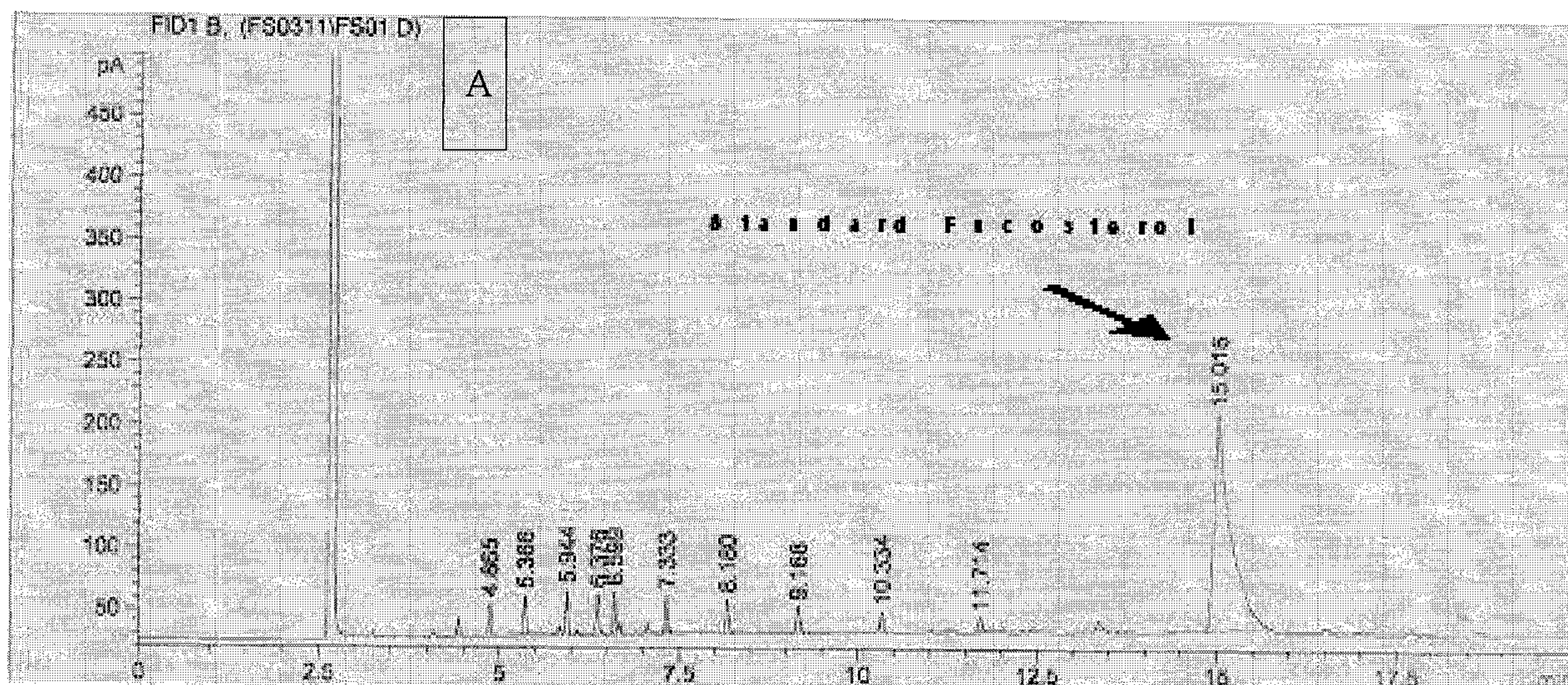
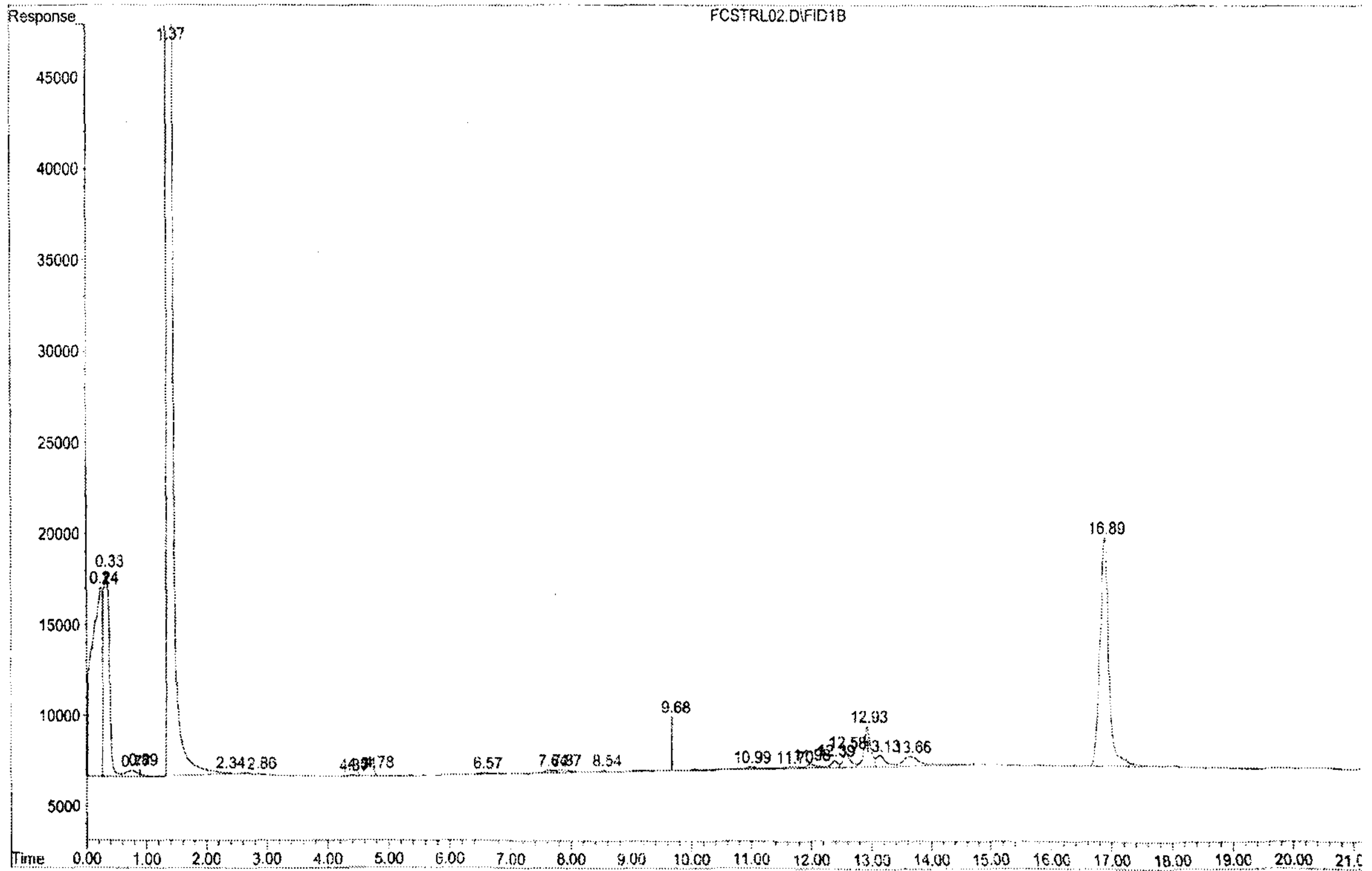


Fig. 33. Gas chromatogram of standard-, purified-II- and purified-III-fucosterol extracted from *E. kurome*.

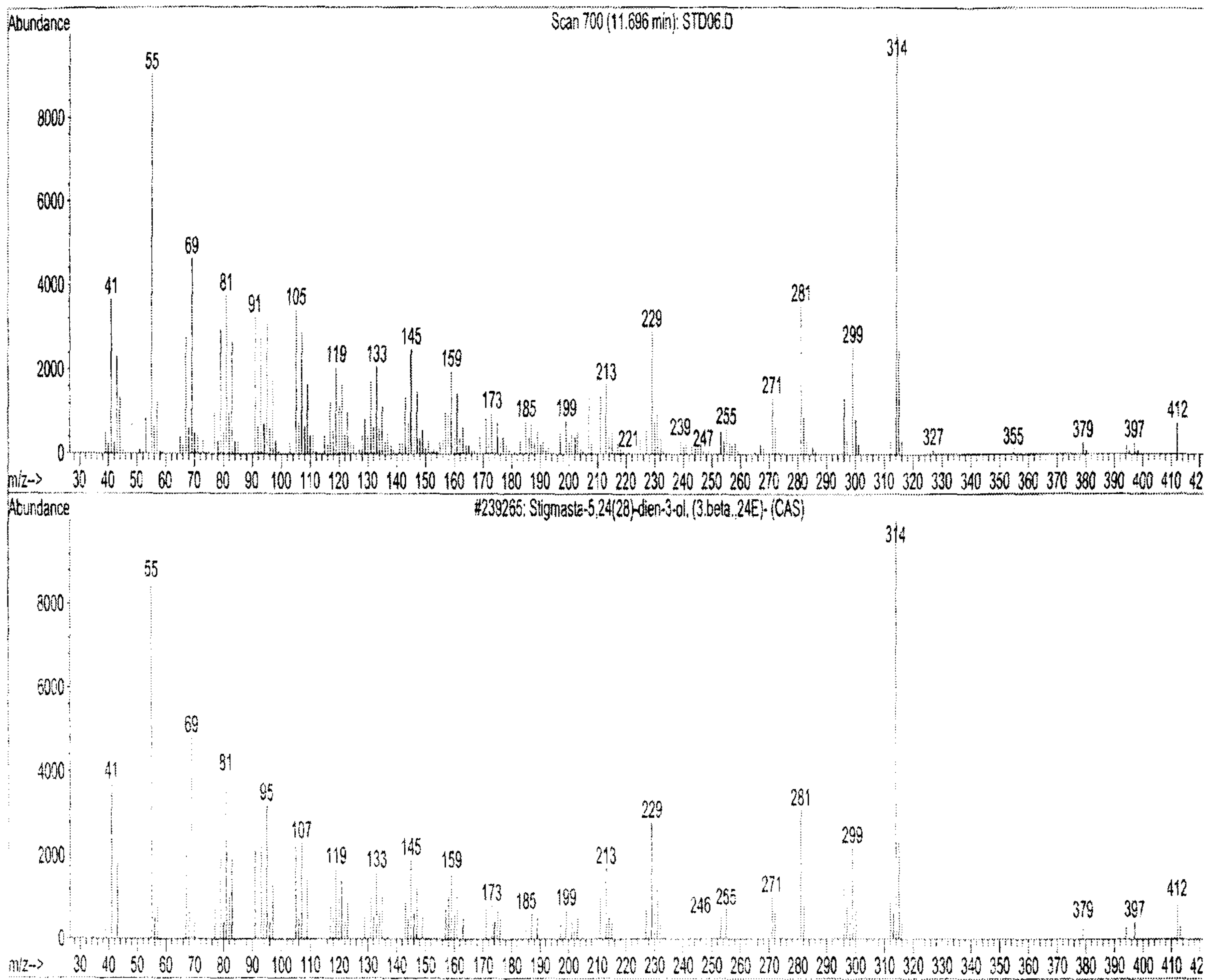
[A: Standard fucosterol; B: Purified-II-fucosterol; C: Purified-III-fucosterol]

### (3) Fucosterol의 구조분석

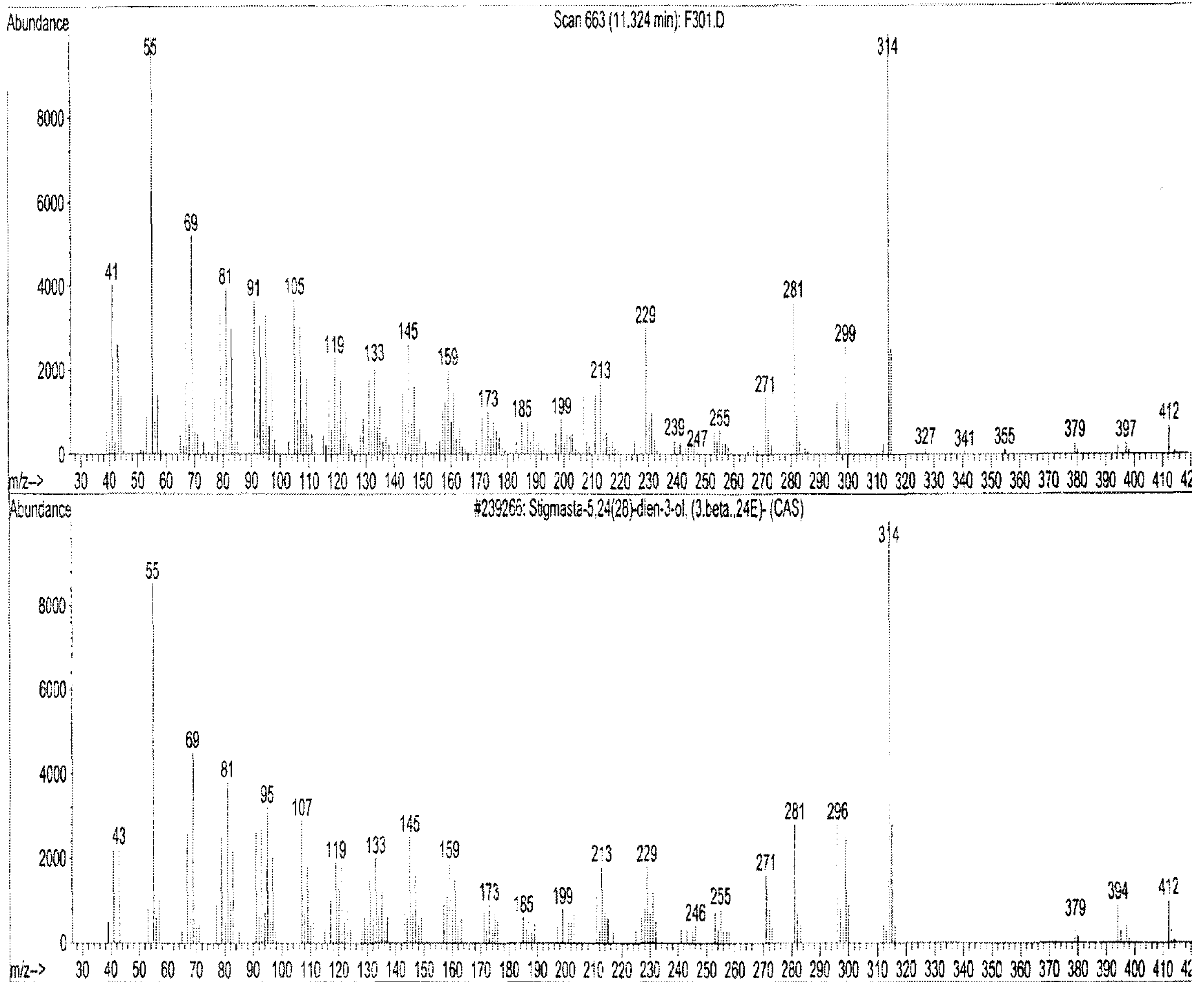
감태의 에탄올 추출물을 감압 농축하여 에탄올을 제거한 후 KOH로 가수분해 한 다음 물과 hexane으로 액-액 분리하여 crude fucosterol을 얻었다. 이어서 crude fucosterol을 활성화시킨 neutral alumina column (3×60 cm)에 2 mg/mL 농도로 주입한 후 benzene 용액으로 1 mL/min 속도로 용출시키면서 fucosterol rich fraction을 분취하였으며, 각각의 fraction은 GC, GC/MS 및 <sup>13</sup>C NMR 분석결과 표준품과 같은 물질임을 확인하였다(Fig. 34 및 35).



GC chromatogram of standard fucosterol



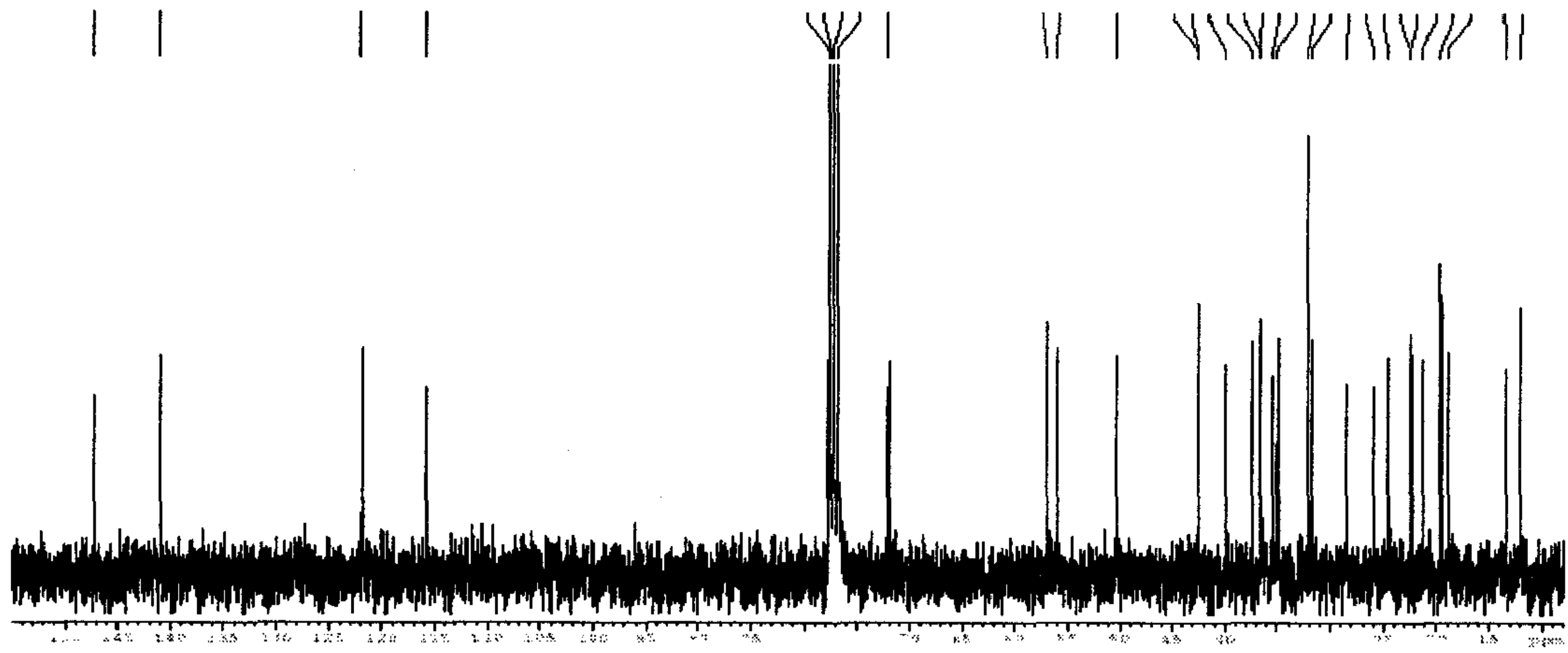
GC/MS spectrum of standard fucosterol



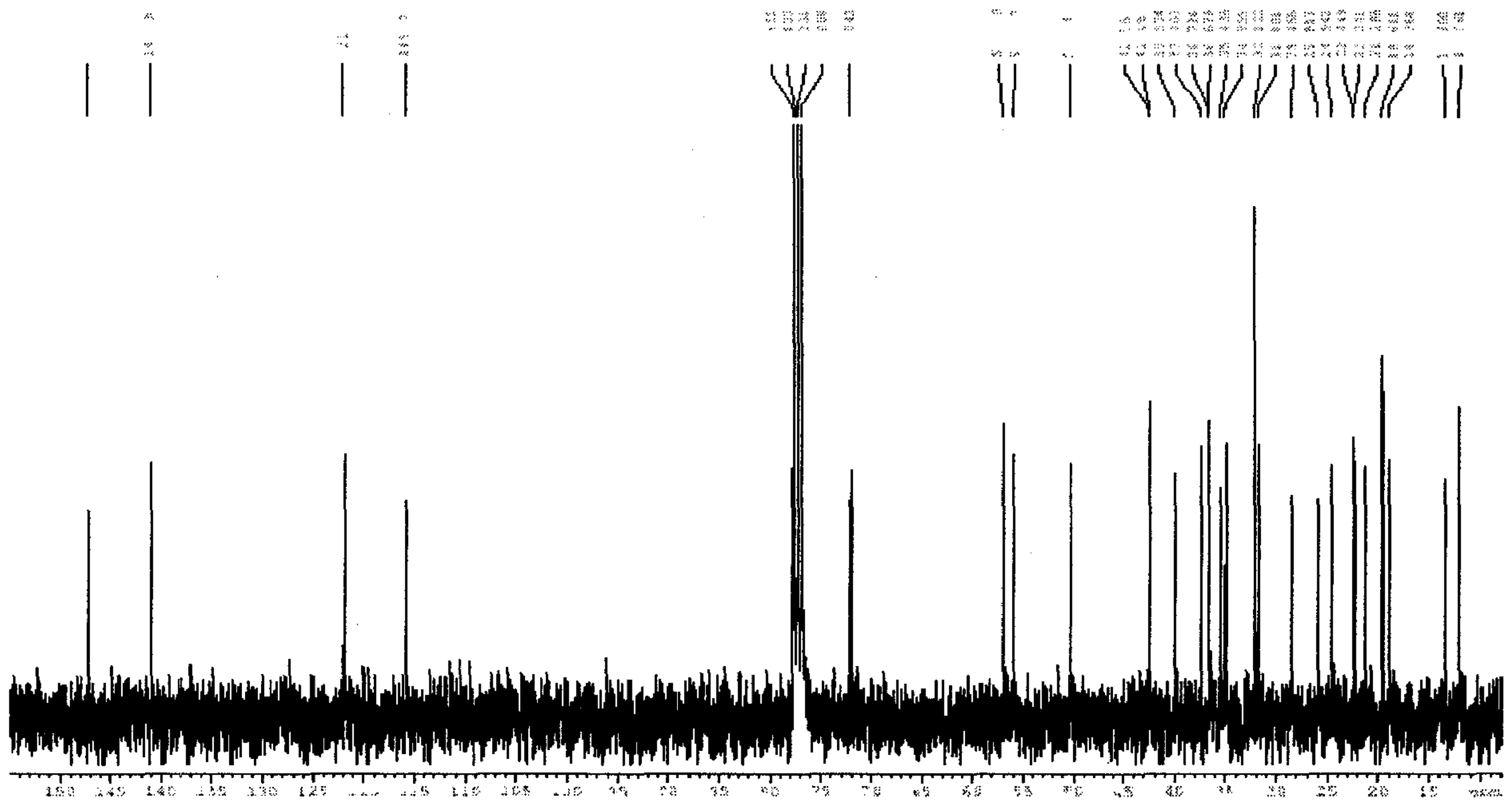
GC/MS spectrum of fucosterol derived from *Ecklonia kurome*

Fig. 34. 감태로부터 추출한 fucosterol의 GC 및 GC/MS 분석 spectrum.





Standard fucosterol



Purified fucosterol from *Ecklonia kurome*

Fig. 35. 감태에서 추출한 fucosterol의  $^{13}\text{C}$  NMR pattern.

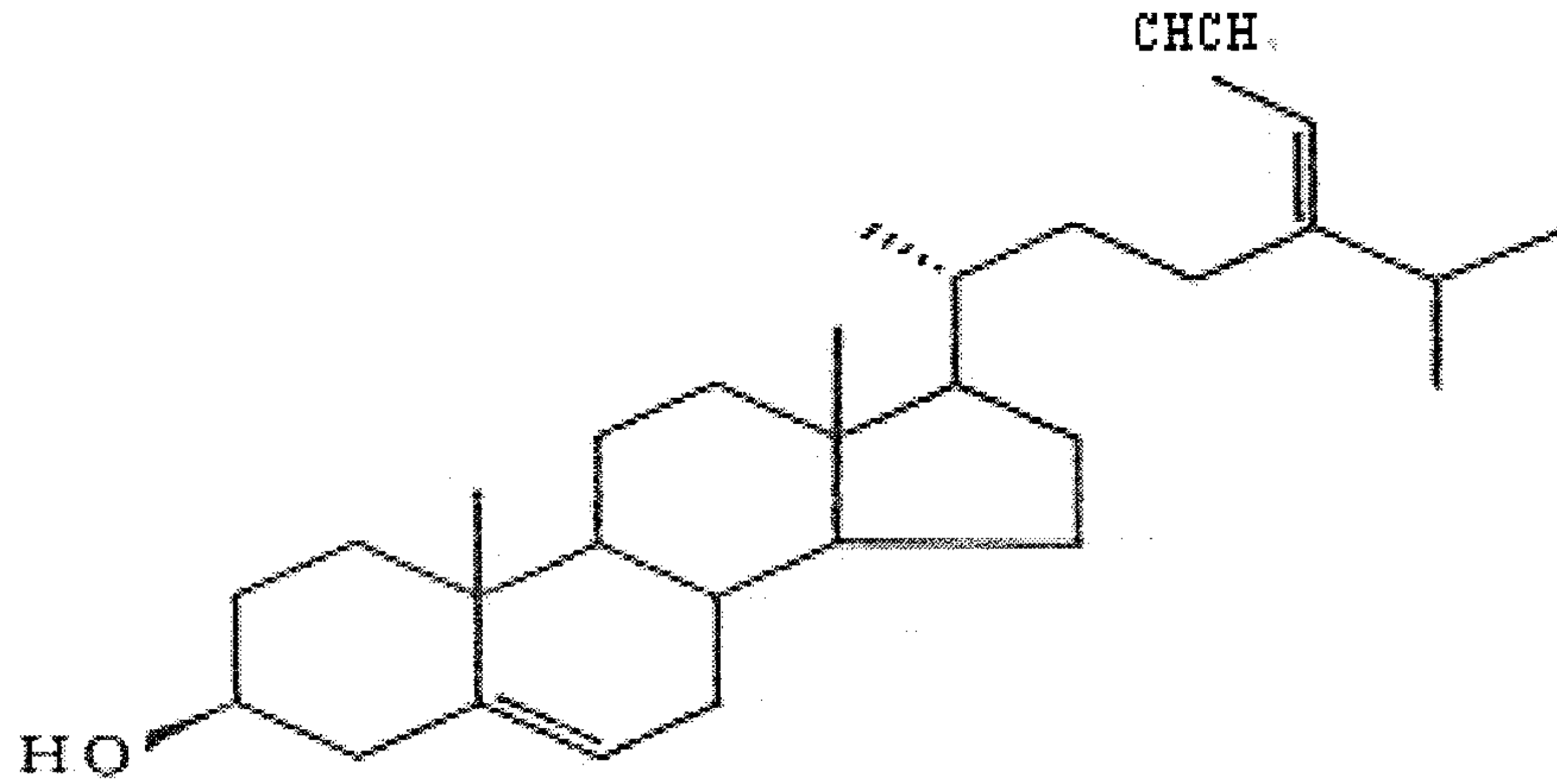


Fig. 36. Fucosterol의 구조

(4) Crude fucosterol의 수율에 미치는 추출온도 및 가수분해 조건의 영향

원료 해조류의 에탄올 추출물로부터 fucosterol의 회수율 극대화를 위한 적정 추출 온도 및 가수분해 시간을 다시마 추출물을 시료로 하여 검토하였다. 우선 다시마 에탄올 추출 시 상온과 60°C에서 추출할 때 상온에서는 0.051%의 수율을, 60°C에서는 0.124%의 수율을 보이며 상온보다 60°C의 고온 에탄올 추출이 두 배의 수율을 보였다(Fig. 37).

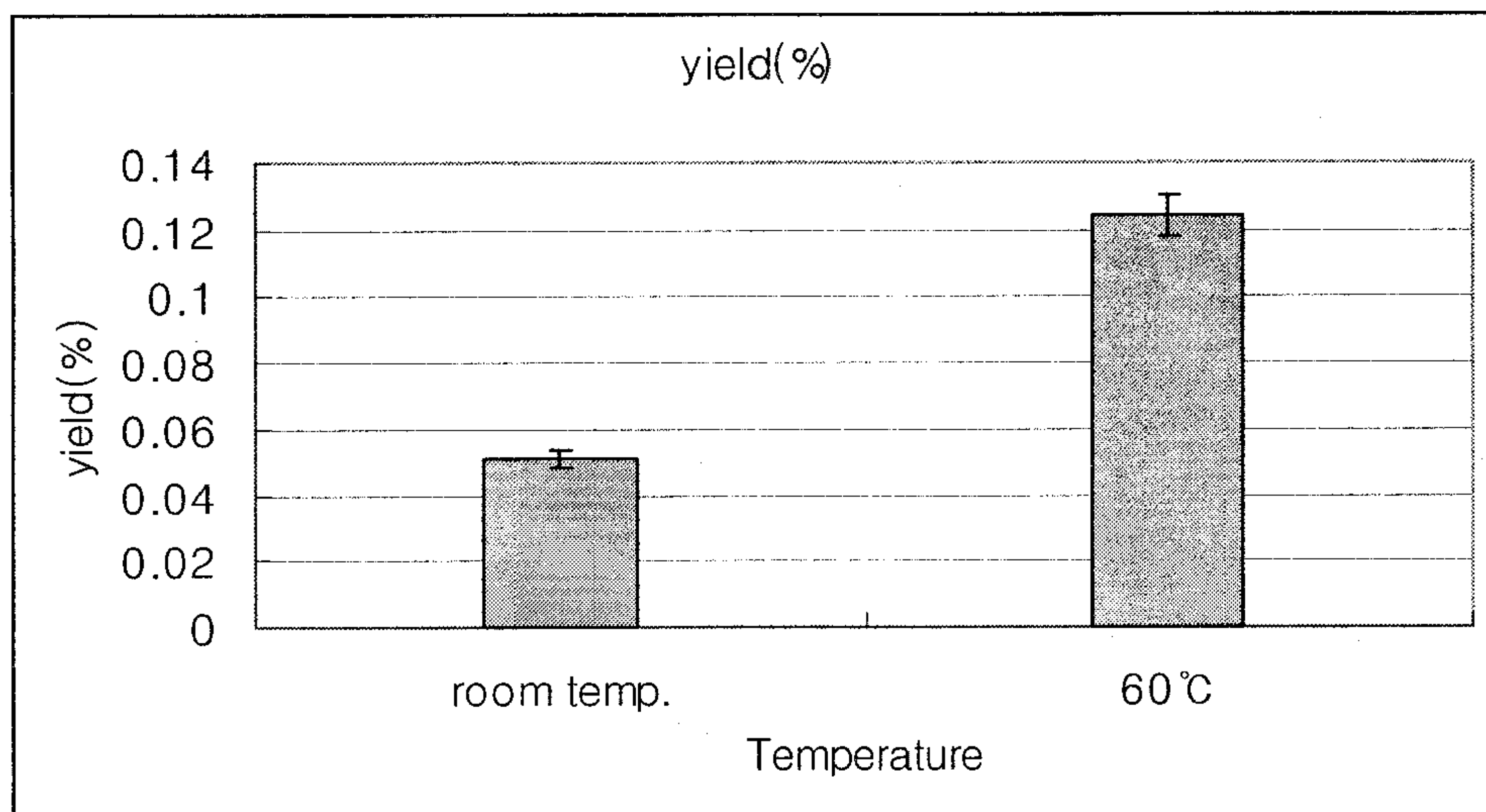


Fig. 37. Effect of ethanol extraction temperature on the yield of crude fucosterol

에탄올 추출 후 10 g당 150 mL의 10% ethanolic KOH를 가한 후 1-5시간 가수분해 하였을 때 crude fucosterol의 수율을 비교하였다(Fig. 38).

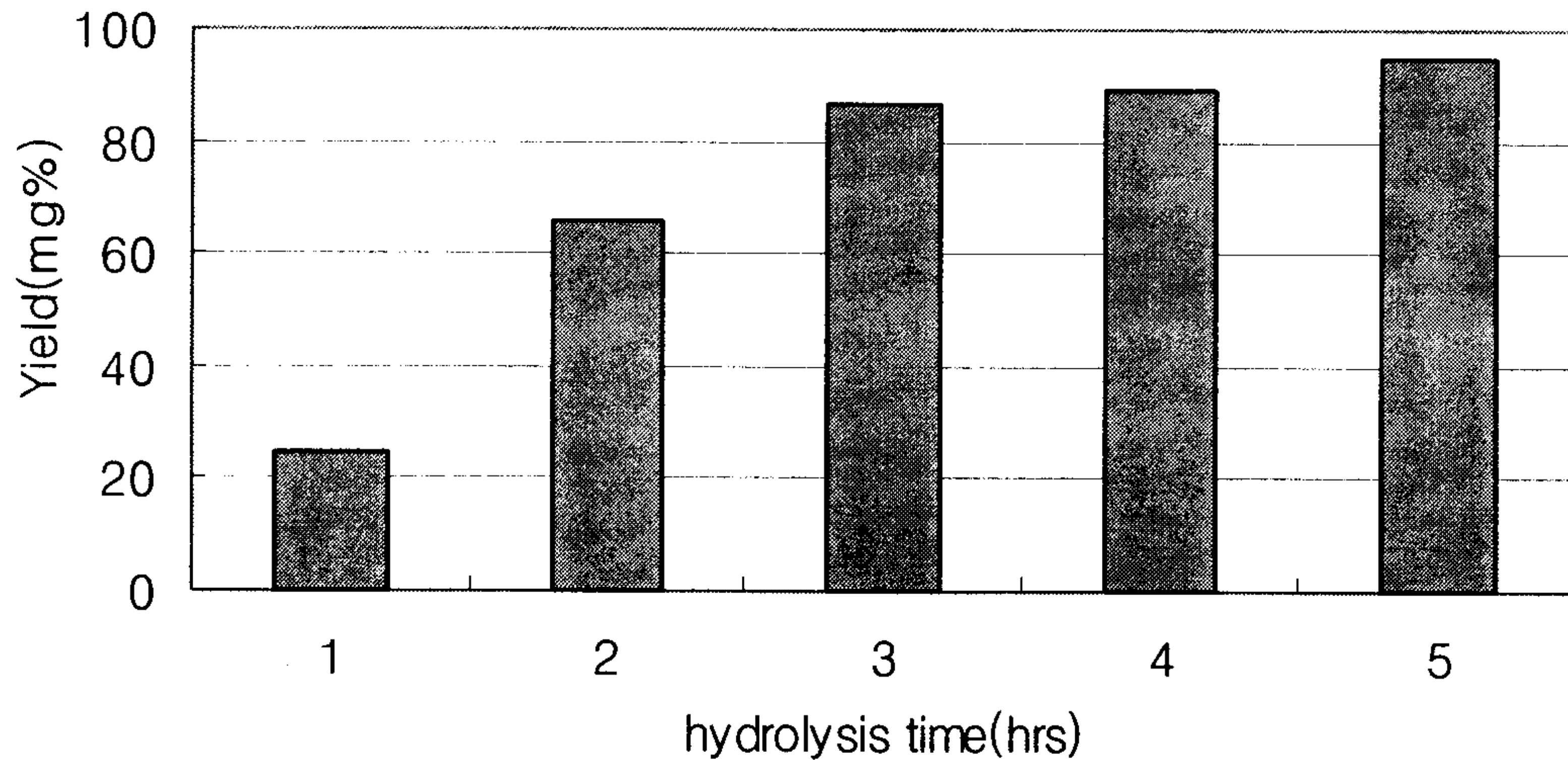


Fig. 38. Effect of hydrolyzed times on the yield of crude fucosterol

가수분해 3시간째까지 수율이 증가하였고 이후 수율증가는 미미하였으므로 적정 가수분해시간을 3시간 정도로 결정 하였다.

(5) 초임계 이산화탄소를 이용한 감태로부터 fucosterol의 분리

초임계 유체추출(Supercritical fluid extraction)은 에너지 사용절감, 추출시 생성되는 잔류 용매 문제해결 등의 이점 때문에 이산화탄소를 용매로 사용할 경우 비극성 기능성분의 환경친화적 생산에 유리한 것으로 기대되고 있다. 1-3년차 실험에서 행한 유기용매 추출 실험의 보완실험으로서 감태 등 해조류로부터 초임계 이산화탄소 추출(Supercritical carbon dioxide)방법으로 fucosterol를 분리·정제하여 유기용매 추출정제품과 화학학적 구조를 GC, GC/MS 및  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C}$  NMR 분석을 통해 비교 검토하였다.

(가) 초임계 이산화탄소 추출(Supercritical carbon dioxide extraction)조건

감태를 시료로 하여 초임계 이산화탄소 추출실험을 수행하였으며, 추출조건은 Table 29에 나타내었으며, 이때의 수율은 0.236%이었다.

Table 29. Condition of supercritical fluid extraction

Sample	<i>E. kurome</i>
Working Temp.	50°C
Working Press.	450 kg/cm <sup>2</sup>
Working Time	4 hr
Total Flow	17 Liter of Liquid CO <sub>2</sub>
Temp. of Chiller	0–1°C
Density of CO <sub>2</sub>	0.92%

## 제 4 절 Laminaran과 fucoidan의 기능성 개선 및 수율증대 기술 검토

### 1. 가수분해 효과

#### 가. 산 처리 효과

*E. bicyclis*으로 부터 열수 추출한 crude laminaran과 *E. kurome* 및 *L. japonica*로부 터 열수 추출하여 얻은 crude fucoidan의 농도는 0.1 N HCl을 사용하여 1%의 용액으로 조정 한 다음 50℃에서 60, 120, 180, 240 및 300분간 shaking water bath에서 반응시킨 후 0.1 N NaOH로 중화하고 증류수로 12시간 투석한 다음 산가수분해 laminaran 및 fucoidan을 제조하 고 항혈액응고활성을 알아보았다. Table 30에서와 같이 반응시간 240분까지 항혈액응고활성 은 증가하다가 240분 이후 약간 감소하는 경향을 보여 산가수분해의 최적 가수분해시간은 240분으로 하였으며, 분자량 크기에 따라 100 kDa 이상, 100-50 kDa, 50-10 kDa 및 10 kDa 이하 분자량을 cut off 시켰다.

Table 30. Anticoagulant activity of acid-modification laminaran and fucoidan on hydrolyzed time

Sample	min	APTT PT		Sample	APTT PT		Sample	APTT PT	
		sec			sec			sec	
Control(plasma)		34.9	12.7						
	60	125.3	20.3		118.5	18.2		108.9	15.6
	120	140.5	25.3		138.6	20.3		118.2	18.9
Fucoidan ( <i>L. japonica</i> )	180	155.2	30.2	Fucoidan ( <i>E. kurome</i> )	150.4	26.3	Laminaran ( <i>E. bicyclis</i> )	125.3	23.5
	240	184.9	38.5		178.2	35.2		163.2	28.2
	300	167.2	36.5		160.9	30.2		155.6	26.3

나. 효소처리 효과

*E. bicyclis* 유래 crude laminaran과 *E. kurome* 및 *L. japonica* 유래 crude fucoidan의 농도를 1%로 한 다음 Econase CE 및 Flavozyme 농도를 각각 1, 2, 3, 4 및 5 mg/mL로 하여 50°C에서 30분간 반응시킨 후 530nm에서 흡광도를 측정하여 유리되는 glucose를 측정하는 방법으로 적정 효소 작용농도를 검토하였다.

또한 10, 30, 60, 120 및 180분 동안 가수분해시킨 다음 530 nm에서 흡광도를 측정하여 유리되는 glucose를 측정하는 방법으로 효소활성을 측정하였다. Crude laminaran(*E. bicyclis*) 및 fucoidan(*E. kurome* 및 *L. japonica*)에 대한 Econase CE 최적농도는 4 및 3 mg/mL(*E. kurome* 및 *L. japonica*), *E. bicyclis*는 4 mg/mL이었으며, Flavozyme 최적농도는 모든 시료에서 각각 4 mg/mL으로 나타났다(Fig. 39).

Crude laminaran(*E. bicyclis*) 및 fucoidan(*E. kurome* 및 *L. japonica*)의 가수분해시간은 모두 120분까지 효소활성이 계속 증가하였으므로(Fig. 40), *E. kurome*, *E. bicyclis* 및 *L. japonica* 유래 laminaran과 fucoidan의 적정 효소 가수분해시간은 120분으로 하여 효소적 가수분해 laminaran 및 fucoidan을 제조하였으며, 분자량에 따라 100 kDa 이상, 100-50 kDa, 50-10 kDa 및 10 kDa 이하 분자량 수준으로 분획하였다.

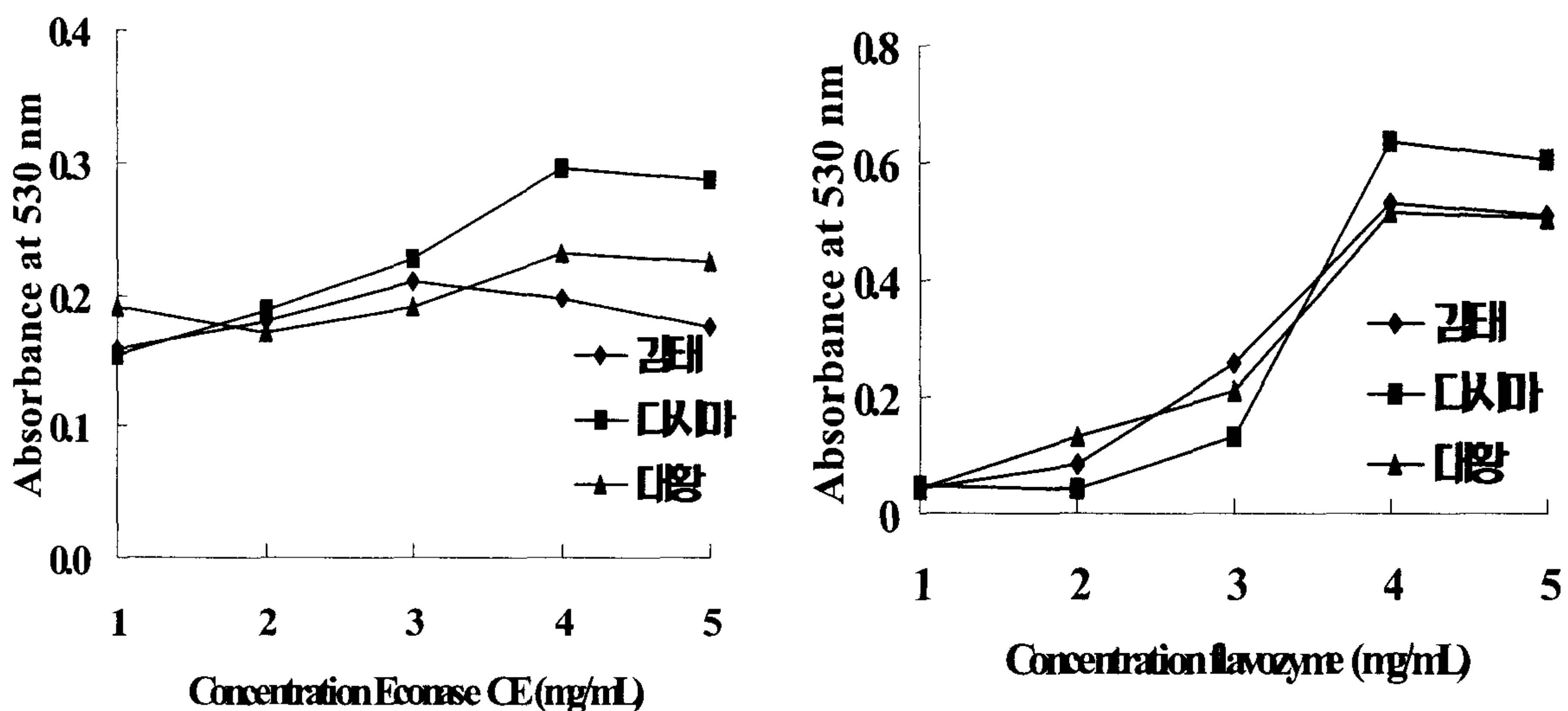
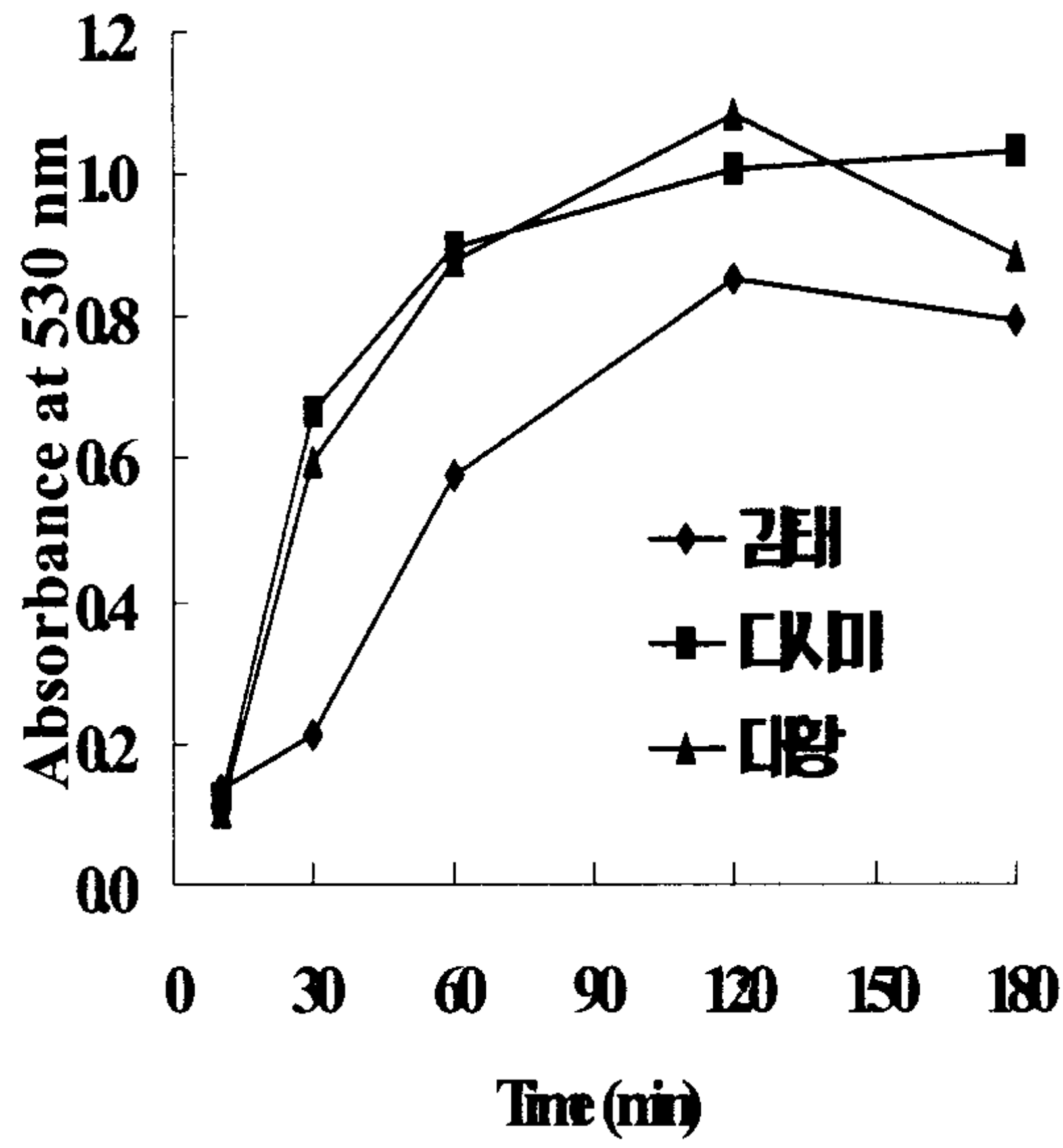
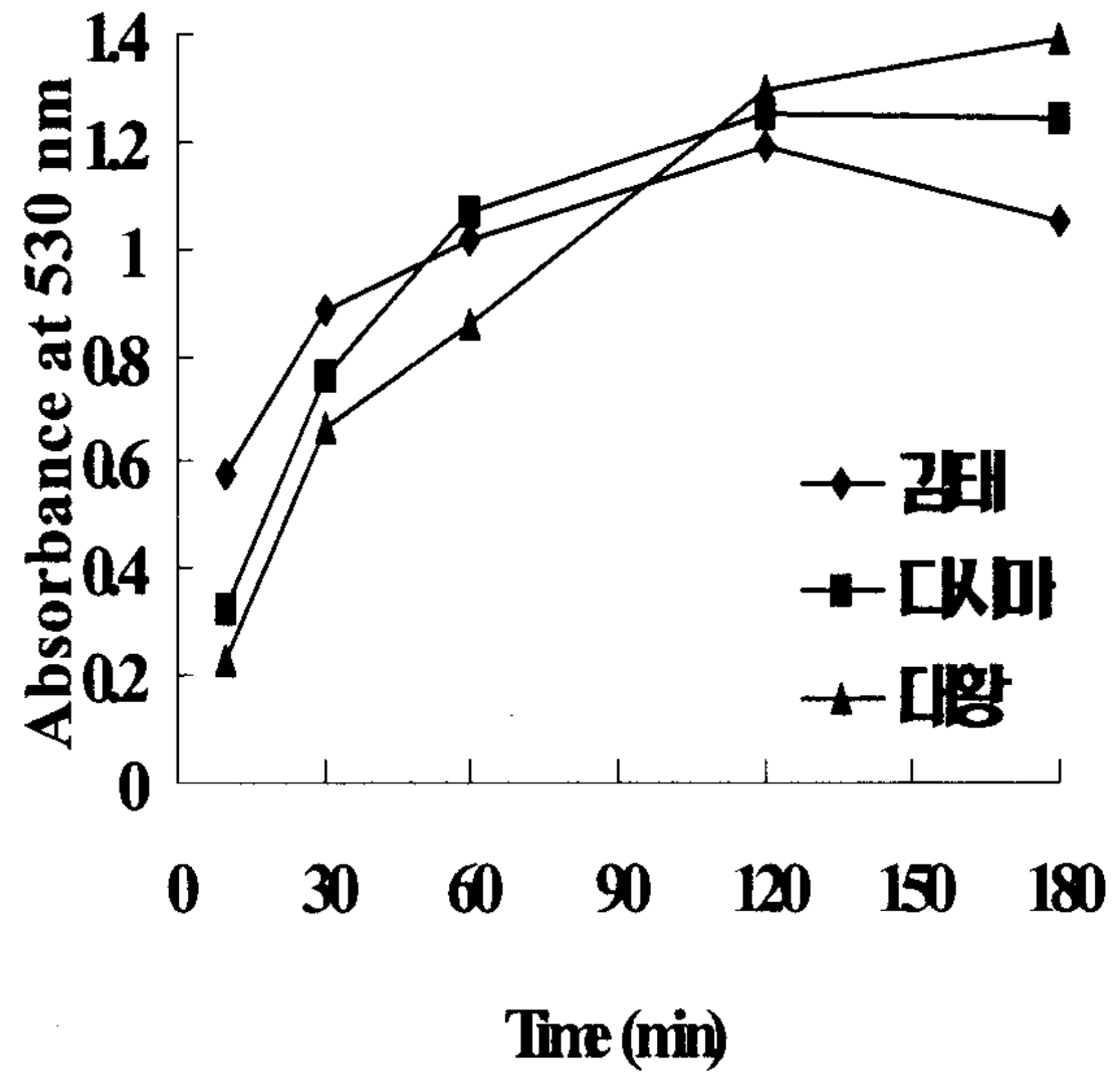


Fig. 39. Optimum concentration of Econase CE and Flavozyme



(Econase CE)



(Flavozyyme)

Fig. 40. Activity of Econase CE and Flavozyyme with the reaction time

#### 다. 고온·가압 처리 효과

*E. bicyclis* 유래 crude laminaran과 *E. kurome* 및 *L. japonica* 유래 crude fucoidan의 농도를 1%로 한 다음 120°C에서 60, 120, 180 및 240분간 가열처리한 후 항혈액응고활성을 조사한 결과 180분간 열처리한 시료의 항혈액응고활성이 가장 높게 나타났으므로, 최적가수분해시간을 180분으로 하여 고온가압처리 수식 laminaran 및 fucoidan을 제조하였으며, 분자량에 따라 100 kDa 이상, 100-50 kDa, 50-10 kDa 및 10 kDa 이하 분자량 수준으로 분획하였다.(Table 31).

Table 31. Anticoagulant activity of thermally modified laminaran and fucoidan at 121 °C for different time

Sample	Time (min)	APTT PT		Sample	APTT PT		Sample	APTT PT	
		sec			sec			sec	
control(plasma)		34.9	12.7						
	60	130.2	18.5		115.6	15.8		98.9	14.3
Fucoidan ( <i>L. japonica</i> )	120	143.2	20.2	Fucoidan ( <i>E. kurome</i> )	128.1	16.2	Laminaran ( <i>E. bicyclis</i> )	108.2	17.9
	180	150.2	25.3		142.9	20.3		118.2	22.5
	240	145.2	23.3		135.6	19.5		106.2	20.6

## 2. 한외여과에 의한 분획

효소가수분해와 산가수분해 및 고온가압 처리 laminaran 및 fucoidan의 분자량 범위에 따른 생리활성을 알아보기 위하여 한외여과기(ultrafilter cell, Amicon 8400)를 사용하여 분자량별(100 kDa 이상, 100-50 kDa, 50-10 kDa, 10 kDa 이하)로 분획한 후 동결건조하여 분자량별 분획물을 얻었다. 항혈액응고활성 측정결과 활성이 높았던 다시마와 감태 유래 fucoidan을 분자량별로 분획하여 구조 및 기능활성을 검토코저 하였다(Table 32, 33).

감태 유래 fucoidan의 산가수분해물의 분자량별 수율은 100 kDa 이상 획분이 50.5%로 주 분획이었고, 10 kDa 이하가 24.1% 100-50 kDa가 2.2%였으며, 주 분획의 화학적 조성은 총당이 28.2%, 황산기 18.3%, 단백질과 우론산이 각각 17.3% 및 11.7% 수준이었다. 주 구성당은 fucose로 51.3% 수준이었으며 이외에 galactose, mannose, xylose, glucose로 이루어진 다당이었다. 가수분해에 의해 저분자화 되면서 단백질과 우론산의 함량이 감소하였고, fucose의 함량은 증가한 반면, 다른 당들의 함량은 감소하는 특성을 나타내었다.

다시마 유래 fucoidan의 분자량별 분획수율은 10 kDa 이하가 43.0%였으며, 다음으로 100 kDa 이상인 LJW-ppf-ep1 분획이 25.4%였다. 주 분획인 LJW-ppf-ep4는 황산기와 fucose로 이루어진 sulfated fucose이었다. LJW-ppf-ep1의 이화학적 조성은 총당 함량 31.3%, 황산기 함량 17.7% 수준이었으며, 이외에 galactose와 glucose로 이루어진 다당이었다. 항혈액응고활성 측정 결과(Fig. 41) 감태유래 부분정제 fucoidan(EKJ-ppf-ep1)과 다시마유래 부분정



제 fucoidan(LJW-ppf-ep1)의 활성이 높아 이후 구조분석을 위한 정제 및 기능성 평가 등을 위한 시료로 사용하였다.

Table 32. Yields and chemical compositions of fractions obtained by ultrafiltration of EKJ-ppf (% , dry basis)

Fractions	Yield <sup>1)</sup>	Sulfate	Protein	Uronic acid	Total sugar	Sugar composition <sup>2)</sup>							
						Rhm	Fuc	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
EKJ-ppf-ep1	50.5	18.3	17.3	11.7	28.2	2.5	51.3	- <sup>4)</sup>	-	6.5	13.6	22.7	3.3
EKJ-ppf-ep2	2.2	9.6	1.8	7.2	22.2	tr <sup>3)</sup>	78.1	-	-	1.2	6.5	12.7	1.5
EKJ-ppf-ep4	24.1	21.0	1.3	3.8	31.0	tr	93.1	-	-	tr	1.9	5.0	tr

1) Percent of EKJ-ppf

2) Calculated from GC analysis, considering the total amounts under the six monosaccharide as 100%

3) trace, 4) Not detected

Table 33. Yields and chemical compositions of fractions obtained by ultrafiltration of LJW-ppf (% , dry basis)

Fractions	Yield <sup>1)</sup>	Sulfate	Protein	Uronic acid	Total sugar	Sugar composition <sup>2)</sup>							
						Rhm	Fuc	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
LJW-ppf-ep1	25.4	17.7	8.9	26.6	31.3	2.9	33.1	0.0	0.0	3.2	12.9	45.5	2.4
LJW-ppf-ep2	1.7	9.7	2.4	7.1	18.4	tr <sup>3)</sup>	59.2	- <sup>4)</sup>	tr	3.2	4.2	33.4	tr
LJW-ppf-ep3	1.6	6.9	1.8	2.2	8.6	-	87.1	-	tr	tr	tr	12.7	tr
LJW-ppf-ep4	43.0	28.0	1.1	1.7	28.6	-	99.9	-	tr	-	tr	tr	tr

1) % of LJW-ppf

2) Calculated from GC analysis, considering the total amounts under the six monosaccharide as 100%

3) trace, 4) Not detected

### 3. 고정화 효소 처리

가. Laminaran의 생리활성 증진을 위한 laminaranase 탐색 및 고정화

대황으로부터 분리한 laminaran의 생산성을 증대하기 위하여 해조류 4종(다시마, 대황, 감태 및 미역)으로부터 laminaranase 활성을 갖는 미생물을 분리하였으며, 또한 해산 조식 동물의 소화효소는 해조의 원형질체를 효과적으로 가수분해 하며, 특히 성게알 및 전복내장에는 다양한 cellulase가 존재 할 것으로 생각되어 이들로부터 laminaran을 가수분해하는 효소를 분리·정제하였다.

#### (1) 해조류 유래 미생물이 생산하는 laminaranase 분리·정제

해조류 4종(다시마, 대황, 감태 및 미역)을 대상으로 하여 laminaranase 활성을 갖는 미생물을 분리하였다. 다시마, 대황, 감태 및 미역을 상온에서 10일간 저장하였을 때 상당량이 미생물에 의해 분해되었으며, 이때 해조류를 각각 100 g씩을 채취하여 900 mL의 멸균 식염수에 희석한 후 laminaran을 첨가한(0.2%) 선택 배지에 도말하여 37°C에서 2-5일간 배양 후 생육 colony를 1차 선별하고, laminaran 함유(1%) broth 3종 [Malt extract broth(MB), Tryptic soy broth(TSB) 및 Nutrient broth(NB)] 에 접종한 뒤 진탕배양기(37°C, 120 RPM)에서 배양하였다. 해조류 종류에 따른 배양액의 환원당(glucose 생성량) 함량은 대황, 다시마, 감태 및 미역 순으로 높았으며(Fig. 42), 환원당 생성측면에서 배지적성은 MB, TSB 및 NB 순으로 우수하였다.(Fig. 42).

대황 및 다시마에서 분리한 미생물이 laminaran 분해활성이 높았으며, 이들로부터 laminaranase를 분리하였다. Laminaran 분해효소의 분리·정제는 laminaran 분해활성이 높은 대황 및 다시마 시료를 사용하였으며, 이때의 액체배지는 MB로 하였다. 상기의 액체배지에 laminaran을 분해하는 미생물을 5일간 배양한 후 원심분리 하여 균체를 분리해낸 다음 ammo-

nium sulfate 농도에 따른 침전물을 분획하였다. Ammonium sulfate 농도에 따른 laminaran 가수분해 활성은 대황은 60-80%에서, 다시마는 40-60%에서 가장 좋았다(Fig. 43). 이 시료를 다시 투석막(MWCO: 3,000)을 사용하여 24시간 투석한 다음 Ion-exchange chromatography 및 gel permeation chromatography를 한 결과 다시마는 각각 Fraction 46-63 및 45-58에서, 대황은 각각 Fraction 29-43 및 38-54 에서 환원당(glucose 생성량)이 높았으며(Fig. 44-47), 다시마 및 대황의 pH 및 온도에 대한 효소활성 변화는 각각 5.0 및 60°C이었다(Fig. 48 및 49).

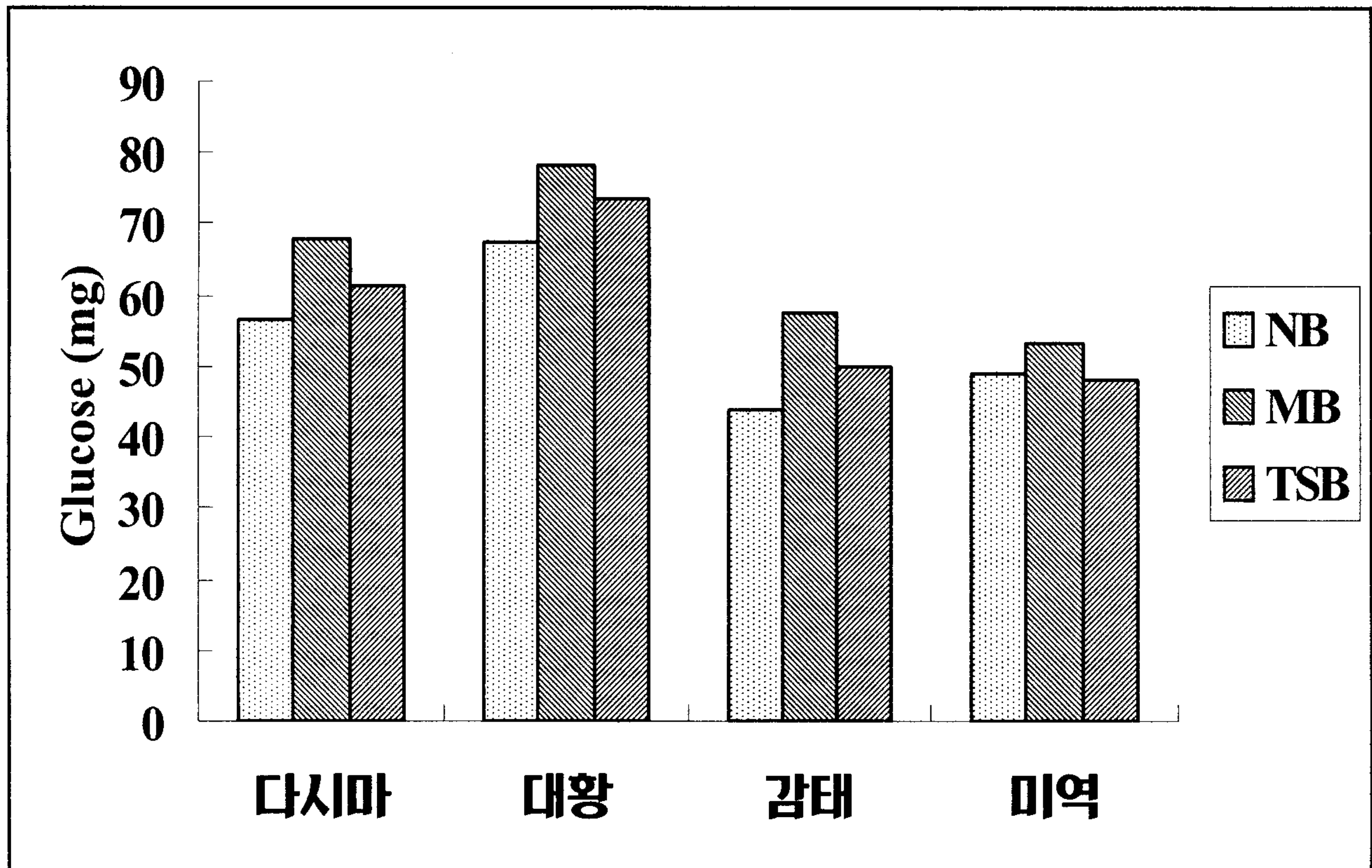


Fig. 42. Effect of various material and culture broth on the production of glucose at 1% laminaran solution. [MB: malt extract broth: TSB: tryptic soy broth: NB: nutrient broth]

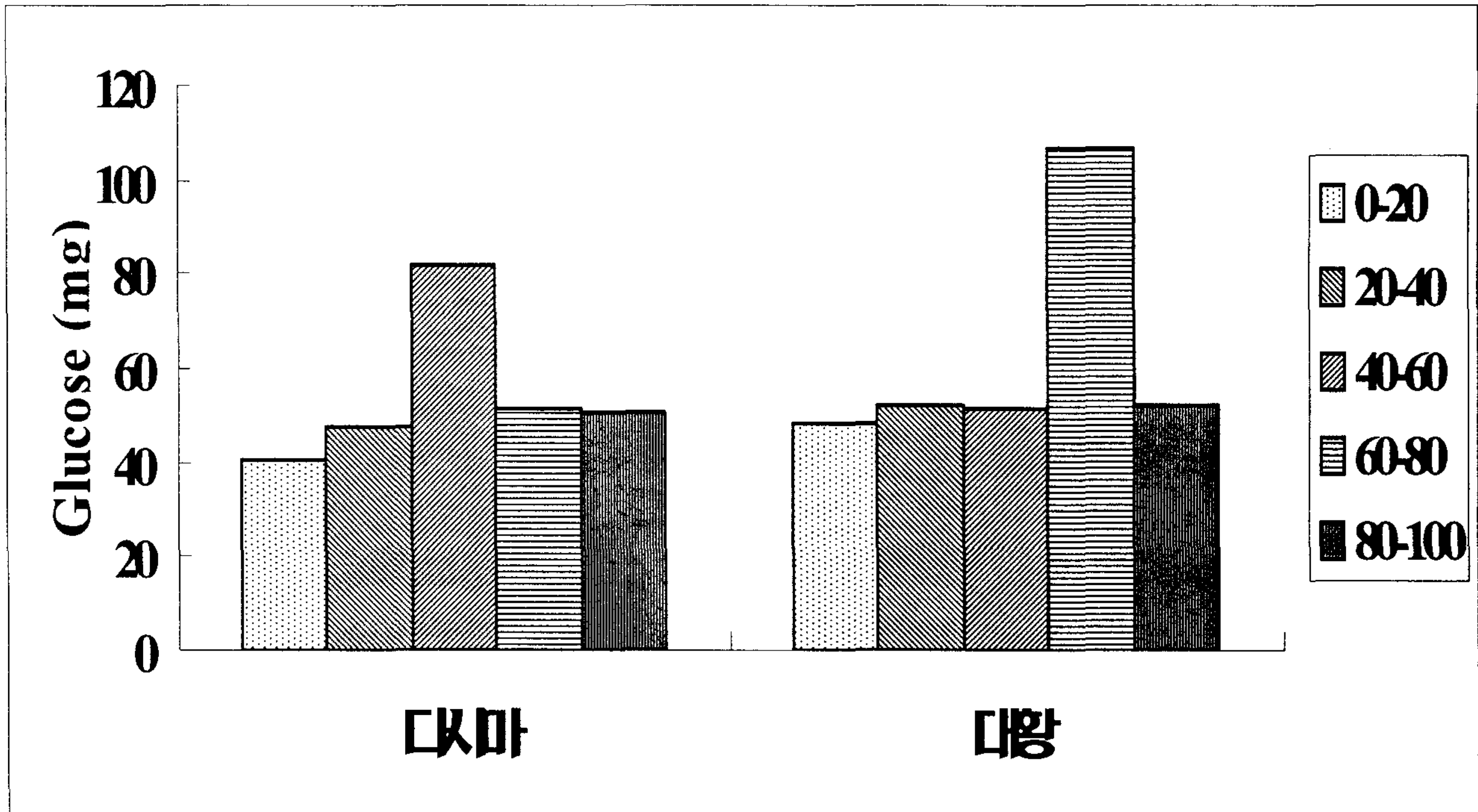


Fig. 43. Effect of ammonium sulfate concentration on the production of glucose at 1% laminaran solution.

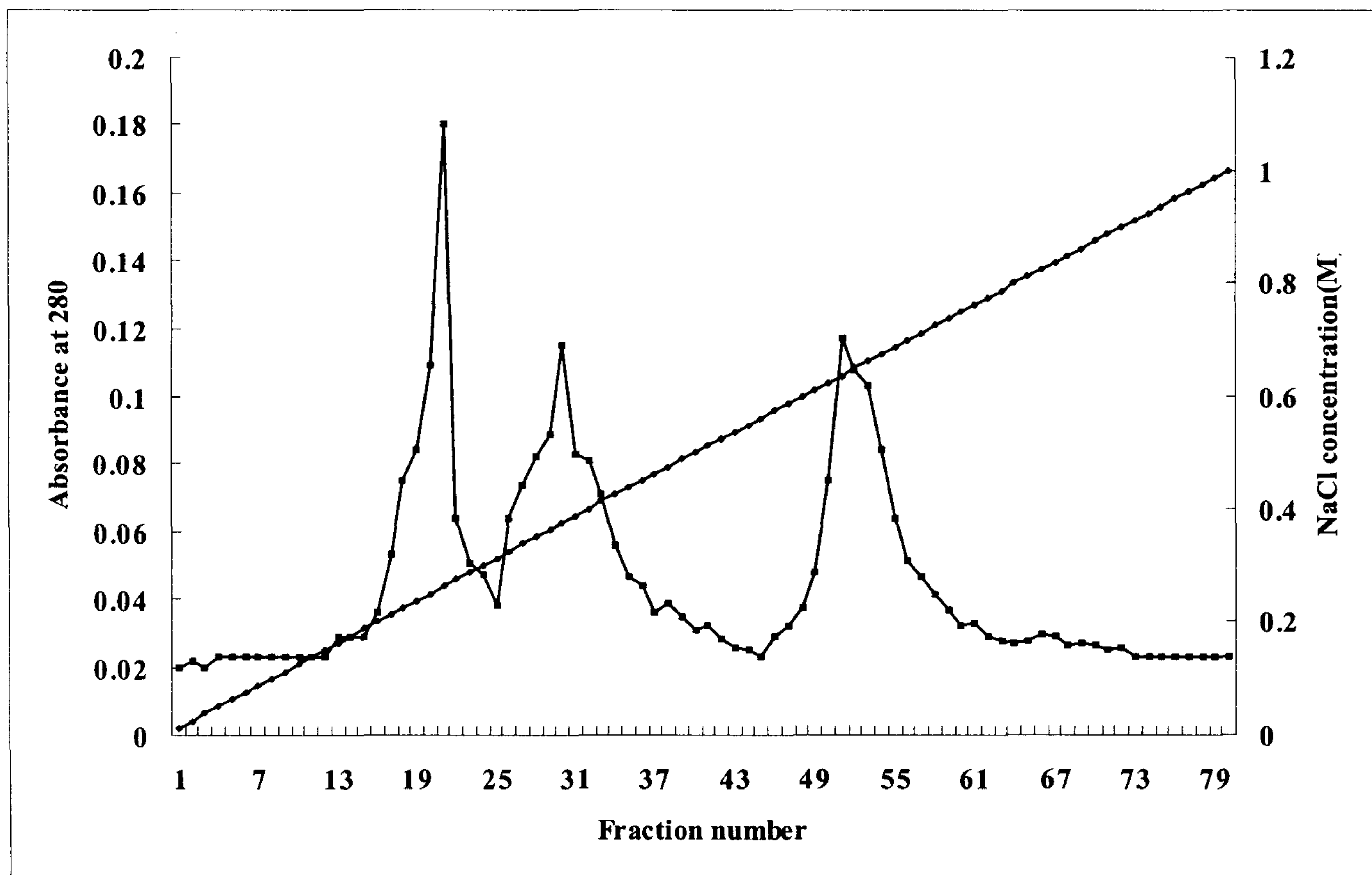


Fig. 44. Ion exchange chromatography pattern of bacterial enzyme derived from *Laminaria japonica*.

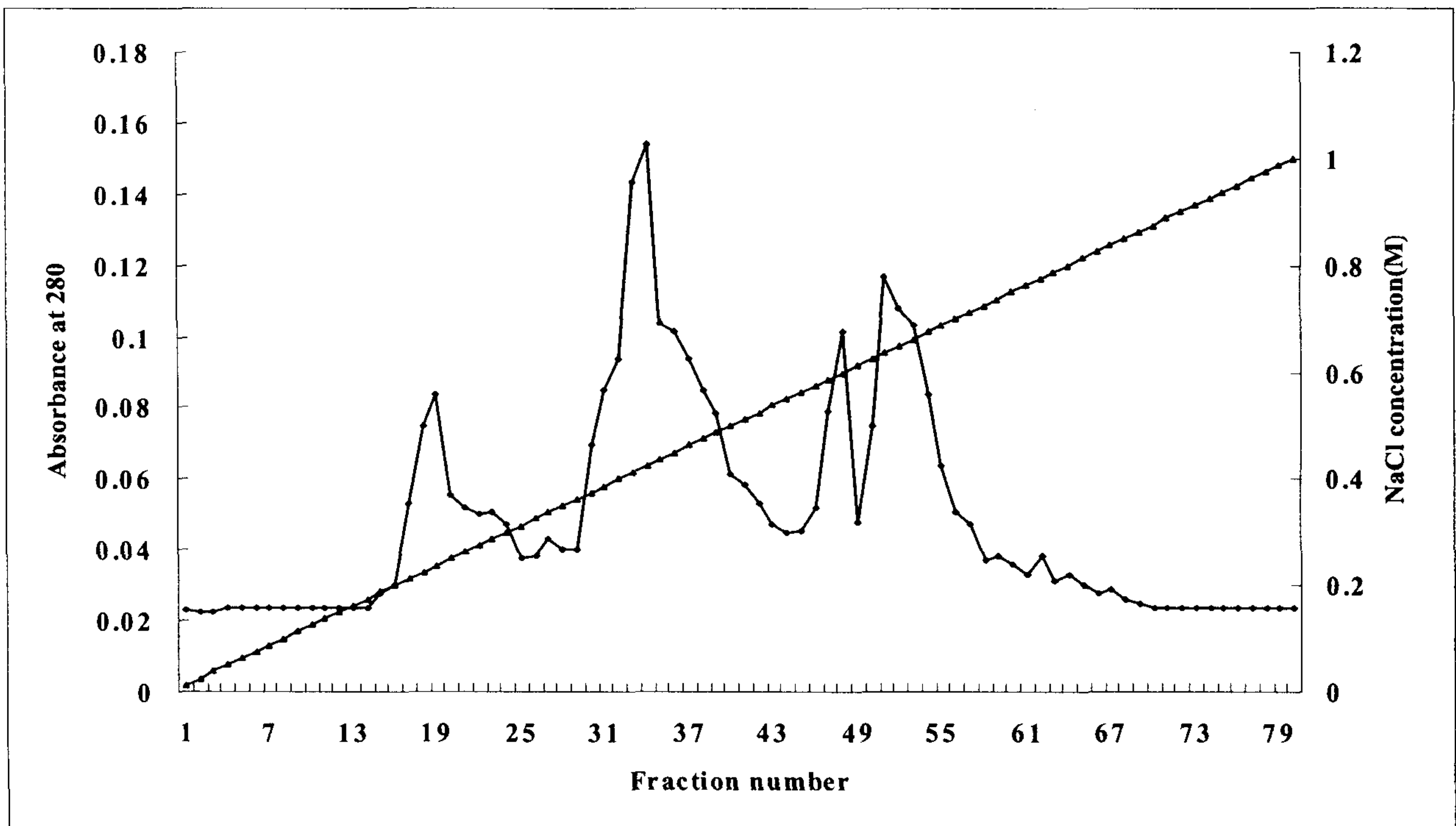


Fig. 45. Ion exchange chromatography pattern of bacterial enzyme derived from *Eisenia bicyclis*.

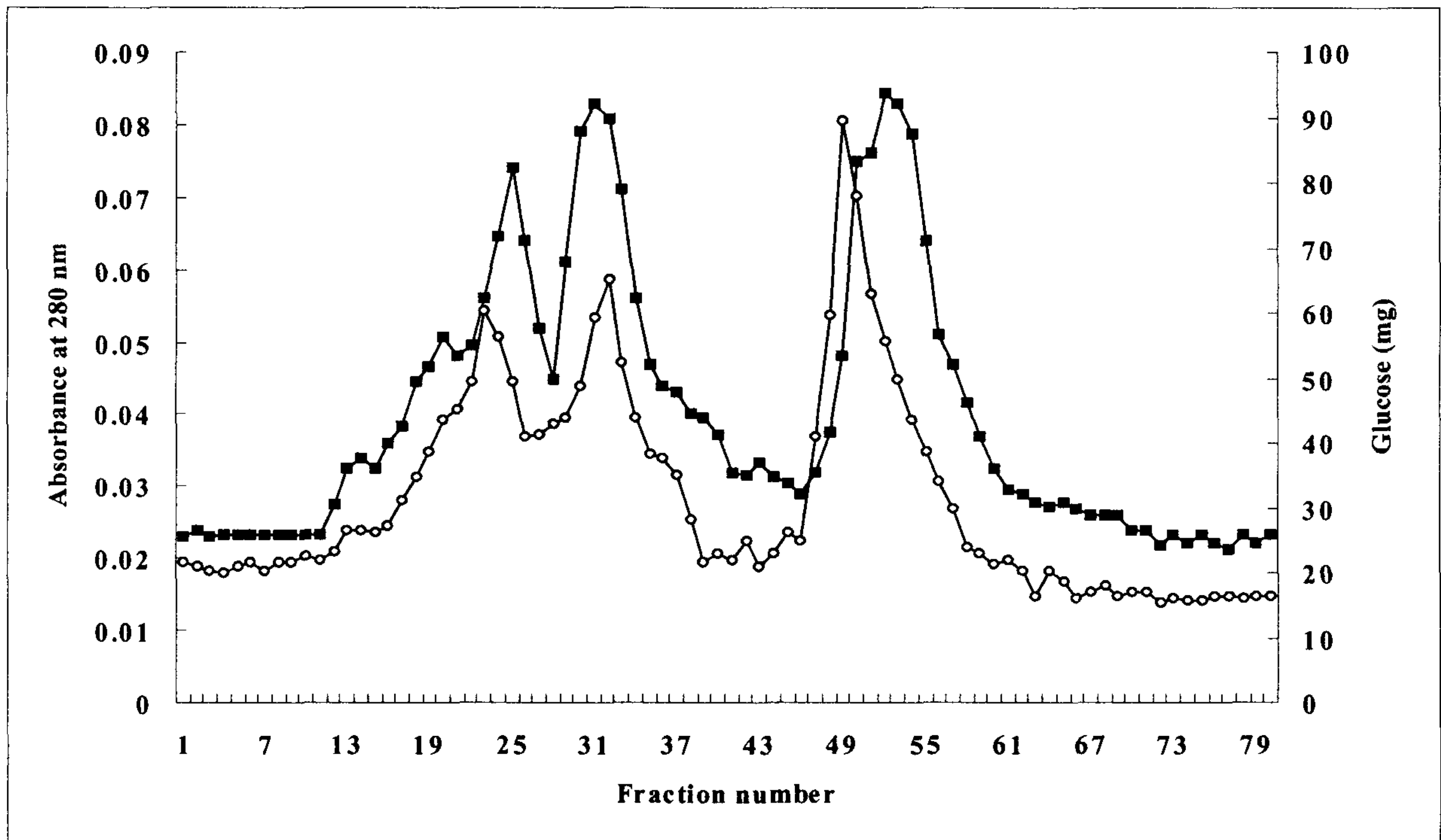


Fig. 46. Gel permeation chromatography pattern of enzyme derived from *Laminaria japonica*. ■: Absorbance at 280 nm; ○: Glucose

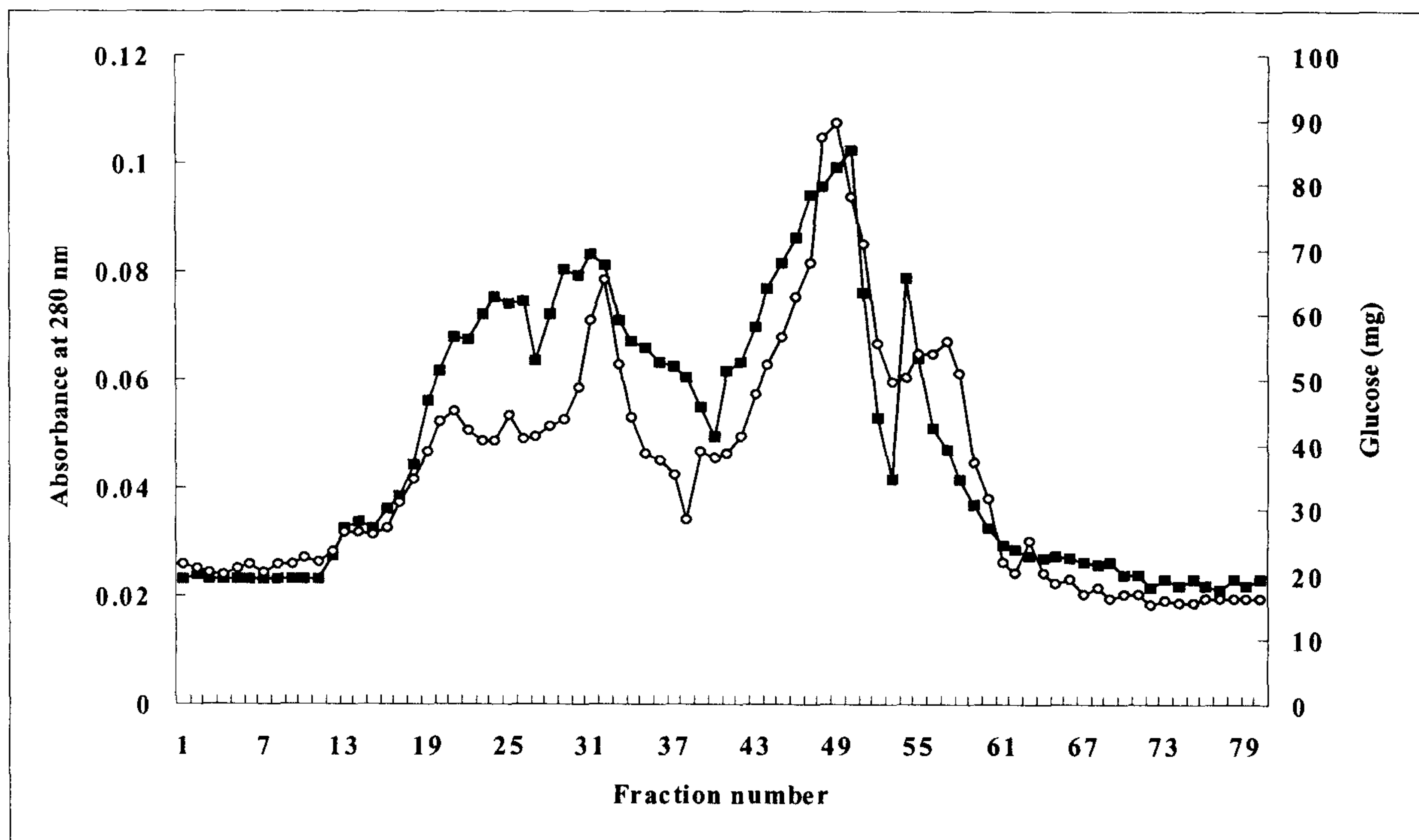


Fig. 47. Gel permeation chromatography pattern of enzyme derived from *Eisenia bicyclis*. ■: Absorbance at 280 nm; ○: Glucose



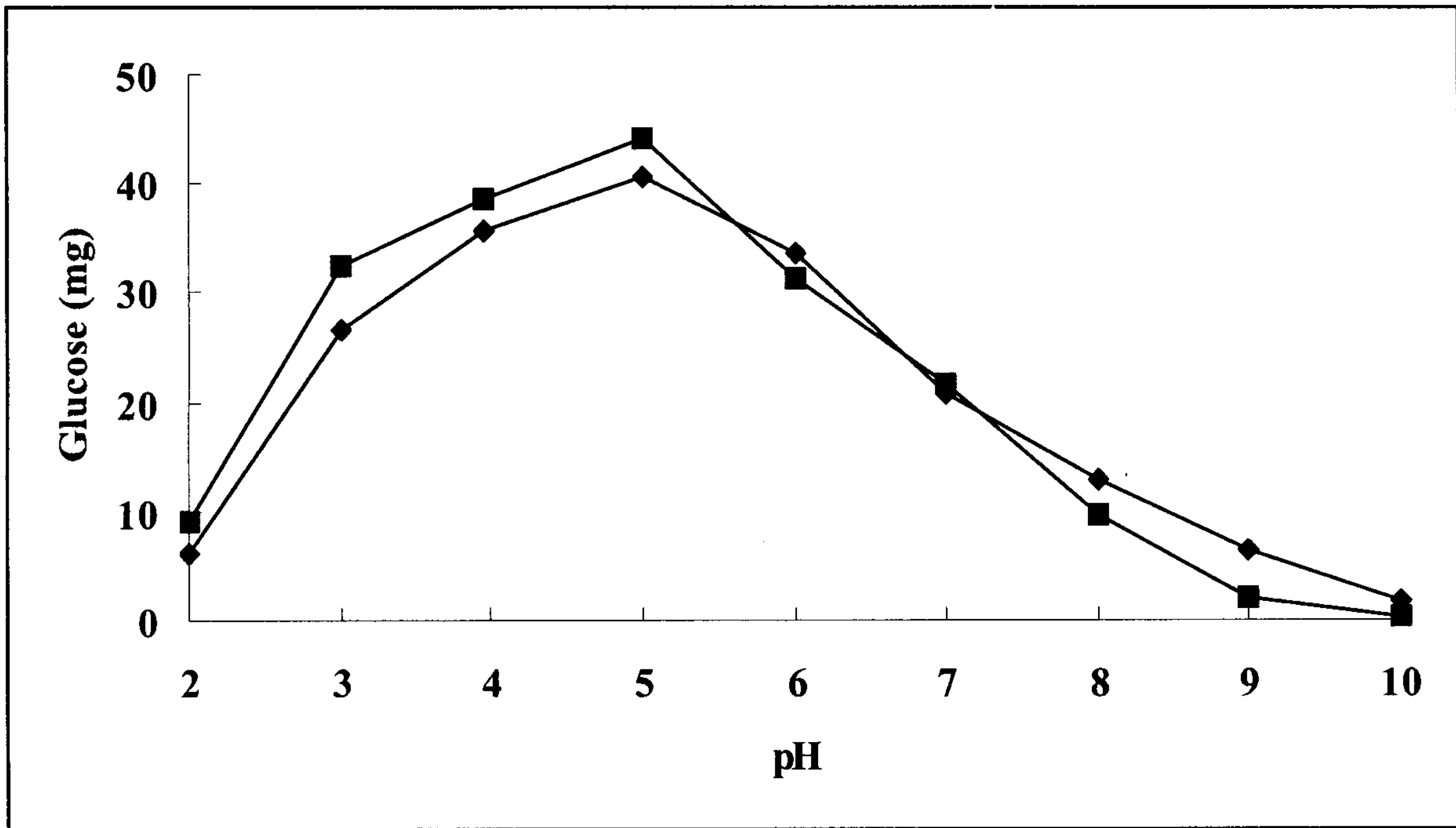


Fig. 48. Effect of pH for the activity of the enzyme.

■: *Eisenia bicyclis*; ◆: *Laminaria japonica*

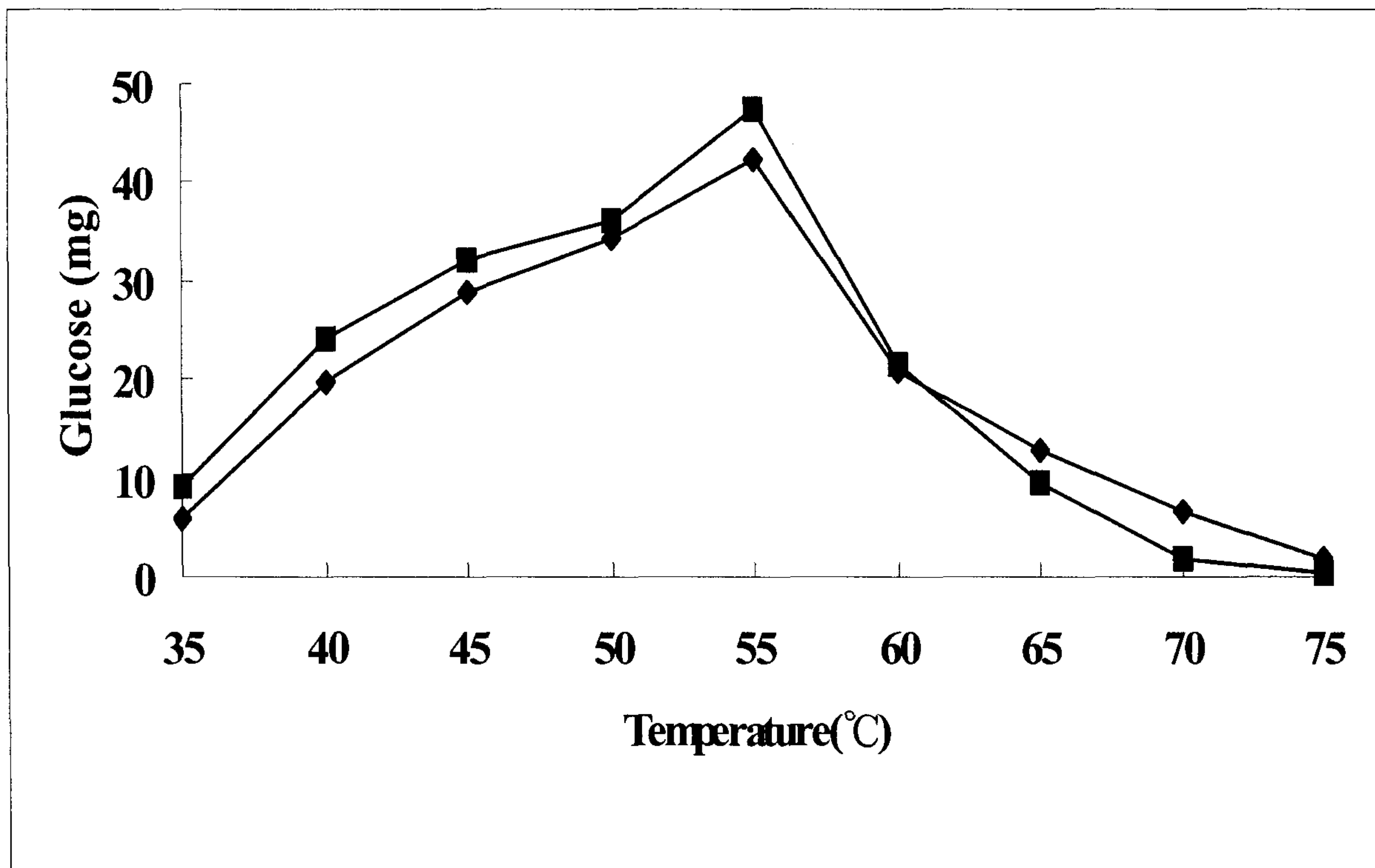


Fig. 49. Effect of temperature for the activity of the enzyme.

■: *Eisenia bicyclis*; ◆: *Laminaria japonica*

(2) 성게알 및 전복내장으로부터 laminaranase 분리·정제

해산 조식동물의 소화효소는 해조의 원형질체를 효과적으로 가수분해하며, 특히 성게알 및 전복내장에는 다양한 cellulase가 존재 할 것으로 생각되어 이들로부터 laminaran을 가수분해하는 효소를 분리·정제하였다. 성게 및 전복은 서울 가락동 시장에서 살아있는 상태로 구입하여 3% 식염수로 수세한 다음 성게알 및 전복내장을 분리하여 ammonium sulfate 농도에 따른 laminaran 가수분해 활성을 측정하였다. 1% laminaran 용액에 대한 ammonium sulfate 농도에 따른 활성은 성게알 및 전복내장의 경우 각각 60-80%에서 환원당(glucose 생성량)이 가장 높았다(Fig. 50). 이 시료를 다시 투석막(MWCO: 3,000 Da)을 사용하여 24시간 투석한 다음 ion-exchange chromatography 및 gel permeation chromatography를 한 결과 성게알은 각각 Fraction 43-50 및 13-28에서, 전복은 각각 Fraction 43-52 및 12-23 에서 환원당(glucose 생성량)이 높았다(Fig. 51-54). 이 분획물을 각각 동결건조한 다음 SDS-PAGE(전기영동)한 결과 분자량은 각각 55,000 Da(성게알) 및 65,200 Da(전복내장)이었다(Fig. 55). 정제된 laminaranase에 대한 다양한 pH 및 온도의 영향을 조사한 결과 성게알은 pH 6.0 및 55°C, 전복은 6.0 및 60°C에서 최대의 효소활성을 나타내었다(Fig. 56).

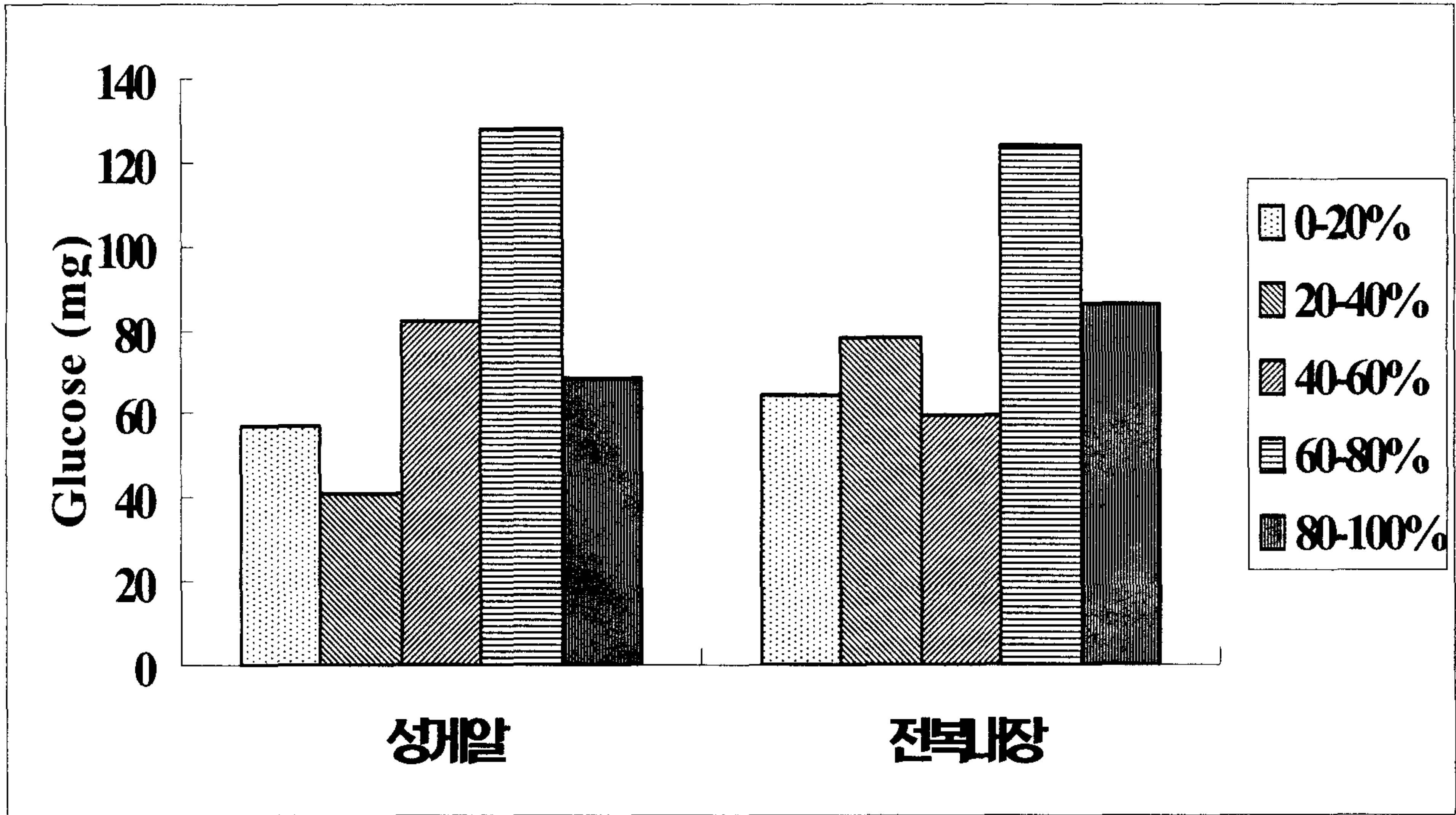


Fig. 50. Effect of ammonium sulfate concentration on the production of glucose at 1% laminaran solution.

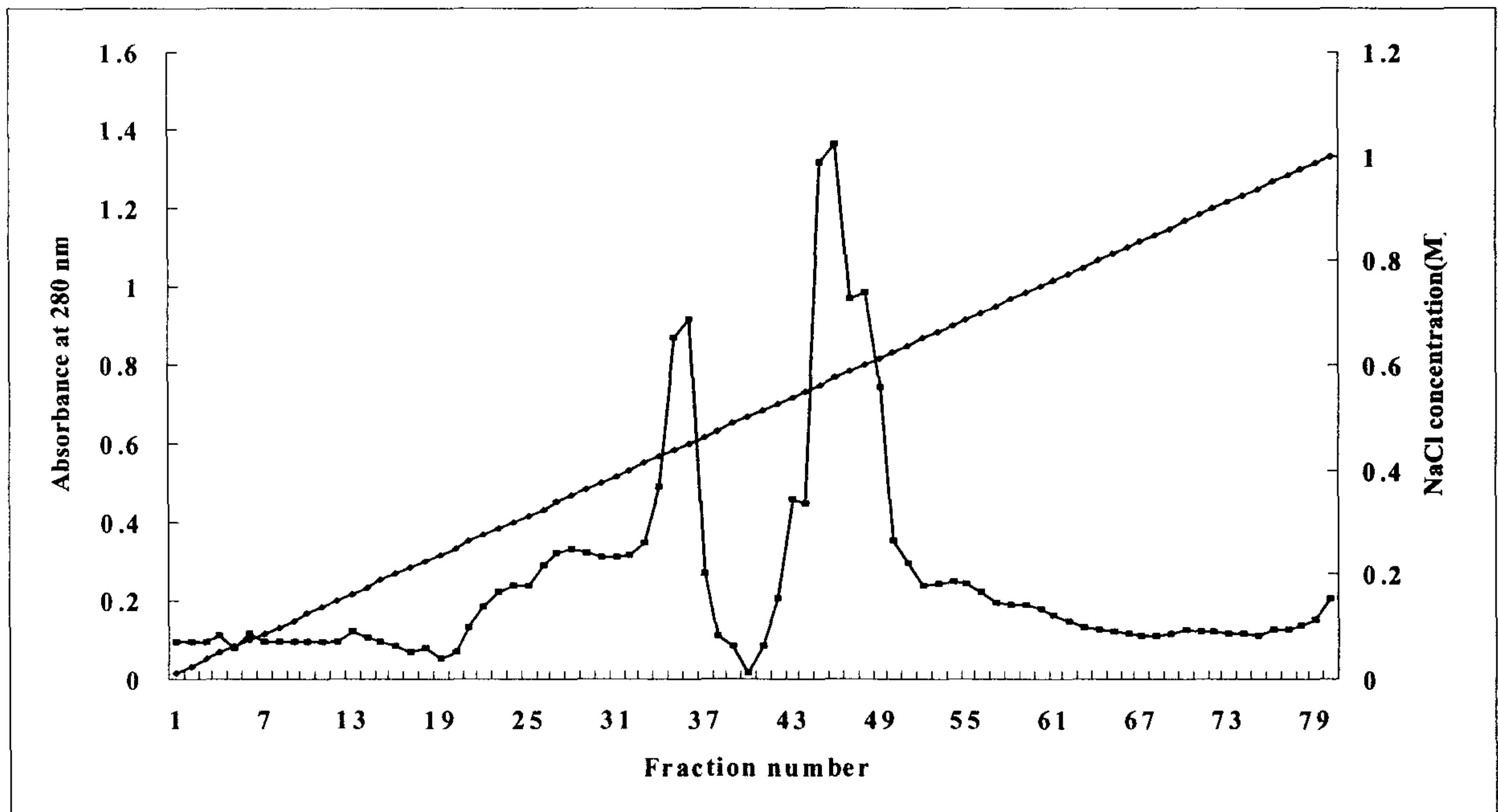


Fig. 51. Ion exchange chromatography pattern of enzyme derived from unfertilized sea urchin.

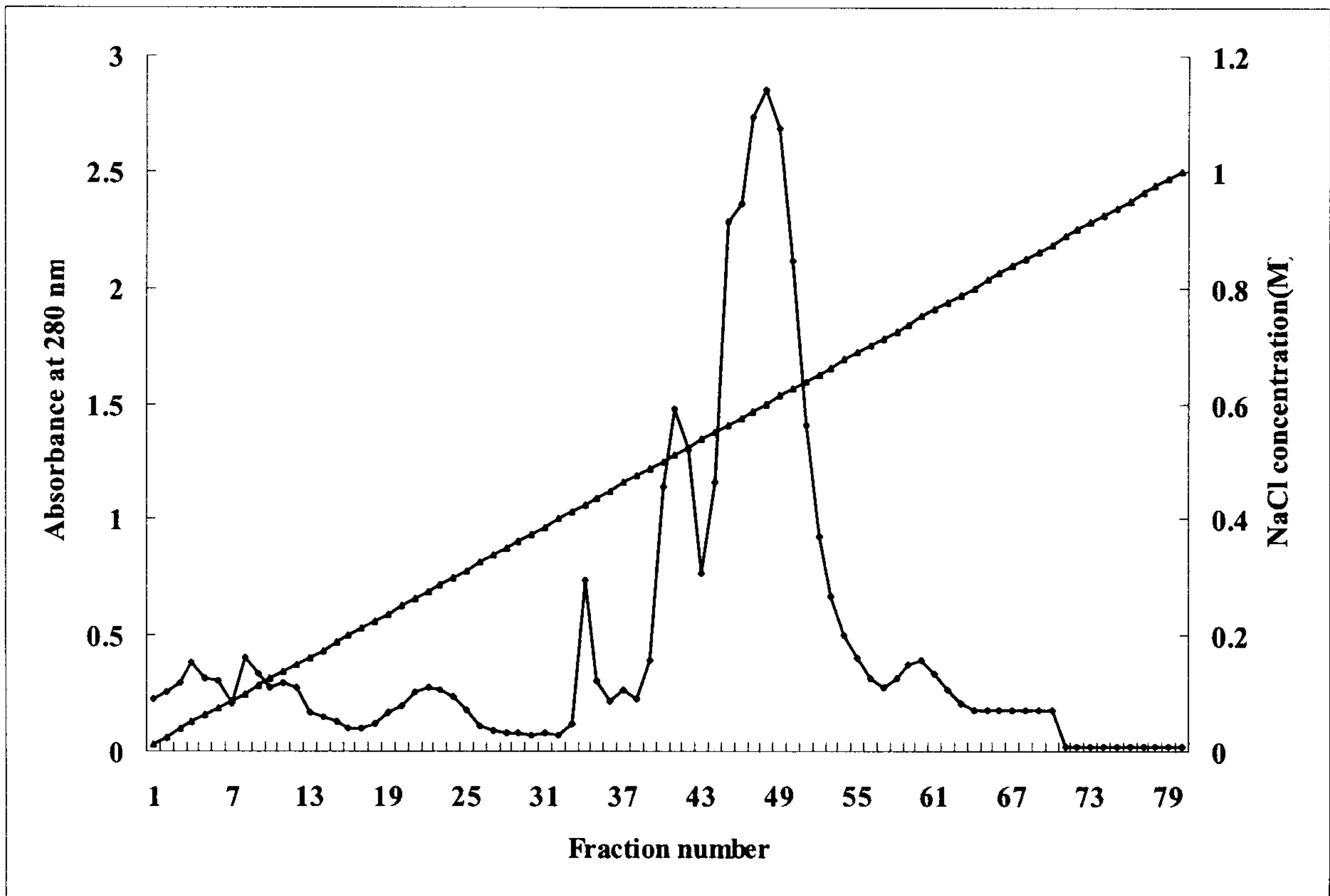


Fig. 52. Ion exchange chromatography pattern of enzyme derived from abalone viscera.

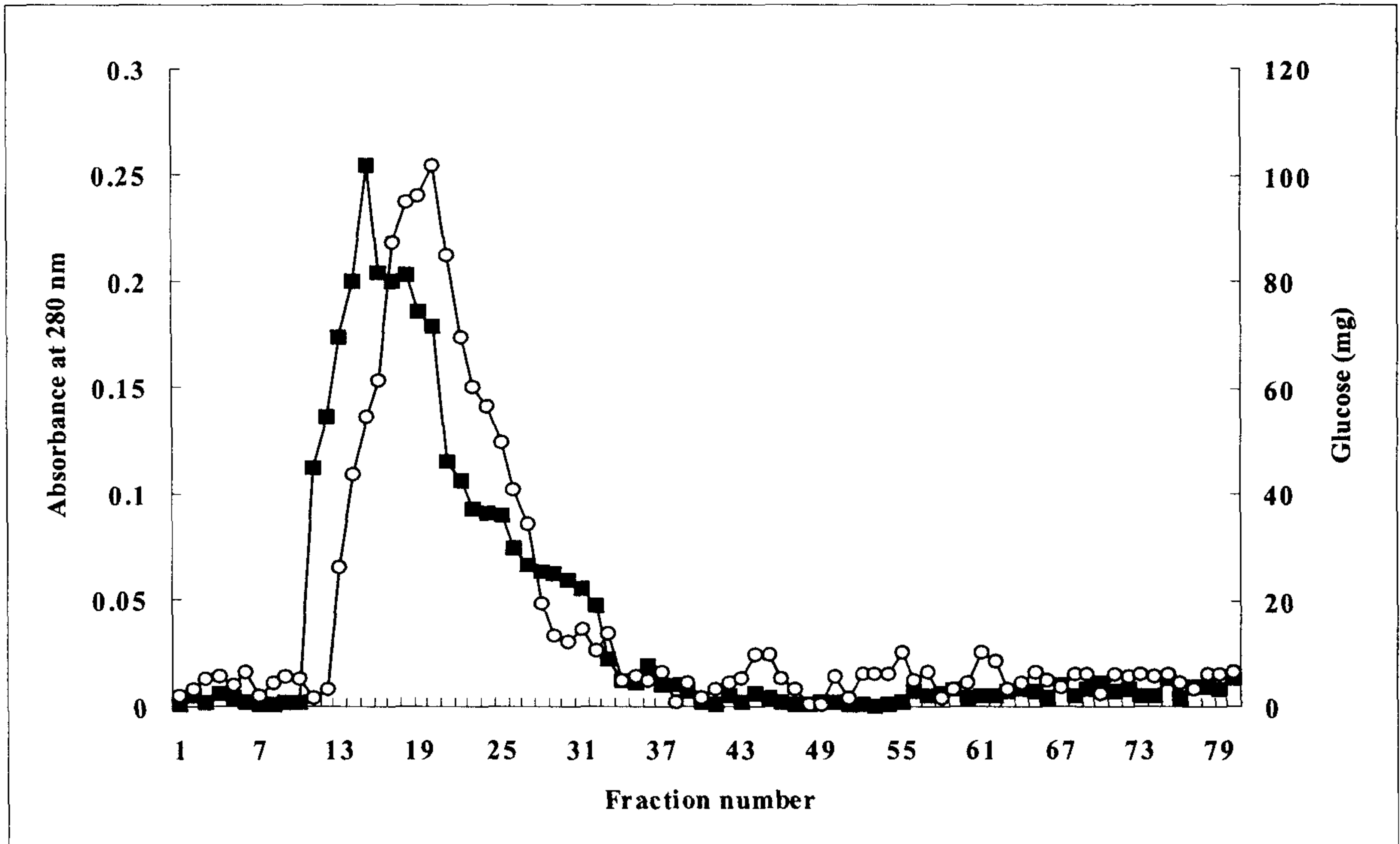


Fig. 53. Gel permeation chromatography pattern of enzyme derived from unfertilized sea urchin. ■: Absorbance at 280 nm; ○: Glucose

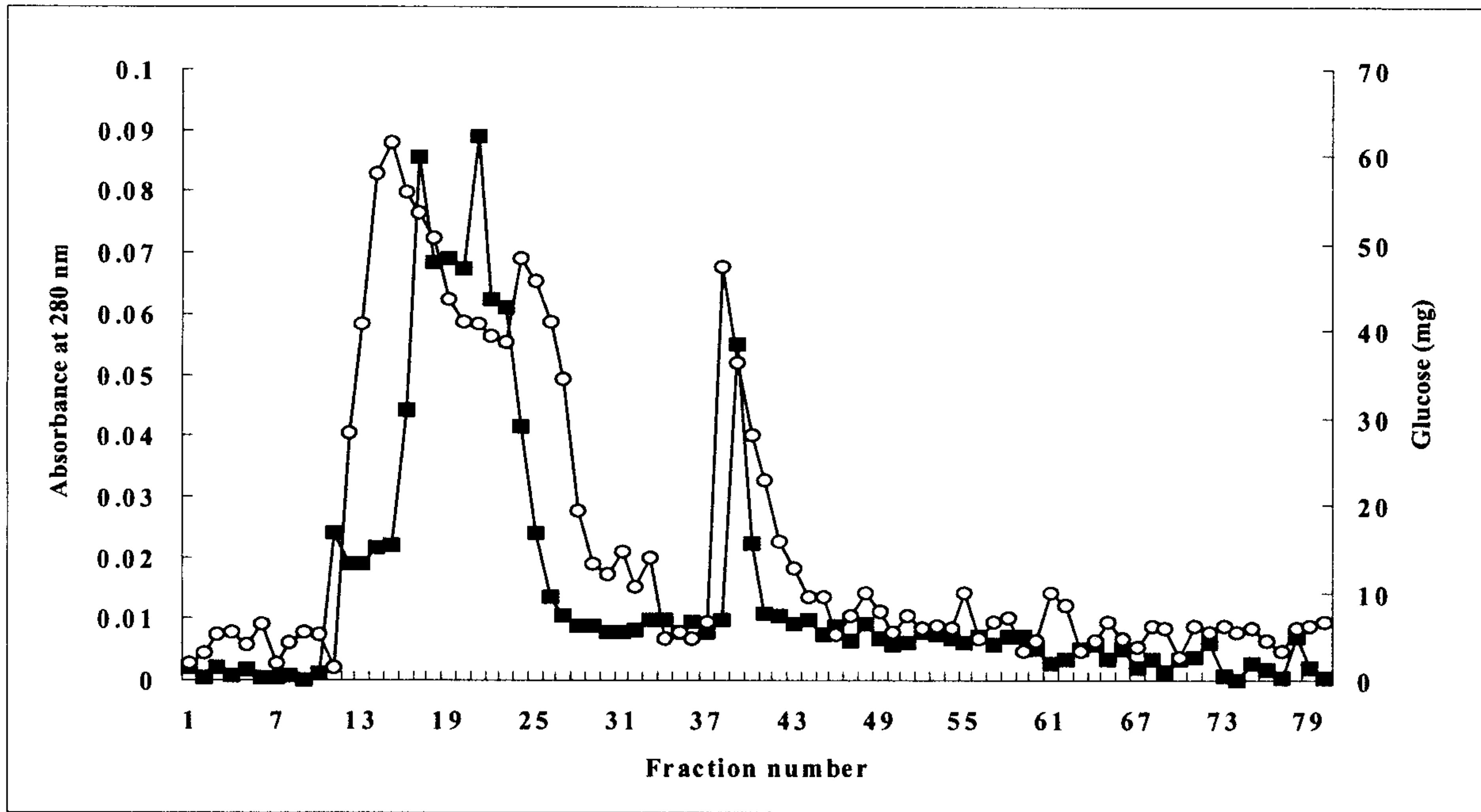


Fig. 54. Gel permeation chromatography pattern of enzyme derived from abalone viscera. ■: Absorbance at 280 nm; ○: Glucose

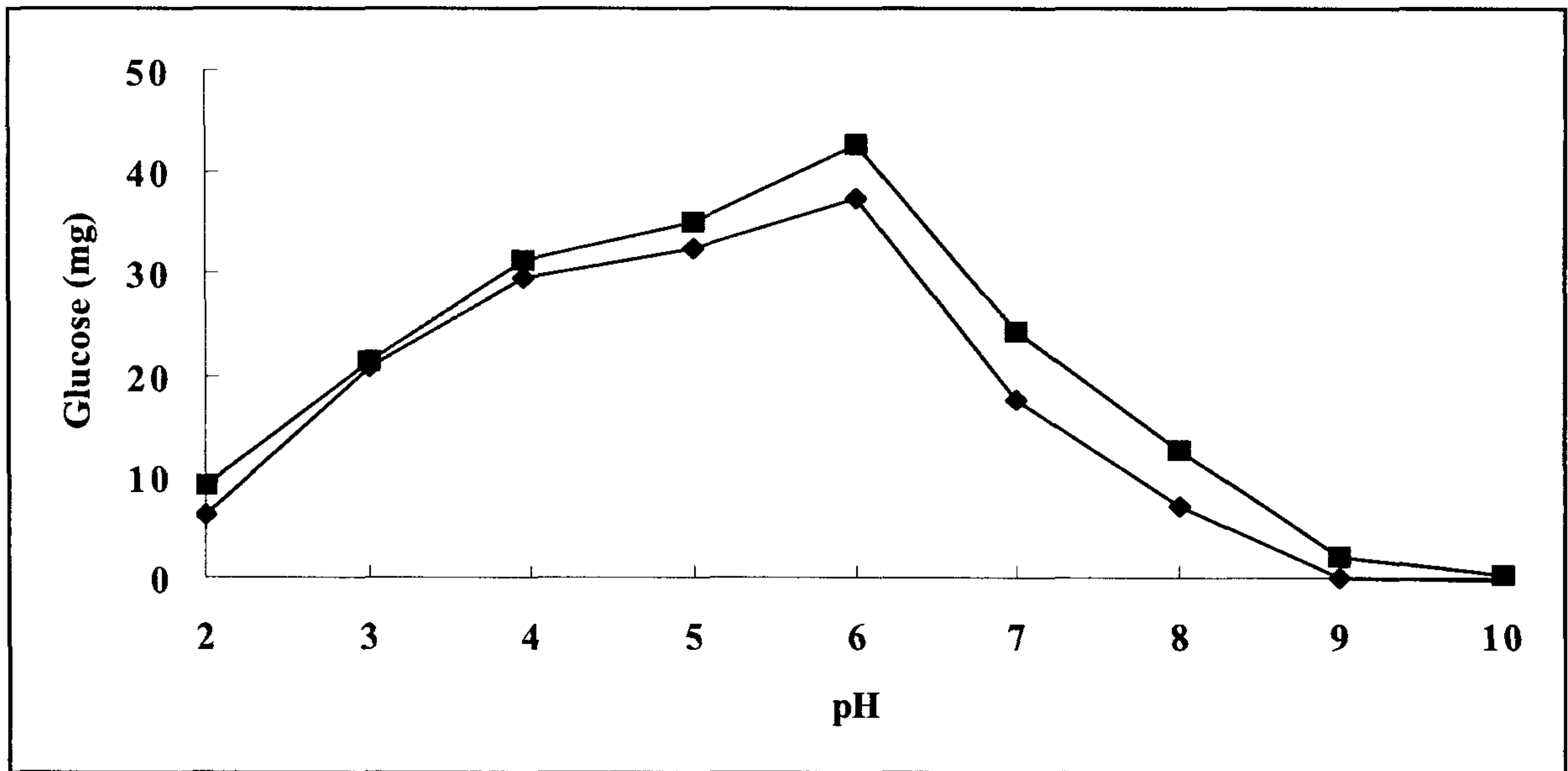


Fig. 55. Effect of pH for the activity of the enzyme.

■: sea urchin; ◆: abalone

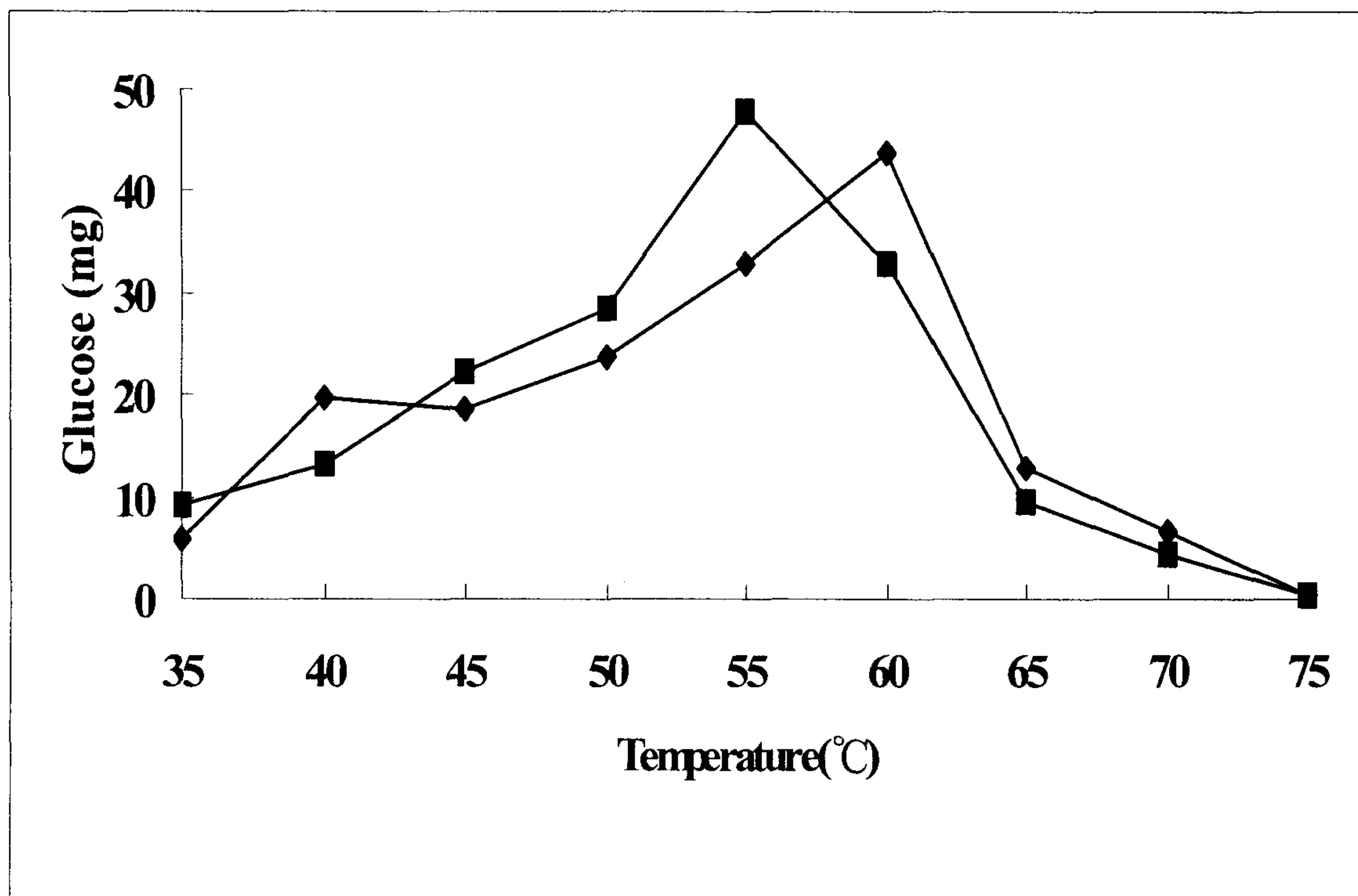


Fig. 56. Effect of temperature for the activity of the enzyme.

■: sea urchin; ◆: abalone



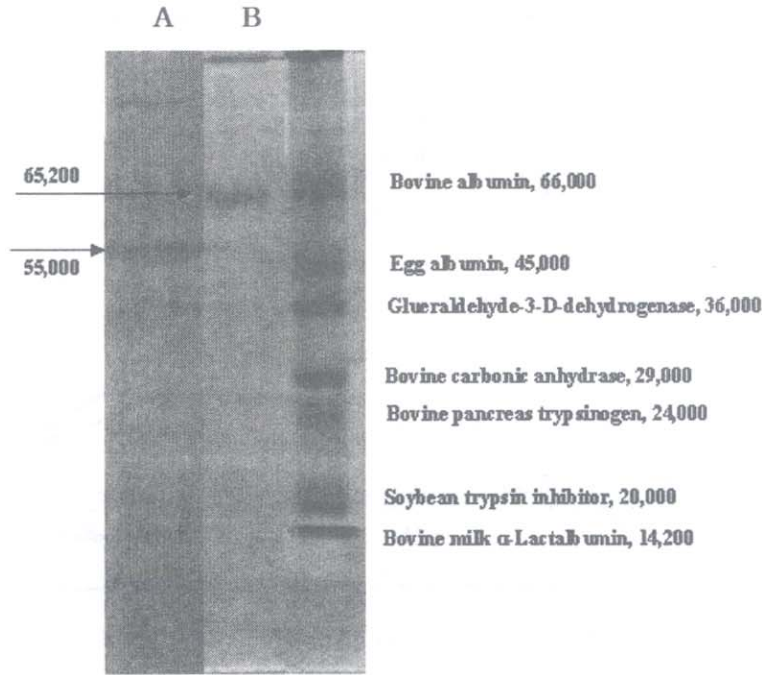


Fig. 57. SDS-Gel electrophoresis of laminaranase.

A: sea urchin; B: abalone

(3) 해조류, 성게알, 전복내장 유래 laminaranase로 처리한 laminaran 수율

Crude laminaran 1% 용액에 다시마 및 대황에서 분리한 미생물이 생산하는 효소와 성게 및 전복 효소를 100, 200, 300, 400 및 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  수준으로 첨가하여 가수분해시간에 따른 환원당을 측정하였으며(Fig. 58), 다시마 및 대황에서 분리한 효소는 각각 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서, 성게 및 전복은 각각 200 및 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 환원당 생성능이 높았다.

Crude laminaran 1% 용액에 다시마 및 대황에서 분리한 효소를 각각 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 성게알 및 전복내장 효소는 200 및 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 첨가한 다음 최적 반응조건(최적 pH 및 온도: 다시마 및 대황에서 분리한 효소의 경우 각각 5.0 및 60 $^{\circ}\text{C}$ , 성게알은 5.5 및 60 $^{\circ}\text{C}$ , 전복은 6.0 및 60 $^{\circ}\text{C}$ )에서 2시간 동안 가수분해한 다음 음이온교환수지(Diaion, 삼양사)를 충전한 column으로 laminaran 및 fucoidan을 분리하였으며, 분획된 laminaran은 다시 한외여과기(Amicon, USA)를 사용하여 분자량수준별로 (50 kDa 이상, 10~50 kDa 및 10 kDa이하)로 cut off 시켰으며, 분자량 수준에 따른 laminaran 수율을 확인하였다(Table 34).

Econase CE로 처리한 laminaran의 분자량 수준에 따른 수율은 50 kDa 이상 52%, 10~50 kDa 35%, 10 kDa 이하 13%로 나타났으며, 다시마유래 효소는 50 kDa 이상 40%, 10~50 kDa 39%, 10 kDa이하 21%이었고, 대황유래 효소는 43, 40 및 17%, 성게알유

래 효소는 32, 48 및 20%, 전복내장유래 효소는 40, 42 및 18% 이었다.

특히 유효 생리활성 획분인 10-50 kDa에서 천연 laminaranase는 Econase CE에 비해 다시마 유래 효소는 4%, 대황 유래 효소는 14.2%, 성게알 유래 효소는 37.1%, 전복내장 유래 효소 20%로 수율이 증대한 것을 확인하였다. 수율면에 있어서는 성게알, 전복내장, 대황 및 다시마 순으로 crude laminaran을 효과적으로 가수분해한 것으로 사료되었다.

분자량 수준에 따른 구성당 조성은 10-50 kDa 획분에서 glucose 함량이 70-80% 이상이었으며, 성게알, 전복 내장, 대황 및 다시마로부터 분리한 미생물효소 순으로 glucose 함량이 증가함을 알 수 있었다(Table 35).

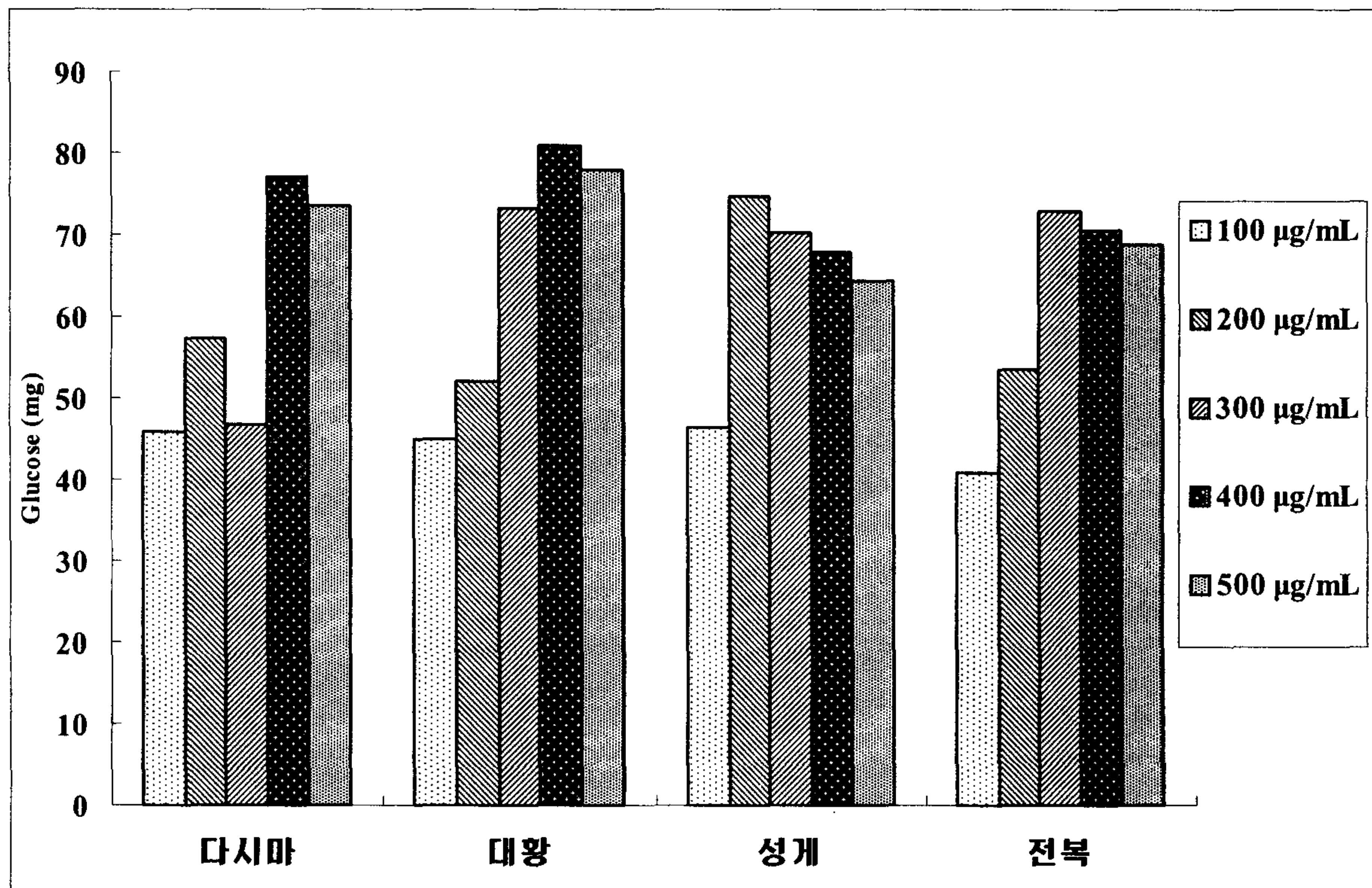


Fig. 58. Effect of enzyme concentration on the production of glucose at 1% laminaran solution.

Table 34. Yield of laminaran hydrolyzed by laminaranase derived from various material source

Laminaran	Molecular weigh	Yield (%)
Control	50 kDa ↑	52
	10–50 kDa	35
	10 kDa ↓	13
A	50 kDa ↑	40
	10–50 kDa	39
	10 kDa ↓	21
B	50 kDa ↑	43
	10–50 kDa	40
	10 kDa ↓	17
C	50 kDa ↑	32
	10–50 kDa	48
	10 kDa ↓	20
D	50 kDa ↑	40
	10–50 kDa	42
	10 kDa ↓	18

Control: Laminaran hydrolyzed by Econase CE

A: Laminaran hydrolyzed by laminaranase derived from *Laminaria japonica*;

B: Laminaran hydrolyzed by laminaranase derived from *Eisenia bicyclis*

C: Laminaran hydrolyzed by laminaranase derived from sea urchin;

D: Laminaran hydrolyzed by laminaranase derived from abalone viscera

Table 35. Chemical composition of laminaran hydrolyzed by laminaranase derived from various material source

Laminaran	Molecular weight	Proportion of monosaccharide(%) <sup>1)</sup>					
		Fucose	Ribose	Xylose	Mannose	Galactose	Glucose
A	50 kDa ↑	4.1	—	3.1	8.9	9.4	74.5
	10–50 kDa	2.8	—	2.2	6.2	5.1	83.7
B	50 kDa ↑	3.1	—	4.2	7.8	6.5	78.4
	10–50 kDa	2.8	—	2.1	4.3	3.2	87.6
C	50 kDa ↑	3.1	—	9.2	12.9	11.5	63.3
	10–50 kDa	2.5	—	1.2	4.3	3.8	88.2
D	50 kDa ↑	4.1	—	3.1	13.9	14.4	64.5
	10–50 kDa	2.8	—	2.2	4.2	4.1	86.7

<sup>1)</sup> Calculated from GC analysis, considering the total amounts under the six monosaccharide as 100%

A: Laminaran hydrolyzed by laminaranase derived from *Laminaria japonica*;

B: Laminaran hydrolyzed by laminaranase derived from *Eisenia bicyclis*

C: Laminaran hydrolyzed by laminaranase derived from sea urchin;

D: Laminaran hydrolyzed by laminaranase derived from abalone viscera

## 나. 성게알 유래 laminaranase의 고정화 방법 및 그 활성 검토

### (1) 고정화 효소의 흡착율 및 그 활성

미생물이 생산하는 효소 2종(B1 및 B2)과 성게알 효소 1종 및 전복내장효소 1종에 대하여 laminaran 가수분해 효과 및 생리활성을 비교 검토한 결과 성게알 효소가 crude laminaran을 가수분해하여 유효성분이 다량함유 되어 있는 10-50 kDa의 획분을 가장 많이 생산해 냈으며, 성게알 효소를 상업적으로 이용하기 위하여 고정화 효소 방안을 검토하였다.

먼저 효소 고정화에 이용된 담체는 agar, sodium alginate, k-carrageenan 및 gelatin등을 사용하여 고정화의 담체 종류에 따른 효소의 생산성 활성을 비교하였다. Laminaranase를 고정화용 담체에 물리적으로 흡착시켰을 때의 흡착율은 Fig. 59에 나타내었으며, sodium alginate의 흡착율은 93.2%로 가장우수 하였으며, 그 다음으로 k-carrageenan 82.5%, agar 76.2% 및 gelatin 66.3% 순이었다.

각각의 담체에 흡착된 고정화 효소의 활성은 1% crude laminaran 용액에 고정화 효소를 첨가하여 55°C에서 30분 동안 반응시킨 후 laminaran으로부터 생성된 환원당(유리 glucose) 함량을 측정하여 Fig. 60에 나타내었다.

Agar, sodium alginate, k-carrageenan 및 gelatin의 환원당 함량은 각각 37.2, 43.2, 29.8 및 25.0 mg으로 sodium alginate를 담체로 사용하는 것이 가장 효율적인 것으로 나타났다. 일정량의 효소용액에 고정화 담체로서 sodium alginate의 양을 점차적으로 증가시켰을 때 sodium alginate 고정화 효소의 흡착율과 활성을 측정하여 Fig. 61에 나타내었다.

Laminaranase (400 µg/mL)에 sodium alginate를 1, 3, 5 및 7%로 첨가하였을 때의 흡착율은 첨가된 sodium alginate의 양에 따라 증가하였으며, 고정화 효소의 활성은 sodium alginate 3% 첨가하였을 때까지 비례적으로 급격하게 증가하였으며, 그이상의 농도에서는 오히려 고정화 효소의 활성이 감소하였다.

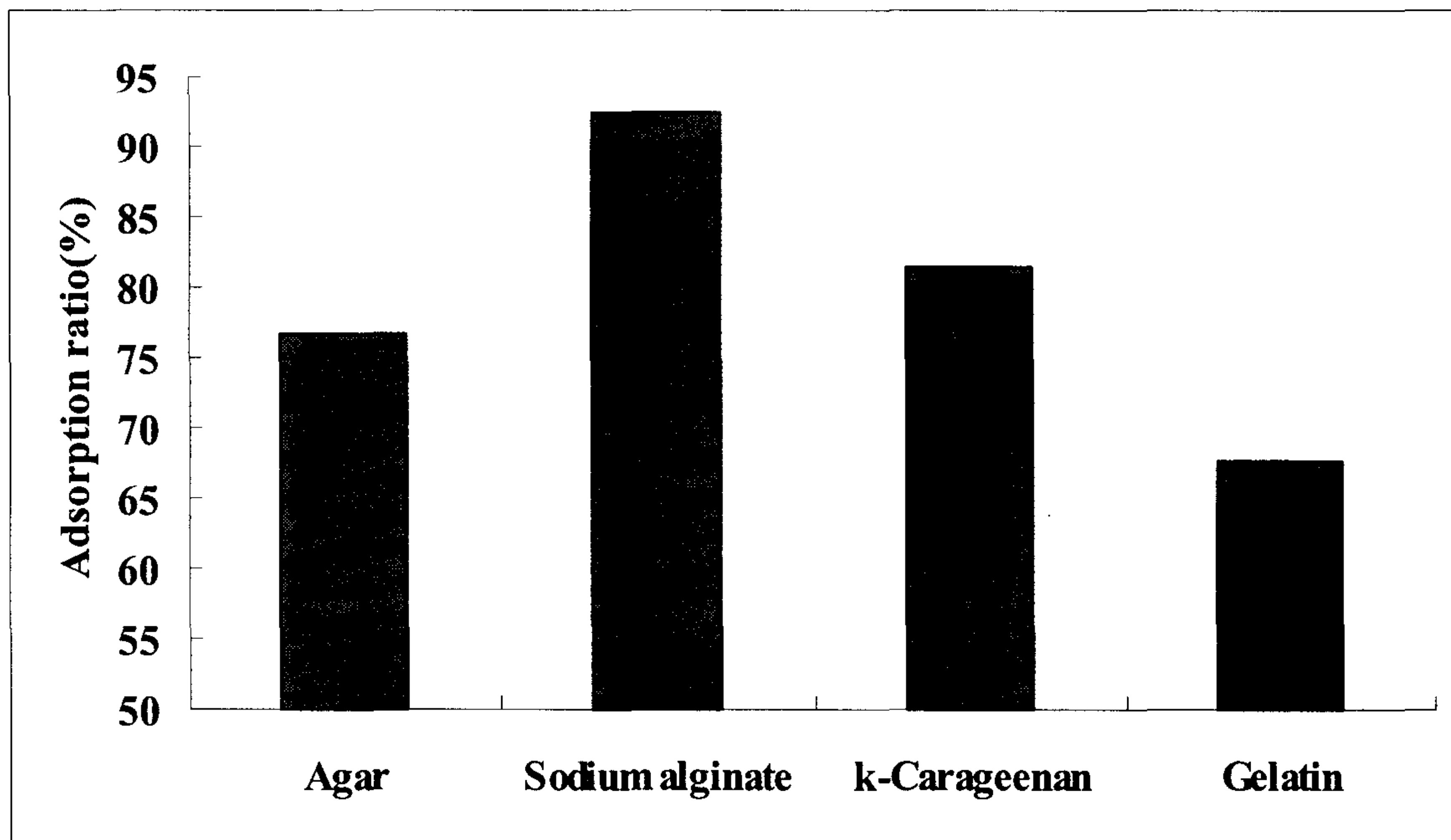


Fig. 59. Adsorption ratio of the immobilized enzyme prepared with various polymers.

\* Enzyme: Laminaranase derived from unfertilized sea urchin

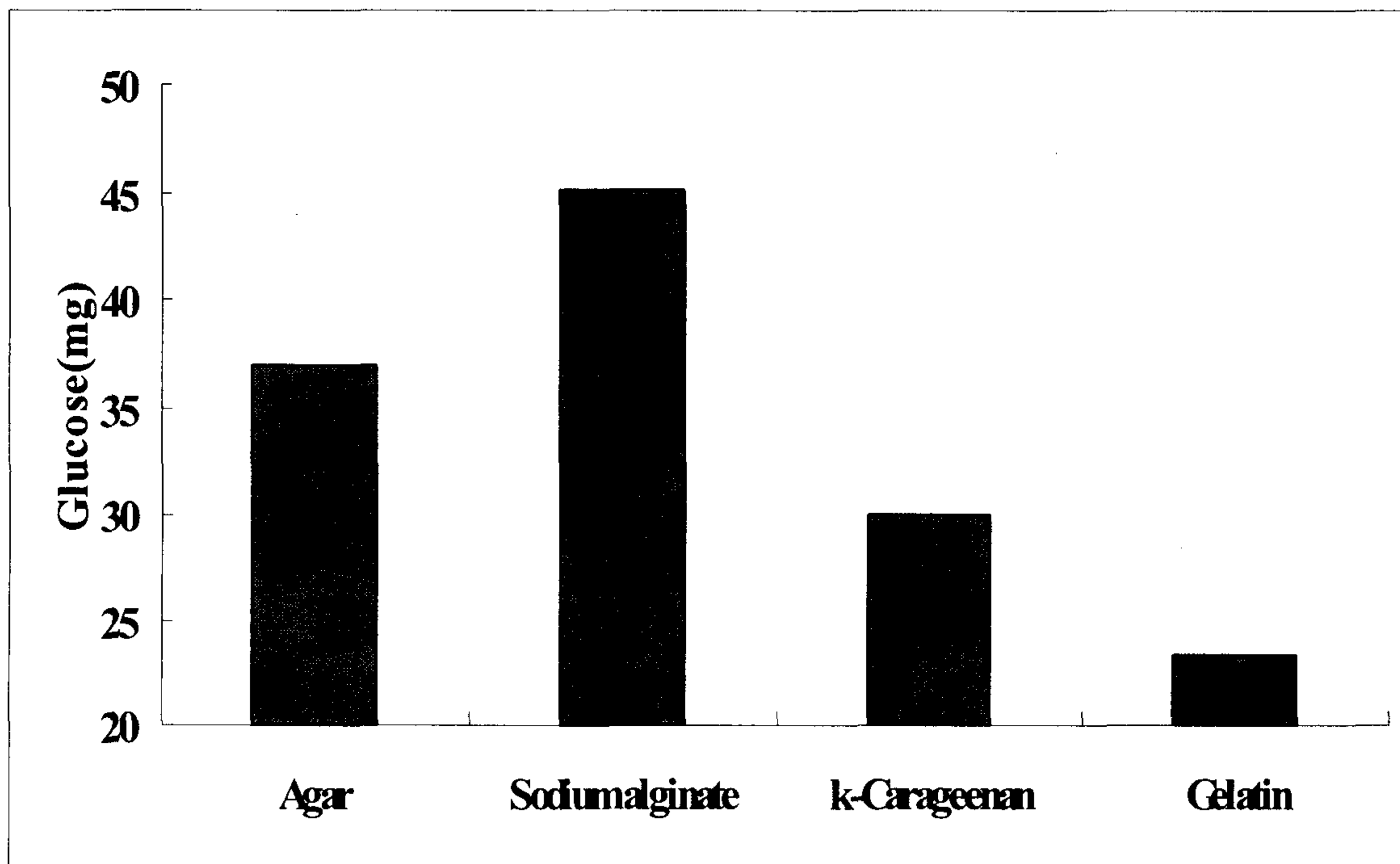


Fig. 60. Activity of the immobilized enzyme prepared with polymer materials.

\* Enzyme: Laminaranase derived from unfertilized sea urchin

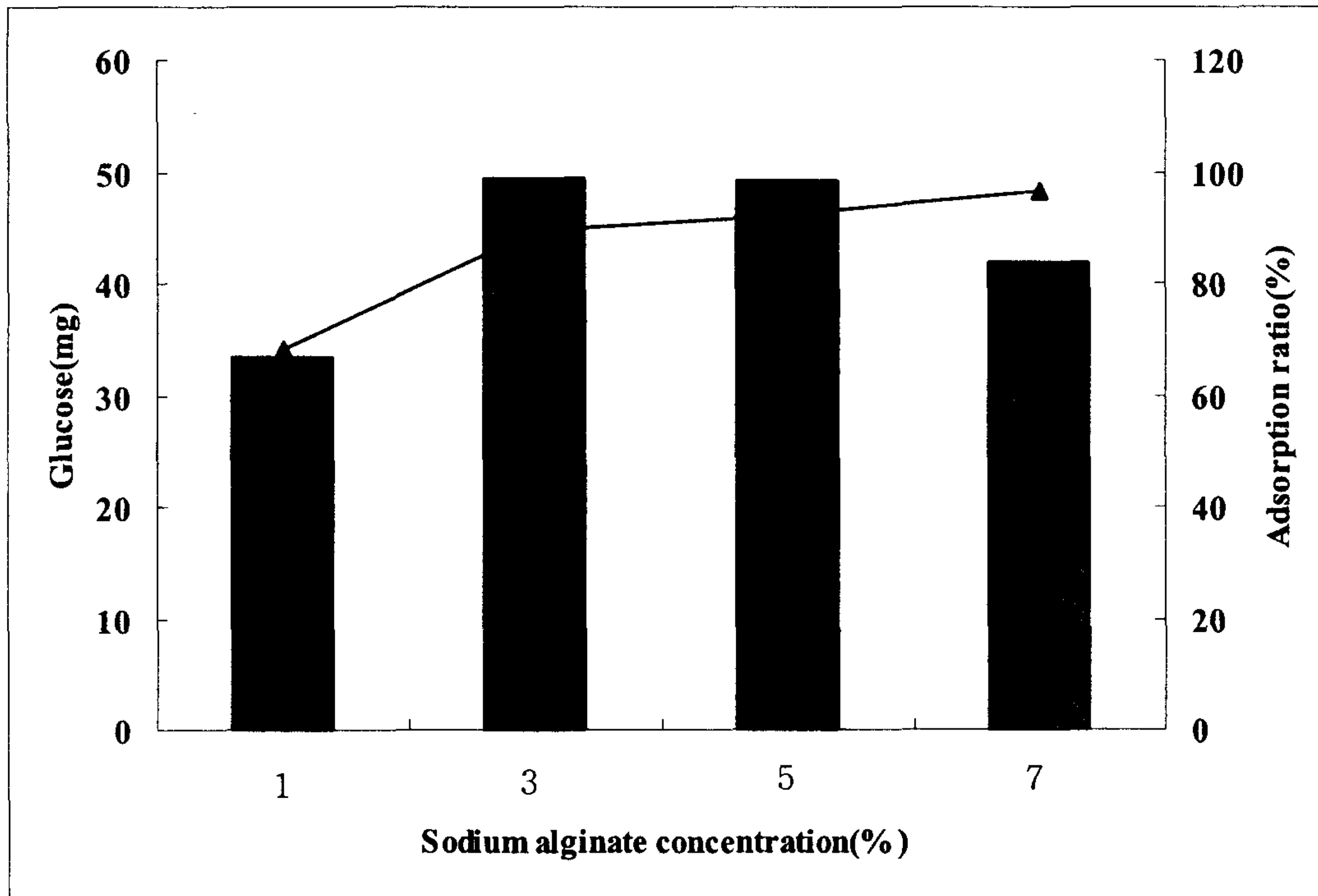


Fig. 61. Adsorption ratio and activity of the immobilized enzyme on the various sodium alginate concentration.

\* Enzyme: Laminaranase derived from sea urchin. ■: glucose (mg); ▲: Adsorption ratio(%)

(2) 온도 및 pH에 대한 고정화 효소의 활성

Sodium alginate를 고정화 담체로 하여 제조한 고정화 효소의 온도 및 pH에 대한 최적 활성조건을 Fig. 62. 및 63에 나타내었다. 유리 효소(성게알 효소)의 최적 온도는 55℃이며 65℃이상의 온도에서는 그 활성이 급격하게 감소한 반면 sodium alginate 고정화 효소는 최적 온도는 60℃로 나타났다.

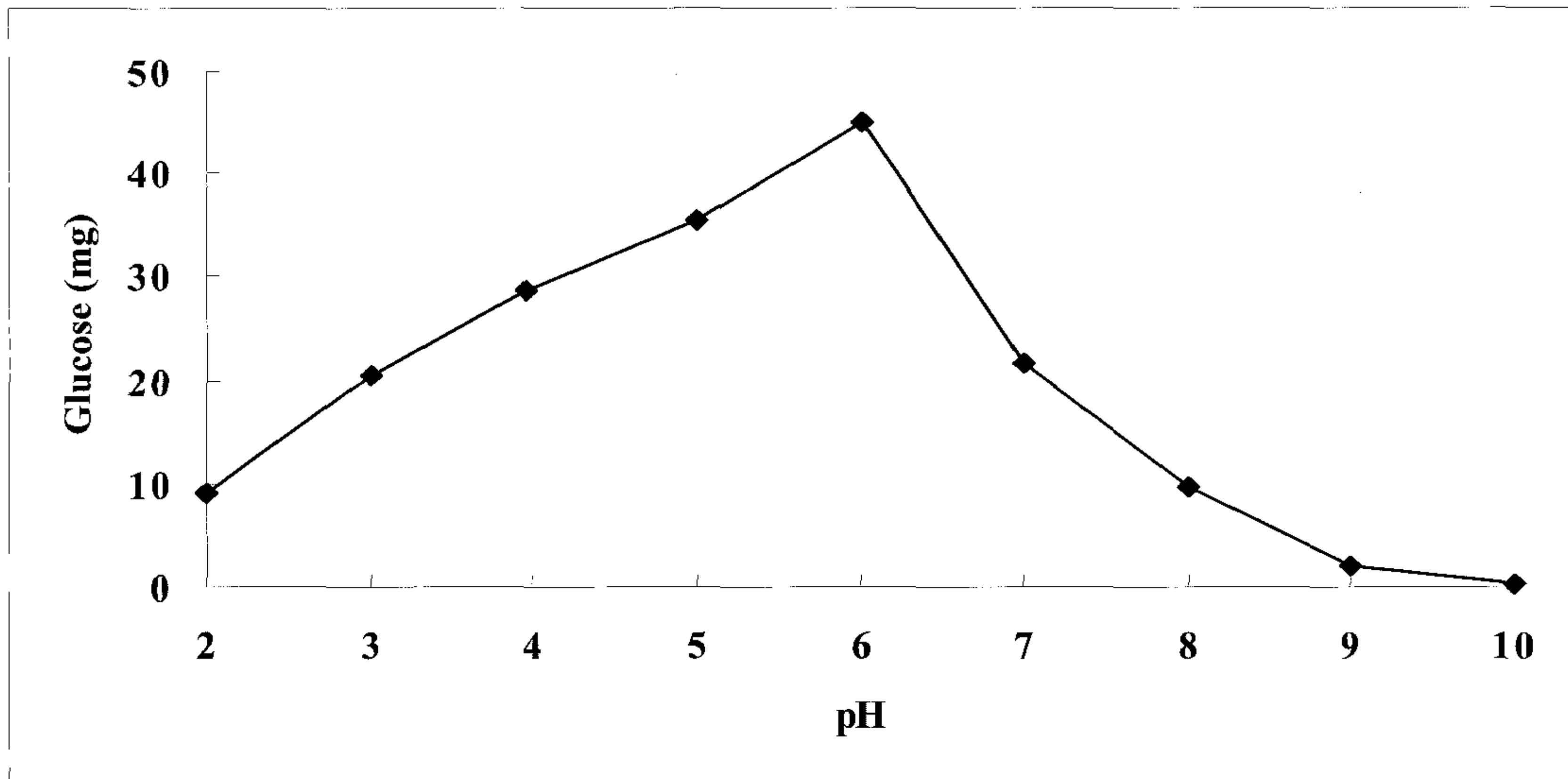


Fig. 62. Effect of pH for the activity of the immobilized enzyme.

\* Enzyme: Laminaranase derived from unfertilized sea urchin.

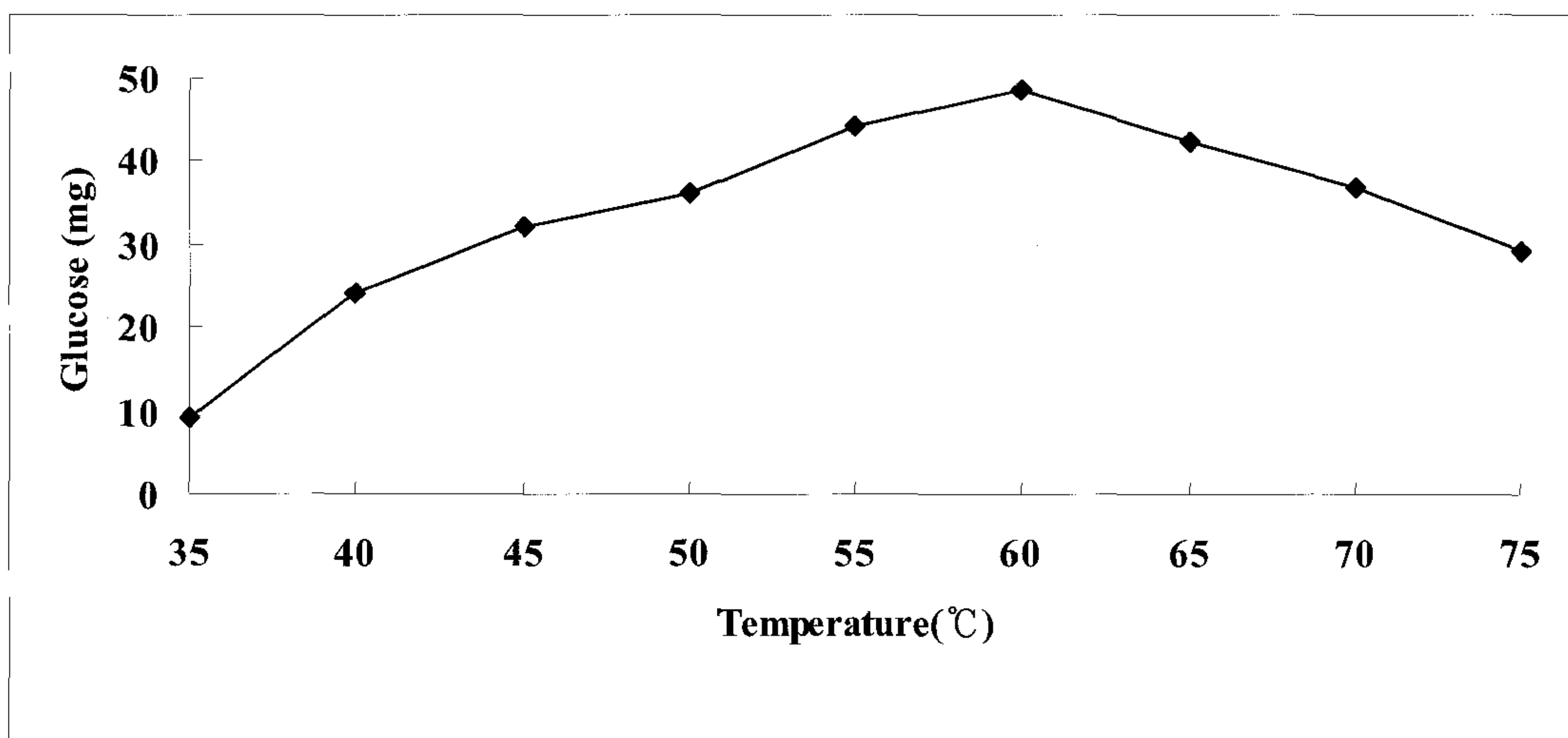


Fig. 63. Effect of temperature for the activity of the immobilized enzyme.

\* Enzyme: Laminaranase from unfertilized sea urchin.

#### 4. 탈색처리 효과

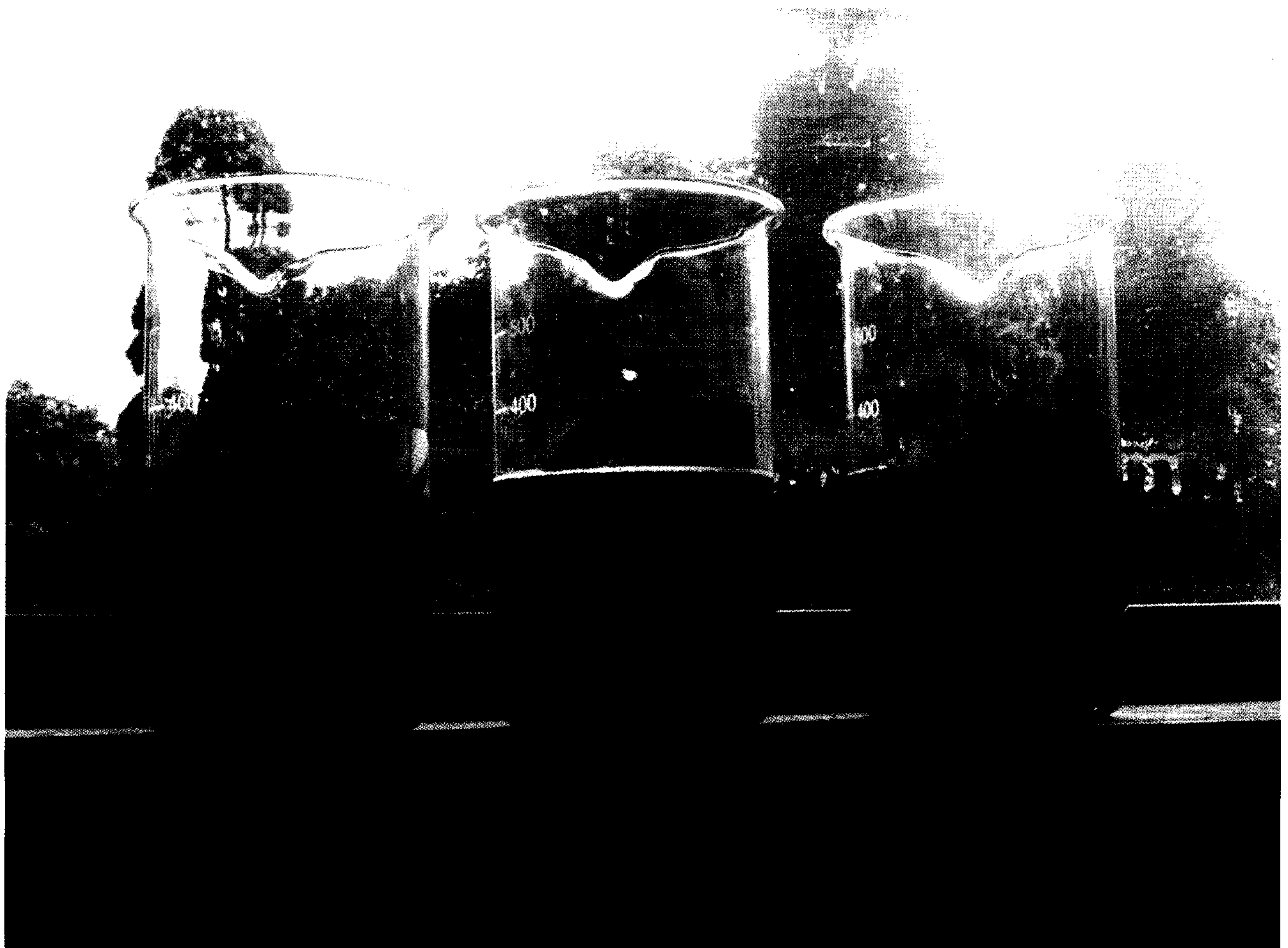
해조유래 crude laminaran의 탈색처리를 위해 활성탄과 산성백토 등을 이용하는 기본적인 탈색처리 효과를 검토하였다(Fig. 64).

Crude laminaran의 원료인 감태의 열수추출물에 탈색제로서 식품처리용 활성탄과 산성 백토를 첨가한 후 70°C에서 40분간 shaking water bath에서 교반 반응시켜 색소물질의 흡착 분리특성을 검토한 결과 활성탄보다 산성백토의 탈색효과가 좋았다. 그러나 산성백토와 색소 물질이 흡착하면서 기능활성 물질도 부분적으로 흡착됨에 따라 이의 대응 방안으로 유기용매



를 사용하여 탈색방법을 살펴보았다. 먼저 진한 갈색의 감태 추출물을 농축하고 양건하여 색소를 파괴하고 파괴된 색소를 에탄올로 2, 3회 수세한 후 저온으로 동결건조 하여 보다 나은 색상의 추출물을 얻을 수 있었다.

해조 시료로부터 특정 기능성 물질을 산업적으로 대량 추출, 분리 및 정제하기 위해서는 기능성분별 수율, 안전성, 품질특성 및 경제성을 동시에 고려하여야 하는 바 탈색을 위한 처리공정의 선택도 제한적일 수 밖에 없다. 본 연구에서는 완전정제 상태의 기능성소재 생산보다는 효능과 경제성 측면에서 기능성식품의 소재적성을 우선적으로 고려하여 제한된 탈색처리 조건을 검토하였으나 향후 고순도 정제를 위해서는 안전성과 효능 및 경제성을 고려한 탈색처리 공정의 후속연구 필요성이 있을 것으로 사료되었다.



[산성백토 처리]

[무처리]

[활성탄처리]

Fig. 64. 산성백토와 활성탄을 사용한 crude laminaran의 탈색효과

## 제 5 절 기능성분의 효능평가

### 1. Laminaran

#### 가. 항암활성

##### (1) *in vitro* 항암활성

##### (가) 수식 Laminaran의 cytotoxicity (MTT assay)

암세포주에 대한 세포독성을 기준으로 한 수식 laminaran의 항종양활성(항암활성) 조사결과를 Table 36에 나타내었다. 수식 laminaran의 암세포 3종(위암, 자궁암 및 대장암 세포주)에 대한 세포독성을 측정한 결과 수식 laminaran은 분자량 10 kDa 이상에서, 수식 fucoidan은 50 kDa 이상에서 50%이상의 높은 활성을 나타내었고, 수식방법에 따라서는 효소적가수분해, 고온가압처리 및 산 가수분해 순으로 활성이 높았다. 이는 Jung과 Bae(2002)의 수식 방법에 따른 결과와 흡사한 결과를 나타내었다.

Table 36. Cytotoxicity of modified laminaran on SNU-1, HeLa and SW cell

	MW <sup>2)</sup>	Cytotoxicity(%) <sup>1)</sup>		
		Laminaran(대황)		
		SNU-1	HeLa	SW
E-F <sup>3)</sup>	f-1 <sup>5)</sup>	80.5	78.3	75.2
	f-2	43.8	62.5	65.4
	f-3	38.8	27.0	46.4
	f-4	-	-	-
E-E <sup>4)</sup>	f-1	80.1	80.8	89.4
	f-2	-	43.9	50.0
	f-3	46.4	56.5	51.3
	f-4	-	-	-
Acid hydrolysis	f-1	66.1	52.1	63.7
	f-2	40.4	6.8	28.5
	f-3	43.2	40.2	42.3
	f-4	-	-	-
Autoclaving	f-1	81.0	80.4	82.0
	f-2	-	49.8	40.4
	f-3	47.7	43.1	40.8
	f-4	-	-	-

<sup>1)</sup> Cytotoxicity of polysaccharides was estimated at concentration of 100  $\mu$ L/mL

<sup>2)</sup> MW: Molecular weight, <sup>3)</sup> E-F: Enzyme (Flavozyme), <sup>4)</sup> E-C: Enzyme (Econase CE)

<sup>5)</sup> f-1(MW: 100 kDa  $\uparrow$ ): f-2(MW: 100-50 kDa): f-3(MW: 50-10 kDa): f-4(MW: 10 kDa  $\downarrow$ )

Laminaran의 항종양활성 IC<sub>50</sub> 값은 Table 37과 같다. Laminaran의 항종양활성 IC<sub>50</sub> 값은 SNU-1, HeLa 및 SW에 대하여 각각 100.12, 98.57 및 97.24 µg/mL로 나타났으며, laminaran의 SNU-1, HeLa 및 SW 각각에 대한 항종양활성 IC<sub>50</sub> 값은 100 µg/mL 전후로 나타났으며 이는 Kim(1998)이 보고한 결과와 유사하였다.

Table 37. IC<sub>50</sub> of laminaran on SNU-1, HeLa and SW cell(unit : µg/mL)

Cell line	Laminaran
	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
SNU-1	100.12
HeLa	98.57
SW	97.24

(나) NO 생성능

Nitric oxide(NO)는 면역계에서 종양세포나 세포내 기생물에 대한 방어 작용을 하는 중요한 신호 전달물질이며, radical molecule로서 nitric oxide synthase(NOS)의 작용에 의해 L-arginine이 L-citrulline으로 변화되는 과정에서 생성된 NO는 대부분의 조직세포에 영향을 미쳐 순환기계에서는 혈관 이완 물질로, 중추신경계에서는 신경전달 물질로, 면역계에서는 방어물질로 알려져 있다. 탐식 작용을 일으킨 대식세포는 NOS를 유도하여 NO를 생산한다. Laminaran의 NO 생성능은 모든 실험구에서 농도 의존적으로 NO의 생성량이 증가하였으며, 성게알 및 전복내장 효소로 처리한 laminaran이 다시마 및 대황유래 미생물 효소로 처리한 laminaran에 비해 NO 생성능이 상대적으로 높았다(Table 38). 이와 같은 효소처리 laminaran의 NO 생성능은 기존의 천연물 성분 중 NO 생성능이 가장 높은 것으로 알려진 가시오가피의 활성획분과 유사하거나 오히려 높은 활성수준을 나타내는 것으로 검토되었다(Doll and Peto(1981)).

Table 38. Nitric oxide production of laminaran hydrolyzed by laminaranase derived from various material source

Enzyme source	Molecular weight (kDa)	NO <sub>2</sub> concentration (μM)		
		100 μg/mL	200 μg/mL	300 μg/mL
A	50 ↑	16.5	20.5	28.9
	10-50	18.2	29.8	29.1
	10 ↓	12.3	18.5	25.3
B	50 ↑	20.3	25.8	30.6
	10-50	25.3	32.8	35.8
	10 ↓	16.3	22.3	30.2
C	50 ↑	29.5	37.5	45.3
	10-50	33.57	37.8	44.8
	10 ↓	27.26	37.5	41.7
D	50 ↑	23.10	31.6	40.0
	10-50	23.24	35.7	40.0
	10 ↓	21.06	33.9	37.2

A : Laminaranase derived from *Laminaria japonica*; B : Laminaranase derived from *Eisenia bicyclis*;  
 C : Laminaranase derived from sea urchin; D : Laminaranase derived from abalone viscera  
 Control : 2.11 μM

(다) 세포자멸사(Apoptosis)

SNU-1 cell을 대상으로 하여 다양한 농도의 laminaran 용액으로 처리하여 apoptosis 유도활성을 조사한 결과 Fig. 65과 같이 apoptosis를 유도하는 Bax의 단백질 발현은 laminaran의 처리농도에 비례하여 증가하는 양상을 보였다. Laminaran을 0.01 mg/mL로 처리하였을 때 6.9%의 세포사멸이 일어났으며, 0.1 mg/mL의 농도를 처리하였을 때는 50%의 세포 사멸이 일어났고 1 mg/mL의 농도를 처리하였을 때는 75.9%의 세포사멸이 일어났다. 따라서 laminaran은 농도 의존적으로 SNU-1의 세포자멸사를 유도하는 것으로 나타났다(Fig. 66).

con            0.01        0.05        0.1        0.5        1        (unit: mg/mL)

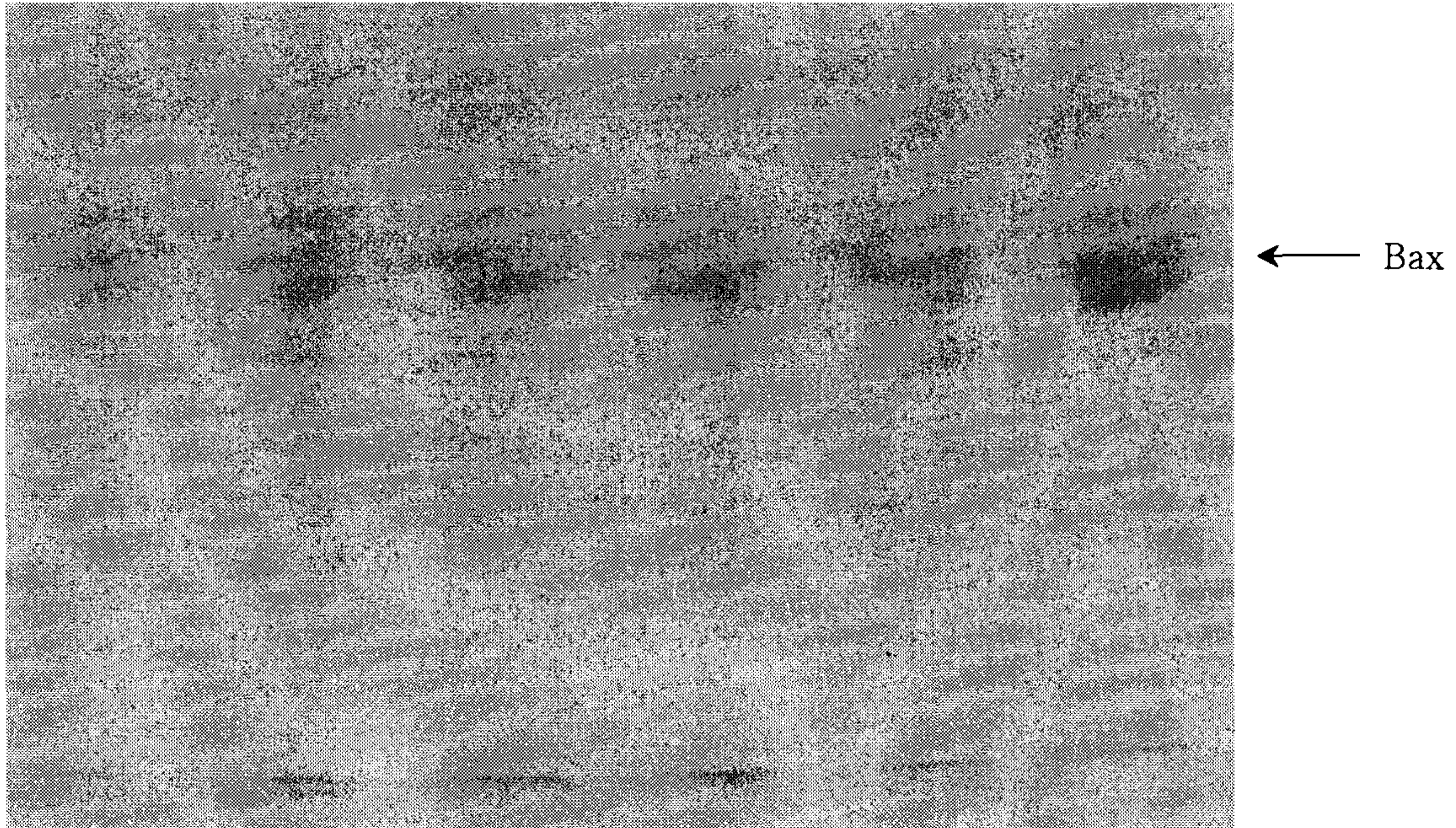


Fig. 65. Laminaran이 SNU-1 세포주의 세포자멸사에 미치는 영향

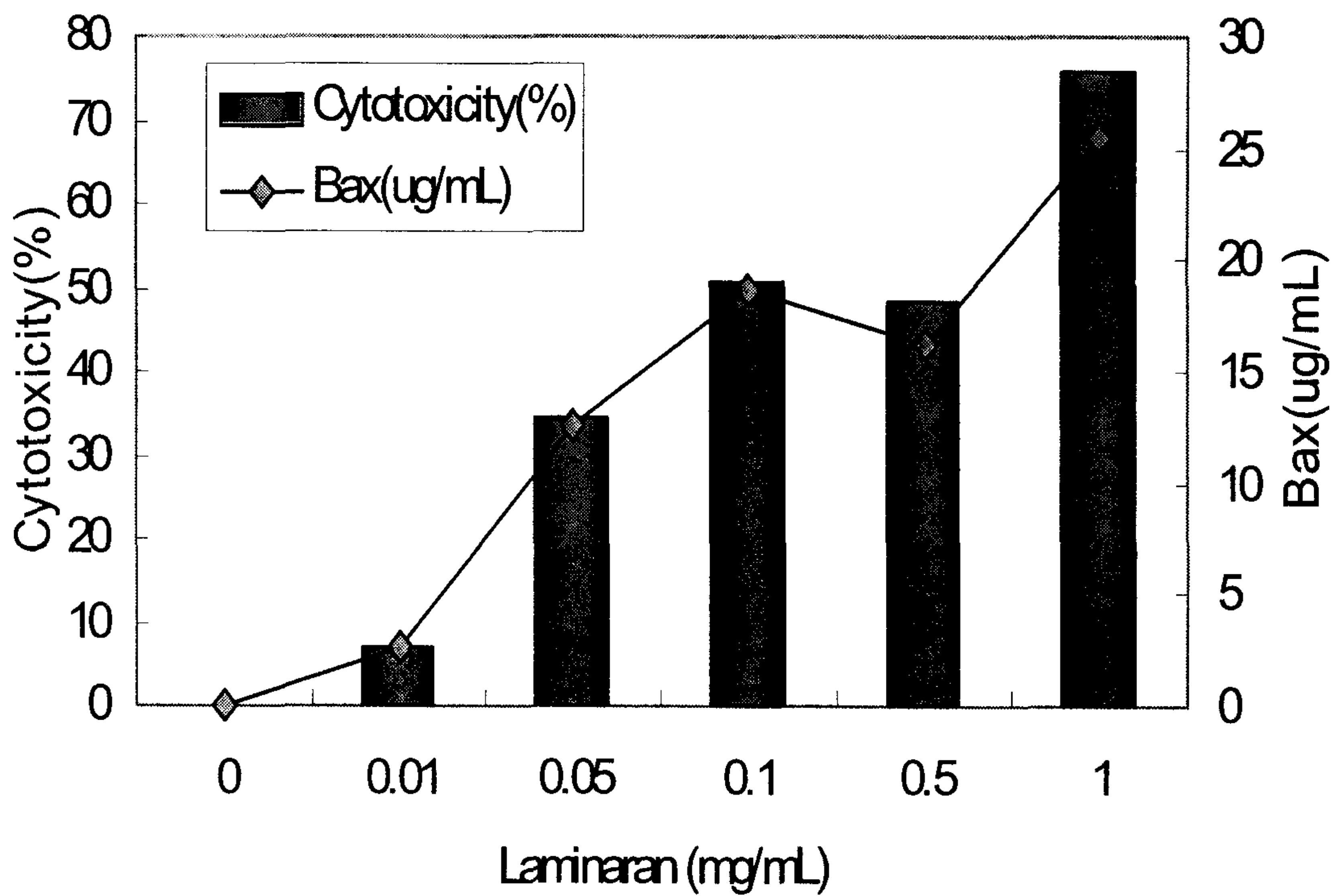


Fig. 66. Laminaran의 첨가 농도에 따른 Cytotoxicity 및 Bax 단백질의 생성량

(라) QR(Quinone reductase) 유도효과

항암작용 기작 중 대표적인 것으로 체내 독성물질이나 발암물질을 무독화시키는 NADPH : quinone reductase(QR)를 들 수 있다. QR은 간세포에서 주로 생성되는 phase II 효소계인 cytochrome P450 효소활성억제, glutathione 생성, transformed cell에서 그 함량이 증가되는 polyamine 생성억제 등을 들 수 있다. QR은 간세포에서 주로 생성되는 phase II 효소계의 한 종류로 quinone을 환원시켜 무독하게 만들고 세포내에 유도되어 여러 돌연변이 물질에 의해 일어나는 돌연변이와 종양화를 막아주고 발암물질을 무독하게 하는 역할을 하는 것으로 알려지고 있다.

QR 유도활성은 간암세포주를 대상으로 하였으며, 대조구로는 정상 간세포를 사용하여 그 효과를 비교하였다. 효소적 가수분해시 cytotoxicity 결과에서와 마찬가지로 수식 laminaran에서 QR 유도활성이 높게 나타났으며, 그 다음으로 고온가압 처리구(laminaran)에서 QR 유도활성이 높게 나타났다(Fig 67).

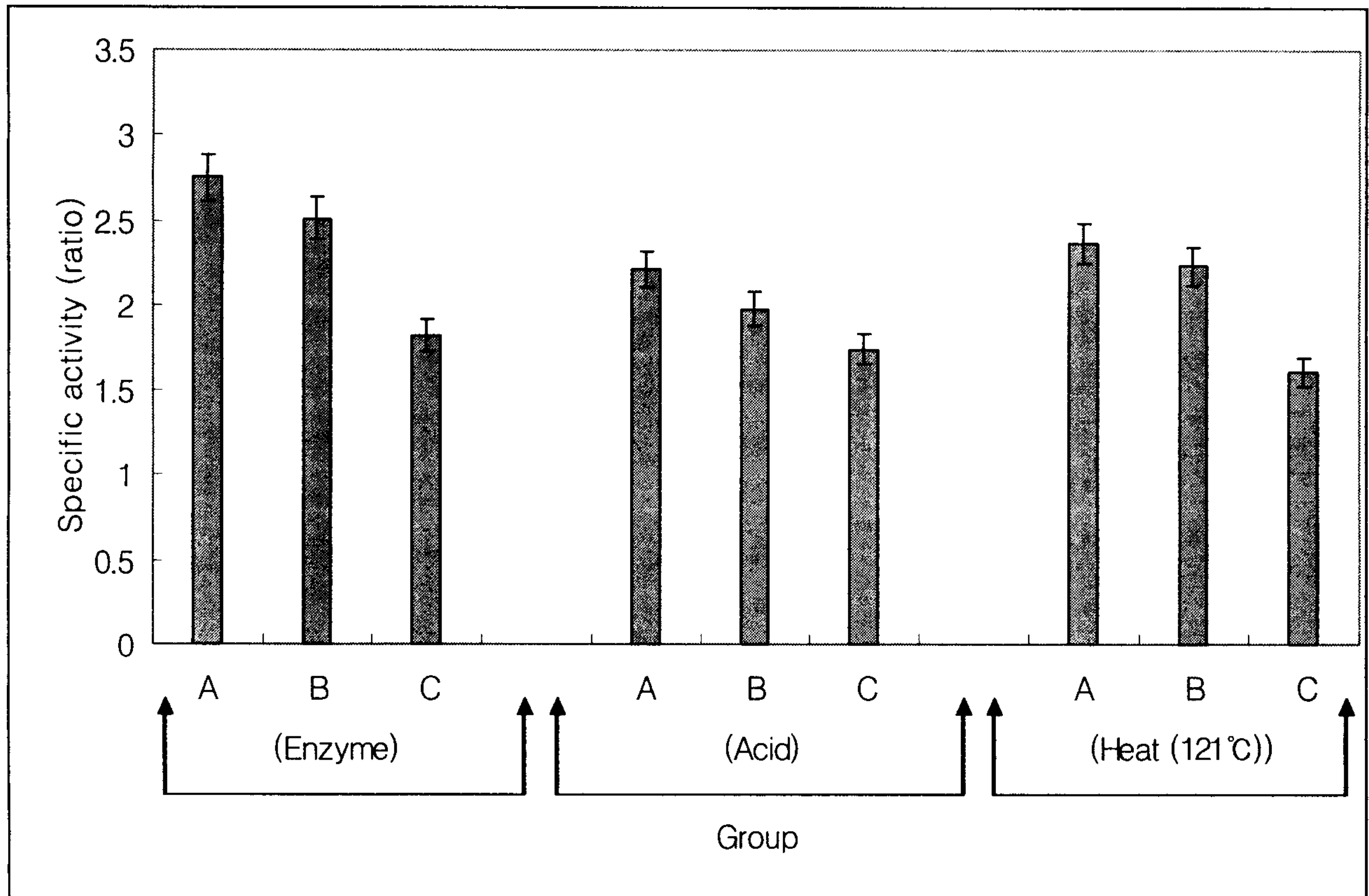


Fig. 67. Quinone reductase induction of hydrolyzed laminaran on HepG2 cells.

(Concentration : 100  $\mu$ L/mL)

A : *E. bicyclis* laminaran (MW: 100 kDa 이상); B: *E. bicyclis* laminaran (MW: 100-50 kDa)

C : *E. bicyclis* laminaran (MW: 50-10 kDa)

## (2) *in vivo* 항암활성

### (가) 전암단계의 *in vivo* 항암활성

#### ① 실험동물의 체중증가량, 사료 섭취량 및 식이효율

DMH 투여로 대장 발암을 유도시킨 흰쥐에 성계생식소 유래 laminaranase로 가수분해한 laminaran(이하 hydrolyzed laminaran)을 농도별로 투여한 후 체중증가량, 사료 섭취량 및 식이효율을 조사한 결과 DMH투여로 발암을 유도한 실험군(Control, LL, LH)이 발암을 유도하지 않은 실험군(TLH)에 비해 체중 증가량, 식이섭취량 및 식이효율 등이 다소 낮게 나타났고, 특히 수식 laminaran을 섭취하는 실험군(LL, LH)이 다른 대조군(Control)에 비하여 더 낮게 나타났으나, 군간의 통계적 유의차는 없었다.

#### ② 대장 이상선와소(ACF) 및 종양 발생 억제율

대장 이상선와소(Abererrant crypt foci of colonic mucosa/colon, ACF) 및 이상선와(Abererrant crypt of colonic mucosa/colon, AC)는 정상선와보다 크기가 크고 내장이

타원형 또는 고양이 눈처럼 가늘고 길게 보이며, 선와 주위부가 정상보다 넓게 나타났다(Fig. 69). 실험종료 후 부검하여 관찰한 실험군의 대장 점막 total AC 및 종양발생 억제율은 Table 39 및 Fig. 70에 나타낸 바와 같으며. 대장을 rectum(RT), distal colon(DC), middle colon(MC) 및 proximal colon(PC)의 4등분으로 나누어 관찰해 보았을 때의 ACF 및 AC는 Table 40에 나타내었다. 대장 이상선와소(ACF)는 1개부터 9개까지의 대장이상선와(AC)가 모여 있으며 대장 부분별로 나누어 보면 상행결장 하단부(DC)와 횡행결장 상단부(MC)에 많이 분포되어 있었다(Fig. 71)(Hollohan et al.(1986), Uchida and Nakayama(1993), Sasaki et al.(1987)).

ACF 및 AC의 수는 각 군에서 유의성 있게 나타났으며( $p < 0.0001$ ), 수식 laminaran의 실험군은 농도의존적으로 ACF 생성 억제효과를 나타내었다. 특히 수식 laminaran 1% 실험군(LH)에서 대조군에 비하여 61.37%의 종양발생 억제율을 보였고, 종양으로서의 병변을 일으킬 확률이 높은 AC 4개 이상의 ACF에서는 70.06% 이상의 종양 발생 억제율을 나타내었다. King 등(1981)은 해조추출물을 이용하여 항종양활성을 측정 한 결과 70% 이상의 높은 활성을 보인다고 하여 본 연구와 유사한 결과를 나타내었다.

Table 39. Organ weighs of DMH-induced male F344 rat fed laminaran

Groups <sup>1)</sup>	Final Body weight(g)	Liver weight		Spleen weight		Kidney weight		Colon length (cm)
		Absolute (g)	Relative (%)	Absolute (g)	Relative (%)	Absolute (g)	Relative (%)	
Control	316.86±21.80	8.08±1.23	2.56±0.42	0.62±0.06	0.20±0.02	1.71±0.25	0.54±0.07	15.7±0.8
LH	311.16±20.73	8.29±2.07	2.64±0.49	0.69±0.08	0.19±0.02	1.76±0.22	0.56±0.04	17.0±0.9
LL	314.63±15.40	8.36±1.48	2.65±0.40	0.64±0.08	0.20±0.02	1.85±0.16	0.59±0.03	17.0±0.8
TLH	312.72±13.18	9.20±1.32	2.70±1.04	0.66±0.05	0.18±0.06	1.79±0.10	0.51±0.17	17.9±0.6

<sup>1)</sup> LH: Hydrolyzed laminaran high dose with DMH, LL: Hydrolyzed laminaran low dose with DMH  
TLH: Hydrolyzed laminaran high dose without DMH



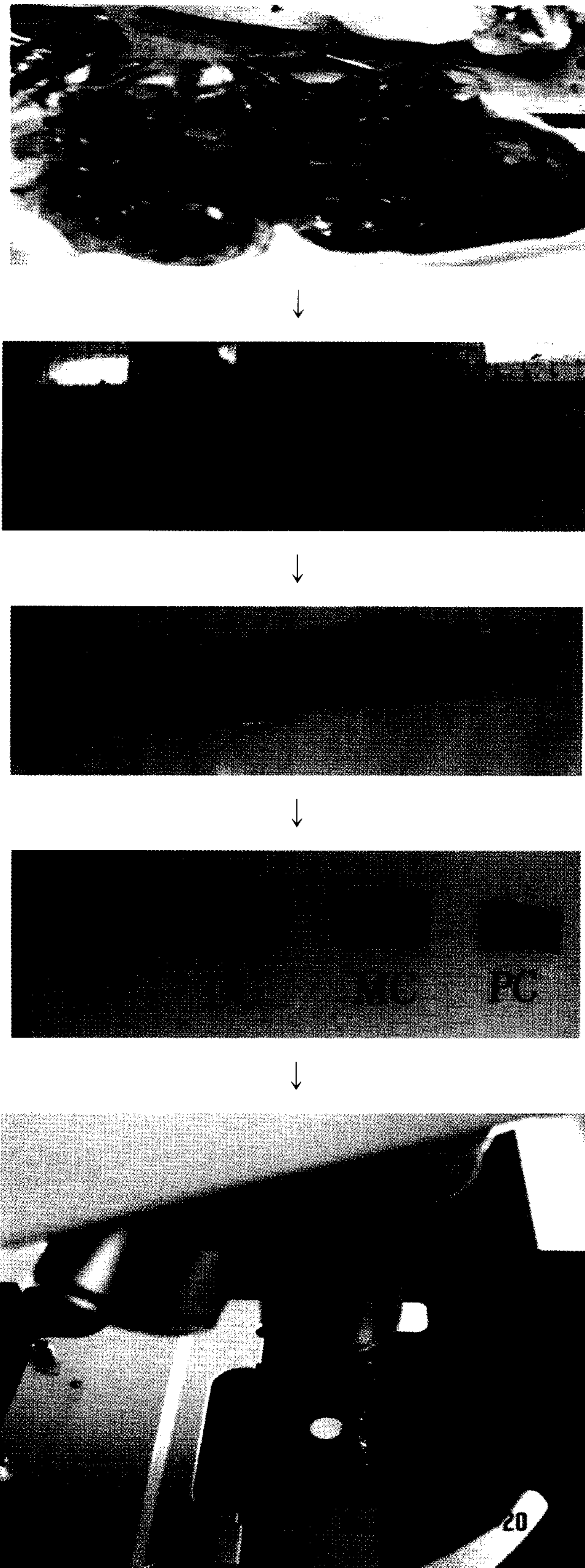


Fig. 68. 장기에서 대장적출 장면과 대장염색 후 AC 및 ACF 관찰 장면

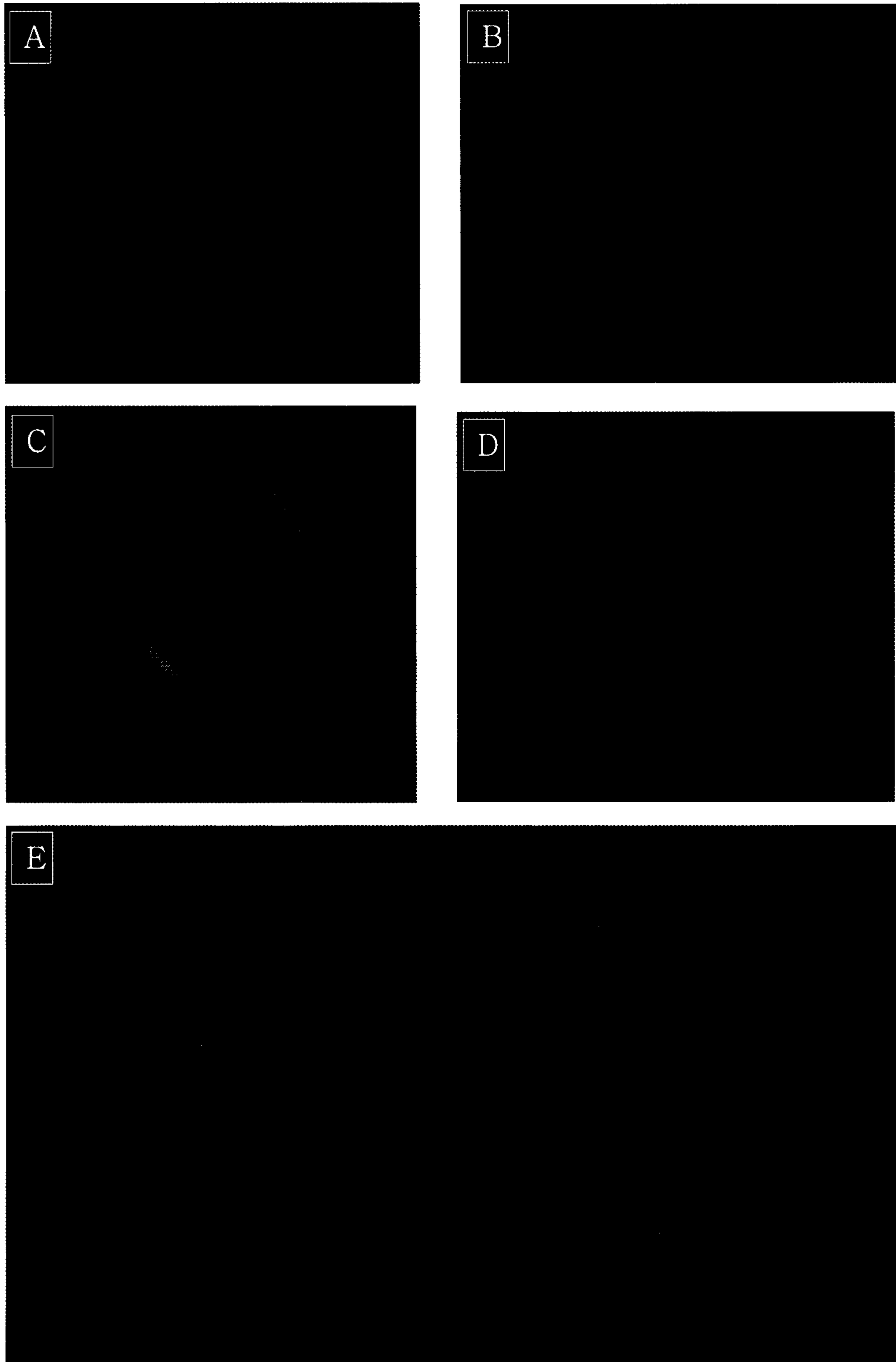


Fig. 69. Microscope로 관찰한 대장 세포중의 ACF 형태  
[A: 정상세포; B: ACF 2개; C: ACF 4개; D: ACF 6개; E: ACF 5 및 3개 ]

Table 40. Effects of laminaran on DMH-induced AC formation in male F344 rats.

Group	Total no. of AC <sup>1)</sup> /rats	Crypt foci				
		1	2	3	4	≥5
Control	863.57±76.97	50.14±18.57	237.43±53.56	265.71±24.61	190.86±41.93	119.43±27.58
LL	453.71±63.40 (47.46%) <sup>2)</sup>	41.14±19.84 (17.95%)	148.29±33.71 (37.54%)	140.57±36.60 (47.10%)	83.43±38.95 (56.29%)	40.29±18.40 (66.26%)
LH	333.57±67.19 (61.37%)	37.00±11.58 (26.21%)	107.43±22.05 (54.75%)	107.57±24.70 (59.52%)	57.14±25.69 (70.06%)	24.43±14.01 (79.54%)

Value are mean ± SD, <sup>1)</sup> AC : aberrant crypt, <sup>2)</sup> Inhibition activity of control (%)

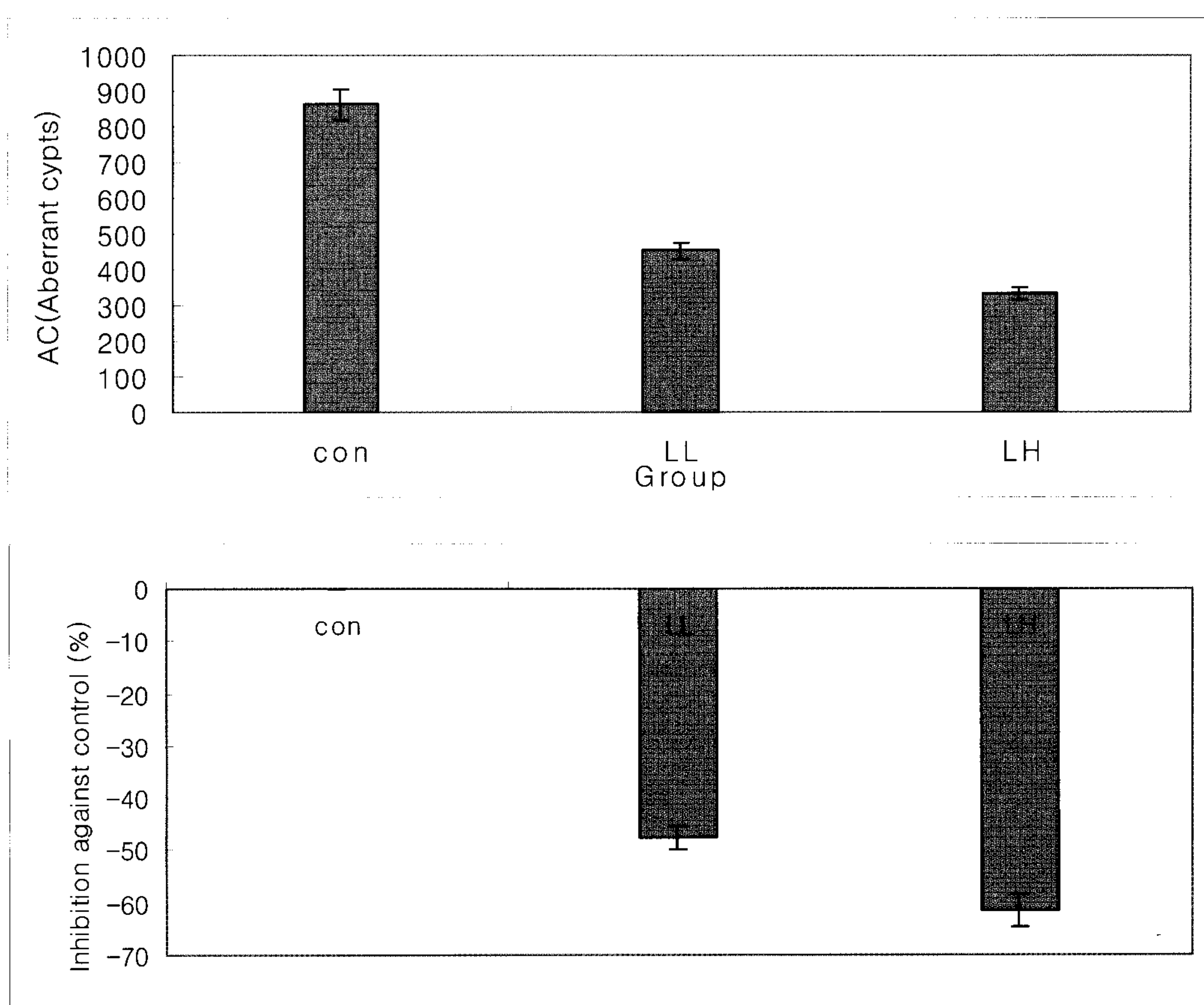


Fig. 70. Effects of dietary laminaran on colonic AC and inhibition rate of tumor in male F344 rats.

[LH: Hydrolyzed laminaran high dose with DMH; LL: Hydrolyzed laminaran low dose with DMH]

Table 41. Effects of dietary laminaran on the development ACF on colon of male F344 rats

Treatment	구분	Number of ACF(Aberrant crypt foci)					Total
		1	2	3	4	≥5	
Control	RT	6.17±3.60	13.71±4.15	9.29±2.75	4.43±2.07	1.50±0.58	33.57±10.34
	DC	18.14±9.72	48.57±12.69	37.71±5.53	20.57±8.48	11.29±3.35	136.29±20.67
	MC	17.71±8.83	44.43±12.90	37.43±7.37	20.00±4.51	8.14±3.44	127.71±20.12
	PC	9.00±7.30	12.00±6.86	4.86±3.44	3.17±2.64	2.75±0.96	30.14±18.39
LL	RT	5.57±4.35	6.00±4.43	5.60±1.67	1.67±1.15	-	16.27±10.27
	DC	13.86±10.37	32.86±12.48	21.14±4.06	8.50±4.64	2.57±2.15	79.57±23.35
	MC	16.71±8.77	30.14±7.27	18.43±5.74	10.29±5.19	4.86±2.41	80.43±11.39
	PC	5.00±1.15	5.14±3.98	3.29±3.59	2.00±0.82	1.00±0.00	14.43±7.09
LH	RT	5.00±4.08	5.57±2.99	5.17±4.07	1.67±1.15	3.00±0.23	16.71±13.29
	DC	13.86±5.05	22.29±6.02	17.71±4.23	9.14±7.24	1.60±0.55	61.29±14.26
	MC	11.00±3.61	19.57±10.45	9.71±4.07	10.29±3.73	2.57±1.81	48.43±17.95
	PC	7.14±5.55	6.29±4.46	3.57±2.30	1.25±0.50	2.00±0.00	18.71±12.75

[LH: hydrolyzed laminaran high dose with DMH; LL: hydrolyzed laminaran low dose with DMH]

(RT, rectum; DC, distal colon; MC, middle colon; PC, proximal colon)

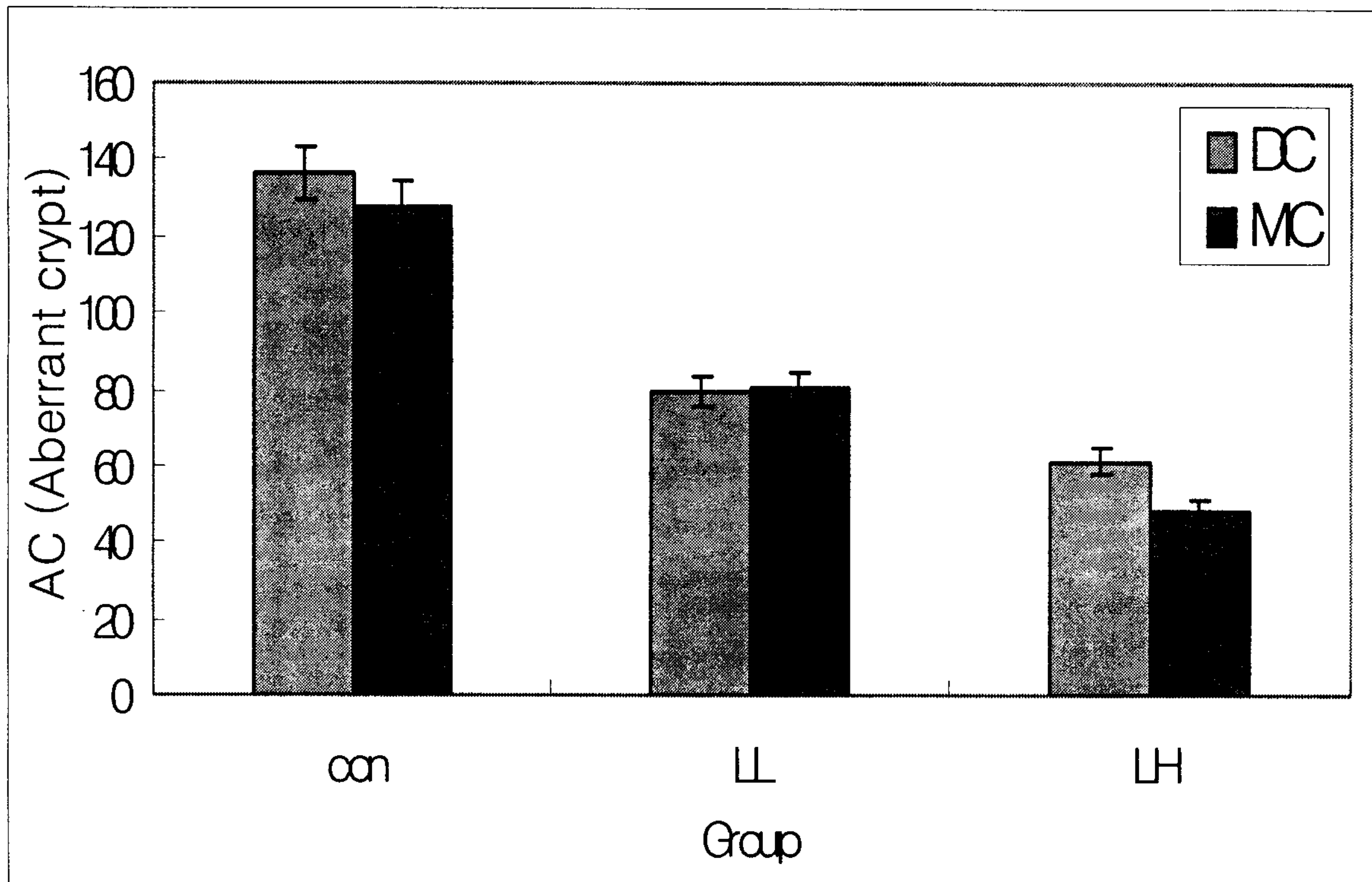


Fig. 71. Number of ACF in DC and MC

[LH: hydrolyzed laminaran high dose with DMH; LL: hydrolyzed laminaran low dose with DMH]

DC : distal colon; MC: middle colon

(나) Laminaran의 *in vivo* 대장암 발암억제 활성

비교적 저농도에서 *in vivo* 대장암세포주에 대하여 유의한 독성을 나타내었으며, DMH 유발 및 이상선와소(ACF) 발현억제 효과 실험을 통해 전암단계의 항암활성이 인정된 laminaran을 F344 rat를 모델로 하여 6주간 12회 DMH를 투여하여 대장암 유발을 시도한 다음 각각 저농도(100 mg/kg/bw) 및 고농도(200 mg/kg/bw) 수준이 되도록 사료에 첨가시켜 32주간 사육한 다음 해부하여 대장암 발현에 미치는 laminaran의 섭취효과를 검토하였다 (Hwang et al.(1993)).

Table 41에 제시한 바와 같이 전암단계 에서의 항암활성 보다는 낮은 40-50% 수준의 농도 의존적 항암활성이 인정되었다. 또한 기능성 물질의 암 종양에 대한 진행억제 등의 효과를 검토하기 위해 암 유도물질의 투여시점과 기능성 물질의 섭취 개시시기를 차별화 하여 조사한 결과 암종양 발생수에 있어서 섭취시점의 차이는 거의 인정되지 않았다(Fig 72, Table 42)(Fischer et al.(1992)).

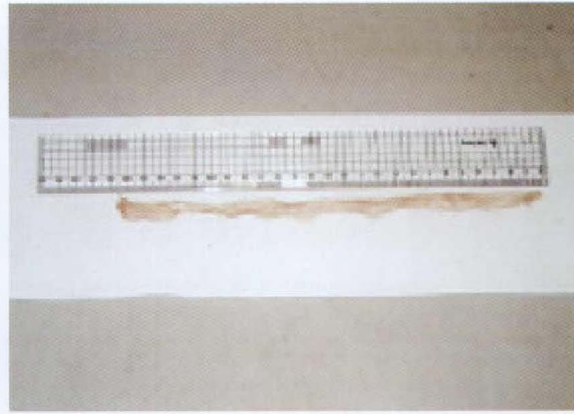


Fig 72. DMH에 의한 대장암 발생군(좌)과 정상군의 대장(우)의 모습

Table 42. Development of colon cancer in F344 rat induced by DMH fed the laminaran containing diet for 32 weeks

Groups	No. of rat	Rats with tumors	Tumor frequency, %	Total No. of tumors	Avg tumors per rat
LL	8	4	50.0	11	1.37
LH	9	3	33.3	7	0.77
ALL	9	5	55.6	14	1.55
ALH	9	5	55.6	12	1.33
Control	8	6	75.0	18	2.25
Normal	0	0	0	0	0

Control : Normal basic diet with DMH, Normal : Normal basic diet

LL : Laminaran low dose(100 mg/kg/bw) with DMH, LH : Laminaran high dose(200 mg/kg/bw) with DMH

ALL : Laminaran low dose(100 mg/kg/bw) with DMH after 6 weeks

ALH : Laminaran high dose(200 mg/kg/bw) with DMH after 6 weeks

(다) Laminaran의 *in vivo* 간암 발암억제 활성

① 간암 발암물질의 투여

간암을 인위적으로 유발시키기 위해 diethylnitrosomin(DEN; N0756, Sigma, USA)을 처리하였다. DEN을 DMSO에 용해하여 mini-osmotic pump(Alzet, ML2002; 14day, 0.5  $\mu$ L/hour, reservoir volume 200  $\mu$ L; ALZA Scientific Product, Palo Alto, CA)에 168  $\mu$ g/pump 용량으로 충전한 후 실험동물(F334 male rat)의 복강에 외과적으로 삽입하였다. Osmotic pump는 2주간 삼투압에 의해 지속적으로 충전된 발암물질을 일정속도로 체내 방출시켜 이전의 발암모델에서처럼 다른 promoter나 initiator를 필요로 하지 않고 효과적으로 간 발암을 일으키는 것으로 알려지고 있다.(Fig 73, 49)(Yang et al.(1997)).

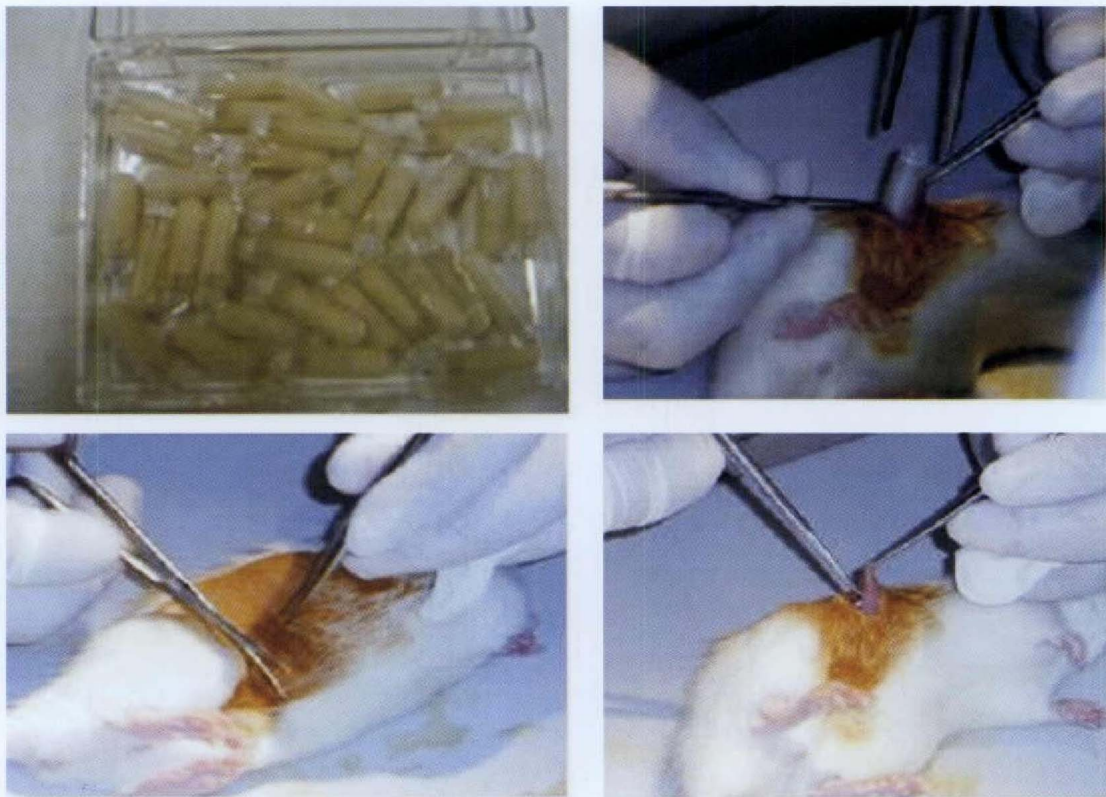


Fig. 73. DEN 함유 Osmotic pump를 F334 Rat 복강삽입 모습

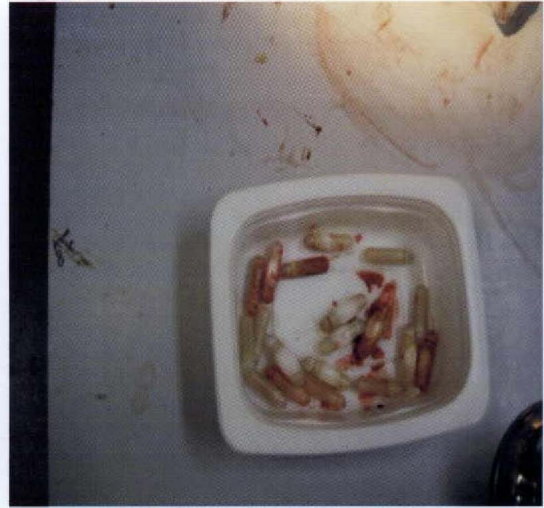
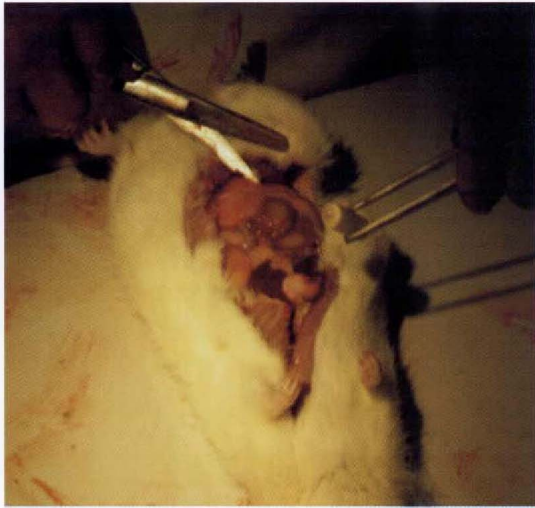


Fig. 74. 삽입된 DEN mini-osmotic pump 제거 장면 및 제거된 mini-osmotic pump

## ② 간암 발암억제 활성

기능성물질의 대장암 중기발암성에 미치는 효과시험과 유사한 방법으로 해조유래 기능성 물질인 laminaran의 식이섭취가 인위적으로 발암 유도된 쥐의 간암발생에 미치는 영향을 알아보았다. 기능성물질의 식이섭취 농도를 각각 100 mg/kg/bw(LL) 및 200 mg/kg/bw(LH) 수준으로 하여 28주간 실험식으로 사육하면서 diethyl nitrosoamine으로 유도된 F344 rat의 간암발생에 미치는 중기발암성 test를 행한 결과 대체적으로 *in vitro* 실험에서 얻은 암세포독성 실험결과 보다는 낮은 30-45% 수준의 농도 의존적 간암종양 발생억제 효과를 확인하였다 (Fig. 75, 76, Table 43)(LaVecchia et al.(1995), Ziegler et al.(1991)).

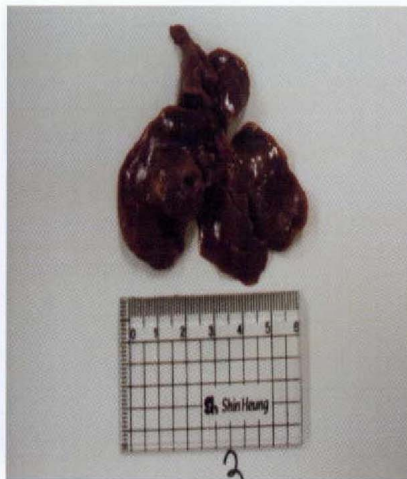


Fig 75 . 간 종양 발생군(좌)과 정상군(중)의 간 및 간 종양의 크기 측정 장면



Table 43. Development of liver cancer in F344 rat induced by diethyl nitrosoamine fed the laminaran containing diet for 28 weeks

Experimental group	총 종양수	종양크기			
		2-5 mm	6-9 mm	10-20 mm	20 mm 이상
LL	6.9±1.7	2.4±1.5	2.1±0.7	1.8±1.0	0.6±0.4
LH	4.7±1.4	1.4±0.7	1.6±0.8	1.4±0.6	0.3±0.2
Control	11.5±2.7	4.7±1.3	2.7±1.2	2.8±0.8	1.3±0.7
Normal	0	0	0	0	0

\* DEN administration : Implantation of OST pump containing DEN subject to release for 14 days(0.2 ug/day)

Control : Normal basic diet + DEN administration

Normal : Normal basic diet

LL : Laminaran low dose(100 mg/kg/bw) with DEN administration

LH : Laminaran high dose(200 mg/kg/bw) with DEN administration

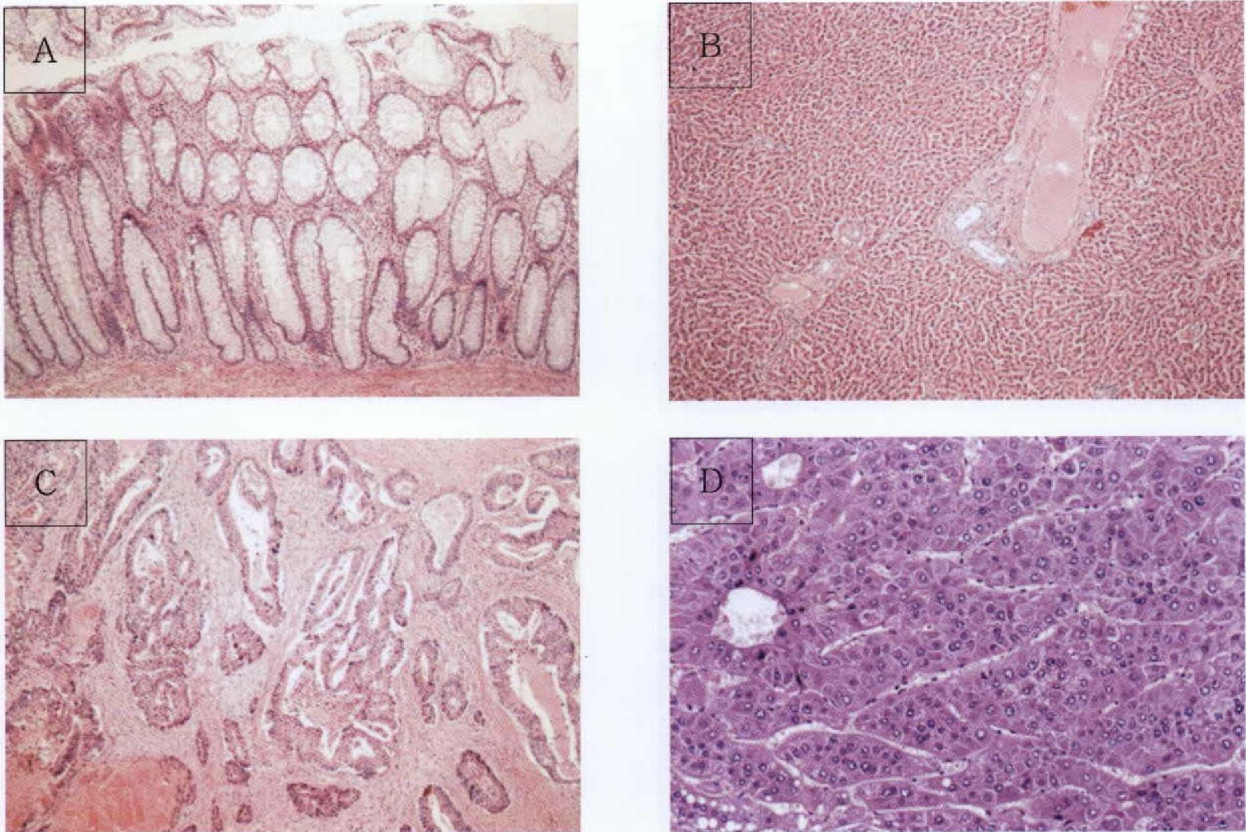


Fig. 76 Microphotograph of large intestine cancer and hepatocarcinogen on SD rat

A: normal colon mucosa; B: adenocarcinoma colon; C: normal liver; D: HCC (hepatocellular carcinoma)

이처럼 해조유래 기능성 다당의 중기 발암억제 효과가 비교적 낮게 나타난 것은 발암유도 물질의 투여기간 및 농도, 실험식이와 발암유도물질 투여의 장기간 중복특성 등 다양한 원인분석이 필요하기 때문에 단회 동물실험 결과만으로 발암 억제활성을 단정 짓기에는 무리가 따를 것으로 사료되었으며, 따라서 본 연구결과는 적절한 반복 보완실험을 거쳐 발암억제 활성구명이 필요할 것으로 검토되었다.

#### 나. 콜레스테롤 대사 개선

##### (1) *in vitro* 콜레스테롤 대사 개선

##### (가) ACE 저해활성

대황에서 추출한 laminaran을 효소분해, 산가수분해 및 가열분해 시킨 후 분자량 수준별 분획물의 ACE 저해활성을 측정된 결과 대체적으로 효소분해나 가열분해물의 ACE 저해활성이 산가수분해물보다 상대적으로 우수하였으나 저해활성 자체는 비교적 낮은 경향을 나타내었다(Table 44).

Table 44. ACE inhibitory activity of enzyme and acid hydrolyzed and heat treated laminaran from *Eisenia bicyclis*

	MW <sup>2)</sup>	<i>Eisenia bicyclis</i>
		ACE inhibitory activity (%) <sup>1)</sup>
E-F <sup>3)</sup>	f-1 <sup>5)</sup>	23.7
	f-2	14.1
	f-3	28.5
	f-4	6.6
E-E <sup>4)</sup>	f-1	27.9
	f-2	23.1
	f-3	17.5
	f-4	8.7
Acid	f-1	2.3
	f-2	21.5
	f-3	15.0
	f-4	28.4
Heat	f-1	24.3
	f-2	43.3
	f-3	28.2
	f-4	26.8

<sup>1)</sup> ACE inhibitory activity and fibrin melting activity of polysaccharides was estimated at concentration of 100 µL/mL

<sup>2)</sup> MW: Molecular weight, <sup>3)</sup> E-F: Enzyme (Flavozyme), <sup>4)</sup> E-E: Enzyme (Econase CE)

<sup>5)</sup> f-1 (MW: 100 kDa ↑); f-2 (MW: 100-50 kDa); f-3 (MW: 50-10 kDa); f-4 (MW: 10 kDa ↓)

(나) HMG-CoA reductase 저해활성

상업적 효소나 산가수분해 및 가열처리에 의해 분자구조가 변형된 laminaran의 HMG-CoA reductase 저해활성은 대체적으로 높지 않았으며 고분자 획분이 저분자 획분보다 상대적으로 높은 저해활성을 나타내었다(Table 45). Econase CE 효소로 처리한 대황 laminaran 100-50 kDa의 획분이 23.2%로 가장 높게 나타났으며, 100 kDa 이상의 획분이 21.3%, flavozyme으로 처리한 100 kDa 이상 획분과 산가수분해한 100 kDa 이상 획분이 20.3%로 동일한 순으로 나타나 50 kDa 이상의 고분자획분이 저분자획분에 비해 높은 HMG-CoA reductase 저해활성을 나타내었다. 이는 해조분해물의 경우 고분자 획분에서 높은 HMG-CoA reductase 저해활성을 보였다고 보고한 Song 등(2003)의 연구결과와 일치하였다.

Table 45. The inhibitory effect of modified laminaran on the microsomal HMG-CoA reductase activity

	MW	<i>Eisenia bicyclis</i>
		Inhibition rate(%) <sup>1)</sup>
E-F <sup>2)</sup>	f-1 <sup>4)</sup>	20.3
	f-2	19.5
	f-3	12.3
	f-4	0.2
E-E <sup>3)</sup>	f-1	21.3
	f-2	23.2
	f-3	10.2
	f-4	0.0
Acid hydrolyzed	f-1	20.3
	f-2	19.2
	f-3	15.8
	f-4	0.3
Heat treated	f-1	18.5
	f-2	15.3
	f-3	12.1
	f-4	0.0

<sup>1)</sup> HMG-CoA reductase activity of polysaccharides was estimated at concentration of 100 µL/mL

<sup>2)</sup> E-F: Enzyme (Flavozyme), <sup>3)</sup> E-E: Enzyme (Econase CE)

<sup>4)</sup> f-1 (MW: 100 kDa ↑); f-2 (MW: 100-50 kDa); f-3 (MW: 50-10 kDa); f-4 (MW: 10 kDa ↓)

해조 유래 미생물이나 전복내장 또는 성게알 유래 laminaranase로 처리한 대황 laminaran의 분자량획분별 *in vitro* HMG-CoA reductase 저해활성을 Table 46에 나타내었다. 전복내장 및 성게알 유래 laminaranase로 처리한 대황 laminaran은 50 kDa 이상의 획분에서 HMG-CoA reductase 저해활성이 각각 82.8 및 71.2%로 높게 나타났고, 대황 및 다시마 유래 laminaranase로 처리한 laminaran의 경우 50 kDa 이상의 획분에서 각각 69.5 및 61.2% 수준의 저해활성을 보였다. 이 결과로 대황 laminaran은 50 kDa 이상의 획분에서 높은 HMG-CoA reductase 저해활성을 갖으며, 상업적인 효소처리 보다는 해양동물 및 해조유래 효소로 처리한 laminaran의 효능이 더 뛰어난 것으로 나타났으며, HMG-CoA reductase 저해활성에 대한 IC<sub>50</sub> 값은 167.33 µg/mL로 나타났다(Table 47).

Table 46. HMG-CoA reductase inhibition activity of laminaran hydrolyzed by laminaranase derived from various material source

Enzyme source <sup>1)</sup>	Molecular weight(kDa)	HMG-CoA reductase inhibition activity(%) <sup>2)</sup>
A	50 ↑	61.2
	10-50	38.2
	10 ↓	20.2
B	50 ↑	69.5
	10-50	38.2
	10 ↓	19.5
C	50 ↑	71.2
	10-50	41.9
	10 ↓	22.8
D	50 ↑	82.8
	10-50	56.4
	10 ↓	28.8

<sup>1)</sup> Enzyme source: laminaranase derived from *Laminaria japonica*(A), *Eisenia bicyclis*(B), unfertilized sea urchin(C) and abalone viscera(D)

<sup>2)</sup> Concentration: 100 µg/mL

Table 47. IC<sub>50</sub> of laminaran on HMG-CoA reductase activity (unit : μg/mL)

Material	IC <sub>50</sub>
Laminaran	167.33

(다) 담즙산(Bile acid) 흡착능

식이콜레스테롤의 체외배출 및 이로 인한 혈중 콜레스테롤 저하와 관련된 지표로서 해조유래 기능성물질의 담즙산 흡착능의 의미가 인정되고 있다. 미성숙 성게알에서 분리한 crude laminaranase로 가수분해하여 실험적으로 제조한 laminaran의 담즙산 흡착능은 50 kDa 이상의 분자량 수준에서 높은 활성을 나타내었다(Table 48).

또한, 효소원에 따른 가수분해 laminaran의 담즙산 흡착능은 성게효소 > 전복내장효소 > 대황유래 미생물 > 다시마유래 미생물 순으로 높았으며 이때의 분자량 수준은 50 kDa 이상이였다(Table 49).

Table 48. Bile acids binding capacity of laminaran hydrolyzed by laminaranase derived from unfertilized sea urchin

Seaweed polysaccharides	Molecular weight(kDa)	Bile acids binding capacity (μmol/100 mg)			
		Cholic acid	Deoxycholic acid	Taurocholic acid	Glycocholic acid
	50 ↑	66.5	73.5	71.2	69.7
Laminaran	10-50	63.7	59.8	63.7	51.8
	10 ↓	61.8	51.4	59.8	43.5

Table 49. Bile acids binding capacity on laminaran hydrolyzed by laminaranase derived from various material source

Enzyme source	Molecular weight(kDa)	Bile acids binding capacity ( $\mu\text{mol}/100 \text{ mg}$ )			
		Cholic acid	Deoxycholic acid	Taurocholic acid	Glycocholic acid
A ( <i>L. japonica</i> )	50 $\uparrow$	55.3	50.6	48.6	52.6
	10-50	50.2	63.6	59.7	65.7
	10 $\downarrow$	30.9	29.6	28.6	32.7
B ( <i>E. bicyclis</i> )	50 $\uparrow$	51.2	53.6	53.2	50.6
	10-50	58.6	50.2	49.8	54.7
	10 $\downarrow$	30.2	22.8	26.9	22.7
C (Sea urchin)	50 $\uparrow$	66.5	73.5	71.2	69.7
	10-50	63.7	59.8	63.7	51.8
	10 $\downarrow$	61.8	51.4	59.8	43.5
D (Abalone viscera)	50 $\uparrow$	63.5	59.8	63.5	63.8
	10-50	63.7	56.8	60.8	61.4
	10 $\downarrow$	51.8	53.5	43.8	54.6

A, B, C, D : Laminaranase derived from *Laminaria japonica*(A), *Eisenia bicyclis*(B), sea urchin(C), abalone viscera (D)

(2) *in vivo* 콜레스테롤 대사 개선

(가) Laminaran의 HMG-CoA reductase 저해활성

고지혈증이 유도된 hamster에게 laminaran의 농도를 달리하여 6주간 사료와 함께 공급하면서 실험식이에 따른 HMG-CoA reductase 저해활성을 조사하였다. LH(laminaran high dose) 실험식이군이 대조실험군에 비해 44.68%의 HMG-CoA reductase 저해활성을 나타내었으며 전반적으로 농도 의존적으로 HMG-CoA reductase 저해활성이 나타난 반면 positive control 식이군은 HMG-CoA reductase 저해활성이 거의 나타나지 않았다(Table 50와 Fig. 77, 53).

Table 50. Laminaran을 급여한 hamster의 HMG-CoA reductase 저해활성

Experimental Diet	Diet group	Specific activity
Basic diet(BS)	A(Negative control)	5.07±0.51
	B(Positive control)	5.64±0.34
High fat diet(HF)	C(HF + Laminaran High)	3.12±0.21
	D(HF + Laminaran Medium)	3.83±0.30
	E(HF + Laminaran Low)	4.73±0.42
Basic diet(BS)	F(BS + Laminaran High)	3.01±0.31
	G(BS + Laminaran Low)	4.33±0.58



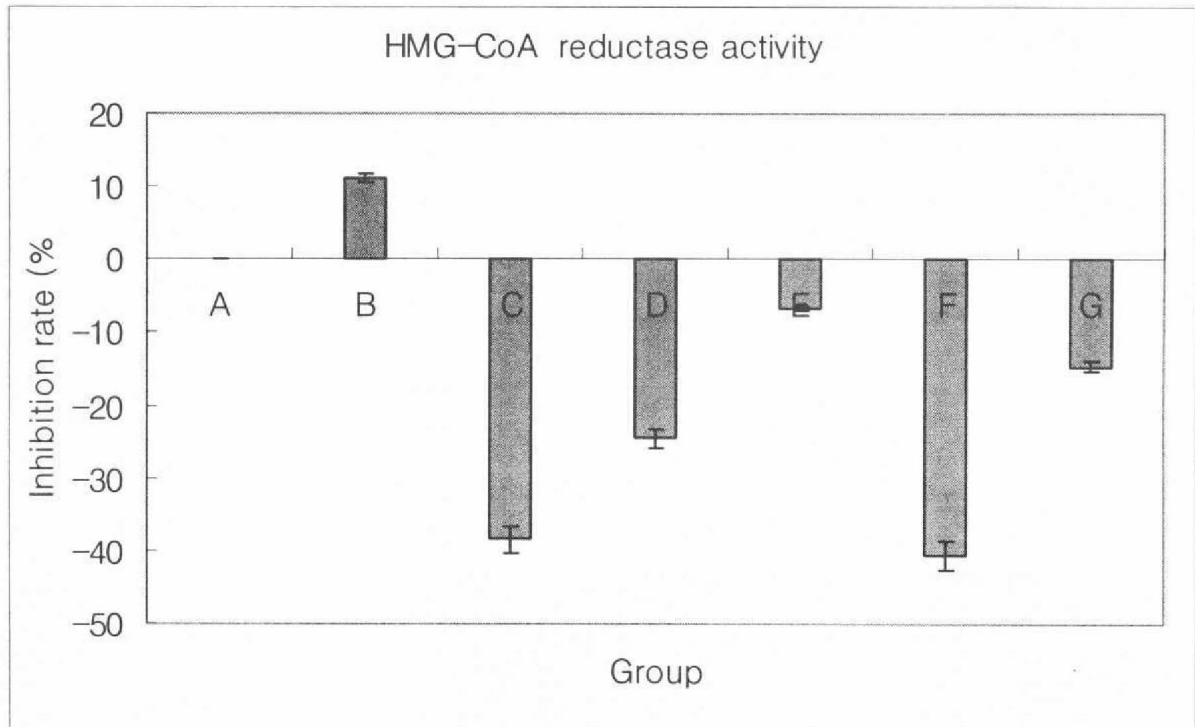


Fig. 77. HMG-CoA reductase inhibition activity of hamster liver fed laminaran containing diet for 6 weeks

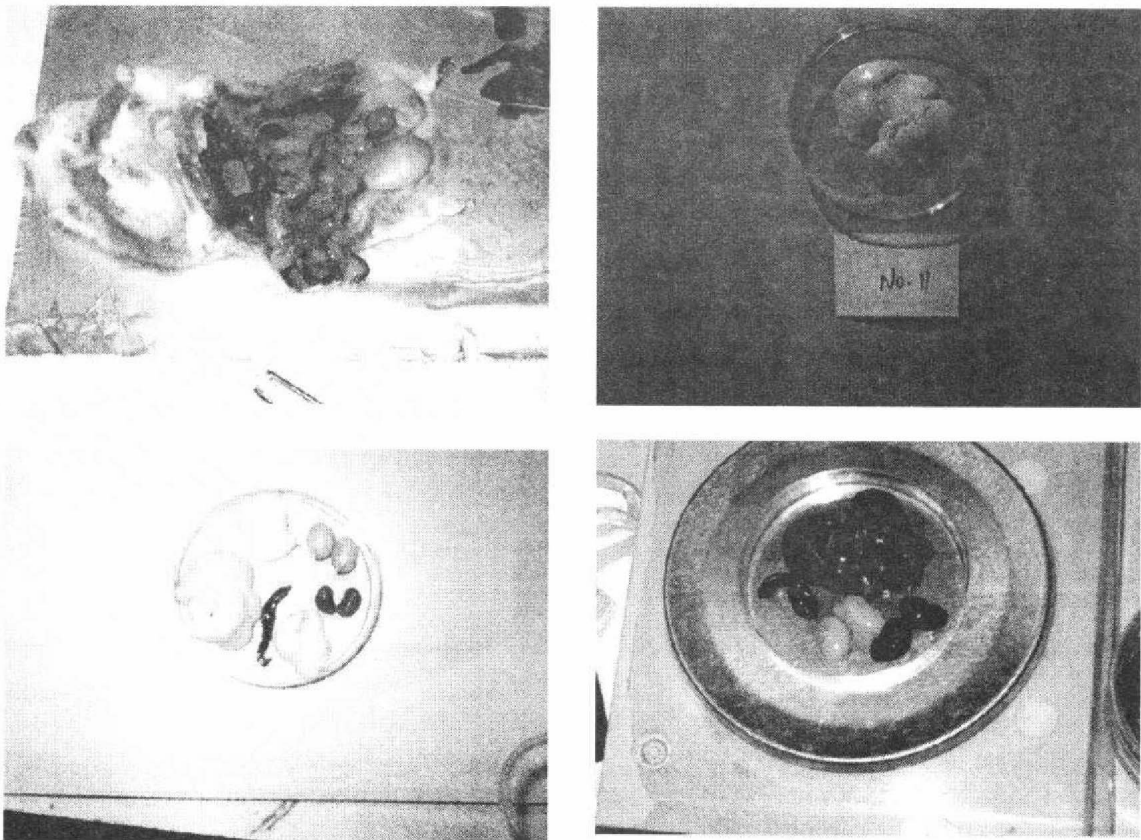


Fig. 78. 고지혈증이 유발된 햄스터의 장기 모습 및 정상군 hamster의 장기모습

Laminaran의 농도를 달리하여 6주간 사료와 함께 공급한 hamster의 혈청지질 성분을 Table 51에 나타내었다.

정상군에 비해 고지방식이 및 일반식사와 laminaran을 함께 급여한 hamster의 총콜레스테롤 및 HDL-cholesterol과 LDL-cholesterol 모두 증가하였다. Positive control의 HDL-cholesterol 및 LDL-cholesterol은 184.77±28.15 및 259.84±24.82 mg/dL로 나타나 고지방식사와 laminaran을 함께 급여한 실험군보다 HDL-cholesterol의 수치는 유의적인 차이를 보이지 않은 반면, LDL-cholesterol의 수치는 E(HF + Laminaran Low)군에 비해 유의적인 차이를 보였다. 일반식사와 laminaran을 함께 급여한 hamster의 LDL-cholesterol 수치는 대조군에 비해 현저히 낮은 값을 나타내어 laminaran의 급여는 hamster의 HDL-cholesterol 값을 높이고, LDL-cholesterol의 값을 낮추는 것을 알 수 있었다. 특히 E군은 대조군에 비해 HDL-cholesterol을 12.0% 높이고, LDL-cholesterol은 2.2% 정도 낮추는 것을 알 수 있었다(Table 51)

Table 50. Laminaran을 급여한 hamster의 혈청지질성분

Group	Serum cholesterols (mg/dL)				AI
	TC	TG	HDL	LDL	
A	141.54±3.51	65.57±2.14	101.05±4.25	32.56±0.76	0.4
B	759.29±34.43	719.23±30.05	184.77±28.15	259.84±24.82	3.1
C	641.04±29.63	450.86±21.19	160.81± 7.73	230.85±7.44	3.0
D	721.53±13.07	633.25±36.56	165.50±9.34	247.34±4.00	3.4
E	500.74±13.22	246.72±11.55	181.79±8.47	182.30±9.08	1.8
F	311.50±2.93	331.05±2.61	156.53±1.32	64.53±1.31	1.0
G	283.54±2.67	252.35±2.53	152.82±2.27	54.37±1.79	0.8

A: Negative control, B: Positive control, C: HF+Laminaran High Dose, D: HF+Laminaran Medium Dose, E: HF+Laminaran Low Dose, F: BS+Laminaran High Dose, G: BS+Laminaran Low Dose

갈조류 유래 Laminaran의 항고지혈증 활성에 대한 정밀검토의 일환으로 간에서의 콜레스테롤 생합성에 관여하는 HMG-CoA reductase 저해활성을 100 µg/mL 농도 수준에서 조사한 결과 laminaran 분자량 10-50 kDa에서 HMG-CoA reductase 활성의 50%이상(100 µg/mL)을 저해하였다(Table 51).

Table 51. Effects of HMG-CoA reductase inhibition activity on laminaran hydrolyzed by laminaranase derived from unfertilized sea urchin

Material	Molecular weight	HMG-CoA reductase inhibition activity(%) <sup>1)</sup>
	50 kDa ↑	71.2
Laminaran	10-50 kDa	51.9
	10 kDa ↓	22.8

<sup>1)</sup>Concentration: 100 µg/mL

(나) Laminaran의 *in vivo* 항고지혈증 활성

7주령의 SD계 rat(200±20 g)를 고지방식이를 2주일간 급여하여 고지혈증을 유발하여 실험에 사용하였다. 정상군(Normal)은 고형사료와 물을 임의로 섭취케 하고, 대조군(control) 및 실험군은 고지방식이(1% cholesterol, 2% corn oil, 10% lard)에 의한 고지혈증(hyperlipidemia)을 유발시킨 후 LH(Laminaran high dose, 800 mg/kg), LL(Laminaran low dose, 400 mg/kg), corn oil(corn oil, 3 mL/kg) 및 lova(lovastatin, 50 mg/kg)군의 실험군은 각각의 시료를 매일 오전 같은 시간에 2주일간 경구투여 하였다. 그 결과 총 콜레스테롤은 대조군(Control) 및 corn oil 경구투여군은 정상군(Normal)에 비해 유의성 있게 증가하였으며, 그 외 실험군들은 정상군과 유의적인 차이가 없었다.

또한 HDL-cholesterol은 주로 간장에서 형성되고 단백질(apoprotein)분획을 50% 이상 함유하고 다른 지단백질과는 달리 심혈관계 질환의 유발 위험성을 감소(예방)하는 유익한 lipoprotein이다. 규칙적인 운동으로 증가하고 식이 섭취에 의해 크게 변동되지 않은 것이 특징이며 비만, 흡연, 당뇨병, 담석증에서 감소되고 사람의 정상 범위는 남자 29-67 mg/dL이고 여자가 35-86 mg/dL이다(Guyton(1994), Corine and Emma(1984), Beeson et al.(1979)).

Laminaran 및 항콜레스테롤 약제인 lovastatin 투여군은 대조군(35.33±4.21 mg/dL)에 비해 LH 43.77±5.79 mg/dL, LL 40.24±5.33 mg/dL 및 lobastatin 40.26±6.33 mg/dL 로 HDL-cholesterol을 증가시키는 것으로 나타났다(Shimizu(1994)).

이와 같은 수치는 정상흰쥐의 HDL-cholesterol을 40.3 mg/dL로 보고한 Rhee와 Park의 연구와도 일치하였다(Rhee and Park(1997)). HDL-cholesterol은 항동맥경화의 지표로써 콜레스테롤을 말초혈관에서 간으로 수송하여 동맥경화를 진행시키지 않는 방향으로 콜레스테롤을 운반하여 심장의 관상동맥에 대한 방어작용을 지니고 있다고 볼 수 있다(Park et al.(1977), Gordon et al.(1977), Rhoades et al.(1976), Miller et al.(1962)). 따라서 laminaran의 관상성 심장질환에 대한 예방효과도 기대된다.

또한 laminaran은 HDL-cholesterol은 증가시키며 LDL-cholesterol의 함량을 유의적으로 감소시키는 것을 알 수 있었다. Laminaran 식이군인 LH 및 LL군은 대조군보다 HDL-cholesterol을 각각 16.9 및 13.0% 정도 더 높게 증가시켰으며, LDL-cholesterol은 각각 8.8 및 6.2% 정도 더 낮추었다. 이는 laminaran이 항콜레스테롤 약제인 lovastatin이 대조군보다 HDL-cholesterol을 10.9% 높이며, LDL-cholesterol은 13.2% 낮추는 효과와 버금가는 항콜레스테롤 효과가 있는 것으로 판단된다(Table 52).

Table 52. Effect of laminaran and lovastatin on changes in serum cholesterols, triglycerides and atherogenic index(AI) in rats fed high fat diet

Group <sup>1)</sup>	Total-Chol. (mg/dL)	HDL-Chol. (mg/dL)	LDL-Chol. (mg/dL)	TG (mg/dL)	AI
Normal	69.53±8.52 <sup>a</sup>	35.38±5.67 <sup>a</sup>	19.52±4.32 <sup>a</sup>	71.21±8.63 <sup>a</sup>	0.96±0.11 <sup>ab</sup>
Control	80.67±10.38 <sup>b</sup>	35.33±4.21 <sup>a</sup>	27.33±6.99 <sup>b</sup>	83.22±10.37 <sup>b</sup>	1.28±0.15
LH	72.05±5.66 <sup>a</sup>	43.77±5.79 <sup>b</sup>	18.08±5.67 <sup>a</sup>	76.36±7.51 <sup>ab</sup>	0.64±0.07 <sup>a</sup>
LL	70.74±7.58 <sup>a</sup>	40.24±5.33 <sup>b</sup>	19.63±7.57 <sup>a</sup>	73.45±10.55 <sup>a</sup>	0.75±0.10 <sup>a</sup>
Corn oil	82.74±5.44 <sup>b</sup>	36.73±5.60 <sup>a</sup>	29.24±7.14 <sup>b</sup>	84.75±7.21 <sup>b</sup>	1.25±0.19 <sup>b</sup>
Lova <sup>2)</sup>	73.55±7.26 <sup>a</sup>	40.26±6.33 <sup>b</sup>	15.24±3.44 <sup>a</sup>	75.23±4.36 <sup>ab</sup>	0.82±0.13 <sup>ab</sup>

<sup>1)</sup> Normal : Negative control; Control : Positive control; LH : Laminaran high dose, 800 mg/kg; LL : Laminaran low dose, 400 mg/kg; corn oil : corn oil, 3 mL/kg; <sup>2)</sup>Lova : Lovastatin, 50 mg/kg

## 다. 혈류개선 효과

### (1) *in vitro* 혈류 개선 효과

#### (가) 항혈액응고 활성

대황에서 추출한 laminaran의 항혈액응고 활성은 Flavozyme으로 처리한 50 kDa 이상의 분획물에서 APTT 및 PT는 각각 190 및 15초 이상으로 대조구(plasma)의 34.9 및 12.7초에 비해 혈액응고 시간이 지연되었으며, heparin과 유사하거나 더 높은 활성을 나타내었다. Econase CE로 처리한 laminaran은 모든 획분에서 대조구(plasma)에 비해 높은 활성으로 보였으며, 10 kDa 이상의 획분에서는 heparin보다 높은 활성을 나타내었다. 대황에서 추출한 laminaran은 Econase CE의 처리가 Flavozyme 처리보다 더 나은 활성을 갖는 것으로 나타났다(Table 53)(Casu et al.(1981), Charmichael et al.(1987)).

또한, 대황에서 추출한 laminaran을 산 및 고온가압 처리하여 항혈액응고 활성을 측정한 결과(Table 54), 산 처리한 laminaran 10 kDa 이상의 획분에서 APTT 및 PT가 각각 190 및 37초 이상으로 나타나 대조구(control) 보다 더 높은 활성을 나타내었다. 고온가압 처리한 laminaran의 경우는 10 kDa 이상의 획분에서 APTT 및 PT는 각각 190 및 50초 이상으로 나타나 대조구의 34.9 및 12.7보다 훨씬 높은 활성을 나타냈었다(Ha and Michael(1991)).

Table 53. Anticoagulant activity of enzyme hydrolyzed laminaran

Sample	Fraction	Anticoagulant activity <sup>1)</sup> (sec)	
		APTT	PT
Heparin		190.0	14.5
Control(Plasma)		34.9	12.7
Laminaran	F-f-1 <sup>2)</sup>	* <sup>4)</sup>	22.2
	F-f-2	*	15.5
	F-f-3	151.8	20.9
	F-f-4	36.6	13.1
	C-f-1 <sup>3)</sup>	*	** <sup>5)</sup>
	C-f-2	*	**
	C-f-3	*	27.1
	C-f-4	37	13

<sup>1)</sup> Anticoagulant activity, anti-platelet aggregation activity and turbidity was estimated at 100 µL/mL

<sup>2)</sup> F-f-1 (Flavozyme: 100 kDa ↑); F-f-2 (Flavozyme: 100-50 kDa); F-f-3 (Flavozyme: 50-10 kDa); F-f-4 (Flavozyme: 10 kDa ↓)

<sup>3)</sup> C-f-1 (Econase CE: 100 kDa ↑); C-f-2 (Econase CE: 100-50 kDa); C-f-3 (Econase CE: 50-10 kDa); C-f-4 (Econase CE: 10 kDa ↓), <sup>4)</sup> 190 sec ↑, <sup>5)</sup> 50 sec ↑

Table 54. Anticoagulant activity of acid and heat(121°C) treated laminaran

Treatment	Fraction	Anticoagulant activity <sup>1)</sup> (sec)	
		APTT	PT
Heparin		190.0	14.5
Control(plasma)		34.9	12.7
	f-1 <sup>2)</sup>	* <sup>3)</sup>	** <sup>4)</sup>
Acid hydrolysis	f-2	*	41
	f-3	*	37.8
	f-4	29.7	15.8
	f-1 <sup>2)</sup>	*	**
Autoclaving (121°C)	f-2	*	**
	f-3	*	**
	f-4	77.6	16

<sup>1)</sup> Anticoagulant activity of polysaccharides was estimated at concentration of 100 µL/mL

<sup>2)</sup> f-1 (MW: 100 kDa ↑); f-2 (MW: 100-50 kDa); f-3 (MW: 50-10 kDa); f-4 (MW: 10 kDa ↓)

<sup>3)</sup> 190 sec ↑, <sup>4)</sup> 50 sec ↑

#### (나) 혈소판응집 억제 활성

혈전증 및 동맥경화증은 과도한 혈소판 응집과 혈액응고 및 혈중지질의 상호작용에 의해 발생된다는 것이 알려져 있다(Dawer(1980), Doyle et al.(1962)). 혈소판응집 억제 활성은 대황에서 추출한 laminaran을 효소(Flavozyme, Econase CE)처리하여 측정하였다. Flavozyme로 처리한 100-50 kDa의 획분에서 Collagen 및 ADP로 유도한 혈소판응집 억제효과는 나타나지 않았으며, Econase CE로 처리한 10 kDa 이하 Collagen으로 유도한 획분에서도 혈소판응집 억제 활성은 거의 나타나지 않았다. Flavozyme로 처리한 laminaran의 나머지

획분에서는 2.9-10.6%의 낮은 활성을 나타내었으며, Econase CE로 처리한 획분에서도 8.2-13.0%의 낮은 활성이 나타나 laminaran의 혈소판응집 억제 활성은 전체적으로 낮게 나타났다(Table 55).

Table 55. Antiplatelet aggregation activity of enzyme hydrolyzed laminaran

Sample	Fraction	Anti-platelet aggregation activity <sup>1)</sup> (%)	
		Collagen	ADP
Laminaran	F-f-1	10.6	10.0
	F-f-2	0.0	0.0
	F-f-3	6.1	8.0
	F-f-4	6.1	2.9
	C-f-1	11.5	11.5
	C-f-2	11.5	8.2
	C-f-3	13.0	11.5
	C-f-4	0.0	9.8

<sup>1)</sup> Anticoagulant activity, anti-platelet aggregation activity and turbidity was estimated at 100  $\mu$ L/mL

<sup>2)</sup> F-f-1 (Flavozyme: 100 kDa  $\uparrow$ ); F-f-2 (Flavozyme: 100-50 kDa); F-f-3 (Flavozyme: 50-10 kDa); F-f-4 (Flavozyme: 10 kDa  $\downarrow$ ), <sup>3)</sup> C-f-1 (Econase CE: 100 kDa  $\uparrow$ ); C-f-2 (Econase CE: 100-50 kDa); C-f-3 (Econase CE: 50-10 kDa); C-f-4 (Econase CE: 10 kDa  $\downarrow$ )

또한 laminaran을 산 및 고온가압 처리하여 분자량 획분에 따른 혈소판응집 억제 활성을 측정한 결과는 Table 56에 나타내었다. 산 처리한 laminaran의 분자량 획분별 혈소판응집 억제 활성은 100  $\mu$ L/mL 농도에서 10.0-17.1% 사이의 활성을 나타내었으며, 고온가압 처리 획분에서는 100  $\mu$ L/mL 농도에서 2.0-23.9%의 활성을 나타내었다. 이 결과 laminaran의 혈소판응집활성은 효소에 의한 처리보다는 산 및 고온가압 처리시 그 활성이 더 높아지지만, 전체적인 활성은 그리 높게 나타나지 않는 것을 알 수 있었다.



Table 56. Antiplatelet aggregation activity of acid and heat(121°C) treated laminaran

Treatment	Fraction	Antiplatelet aggregation activity <sup>1)</sup> (%)	
		Collagen	ADP
Acid hydrolysis	f-1 <sup>2)</sup>	11.4	11.3
	f-2	12.9	11.3
	f-3	17.1	16.5
	f-4	10.0	12.9
Autoclaving (121°C)	f-1	19.7	19.3
	f-2	15.2	19.3
	f-3	23.9	18.0
	f-4	22.7	2.0

<sup>1)</sup> Anti-platelet aggregation activity of laminaran was estimated at concentration of 100 µL/mL,

<sup>2)</sup> f-1 (MW: 100 kDa ↑); f-2 (MW: 100-50 kDa); f-3 (MW: 50-10 kDa); f-4 (MW: 10 kDa ↓)

## (2) *in vivo* 혈류 개선 효과

### (가) 실험동물 및 처리

4주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 실험 시작 1주일 동안 적응시킨 후 동물의 체중에 따라 각 군의 평균 체중을 134.1±1.4 g이 되도록 플라스틱 케이지에 2마리씩 넣어 4군[정상식이대조군(Normal), 고지방식이대조군(Control), 고지방식이 심층수 투여 실험군(LD) 및 고지방식이 일반수 투여실험군(LW)]으로 구분하여 사육하였다(Table 57). 고지혈증(Hyperlipidemia)을 유발시키기 위해 1% cholesterol, 2% corn oil, 10% lard를 혼합한 고지방 식이를 3주간 섭취 시키면서 심층수 및 일반수에 laminaran을 100 mg/kg/bw/day를 혼합하여 음용수로 사용하였다. 체중은 사육 기간 동안 격일로 오전 중에 측정하고, 식이 섭취량은 매일 식이 잔량을 측정하여 산출하였다. 실험기간동안의 사육 환경은 23±2°C, 상대습도 55±10%를 유지하였고 인공조명(12시간 점등, 12시간 소등) 하에서 사육하였으며 물과 식이는 자유 공급하였다.

Table 57. Experimental design of animal

Groups(No.)	Treatment
Normal (8)	Normal rats
Control(8)	Hyperlipidemia induced rats
LD(6)	Hyperlipidemia induced rats supplemented laminaran at 100 mg/kg/bw/day in deep sea water
LW(6)	Hyperlipidemia induced rats supplemented laminaran at 100 mg/kg/bw/day in water

모든 실험동물은 부검 전 24시간 동안 절식시킨 다음 ethyl ether로 마취 하여 복대동맥으로부터 혈액을 채취한 다음 실온에서 30분간 방치 한 후 3,000rpm, 4℃에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다.

(나) 체중 증가량, 사료 섭취량 및 식이효율

고지혈증을 유발시킨 rat에 laminaran 함유 심층수 및 일반수를 laminaran 기준 각각 100 mg/kg/bw/day 수준으로 3주간 섭취시킨 후 체중증가량, 사료섭취량 및 식이효율을 조사하였다. 실험기간 동안 체중증가량, 사료섭취량 및 식이효율은 고지혈증을 유발시킨 대조군 및 실험군들(LD, LW)이 정상 대조군(Normal)보다 높은 수치를 나타냈으나, 군간의 유의적인 차이는 없었다. (Table 58)

Table 58. Laminaran 함유 음용수 급이가 실험동물의 체중 및 식이에 미치는 영향

Groups	Weight gain (g/day)	Diet intake (g/day)	FER <sup>2)</sup>
Normal	8.86±0.95 <sup>1)</sup>	27.0±2.5	0.33±0.38
Control	10.14±1.22	25.4±2.7	0.40±0.45
LD	10.86±1.25	24.9±2.9	0.44±0.43
LW	9.97±0.84	24.9±2.0	0.40±0.42

<sup>1)</sup> Values are mean±S.D. <sup>2)</sup> FER=Body weight gain (g/day)/Food intake(g/day)

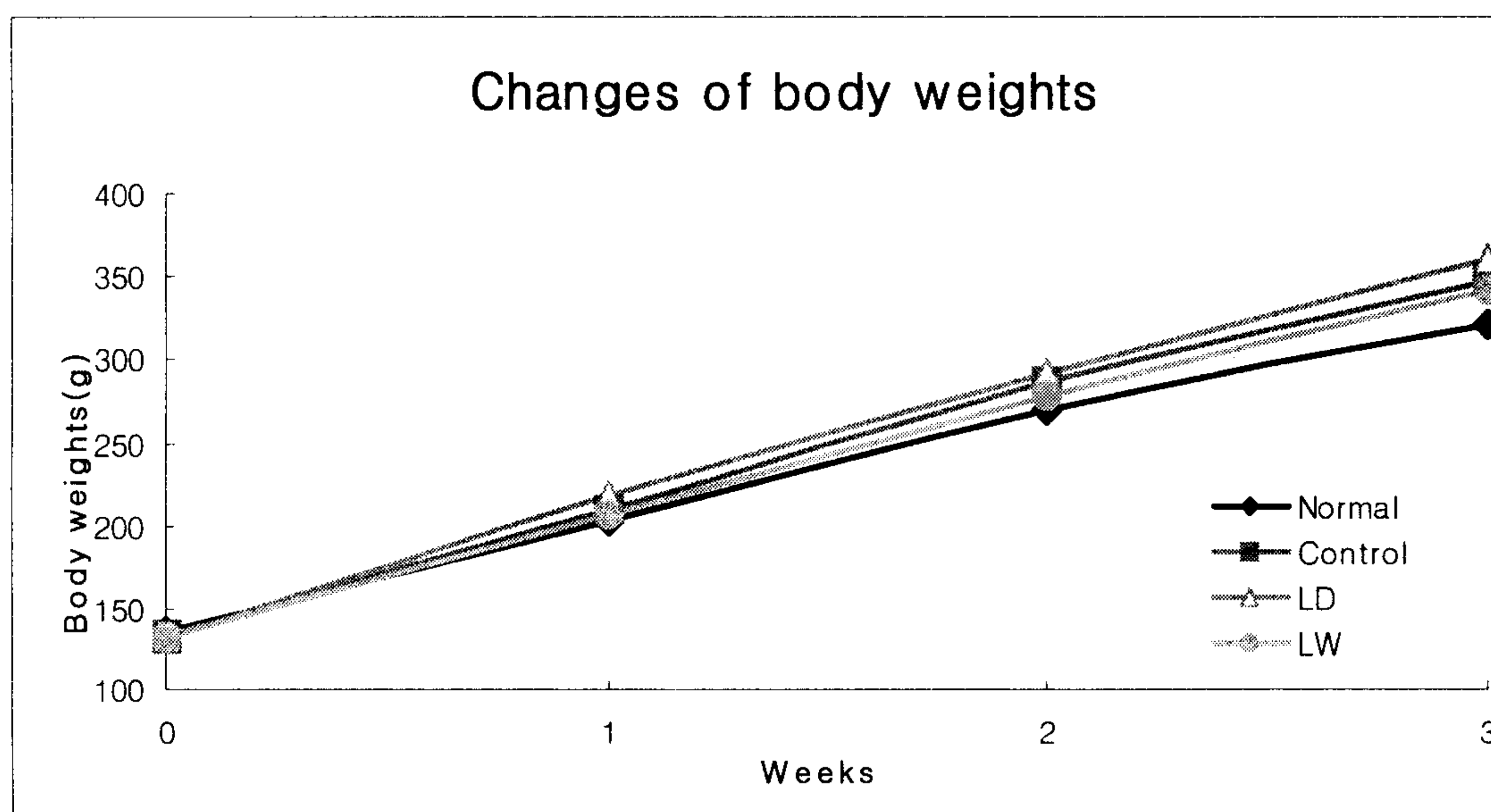


Fig. 79. Rat의 체중변화에 미치는 laminaran 혼합음용수의 효과

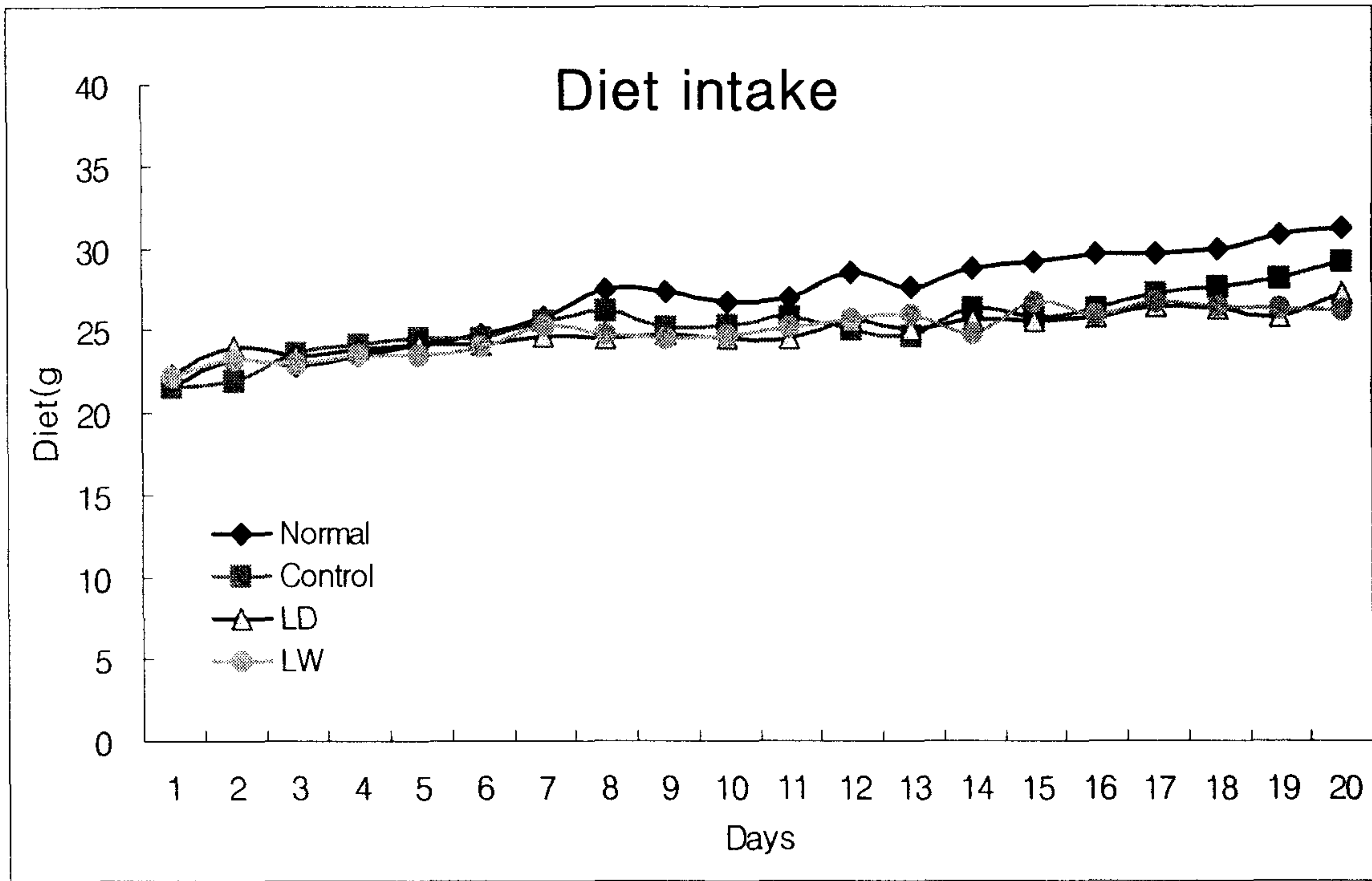


Fig. 80. Rat의 식이섭취에 미치는 laminaran 혼합음용수의 효과

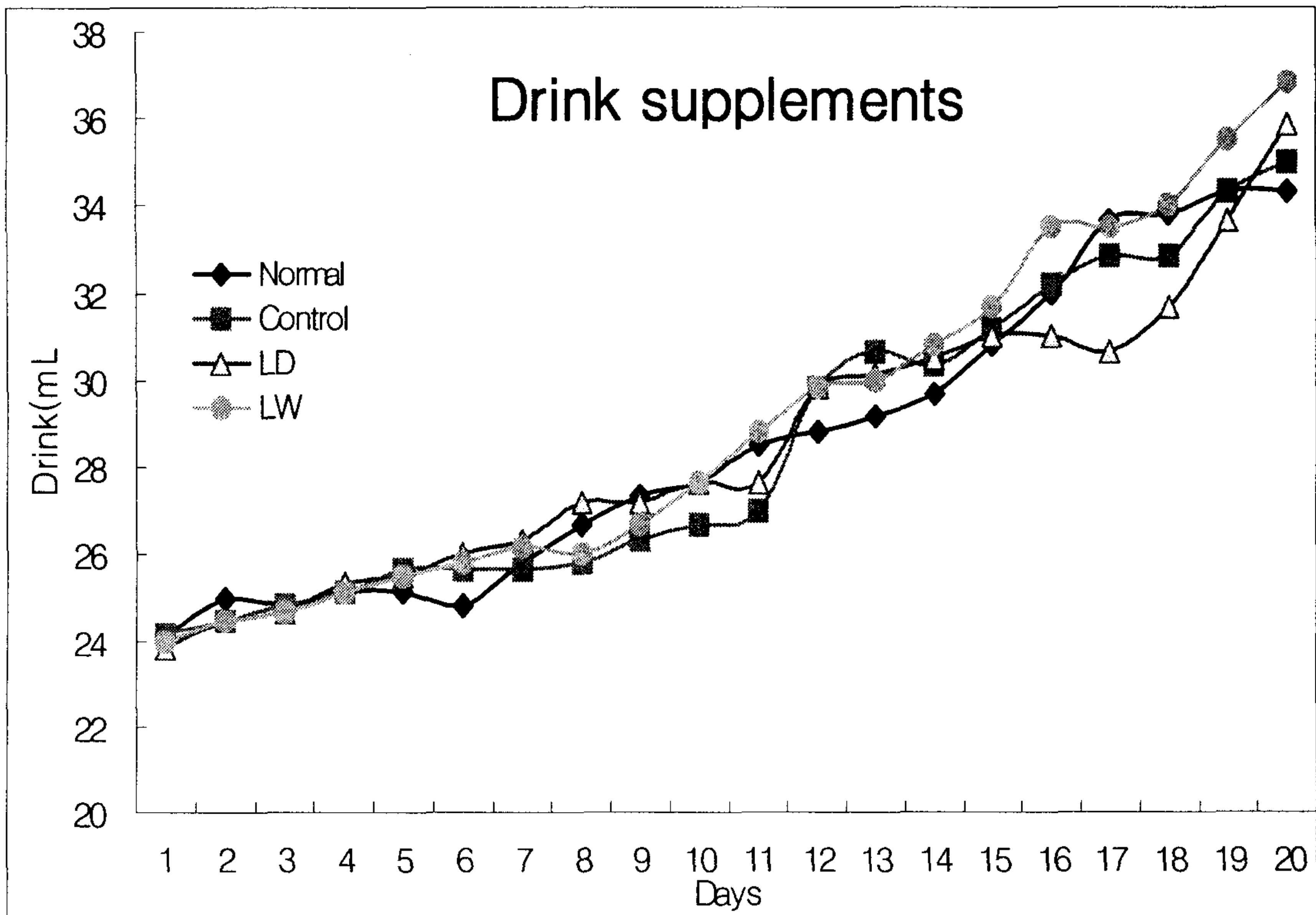


Fig. 81. Rat에 대한 laminaran 혼합음용수의 섭취량

#### (다) 혈청지질 농도

3주간 고지방식이를 급여하여 고지혈증(hyperlipidemia)을 유발시킨 rat에게 laminaran 함유 심층수 또는 일반수를 laminaran 기준 100 mg/kg/bw 수준으로 투여한 후 측정된 혈청지질농도는 Table 59에 나타내었다. Total cholesterol의 경우, 고지방식이와 일반수를 음용하는 대조군(control)의  $81.5 \pm 15.2$  mg/dL에 비하여 고지방식이와 심층수를 음용하는 laminaran 투여군이  $69.2 \pm 12.6$  mg/dL, 고지방식이와 일반수를 음용하는 laminaran 투여군이  $75.0 \pm 13.9$  mg/dL로 각각 15% 및 8%정도의 감소효과가 나타났다. LD군의 이와 같은 수치는 정상식이와 일반수를 음용하는 normal군  $74.3 \pm 11.9$  mg/dL에 비하여도 약 7%정도의 감소효과를 나타내었다.

LDL-cholesterol의 경우, 고지방식이와 일반수를 음용하는 대조군(control)의  $18.2 \pm 2.7$  mg/dL에 비해 고지방식이와 심층수를 음용하는 laminaran 투여군(LD)이  $11.0 \pm 2.3$  mg/dL, 고지방식이와 일반수를 음용하는 laminaran 투여군(LW)이  $13.0 \pm 1.3$  mg/dL로 각각 40% 및 30%정도의 감소효과가 유의적으로 나타났다. 또한, 정상식이와 일반수를 음용하는 normal군  $11.5 \pm 2.0$  mg/dL과도 비슷한 수치를 나타내었다. 콜레스테롤을 말초조직으로부터 간으로 역수송하여 세포에서 LDL-cholesterol의 흡수를 억제시켜 동맥경화 및 혈관장애 개선에 유익한 HDL-cholesterol의 경우도 정상식이와 일반수를 음용하는 normal군은  $25.8 \pm 2.9$  mg/dL으로 나타났고, 고지방식이와 일반수를 음용하는 대조군(control)은  $24.5 \pm 2.7$  mg/dL으로 나타났으나, 고지방식이와 심층수를 음용하는 laminaran투여군(LD)과 고지방식이와 일반수를 음용하는 laminaran투여군(LW)은 각각  $27.3 \pm 3.0$  mg/dL 및  $30.0 \pm 2.2$  mg/dL로 나타나 control에 비하여 각각 11% 및 22%의 증가하는 효과를 보였고, 또한 LW군은 control에 비하여 유의적인 증가효과를 나타내었다( $p < 0.05$ ).

동맥경화지수인 AI지수 또한 정상식이와 일반수를 음용하는 normal군은  $2.9 \pm 0.4$ 이고, 고지방식이와 일반수를 음용하는 대조군(control)은  $3.3 \pm 0.5$ 으로 나타났으나, 고지방식이와 심층수를 음용하는 laminaran투여군(LD)과 고지방식이와 일반수를 음용하는 laminaran투여군(LW)은 각각  $2.6 \pm 0.6$  및  $2.5 \pm 0.4$ 로 나타나 normal에 비해서는 각각 11% 및 14%의 효과를 보였고, control에 비해서는 각각 22% 및 25%의 동맥경화 위험지수의 감소효과가 있음을 알 수 있었다.

위와 같은 결과로 미뤄보아 고지방 식이로 고지혈증을 유발하여 laminaran을 매일 100 mg/kg/bw씩 심층수와 일반수로 rat에 섭취시켜 혈 중 지질 농도를 측정해 본 결과, 총 콜레스테롤, LDL-cholesterol 및 중성지방에 대해서는 laminaran을 심층수에 혼합시켰을 때 일반수에 비하여 감소효능이 있는 것으로 보여지고, HDL-cholesterol과 동맥경화지수에 있어서는 심층수 혼합음료보다 일반수와 laminaran과의 혼합이 혈 중 지질농도 저하효과가 있는 것으로 사료되었다.

Table 59. Laminaran 혼합음용수가 rat의 혈중 지질농도에 미치는 영향

Group	Total-cholesterol (mg/dL)	HDL-cholesterol (mg/dL)	LDL-cholesterol (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	AI
Normal	74.3±11.9 <sup>1)</sup>	25.8±2.9	11.5±2.0	38.3±9.6	2.9±0.4
Control	81.5±15.2	24.5±2.7	18.2±2.7	47.5±18.1	3.3±0.5
LD	69.2±12.6	27.3±3.0	11.0±2.3*	25.0±14.2**	2.6±0.6*
DW	75.0±13.9	30.0±2.2*	13.0±1.3*	30.3±17.1	2.5±0.4*

<sup>1)</sup> Values are mean±S.D, \*<sup>1)</sup> Values are significantly different from control at p<0.05

\*\*<sup>2)</sup> Values are significantly different from Normal at p<0.05

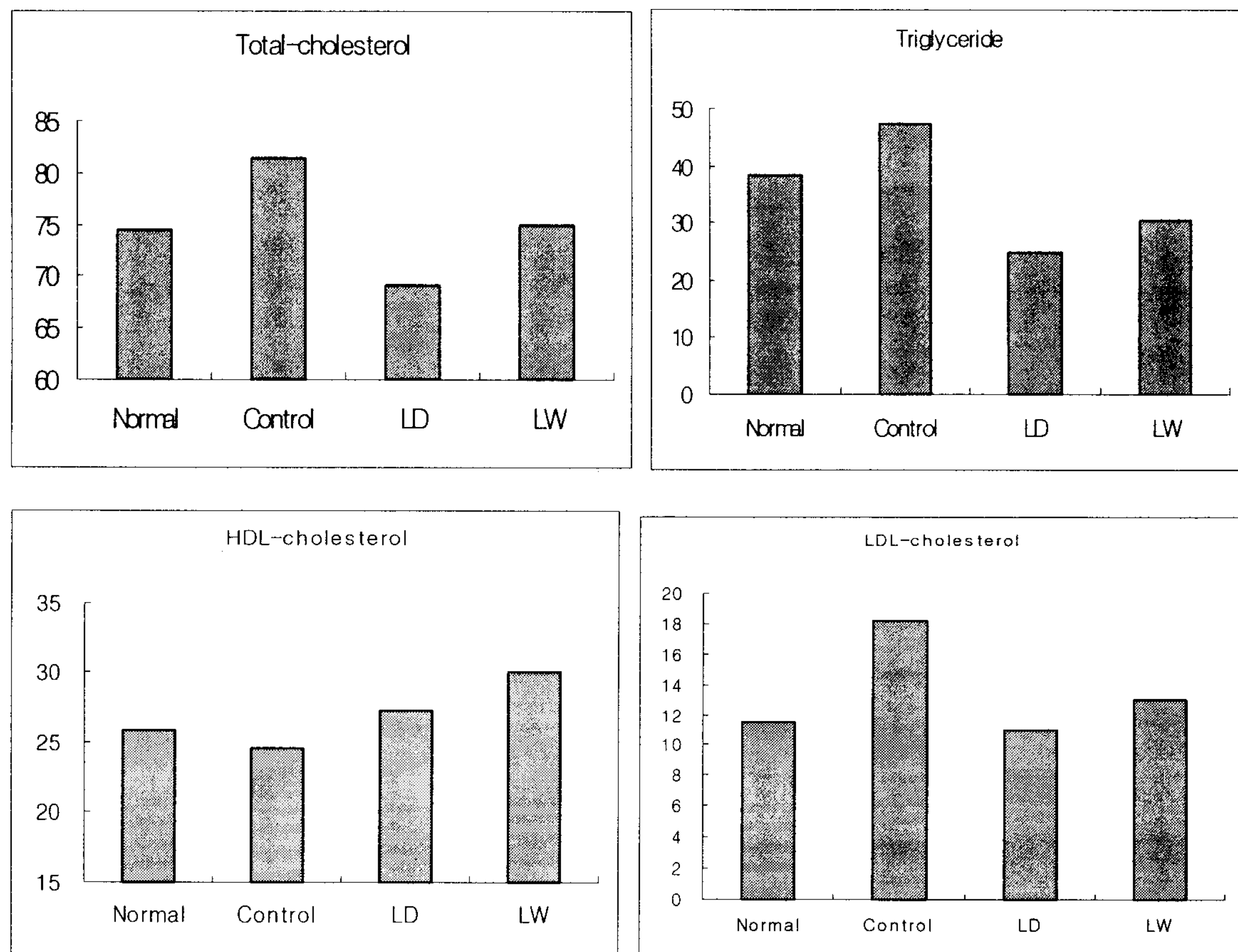


Fig. 82. Laminaran 혼합음용수가 고지혈증이 유도된 rat의 혈청지질농도에 미치는 영향

(라) 혈류개선 효과

혈류의 흐름에 미치는 laminaran 혼합 음용수의 영향을 검토하기 위하여 Micro channel array flow analyzer KH-6을 이용하여 유동용량 25, 50, 75 및 100  $\mu$ L 수준에서의 혈액의 모세관 통과 소요시간을 측정하였다. 고지방식이와 일반수를 음용하는 대조군(control)과 실험식이군 간에는 혈액의 모세관 흐름이 진행됨에 따라 점차 혈류유동 속도에 있어서 큰 차이를 보여, 모세관 유동용량 100  $\mu$ L 도달 시점에서는 고지방식이와 일반수를 음용하는 대조군(control), 정상대조군인 Normal과 고지방식이와 laminaran 함유 심층수를 음용하는 LD 및 고지방식이와 laminaran 함유 일반수를 음용하는 LW 처리구간에 현저한 차이를 보였다. 즉, 실험식이군과 Normal 실험군은 모두 Control 실험군 대비 100% 이상 증가된 혈류개선 효과를 확인할 수 있었다(Table 60).

Table 60. Laminaran 혼합음용수가 고지혈증이 유도된 rat의 혈류흐름에 미치는 영향

Group	0uL	25uL	50uL	75uL	100uL
Normal	0 <sup>1)</sup>	8.9	17.6	29.2	46.3
Control	0	13.1	27.1	48.3	98.0
LD	0	6.9	14.4	24.4	44.3
LW	0	8.1	17.1	26.6	40.9

<sup>1)</sup> sec of blood flow

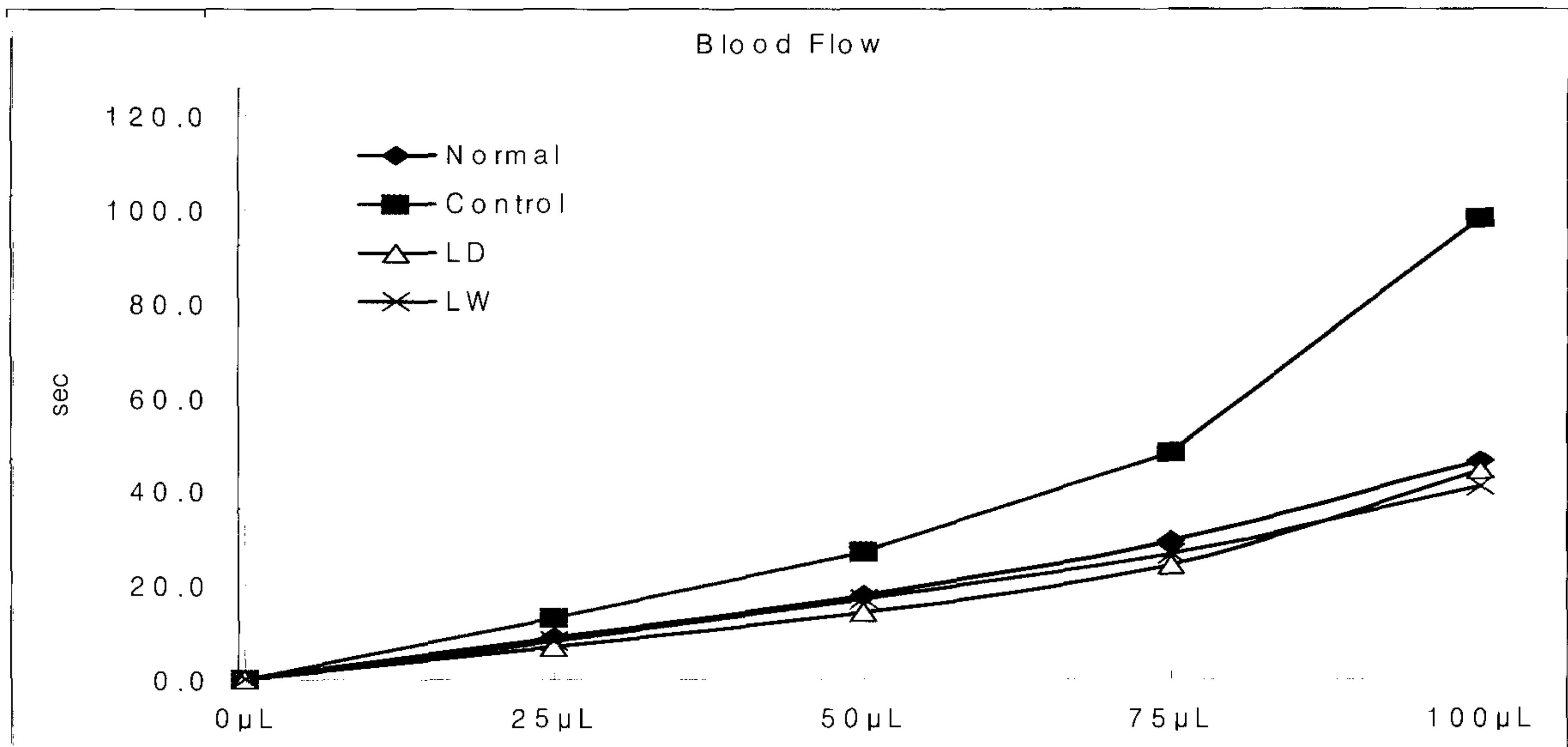


Fig. 83. Laminaran 혼합음용수가 고지혈증이 유도된 rat의 혈류흐름에 미치는 영향

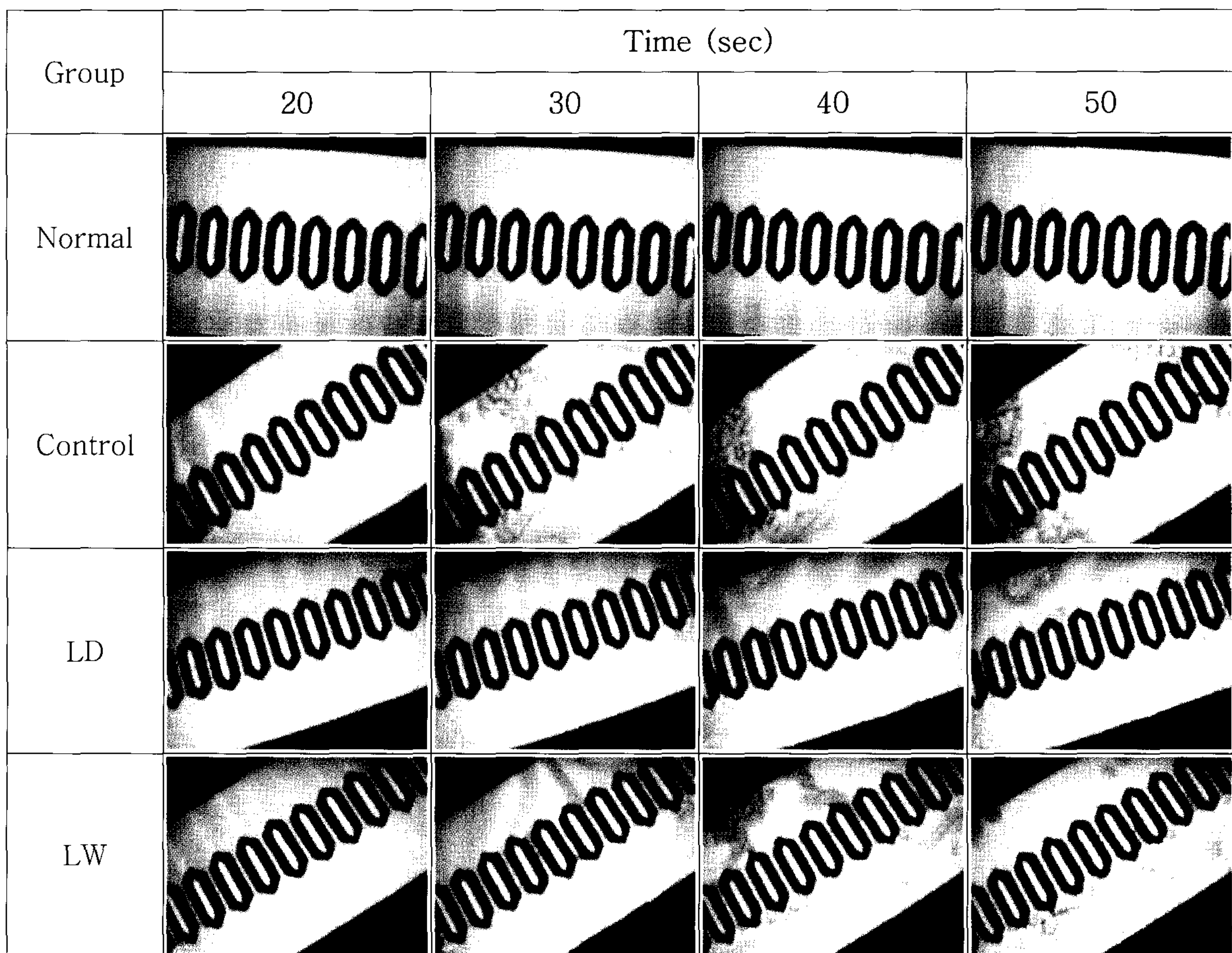


Fig. 84. Micro channel array flow analyzer KH-6을 통과한 laminaran 혼합음용수가 고지혈증이 유도된 rat의 혈류흐름에 미치는 영향



## 2. Fucoidan

### 가. 항암활성

#### (1) *in vitro* 항암활성

##### (가) 수식 Fucoidan의 cytotoxicity(MTT assay)

암세포주에 대한 세포독성을 기준으로 한 수식 fucoidan의 항종양활성(항암활성)을 Table 61에 나타내었다. 암세포 3종(위암, 자궁암 및 대장암 세포주)에 대한 세포독성을 측정한 결과 수식 fucoidan은 50 kDa 이상에서 50%이상의 높은 활성을 나타내었고, 수식방법에 따라서는 효소적가수분해, 고온가압처리 및 산 가수분해 순으로 활성이 높았다.

Fucoidan의 IC<sub>50</sub>은 SNU-1, HeLa 및 SW에 대하여 각각 156.34, 167.25 및 169.76로 나타났다(Table 62).

Table 61. Cytotoxicity of modified fucoidan on SNU-1, HeLa and SW cell

Fucoidan	MW <sup>2)</sup>	Cytotoxicity(%) <sup>1)</sup>					
		다시마			감태		
		SNU-1	HeLa	SW	SNU-1	HeLa	SW
E-F <sup>3)</sup>	f-1 <sup>5)</sup>	53.8	54.1	55.3	51.5	65.2	47.1
	f-2	34.5	44.9	38.5	-	54.0	32.5
	f-3	-	-	-	-	-	-
	f-4	-	-	-	-	-	-
E-E <sup>4)</sup>	f-1	48.9	51.2	50.3	56.4	69.4	53.6
	f-2	43.7	54.9	55.8	50.1	58.9	51.9
	f-3	-	-	-	-	-	-
	f-4	-	-	-	-	-	-
Acid hydrolysis	f-1	45.2	59.1	38.2	54.2	37.3	47.2
	f-2	36.2	47.5	33.1	47.6	46.0	39.9
	f-3	-	-	-	-	10.8	-
	f-4	-	-	-	-	-	-
Autoclaving	f-1	41.2	50.4	36.0	47.8	65.3	44.4
	f-2	-	12.8	-	-	14.0	7.3
	f-3	-	-	-	-	-	-
	f-4	-	-	-	-	-	-

<sup>1)</sup> Cytotoxicity of polysaccharides was estimated at concentration of 100  $\mu$ L/mL

<sup>2)</sup> MW: Molecular weight; <sup>3)</sup> E-F: Enzyme (Flavozyme); <sup>4)</sup> E-C: Enzyme (Econase CE)

<sup>5)</sup> f-1 (MW: 100 kDa  $\uparrow$ ); f-2 (MW: 100-50 kDa); f-3 (MW: 50-10 kDa); f-4 (MW: 10 kDa  $\downarrow$ )

Table 62. IC<sub>50</sub> of fucoidan on SNU-1, HeLa and SW cell(unit : µg/mL)

Cell line	Fucoidan
SNU-1	156.34
HeLa	167.25
SW	169.76

## (나) QR(Quinone reductase) 유도활성

QR 유도활성은 간암 세포주를 대상으로 하였으며, 대조구로는 정상 간세포를 사용하여 유도활성을 비교하였다(Fig. 85). 효소처리한 fucoidan 중에서 다시마에서 추출한 100 kDa 이상의 fucoidan 획분에서 가장 높은 QR 유도활성이 나타났으며, 감태에서 추출한 100 kDa 이상의 fucoidan 획분이 두 번째로 높았고, 감태 fucoidan 100-50 kDa 획분 및 다시마 fucoidan 100-50 kDa 획분 순으로 활성이 높게 나타났다. 산 처리 fucoidan group에서는 다시마 fucoidan 100 kDa 이상 획분에서 가장 높은 활성이 나타났으며, 감태 fucoidan 100 kDa 이상 획분, 감태 fucoidan 100-50 kDa 획분 및 다시마 fucoidan 100-50 kDa 획분의 순으로 나타났다. 고온가압처리구에서는 다시마 fucoidan 100 kDa 이상 획분에서 가장 높은 활성이 나타났으며, 다음으로 다시마 fucoidan 100-50 kDa 획분, 감태 fucoidan 100 kDa 이상 획분 및 감태 fucoidan 100-50 kDa 획분의 순으로 나타났다. 수식 처리한 다시마와 감태 fucoidan의 QR 유도활성은 분자량에 따라 다시마와 감태 fucoidan 100 kDa 이상 획분에서 비교적 높은 활성을 나타내었으며, 다음으로 감태 fucoidan 100-50 kDa 및 다시마 fucoidan 100-50 kDa 순으로 활성이 나타났다. 수식 방법에 따라서는 효소 처리한 fucoidan의 QR 유도활성이 높게 나타났으며, 다음으로 고온가압처리, 산 처리 순으로 활성이 나타났으나 활성 차이는 그리 크지 않았는데, 이러한 차이는 수식방법에 따라 다당체 특성을 갖는 fucoidan의 부분적 분자구조 변형 등에 기인한 것으로 사료되었다.

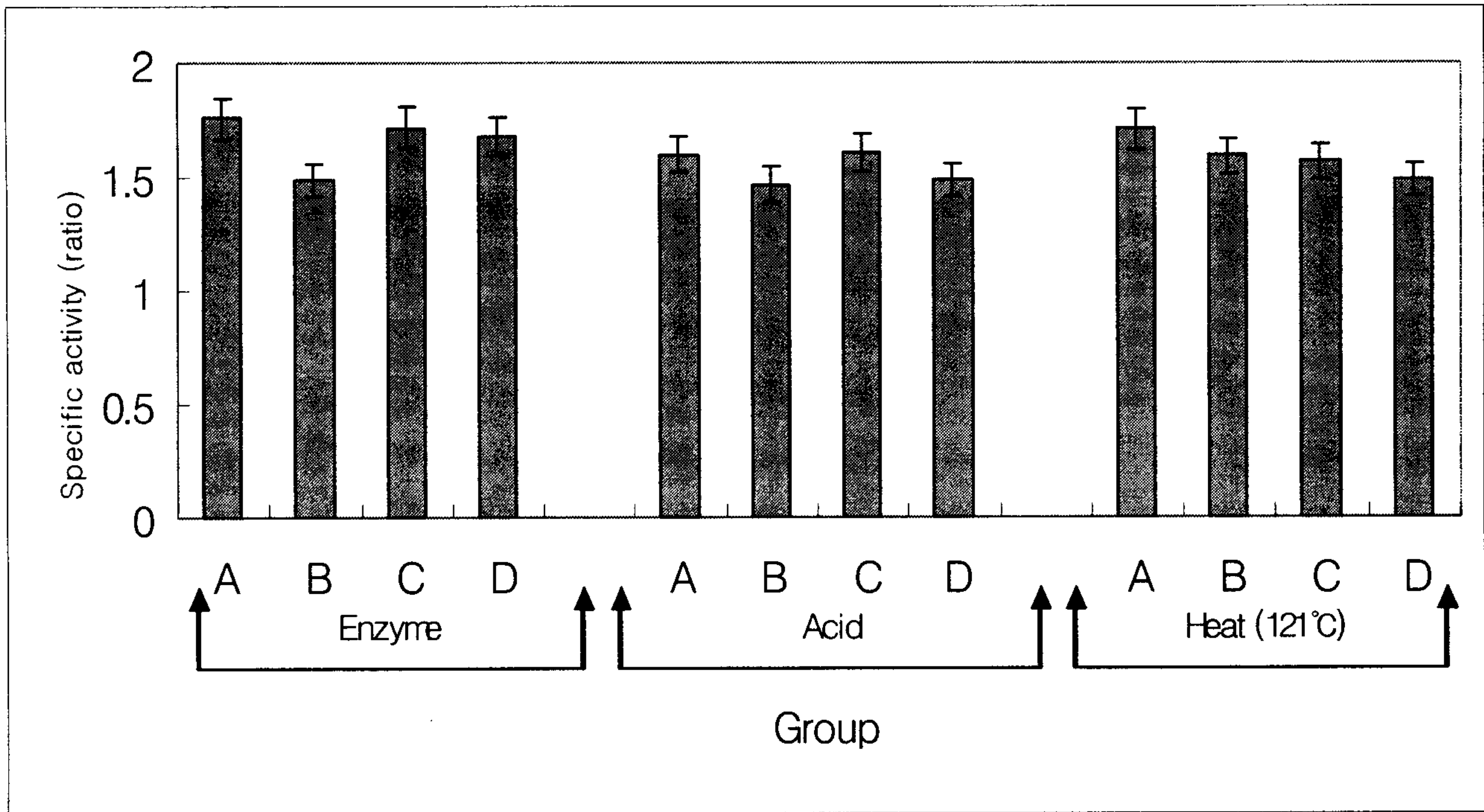


Fig. 85. Quinone reductase induction of hydrolyzed fucoidan on HepG2 cells.

Concentration : 100  $\mu$ L/mL

A : *L. japonica* fucoidan (MW: 100 kDa 이상); B: *L. japonica* fucoidan (MW: 100-50 kDa)

C : *E. kurome* fucoidan (MW: 100 kDa 이상); D: *E. kurome* fucoidan (MW: 100-50 kDa)

## (2) *in vivo* 항암활성

### (가) Fucoidan의 전암단계 *in vivo* 항암활성

수식 Fucoidan의 항종양활성을 검증하기 위하여 실험관내 실험 (*in vitro*)으로 QR 유도활성 및 암세포 독성실험(MTT assay)을 수행하였다. 실험동물은 Fisch 344 수컷 흰쥐를 미국 Harlan Sprague Dawley사로부터 구입하여 발암 물질인 DMH을 인위적으로 투여하여 대장 발암을 유도시킨 다음 수식 기능성다당(fucoidan) 식이첨가 수준에 대한 효능을 측정 하였다.

### (나) 실험동물의 체중증가량, 사료 섭취량 및 식이효율

DMH 투여로 대장 발암을 유도시킨 흰쥐에 수식 fucoidan을 농도별로 투여한 후 체중증가량, 사료섭취량 및 식이효율을 조사하였다. 체중증가량은 대조군(control)에 비해서 FL 투여군은 차이가 없었으나 FH 및 TFH군에서는 다소 높게 나타났다. 또한 TFH군은 간 및 신장의 무게가 대조군(control) 보다 다소 높게 나타났으며, FL 및 FH군은 대조군과 유사한 경향을 나타내었다. 체중증가량 및 장기의 무게는 각 군마다 다소 차이는 있었으나 군간의 유의적인 차이는 없었다(Table 63).

Table 63. Organ weights of DMH-induced rat fed fucoidan

Groups <sup>1)</sup>	Final Body weight(g)	Liver weight		Spleen weight		Kidney weight		Colon length (cm)
		Absolute (g)	Relative (%)	Absolute (g)	Relative (%)	Absolute (g)	Relative (%)	
Control	316.86±21.80	8.08±1.23	2.56±0.42	0.62±0.06	0.20±0.02	1.71±0.25	0.54±0.07	15.7±0.8
FL	316.53±16.20	8.55±1.58	2.69±.39	0.63±0.09	0.20±0.02	1.80±0.11	0.57±.02	16.7±0.4
FH	322.15±17.44	8.55±1.84	2.64±0.46	0.69±0.33	0.21±0.10	1.84±0.13	0.57±0.03	17.4±0.8
TFH	334.93±16.66	11.57±1.51	3.44±0.31	0.58±0.10	0.18±0.05	2.00±0.15	0.51±.14	18.1±0.2

<sup>1)</sup>FL: hydrolyzed fucoidan low dose with DMH, FH: hydrolyzed fucoidan high dose with DMH;  
TFH: hydrolyzed fucoidan high dose without DMH

(다) 대장 이상선화소(ACF) 및 종양 발생 억제율

실험 종료 후 부검하여 관찰한 실험군의 대장 점막의 Total AC 및 종양발생 억제율은 Table 64와 같다. 대장을 rectum(RT), distal colon(DC), middle colon(MC) 및 proximal colon(PC)의 4등분으로 나누어 관찰해 보았을 때의 ACF 및 AC는 Table 65에 나타내었다. ACF 및 AC의 수는 각 군에서 유의성 있게 나타났으며(p<0.0001), 수식 fucoidan의 실험군은 농도 의존적으로 ACF 형성 억제효과를 나타내었다. 수식 fucoidan의 1% 실험군(FH)에서 대조군에 비하여 53.1%의 종양발생 억제율을 보였고, 종양으로서의 병변을 일으킬 확률이 높은 AC 4개 이상의 ACF에서는 59.28% 이상의 종양 발생 억제율을 나타내었다.

Table 64. Effects of fucoidan on formation of AC in DMH-induced male F344 rats

Group	Total no. of AC <sup>1)</sup> /rats	Crypt foci				
		1	2	3	4	≥5
Control	863.57±76.97	50.14±18.57	237.43±53.56	265.71±24.61	190.86±41.93	119.43±27.58
FL	515.71±171.01 (40.28%) <sup>2)</sup>	42.86±16.76 (14.52%)	174.00±56.25 (26.72%)	160.71±58.17 (39.52%)	103.43±46.61 (45.81%)	34.71±11.54 (70.94%)
FH	405.14±153.11 (53.1%)	30.43±13.02 (39.31%)	141.43±45.73 (40.43%)	118.29±40.39 (55.48%)	77.71±42.13 (59.28%)	37.29±23.89 (68.78%)

Value are mean ± SD, <sup>1)</sup> AC : aberrant crypt, <sup>2)</sup> Inhibition activity of control (%)

Table 65. Effects of dietary fucoidan on the development ACF on colon of male F344 rats

Treatment	구분	Number of ACF(Aberrant Crypt Foci)					Total
		1	2	3	4	≥5	
Control	RT	6.17±3.60	13.71±4.15	9.29±2.75	4.43±2.07	1.50±0.58	33.57±10.34
	DC	18.14±9.72	48.57±12.69	37.71±5.53	20.57±8.48	11.29±3.35	136.29±20.67
	MC	17.71±8.83	44.43±12.90	37.43±7.37	20.00±4.51	8.14±3.44	127.71±20.12
	PC	9.00±7.30	12.00±6.86	4.86±3.44	3.17±2.64	2.75±0.96	30.14±18.39
FL	RT	6.57±2.76	11.00±3.27	4.86±2.67	1.75±0.96	2.00±1.73	24.29±7.27
	DC	11.71±7.99	31.00±18.83	27.43±11.93	16.14±9.96	7.33±7.47	92.57±34.23
	MC	14.00±7.68	30.29±10.08	19.86±6.18	10.86±7.03	3.00±1.53	78.00±29.31
	PC	6.14±5.58	10.29±6.37	4.60±6.07	2.60±2.51	1.67±1.15	22.29±16.07
FH	RT	4.20±2.95	10.43±4.69	5.00±3.92	1.67±1.15	-	17.00±11.46
	DC	8.29±5.94	26.14±12.19	14.71±8.34	8.50±4.64	4.20±1.64	59.43±29.00
	MC	13.86±5.01	28.29±11.32	18.71±6.34	10.29±5.19	4.00±0.89	74.57±26.39
	PC	6.17±4.02	6.83±3.76	3.67±1.63	2.00±0.82	1.33±0.58	16.00±11.63

[FH : hydrolyzed fucoidan high dose with DMH; FL : hydrolyzed fucoidan low dose with DMH]

RT, rectum; DC, distal colon; MC, middle colon; PC, proximal colon

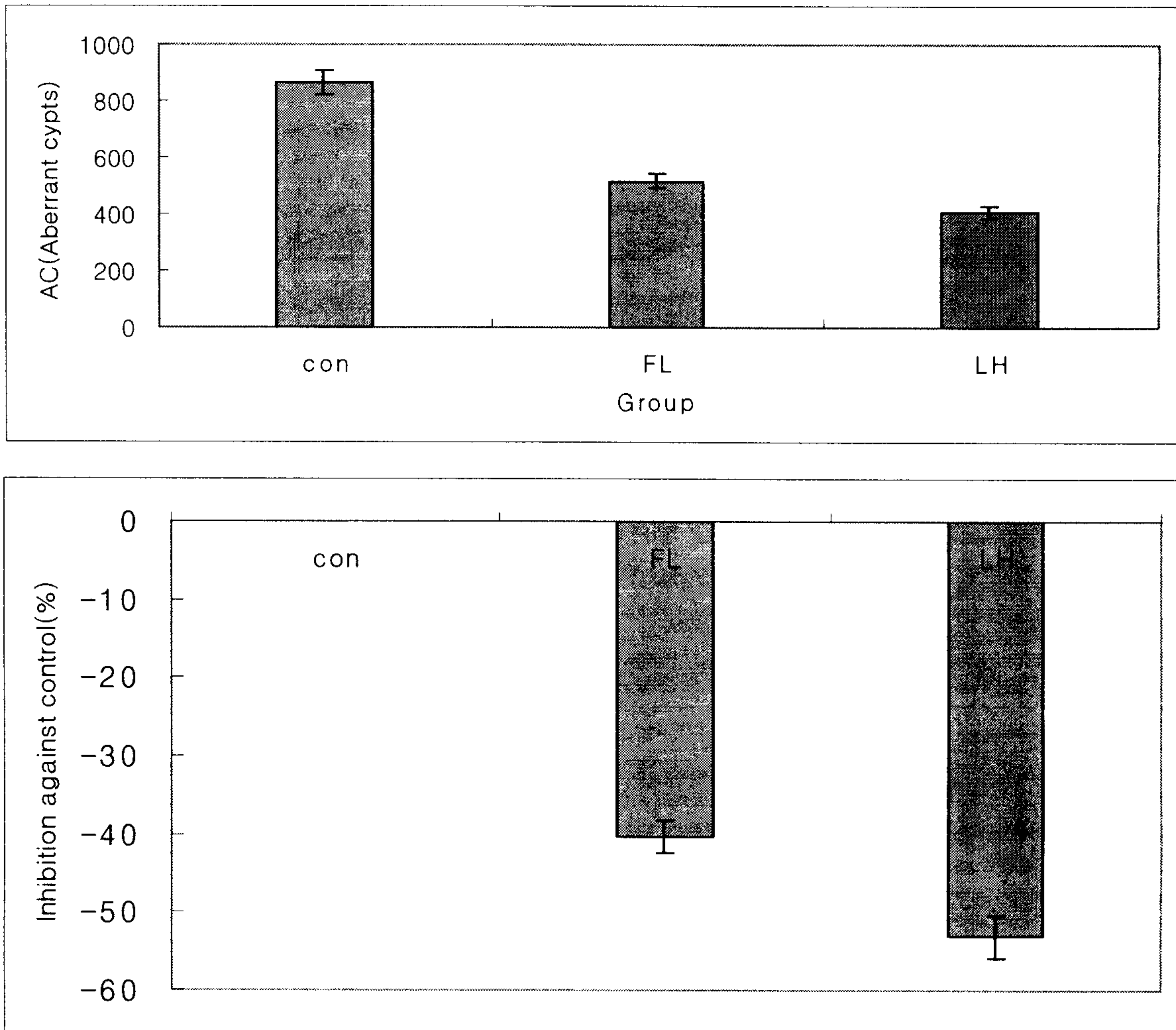


Fig. 86. Effects of dietary fucoidan on the development of colonic AC and inhibition rate of tumor in male F344 rats.

[FH: hydrolyzed fucoidan high dose with DMH; FL: hydrolyzed fucoidan low dose with DMH]

#### 나. 콜레스테롤 대사 개선

##### (1) *in vitro* 콜레스테롤 대사 개선

##### (가) ACE 저해활성

다시마 및 감태에서 추출한 fucoidan을 효소분해, 산가수분해 및 가열분해 시킨 후 분자량 수준별 분획물의 ACE 저해활성을 측정하였다. 다시마 fucoidan의 ACE 저해활성은 효소(Flavozyme) 가수분해 후 분자량 100-50 kDa 획분이 55.2%로 가장 높았으며, 열처리한 100 kDa 이상 획분이 47.0%, 효소(Flavozyme) 처리 후 100 kDa 이상 획분이 43.2% 순으로 높았으며, Econase CE 효소 및 산 처리한 획분에서는 40% 미만의 낮은 활성이 나타났다. 감태에서 추출한 fucoidan의 ACE 저해활성은 효소(Flavozyme)처리 후 분자량 100 kDa 이상의 획분에서 39.5%로 가장 높게 나타났으며, 열처리한 50-10 kDa의 획분이 29.1%, 효소(Flavozyme)처리한 100-50 kDa 획분이 26.3%의 순으로 높았고, Econase CE 효소 및 산 처

리한 획분에서는 20% 미만의 낮은 활성값을 보였다. ACE 저해활성은 다시마에서 추출한 fucoidan의 ACE 저해활성이 감태에서 추출한 fucoidan 보다 훨씬 높은 활성을 갖는 것을 알 수 있었다(Table 66).

Table 66. ACE inhibitory activity of enzyme and acid hydrolyzed and heat treated fucoidan from brown seaweed

	MW <sup>2)</sup>	<i>L. japonica</i>	<i>Ecklonia cava</i>
		ACE inhibitory activity (%) <sup>1)</sup>	
E-F <sup>3)</sup>	f-1 <sup>5)</sup>	43.2	39.5
	f-2	0.0	26.3
	f-3	55.2	16.5
	f-4	35.4	0.0
E-E <sup>4)</sup>	f-1	35.5	17.4
	f-2	24.9	14.8
	f-3	27.8	16.4
	f-4	21.9	0.0
Acid	f-1	14.6	6.9
	f-2	35.4	14.2
	f-3	2.1	7.2
	f-4	13.0	3.0
Heat	f-1	47.0	23.6
	f-2	4.9	25.6
	f-3	26.1	29.1
	f-4	25.7	15.4

<sup>1)</sup> ACE inhibitory activity of polysaccharides was determined at concentration of 100 µL/mL

<sup>2)</sup> MW: Molecular weight, <sup>3)</sup> E-F: Enzyme (Flavozyme), <sup>4)</sup> E-E: Enzyme (Econase CE),

<sup>5)</sup> f-1 (MW: 100 kDa ↑); f-2 (MW: 100-50 kDa); f-3 (MW: 50-10 kDa); f-4 (MW: 10 kDa ↓)

#### (나) 항혈액응고활성

다시마 및 감태로부터 추출한 fucoidan의 *in vitro* 항혈액응고활성 조사를 위한 실험으로서 혈액의 응고기전 중 내인성경로(intrinsic pathway)와 관련되는 activated partial thromboplastin time(APTT)과 외인성경로(extrinsic pathway)와 관련되는 prothrombin time(PT)을 측정하여 Table 67에 나타내었다. 다시마 fucoidan을 Flavozyme으로 처리한 군의 100 kDa 이상 획분과 50-10 kDa 획분에서 APTT 및 PT는 각각 190초 이상 및 50초 이상으로 대조구의 34.9초 및 12.7초 보다 더 높은 활성을 나타내었다. 또한 다시마 fucoidan을 Econase CE로 처리한 군의 100 kDa 이상 획분과 100-50 kDa 획분에서도 190초 이상 및 50초 이상의 높은 활성을 나타내었다. 감태 fucoidan을 Flavozyme으로 처리한 군에서는 100 kDa 이상의 획분에서 APTT 및 PT는 각각 190초 이상 및 50초 이상으로 나타났으며, Econase CE로 처리한 군에서는 100 kDa 이상의 획분 및 50-10 kDa 획분에서 190초 이상 및 50초 이상의 높은 활성이 나타났다. 대체적으로 fucoidan은 분자량이 100 kDa 이상과 50-10 kDa 사이에서 높은 항혈액응고 활성을 나타내었는데 이는 고분자 특성을 갖는 산성다당체의 구조적 특성에 기인한 것으로 사료되었다.



Table 67. Anticoagulant activity of enzyme hydrolyzed fucoidan

Sample	Fraction	Anticoagulant activity <sup>1)</sup> (sec)	
		APTT	PT
Heparin		190.0	14.5
Control	(Plasma)	34.9	12.7
<i>L. japonica</i>	F-f-1 <sup>2)</sup>	* <sup>4)</sup>	** <sup>5)</sup>
	F-f-2	19.1	8
	F-f-3	*	**
	F-f-4	19.1	8.0
	C-f-1 <sup>3)</sup>	*	**
	C-f-2	*	**
	C-f-3	16.3	*8
	C-f-4	30.8	13
	F-f-1	*	**
	F-f-2	40.6	15.2
	F-f-3	39.5	11.2
	F-f-4	43	12.5
<i>E. kurome</i>	C-f-1	*	**
	C-f-2	77.7	7.3
	C-f-3	*	**
	C-f-4	77.7	15.7

<sup>1)</sup> Anticoagulant activity, anti-platelet aggregation activity and turbidity was estimated at 100  $\mu$ L/mL

<sup>2)</sup> F-f-1 (Flavozyme: 100 kDa  $\uparrow$ ); F-f-2 (Flavozyme: 100-50 kDa); F-f-3 (Flavozyme: 50-10 kDa); F-f-4 (Flavozyme: 10 kDa  $\downarrow$ ), <sup>3)</sup> C-f-1 (Econase CE: 100 kDa  $\uparrow$ ); C-f-2 (Econase CE: 100-50 kDa); C-f-3 (Econase CE: 50-10 kDa); C-f-4 (Econase CE: 10 kDa  $\downarrow$ ), <sup>4)</sup> 190 sec  $\uparrow$ , <sup>5)</sup> 50 sec  $\uparrow$

다시마 및 감태로부터 추출한 fucoidan의 수식방법에 따른 항혈액응고활성을 Table 68에 나타내었다. 다시마 fucoidan 산 처리구에서 50 kDa 이상획분이 APTT 및 PT가 190초 이상 및 50초 이상으로 가장 높은 활성을 보였으며, 고온가압 처리구에서는 50-10 kDa획분에서 190초 이상 및 50초 이상으로 가장 높은 활성을 나타내었다. 감태 fucoidan 산 처리구에서는 100 kDa 이상의 획분에서 가장 높은 활성을 보인 반면, 고온가압 처리구에서는 50 kDa 이상의 획분에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 다시마 fucoidan에서는 산 처리시 고분자의 획분에서 항혈액응고활성이 높게 나타난 반면, 고온 가압 처리시에는 저분자 획분에서 그 활성이 높게 나타났다. 또한 감태 fucoidan은 산 및 고온가압 처리시 고분자의 획분에서 그 활성이 높게 나타난 것을 알 수 있었다.

Table 68. Anticoagulant activity of acid and heat(121°C) treated fucoidan

Treatment	Sample	Fraction	Anticoagulant activity <sup>1)</sup> (sec)	
			APTT	PT
	Heparin		190.0	14.5
	Control (plasma)		34.9	12.7
Acid hydrolysis	<i>L. japonica</i>	f-1 <sup>2)</sup>	* <sup>3)</sup>	** <sup>4)</sup>
		f-2	*	**
		f-3	91.3	19.5
		f-4	24.7	15.6
	<i>E. kurome</i>	f-1	*	**
		f-2	76.2	19.3
		f-3	52.9	16.4
		f-4	70.2	19.3
Autoclaving (121°C)	<i>L. japonica</i>	f-1	17.4	**
		f-2	23.2	**
		f-3	*	**
		f-4	35.4	12.3
	<i>E. kurome</i>	f-1	*	**
		f-2	*	**
		f-3	*	48.4
		f-4	46.4	15.1

<sup>1)</sup> Anticoagulant activity of polysaccharides was determined at concentration of 100 µL/mL,

<sup>2)</sup> f-1 (MW: 100 kDa ↑); f-2 (MW: 100-50 kDa); f-3 (MW: 50-10 kDa); f-4 (MW: 10 kDa ↓)

<sup>3)</sup> 190 sec ↑, <sup>4)</sup> 50 sec ↑

(다) 혈소판응집 억제 활성

다시마 및 감태로부터 추출한 fucoidan의 혈소판응집 억제활성을 측정하여 Table 69에 나타내었다. Flavozyme으로 처리한 다시마 fucoidan 군의 모든 분자량별 획분에서 Collagen 및 ADP로 유도한 혈소판응집 억제효과는 각각 0.0-21.2% 및 3.5-17.0%의 낮은 활성을 나타내었다. 또한 Econase CE로 처리한 모든 분자량별 획분에서는 혈소판응집 억제활성은 각각 0.0-21.2% 및 0.0-11.8%로 나타나 Flavozyme으로 처리한 결과와 비슷한 낮은 활성을 보였다. 감태 fucoidan을 Flavozyme으로 처리한 모든 획분에서 각각 0.0-6.1% 및 0.0-1.8%의 극히 미미한 혈소판응집 활성을 나타내었다. 또한 Econase CE로 처리한 모든 분자량별 획분에서는 0.0-15.2% 및 0.0-15.7%로 나타남으로서 다시마 및 감태 유래 fucoidan을 효소로 처리시 혈소판응집 억제 활성은 미미한 것으로 나타났다.

Table 69. Antiplatelet aggregation activity of enzyme hydrolyzed fucoidan

Sample	Fraction	Antiplatelet aggregation activity <sup>1)</sup> (%)	
		Collagen	ADP
<i>L. japonica</i>	F-f-1 <sup>2)</sup>	19.7	10.0
	F-f-2	21.2	17.0
	F-f-3	15.2	14.0
	F-f-4	0.0	3.5
	C-f-1 <sup>3)</sup>	12.1	10.0
	C-f-2	0.0	0.0
	C-f-3	12.1	10.0
	C-f-4	21.2	11.8
<i>E. kurome</i>	F-f-1	6.1	0.0
	F-f-2	6.1	0.0
	F-f-3	6.1	0.0
	F-f-4	0.0	1.8
	C-f-1	0.0	4.3
	C-f-2	10.6	10.0
	C-f-3	15.2	15.7
	C-f-4	7.6	0.0

<sup>1)</sup> Anticoagulant activity, anti-platelet aggregation activity and turbidity was determined at 100  $\mu$ L/mL

<sup>2)</sup> F-f-1 (Enzyme: Flavozyme; MW: 100 kDa  $\uparrow$ ); F-f-2 (Enzyme: Flavozyme; MW: 100-50 kDa)  
F-f-3 (Enzyme: Flavozyme; MW: 50-10 kDa); F-f-4 (Enzyme: Flavozyme; MW: 10 kDa  $\downarrow$ )

<sup>3)</sup> C-f-1 (Enzyme: Econase CE; MW: 100 kDa  $\uparrow$ ); C-f-2 (Enzyme: Econase CE; MW: 100-50 kDa)  
C-f-3 (Enzyme: Econase CE; MW: 50-10 kDa); C-f-4 (Enzyme: Econase CE; MW: 10 kDa  $\downarrow$ )

<sup>4)</sup> 190 sec  $\uparrow$ , <sup>5)</sup> 50 sec  $\uparrow$

다시마 및 감태 유래 crude fucoidan을 산 및 고온가압 처리 후 혈소판응집 억제 활성을 측정하였다(Table 70). 다시마 유래 crude fucoidan을 산 처리 후 분자량별로 분획하여 측정한 결과 Collagen 및 ADP로 유도한 혈소판응집 억제활성은 각각 10.0-17.1% 및 4.8-14.5%의 범위로 나타났다. 다시마 fucoidan을 고온가압 처리 후 분자량별 분획에 대한 혈소판응집 억제활성은 각각 6.1-18.2% 및 10.5-21.1% 범위였다. 감태 유래 fucoidan을 산 처리한 후 분자량별 분획에 대한 측정한 혈소판응집 억제활성은 각각 4.3-12.9% 및 6.5-11.3%이었으며, 고온가압 처리 시료의 경우는 각각 0.0-19.7% 및 1.3-14.0%의 범위의 활성을 보였다. 결과적으로 다시마 및 감태 유래 crude fucoidan을 효소처리한 경우에는 혈소판응집 억제활성이 거의 나타나지 않았으나 산이나 고온가압 처리에 의해 약간의 활성증가 경향이 나타났다. 이는 기능성 다당체의 분자구조에 미치는 가수분해 효과 등의 영향력 차이에 기인한 것으로 사료되었다.

Table 70. Antiplatelet aggregation activity of acid and heat(121°C) treated fucoidan

Treatment	Sample	Fraction	Anti-platelet aggregation activity <sup>1)</sup> (%)	
			Collagen	ADP
Acid hydrolysis	<i>L. japonica</i>	f-1 <sup>2)</sup>	14.3	4.8
		f-2	10.0	8.1
		f-3	17.1	14.5
		f-4	12.9	14.5
	<i>E. kurome</i>	f-1	12.9	11.3
		f-2	4.3	6.5
		f-3	12.9	10.0
		f-4	5.7	8.1
Autoclaving (121°C)	<i>L. japonica</i>	f-1	13.6	14.8
		f-2	18.2	10.5
		f-3	15.2	21.1
		f-4	6.1	15.8
	<i>E. kurome</i>	f-1	19.7	14.0
		f-2	15.2	14.0
		f-3	15.2	13.2
		f-4	0.0	1.3

<sup>1)</sup> Anticoagulant activity, anti-platelet aggregation activity and turbidity of polysaccharides was determined at 100 µL/mL,

<sup>2)</sup> f-1 (MW: 100 kDa ↑); f-2 (MW: 100-50 kDa); f-3 (MW: 50-10 kDa); f-4 (MW: 10 kDa ↓)

<sup>3)</sup> 190 sec ↑, <sup>4)</sup> 50 sec ↑

(2) *in vivo* 콜레스테롤 대사 개선

(가) HMG-CoA reductase 저해활성

고지혈증이 유도된 hamster를 동물모델로 하여 fucoidan의 농도를 달리하여 6주간 사료와 함께 공급하면서 실험식이에 따른 HMG CoA reductase 저해활성을 조사하였다. FH(fucoidan high dose) 실험식이군이 대조실험군에 비해 고지혈증 사료식이군과 일반식이군이 각각 35.28% 및 41.42%의 HMG-CoA reductase 저해활성을 나타내었으며 전반적으로 농도 의존적으로 HMG-CoA reductase 저해활성을 나타내었다(Table 71과 Fig. 87).

Table 71. Fucoidan을 급여한 hamster의 HMG-CoA reductase 저해 활성

Experimental diet	Diet group	Specific activity
Basal diet(BS)	A(Negative control)	5.07±0.51
	B(Positive control)	5.64±0.34
High fat diet(HF)	C(HF + Fucoidan High)	3.65±0.24
	D(HF + Fucoidan Medium)	3.98±0.54
	E(HF + Fucoidan Low)	4.53±0.63
Basal diet(BS)	F(BS + Fucoidan High)	3.54±0.42
	G(BS + Fucoidan Low)	4.26±0.45

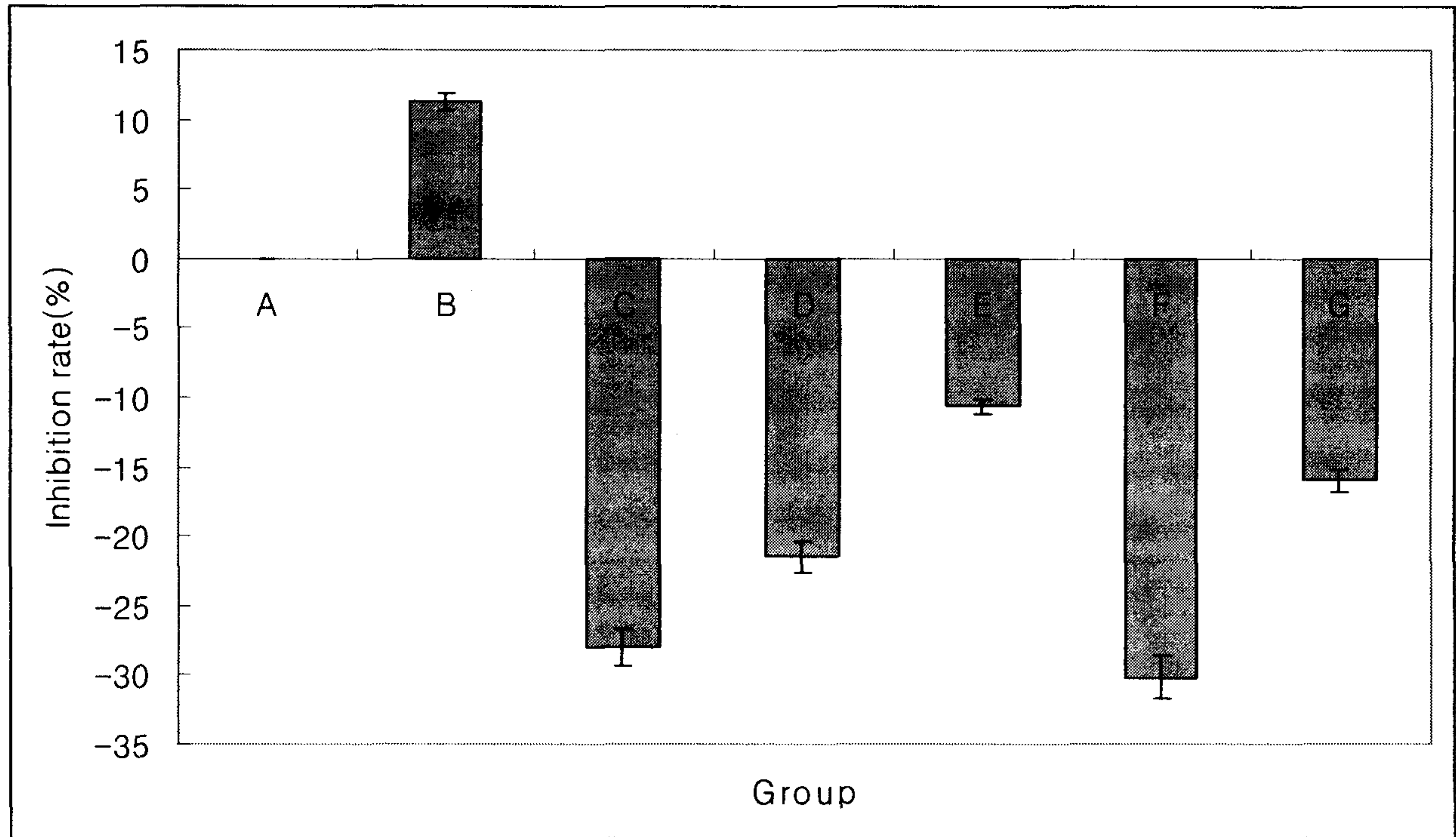


Fig. 87. HMG CoA reductase inhibition activity of hamster liver fed fucoidan containing diet for 6 weeks

Fucoidan의 농도를 달리하여 6주간 사료와 함께 공급한 hamster의 혈청지질 성분을 Table 72에 나타내었다. 고지방식이를 섭취한 군은 일반식이 급여군보다 전체적으로 TC(Total-cholesterol), TG(Triglyceride), HDL(HDL-cholesterol) 및 LDL(LDL-cholesterol)이 모두 증가하였다. 대조군의 TC는  $759.29 \pm 34.43$  mg/dL로 실험식이군에 비해 월등히 높은 수치를 나타낸 반면, HDL은  $184.77 \pm 28.15$  mg/dL로 실험군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. C(HF + Fucoidan High), D(HF + Fucoidan Medium) 및 E(HF + Fucoidan Low)군은 대조군에 비해 HDL(HDL-cholesterol) 값이 각각 2.93, 3.45 및 5.11% 높게 나타났다. 특히, E(HF + Fucoidan Low)군은 대조군에 비해 LDL 값이 5.50% 낮게 나타나 fucoidan의 급여는 rat에 대한 혈청내 지질성분에 대한 콜레스테롤 개선효과가 있는 것으로 판단된다.

Table 72. Fucoidan을 급여한 hamster의 혈청지질성분

Group	serum cholesterols (mg/dL)				AI
	TC	TG	HDL	LDL	
A	141.54±3.51	65.57±2.14	101.05±4.25	32.56±0.76	0.4
B	759.29±34.43	719.23±30.05	184.77±28.15	259.84±24.82	3.1
C	698.70±23.15	608.74±18.50	169.54±8.08	244.22±15.50	3.1
D	631.88±26.24	485.23±13.80	175.54±8.03	215.84±10.83	2.6
E	631.22±28.81	581.84±12.27	185.85±9.04	181.33±10.51	2.4
F	352.04±2.26	299.25±2.28	167.54±1.33	90.54±1.33	1.1
G	313.56±2.43	393.00±2.24	166.35±1.74	56.52±1.32	0.9

A: Negative control, B: Positive control, C: HF+Fucoidan High, D: HF+Fucoidan Medium, E: HF+Fucoidan Low, F: BS+Fucoidan High, G: BS+Fucoidan Low

### 3. Fucosterol

#### 가. 콜레스테롤 대사 개선

##### (1) *in vivo* 활성

##### (가) HMG-CoA reductase 저해활성

고지혈증이 유도된 hamster에게 fucosterol의 농도를 달리하여 6주간 사료와 함께 공급하면서 실험식이에 따른 HMG-CoA reductase 저해활성을 조사하였다. FSH (Fucosterol high dose, 10 mg/kg) 함유 고지방식이 및 일반식이군은 대조실험군에 비해 각각 51.28 및 54.83%의 HMG-CoA reductase 저해활성을 나타내었으며 전반적으로 농도 의존적으로 HMG-CoA reductase 저해활성이 나타났다(Table 73과 Fig. 88). 이 결과로 보아 Fucosterol이 laminaran 및 fucoidan보다 상대적으로 높은 HMG-CoA reductase 저해활성을 나타내는 것으로 사료되었다.



Table 73. Fucosterol을 급여한 hamster의 HMG-CoA reductase 저해 활성

Experimental Diet	Diet group	Specific activity
Bassal diet(BS)	A(Negative control)	5.07±0.51
	B(Positive control)	5.64±0.34
High fat diet(HF)	C(HF + Fucosterol High, 10 mg/kg)	3.04±0.14
	D(HF + Fucosterol Medium, 5 mg/kg)	3.57±0.26
	E(HF + Fucosterol Low, 1 mg/kg)	4.23±0.33
Basal diet(BS)	F(BS + Fucosterol High, 10 mg/kg)	2.86±0.29
	G(BS + Fucosterol Low, 1 mg/kg)	3.52±0.37

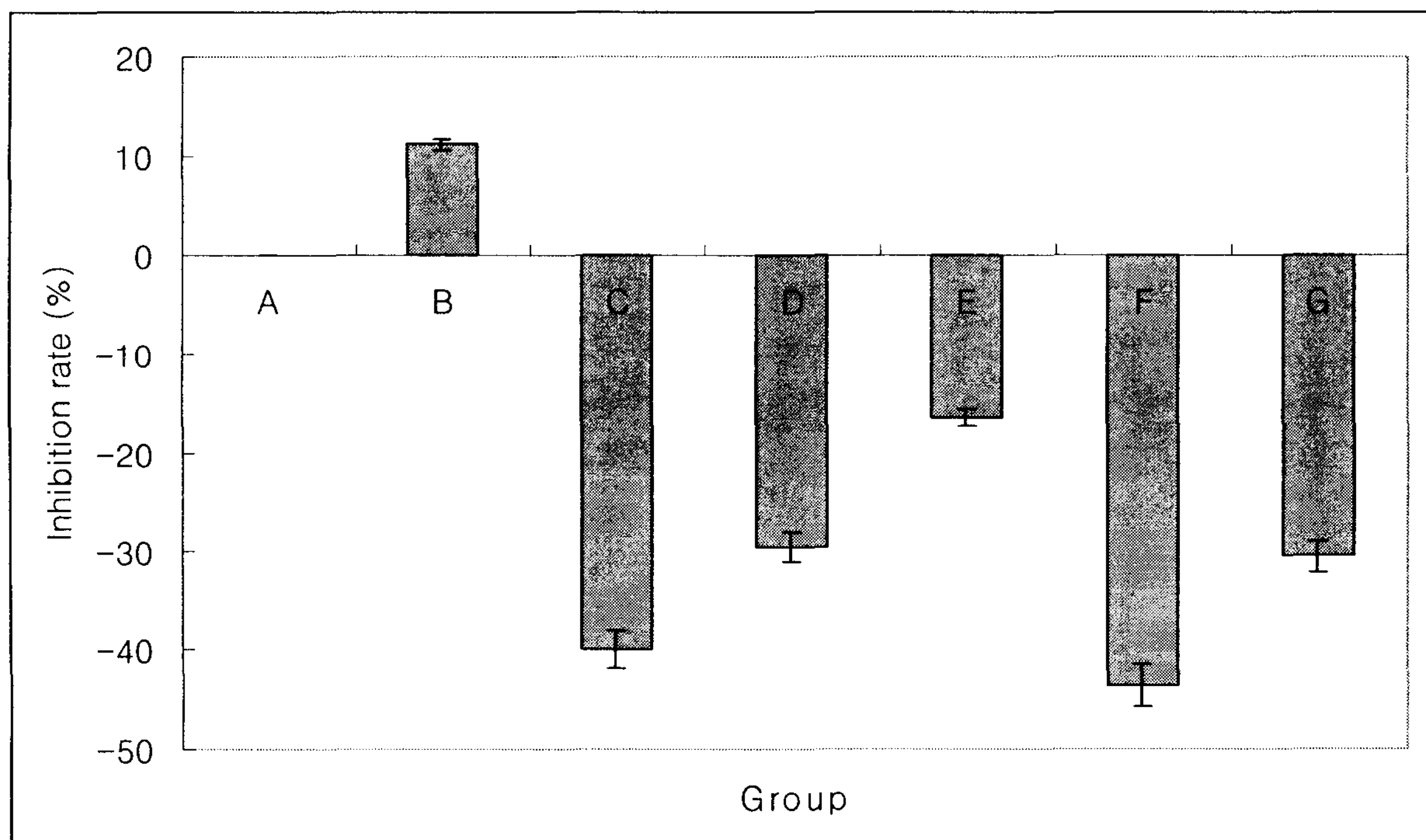


Fig. 88. HMG-CoA reductase inhibition activity of hamster liver fed fucosterol containing diet for 6 weeks

Fucoesterol의 HMG-CoA reductase 저해활성의 IC<sub>50</sub> 값은 2.34 µg/mL으로 나타났다. 이는 laminaran의 167.33 µg/mL보다 더 낮은 값으로 fucoesterol이 laminaran보다 더 높은 활성이 있는 것으로 나타났다(Table 74).

Table 74. IC<sub>50</sub> of fucoesterol on HMG-CoA reductase activity (unit : µg/mL)

Material	IC <sub>50</sub>
Fucoesterol	2.34

(나) 항고지혈증 활성

7주령의 SD계 rat(200±20 g)를 동물모델로 하여 고지방식을 2주일간 급여하여 고지혈증을 유발시킨 다음 기능성 물질을 투여하여 혈중콜레스테롤 등 지질성분 변화에 미치는 영향을 조사하는 방법으로 항고지혈증 활성평가 실험을 행하였다.

정상군(Normal)은 시판용 일반식이(AIN-diet)와 물을 임의로 섭취케 하고, 대조군(Control) 및 실험군은 고지방식이(1% cholesterol, 2% corn oil, 10% lard)에 의한 고지혈증(Hyperlipidemia)을 유발하였으며, 실험기간 동안 고지방식을 계속 자유 급이 시켰다.

FSH(Fucoesterol high dose, 10 mg/kg), FSL(Fucoesterol low dose, 1 mg/kg), corn oil(corn oil, 3 mL/kg) 및 Lova(Lovastatin, 50 mg/kg)군의 실험군은 각각의 시료를 매일 오전 같은 시간에 2주일간 경구 투여하였다. 그 결과 총 콜레스테롤은 대조군(Control) 및 corn oil 경구투여군은 정상군(Normal)에 비해 유의하게 증가한 반면, fucoesterol 투여군 및 Lova 군은 그 증가량이 현저히 감소하였다.

또한 fucoesterol 및 항콜레스테롤 약제인 Lovastatin 투여군은 HDL-cholesterol이 증가하였으며, LDL-cholesterol의 함량이 유의적으로 감소하였다. 이 결과로 보아 fucoesterol은 항콜레스테롤 약제인 Lovastatin에 버금가는 항콜레스테롤 효과를 기대할 수 있을 것으로 판단되었다(Table 75).

Table 75. Effect of fucosterol and lovastatin on serum cholesterols, TG and AI in rats fed high fat diet

Group <sup>1)</sup>	Total-Chol. (mg/dL)	HDL-Chol. (mg/dL)	LDL-Chol. (mg/dL)	TG (mg/dL)	AI
Normal	69.53±8.52 <sup>a</sup>	35.38±5.67 <sup>a</sup>	19.52±4.32 <sup>a</sup>	71.21±8.63 <sup>a</sup>	0.96±0.11 <sup>ab</sup>
Control	80.67±10.38 <sup>b</sup>	35.33±4.21 <sup>a</sup>	27.33±6.99 <sup>b</sup>	83.22±10.37 <sup>b</sup>	1.28±0.15
FSH	73.84±9.63 <sup>a</sup>	41.33±7.25 <sup>b</sup>	17.71±4.68 <sup>a</sup>	75.33±10.34 <sup>ab</sup>	0.78±0.11 <sup>a</sup>
FSL	71.34±8.22 <sup>a</sup>	38.55±4.27 <sup>b</sup>	16.24±4.25 <sup>a</sup>	71.07±6.45 <sup>a</sup>	0.85±0.10 <sup>ab</sup>
Corn oil	82.74±5.44 <sup>b</sup>	36.73±5.60 <sup>a</sup>	29.24±7.14 <sup>b</sup>	84.75±7.21 <sup>b</sup>	1.25±0.19 <sup>b</sup>
Lova <sup>2)</sup>	73.55±7.26 <sup>a</sup>	40.26±6.33 <sup>b</sup>	15.24±3.44 <sup>a</sup>	75.23±4.36 <sup>ab</sup>	0.82±0.13 <sup>ab</sup>

<sup>1)</sup> Normal : Negative control; Control : Positive control; FSH : Fucosterol high dose, 10 mg/kg;

FSL : Fucosterol low dose, 1 mg/kg; corn oil : corn oil, 3 mL/kg;

<sup>2)</sup>Lova : Lovastatin, 50 mg/kg

#### 나. 혈류개선

##### (1) Fucosterol의 *in vivo* 혈류개선 효과

##### (가) 실험동물

5주령의 SD rat(male)을 1주일 동안 실험환경 조건에 적응시킨 후 동물의 체중에 따라 각 군의 평균체중을 137.5±2.9 g이 되도록 플라스틱 케이지에 실험군은 2마리씩 3케이지, normal군 및 control군은 2마리씩 4케이지에 넣어 5군[정상식이대조군(Normal), 고지방식이대조군(Control), 고지방식이 실험대조군(FC), fucosterol 저농도 투여실험군(FL) 및 fucosterol 고농도 투여실험군 (FH)]으로 구분하여 사육하였다(Table 76).

고지혈증(Hyperlipidemia)을 유발시키기 위해 1% cholesterol, 2% corn oil, 10% lard를 혼합한 고지방식을 실험기간(2주) 동안 자유섭취 시켰으며 FL 및 FH군은 각각 1 mg/kg/bw 및 10 mg/kg/bw의 fucosterol을 corn oil로 용해하여 매일 1 mL씩 같은 시간에 경구 투여하였고, 실험 대조군(FC)은 동일 용량의 corn oil을 매일 경구투여 하였다. 체중은 사육 기간 동안 격일로 오전 중에 측정하고, 식이 섭취량은 매일 식이 잔량을 측정하여 산출 하였다.

실험기간 동안의 사육환경은 23±2℃, 상대습도 55±10%를 유지하였고 인공조명 (12시간 점등, 12시간 소등) 하에서 사육하며 물과 식이는 자유 공급하였다.

Table 76. Experimental design of animal test

Groups(No.)	Treatment
Normal (8)	Not hyperlipidemia induced rats
Control(8)	Hyperlipidemia induced rats
FC(6)	Hyperlipidemia induced rats supplemented 1 mL corn oil/day
FL(6)	Hyperlipidemia induced rats supplemented fucosterol at 1 mg/kg/bw/1 mL corn oil/day
FH(6)	Hyperlipidemia induced rats supplemented fucosterol at 10 mg/kg/bw/1 mL corn oil/day

(나) 체중 증가량, 사료 섭취량 및 식이효율

고지혈증을 유발한 Rat에 fucosterol을 농도별로 섭취시킨 후 체중 증가량, 사료 섭취량 및 식이효율을 나타낸 것이다. 실험기간 동안 체중증가량, 사료섭취량 및 식이효율은 고지혈증을 유발시킨 대조군 및 실험군들(Control, FC, FL and FH)이 정상대조군(Normal)보다 높은 수치를 나타냈으나, 군간의 유의적인 차이는 없었다.(Table 77)

Table 77. Fucosterol 투여 Rat의 체중, 식이섭취량 및 FER

Groups	Weight gain (g/day)	Diet intake (g/day)	FER <sup>2)</sup>
Normal	7.55±0.92 <sup>2)</sup>	27.0±3.0	0.28±0.31
Control	8.43±0.93	23.8±3.2	0.35±0.29
FC	9.98±1.69	22.3±2.2	0.45±0.77
FL	10.54±1.58	23.1±1.9	0.46±0.83
FH	10.42±1.29	22.8±2.5	0.46±0.52

<sup>1)</sup> Values are mean±S.D    <sup>2)</sup> FER=Body weight gain (g/day)/Food intake(g/day)

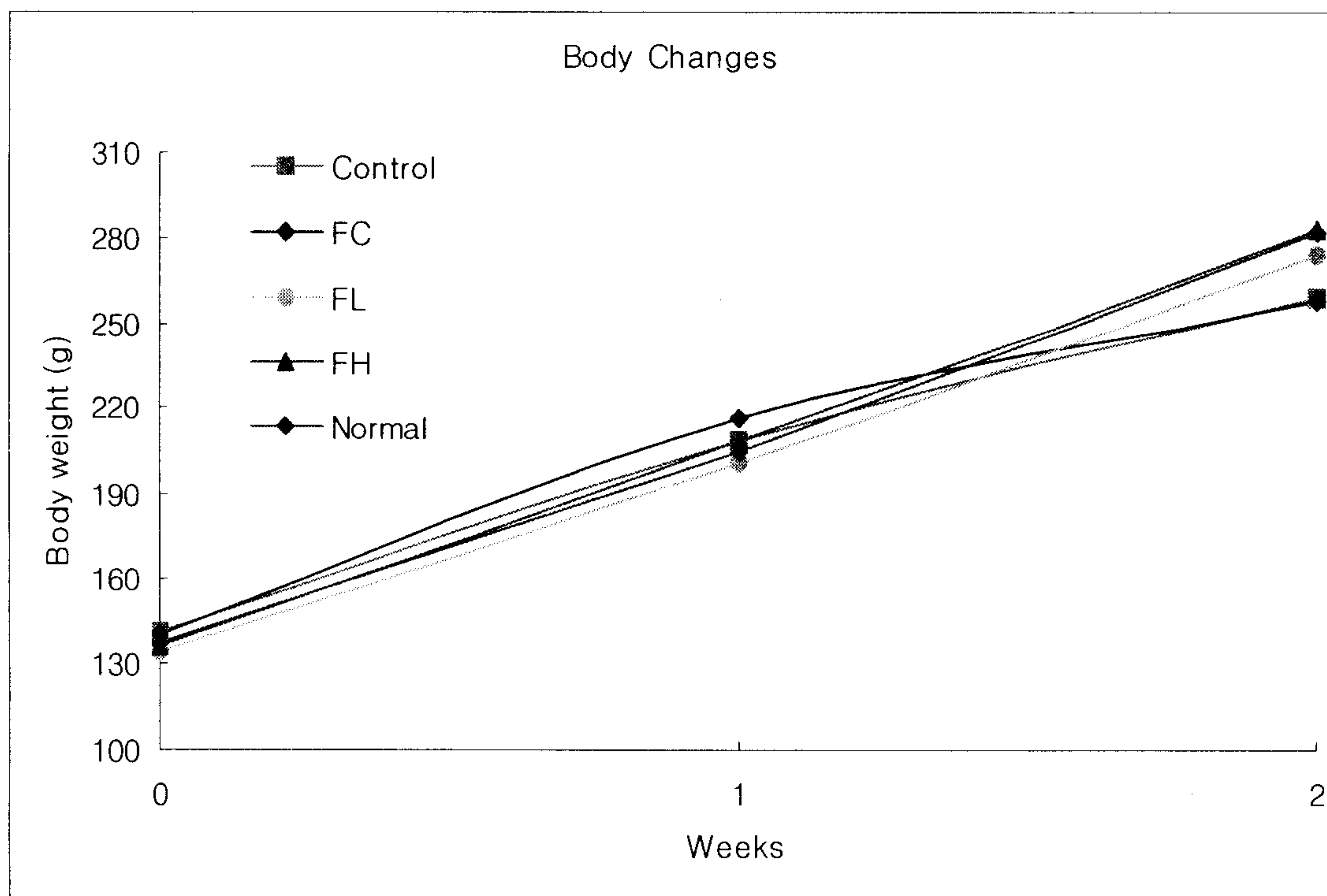


Fig. 89. 고지혈증이 유도된 rat의 체중변화에 미치는 fucosterol의 영향  
(다) 혈청지질 농도

2주간 고지방식이를 급여하여 Hyperlipidemia를 유발시킨 rat에게 fucosterol을 매일 1 mg 및 10 mg씩 투여한 후 측정된 혈청 지질농도는 Table 78에 나타내었다. Total cholesterol은 고지혈증을 유발한 모든 실험군에서 정상대조군(Normal) 보다 높게 나타났는데 이는 고지방식이의 영향으로 사료되었다. Triglyceride는 매일 1 mg을 투여한 FL군은  $38.7 \pm 11.7$  mg/dL, 10 mg을 투여한 FH군은  $39.7 \pm 12.7$  mg/dL로 나타나 고지혈증을 유발한 실험대조군(Control)  $45.3 \pm 9.1$  mg/dL에 비하여 각각 14.6% 및 12.4%의 감소 효과가 나타났다.

LDL-cholesterol은 지혈증을 유발한 실험대조군(Control)의  $15.3 \pm 4.0$  mg/dL에 비해 fucosterol을 섭취시킨 실험군들이 FL이  $14.7 \pm 3.1$  mg/dL로 FH이  $13.0 \pm 3.6$  mg/dL로 낮게 나타났다. 콜레스테롤을 말초조직으로부터 간으로 역수송하여 세포에서 LDL-cholesterol의 흡수를 억제시켜 동맥경화 및 혈관장애 개선에 유익한 HDL-cholesterol의 경우도 정상 대조군(Normal)  $25.6 \pm 2.9$  mg/dL과 실험대조군(Control)  $25.7 \pm 7.6$  mg/dL에 비하여 저농도 fucosterol 투여실험군(FL)에서는  $33.5 \pm 6.9$  mg/dL, 고농도 투여실험군(FH)은  $30.5 \pm 3.4$  mg/dL로 모두 높게 나타났다.

이처럼 fucosterol을 투여한 rat의 혈중 HDL-cholesterol은 고지혈증을 유발시키지 않은 정상대조군(Normal)에 비하여 fucosterol의 농도별로 각각 30.9% 및 19.1% 수준으로 유의하게 높은 함량을 나타내었다( $p < 0.05$ ). 동맥경화지수(AI) 또한 fucosterol의 투여 농도별로 각각  $2.4 \pm 0.4$  및  $2.4 \pm 0.6$ 으로 정상대조군(Normal)  $2.8 \pm 0.6$ 에 비하여도 낮게 나타났고, 고지혈증이 유발된 실험대조군(Control)  $3.0 \pm 0.5$ 에 비하여 fucosterol 투여에 의해 약 20% 수준으로 동맥경화 위험지수가 감소되었음을 알 수 있었다.

이러한 결과로 미루어 고지방식이로 고지혈증을 유발한 후 fucosterol을 매일 1 mg 및 10 mg씩 농도별로 rat에 섭취시켜 혈중지질 농도를 측정해 본 결과, 고지혈증을 유발한 실험대조군(Control)에 비해 유의한 지질농도 개선효과를 보였으며 fucosterol의 투여농도에 따라 1 mg과 10 mg간에 농도의존적인 차이가 인정되지 않음으로서 1 mg/kg/bw/day 수준의 투여에서도 소정의 콜레스테롤 대사개선 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료되었다.

Table 78. Fucosterol이 고지혈증이 유도된 rat의 혈중 지질농도에 미치는 영향

Group	Total-cholesterol (mg/dL)	HDL-cholesterol (mg/dL)	LDL-cholesterol (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	AI
Normal	72.5±11.8 <sup>1)</sup>	25.6±2.9	13.0±2.0	39.4±9.8	2.8±0.6
Control	77.0±14.2	25.7±7.6	15.3±4.0	45.3±9.1	3.0±0.5
FC	78.0±16.1	27.5±3.7	14.5±2.4	57.5±13.6	2.4±0.7
FL	78.7±9.5	33.5±6.9	14.7±3.1	38.7±11.7	2.4±0.4
FH	73.5±13.7	30.5±3.4	13.0±3.6	39.7±12.7	2.4±0.6

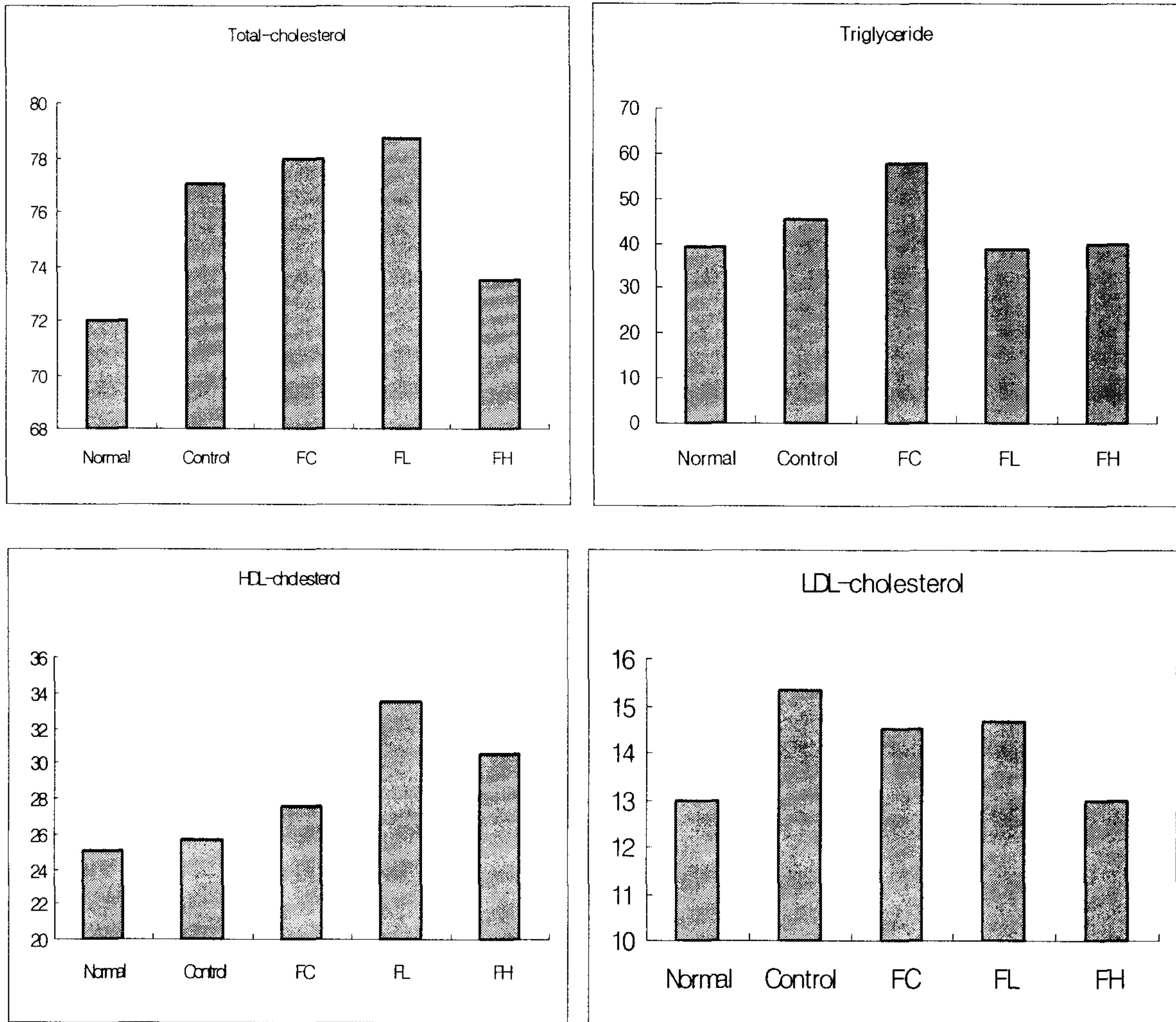


Fig. 90. 고지혈증이 유도된 rat의 혈청 중 지질 농도에 미치는 fucosterol의 영향

(라) 혈류개선 효과

혈액의 흐름에 미치는 fucosterol의 영향을 검토하기 위하여 Micro channel array flow analyzer KH-6을 이용하여 유동용량 25, 50, 75 및 100  $\mu$ L 수준에서의 혈액의 모세관 통과소요 시간을 측정하였다(Table 79). 전반적으로 고지방식이 대조군(Control)과 고지방식이에 corn oil을 첨가한 fucosterol 대조군(FC)의 혈류속도는 유동용량에 무관하게 일반식이대조군(Normal)이나 fucosterol 함유 실험식이군(FL, FH) 보다 현저히 낮은 혈액 유동특성을 보여줌으로써 fucosterol의 우수한 혈류개선 효과를 확인할 수 있었다.



Table 79. 고지혈증이 유도된 rat의 혈류흐름에 미치는 fucosterol의 영향

Group	0 uL	25 uL	50 uL	75 uL	100 uL
Normal	0 <sup>1)</sup>	8.3	16.7	25.4	33.8
Control	0	18.7	41.7	58.2	64.2
FC	0	12.4	34.5	57.0	- <sup>2)</sup>
FL	0	8.6	20.8	42.1	55.2
FH	0	8.8	19.8	34.6	49.6

<sup>1)</sup> sec of blood flow    <sup>2)</sup> Not applicable

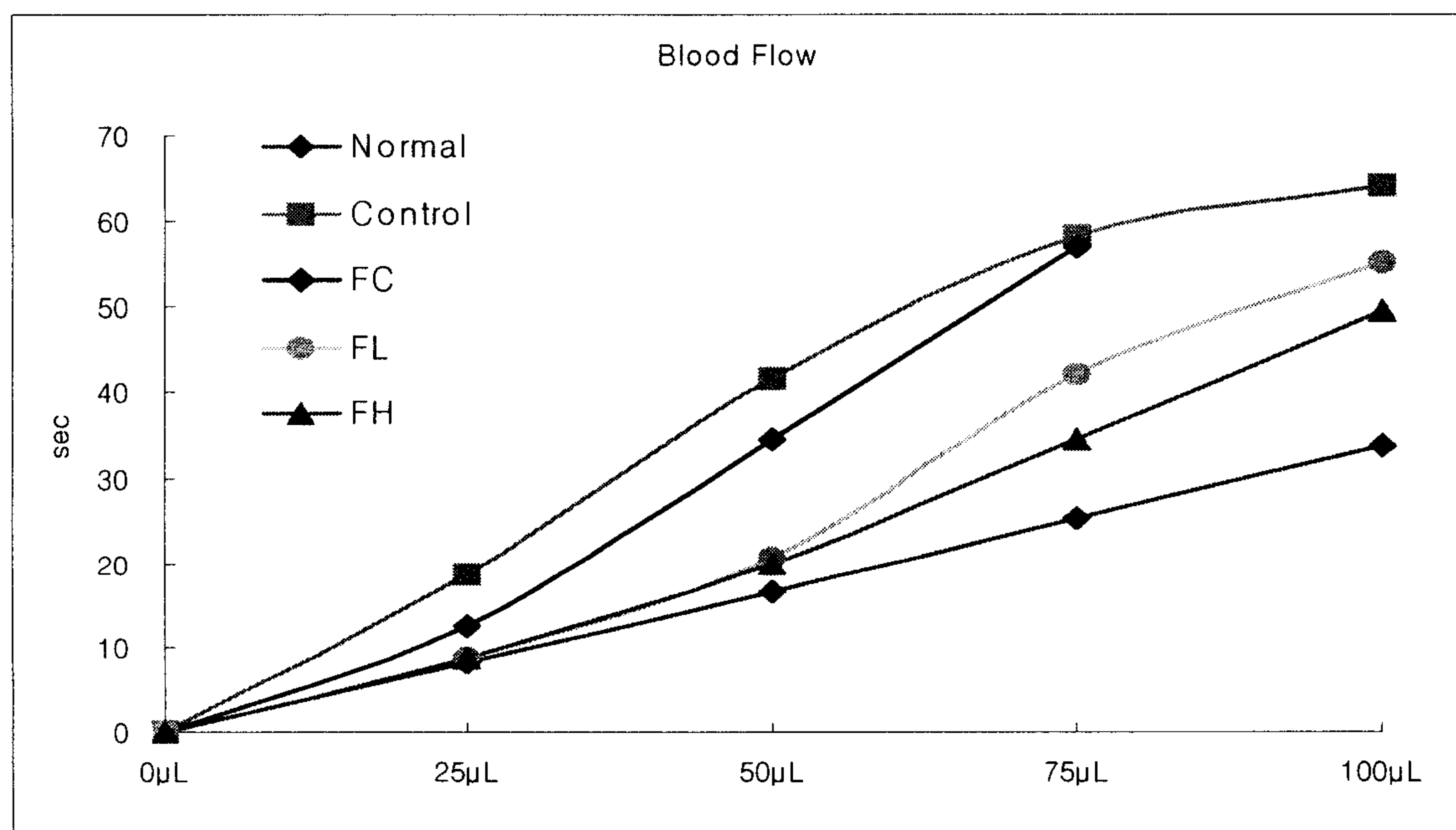


Fig. 91. 고지혈증이 유도된 rat의 혈류흐름에 미치는 fucosterol의 영향

## 제 6 절 안전성 평가

### 1. Laminaran 및 fucoidan의 급성독성 평가(LD<sub>50</sub>)

Laminaran 및 fucoidan에 대한 안전성평가의 일환으로 단회 경구투여시 발현될 수 있는 급성독성 잠재력을 평가하기 위해 식품의약품안전청(KFDA) 고시 의약품등의 독성검사기준(99-61) 중 단회투여독성시험법에 의거 2,000 mg/kg/bw을 최고용량으로 선택하였으며, 희석배수에 따라 모두 5개의 투여 용량군(125, 250, 500, 1,000 및 2,000 mg/kg/bw)을 설정하고 대조군은 증류수 투여군으로 하였다.

실험동물은 4주령의 SPF(특정병원체 부재) SD계(Sprague Dawley) Rat를 구입 확보하여 각 군당 평균체중이 비슷하게 되도록 군 분리를 한 다음, 각 투여 용량군당 암·수 각각 10마리가 되도록 하였으며, 실험물질로는 대황에서 추출 분리한 crude laminaran과 다시마에서 추출·분리한 crude fucoidan을 사용하였다.

투여용량은 20 mL/kg/bw이 되도록 계산하여 1회 경구 투여한 후 처음 6시간까지는 매시간 관찰하였으며, 투여 2일차부터 관찰 종료일인 14일까지 1일 1회 동물의 일반상태 변화, 중독증상 및 폐사동물의 유무를 관찰하였다.

#### 가. 사망동물 및 임상증상

시험기간 동안에 rat 모두에서 폐사동물이 관찰되지 않았으며(Table 80), 비정상적인 임상증상도 관찰되지 않았다(Table 81).

#### 나. 체중변화 및 육안적 해부소견

투여 직전과 투여 후 4, 7, 11 및 14일째에 체중을 측정한 결과 시험물질 투여군과 대조군 사이에 유의성 있는 체중 변화가 관찰되지 않았다(Table 82). 시험 종료 후 생존 동물 모두를 ether로 마취하고 방혈치사 시킨 후 내장 장기의 이상 유무를 육안적으로 관찰한 결과 시험물질에 기인한 내부 장기의 이상 소견은 관찰되지 않았다. LD<sub>50</sub> 및 신뢰한계는 본 실험의 결과 사망례가 없어 측정할 수 없었으며, 다만 rat 모두에서 허용 가능한 용량은 2,000 mg/kg/bw 이상일 것으로 사료된다.

Table 80. Mortality in male and female rats after single oral administration of laminaran and fucoidan (n=10)

	Dose (mg/kg)	Days after treatment														Final Mortality	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14
Male																	
Laminaran	0	0 <sup>1)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
	125	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
	250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
	500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
	1,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
	2,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
Female																	
Laminaran	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
	125	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
	250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
	500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
	1,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
	2,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
Male																	
Fucoidan	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
	125	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
	250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
	500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
	1,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
	2,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
Female																	
Fucoidan	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
	125	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
	250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
	500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
	1,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10
	2,000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/10

<sup>1)</sup>Number of dead animals

Table 81. Clinical signs of rats after single oral administration of laminaran and fucoidan

Sex	Dose (mg/kg)	Clinical sign	Days after treatment															
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
L a m i n a r a n	Male	0	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		125	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		250	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		500	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1,000	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2,000	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F u c o i d a n	Female	0	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		125	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		250	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		500	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1,000	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2,000	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F u c o i d a n	Male	0	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		125	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		250	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		500	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1,000	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2,000	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F u c o i d a n	Female	0	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		125	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		250	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		500	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1,000	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2,000	NAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* NAD, - : no abnormality detected

Table 82. Body weight changes in rats after single oral administration of laminaran and fucoidan (n=10)

			Dose (mg/kg/bw)					
			0	125	250	500	1,000	2,000
L a m i n a r a n	Male	Day 0	110.2	111.4	109.5	109.9	110.9	107.9
		Day 4	118.2	118.6	111.6	111.7	108.7	105.7
		Day 7	127.8	130.6	128.3	125.5	124.5	121.5
		Day 11	164.0	165.8	161.5	166.5	164.9	165.0
		Day 14	206.2	205.2	204.9	203.8	205.2	206.1
	Female	Day 0	107.6	107.6	107.5	108.2	105.6	107.3
		Day 4	119.3	115.6	112.8	113.5	112.5	113.2
		Day 7	130.3	130	132.5	130.7	135.7	132.7
		Day 11	145.9	144.2	142.3	142.7	141	143.5
		Day 14	155.8	157.4	155.3	155.7	154.7	153.7
F u c o i d a n	Male	Day 0	109.1	110.1	108.0	108.0	109.3	106.3
		Day 4	117.5	117.3	110.3	110.3	107.5	104.6
		Day 7	126.2	129.5	127.5	124.4	123.1	120.3
		Day 11	163.9	164.9	160.9	165.0	163.6	164.1
		Day 14	205.5	204.0	203.7	202.1	204.0	205.2
	Female	Day 0	106.3	106.3	106.2	107.9	104.9	106.4
		Day 4	118.7	114.5	111.4	112.3	111.3	112.3
		Day 7	129.6	129.1	131.3	129.4	134.9	131.5
		Day 11	144.9	143.2	141.8	141.3	143.3	142.9
		Day 14	154.1	156.3	154.1	154.0	153.1	152.0

## 2. Laminaran 및 fucosterol 최고용량 초과 경구투여 독성

해조유래 다당인 laminaran 및 해조유래 식물성스테롤인 fucosterol에 대한 안전성평가의 일환으로 단회 경구투여시 발현될 수 있는 급성독성 잠재력을 평가하기 위해 식품의약품안전청(KFDA) 고시 의약품등의 독성검사기준(99-61) 중 단회투여 독성시험법에 의거 2,000 mg/kg/bw의 최고용량보다 더 높게 Laminaran은 8,000 mg/kg/bw으로, fucosterol은 4,000 mg/kg/bw의 용량으로 경구투여 시 흰쥐에서 나타나는 임상증상과 육안적 해부소견 및 혈액학적 성분분석을 행하였다.

Control군은 시료 대신 증류수를 경구 투여하였으며, laminaran 및 fucosterol 투여군은 각각 8,000 mg/kg/bw 및 4,000 mg/kg/bw의 용량을 단회경구투여 하였다. 그 결과 rat의 체중변화량(Fig 92)은 군 간의 유의차가 없었으며, 14일간의 관찰 기간 중 폐사한 동물은 없었다. 또한 혈액학적 분석 결과(Table 83) laminaran 및 fucosterol 투여군은 control 및 normal 군과 비교하여 혈소판의 함량에 다소 차이가 있으나 다른 혈액학적 분석 결과는 유의적인 차이가 없었다.

미국 FDA는 인위적으로 첨가된 식물스테롤 및 식물스테롤에스테르의 안전성에 대하여 무독성물질(GRAS)로 분류하였다. 실제로 유니레버사가 설치류를 대상으로 실시한 13주 독성시험 결과 식물스테롤의 최대무작용량(NOAEL)은 수컷 3,900 mg/kg/bw/day이며 암컷 4,200 mg/kg/bw/day로 관찰되었으며, 또한 *in vitro*에서 실시된 유전독성 실험결과, 아무런 독성도 관찰할 수 없었다고 보고하였다.

또한, 미성숙 쥐를 대상으로 한 자궁비대시험(Uterotrophic assay)에서도 식물스테롤에스테르의 경구투여시 에스트로겐 효과를 나타내지 않았으며, 2대에 걸친 생식독성에서도 부작용은 관찰되지 않았고, 현재까지 2,400명 이상이 식물스테롤 및 식물스테롤 에스테르 관련 인체시험(최고 25 g/day 투여)에 참여하였으나, 지금까지 어떠한 부작용도 보고된 바가 없다고 하였다.

따라서 해조유래 다당인 laminaran 및 스테롤성분인 fucosterol에 대한 독성시험 결과 최대무작용량(NOAEL)은 laminaran은 8,000 mg/kg/bw 이상, fucosterol은 4,000 mg/kg/bw 이상으로 판단되며 fucosterol의 최대무작용량(NOAEL)은 미국 FDA의 식물스테롤의 독성결과와 거의 비슷한 결과로 나타났다.

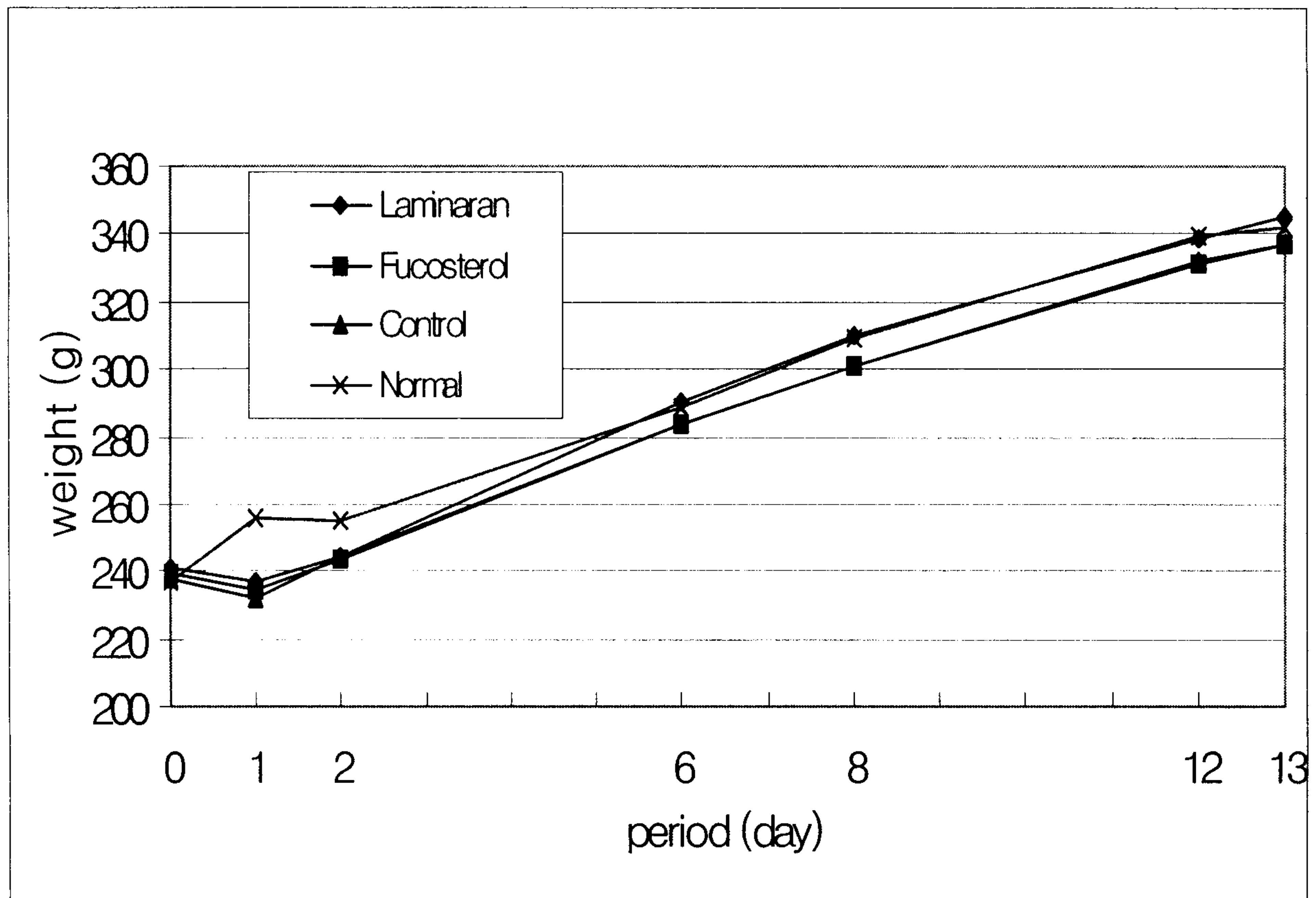


Fig 92. Laminaran 및 fucosterol 투여군의 체중 변화량

Table 83. Laminaran 및 fucosterol 투여군의 혈액학적 특성

Group <sup>1)</sup>	RBC (적혈구수)	Hb (혈색소량)	HCT (hematocrits)	MCV (평균적혈구 용적)	MCH (평균적혈구 혈색소량)	MCHC (평균적혈구 혈색소농도)	Platelet (혈소판)
	Mil/uL	g/dL	%	fL	pg	%	Thous/uL
Laminaran	7.88±0.69 <sup>a</sup>	15.68±1.40 <sup>a</sup>	52.32±4.53 <sup>a</sup>	66.43±1.99 <sup>a</sup>	19.89±0.62 <sup>a</sup>	29.98±0.69 <sup>a</sup>	746.67±88.41 <sup>a</sup>
Fucosterol	8.17±0.65 <sup>a</sup>	15.51±2.17 <sup>a</sup>	53.06±4.01 <sup>a</sup>	65.03±2.67 <sup>a</sup>	18.92±1.69 <sup>a</sup>	29.11±2.39 <sup>a</sup>	745.29±98.04 <sup>a</sup>
Control	7.86±0.83 <sup>a</sup>	15.34±1.92 <sup>a</sup>	51.91±5.36 <sup>a</sup>	66.14±2.59 <sup>a</sup>	19.53±1.00 <sup>a</sup>	29.50±0.82 <sup>a</sup>	771.00±53.54 <sup>ab</sup>
Normal	8.29±0.57 <sup>a</sup>	16.40±1.01 <sup>a</sup>	55.98±4.12 <sup>a</sup>	67.55±1.17 <sup>a</sup>	19.80±0.46 <sup>a</sup>	29.33±1.04 <sup>a</sup>	792.00±112.66 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup> Laminaran : medicated 8,000 mg/kg/bw; Fucosterol : medicated 4,000 mg/kg/bw; Control: medicated distilled water; Normal: medicated distilled water

## 제 7 절 Laminaran과 fucosterol의 기능성식품 소재화

### 1. Laminaran을 주원료로 한 항암 활성 소재화

#### 가. Laminaran을 주원료로 한 항암기능성 음료의 가공

Laminaran을 주원료로 하고 마늘, 녹차 등의 유력한 항암 천연성분의 시너지 효과를 혼합물 조성의 암세포에 대한 독성분석과 반응표면(RSM) 통계분석 방법으로 검토하였으며, 음료타입의 항암기능성 식품 개발이 가능함을 확인하였다.

기능성 항암음료의 개발을 위하여 양파, 마늘, 녹차 및 매실을 시너지물질로 첨가하였을 때의 항암활성을 Table 84에 나타내었다. 중심합성계획인 2차 모형으로 총 35개의 실험을 무작위로 수행하였으며 2차 회귀모형은 다음과 같다.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{14}X_1X_4 + b_{23}X_2X_3 + b_{24}X_2X_4 + b_{34}X_3X_4 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{44}X_4^2$$

여기서 Y는 종속변수(항암활성), X1, X2, X3, X4는 독립변수(시너지물질들의 함량), b0는 절편 및 bn은 회귀계수이다. 또 회귀분석 결과 임계점(critical point)은 최대점을 구하였다. 반응표면분석법으로 계획한 결과 값은 결정계수(R-square)가 0.8520 이었으며, 이때의 시너지 물질의 최적배합비는 laminaran 1%, 양파 1.96%, 마늘 2.10%, 녹차 2.11%, 매실 2.36%, water 90.47%였고, 이 배합의 항암활성 효과는 73.99%로 laminaran을 단일로 첨가한 배합비의 50.4%보다 양파, 마늘, 녹차 및 매실 등의 시너지 물질을 첨가함으로써 23.5%의 항암 시너지 상승효과를 보였다.

Laminaran을 1%로 고정하고 양파, 마늘, 녹차 및 매실을 시너지물질로 각각 1.96%, 2.10%, 2.11%, 2.36%로 배합하였을 때의 항암 활성의 시너지효과를 Fig 93-95에 나타내었다. 양파×마늘의 효과는 77.8%, 양파×녹차는 74.2%, 양파×매실은 73.8%, 마늘×녹차는 73.7%, 마늘×매실은 74.0% 및 녹차×매실의 효과는 73.9%로 각각 나타나 laminaran 단일로 첨가한 50%의 항암활성보다 시너지 물질들을 배합하였을 때 시너지물질들 간의 항암활성 시너지 상승효과가 나타났다. 항암기능성을 기대하는 laminaran 함유 음료제품의 원부재료 배합비는 다음 Table 84와 같다.



Table 84. 항암활성 laminaran 음료의 원부재료 배합비

원부재료	혼합비(w/w.%)	비고
laminaran	1.0	다시마 laminaran
마늘 Ex	1-3	50 °brix
양파 Ex	1-3	-
녹차추출물	1-3	카테킨함량 40%, 분말
매실 Ex	1-3	-
구연산	2.0	-
백설탕	1.0	-
비타민 C	0.2	-
액상과당	1.0	-
정제수	82.8	-

Table 85. 중심합성계획에 의한 laminaran 음료의 항암활성

Model	Laminaran	양파	마늘	녹차	매실	Cytotoxicity <sup>1)</sup>
합량	X0	X1	X2	X3	X4	(%)
1	1	1	1	1	1	55.63
2	1	1	1	1	3	60.34
3	1	1	1	3	1	57.34
4	1	1	3	1	1	56.84
5	1	3	1	1	1	55.23
6	1	1	1	3	3	61.24
7	1	1	3	1	3	62.34
8	1	3	1	1	3	60.12
9	1	1	3	3	1	55.24
10	1	3	1	3	1	56.66
11	1	3	3	1	1	53.78
12	1	1	3	3	3	63.24
13	1	3	1	3	3	58.33
14	1	3	3	1	3	60.42
15	1	3	3	3	1	55.21
16	1	3	3	3	3	64.23
17	1	2	2	2	2	72.34
18	1	2	2	2	2	74.26
19	1	2	2	2	2	73.24
20	1	2	2	2	2	72.46
21	1	2	2	2	2	70.23
22	1	2	2	2	2	72.35
23	1	2	2	2	2	74.16
24	1	2	2	2	2	72.95
25	1	2	2	2	2	72.12
26	1	2	2	2	2	70.13
27	1	3.6	2	2	2	70.25
28	1	0.4	2	2	2	67.36
29	1	2	3.6	2	2	70.26
30	1	2	0.4	2	2	68.56
31	1	2	2	3.6	2	70.12
32	1	2	2	0.4	2	64.12
33	1	2	2	0	3.6	71.33
34	1	2	2	2	0.4	66.47
35	1	0	0	0	0	50.40

1) MTT assay on SNU-1 cellline

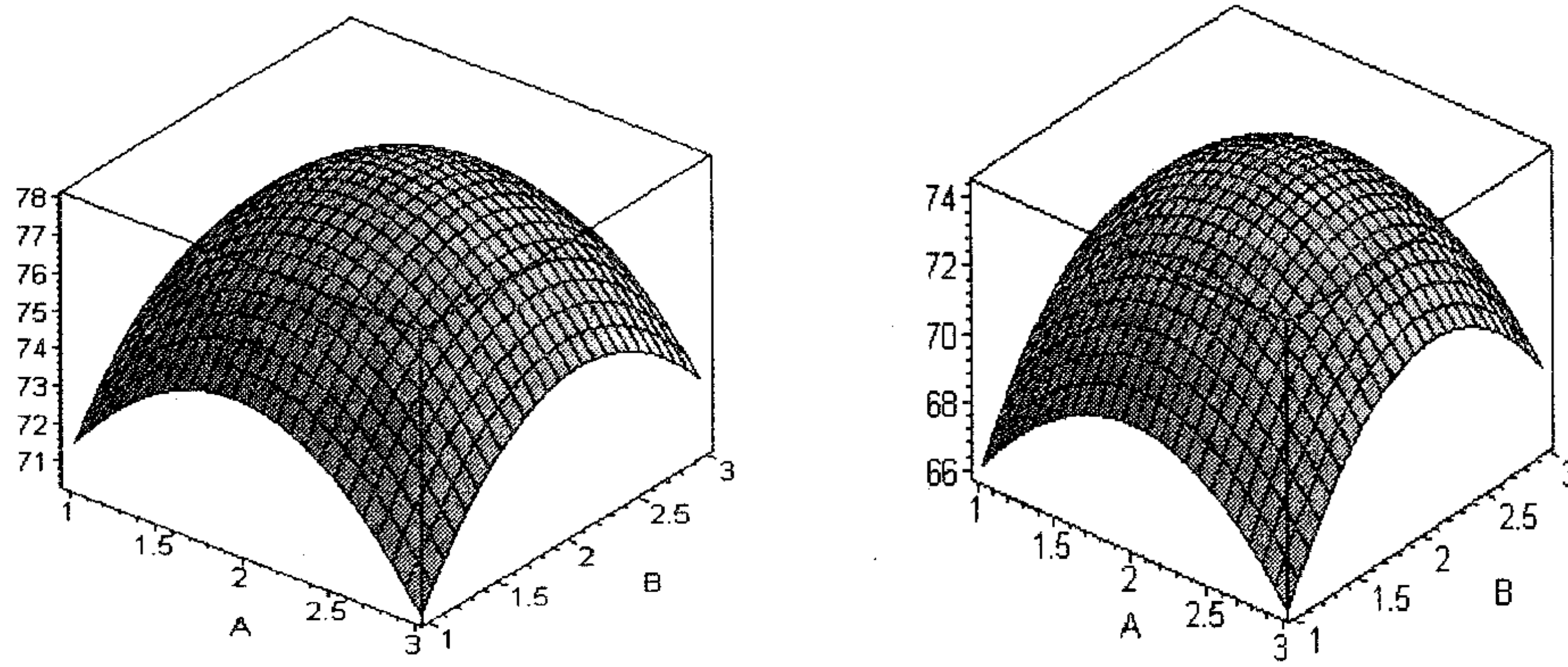


Fig. 93. 양파, 마늘 및 녹차의 함량에 따른 반응표면 분석  
좌; (A:양파; B:마늘), 우; (A:양파; B:녹차)

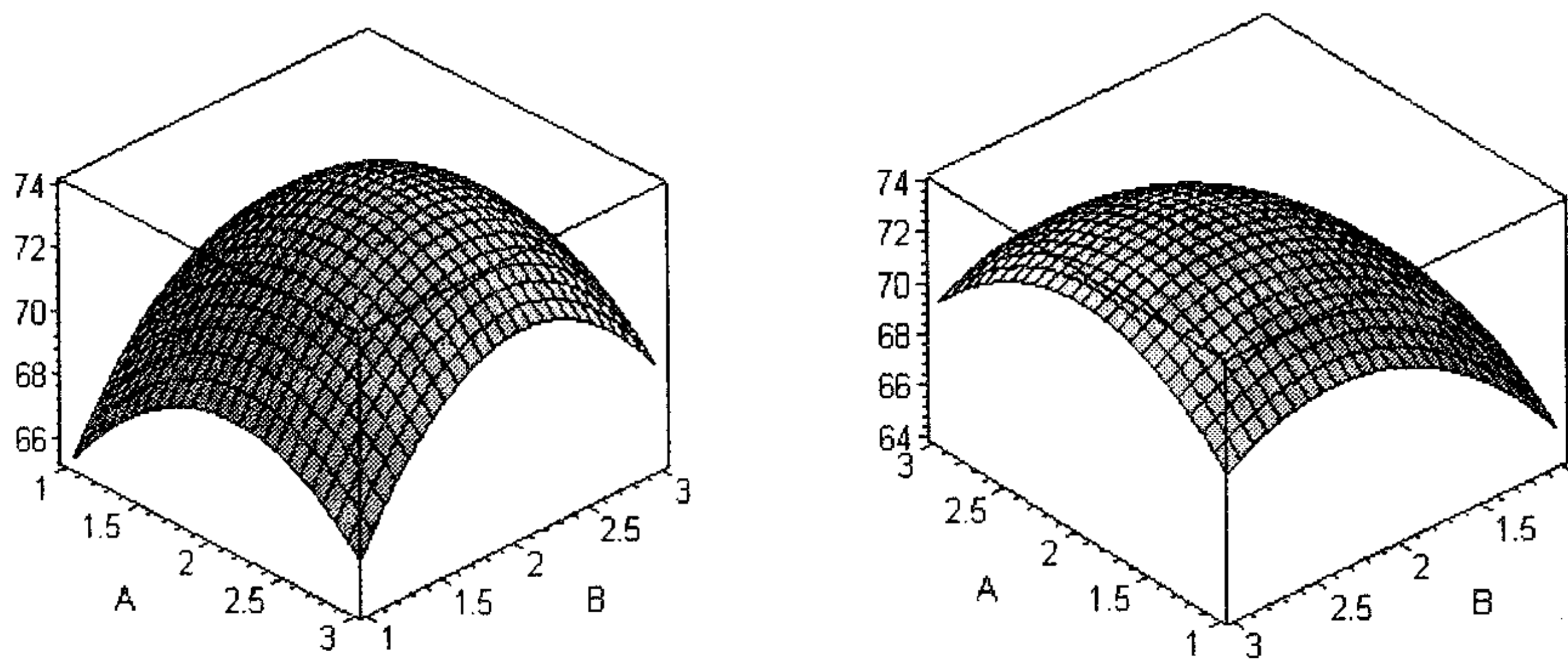


Fig. 94. 양파, 매실, 마늘 및 녹차의 함량에 따른 반응표면 분석  
좌(A:양파; B:매실), 우(A:마늘; B:녹차)

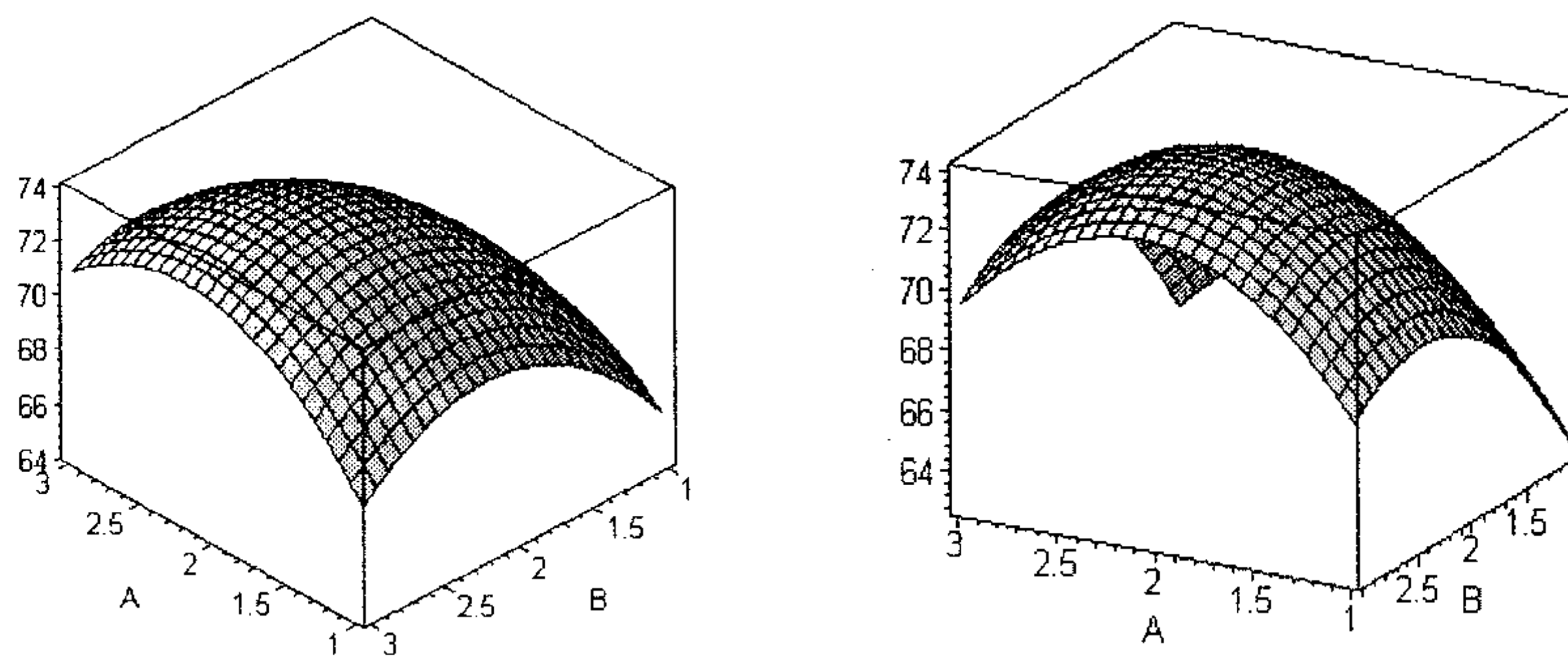


Fig. 95. 마늘, 매실 및 녹차의 함량에 따른 반응표면 분석  
좌(A:마늘; B:매실), 우(A:녹차; B:매실)

나. Laminaran을 주성분으로 하는 항암기능성 캡슐제품의 가공

Laminaran을 주원료로 한 음료제품의 원부재료 배합비를 기본으로 하여 일반적인 영양보충용 캡슐제품의 제조공법에 준하여 laminaran 캡슐제품을 제조하였으며 원부재료 배합비는 다음 Table 86과 같다.

Table 86. 항암기능성 laminaran 캡슐제품의 원부재료 배합비

원·부재료명	배합비(w/w%)	비 고
laminaran	20.0	다시마 laminaran
다시마 Ex	20.0	50 °brix
양 파 Ex	10.0	50 °brix
마 늘 Ex	5.0	50 °brix
녹 차 Ex	10.0	카테킨 함량 40%
매 실 Ex	5.0	50 °brix
비타민 C	15.0	-
토코페롤	2.0	-
미네랄 Mix	2.0	Ca, Zn, Se
유 당	11.0	-

## 2. Fucosterol을 주원료로 한 항고지혈활성 소재화

### 가. Fucosterol을 주원료로 한 항고지혈활성 음료의 가공

기능성 항고지혈증 음료의 개발을 위하여 마늘, 녹차, 식물성스테롤 및 표고버섯 추출물을 시너지물질로 첨가하였을 때의 HMG-CoA reductase 저해 활성을 Table 87에 나타내었다. 중심합성계획인 2차 모형으로 총 35개의 실험을 무작위로 수행하였으며 2차 회귀모형은 다음과 같다.

$$Y=b_0+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_3+b_4X_4+b_{12}X_1X_2+b_{13}X_1X_3+b_{14}X_1X_4+b_{23}X_2X_3+b_{24}X_2X_4+b_{34}X_3X_4+b_{11}X_1^2+b_{22}X_2^2+b_{33}X_3^2+b_{44}X_4^2$$

회귀분석 결과 임계점(critical point)은 최대점을 구하였다. 반응표면분석법으로 계획한 결과 값은 결정계수(R-square)가 0.8745였으며, 이때의 시너지물질의 최적 배합비는 Fucosterol 0.02%, 마늘 2.12%, 녹차 2.41%, 식물성스테롤 1.98%, 표고버섯추출물 2.44%, water 91.03%였고, 이 배합의 HMG-CoA reductase 저해 활성 효과는 73.87%로 fucosterol 단일로 배합한 음료의 50%보다 마늘, 녹차, 식물성스테롤 및 표고버섯 추출물 등의 시너지 물질을 첨가함으로써 23.8%의 HMG-CoA reductase 저해활성 증가의 시너지효과를 보였다.

Fucosterol을 0.02%로 고정하고 마늘, 녹차, 식물성스테롤 및 표고버섯추출물의 시너지 물질을 각각 2.12%, 2.41%, 1.98%, 2.44%로 배합하였을 때의 항고지혈활성의 시너지 효과를 Fig 96-98에 나타내었다. 마늘×녹차의 항고지혈 효과는 74.2%, 마늘×식물성스테롤은 74.0%, 마늘×표고버섯추출물은 73.9%, 녹차×식물성스테롤은 73.9%, 녹차×표고버섯추출물은 73.8% 및 식물성스테롤×표고버섯추출물의 효과는 68.0%로 각각 나타나 fucosterol을 단일로 첨가한 50%의 항고지혈증활성 보다 시너지 물질들을 배합하였을 때 시너지물질들 간의 항고지혈 활성 시너지 상승효과가 나타났다. Fucosterol 함유 항고지혈활성 음료제품의 원부재료 배합비는 다음 Table 88와 같다.

Table 87. Fucosterol 음료의 원부재료 배합비

원부재료	혼합비(w/w.%)	비고
Fucosterol	0.02	다시마유래, 순도 35%
마늘 Ex	1-3	50 °brix
녹차추출물	1-3	카테킨함량 40%, 분말
식물성스테롤	1-3	-
표고버섯추출물	1-3	-
구연산	2.0	-
백설탕	1.0	-
비타민 C	0.2	순도 50%
액상과당	1.0	-
슈가에스테르	0.1	-
정제수	80.7	-

Table 88. 중심합성계획에 의한 fucosterol 음료의 HMG-CoA reductase 저해 활성

Model	Fucosterol	마늘	녹차	식물성스테롤	표고버섯 추출물	HMG-CoA reductase inhibition(%)
합량	X0	X1	X2	X3	X4	
1	0.02	1	1	1	1	56.37
2	0.02	1	1	1	3	52.48
3	0.02	1	1	3	1	58.26
4	0.02	1	3	1	1	53.48
5	0.02	3	1	1	1	57.26
6	0.02	1	1	3	3	62.57
7	0.02	1	3	1	3	68.15
8	0.02	3	1	1	3	58.26
9	0.02	1	3	3	1	55.41
10	0.02	3	1	3	1	50.34
11	0.02	3	3	1	1	58.39
12	0.02	1	3	3	3	60.12
13	0.02	3	1	3	3	57.34
14	0.02	3	3	1	3	64.57
15	0.02	3	3	3	1	53.24
16	0.02	3	3	3	3	67.24
17	0.02	2	2	2	2	69.58
18	0.02	2	2	2	2	73.41
19	0.02	2	2	2	2	75.15
20	0.02	2	2	2	2	76.34
21	0.02	2	2	2	2	72.39
22	0.02	2	2	2	2	78.26
23	0.02	2	2	2	2	76.39
24	0.02	2	2	2	2	75.26
25	0.02	2	2	2	2	70.19
26	0.02	2	2	2	2	46.31
27	0.02	3.6	2	2	2	72.48
28	0.02	0.4	2	2	2	70.4
29	0.02	2	3.6	2	2	72.54
30	0.02	2	0.4	2	2	70.36
31	0.02	2	2	3.6	2	72.49
32	0.02	2	2	0.4	2	69.45
33	0.02	2	2	0	3.6	70.14
34	0.02	2	2	2	0.4	69.57
35	0.02	0	0	0	0	50.00

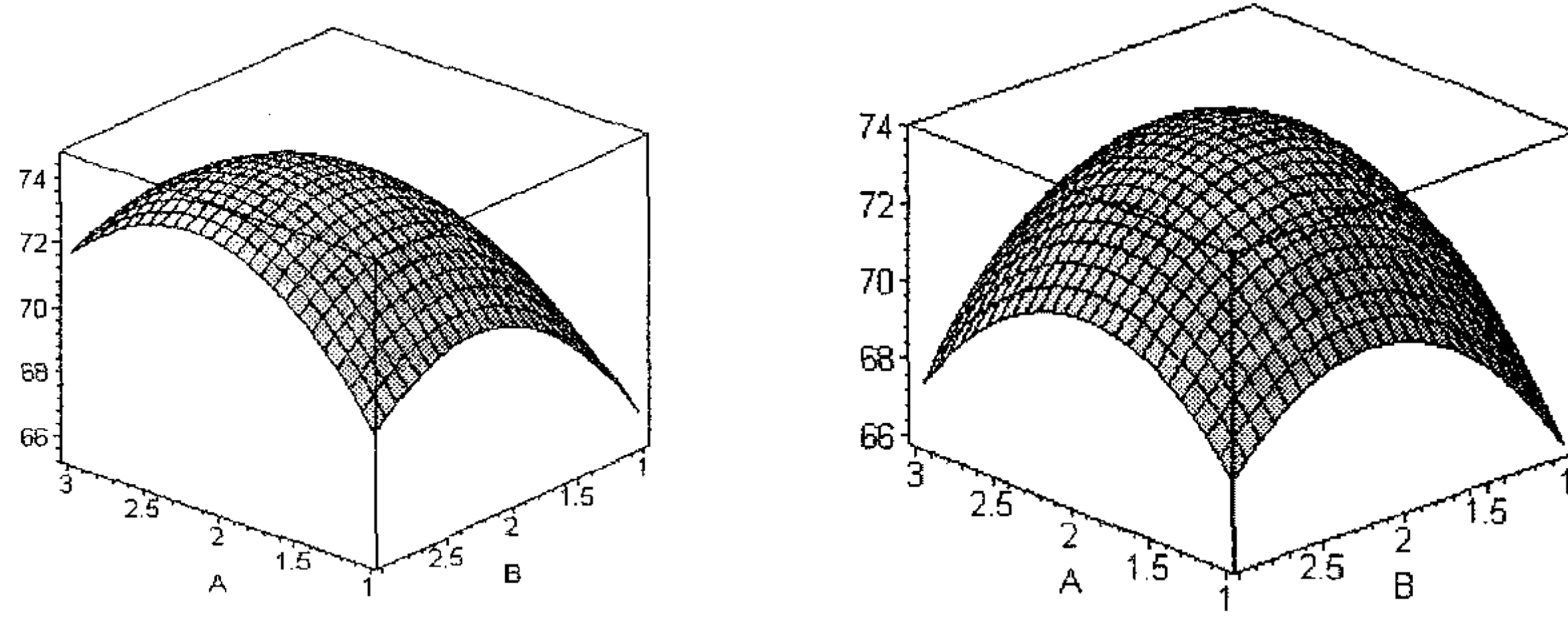


Fig. 96. 마늘, 녹차 및 식물성스테롤(phytosterol)의 함량에 따른 반응표면 분석  
좌(A:마늘; B:녹차), 우(A:마늘; B:식물성스테롤)

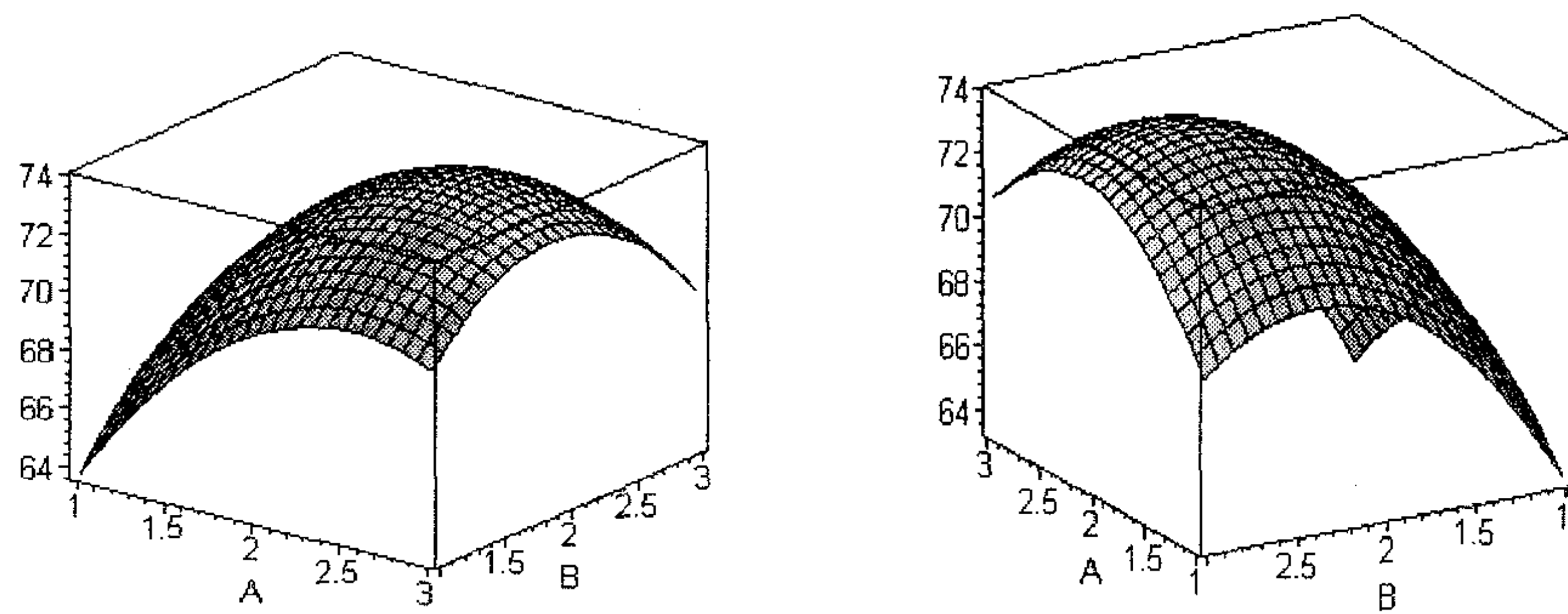


Fig. 97. 마늘, 표고버섯추출물, 녹차 및 식물성스테롤의 함량에 따른 반응표면 분석  
좌(A:마늘; B:표고버섯추출물), 우(A:녹차; B:식물성스테롤)

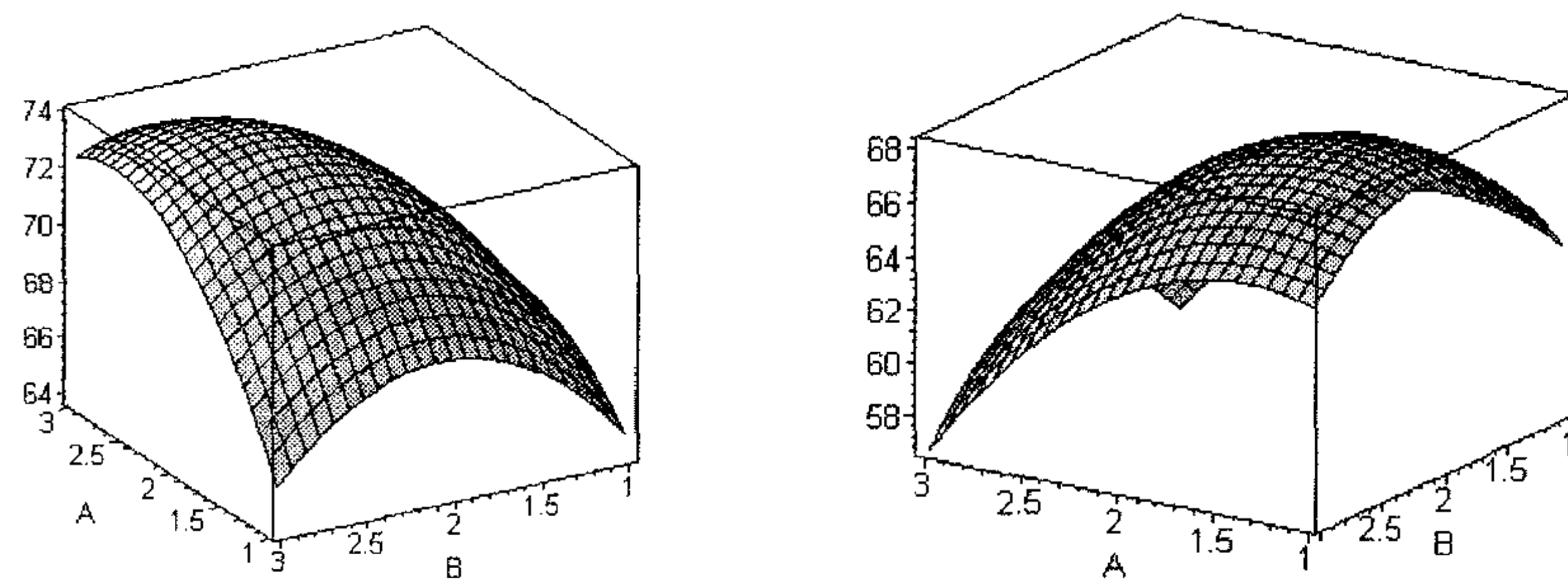


Fig. 98. 녹차, 표고버섯추출물 및 식물성스테롤의 함량에 따른 반응표면 분석  
좌(A:녹차; B:표고버섯추출물), 우(A:식물성스테롤; B:표고버섯추출물)



나. Fucosterol을 주성분으로 하는 항고지혈증 캡슐제품의 가공

Fucosterol을 주원료로 한 음료제품의 원부재료 배합비를 기본으로 하여 일반적인 영양보충용 캡슐제품의 제조공법에 준하여 콜레스테롤 대사개선 및 항고지혈활성을 기대하는 캡슐형제품을 제조하였으며 원부재료 배합비는 다음 Table 89과 같다.

Table 89. 항암기능성 laminaran 캡슐제품의 원부재료 배합비

원·부재료명	배합비(w/w%)	비 고
Fucosterol	10.0	다시마 유래, 순도 35%
식물성스테롤	25.0	50 °brix
마 늘 Ex	5.0	50 °brix
녹 차 Ex	20.0	50 °brix
표고버섯 Ex	10.0	카테킨 함량 40%
비타민 C	5.0	함량 50%분말
토코페롤	2.0	-
미네랄 Mix	3.0	Ca, Zn, Se
유 당	10.0	-
Sugar ester	10.0	-



Fig. 99. 해조유래 기능성소재 활용 시제품(Laminaran음료, 캡슐 및 Fucosterol 캡슐)

## 제 8 절 기능성분의 대량생산공정

기능성물질의 산업적 생산을 위한 기초공정 검토의 일환으로 다시마를 원료로 하여 지용성분인 fucosterol 함유 중간물질을 1차적으로 에탄올 추출공정으로 추출한 다음 열탕추출공정으로 잔존하는 기능성다당을 추출한 후 알긴산과 laminaran 및 fucoidan의 계통적 분리공정을 검토하는 한편 개별 다당류 및 fucosterol의 일괄 분리정제공정을 검토하였다.

### 1. Single process 공정

#### 가. Laminaran의 대량생산공정

##### (1) 생산공정

원료 해조류로부터 laminaran을 분리하기 위한 single process는 다음과 같은 계략적 공정으로 검토하였다. 즉, 건조상태의 원료 해조류 중에서 대량생산 및 안정적 공급이 가능한 해조류(예 : 다시마)를 원료로 하여 협잡물 등 불순물을 제거하는 전처리 공정을 거친 다음 가로 x 세로 3-5cm 크기로 세절하고 Hammer mill 등을 이용하여 입도 20-50 메쉬로 조분쇄한 후 스팀자켓이 부착된 열탕추출장치로 가용성 물질을 추출하였다. 이어서 추출물에 식품첨가물급 염화칼슘을 첨가하여 공존하는 수용성 알긴산을 불용성 알긴산 칼슘형태로 변화시키고 여과 또는 원심분리 방식으로 제거하고 여과 농축과정을 거쳐 laminaran 함유 추출액을 얻었다. 이어서 laminaran의 기능성 유효획분 분획을 위해 beta-glucanase와 cellulase의 복합분해효소(Econase)나 실험적으로 분리 고정화 한 crude laminaranase를 가하여 laminaran을 부분적으로 가수분해 한 후 효소 불활성화, 이온교환수지 처리, 탈염, 분자량 분획, 농축, 건조 등의 과정을 거치는 crude laminaran의 생산공정이 상업적 대량생산에 적합할 것으로 검토되었다. 이하 공정을 요약하면 다음과 같다.

1

- ① 원료 ▶ ② 전처리 ▶ ③ 세절 ▶ ④ 추출 ▶ ⑤ 알긴산제거 ▶ ⑥ 여과 ▶ ⑦ 농축
- ▶ ⑧ 다당류회수 ▶ ⑨ 수용화 ▶ ⑩ 효소처리 ▶ ⑪ 효소불활성화
- ▶ ⑫ 이온교환수지처리 ▶ ⑬ 중성다당 용출 ▶ ⑭ 탈염처리 ▶ ⑮ 분자량분획
- ▶ ⑯ 농축 ▶ ⑰ 건조 ▶ ⑱ Crude laminaran

(2) 공정요건 및 특성

대량생산 공정에 의한 laminaran의 공정별 관리요건과 특성을 정리하면 다음과 같다.

공정	요건 또는 특성	비고
① 원료	대황, 다시마, 모자반류, 미역 등	건조품
② 전처리	간이수세, 탈염, 선별에 의한 이물질 제거	
③ 세절	가로 1-2cm, 세로 1-2cm 크기로 세절	
④ 추출	10-20배량의 공정수 첨가, 5시간 2회 추출	Reflux, 열탕추출
⑤ 알긴산 침전처리	CaCl <sub>2</sub> 첨가 알긴산염 침전	
⑥ 여과	알긴산염 침전응고물의 제거(여과법, 운심분리법)	Ca-alginate 회수
⑦ 농축	알긴산제거 잔액의 감압농축(10 °brix 내외)	
⑧ 다당류회수	다당의 침전회수(에탄올처리/ 원침)	
⑨ 수용화	다당류의 공정수 용해(5 °brix 내외)	
⑩ 효소처리	1,3-(4)-b-glucanase 함유 효소(Econase) 또는 성게알 유래 다당분해 고정화효소 처리	
⑪ 효소불활성화	100℃, 3분간	
⑫ 이온교환수지처리	-N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Cl )trimethylammonium	Diaion PA 312
⑬ 중성다당 용출	수지흡착 중성다당(laminaran)의 탈이온수 용리	
⑭ 탈염처리	용리액을 탈염처리(RO 또는 전기투석)	
⑮ 분자량분획	MWCO 10-50 kDa 수준으로 분자량 분획	UF, 공중사막
⑯ 농축	60-70 °C에서 감압농축(20-40 °brix)	
⑰ 건조	FD, 열풍건조 또는 분무건조	
⑱ Crude laminaran	Glucose 함량 80% 이상의 제품	

(3) 대량생산공정의 산업 적용성

o 원료추출 및 성분분리·정제는 일반적인 산업설비 공정에 의해 충분히 적용 가능할 것으로 사료되었다.

o Laminaran 함량이 특이하게 높은 대황의 원료적성이 우수하나 현재로서는 양식 기술 개발 및 연근해 수중립 조성 사업품목으로서 상업적 제품생산이 이루어지지 않고 있어 laminaran 함량은 대황보다 낮으나 안정적 공급이 가능한 다시마나 팽생이모자반의 원료이용 적성이 우수한 것으로 검토되었다.

## 나. Fucoidan의 대량생산공정

### (1) 생산공정

Laminaran의 경우와 유사하게 다음 공정별 관리요건에 의해 fucoidan의 산업적 생산공정을 검토하였다. 이때 원료 해조류로서는 대량생산 및 안정적 공급이 가능한 다시마나 톳, 모자반류, 미역 또는 이들 해조가공 부산물들이 유망할 것으로 사료되었다. 개략적 공정을 요약하면 다음과 같다.

- ① 원료▶ ② 전처리▶ ③ 세절▶ ④ 추출▶ ⑤ 알긴산제거 ▶ ⑥여과 ▶ ⑦ 농축
- ▶ ⑧ 다당류회수▶ ⑨수용화▶ ⑩ 효소처리▶ ⑪ 효소불활성화
- ▶ ⑫ 이온교환수지처리▶ ⑬ 산성다당 용출▶ ⑭ 탈염처리
- ▶ ⑮ 분자량분획▶ ⑯ 농축▶ ⑰ 건조▶ ⑱ Crude laminaran

(2) 공정요건 및 특성

공정	요건 또는 특성	비고
① 원료	대황, 다시마, 모자반류, 미역 등	건조품
② 전처리	간이수세, 탈염, 선별에 의한 이물질 제거	
③ 세절	가로 1-2 cm, 세로 1-2 cm 크기로 세절	
④ 추출	10-20배량의 공정수 첨가, 5시간 2회 추출	Reflux, 열탕추출
⑤ 알긴산 침전처리	CaCl <sub>2</sub> 첨가 알긴산염 침전	
⑥ 여과	알긴산염 침전응고물의 제거(여과법, 운심분리법)	Ca-alginate 회수
⑦ 농축	알긴산제거 잔액의 감압농축(10 °brix 내외)	
⑧ 다당류회수	다당의 침전회수(에탄올처리/ 원침)	
⑨ 수용화	다당류의 공정수 용해(5 °brix 내외)	
⑩ 효소처리	1,3-(4)-b-glucanase 함유 효소(Econase) 또는 성게알 유래 다당분해 고정화효소 처리	
⑪ 효소불활성화	100°C, 3분간	
⑫ 이온교환수지처리	-N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> Cl )trimethylammonium	Diaion PA 312
⑬ 산성다당 용출	수지흡착 산성다당의 식염수 용리	
⑭ 탈염처리	용리액을 탈염처리(RO 또는 전기투석)	
⑮ 분자량분획	MWCO 10-50 kDa 수준으로 분자량 분획	UF, 공중사막
⑯ 농축	60-70 °C에서 감압농축(20-40 °brix)	
⑰ 건조	FD, 열풍건조 또는 분무건조	
⑱ Crude fucoidan	총당 14-39%, 조단백질 1.7-15%, sulfate 9-28%, fucose 25-97% 수준	

(3) 대량생산공정의 산업 적용성

o 원료추출 및 성분분리·정제는 일반적인 산업설비 공정에 의해 충분히 적용가능 할 것으로 사료되었다.

o Fucoidan의 함량과 수율이 상대적으로 높고 원료가 낮은 팽생이모자반, 감태, 다시마의 원료이용 적성이 우수할 것으로 사료되었다.

다. Fucosterol의 대량생산공정

(1) 생산공정

기능성분의 일반적인 추출공정에 준하되, 식품소재로서의 사용에 문제가 없도록 식용주정을 비극성 추출용매로, hexane을 fucosterol 성분의 분획용매로 하여 산업적 생산공정을 검토하였다. 개략적 생산공정을 도시하면 다음과 같다.

- ① 원료▶ ② 전처리▶ ③ 세절▶ ④ 비극성 용매추출(에탄올추출)▶ ⑤ 여액분리▶ ⑥ 감압농축(에탄올제거)▶ ⑦ 알칼리가수분해▶ ⑧비누화물질제거(여과)▶ ⑨ Fucosterol 추출(극성-비극성 액-액 분리)▶ ⑩ 비극성획분 농축▶ ⑪ Crude fucosterol

(2) 공정요건 또는 특성

공정	요건 또는 특성	비고
① 원료	대황, 다시마, 모자반류, 미역 등	건조품
② 전처리	간이수세, 선별에 의한 이물질 제거	
③ 세절	가로 1-2cm, 세로 1-2cm 크기로 세절	
④ 추출	10-20배량의 공정수 첨가, 5시간 2회 추출	Reflux, 열탕추출
⑤ 여액분리	여과법으로 에탄올 추출잔사 제거	
⑥ 감압농축	70℃ 이하 감압농축(에탄올 제거)	
⑦ 알칼리분해	Ethanolic KOH로 가수분해, saponifying	
⑧ 여액분리	Unsaponifiable material의 분리회수	여과법
⑨ Fucosterol 추출	hexane-water liquid extraction & separation	KOH 제거
⑩ 농축	Hexane fraction 감압농축	
⑪ Crude fucosterol	순도 35-45%	

(3) 대량생산공정의 산업 적용성

o 원료

낮은 가공수율 때문에 값싼 원료의 안정적 공급이 필수요건임. 일반 해조류 자원 중에서는 팽생이모자반이나 다시마의 원료적성이 상대적으로 우수하며, 산업적으로 대량



발생하는 알긴산 가공부산물의 유효활용이 산업적 관점에서 유망할 것으로 사료되었다.

o 생산공정의 산업 적용성

추출용매의 적합성, 공정요건 및 설비 등을 종합적으로 고려할 때 국내 관련 산업설비 공정을 이용한 산업생산에는 큰 문제가 없을 것으로 사료되었다.

## 2. Multiple process 공정

### 가. Laminaran, fucoidan, alginate, fucosterol의 일괄분리 공정

기능성분의 계통적 분리를 통해 동일 원료로부터 공존하는 성분을 모두 분리회수함으로써 기능성분의 생산단가 저하 및 부산물 발생의 최소화 공정을 검토하였다. 원료 해조류로부터 비극성 용매를 사용하여 fucosterol 함유추출물을 1차적으로 얻은 다음 잔사를 열탕 추출하여 기능성 다당성분 함유 추출액을 얻은 후 각각의 추출액으로부터 별도의 분리 정제방법을 이용하여 crude fucosterol, laminaran, fucoidan을 계통적으로 얻으며 alginate를 부산물로 얻는 공정을 검토하였으며 개략적 공정은 다음에 도시한 바와 같다.

- 원료해조류 ▶ 에탄올추출 ▶ 추출액 → ① Fucosterol 회수
- ▶ 추출잔사 → ② Alginate 회수
- ③ Laminaran 회수
- ④ Fucoidan 회수

#### (1) 생산공정

원료해조류로부터 1차적으로 유기용매(에탄올)를 사용하여 비극성용매획분을 얻어 fucosterol의 생산공정으로 연결하며, 에탄올 추출잔사를 2차적으로 열수추출한 후 염화칼슘 용액으로 처리하여 추출물중의 알긴산을 알긴산칼륨형태로 회수하는 2단계 공정, 이어서 알긴산 제거 추출액을  $-N^+(CH_3)_3Cl^-$ trimethylammonium를 주성분으로 하는 이온교환수지(Diaion PA 312)에 흡착시켜 중성다당인 laminaran을 용리회수하는 3단계 공정 및 laminaran 회수 이후 식염수 용리방법으로 fucoidan을 회수하는 4단계 공정으로 구성되는 복합처리공정이다(Fig. 100).

- 원료해조류 ▶ 에탄올추출 ▶ 추출액 → ① Fucosterol 회수( 1단계 공정)
- ▶ 추출잔사 → ② Alginate 회수( 2단계 공정)
- ③ Laminaran 회수( 3단계 공정)
- ④ Fucoidan 회수(4단계 공정)

#### (2) 공정요건 및 특성

각 단계별 공정요건 및 특성은 개별 물질의 생산공정과 큰 차이가 없다.

(3) 대량생산공정의 산업 적용성

국내 산업공정 설비를 활용하여 해조류로부터 4종의 기능성물질을 복합적으로 추출 분리 화수하는 것은 산업기술적으로는 큰 문제가 없을 것이며, 경제적으로도 분리수율이 낮은 fucosterol이나 laminaran 및 fucoidan의 높은 생산원가를 분리수율이 높은 알긴산이 상당부분 보완해줄 수 있는 이점이 있어 산업적 적용 가능성이 높을 것으로 사료된다.

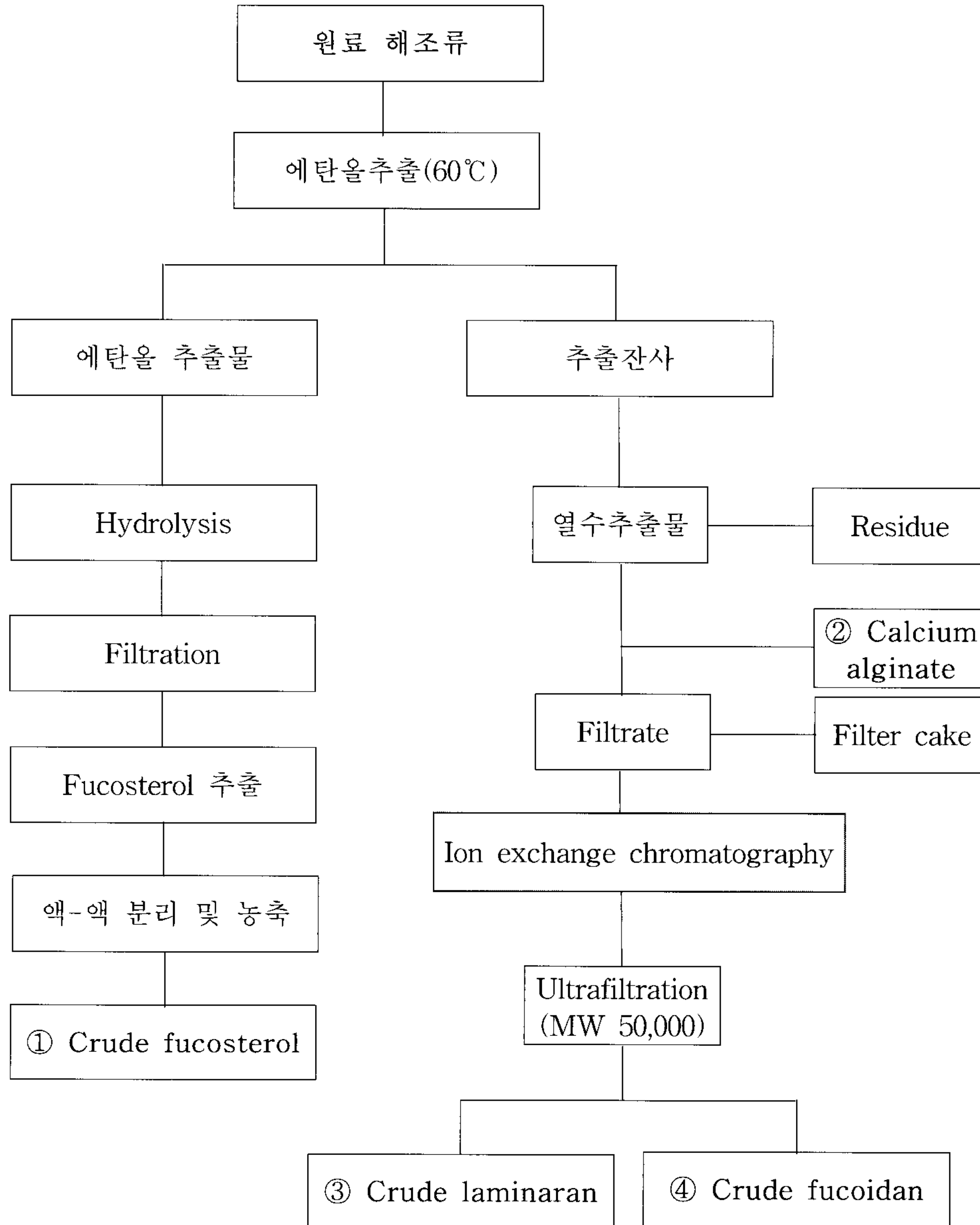


Fig. 100. 해조류에서 기능성 다당의 추출공정



Fig. 101. 해조유래 기능성소재(Ca-alginate, Fucoidan, Laminaran, Fucosterol)

## 제 9 절 해조 기능성물질 생산의 경제성 검토

Laminaran과 fucosterol 및 fucoidan의 산업소재화를 위한 경제성 검토를 위해 다시마, 팽생이모자반, 대황 및 알긴산제조 부산물을 원료로 한 생산공정을 검토하고 각 공정의 처리수율을 분석하여 추정생산원가를 비교분석 하였다.

Laminaran의 함량이 높고 안정적 공급이 가능한 원료 해조류로서 대황과 다시마 및 팽생이모자반을 고려할 수 있겠으나 대황의 경우 아직까지 인공양식에 성공하여 수중림사업의 핵심종으로 이용되고 있으며 상업적 제품생산은 이루어지지 않고 있으나 타 품종의 해조류에 비해 laminaran의 함량이 월등히 높은 장점이 있다.

다시마나 팽생이모자반의 경우 인공양식에 의한 안정적 공급이 가능하며 비교적 laminaran은 편이며 수요개발이 이루어질 경우 원료가 절감의 가능성도 있을 것으로 예상된다. 특히 다시마와 팽생이모자반의 경우 단일성분의 추출·분리 시에는 생산원가의 문제가 심각할 수 있으나 다성분 일괄추출 및 계통분리공정을 택할 경우 생산원가는 크게 절감할 수 있을 것으로 보인다. 특히 생산설비의 효율성을 고려한다면 생산수율이 극히 낮음에도 불구하고 상업적 생산공급이 이루어지고 있는 식물성스테롤의 경우 fucosterol의 산업생산 가능성을 입증한다고 할 수 있겠다. Laminaran과 fucoidan 및 fucosterol의 추정 생산원가를 다음 Table 90-92에 제시하였다.

Table 90. 주요 갈조류로부터 Laminaran의 추정 생산원가

구 분	원료해조류						비 고 (원/kg)
	대황		다시마		팽생이모자반		
	S 공정 <sup>1)</sup>	M공정 <sup>2)</sup>	S 공정	M공정	S 공정	M공정	
① 원료대	500,000	500,000	5,000	500,000	300,000	300,000	
- 원료중량(kg)	100	100	100	100	100	100	
- 구입단가(원/kg)	5,000	5,000	5,000	5,000	3,000	3,000	
② 직접가공비	280,000	300,000	280,000	300,000	280,000	300,000	
- 추출비	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	
- 여과 농축비	50,000	50,000	50,000	50,000	50,000	50,000	
- 반응·분리가공비	80,000	100,000	80,000	100,000	80,000	100,000	
- 농축 건조비	50,000	50,000	50,000	50,000	50,000	50,000	
③ 간접가공비	130,000	220,000	130,000	220,000	130,000	220,000	
- 노무인건비	60,000	100,000	60,000	100,000	60,000	100,000	
- 전력·수도료	20,000	40,000	20,000	40,000	20,000	40,000	
- 감가상각비	20,000	40,000	20,000	40,000	20,000	40,000	
- 공과잡비	30,000	40,000	30,000	40,000	30,000	40,000	
④ 제품생산량(kg)	12.0	71.5	5.0	58.0	5.8	58.3	
- Laminaran 생산량	12.0	12.0	5.0	5.0	5.8	5.8	
- 알긴산칼슘생산량	-	55.0	-	43.0	-	45.0	-
- Fucoidan 생산량	-	4.5	-	10.0	-	7.5	-
- Fucosterol생산량	-	0.1	-	0.12	-	1.15	-
⑧ 제품생산비용(원)	910,000	1,020,000	910,000	1,020,000	910,000	1,020,000	
- Laminaran 생산비용	910,000	630,000	910,000	391,000	910,000	510,000	
- 알긴산칼슘 비용	-	165,000	-	129,000	-	135,000	@3,000
- Fucoidan 생산비	-	225,000	-	500,000	-	375,000	@50,000
- Fucosterol 생산비	-	-	-	-	-	-	
⑨ Laminaran 단가 (원/kg)	75,833	52,500	182,000	78,200	156,896	87,931	

<sup>1)</sup> S 공정 : 원료로부터 주제품(crude laminaran) 1종 만을 생산하기 위한 공정

<sup>2)</sup> M 공정 : 원료로부터 주제품과 함께 부산물(또는 부산물 원료)도 동시에 생산하기 위한 공정

Table 91. 주요 갈조류로부터 Fucoidan의 추정 생산원가

구 분	원료해조류				비 고 (원/kg)
	다시마		괭생이모자반		
	S 공정 <sup>1)</sup>	M공정 <sup>2)</sup>	S 공정	M공정	
① 원료대	5,000	500,000	300,000	300,000	
- 원료중량(kg)	100	100	100	100	
- 구입단가(원/kg)	5,000	5,000	3,000	3,000	
② 직접가공비	280,000	300,000	280,000	300,000	
- 추출비	100,000	100,000	100,000	100,000	
- 여과 농축비	50,000	50,000	50,000	50,000	
- 반응·분리가공비	80,000	100,000	80,000	100,000	
- 농축 건조비	50,000	50,000	50,000	50,000	
③ 간접가공비	130,000	220,000	130,000	220,000	
- 노무인건비	60,000	100,000	60,000	100,000	
- 전력·수도료	20,000	40,000	20,000	40,000	
- 감가상각비	20,000	40,000	20,000	40,000	
- 공과잡비	30,000	40,000	30,000	40,000	
④ 제품생산량(kg)	10.0	58.0	7.5	58.3	
- Laminaran 생산량	-	5.0	-	5.8	
- 알긴산칼슘 생산량	-	43.0	-	45.0	-
- Fucoidan 생산량	-	10.0	-	7.5	-
⑤ 제품생산비용(원)	910,000	1,020,000	910,000	1,020,000	
- Laminaran 생산비용	-	262,500	-	304,500	@52,500
- 알긴산칼슘 비용	-	129,000	-	135,000	@3,000
- Fucoidan 생산비	910,000	629,000	910,000	580,500	
⑥ Fucoidan 단가(원/kg)	91,000	62,900	121,334	77,400	

<sup>1)</sup> S 공정 : 원료로부터 주제품(crude fucoidan) 1종 만을 생산하기 위한 공정

<sup>2)</sup> M 공정 : 원료로부터 주제품과 함께 부산물(또는 부산물 원료)도 동시에 생산하기 위한 공정

Table 92. 주요 갈조류로부터 Fucosterol의 추정 생산원가

구 분	원료 해조류					비고 (원/kg)
	다시마		팽생이 모자반		알긴산 부산물	
	S 공정 <sup>1)</sup>	M공정 <sup>2)</sup>	S 공정	M공정	S 공정	
① 원료대	500,000	500,000	300,000	300,000	30,000	
- 원료중량(kg)	100	100	100	100	100	
- 구입단가(원/kg)	5,000	5,000	3,000	3,000	300	
② 직접가공비	330,000	350,000	330,000	350,000	200,000	
- 추출비	150,000	150,000	150,000	150,000	50,000	
- 여과 농축비	50,000	50,000	50,000	50,000	50,000	
- 반응·분리가공비	80,000	100,000	80,000	100,000	50,000	
- 농축 건조비	50,000	50,000	50,000	50,000	50,000	
③ 간접가공비	130,000	220,000	130,000	220,000	130,000	
- 노무인건비	60,000	100,000	60,000	100,000	50,000	
- 전력·수도료	20,000	40,000	20,000	40,000	20,000	
- 감가상각비	20,000	40,000	20,000	40,000	40,000	
- 공과잡비	30,000	40,000	30,000	40,000	20,000	
④ 제품생산량(kg)	10.0	58.0	7.5	58.3	1.5	
- Laminaran 생산량	-	5.0	-	5.8	-	
- 알긴산칼슘 생산량	-	43.0	-	45.0	-	
- Fucoidan 생산량	-	10.0	-	7.5	-	
- Fucosterol 생산량	0.2	0.2	0.3	0.3	1.5	
⑤ 제품생산비용(원)	960,000	1,070,000	760,000	870,000	333,000	
- Laminaran 생산비용	-	262,500	-	304,500		@52,500
- 알긴산칼슘 비용	-	129,000	-	135,000		@3,000
- Fucoidan 생산비	-	500,000	-	375,000		@50,000
- fucosterol 생산비	960,000	178,500	760,000	55,500		
⑥ Fucosterol 단가 (원/kg)	4,800,000	892,500	2,533,334	185,000	222,000	

<sup>1)</sup> S 공정 : 원료로부터 주제품(crude fucosterol) 1종 만을 생산하기 위한 공정

<sup>2)</sup> M 공정 : 원료로부터 주제품과 함께 부산물(또는 부산물 원료)도 동시에 생산하기 위한 공정

## 제 5 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

연구목표인 갈조류로부터 항종양활성 및 혈액순환 개선효과가 기대되는 Lamina-  
ran과 fucosterol의 분리정제 및 산업생산 공정기술 개발을 위한 적정 원료해조류 선정에  
위하여 연안산 갈조류 23종을 대상으로 주요 이화학적 성분분석 및 생리기능활성  
성분의 분석과 fucosterol과 fucoidan, laminaran, alginic acid 등 기능성다당 및  
식이섬유, betaine, polyphenol 함량 등을 분석하여 기능성 다당의 함량이 높고  
안정적 원료공급이 가능할 것으로 기대되는 대황, 감태, 다시마 등 잠재적  
원료해조류 7종 중 산업적 활용가능성이 기대되는 다시마, 팽생  
이모자반, 대황 등 원료해조류 3종을 선정함으로써 적정 원료가 합리적으로  
선정되었다.

또한 원료해조류로부터 laminaran, fucoidan 및 fucosterol의 추출을 위해 법적으로  
허용된 물과 에탄올을 용매로 사용하였으며 추출물로부터 기능성분의 분리·정제에  
사용된 공정이 기능성식품 소재로서의 안전성에 부정적인 영향을 끼치지 않을  
뿐만 아니라 기능성 다당의 분자량 분획 공정의 산업적용성에 무리가 없으며  
TLC, GC, GC/MSD, HPLC, NMR 등의 정밀분석을 통한 구조분석 및 표준품과의  
비교확인이 적절하게 이루어진 것으로 사료된다.

갈조류 유래 laminaran과 fucoidan의 항암활성 평가를 위해 한국인에 대한 발생  
빈도가 높은 위암, 대장암 및 간암세포주를 대상으로 한 세포독성 검토 외에  
면역활성, Apoptosis 활성, Quinone reductase 유도효과 등이 다각적으로 검토되었다.

Laminaran과 fucoidan의 *in vivo* 항암활성 검증을 위해 적정 발암동물모델(SD  
Rat F344)을 이용하여 DMH로 대장암을 유발시킨 뒤 Laminaran과 fucoidan의  
투여가 Rat의 대장 상피세포층의 이상선화소(ACF) 발생에 미치는 영향을 조사하는  
방법으로 전암단계의 항암활성을 조사하여 양호한 항암활성을 확인하였으며,  
대장암 모델 및 간암모델 동물실험을 통해 중기발암성에 미치는 laminaran과  
fucoidan의 섭취효과를 분석하여 소정을 발암억제효과를 확인함으로써 당초  
연구내용이 성실하게 수행되었다.

또한 주요 성인병의 예방을 위한 기능성 소재연구와 관련, laminaran과 fucoidan  
및 fucosterol의 *in vitro* 혈류개선 기능활성이 혈소판응집 억제활성(antiplatelet  
activity), ACE 저해활성, 혈전용해활성(fibrinolysis), 항혈액응고활성(anticoagulant  
activity) 등을 중심으로 조사되었을 뿐만 아니라 콜레스테롤 대사와 관련되어  
결과적으로 혈액순환과 관련되는 기능성요인으로서 *in vitro* 담즙산 흡착특성  
(Bile acid binding capacity)과 Rat의 liver liposome을



대상으로 한 HMG-CoA 저해활성이 각각 조사되어 우수한 기능활성을 확인함으로써 당초 연구목표가 충실히 달성된 것으로 사료되었다.

인위적으로 고지혈증을 유도한 SD Rat 및 Hamster의 혈액조성 및 HMG-CoA reductase 저해활성에 미치는 laminaran과 fucosterol의 투여효과를 조사하여 혈중 HDL 콜레스테롤의 유의한 증가, LDL 콜레스테롤 및 중성지질(TG)의 현저한 감소효과를 확인하였으며 유의한 HMG-CoA reductase 저해활성을 확인함으로써 생체 내에서의 콜레스테롤 생합성 저해에도 유효함을 확인하였다.

SD rat를 실험동물로 하여 laminaran 및 fucosterol의 경구투여독성을 다양한 농도로 조사하여 4,000-8,000 mg/kg/bw수준에서도 독성발현 징후가 관찰되지 않음으로서 안전한 물질임을 확인하였다.

또한 laminaran과 fucosterol의 투여가 인위적으로 고지혈증을 유발시킨 SD rat의 혈액 유동성에 미치는 영향을 micro channel array 분석방법으로 조사하고 혈액의 지질 성분 조성을 분석하여 laminaran과 fucosterol의 투여가 모두 우수한 혈액유동성 개선효과를 보여주었으며 혈중 지질조성 또한 유의하게 개선되는 효과를 확인함으로써 laminaran과 fucosterol의 *in vivo* 혈류개선 기능성 검토의 임상실험 전단계의 유익한 기능성 평가자료를 확보한 것으로 검토되었다.

Laminaran을 주원료로 하고 기존의 유력한 항암 천연소재를 synergy 물질로 한 항암기능성 식품의 소재화 가능성을 혼합물 조성의 암세포에 대한 독성분석과 반응표면(RSM) 통계분석 방법으로 검토하여 음료타입의 항암기능성 식품 개발이 가능함을 확인하였으며, laminaran과 fucosterol을 주원료로 한 항고지혈 기능성 음료제품의 formulation도 수행함으로써 laminaran과 fucosterol의 기능성식품 소재화 가능성을 적절히 제시한 것으로 평가된다.

해조유래 laminaran과 fucosterol의 산업적 생산을 위한 기초공정 검토의 일환으로 다시마를 원료로 하여 1차적으로 에탄올 가온추출에 의한 지용성분(Fucosterol)의 우선추출 후 기능성 다당(Laminaran, Fucoidan, Alginate)을 열수추출 하는 2단계 추출공정을 검토하였으며, alginate와 laminaran 및 fucoidan의 계통적 분리공정을 검토하였다. 에탄올 추출물로부터 알칼리 가수분해, 물과 헥산을 이용한 액-액 분리에 의한 순도 35% 수준의 crude fucosterol의 분리 및 crude fucosterol의 컬럼정제에 의한 고순도 fucosterol의 정제공정을 검토함으로써 산업 적용성을 높인 것으로 평가된다.

Laminaran과 fucosterol 및 fucoidan의 산업소재화를 위한 경제성 검토를 위해 다시마, 팽생이모자반, 대황 및 알긴산제조 부산물을 원료로 한 생산공정을 검토하고 각 공정의 처리수율을 분석하여 추정생산원가를 비교분석 하였으며 부산물의 경제적 가치도 동시에 반영함으로써 목표물질의 현실성 있는 경제성 분석이 이루어졌다.

이러한 결과들을 종합적으로 판단할 때 국내산 갈조류로부터 항암 및 혈액순환 개선효과가 높은 것으로 알려진 laminaran과 fucosterol 등의 효과적 분리정제 및 각 기능성분의 항암 및 할고지혈활성 평가 등의 제반 연구가 당초의 연구목표에 부합하도록 충실하게 수행된 것으로 검토되었다.

## 제 6 장 연구개발결과의 활용계획

연구과정에서 발생한 know how는 국내·외 기술권 확보를 추진하며 개발된 기술 및 제품은 관련 산업계에 홍보하여 산업적 실용화를 적극 추진하되 참여기업에 대한 기술이전을 우선적으로 고려한다.

개발제품의 생리기능성 및 임상효과는 개발제품의 설명회, 매스컴 홍보 및 식품기술전 출품 등의 방법으로 소비자에게 홍보하며 학술적 가치가 있는 연구결과는 국내·외 전문 학술잡지에 발표함으로써 관련 학술발전에 기여함은 물론 산업적 실용화의 과학적 지원기반을 구축한다. 또한 원료해조의 품질특성 요건 및 전처리 방법 등을 직·간접적으로 생산어민, 유관기관 및 단체에 홍보 보급함으로써 해조 원료의 계획적 생산 및 고부가가치 이용을 도모할 예정이다.

## 제 7 장 참고문헌

- o Ando Y, Inoue K. Decomposition of alginic acid by microorganisms-IV. On the *Vibrio*-type bacteria, newly isolated from the decaying *Laminaria*. J. Jap. Soc. Sci. Fish. 27: 339-341 (1961)
- o AOAC : Official Method of Analysis. Assoc. Offic. Analy. Chem. Washington, DC, USA (1996)
- o Beeson PB, McDermott W, Wyngaarden JB. Text book of medicine. Saunders Co., Philadelphia, pp.77-100 (1979)
- o Bjorsson S, Takida H, Combination chemotherapy plus methanol extracted residue of *Bacillus Calmette-Guerin* or *Corynebacterium parvum* in stage III lung cancer. Cancer Treat. Rep. 62: 505-510 (1978)
- o Black DL, Klinzing GE, Tierney JW. Temperature-viscosity induced laminar instabilities in a gaseous heated channel. Nuclear Engineering and Design, 40: 225-233 (1951)
- o Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature. 26: 1119-1200 (1958)
- o Boyd J, Turvey JR. Isolation of poly- $\alpha$ -L-gulonate lyase from *Klebsiella aerogenes*. Carbohydrate Res. 57: 163-171 (1977)
- o Casu B, Oreste P, Torri G, Zoppetti G, Choay J, Lormeau JC, Petitou M, Sinay P. The structure of heparin oligosaccharide fragments with high anti-(factor Xa) activity containing the minimal antithrombin III-binding sequence. Chemical and  $^{13}\text{C}$  nuclear-magnetic-resonance. J. Biochem. 197: 599-609 (1981)
- o Charmichael J, Degraff EG, Gazdaar AF, Minna JD, Michell JB. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay, assessment of chemosensitivity testing. Cancer. Res. 47: 936-942 (1987)
- o Choi DM, Kim DS, Lee DS, Kim HR, Pyeun JH. Trace components and functional saccharides in seaweed-1. J. Kor. Fish. Soc. 28: 49-59 (1995)
- o Choi JH, Oh SK, Park KD, Choi YJ, Rhim CH. Comparative study on amino acid profile of wild and cultured carp, and Israeli Carp. J. Kor. Fish Soc. 18: 545-549 (1985)
- o Cooper AD. Hepatic uptake of chylomicron remnants. J. Lipid Res. 38: 2173-2192 (1997)

- o Corine HR, Emma SW. Basic nutrition and diet therapy. 5th ed., Macmillan Co., New York, pp. 272-273 (1984)
- o Cui CB, Lee EY, Lee DS, Ham SS. Antimutagenic and anticancer effects of ethanol extract from *Korean* traditional *Doenjang* added sea tangle. J. Kor Soc. Food Sci. Nutr. 31: 322-328 (2002)
- o Cushman DW, Cheung HS. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung. Biochem Pharm 20: 1637-1648 (1971)
- o Guyton. Text book of medical physiology. 8th ed., Saunders Co., Philadelphia, pp.754-764 (1994)
- o Davidson IW, Sutherland IW, Lawson CJ. Purification and properties of an alginate lyase from a marine bacterium. J. Biochem. 159: 707-713 (1976)
- o Dawer TR. The framingham study: the epideminology of atherosclerotic disease. Harvard university press. Cambridge. pp. 267 (1980)
- o Dietschy JM. Dietary fatty acids and the regulation of plasma low density lipoprotein cholesterol concentrations. J. Nutr. 128: 444-448 (1998)
- o Dilip Kittur, Mark LaSpina, Kristopher Maier. Cyclosporin upregulates IL-6 by activating NADPH oxidase and c-src. Journal of the American College of Surgeons. 201: 91 (2005)
- o Dodgson KS. Price RG. A note on the determination of the ester sulfate content of sulfated polysaccharides. Biochem. J. 84: 106-110 (1962)
- o Doll R, Peto R. The causes of cancer. J. Natl. Cancer Inst. 66: 1191-1308 (1981)
- o Hollohan BT, Dabinett PE, Gow JA. Bacterial succession during biodegradation of the kelp *Alaria esculenta* (L.) Greville. Can. J. Microbiol. 32: 505-512 (1986)
- o Doyle JT, Dawber TR, Kannel WB. N. Engl. J. Med. 226: 796 (1962)
- o Dubois M, Gills KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350-352 (1956)
- o Eller J, Payne WJ. Studies on bacteria utilization of uronic acid. IV. Alginolytic and mannuronic acid oxidizing isolates. J. Bacteriology. 80: 193-199 (1960)
- o Ferial HB, Mostafai E, Corinne S, Catherine BV. Relationship between sulfate groups and biological activities of fucans. Thrombosis Research. 100: 453-459 (2000)
- o Fischer SM, Leyton LJ, Lee ML, Lochniscar M, Belury MA, Maldve RE. Differential effects of dietary linoleic acid on mouse skin-tumor promotion and mammary carcinogenesis. Cancer Res. 52: 2049-2056 (1992)
- o Franz G. Polysaccharides in pharmacy: current applications and future concepts. Planta.

- Med. 55: 493-497 (1989)
- o Furneaux RH, Miller IJ, Stevenson TT. Agaroids from New Zealand members of the *Gracilariaceae*(*Gracilariales*, *Rhodophyta*)-a novel dimethylated agar. *Hydrobiologia*. 645: 204-205 (1990)
  - o Goldin AI, Kline ZP, Sofina ZP, Syrkin AB. Academic Press, New York. USA. Experimental evaluation of antitumor drugs in the USA and USSR clinical correlation. NIH. pp. 33-44 (1980)
  - o Gordon T, Casfelli WP, Hjortland MC, Kennel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart diseases, the Framingham study. *Am. J. Med.* 62: 707 (1977)
  - o Gorinstein S, Kulasek GW, Barmikowska E, Leontowicz M, Zemser M, Morawiec M, Trakhtenberg S. The influence of persimmon peel and persimmon pulp on the lipid metabolism and antioxidant activity of rats fed cholesterol. *J. Nutr. Biochem* 9: 223-227 (1998)
  - o Han KH, Choi MS, Ahn CK, Yoon MJ, Song TH. Soboru bread enriched with dietary fibers extracted from Kombu. *Kor. J. Soc. Food Cookery Sci.* 18: 619-624 (2002)
  - o Ha YL, Michael WP. Naturally-occurring novel anticarcinogens: Conjugated dienoic derivatives of linoleic acid(CLA). *Kor. J. Food Nutr.* 20: 401-407 (1991)
  - o Hebert JT, Barone J, Reddy MM, Backlund JC. Natural killer cell activity in dietary fat intervention trial. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 54: 103-106 (1990)
  - o Hiroyuki N, Hideomi A, Koichi A, Kazutosi N. Antitumor activity of marine algae. *Hydrobiologia*. 204: 577-584 (1990)
  - o Hwang WI, Sohn JW. Comparative study on the cytotoxic activities of red ginseng of Korea and China. *Kor. J. Ginseng Sci.* 17: 196-200 (1993)
  - o Inoue Yuko, Nagasawa Kinzo. A new method for the determination of N-sulfate in heparin and its analogs. *Analytical Biochemistry.* 71: 46-52 (1976)
  - o Jo GS, Kim YM, Kim DS, Ku JG, Do JY, Lee MH, Sin MW. Studies on the development of utilization technology of aquacultural seaweeds. *Aquaculture.* 25: 341-347 (1996)
  - o Jung SE, Bae JH. The effect of *Prunus mume* extracts on the growth of Hepg 2 and HeLa cell lines. *Kor. J. Food Nutr.* 35: 439-445 (2002)
  - o Kamiya H. Endo Y. Uchida A, Raj U. Antitumor activity of the macromolecular fraction from a *Fihan tunicate* *Didemnum carians*. *Nippon suisan Gokkaishi.* 53: 493-504 (1987)

- o Kim DS, Park YH. Uronic acid composition block structure and some related properties of alginic acid. *J. Kor. Fish. Soc.* 18: 29-36 (1985)
- o Kashiwabara Y, Hiroshi S, Nisizawa K. 1969. Alginate lyases of *Pseudomonas*. *J. Biochem.* 66: 503-512 (1969)
- o Kim JS, Kang KJ. Effect of laminaria addition on the shelf-life and texture of bread. *Kor. J. Food Nutr.* 11: 556-560 (1998)
- o Kim JW, Slavik MF, Li Y. Cetylpyridinium chloride (CPC) treatment on poultry skin to reduce attached *Salmonella*. *J. Food prot.* 59: 322-326 (1996)
- o Kim PJ, Lee JC, Ko KH, Lee CH. Effects of drying and extraction conditions on the chemical composition of water extract of *Lycium chinense Miller*. *Food Engin. Prog.* 2: 105-110 (2004)
- o Kim SA, Kim J, Woo MK, Kwak CS, Lee MS. Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extracts from five kinds of seaweeds. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr* 34: 451-459 (2005)
- o Kim SS. A study on the related factors of Korean cancer-outbreaks. *J. Kor. Soc. Health statistics.* 23: 1-16 (1998)
- o Kim TJ, Yoon HD, Lee DS, Jang YS, Suh SB, Yeum DM. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of hot-water extract and enzymatic hydrolysate of fresh water fish. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 25: 871-877 (1996)
- o Kimura Y, Okuda H, Mori K. Studies on the activities of tannis and related compounds from medicinal plant and drugs. IV. Effects of various extracts of *Geranii herba* and *Geraniin* on liver injury and lipid metabolism in rats fed peroxidized oil. *Chem. Pharm. Bull.* 32: 1866-1871 (1984)
- o King CY, Shim MJ, Choi EC, Lee YN, Kim BK. Studies on antitumor components of *Korean Basidiomycetes*. Mycelial culture and antitumor components of *Ganoderma lucidum*. *Kor. Biochem. J.* 14: 100-109 (1981)
- o Kitamikado M, Tseng CH, Aoki T, Yamaguchi K, Araki T. Isolation of bacteria capable of producing alginate-degrading enzyme from natural environment. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 55: 709-713 (1989)
- o Kleinsek Don, Tony Giordano, Douglas N Foster. Increase in abundance of a transcript hybridizing to elongation factor I alpha during cellular senescence and quiescence. *Experimental Gerontology.* 24: 501-513 (1989)
- o Knutson CA, Jeanes A. A new modification of the carbazole analysis. *Anal. Biochem.* 24: 470 (1968)

- o Krichevsky D. History of recommendations to the public about dietary fat. *J. Nutr.* 128: 449-452 (1998)
- o Kwon EA, Chang MJ, Kim SH. Quality characteristics of bread containing *Laminaria* powder. *J. Kor. Food Sci. Nutr.* 32: 406-412 (2003)
- o Lattin DL, Breen CM, Compadre EK, Fifer H, Salari M, Slavik F, Engler PV. The use of quarternary ammonium compounds to remove Salmonella contamination from meat products. U.S. patent. pp. 5, 368, 983 (1994)
- o LaVecchia C, Negri E, Decarli A, D'Avanzo B, Franceschi S. Risk factors for hepatocellular carcinoma in northern Italy. *Int. J. Cancer.* 42: 872-876 (1995)
- o Lee BH, Choi BW, Chun JH, Yu BS. Extraction of water soluble antioxidants from seaweeds. *J. Kor. Ind. Eng. Chem.* 7: 1069-1077 (1996)
- o Lee JK, Lee SY, Kim WJ. Effect of removal of viscous materials on physicochemical properties of sea tangle extract. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 26: 127-132 (1994)
- o 이양자. 바람직한 지방산의 섭취, 대한 영양사회 학술 세미나 (1993)
- o Lee YT. Dietary fiber composition and viscosity of extracts from domestic barley, wheat, oat, and rye. *Kor. J. Food and Nutr.* 3: 223-238 (2001)
- o Li Y, Xiong H, Matsler PL, Walker JT, Slavik MF. Pre-chill spraying to reduce bacterial contamination in poultry processing. ASAE paper No. 95613. The American Society of Agriculture Engineering, St. Joseph. M1 (1995)
- o Miller NE, Forde OH, Telle DS, Mjos OD. The tromoso heart study. High density lipoprotein and coronary heart disease: a prospective case. *Lekarstennie srestava Iz rasteniy.* 8: 378 (1962)
- o Miyazaki T, Nishijima M. Structural examination of a water soluble antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* 29: 3611-3616 (1981)
- o Nagasawa Hiromichi, Hironori Ishizaki Akinori Suzuki, Akira Isogai, Saburo Tamura. Enzymatic and chemical inactivation of partially purified prothoracicotropic(brain) hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology.* 23: 1219-1222 (1977)
- o Olson RE. Discovery of the lipoproteins, their role in fat transport and their significance as risk factors. *J. Nutr.*, 128: 439-443 (1998)
- o Park JH, Kang KC, Baek SB, Lee YH, Rhee KS. Separation of antioxidant compounds from edible marine algae. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 23: 256-261 (1991)
- o Park YS, Song JY, Chung TJ. Changes of lipids and apoprotein during lipolysis of high density lipoprotein in serum of liver necrosis patients. *Kyemyung Medical*



- Bulletin. 4: 28 (1977)
- o Prosky L, Asp N, Sweizer TF, Devries J, Furda I. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: Interlaboratory study. JAOAC. 71: 1017-1023 (1988)
  - o Purnell D, Bartlet G, Kreidet J, Biro T. *Corynebacterium parvum* and cyclophosphamides as combination treatment for a murine mammary adenocarcinoma. Cancer Res. 37: 1137-1140 (1977)
  - o Rhee SJ, Park GY. Effects of green tea catechin on liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase activity and serum lipid levels in streptozotocin - induced diabetic rats. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 26: 1187-1193 (1997)
  - o Rhoades GG, Gulbrandse CL, Kkagan A. Serum lipoproteins and coronary heart disease in a population study of Hawaii Japanese men, New Eng. J. Med. 294: 293 (1976)
  - o Ruperez P. Mineral content of edible marine seaweeds. Food Chem. 79: 23-26 (2002)
  - o Sasaki T, Uchida A, Takasuka N, Tachihana Y, Nakamich K, Endo Y, Kamiya H. Antitumor activity and immunomodulatory effect of glycoprotein fraction from scallop *Patinopecten Yessoensis*. Nippon Suisan Gokkaishi. 53: 267-273 (1987)
  - o Scot Mathieson, Colin G Moore, David J, Mills L, Brian J Bett. Estimation of meiobenthic nematode diversity by non-specialists. Marine Pollution Bulletin. 18: 646-649 (1987)
  - o Serougne C, Felgines C, Ferezou J, Hajri T, Bertin C, Mazur A. Hypercholesterolemia induced by cholesterol- or cystine-enriched diets is characterized by different plasma lipoprotein and apolipoprotein concentration in rats. J. Nutr. 125: 34-41 (1995)
  - o Shimizu. Inactivation of virus by high oxidation potential water. The Medical and Test Journal. Vol 398, pp 28 (1994)
  - o Song JH, Lee HS, Hwang JK, Han JW, Ro JG, Keum DH, Park KM. Physiological activity of *Sarcodon aspratus* extracts. Kor. J. Food Sci. Ani. Res. 23: 172-179 (2003)
  - o Stevenson Sheena, Paul A Sermon. Effect of alkali metal addition on the activity of WO<sub>3</sub> in propene metathesis. Journal of Molecular Catalysis. 65: 181-185 (1991)
  - o Stuelp Gorin Sandra, Philip AJ. Elaine R Carbonero, Guilherme L Sasaki, Patrícia M, Woranovicz-Barreira. Marcello Iacomini. Comparative studies of the polysaccharides isolated from lichenized fungi of the genus *Cladonia*: significance as chemotypes. FEMS Microbiology Letters. 194: 65-69 (2001)
  - o Sugiura M, Ito H. Toxicological studies of *Ganoderma lucidum* Karst. Tokyo Yakka

- Daigaku Kenkyu Nempo. 27: 722-733 (1977)
- o Suzuki I, Hashimoto K, Oikawa S, Sato K, Osawa M, Yadomae T. Antitumor and immunomodulation activities of a  $\beta$ -glucan obtained from liquid-cultured *Grifola flondosa*. Chem. Pharm. Bull. 37: 410-413 (1980)
  - o Tatiana NZ, Nataliya MS, Irina BP, Vladimir VI, Andrey SS, Elena VS, Lyudmila AE. A new procedure for the separation of water-soluble polysaccharides from brown seaweeds. Carbohydrate Res. 322: 32-39 (1999)
  - o Taylor WE, Jeffrey Baron, Bettie Sue Siler Masters. Immunochemical studies on electron transport chains involving cytochrome P-450. The role of the iron-sulfur protein, adrenodoxin, in mixed-function oxidation reactions. Archives of Biochemistry and Biophysics. 150: 105-115 (1972)
  - o The Association of Korean Clinical pathology. *The clinical pathology*. Korea Medicine Co., Seoul pp. 40-79 (1994)
  - o Uchida M, Nakayama A. Isolation of *Laminaria*-frond decomposing bacteria from Japanese coastal waters. Nippon Suisan Gakkaishi. 59: 1865-1871 (1993)
  - o Whistler RL, Bemiller JN. Industrial Gums-polysaccharides and their derivatives. Academic Press, INC. 2nd edit. 139-143 (1973)
  - o Xianyong Gui, Teresa F. DeGolier, Gary E. Duke, Robert E. Carraway. Neurotensin elevates hepatic bile acid secretion in chickens by a mechanism requiring an intact enterohepatic circulation. 127: 61-70 (2000)
  - o Yamamoto I, Nagumo T, Takahashi M, Fujihara M, Suzuki Y, Iizima I. Antitumor Effect of Seaweeds III. Antitumor Effect of an Extract from *Sargassum Kjellmanianum*. J. Exp. Med. 51: 187 (1981)
  - o Yang KH, Yang JH, Ryu BH. Antitumor effects of extracts obtained from *Daedalea dickinsii*. Kor. J. Appl. Microbiol Biotechnol. 25: 178-182 (1997)
  - o Yoon JA, Yu KW, Jun WJ, Cho HY, Son YS, Yang HC. Screening of anticoagulant activity in the extracts of edible seaweeds and optimization of extraction condition. J. Kor. Food Sci. Nutr. 29: 1098-1106 (2000)
  - o York P, Miller TA. Physical and chemical characteristics of some high purity magnesium stearate and palmitate powders. International Journal of Pharmaceutics. 23: 55-67 (1985)
  - o Yugarani T, Tan BH, The M. Das NP. Effects of polyphenolic natural products on the lipid profiles of rats fed high fat diets. Lipid. 27: 181-186 (1992)
  - o Ziegler RG, Jones CJ, Brinton LA. Diet and risk of in situ cervical cancer among white

- women in the United States. *Cancer Causes Control*. 2: 17-29 (1991)
- o Zvyagintseva TN, Shevcheko NM, Chizhov AO, Krupnova TN, Sundukova EV, Isakov VV. Water-soluble poly saccharides of some far-eastern brown seaweeds Distribution, structure, and their dependence on the developmental conditions. *J. Marine Biol. Ecology*. 294: 1-13 (2003)