

툇을 이용한 기능성 다당류 추출 및 항비만 효과 검출

김 현 우*, 이 중 현**†

*프로애펙(주)

**† 조선대학교 생명화학공분자공학과

Enzymatic Extraction of Polysaccharide from *Hizikia fusiforme* and its Effects on Anti-obesity

Hyun Woo Kim*, Jung Heon Lee**†

*ProAbtech, Chumdangwagi-ro 123, Bukgu, Gwangju

**† Department of Chemical and Biochemical Engineering Chosun University, Pilmoondaero 309, Dongu, Gwangju

(Received : Jan. 24, 2020, Revised : Feb. 07, 2020, Accepted : Mar. 30, 2020)

Abstract : *Hizikia fusiforme*, a brown algae, is a major polysaccharide composed of alginate and fucoidan. In this study, the extraction of the useful substance using the organic solvent is generally avoided and a simple biocompatible / eco-friendly extraction method is devised to obtain an extract containing the water-soluble polymer polysaccharide as the main component from the dried or raw *Hizikia fusiforme*. In this study, the water soluble polymer polysaccharides were prepared with enzyme digestion and recovered with ethanol precipitation. The changes of reducing sugar content and protein content were observed and the molecular weight distribution was analyzed after enzyme digestion. Molecular weight measurements were performed using HPAEC and HPLC to reveal the constituents of the fraction material having anti-obesity bioactivity. The molecular weight (MW) of the extract was analyzed using a RI (Refractive Index) detector using a GPC column (PSS Suprema 1,000 Å). Dextran (MW: 5, 12, 50, 150, 670 kDa) was used as a standard. As a result, polysaccharides composed of fucose, galactose and xylose (Average molecular weight: 18.5 kD) were identified. The IC50 value was determined using an enzyme extract having the best inhibition rate in the anti-obesity activity inhibition experiment. viscozyme, celluclast and alcalse were 14.06, 11.27, and 10.02 mg/ml, respectively, indicating that alcalase is most suitable.

Keyword : *Hizikia fusiforme*, polysaccharides, Anti-obesity, separation

1. 서 론

툇은 호르몬 대사기능 조절에 관여하는 비타민과 무기질이 풍부하고 비타민 B, C 및 니아신 등이 함유되어있으며 생리활성을 나타낼 수 있는 taurine, n-3

지방산, 알긴산, fucoidan, laminarin, pectin 및 식이섬유 등 다양한 기능성 성분이 포함되어 있다. 무기질 중 칼슘과 철분이 다량 함유된 퇇은 노화 방지와 신체 장기의 기능을 활발하게 하며 면역증강작용, 종양 억제, 항 혈액 응고 작용, 비만억제 및 정장작용 등의 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다[1-3].

최근 한국인에서도 과도한 스트레스와 섭취 등으로 인해 비만 인구가 점차 증가하고 있는 추세를 보여 향후 국민 건강 관리에 심각한 우려가 제기되고 있는 실정이다 [4-7]. 비만이란 피하지방을 비롯한 체내 지방 저장량이 비정상적으로 많아진 상태를 뜻하며 당, 지질 대사의 이상을 초래하고 당뇨병, 관절염, 신장병, 심장 질환, 소화기 질환, 월경 이상, 불임증 등 심한

† Corresponding Author

성명 : 이 중 현

소속 : 조선대학교 생명화학공분자공학과

주소 : 광주 동구 필문대로 309 조선대학교

전화 : 062-230-7079

E-mail : gochamp@chosun.ac.kr

심리적 부담 등의 위험이 있으며 고혈압, 뇌졸중과 같은 여러 가지 성인병의 위험 인자로 널리 알려져 있다 [4-6, 8].

음식으로 섭취하는 지방의 90%는 여러 종류의 triglycerides(TGS)로 구성되며 체내에 흡수되기 위해 가수분해 과정이 필요하다. 지방의 50~70%를 다양한 lipase들이 fatty acid로 분해하고 사람의 주요 에너지원인 adipocyte안에 저장한다[8]. 따라서, 항비만 기능성 후보물질의 선별 및 효과 검증을 위해 여러 작용기작 혹은 signaling상에서 여러 가능성을 고려해볼 수 있으나, 일반적으로 항 비만 in vitro 실험의 대부분은 pancreatic lipase의 효소 활성 저해 효과를 확인함으로써 다양한 종류와 형태의 항 비만 기능성 저해 물질을 탐색할 수 있다[9].

Adipose tissue로부터 과잉의 fat(지방) 분해가 촉진되거나 이루어짐에 따라 obesity(비만)와 직접적인 관련이 있는 것으로 보여져 Adipose tissue에서의 과잉의 fat분해를 저해하거나 억제 가능한 물질 탐색보다는 보다 앞선 단계에서 음식으로 섭취하는 흡수를 위해 지방은 여러 종류의 triglycerides (TGS)로 구성되어 있어 이들이 흡수되기 위해서는 일단 가수분해 과정이 필요하다. 여기에 작용하는 pancreatic lipase 활성 저해 효과를 지닌 후보물질의 탐색은 기능성 항비만 후보물질의 저해 효과 기능을 검증하는 가장 기초적인 연구가 된다[6, 10-12].

최근에는 해조류가 여러 생리활성물질에 의한 건강 기능성 효과가 밝혀지면서 점차 해조류의 소비성향이 바뀌고 국민의 기호도 증대, 해조류를 이용한 고차 가공품 개발이 활발해지고 있는 실정이다[13-18]. 해조류의 건강기능성에 관한 연구가 진행됨에 따라 해조류 유래 당 생물학과 그 구조를 밝히고 합성 및 분해 방법을 다루는 당 화학, 탄수화물의 실용화를 연구하는 당 공학은 향후 해양생명공학의 첨단 분야가 될 것으로 인식되고 있다[13, 18, 19].

본 연구에서는 토트의 효소 추출물의 다당류를 분석하고 항 비만 기능성 후보물질 탐색, 생리활성 검증, 유효성분 물질 성분을 확인하였다. 기존의 단순 추출 가공이 아닌 토트 유래의 다양한 탄수화물을 효소를 이용한 저분자화 공정을 개발하고자 한다.

2. 실험재료 및 방법

2.1 실험 재료

일반성분 분석결과 지역별 및 자연산과 양식산의 차이가 거의 없어 완도 지역에서 가장 생산량이 많은 전남 완도군 완도읍 정도리에서 채취한 자연산 토트를 이용하였다. 채취한 토트를 깨끗이 세척한 후, 동결건조하여 분쇄한 후 시료로 사용하였다. 효소는 Viscozyme, Celluclast, Alcalase는 Sigma-Aldrich (Missouri, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2.2 산, 알칼리, 열수 추출물 제조

산 추출물은 토트 분말 시료 300mg 에 0.1N HCl

30ml 를 첨가하여 150 rpm 으로 진탕하면서 3시간 추출하고 원심분리기 사용하여 상등액을 모아 동결건조 하여 시료로 사용하였다. 알칼리 추출물은 0.1N NaOH을 사용하여 동일한 방법으로 제조하였다. 열수 추출물은 토트 분말 시료 300 mg 에 증류수 30 ml를 첨가하여 Autoclave를 이용하여 100℃로 1시간 추출하고 원심분리기를 사용하여 상등액을 모아 동결건조하여 시료로 사용하였다.

2.3 효소를 이용한 추출물 제조

효소를 이용한 추출 방법은 Table 1. 에 따라 수행하였다. 토트 분말 시료 2 g에 Buffer 100 ml를 넣고 각각 효소를 100 ul를 첨가하여 혼합한 후 150 rpm, 50℃에서 반응을 시켰다. 효소적 가수분해물은 100℃에서 15분간 가열하여 효소를 불활성화 시킨 후 8,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상등액만을 취하여 시료로 사용하였다.

생체 친화적/환경 친화적인 방법을 사용하여 추출하기 위해 효소를 사용하였다. 토트는 복합 다당류로 구성되어 있으며 각 효소에 따른 분해되는 부위가 달라 다양한 당류를 생성한다.

Table 1. Optimum hydrolytic condition of particular enzymes.

Enzyme	Buffer	pH	Temp (°C)	Enzyme characteristics
Viscozyme	0.1M sodium acetate	4.5	50	aravanase, cellulase, glucanase, hemi-cellulase, xylanase
Celluclast	0.1M sodium acetate	4.5	50	cellulase
Alcalase	0.1M sodium phosphate	8.0	50	endoprotease

2.4 추출 조건에 따른 환원당 함량 변화

탄수화물은 그 결합 수에 따라 단당류, 이당류, 다당류로 나뉘며 단당류와 이당류 중 알데하이드기(R-CHO) 및 케톤기(R-CO-R')의 존재에 따라 환원성이 있는 환원당과 환원성이 없는 비환원당으로 나누어진다. 환원당의 종류는 포도당(Glucose), 과당(Fructose), 유당(Loctose), 갈락토스(Galactose) 등이 있으며 이들 환원당과 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS)을 알칼리 조건에서 반응시켜 발색 하는 원리를 이용하여 환원당을 측정한다. 다양한 추출방법에 따른 환원당 함량을 DNS 방법으로 측정하였다(ref).

2.5 추출 조건별 단백질 함량 변화

UV-visible spectrophotometer를 이용해 흡광도를 측정하여 표준물질인 BSA (Bovine Serum Albumin)을 기준으로 시료에 얼마만큼의 단백질이

들어있는지 측정하는 방법 중 하나이다. Bradford 방법은 Coomassie blue에 의해 아미노산과 ionic 또는 hydrophobic interaction작용에 의해 단백질질을 정량하는 방법이므로 이러한 ionic 또는 hydrophobic interaction작용을 방해하는 물질이 존재하면 test가 제대로 이루어지지 않을 수 있다. 다양한 추출방법에 따른 환원당 함량을 Bradford 방법으로 측정하였다(ref).

2.6 GPC (Gel Permeation Chromatography)를

이용한 분자량 측정

투스출물의 분자량을 GPC 컬럼을 이용해 RI (Refractive Index) 검출기를 통하여 분석하였다. 분석 조건은 Suprema 1,000Å column (8x300 mm, PSS)을 사용하였으며 이동상으로 0.05% Sodium nitrate solution을 사용하였다. 상대적인 분자량 측정을 위해 표준물질로 Dextran (Fluka, Dextran MW : 670, 150, 50, 12, 5 kDa)을 사용하였다.

2.7 항비만 활성 측정

2.7.1 Fluorescence를 이용한 항비만 활성 측정

Pancreatic lipase는 triacylglycerol을 2-monoacylglycerol 과 fatty acid로 분해하는 핵심적인 반응을 진행하는 효소로 작용한다. 대표적인 pancreatic lipase inhibitor로 Streptomyces toxicicini로부터 유래된 lipstatin의 유도체인 tetrahydroliastatin가 있다. 이 tetrahydroliastatin은 pancreatic lipase 의 active site에 위치한 serin과 공유결합을 형성하여 lipase의 활성을 억제한다. 섭취지방의 30%까지 억제하지만 위장장애, 과민증, 담즙분비장애, 지용성 비타민 흡수 억제 등의 부작용이 수반된다.

Fluorescence를 이용한 항비만 활성측정방법은 다음과 같다. 96Well plate에 buffer 50 mM Sodium phosphate 90 ul, substrate 4-Methylumbelliferyl oleate(1 mM) 10 ul, Enzyme Lipase from porcine pancreas, Type VI-S (1 KU) 50 ul 를 혼합하여 5분 간격으로 30분 동안 37°C에서 fluorescence Ex. 360nm, Em. 460nm으로 측정하였다.

2.7.2 TLC (Thin layer chromatography)를

이용한 항비만 활성 측정

TLC는 실리카겔 지지체를 유리판 상에 얇고 균일하게 펼친 고정상을 사용한 크로마토그래피이다. 크로마토그래피의 기술에 의하여 물질이 분리되는 것은 서로 접촉해 있는 두 상에 대한 물질의 상분포가 물질에 따라 다르다는 것 때문에 발생한다. 한상(이동상)이 다른 하나의 상(정지상)을 통과하면 이동상의 성분 분자들이 정지상으로 들어가게 되고 두 상에 대한 성분 물질들의 분포는 평형에 도달하게 된다. 정지상에 더 약하게 붙잡히는 물질일수록 즉 정지상보다 이동상에 따라 더 크게 이동할 것이다.

전개 용매로 chloroform : acetone : acetic acid

= 96 : 4 : 1 로 만든 후에 Enzyme Lipase from porcine pancreas, Type VI-S (100U) 10 ul, 톱 추출물 20 ul, Trioelin 20 ul, buffer 50 mM sodium phosphate pH7.0 300ul를 37°C, 1시간 동안 microthemomixer를 이용하여 최대 rpm으로 반응을 시킨다. Ehly Ehter 400 ul 첨가후 상등액을 취하여 실리카겔 판에 전개를 시킨다.

2.8 PMP(1-pheneyl-3-methyl-5-pyrazolone)

-Labeling을 이용하여 구성 당 성분 분석

효소 추출한 톱 동결건조 smaple에 2.0 M TFA 를 처리하여 100°C에서 24시가 처리 한다. sample 100 ul, 1 mM PMP 100 ul, 0.3 M NaOH 100 ul를 1.5 ml Tube에 넣고 30분동안 70°C에서 가열은 한다. sample을 식힌 후 0.3 N HCl 100 ul를 첨가시켜 중화 시킨다. 반응 혼합물에 chlorofrom 1 ml을 넣어 상등액을 여러번 분리한다. 상등액을 증류수로 일정량 희석하여 HPLC로 다음과 같은 조건으로 분석하였으며, 여러 가지 표준당을 활용하여 PMP-labeling하여 각 당이 검출되는 시간을 측정하였다.

Table 2. Operating condition for analysis PMP-Labeled sample by HPLC

	Conditions
Instruct	Shimadzy LC-10AD
Column	Eclips XDB-C8 (4.6x150nm)
Moble phase	Sol.A : 20mM ammonium acetate
	Sol.B : acetonitrile
Flow rate	0.5ml/min
Detector	UV254nm

3. 결과 및 토론

3.1 추출 조건별 환원당 함량 변화

투스출 용매를 증류수로 이용한 것에 비해 산 (0.1N HCl)을 이용했을 때 더 많은 환원당이 검출되었다. 효소를 이용하여 톱으로부터 환원당 함량을 측정할 결과 다당류 분해 효소인 Viscozyme, Celluclast에서 반응시간에 따라 높은 환원당 함량이 증가함을 보여줬고, 단백질 분해 효소인 Alcalase 역시 높은 환원당 양을 보여주었다. 이러한 결과를 통해 일반 추출을 할 때 산 처리가 높은 환원당을 얻을 수 있었으나, 효소 처리 시 더 효과적이고 많은 양의 당 성분을 얻을 수 있다. 다당류 분해 효소에 의해 톱의 다당류가 저분자 화되어 환원당의 함량이 높아진 것으로 사료되며, 그 중 Celluclast으로 처리했을 때 더 많은 환원당 함량을 보였다 (Fig. 1).

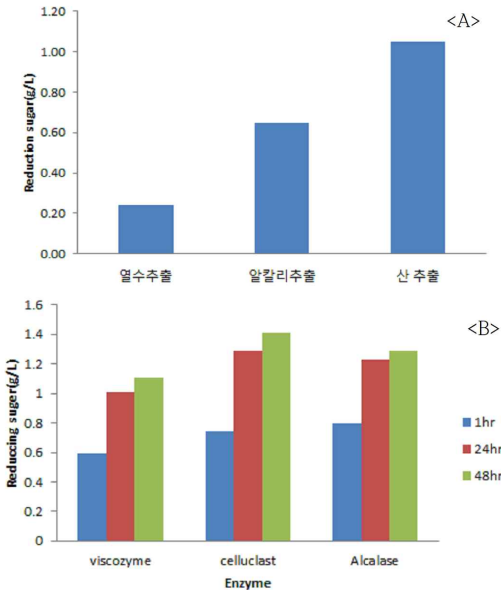


Figure 1. Reducing sugar content of *Hizikia fusiformis* (Harvey) Okamura. A; Water, Acid (0.1 N HCl), Alkali (0.1 M NaOH), B; Enzymatic extracts

3.2 추출조건별 단백질 함량 변화

뜻의 다양한 추출물의 단백질 함량을 측정된 결과 추출 용매를 증류수를 이용했을 때 가장 많은 단백질 양을 얻을 수 있었다. 알칼리 추출을 하였을 경우 산보다 더 높은 단백질 양이 검출되기 때문에 알칼리 처

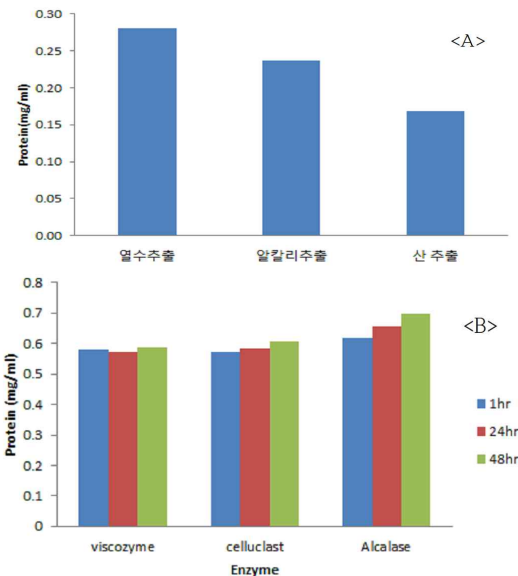


Figure 2. Protein content of *Hizikia fusiformis* (Harvey) Okamura. A; Water, Acid (0.1N HCl), Alkali (0.1M NaOH), B; Enzymatic extracts.

리와 가열을 동시에 한다면 단백질 함량을 더 높일 수 있을 것으로 사료 된다.

Viscozyme, Celluclast, Alcalase 세 가지 효소에서 비슷한 양의 단백질이 검출되지만 시간이 늘어날수록 단백질 분해 효소인 Alcalase에서 더 많은 양의 단백질이 검출되는 것을 확인할 수 있었다. 에탄올 처리 후 효소 추출을 한 실험은 시간에 따른 변화가 미미하고 효소 추출물과 같이 Alcalase에서 더 많은 양의 단백질이 검출되었다. 위의 결과로 보아 단백질 공정 시 Alcalase가 최적 효소로 보인다 (Fig. 2).

3.3 GPC(Gel Permeation Chromatography)를 이용한 분자량 측정

GPC를 사용하여 표준물질을 이용한 상대 분자량을 측정된 그림 (Fig. 3)과 분자 결과 표이다. 수평균 분자량은 약 4 만에서 단량체까지 다양하게 측정되었다. 대부분의 분자량 분포는 가우시안 분포를 가지는 다당류로 판단되며 분율을 보면 3가지의 주요 물질이 혼합된 물질로 판단된다.

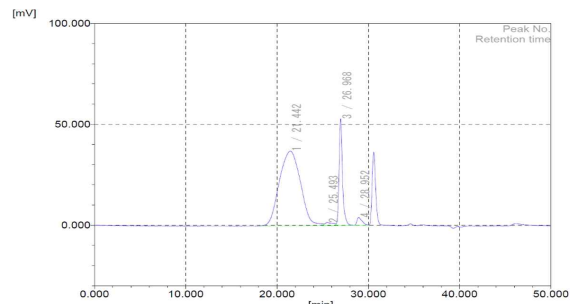


Figure 3. Molecular weight distribution of viscozyme extract.

Table 3. List of molecular weight distribution.

	Mn	Mw	Mp	Mw/Mn
Peak 1	41,300	107,000	64,700	2.60
Peak 2	1,390	1,500	1,680	1.09
Peak 3	547	561	574	1.03
Peak 4	163	167	179	1.02
Total	2,640	90,000	574	34.1

3.4 항비만 활성 측정

Pancreatic lipase는 triacylglycerol을 2-monoacyl glycerol과 fatty acid로 분해하는 핵심적인 반응을 진행하는 효소로 작용. 대표적인 pancreatic lipase inhibitor로 Streptomyces totricini로부터 유래된 lipstatin의 유도체인 tetrahydroliastatin을 들 수 있다. 이 tetrahydroliastatin은 pancreatic lipase의 active site에 위치한 serin과 공유결합을 형성하여 lipase의 활성을 억제 한다. 섭취지방의 30%까지 억제하지만 위장장애, 과민증, 담즙분비장애, 지용성

비타민 흡수 억제 등의 부작용이 수반된다.

$$\text{pancreatic lipase inhibition activity}(\%) = \left(\frac{A - B}{A} \right) \times 100$$

A : Blank Initial rate, B: Sample Initial rate

Figure 4.의 결과와 같이 비만과 관련되는 pancreatic lipase를 저해하는 정도를 측정하여 항비만 활성을 측정하였다. Alcalase에서 48 시간 처리 시 81%의 저해율을 보인 반면 다른 추출물에서는 낮은 활성을 보였다. 이는 Alcalase에 의해 생성된 올리고머 및 단당류와 단백질에 의한 저해 활성으로 보여지며, Viscozyme 과 celluclast 경우 24시간이 지나면 활성이 떨어지는 것을 보여 최적화된 시간은 24시간으로 설정하였다.

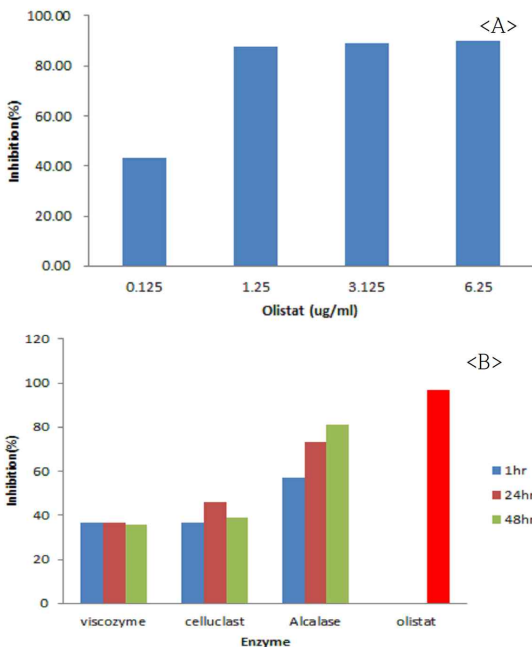


Figure 4. Pancreatic lipase inhibition of Extracts of Hizikia fusiformis. A; olistate, B; enzyme extracts.

3.5 IC₅₀ (half maximal inhibitory concentration) 측정 결과

억제 중간 값은 생물학적 생화학적 기능에서 화합물 효과의 척도이다. 양적인 측정치는 주어진 효소의 생물학적 과정을 절반으로 억제 시키는데 특정한 약품 또는 억제제가 얼마나 필요한가를 가리키는 것이다. 흔히 IC₅₀은 제약 연구에서 길항 약의 효능을 측정하는데 사용된다. IC₅₀을 pIC₅₀ 척도로 변환시키는데 높은 값은 지수 적으로 더 큰 효과가 있음을 나타낸다. 본 실험에서는 저해율이 높았던 효소 추출물을 동결건조 시켜 이를 1, 5, 10, 20 mg/ml 농도로 설정 하여 각각의 저해율을 측정한 후에 IC₅₀ 값을 아래와 같은 식으로 구하였다.

$$IC_{50} = (50 - A) / B$$

A : 농도별 그래프의 절편 B : 기울기

항비만 활성 저해 실험에서 가장 저해율이 좋았던 효소 추출물을 이용을 해서 IC₅₀ 값을 구해 보았다. Viscozyme, Celluclast 그리고 Alcalase는 각각 14.06, 11.27, 10.02 mg/ml로 나타났으며 시간별 항비만 활성 실험에서처럼 Alcalase에서 저해율이 가장 좋음을 보였으며 농도가 증가 할수록 저해율도 증가하는 양상을 볼 수 있었다. 효소에 따라 억제 중간 값은 Alcalase, Celluclast, Viscozyme 순으로 증가하였다 (Fig. 5).

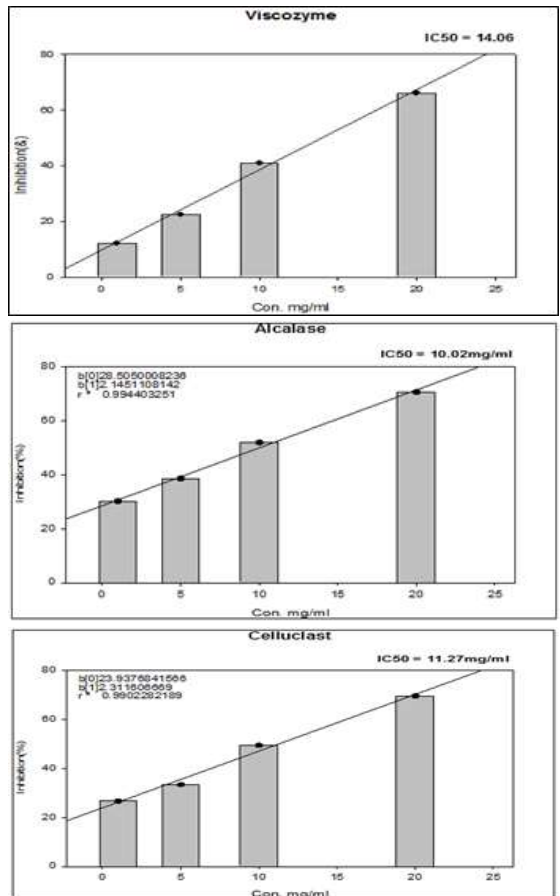


Figure 5. Anti-obesity IC₅₀ value of enzyme extracts.

3.6 TLC(Thin layer chromatography)를 이용한 항비만 활성 측정

TLC를 통해 항비만 저해를 살펴본 결과 Fluorescence 를 이용한 항비만 활성 결과와 비슷하게 olistat의 높은 저해로 일반 Triolein Spot 만을 볼 수 있고, 효소 추출물의 경우 olistat처럼 확연하게 저해 시키는 것은 아니었지만 일반 Triolein 과 Enzyme 처리한 결과보다 희미한 spot을 나타내어 Enzyme을 저해하

는 것을 확인할 수 있다 (Fig. 6).

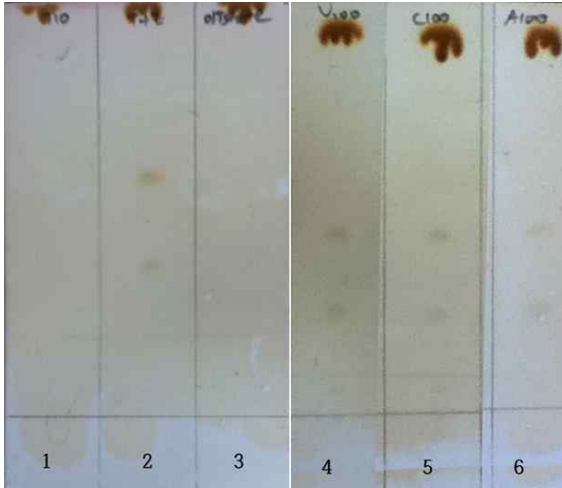


Figure 6. TLC chromatogram after treatment of enzyme extracts. 1; Triolein, 2; Triolein + Enzyme, 3; olistat, 4; Viscozyme, 5; Celluclast, 6; Alcalase

4. 결론

토의 유용성분을 건강 기능성 소재의 개발에서 사용되는 기존의 단순 추출 가공이 아닌 효소를 이용한 친환경 추출법을 고안하여 수용성 고분자 다당류를 저분자화하여 추출하는 공정을 개발하고 HPLC를 이용한 추출물의 분자량 및 생리활성 물질을 분석하였다.

효소는 다당류 분해효소인 viscozyme, celluclast와 단백질 분해 효소인 alcalase를 사용하였고, 효소를 이용한 추출의 최적화를 위해 산, 알칼리, 열수 추출과 비교, 분석하였다. 추출 조건에 따른 환원당 함량을 측정하기 위해 DNS 방법을 사용하였고 산, 알칼리, 열수 추출물의 함량은 0.5402 g/L, 0.6634 g/L, 0.2893 g/L였고 효소 추출 시 viscozyme 1.1868 g/L, celluclast 1.1080 g/L, alcalase 1.0811 g/L로 나타났다. 이러한 결과를 통해 추출 조건에 따른 화학적 조성 분석 결과로 보아 효소를 사용한 추출이 일반적인 추출 방법과 비교했을 시 친환경적이며 안전한 추출방법으로 사료된다. 효소를 이용한 토 추출물의 분자량 분포를 확인하기 위해 GPC를 통해 분석한 결과, viscozyme 추출물이 가수분해를 통해 약 41,300 Da의 저분자를 다량 함유함을 확인했다. 세 효소 추출물은 glucose, fucose, mannose, xylose, glucuronic acid의 구성 당 성분을 동일하게 함유하며 황산기 함량은 alcalase가 2.757 mg/L로 가장 높은 함량을 나타냈다.

비만과 관련된 pancreatic lipase를 저해하는 정도를 측정하여 항비만 활성을 측정한 결과 Alcalase에서 48시간 처리 시 81%의 저해율을 보였다. 이는 Alcalase에 의해 생성된 추출물에 의한 저해 활성으

로 보여지며, Viscozyme 과 celluclast 경우 24시간이 지나면 활성이 떨어지는 것으로 보인다. 항비만 활성 저해 실험에서 가장 저해율이 좋았던 효소 추출물을 이용하여 IC₅₀ 값을 측정한 결과 Viscozyme, Celluclast, 그리고 Alcalase는 각각 14.06, 11.27, 10.02 mg/ml로 나타났다. 항비만 활성은 Alcalase 추출물에서 저해율이 가장 우수함을 보였다.

감사의 글

이 논문은 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음(2019)

참고문헌

1. Kolsi, R. B. A., Jardak, N., Hajkacem, F., Chaaben, R., El Feki, A., Rebai, T., Jamoussi, K., Fki, L., Belghith, H., Belghith, K International Journal of Biological Macromolecules, 102, 119-129(2017).
2. Kwon, H. O., Lee, M., Kim, O. K., Ha, Y., Jun, W., Lee, J., Nutrition Research and Practice, 10(3), 265-273(2016).
3. Kwon, T. H., Wu, Y. X., Kim, J. S., Woo, J. H., Park, K. T., Kwon, O. J., Seo, H. J., Park, N. H., Journal of the Science of Food and Agriculture, 95(9), 1830-1837(2015).
4. Castro, M., Preto, M., Vasconcelos, V., Urbatzka, R., Current Topics in Medicinal Chemistry, 16(23), 2577-2604(2016).
5. Ding, Y., Wang, L., Im, S., Hwang, O., Kim, H. S., Kang, M. C., & Lee, S. H., Marine Drugs, 17(11), 637(2019).
6. Kim, I. H., Choi, J. W., Lee, M. K., Kwon, C. J., Nam, T. J., International Journal of Molecular Medicine, 41(2), 924-934(2018).
7. Zhao, B., Cui, Y., Fan, X., Qi, P., Liu, C., Zhou, X., Zhang, X., Plos One, 14(6), (2019)
8. Kang, M. C., Kang, N., Ko, S. C., Kim, Y. B., Jeon, Y. J., Food and Chemical Toxicology, 90, 36-44(2016).
9. Kim, K. B. W. R., Jung, J. Y., Cho, J. Y., & Ahn, D. H., Biotechnology and Bioprocess Engineering, 17(4), 739-745(2012).
10. Kawee-Ai, A., Kim, A. T., Kim, S. M., Journal of Oceanology and Limnology, 37(3), 928-937(2019).
11. Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Murakami-Funayama, K., Miyashita, K., Molecular Medicine Reports, 2(6), 897-902(2009).
12. Pandey, S., Sree, A., Dash, S. S., Sethi, D. P., Chowdhury, L., Microbial Cell Factories, 12(1), 35(2013).

13. Anand, N., Rachel, D., Thangaraju, N., Anantharaman, P., *Plant Genetic Resources*, 14(4), 303-313(2016).
14. Cho, S. H., Park, S. Y., & Choi, S. W., *The FASEB Journal*, 22, 681-681(2008).
15. Hassan, M. M., Mueller, M., Tartakowska, D. J., & Wagner, M. H., *Journal of Applied Polymer Science*, 120(3), 1843-1849(2011).
16. Rai, S. N., Chopra, R. C., Sharma, K., *Indian Journal of Animal Sciences*, 78(11), 1278-1280(2008).
17. Shimoda, Y., Suzuki, Y., Endo, Y., Kato, K., Tachikawa, M., Ogawa, M., Endo, G., Yamanaka, K., *Epidemiology*, 20(6), 124-125(2009).
18. Solomon, R. J., Santhi, V. S., *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 24(9), 1747-1752(2008).
19. Thomas, N. V., & Kim, S. K., *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32(3), 325-335(2011).
20. Chakraborty, S., *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 36(1), 1-19(2017).
21. Charles, A. L., Chang, C. K., Wu, M. L., & Huang, T. C., *Food and Chemical Toxicology*, 45(12), 2390-2396(2007).
22. Hu, X., Tao, N., Wang, X., Xiao, J., & Wang, M., *Journal of Functional Foods*, 21, 372-387(2016).