

## 해양미세조류의 라디칼소거활성 검색

최진석,<sup>1,2</sup> 이원갑,<sup>1,2</sup> 손병화,<sup>1,\*</sup> 김동수,<sup>2</sup> 최흥대,<sup>3</sup> 최재수,<sup>4</sup> 정지형,<sup>5</sup> 임광식,<sup>5</sup> 최원철<sup>6</sup>

<sup>1</sup>부경대학교 화학과, <sup>2</sup>경성대학교 식품공학과, <sup>3</sup>동의대학교 화학과,  
<sup>4</sup>부경대학교 식품생명과학과, <sup>5</sup>부산대학교 약학대학, <sup>6</sup>부산대학교 생물학과

## Screening on Radical Scavenging Activity of Marine Microalgae

Jin Seok Choi,<sup>1,2</sup> Won Kap Lee,<sup>1,2</sup> Byeng Wha Son,<sup>1,\*</sup> Dong-Soo Kim,<sup>2</sup> Hong Dae Choi,<sup>3</sup>

Jae Sue Choi,<sup>4</sup> Jee H. Jung,<sup>5</sup> Kwang Sik Im,<sup>5</sup> Won Chul Choi<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea,

<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, Kyungsung University, Pusan 608-736, Korea,

<sup>3</sup>Department of Chemistry, Donggeui University, Pusan 614-714, Korea,

<sup>4</sup>Department of Food and Life Science, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea,

<sup>5</sup>College of Pharmacy and <sup>6</sup>Division of Biological Sciences,

Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

**Abstract** – In order to screen new radical scavenging principle which is expected to be antiaging drug lead, we have investigated 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity of the marine microalgae, greenalgae(10 speices), diatom (10 speices) and blue-green algae (10 speices). The significant activities(IC<sub>50</sub>: <100 µg/ml) were observed in 4 species of green algae (MA002, 006, 009, 010), 1 species of diatom (MA015) and 5 species of blue-green algae (MA017, 018, 019, 024, 025). Within the scope of family tested, MA009 (IC<sub>50</sub>=78 µg/ml), MA015 (IC<sub>50</sub>=38 µg/ml) and MA019 (IC<sub>50</sub>=41 µg/ml) displayed the most significant activity. Among the marine microalgae tested at family level, cyanophycean blue-green algae was shown to be the most active family on screening of new bioactive compounds.

**Key words** – Marine microalgae; Green algae; Diatom; Blue-green algae; Free radical; DPPH;

미세조류는 해양에서의 기초생산, 즉 태양에너지를 이용하여 무기물로부터 유기물을 생산하며, 그 종류도 수만종에 이르고 있을 뿐만 아니라, 해양생물의 먹이사슬에서 1차생산자로서 그 중요성은 매우 크다. 분류학적으로는 넓은 의미의 세균에 속하는 원핵생물의 남조류로부터 고등식물에 가까운 녹조류, 원생동물문으로도 분류되는 편모조류까지 그 종류가 다양한 관계로 단백질, 지방, 탄수화물과 같은 1차 대사성분은 물론, 이들로부터 먹이연쇄에 따라 2차적으로 만들어지는 2차 대사성분과 그 생물활성도 매우 다양하다.

이들 미세조류는, 적조의 경우에서와 같이 환경조건에 따라 폭발적인 증식력을 가지고 있으며, 배양이 가능하기 때문에 기존의 생태계를 손상시키지 않고, 유

용물질을 생산하거나 환경문제해결 등 다각적 방면에 이용될 수 있으며, 오늘날, 해양미세조류를 대상으로 한 연구는 주로 biotechnology를 이용하여 유용한 물질을 생산하고 있는 연구와 그 외에 생조체를 그대로 폐수처리, 사료생산, 우주이용 및 환경정화 등에 사용하기 위한 연구가 실험 모델을 통해 수행되고 있다.<sup>1,2)</sup>

노화억제제의 탐색과 개발을 지향한 해양생물유래의 생물활성물질에 대한 화학적연구의 일환으로서 해양미세조류의 녹조, 규조 및 남조 각각 10종을 대상으로 free radical 소거활성을 검색하였다.

### 재료 및 방법

**1/2 배지의 조성 및 조제<sup>3)</sup>** – 해수 1리터에 NaNO<sub>3</sub> (150 mg), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (8.69 mg), Ferric EDTA (10 mg),

\*교신저자 : Fax : 051-628-8147

MnCl<sub>2</sub>(0.22 mg), CoCl<sub>2</sub>(0.11 mg), CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O (0.0196 mg), ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O(0.044 mg), Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> · 9H<sub>2</sub>O(50 mg), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O(0.012 mg), B<sub>12</sub>(1.0 µg), Biotin(10 µg), Thiamine · HCl (0.2 mg)을 용해하여 조제 하였으며, 121°C에서 20분간 멸균하여 배지로 사용하였다.

**배양** - 부경대학교 한국해양미세조류은행 (Korea Marine Microalgae Culture Center)에서 보관 중인 해양미세조류 중 녹조(10종), 규조(10종) 및 남조(10종)를 1 ml씩 분양 받아, f/2 배지 (10 ml)에 접종한 후, 23°C, 형광 불빛 (5000Lux) 아래, 공기를 주입하면서 10~31일간 배양하였다. 이어, 그 배양액을 같은 조건에서 f/2배지 100 ml, 500 ml, 1L, 15L 순으로 계대배양하였다.

**수확** - 배양액(15L)을 대형 원심분리기 (AML flow basket, 5000 rpm)로 30분간 원심분리한 후 얻은 잔사를 감압여과하여 생조체(生藻體)를 얻은 다음 동결건조하였다.

**추출** - 동결 건조한 조체(藻體)를 상온에서 용매 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH(1:1)에 침적시켜 24시간 추출한 후 (2회) 감압 여과 하고, 분리 된 추출액을 감압 하에서 용매를 유거 하여 추출엑스를 얻었다.

**자유라디칼 소거활성시료의 조제** - 각 엑스(1 mg)를 칭량하여 MeOH(1 ml)에 녹여 1 mg/ml로 조제한 후, 이것을 단계별로 희석하여 1000 µg/ml, 100 µg/ml 및 10 µg/ml농도로 조절하였다.

**활성시험** - 위에서 조제한 각 시료(160 µl)를 96-well microtiter tray에 취한 다음, 여기에 1.5 × 10<sup>-4</sup> M DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)(40 µl)을 각 well에 가하였다. 시료자체의 색깔이나 용매 등의 영향을 보정하기 위하여 각 시료(160 µl)와 MeOH(40 µl)을 각각의 well에 주입한 대조군을 조제하였다. 시료군과 대조군을 30분간 암소에 방치한 후 분광광도계(microplate reader)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료군과 대조군을 비교하여 흡광도차를 조사하였으며, 평균 차이율을 이용한 IC<sub>50</sub> (µg/ml)값은 아래의 방법과 같이 계산하였다.

**IC<sub>50</sub> (µg/ml)값의 결정** - IC<sub>50</sub> 값은 대조군에 비해 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 시료의 농도로서 Finney의 probit analysis법을 이용하여, Corrected % difference(y)대 log concentration(x)의 linear regression 관계식을 구한 다음, y=50%일때의 값을 구하고, 이 값의 antilog치를 취하여 IC<sub>50</sub> 값을 계산하였다.<sup>4)</sup>

## 결과 및 고찰

풍부한 종류의 해양생물로부터 새로운 생리활성 물질을 개발하기 위해서는 선택성이 크며, 적은 비용으로 손쉽게 검색할 수 있는 새로운 생물활성 검정법의 확립은 대단히 중요하다.

기존의 free radical 소거활성 assay법<sup>5)</sup>을 개량하여, microscale로써 대량으로 검정할 수 있는 개량 assay법을 이용하여 노화억제제 개발을 지향한 해양미세조류 유래의 free radical 소거활성 물질의 검색에 적용하였다.

15리터 규모로 배양한 녹조(10종), 규조(10종) 및 남조(10종)를 수확하여 얻은 생조체(生藻體)를 동결건조하고 용매(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH=1:1)로 추출한 후, 각 엑스를 대상으로 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 소거활성을 검색한 결과, 유의성 있는 라디칼 소거활성 (IC<sub>50</sub> : <100 µg/ml)이, 녹조의 경우 4종(MA002, 006, 009, 010), 규조의 경우 1종 (MA015), 남조의 경우 5종 (MA017, 018, 019, 024, 025)에서 관찰되었으며, 종류별로 살펴 본 가장 강한 소거활성은 녹조 MA009 (IC<sub>50</sub>=78 µg/ml), 규조 MA015 (IC<sub>50</sub>=38 µg/ml) 및 남조 MA019 (IC<sub>50</sub>=41 µg/ml)에서 관찰되었다(Table 1).

해양 미세조류의 종류별로 살펴 본 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 소거활성 (IC<sub>50</sub> : <100 µg/ml)을 가지는 비율은 녹조(40%), 규조(10%), 남조(50%)의 비율로 관찰되었다. 따라서, 남조류가 라디칼 소거활성 검색에 가장 유망한 생물종으로 사료되었다 (Table 2).

해양 미세조류의 종류는 대략 수만 종에 이르는 것으로 알려져 있으며,<sup>6)</sup> 오늘날 biotechnology의 중요한 연구대상이 되고 있다.<sup>1)</sup> 특히, 해양 미세조류는 그 다양성과 대량배양의 가능성에 의해 새로운 유용물질의 생산이나<sup>7,9)</sup> 지구환경문제해결<sup>10)</sup>등의 여러 가지 응용 가능성이 보고되고있어, 해양 미세조류를 대상으로 한 항노화 신약선도물질의 탐색연구결과에 많은 흥미가 기대되고 있다.

## 사 사

해양 미세조류를 분양해 주시고, 배양시설을 사용할 수 있도록 배려하여 주신 부경대학교 수산과학연구소 부설 한국미세조류은행의 허성범 교수님께 감사드립니다. 본 연구는 해양수산부의 지원으로 수행되

**Table 1.** Free radical scavenging activity of the marine microalgae

Serial #	Family	Scientific name	Acitivity
			DPPH (IC <sub>50</sub> : µg/ml)
MA001	Chlorophyceae	<i>Chlorella stigmatophora</i>	110
MA002	"	<i>Chlorella sp.</i>	85
MA003	"	<i>Chlorella sp.</i>	154
MA004	"	<i>Chlorella sp.</i>	127
MA005	"	<i>Chlorella sp.</i>	123
MA006	"	<i>Unid. Chlorophyceae</i>	87
MA007	"	<i>Chlorella sp.</i>	131
MA008	"	<i>Chlorella sp.</i>	200<
MA009	"	<i>Chlorella sp.</i>	78
MA010	"	<i>Nonnochloris oculata</i>	91
MA011	Bacillariophyceae	<i>Navicula incerta</i>	200<
MA012	"	<i>Navicula incerta</i>	200<
MA013	"	<i>Navicula incerta</i>	200<
MA014	"	<i>Navicula sp.</i>	200<
MA015	"	<i>Nitzschia sp.</i>	38
MA016	Cyanophyceae	<i>Oscillatoria sp.</i>	197
MA017	"	<i>Lyngbya taylorii</i>	82
MA018	"	<i>Oscillatoria sp.</i>	82
MA019	"	<i>Oscillatoria sp.</i>	41
MA020	"	<i>Oscillatoria sp.</i>	200<
MA021	"	<i>Oscillatoria sp.</i>	167
MA022	"	<i>Oscillatoria sp.</i>	134
MA023	"	<i>Oscillatoria sp.</i>	161
MA024	"	<i>Oscillatoria sp.</i>	48
MA025	"	<i>Oscillatoria sp.</i>	94
MA026	Bacillariophyceae	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	167
MA027	"	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	121
MA028	"	<i>Hantzschia marina</i>	108
MA029	"	<i>Navicula sp.</i>	133
MA030	"	<i>Navicula sp.</i>	135
(standard: ascorbic acid)			10

**Table 2.** The evaluation of bioactive frequency of the marine microalgae by free radical(DPPH) scavenging assay

Marine algae	No. of sample	Bioactive sample(%)
		DPPH(IC <sub>50</sub> : < 100 µg/ml)
green algae	10	4 (40%)
diatom	10	1 (10%)
blue-green algae	10	5 (50%)

었으며, 이에 감사드립니다.

### 인용문헌

- Matsunaga, T. and Takeyama, H.(1995) Biotechnological application of marine microalgae. *J. Chem. Soc. Jpn.* No. 9: 669-680.
- Metting Jr., F. B.(1996) Biodiversity and application of microalgae. *J. Indust. Microbiol.* 17: 477-489.
- McLachlan, J. (1975) Growth media-marine. In Stein, J. R. (ed.), Handbook of phycological methods: Culture methods and growth measurements, 25-51. Cambridge University Press. London, U.K.
- Finney, D. J.(1971) Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press. Cambridge.
- Kim, S. S., Lee, C. K., Kang, S. S., Jung, H. A. and Choi, J. S.(1997) Chlorogenic acid, an antioxidant principle from the aerial parts of *Artemisia wayomogi* that acts on DPPH radical. *Arch. Pharm. Res.* 20: 148-154.
- 山口勝己 編(1992) 微細藻類の利用, 水産學 シリーズ 91, 日本水産學會監修, 恒星社厚生閣, 東京.
- Choi, J. S., Lee, D. I., Lee, W. K., Kim, D. -S., Choi, H. D. and Son, B. W.(1999) 2-O-( -D-Glucopyranosyl)glycerol, a new glycerol glycoside from the marine blue-green alga *Oscillatoria sp.* *Bull. Korean*

- Chem. Soc.* 20: 1121-1122.
8. Wachi, Y., Burgess, J. G., Iwamoto, K., Yamada, N., Nakamura, N. and Matsunaga, T. (1995) Effect of ultraviolet-A(UV-A) light on growth, photosynthetic activity and production of biopterin glucoside by the marine UV-A resistant cyanobacterium *Oscillatoria* sp. *Biochim. Biophys. Acta* 1244: 165-168.
  9. Jeffrey, S. W., MacFavish, H. S., Dunlap, W. C., Veski, M. and Groenewoud, K. (1999) Occurrence of UVA- and UVB-absorbing compounds in 152 species(206 strains) of marine microalgae. *Marine Ecology Progress Series* 189: 35-52.
  10. Matsunaga, T., Takeyama, H., Nakao, T. and Yamazawa, A. (1999) Screening of marine microalgae for bioremediation of cadmium-polluted seawater. *J. Biotechnol.* 70: 33-38.

(2000년 5월 17일 접수)