

잠재적 푸코잔틴 및 오메가-3 지방산 생산자로서 토착 규조류 오돈텔라의 분리 및 배양 특성

Isolation and Characterization of Indigenous Diatom, *Odontella* sp. BS-003 as Potential Fucoxanthin and Omega-3 Fatty Acid Producer

여진아^{1,2}, 조대현¹, 김우림^{1,2}, 김희식^{1,2*}

Jina Heo^{1,2}, Dae-Hyun Cho¹, Urim Kim^{1,2}, Hee-Sik Kim^{1,2*}

¹한국생명공학연구원 세포공장연구센터, 대전광역시 유성구 과학로 125, 34141, 대한민국

²과학기술연합대학원대학교 환경바이오공학, 대전광역시 가정로 217, 34113, 대한민국

¹Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology(KRIBB) Cell Factory Research Center, Daejeon 34141, Republic of Korea

²Korea University of Science and Technology(UST) Department of Environmental Biotechnology, Daejeon 34113, Republic of Korea

(Received 31 March 2018, Revised 22 June 2018, Accepted 25 June 2018)

Abstract Fucoxanthin has been reported as bioactive compounds exhibiting strong antioxidant, anticancer and anti-inflammatory activities. Owing to its a wide range of applications and potentials, commercial production of fucoxanthin from algae has been attracted many attentions. Although, most of seaweeds and diatoms contain fucoxanthin as major carotenoid contents, low productivity of fucoxanthin still hinder the industrial application. Here, we newly isolated and identified indigenous marine diatom *Odontella* sp. BS-003 as a resource of fucoxanthin production. The characterization, optimization and production of the fucoxanthin, along with other bioactive compound omega-3 fatty acid from *odontella* sp. BS-003 were analyzed in this study, and the results represented optimal culture condition (two-fold silicate containing F/2 medium) significantly enhanced the algal biomass productivity. The maximum biomass (1.83 g/L), fucoxanthin (3.88 mg/g), along with omega-3 fatty acid (10 %, w/w) were obtained from the 10 L of photobioreactor. Based on the results, it is speculated that the microalga *Odontella* sp. BS-003 can be a promising natural resource for the production of bioactive compounds.

Keywords : Microalgae, *Odontella* sp., Optimization, Fucoxanthin, Omega-3 fatty acid

서 론

푸코잔틴은 지구상에 존재하는 카로티노이드 화합물 중 가장 많이 존재하는 화합물로서 지구상 자

연계에 존재하는 카로티노이드의 약 10% 이상을 차지하는 것으로 예측되고 있다 [1-3]. 푸코잔틴은 잔토필의 일종으로 allen 결합, polyenic group, 5,6-mono epoxide group을 모두 가지고 있는 독특한 poly-

* Corresponding author
Phone: +82-42-860-4326 Fax: +82-42-860-4594
E-mail: hkim@kribb.re.kr

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

isoprenic 구조를 가지고 있다 [4]. 이러한 구조적 특징 때문에 푸코잔틴은 적갈색을 띠고 400-500nm 범위의 파장을 강하게 흡수한다 [5-6]. 이 화합물은 해양자원인 갈조류와 규조류에 많이 존재하므로 해양조류를 통해서 대량 얻을 수 있다. 푸코잔틴은 미세조류에서 광합성에 필요한 빛을 수확하는 역할을 한다고 알려져 있으며, 환경에서 강한 빛에 노출되어 있는 미세조류의 경우에는 슈퍼옥사이드 같은 다양한 활성 산소 종이 생성되고 이러한 활성산소를 소거하는 역할로서 카로티노이드가 사용된다고 여겨진다 [7-8]. 따라서, 카로티노이드를 많이 함유하고 있는 미세조류 추출물은 뛰어난 항산화 및 항염 작용을 나타낸다 [3]. 특히, 카로티노이드 중 하나인 푸코잔틴이 항산화, 간보호, 항고지혈증, 항염증, 항노화, 항당뇨 등의 다양한 생리 활성을 갖는 것으로 많은 연구자들에 의해 확인되었으며, 그 외에도 혈관신생억제, 피부보호, 눈 보호 효과 등이 보고되고 있다 [2,9-13]. 따라서, 푸코잔틴의 다양한 활성을 가지는 제품 개발을 위한 산업화 연구가 지속되고 있다. 그 동안 대부분의 연구는 *Laminaria japonica*, *Eisenia bicyclis*, *Undaria pinnatifida*와 같은 거대조류로부터 푸코잔틴을 추출하기 위해 수행되어왔다 [14-15]. 하지만 거대조류들은 약 0.122mg/g 수준의 매우 낮은 농도의 푸코잔틴을 함유하고 있기 때문에 푸코잔틴의 생산은 상업적으로 어려움이 있다 [16,17]. 따라서, 푸코잔틴을 생산할 수 있는 대체 원료를 찾는 것이 필요하다.

Dunaliella salina, *Haematococcus pluvialis*, *Scenedesmus almeriensis*와 같은 몇몇 미세조류는 베타카로틴, 아스타잔틴, 루테인과 같은 특정 카로티노이드를 대량 생산할 수 있다고 알려져 있다 [18]. 푸코잔틴을 함유하고 있는 약 10만종의 규조류는 다양성에도 불구하고 산업적으로 이용되는 종은 몇 종에 불과하다. *Phaeodactylum tricornutum*, *Isochrysis galbana*, *Odontella aurita*는 거대조류보다 최소 10배 이상의 푸코잔틴을 함유하고 있기 때문에 산업적인 원료로서 대량 배양 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 중 *O. aurita*는 15-30 μm 길이를 갖는 규조류로서 DHA(Docosahexaenoic acid, 22:6n-3), EPA(Eicosapentaenoic acid, 20:5n-3)를 포함하는 오메가-3 지방산을 28 % 가량 함유하고 있어 유용물질

생산 원료로서 주목받고 있다. 오메가-3 지방산은 심혈관 질환, 인슐린 저항성 및 염증에 대한 효능이 있다고 보고되어 어류로부터 추출한 오메가-3 지방산은 건강기능식품으로 널리 이용되고 있다 [19].

다양한 유용물질을 함유하고 있는 미세조류를 산업화하기 위한 생명공학기술과 배양 시스템의 발전에도 불구하고, 여전히 바이오매스 및 유용물질의 생산성이 낮아 미세조류를 이용한 산업이 활발히 진행되지 못하는 실정이다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 바이오매스 생산성 및 유용물질 함량이 높은 우수한 미세조류 균주를 분리 확보하는 것이 중요하다. 따라서, 본 연구에서는 푸코잔틴, 오메가-3 지방산을 고농도로 함유하고 있는 토착 미세조류 *Odontella sp.* BS-003을 국내 남해 인근 해변에서 분리하여 동정하였다. 배지조성과 광 파장에 따른 성장 비교를 통한 배양최적화를 진행하여 바이오매스 생산성을 향상시켰으며, 푸코잔틴, 오메가-3 지방산의 함량을 분석하여 유용물질 생산 균주로서의 잠재성을 평가하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 동정

대한민국 남해 인근 해변에서 해수 시료를 채취한 후 원심분리(3,000 rpm, 20 min)하여 농축하였다. 농축한 해수 시료를 분리기술인 마이크로피펫팅(Micropipetting)을 통해 미세조류로 분리하였고, 분리된 미세조류는 멸균된 F/2 배지에서 25°C, 100 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ 의 광원 하에서 배양하였다 [20]. 분리된 미세조류는 광학현미경(Nikon Eclipse 80i, Nikon, Japan)으로 관찰하여 형태학적 동정을 하였다.

분리된 미세조류에 대한 유전학적 동정을 위해 18S rDNA 염기서열 분석 실험을 수행하였다. DNA 추출키트 (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega, USA)로 분리한 Genome DNA를 이용하여 18S rDNA의 염기서열 분석을 통해 미세조류를 동정하였다. 18S rDNA 염기서열을 확인하기 위해 D512 프라이머를 사용하여 해당 유전자의 단편을 중합효소연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction, PCR)을 통해 증폭시켰다 [21]. 정방향 프라이머는 5'-ATTCCAGCTCCAATAGCG-3', 역방향 프라이머는 5'-GACTACGATGGTATCTAATC-3'를 사용하였

다. PCR은 GO Taq DNA 중합효소 (GoTaq Green Master Mix 2×, Promega, USA)를 사용하였고, 미세조류로부터 추출한 DNA를 사용하였다 [21]. PCR 조건은 초기변성을 94°C에서 5 분간 실시한 후, 94°C에서 45 초, 58°C에서 45 초, 72°C에서 45 초의 반응을 35회 반복하였고 마지막 72°C에서 5 분간 실시하였다. 염기서열 분석은 슬젬트(주)에 의뢰하여 수행하였고, 분석한 미세조류의 염기서열을 NCBI blast 프로그램을 이용하여 동정하였다.

배지 최적화

분리 균주의 최적 배양 조건을 확립하기 위하여 F/2 배지의 조성에서 질소와 규소의 농도를 조정하여 5일 동안 배양하였다 [22]. F/2 배지에 규소를 넣지 않은 F/2-Si(-) 배지, F/2 배지 질소 농도의 2배의 질소를 넣은 F/2-N(+) 배지 (150 g/L의 NaNO₃를 포함하는 배지) 및 F/2 배지 규소 농도의 2배의 규소를 넣은 F/2-Si(+) 배지 (60-90 g/L의 NaSiO₃ · H₂O를 포함하는 배지)를 이용하여 배지 조성에 따른 성장을 확인하였다. 배양은 25°C, 100 μmol/m²/s, 120 rpm의 속도로 교반하여 5일간 진행하였다. 배양기간 동안 세포건조중량(Dry Cell weight, DCW)을 측정하여 통해 성장 정도를 확인하였다. 세포건조중량은 25 mm Glass microfiber filters (Whatman, UK)를 이용하여 여과된 균체를 105°C에서 3시간 동안 건조시켜 그 무게를 측정하여 분리 균주의 성장을 분석하였다.

배양 및 Cell density 분석

분리 균주를 기존 배지보다 두 배 농도의 규소가 들어있는 F/2를 이용하여 15-18°C의 온도, 100 μmol/m²/s의 광원, 120 rpm의 교반속도로 10 L 유리 광생물 반응기(Biotron GX, Hanil science medical, Korea)에서 회분식 배양을 5일 간 진행하였다. 배양기간 동안 미세조류의 성장을 측정하기 위하여 24 시간 간격으로 채취한 시료는 세포건조중량 측정을 통해 Cell density를 확인하였다 [23]. 세포건조중량은 25 mm Glass microfiber filters (Whatman, UK)를 이용하여 여과된 균체를 105°C에서 3시간 동안 건조시킨 후 그 무게를 측정하여 미세조류의 성장을 분석하였다.

Nile Red 염색을 이용한 중성지질 확인

Odontella sp. BS-003의 중성지질을 확인하기 위

하여 Nile 염색법을 사용하였다 [24]. 아세톤 10 μg/L의 농도로 Nile red powder를 용해시킨 용액을 1 mL의 균주 배양액에 1 μL를 첨가한 후 약 1분 동안 혼합하여 반응시켰다. 반응 후, Nikon Eclipse 80i (Nikon, Japan) 형광 현미경을 이용하여 Nile red 염색에 의한 중성지질을 확인하였다. 모든 실험 과정은 빛을 차단한 후 진행하였다.

지질 함량 분석

총 지질 추출 방법은 Bligh and Dyer method를 변형하여 사용하였다 [25]. 약 5×10^7 cells/mL 농도의 배양액 10 mL를 4,000 rpm으로 20분간 원심분리한 후 균체를 수확하였다. 수확된 *Odontella* sp. BS-003에 15 mL의 추출용매(Chloroform:Methanol=2:1, v:v)를 넣고 초음파파쇄기(Vibra Cell, Sonics & materials Inc., USA)를 사용하여 5 분 동안 세포를 파쇄 하였다. 300 rpm 속도의 편넬셰이커를 이용하여 파쇄된 세포로부터 지질을 15 분 동안 추출하였다. 추출된 용액에 증류수 10 mL을 첨가하고 4,000 rpm으로 10 분간 원심 분리하여 유기용매와 물 층으로 나눈 뒤, 유기 용매 층을 분리하여 유기용매용 PTFE 필터(0.2 μm, Watman, UK)로 여과한 후 Cell debris를 제거하였다. Cell debris를 제거한 시료는 회전감압농축기(Rotary Vacuum Evaporator, Buchi, Switzerland)를 이용하여 추출용매를 제거한 후 시료를 건조하여 지질의 무게를 측정하였다. 측정된 무게는 추출에 사용한 바이오매스의 초기 무게와 비교하여 % of dcw (오일무게/건조중량*100)을 계산하였다.

지방산 조성 분석

지방산 분석을 위해 *Odontella* sp. BS-003의 배양액 5 mL을 4,000 rpm으로 15 분간 원심 분리하여 균체를 수확한 후 지방산 추출을 진행하였다 [26]. 수확한 균체는 Glass tube에 옮겨 Saponification 용액(NaOH 45 g, Methanol 150 mL, 증류수 150 mL) 1 mL과 혼합하였다. 혼합한 시료는 100°C에서 5 분 동안 반응시킨 후 다시 혼합하여 25 분 동안 100°C에서 추가적으로 반응시켰다. 반응시킨 혼합물의 온도가 상온 정도로 낮아지면 Methylation 용액 (6N HCl 325 mL, Methanol 275 mL) 2 mL을 첨가한 후 혼합하여 80°C에서 10 분 간 반응시켰다. 혼합물을 꺼내어 빠르게 냉각시킨 후 Extraction 용매 (Hexane 200 mL

Methyl tert-butyl ether 200 mL) 1.25 mL을 첨가한 후 편넬쉐이커로 10 분 간 교반하여 지방산을 추출하였다. 추출된 지방산 용액에 Base Wash 용액 (NaOH 10.8 g, 증류수 900 mL) 3 mL을 혼합하여 지방산을 세척한 뒤, 이 중 1 mL을 취하여 유기용매용 PTFE 필터(0.2µm, Watman, UK)로 여과한 후 GC(Gas Chromatography) 분석용 vial에 옮겼다. 옮긴 시료에 C17 내부표준물질 (Internal standard, Fluka) 50 µL를 첨가하여 지방산 분석용 시료를 만들었다. 지방산은 GC (Shimadzu GC-2010, Japan) 분석을 이용하였고, Wax columne (Zebron, ZB-WAX, 최대온도:250°C, Phenomenex, USA) 및 FID detector(flame ionization detector, 최대온도:300°C)을 사용하여 지방산을 검출하였다. 검출에 사용된 주입 용량은 1 µL, 총 검출시간은 25 분으로 설정하였다. 지방산 분석을 위한 표준 물질로서 Supelco의 FAME mix 18918 (C8-C24)를 사용하였다. 분석 후 각 시료와 결과와 표준물질의 결과를 상대 비교한 뒤, 지방산 함량을 계산하였다.

색소 분석

Odontella sp. BS-003의 색소분석은 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)를 이용하였다. 동결 건조한 *Odontella* sp. BS-003 10 mg에 100 % Ethanol 1 mL을 혼합한 후 1 분간 Homogenizer를 이용하여 색소를 추출하고, 13,000 rpm으로 1 분간 원심 분리하여 상층액만 유기용매용 PTFE 필터(0.2µm, Watman, UK)를 이용해 여과하였다. 여과한 색소 추출물은 HPLC 분석용 vial에 옮겨 분석을 진행하였다. HPLC 분석을 위해 20 µL의 샘플을 주입하였고, 분리시간 25 분 동안 진행되었다. HPLC는 Agilent

사의 Agilent 1260 Infinity Binary LC를 이용하였고, Column은 Waters Spherisorb®S5 ODS1 4.6×250 mm, 5 m Cartridge Column (Maple St. Milford, Massachusetts USA)을 사용하였고, Column 온도는 40°C로 하였다. 색소를 분리하는 용매로 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, acetonitrile, methanol, ethyl acetate가 이용되었다. 사용된 용매의 농도는 다음과 같다: 15 0.1M Tris HCl(pH 8.0), 84 % acetonitrile, 2 % methanol (0-15 분), 68 methanol and 32 % ethyl acetate (15-19 분). 그 후 6 분의 post-run 동안은 처음 시작할 때의 용매 농도와 동일하다. Column 내의 유속은 분당 1.2 mL로 지속되었다. 분석된 색소는 인증된 표준물질과 상대 비교하여 정량하였다 [27].

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

미세조류 분리기술인 마이크로피펫팅을 통해 순수 분리한 BS-003 균주는 현미경을 이용한 형태분석에서 규조류이며, 형태적으로 *Odontella*와 유사함을 알 수 있었다 (Fig. 1A). 분리된 BS-003의 DNA를 추출하여 분석한 18s rDNA 염기서열을 NCBI의 BLAST 프로그램을 이용하여 Genebank의 Ribosomal DNA 염기서열과 비교하여 상동성을 검사하였다. 상동성을 검사한 결과 *Odontella aurita*와 96 % 유사한 것으로 동정되어 신규한 미세조류임을 확인할 수 있었다. 또한, Clustal X와 MEGA 4.0을 이용하여 비교 분석한 결과 *Odontella rostrate*와 높은 유사도를 나타내어 *Odontella* sp. BS-003으로 명명하였다 (Fig. 1B).

(A)



(B)

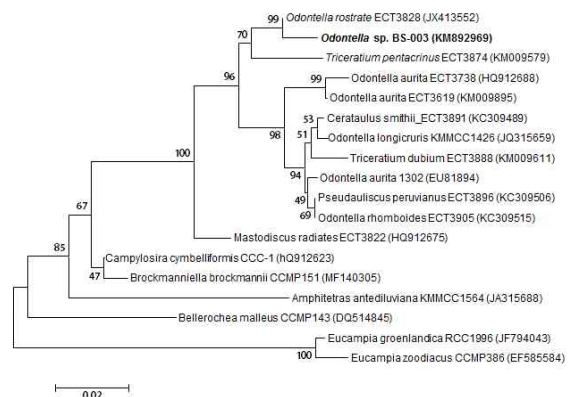


Figure 1. (A) Light microscopy image of isolated strain, *Odontella* sp. BS-003. (B) Phylogenetic tree based on 18S rDNA gene sequence

균주의 배양 최적화

배지 조성에 따른 BS-003의 성장을 알아보기 위해 규소와 질소의 함량이 다른 배지를 이용하여 25°C, 00 μmol/m²/s, 120 rpm으로 5일 동안 배양하였다. 배양 결과 기존의 해수미세조류 배지인 F/2배지에서 0.63 g/L의 바이오매스 농도를 나타내었다 (Fig. 2). 기존 배지보다 규소 농도를 2배 넣어 준 배지에서 배양하였을 때 가장 높은 농도인 0.78 g/L을 나타내었고, 그와 반대로 규소를 제거하여 만든 배지에

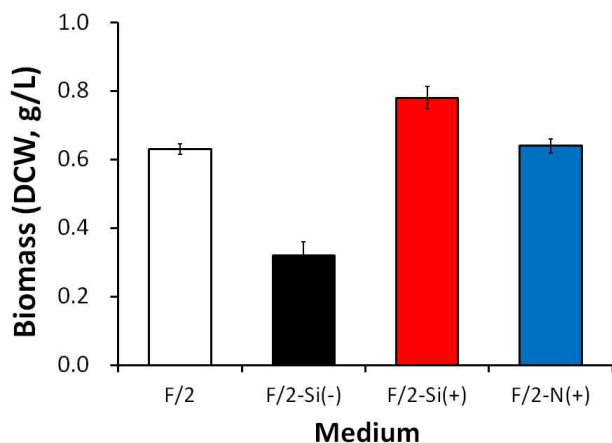


Figure 2. Effect of different silicate and nitrogen concentration on the growth of *Odontella* sp. BS-003

서는 0.32 g/L로 가장 낮은 성장을 보였다. 추가적으로 질소 농도에 따른 영향을 확인하기 위하여 기존 배지보다 2배의 농도로 질소를 넣어준 배지에 BS-003을 배양한 결과 0.64 g/L로 기존배지와 큰 차이가 없는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 BS-003을 배양하기 위해서는 규소가 필수적임을 알 수 있었고, 이후의 실험에서는 규소를 2배 넣은 배지를 선택하였다.

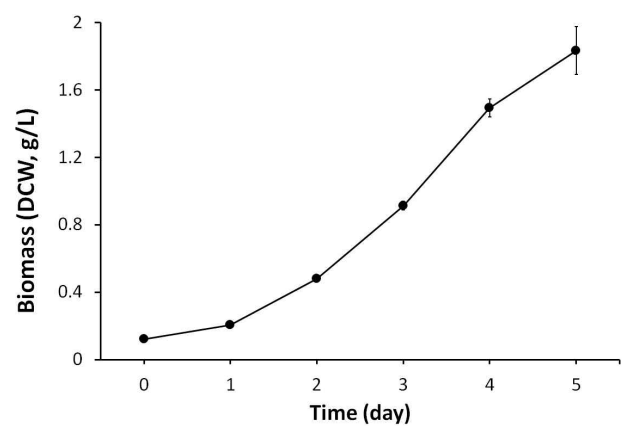


Figure 3. Growth curve of *Odontella* sp. BS-003 under optimal conditions using 10L PBR.

분리균주의 성장

분리균주 BS-003을 18°C의 온도, 100 μmol/m²/s의 광원 120 rpm의 교반속도로 10 L 유리 광생물 반응기에서 5일 간 배양하여 성장 및 지질 함량을 분석하였다. 실험 결과 5일 동안 세포건조중량이 1.83 g/L에 도달하였으며, 이 때 바이오매스 생산량은 0.342 g/L/day를 나타내었다 (Fig. 3).

균주의 지질함량 및 지방산 조성

Nile red 염색을 통하여 BS-003의 세포 내 중성지질 축적에 대해 검토한 결과 세포 내에 많은 양의 중성지질이 포함된 것을 관찰하였다 (Fig. 4A). 이 결과를 토대로 BS-003 균주의 총 지질 함량 분석을 진행한 결과 총 지질함량이 세포 건조 중량 대비 38%인 것을 확인할 수 있었다. 이 수치는 다른 미세조류인 *Chlorella vulgaris*에 비해 약 150-180% 수준의 높은 지질 함유량을 나타낸다 (Fig. 4B) [28]. 이 때 지질생산량은 0.13 g/L/day로 높은 수치를 보였다.

BS-003의 지방산 조성을 분석하기 위하여 지방산 추출 및 분석을 진행하였다. 그 결과, BS-003 균주로부터 건조중량 당 16%의 FAME이 추출되었고, 포함되어 있는 지방산은 caprylate(C8:0), caprate(C10:0), palmitate(C16:0), palmitoleate(C16:1), hexadecadienoate(C16:2), hexadecatrienoate(C16:3), stearate(C18:0), oleate(C18:1), Elcosapentaenoate(C20:5)인 것을 확인할 수 있었다 (Figure 4c). 추출한 FAME의 성분을 분석한 결과, C16이 전체 지방산의 60% 존재하였으며, C18은 20%로 두 번째로 높은 함유량을 보였다. 특히, DHA, DPA와 함께 음식을 통해 섭취해야만 하는 불포화 지방산(오메가-3 지방산)으로 콜레스테롤 저하, 뇌기능 촉진 등 각종 질병 예방에 효과가 있다고 알려진 EPA(Eicosapentaenoic acid)가 10% 수준으로 존재하는 것으로 보아 BS-003 균주가 EPA 공급원으로서 사용 가능하다는 것을 보여준다.

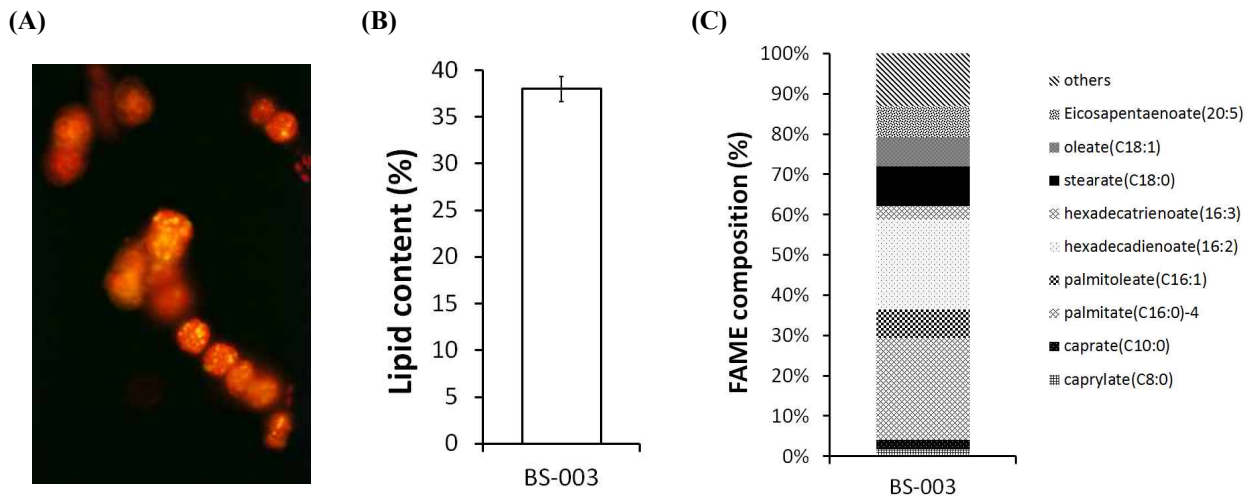


Figure 4. (A) Fluorescence microscope image of *Odontella* sp. BS-003 dyed with Nile red. (B) Lipid content and (C) FAME composition of *Odontella* sp. BS-003

색소 조성

HPLC를 통한 BS-003의 색소 분석 결과 푸코잔틴이 3.88 mg/g으로 전체 색소의 36 %를 차지하는 것으로 보아 색소의 주요 구성성분인 것을 알 수 있었다 (Fig. 5). 따라서, 현미경을 통한 형태학적 분석에서도 확인할 수 있듯이 다량의 푸코잔틴을 함유하고 있어 적갈색을 띠는 것으로 판단되어 진다. 두 번째로는 클로로필 a가 2.65 mg/g으로 25 % 존재하며, 이외에도 베타카로틴, 다이아디노잔틴 등의 카로티노이드를 함유하였다. 총 색소는 건조중량 대비 1.06 %를 차지하는 것을 확인하였다. 결과적으로 푸코잔틴을 고농도로 함유하고 있는 BS-003은 푸코잔틴 생산을 위한 산업적 생산자로서 잠재성이 충분하다고 여겨진다.

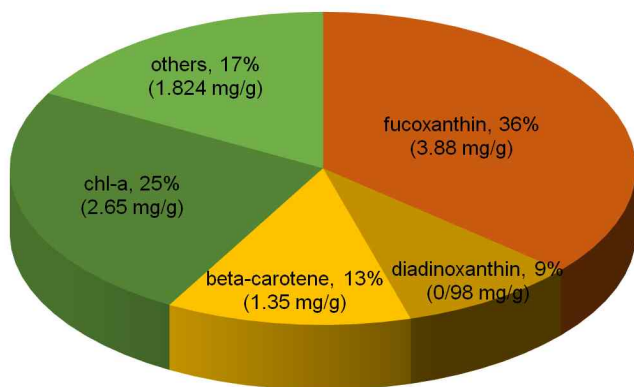


Figure 5. Pigment content of *Odontella* sp. BS-003

결론

본 실험을 통해 높은 바이오매스 생산성과 유용 물질 푸코잔틴 오메가-3 지방산을 많이 함유하고 있는 균주를 개발하기 위하여 대한민국 남해 인근 해변에서 해양 미세조류를 분리하였다. 현미경을 이용한 형태학적 동정 및 18S rDNA 염기서열 분석을 이용한 유전학적 동정을 한 결과 *Odontella aurita* 와 매우 유사함을 나타내어 *Odontella* sp. BS-003균주로 명명하였다. 신규 분리한 규조류 *Odontella* sp. BS-003은 기존 해수미세조류 배지인 F/2보다 2배 이상의 규소 농도로 함유한 배지에서 0.78 g/L의 높은 바이오매스 농도를 보였으며, 최적배양 조건으로 5일간 진행한 회분식 배양을 통해 바이오매스 생산량 0.342 g/L/day, 지질 생산량 0.1269 g/L/day에 도달하였다. (Table. 1) 또한, HPLC를 이용한 색소

Table 1. Characterization of BS-003 under optimal culture condition.

	BS-003
Growth rate (max, /d)	0.54(±0.3)
Biomass DCW (g/L)	1.83(±0.014)
Lipid content (%)	38(±3.2)
Biomass productivity (g/L/day)	0.342(±0.002)
Lipid productivity (g/L/day)	0.129(±0.001)

분석을 통해 BS-003이 푸코잔틴을 전체 건조 중량 대비 36 %로 고농도 함유하고 있는 것을 확인하였고, 지방산 분석을 통해 오메가-3 지방산은 10 % (w/w) 함유하는 것을 확인하였다. 따라서, 분리균주 BS-003은 높은 바이오매스 생산성과 푸코잔틴, 오메가-3 지방산을 다량 함유하고 있어 미세조류 유래 유용 물질 생산 균주로서 산업에도 적용될 수 있을 것이다.

감사의 글

이 논문은 2018년 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 (재)차세대 바이오매스 연구단-2015M3A6A2065697 (글로벌프런티어사업), 해양수산부의 재원으로 해양생명공학기술개발사업(25150184), 한국생명공학연구원(www.kribb.re.kr)의 주요사업 연구개발비 지원에 의해 수행되었습니다.

References

- Peng, Juan, et al. "Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health." *Marine drugs* 9.10 (2011): 1806-1828.
- Pangestuti, Ratih, and Se-Kwon Kim. "Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae." *Journal of functional foods* 3.4 (2011): 255-266.
- Dembitsky, Valery M., and Takashi Maoka. "Allenic and cumulenic lipids." *Progress in Lipid Research* 46.6 (2007): 328-375.
- Xia, Song, et al. "Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *Odontella aurita*." *Marine drugs* 11.7 (2013): 2667-2681.
- Kumar, Chandini S., et al. "Seaweeds as a source of nutritionally beneficial compounds-a review." *Journal of Food Science and Technology* 45.1 (2008): 1-13.
- Hosokawa, Masashi, et al. "Bio-functions of marine carotenoids." *Food Science and Biotechnology* 18.1 (2009): 1-11.
- Heo, Soo-Jin, et al. "Evaluation of anti-inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages." *Food and Chemical Toxicology* 48.8-9 (2010): 2045-2051.
- Jiménez Escrig, Antonio, et al. "Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81.5 (2001): 530-534.
- Urikura, Itaru, Tatsuya Sugawara, and Takashi Hirata. "Protective effect of fucoxanthin against UVB-induced skin photoaging in hairless mice." *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 75.4 (2011): 757-760.
- Sachindra, Nakkarike M., et al. "Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites." *Journal of agricultural and food chemistry* 55.21 (2007): 8516-8522.
- Beppu, Fumiaki, et al. "Down regulation of hepatic stearoyl CoA desaturase 1 expression by Fucoxanthin via leptin signaling in diabetic/obese KK Ay mice." *Lipids* 48.5 (2013): 449-455.
- Satomi, Yoshiko. "Antitumor and Cancer-preventative Function of Fucoxanthin: A Marine Carotenoid." *Anticancer research* 37.4 (2017): 1557-1562.
- S. Y. Kang, H. Kang, J. E. Lee, C. S. Jo, C. B. Moon, J. Ha, J. S. Hwang, J. Choi, "Anti-aging potential of fucoxanthin concentrate derived from *Phaeodactylum tricornum*", *J. Cosmet. sci.*, submitted, 2017.
- Kanazawa, Kazuki, et al. "Commercial-scale preparation of biofunctional fucoxanthin from waste parts of brown sea algae *Laminaria japonica*." *Food science and technology research* 14.6 (2008): 573-573.
- Kim, Sang Min, Ya Fang Shang, and Byung Hun Um. "A preparative method for isolation of fucoxanthin from *Eisenia bicyclis* by centrifugal partition chromatography." *Phytochemical analysis* 22.4 (2011): 322-329.
- Kim, Sang Min, et al. "A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricornum*." *Applied biochemistry and biotechnology* 166.7 (2012): 1843-1855.
- WANG, Wen Jun, et al. "Isolation of fucoxanthin from the rhizoid of *Laminaria japonica* Aresch" *Journal of Integrative Plant Biology* 47.8 (2005): 1009-1015
- Pulz, Otto, and Wolfgang Gross. "Valuable products from biotechnology of microalgae." *Applied microbiology and biotechnology* 65.6 (2004): 635-648.
- Mimouni, Virginie, et al. "Marine microalgae used as food supplements and their implication in preventing cardiovascular diseases." *OCL* 22.4 (2015): D409.
- Cho, Dae Hyun, et al. "Novel approach for the development of axenic microalgal cultures from environmental samples." *Journal of Phycology* 49.4 (2013): 802-810.
- Zimmermann, Christine, et al. "A chemical-genetic screen to unravel the genetic network of CDC28/CDK1 links ubiquitin and Rad6 - Bre1 to cell cycle progression." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.46 (2011): 18748-18753.
- Guillard, Robert RL. "Culture of phytoplankton for

- feeding marine invertebrates." Culture of marine invertebrate animals. Springer, Boston, MA, 1975. 29-60.
23. Peters, Adam, et al. "Development of biotic ligand models for chronic manganese toxicity to fish, invertebrates, and algae." *Environmental Toxicology and Chemistry* 30.11 (2011): 2407-2415.
24. Wayama, Marina, et al. "Three-dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis*." *PloS one* 8.1 (2013): e53618.
25. Bligh, E. Graham, and W. Justin Dyer. "A rapid method of total lipid extraction and purification." *Canadian journal of biochemistry and physiology* 37.8 (1959): 911-917.
26. Luhana, K. K., and H. D. Patel. "Cultural and molecular characterization of tetracycline resistant microflora associated with dental caries." *International Journal of Genetics* 2.1 (2010): 1.
27. 윤지현; 박인규; 진언선. 효소, 대사산물; 고광도와 질소 결핍이 *Haematococcus pluvialis* 의 색소 생합성에 미치는 영향. *한국미생물·생명공학회지*, 2007, 35.4: 292-297.
28. CHO, Dae-Hyun, et al. "Enhancing microalgal biomass productivity by engineering a microalgal - bacterial community" *Bioresource technology* 175 (2015): 578-585.