

# 해양미세조류(*Nannochloropsis oculata*)로부터 saponification을 통한 Sterols 분획물의 항염증 및 항암 효능 평가

김준성 · H.H.Chaminda Lakmal · 이지혁 · 이원우 · 전유진\*

제주대학교 해양생명과학과

## Anti-inflammatory and Anti-cancer Effects of Sterol-rich Fraction from *Nannochloropsis oculata* by using Saponification

Junseong Kim, H.H.Chaminda Lakmal, Ji-Hyeok Lee, WonWoo Lee and You-Jin Jeon\*

Department of Marine Life Sciences, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

The green microalga of the genus *Nannochloropsis* (class Eustigmatophyceae) is a leading candidate for biofuel production due to its ability to accumulate high oil content (28.7% of cellular ash-free dry weight). We investigated the anti-inflammatory and anticancer activities of sterol-rich fraction from *nannochloropsis oculata* *n*-hexane (NOH) extract after saponification of the microalga. Among the fractions with *n*-hexane, chloroform and ethyl acetate, the *n*-hexane fraction showed the highest anti-inflammatory activity in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage as well as anticancer activity against human leukemia HL-60 cells without the cytotoxicity. And the sterol-rich fraction was obtained from the *n*-hexane fraction by open silica column under the gradient solvent condition with 100% hexane (1L), hexane : ethyl acetate (20 : 1, 10 : 1, 5 : 1, 1 : 1, v/v). Among the four fractions (NOH-1~4), especially NOH-1 contained the highest content of sterols. NOH1 showed the highest HL-60 (about 85%) and NO inhibitory activities at the concentration of 100 µg/mL. These results demonstrated that the sterol-rich fraction from *N. oculata* might be a useful candidate as anti-inflammatory and anticancer agents for anti-inflammatory and anticancer activity.

Key words : Sterol, *Nannochloropsis oculata*, Anti-inflammatory, Anticancer, Saponification

### 서론

염증반응은 생체 조직이 손상을 입거나 외부 화학물질의 침입이나 세균반응에 대하여 손상부위를 회복 재생하려고 일어나는 체내 방어적 반응으로 발열이나 통증을 일으킨다(Imm and Kim, 2010). 또한, 염증반응은 대식세포, 호중구 등과 같은 면역관련 세포들이 염증성 cytokine, nitric oxide (NO) 및 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 등의 염증매개물질을 분비하여 발생한다(Adams and Hamilton, 1984). 특히, NO는 세포 내 L-arginine의 산화반응을 촉진하는 NO 합성효소(inducible nitric oxide synthases, iNOS)에 의해 생성되는데, 세균성 염증 유발 성분인 lipopolysaccharide (LPS)가 대식세포를 자극하면, 활성화된 대식세포가 iNOS를 발현하여 NO의 생성을 유도함으로써, 염증반응을 유발하게 된다(An et al., 2014; Chung et al., 2011).

또한, NO는 생체 내에서 염증에 반응하는 생체 내 분자로서 반응성이 높고, 면역 반응에서 화학적 매개체의 역할을 하며, 혈관의 이완 및 신경전달에 관여한다(An et al., 2014; Chung et al., 2011). 따라서, LPS가 자극한 대식세포에서 유도되는 NO의 생성을 억제할 수 있는 새로운 인자를 연구하고 개발하는 것은 염증성 질환의 치료 및 면역 반응에서 중요한 역할을 할 것으로 여겨진다.

암은 2004년 통계청에 의하면 우리나라 전체 사망원인의 26.3%를 차지하는 주된 사망원인이었으며, 지금까지도 매년 600만명 이상이 암으로 고통 받고 있는 실정이다(Kim et al 2006). 인체는 면역반응이 정상적으로 유지되지 않을 경우, 세포가 일정하게 증식과 사멸을 유지하는 항상성을 상실하면서 이상증식이 일어나 암으로 발전하고, 이에 따라 암은 면역기능 이상으로 유전적 변이 세포를 사멸하는 면역질환으로 볼 수 있

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2014.0770>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Kor J Fish Aquat Sci 47(6) 770-775, December 2014

Received 26 November 2014; Revised 14 December 2014; Accepted 16 December 2014

\*Corresponding author: Tel: +82. 64. 754. 3475 Fax: +82. 64. 756. 3493

E-mail address: youjin@jejunu.ac.kr

다(Ha et al., 2010; Jin et al., 2009). 따라서, 만성 염증과 암 또는 다른 질병과의 상관 관계에 있어서, 염증 반응을 감소시킴으로써 질병의 위험을 줄이려는 노력이 진행되고 있다(Imm and Kim 2010; Aggarwal et al., 2006). 이러한 점들을 감안할 때, LPS가 자극한 대식세포에서 유도되는 NO의 생성을 억제하고 암세포의 증식을 억제할 수 있는 새로운 천연 소재를 연구하고 개발하는 것은 매우 유용하다고 할 수 있다.

미생물들은 최근 대체에너지와 식량, 고부가가치의 의약품 물질 등 산업적으로 유용한 물질을 생산한다(Fu et al., 2014). 또한, 미세조류는 광합성을 통해 지구 생태계에서 1차 생산자 역할을 함으로써 해양생물양식에서 잠재적인 식품 소재로서 이용될 수 있다(Teo et al., 2014; Wei et al., 2013). 게다가, 미세조류의 지방산이나 sterol과 같은 지질 성분에 대한 연구가 수행되어 왔으나, 바이오 원료가 대부분이었고, 최근에는 미세조류의 생리활성에 대한 연구가 진행되고 있다(Teo et al., 2014; Wei et al., 2013; Cha et al., 2010). 이 중, *Nannochloropsis oculata*는 단세포 녹조류로 양식용 사료로 이용되며, 최적영양조건이 충족 시 지질함량(최대 68%)이 다른 미세조류에 비해 매우 높다. 또한, *N. oculata*는 광합성 미세조류로서 배양이 용이하고 sterols나 EPA (eicosapentaenoic acid) 성의 지질 함량이 높아 고부가가치 기능성 식품으로서 이용가치가 높다(Patterson et al., 1994; Jo and Cha, 2010; Fabregas et al., 2004; kim et al., 2013). 그러나, 아직까지도 sterols 성분이 가지는 생리활성에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다.

이번 연구에서는 해양미세조류인 *N. oculata*의 새로운 기능성 식품으로서의 소재 탐색을 목적으로 대량 배양한 *N. oculata*를 sterol의 함량을 증진시키는데 효율적인 saponification 과정을 통해 sterol 추출물을 준비하고, 이들의 항염증과 항암 효과를 검증하였다.

## 재료 및 방법

### 미세조류 배양

본 실험에 사용된 광합성 미세조류 *N. oculata*는 한국해양 미세조류 은행으로부터 분양 받아 사용하였다. *N. oculata*를 배양하기 위해 f/2-Si 배지를 Cha et al. (2010)의 방법에 따라 제조하였다(Aggarwal et al., 2006). 여과 해수 1 L에  $\text{NaNO}_3$  (75 mg),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (5 mg),  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (4.36 mg),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (22  $\mu\text{g}$ ),  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (3.15 mg),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (9.8  $\mu\text{g}$ ),  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.01 mg),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0.18 mg),  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (6.3  $\mu\text{g}$ ), thiamine HCl (0.1 mg), biotin (0.5  $\mu\text{g}$ ) 및  $\text{B}_{12}$  (0.5  $\mu\text{g}$ )를 용해하였고, pH 8로 조정한 후, 121°C에서 15분간 멸균하여 f/2-Si 배지로 사용하였다. f/2-Si 배지로 26°C, 60% 수분을 유지하면서 12시간 암-광 주기로 하여 *N. oculata*를 배양하였다. 이후 배양액을 같은 조건에서 F/2-Si배지 100 mL, 500 mL 순으로 계대 배양하였다(Aggarwal et al.,

2006).

### 미세조류의 Sterols 추출

*N. oculata* 배양액으로부터 sterols 분획물 제조는 Kim et al. (2011)의 방법을 이용하여 실시하였다. 즉, *N. oculata* 배양액 500 mL를 1 M ethanolic NaOH와 섞어 15분간 환류하여 추출하였고, *N. oculata*의 수분을 제거하기 위해 105°C 오븐에서 12시간 동안 건조시켰다. 건조 후 100 mL three-neck jacketed glass reactor를 사용하여 0.5M NaOH를 통해 saponification 하였다. Saponification 추출한 n-hexane 추출물을 open silica column을 통해 hexane : ethyl acetate (20 : 1, 10 : 1, 5 : 1, 1 : 1, v/v) 조건으로 분리하여 NOH1, NOH2, NOH3 및 NOH4를 획득하였다(Fig. 1).

### Total sterol 함량

Total sterol의 정량은 Liebermann-Burchard Nath et al. (1946)의 방법에 따라 측정하였다. Liebermann-Burchard 시약의 제조는 Acetic anhydride 220 mL과 glacial acetic acid 200 mL을 혼합하고 sulfuric acid 30 mL을 추가 혼합하였고 standard는 200 mg 콜레스테롤을 glacial acetic acid 100 mL에 녹여 갈색병에 보관하였다. NOH 분획물(NOH1, NOH2, NOH3 및 NOH4) 시료는 2 mg을 glacial acetic acid 1 mL에 녹여 갈색병에 보관하였다. 96 well plates를 사용해 각각 정량하여 10 분 동안 반응시킨 후 625 nm에서 흡광도를 측정하여 sterols의 함량을 정량하였다.

### 세포배양

생쥐 대식세포계열(murine macrophage cell line)인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행 (KCLB; Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 penicillin-streptomycin 100 units/mL과 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 DMEM 배지(GIBCO, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였으며, 3일에 한 번씩 계대 배양을 시행하였다(Wei et al., 2013; Cha et al., 2010). 인간 혈액암 세포인 HL-60 (human promyelocytic leukemia cells) 세포주를 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB)으로부터 분양 받아 100 units/mL의 penicillin-streptomycin (GIBCO)과 10%의 fetal bovine serum (FBS; GIBCO)이 함유된 RPMI 1640 (GIBCO)을 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였으며, 계대 배양은 3~4일에 한 번씩 시행하였다.

### 항염 활성을 위한 Nitric oxide (NO) 생성 평가

4개의 NOH 분획물(NOH1, NOH2, NOH3 및 NOH4)이 LPS가 자극한 대식 세포의 NO 생성에 영향을 줄 수 있는지를 확인하였다. RAW 264.7 세포를 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여  $1.5 \times 10^5$  cells/mL로 조절한 후 24 well plate에 접종하고, 추출물 시료와 LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 동시에 처리하여

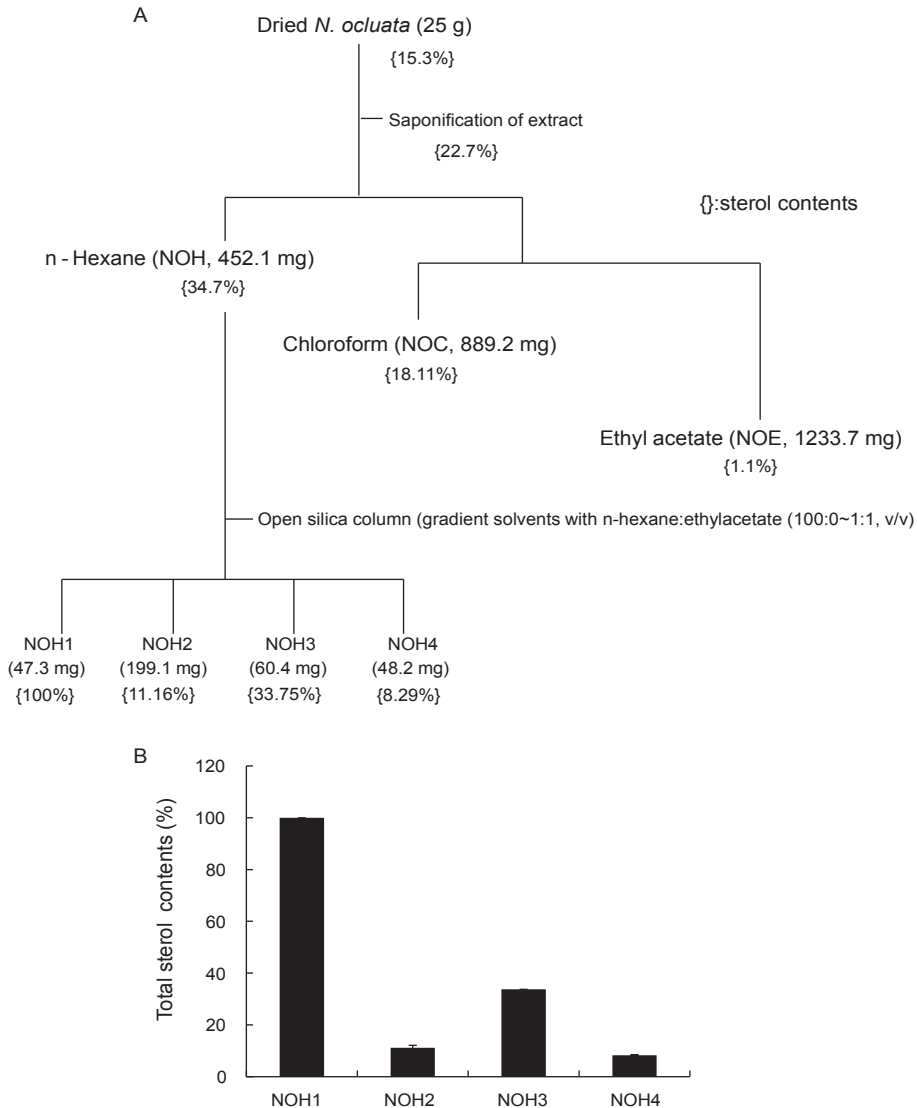


Fig. 1. Purification procedure of 4 fraction from *Nannochloropsis oculata* (A). Quantification of total sterol contents of the each fraction (NOH1, NOH2, NOH3 and NOH4) by Liberman-Burchard assay (B).

24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양은 Griess 시약[1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% (w/v) naphylethylenediamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid]을 이용하여 세포배양액에서 측정하였다. 세포배양 상층액 100  $\mu$ L와 Griess 시약 100  $\mu$ L를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(Adams and Hamilton, 1984; An et al., 2014; Chung et al., 2011).

#### MTT assay

4개의 NOH 분획물(NOH1, NOH2, NOH3 및 NOH4)이 혈액암 세포의 성장에 대한 억제 효과를 가지는지를 측정하기 위해, MTT assay를 수행하였다. HL60 세포( $1 \times 10^5$  cell/mL)를

96 well plates에 분주하여 24시간 배양한 후, 시료를 농도별 (12.5, 25, 50, 100 및 200  $\mu$ g/mL)로 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였다. 24시간동안 배양한 후, 2 mg/mL의 농도로 제조한 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액 50  $\mu$ L를 첨가하고 동일한 조건에서 3시간 배양하였다. Plate를 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 조심스럽게 배지를 제거한 다음, 각 well에 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma) 150  $\mu$ L를 가하여 MTT의 환원에 의해 생성된 formazan 침전물을 용해시킨 후, microplate reader (Bio-TEK instrumenis. Inc., Winooski Vermont, WI, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료군에 대한 평균 흡광도 값을 구하였으며, 대조

군의 흡광도 값과 비교하여 세포 증식억제 정도를 조사하였다 (Ha et al., 2010).

통계 분석

모든 분석 수치는 mean ± SD 으로 나타내었다. 수집된 결과는 SPSS (SPSS Inc., Version 12.0) 프로그램을 이용하여 통계 분석하였으며, 각 실험군들의 평균치간의 유의성은  $P < 0.05$  수준에서 analysis of variance와 Duncan's range test에 의해 분석하였다(Cha et al., 2010).

결과 및 고찰

각 추출물의 total sterols 함량 비교

Terpene 계열의 sterols은 여러 가지 색소체들의 면역기능강화 효과로 인해 하루에 2,000 mg 내지 3,000 mg의 sterols을 섭취할 경우 면역 기능이 향상되는 것으로 알려져 있다. Sterols은 채소와 과일 견과류 등에 섬유소와 함께 붙어있는데 음식을 가공 할 시에 여러 화합물질과 고열로 인하여 sterols의 양이 경감된다. 그러므로 sterols을 충분히 흡수하기 위해서는 천연 그대로 섭취하는 것이 좋다. 그래서 미세조류를 통한 sterols의 섭취가 각광받고 있는 이유 중 한가지다. 특히, 지질 성분이 세포의 지질 속에 유리 또는 에스터 등의 유도체로 존재하며 다양 함유되어 있다고 보고되었다. 따라서 지질추출을 위하여 비극성 용매인 *n*-hexane을 이용하여 분획 하였다. 최근, 미세조류에 다량 함유되어 있는 sterols 성분은 생리작용에 있어 꼭 필요한 물질로 생리작용 조절, 각종 암세포 자살 유도, 혈중 콜레스테롤 저하, 혈청 지질 개선, 심혈관 질환 개선 및 염증 질환과도 연관되어 있다(Park et al., 2011; Lee and Shin, 2011). 이전 연구는 광합성미세조류인 *N. oculata*에 sterols과 같은 지질 성분을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다. 지질을 함유한 *N. oculata*에 NaOH, KOH 등의 환원제를 첨가해 saponification을 하면 에스터 결합이 파괴되어 유리지방산염, sterol류 등이 생성되며 유리지방산염은 수용액 층에, sterol류는 유기용매 층에 나뉘어 각각 성분 분석에 활용 할 수 있다. saponification을 위한 환원제로 NaOH를 선택하였고, *n*-hexane 분획물을 saponification 전후로 나눠 각각 비교하였다. 결과는 saponification 전은 15.3%의 sterols의 함량을 보유했고, 후는 22.7%로 saponification을 하기 전보다 후가 더 높은 sterols의 함량을 나타냈다. 위 결과에 따라 본 연구는 건조된 *N. oculata* (25 g)를 saponification 하여 *n*-hexane (452.1 mg), chloroform (889.2 mg), ethyl acetate (1,233.7 mg)를 획득 하였고 각각의 sterols의 함량을 확인 한 결과, *n*-hexane 분획물에서 34.7%로 가장 많은 sterols 함량을 가지는 것을 확인했다. 이에 따라 *n*-hexane 분획물을 open silica column을 사용하여 NOH1 (47.3 mg), NOH2 (199.1 mg), NOH3 (60.4 mg) 및 NOH4 (48.2 mg)를 분리했다. 분리된 시료에서는 NOH1이 sterols 함량이 100%로 가장 많은 함량을

나타냈다(Fig. 1). 본 연구의 total sterol 함량 측정 결과, 분획별로 다양하게 sterols의 함량이 존재하는 것을 확인하였는데 NOH1에서 sterols 함량이 가장 높게 나온 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 1).

항염 활성을 위한 Nitric oxide (NO) 억제효과

대식세포는 염증매개물질(cytokines, prostaglandins 및 NO)을 방출하는 것을 통해 선천면역과 후천면역에서 중요한 역할을 할 뿐만 아니라, 염증성 질병에서 중심적인 역할을 한다 (Kim et al., 2013). 특히, NO는 NO 합성효소(inducible isoforms of NO synthase, iNOS)에 의해 L-arginine으로부터 생성되는 유리체로 여러 가지 생물학적 과정에 관여하며, 세포독성, 신경 전달계, 면역반응 및 혈관이완 등에 관여한다. NOH 분획물(NOH1, NOH2, NOH3 및 NOH4)을 마우스 대식세포인 Raw264.7 세포에 처리하여 NO 생성 억제효과를 연구한 결과, 각각 다른 NO 생성 억제효과를 나타냈다(Fig. 2). Sterols를 open silica column를 통해 분리한 NOH1은 25 µg/mL부터 활성을 나타내며, 100 µg/mL는 높은 활성을 보여 농도 의존

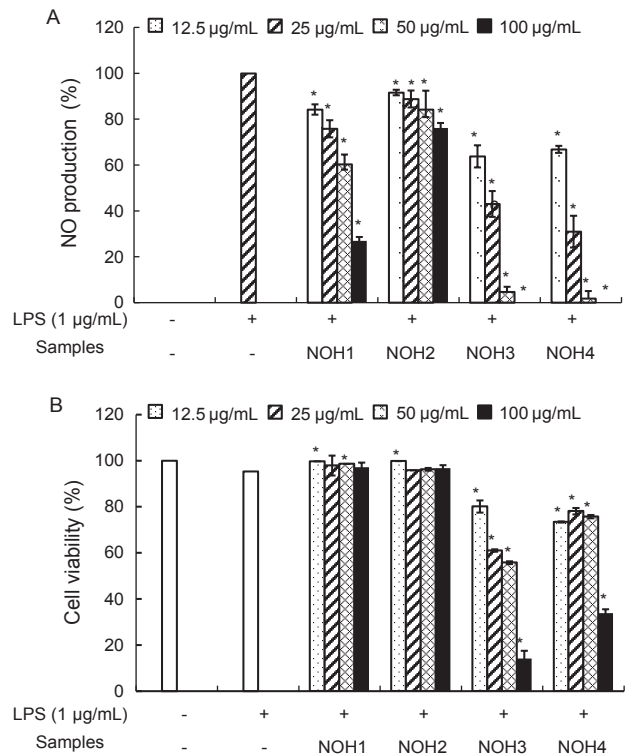


Fig. 2. Anti-inflammatory activities on pre sample treated RAW 264.7 cells and cell viability after LPS (1 µg/mL) induction. NO production of the RAW 264.7 cells after the treatments of NOH1, NOH2, NOH3 and NOH4 (A). Cell viability of RAW 264.7 cells after LPS induction with or without the samples (B). Values are mean ± SD of three times.

적으로 NO생성억제 효과를 보여주는 것을 확인할 수 있다. 세포생존율에서도 NOH1은 세포독성이 없는 것을 확인 하였다. NOH3과 NOH4는 NOH1보다 보다 뛰어난 NO 억제활성을 보이나 세포독성이 높은 것을 확인 하였다(Fig. 2). 위 결과를 통해 확인할 수 있는 부분은 sterols가 많이 함유되어 있을수록 높은 활성을 보인다 라고 할 수 없지만 sterols의 함량에 따라 sterols를 가장 많이 함유한 NOH1에서 높은 활성에 독성이 없는 활용 가능한 샘플이 만들어지는 결과가 나오는 것을 확인 하였다. *N. oculata*에서 분리한 sterols는 phytosterol로 terpene 계열이다. 대표적으로  $\beta$ -carotene, retinol, lutein 등이 존재하는데 이 물질들은 면역반응, 항산화 및 항암에 효과를 보인다고 알려져 있다. *N. oculata*에서 분리한 sterols는 기존연구들과 비교해서 항염증에 대한 활성이 높게 나타났고 활성에 대한 연구는 많이 진행되어 왔으며 NO의 생성을 억제하는 것으로 알려져 있다(Adams and Hamilton, 1984; An et al., 2014; Chung et al., 2011).

### 암세포 성장억제 효과

이전 연구들에서 sterols는 전립선 암 세포와 유방암 세포 및 폐암과 난소암 세포를 사멸시키며, 암세포를 공격하는 T-세포의 기능을 증강 시키는 것으로 알려져 있다. 또한 DNA단편화 실험에서는 DNA를 분해하고 세포 분열주기 실험에서는 G1 단계를 억제하는 것으로 알려져 있다(Park et al., 2006; Lee et al., 2006). 이처럼 sterols는 암세포 억제에 대한 효과가 뛰어난 것으로 알려져 있다. 이에 본 연구는 NOH를 인간혈액암 세포 HL60에 처리하여 암세포 성장억제 효과를 조사한 결과, NOH2를 제외한 모든 시료에서 농도 의존적으로 암세포 억제 효과가 뛰어난 것을 확인 하였다(Fig. 3). 이 결과는 여러 물질이 섞여 있는 것보다 단일 sterols를 분리했을 때 더 높은 활성을 나타내는 것을 증명한다. NOH3이나 NOH4의 경우 NOH1 보다 낮은 농도인 12.5  $\mu\text{g/mL}$ 부터 암세포 성장억제 효과가 좋은 것으로 볼 수 있으나, 세포생존율에서 NOH3과 NOH4의 경우 RAW 264.7에서 세포독성(Cytotoxicity)이 있는 것을 확인 하

였다(Fig. 2). sterols를 가장 많이 함유하고 있는 NOH1에서 항염활성 결과와 마찬가지로 세포독성이 없고 활성이 뛰어난 물질이 존재하는 것을 확인 하였고, 이 결과는 sterol이 암세포 억제에도 효과가 있다는 것을 증명한다. 세포독성이 존재 할 경우 기능성 식품이나 의약품 개발로 사용 하기에는 적절하지 않기 때문에 NOH1이 여러 측면에서 가장 활용도가 높은 시료로 생각된다.

본 연구는 *N. oculata*의 많은 지질 함량에 sterols가 함유되어 있을 것으로 예상되어짐에 따라, *N. oculata*를 대상으로 *n*-hexane을 사용하여 분획을 실시하고 saponification을 통해 sterols를 분리하였고, saponification 전, 후의 sterols 함량이 다른 것을 확인할 수 있었다. Saponification을 하기 전보다 후의 sterol 함량이 증가한 것을 확인하였고, 분리한 sterols를 이용하여 대식세포인 RAW 264.7 세포를 통해 NO 생성 억제효과를 확인한 결과, sterols 함량이 많은 NOH1 시료에서 NO 생성 억제효과가 높게 나타났으며 세포독성 또한 나타나지 않았다. 다음으로 *N. oculata*에서 분리한 sterols를 이용하여 인간혈액암 세포인 HL60 세포의 억제 효과를 확인한 결과, sterols 함량이 많은 NOH1 시료에서 암세포 억제효과가 나타나는 것을 확인하였다. *N. oculata*로부터 분리한 NOH1은 항염증과 항암에 대한 효과를 나타낸다. 항암효과에 대한 부분만 고려한다면 NOH1, NOH3, NOH4 모두 높은 활성을 보이는 것을 확인할 수 있으나, 지속적인 섭취나 안전성까지 고려한다면 정상세포에 독성이 없는 NOH1이 천연 유래 기능성소재로서의 개발 가능성이 높다는 것을 확인 하였다(Lee et al., 2006).

## 사 사

이 논문(저서)은 2012년 교육부와 한국연구재단의 지역 혁신인력양성사업의 지원을 받아 수행된 연구임(NRF-2012H1B8A2025863)

## References

- Adams Dolph and Hamilton Thomas. 1984. The cell biology of macrophage activation. *Annu Rev Immunol* 2, 283-318.
- An SM, Kim HG, Choi EJ, Hwang H, Lee ES, Back JH, Boo YC and Koh JS. 2013. Screening for Anti-inflammatory Activities in Extracts from Korean Herb Medicines. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 40, 95-108.
- Aggarwal Bharat B, Shishodia Shishir, Sandur Santosh K, Pandey Manoj K and Sethi Gautam. 2006. Inflammation and cancer: How hot is the link?. *Biochem Pharmacol* 72, 1605-1621.
- Chung EK, Seo EH, Park JH, Shim HR, Kim KH and Lee BR. 2011. Anti-inflammatory and Anti-allergic Effect of Extracts from Organic Soybean. *Kor J Organic Agriculture* 2, 245-253
- Cha SH, Kim MJ, Yang HY, Jin CB, Jeon YJ, Oda Tatsuya

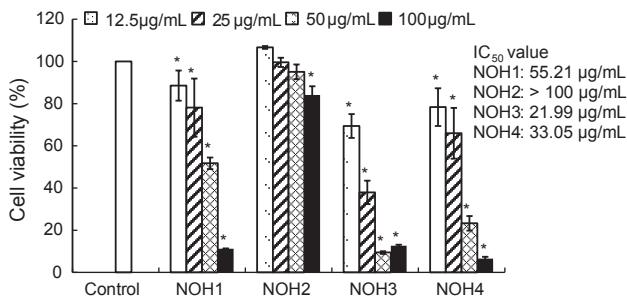


Fig. 3. Anticancer activities of the four fractions NOH1, NOH2, NOH3 and NOH4 separated from the hexane fraction. The cells with or without the sample were incubated for 24 h and cell viability was evaluated by MTT assay. Values are mean  $\pm$  SD of three times.

- and Kim DK. 2010. ACE,  $\alpha$ -Glucosidase and Cancer Cell Growth Inhibitory Activities of Extracts and Fractions from Marine Microalgae, *Nannochloropsis oculata*. *Kor J Fish Aquat Sci* 43, 437-444.
- Fu Y, Zhang Yan, Hu Huiying, Chen Ying, Wang Rong, Li Duo and Liu Songbai. 2014. Design and straightforward synthesis of novel galloyl phytosterols with excellent antioxidant activity. *J Food Chemistry* 163, 171-177.
- Fabregas Jaime, Maseda Ana, Diminguez Adilfo and Otero Ana. 2004. The cell composition of *Nannochloropsis* sp. changes under different irradiances in semicontinuous culture. *World J Microbiol Biotechnol* 20, 31-35.
- Ha JH, Kwon Mc, Seo YC, Choi WY, Chung EK, Chung AR, Kim JC, Ahn JH and Lee HY. 2010. Comparison of Anticancer Activities of *Berberis koreana* Extracts Obtained by Different Extraction Processes. *Kor J Food Sci Technol* 2, 233-239.
- Imm JY and Kim SJ 2010. Anti-cancer and Anti-inflammatory Effects of Mung Bean and Soybean Extracts. *Kor J Food Sci Technol* 6, 755-761.
- Jin Ling, Ha JH, Jeong MH, Chung EK, Chung AR, Kim JC, Ahn JH and Lee HY. 2009. Enhancement of the Antioxidant and Anticancer Activities of *Berberis koreana* Bark by Using a Low Temperature and High-Pressure Extraction Process. *Kor J Food Sci Technol* 41, 284-291.
- Jo BH and Cha HJ. 2010. Biodiesel production using microalgal marine biomass. *KSBB J* 25, 109-115.
- Kim KN, Lee KW, Song CB and Jeon YJ. 2006. Cytotoxic activities of green and brown seaweeds collected from Jeju island against four tumor cell lines. *J Food Sci Nutr* 649, 369-375.
- Kim JH, Park HJ, Kim YH, Joo H, Lee SH and Lee JH. 2013. UV-induced Mutagenesis of *Nannochloropsis oculata* for the Increase of Lipid Accumulation and its Characterization. *Appl Chem Eng* 24, 155-160.
- Kim JH, Park JM, Yoon TH, Leem Donggil, Yoon CY, Jeong JY, Jeong IS, Kwak BM and Ahn JH. 2011. Development of Analysis Method for Cholesterol in Infant Formula by Direct Saponification. *Kor J Fish Aquat* 31, 944-951.
- Lee SJ and Shin WC. 2011. Physiological Functionalities of Makgeolli (Korean Paradox). *Korean J Food Sci Technol* 44, 50-56.
- Lee YH, Park KH, Lee BW, Cho YU, Choi YJ and Gal SW. 2006. Antitumor Sterol Isolated from the Fruiting Body of *Pleurotus eryngii*. *J Life Sci* 16, 282-288
- Nath MC, Chakravorty and Chowdhury SR. 1946. Liebermann-Burchard Reaction for steroids. *Nature* 157, 103-104.
- Patterson G W, Tsitsa-Tzardis E, Wikfors G H, Ghosh P, Smith B C and Gladu P K. 1994. Sterols of Eustigmatophytes. *Lipids* 29, 661-664.5
- Park SY, Cho JY, Chung DO and Ham KS. 2011. Physicochemical Characteristics and Physiological Activities of Naturally Fermented Glasswort (*Salicornia herbacea* L.) Juice *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40, 1493-1500.
- Park KH, Lee YH, Lee BW, Cho YU, Choi YJ and Gal SW. 2006. Antitumor Sterol Isolated from the Fruiting Body of *Pleurotus eryngii*. *J Life Sci* 2, 282-288.
- Teo SH, Islam Aminul, Yusaf Talal and Taufiq-Yap YH. 2014. Transesterification of *Nannochloropsis oculata* microalga's oil to biodiesel using calcium methoxide catalyst. *J Energy* 78, 63-71.
- Wei Likun, Huang Xuxiong, Huang Ahenzheng and Zhou Zhigang. 2013. Orthogonal test design for optimization of lipid accumulation and lipid property in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel production. *J Bio Res Technol* 147, 534-538.