

탈지 미세조류 *Botryococcus braunii* 로부터의 수용성 다당의 황산화 활성과 항균활성

Antioxidant and Antibacterial Activity of Water Soluble Polysaccharide from Defatted *Botryococcus braunii*

이다경, 박제권*

Da Gyung Lee, Jae Kweon Park*

가천대학교 바이오나노대학 생명과학과, 성남시, 경기도, 461-701, 대한민국

Department of Life Science, Gachon University, Seongnamdaero 1342, Seongnam-si, Gyeonggi-do 461-701, Republic of Korea

(Received 28 December 2015, Revised 25 January 2016, Accepted 27 January 2016)

Abstract Sulfated polysaccharides from plants or seaweed are well known for antioxidant, anti-coagulant activity or other biological activities. The aim of the present study is to optimize the condition for the isolation of water soluble polysaccharides (WSP) and evaluate the biological activity. WSP was isolated from defatted microalgae *B. braunii* using chlorosulfonic acid or sulfuric acid. Among WSP isolated using sulfuric acid showed the lowest the content of total carbohydrates (g/L), whereas showed the highest antioxidant activity. Also the preliminary structural analysis of WSP was performed by FT-IR spectroscopy analysis.

Keywords : *Botryococcus braunii*, Chlorosulfonic acid, Sulfuric acid, Antioxidant activity

서 론

황산화 다당은 자연에 널리 있으며 해양 생물에 의해 생산되기도 하고, 식물과 해조류로부터 파생되기도 하여서 생물학적 활성에 대한 연구가 많이 이루어져 왔다 [1-5].

또한, 황산화 다당은 항암 치료를 위한 약물 후보 화합물로 고려되어질 뿐만 아니라 항응고, 황산화, 항증식, 항면역, 항바이러스 등을 포함하는 생리활성에 효과를 가진다 [2,6,7]. 황산화 다당의 생리활성은 분자구조의 특징과 연관이 있다 [6,8-10]. 황산화 다당의

분자적 수정과 구조 향상은 생물학적 활성을 향상시키고, 새로운 산물을 얻을 수 있는 다양성과 가능성을 제시하고 있다. [6,7,9].

다당의 황산화 및 항응고 활성은 황산화의 정도, 분자량, 당골격의 황산기 위치, 당성분, glycosidic branching에 의존적이다 [2,6]. 또한 중합체의 황산화는 이들의 생물학적 활성을 향상시키기 위해 시도되어 왔으며 [11], 황산화 다당은 수용성을 증가시켜 줄 뿐만 아니라 사슬의 형태구조를 변하게 해서 생물학적 활성을 향상시키는 것으로 알려져 왔다 [5,6,9,12].

* Corresponding author
Phone: +82-31-750-4763
E-mail: jkpark@gachon.ac.kr

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/bync/3.0>)

Esterification, oxidation, hydroxypropylation에 의한 다당의 화학적 유도체화 중, 특히 중합체 구조에서 수산기가 황산기로 대체되는 황산화 과정은 다당의 생리적 기능에 영향을 미친다 [6,13]. 다당의 황산화를 위한 반응 시약은 일반적으로 pyridine의 ClSO_3H 또는 아민 또는 N,N' -Dimethylformamide (DMF)와 sulfur trioxide 복합체가 이용되고 있다 [14].

미세조류 *Botryococcus braunii*는 중요한 bio-fuel-feedstock으로 알려져 있다. *B. braunii*는 화석연료를 대체할 hydrocarbons의 원료가 될 수 있다 [15].

이 연구에서는 Biodiesel생산으로 지질을 빼고 남은 미세조류를 황산화 과정을 통해서 유용한 활성을 가지는 황산화 다당을 추출하고, 그 생리활성을 확인하고자 하였다. Hydrogen peroxide, superoxide and hydroxyl radicals로부터 만들어지는 Reactive Oxygen Species (ROS)는 세포의 DNA, 단백질, 지질을 산화시키는데 [16], 본 연구 목적은 탈지미세조류 유래 수용성 다당의 황산화 활성에 두고 있다.

재료 및 방법

재료

본 연구에서 사용한 탈지 미세조류 *Botryococcus braunii*는 인하대에서 제공받아 사용하였다. 황산화 과정을 위해서 사용된 N,N' -Dimethylformamide (DMF)는 Sigma (St. Louis, MO, US) 사로부터 구입하였고, chlorosulfonic acid는 Wako (Wako Pure Chemical, Tokyo, Japan) 사로부터 구입하였다.

황산화 과정을 이용한 수용성 다당 추출

Sulfation reagent를 이용하는 기존의 방법을 수정하여 수용성 다당을 추출하였다 [9]. 간략히 기술하면, 우선 탈지 미세조류 *B. braunii* 0.1 g에 DMF를 첨가했다. 그 다음 chlorosulfonic acid (ClSO_3H) 또는 1 N sulfuric acid (H_2SO_4)를 첨가하고, 30°C 에서 2시간 동안 반응시켰다. 그 후, 각 혼합물의 pH를 맞추기 위해 20% sodium hydroxide (NaOH)를 사용하였다. 중화시킨 반응물을 원심분리를 통해서 상층액을 얻었다. 각 상층액은 methanol에 의해 침전시키고, 씻어냈다. 침전물을 다시 증류수에 휘저어 녹여, 이렇게 얻어진 생산물을 일차(1°) 생산물이라고 명명하였다. 중화시킨 반응물의 침전물을 앞선 과정을

반복하여 얻은 생산물을 이차(2°) 생산물이라고 명명하였다.

추출된 수용성 다당의 확인

증류수에 녹인 일차, 이차 생산물을 각각 $6 \mu\text{l}$ 씩 TLC plate에 로딩하였다. Methanol에 의해 침전되었기 때문에 이 침전물은 적어도 올리고 이상의 다당이라고 생각되었다. 그래서 로딩 후, 전개용매에 넣어 전개시키지 않고, 바로 UV (254 nm와 365 nm)에서 관찰하였다. UV 관찰 후, TLC plate을 baking solution (8% 인산과 5% 황산구리 용액)에 반응시킨 후 핫플레이트에 올려 $180\sim 220^\circ\text{C}$ 에서 탄화시켜 각 생산물에 포함된 당을 검출하고자 하였다. 또한, 다당 체임을 확인하고자 MALDI-TOF mass (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass) 분석을 수행하였다. 분석을 위해 alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)를 matrix로 사용하였으며, $500\sim 20,000 \text{ m/z}$ 범위에서 측정하였다 [17].

추출된 수용성 다당의 Fourier transformation infrared(FT-IR) 분석

수용성 다당의 구조적 특징을 분석하기 위해 500 and 4000 cm^{-1} 범위에서 FT-IR 분석을 수행하였다. 수용성 다당을 직접적으로 분석하기 위해 ZnSe 윈도우를 사용하였으며, 4 cm^{-1} 범위에서 해상도 극대화를 위해 64회 스캔한 스펙트럼 값을 그래프화 하여 특정 잔기의 존재여부를 확인하였다.

추출된 수용성 다당의 황산기, 총탄수화물, 건조중량 정량

ClSO_3H 를 이용해 추출한 다당 침전물 (1° -a ClSO_3H)을 증류수에 녹이고, 동결건조 후 건조중량을 재고, 황산기가 포함된 양을 정량하였다. 황산기 정량을 위해서 barium buffer와 rhodizonate reagent, 0.02 M NaOH가 필요하다. Barium buffer는 2 M acetic acid, 0.01 M BaCl_2 , 0.02 M NaHCO_3 를 ethanol에 녹여서 만들었다. Rhodizonate reagent는 rhodizonate와 ascorbate를 증류수에 녹인 뒤, ethanol로 희석하여 실온에서 15분 반응 후 -20°C 에서 보관하였다.

샘플과 0.02 N NaOH를 넣어준 후 태워주고, 증류수를 넣어준다. 0.1 ml 씩 tube에 나누어 담고, barium

buffer와 rhodizonate reagent를 넣고 섞는다. 10분간 실온에서 보관 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

각 생산물들의 총탄수화물 정량은 phenol-sulfuric acid assay 방법을 이용하였다 [18].

추출된 수용성 다당의 항산화 활성

추출된 수용성 다당의 항산화 활성을 확인하기 위해서 DPPH radical-scavenging assay [19]와 ABTS radical-scavenging assay [20]를 수행하였다.

DPPH radical-scavenging assay는 DPPH solution과 샘플을 1:3 (v/v)으로 혼합한 후 암실에서 20분 동안 실온에서 반응시켰다. 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

ABTS radical-scavenging assay는 ABTS solution과 샘플을 1:10 (v/v)으로 혼합한 후 6분 동안 반응시키고, 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

표준물질로는 ascorbic acid를 사용하였다. Scavenging effect는 추출된 수용성 다당의 총탄수화물 (g/L)에 비교한 specific activity (μmole/g/min)으로 나타내었다. 이것이 의미하는 바는 반응시간 당 반응 샘플의 총탄수화물 g당 radical μmole을 제거할 수 있는 특정 단위로 표현할 수 있다.

추출된 수용성 다당의 Anti-Candidal 활성

추출된 수용성 다당이 *Candida albicans*에 대해 억제 활성이 있는지 보고자 하였다. Agar plate에 *C. albicans*를 100 μl 로딩하여 전면 도말한 다음, 추출한 수용성 다당과 항진균제로 널리 알려진 imidazole과 thiabendazole을 각각 20 μl씩 disc위에 로딩하였다. 항균 활성을 확인하기 위해 실온에서 배양 후 disc 주변에 나타나는 투명환 크기로 일차적인 항균성을 평가하였다.

결과

추출된 수용성 다당의 확인

수용성 다당을 얻기 위해 전략적으로 단계별 추출을 수행하였고, 최대의 수율과 활성형 수용성 다당을 수득하기 위해 최적으로 조건을 구축하고자 하였다 (Fig. 1). 이와 같은 방법으로 추진하여 분리해낸 수용성 다당의 유무를 간단히 확인하고자, TLC plate에 6 μl씩 로딩한 각 샘플을 UV (254 nm와 365 nm)

에서 관찰하고, 구워서 dot blotting으로만 알아본 결과이다 (Fig. 2).

구성당의 특징과 종류에 따라 UV 파장으로 검출되는 특성을 이용하여 검출해본 결과, 특이적인 다당 성분으로 추측할 수 있는 물질이 검출되지 않았으며, 당 검출용 황산구리 용액과 반응시킨 후 구웠을 때도 dot이 진하게 나타나지 않았으나, 농도 의존적 특성과 일반적으로 중성당의 경우와는 달리 분리한 다당은 아마도 음이온계 다당일 가능성도 있음을 고려하여, 총 탄수화물 정량은 물론 이후 특정 잔기의 존재여부를 확인하기 위해 기기분석도 수행하고자 하였다. 단계별 추출된 다당의 정량적 분석을 위해 이후 동결건조에 따른 정량적 분석으로 수율을 계산하였다 (하기의 단계별 분석 결과 참고).

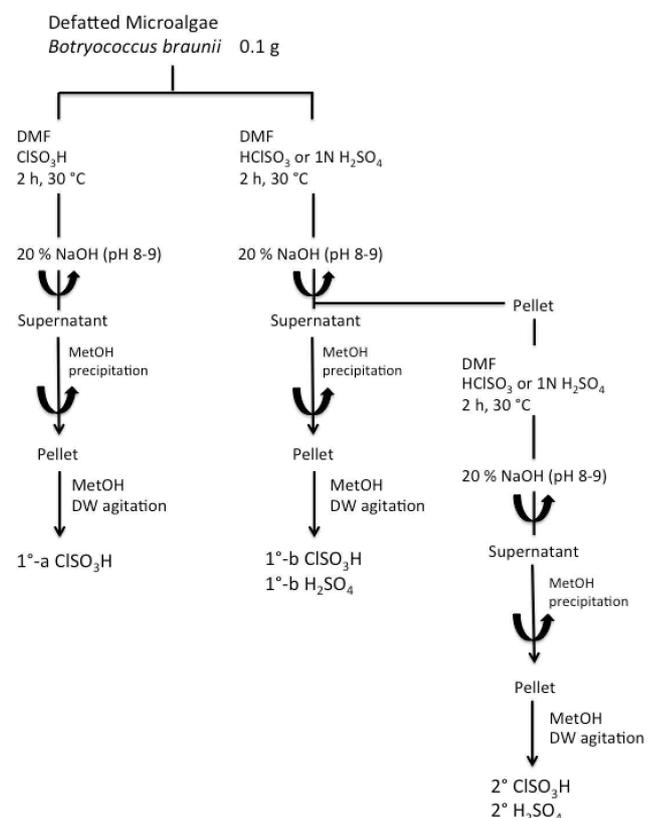


Figure 1. Extraction of polysaccharide.

1°-a ClSO3H is preliminary data. Sulfate content and dry weight of 1°-a ClSO3H were estimated in step-wise.

추출된 수용성 다당의 Fourier transformation infrared(FT-IR) 분석

FT-IR 분석을 통해 분리한 다당의 특정 작용기의

존재여부를 파악하고자 하였다. 여기서 우리가 알고자 하는 작용기는 우선 탈지 미세조류 *B. braunii*에서 추출된 다당의 황산기이다.

FT-IR 분석 결과를 바탕으로, 수용성 다당의 황산기 존재를 확인 (1018 cm^{-1}) 하였으며, 이러한 황산기의 존재 여부는 수용성 다당의 생리활성이나 특징에 큰 영향을 미칠 것으로 사료되기에 우선적으로 황산화 활성에 초점을 두고 이후 연구를 수행하였다. 여기서, 확인된 황산기는 추출과정에서 사용한 ClSO_3H 이나 황산의 잔류에 의한 것인지의 여부는 명확히 설명하기 힘들지만, 중화 및 수세 과정을 통해 잔여물질은

제거되었다고 생각하면 아마도 이 수용성 다당은 황산기 함유 음이온성 다당으로 생각되어진다. 다만, 일반적인 중성당의 황산화 과정을 탈지미세조류 biomass로부터 수용성 다당 추출에 활용한 점을 고려해보면, 특정 성분당 일부가 황산화 되었을 가능성도 배제할 수 없다. 다만, 추출과 별도의 황산화 과정을 통해 수율과 황산기 함량을 확인한 결과 본 연구에서 수행한 방법에 의한 결과와 큰 차이를 볼 수 없었다 (data not shown). 달리 손쉽게 수용성 다당을 분리할 수 없기에 어쩌면 본 연구에서 수행한 방법 및 결과물에 대한 가치는 이러한 측면으로 평가되어야 하지 않을까 사료된다.

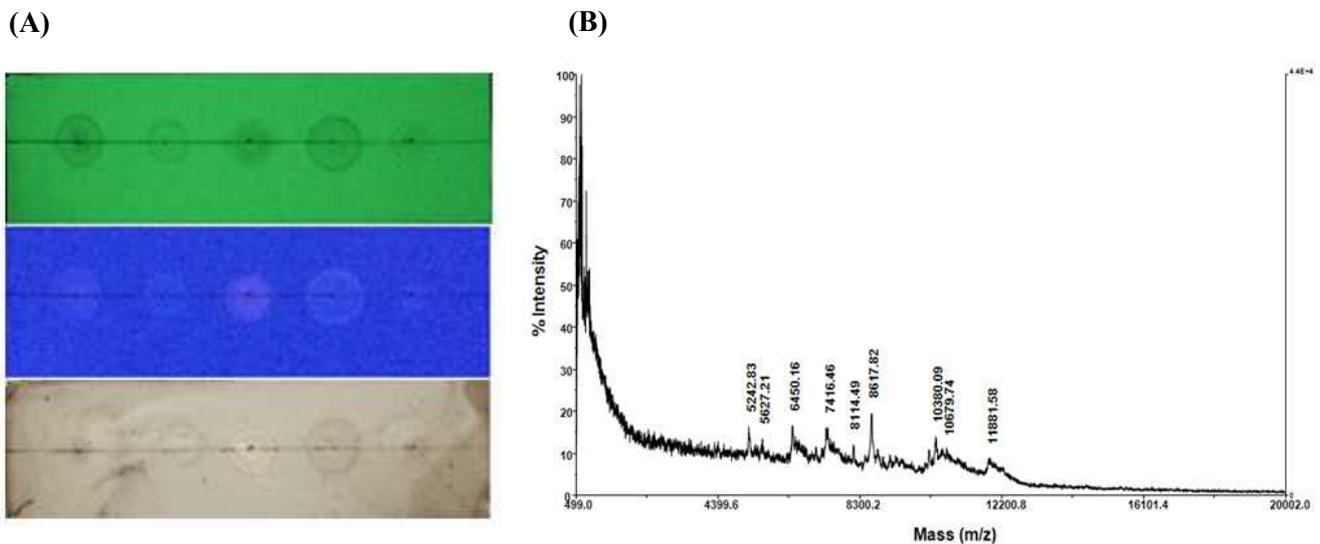


Figure 2. TLC dot blotting of extracted polysaccharide from defatted microalgae by sulfation.

Each sample is loaded $6\ \mu\text{l}$, respectively. After UV observation under 254 nm and 365 nm, samples are reacted with baking solution (copper sulfate) and baked to detect polysaccharides (A). MALDI-TOF mass analysis of 1°-a ClSO_3H (B).

추출된 수용성 다당의 황산기, 총탄수화물, 건조중량 정량

특정 성분의 생물학적 특징도 중요하지만, 우선적으로 검토되어야 할 사항이 수율이다. 결과적으로, 1°-a ClSO_3H 의 황산기는 약 9 mM, 동결건조 후 건조중량은 87.5 mg/ml로 정량되었다. 황산화 과정을 통해 추출된 다당의 수율은 건조중량 87.5 mg/ml에 증류수에 녹일 때의 최종 부피 10 ml를 곱한 값을 초기 중량인 0.1 g으로 나눈 값으로, 8.75 g/g이다 (Table 1).

1°-b ClSO_3H 와 2° ClSO_3H 의 총 탄수화물은 0.173 g/L로 정량되었으며, 2° H_2SO_4 는 1°-b H_2SO_4

Table 1. Quantification of sulfate group (mM) and dry weight (mg/ml) of extracted water soluble polysaccharides.

1°-a sulfate group (mM)	8.96
1°-a dry weight (mg/ml)	87.5

보다 더 많은 총 탄수화물 함유하는 것으로 정량되었다 (Table 2). 이러한 결과들을 바탕으로, 탈지미세조류 유래 수용성 다당의 분리가 산 처리에 따라 쉽게 이뤄질 수 있으며, 수율적인 측면에서도 매우 높은 수율로 분리됨을 확인하였기에 수용성 다당의 효율적 활용이 크게 기대된다 하겠다.

Table 2. Quantification of total carbohydrates (g/L) of extracted water soluble polysaccharides. Each product was estimated in total carbohydrates (g/L) by phenol-sulfuric assay.

Products	Total carbohydrates (g/L)
1°-a ClSO ₃ H	0.264
1°-b ClSO ₃ H	0.173
1°-b H ₂ SO ₄	0.119
2° ClSO ₃ H	0.173
2° H ₂ SO ₄	0.228

추출된 수용성 다당의 항산화 활성

추출한 수용성 다당의 생리활성을 확인하기 위해 항산화 활성을 측정해 보았다. 활성 단위로 나타내

기 위한 specific activity (μmole/g/min)는 총탄수화물 정량에 비교한 값이다. 반응시간 당 반응 샘플의 총탄수화물 g당 radical μmole을 제거할 수 있는 능력으로, Fig. 5와 Fig. 6에서 보이는 것처럼 1°-b H₂SO₄는 가장 높은 specific activity를 보였다. 하지만 2° H₂SO₄는 1°-b H₂SO₄보다 더 낮은 specific activity를 보였다. 1°-b ClSO₃H와 2° ClSO₃H는 각 테스트에서 유사한 specific activity를 보였다. 반면, 1°-a ClSO₃H는 각 테스트에서 1°-b ClSO₃H보다 더 낮은 specific activity값을 보였다. 이러한 결과를 바탕으로 특정 효과를 나타내는 성질의 수용성 다당은 추출하는 방법 및 순차에 의해 달라짐을 확인 할 수 있었다.

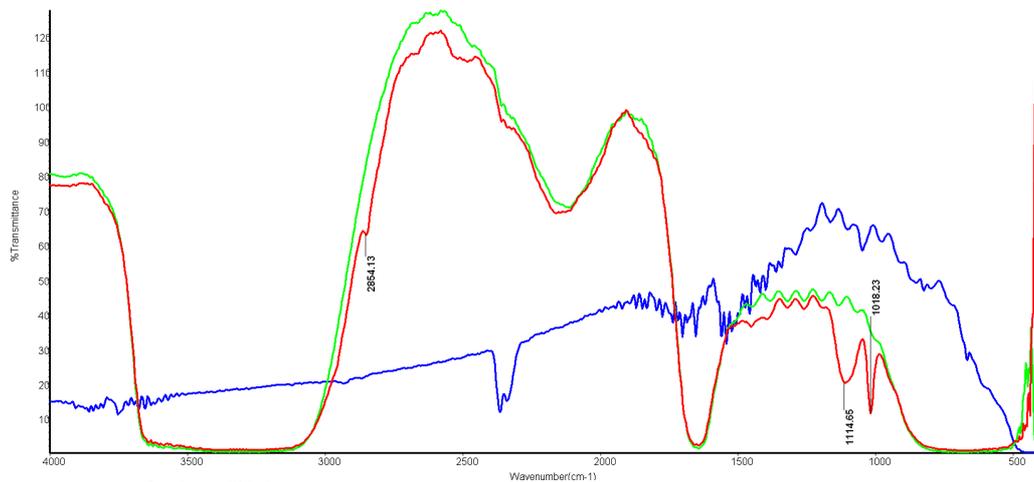


Figure 3. FT-IR spectra of 1°-a ClSO₃H. Red graph: a spectrum of 1°-a ClSO₃H. Blue: a spectrum of background. The sulfate group of sample was presented at 1018 cm⁻¹.

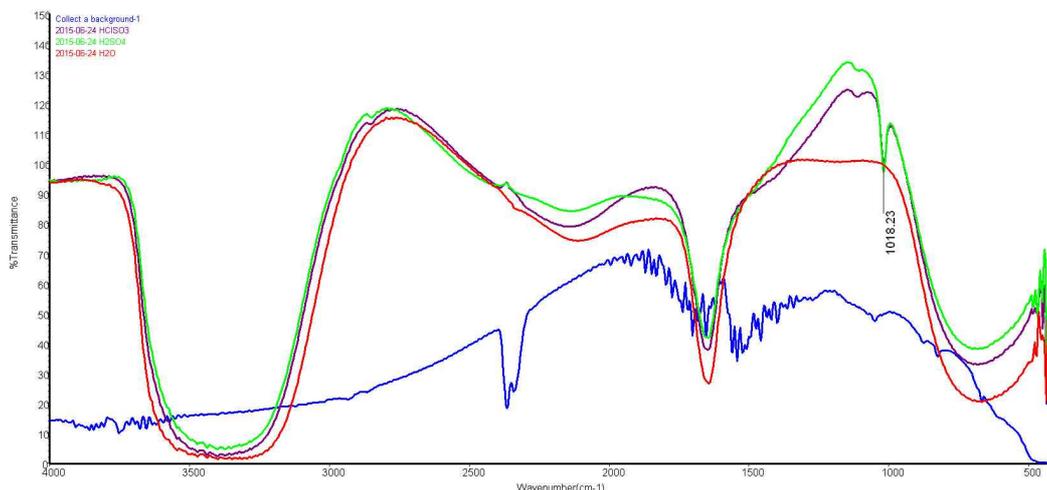


Figure 4. FT-IR spectra of 1°-b ClSO₃H and 1°-b H₂SO₄. Violet graph: a spectrum of 1°-b ClSO₃H. Green graph: a spectrum of 1°-b H₂SO₄. Blue: background spectrum. The sulfate group was presented at 1018 cm⁻¹.

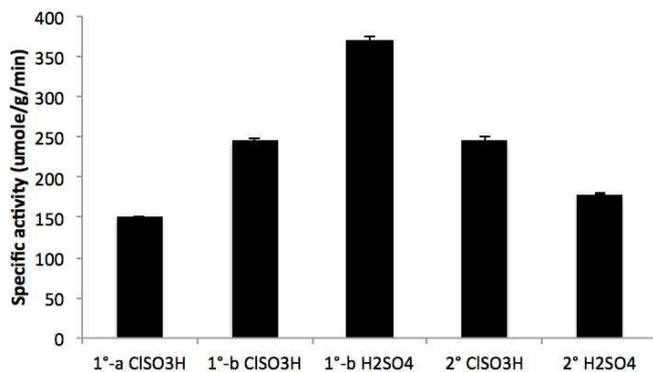


Figure 5. DPPH radical-scavenging activity of extracted polysaccharides from defatted microalgae.

Specific activity (umole/g/min) was estimated as a value for the removal activity of free radical (umole) per total carbohydrates (g) per reaction time.

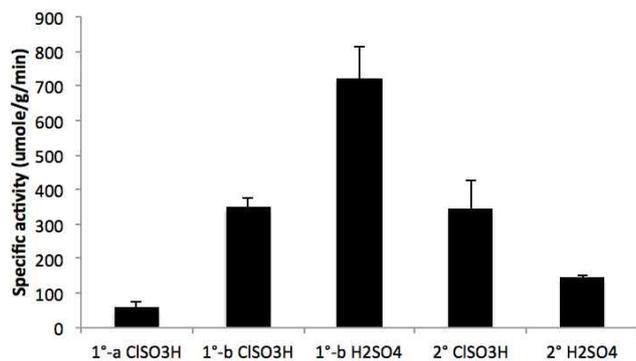


Figure 6. ABTS radical-scavenging activity of extracted polysaccharides from defatted microalgae.

Specific activity (umole/g/min) was estimated as a value for the removal activity of free radical (umole) per total carbohydrates (g) per reaction time.

추출된 수용성 다당의 Anti-Candidal 활성

항균활성을 나타내는 추출물의 항균활성을 측정하여 두 활성간의 연관성을 확인하였다. 특히 본 연구자들은 항균성과 결부시켜 특성을 확인해보고자 하였다. 항균 활성에 대한 대상으로 *Candida albicans*을 선택하였으며, 이에 대한 수용성 다당의 항균성을 평가하였다. 대조물질로는 이미 알려진 항진균제인 imidazole과 thiabendazole을 사용하였다. 그 결과, 본 연구에서 분리한 단계별 수용성 다당은 농도별로 (87.5 mg/ml, 43.7 mg/ml, 21.8 mg/ml) 처리했을 때 상기 효모성 곰팡이 균으로 잘 알려진 *C. albicans*에 대하여 유의적 활성을 나타내지 못하였다. 또한

항진균제인 imidazole과 thiabendazole을 농도별로 (0.1%, 0.05%, 0.025%) 처리했을 때도 clear zone이 형성되지 않았다 (data not shown). *C. albicans*을 특이적, 선택적으로 사멸 시킬 수 있는 유사 다당체나 물질을 활용할 수 없었으나, 다른 관련 연구 중인 분자량 범위가 0.5~2-kDa 사이의 활성분자형 키토산이라 명명한 분자들은 이 균체에 매우 활성이 우수하게 나타났다 (data not shown). 이는 아마도 아미노 다당인 키토산 분자들의 특징으로 *C. albicans*에 대해 높은 활성을 나타내지만, 본 연구에서 분리한 음이온성 다당 (Fig. 3 & 4, Table 1)은 상기 균체에 항균 활성을 나타내지 않는 점으로 미루어 보아 균체 세포벽과의 친화성, 분자량 크기, 그리고 특정 작용기의 상관성 등을 고려해볼 수 있는 기회를 마련했음에 그 가치가 있다고 사료된다.

고찰

에너지 생산 측면에서 볼 때 미세조류에 대한 관심은 매우 높고, 현실적으로 충분한 가능성이 타진되고 있는 실정이다. 다만, 본 연구자들은 바이오디젤 생산과는 무관하게 선택적으로 분리된 미세조류의 효율적 활용을 위한 검토를 지속적으로 수행해왔다. 일차적 방안으로 탈지 후 biomass의 수용성 다당에 관심을 두고 추출 수율과 생리활성 등 주요 특징을 살펴보고자 하였다. 이전 보고한 바와같이 미세조류 종류에 따라 그 세포벽 구성성분 중 하나인 다당의 구성당 성분이 크게 차이가 나며 [21], 이러한 점은 아마도 세포외부로 부터의 물리, 화학적 스트레스에 대한 차폐, 수용, 결합 등의 다양한 기능을 할 것으로 사료된다. 이에 본 연구자들은, 바이오에너지 생산 이후 얻어진 biomass의 효율적 이용을 위한 첫 단계로 수용성 다당의 활용에 연구 목적을 두었다.

1°-a ClSO₃H를 통해서 먼저 알아본 바에 의하면, 탈지 미세조류 g당 황산화 과정에 의해 추출된 수용성 다당의 수율이 8.75 g으로 얻어졌다. 그리고 정량된 총탄수화물은 0.264 g/L이었다. 황산기는 다당의 생물학적 활성에서 중요한 역할을 한다. 특히 황산화 정도가 생물학적 활성을 분석할 때 중요한 척도가 되고, sulfate content가 높을수록 황산화 활성이 높게 나오는 것으로 알려져 있다 [5,6]. 다른 논문

의하면 1240-1256 cm^{-1} 에서 S=O 작용기가 강하게 나타나지만 [5,6,14], FT-IR 분석은 사용하는 기계에 따라 약간의 차이가 생길 수 있으므로 본 연구의 FT-IR 분석에서는 1018 cm^{-1} 에서 황산기가 나타남으로써 황산화 다당이 추출되었음을 알 수 있었다.

일반적으로 사용되는 황산화 과정의 반응시약은 chlorosulfonic acid (ClSO_3H)-pyridine 복합체, SO_3 -pyridine 복합체 또는 SO_3 -DMF 복합체를 사용한다. 그리고 황산화 과정의 용매는 formamide (FA), DMF, DMSO 또는 pyridine이다 [5]. 그런데 이 연구의 추출과정에서 쓰이는 ClSO_3H 가 생물학적 위험성이 높아서 황산으로 대체할 가능성이 있는지 확인하고자 하였다. 단계별로 추출하여 얻은 생산물을 1°-b ClSO_3H , 1°-b H_2SO_4 라고 명명하고, 총 탄수화물을 정량하였다. 이 때, 1°-b ClSO_3H 가 1°-b H_2SO_4 보다 약간 더 높게 측정됐지만, 두 생산물 1°-a ClSO_3H 보다 낮은 총탄수화물이 정량되었다. 일차 생산물을 얻고서 남은 pellet (microalgae)를 같은 방법으로 또 추출한 생산물을 2° ClSO_3H , 2° H_2SO_4 라고 명명하고, 똑같이 총 탄수화물을 정량하였다. 하지만, 이 때, 2° ClSO_3H 는 1°-b ClSO_3H 와 비슷한 값을 보였지만, 2° H_2SO_4 는 1°-b H_2SO_4 보다 총 탄수화물이 높게 확인되었다. 수율과 황산화의 상호 상관성을 밝힐 수는 없었지만, 수용성 다당 추출을 위해 황산화 방법을 사용하여 직접 추출함으로써 시간적, 경비적인 요소를 고려할 수 있었고, 비교적 간단한 방법을 통해 수용성 다당 추출을 할 수 있었다는 결과를 얻었다. 이는 후속연구에 많은 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

각 추출물들의 황산화 활성을 확인하기 위해 DPPH radical scavenging assay와 ABTS radical scavenging assay를 하였다. 그리고서 scavenging effect를 specific activity ($\mu\text{mole/g/min}$)로 나타냈다. 1°-a ClSO_3H 가 추출물 중에서 가장 높은 총탄수화물 농도를 보였지만, 황산화 활성은 가장 낮았다. 그리고 각 추출물의 총탄수화물 농도가 높을수록 황산화 활성은 낮게 나타났다. 또한, 연속적으로 추출했을 때, 1°-b ClSO_3H 와 2° ClSO_3H 는 총탄수화물 농도도 똑 같았고, 황산화 활성도 비슷하게 나타났다. 그런데 1°-b H_2SO_4 와 2° H_2SO_4 는 2차 추출물이 총탄수화물 농도가 더 높고, 황산화 활성은 더 낮았다. 따라서, 추출된 각각의 성분당 조성이나 분자 크기에 따른

수율, 활성도 차이가 나타남으로서 향후 좀 더 세밀한 분석이 이뤄져야 할 것으로 생각한다. 결과적으로 H_2SO_4 가 ClSO_3H 보다 생물학적 위험도도 낮고, 일차 추출물에 한해서 황산화 활성도 좋게 나오지만, 추출되는 다당의 양이 적고, 연속적으로 추출할 때 사용하기에는 유용성이 적다고 생각된다. 반면에, ClSO_3H 를 사용하면 생물학적 위험도도 높지만, 일차 추출물과 이차 추출물의 추출되는 다당의 양도 비슷하며, DPPH radical scavenging activity도 H_2SO_4 에 비해 크게 떨어지지 않는다. 따라서, 연속적으로 탈지 미세조류에서 다당을 추출하고자 한다면 ClSO_3H 를 사용하는 것이 더 유용하다고 생각된다.

결론

바이오피젤 생산에 따른 탈지미세조류 biomass의 효과적인 활용을 위한 첫 번째 과정으로 수용성 다당의 효율적 추출, 구조 및 이들 물질의 생리활성을 확인함으로써, 고부가가치성 물질로의 연구에 본 연구의 가치를 두고자 한다.

감사의 글

이 논문은 해양수산부의 재원으로 해양생명공학 기술개발사업 (Marine Biotechnology Program funded by Ministry of Oceans and Fisheries, Korea) 연구 개발 비지원에 의해 수행되었습니다.

References

1. Alban, S., Schauerte, A. and Franz, G. 2002. Anticoagulant sulfated polysaccharides: Part I. Synthesis and structure-activity relationships of new pullulan sulfates. *Carbohydr. polym.* **47**, 267-276.
2. Gomez-Ordóñez, E., Jimenez-Escrig, A. and Ruperez, P. 2014. Bioactivity of sulfated polysaccharides from the edible red seaweed *Mastocarpus stellatus*. *Bioact. Carbohydr. Dietary Fibre*, **3**, 29-40.
3. Sellimi, S., Kadri, N., Barragan-Montero, V., Laouer, H., Hajji, M. and Nasri, M. 2014. Fucans from a Tunisian brown seaweed *Cystoseira barbata*: Structural characteristic and antioxidant activity. *Int. J. Biol. Macromol.*, **66**,

- 281-288.
4. Wu, Y., Cui, S. W., Tang, J. and Gu, X. H. 2007. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from boat-fruited sterculia seeds by response surface methodology. *Food Chem.*, **105**, 1599-1605.
 5. Wang, X., Zhang, Z., Yao, Z., Zhao, M. and Qi, H. 2013. Sulfation, anticoagulant and antioxidant activities of polysaccharide from green algae *Enteromorpha linza*. *Int. J. Biol. Macromol.*, **58**, 225-230.
 6. Wang, X., Wang, J., Zhang, J., Zhao, B., Yao, J. and Wang, Y. 2010. Structure-antioxidant relationships of sulfated galactomannan from guar gum. *Int. J. Biol. Macromol.*, **46**, 59-66.
 7. Telles, C. B. S., Sabry, D. A., Almeida-Lima, J., Costa, M. S. S. P., Melo-Silveira, R. F., Trindade, E. S., Sasaki, G. L., Wisbeck, E., Furlan, S. A., Leite, E. L. and Rocha, H. A. O. 2011. Sulfation of the extracellular polysaccharide produced by the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* alters its antioxidant, anticoagulant and antiproliferative properties *in vitro*. *Carbohydr. polym.*, **85**, 514-521.
 8. Lu, Y., Wang, D. Y., Hu, Y. L., Huang, X. Y. and Wang, J. M. 2008. Sulfated modification of epimedium polysaccharide and effects of the modifiers on cellular infectivity of IBDV. *Carbohydr. polym.*, **71**, 180-186.
 9. Chen, Y., Zhang, H., Wang, Y., Nie, S., Li, C. and Xie, M. 2015. Sulfated modification of the polysaccharides from *Ganoderma atrum* and their antioxidant and immunomodulating activities. *Food Chem.*, **186**, 231-238.
 10. Wang, Y., Peng, Y., Wei, X., Yang, Z., Xiao, J. and Jin, Z. 2010. Sulfation of tea polysaccharides: Synthesis, characterization and hypoglycemic activity. *Int. J. Biol. Macromol.*, **46**, 270-274.
 11. Hussein, M. M., Helmy, W. A. and Salem, H. M. 1998. Biological activities of some galactomannans and their sulfated derivatives. *Phytochemistry*, **48**, 479-484.
 12. Jian-Ya, Q., Ye-Yu, B., Jing, T. and Wei, C. 2015. Antioxidation and α -glucosidase inhibitory activities of barley polysaccharides modified with sulfation. *LWT-Food Sci. Technol.*, **64**, 104-111.
 13. Lu, X., Mo, X., Guo, H. and Zhang, Y. 2012. Sulfation modification and anticoagulant activity of the polysaccharides obtained from persimmon (*Diospyros kaki L.*) fruit s. *Int. J. Biol. Macromol.*, **51**, 1189-1195.
 14. Geresh, S., Mamontov, A. and Weinstein, J. 2002. Sulfation of extracellular polysaccharides of red microalgae: preparation, characterization and properties. *J. Biochem. Biophys. Methods.*, **50**, 179-187.
 15. Al-Hothaly, K. A., Adetutu, E. M., Taha, M., Fabbri, D., Lorenzetti, C., Conti, R., May, B. H., Shar, S. S., Bayoumi, R. A. and Ball, A. S. 2015. Bio-harvesting and pyrolysis of the microalgae *Botryococcus braunii*. *Bioresour. Technol.*, **191**, 117-123.
 16. Yang, X. B., Gao, X. D., Han, F. and Tan, R. X. 2005. Sulfation of a polysaccharide produced by a marine filamentous fungus *Phoma herbarum* YS4108 alters its antioxidant properties *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1725**, 120-127.
 17. Lee, C. G., Lee, J., Lee, D. G., Kim, J. W., Alnaeeli, M., Park, Y. I. and Park, J. K. 2016. Immunostimulating activity of polyhydric alcohol isolated from *Taxus cuspidata*. *Int. J. Biol. Macromol.*, **85**, 505-513.
 18. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350-356.
 19. Mohsin, S., Mahadevan, R. and Kurup, G. M. 2014. Free radical-scavenging activity and antioxidant effect of asophyllan from marine brown algae *Padina tetrastratica*. *Biomed. Prev. Nutr.*, **4**, 75-79.
 20. Zheng, L., Zhao, M., Xiao, C., Zhao, Q. and Su, G. 2016. Practical problems when using ABTS assay to assess the radical-scavenging activity of peptides: Importance of controlling reaction pH and time. *Food Chem.*, **192**, 288-294.
 21. Goo, B. G., Baek, G., Choi, D. J., Park, Y. I., Synytsya, A., Bleha, R., Seong, D. H., Lee, C. G. and Park, J. K. 2013. Characterization of a renewable extracellular polysaccharide from defatted microalgae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresour. Technol.*, **129**, 343-50.