(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0010567
(43) 공개일자 2008년01월31일

(51) Int. Cl.
A61K 31/35 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-0070728
(22) 출원일자 2006년07월27일
심사청구일자 2006년07월27일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내
(72) 발명자
홍용기
부산 해운대구 우1동 974번지 경동아파트 103동 703호
(74) 대리인
박병석, 서장찬

전체 청구항 수 : 총 3 항

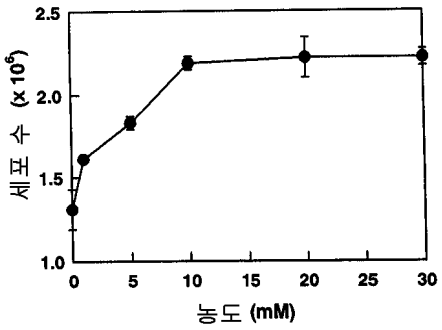
(54) 미세조류 성장 촉진제로서의 레보글루코산

(57) 요 약

본 발명은 해양 미세조류들의 배양시 세포성장속도를 증가시키는 레보글루코산 (levoglucosan) 물질 및 사용방법에 관한 것이다. 레보글루코산 물질은 해조류인 홑파래 (*Monostroma nitidum*)의 물 추출로부터 분자량 500 이하의 분획, DEAE-셀룰로즈 칼럼, HPLC를 통하여 분리할수 있다. 홑파래 분말로부터 얻은 물질의 수율은 약 5 x 10^{-3}% 였다. 10 mM 농도에서 실험에 사용한 6종의 미세조류 및 6종의 배지 모두에서 거의150%의 세포성장율을 나타내었다. 레보글루코산이 포함된 배양액에서 자란 미세조류는 레보클루코산이 포함되지 않은 배양액에서 자란 미세조류와 지방산 조성 및 세포의 크기 등에는 차이가 없이 세포성장 속도만 증가되므로 해양 미세조류의 배양 첨가제로서 사용될 수 있다.

대표도 - 도2

레보글루코산 농도에 따른 미세조류 T. suecica의 성장촉진 효과



특허청구의 범위

청구항 1

미세조류 성장 촉진제(microalgal growth enhancer)로 사용하기 위한 레보글루코산.

청구항 2

미세조류의 배양시에 배양 배지 첨가제로서의 레보글루코산.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 미세조류가 Chaetoceros gracillis, Chlorella elliproidea, Dunaliela salina, Isochrysis galbana, Nannochloris ocalata, Navicula incerta, Pavlova lutheri 및 Tetraslemis suecica로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 레보글루코산.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<3> 본 발명은 미세조류 성장 촉진제로 사용하기 위한 레보글루코산의 용도, 미세조류 배양시에 배양 배지 첨가제로서의 레보글루코산의 용도에 관한 것이다.

<4> 미세조류의 대량 배양은 연체동물과 갑각류, 어류의 먹이생물로써 해양 양식 산업에 있어 아주 중요하다(참조: Pulz & Gross, 2004). 미세조류 먹이는 해양생물들의 영양섭취가 까다로운 초기 성장단계에서 특히 중요하다. 이때의 영양요구도는 일반적인 농산물들로서는 보충하기가 어렵다. 미세조류는 단백질, 비타민, 색소, 도코사헥사에노산 (docosahexaenoic acid) [DHA; 22:6 (n-3)], 에이코사펜타에노산 (eicosapentaenoic acid) [EPA; 20:5 (n-3)] 등을 다량 함유하고 있어 영양학적으로 뛰어나다고 알려져 있다(참조: Mansour et al., 2005). 태어난 지 얼마 지나지 않은 미숙한 유생단계에서는 특히 고도불포화 지방산인 DHA와 EPA의 양이 부족하면 낮은 성장률과 높은 사망률을 야기한다(참조: Om et al., 2003; Park et al., 2006). 일부 미세조류 종들은 고농도로 대량배양하기 힘들어서 수급문제로서 영양분이 풍부함에도 불구하고 먹이생물로서 널리 사용되지 못하고 있다(참조: Wikfors & Ohno, 2001). 이러한 문제를 해결하는 방법 중의 하나는 편리한 생물반응장치의 개발이다(참조: Pulz, 2001). 다른 한 방법은 세포 성장을 촉진하는 물질을 사용하여 세포량을 증가시켜서 소규모 생산을 통해서도 경제적인 생산이 가능토록 하는 것이다. 본 발명 분야에서는 이미 해조류 추출물들의 효과 탐색을 통하여 홑파래(*Monostroma nitidum* Wittrock)의 물 추출물이 다양한 미세조류들의 세포 성장을 촉진시킨다는 사실이 본 발명자에 의해서 보고된 바 있다(Cho et al., 1999).

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<5> 본 발명에서는 위에서 언급한 미세조류들의 성장을 촉진시키는 원인 물질을 규명하고자 집중적인 연구를 시도하였으며, 결과적으로 미세조류 성장 촉진의 주된 물질을 분리하였으며, 또한 당해 물질이 각종 배지에서 다양한 미세조류들의 세포성장에 효과적이라는 사실을 규명해 내어 본 발명을 완성하였다.

발명의 구성 및 작용

<6> 본 발명은 해양 미세조류들의 배양시 세포성장 속도를 증가시키는 레보글루코산 물질 및 이의 용도에 관한 것이다.

<7> 한 가지 양태에서, 본 발명은 미세조류 성장 촉진제로 사용하기 위한 레보글루코산에 관한 것이다.

<8> 다른 양태에서, 본 발명은 미세조류의 배양시에 배양 배지 첨가제로서의 레보글루코산에 관한 것이다.

<9> 또 다른 양태에서, 본 발명에 사용되는 미세조류는 Chaetoceros gracillis, Chlorella elliproidea, Dunaliela salina, Isochrysis galbana, Nannochloris ocalata, Navicula incerta, Pavlova lutheri 및 Tetraslemis

suecica로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

<10> 미세조류의 배양액에 레보글루코산 (levoglucosan)을 첨가하면 미세조류의 성장이 촉진되었다. 성장촉진 물질인 레보글루코산은 해조류인 홑파래 (*Monostroma nitidum*)의 물 추출, 분자량분획, DEAE-셀룰로즈 칼럼, HPLC를 통하여 분리하였다. 홑파래 분말로부터 얻은 물질의 수율은 약 5 x 10^{-3}% 였다. 10 mM 농도에서의 레보글루코산은 실험에 사용한 6종의 미세조류 및 6종의 배지 모두에서 거의150%의 세포성장율을 나타내었다. 레보글루코산이 포함된 배양액에서 자란 미세조류는 레보클루코산이 포함되지 않은 배양액에서 자란 미세조류와 지방산 조성 및 세포의 크기 등에는 차이가 없이 세포성장 속도만 증가되므로 해양 미세조류의 배양 첨가제로서 사용될 수 있다.

<11> 본 발명에 따르는 레보글루코산 물질의 제조 및 분석 공정은 다음과 같다.

<12> 홑파래 재료

<13> 해조류인 홑파래 즉 *M. nitidium* Wittrock (Monostromaceae, Ulvales) 엽체들은 2004년 3월 및 2005년 3월에 전라남도 진도군 임해 (북위 34° 22' 23", 동도 126° 15' 16"의 조간대 상부 해안에서 채집하였다. 시료는 홑파래 엽체를 실내에서 일주일 동안 완전하게 건조시킨 후 커피 분쇄기를 이용해 5분 동안 가루로 분쇄하여 -20 °C에 보관하면서 사용하였다.

<14> 활성물질 분리

<15> 홑파래 분말 (100g)을 100% 메탄올 5 L로 세번 추출하여 메탄올 추출분을 제거한다. 남아있는 홑파래 분말로부터 메탄올을 완전히 감압 증발시킨 후 물에 용해되는 부분을 추출하기 위하여 5 L의 증류수를 첨가하여 하루 동안 추출한다. 물 추출물은 감압상태에서 농축시킨다. 이 추출물을 0.1M Tris 완충용액 (pH 8.0)에 용해시키고 분자량 분획법인 아미콘 다이아필터 막 (Amicon diafilter membrane)을 사용하여 4가지 분획으로 분리하였다. 그리고 분자량이 500보다 작은 활성 분획은 DEAE-셀룰로오즈 (Sigma) 칼럼 (50 g; 30 cm x 6 cm)을 사용하여 분리하였으며 용출은 같은 완충용액에 0.1 M NaCl을 넣어 만든 용액으로 분리하였다. 이 0.1 M NaCl분획은 역상 HPLC를 사용하여 μBondapak C-18 칼럼 (3.9 mm ID x 30 cm: Waters)으로 분리하였다. 이때 사용한 HPLC는 워터스(Waters) 600 농도구배 액체 크로마토그래프로서 220nm에서 흡광도를 측정하였다. 유동상은 두가지 용매계로서 0.1% TFA가 섞인 아세토니트릴과 0.1% TFA가 섞인 증류수이다. 용출은 1차 HPLC로 0-100% 아세토니트릴을 1분에 1ml씩 50분간 농도 구배로 흘려주고, 2차 HPLC로는 0-30% 아세토니트릴을 30분간 농도구배로 흘려주었다. 이때 주 활성을 나타내는 성장 촉진물질은 16% 아세토니트릴에서 용리되었다.

<16> 화학구조 분석방법

<17> 순수 분리된 분자량 500보다 작은 분리물질은 Jeol JNM-ECP 400 NMR 분광계(spectrometer)로 400MHz 및 100MHz에서 ^{1}H 및 ^{13}C를 분석하였다. 적외선 스펙트럼은 Perkin-Elmer GX 스펙트로 포토미터로 측정하였다. GC-MS 스펙트럼은 frame ionization detector가 달린 Shimadzu GC-MS-QP5050A 장비로 분석하였다. 정제된 화합물의 구조는 Lafont et al. (1989) 과 Pfeffer et al. (1979)의 스펙트럼 자료들과 일치함을 확인하였다.

<18> 결과

<19> 활성물질의 확인

<20> 홑파래 가루 (100 g)로부터 메탄올 용해 부분을 제거한 후 증류수로 추출하였다. 이 수용성 추출물 (800 mg)은 아미콘 다이아필터(Amicon diafilter) (= MW 500)와 DEAE-셀룰로즈 칼럼 크로마토그라피를 사용하여 분리하였다 (121 mg). 성장촉진 활성분획은 아세토나이트릴과 물의 농도구배를 사용하여 역상 HPLC에 의해 분리하였다. 활성 피크는 16% 아세토나이트릴에서 용리되었고 흰 가루 모양으로 나타났다 (5mg). 홑파래 파우더로부터 얻은 활성 물질의 수율은 5 x 10^{-3}%였다. 정제된 활성물질은 GC-MS, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, IR 분광계를 사용하여 분석하였다. 질량 스펙트럼은 162에서 분자적 이온 피크를 보여주었고 분자식$C_6H_{10}O_5$ 에 상응하였다. 이러한 스펙트럼 패턴을 저장된 데이터와 비교하였을 경우 레보글루코산 (levoglucosan)과 잘 일치함을 알 수 있었다 (도 1). ^{13}C NMR 스펙트럼은 산화된 6개의 탄소 (δ_C 68.5, 67.8, 71.6, 72.2, 82.1, 107.8)의 존재를 나타내었다. ^{1}H NMR 스펙트럼은 세개의 5-산화 메틴(methine) 프로톤과 하나의 메틸렌(methylene) 프로톤 (δ_H 3.40, 3.49, 3.97, 4.98, 3.86)을 나타내었다. 이 스펙트럼 자료를 바탕으로 이 화합물은 레보글루코산으로 동정되었고 레보글루코

산의 기존 자료와도 확실히 일치함을 확인하였다.

<21> 미세조류 배양

<22> 미세조류 성장촉진 활성물질의 분리를 위한 활성측정, 여러 배지에서의 활성비교, 미세조류 세포에 미치는 영향 중의 하나로서의 지방산 비교 등을 위하여 편모 미세조류인 *Tetraselmis suecica* (CCAP-66; P-4)를 무균상태로 f/2 배지 (Guillard & Ryther, 1962)에서 1.2 x 10^5 cells mL^{-1} 만큼 접종한 후 배양하였다. 배양은 70 mmol m^{-2} s^{-1} 조도와 18 °C에서 4일 동안 이루어졌다. 세포성장 정도는 혈구계를 이용하여 현미경하에서 세포 수를 측정하였다. 레보글루코산 (levoglucosan)의 효과를 알아보기 위하여 여섯 가지의 배지 즉 f/2, ESM, MF, MKM, M-ASP7, W-ESM (Kasai et al., 2004)에서 *T. suecica*의 세포 성장도 비교하였다. 모든 미세조류 균주는 한국해양미세조류은행으로부터 분양 받아서 사용하였다.

<23> 지방산 분석

<24> 지방산 분석을 위하여 *T. suecica*를 레보글루코산 (10mM)을 첨가한 f/2배지와 첨가하지 않은 f/2배지를 18 °C에서 4일 동안 배양하였다. 지질을 추출한 후 메틸화는 삼불화붕소를 사용하였다 (Xu et al., 1998). 즉 500 mL 배지에서 배양한 대략 5 x 10^6 세포를 1000 x G에서 10분동안 원심분리하여 모은 다음, 8 mL 물, 10mL 클로르포름, 20mL 메탄올을 함께 섞어 즉시 10분 동안 초음파 처리하였다. 10mL 클로르포름과 10mL물을 더 첨가하고 10분간 더 초음파 처리하였다. 원심분리 후 아래 층의 클로르포름 층을 새 시험관에 옮겨서 진공하에서 감압증발시킨다. 이 지질을 5 mL 메탄올에 녹인 14% BF3 : 벤젠 : 메탄올(5 : 4 : 11)에서 메틸화시켰다. 시험관은 질소가스로 충전하고 단단히 봉인한 후 90 °C에서 30분간 열을 가하였다. 이 메틸화된 지방산은 Shimadzu GC QP5050A 가스 크로마토그라피로 분석하였다.

<25> 통계

<26> 모든 실험은 각각 독립적으로 적어도 3회 이상 반복하였다. 측정치의 평균값은 스튜던트 t- 시험(student *t*-test)을 사용하여 대조구와 비교하였다.

<27> 레보글루코산의 미세조류 성장효과

<28> *T. suecica*는 f/2배지에서 70 mmol m^{-2} s^{-1} 조도 및 18 °C 조건하에서 8일만에 정지기에 도달하였다. 대수 증식기의 중간 시점은 대략 4일이였으므로 세포 성장 촉진을 측정하기 위해 4일째 되는 날 세포 수를 계측하였다. 정제된 레보글루코산의 화합물을 *T. suecica*를 사용하여 f/2배지에서 농도별로 조사하였다 (도 2). 레보글루코산은 추출물이 없는 배양액과 비교했을 때 10 mM 농도에서 169% 정도의 강한 성장 촉진을 나타내었고 이 농도로서 이후 모든 실험을 행하였다. 다양한 배지에서 레보글루코산의 효과를 알아보기 위하여는 10 mM 레보글루코산을 6가지의 다른 배지들에 첨가하여 4일동안 배양하였다. *T. suecica*의 세포수는 레보글루코산이 첨가된 배지들에서 전반적으로 증가하였다 (표 1).

표 1

<29> 여러 배지에서의 10 mM 레보글루코산 첨가에 따른*T. suecica* 의 세포수

배지명	레보글루코산 무첨가 배양	레보글루코산 첨가 배양	레보글루코산 무첨가 배양시의 1일당 세포생육속도	레보글루코산 첨가시의 1일당 세포생육속도
ESM	2.1±0.1	3.1±0.2	0.54	0.96
F/2	1.6±0.2	2.3±0.2	0.44	1.02
MF	1.9±0.1	2.4±0.1	0.98	1.66
MKM	3.0±0.8	3.9±0.2	0.18	0.30
W-ASP7	1.5±0.1	2.0±0.1	0.28	0.68
W-ESM	2.7±0.1	4.0±0.3	1.70	2.06

<30> 상기 표 1에서, 세포수는 4일간 배양한 것이고, 데이터는 (평균 ±SD) x 10^6 (n = 3); P < 0.1이다.

<31> 레보글루코산은 해양 미세조류의 배양에 흔히 사용하는 f/2배지나 ESM배지에서 더 효과가 뛰어났다. 배양액의

세포 수뿐만 아니라, 세포 성장속도도 증가하였다. 미세조류의 성장속도는 레보글루코산의 첨가로서 배양초기에 거의 2배로 증가하였다. 세포 크기 (대략 직경 20 ㎛)는 레보글루코산이 있는 배지와 없는 배지 사이에 차이가 없었다. 또한 레보글루코산의 성장 촉진 효과를 알아보기 위하여 먹이생물로서 많이 이용되는 여러 미세조류들에 대하여도 조사하였다 (표 2).

표 2

<32> 여러 미세조류 종들의 성장에 대한 레보글루코산 효과

	레보글루코산 무첨가 배양	레보글루코산 첨가 배양	상대 성장율 (%)
Chaetoceros gracillis B-015	*1.2±0.1*	*1.6±0.1*	*133*
Chlorella elliproidea C-021	*1.6±0.3*	*2.3±0.4*	*144*
Dunaliela salina C-248	*1.0±0.3*	*1.3±0.1*	*130*
Isochrysis galbana H-002	*1.3±0.2*	*1.9±0.1*	*146*
Nannochloris ocalata C-031	*1.6±0.1*	*2.2±0.1*	*138*
Navicula incerta B-001	*1.4±0.2*	*1.8±0.2*	*129*
Pavlova lutheri H-003	*1.9±0.4*	*2.6±0.3*	*137*
Tetraslemis suecica CCAP-66	*1.2±0.2*	*1.9±0.2*	*158*

<33> 상기 표 2에서, 각 미세조류들은 10mM 레보글루코산 첨가 및 무첨가의 f/2 배지에서 4일간 배양한 것이고, 데이터는 (평균 ±SD) x 10^6; (n = 3); P < 0.1이다.

<34> 상기 실험결과, 실험에 사용된 모든 미세조류들의 세포 성장을 촉진시켰으며 특히 *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*와 *Chlorella elliproidea*는 거의 150% 가까이 세포수가 증가되었다.

<35> 지방산 조성

<36> 레보글루코산의 첨가에 의해 먹이 생물로서의 미세조류에서 가장 중요한 지질의 특성변화를 확인하기 위하여 지방산조성을 조사하였다. 고도불포화 지방산 (PUFA)들은 어류 유생의 생존과 성장을 위한 사료의 영양학적 가치를 결정하는데 특히 중요한 성분이다. 실험 결과 리놀레산(linoleic acid), 리놀렌산(linolenic acid), EPA와 같은 고도 불포화 지방산들의 비율은 레보글루코산을 넣고 배양한 *T. suecica*와 넣지 않고 배양한 *T. suecica* 사이에 거의 차이를 보이지 않았다 (표 3).

표 3

<37> 10 mM 레보글루코산 첨가 및 무첨가된 f/2 배지에서 4일간 배양된*T. suecica* 의 주 지방산 (총 지방산에 대한 상대비율로서 1 % 이상) 조성

지방산	*레보글루코산 무첨가 배양*	*레보글루코산 첨가 배양*
14:0	*2.8*	*3.2*
16:0	21.9	22.7
17:0	2.7	2.9
18:0	47.1	49.4
18:1 (n-9)	1.9	1.7
18:2 (n-6)	2.0	1.7
18:3 (n-3)	14.5	13.2
20:5 (n-3)	2.7	2.5

발명의 효과

<38> 생 사료로서의 미세조류들은 주로 제한된 일부 지역에 사용하기 위하여 옥외탱크나 배양기에서 주로 생산하여 왔다. 이것은 오염될 위험이 높고 유지하는데 많은 비용이 든다. 현재까지 많은 연구자들은 새로운 디자인의 배양기 개발 (Burgess et al., 1993), 수확 후의 저장 방법 개발 (Lim & Park, 1998), 영양학적 가치 향상

(Lopez Alonso et al., 1992) 등에 많은 노력을 기우려 왔다. 먹이생물로서의 미세조류의 생산성을 높이기 위한 미세조류 성장촉진 물질들에 대한 개발은 거의 없었다. 본 연구에서 같은 환경조건에서 배양한 미세조류의 세포수는 레보글루코산을 넣어준 배지와 그렇지 않은 배지를 비교한 결과 레보글루코산을 넣어준 배지에서 약 150% 증가하는 것을 알 수 있었다. 레보글루코산을 넣어준 배지에서 배양된 세포의 크기 및 지방산 조성의 변화는 없었다. 앞서 발표된 논문 (Cho et al., 1999)에 의하면 홑파래의 추출물을 넣은 *Isochrysis galbana*의 배양세포와 넣지 않은 배양세포 사이에 생화학 조성 성분과 소화율에도 또한 차이가 없었다. 단지 홑파래와 미끌지누아리 (*Grateloupia turuturu*) 두종의 해조류만이 4 종의 녹조류, 13종의 갈조류, 10종의 홍조류 중에서 미세조류의 성장을 촉진시켰다.

<39> 홑파래는 주로 파도가 없는 내만의 조간대 상부 암반지역에 서식한다. 그리고 겨울부터 이른 봄까지 자란다. 2월부터 엽상체 가장자리를 따라 녹황색 조직이 보이면서 성숙하기 시작한다. 엽상체는 3월이 되면 거의 길이 8 cm, 넓이 9 cm, 습중량 2g 정도로 아주 커진다. 엽상체의 세포는 단일층이다. 엽상체는 식용 가능하고 요즈음 김 양식에 사용하는 같은 그물을 사용하여 양식되고 있다 (Kida, 1990). 물 추출물은 녹조류인 가시파래 (*Enteromorpha prolifera*) 엽체의 성장을 저해한다고 알려져 있고 (Hong et al., 1997), 총 콜레스테롤 및 저밀도 지단백을 감소시키며 (Jung et al., 1997), 미세조류의 세포 성장을 촉진시킨다 (Cho et al., 1999).

<40> 홑파래로부터 미세조류 성장촉진 물질을 확인하는 본 발명에서 다양한 미세조류 종과 다양한 배지에서 성장촉진 작용을 보이는 레보글루코산을 분리하였다. 레보글루코산 (CAS RN 498-07-7)은 분자내 글루코시딕 결합을 이루고 있고 1,6-안하이드로-β-D-글루코피라노즈; 1,6-안하이드로-b-D-글루코즈; 안하이드로-d-만노산과 같은 동의어를 사용하고 있다. 레보글루코산은 산을 사용하여 포도당으로 쉽게 가수분해됨에도 불구하고 효모와 곰팡이 균주를 대상으로 한 실험에서는 가수분해의 효과를 나타내지 않았다 (Kitamura et al., 1991). 반면에, 글루코즈-6-포스페이트가 레보글루코산 이용가능한 효모와 곰팡이의 세포 추출물 반응액에서 유도효소인 레보글루코산 킨나제 (levoglucosan kinase) 반응에 의하여 생성됨을 알았다. 많은 진핵세포 미생물들의 경우 성장을 위해 탄소와 에너지원으로써 레보글루코산을 사용할 수 있다 (Prosen et al., 1993; Zhuang et al., 2001). 그리고 원핵세포 미생물의 경우는 레보글루코산을 사용할수 있는 것이 거의 없었다 (Nakahara et al., 1994; Khiyami et al., 2005). 미세조류에서의 레보글루코산 대사작용이 명확히 검증되어 있지 않음에도 불구하고, 대부분의 원핵세포 미생물들은 레보글루코산을 이용할 수 없는 반면, 본 발명에 사용된 모든 미세조류들의 경우 상당 부분 이를 사용할 수 있음을 확인하였으며, 향후 미세조류의 배양에 많이 사용할 수 있을 것으로 예상되어 미세조류의 대량 배양이나 산업적 생산에 효과적인 성장 촉진제로 사용될 것으로 기대된다.

<41> 참고문헌:

<42> 1. Cho JY, Jin HJ, Lim HJ, Whyte JNC, Hong YK (1999) Growth activation of the microalga *Isochrysis galbana* by the aqueous extract of the seaweed *Monostroma nitidum*. J. Appl. Phycol. 10: 561-567.

<43> 2. Cho JY, Kwon EH, Choi JS, Hong SY, Shin HW, Hong YK (2001) Antifouling activity of seaweed extracts on the green alga *Enteromorpha prolifera* and the mussel *Mytilus edulis*. J. Appl. Phycol. 13: 117-125.

<44> 3. Guillard RL, Ryther JH (1962) Studies for marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonule conferyacea* (Cleve) Gran. Can. J. Microbiol. 8: 229-239.

<45> 4. Jung Y, Cho YC, Park IS, Ahn SH, Kim JT, Kang YJ, Hong YK (1997) Effect of the seaweed (*Monostroma nitidum*) extract on Triton WR-1339 induced hyperlipidemia in mouse. J. Kor. Fish. Soc. 30: 850-858.

<46> 5. Kasai F, Kawachi M, Erata M, Watanabe MM (2004) NIES Collection List of Strains. 7th ed, Microalgae and Protozoa. National Institute for Environmental Studies, Japan. p. 246.

<47> 6. Khiyami MA, Pometto AL, Brown RC (2005) Detoxification of corn stover and corn starch pyrolysis liquors by *Pseudomonas putida* and *Streptomyces setonii* suspended cells and plastic compost support biofilms. J. Agric. Food Chem. 53: 2978-2987.

<48> 7. Kida W (1990) Culture of the seaweed *Monostroma*. Mar. Behav. Physiol. 16: 109-131.

<49> 8. Kitamura Y, Abe Y, Yasui T (1991) Metabolism of levoglucosan (1,6-anhydro-beta-D-glucopyranose) in microorganisms. Agr. Biol. Chem. 55: 515-521.

<50> 9. Lafont D, Boullanger P, Cadas O, Descotes G (1989) A mild procedure for the preparation of 1,6-

anhydro-b-D-hexopyranoses and derivatives. Synthesis 78: 191-194.

<51> 10. Lim HJ, Park SR (1998) Changes in survival rate, nutritional value and fatty acid profile of concentrated food phytoplanktons by cold storage. J. Kor. Fish. Soc. 31: 567-573.

<52> 11. Lopez Alonso D, Molina Grima E, Sanchez Perez JA, Garcia Sanchez JL, Garcia Camacho F (1992) Isolation of clones of *Isochrysis galbana* rich in eicosapentaenoic acid. Aquaculture 102: 363-371.

<53> 12. Mansour MP, Frampton DMF, Nichols PD, Volkman JK, Blackburn SI (2005) Lipid and fatty acid yield of nine stationary-phase microalgae: Applications and unusual C_{24}-C_{28} polyunsaturated fatty acids. J. Appl. Phycol. 17: 287-300.

<54> 13. Nakahara K, Kitamura Y, Yamagishi Y, Shoun H, Yasui T (1994) Levoglucosan dehydrogenase involved in the assimilation of levoglucosan in *Arthrobacter* sp. I-552. Biosci. Biotechnol. Biochem. 58: 2193-2196.

<55> 14. Om AD, Ji H, Umino T, Nakagawa H, Sasaki T, Okada K, Asano M, Nakagawa A (2003) Dietary effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on lipid metabolism in black sea bream. Fish. Sci. 69: 1182-1193.

<56> 15. Park HG, Puvanendran V, Kellett A, Parrish CC, Brown JA (2006) Effect of enriched rotifers on growth, survival, and composition of larval Atlantic cod (Gadus morhua). J. Mar. Sci. 63: 285-295.

<57> 16. Pfeffer PE, Valentine KM, Parrish FW (1979) Deuterium-induced differential isotope shift ^{13}C NMR-resonance reassignments of mono- and disaccharides. J. Amer. Chem. Soc. 101: 1265-1274.

<58> 17. Prosen EM, Radlein D, Piskorz J, Scott DS (1993) Microbial utilization of levoglucosan in wood pyrolysate as a carbon and energy source. Biotechnol. Bioeng. 42: 538-541.

<59> 18. Pulz O (2001) Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57: 287-293.

<60> 19. Pulz O, Gross W (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. Appl. Microbiol. Biotechnol. 65: 635-648.

<61> 20. Wikfors GH, Ohno M (2001) Impact of algal research in aquaculture. J. Phycol. 37: 968-974.

<62> 21. Xu XQ, Beardall J, Hallam ND (1998) Modification of fatty acid composition in halophilic Antarctic microalgae. Phytochem. 49: 1249-1252.

<63> 22. Zhuang XL, Zhang HX, Tang JJ (2001) Levoglucosan kinase involved in citric acid fermentation by *Aspergillus niger* CBX-209 using levoglucosan as sole carbon and energy source. Biomass Bioenergy 21: 53-60.

<64> 23. Zhu CJ, Lee YK, Chao TM (1997) Effects of temperature and growth phase on lipid and biochemical composition of *Isochrysis galbana* TK1. J. Appl. Phycol. 9: 451-457.

도면의 간단한 설명

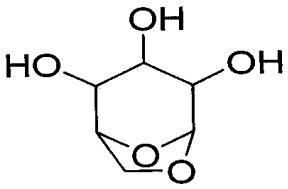
<1> 도 1은 본 발명에 따르는 미세조류 성장촉진 작용을 가지는 레보글루코산 물질의 화학구조를 도시한 것이다.

<2> 도 2는 본 발명에 따르는 레보그루코산의 농도별로 미세조류(예: Tetraselmis suecica)의 성장에 미치는 효과를 도시한 것이다. 도 2에서는, 레보글루코산 농도별로 첨가된 f/2 배지에 mL 당 1.2 x 10^5 세포들을 접종하여 18 ^{o}C에서 4 일간 배양한 것을 나타내었으며, 데이터는 (평균 ±SD); (n = 3)이다.

도면

도면1

흩파래에서 분리한 레보글루코산의 화학구조



도면2

레보글루코산 농도에 따른 미세조류 T. suecica의 성장촉진 효과

