

극지 미세조류 유래 항알러지와 항염증 활성  
소재 개발

Development for anti-allergic and anti-inflammatory  
therapeutic compounds from antarctic microalgae



대구가톨릭대학교

# 제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “극지 미세조류 유래 천연 세포보호 물질의 안정적 대량 확보 및 효능분석” 과제의 위탁연구 “극지 미세조류 유래 항알러지와 항염증 활성 소재 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.



2020 . 01 . 31

(본과제) 총괄연구책임자	:	김 상 희
위탁연구기관명	:	대구가톨릭대학교
위탁연구책임자	:	민 병 선
위탁참여연구원	:	트란환뉴엔크한
“	:	하만두안
“	:	가오다오쿠엔



# 요 약 문

## I. 제 목

극지 미세조류 유래 항알러지 및 항염증활성 소재 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 극지 미세조류에서 항알러지 및 항염증 활성을 갖는 화합물 분리동정 및 구조결정
- 분리된 화합물의 항염증 및 항알러지 활성 평가
- 활성물질 대량 확보
- 활성물질의 화장품 혹은 기능성 식품 개발 가능성 확립

## III. 연구개발의 내용 및 범위

- 극지 미세조류의 유기용매 추출 및 화합물 분리
- 분리된 화합물 NMR 등의 기기를 이용한 구조동정
- 분리된 화합물 Jurkat T cell를 이용한 항알러지활성 평가
- 분리된 화합물 RAW264.7 cell를 이용한 항염증활성 평가
- 활성물질 기능성 화장품으로 적용

## IV. 연구개발결과

- 극지 미세조류 *Chloromonas* sp. KSF0108에서 9종 화합물 분리동정 및 활성평가
- 극지 미세조류 *Chlamydomonas* sp. KSF0031에서 8종 화합물 분리동정 및 활성평가
- 극지 미세조류 *Chlamydomonas* sp. KSF006에서 6종 화합물 분리동정 및 활성평가
- 극지 미세조류 *Chlamydomonas* sp. KSF100에서 8종 화합물 분리동정 및 활성평가

## V. 연구개발결과의 활용계획

- *Chlamydomonas* sp. KSF0031에서 분리한 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoic acid-2,3-dihydroxy-propyl ester의 기능성 화장품 개발 선도물질 개발
- 활성물질 기능성 화장품으로 특허출원 및 기술이전 추진
- 활성물질 합성에 따른 기능성 화장품 상품화 추진

# S U M M A R Y

## (영 문 요 약 문)

### I. Title

Development for anti-allergic and anti-inflammatory therapeutic compounds from antarctic microalgae

### II. Purpose and Necessity of R&D

- Separation and structural determination with anti-allergic and anti-inflammatory activity from antarctic microalgae
- Evaluation of anti-allergic and anti-inflammatory activity of compounds
- Procure of large quantity for active compounds
- Establishing the possibility of developing cosmetics or functional food for active compounds

### III. Contents and Extent of R&D

- Extracting organic solvents from antarctic microalgae and isolating compounds
- Structural determination of isolated compounds using equipments such as NMR
- Evaluation of anti-allergic activity of compounds by Jurkat T cells
- Evaluation of anti-inflammatory activity of compounds by RAW264.7 cells
- Active compounds applied as functional cosmetics

### IV. R&D Results

- Identification of nine compounds from *Chloromonas* sp. KSF0108 and evaluation for their anti-allergic and anti-inflammatory activities
- Identification of eight compounds from *Chlamydomonas* sp. KSF0031 and evaluation for their anti-allergic and anti-inflammatory activities
- Identification of six compounds from *Chlamydomonas* sp. KSF006 and

evaluation for their anti-allergic and anti-inflammatory activities

- Identification of six compounds from *Chlamydomonas* sp. KSF100 and evaluation for their anti-allergic and anti-inflammatory activities

#### V. Application Plans of R&D Results

- Development of functional cosmetics for 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoic acid-2,3-dihydroxy-propyl ester isolated from *Chlamydomonas* sp. KSF0031
- Patent application and technology transfer through cosmetic products that improve wrinkles of active compounds
- Promoting the commercialization of functional cosmetics by the synthesis of active compound



# 목 차

## 제 1 장 서론

- \* 연구개발의 목적, 필요성 및 범위 등을 기술

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

- \* 국·내외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국·내외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

- \* 이론적, 실험적 접근방법, 연구내용, 연구결과를 기술

## 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

- \* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전에의 기여도 등을 기술

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- \* 추가연구의 필요성, 타연구에의 응용, 기업화 추진방안을 기술
- \* 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능함.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

## 제 7 장 참고문헌

- \* 보고서 작성시 인용된 모든 참고 문헌을 열거한다.

# 제 1 장 서론

## 제1절 연구개발 목적

- 극지 미세조류에서 항알러지 및 항염증 활성을 갖는 화합물 분리동정 및 구조결정
- 분리된 화합물의 항염증 및 항알러지 활성 평가
- 항알러지 및 항염증 활성 물질 도출
- 활성물질 대량 확보
- 활성물질의 화장품 혹은 기능성 식품 개발 가능성 확립

## 제2절 연구개발 필요성

### 1. 기술적 측면

- 극지 생물연구는 주로 세균을 중심으로 연구되어 왔으며 진핵 미세조류에 대한 연구는 초기단계이다. 다양한 종에 비하여 활용되고 있는 미세조류의 수는 일부에 한정되어 있어서 남북극 같은 극한지에서 새로운 종의 발굴과 기능성 탐색을 통해 유용 자원의 권리 확보 및 관련 시장 장악을 위한 노력이 필요함
- 극한 생물로부터 유래한 천연 방어물질들은 세포 추출물 및 천연 순수 추출물질을 활용하는 상황임. 산업적 활용을 위한 물질 확보를 위하여 해당 생물의 대량 배양으로 인한 공간, 시간, 비용적 측면에서 비교적 비효율적임
- 상기 기술한 비효율적 상황을 극복하기 위하여 GRAS (Generally Regarded as Safe) 생물들을 활용한 물질을 적극적으로 개발하고자 하며 물질 활성 개량을 통하여 고효성 세포보호물질을 확보함으로써 지속적인 연구개발 및 상품화를 진행하고자 함
- 극지 미세조류에 대한 기초 및 응용 연구의 활성화를 위해 유용 활성 물질 스크리닝 기술 및 대량 배양 시스템의 개발 방법에 대한 조사 필요
- 산업적 접근을 위해 세포보호 물질의 분리 및 활성 평가 방법에 대한 다학제 간 협력 조사 필요

### 2. 경제·산업적 측면

- 세계의 피부질환 치료제 시장규모는 연평균 성장률 7.7%로 2015년 200억 달러에서 2022년 337억 달러로 확대될 전망이다 (세계의 피부질환 치료제 시장 전망, 2016)
- 현재 국내의 피부질환 시장은 다국적제약회사가 장악하고 있음. 여드름 치료제 시장은 GSK와 갈더마가 ‘스티바에이크림’과 ‘레타크닐크림’ 등으로 높은 점유율



을 보임. 다국적 제약사들도 아토피성 피부염 치료제 ‘프로토픽’, ‘아드반탄크림’ 등 제품으로 레오파마, 바이엘 코리아에서 피부질환 치료제의 포트폴리오를 강화하고 있음 (대한임상피부치료연구회, 2016)

- 자외선 차단, 항암 항산화 등의 생리활성 연구와 제약개발이 주를 이루고 있으나, 제약 제재의 효능을 보존하고 세포를 보호하는 소재에 대한 연구 개발은 미미함
- 극지 생물연구는 주로 세균을 중심으로 연구되어 진핵 미세조류에 대한 연구는 초기 단계이며, 다양한 종에 비해 활용되고 있는 미세조류의 수는 일부로 기능성 탐색을 통한 유용 자원 권리 및 관련 시장 장악을 위한 노력이 시급함
- 시장 진입 시 매출액 상승, 일자리 창출, 연구 개발 투자 증대, 신제품 추가 개발의 시장 선순환 고리를 만들 수 있음

### 3. 과학적 측면

- 해조류 화장품으로 단 21편의 논문이 검색될 만큼 연구가 미비하며 주로 대형 해조류 위주로 미세조류 성분 연구는 전무한 상황
- 남극 미세조류 유래 세포보호물질 추출물 및 천연 순수물질 확보 이외에 세포보호 기능을 향상시킨 고효성 세포보호물질을 개발함으로써 과학분야 및 경제, 산업분야에서의 발전을 향상시킬 것으로 기대함
- 남극 미세조류 유래 추출물 및 천연 순수물질 등을 확인함으로써 세포보호물질 이외의 미확인 유용물질을 발굴하여 극지 미세조류에 대한 기초연구를 넘어 본격적으로 활용연구 시대를 열 수 있음

### 4. 사회·문화적 측면

- 본 연구개발에 의한 제품에 “극지연구소 보유 남극 미세조류 유래 항알러지-항염증물질” 문구를 기재함으로써 자연적인 극지연구소의 대국민 홍보 등에 기여할 것으로 기대함.
- 지속적인 남극 미세조류 유래 유용물질 등이 함유된 제품 등을 개발함으로써 사회, 문화적으로 극지 및 극지연구소에 대한 이미지 확대 및 향상에 이바지할 것으로 기대됨
- 극지역의 생명체 연구에 대한 도전정신, 탐험심의 증대로 국민 자긍심을 고취할 수 있음

## 제3절 연구개발 범위

- 극지 미세조류에서 활성물질 확보
  - 대량배양을 통한 안정적 확보 기술 개발 및 활성 개량
  - 물질 추출 및 구조동정 물질 확보
- 항알러지 및 항염증활성 분석

- Jurkat T cell를 이용한 분리물질 항알러지 활성평가
- RAW264.7 cell를 이용한 분리물질 항염증 활성평가

■ 피부질환 개선 소재로서의 실용화 기반 구축

- 활성평가에 따른 실용화 검토
- 기능성 화장품으로 기술 이전 및 시제품 제작



## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제1절 국외 기술개발 현황

- 고령화로 인한 수요 증가로 노화예방 등 피부건강 관련 시장은 2007년에는 600억불, 최근에는 1000억불 (100조원)로 그 어느 시장보다 지속적인 증가세를 유지할 것으로 예측
- 세계의 피부질환 치료제 시장규모는 연평균 성장률 7.7%로 2015년 200억 달러에서 2022년 337억 달러로 확대될 전망이다
- 전 세계적으로는 미세조류 및 해조류의 물질 추출, 배양, 활용, 반응기 기술 분야는 폭발적인 성장세를 나타내고 있지만 피부외용제, 화장품로의 기능성 기술 위치는 상대적으로 약한 성장기에 위치하는 것으로 보아 현재 미세조류 기술은 상업성이 높은 에너지 분야에 집중되고 있음
- 극지 미세조류에서 세포보호 효능을 확인함으로써 독보적인 극지유래 천연신소재 개발에 우위를 차지할 수 있으며 피부 관련 제품, 질환 치료제 산업으로 확대 가능

### 제2절 국내 기술개발 현황

- 미세조류 관련 한국의 특허 기술 위치는 전체적인 감소세이며 대학교 산학협력단들이 주요 출원인으로, 아직 기업에 의한 진출은 활발하지 않음. 기업의 출원 및 기술 권리화는 제품화와 직접 연결된 가능성이 높은 만큼 아직 시장 경쟁이 활발하지 않은 것으로 보임
- 본 연구에서 기 확보된 기능성 소재는 정상세포에 독성을 나타내지 않는 특성을 보여 세포보호 물질 후보군으로 우수성을 확인. 이들 물질들의 활용성을 높여 외부 유해성분으로부터 피부세포를 보호하고 피부질환 개선제로 개발하게 된다면 극지의 청정 이미지가 합쳐져 현재 전세계 웰빙 트렌드에 맞는 고부가 상품으로 독보적인 분야를 형성할 것으로 기대
- 해양바이오소재연구단은 2016년 스피롤리나를 이용하여 활성산소를 낮추고 상처세포를 활성화하여 피부재생을 높이는 나노소재를 개발
- 바이오벤처기업인 엠바이오(주)는 2016년 두나리엘라 추출물을 주요 성분으로 '해무수'를 출시
- 낙동강 생명자원관은 미세조류 시조카이트리움 속 PB-31 균주 추출물의 항염, 항산화 등 효과를 확인하여 파이코일바이오텍코리아(주)과의 기술이전 협약을 체결하였으며 제품 출시
- 미세조류 연구업체 (주)엔엘피 한국남부발전 업무협약체결(2011.04.04): 발전소에서 배출되는 이산화탄소와 온배수를 활용하여 미세조류 배양 / 바이오오일, 의약품, 화장품 등 원료생산 계획

- 최근 미세조류의 생물학적 개량을 통하여 바이오디젤, 바이오매스 향상의 연구가 진행되고 있으며 이를 통하여 산업적 유용물질의 전구체 및 고부가가치 물질을 생산하는 기반을 구축하고 있음

### 제3절 특허 현황

- 전 세계적인 동안열풍과 웰빙 트렌드로 피부 건강산업에서 천연원료 선호도가 급증하면서 해조류, 미세조류 활용이 급증하고 있으며 국내외 기능성 제품 개발이 활발히 진행되고 있음
- 특허 기술 분석 결과 아직은 기업에 의한 시장 진출이 활발하지 않은 것으로 보이나 2016년 아모레, 한불 등 국내 대기업들이 산학협력단과 기술제휴를 맺은 것으로 보아 향후에는 관련시장 경쟁이 치열해질 것으로 예상됨.
- 미세조류의 기초 연구 사례와 논문 분석 결과 점유율이 높은 기술이 없는 것으로 보임. 그러나 타 천연물의 경우 피부외용제/화장표의 개발이 저조한 항여드름, 발모, 자외선 차단 기능성에 대한 연구도 다수 수행됨에 따라 해조류 및 미세조류의 기능성 관련 시장성이 매우 넓은 것으로 보이며 결론적으로 시장 선점을 위한 기술 개발과 제품화를 통한 시장 선점이 시급하다고 판단됨
- 종합하면 한국의 경우 항염/자극개선, 주름개선, 미백, 항노화의 순으로 연구가 활발하게 진행되었으며 미국의 경우 항노화, 주름개선 기술의 개발 비율이 높음. 동양권은 미백, 보습, 항노화 기능성이 선호되고 있으며 서양권은 항노화, 주름 개선에 대한 소비자의 욕구가 높음
- 미세조류 기술의 주요 출원인은 주름개선 기능성을 강조한 Solazyme, Inc.으로 확인되었으며 일본의 SHISEIDO CO LTD는 Scenedesmus, chlorella 등의 항노화 기능성, 프랑스의 LVMH Recherche는 Phaeodactylum 등의 항노화 및 자외선 차단 기능, 독일의 SYMRISE GMBH & CO KG는 *Isochrysis* sp. 또는 *Tetraselmis* sp.의 발모 기능성, 영국의 THE BOOTS COMPANY PLC는 *Haematococcus* sp.를 이용한 전반적인 피부개선에 대한 조성물 특허를 출원
- 분석대상 주요 국가별 출원비율은 한국, 중국 및 일본이 22% 내지 28%로 나타났으며 이는 김, 미역, 우뭇가사리, 감태 등의 해조류가 전통적으로 이용되어 왔기 때문으로 보이며 미국과 유럽에서는 미세조류와 해조류 중 해조류 연구 비율이 타 국가에 비하여 낮은 편
- 해조류를 이용한 기술의 경우 전체 출원의 80%, 미세조류는 20%를 차지. 해조류의 경우 특히 2010년 후반 이후 한국 및 중국에 의하여 주도되는 기술 개발이 두드러지는 것으로 나타났고 미세조류의 경우 2000년대 초반 이후 완만한 출원 양상을 나타내고 있는데 주로 클로렐라와 스피룰리나 등 특정 미세조류 종에 한정된 관련 기술에 집중
- 극지역 생물자원을 이용한 피부관련 회사와 제품 현황은 아래와 같음
  - LIFT LABS 사: 극한 환경(남극, 사막) 서식 생물체에서 추출한 천연 세포보호 단

백질을 이용한 화장품 시판

- Polaar 사: 남극과 북극 식물에서 추출한 물질을 이용하여 유해환경으로부터 피부를 보호하는 화장품 시판
- Lumene 사: 북극 식물에서 피부 항노화 물질을 추출하여 화장품 시판
- Skyn ICELAND 사: 북극 식물에서 추출한 항산화물질을 활용한 유기농 화장품 시판
- 극지에서 분리되어진 호냉성 클로레라의 연구 결과, 저온에서 우수한 생장을 보여 다양한 기온을 보이는 국가에서의 옥외 대량배양 가능성을 제시하고 있고, 에틀리아 종은 국내에서 분리된 토착 미세조류 균주로서 우수한 성장속도 및 높은 오일함량이 조사되어 이를 활용한 연구가 현재 진행되고 있음
- 극지 미세조류 연구는 주로 항동결 물질에 대한 연구로 비 극지역 생물에서는 상대적으로 적어 대부분 남극 녹조류와 규조류 유래 항동결 물질 발견 및 생리적 특성연구가 진행되는 정도임
- 국내에서는 남극 해양 녹조 클라미도모나스, 남극 해양 규조 케토세로스, 남극 담수 녹조 콜로로모나스 등의 미세조류의 호냉성 특성에 기인한 항동결 물질 활용 연구가 진행되고 있음



## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제1절 연구개발 내용

#### 1. 미세조류 용매분획, 물질분리 및 구조결정

##### ■ 활성물질 분리를 위한 추출물 제조 및 용매분획

- 활성물질 분리를 위한 MeOH로 추출물을 제조함
- MeOH 추출물의 활성물질 분리를 위한 hexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc 및 BuOH로 용매분획

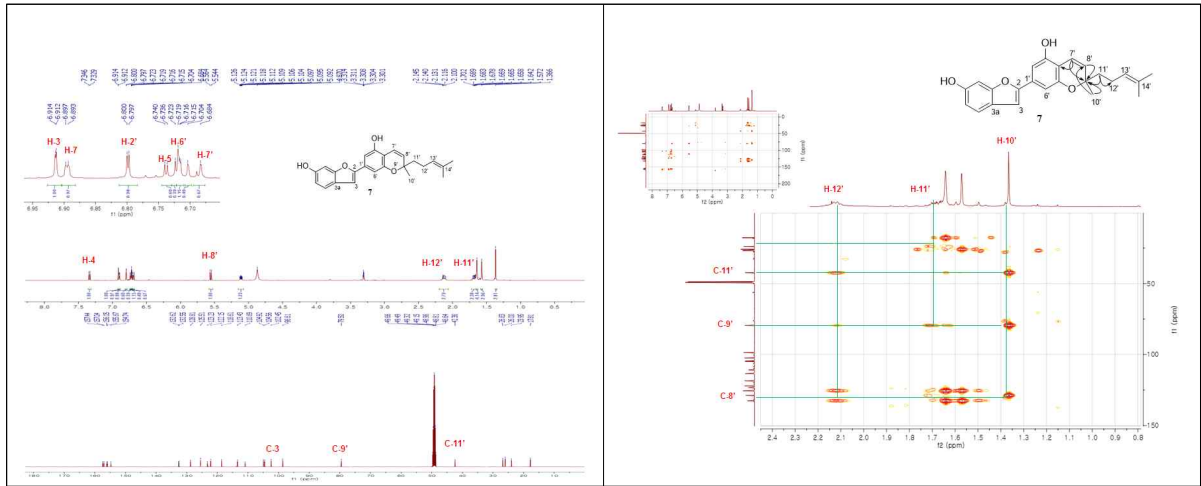
##### ■ 활성물질 분리정제

- 활성을 갖는 용매분획에서 silica gel, Sephadex LH-20, MCL gel, 역상 silica gel 등을 이용한 large-scale column chromatography를 이용하여 물질 분리



[그림 ] 활성물질 추출/분리

- 분리된 화합물은 <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-, 2D-NMR, MASS, CD, UV, IR 등의 spectroscopic analysis로 구조를 동정함.



[그림] 활성물질 구조결정

## 2. 미세조류 활성의 효능 검증

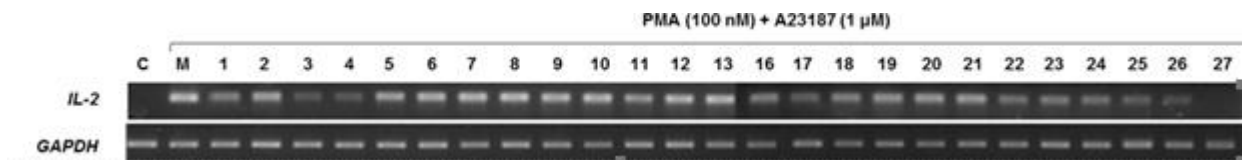
### ■ 항알러지 시험

#### ● 세포배양

Jurkat T 면역세포는, 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank)에서 구입하며, 10% FBS와 100 unit/mL penicillin-streptomycin이 포함된 RPMI 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 적응시켜 배양한다. 계대 배양은 이틀에 한번 씩 한다.

#### ● RT-PCR을 이용한 IL-2 생성억제 활성측정

RNA는 TRIZOL을 이용한 Jurkat T cell에서 분리한다. RNA의 reverse transcription은 RT Pre-Mix를 사용한다. human IL-2는 5' -CACGTCTTGCAC TTGTCAC-3' and 5' -CCTTCTTGGGCATGTAAAAC-3'; human GAPDH, 5' -CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT-3' and 5' -AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3' 을 사용한다. amplification profile은 90°C 30초 denaturation, 60°C 20초 annealing, 72°C 40초 extension 시킨다. 30 cycle은 72°C 7분 denaturation으로 진행하여 PCR data로 IL-2 억제활성을 측정한다.

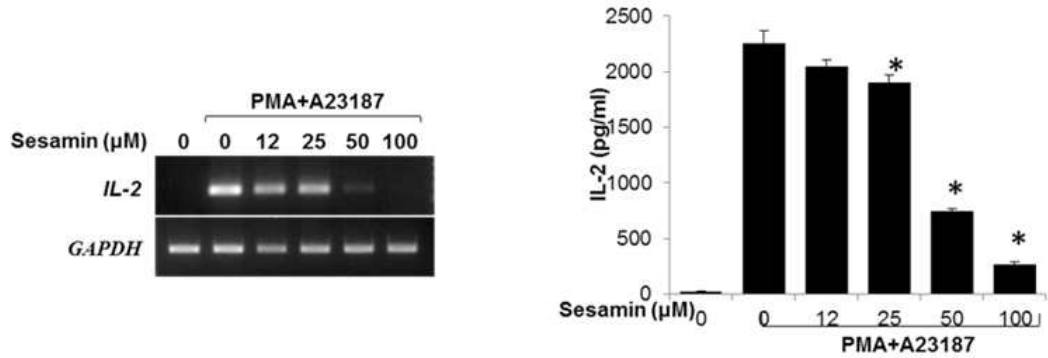


[그림] IL-2 억제활성 RT-PCR



- ELISA assay

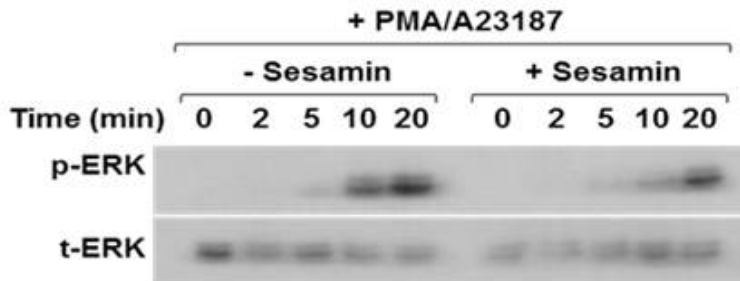
Jurkat T 면역세포에 일정농도 화합물을 30 분간 처리한다. 그리고 PMA(100 nM)/A23187 (1  $\mu$ M)로 30분간 배양한다. 실험액을 24 시간 배양한 후, 상등액을 Duoset Human IL-2 ELISA kit로 처리하여 IL-2 생성억제를 측정하여 IC<sub>50</sub> 값을 얻는다.



[그림] IL-2 ELISA assay

- Western blotting

Jurkat T 면역세포를 lysis buffer (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.5)에 어름 위에서 한 시간 처리하고, 4°C 14,000 rpm에서 2 시간 원심분리 한다. lysis 추출물 50  $\mu$ g을 10% SDS-PAGE을 통하여 분리한다. 단백질을 Trans-Blot SD semidry transfer cell의 nylon membrane으로 이행하고, 5% skim milk로 1시간 blocking한 후, 세척하여 0.1% Tween 20 (TBS-T)와 3% skim milk을 함유하는 TBS에서 Rabbit anti-human ERK와 하루 밤 방치한다. 과량의 primary antibody는 TBS-T로 4회 세척하여 제거한다. nylon membrane은 0.1  $\mu$ g/mL peroxidaselabeled secondary antibody로 2시간 반응시킨다. TBS-T로 세 번 세척한 후, 밴드를 ECL Western Blotting detector로 확인한다.



[그림] IL-2 활성화 Western blotting

■ NO 생성억제 활성(항염증작용)



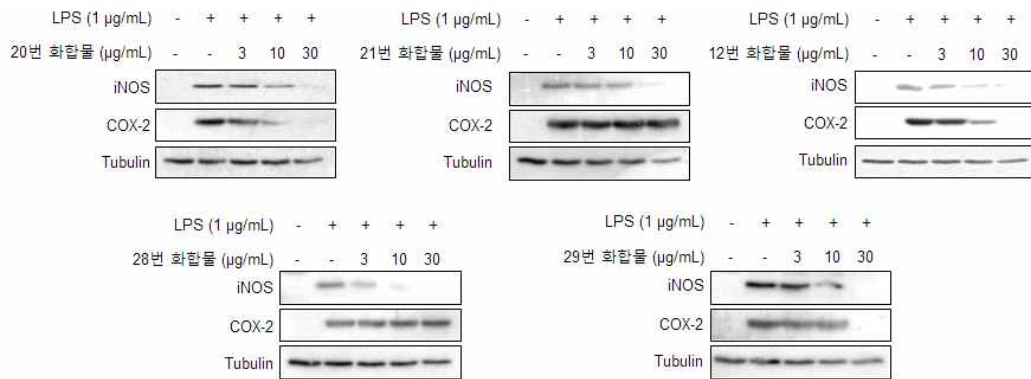
- 세포배양
 

RAW 264.7 대식세포는 murine macrophage cell line으로, 한국세포주은행 (Korean Cell Line Bank)에서 구입하며, 10% FBS와 100 unit/mL penicillin-streptomycin이 포함된 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에 적응시켜 배양한다. 계대 배양은 이틀에 한번 씩 한다.
- 세포독성 측정(MTT Assay)
 

시료의 세포독성은 MTT assay를 통해 확인한다. RAW 264.7 cell를 24 well plate에 2x10<sup>5</sup> cell/well로 분주한 후, 1 시간 후 LPS를 1 µg/mL로 처리하고, 24 시간 동안 배양한 후, MTT solution을 첨가한다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 2 시간 배양한 후, 상층액을 scution하고, 석출된 결정(formazan)에 DMSO를 1 mL씩 넣고 실온에서 30분 동안 shaking하여 녹인다. 96 well plate에 분주하여 ELISA를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정한다.
- NO 생성억제 활성
 

NO 생성은 Griess reaction assay를 통해 확인한다. RAW 264.7 cell를 24 well plate에 2x10<sup>5</sup> cell/well로 분주한 후, 24 시간 뒤 sample을 농도별로 처리한다. 1 시간 후 LPS를 1 µg/mL로 처리하고, 24 시간 동안 배양한 후, 상층액을 수거한다. 상층액과 standard(NaNO<sub>2</sub>)를 100 µL씩 96 well에 분주하고, Griess reagent를 100 µL씩 첨가한 후, ELISA를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정한다. positive control로는 cerastol를 사용한다.
- Western Blot analysis
 

rIFN-γ(20 U/mL)와 LPS(10 µg/mL)로 염증 반응을 유도한 대식세포를 PBS로 세척한 후 cell scrapper로 긁어 수집한다. 이를 2X sample buffer를 이용하여 sampling을 하고, 7.7% acrylamide gel에 전기영동을 하여 단백질을 분리한 후, PVDF membrane으로 옮긴다. 그 뒤 항체의 비 특이적 결합을 차단하기 위하여 blocking buffer 용액을 처리한 뒤 1차 항체를 첨가하여 4°C에서 overnight 반응시킨다. 다음날 tween 20을 함유한 PBS(PBST)로 10분씩 3회 세척한 뒤 2차 항체로 1시간 반응시킨다. 이어서 PBST로 10분씩 7회 세척한 후 ECL 시약으로 반응시킨 후 필름에 현상하여 단백질을 확인한다.

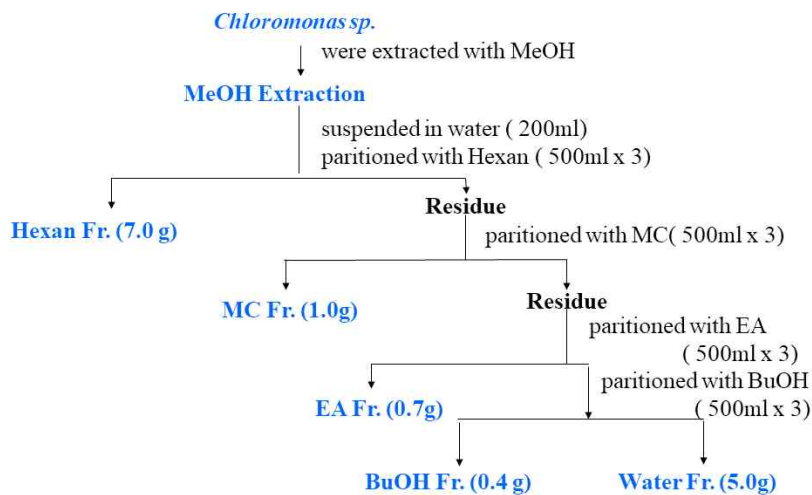


[그림] iNOS 및 COX-2 웨스턴 블로팅

## 제2절 연구개발수행 결과

### 1. 1차년도 (2017년)

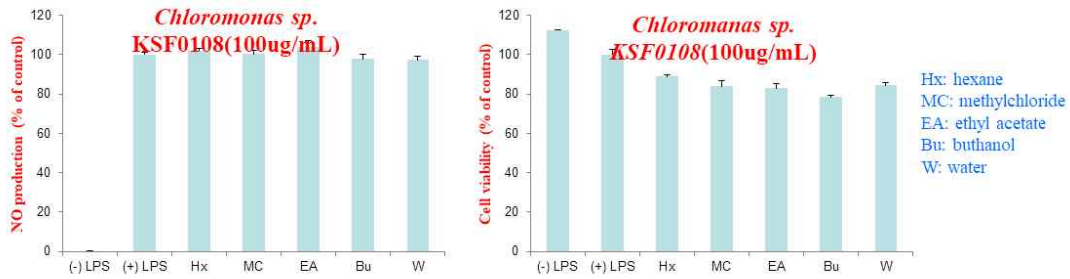
가, 극지 미세조류(*Chloromonas* sp. KSF0108) 추출 및 추출물 용매분획



그림, Extraction and partition fraction from *Chloromonas* sp. KSF0108

■ *Chloromonas* sp. KSF0108에서 활성물질을 분리하기 위하여 시료 50 g을 MeOH로 추출하여 MeOH 추출물을 얻고, MeOH 추출물을 물에 현탁한 후 유기용매 hexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, BuOH로 분획하여 각각의 분획물 7.0 g, 1.0 g, 0.7 g, 0.4 g 및 5.0 g을 얻어 활성 측정을 하였음.

나, *Chloromonas* sp. KSF0108 용매분획물 항염증 평가 및 항알러지 평가



**그림 NO result of fractions from *Chloromonas sp.* KSF0108**

- *Chloromonas sp.* KSF0108 미세조류를 MeOH 추출액의 hexane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, BuOH 용매분획물을 RAW264.7 cell에서 NO 생성억제 활성을 측정하였으나, 100 µg/mL 농도에서 강한활성은 측정되지 않음.
- 각각의 용매분획물의 RAW264.7 cell에 대한 세포독성은 100 µg/mL 농도에서 약한 독성이 관찰되었음.

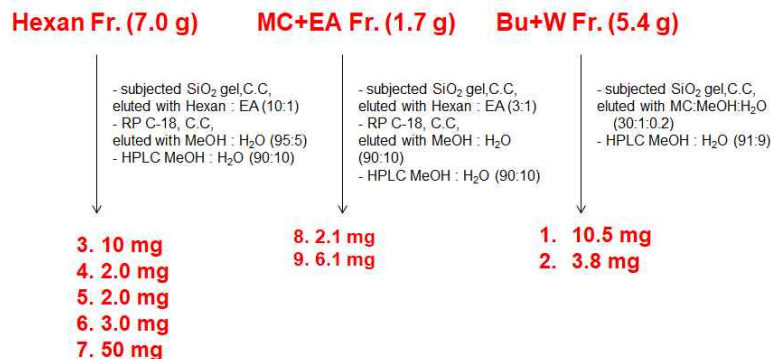


\*Jurkat cell number: 1 X 10<sup>6</sup>  
 \*Fraction concentration: 100 µg/mL  
 \*Stimulating time: 6 h  
 \*PMA con.: 100 nM  
 \*A23187 con.: 1 µM

**그림, IL-2 inhibition of fractions from *Chloromonas sp.* KSF0108**

- 각각의 용매분획물에 대해 Jurkat T을 이용해 IL-2 유리억제의 측정으로 항알러지 효과를 확인하였으나, 100 µg/mL 농도에서 강한활성은 측정되지 않음.

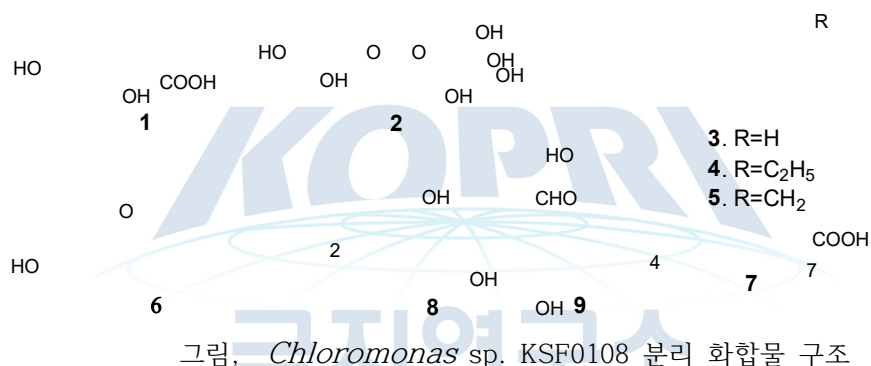
다, *Chloromonas sp.* KSF0108 화합물 분리 및 구조동정



- *Chloromonas sp.* KSF0108 MeOH 추출물의 hexane-soluble fraction 7.0 g을

silica gel column과 hexane-EtOAc (10:1) 용매로 분획하고, 각각의 분획물을 RP C-18 column (MeOH-H<sub>2</sub>O, 9:1) 및 HPLC (MeOH-H<sub>2</sub>O, 95:5)로 용출하여 화합물 **3** (10.0 mg), **4** (2.0 mg), **5** (2.0 mg), **6** (2.3 mg), **7** (50.0 mg)을 분리하였음.

- *Chloromonas* sp. KSF0108 MeOH 추출물의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-soluble fraction 및 EtOAc-soluble fraction 을 합쳐서 (1.7 g)을 silica gel column과 hexane-EtOAc (3:1) 용매로 분획하고, 각각의 분획물을 RP C-18 column (MeOH-H<sub>2</sub>O, 9:1) 및 HPLC (MeOH-H<sub>2</sub>O, 9:1)로 용출하여 화합물 **8** (2.1 mg), **9** (6.1 mg)을 분리하였음.
- *Chloromonas* sp. KSF0108 MeOH 추출물의 BuOH-soluble fraction 및 물 잔류물을 합쳐서 (5.4 g)을 silica gel column과 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (30:1:0.2) 용매로 분획하고, 각각의 분획물을 HPLC (MeOH-H<sub>2</sub>O, 91:9)로 용출하여 화합물 **1** (10.5 mg), **2** (3.8 mg)을 분리하였음.



- Compound **1** : Amorphous colorless powder; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) and <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz) measured in CD<sub>3</sub>OD: <sup>1</sup>H-NMR: 2.44 (d, *J* = 13.6 Hz, H-3a), 1.75 (ovl, H-3b), 4.24 (m, H-4), 1.99 (d, *J* = 14.4 Hz, H-5a), 1.57 (dd, *J* = 14.4, 3.6 Hz, H-5a), 1.78 (s, 2-CH<sub>3</sub>), 1.54 (s, 6-CH<sub>3</sub>), 1.30 (s, 6-CH<sub>3</sub>), 5.77(s, H-1'). <sup>13</sup>C-NMR: 185.6 (C-1), 88.9 (C-2), 46.4 (C-3), 67.2 (C-4), 48.6 (C-5), 37.1 (C-6), 113.3 (C-1'), 174.4 (C-2'), 26.9 (2-CH<sub>3</sub>), 31.0(6-CH<sub>3</sub>), 27.4(6-CH<sub>3</sub>). - (Z)-2-(2,4-dihydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexylidene) acetic acid로 동정함.

- Compound **2** : Colorless viscous syrup; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz): 5.68 (m, H-2), 4.85 (d, *J* = 7.5 Hz, H-4), 4.89 (m, H-3a), 4.54 (m, H-3b), 4.59 (m, H-5), 4.47 (m, H-6), 4.43 (m, H-1a), 4.10 (m, H-1b), 4.17 (d, *J* = 9.5 Hz, H-8), and 4.10 (m, H-9). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz): 106.2 (C-4), 77.7 (C-6), 75.8 (C-8), 72.8 (C-5), 71.5 (C-1), 70.6 (C-7), 68.6 (C-2), 63.7 (C-3), and 62.7 (C-9). -lilioside D로 동정함.

- Compound **3** : Amorphous white powder;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (100MHz) measured in  $\text{CDCl}_3$ :  $^1\text{H-NMR}$ : 5.34 (d,  $J = 4.8$  Hz, H-6), 3.51 (m, H-3), 1.00 (s, H-19), 0.91 (d,  $J = 6.4$ , Hz, H-21), 0.86 (d,  $J = 6.8$  Hz, H-26), 0.85 (d,  $J = 6.8$  Hz, H-27), 0.67 (s, H-18).  $^{13}\text{C-NMR}$ : 36.7 (C-1), 32.1 (C-2), 71.9 (C-3), 42.4 (C-4), 140.1 (C-5), 121.9 (C-6), 31.8 (C-7), 32.1 (C-8), 50.3 (C-9), 36.3 (C-10), 21.2 (C-12), 42.4 (C-13), 56.9 (C-14), 35.9 (C-15), 28.4 (C-16), 56.3 (C-17), 12.0 (C-18), 19.6 (C-19), 37.4 (C-20), 18.9 (C-21), 28.4 (C-22), 22.7 (C-23), 39.9 (C-24), 28.2 (C-25), 22.7 (C-26), 23.9 (C-27). - cholesterol로 동정함.

- Compound **4** : Amorphous white powder;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz) measured in  $\text{CDCl}_3$ :  $^1\text{H-NMR}$ : 5.34 (d,  $J = 3.2$  Hz, H-6), 3.51 (m, H-3), 1.00 (s, H-19), 0.90 (d,  $J = 6.4$ , Hz, H-21), 0.84 (d,  $J = 6.8$  Hz, H-26), 0.80 (d,  $J = 6.8$  Hz, H-27), 0.77 (d,  $J = 6.4$  Hz, H-29), ), 0.68 (s, H-18).  $^{13}\text{C-NMR}$ : 37.4 (C-1), 32.1 (C-2), 71.9 (C-3), 42.4 (C-4), 140.1 (C-5), 121.9 (C-6), 31.8 (C-7), 32.6 (C-8), 50.3 (C-9), 36.7 (C-10), 21.2 (C-12), 39.9 (C-13), 56.9 (C-14), 21.5 (C-15), 28.4 (C-16), 56.3 (C-17), 12.0 (C-18), 19.6 (C-19), 39.0 (C-20), 20.3 (C-21), 30.4 (C-22), 20.4 (C-23), 42.5 (C-24), 36.0 (C-25), 18.9 (C-26), 30.1 (C-27), 33.9 (C-28), 15.5(C-29). -  $\beta$ -sitosterol로 동정함.

- Compound **5** : Amorphous white powder;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz) measured in  $\text{CDCl}_3$ :  $^1\text{H-NMR}$ : 5.34 (d,  $J = 4.4$  Hz, H-6), 4.71 (s, H-30a), 4.65 (s, H-30b), 3.52 (m, H-3), 1.25 (s, H-19), 1.03 (d,  $J = 6.4$ , Hz, H-21), 1.01 (d,  $J = 6.8$  Hz, H-26), 0.86 (d,  $J = 6.8$  Hz, H-29), 0.68 (s, H-18).  $^{13}\text{C-NMR}$ : 37.4 (C-1), 32.1 (C-2), 71.9 (C-3), 42.5 (C-4), 140.9 (C-5), 121.9 (C-6), 31.8 (C-7), 32.1 (C-8), 50.3 (C-9), 36.6 (C-10), 21.2 (C-12), 42.5 (C-13), 56.9 (C-14), 22.0 (C-15), 28.4 (C-16), 56.3 (C-17), 12.0 (C-18), 19.6 (C-19), 36.3 (C-20), 24.5 (C-21), 28.1 (C-22), 18.9 (C-23), 39.9 (C-24), 35.9 (C-25), 157.0 (C-26), 35.9 (C-27), 22.2 (C-28), 22.0(C-29), 106.1 (C-30). - hurgadacin으로 동정함.

-Compound **6** : Amorphous yellow liquid;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz) measured in  $\text{CDCl}_3$ :  $^1\text{H-NMR}$ : 2.16 (s, H-28), 2.11 (s, H-29 and H-30).  $^{13}\text{C-NMR}$ : 74.7 (C-2), 39.5 (C-3), 37.6 (C-4), 117.5 (C-5), 145.7 (C-6), 118.6 (C-7), 121.1 (C-8), 122.8 (C-9), 144.7 (C-10), 39.5 (C-11), 31.7 (C-12), 37.4 (C-13), 22.8 (C-14), 25.0 (C-15), 33.0 (C-16), 32.9 (C-17), 22.8 (C-18), 37.6 (C-19), 37.6 (C-20), 28.1 (C-21), 21.2 (C-22), 19.9 (C-23), 11.4 (C-25), 12.4 (C-26), 19.8 (C-27), 11.9 (C-28), 19.9 (C-29), 29.9 (C-30). -  $\alpha$ -tochoperol로 동정함.

-Compound **7** : Amorphous colorless liquid;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz) measured in  $\text{CDCl}_3$ :  $^1\text{H-NMR}$ : 5.37 (m, H-11~12, 14~15), 0.90 (s, H-20).  
- 9Z,12Z-nonadecadienoic acid로 동정함.

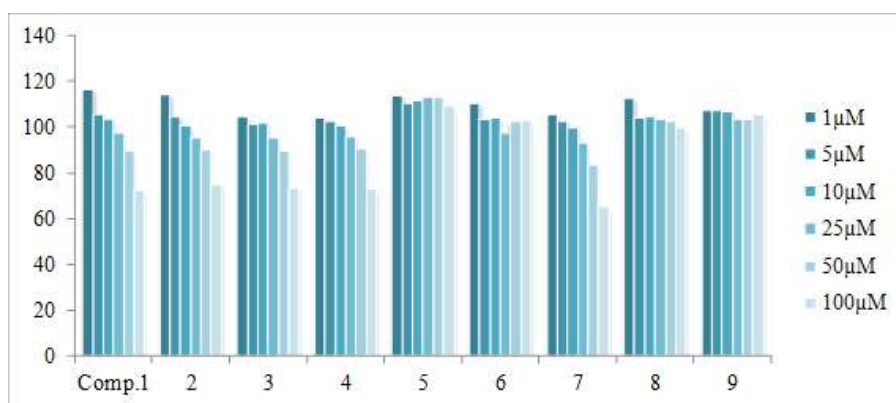
-Compound **8** : Amorphous yellow powder;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz) measured in  $\text{CD}_3\text{OCD}_3$ :  $^1\text{H-NMR}$ : 9.10 (s, H-2), 8.74 (s, H-4), 8.30 (m, H-6), 7.53 (m, H-5).  $^{13}\text{C-NMR}$ : 152.4 (C-1), 124.5 (C-2), 149.2 (C-3), 141.7 (C-4), 136.6 (C-5), 136.8 (C-6). - *m*-hydroxyphenol로 동정함.

-Compound **9** : Amorphous yellow liquid;  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz) and  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz) measured in  $\text{CD}_3\text{OCD}_3$ :  $^1\text{H-NMR}$ : 11.05 (s, -CHO), 8.68 (d,  $J = 8.4$  Hz, H-2, 6), 8.24 (d,  $J = 8.4$  Hz, H-3, 5).  $^{13}\text{C-NMR}$ : 191.5 (-CHO), 133.4 (C-4), 127.7 (C-1), 117.3 (C-2, 6), 116.5 (C-3, 5). - *p*-hydroxybenzaldehyde로 동정함.

## 2. 2차년도(2018년)

가, *Chloromonas* sp. KSF0108 화합물 항염증 활성평가

- NO 생성억제 시험은 Griess reaction assay를 통해 RAW 264.7 cell로 확인하며, positive control로는 cerastrol를 사용함. 실험결과 *Chloromonas* sp. KSF0108 분리한 화합물은 NO 생성억제 활성이 측정되지 않아 항염증활성이 없음이 확인됨.



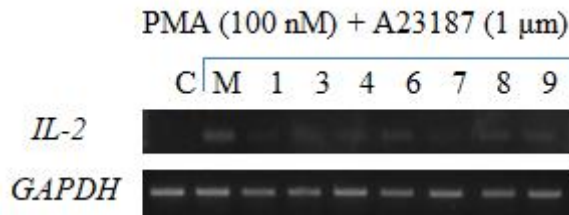
그림, RAW264.7 cell에서 NO 생성억제 활성

나, *Chloromonas* sp. KSF0108 화합물 항알러지 활성평가

- Jurkat T 면역세포에 일정농도 화합물을 30 분간 처리한다. 그리고 PMA (100 nM)/A23187 (1 μM)로 30분간 배양한다. 실험액을 24 시간 배양한 후, 상등액을



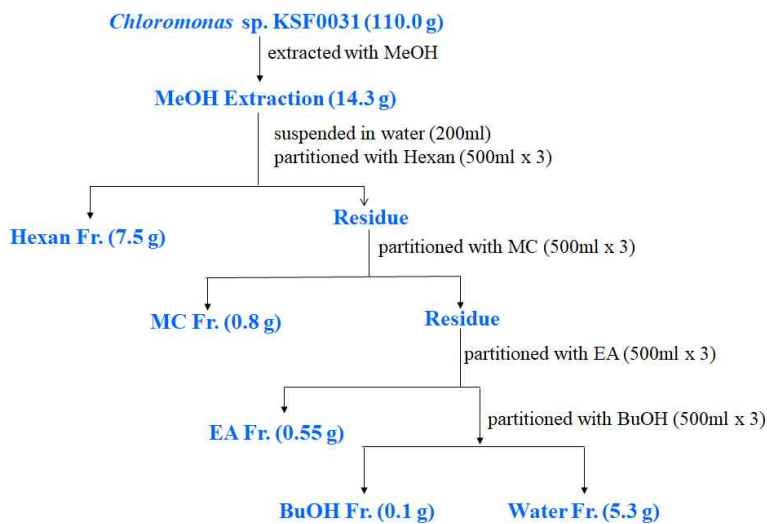
Duoset Human IL-2 ELISA kit로 처리하여 IL-2 생성억제를 측정함. 실험결과 *Chloromonas* sp. KSF0108 분리한 화합물은 Jurket T cell의 IL-2 mRNA 발현을 억제하지 않아 항알러지활성이 없음이 확인됨 (화합물 중 2, 5번 화합물은 시료부족으로 활성 측정하지 못하였음).



그림, 100 μM농도에서 시료의 IL-2 생성억제 활성

다, *Chlamydomonas* sp. KSF0031 용매분획

- *Chlamydomonas* sp. KSF0031에서 화합물을 분리하기 위하여 *Chlamydomonas* sp. KSF0031 (110 g)을 MeOH로 추출하여 14.3 g의 MeOH 추출물을 얻어 물에 현탁한 후 각각 hexane, methylene chloride, EtOAc 및 BuOH로 추출하여 각각의 용매분획물 얻었음.



그림, *Chlamydomonas* sp. KSF0031 추출 및 용매분획

라, *Chlamydomonas* sp. KSF0031 화합물 분리

- *Chlamydomonas* sp. KSF0031 용매분획에서 얻은 BuOH 분획물과 물 잔사를 합쳐 silica gel column에 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (60:1:0.1 → 0:100:0)의 용매로 용출하여 5개의 분획으로 나누었다 (W1-W5). 소분획 W2을 다시 silica gel column

과 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (60:1:0.1 → 0:100:0)의 용매로 용출하여 3개의 분획으로 나누었다 (W2.1-W2.3). 소분획 W2.2을 역시 silica gel column과 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (60:1:0.1 → 0:100:0)의 용매로 용출하고 RPC-18 column (MeOH-H<sub>2</sub>O, 90:10) 및 HPLC (C-18 column, MeOH-H<sub>2</sub>O, 91:9)로 분리하여 화합물 **1** (5.0 mg), **2** (3.8 mg), **3** (5.1 mg), **4** (6.6 mg)을 얻었음. C. KSF031의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>과 EtOAc 분획물을 합쳐 silica gel column에 hexane-EtOAc (2:1)로 용출하여 6개의 분획물을 얻었다 (MC1-MC6). MC4분획물을 RPC-18 column과 MeOH-H<sub>2</sub>O (4:1)로 용출하여 다시 3개의 소분획으로 나누었다 (MC4.1-MC4.3). MC4.2 분획을 RPC-18 column (MeOH-H<sub>2</sub>O, 4:1) 및 HPLC (C-18 column, MeOH-H<sub>2</sub>O, 90:10)로 분리하여 화합물 **5** (7.0 mg), **6** (55.0 mg)을 분리하였음. *Chloromonas* sp. KSF031의 hexane 분획물을 silica gel column과 hexane-EtOAc (40:1)로 용출하여 8개의 분획물을 얻었다 (HX1-HX8). 소분획 HX3을 silica gel column과 hexane-EtOAc (30:1)로 용출하여 3개의 분획물을 얻었다 (HX3.1-HX3.3). 다시 소분획 HX3.2을 silica gel column과 hexane-EtOAc (15:1)의 용매로 용출하고 RPC-18 column (MeOH-H<sub>2</sub>O, 90:10) 및 HPLC (C-18 column, MeOH-H<sub>2</sub>O, 9:1)로 분리하여 화합물 **8** (3.0 mg)을 분하였음.

마, *Chlamydomonas* sp. KSF0031 화합물 구조동정

■ 분리한 화합물은 <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR 및 MASS data을 분석하여 다음과 구조동정을 하였음.

- 화합물 **1** : Amorphous white powder; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz): Glycerol moiety: 4.12 (dd, *J* = 6.3, 11.5 Hz, H-1a), 4.18 (dd, *J* = 4.5, 11.5 Hz, H-1b), 4.03 (m, H-2), 3.67 (dd, *J* = 6.0, 10.0 Hz, H-3a), and 3.90 (m, H-3b). Sugar moiety: 4.87 (ovl, H-1') and 4.30 (d, *J* = 7.5 Hz, H-1''). Fatty acid moiety: 1.17-2.37 (m, CH<sub>2</sub>''), and 0.87 (t, *J* = 7.0 Hz, H-14''). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz): Glycerol moiety: 66.5 (C-1), 69.4 (C-2), and 71.9 (C-3). Sugar moiety: 100.1 (C-1'), 72.3 (C-2'), 69.2 (C-3'), 70.8 (C-4'), 69.9 (C-5'), and 67.5 (C-6'); 104.9 (C-1''), 72.3 (C-2''), 74.3 (C-3''), 71.2 (C-4''), 74.4 (C-5''), and 62.5 (C-6''). Fatty acid moiety: 176.3 (C-1'''), 34.8, 32.7, 30.4, 30.3, 30.2, 30.1, 30.0, 29.9, 25.7, 23.3 (CH<sub>2</sub>''), and 14.3 (C-14'''). - 신물질로 확인함.

- 화합물 **2** : Colorless viscous syrup; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz): 5.68 (m, H-2), 4.85 (d, *J* = 7.5 Hz, H-4), 4.89 (m, H-3a), 4.54 (m, H-3b), 4.59 (m, H-5), 4.47 (m, H-6), 4.43 (m, H-1a), 4.10 (m, H-1b), 4.17 (d, *J* = 9.5 Hz, H-8), and 4.10 (m, H-9).



$^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz): 106.2 (C-4), 77.7 (C-6), 75.8 (C-8), 72.8 (C-5), 71.5 (C-1), 70.6 (C-7), 68.6 (C-2), 63.7 (C-3), and 62.7 (C-9). - lilioside D로 구조 동정함.

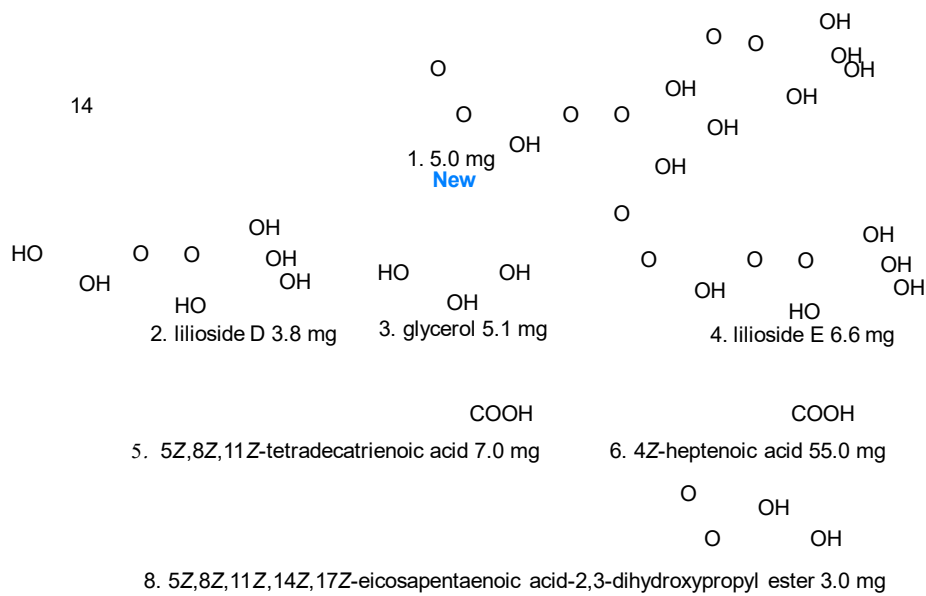
- 화합물 3 : White powder;  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz) : 3.86 (m, H-2), 3.75 (m, H-1), and 3.67 (m, H-3).  $^{13}\text{C}$ -NMR (125 MHz): 72.2 (C-2), and 62.7 (C-1, 3). - glycerol로 구조 동정함.

- 화합물 4 : Colorless viscous syrup;  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz) : 4.25 (d,  $J = 7.6$  Hz, H-4), 4.18 (m, H-3), 4.01 (m, H-2), 3.92 (m, H-1a), 3.84 (m, H-7), 3.76 (m, H-9), 3.67 (m, H-1b), 3.54 (m, H-5,6 and 8), and 2.42 (br, H-11).  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz) : 174.7 (C-10), 105.3 (C-4), 69.9 (C-6), 72.6 (C-8), 74.8 (C-5), 71.5 (C-1), 70.3 (C-7), 71.8 (C-2), 66.6 (C-3), 62.5 (C-9), and 23.7 (C-11). - lilioside E로 구조 동정함.

- 화합물 5 : Yellow oil;  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz) : 5.33 (m, CH=CH), 1.20-2.30 (m,  $\text{CH}_2$ ), and 0.95 (t,  $J = 7.6$  Hz, H-18).  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz) : 180.7 (C-1), 131.9, 130.2, 128.24, 128.2, 127.6, and 127.1 (CH=CH), 31.9, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.0, 27.2, 25.6, 25.5, 24.7, and 20.5 ( $\text{CH}_2$ ), and 14.3 (C-18). - 5Z,8Z,11Z-tetradecatrienoic acid로 구조 동정함.

- 화합물 6 : Yellow oil;  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz) : 5.28 (m, CH=CH), 4.27 (dd,  $J = 10.8, 2.8$  Hz, H-18a), 4.12 (dd,  $J = 10.8, 6.6$  Hz, H-18b), and 1.23-2.30 (m,  $\text{CH}_2$ ).  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz) : 173.4 (C-1), 129.9 and 129.6 (CH=CH), 62.0 (C-18), 34.0, 31.9, 31.8, 29.7, 29.5, 29.4, 29.1, 29.0, 28.9, 27.2, 27.1, 24.8, and 22.7 ( $\text{CH}_2$ ). - 4Z-heptenoic acid로 구조 동정함.

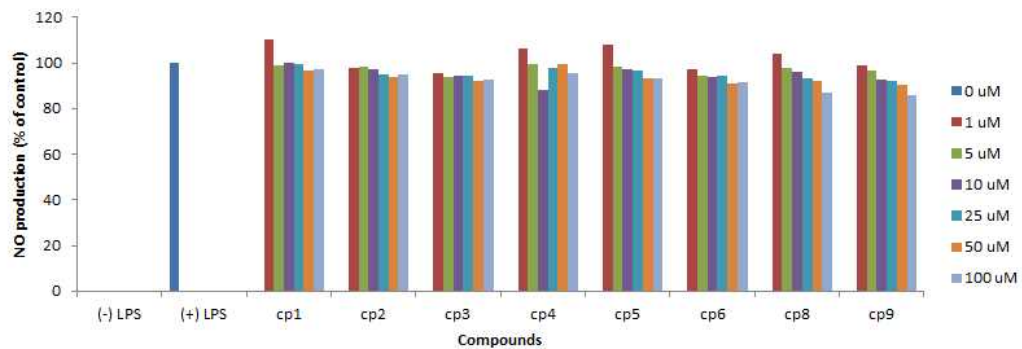
- 화합물 8 : Yellow oil;  $^1\text{H}$ -NMR (400 MHz) : 5.36 (m, CH=CH), 1.22-2.82 (m,  $\text{CH}_2$ ), 0.95 (t,  $J = 7.6$  Hz, H-17).  $^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz) : 178.0 (C-1), 132.0, 128.9, 128.7, 128.6, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.8, and 126.9 (CH=CH), 33.4, 26.5, 25.6, and 25.5 ( $\text{CH}_2$ ), and 24.7 (C-17). - 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoic acid-2,3-hydroxypropyl ester로 구조 동정함.



그림, *Chlamydomonas* sp. KSF0031 분리 화합물 구조

바, *Chlamydomonas* sp. KSF0031 화합물 항염증 활성평가

■ NO 생성억제 시험은 Griess reaction assay를 통해 RAW264.7 cell로 확인하며, 실험결과 *Chlamydomonas* sp. KSF0031 분리한 화합물은 NO 생성억제 활성이 측정되지 않아 항염증활성이 없음이 확인됨.

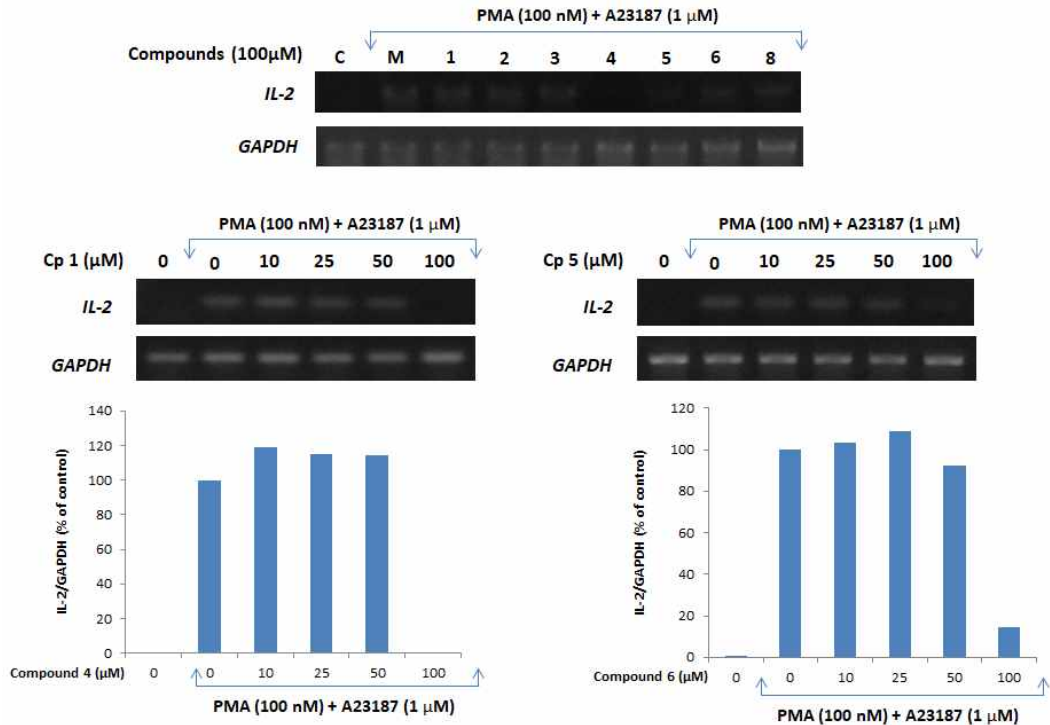


그림, RAW264.7 cell에서 NO 생성억제 활성

사, *Chlamydomonas* sp. KSF0031 화합물 항알러지 활성평가

■ Jurkat T 면역세포에 일정농도 화합물을 30 분간 처리한다. 그리고 PMA(100 nM)/A23187 (1  $\mu$ M)로 30분간 배양한다. 실험액을 24 시간 배양한 후, 상등액을 DuoSet Human IL-2 ELISA kit로 처리하여 IL-2 생성억제를 측정함. 실험결과 *Chlamydomonas* sp. KSF0031 분리한 화합물은 Jurkat T cell의 IL-2 mRNA 형성을 화합물 신물질 (1)와 5Z,8Z,11Z-tetradecatrienoic acid (5)에서 억제되어 항

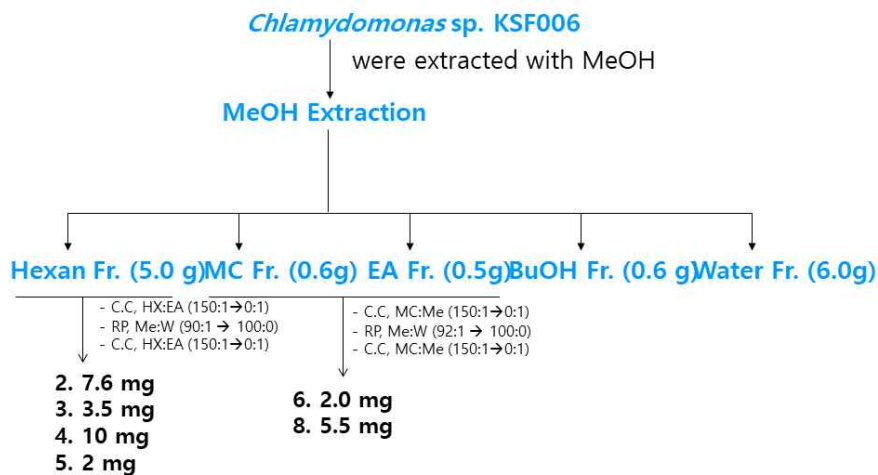
알러지활성이 있음이 확인됨.



그림, 100 μM농도에서 시료의 IL-2 생성억제 활성

3. 3년차(2019년)

가, *Chlamydomonas* sp. KSF006 화합물 분리

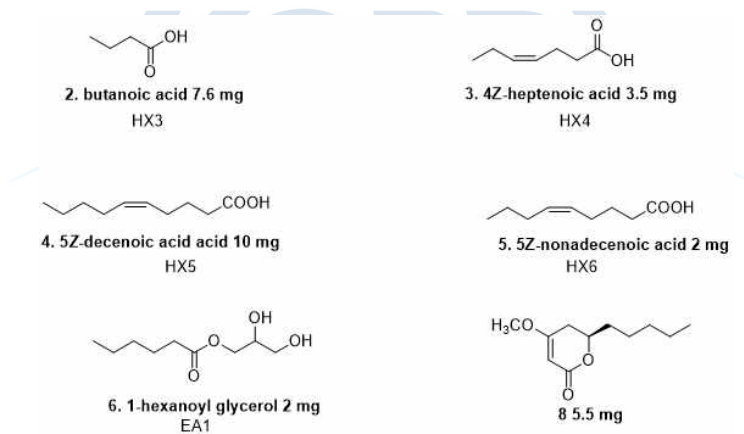


- *Chlamydomonas* sp. KSF006 110 g을 MeOH로 추출하여, MeOH 추출물을 얻었음. MeOH 추출물을 물에 현탁한 후, hexane, methylene chloride, ethyl acetate, butanol로 분획하여 각각의 hexane (5.0 g), methylene chloride (0.6 g), ethyl acetate (0.5 g), butanol (0.6 g)의 분획물을 얻음. 각각의 분획물 중 hexane 분

획물 5.0 g을 silica gel column과 hexane : ethyl acetate = 150 : 1 → 0 : 1 용매조건으로 소분획으로 나누고 RP C-18 column (MeOH : H<sub>2</sub>O, 90 : 1 → 100 : 0)으로 정제하여 화합물 **2** (7.6 mg), **3** (3.5 mg), **4** (10 mg) 및 **5** (2.0 mg)을 분리하였음. 그리고, methylene chloride 분획물을 역시 silica gel column과 hexane : ethyl acetate = 150 : 1 → 0 : 1 용매조건으로 소분획으로 나누고 RP C-18 column (MeOH : H<sub>2</sub>O, 92 : 1 → 100 : 0)으로 정제하여 화합물 **6** (2.0 mg) 및 **8** (5.5 mg)을 분리하였음.

나, *Chlamydomonas* sp. KSF006 화합물 구조동정

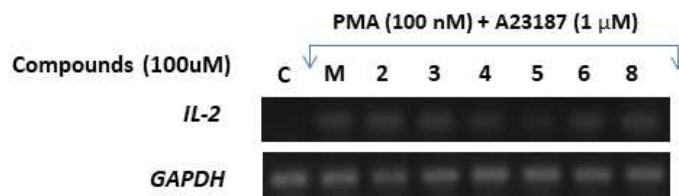
- *Chlamydomonas* sp. KSF006 미세조류에서 분리한 화합물 6종의 구조동정을 위하여 NMR 및 MASS 등의 기기분석을 이용하였고, 각각의 화합물은 butanoic acid (**2**), 4*Z*-heptanoic acid (**3**), 5*Z*-decenoic acid (**4**), 5*Z*-nonadecenoic acid (**5**), 1-hexanoyl glycerol (**6**) 및 4-methoxy-6pentyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-one (**8**)로 구조 확인하였음.



그림, *Chlamydomonas* sp. KSF006 분리 화합물 구조

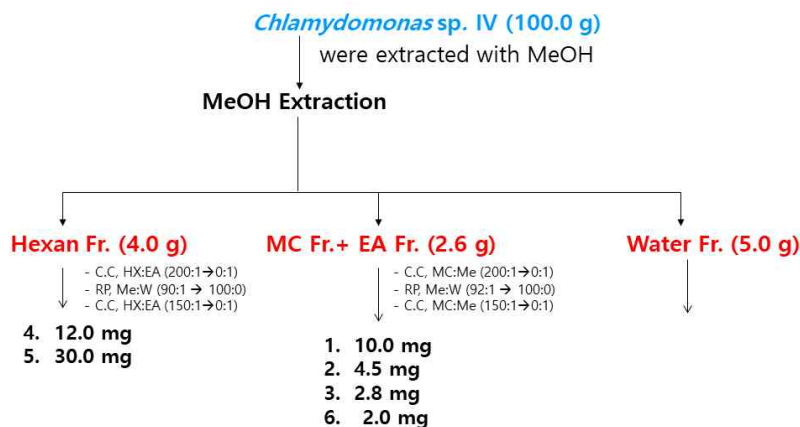
다. *Chlamydomonas* sp. KSF006 화합물 항염증 및 항알러지 평가

- *Chlamydomonas* sp. KSF006 미세조류에서 분리한 6종의 화합물에 대해 RAW264.7 cell에서 NO 생성억제 활성을 측정하였으나, 100 μM 농도에서 활성은 측정되지 않음.
- *Chlamydomonas* sp. KSF006 미세조류에서 분리한 6종의 화합물에 대해 Jurkat T을 이용해 IL-2 유리억제의 측정으로 항알러지 효과를 확인 결과 5번 화합물 5*Z*-nonadecenoic acid가 약한 활성이 확인되었음.



그림, *Chlamydomonas* sp. KSF006 분리 화합물 IL-2 억제활성

라, *Chlamydomonas* sp. KSF100 화합물 분리



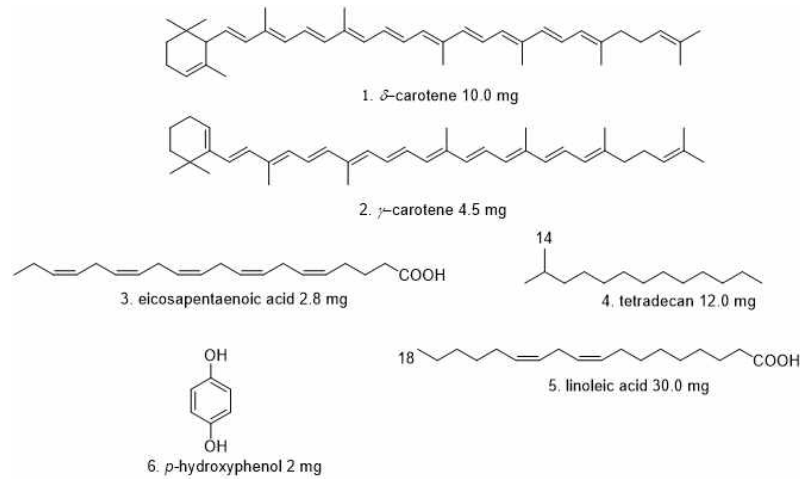
그림, *Chlamydomonas* sp. KSF100 용매분획 및 화합물 분리도

- *Chlamydomonas* sp. KSF100 100 g을 MeOH로 추출하여, MeOH 추출물을 얻었음. MeOH 추출물을 물에 현탁한 후, hexane, methylene chloride, ethyl acetate로 분획하여 각각의 hexane (4.0 g), methylene chloride (1.6 g), ethyl acetate (1.0 g)의 분획물을 얻음. 각각의 분획물 중 hexane 분획물 4.0 g을 silica gel column과 hexane : ethyl acetate = 200 : 1 → 0 : 1 용매를 이용하여 소분획으로 나누고, RP C-18 column (MeOH : H<sub>2</sub>O, 90 : 1 → 100 : 0) 및 silica gel column (hexane : ethyl acetate = 150 : 1 → 0 : 1)으로 정제하여 화합물 4 (12.0 mg) 및 5 (30.0 mg)을 분리하였음. 그리고, methylene chloride 분획물 및 ethyl acetate 분획물을 합한 후 (2.6 g), 역시 silica gel column과 hexane : ethyl acetate = 200 : 1 → 0 : 1 용매를 이용하여 소분획으로 나누고 RP C-18 column (MeOH : H<sub>2</sub>O, 92 : 1 → 100 : 0) 및 silica gel column (hexane : ethyl acetate = 150 : 1 → 0 : 1)으로 정제하여 화합물 1 (10.0 mg), 2 (4.5 mg), 3 (2.8 mg) 및 6 (5.5 mg)을 분리하였음.

마, *Chlamydomonas* sp. KSF100 화합물 구조동정

- *Chlamydomonas* sp. KSF100 미세조류에서 분리한 화합물 6종의 구조동정을 위하여 NMR 및 MASS 등의 기기분석을 이용하였고, 각각의 화합물은  $\delta$ -carotene

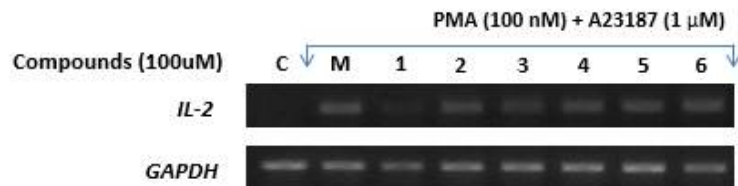
(1),  $\gamma$ -carotene (2), eicosapentaenoic acid (3), tetradecan (4), linoleic acid (5) 및 p-hydroxyphenol (6)로 구조 동정하였음.



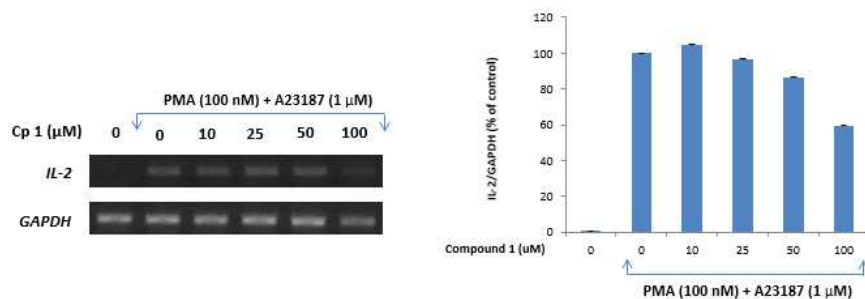
그림, *Chlamydomonas* sp. KSF100 분리 화합물 구조

바. *Chlamydomonas* sp. KSF100 화합물 항염증 및 항알러지 평가

- *Chlamydomonas* sp. KSF100 미세조류에서 분리한 6종의 화합물에 대해 RAW264.7 cell에서 NO 생성억제 활성을 측정하였으나, 100  $\mu$ M 농도에서 활성은 측정되지 않음.
- *Chlamydomonas* sp. KSF100 미세조류에서 분리한 6종의 화합물에 대해 Jurkat T cell를 이용해 IL-2 유리억제의 측정으로 항알러지 효과를 확인 결과 1번 화합물  $\delta$ -carotene가 활성이 확인되었음. 그러나, IC<sub>50</sub> 값이 100  $\mu$ M 이상으로 확인됨.



그림, *Chlamydomonas* sp. KSF100 분리 화합물 IL-2 억제활성



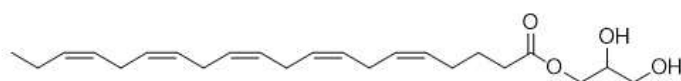
그림, *Chlamydomonas* sp. KSF100 분리 화합물  $\delta$ -carotene IL-2 억제활성

사, *Chlamydomonas* sp. KSF031 활성물질 다량분리

■ *Chloromonas* sp. KSF031 배양물을 MeOH로 추출하고 물에 현탁하여 hexane으로 용매분획하여 hexane 분획물을 얻음. hexane 분획물을 silica gel column과 hexane-EtOAc (40:1)로 용출하여 8개의 분획물을 얻었다 (HX1-HX8). 소분획 HX3을 silica gel column과 hexane-EtOAc (30:1)로 용출하여 3개의 분획물을 얻었다 (HX3.1-HX3.3). 다시 소분획 HX3.2을 silica gel column과 hexane-EtOAc (15:1)의 용매로 용출하고 RPC-18 column (MeOH-H<sub>2</sub>O, 90:10) 및 HPLC (C-18 column, MeOH-H<sub>2</sub>O, 9:1)로 분리하여 화합물 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosa-pentaenoic acid-2,3-dihydroxy-propyl ester (10.0 mg)을 분리하였음.

■ 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosa-pentaenoic acid-2,3-dihydroxy-propyl ester

Yellow oil; <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) : 5.36 (m, CH=CH), 1.22-2.82 (m, CH<sub>2</sub>), 0.95 (t, *J* = 7.6 Hz, H-17). <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz) : 178.0 (C-1), 132.0, 128.9, 128.7, 128.6, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 127.8, and 126.9 (CH=CH), 33.4, 26.5, 25.6, and 25.5 (CH<sub>2</sub>), and 24.7 (C-17).



그림, 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosa-pentaenoic acid-2,3-dihydroxy-propyl ester

■ 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosa-pentaenoic acid-2,3-dihydroxy-propyl ester은 주름개선 활성이 확인되어 대량 합성에 성공하였고, 주름개선 기능성 화장품으로 상품화 추진중에 있음.



## 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

### 제1절 1차년도(2017년)

성과목표	세부목표	달성 주요내용	달성도(%)
1. 극지 미세조류 ( <i>Chloromonas</i> sp. KSF0108)의 활성물질 분리 및 구조동정	1-1	-극지 미세조류 ( <i>Chloromonas</i> sp. KSF0108)의 추출 및 유기용매를 이용한 용매분획 - 극지 미세조류( <i>Chloromonas</i> sp. KSF0108)의 성분분리를 위한 MeOH 추출 - MeOH 추출물의 hexane, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , EtOAc, BuOH 등 다양한 종류의 유기용매를 이용한 용매분획	- 100% - 100%
	1-2	- <i>Chloromonas</i> sp. KSF0108 유기용매 분획물 활성평가 - <i>Chloromonas</i> sp. KSF0108 유기용매 분획물 활성평가 - Jurkat T cell에서 IL-2을 이용한 항알러지 활성평가	- 100% - 100%
	1-3	- 활성 화합물 분리 및 구조동정 - 활성 분획물에서 silica gel & RP C-18 고정상을 이용한 유효물질 분리 - 분리된 화합물의 NMR & MASS 등의 기기분석을 이용한 구조동정	- 100% - 100%

### 제2절 2차년도(2018년)

성과목표	세부목표	달성 주요내용	달성도(%)
1. 극지 미세조류( <i>Chloromonas</i> sp. KSF0108)의 활성물질 분리 및 구조동정	1-1	-극지미세조류 ( <i>Chloromonas</i> sp. KSF0108)의 추출 및 유기용매를 이용한 용매분획 - 극지 미세조류( <i>Chloromonas</i> sp. KSF0108)의 성분분리를 위한 MeOH 추출 - MeOH 추출물의 hexane, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , EtOAc, BuOH 등 다양한 종류의 유기용매를 이용한 용매분획	- 100% - 100%
	1-2	<i>Chloromonas</i> sp. KSF0108 유기용매 분획물의 RAW264.7 cell에서	- 100%



		유기용매 분획물 활성평가	항염증활성 - Jurkat T cell에서 IL-2을 이용한 항알러지 활성평가	- 100%
	1-3	- 활성 화합물 분리 및 구조동정	- 활성 분획물을 silica gel & RP C-18고정상 이용한 유효물질 분리 - 분리된 화합물의 NMR & MASS 등의 기기분석을 이용한 구조동정	- 100% - 100%
	2-1	- 극지미세조류 ( <i>Chloromonas</i> sp. KSF0108)에서 분리한 화합물의 항염증 및 항알러지 활성평가	- 분리된 화합물의 Jurkat T cell을 이용한 IL-2 mRNA 생성 억제활성 평가 - 분리된 화합물의 RAW 264.7 cell에서 LPS로 유도한 NO 생성 억제활성 평가로 화합물의 항염증 활성 평가	- 100% - 100%
2. 극지 미세조류에서 항알러지와 항염증 활성용매분획 및 물질 분리	2-2	활성물질 확보	- 미세조류( <i>Chlamydomonas</i> sp. KSF031)에서 활성물질 분리 및 구조동정	- 100%
	2-3	<i>Chlamydomonas</i> sp. KSF31) 화합물의 활성평가	- 분리된 화합물의 Jurkat T cell을 이용한 IL-2 mRNA 생성 억제활성 평가 - 분리된 화합물의 RAW 264.7 cell에서 LPS로 유도한 NO 생성 억제활성 평가로 화합물의 항염증 활성	- 100% - 100%

### 제3절 3차년도(2019년)

성과목표	세부목표	달성 주요내용	달성도(%)
1.	1-1	극지 미세조류 활성물질 분리 - <i>Chlamydomonas</i> sp. KSF006 미세조류에서 6종의 화합물 분리 - <i>Chlamydomonas</i> sp. KSF100 미세조류에서 6종의 화합물 분리	- 100 - 100
	1-2	분리 화합물 구조동정 - <i>Chlamydomonas</i> sp. KSF006 미세조류에서 분리한 화합물 6종의 화합물 구조동정 - <i>Chlamydomonas</i> sp. KSF100 미세조류에서 분리한 화합물 6종의 화합물 구조동정	- 100 - 100

			세조류에서 분리한 6종의 화합물 구조동정	
2.	2-1	분리 화합물 항염증 및 항알러지 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Chlamydomonas</i> sp. KSF006 화합물 6종 NO 생성억제와 IL-2 생성억제 활성측정</li> <li>- <i>Chlamydomonas</i> sp. KSF100 분리한 화합물 6종 NO 생성억제와 IL-2 생성억제 활성측정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 100</li> <li>- 100</li> </ul>
	2-2	활성물질 확보 및 기능성 화장품 개발 가능성 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Chlamydomonas</i> sp. KSF0031 미세조류에서 5Z,8Z,11Z,14Z,-17Z-eicosapentaenoic acid-2,3-dihydroxy-propyl ester 다량 분리</li> <li>- <i>Chlamydomonas</i> sp. KSF0031에서 분리한 화합물 기능성 화장품으로 가능성 확보</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 100</li> <li>- 100</li> </ul>

#### 제4절 연구기간 발표 논문 및 특허출원

1. Tran HNK., Cao TQ., Kim JA., Youn UJ., Kim S., Woo MH., Min BS., Anti-inflammatory activity of compounds from the rhizome of *Cnidium officinale*. *Archives of Pharmacal Research* **41** (2018), 977-985.
2. Tran HNK., Kim JA., Youn UJ., Kim S., Woo MH., Min BS., Investigation of chemical compounds from *Chlamydomonas* sp. KSF108 (Chlamydomonadaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **83** (2019), 4-6.
3. Tran HNK., Youn UJ., Kim JA., Chae H., Kim S., Min BS., Glycerols and fatty acids isolated from *Micractinium* sp. KSF0031. *Biochemical Systematics and Ecology* **89** (2020), 4-6.
4. Tran HNK., Youn UJ., Kim MJ., Cao TQ., Kim JA., Woo MH., Kim S., Min BS., Immunosuppressive activity of chemical constituents from strain *Chlamydomonas* sp. KSF108 (Chlamydomonadaceae). *Natural Product Sciences*, in submit (2020).
5. “마이크락티눔속(*Micractinium* sp. KSF0031)으로부터 분리한 화합물을 포함하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물”, 출원번호, 10-2020-0001752.

## RESEARCH ARTICLE

**Anti-inflammatory activity of compounds from the rhizome of *Cnidium officinale***Huynh Nguyen Khanh Tran<sup>1</sup> · Thao Quyen Cao<sup>1</sup> · Jeong Ah Kim<sup>2</sup> ·  
Ui Joung Youn<sup>3</sup> · Sanghee Kim<sup>3</sup> · Mi Hee Woo<sup>1</sup> · Byung Sun Min<sup>1</sup>Received: 19 April 2018 / Accepted: 20 June 2018 / Published online: 30 June 2018  
© The Pharmaceutical Society of Korea 2018**Abstract** Five new compounds, 9,3'-dimethoxyhierochin A (**1**), 6-oxo-*trans*-neocnidilide (**2**), (±)-(3*E*)-*trans*-6-hydroxy-7-methoxydihydroligustilide (**3**), (±)-cnidiumin (**4**), and 6-(1-oxopentyl)-salicylic acid methyl ester (**5**), together with twenty known compounds (**6–25**), were isolated**Keywords** *Cnidium officinale* · Umbelliferae · Anti-inflammatory · NO inhibition**Introduction**

984

H. N. K. Tran et al.

spectrum showed 13 carbon signals, consist of one aromatic ring, three methylenes, one terminal methyl, one methoxy, and two carbonyl groups ( $\delta_C$  205.3 and 170.8). On the basis of the above spectral analyses, indicated that **5** was a salicylic acid derivative similar to 6-acylsalicylates (Tamura et al. 1996), apart from the oxopentyl group instead of oxobutyl group in 6-acylsalicylates. In the HMBC experiment, the signals of  $\delta_H$  2.88 (H-8) and 7.13 (H-5) showed correlation  $\delta_C$  205.3 (C-7) and 142.1 (C-6), respectively, which indicated that oxopentyl group was connected to phenyl ring at C-6. Therefore, it was determined that **5** had a structure as shown in Fig. 1, and was named 6-(1-oxopentyl)-salicylic acid methyl ester.

The inhibitory effects of the 25 compounds isolated from *C. officinale* were evaluated on RAW264.7 cells by NO production. As shown in Table 3, **7** showed the strongest inhibitory potency with  $IC_{50}$  5.1  $\mu$ M, following **13** and **14** with  $IC_{50}$  values of 24.5 and 27.8  $\mu$ M, respectively, but the others were inactive. The presence of a double bond at position 9 and 10 of **6** did not seem to influence the inhibition of NO production in comparison of **7**. In addition, the presence of that aldehyde moiety at

position 3 of **14**, strongly showed inhibitor of NO production in comparison with the attached carboxylic unit in **9**. RAW264.7 cells were pretreated for 30 min with **7**, **13**, and **14** followed by stimulation with LPS (1  $\mu$ g/mL) for 18 h. Total lysates were prepared, and the expression levels of iNOS and COX-2 were determined by western blot. Compounds **7**, **13**, and **14** were shown to suppress LPS-induced iNOS and COX-2 protein expression (Fig. 4). This is a first report for the anti-inflammatory of constituents from *C. officinale*. With result of this research, it may contribute a part of screening test for treatment of diseases which related to the anti-inflammatory response from herb.

**Acknowledgements** This research was supported by a Grant to the Korea Polar Research Institute, KOPRI, under project PE18180. We are grateful to the Korea Basic Science Institute (KBSI) for mass spectrometric measurements.

**References**

- Bae KE, Choi YW, Kim ST, Ki YK (2011) Components of rhizome extract of *Cnidium officinale* Makino and their In vitro biological effects. *Molecules* 16:8833–8847





Contents lists available at ScienceDirect

## Biochemical Systematics and Ecology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biochemsysseco](http://www.elsevier.com/locate/biochemsysseco)Investigation of chemical compounds from *Chlamydomonas* sp. KSF108 (Chlamydomonadaceae)Huyh Nguyen Khanh Tran<sup>a</sup>, Jeong Ah Kim<sup>b</sup>, Ui Joung Youn<sup>c</sup>, Sanghee Kim<sup>c</sup>, Mi Hee Woo<sup>a</sup>, Byung Sun Min<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> College of Pharmacy, Drug Research and Development Center, Daegu Catholic University, Gyeongsbuk 38430, Republic of Korea<sup>b</sup> College of Pharmacy, Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea<sup>c</sup> Division of Life Sciences, Korea Polar Research Institute, Incheon 21990, Republic of Korea

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Chlamydomonadaceae  
*Chlamydomonas*  
Norisoprenoid  
Chemotaxonomy

## ABSTRACT

Nine compounds (1–9) including one norisoprenoid (1), one polyol-glycoside (2), three sterols (3–5), three phenols (6, 8, and 9), and one fatty acid (7) were isolated from *Chlamydomonas* sp. KSF108. Their chemical structures were established using NMR spectroscopic techniques and compared with published data. None of the compounds have been previously reported from the genus *Chlamydomonas* and they may therefore serve as chemotaxonomic markers for *Chlamydomonas* sp. KSF108 within the genus.

H.N. Khanh Tran et al.

Biochemical Systematics and Ecology 83 (2019) 4–6

microalgal metabolites, such as halogenated and polyphenolic compounds (Butler and Franklin, 2004) and another chemical markers to differentiate *Chlamydomonas* sp. KSF108 from other species of *Chlamydomonas*.

Fatty acids with two methylene-interrupted double bonds as 9Z,12Z-nonadecadienoic acid (7) confirming by mass spectrum analysis with EIMS at  $m/z$  294 [M]<sup>+</sup> were commonly found in a variety of microalgae (Ginneken et al., 2011). Most species from the classes Cyanophyceae, Prymnesiophyceae, Bacillariophyceae, Rhodophyceae, Cryptophyceae, Chlorophyceae, Xantophyceae, and Eustigmatophyceae have been described in terms of their fatty acid profiles (Cardozo et al., 2007; Patil et al., 2007; Otles et al., 2001), and fatty acid was described as major compound in the genus *Chlamydomonas* during its first isolation. Therefore, the isolation of 7 from *Chlamydomonas* sp. KSF108 could be of chemotaxonomic significance and serve as valuable chemotaxonomic markers for *Chlamydomonas* sp. KSF108.

In conclusion, the structural skeleton of 1–9 were firstly isolated from species of *Chlamydomonas*. Especially, polyol-glycoside (2), sterols (3–5), phenols (6, 8 and 9) and fatty acid (7) exist widely in microalgae and could potentially be used to describe the chemotaxonomic relationships between *Chlamydomonas* species and other lineages. Ours is the first report to describe the chemical composition of a *Chlamydomonas* species, which may serve as chemotaxonomic markers for the identification of genus. However, further studies into the chemical makeup of other *Chlamydomonas* species are required.

## Acknowledgement

This research was supported by a grant to the Korea Polar Research Institute, KOPRI, under project PE18180. We are grateful to the Korea Basic Science Institute (KBSI) for mass spectrometric measurements.

10-104.

- Hallmann, A., 2007. Algal Transgenics and Biotechnology. Transgenic Plant Journal © Global Science Books, pp. 81–98.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. MRBAYES: bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics Oxford University Press*, pp. 754–755.
- Isoe, S., Hyeon, S.B., Sakan, T., 1969. Photo-oxygenation of carotenoids. The formation of hydrocarinindiolide and  $\alpha$ -ionone from  $\alpha$ -catotene. *Tetrahedron Lett.* 4, 279–281. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)87530-4](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)87530-4).
- Kanasawud, P., Crouzet, J.C., 1990. Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium  $\alpha$ -carotene degradation. *J. Agric. Food Chem.* 38, 1237–1244. <https://doi.org/10.1021/jf00091a052>.
- Kaneda, M., Kobayashi, K., Nishida, K., Katsuta, S., 1984. Lilioidside D and E, two glycerol glucoside from *Ililium japonicum*. *Phytochemistry* 23, 795–798. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)85029-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85029-3).
- Landy, D., Fourmentin, S., Elhouhaji, F., Surpateanu, G., 1999. <sup>1</sup>H NMR, circular dichroism and UV-VIS spectroscopic study of inclusion complexes formation between  $\alpha$ -*m*-, *p*-hydroxyphenol and  $\beta$ -cyclodextrin. In: *Proceedings of the Ninth International Symposium on Cyclodextrins*, pp. 663–667. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-4681-4>.
- Leblond, J.D., Chapman, P.J., 2002. A survey of the sterol composition of the marine dinoflagellates *Karenia brevis*, *Karenia mikimotoi*, and *Karlodinium micrum*: distribution of sterols within other members of the class Dinophyceae. *J. Phycol.* 38, 670–682. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.01181.x>.
- Leu, S., Boussiba, S., 2014. Advances in the production of high-value products by microalgae. *Ind. Biotechnol.* 10, 169–183. <https://doi.org/10.1089/ind.2013.0039>.
- Manuela, M., Pinto, M., 2009. Carotenoid breakdown products the norisoprenoids in wine aroma. *Arch. Biochem. Biophys.* 483, 236–245. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.01.008>.
- Milledge, J.J., 2011. Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 10, 31–41. <https://doi.org/10.1007/s11157-010-9214-7>.
- Nes, W.D., 2000. Sterol methyl transferase: enzymology and inhibition. *BBA-Mol. Cell Biol. L.* 1529, 63–88. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00138-4](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00138-4).
- Onofrejoval, L., Vasicikova, J., Klejdus, B., Stratil, P., Misurcova, L., Kracmas, S., Kopecky, J., Vacek, J., 2010. Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 51, 464–470. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.03.027>.
- Otles, S., Pire, R., 2001. Fatty acid composition of *Chlorella* and *Spirulina* microalgae species. *J. AOAC Int.* 84, 1708–1714. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1602>.
- Patil, V., Kallqvist, T., Olsen, E., Vogt, G., Giesler, H.R., 2007. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquacult. Int.* 15, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10499-006-9060-3>.

Glycerols and fatty acids isolated from *Micractinium* sp. KSF0031Huynh Nguyen Khanh Tran<sup>a</sup>, Ui Joung Youn<sup>b</sup>, Jeong Ah Kim<sup>c</sup>, Hyunsik Chae<sup>b</sup>, Sanghee Kim<sup>b,\*</sup>,  
Byung Sun Min<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> College of Pharmacy, Daegu Catholic University, Gyeongsbuk, 38430, Republic of Korea<sup>b</sup> Division of Life Sciences, Korea Polar Research Institute, Incheon, 21990, Republic of Korea<sup>c</sup> College of Pharmacy, Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Kyungpook National University, Daegu, 41566, Republic of Korea

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Chlorellaceae  
*Micractinium* sp. KSF0031  
Glycerol

## ABSTRACT

From the collected extract from King Sejong Antarctic Station, strain *Micractinium* sp. KSF0031, led to the isolation of one new monoacyldigalactosyl glycerol (1) and seven known compounds (2–8). Their chemical structures were established using extensive spectroscopic techniques, including 1D, 2D-NMR, and MS, and compared with the published data. To the best of our knowledge, this is the first report to investigate the secondary metabolites from genus *Micractinium*. The monoacyldigalactosyl glycerol in *Micractinium* could serve as its chemotaxonomic markers.

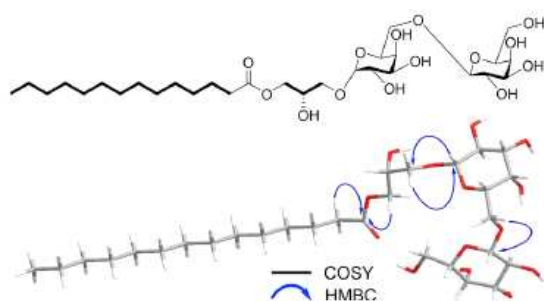


Fig. 2. Key COSY and HMBC correlations for new compound (1).

3.4. *Micractinin A* (1)

Amorphous white powder;  $[\alpha]_D^{24} +19.9$  ( $c = 0.1$ , MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log $\epsilon$ ) nm: 203.0 (0.59); IR  $\nu_{max}$   $cm^{-1}$ : 3329, 1743, 1448, and 1024;  $^1H$  and  $^{13}C$ -NMR (500 and 125 MHz, methanol- $d_4$ ) data, see Table 1; HR-FABMS  $m/z$ : 649.3414  $[M+Na]^+$  (Calcd for  $C_{29}H_{54}O_{14}Na$ : 649.3411).

## 3.5. Digalatosyl glycerol (1b)

Amorphous white powder;  $[\alpha]_D^{20} +83.3$  ( $c = 0.1$ ,  $H_2O$ );  $^1H$ -NMR (400 MHz, methanol- $d_4$ )  $\delta_H$  (ppm): 5.04 (d,  $J = 3.6$ , H-1'), 4.18 (d,  $J = 7.2$ , H-1''), and 3.29–4.00 (m, H-1-3, 2'-6', and 2''-6').

phyceae, Cryptophyceae, Chlorophyceae, Xantophyceae, and Eustigmatophyceae (Tran et al., 2019). In this study, fatty acids were described as major compounds in the strain *M. sp.* KSF0031. In conclusion, this report increases our knowledge about the secondary metabolites of a species of *Micractinium*. It builds the fact that the glycerols 2–4 and 8 could be markers for the genus, whereas the fatty acids 5–7 are common to a range of different microalgae and cannot be used as markers for the genus. However, phytochemistry investigation of the other strains and species of *Micractinium* are required.

## CRediT authorship contribution statement

Huynh Nguyen Khanh Tran: Writing - original draft. Ui Joung Youn: Writing - original draft. Jeong Ah Kim: Writing - original draft. Hyunsik Chae: Writing - original draft, Writing - review & editing. Sanghee Kim: Writing - original draft, Writing - review & editing. Byung Sun Min: Writing - original draft, Writing - review & editing.

## Declaration of competing interest

The authors have declared that there is no conflict of interest.

## Acknowledgement

This research was supported by a grant to the Korea Polar Research Institute, KOPRI (PE18180). We are grateful to the Korea Basic Science Institute (KBSI) for mass spectrometric measurements.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bse.2019.104000>.

↵

**Immunosuppressive activity of chemical constituents from strain  
*Chlamydomonas* sp. KSF108 (Chlamydomonadaceae)**

↵

↵

**Huynh Nguyen Khanh Tran<sup>1</sup>, Ui Joung Youn<sup>2</sup>, Minji Kim<sup>1</sup>, Thao Quyen Cao<sup>1</sup>,**

**Jeong Ah Kim<sup>3</sup>, Mi Hee Woo<sup>1</sup>, Sanghee Kim<sup>2,\*</sup>, Byung Sun Min<sup>1,\*</sup>**

↵

<sup>1</sup> College of Pharmacy, Drug Research and Development Center, Daegu Catholic University, Gyeongbuk 38430, Republic of Korea

<sup>2</sup> Division of Life Sciences, Korea Polar Research Institute, Incheon 21990, Republic of Korea

<sup>3</sup> College of Pharmacy, Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Kyungpook National University, Daegu 41566, Republic of Korea

↵

↵

\* Corresponding author. Tel.: +82 53 850 3613; Fax: +82 53 850 3602

Email address: [sanhheekim@kopri.re.kr](mailto:sanhheekim@kopri.re.kr); [bsmin@cu.ac.kr](mailto:bsmin@cu.ac.kr) (B.S. Min)



자료 5.

## 관인생략

# 출원번호통지서

출원일자 2020.01.07  
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)  
출원번호 10-2020-0001752 (접수번호 1-1-2020-0013672-38)  
출원인명칭 대구가톨릭대학교산학협력단(2-2007-004237-3) 외 1명  
대리인성명 특허법인 공간(9-2014-100141-0)  
발명자성명 민병선 김은재 윤의중 김상희  
발명의명칭 마이크락티눔속(Micractinium sp. KSF0031)으로부터 분리한 화합물을 포함하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물

## 특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.  
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 특허고객번호 정보변경(경

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획서

- *Chlamydomonas* sp. KSF031 미세조류에서 분리한 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosa-pentaenoic acid-2,3-dihydroxy-propyl ester의 기능성 화장품 개발을 위한 선도물질 개발
- 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosa-pentaenoic acid-2,3-dihydroxy-propyl ester은 주름개선 활성이 확인되어 대량 합성에 성공하였고, 주름개선 기능성 화장품으로 상품화 추진.
- 본 연구로 도출된 극지 미세조류 항알러지 및 항염증 활성 화합물 기능성 신소재 특허출원 및 기술이전 추진
- 개발 소재의 연구방법 및 결과 논문투고 등의 학문적 발전
- 극지 미세조류를 이용한 활성물질 탐색을 위한 기초연구 및 사용화기술 개발 경험을 축적한 석/박사급 전문연구인력 양성
- 학계, 연구소 및 산업체 관련 연구자들 간의 산-학-연 네트워크 구축
- 극지 미세조류에 대한 관련기술은 천연물화학, 생약학 등의 학문적 발전에 기여





## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

- 미국 MARY KAY는 화장품 및 자외선 차단제 등의 제품이 있으며 해조류를 이용한 항노화 관련 기술에 대한 특허를 출원
- 독일 Heinrich U.는 해조류를 이용한 자외선 차단 기능 등 다양한 피부 관련 기능을 확인
- 루마니아 Sirbu R.는 해양 생태계에 대한 연구 및 해양에서 획득 가능한 고부가가치 원료에 대한 연구를 수행하고 있음
- 프랑스 남성 화장품 Polaar는 북극 blue micro-algae를 유효성분으로 사용하는 고보습 크림 제품을 출시, 바이오템에서는 *Aphanizomenon flos-aquae*와 *Laminaria ochroleuca*를 유효성분으로 포함하는 피부노화 개선용 프리미엄 라인인 블루테라피 라인을 2015년 출시
- 일본 시세이도는 다양한 화장품 원료 관련 특허를 출원하고 있으며 미세조류 및 해조류의 출원도 다양하게 이루어지고 있음. 항노화, 미백 등에 대한 특허를 출원하였고 한국, 미국, 유럽 및 중국에 특허를 출원
- 영국 THE BOOTS COMPANY PLC는 *Haematococcus* sp.를 이용한 전반적인 피부개선에 대한 조성물 특허를 출원

극지연구소

## 제 7 장 참고문헌

- Binneken, V.J.T.V., Helsper, J.P.F.G., Visser, W.D., Keulen, H.V., Brandenburg, W.A., 2011. Polyunsaturated fatty acids in various macroalgal species from north atlantic and tropical seas. *Lipids Health Dis.* 10, 2-8. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-104>.
- Suh, S., Yang, E.J., Lee, S.G., Youn, U.J., Han, S.H., Kim, I., Kim, S., 2017. Bioactivities of ethanol extract from the antarctic freshwater microalga, *Chloromonas* sp. In. *J. Med. Sci.* 14, 560-569. <https://doi.org/10.7150/ijms.18702>.
- Borowitzka, M.A., 2013. High-value products from microalgae and their development and commercialisation. *J. Appl. Phycol.* 25, 743-756. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-9983-9>.
- Leu, S., Boussiba, S., 2014. Advances in the production of high-value products by microalgae. *Ind. Biotechnol.* 10, 169-183. <https://doi.org/10.1089/ind.2013.0039>.
- Cardozo, K.H.M., Guaratini, T., Barros, M.P., Falcao, V.R., Tonon, A.P., Lopes, N.P., Campos, S., Torres, M.A., Souza, A.O., Colepicolo, P., Pinto, E., 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comp. Biochem. Physiol.* 146, 60-78. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.05.007>.
- Hallmann, A., 2007. Algal transgenics and biotechnology. *Transgenic Plant Journal* © Global Science Books, pp.81-98.
- Milledge, J.J., 2011. Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 10, 31-41. <https://doi.org/10.1007/s11157-010-9214-7>.
- Pulz, O., Gross, W., 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 635-648. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>.
- Tran H.N.K., Kim J.A., Youn U.J., Lim S., Woo M.H., Min B.S., 2019. Investigation of chemical compounds from *Chlamydomonas* sp. KSF108 (Chlamydomonadaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 83,4-6. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2018.12.009>.
- Tran H.N.K., Cao T.Q., Kim J.A., Youn U.J., Kim S., Woo M.H., Min B.S., 2018. Anti-inflammatory activity of compounds from the rhizome of *Cnidium officinale*. *Arch. Pharm. Res.* 41, 977 - 985. <https://doi.org/10.1007/s12272-018-1048-9>.
- Tran H.N.K., Youn U.J., Kim J.A., Chae H., Kim S., Min B.S., Glycerols and fatty acids isolated from *Micractinium* sp. KSF0031. 2020. *Biochemical Systematics and Ecology* 89, 104000. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2019.104000>.

## 뒷 면

### 주 의

1. 이 보고서는 극지연구소 위탁과제 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 위탁연구과제로 수행한 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.