

미세조류 *Chlorella vulgaris* YH703의 기름질함량에 미치는 고농도염스트레스의 영향

리윤철, 황금옥, 윤철진

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《현시기 과학기술을 발전시키는데서 나서는 중요한 문제는 무엇보다도 원료와 연료, 동력문제를 해결하기 위한 과학기술적문제를 푸는것입니다.》(《김정일선집》 증보판 제11권 134페이지)

세계의 많은 나라들에서 화석연료의 고갈과 그 리용으로 인한 심각한 기후변화를 방지하기 위하여 여러가지 형태의 생물연료를 개발리용하고있다.[4] 미세조류는 매우 빠른 성장과 높은 기름질함량, 소금물과 여러가지 오수에서 자랄수 있는 능력, 높은 빛합성효율로 하여 가장 전망성있는 생물연료원천으로 주목되고있다.[4] 질소결핍, 빛세기증가, 혼합영양 배양과 같은 배양조건들은 여러가지 미세조류종들에서 기름질함량을 현저하게 높인다.[7, 9] 는데 영양이 충분한 조건에서 자란 미세조류 *Chlorella vulgaris*의 기름질함량은 14% 정도이지만 영양결핍조건에서는 70%까지 증가한다.[7]

영양결핍과 류사하게 염스트레스도 *Clamidomonas* sp., *Desmodesmus abundans*, *Nannochloropsis* sp. 등과 같은 여러가지 미세조류에서 기름축적을 유도한다.[7, 10]

우리는 민물미세조류 *Chlorella vulgaris* YH703의 기름질함량에 미치는 고농도염스트레스의 영향을 평가하였다.

재료와 방법

연구재료로는 황해북도지방에서 분리한 토착민물미세조류 *Chlorella vulgaris* YH703을 리용하였다.

BG-11배지에서 15일동안 자래운 세포를 200, 300, 400, 500, 600mmol/L의 염용액속에 각각 1, 2, 3일동안 잠그어 고농도염스트레스를 받게 한 다음 세포내 기름질함량변화를 측정하였다.

기름질함량은 클로로포름:메타놀(95%이상)=1:2의 혼합용액으로 추출하고 선행방법[6]에 따라 결정하였다. 염스트레스조건에서의 기름질조성변화를 조사하기 위하여 탑크로마토그래프를 리용하여 총기름질을 중성기름질, 당기름질, 린기름질로 분획화하였다. 분획화는 총기름질을 클로로포름/초산(9:1), 아세톤/메타놀(9:1), 메타놀용액으로 각각 추출하는 방법으로 진행하였다.

미세조류의 질소함량은 CHNS분석기(《Perkin-ElmerModel 2400》)를 리용하여 결정하였으며 단백질함량은 질소함량에 6.25를 곱하는 방법[2]으로 얻었다.

당질함량은 페놀류산법[8]으로 결정하였다.

과산화수소(H_2O_2)의 함량을 결정하기 위하여 배양물 500mL를 10 000r/min에서 10min간

원심분리하고 양금을 0.1% TCA용액에 풀었다. 혼합액을 10 000r/min에서 10min간 원심분리하고 상청액 0.5mL를 10mmol/L 린산완충액(pH 7.0) 0.5mL, 1mol/L KI용액 1mL와 혼합한 다음 390nm에서 흡광도를 측정하였다.

아스코르빈산페록시다제(APX, EC1.11.1.11)의 활성은 290nm에서의 흡광도변화로 결정하였는데 $2.8(\text{mmol/L})^{-1}\text{cm}^{-1}$ 의 몰흡광계수를 리용하여 계산하였다. 아스코르빈산페록시다제(APX)의 단위는 1min당 $1\mu\text{mol}$ 의 아스코르빈산을 분해하는 효소량으로 표시된다.

유리프롤린은 3% 술폰살리칠산을 리용하여 추출하였으며 선행방법[1]에 따라 L-프롤린으로 표준곡선을 만들어 결정하였다.

시험구들사이의 통계적차이는 통계처리프로그램(Infostat Software Package(2012))을 리용하여 분산분석을 진행하고 평가하였다.

결과 및 논의

먼저 200mmol/L이상의 고농도염에 의한 스트레스를 각이한 시간동안 주면서 *Chlorella vulgaris* YH703의 세포내 기름질함량변화를 조사하였다.(그림 1)

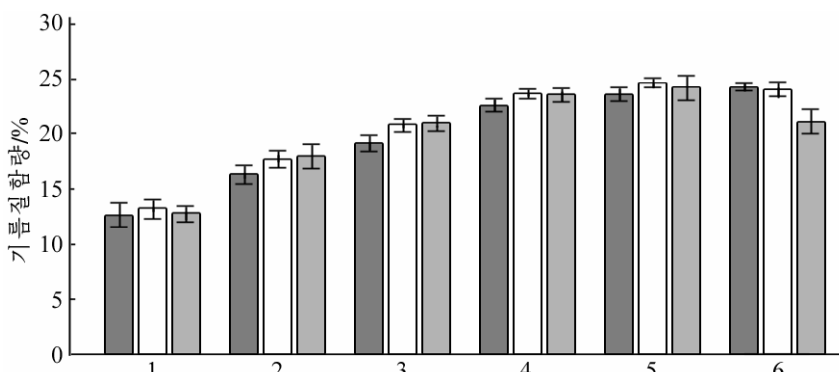


그림 1. *Chlorella vulgaris* YH703에서 NaCl농도와 처리일수에 따른 기름질함량변화

1-6은 NaCl농도가 각각 0, 200, 300, 400, 500, 600mmol/L일 때;

■ 1일처리, □ 2일처리, ▨ 3일처리

불리한 환경조건에서 세포내 기름질함량과 조성이 변화되는것은 미세조류의 생존능력을 평가하는 지표로 된다.[9]

NaCl처리농도와 처리일수에 따라 *Chlorella vulgaris* YH703의 세포내 기름질함량이 크게 변하였는데 그림 1에서 보는바와 같이 모든 시험구들에서 염스트레스를 1일간 주었을 때 보다 2~3일간 주었을 때 전반적으로 기름질함량이 높아졌지만 600mmol/L NaCl을 3일간 처리했을 때에는 기름질함량이 낮아졌다. 500mmol/L NaCl로 2일간 처리하였을 때 세포내 기름질함량이 24.5%로서 가장 높았다. NaCl처리시간을 2~3일로 하였을 때 세포내 기름질함량에서는 유의한 차이가 없었으므로 기름질유도를 위한 처리일수를 2일로 하였다.

일반적으로 스트레스를 받는 미세조류에서는 세포내 기름질함량뿐만아니라 당질, 단백질함량도 변하는데 미세조류 *Chlorella vulgaris* YH703을 각이한 NaCl농도에서 2일간 처리했을 때 기름질, 당질, 단백질조성의 변화는 그림 2와 같다.

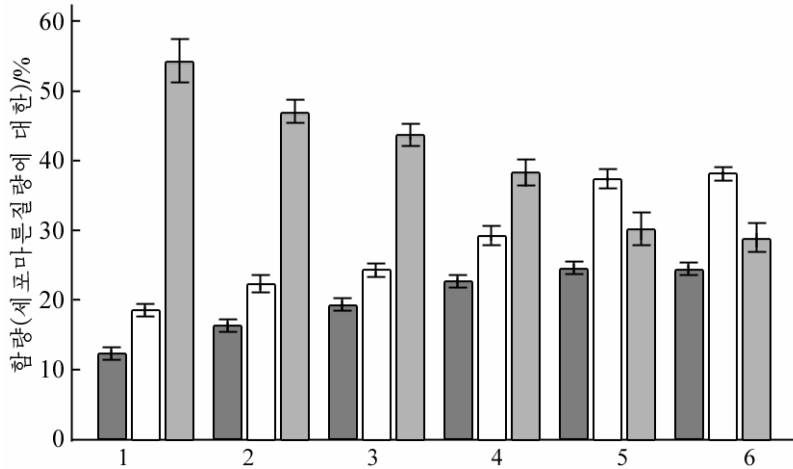


그림 2. *Chlorella vulgaris* YH703을 각이한 NaCl농도에서 2일간 처리했을 때 기름질, 당질, 단백질조성의 변화

1-6은 NaCl농도가 각각 0, 200, 300, 400, 500, 600mmol/L일 때;

■ 기름질, □ 당질, ▨ 단백질

NaCl농도가 높아질수록 기름질과 당질함량은 증가하였으나 단백질함량은 감소하였는데 NaCl 500mmol/L 처리구에서 기름질함량이 24.5%(대조 12.7%), 600mmol/L 처리구에서 당질함량이 37.4%(대조 18.3%)정도로써 제일 높았으며 NaCl 600mmol/L 처리구에서 단백질함량은 28.7%(대조 53.6%)로서 제일 낮았다. 기름과 함께 당질도 생물디젤유나 생물에타놀생산에 리용될수 있으므로 당질함량이 높아지는것은 생물연료생산의 견지에서 유리하다.

각이한 염스트레스조건에서 기름질조성변화를 조사한데 의하면 염농도가 높아질수록 중성기름질함량이 증가하였는데 NaCl 400mmol/L이상 처리구들에서 대조에 비하여 약 1.2배 높아졌다.(그림 3) 염스트레스기간에 중성기름질함량이 증가하는것은 세포막을 견고하게 하여 광물질이온조절능력을 유지하는데 관계된다고 본다.

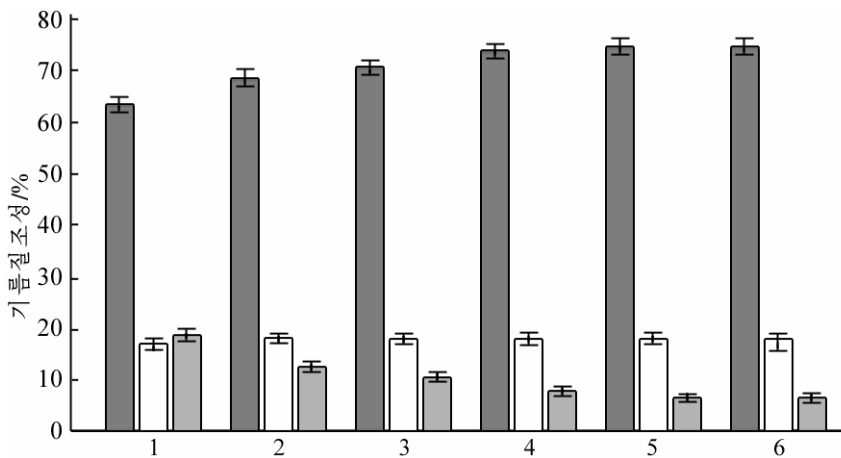


그림 3. *Chlorella vulgaris* YH703의 기름질조성변화에 미치는 NaCl농도의 영향

1-6은 NaCl농도가 각각 0, 200, 300, 400, 500, 600mmol/L일 때;

■ 중성기름질, □ 린기름질, ▨ 당기름질

고농도염스트레스기간에 린기름질함량은 17%로부터 18%로 약간 높아졌고 당기름질함량은 염농도가 증가함에 따라 감소하였다. 미세조류 *Monoraphidium*에서는 높은 염농도에서 막의 류동성과 투과성을 감소시켜 삼투평형을 유지하기 위하여 더 많은 린기름질을 합성한다.[10]

염스트레스와 같은 불리한 환경조건에서 미세조류는 여러가지 활성산소(ROS)를 생성하는데 이것들은 단백질이나 기름질, 핵산과 같은 생체분자들을 손상시켜 세포성장을 억제한다. 활성산소에 의한 세포손상을 막기 위하여 식물과 조류는 항산화효소인 APX, 카탈라제와 프롤린과 같은 비효소분자들을 생성하는 자체방어체계를 가지고있다.[3]

이로부터 우리는 염스트레스조건에서 H_2O_2 과 APX, 유리프롤린과 같은 스트레스견딜성지표들의 변화를 관찰하였다.(표)

표. H_2O_2 , APX, 유리프롤린함량에 미치는 NaCl농도의 영향

NaCl농도 /(mmol·L ⁻¹)	H_2O_2 함량 /(μ mol·g ⁻¹)	APX상대활성 /%	유리프롤린함량 /(μ mol·g ⁻¹)
0	3.47±0.41 ^f	100±0.35 ^g	33.31±2.66 ^g
100	15.11±1.78 ^e	129.68±0.21 ^f	72.47±1.93 ^f
200	20.28±0.83 ^d	167.55±0.38 ^d	115.86±3.72 ^e
300	25.67±1.69 ^c	210.48±0.45 ^b	124.31±2.95 ^d
400	33.19±2.85 ^b	249.76±0.52 ^a	138.59±3.46 ^c
500	38.56±1.48 ^a	174.69±0.29 ^c	147.24±1.57 ^b
600	41.43±4.24 ^a	135.23±0.25 ^e	156.53±1.18 ^a

* 각이한 영문자는 $p<0.05$ 에서 시험구들사이의 유의한 차이를 나타낸다.

NaCl농도가 증가할수록 H_2O_2 이 더 많이 축적되고 APX상대활성은 증가하였는데 H_2O_2 은 600mmol/L에서 41.43 μ mol/g, APX상대활성은 400mmol/L에서 249.76%로서 가장 높았다. NaCl농도가 높아짐에 따라 *Chlorella vulgaris* YH703에서 유리프롤린함량도 증가하였다. 이것은 민물미세조류 *Chlorella vulgaris* YH703이 높은 염농도에서 유도되는 염스트레스에 대한 저항성이 있다는것을 보여준다. 염스트레스에 의해 유도되는 산화스트레스에 대한 저항성을 가진 미세조류가 비저항성미세조류보다 생물연료생산에 더 효율적이라는 선행자료[5]를 놓고 볼 때 미세조류 *Chlorella vulgaris* YH703이 좋은 생물연료생산종이라는것을 알수 있다.

맺 는 말

1) 민물미세조류 *Chlorella vulgaris* YH703은 고농도염스트레스견딜성이 높은 종으로서 생물연료생산에 유리하다.

2) 500mmol/L의 염스트레스조건에서 2일간 처리하면 세포내 기름질함량은 24.5%로서 대조에 비하여 2배정도 높아진다.

참 고 문 헌

- [1] L. S. Bates et al.; Plant Soil, **39**, 205, 1973.
- [2] E. W. Becker; Microalgae: Biotechnology and Microbiology, Cambridge University Press, 56~122, 1994.
- [3] K. Chokshi et al.; Bioresour. Technol., **180**, 161, 2015.
- [4] Guanyi Chen et al.; Applied Energy, **137**, 282, 2015.
- [5] O. Osundeko et al.; Biomass Bioenergy, **56**, 284, 2013.
- [6] I. Pancha et al.; Bioresour. Technol., **156**, 146, 2014.
- [7] I. Pancha et al.; Bioresour. Technol., **189**, 341, 2015.
- [8] V. Velikova et al.; Plant Sci., **151**, 59, 2000.
- [9] P. J. B. Williams et al.; Energy Environ. Sci., **3**, 554, 2010.
- [10] H. Yang et al.; Bioresour. Technol., **172**, 131, 2014.

주체107(2018)년 10월 5일 원고접수

Effect of High Salinity Stress on the Lipid Contents of Microalgae *Chlorella vulgaris* YH703

Ri Yun Chol, Hwang Kum Ok and Yun Chol Jin

During the cultivation of freshwater microalgae *Chlorella vulgaris* YH703, the 2-day-stressing with 500mmol/L NaCl enhanced the lipid contents of the cell by 2 times than the control.

Key words: microalgae, biofuel, lipid, high salinity stress, *Chlorella vulgaris*