

*Chlorella pyrenoidosa*의 성장 특성 및 동일 균주로부터 Acetaldehyde Dehydrogenase의 활성 검출

이준우

부산가톨릭대학교 응용과학대학 환경공학과

광합성 담수 녹조류인 *Chlorella pyrenoidosa*의 최적 성장 조건을 알기 위해 배양 온도, 시간, 영양물질의 영향 및 조도 등을 조사하였다. Growth chamber를 사용하여 알아본 가장 적절한 조건은 온도 28°C에서 4일간 배양했을 때이며 배지에 첨가된 타 영양물질의 농도가 높을수록 활발한 광합성을 하면서 성장하였고 조도(Lux)가 크면 클수록 잘 자랐다. 또한 동일 균주로부터 acetaldehyde를 분해하는 효소의 활성을 살펴보았는데 이 효소는 β -NAD⁺를 조효소로 하는 탈수소효소였으며, ODS-Hypersil column과 50%(v/v) acetonitrile을 이동상으로 한 HPLC로 분석한 결과 pH 9.0, 온도 40°C 부근에서 최대 효소 활성을 보여주었다.

Key words □ acetaldehyde dehydrogenase, *C. pyrenoidosa*, chlorophyll, HPLC, β -NAD⁺

*Chlorella*는 직경 2~10 μ m의 구형 내지 타원형의 단세포인 담수 녹조류로 무성생식을 하며 편모가 없어 운동성이 없고 반쯤 채워진 컵 모양의 엽록소 a, b를 가짐으로써 광합성을 하는 식물이다(20). 종으로는 *Chlorella vulgaris*, *C. pyrenoidosa*, *C. ellipsoidea* 등이 널리 알려져 있다. *Chlorella*는 하루만에 4~16배로 아주 빠른 증식을 하고, 세포 내에 식물성 단백질 45%, 지방 20%, 탄수화물 20%, 섬유질 5% 및 다양한 mineral 및 필수 아미노산 10%를 가지고 있으며 또한 핵산 관련물질인 클로렐라 성장촉진인자(CGF)를 함유하고 있는 완전 영양식품으로 인식되어 왔다. 그러나 무엇보다도 cellulose 성분의 세포벽 때문에 소화 잘 안 되는 단점을 지니므로써 우리나라에서는 통상적으로 열수 추출물을 얻어 이를 상품화해왔는데(5) 최근 단백질 분해 효소에 의한 *chlorella*의 가수분해(3, 18)에 대한 연구도 진행되고 있다.

그 외에도 *chlorella*는 당뇨(2, 8), 항암 작용(1, 21), 면역증가(13), 치매(17), 항 세균감염(9), 혈관 지질대사(7), dioxin 제거(16, 22), 중금속 제거(11, 19), 항 피로(6), 피부 세포증식(12) 등에 탁월한 효과가 나타남으로써 영양식품 외에 건강식품으로 꾸준한 연구 대상이 되어왔다.

그간 우리나라에 들여와 상업적으로 많이 이용된 *chlorella* 종은 *Chlorella vulgaris*로 대부분 육내 배양을 통해 상품화 되어왔다. 그러나 아열대 기후에서만 잘 자라던 *chlorella*가 지구온난화의 여파로 우리나라가 아열대 기후로 점차 변화함에 따라 우리나라 남해안 지역에서도 육외 배양, 특히 자연광을 이용한 배양이 가능하게 되었는데 그 중 하나가 (주)클만사에서 배양하는 *Chlorella pyrenoidosa*이다.

*Chlorella pyrenoidosa*는 엽록체 속에 pyrenoid (*pyren* = fruit, stone ; *noid* = like)라는 조밀한 단백질성 물질을 함유함으로써 이름이 붙여지게 되었다. Pyrenoid는 아직 그 기능이 완전히 밝혀지지 않았으나 일종의 세포 저장물질을 만드는 곳으로 추정된다(20).

본 연구에는 많은 사람들이 경험적으로 *Chlorella pyrenoidosa*의 열수 추출물을 복용한 결과 알코올 해독에 상당한 효과가 있다는 점에 근거하여 (주)클만사에서 자연 육외 배양(Fig. 1)한 *Chlorella pyrenoidosa*로부터 숙취해소를 위한 기능성 음료의 개발에 주안점을 두고 우선 인체의 간에서 알코올대사 과정 중 숙취의 원인물질인 acetaldehyde를 분해하는 효소를 연구하게 되었다.

재료 및 방법

균주 및 배양 조건

실험에 사용된 균주는 (주)클만사로부터 제공받은 *Chlorella pyrenoidosa* 종균을 사용하였다. 배지의 조성은 증류수 1L 당 urea 1.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, glucose 0.25 g, NH₄HCO₃ 0.25 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, KH₂PO₄ 0.25 g, EDTA·2Na 1 mg이며 이 중 FeSO₄·7H₂O와 KH₂PO₄는 각각 따로 pore size 0.45 μ m filter paper로 여과하여 균 접종 때마다 배지에 첨가하였다. 그리고 타 영양물질의 영향을 알아보기 위해 Nutrient Broth (NB; Difco Laboratories, USA)를 이용하였으며 *chlorella* 세포수의 관찰을 위해서는 hemacytometer를 사용하여 200배 배율의 현미경(Model Olympus CX40, Olympus Optical Co., Ltd., Japan)으로 세포수를 산정하였다.

균의 배양 실험은 growth chamber (Model VS-91G09M-1300, Vision Sci. Co. Ltd., Korea) 내에서 조도 약 20,000 Lux 이상,

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-51-510-0621, Fax: 82-51-510-0628
E-mail: leejw@cup.ac.kr



Fig. 1. A features of culture ground of *C. pyrenoidosa*.

회전수 200 rpm의 진탕교반기(Model VS-202D, Vision Sci. Co. Ltd., Korea)를 이용하여 이루어졌다.

흡수스펙트럼의 결정

UV-Visible Spectrophotometer (Varian Cary 50, Varian Australia Pty. Ltd., Australia)를 이용하여 세포 배양액을 파장 200 nm에서 800 nm에 걸쳐 scanning한 결과 최대흡수파장을 결정하였다. 그리고 chlorophyll의 scanning은 380 nm에서 750 nm에 걸쳐 흡수 spectrum을 얻었다.

클로로필 정량

M. F. Hipkins와 N. R. Baker의 방법(10)에 따라 클로로필의 함량을 살펴보았다. 먼저 80% (v/v) acetone 10 ml에다 파쇄된 세포액 0.1 ml를 가하여 잘 혼합한 다음 이를 2,000×g, 4°C, 5분 동안 원심분리(Model MEGA 17R, Hanil Sci. Industrial Co., Ltd. Korea)하였다. 원심분리 후 상층액은 따로 분리하였고 침전물은 다시 같은 방법으로 추출하여 원심분리 한 다음 상층액을 얻었으며 그 후 두 상층액을 혼합한 다음 이를 각각 645 nm 및 663 nm에서 흡광도를 측정(Model UVmini-1240, Shimazu Corporation, Japan)하여 클로로필의 양을 정량하였다.

단백질 정량

단백질 정량은 Lowry 등(15)의 방법에 따랐다. 즉, bovine serum albumin을 표준시료로 420 nm에서 흡광도를 측정(Model UVmini-1240, Shimazu Corporation, Japan)하여 단백질의 양을 정량하였다.

효소활성 분석을 위한 시료와 효소반응 혼합액

효소활성을 분석하기 위해 (주)클만사에서 자연 배양한 chlorella 원 배양액을 농축기(Model Philosep RCM 60, Philos

Co., Ltd, Korea)를 통해 농축시킨 chlorella 농축액(약 5×10^8 cell/ml)을 사용하였다. Chlorella 농축액 2L를 다시 대량 냉장 원심분리기(Model VS-G000CFi, Vision Sci. Co. Ltd., Korea)를 통해 2,096×g, 4°C에서 30분 동안 harvest한 다음 chlorella cell을 반복하여 배양배지로 2회 씻어 주었고, 그 후 French Press (Model VS-4600P, Vision Sci. Co. Ltd., Korea)를 이용하여 압력 약 1,500 psi에서 파쇄하였다. 그 다음 파쇄된 세포를 15,610×g, 4°C에서 20분간 원심분리(Model MEGA 17R, Hanil Sci. Industrial Co., Ltd. Korea)하여 상층액을 얻고 이를 조효소액으로 하여 효소활성 분석에 사용하였다.

효소반응 혼합액의 조성은 1 ml 당 0.05 M 2-mercaptoethanol (2-MeSH) (Sigma Chemical Co., USA)이 첨가된 2.5 mM buffer 용액 0.5 ml, 조효소액 0.25 ml, 2.5 mM acetaldehyde (Sigma Chemical Co., USA) 용액 0.125 ml, 2.5 mM β -NAD⁺ (Sigma Chemical Co., USA) 용액 0.125 ml로 하였다.

HPLC에 의한 효소활성 분석

효소활성 분석을 위해 HPLC (HP 1100 Series, Hewlett-Packard Co., USA)를 이용하였는데 이때 운전 조건은 ① Hewlett-Packard (HP) ODS-Hypersil (5 μ m, 200×4.6 mm) column ② 이동상 50% (v/v) acetonitrile ③ flow rate는 1 ml/min ④ autosampler (Model G1329A, Agilent Tech. 1200 Series, USA)에 의한 시료 주입량 5~10 μ l ⑤ 온도 상온 ⑥ Variable Wavelength Detector (VWD)를 사용하여 340 nm에서 분석하였으며, HPLC 분석용 표준시료로 β -NADH (Sigma Chemical Co., USA)를 사용하였다. 그리고 HPLC 분석에 사용된 모든 용매는 pore size 0.45 μ m filter로 여과하였다.

그리고 효소반응 혼합액은 수욕 상에서 1시간 반응 시킨 후 10,840 ×g, 4°C에서 10분간 원심분리(Model MEGA 17R, Hanil Sci. Industrial Co., Ltd. Korea) 한 다음 상층액을 얻어 이를 HPLC로 적정 pH, 적정 온도, kinetics 등을 분석하였다.

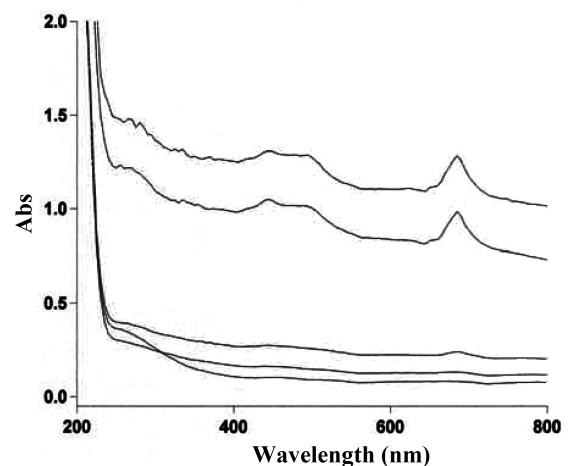


Fig. 2. The scan of culture broths of *C. pyrenoidosa*. Samples were prepared at intervals of a day, and a total incubation time was for 4 days.

Table 3. Chromatograms of β -NADH (1 mM) according to the concentration of CH_3CN

Concn. of CH_3CN , % (v/v)	30	40	50	60	70
Peak width (min)	0.074	0.070	0.063	0.069	0.095
Area (mAu*s)	1517	1569	1727	1622	1522
Peak height (mAu)	299	337	418	339	297
Column pressure (Bar)	95	88	80	70	60

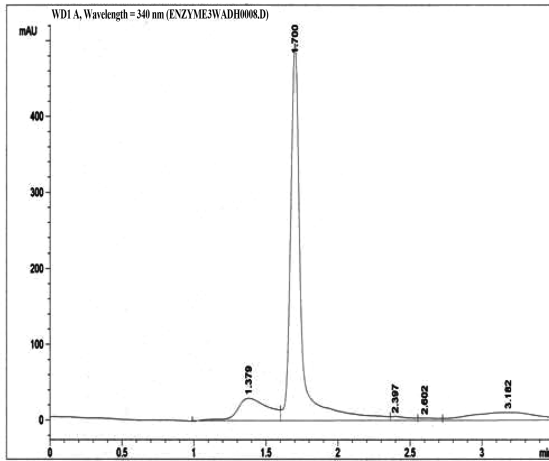


Fig. 4. The chromatogram of standard β -NADH (2.5 mM).

높게 나와 대신 acetonitrile (CH_3CN)을 이동상으로 사용하게 되었다.

그리고 HPLC에 의한 분석조건을 확립하기 위해 표준시료로 β -NADH를 사용하였다. Table 3은 30% (v/v)에서 10 단위로 70% (v/v)까지 CH_3CN 농도에 따라 각각 1 mM β -NADH를 5 μl 씩 동일한 양을 주입했을 때의 chromatogram을 살펴본 결과이다. 즉, CH_3CN 의 농도가 70% (v/v)에서는 column에 걸리는 압력이 60 bar 정도로 낮았으나 peak의 높이가 297 mAu 정도로 낮아졌으며, 그 반대로 30% (v/v)에서는 역시 peak의 높이도

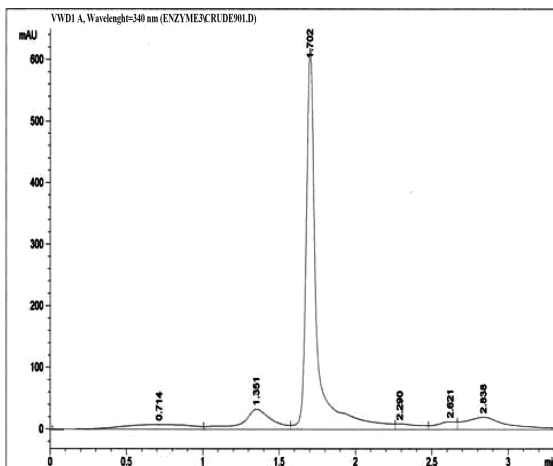


Fig. 5. The chromatogram of enzyme reaction mixture after 60 min of enzymatic reaction on pH 9.0 and at temperature 40°C.

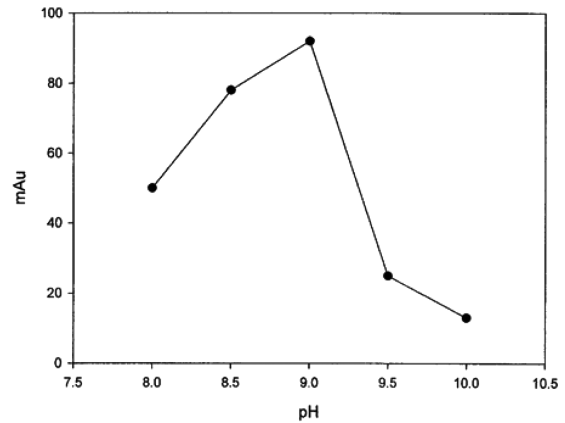


Fig. 6. pH profile of the crude enzyme.

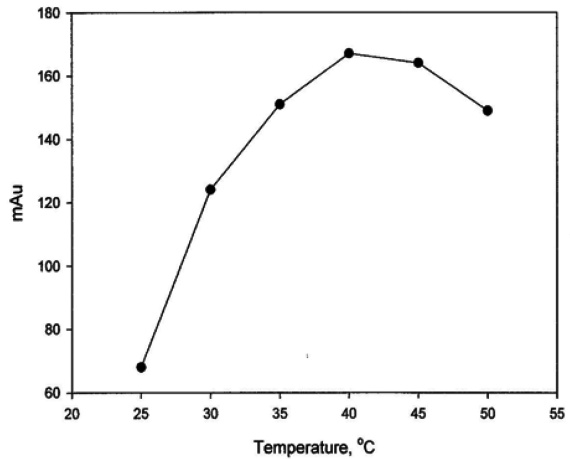


Fig. 7. Temperature profile of the crude enzyme.

299 mAu 정도로 낮았고 column에 걸리는 압력도 95 bar로 높아졌다. 이 때 peak의 유지시간은 대략 1.5분에서 2.5분 사이였다. 그 결과 이동상으로 CH_3CN 을 H_2O 와 1(V):1(V)의 비율로 혼합했을 때 가장 양호한 결과가 나타났는데 peak의 높이가 418 mAu, 압력은 80 bar, 유지시간 약 1.7분이었다.

각각 Fig. 4는 표준시료인 2.5 mM 농도의 β -NADH를 50% (v/v) CH_3CN 을 이동상으로 하고 autosampler를 이용하여 5 μl 주입했을 때와 Fig. 5는 효소의 적정 pH와 온도를 찾은 다음 1시간 동안 반응시킨 후 효소반응 혼합물을 5 μl 주입했을 때의 chromatogram이다. 그때 각각의 유지시간은 전자의 경우 1.700분, 후자의 경우 1.702분이었다.

그리고 효소의 pH profile을 찾기 위해 pH 6~8까지는 2.5 mM phosphate buffer를 pH 7~9까지는 2.5 mM Tris(hydroxymethyl) aminomethane-HCl buffer를 pH 8~10까지는 2.5 mM boric acid, KCl-NaOH buffer를 사용하였다. Fig. 6은 이 효소의 적정 pH가 9.0 부근임을 보여준다. 다시 효소의 temperature profile을 찾기 위해 5°C 간격으로 15°C에서 60°C까지 1시간 동안 반응시켜 보았는데 그 결과는 Fig. 7과 같이 이 효소의 적정 온도는 40°C 부근임이 나타난다. 모든 실험은 3회 이상 반복한 후 결과를 얻었다.

다음으로는 조효소(crude enzyme)이 아니라 Km, Vmax값을 정하

Table 4. Preheating for 30 min of disrupted algal cells in water bath so as to separate the crude enzyme solution from cell debris

Incubating temperature (°C)	Peak height (mAu)
30	78
35	132
40	166
45	136
50	130
55	107

였다. 반응조건은 2.5 mM boric acid, KCl-NaOH buffer + 0.05 M 2-MeSH, 40°C, 1시간이었으며, acetaldehyde와 β-NAD⁺ 용액을 각각 1 mM 단위로 1 mM에서 4 mM까지 농도 별로 첨가하였다. 그때 HPLC chromatogram에 나타난 peak의 높이가 각각 37, 44, 55, 66 mAu였는데 이를 Lineweaver-Burk plotting 한 결과 Km의 값이 약 1.23 mM, Vmax의 값이 약 80 units/μg·protein으로 나타났다.

C. pyrenoidosa로부터 acetaldehyde 분해 효소를 연구하는데 가장 큰 걸림돌은 algal cell의 파쇄와 algal cell을 파쇄 한 후의 cell debris와 조효소액의 분리였다. 그 중 한 가지 방법으로 우선 cell debris를 분리하기 위해 각각의 수욕 온도를 30°C에서 5°C 간격으로 55°C까지 맞춘 다음 30분간 warm up을 시켰다. 그 후 10,840 ×g, 4°C, 10분 동안 원심분리를 하여 얻어진 상층액의 효소활성을 살펴보았는데 이도 역시 40°C에서 warm up을 시켜준 게 제일 높은 효소활성을 보여 주었다(Table 4). 하지만 이 문제는 앞으로 이 효소를 완전히 정제하는데 있어 좀 더 연구해야만할 과제로 생각된다. 그리고 본 연구에 덧붙여 column chromatography, SDS gel 전기영동, enzyme kinetics 등의 계속적인 연구를 통해 Chlorella pyrenoidosa로부터 얻어진 acetaldehyde dehydrogenase를 완전히 정제하고, 그로써 숙취해소의 기능성 음료를 개발하는데 도움이 될 것으로 사료된다.

감사의 말

본 연구는 2008년도 부산가톨릭대학교 교내연구비의 지원에 의해 연구되었습니다.

참고문헌

1. 강민숙, 심상준, 채희정. 2004. 클로렐라 가수분해물로부터 향암 및 혈액 응고 저해 활성을 가진 단백질의 부분 정제. 한국산업식품공학회지 8, 1584-1591.
2. 김정욱, 차재형, 허진선, 진현진, 조영수. 2008. Streptozotocin-유발 당뇨 쥐에 대한 클로렐라 열수 추출물의 혈당 강하 효과. 생명과학회지 18, 1584-1591.
3. 박민경, 이재민, 박찬현, 인만진. 2002. 클로렐라를 첨가한 설기떡의 품질특성. 한국식품영양과학회지 31, 225-229.
4. 이영자, 김소희, 김진숙, 한정아, 서해점, 임효정, 최수영. 2005. 클로렐라 및 스피루리나 제품에 함유된 엽록소 a, b,

페오포르마이드 a 및 β-카로틴의 동시연속분석법에 관한 연구. 한국식품위생안전성학회지 19, 141-146.

5. 한재갑, 강기권, 김진국, 김상환. 2002. 클로렐라 추출물 현황 및 전망. 식품과학과 산업 35, 64-69.
6. An, H.J., S.W. Seo, K.S. Sim, J.S. Kim, E.H. Kim, M.O. Lee, H.S. Park, J.G. Han, E.H. Lee, J.Y. Um, S.H. Hong, and H.M. Kim. 2006. Antifatigue effect of *Chlorella vulgaris* in mice. *Korean J. Food Nutr.* 19, 169-175.
7. Cherng, J.Y. and M.F. Shih. 2005. Preventing dyslipidemia by *Chlorella pyrenoidosa* in rats and hamsters after chronic high fat diet treatment. *Life Sci.* 76, 3001-3013.
8. Cherng, J.Y. and M.F. Shih. 2006. Improving glycogenesis in streptozocin (STZ) diabetic mice after administration of green algae *Chlorella*. *Life Sci.* 78, 1181-1186.
9. Hasegawa, T., M. Okuda, M. Makino, K. Hiromatsu, K. Nomoto, and Y. Yoshikai. 1995. Hot water extracts of *Chlorella vulgaris* reduce opportunistic with *Listeria monocytogenes* in C57BL/6 mice infected with LP-BM5 murine leukemia viruses. *Int. J. Immunopharmacol.* 17, 505-512.
10. Hipkins, M.F. and N.R. Baker. 1986. Spectroscopy, pp. 62-65. In *Photosynthesis: Energy transduction*. IRL Press Limited, Oxford, England.
11. Kaplan, D., Y.M. Heimer, A. Abeliovich, and P.B. Goldsbrough. 1995. Cadmium toxicity and resistance in *Chlorella* sp. *Plant Sci.* 109, 129-137.
12. Kim, Y.H., Y.K. Hwang, Y.Y. Kim, S.M. Ko, J.M. Hwang, and Y.W. Lee. 2002. Effect of chlorella growth factor on the proliferation of human skin keratinocyte. *J. Biomed. Lab. Sci.* 8, 229-234.
13. Kralovec, J.A., K.L. Metera, J.R. Kumar, L.V. Watson, G.S. Girouard, Y. Guan, R.I. Carr, C.J. Barrow, and H.S. Ewart. 2007. Immunostimulatory principles from *Chlorella pyrenoidosa*-Part 1: Isolation and biological assessment *in vitro*. *Phytomedicine* 14, 57-64.
14. Lee, J.W., S.O. Kang, Y.C. Hah, and H.E. Han. 1988. Characterization of the outer membrane-associated 2-furaldehyde dehydrogenase from *Klebsiella pneumoniae*. *Kor. J. Microbiol.* 26, 197-206.
15. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Parr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
16. Nakano, S., T. Noguchi, H. Takekoshi, G. Suzuki, and M. Nakano. 2005. Maternal-fetal distribution and transfer of dioxins in pregnant women in Japan, and attempts to reduce maternal transfer with *Chlorella*(*Chlorella pyrenoidosa*) supplements. *Chemosphere* 61, 1244-1255.
17. Nakashima, Y., I. Ohsawa, F. Konishi, T. Hasegawa, S. Kumamoto, Y. Suzuki, and S. Ohta. 2009. Preventive effects of *Chlorella* on cognitive decline in age-dependent dementia model mice. *Nerosci. Lett.* 464, 193-198.
18. Morris, H.J., A. Almarales, O. Carrillo, and R.C. Bermudez. 2008. Utilization of *Chlorella vulgaris* cell biomass for the production of enzymatic protein hydrolysates. *Bioresource Technology* 99, 7723-7729.
19. Queiroz, M.L.S., A.P.O. Rodrigues, C. Bincoletto, C.A.V. Figueiredo, and S. Malacrida. 2003. Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with *Listeria monocytogenes*. *International Immunopharmacology* 3, 889-900.
20. Scagel, R.F., R.J. Bandoni, J.R. Maze, G.E. Rouse, W.B. Schofield, and J. R. Stein. 1982. Chlorophyta (Green Algae), pp. 253-307. In *Nonvascular plants: An evolutionary survey*. Wadsworth Pub. Co.,

- Belmont, California, USA.
21. Sheng, J., F. Yu, Z. Xin, L. Zhao, X. Zuh, and Q. Hu. 2007. Preparation, identification and their antitumor activities *in vitro* of polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa*. *Food Chemistry* 105, 533-539.
22. Takekoshi, H., G. Suzuki, H. Chubachi, and M. Nakano. 2005. Effect of *Chlorella pyrenoidosa* on fecal excretion and liver accumulation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin in mice. *Chemosphere* 59, 297-302.

(Received November 19, 2009/Accepted December 1, 2009)

ABSTRACT: Cellular Growth Traits and Detection of Acetaldehyde Dehydrogenase from *Chlorella pyrenoidosa*

June Woo Lee (Department of Environmental Engineering, Catholic University of Pusan, Pusan 609-757, Republic of Korea)

To investigate the cellular growth traits of a photosynthetic green algae, *Chlorella pyrenoidosa*, several tests upon a culture temperature, a culture time, the influence of nutrient and the intensity of illumination were executed. Using growth chamber, some optimal conditions for the culture of algae were as follows: The culture temperature was about 28°C, the culture time about 4 days, and the cellular growth of algae was in proportioned to the concentration of nutrient such as nutrient broth. And the more the intensity of illumination was increased, the more the algal cell showed good growth. And then, the activity of enzyme degrading acetaldehyde was also studied using HPLC from the same strain. This enzyme was dependent on β -NAD⁺. And showed its optimal pH around on 9.0, and also its optimal temperature around at 40°C. The operational conditions of HPLC were as follows: Column, ODS-Hypersil ; mobile phase, 50% (v/v) acetonitrile.