

자외선 차단능을 보유한 미세조류의 스크리닝

Screening of Freshwater Microalgae for Resistance to Ultraviolet Radiation

한미애¹, 한혜진², 정문희¹, 유림환³, 황채은³, 명수현⁴, 손윤진⁴, 윤영실³, 이철균^{1*}

Mi-Ae Han¹, Hye Jin Han², Moon Hee Jung¹, Rim Hwan Yoo³, Chae Eun Hwang³, Su Hyun Myung⁴, Yun Jin Son⁴, Young-Sil Yoon³, Choul-Gyun Lee^{1*}

¹인하대학교 생물공학과, 인천광역시, 402-751, 대한민국

²인하대학교 식품영양학과, 인천광역시, 402-751, 대한민국

³인천 해송 고등학교, 인천광역시, 406-840, 대한민국

⁴인천 고잔 고등학교, 인천광역시, 425-906, 대한민국

¹Department of Biological Engineering, Inha University, Inhceon 402-751, Republic of Korea

²Department of Food and Nutrition, Inha University, Inhceon 402-751, Republic of Korea

³Haesong High School, Incheon 406-840, Republic of Korea

⁴Kojan High School, Incheon 425-906, Republic of Korea

(Received 30 December 2014, Revised 27 January 2015, Accepted 29 January 2015)

Abstract Ultraviolet-B radiation (UV-B) in sunlight causes biological damages such as erythema and blister on skin. Microalgae have been in the limelight as an attractive feedstock for manufacturing functional materials. This study focused on screening microalga with protection ability against UV-B. The microalgae were isolated from local areas on April to June 2013 as well as June 2014. The cells were grown under continuous illumination from fluorescent lamps at $136.3 \pm 2.2 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ in BG-11 medium at 15°C for 12-14 days. The selected cells were spread on BG-11 agar and were exposed to UV-B (312 nm) for 20 and 25 minutes. The 13 strains among selected algae were classified. Among these, 9 strains were *Scenedesmus* sp. and the remains were *Chlorella* sp. Based on this study, it seems that *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. have resistibility against ultraviolet. These results will help to study on UV protection using microalgae.

Keywords : microalgae, screening, Ultraviolet-B radiation, protection ability

서 론

자외선은 파장이 200 nm에서 400 nm인 태양광선의 전자파장으로 지표에 도달하는 태양광선 중 약 6.1%를 차지한다 [1]. 자외선은 비타민 D의 생합성 작용에 의하여 구루병을 예방하고 살균소독 작용 등

의 효과가 있는 것으로 알려져 있으나 그 양이 지나치게 되면 인체에 악영향을 일으키게 된다 [2]. 자외선은 파장영역에 따라 장파장 자외선 (UV-A, 320~400 nm), 중파장 자외선 (UV-B, 290~320 nm), 단파장 자외선 (UV-C, 180~290 nm)으로 분류할 수 있다 [5-10].

* Corresponding author
Phone: +82-32-872-7518 Fax: +82-32-873-7518
E-mail: leecg@inha.ac.kr

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

UV-B는 태양광선의 약 0.5%를 차지하고 있으며 대부분은 오존층에서 흡수되지만 지표면에 도달한 잔여 파장은 단백질과 DNA에 의해 흡수될 때까지 존재하게 된다 [3]. 때문에 무방비 상태의 세포를 손상 시킬 수 있어 UV-B에 많은 양이 노출되었을 경우 흥반을 일으키고 [4, 5], DNA에 구조적 이상을 일으켜 단백질 변형, 지질 과산화 등을 초래하게 되는 것으로 알려져 있다 [6].

UV-B는 장파장 UV-A에 비해 피부 깊숙이 침투하지는 못하지만, 에너지가 크며 피부를 빨갱게 붓게 하거나 수포를 발생시키고 화상을 유발 한다 [2, 4, 6-9]. 또한, UV-B 노출은 활성산소종 (ROS, reactive oxygen species) 의 발생을 야기 하며, 그것은 피부의 단백질과 다른 고분자에 산화적 스트레스와 광손상을 일으킨다 [10]. 때문에 UV-B로 인한 피부 손상을 방지하기 위해 UV-B를 차단시킬 필요성이 있다.

환경오염으로 인한 오존층의 파괴로 흡수되는 자외선의 양이 많아지고 인간의 수명 연장, 야외활동 증가로 인해 자외선에 대한 피해가 심각해지고 있는 실정이며 이를 방지하기 위하여 빛을 반사시킴으로써 피부를 보호하는 자외선차단 물질에 대한 관심이 높아지고 있다 [11].

하지만 기존의 자외선 차단제는 유기 성분을 포함하기 때문에 화학성분의 독성으로 인해 피부 알레르기와 발암성 및 환경호르몬 물질을 유발시킨다 [12, 13]. 때문에 천연물질로부터 자외선 차단 물질의 연구 및

개발이 진행되고 있다 [11].

미세조류는 물, 이산화탄소 그리고 빛을 이용하여 광합성을 하는 수중 단세포 생물로 그 종류는 매우 다양하고 자라는 속도가 빠르다 [14]. 전 세계적으로 보고된 미세조류는 약 73,000여 종이며 단백질, 색소, 비타민, 의약성분 및 유용한 물질들을 생산하는 특징을 갖고 있어 화장품, 의약품, 식품, 수산양식용 사료 등에 원료가 되는 바이오매스로서 주목 받고 있다 [5, 15, 16].

본 연구에서는 기능성 원료물질 개발을 위한 기초자료를 얻기 위해 담수 미세조류 중 UV-B resistance 능력이 우수한 균주를 스크리닝하고 균주들의 형태와 세포 성장 그리고 계통 관계에 대해 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

담수 미세조류의 채집

담수 미세조류는 2013년 4월에서 6월 사이, 2014년 6월에 강원 고성 (Goseong, Gangwon Province), 경기 용인 (Yongin, Gyeonggi Province), 경기 광주 (Gwangju, Gyeonggi Province), 경기 이천 (Icheon, Gyeonggi Province), 인천 영종 (Youngjong, Incheon), 인천 고잔 고등학교 (Kojan High School), 해송 고등학교 (Haesong High School) 그리고 미추홀 도서관 (Michuhol Library)의 호수 및 웅덩이에서 미세조류를 채집하였다 (Table 1).

Table 1. Collection of microalgae according to the gathering place

No.	Gathering place	Collection date	Labeling	Note
1	Goseong, Gangwon Province	2013.04.26	GS	
2	Songdo, Incheon	2013.05.03	MS	
3	Yongin, Gyeonggi Province	2013.05.10	BS	
4	Youngjong, Incheon	2013.05.21	YJ	
5	Gwangju, Gyeonggi Province	2013.06.07	GAJ	Fresh water
6	Icheon, Gyeonggi Province	2013.06.25	BA	
7	Kojan high school, Incheon	2014.06.04	GJM, GJ	
8	Michuhol park, Incheon	2014.06.04	MCH	
9	Haesong high school, Incheon	2014.06.04	HSJ	

미세조류의 배양 및 조건

BG-11 배지 [17]에 채집한 샘플을 접종하여 15°C 의 Shaking incubator (VS-8480SF/S, Vision Scientific, Daejeon, Korea) 에서 140 rpm, 광도 136.3 ± 2.2 μE/m²/s 조건하에서 광주기 24 시간으로 14일간 배양하였다.

단일 콜로니를 얻기 위하여 각각의 미세조류 배양액을 BG-11 고체배지에 20 μL씩 도말하였다. 도말된 미생물을 종균대에서 광도 44.3 ± 3.1 μE/m²/s, 20 ± 1°C의 조건 하에서 배양시킨 후 단일 콜로니를 액체 BG-11에 접종한 후 배양하였다.

중파장 자외선 (UV-B) 조사

자외선의 차단효능이 있는 미세조류를 식별하기 위해 단일 배양한 미세조류를 고체 BG-11에 도말하여 0, 15, 20, 25 분으로 시간차를 두어 Gel Documentation System (WGD-30, Daihan Scientific, Wonju, Korea)를 이용하여 자외선 (UV-B, 312 nm)을 조사하였다.

UV-B에 대한 저항성을 가진 미세조류의 형태관찰

UV를 조사하지 않은 대조군과 조사한 실험군을 정립 현미경 (ECLIPSE 50i, Nikon, Tokyo, Japan)을 이용하여 형태를 관찰하였다. 또한 Cellometer (Cellometer CBA, Nexcelom Bioscience, MA, U.S.A.)를 이용하여 세포의 평균 지름을 측정하여 UV 조사 후 세포 크기의 변화를 확인하였다.

세포성장

UV-B조사 25분에서 생존을 보인 미세조류들의 성장성을 관찰하기 위해 Coulter Counter®(Multisizer 4, Brea, CA, U.S.A.)를 이용하여 세포 농도와 평균 세포 크기를 측정하였다.

미세조류의 동정

자외선 (UV-B)조사 20, 25분에 대하여 생존을 보인 미세조류의 분류학상 종을 찾아내었다. 분류학적 거리 관계는 Neighbor Joining (NJ)방법을 이용하여 계통도를 구성하였다.

결과 및 고찰

UV-B에 저항성이 있는 균주 선발

중파장 자외선 (UV-B, 312 nm)에 각각 0, 15, 20, 25분 노출시킨 결과 자외선 조사 시간이 길어질수록 미세조류가 사멸하였다. 자외선 조사 20분을 기점으로 선별된 균주가 사멸하거나 생존하였다. 20, 25분에 생존한 미세조류를 선별, 명명하여 Table 2에 나타내었다.

고성, 송도, 용인, 광주, 이천 그리고 영종에서 채집한 미세조류들이 UV-B 20분 조사 후에 생존을 보였다. UV-B 25분 조사 후에서 생존을 보인 미세조류는 고잔 고등학교, 해송 고등학교 그리고 미추홀 공원에서 채집한 미세조류였으며 각각 55.5%, 33.3%, 50%의 생존율을 보였다.

Table 2. Selection of strain to have UV radiation tolerance

Time (min)	Gathering place	Number of Strain	Number of selected colony	Survival rate (%)	Labeling
20	Goseong	25	1	4	GS3426,GS6426,GS11426
	Songdo	25	1	4	MS1503
	Yongin	25	2	8	YI5103, YI5104
	Youngjong	25	2	8	YJ1521, YJ8521
	Gwangju	25	2	8	BA3607, BA6607
	Icheon	25	2	8	BS3625, BS8625
	Total		156	10	6.4
25	Kojan high school	9	5	55.5	GJM01, GJM02, GJM05, GJ01, GJ02
	Michuhol park	4	2	50	MCH02, MCH03
	Haesong high school	3	1	33.3	HS02
	Total		16	8	50

UV-B 조사에 따른 세포 형태 변화

UV-B 20분 조사에서 생존한 균주 가운데 GS3426, GS6426, GS11426의 평균 세포 크기가 UV를 조사하지 않았을 때보다 조사하였을 때 감소하였다 (Fig. 1(a)).

마찬가지로 UV 25분 조사에서 생존한 균주 GJM01, GJM02, GJ02의 자외선 조사 전 후 세포의 크기가 작거나 비슷한 것으로 나타났으나 MCH02는 그 크기가 증가하였다 (Fig. 1(b)).

UV-B 조사 전 후의 세포 형태를 현미경으로 관찰한

결과 (Fig. 2 (a-z)), GJM01은 UV 조사 후에 세포 내 물질이 줄어든 것으로 판단되며 YI5103, YJ1521, BA6607, GJM02, GJ02는 조사 후 세포가 진한 녹색을 띄는 것으로 보아 UV 흡수가 세포 내의 엽록체에 영향을 주는 것으로 사료된다. 세포들의 형태는 대체적으로 구형이었으며 BA3607과 MCH02는 타원형의 모습이었다.

자외선 조사 전 후의 세포의 크기 및 형태의 변화가 있는 것으로 보아 자외선에 대한 내성 기전이 있는 것으로 추측된다.

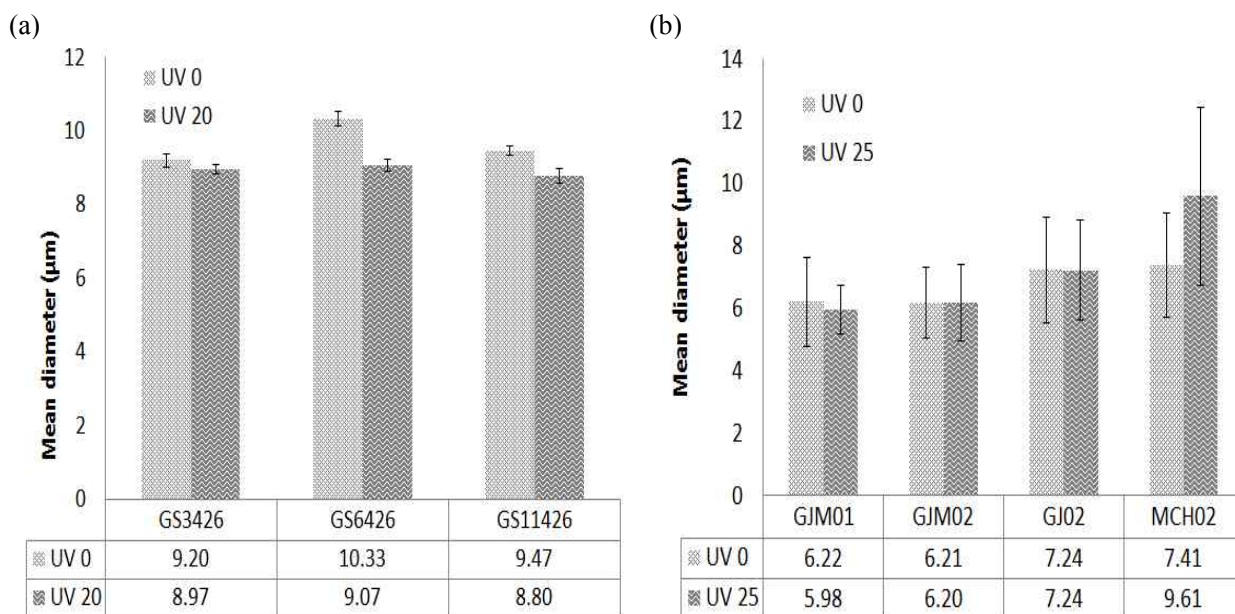


Figure 1. Change of cell size on surviving strains according to exposure time under UV-B radiation (a) 20 min, (b) 25 min.

UV-B 25분 조사 균주의 세포성장 변화

UV-B 조사 25분에서 생존을 보인 네 종류의 균주 (GJM01, GJM02, GJ02, MCH02)들의 성장패턴을 확인하였다. 세포성장의 변화를 측정된 결과 (Fig. 3) 168시간 배양 후 GJM01, GJM02, GJ02, MCH02의 균체량은 각각 0.87 ± 0.08 , 0.97 ± 0.07 , 1.08 ± 0.01 , 1.26 ± 0.03 g/L로 비슷한 성장성을 보였다.

세포 농도 (cells/mL)에서는 $1.78 \times 10^7 \pm 6.84 \times 10^6$ 으로 GJM01이 가장 높은 결과를 보였으며 MCH02가 평균 세포 크기 4.56 ± 0.24 µm로 가장 큰 크기를 보였다.

배양 48시간 이후 GJM01의 세포수가 24시간 때의 세포 수에 비해 74.6% 급격하게 증가하였다. GJM01은 네 종류의 세포 중 가장 작은 세포 크기로 인해 균체량 (g/L)으로 나타내었을 때 다른 균주들과 비슷한 결과를 보였지만 성장성으로 보았을 때 가장 빠

른 성장률을 나타내는 것으로 판단된다.

선별된 균주의 동정

UV-B 조사 20분, 25분에서 생존되어 선별된 균주들의 계통분석을 위해 (주)바이오팩트에 시퀀싱을 의뢰하였다. 18S primer를 이용해 균주들의 18S RNA 염기서열분석을 의뢰한 결과를 Table 3에 나타내었다.

그 결과 *Scenedesmus abundans*, *Scenedesmaceae* sp., *Scenedesmus* sp., *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella* sp., *Chlorella vulgaris*, *Chlorella rotunda*로 분류되었으며 (Fig. 4) UV-B에 저항성이 있는 7종류의 균주를 확보할 수 있었다. 동정한 균주 모두 *Scenedesmus* sp. 또는 *Chlorella* sp.에 속하는 것으로 보아 이 두 종은 여름철 담수의 우점종으로 사료되며 이와 동시에 UV에 저항성이 강한 균주인 것으로 해석할 수 있었다.

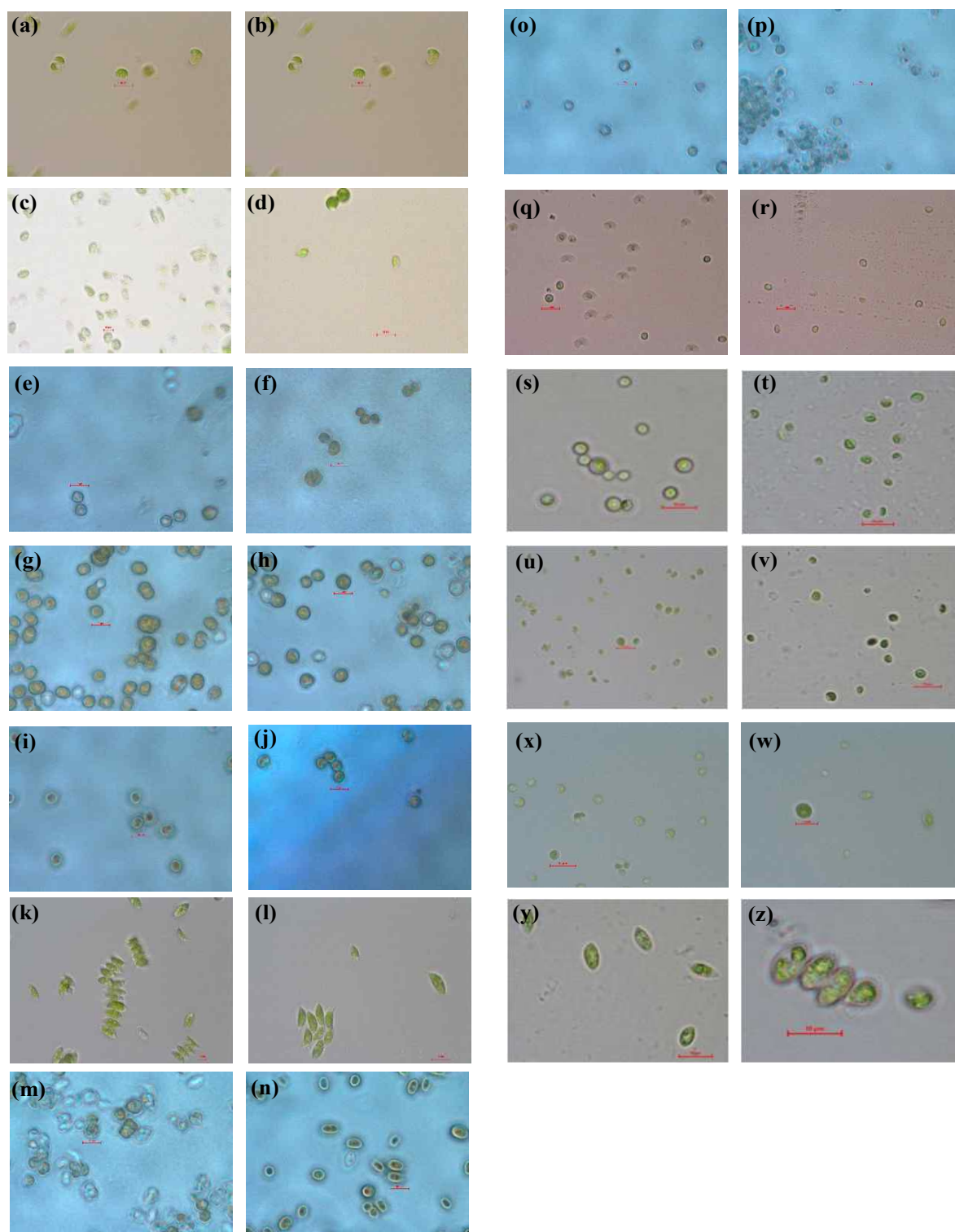


Figure 2. Morphology of surviving strains according to exposure time under UV-B radiation. (a) MS1503, 0 min; (b) MS1503, 20 min; (c) YI5103, 0 min; (d) YI5103, 20 min; (e) YI5104, 0 min; (f) YI5104, 20 min; (g) YJ1521, 0 min; (h) YJ1521, 20 min; (i) YJ8521, 0 min; (j) YJ8521, 20 min; (k) BA3607, 0 min; (l) BA3607, 20 min; (m) BA6607, 0 min; (n) BA6607, 20 min; (o) BS3625, 0 min; (p) BS3625, 20 min; (q) BS8625, 0 min; (r) BS8625, 20 min; (s) GJM01, 0 min; (t) GJM01, 25 min; (u) GJM02, 0 min; (v) GJM02, 25 min; (x) GJ02, 0 min; (w) GJ02, 25 min; (y) MCH02, 0 min; (z) MCH02, 25 min.

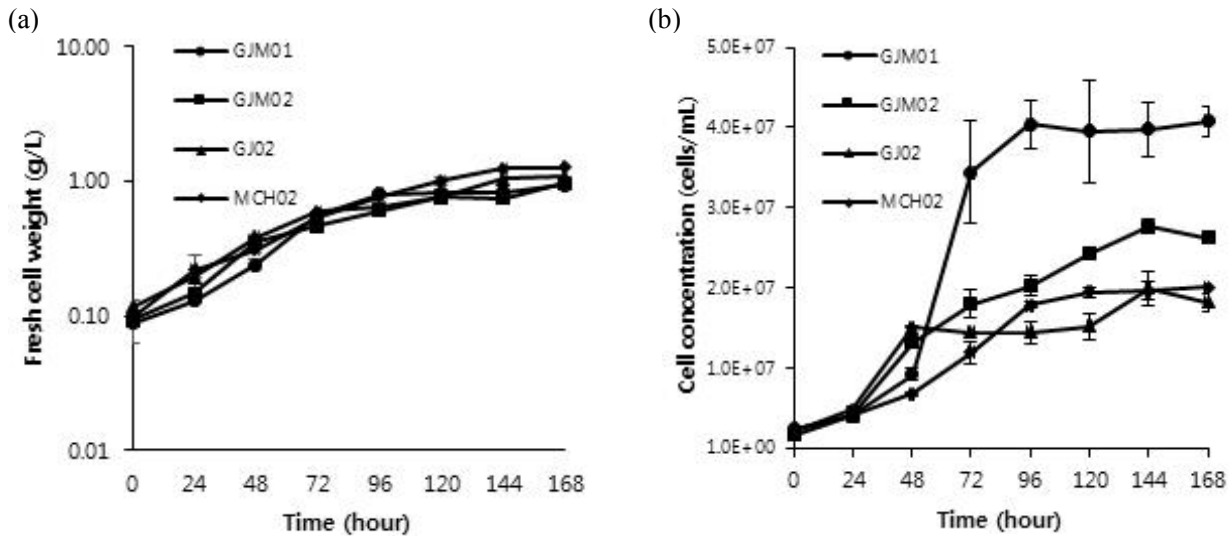


Figure 3. Cell growth profile on surviving strains to exposure UV-B radiation for 25 min (a) fresh cell weight, (b) cell concentration.

Table 3. Identification of selected strains with resistance against UV-B radiation

No.	Name	Identity	Score
1	GS11426	-	-
2	MS1503	<i>S. abundans</i>	2889
3	YI5103	<i>S. abundans</i>	2894
4	YI5104	<i>S. abundans</i>	2881
5	YJ1521	<i>Scenedesmaceae</i> sp.	1430
6	YJ8521	<i>Scenedesmaceae</i> sp.	1519
7	BA3607	<i>Scenedesmus</i> sp.	2861
8	BA6607	<i>Scenedesmus</i> sp.	2904
9	BS3625	<i>Chlorella</i> sp.	2887
10	BS8625	<i>Chlorella</i> sp.	2887
11	GJM01	<i>Chlorella vulgaris</i>	1423
12	GJM02	<i>S. obliquus</i>	1290
13	GJM05	-	-
14	GJ01	-	-
15	GJ02	<i>Chlorella rotunda</i>	1107
16	MCH02	<i>Scenedesmus</i> sp.	1194
17	MCH03	-	-
18	HS02	-	-

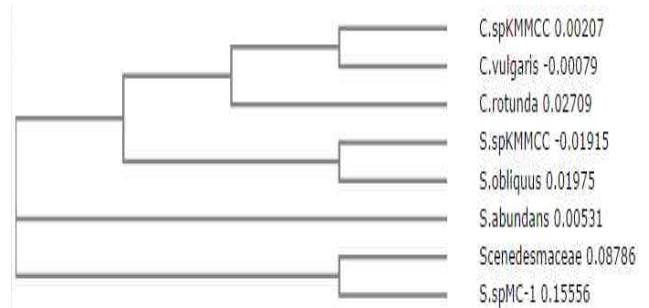


Figure 4. Phylogenetic tree of identified strains.

결론

본 연구는 미세조류로부터 UV-B 차단능이 있는 기능성 물질을 얻기 위하여 UV-B에 저항성이 있는 미세조류를 스크리닝하였다. 전국의 10곳 (고성, 안양, 용인, 이천, 경기도 광주, 인천)에서 채집한 담수미세조류를 배양하여 UV-B를 10, 15, 20, 25분 동안 조사하였다. 그 결과 UV-B 조사 20, 25분에서 18개의 균주를 선별하였고 자외선에 노출시킨 균주의 세포 크기는 MCH02를 제외하고 줄어들거나 같았다. 선별한 18개 균주의 계통을 분석한 결과 13개의 균주의 계통을 얻을 수 있었으며 이 가운데 9 균주가 *Scenedesmus* sp. 이었고 4개의 균주가 *Chlorella* sp.로 확인되었다. 이로부터 *Scenedesmus* sp.와 *Chlorella* sp.는 UV-B에 대한 저항능력이 있는 것으로 사료된다. 본 연구는 자외선

에 저항성을 가진 *Scenedesmus* sp.와 *Chlorella* sp.를 이용한 자외선 차단연구에 기여할 수 있을 것이다.

감사의 글

이 논문은 2014년 정부재원 (미래창조과학부 여대학(원)생 공학연구팀제 사업)으로 한국연구재단과 한국여성과학기술인지원센터의 지원, 해양수산부의 재원으로 해양생명공학기술개발사업 (PJT200255, 해양미세조류 이용 바이오디젤 생산기술 개발) 연구개발비 지원에 의해 수행되었습니다.

References

- Lee, J. K., Shin, J. S., Kim, J. H., Eom, J. H., Kim, H. S., and Park, K. L. 2006. Evaluation of Phototoxicity for Cosmetics and Alternative Method. *Cosmet. Scientists*. **31**, 245-251.
- Kim, J. D., Kim, I. S., and Choi, T. S. 1992. Anti-Ultraviolet Textile. *J. Textile. Sci. Eng.* **29**, 85-86.
- De Gruijl, F. R. 1999. Skin Cancer and Solar UV Radiation. *Eur. J. Cancer*. **35**, 2003-2009.
- Kim, J. J., and Jang, J. D. 2002. Properties and UV-Cut Effects of Cotton Fabric Treated with TiO₂/PEG. *Text. Color. Finish*. **14**, 27-32.
- Lee, K. A., Kim, K. Y., Jung, K. J., Choi, Y. J., and Baek, J. Y. 2011. Korea patent 10-2011-0044494.
- Ahn, R. M., Lee, S. J., and Song, M. K. 1997. Protection Effects of Summer Fabrics from Cell Toxicity of UV-B. *J. Korean. Soc. Cloth. Text.* **21**, 750-756.
- Kim, J. H., Ahn, R. M., and Song, M. K. 1998. UVB Photosynthesis of Vit. D₃ and Fabrics (Part2). *J. Korean. Soc. Cloth. Text.* **22**, 646-653.
- Song, M. K., Ahn, R. M., and Shin, J. H. 1999. UVB Photosynthesis of vit. D₃ and Physiological Thermal Responses on the Protection Rate of Fabric. *J. Korean. Soc. Cloth. Text.* **23**, 980-986.
- Shin, J. S., and Son, W. G. 2003. Influence of Plasma Treatment & UV Absorbent on Light fastness Improvement of Brazilin. *CCA*, **11**, 66-74.
- Widmer, R., Ziaja, I., and Grune, T. 2006. Protein Oxidation and Degradation during aging : Role in Skin Aging and Neurodegeneration. *Free Radical Res.* **40**, 1259-1268.
- Naylor, M. F., and Farmer, K. C. 1997. The Case for Sunscreens a Review of Their Use in Preventing Actinic Damgae and Neoplasia. *Arch. Dermatol.* **133**, 1146-1154.
- Seo, H. H., Song, M. Y., Kulkarni, A., Suh, S. S., Lee, T. K., and Moh, S. H. 2014. Production Yield Enhancement of Mycosporine-like amino acid (MAA)s in Transformed Microglae Culture by Radiofrequency. *J. Korea. Acad. Industr. Coop. Soc.* **15**, 3799-3804.
- Shick, J. M., and Dunlap, W. C. 2002. Mycosporine-like Amino Acids and Related Gadusols : Biosynthesis, Accumulation, and UV-Protective Functions in Aquatic Organisms. *Annu. Rev. Physiol.* **64**, 223-262.
- Dong, S. J., Kim, K. W., and Cho, S. Y. 2011. Effect of Nano Bubble Oxygen and Hydrogen Water on Microalgae. *J. Fish. Aquat Sci.* **25**, 324-329.
- Guiry, M. D. 2012. How Many Species of Algae Are There? *Phycol.* **48**, 1057-1063.
- Park, H. J., H., K. Y., and Lee, J. H. 2012. Characterization of *Arthrospira platensis* Mutants Generated by UV-B Irradiation. *Chem. Eng.* **23**, 496-500.
- Franco-Lara, E., Link, H., and Weuster-Botz, D. 2006. Evaluation of Artificial Neural Networks for Modelling and Optimization of Medium Composition with a Genetic Algorithm. *Process Biochem.* **41**, 2200-2206.