

광합성 색소의 HPLC 분석을 위한 여과지 분쇄 효과 평가

장수진 · 박미옥*
부경대학교 해양학과

Evaluation of Grinding Effects on the Extraction of Photosynthetic Pigments for HPLC Analysis

SU JIN JANG AND MI OK PARK*

Department of Oceanography, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) 분석방법은 식물플랑크톤의 생물량 및 일차생산력을 추정하기 위한 지시자로서 chlorophyll *a* 농도를 측정하고 carotenoids의 종류를 파악해 종조성을 확인하기 위해 널리 이용되고 있다. 그러나 대량시료의 분석에 요구되는 시료 전처리 과정 중 여과지 분쇄는 상당한 시간과 숙련이 요구된다. 본 연구에서는 엽록소 및 carotenoids의 정량분석에 대한 여과지 분쇄의 영향을 파악하고자 동해 남서부 해역의 시료를 이용해 여과지 분쇄 전후의 광합성 색소 농도를 비교 평가했다. HPLC 분석에서 여과지 분쇄 생략 시 Chl *a*의 경우 평균 45% 과소평가되었다. 또한 pico, nano 크기 식물플랑크톤의 지표색소인 Zeaxanthin, 19'-butanoyloxyfucoxanthin, 19'-hexanoyloxyfucoxanthin는 최대 77~85% 과소평가되었다. 크기가 작은 식물플랑크톤의 경우 여과지 분쇄가 생략될 경우 불완전한 추출로 지표색소의 농도가 실제보다 저평가될 가능성이 크다는 것을 확인하였다. 따라서 HPLC 분석에서 여과지 분쇄 생략 시 Chl *a* 뿐 아니라 carotenoids 또한 과소평가 되므로 모든 경우에서 여과지 분쇄 과정이 반드시 필요하다고 판단된다.

High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) is a widely used method for measuring the concentration of chlorophyll *a* as an indicator for estimating phytoplankton biomass and primary production and also for identifying carotenoids to determine phytoplankton composition. However, tissue grinding procedure requires a lot of time and experience in the analysis of multiple sample. Accordingly, we measured the concentrations of photosynthetic pigments before and after the grinding, in order to understand the grinding effects on the quantitative analysis of chlorophylls and carotenoids using samples from southwestern East Sea. When tissue grinding procedure was omitted, we found that Chl *a* concentrations were underestimated up to 45% in average. Also, concentrations of Zeaxanthin, 19'-butanoyloxyfucoxanthin, 19'-hexanoyloxyfucoxanthin, biomarkers of pico and nano-size phytoplankton, were underestimated up to maximum 77~85% without grinding. We found that the smaller the phytoplankton, the bigger underestimation of their biomarker pigments concentration is likely to happen due to the incomplete extraction. Thus, tissue grinding procedure should be included for HPLC analysis in all cases, to prevent the underestimation of not only Chl *a* but also carotenoids pigments.

Keywords: HPLC, Extraction, Grinding effect, Photosynthetic pigment, Phytoplankton, East Sea

서 론

식물플랑크톤의 크기 및 분류군별 조성은 생태계 내의 먹이망 구조, 물질 순환, 생물 생산력 등을 결정짓는 중요한 요인이다 (Longhurst, 1991; Legnedre and Le Fevre, 1995; Legendre and

Michaud, 1998). 이러한 중요성 때문에 많은 연구자들이 식물플랑크톤의 생물량 및 일차생산력을 추정하기 위한 지시자로서 식물플랑크톤의 Chlorophyll *a*(Chl *a*)의 농도를 측정한다(Jeffrey and Mantoura, 1997).

전통적으로 식물플랑크톤의 생체량과 군집조성에 대한 연구는 흡광광도계나 형광 분석기를 이용하여 Chl *a*의 농도를 측정하고 (Holm-Hansen *et al.*, 1965; Strickland and Parsons, 1972; Lorenzen

Received September 19, 2014; Revised December 15, 2014; Accepted May 11, 2015
*Corresponding author: mopark@pknu.ac.kr

and Jeffrey, 1980) 현미경 관찰을 통해 식물플랑크톤의 종조성 분석을 실시해왔다. 하지만 이러한 방법들에 의한 Chl *a*의 분석은 엽록소의 분해산물과 보조 색소들의 흡광, 형광 bands의 중복에 의해 과소 또는 과대평가 될 수 있다(Mantoura and Llewellyn, 1983; Rowan, 1991; Gieskes and Kraay, 1983; Trees *et al.*, 1986). 또한 현미경 관찰을 통한 종조성 분석은 정확한 동정기술과 상당한 시간을 필요로 하며, 특히 초미소 조류를 동정하는 데에는 이들의 작은 세포 크기로 인해 많은 어려움이 따른다(Tester *et al.*, 1995). 이러한 문제들을 해결하고자 고성능 액체 크로마토그래피(High-Performance Liquid Chromatography, HPLC)를 이용한 식물플랑크톤의 광합성 색소의 분석 방법이 도입되었다.

HPLC를 이용한 광합성 색소분석은 각각의 색소를 분리한 상태에서 정성, 정량 분석하므로 정확한 Chl *a* 농도를 측정할 수 있으며(Wright and Shearer, 1984; Riaux-Gobin *et al.*, 1987; Plante-Cunney *et al.*, 1993; Pinckney *et al.*, 1994), 식물플랑크톤은 분류군에 따라 지표색소를 가지고 있어 이러한 지표색소를 통해 식물플랑크톤의 군집구조를 알 수 있다(Jeffrey and Vesk, 1997; Schluter *et al.*, 2000; Gibb *et al.*, 2001). 특히, 일반적인 현미경 관찰을 통해 구별하기 힘든 미소, 초미소 식물플랑크톤의 군집구조에 대해 유용한 정보를 제공해 준다(Mackey *et al.*, 1998).

해수 중 Chl *a* 농도는 국내외적으로 많은 연구자들에 의해 다양한 방법으로 측정되고 있으나, 측정 방법이 다르면 감도에 차이가 있으며, 같은 방법을 사용하더라도 연구실에 따라 용매 조성이나 전처리 방법 등 절차상의 차이로 인해 자료의 직접적인 비교가 어렵다(문 등, 2014). 특히 전처리 과정 중 여과지 구멍에 숨겨진 작은 세포까지 추출해내기 위한 여과지 분쇄과정은 각 시료마다 분쇄시간이 요구되기 때문에 전처리 시간이 길어지고 연구자들은 이 과정을 생략한 방법을 사용하기도 하여(Wright *et al.*, 1997; 문 등, 2014) HPLC 분석 자체에 대한 표준화가 어려운 상황이다. HPLC 분석을 이용한 Chl *a* 농도 측정이 추천되고 있으나, 여과지 분쇄 과정에 많은 시간과 숙련이 요구된다는 점에 대해 본 연구에서는 여과지 분쇄과정을 생략한다면 어떠한 차이가 나타나며, 효과를 파악하여 이를 생략할 수 있을지 고찰하고자 한다. Wright *et al.*(1997)는 추출이 어려운 종의 단일배양 시료를 이용한 분쇄효과를 확인하여, 여과지 분쇄에 의한 광합성 색소의 추출효율이 62% 증가된 결과를 보고한 바 있다. 본 연구에서는 단일배양 시료가 아닌 현장시료로 분쇄효과를 확인해 보고자 한다. 미국 항공우주국(National Aeronautics and Space Administration, NASA)에서는 해상위성의 정확도를 향상시키기 위해 현장관측 자료를 이용하여 위성자료를 보정하고 있고, 그에 따른 정확한 현장자료를 위해 해양식물플랑크톤 색소 측정에 대한 표준 지침을 만드는 활동을 지속적으로 하고 있다(Mueller *et al.*, 2003). 이 지침에서는 여과지 분쇄를 필수적인 과정으로 제시하고 있지만, 한반도 해역에서 엽록소 농도 측정을 위한 여과지 분쇄의 효과를 확인한 결과가 없고, 분쇄효과에 대한 정량적 분석 결과도 알 수 없으므로 이에 대한 이해가 필요하다. 본 연구는 연구해역에서 식물플랑크톤 광합성 색소 분석 시 여과지 분쇄에 의한 Chl *a*와 carotenoids의 추출 효과를 규명하고, 분석시간 단축을 위한 여과지 분쇄 효과를 평가해 그 필요성을 고찰하고자 한다.

재료 및 방법

연구해역

동해 남서부 해역에서 2013년 9월 30일~10월 3일 동안 4일에 걸쳐 R/V 탐양호를 이용하여 2개 정선 14개 정점에서 해수 시료를 채취하여 그 중 40개의 시료를 이용해 광합성 색소분석을 실시하였다(Fig. 1). 탐양호에 장착된 CTD(SBE 911)의 Rosette sampling system에 Niskin 채수기를 부착하여 표준 수심(10 m, 20 m, 30 m, 50 m, 70 m, 100 m)에서 각각 해수 3 L를 채수하였다.

식물플랑크톤의 광합성색소 분석

채수한 해수시료는 현장에서 GF/F 여과지(47 mm)로 여과하고 광분해를 막기 위해 알루미늄 호일로 싸 후 드라이아이스에 저장하여 실험실로 운반하였다. 운반 후 시료 분석 전까지 초저온 냉동고(-80 °C)에 보관하였다. 색소 추출을 위해 여과지를 15 mL 유리관에 넣어 100% 아세톤 5 mL를 첨가하였고 초음파 분쇄를 10 분간 실시하여 세포를 파쇄한 후, 냉암소(4 °C)에서 24시간 이내로 보관하였다. 분쇄 시 발생할 수 있는 시료의 손실을 보정하기 위해서 내부표준물질로써 canthaxanthin 50 µL를 첨가하였다(Wright *et al.*, 1991). 여과지 분쇄 후의 추출효과를 확인하기 위해 여과지 분쇄 직전에 2000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상등액 1 mL를 취하여 300 µL의 3차 증류수와 잘 섞은 후 여과지 분쇄 전의 시료(non grinding, NGR)로 준비하였다. 1 mL를 취하고 남은 시료를 갈아 조식을 분쇄하여 위와 같은 방법으로 원심분리 후 상등액 1 mL를 취해 300 µL의 3차 증류수와 혼합하여 여과지 분쇄 후의 시료(grinding, GR)로 준비하였다. 혼합시료를 100 µL loop에 주입하여 HPLC를 이용해 광합성 색소를 정량 분석하였다. 표준색소의 정량 식은 Jeffrey에 의해 알려진 흡광계수(Jeffrey *et al.*, 1997)를 이용하여 Park and Park(1997)의 방법으로 계산하였다.

각 지표색소의 peak 동정은 표준 색소와 Retention Time을 비교하여 결정하였다. 표준 색소는 chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, peridinin, lutein, fucoxanthin, zeaxanthin, 19-hexanoyloxyfucoxanthin, alloxanthin, violaxanthin, 19-butanoyloxyfucoxanthin, diadinoxanthin, diatoxanthin (VKI, Denmark)을 구입하여 이용하였다. 식물플랑크톤의 지표색소인 광합성색소의 명칭에 대한 약어(Table 1)는 SCOR의 규정에 따랐다(Jeffrey and Vesk, 1997).

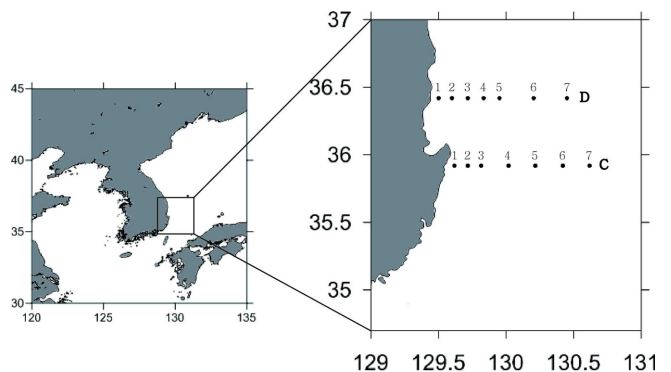


Fig. 1. Map of the study area.

Table 1. List of photosynthetic pigment standards and their abbreviations

Standard pigments	SCOR abbreviations	Class of phytoplankton
Chlorophyll <i>a</i>	Chl <i>a</i>	-
Chlorophyll <i>b</i>	Chl <i>b</i>	Chlorophyte
Alloxanthin	Allo	Cryptophyte
19'-Butanoyloxyfucoxanthin	But-fuco	Chrysophyte
19'-Hexanoyloxyfucoxanthin	Hex-fuco	Prymnesiophyte
Fucoxanthin	Fuco	Bacillariophyte
Peridinin	Perid	Dinophyte
Violaxanthin	Viola	-
Zeaxanthin	Zea	Cyanophyte
Diadinoxanthin	Diadino	-
Diatoxanthin	Diato	-
Lutein	Lut	Chlorophyte

Table 2. The R value of photosynthetic pigments

Pigment	R (n=40)	
	Range	Mean±SD
Chl <i>a</i>	0.24~0.98	0.55±0.20
Zea	0.15~0.98	0.47±0.20
Allo	0.38~1.03	0.60±0.22
But-fuco	0.23~0.86	0.52±0.22
Chl <i>b</i>	0.29~1.00	0.61±0.22
Diadino	0.15~0.94	0.47±0.24
Diato	0.32~1.04	0.60±0.19
Fuco	0.25~1.11	0.57±0.23
Hex-fuco	0.18~1.03	0.54±0.26
Lut	0.51~0.83	0.64±0.16
Viola	0.23~1.10	0.59±0.26
Perid	0.70~0.97	0.84±0.19

여과지 분쇄 효과 평가

식물플랑크톤의 그룹별 광합성 보조색소의 추출효과를 알아보기 위해서 여과지 분쇄를 하기 전 광합성 색소의 농도(C_{NGR})와 여과지를 분쇄한 후 광합성 색소의 농도(C_{GR})의 비(R)를 평가하였다.

$$R = \frac{C_{NGR}}{C_{GR}}$$

C_{NGR} : 여과지 분쇄를 생략한 광합성 색소 농도

C_{GR} : 여과지 분쇄 후 측정된 광합성 색소 농도

R이 1에 가까울수록 두 농도값의 차이가 작아 분쇄 효과가 미미하며, R이 1보다 작을수록 두 농도값의 차이가 크기 때문에 분쇄효과가 크고 분쇄 생략 시 불완전한 추출을 의미한다. 여과지 분쇄는 조류의 세포를 부수고 용매에 잘 스며들도록 하기 위해 전통 테프론 패스를 사용해 약 1분 동안 파쇄하였다(SCOR-UNESCO, 1966).

결과 및 토의

광합성 색소의 여과지 분쇄효과

HPLC 분석 시 전처리 과정 중 여과지 분쇄 효과를 확인하기 위해, 여과지 분쇄를 생략한 시료와 여과지를 분쇄한 시료의 분석 결과를 비교하여 Chl *a*와 carotenoids에 대한 분쇄효과를 살펴 보았다. 모든 분석 색소의 R값 범위, 평균값과 표준편차는 Table 2에 나타났다.

Chl *a*

연구 해석에서 Chl *a*에 대한 R값은 0.24~0.98의 범위를 보였고, 평균은 0.55(±0.20)이었다. 이는 여과지 분쇄에 의한 추출 증가가 확실함을 나타내며, 만일 분쇄 과정을 생략한다면 Chl *a* 농도는 2~76%, 평균 45% 과소평가된다고 할 수 있다.

Carotenoids

Carotenoids에 대한 R값은 0.15~1.11의 범위를 보였다. R값의 평균은 0.47~0.84이며, pico와 nano 크기의 지표색소인 But-fuco(Chrysophyte), Hex-fuco(Prymnesiophyte), Zea(Cyanophyte)의 평

균은 0.6 이하로 상대적으로 작게 나타났다. 상대적으로 크기가 큰 식물플랑크톤의 지표색소인 Fuco(Bacillariophyte), Lut(Chlorophyte), Perid(Dinophyte)의 경우 R값의 평균이 각각 0.57, 0.64, 0.84로 크기가 작은 식물플랑크톤에 비해 분쇄효과가 작았다. 따라서 크기가 작은 picoplankton 중 특히 Zea(Cyanophyte)는 R값이 가장 낮은 평균 0.47의 수준으로 여과지의 구멍에 갇혀 여과지 분쇄가 생략될 시 추출이 불완전하고 상당히 낮은 농도로 검출될 가능성이 크다(Mantoura *et al.*, 1997; Wright *et al.*, 1997).

R값이 1 보다 크게 나타나는 경우는 여과지 분쇄 후의 농도보다 분쇄 전의 농도가 더 높은 것으로, 이는 분쇄 과정 중 발열 등으로 인한 손실의 가능성이 있다고 보고된 바 있다(Downes *et al.*, 1993; Downes and Hall, 1998).

이전 연구 중, Wright *et al.*(1997)에 의한 분쇄효과의 영향을 본 연구와 비교해보면, 본 연구에서 정의한 R값으로 비교했을 때 0.16~1.16의 범위를 가지며, 이는 본 연구결과와 유사한 범위이다. Wright 등은 *Nannochloris atomus*, *Tetraselmis suecica*, *Phaeodactylum tricorutum* 세 종을 선택해 여러 방법에 따른 추출효율을 비교하였다. *N. atomus*와 *T. suecica*는 추출이 어려운 녹조류이며, *P. tricorutum*는 추출이 쉬우나 염록소 분해 효소 작용이 높은 규조류이다. 가장 효율적인 추출이 가능했던 methanol과 dimethylformamide를 이용한 초음파 추출 결과를 100% 기준으로 각각의 다른 추출 방법에 따른 모든 광합성색소의 추출 효율을 퍼센트로 나타냈다

Table 3. Percentage extractibility in each treatment (all pigments)

	100% Acetone			R (Sonic/Soak +Grind)
	Sonic	Grind	Soak+Grind	
<i>Nannochloris atomus</i>				
Fresh	15	68	85	0.18
Frozen	12	60	74	0.16
<i>Tetraselmis suecica</i>				
Fresh	64	81	84	0.76
Frozen	80	80	69	1.16
<i>Phaeodactylum tricorutum</i>				
Fresh	66	84	87	0.76
Frozen	71	71	72	0.99

*Wright *et al.* (1997)

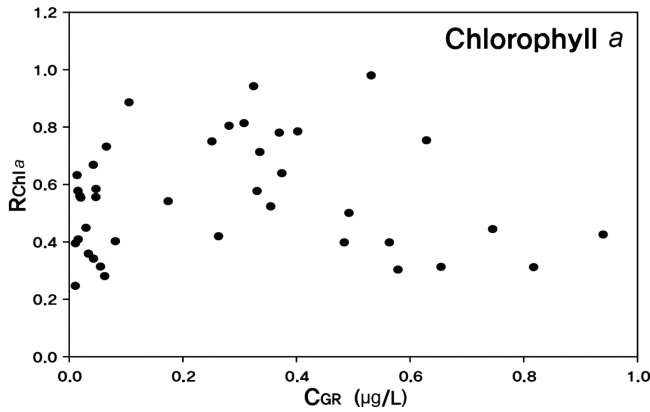


Fig. 2. The relationship between Chl *a* concentration and the $R_{Chl a}$.

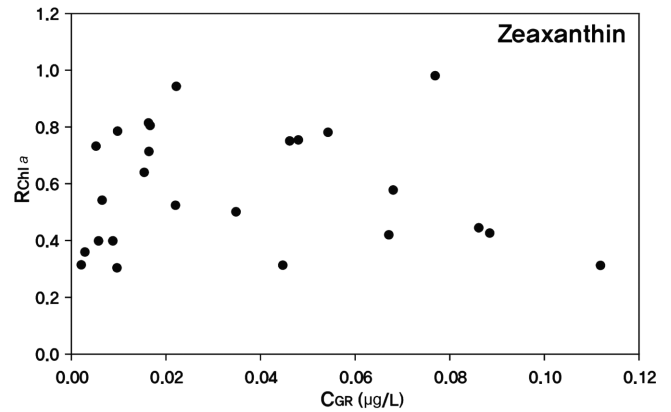


Fig. 3. The relationship between Zeaxanthin concentration and the $R_{Chl a}$.

(Table 3). 그 결과, 100% 아세톤을 용매로 사용했을 경우 냉동한 시료에서 초음파 추출만을 거쳤을 때보다 냉암소 추출 후 여과지를 분쇄 시 추출 효율은 *T. suecica*에서는 예외적으로 11% 낮게 나타났지만, *N. atomus*에서 62%, *P. tricorutum*에서 1% 높게 나타났다. 따라서 전체적으로 초음파 분쇄만을 실시했을 때 보다 여과지 분쇄 시 더 높은 추출효율을 보여주었다.

색소 농도에 따른 $R_{Chl a}$

Chl *a* 농도에 따른 $R_{Chl a}$ 값에서, Chl *a* 농도가 낮을수록 큰 R값을 예상했으나 실제로는 Chl *a* 농도가 높은 시료에서도 낮은 R값으로 수렴하는 양상을 보였다(Fig. 2). 낮은 Chl *a* 농도의 경우 R값이 넓은 범위를 보이며 분산되어 있지만 높은 Chl *a* 농도의 경우는 낮은 R값이 얻어졌다. Chl *a* 농도가 0.5 µg/L 미만일 경우(n=32) 평균 R값은 0.56±0.18, 0.5 µg/L 이상일 경우(n=8) 0.49±0.25으로, 높은 Chl *a* 농도에서 분쇄효과가 더 크게 나타났다. 즉, 높은 농도의 Chl *a* 시료의 경우에는 분쇄효과가 대체로 크게 나타나며 낮은 농도의 Chl *a* 시료 측정 시에도 분쇄과정을 생략한다면 변화 폭이 매우 큰 오차가 예상된다. 따라서 분쇄과정 생략 시, Chl *a* 농도는 2~76% 범위 내의 차이와 평균 45% 과소 평가됨을 보였다. 높은 농도의 Chl *a* 시료의 수가 부족했기 때문에, 추후에 많은 수의 시료를 이용해 Chl *a* 농도에 따른 $R_{Chl a}$ 값에 대한 확인이 필요할 것으로 판단된다.

Picoplankton 중 *Synechococcus*와 같은 작은 크기의 식물플랑크톤의 불완전한 추출에 대한 영향을 보기 위해 cyanophytes의 지표색소인 Zea 농도에 따른 $R_{Chl a}$ 값을 살펴보았다. Zea 농도가 높은 시료일수록 $R_{Chl a}$ 값은 낮아지는 경향을 보였다(Fig. 3). 이는 picoplankton 크기의 Zea이 많이 포함된 시료일수록 여과지 분쇄 생략 시 완전한 추출이 불가능하고 여과지 분쇄효과가 크게 나타남을 의미한다.

$R_{Chl a}$ 의 수평 분포

분석된 전 정점의 결과 중, 수직, 수평적인 농도 분석의 경향을 보기 위해서 D transect의 시료 분석 값을 이용하였다. D transect의 0 m(D1, D2, D4, D6, D7) 또는 10 m(D3, D5)에서 모든 광합성 색소에 대한 R값을 비교해본 결과, Chl *a*의 경우 연안보다 외양에서 낮은 R값을 보였다(Fig. 4a). 외양의 높은 Chl *a* 농도를 보여 Chl *a* 농도가 높을 때 낮은 R값을 보이는 것을 확인할 수 있다. 50 m 이하의 수심에서 Chl *a*에 대한 R값 또한 외양에서 낮은 R값을 나타내는 것을 확인하였다. 또한 Chl *a*에 대한 Zeaxanthin의 비중이 연안에 비해 외양에서 훨씬 높았고(Fig. 4b), 이러한 결과로 보아 상층과 저층 모두 연안에서 멀어질수록 pico 크기의 fraction 증가로 인한 영향으로 분쇄에 의한 추출 효과가 큰 것으로 판단된다(Iriarte and Purdie, 1994; Park, 2006). Carotenoids 또한 외양으로 갈

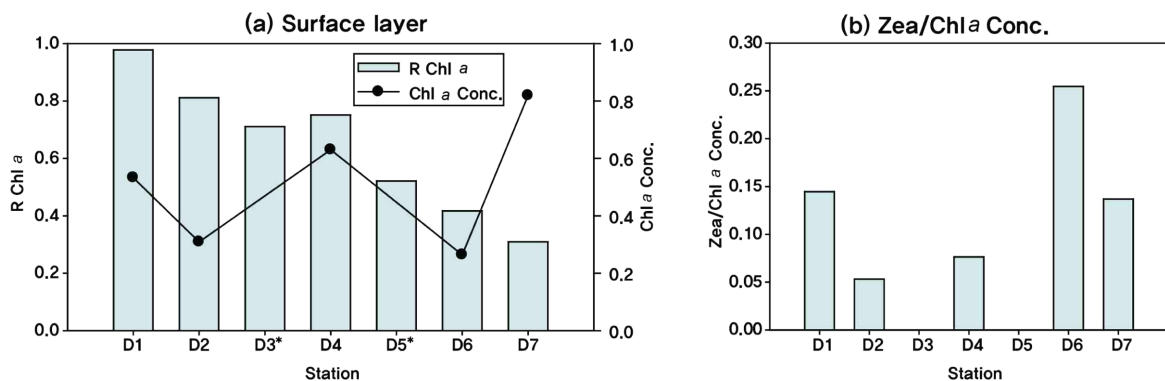


Fig. 4. The relationship between $R_{Chl a}$ and Chl *a* concentration (a) and the concentration ratio of Zeaxanthin to Chl *a* (b) at the surface along D transect (* $R_{Chl a}$ from samples at 10 m depth).

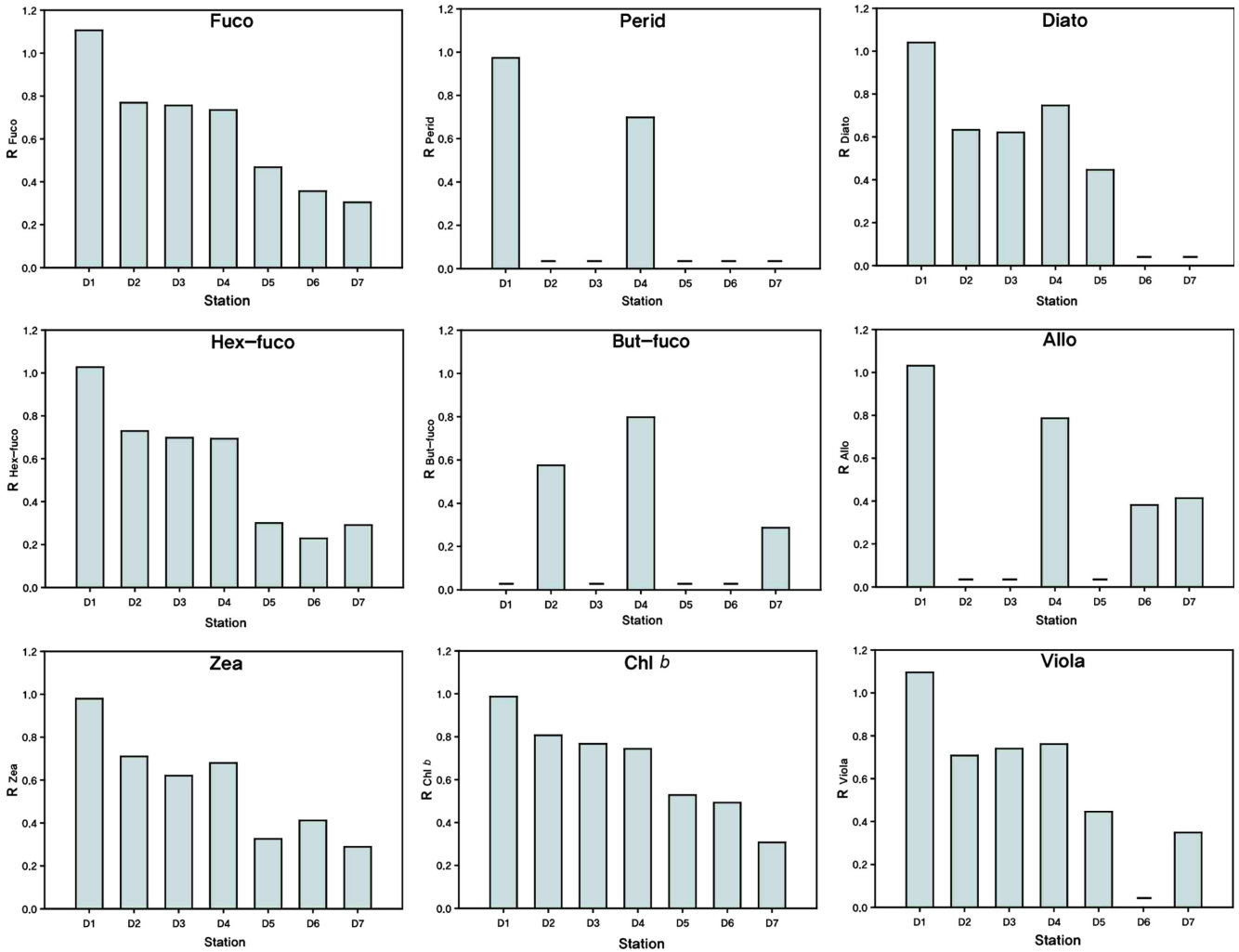


Fig. 5. R values of each pigments at the surface along D transect. (-: Not detected, D3·D5 : 10 m depth)

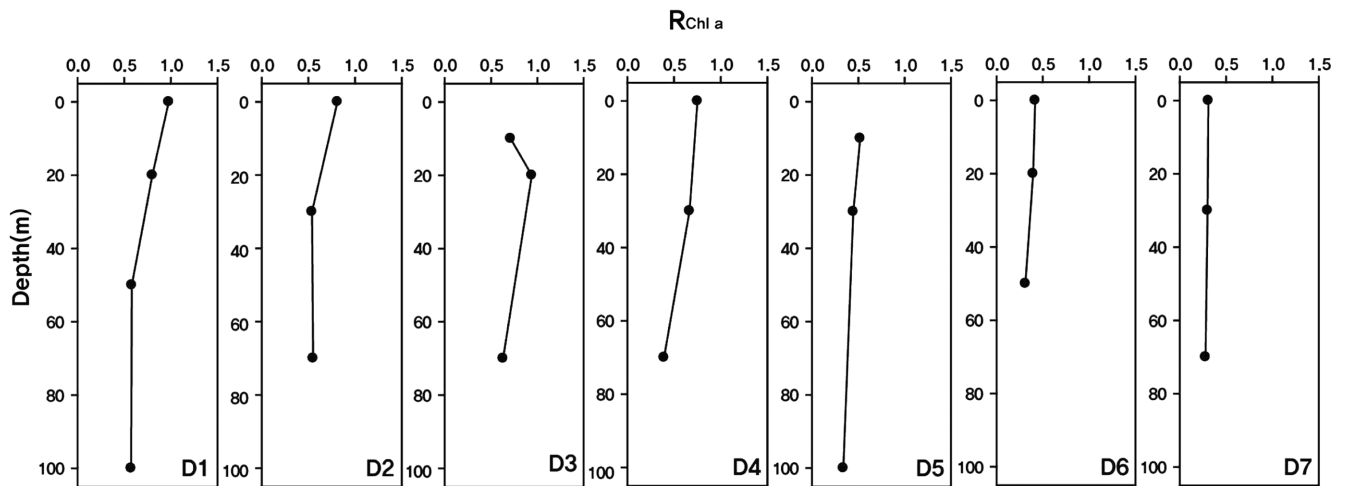


Fig. 6. Vertical profiles of the $R_{Chl a}$ at D transect.

수록 $R_{Chl a}$ 가 감소하는 경향을 보였다(Fig. 5). 특히, Fucoxanthin은 비교적 크기가 큰 Bacillariophyte의 지표색소이므로 여과지 분쇄 유무에 따른 효과가 적을 것이라고 예상했지만 Chl a와 마찬가지로

로 Fucoxanthin의 농도가 높을수록 여과지 분쇄효과는 크게 나타났다. 따라서 수평분포에서 본 대부분의 carotenoids는 크기에 상관없이 모두 분쇄효과가 나타났다. 즉, 크기가 작은 식물플랑크톤

이 많을수록 추출이 불완전할 것이라고 예상했지만, 본 연구결과에서 전체 Chl *a* 농도가 높을수록 분쇄효과가 크게 나타나는 결과를 얻었고 식물플랑크톤의 크기가 큰 경우와 작은 경우 모두 다 여과지 분쇄 과정이 생략되면 불완전한 추출이 이루어질 것으로 여겨진다. Chl *a* 뿐만 아니라 모든 광합성 색소들의 분석에 있어서 외양으로 갈수록 분쇄 전후의 농도차이가 커지는 것을 확인할 수 있었다.

$R_{Chl a}$ 의 수직분포

D line의 7개 정점에서 연안에서는 수심이 깊어질수록 $R_{Chl a}$ 값이 감소하는 경향을 보였고, 외양에서는 표층과 유사하게 낮은 $R_{Chl a}$ 값을 보였다(Fig. 6). 표층에서 R값의 범위는 0.31~0.98 (0.64 ± 0.24) 이었고, 저층의 범위는 0.28~0.63(0.44 ± 0.14) 이었다. 수심이 깊어짐에 따른 $R_{Chl a}$ 값의 감소는 혼합층 아래에서 Chl *b* 와 But-fuco를 포함하는 pico, nano 크기 식물플랑크톤 fraction의 증가로(Park, 2006), 그에 따른 불완전한 추출이 한가지 요인으로 추정된다.

결론

국내에서 Chl *a* 농도 측정은 많은 연구자들에 의해 다양한 방법이 사용되어 측정되고 있기에 생산된 자료들의 직접적인 비교가 어려운 실정이다. SCOR-UNESCO Working Group에 의해 HPLC를 이용한 Chl *a* 농도 측정이 추천되고 있으나 HPLC 분석 방법에 대한 표준화가 어렵고, 전처리 중 여과지를 분쇄하는 과정에 시간과 노력이 요구되기 때문에 이 과정을 생략 시 나타나는 차이에 대해 살펴보고 생략이 가능한지 고찰해보고자 하였다.

본 연구결과, 연구 해역에서 여과지 분쇄 생략 시 예상대로 측정값의 오차가 관찰되었으며, Chl *a*의 경우 2~76% 과소평가 될 가능성이 있다고 본다. Chl *a*의 농도에 따라 분쇄효과가 다르게 나타나는데, Chl *a* 농도가 높은 경우 분쇄효과가 크게 나타났으며, 낮은 농도의 Chl *a* 시료의 경우에는 분산 범위가 매우 큰 오차가 나타났다. Chl *a* 농도가 0.5 $\mu\text{g/L}$ 보다 높은 경우 평균 58%, 낮은 경우 평균 44% 과소평가 되었으며, 높은 농도의 Chl *a*의 경우 분쇄효과가 더 크다고 판단된다. Chl *a* 뿐만 아니라 carotenoids에서도 여과지 분쇄효과가 확인 되었다. 특히 pico, nano 크기 식물플랑크톤의 지표색소인 Zea, But-fuco, Hex-fuco는 여과지의 구멍에 숨겨져 특히 분쇄효과가 크게 나타난 것으로 판단된다. 또한 연안에서 외양으로 갈수록 분쇄효과가 크게 나타났는데 이는 크기가 작은 pico 또는 nanoplankton의 비중이 상대적으로 커지기 때문에 여과지 분쇄 생략 시 이들의 불완전 추출에 의한 영향이 크게 나타난 것과 더불어 Chl *a* 농도가 높을수록 여과지 분쇄효과가 커지는 경향이 수반된 결과인 것으로 판단된다.

높은 Chl *a* 농도의 시료가 많지 않아 추후에 더 많은 개수의 고농도 Chl *a* 시료를 확보해 확인할 필요가 있다. 또한 size fraction 실험결과를 얻는다면 여과지 분쇄 효과에 의한 차이의 원인에 대해 더 나은 이해가 가능할 것으로 보인다. 따라서 본 연구해역에서 여과지 분쇄는 생략할 수 없는 중요한 과정으로 판단되며, 본 연구해역 뿐 아니라 한반도의 다른 해역에서의 분쇄 효과를 추후 확인할 필요가 있다고 본다.

사사

이 논문은 부경대학교 해양과학공동연구소의 지원을 받아 수행 하였습니다. 조사 시 협조해주신 탐양호의 선장님을 비롯한 모든 선원분들과 논문의 완성도를 높이는 데 큰 도움을 주신 심사자분들께 감사드립니다.

참고문헌(References)

- Moon C.R., D.J. Kang, M.O. Park, J.H. Noh, S.J. Yoo, J.E. Moon, K.H. Shin, Y.S. Kim, J.K. Choi, Y.S. Suh, 2014. An Inter-Laboratory Comparison Study on Chlorophyll *a* Determination in Seawater. *Journal of the Korean Society of Oceanography*, **19**: 76–87.
- Downes, M.T., L. Hrstich and W.F. Vincent, 1993. Extraction of chlorophyll and carotenoid pigments from Antarctic benthic mats for analysis by HPLC. *Journal of Applied Phycology*, **5**(6): 623–628.
- Downes, M.T., J.A. Hall, 1998. A sensitive fluorometric technique for the measurement of phycobilin pigments and its application to the study of marine and freshwater picoplankton in oligotrophic environments. *Journal of Applied Phycology*, **10**: 357–363.
- Gibb, S.W., D.G. Cummings, X. Irigoien, R.G. Barlow, R. Fauzi and C. Mantoura, 2001. Phytoplankton pigment chemotaxonomy of northeastern Atlantic. *Deep Sea Res. II*, **48**: 795–823.
- Gieskes, W.W. and G.W. Kraay, 1983. Unknown chlorophyll *a* derivatives in the North Sea and the tropical Atlantic Ocean revealed by HPLC analysis. *Limnol. Oceanogr.*, **28**: 757–766.
- Holm-Hansen, O., C.J. Lorenzen, R.W. Holmes and J.D.H. Strickland, 1965. Fluorometric determination of chlorophyll. *J. Cons. perm. int. Explor. Mer.*, **30**: 3–15.
- Iriarte A, Purdie D.A., 1994. Size distribution of Chl *a* biomass and primary production in a temperate estuary (Southampton Water): The contribution of photosynthetic picoplankton. *Marine Ecology Progress Series*, **115**: 283–297.
- Jeffrey, S.W. and M. Veski, 1997. Introduction to marine phytoplankton and their pigment signatures. In: *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods*. edited by Jeffrey, S.W., R.F.C. Mantoura and S.W. Wright, UNESCO, Paris, 37–84 pp.
- Jeffrey, S.W. and R.F.C. Mantoura, 1997. Development of pigment methods for oceanography: SCOR-supported working groups and objectives. In: *Phytoplankton Pigments in Oceanography*, edited by Jeffrey, S.W., R.F.C. Mantoura, S.W. Wright, UNESCO, Paris, 19–36 pp.
- Jeffrey, S.W., R.F.C. Mantoura and Wright, S.W. (eds.), 1997. *Phytoplankton Pigments in Oceanography*. UNESCO Publishing, Paris.
- Legendre, L. and J. Le Fevre, 1995. Microbial food webs and the export of biogenic carbon in oceans. *Aquat. Microb. Ecol.*, **9**: 69–77.
- Legendre, L. and J. Michaud, 1998. Flux of biogenic carbon in oceans: size dependant regulation by pelagic food webs. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **164**: 1–11.
- Lorenzen, C.J. and S.W. Jeffrey, 1980. Determination of chlorophyll in seawater. *UNESCO Tech. pp. Mar. Sci.*, **35**: 1–20.
- Longhurst, A.R., 1991. Role of the marine biosphere in the global carbon cycle. *Limnol. Oceanogr.*, **36**: 1507–1526.

- Mackey, D.J., H.W. Higgins, M.D. Mackey and D. Holdsworth, 1998. Algal class abundances in the western equatorial Pacific: Estimation from HPLC measurements of Chloroplast pigments using CHEMTAX. *Deep-sea Res. I*, **45**: 1441–1468.
- Mantoura, R.F.C. and C.A. Llewellyn, 1983. The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, **151**: 297–314.
- Mantoura, R.F.C., S.W. Wright, S.W. Jeffrey, R.G. Barlow and D.E. Cummings, 1997. Filtration and storage of pigments from microalgae. In: *Phytoplankton Pigments in Oceanography*, edited by Jeffrey, S.W., R.F.C. Mantoura, S.W. Wright, UNESCO, Paris, 283–305 pp.
- Mueller, J.L., R.R. Bidigare, C. Trees, W.M. Balch, J. Dore, D.T. Drapeau, D. Karl, L. Van Heukelem, J. Perl, 2003. Ocean optics protocols for satellite ocean color sensor validation, revision 5, volume 7: HPLC Phytoplankton pigments: Sampling, Laboratory Methods, and Quality Assurance Procedures. edited by Mueller, J.L., Fargion, G.S., McClain, C.R., NASA Tech. Rep. 5, vol. V. NASA Goddard Space Flight Center, 5–14 pp.
- Park, M.O., 2006. Composition and distribution of phytoplankton with size fraction results at Southwestern East/Japan Sea. *Ocean Science Journal*, **41**(4): 301–313.
- Park, M.O. and J.S. Park, 1997. HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *J. Korean Soc. Oceanogr.*, **32**: 46–55.
- Pinckney, J.R.P. and R. Zingmark, 1994. Comparison of high performance liquid chromatographic, spectrophotometric and fluorometric methods for determining chlorophyll a concentrations in estuarine sediments. *J. Microbiol. Methods*, **19**: 59–66.
- Plante-Cunney, M.R., C. Barranguet, D. Bonin and C. Grenz, 1993. Does chlorophyllide a reduce reliability of chlorophyll a measurements in marine coastal sediments? *Aquat. Sci.*, **55**: 19–30.
- Riaux-Gobin, C., C.A. Llewellyn and B. Klein, 1987. Microphytobenthos from two subtidal sediments from North Brittany. II. Variations of pigment compositions and concentrations determined by HPLC and conventional techniques. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **40**: 275–283.
- Rowan, K.S., 1991. *Photosynthetic Pigments of Algae*. Cambridge University Press, 95–110 pp.
- Schlutter, L., F. Mohlenberg, H. Havskum and S. Larsen, 2000. The use of phytoplankton pigments for identifying and quantifying phytoplankton groups in coastal areas: testing the influence of light and nutrients on pigment/chlorophyll a ratio. *Marine Ecology Progress Series*, **192**: 49–63.
- SCOR-UNESCO Working Group 17, 1966. *Determination of Photosynthetic Pigments in Seawater*. UNESCO Monographs on Oceanographic Methodology, I, Paris, 69pp.
- Strickland, J. D. and T. R. Parsons, 1972. *A practical handbook of seawater analysis*. 2nd ed. Bull. Fish. Res. Bd. Can., pp. 167.
- Tester, P.A., M.E. Greesey, C. Guo, H.W. Paerl and D.F. Millie, 1995. Evaluating phytoplankton dynamics in the Newport River estuary (North Carolina, USA) by HPLC-derived pigment profiles. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **124**: 237–245.
- Trees, C.C., R.R. Bidigare and J.M., Brooks, 1986. Distributions of chlorophylls and phaeopigments in the Northwestern Atlantic Ocean. *J. Plan. Res.*, **8**: 447–458.
- Wright, S.W. and J.D. Shearer, 1984. Rapid extraction and high performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *J. Chromatogr.*, **294**: 281–295.
- Wright, S.W., S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura, 1997. Evaluation of methods and solvents for pigment extraction. In: *Phytoplankton Pigments in Oceanography*, edited by Jeffrey, S.W., R.F.C. Mantoura, S.W. Wright, UNESCO, Paris, 261–282 pp.
- Wright, S.W., S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura, C.A. Llewellyn, T. Bjornland, D. Repeta, N. Welschmeyer, 1991. Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **77**: 183–196.

2014년 9월 19일 원고접수

2014년 12월 15일 수정본 접수

2015년 5월 11일 수정본 채택

담당편집위원: 박철