

유독 와편모조류 *Alexandrium catenella*와 *A. pacificum*의 성장과 마비성 독소 생산에 미치는 빛의 파장의 영향

남기택* · 김석윤** · 문창호** · 김창훈*** · 오석진**†

* 부경대학교 해양학과 석사과정, ** 부경대학교 해양학과 교수, *** 부경대학교 해양바이오신소재학과 교수

Effects of Light Wavelengths on the Growth and Paralytic Shellfish Toxin Production of *Alexandrium catenella* and *A. pacificum*

Ki Taek Nam* · Seok-Yun Kim** · Chang-Ho Moon** · Chang-Hoon Kim*** · Seok Jin Oh**†

* Master's Course, Department of Oceanography, Pukyong National University

** Professor, Department of Oceanography, Pukyong National University

*** Professor, Department of Marine Bio-materials and Aquaculture, Pukyong National University

요 약 : 본 연구는 마비성 독소 표준물질의 안정적인 공급을 위해 친환경적이고 경제성이 우수한 발광다이오드 광원의 파장을 이용하여, PST의 원인종 *Alexandrium catenella*와 *A. pacificum*의 독 함량을 증대시킬 수 있는 가능성을 살펴보았다. 파장별 광량과 성장속도의 관계를 보면, 반포화상수(K_s)는 두 종 모두 적색파장에서 가장 높게 나타났고, 청색파장에서 가장 낮았다. 빛 파장에 따른 독함량의 경우, 적색 파장이 *A. catenella*은 최고 약 8배 그리고 *A. pacificum*은 약 3.4배 다른 파장보다 높았다. 그리고 광량에 대한 친화성을 나타내는 K_s 와 독농도와 밀접한 관련이 있는 것으로 나타났다. 따라서 세포당 독농도 증가를 위한 배양법은 초기에 세포수량의 확보 및 빠른 성장속도를 유도하기 위해서 청색파장을, 대수성장기 후기에는 적색파장을 주사하여, 세포내 독함유량을 증가시킬 수 있는 2단계 배양법을 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

핵심용어 : *Alexandrium catenella*, *Alexandrium pacificum*, 마비성패독, 발광다이오드, 반포화상수, 적색파장

Abstract : To supply a stable amount of standard material to detect paralytic shellfish toxin (PST), we examined possible increases in toxic content in *Alexandrium catenella* and *A. pacificum* using a light emitting diode (LED), which is one of the most eco-friendly and economical lighting method. When comparing the growth rates of organisms and wavelengths of light used, the half saturation constants (K_s) of red wavelength were higher than those of other wavelengths. In contrast, the K_s of blue wavelength were lower than those of other wavelengths. Moreover, when comparing the toxic contents and wavelengths of light used, red wavelength produced approximately 8 times more toxic content in *A. catenella* and approximately 3.2 times more toxic content in *A. pacificum* than other wavelengths. Thus, the toxic content present in the organism might be closely related to the K_s of light. The optimum light source to be used to ensure economically effective and productive growth in an *Alexandrium* culture system (photo-bioreactor) would likely consist of a two-phase culture, wherein a blue LED is used during the lag and exponential phases to increase growth rates, followed by the use of a red LED during late exponential and stationary phases to achieve increased PST yields.

Key Words : *Alexandrium catenella*, *Alexandrium pacificum*, Paralytic shellfish toxin (PST), Light emitting diode (LED), Half saturation constants (K_s), Red wavelength

* First Author : nkt6699@naver.com, 051-629-6576

† Corresponding Author : sjoh1972@pknu.ac.kr, 051-629-6576

1. 서론

마비성 독소(Paralytic shellfish toxin; PST)은 연안환경에서 오래 동안 알려져 왔으며, 최초의 구조가 밝혀진 독성분은 saxitoxin이다. 화학적 구조는 1975년 X선 결정 해석법으로 판별되었으며, 그 후 다수의 이성질체가 발견되어, 현재 30종 이상의 이성질체가 있는 것으로 알려져 있다(Oshima, 1995). 통상 가열 조리로 완전히 분해가 되지 않으며, 생체막의 전위의존성나트륨채널에 작용하여 나트륨이온의 유입을 단절시켜 독성을 유발시킨다. 우리나라에서 PST에 의한 중독 사고는 1986년 부산 감천항에서 중독 환자가 발생하여 사망한 사고가 공식적으로는 보고되었으며, 1996년 경남 거제에서도 사망사건이 발생하였다(Chang et al., 1987; Lee et al., 1997). 더욱이 매년 우리나라 연안역에서 PST의 기준치 초과(허용 기준치: 80 µg/100 g)에 따라 양식 이매패류의 출하가 금지되고 있다(Oh et al., 2012).

PST를 주로 유발시키는 원인종인 *Alexandrium* spp.는 1970년대에 주로 미국, 유럽, 일본 및 호주 등 대부분 북반구의 온대지역에서 우세하게 출현하였지만, 1990년대 이후 출현 해역은 점차 확대되고 있는 실정이다(Hallegraeff, 1993). 국내 연안에서 *Alexandrium* 속의 최초 출현보고는 1978년이며, 약 20여 종의 *Alexandrium* 속종에서 *A. catenella*, *A. affine*, *A. insuetum*, *A. tamarense*, *A. minutum*, *A. fraterculus* 등 약 6여 종이 출현하는 것으로 보고되어 있다(Shin et al., 2014). 그 중 우리나라에서는 *A. catenella*와 *A. pacificum*이 PST를 발생시키는 대표적인 원인종으로 알려져 있다(Kim et al., 2002; Oh et al., 2012; Kim et al., 2017).

Alexandrium 속은 다른 식물플랑크톤처럼 수온, 염분, 조도 및 영양염 등 물리·화학적 환경요인에 의해 성장속도가 결정되며, 독함량 혹은 독생산에도 직접적인 영향을 준다고 알려져 있다(Hwang and Lu, 2000; Hamasaki et al., 2001; Etheridge and Roesler, 2005; Han et al., 2016). 그 중 광량의 변화는 광합성 과정에서 독소 생합성 및 여러 생리학적 변화에 영향을 미칠 수 있기 때문에 중요한 요인으로 작용하고, 성장동안 빛에 의한 스트레스는 성장과 독소생산에 영향을 미친다. 빛의 파장은 해양의 시공간적으로 달라지는 파장의 영향으로 종우점 및 천이에도 영향을 미칠 수 있으며, 다양한 광합성 색소 반응성에 따라 세포 내 생화학적 조성 및 함유량을 변화시킬 수 있어, 유용물질 증대 등 산업적인 분야에 많은 활용이 기대되고 있다(Mouget et al., 2004; Saavedra and Voltolina, 1994; Oh et al., 2015; Han and Oh, 2018).

한편 우리나라의 패류독소 모니터링 프로그램은 동물시험법을 기본으로 하고 있지만, 분석 한계가 종에 따라 달라지며, 정확한 사망시간 측정에 많은 인력이 소요되고, 시험

동물의 대량희생이 수반되기 때문에 윤리적인 문제가 대두되고 있다. 또한 독 조성을 알 수 없기 때문에 동물시험법의 사용빈도를 줄이거나 완전히 배제할 수 있는 대체 시험법을 찾는 것이 바람직하다는 분위기가 조성되고 있다(Suzuki, 2007). 가까운 일본의 경우, 2015년부터 PST의 분석이 동물시험법에서 고속 액체 크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography; HPLC)로 변경되었다(Suzuki et al., 2017). 이로 인하여 고품질의 표준물질이 필요로 하게 되어, 일본수산청(水産廳) 및 농수성소비·안전국(農水省消費·安全局) 주관으로 PST 표준물질을 자국에 공급하고 있다(Suzuki et al., 2017). PST 표준물질은 원인종의 대량배양으로 수확하여 추출하기 때문에 보다 인위적인 환경조절을 통하여 PST 원인종의 독력을 극대화 시킬 필요가 있어, 많은 예비실험이 필수적이다.

본 연구는 PST 표준물질 및 해양천연소재 물질의 공급을 위하여 친환경적이고 경제성이 우수한 발광다이오드(Light emitting diode; LED) 광원의 파장을 이용하여, PST의 원인종 *A. catenella*와 *A. pacificum*의 독 함량을 증대시킬 수 있는 가능성을 살펴보는 데 있다. 만약, 파장에 따라 PST의 증가 특성을 알게 된다면, 대량배양에 응용하여 고품질 표준물질 및 근육활성억제와 같은 해양천연신소재의 대량생산에 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

2. 재료 및 방법

2.1 LED 파장에 따른 마비성 독소 원인 플랑크톤 *Alexandrium catenella*와 *A. pacificum* 성장 특이성 파악

본 연구에서 사용된 *A. catenella*는 국립수산물과학원(KNU-YS-01)으로부터, *A. pacificum*은 한국해양과학기술원 해양시료도서관(LIMS-PS-2729)으로부터 분양 받은 종을 사용하였다. 먼저 파장에 따른 *A. catenella*와 *A. pacificum*의 성장특성을 파악하기 위해서, 각각의 유독 와편모조류를 수온 20°C, 염분 30 psu, 광량 300 µmol m⁻²s⁻¹(12L:12D; cool-white fluorescent lamp)에서 대수생장기 중기까지 전배양을 수행하였다. 그 후 9 ml 배양 튜브(DH. TT10100, DAIHAN, Won-ju)에 5 ml f2 배지를 주입하고, 최종세포가 100 cells ml⁻¹가 되도록 접종하였다. 파장의 광원은 백색광으로 형광램프(fluorescent lamp)를 이용하였으며, 단일파장은 청색 LED(λ_{max} = 450 nm; LUMILEDS), 녹색 LED(λ_{max} = 525 nm; LUMILEDS) 그리고 적색 LED(λ_{max} = 650 nm; LUMILEDS)를 이용하였다. 광량은 총 8단계(10, 30, 50, 75, 100, 150, 200, 300 µmol m⁻²s⁻¹)로 조절하였으며, 세포 밀도의 증감을 확인하기 위해서 이를 간격으로 동일한 시간에 형광광도계(10-AU-Fluorometer, Tuner Designs)를 통하여 *in vivo* chlorophyll 형광값을 측정하였다. 직접검정에 따른 세

포밀도를 확인하기 위해서는 배양튜브의 개폐가 반드시 필요하지만, 형광값의 측정은 형광광도계에서 직접 측정 가능한 배양튜브를 활용하기 때문에, 2차 오염을 방지할 수 있으며, 신속하게 대량의 샘플을 처리할 수 있다. 세포의 성장속도(growth rate; μ)는 대수성장기(exponential growth)를 보였던 기간 동안의 형광값을 이용하여 다음 식(1)에 의해 계산하였다.

$$\mu = \frac{1}{\Delta t} \ln \frac{N_t}{N_0} \quad (1)$$

μ : 성장속도(specific growth rate; day⁻¹)

N_0, N_t : 대수성장기에서 초기와 t시간(day) 후의 형광값

Δt : 대수성장기 기간(day)

파장 실험은 triplicate로 수행하였으며, 성장속도는 이들의 평균값으로 나타냈다. 단, 오류로 판명된 값은 제외하여 계산하였다. 성장속도와 광량의 관계를 Lederman and Tett (1981)의 모델을 개량한 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{I - I_0}{(K_s + I_0) + (I - I_0)} \quad (2)$$

μ : 성장속도(specific growth rate; day⁻¹)

μ_{\max} : 최대성장속도(maximum specific growth rate; day⁻¹)

I: 광량(irradiance; $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)

I_0 : 보상광량(compensation PFD; $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)

K_s : 반포화광량(half-saturation light intensity; $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)

2.2 LED 파장에 따른 마비성 독소 원인 플랑크톤 *Alexandrium catenella*와 *A. pacificum*의 독함량 변화 파악

파장에 따른 *A. catenella*와 *A. pacificum*의 독농도 및 독성변화를 파악하기 위해서 수온 20°C 염분 30 psu, 광량 300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (12L:12D; cool-white fluorescent lamp)에서 대수성장 중기까지 성장시킨 후, 200 ml 배양플라스크에 부산 청사포에서 채수한 해수를 바탕으로 한 f/2배지 100 ml에 최종 세포밀도가 약 $2.0 \times 10^2 \text{ cells ml}^{-1}$ 이 되도록 집중하였다. 파장의 광원은 전술한 백색광, 청색 LED, 녹색 LED 그리고 적색 LED를 이용하였다. 수온 20°C, 염분 30 psu, 광량 50, 100과 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (12L:12D; cool-white fluorescent lamp) 조건에서 수행되었으며 대수성장기 후기의 세포를 수확하여 PST를 분석하였다. PST를 분석하기 위한 시료의 전처리에는 대수성장기 후기의 *A. catenella*와 *A. pacificum*를 반복 계수한 후, 배

지 성분 제거를 위하여 원심 분리하여 상등액을 제거하였다. 그 후 0.5 N acetic acid를 첨가하고, -20°C에 24시간 냉동보관 후 초음파 파쇄기를 이용하여 파쇄한 후, 원심 분리하여 상등액을 분취하였다. 분취한 상등액을 한외여과기(Ultrafree-MC; M. W., 10,000, Millipore, Massachusetts)에 넣어 한외여과 후, 얻어진 여과 시료를 분석 전까지 -20°C에 보관하였다. PST의 분석은 역상계 컬럼(Hypersil GOLD C8 column; 250 mm × 4.6 mm; Thermo Scientific, Massachusetts)으로 각 성분을 분리한 후, 형광검출기로 분석하는 post-column 법(Oshima, 1995)을 이용하였다. 분석에 사용된 표준독소는 National Research Council Institute for Marine Biosciences (Halifax, NS, Canada)에서 얻어졌으며, 분석된 시료의 독농도는 표준독소와의 상대 면적비로부터 계산하였다. 또한 독농도(fmole cell⁻¹)를 독성(STXeq)을 전환시키기 위해서 Oshima(1995)가 제안한 toxicity equivalent factors(TEFs)를 활용하여 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 LED 파장에 따른 마비성 독소 원인 플랑크톤 *Alexandrium catenella*와 *A. pacificum* 성장 특이성

*A. catenella*는 파장별 광량이 증가함에 따라 형광값이 증가하였으며, 일정광량 이상의 조건에서는 형광값이 변하지 않았다. 백색광은 10 ~ 30 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 청색파장은 10 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 녹색파장은 10 ~ 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 그리고 적색파장은 10 ~ 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 광량에서 형광값의 변화가 크지 않았다. 하지만, 각 파장별로 그 상위 광량에서 시간에 따라 점차 증가하는 양상을 나타내었으며, 높은 광량일수록 대수성장기 후기 및 퇴조기에서 형광값이 높았다(Fig. 1).

각 파장별 성장곡선을 바탕으로 성장속도를 구하여 본 결과, 백색광에서의 성장속도는 10 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서 가장 낮은 성장속도를 보였고, 광량이 증가할수록 성장속도가 증가하였으며, 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 과 300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서 0.30과 0.36 day⁻¹로 나타냈다. 청색파장에서 10 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서 가장 낮은 성장속도를 보였고(0.01 day⁻¹), 광량 증가와 함께 증가를 하였다. 150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 이상에서 가장 높은 성장속도를 보였으며, 이 광량구간에서 성장속도 변화는 크지 않았다(0.25 - 0.27 day⁻¹). 녹색파장과 적색파장에서도 유사한 경향을 나타내었다. 녹색파장은 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 이상에서 0.28 ~ 0.30 day⁻¹, 적색파장에서는 300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서 0.30 day⁻¹로 높은 성장속도를 보였다. 다만 적색파장의 경우는 다른 파장에 비하여 본 실험에서 설정한 최대광량인 300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 이상에서도 더 높은 성장속도를 보일 가능성도 있기 때문에 향후 검토가 필요할 것으로 생각된다.

유독 와편모조류 *Alexandrium catenella*와 *A. pacificum*의 성장과 마비성 독소 생산에 미치는 빛의 파장의 영향

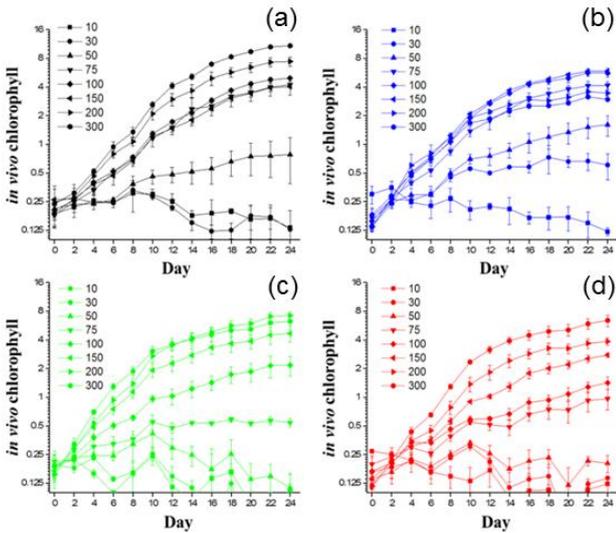


Fig. 1. Growth curves of *Alexandrium catenella* under various wavelengths (a: fluorescent, b: blue LED, c: green LED, d: red LED).

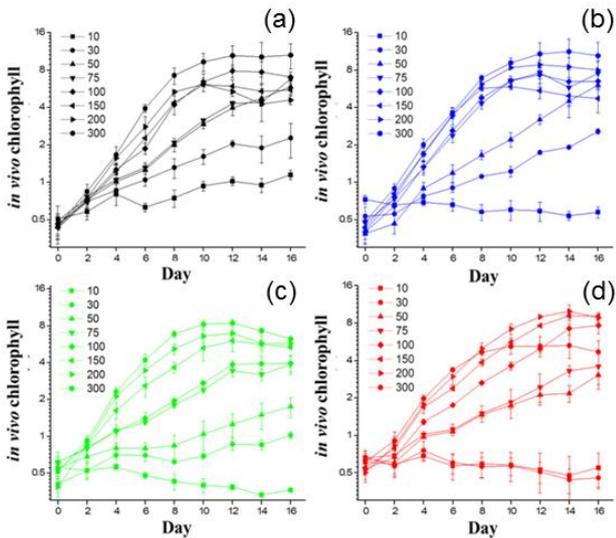


Fig. 2. Growth curves of *Alexandrium pacificum* under various wavelengths (a: fluorescent, b: blue LED, c: green LED, d: red LED).

*A. pacificum*도 *A. catenella*와 같이 파장별 광량이 증가함에 따라 형광값이 증가하였으며, 일정광량 이상의 조건에서는 형광값이 일정하였다(Fig. 2). 백색광과 청색에서는 $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 녹색과 적색파장에서는 $10 \sim 30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서 형광값의 변화가 크지 않았다. 하지만, 각 파장별로 상위 광량에서는 시간에 따라 점차 증가하는 경향을 나타내었으며, 높은 광

량일수록 대수성장기 후기 및 퇴조기에서 형광값이 가장 높았다.

각 파장별로 성장속도를 구하여 본 결과, 백색광에서의 성장속도는 $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서 가장 낮은 성장속도를 보였고, 광량이 증가할수록 성장속도가 증가하였으며, $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 과 $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서는 0.21 day^{-1} 과 0.23 day^{-1} 로 높게 나타났다. 청색파장에서 $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서 가장 낮은 성장속도를 보였고, 광량상승과 함께 증가를 하였다. $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 이상에서 가장 높은 성장속도를 보였으며, 이 광량구간에서 성장속도 변화는 크지 않았다($0.32 \sim 0.35 \text{ day}^{-1}$). 녹색파장과 적색파장도 유사한 경향을 보였다. 녹색파장은 $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 이상에서 0.33 day^{-1} , 적색파장에서는 $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 이상에서 $0.27 \sim 0.29 \text{ day}^{-1}$ 로 높은 성장속도를 나타내었다.

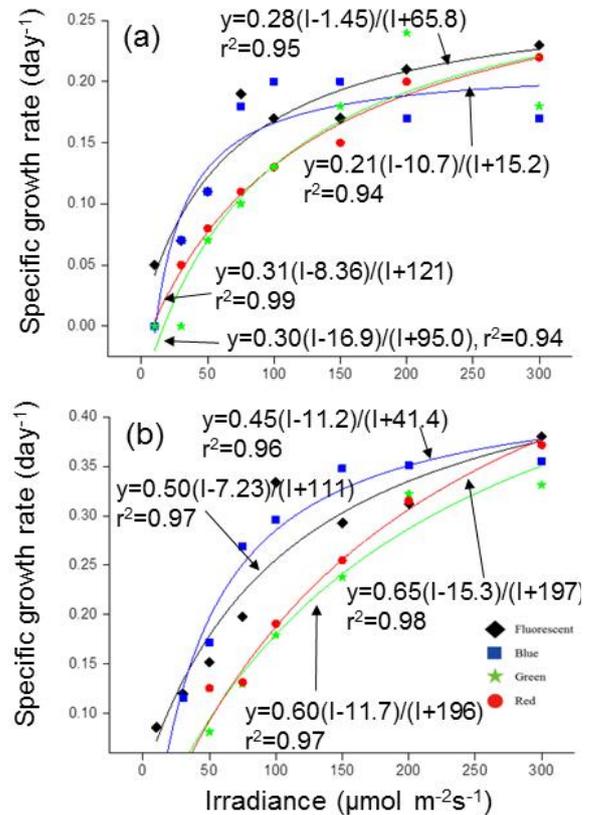


Fig. 3. Specific growth rates of (a) *Alexandrium catenella* and (b) *Alexandrium pacificum* under various wavelengths.

Lederman and Tett(1981)의 모델을 개량한 식을 통해 파장별 광량과 성장속도의 관계를 보면, *A. catenella*는 청색파장을 제외하고는 μ_{max} 에서 형광램프, 적색파장과 녹색파장에서 모두 통계적으로 유사하게 나타났다(t-test, $p < 0.05$). 하지만, K_s 는 적색파장에서 가장 높게 나타났고, 청색파장에서 가장

낮았다(Fig. 3a, Table 1). *A. pacificum*은 청색파장을 제외하고는 μ_{max} 에서 형광램프와 녹색파장에서 모두 통계적으로 높게 나타났다. 하지만 Ks는 녹색과 적색파장에서 높게 나타났으며, 청색파장에서 가장 낮게 나타났다(Fig. 3b; Table 1).

Table 1. Parameters of *Alexandrium catenella* and *A. pacificum* as a function of light intensity under different wavelengths

Species	Wavelengths	Ks (μM)	μ_{max} (day^{-1})
<i>A. catenella</i>	Fluorescent lamp	68.7	0.28
	Blue LED	36.6	0.21
	Green LED	129	0.30
	Red LED	138	0.31
<i>A. pacificum</i>	Fluorescent lamp	125	0.50
	Blue LED	63.7	0.45
	Green LED	219	0.60
	Red LED	228	0.65

대부분 규조류 및 와편모조류에서 식물플랑크톤의 광 친화도(affinity)를 나타내는 Ks가 청색파장이 다른 파장보다 낮게 나타났다(Oh et al., 2007; 2015; Shikata et al., 2009). 본 연구의 결과도, 두 종 모두 청색파장에서 가장 높은 친화성을 보였다. 광합성 색소 중 주색소인 chlorophyll *a*는 주로 보라-청색 파장대와 적색파장대의 빛을 흡수하며, 이 중 청색파장대는 미세조류의 생장이나 광합성에 효과적으로 이용되어, 미세조류의 유전자 발현 및 물질의 신진대사에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Kianianmomeni and Hallmann, 2014). 적색파장대는 청색파장과 같이 주색소인 Chlorophyll *a*가 흡수하는 파장영역이지만, 본 연구에서 적색파장에서 친화도는 청색파장대보다 낮게 나타났으며, 광이용성이 낮을 것으로 생각되는 녹색파장과 유사하였다.

최근 연구에서 고밀도의 세포축적을 위해 청색파장에서 초기 배양을, 이후 정지기에 도달하면 생장에 스트레스를 주는 환경조건으로 생화학적 축적을 유도하는 성장단계별로 환경조건을 달리하는 대량배양 방법이 알려져 있다(Ra et al., 2016; Han and Oh, 2018). 만약 두 종의 PST가 적색파장에서 많이 유도가 된다면, 초기에 높은 광 친화성을 바탕으로 한 청색파장에서 세포수를 확보하고, 후기에 적색파장을 주사하면, 같은 에너지를 사용하더라도 PST를 보다 증대시킬 수 있을 것으로 기대된다.

3.2 LED 파장에 따른 마비성 독소 원인 플랑크톤 *Alexandrium catenella*와 *A. pacificum*의 독함량 변화 파악

*A. catenella*의 독조성을 보면, 주요성분은 N-sulfocarbamoyl 독성으로 C1+2, GTX 5, 그리고 carbamoyl 독성으로 GTX1+4와 neoSTX이며, 미량성분은 carbamoyl 독성인 GTX2+3이었다. 함량으로 보면 C1+2가 60% 이상을 차지하였으며, 비교적 강독으로 보이는 neoSTX도 약 10% 정도를 나타내었다(Table 2). *A. pacificum*의 경우, 주요성분은 N-sulfocarbamoyl 독성으로 C1+2, GTX 5+6 그리고 carbamoyl 독성으로 GTX1+4이며, 미량성분은 *A. catenella*와 같이 carbamoyl 독성인 GTX2+3이었다. 함량은 *A. catenella*와 같이 C1+2가 60% 이상의 함량을 보였지만, 강독으로 고려되는 neoSTX는 검출되지 않았다(Table 2).

Table 2. Toxic profile (mol%) of toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* and *A. pacificum*

Toxic components	<i>A. catenella</i>	<i>A. pacificum</i>
C1+2	61.5	56.3
GTX1+4	9.97	19.0
GTX2+3	0.17	0.11
GTX5+6	18.1	24.6
dcGTX2+3	0.00	0.04
neoSTX	10.3	0.00

LED 파장에 따른 광량별 *A. catenella*의 독농도(toxin content)의 경우(Fig. 4), 형광램프, 청색파장 그리고 녹색파장에서 낮은 광량($50 \mu mol m^{-2}s^{-1}$)에서 높은 농도를 보였으며, $100 \mu mol m^{-2}s^{-1}$ 이상에서는 농도가 낮아지는 경향을 나타내었다. 적색파장에서는 다른 파장과 다르게 $50 \mu mol m^{-2}s^{-1}$ 보다는 $100 \mu mol m^{-2}s^{-1}$ 에서 높게 나타났으며($360 fmol cell^{-1}$), $150 \mu mol m^{-2}s^{-1}$ 에서 다소 감소하였다. 같은 광량에서 적색파장이 다른 파장보다 독농도는 높게 나타났으며, $100 \mu mol m^{-2}s^{-1}$ 에서 그 차이가 뚜렷하였고, 크기는 8배(형광램프 $100 \mu mol m^{-2}s^{-1}$) 높은 농도를 보였다. Saxitoxin으로 환산한 독성(toxicity) 평가에서도 형광램프, 청색파장 그리고 녹색파장의 경우, 독 농도와 그 분포경향이 크게 다르지 않았으며, 같은 파장역의 경우 낮은 광량에서 독성이 높았으며, 광량이 높아질수록 독성은 낮아지는 경향을 보였다. 적색파장에서는 독농도와 같이 $100 \mu mol m^{-2}s^{-1}$ 에서 다른 광량보다 가장 높은 독성을 보였다. 파장별 비교에서도 적색파장이 다른 파장대보다 같은 광량일 때 대체적으로 높은 독성을 나타내었다($100 \mu mol m^{-2}s^{-1}$ 에서 48 STXeq).

유독 와편모조류 *Alexandrium catenella*와 *A. pacificum*의 성장과 마비성 독소 생산에 미치는 빛의 파장의 영향

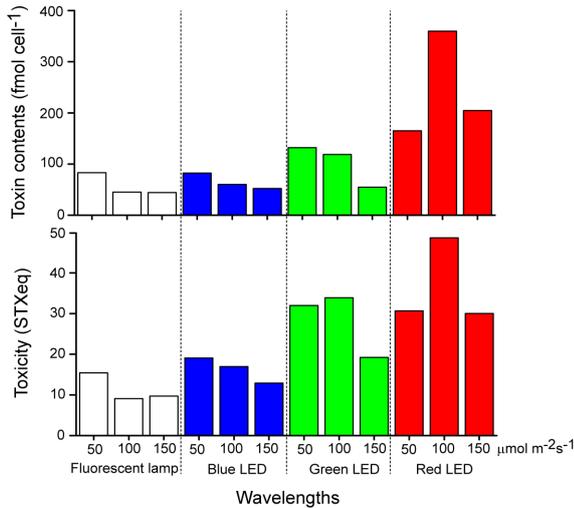


Fig. 4. Toxin contents and toxicities of toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella* under different wavelengths.

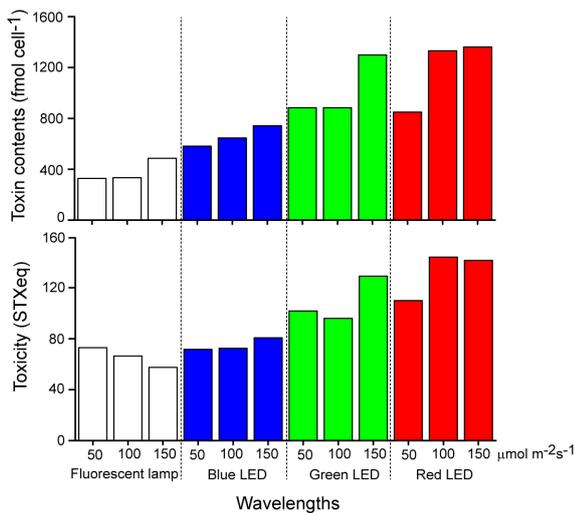


Fig. 5. Toxin contents and toxicities of toxic dinoflagellate *Alexandrium pacificum* under different wavelengths.

*A. pacificum*의 독 함량의 경우(Fig. 5), *A. catenella*와 다르게 형광램프, 청색과장 그리고 녹색과장의 낮은 광량 ($50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)에서 낮은 함량이었으며, $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서 다른 광량보다 높았다($50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 와 $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서 차이는 크지 않았음). 적색과장도 $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 보다 100과 $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서 높게 나타났다. 같은 광량에서는 녹색과장과 적색과장이 다른 과장보다 독농도는 높게 나타났으며, $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서는 약 3.4배 적색과장에서 높게 나타났다. Saxitoxin으로 환산한 독성(toxicity) 평가에서도 형광램프, 청색과장, 녹색과장 그리고 적색과장의 경우, 독 농도와 그 경향이 크게 다르지 않았으며, 같은 과장역의 경우 낮은 광

량에서 독성이 낮았으며, 광량이 높아질수록 독성은 높아지는 경향을 보였다. 적색과장에서는 독농도와 같이 $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 와 $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서 다른 과장의 동 광량보다 높은 독성을 보였다(약 140 STXeq).

독농도 및 독성의 증감은 여러 가지 물리·화학적 환경 요인에 따라 달라진다. 현재까지 빛에 관련하여 독농도 및 조성의 변화는 Ogata et al.(1987)과 Hamasaki et al.(2001) 등과 같이, 광량의 증가와 반하여 독농도가 감소하는 경향을 보고 한 결과가 있다. 하지만, Etheridge and Roesler(2005)와 Laabir et al.(2013)은 광량의 증가와 함께 독농도가 증가된다는 보고도 있어, 같은 유독 와편모조류 일지라도 서로 상의한 결과를 보고하고 있다. 따라서 본 연구에서 진행된 *A. catenella*의 경우는 전자의 보고와 일치하였지만, *A. pacificum*의 경우는 후자의 보고와 일치하여, 같은 과장 및 광량 환경 조건일지라도 종에 따라 독 생성이 달라지는 것을 알 수 있었다. 이것은 PST에 대한 종 특이성(species specificity)으로 고려될 수도 있지만, 최근에 독농도는 세포분열의 횟수 즉, 세포성장속도와 관련이 없으며, 세포내에 축적하는 질소의 농도(cellular nitrogen content)에 의존하여 독 농도가 지배된다는 보고가 있다(Leong et al., 2004; Van de Waal et al., 2013). 따라서 빛을 이용한 PST 조절을 위해서는 빛의 광량도 중요하지만, 과장을 이용하여도 PST의 증감을 충분히 조절할 수 있을 것으로 생각된다.

한편, Ks와 독농도와 밀접한 관련이 있는 것으로 보였다. *A. catenella*와 *A. pacificum* 모두 높은 Ks를 보였던 과장대(녹색과 적색과장)에서 높은 독농도 및 독성을 보였으며, 낮은 Ks를 보였던 청색과장에서는 낮은 독농도 및 독성을 나타내었다. 따라서 세포당 독농도를 증가시키기 위해서는 초기에 세포수량의 확보 및 빠른 성장속도를 유도하기 위해서 청색과장을 주사한 후, 대수생장기 후기에 적색과장을 주사하여, 세포내 독 함유량을 증가시킬 수 있는 다단계배양방법을 제시할 수 있을 것으로 생각된다. Ra et al.(2016)는 세포내 오일함량을 증가시키기 위해, 청색과장에서 초기 배양을, 이후 정지기에는 오일함량을 증진시키기 위해 생장이 억제된 광원인 적색과장 또는 녹색과장에서 후기 배양을 해야 한다고 보고하였다. 또한 유용물질을 더 극대화시키기 위해, 성장단계를 고려한 3단계 조명배양(유도기와 초기 대수생장기에 빠른 성장을 위하여 황색 LED, 중기 대수생장기는 최대성장속도를 보이는 적색 LED 그리고 후기 대수생장기와 정상기는 유용물질 증대를 위하여 황색 LED)도 제안이 되어 있다(Han and Oh, 2018). 이러한 다단계 배양기법은 배양 초기에 성장최적의 환경조건으로, 이후 정지기에 도달하면 생장에 스트레스를 주는 환경조건으로 생화학적 축적을 유도하는 유용한 방법으로 알려져 있다(Xia et al., 2014; Lee

et al., 2017). 따라서 *Alexandrium*의 독농도 추출을 위한 광배양기(photo-bioreactor)의 경우, 성장단계별로 광 환경을 달라하는 다단계 배양(2단계의 조명배양)의 검토가 필요할 것으로 보인다.

상기의 천연물질을 합성하기 위해서는 유독플랑크톤의 기본적인 광과장 식견을 바탕으로 대량배양기를 구축할 필요가 있다. 통상 LED 배양기는 기존의 형광등을 기반으로 한 배양기 보다 경제적인 이득 있는 것으로 보고되고 있다. 한국전력의 전기요금을 참고하여, 산업용 평균 전력량 요금(kWh)을 시간 당 약 73.2원으로 가정하고, 형광램프(40 W, 수명시간 8000 h)와 LED(20 W, 수명시간 25000 h)를 비교해보면, 25,000시간 사용을 기준으로 형광램프의 경우 요금이 79,450원이었고, LED는 49,100원으로 약 45%의 절감효과가 있다. 따라서 LED는 형광램프와 비슷한 수준으로 미세조류의 성장을 보이더라도, 장기적으로 절반 정도의 전기 절감 효과를 기대할 수 있다.

한편, 우리나라의 PST 모니터링 프로그램은 동물시험법을 기본으로 하고 있다. 앞서 설명한 것과 같이 이 측정법은 분석 한계가 종에 따라 달라지며, 정확한 사망시간 측정에 많은 인력이 소요되고, 시험 동물의 대량희생이 수반된다. 또한 독 조성을 알 수 없기 때문에 동물시험법의 사용빈도를 줄이거나 완전히 배제할 수 있는 대체 시험법을 찾는 것이 바람직하다는 분위기가 조성되고 있다. 하지만, 우리나라의 PST의 기기분석을 위한 표준물질은 1980년대와 1990년대에는 일본에 의존하고 있었으며, 현재에는 캐나다에서 전량 수입을 하고 있다. 캐나다의 경우, 폐독 정제를 위해서 주로 독화된 이매패류를 이용하여 왔지만(Suzuki et al., 2017), 우리나라의 경우, 폐독이 춘계에 집중적으로 발생하고 있기 때문에, 안정적으로 독화된 패류시료의 확보가 어렵다. 그래서 정제를 위해서 이매패류보다 비용이 높지만, 독성분을 생성하는 미세조류를 대량 배양하여 사용하는 방법이 원재료를 확보하는 가장 합리적인 방법이다. 박테리아, 균류의 배양과 다르게 미세조류의 배양효율은 높지 않지만, 미세조류를 원재료로 사용은 이매패류에 비교하여 정제가 간단하다는 이점이 있다. 최근 PST 중 saxitoxin, neo-saxitoxin 및 gonyautoxins은 근육의 나트륨 채널에 대한 특이적 차단제로서 작용한다. 이러한 생리학적 효과에 기인하여, 이들 화합물은 미량으로 체내 투여를 하여, 근육 경련 및 국소 긴장이상과 같은 근육 과다활동과 연관된 근육 활성 억제제로 사용되고 있다. 또한 이들 물질은 해양성 천연물성분으로 난치성 만성 질환의 치료를 위한 새로운 의약품 개발의 후보물질이 될 수 있는 가능성도 있으며, 분자 모델링을 통한 유도체의 합성을 실시하여 새로운 약효물질의 도출도 가능하다는 보고도 있다(Strichartz et al., 1986; Wiese et al., 2010). 따라서 과장

의 조절에 따라 saxitoxin 등의 PST 함량의 증가는 보다 저비용으로 해양성 천연물성분 및 표준물질을 합성할 수 있어, 보건 및 경제·산업적인 측면에서 유리한 이점이 있을 것으로 생각된다.

사 사

이 논문은 2019학년도 부경대학교 국립대학육성사업 지원비에 의하여 연구되었습니다.

References

- [1] Chang, D. S., I. S. Shin, J. H. Pyeon, and Y. H. Park(1987), A study on paralytic shellfish poison of sea mussel, *Mytilus edulis* - Food poisoning accident in Gamchun Bay, Pusan, Korea, 1986, Bulletin of the Korean Fisheries Society, Vol. 20, No. 4, pp. 293-299.
- [2] Etheridge, S. M. and C. S. Roesler(2005), Effects of temperature, irradiance, and salinity on photosynthesis, growth rates, total toxicity, and toxin composition for *Alexandrium fundyense* isolates from the Gulf of Maine and Bay of Fundy, Deep-Sea Research II, Vol. 52, pp. 2491-2500.
- [3] Hallegraef, G. M.(1993), A review of harmful algal blooms and their apparent global increase, Phycologia, Vol. 32, No. 2, pp. 79-99.
- [4] Hamsaki, K., M. Horie, S. Tokimitsu, T. Toda, and S. Toguchi(2001), Variability in toxicity of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* isolated from Hiroshima Bay, Western Japan, as a reflection of changing environmental conditions, Journal of Plankton Research, Vol. 23, No. 3, pp. 271-278.
- [5] Han, K. H. and S. J. Oh(2018), Effects of Various Intensities and Wavelengths of Light Emitting Diodes (LEDs) on the Growth of the Prasinophytes *Tetraselmis suecica* and *T. tetrahele*, Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, Vol. 51, No. 1, pp. 64-71.
- [6] Han, M., H. Lee, D. M. Anderson, and B. Kim(2016), Paralytic shellfish toxin production by the dinoflagellate *Alexandrium pacificum* (Chinhae Bay, Korea) in axenic, nutrient-limited chemostat cultures and nutrient-enriched batch cultures, Marine Pollution Bulletin, Vol. 104, No. 1-2, pp. 34-43.
- [7] Hwang, D. F. and Y. H. Lu(2000), Influence of environmental and nutritional factors on growth, toxicity, and toxin profile of dinoflagellate *Alexandrium minutum*, Toxicon, Vol. 38, No. 1491-1503.

- [8] Kianianmomeni, A. and A. Hallmann(2014), Algal photoreceptors: in vivo functions and potential applications, *Planta*, Vol. 239, No. 1, pp. 1-46.
- [9] Kim, K. Y., M. Yoshida, Y. Fukuyo, and C. H. Kim(2002), Morphological observation of *Alexandrium tamarense* (Lebour) Balech, *A. catenella* (Whedon et Kofoid) Balech and one related morphotype (Dinophyceae) in Korea, *Algae*, Vol. 17, No. 1, pp. 11-19.
- [10] Kim, E. S., Z. Li, S. J. Oh, Y. Y. Yoon, and H. H. Shin(2017), Morphological indentification of *Alexandrium* species (Dinophyceae) from Jinhae-Mansa Bay, Korea, *Ocean Science Journal*, Vol. 52, No. 3, pp. 427-437.
- [11] Laabir, M., Y. Collos, E. Masseret, D. Grzebyk, E. Abadie, V. Savart, M. Sibat, and Z. Anzilm(2013), Influence of environmental factors on the paralytic shellfish toxin content and profile of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) isolated from the Mediterranean Sea. *Marine Drugs*, Vol. 11, No. 5, pp. 1583-1601.
- [12] Lederman, T. C. and P. Tett(1981), Problems in modelling the photosynthesis-light relationship for phytoplankton, *Botanica Marina*, Vol. 24, pp. 125-134.
- [13] Lee, J. S., I. S. Shin, Y. M. Kim, and D. S. Chang(1997), Paralytic shellfish toxins in the mussel, *Mytilus edulis*, caused the shellfish poisoning accident at Geoje, Korea, in 1996, *Journal of the Korean Fisheries Society*, Vol. 30, No. 1, pp. 158-160.
- [14] Lee, Y. J., C. H. Lee, K. Cho, H. N. Moon, J. Namgung, K. H. Kim, B. J. Lim, D. Kim, and I. K. Yeo(2017), Effect of temperature-induced two-stage cultivation on the lipid and saccharide accumulation of microalgae *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella salina*. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, Vol. 50, No. 1, pp. 32-40.
- [15] Leong, S. C. Y., A. Murata, Y. Nagashima, and S. Taguchi (2004), Variability in toxicity of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* in response to different nitrogen sources and concentrations, *Toxicon*, Vol. 43, pp. 407-415.
- [16] Mouget, J. L., P. Rosa, and G. Tremblin(2004), Acclimation of *Haslea ostrearia* to light of different spectral qualities confirmation of chromatic adaptation in diatoms. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, Vol. 75, No. 1-2, pp. 1-11.
- [17] Ogata, T., T. Ishimaru, and M. Kodama(1987), Effects of water temperature and light intensity on growth rate and toxicity change in *Protogonyaulax tamarensis*, *Marine Biology*, Vol. 95, No. 2, pp. 217-220.
- [18] Oh, S. J., D. S. Park, H. S. Yang, Y. H. Yoon, and H. Tsuneo(2007), Bio-remediation on the benthic layer in polluted inner bay by promotion of microphytobenthos growth using light emitting diode (LED) - 1. Effects of irradiance and wavelength on the growth of benthic diatom, *Nitzschia* sp. *Journal of the Korean Society for Marine Environment and Energy*, Vol. 10, No. 2, pp. 93-101.
- [19] Oh, S. J., H. K. Kwon, J. Y. Jeon, and H. S. Yang(2015), Effect of monochromatic light emitting diode on the growth of four microalgae species (*Chlorella vulgaris*, *Nitzschia* sp., *Phaeodactylum tricorutum*, *Skeletonema* sp.), *Journal of the Korean Society of Marine Environment and Safety*, Vol. 21, No. 1, pp. 1-8.
- [20] Oh, S. J., J. A. Park, H. K. Kwon, H. S. Yang, and W. A. Lim(2012), Ecophysiological studies on the population dynamics of two toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *Alexandrium catenella* isolated from the southern coast of Korea I. Effects of temperature and salinity on the growth, *Journal of the Korean Society for Marine Environmental Engineering*, Vol. 15, No. 2, pp. 133-141.
- [21] Oshima, Y.(1995), Post-column derivatization HPLC methods of paralytic shellfish poisons, In; *Manual on harmful marine microalgae*, Hallegraff, G. M., D. M. Anderson and A. D. Cembella (eds), UNESCO, Paris, pp. 81-94.
- [22] Ra, C. H., C. H. Kang, J. H. Jung, G. T. Jeong, and S. K. Kim(2016), Effects of light-emitting diodes (LEDs) on the accumulation of lipid content using a two-phase culture process with three microalgae. *Bioresource technology*, Vol. 212, pp. 254-261.
- [23] Saavedra, M. P. S. and D. Voltolina(1994), The chemical composition of *Chaetoceros* sp. (bacillariophyceae) under different light conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, Vol. 107, No. 1, pp. 39-44.
- [24] Shikata, T., A. Nukata, S. Yoshikawa, T. Matsubara, Y. Yamasaki, Y. Shimasaki, Y. Oshima, and T. Honjo(2009), Effects of light quality on initiation and development of mezoplanktonic diatom blooms in a eutrophic shallow sea, *Marine Biology*, Vol. 156, No. 5, pp. 875-889.
- [25] Shin, H. H., S. H. Baek, Z. Li, M. S. Han, S. J. Oh, S. H. Youn, Y. S. Kim, D. K. Kim, and W. A. Lim(2014), Resting cysts, and effects of temperature and salinity on the growth of vegetative cells of the potentially harmful species

- Alexandrium insuetum* (Dinophyceae), Harmful Algae, Vol. 39, pp. 175-184.
- [26] Strichartz, G., T. Rando, S. Hall, J. Gitschier, L. Hall, B. Magnani, and C. H. Bay(1986), On the mechanism by which saxitoxin binds to and blocks sodium channels, Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 479, pp. 96-112.
- [27] Suzuki, T.(2007), Development of analytical method for shellfish toxins and its application for the elucidation of toxification mechanism in bivalves, Nippon Suisan Gakkaishi Vol. 73, No. 3, pp. 425-428.
- [28] Suzuki, T., T. Kamiyama, and Y. Oshima(2017), The new guideline for risk management measures for shellfish toxins and investigation on its implementation, Kouseisha, Tokyo, pp. 1-161.
- [29] Van de Waal, D. B., U. Tillmann, M. Zhu, B. P. Koch, B. Rost, and U. John(2013), Nutrient pulse induces dynamic changes in cellular C:N:P, amino acids, and paralytic shellfish poisoning toxins in *Alexandrium tamarense*, Marine Ecology and Progress Series, Vol. 493, pp. 57-69.
- [30] Wiese, M., P. M. D. Agostino, T. K. Mihali, M. C. Moffitt, and B. A. Neilan(2010), Neurotoxic alkaloids: Saxitoxin and its analogs, Marine Drugs, Vol. 8, No. 7, pp. 2185-2211.
- [31] Xia, L, J. Rong, H. Yang, Q. He, D. Zhang, and C. Hu(2014), NaCl as an effective inducer for lipid accumulation in freshwater microalgae *Desmodesmus abundans*, Bioresource and Technology, Vol. 161, pp. 402-409.

Received : 2020. 01. 06.

Revised : 2020. 02. 24.

Accepted : 2020. 02. 25.