

미세조류 및 해조류 유주자의 피막화를 통한 성장 및 생존율 연구^{1a}

정상목² · 이한성³ · 강슬기² · 손지수² · 전재혁² · 이한주² · 신현웅^{2*}

Study on the Growth and Survival Rate of Capsulated Microalgae and Macroalgae Zoospores^{1a}

Sang-Mok Jung², Han-Seong Lee³, Seul-Gi Kang², Ji-Su Son², Jae-Hyuk Jeon², Han-Joo Lee², Hyun-Woung Shin^{2*}

요 약

본 연구는 미세조류 및 해조류 유주자의 피막화가 이들의 성장 및 생존에 미치는 영향을 파악할 목적으로 수행되었다. 갈조류의 세포벽을 구성하는 녹말과 알긴산을 다양한 비율로 혼합하여 친환경 피막소재로 이용하였으며, 염화칼슘 수용액에 적하(form a drop)한 후 피막의 형성 여부를 확인하였고, 미세조류 *Nannochloropsis salina*와 해조류 *Ulva australis*의 유주자를 피막화하여 생존율 및 성장률을 측정하였다. 미세조류와 해조류 피막은 녹말과 알긴산의 배합비(무계비)가 5:5, 2:8, 0:10일 때에만 형성되었으며, 10:0과 8:2에서는 형성되지 않았다. 형성된 피막 중 녹말과 알긴산의 5:5 배합비에서 미세조류 개체수가 8.74×10^5 cells mL⁻¹로 최대 증가를 보였으나, 알긴산만을 이용한 피막에서는 4.92×10^5 cells mL⁻¹로 가장 낮았다. 따라서, 녹말과 알긴산의 혼합으로 구성된 피막에서 녹말의 함량이 증가할수록 미세조류 및 해조류 유주자의 생존 및 성장율은 증가되지만 알긴산이 50% 이하인 배합비에서는 물성이 약한 것으로 나타났다. 또한, 인공어초 표면에 응용한 결과, 99 개체 cm⁻²가 발아하는 것으로 나타났다. 본 연구는 해양생태계 복원을 위한 해조류 유주자의 생존율 및 성장률을 향상 시킬 수 있는 다양한 기초자료가 될 것으로 사료되어진다.

주요어: 녹말, 알긴산, 엽록소

ABSTRACT

The purpose of this study was to improve growth and survival rate of marine microalgae and macroalga zoospores using with eco-friendly capsulation materials. The capsulation materials were chosen an alginic acid which extracted from marine brown algae combining with starch and calcium chloride. The capsulated microalgae, *Nannochloropsis salina* and macroalga zoospores, *Ulva australis* were evaluated with growth and survival rate. When the mixed ratio of alginic acid was less than 50%, capsule formation was not performed. When the ratio of 50% alginic acid and 50% starch, the microalgae was shown the highest growth and survival rate increasing up to 8.74×10^5 cells mL⁻¹ while 100% of alginic acid was the lowest rate up to 4.92×10^5 cells mL⁻¹. The increasing starch ratio improved to their growth and survival rate, however decreasing alginic acid make physical capsule formation weaken. By applying on a surface of artificial reef, capsulated algal zoospores were germinated 99 individuals cm⁻². This attempt will be provided to basic core technology for marine afforestation in coastal area.

1 접수 2016년 1월 14일, 수정 (1차: 2016년 2월 16일), 게재확정 2016년 2월 17일

Received 14 January 2016; Revised (1st: 16 February 2016); Accepted 17 February 2016

2 순천향대학교 생명시스템학과 Dept. of Life Science and Biotechnology, Soonchunhyang Univ., Asan 31538, Korea (thinkdi@gmail.com)

3 해양경비안전본부 Korea Coast Guard, Cheonan 330-860. Korea (leechungwol@hanmail.net)

a 이 논문은 순천향대학교의 지원에 의하여 연구되었음.

* 교신저자 Corresponding author: Tel: +82-41-530-1284, Fax: +82-41-530-1256, E-mail: hwshin@sch.ac.kr

KEY WORDS: STARCH, ALGINIC ACID, CHLOROPHYLL

서 론

현재 전 세계적으로 대기 중의 이산화탄소 농도가 증가하여 지구온난화(Global warming)가 발생하고 있으며 해수면 및 수온 상승과 같은 기후 변화가 나타나고 있다(Lee *et al.*, 2013). 육상 및 해양생태계가 지구온난화로 인해 큰 변화를 보이고 있으며, IPCC(2007)의 보고에서는 온실가스의 방출이 지속될 경우, 2050년 내에 이산화탄소의 농도가 자연농도의 2배에 이르러, 21세기 말에는 지구의 평균 기온이 최대 6.4℃까지, 해수면이 최대 59m 상승할 것으로 예상하고 있다. 우리나라의 경우에도 지구온난화의 영향으로 수온 및 해수면 상승하고 있어 연안에서는 갯녹음 현상이 발생하고 있다(Kim, 2010). 갯녹음은 연안에 서식하는 대형해조류인 다시마, 감태 등의 해조군락이 소멸되고 석회질로 된 암반 피복성 홍조류인 무절석회조류가 번식하여 암반이 홍색이나 백색으로 변하는 백화 현상을 말한다(Jeong *et al.*, 1998). 갯녹음 현상의 확산에 따라 해조류와 어패류 등의 어업자원이 감소하여 연안 생태계의 황폐화가 급속히 진행되고 있다(Shin *et al.*, 2014).

해조류는 연안 생태계의 일차 생산자로, 대형 해조들이 이루고 있는 해중림은 해양 생물의 서식처 및 은신처를 제공하여 높은 생물 생산력을 지니고 있으며, 이산화탄소 흡수원으로 기후변화에 대응할 수 있는 연안 생태계의 중요한 요소이다(Cho *et al.*, 2012). 해양 생태계의 물질순환의 중심을 이루고 있는 해중림이 최근 갯녹음 현상의 확산으로 인해 소멸되어 해양 생태계가 파괴되고 있으며, 이의 대안으로 국내에서는 바다숲 조성사업을 수행하고 있다(Jeong *et al.*, 2012).

바다숲 조성사업은 세계 각국에서 이루어졌으며, 특히 인공어초를 이용한 해중림 조성 기술이 주로 연구되고 있다(Terawaki *et al.*, 2001). 현재에는 인공어초를 이용한 기술 뿐만 아니라 씨줄, 시비제, 해조류 이식 기술 등 다양한 기술 연구도 이루어지고 있다(Kim, 2006). 하지만 연안 해역에서 적용할 때 효율성에 대한 문제점을 가지고 있어 해중림 조성에 효율적인 신기술 개발이 필요한 실정이다. 생물의 고정화 기술에 포괄법(entrapment), 가교법(cross-linking) 등이 알려져 있으며, 주로 피막 내부에 생물을 포괄하는 방법인 포괄법이 이용되고 있고, 생물의 고정화를 통해 피막 내부에 고농도로 축적시킬 수 있다는 장점이 있다(Han *et al.*, 1999; Park and Chang, 2000). 따라서 본 연구에서는 피막

소재를 이용하여 해산식물의 피막화를 통한 해조류 유주자의 생존율 및 성장률 향상을 검증하기 위해, 인공피막소재로 주로 사용되는 알긴산으로 미세조류 *Nannochloropsis salina*와 해조류 *Ulva australis* 유주자를 피막화하고 녹말 배합에 따른 성장률 및 생존율을 엽록소 *a*와 *b*로 비교 하였으며, 인공어초 소재에 도포 하여 해조류 유주자의 성장 향상을 검증하였다. 대상생물인 *N. salina*와 *U. australis*은 배양이 용이하며 우리나라 인근 해역에 분포하고 있어 채집이 쉽다는 장점을 가지고 있다. *Nannochloropsis sp.*는 최적 배양조건에서 세포내 지질함량이 최대로 증가하여 최근에는 바이오디젤 소재로도 각광받고 있으며(Kim *et al.*, 2014), *U. australis*는 성장주기가 짧고 서식 가능한 환경 범위가 큰 해조류이다(Wichard *et al.*, 2015).

연구방법

1. 피막 제조 적용

미세조류와 해조류 유주자의 피막소재로 알긴산과 녹말을 사용하였으며, 알긴산과 녹말을 멸균해수 100 mL에 용해시켜 Table 1과 같이 제조하였다. 경화제는 멸균해수 100 mL에 염화칼슘 3g을 용해시켜 제조하였고 녹말-알긴산수용액과 경화제로 미세조류 *Nannochloropsis salina*와 해조류 *Ulva australis* 유주자를 피막화하여 경화(hardening)하였으며, 알긴산으로만 제조한 피막을 대조군으로 설정하였다.

Table 1. Mixture ratio of alginic acid and starch in weight(g) for capsulation

Mixture ratio	Starch : Alginic acid				
Weight : Weight	10:0	8:2	5:5	2:8	0:10

2. 피막소재 미세조류 적용

미세조류 *N. salina*는 한국해양미세조류은행(Korea Marine Microalgae Culture Center, KMMCC-24)에서 분양받아 F/2 배지에 배양하여 사용하였고, *N. salina*가 배양된 배양액과 녹말-알긴산 수용액을 1:1로 혼합한 후 경화제에 적하(form a drop)하여 피막을 제작하였다. 완전히 경화된 피막은 증류수 세척 후 음건하여 F/2 배지에 7일 동안 Table

2와 같은 조건에서 배양하여 미세조류-피막의 개체수 및 엽록소를 측정하여 생존율을 분석하였다. 엽록소 *a*, *b*는 아세톤 추출법을 사용하여 추출한 후 UV-Vis spectrophotometer (UV-1601, Shimadzu, Japan)를 사용하여 측정하였다.

Table 2. Culture system of capsulation of microalgae *Nannochloropsis salina*

Environment	Condition
Light intensity	55 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$
Temperature	25 °C
Photoperiod	12:12h L:D (Light:Dark)
pH	7.5
Salinity	32 psu

3. 피막소재 해조류 유주자 적용

해조류는 2014년 5월 충남 당진군 한진항(위도 36°58'16.37"; 경도 126°46'57.76")에서 채집한 구멍갈파래(*U. australis*)를 사용하였다. 채집한 *U. australis*는 엽체표면의 불순물을 제거하기 위해 증류수로 세척한 후 멸균여과해수에 담아 광량 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 온도 25 °C에서 2시간 동안 유주자의 방출을 유도하였다(Callow *et al.*, 1997). 녹말-알긴산 수용액은 0:10, 2:8, 5:5 비율로 제조하였으며, 수용액과 유주자액($1.2 \times 10^5 \text{ cell mL}^{-1}$)을 1:1로 혼합한 후 경화제에 적하하여 피막화하였다. 피막은 30분 동안 경화 시킨 후 증류수로 세척하여 6시간 동안 반 건조시켰다. 반 건조된 피막은 PES 배지 30 mL에 Table 2와 같은 조건으로 배양하였으며 규조류의 번식을 억제하기 위해 산화게르마늄을 5 mg L^{-1} 농도로 처리하였다. 거대조류의 생존율은 광학현미경(BX53, Olympus, Japan) 관찰 및 엽록소 측정을 통해 분석하였다. 엽록소 *a*, *b*는 아세톤 추출법을 사용하여 추출한 후 UV-Vis spectrophotometer(UV-1601, Shimadzu, Japan)를 사용하여 측정하였다.

4. 피막 해조류 유주자의 인공어초 적용

2014년 5월에 충남 당진군 한진항에서 구멍갈파래(*U. australis*)를 채집하여 사용하였으며, *U. australis* 표면의 불순물을 제거하기 위해 증류수로 세척한 후 멸균여과해수에 담아 광량 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 온도 25 °C에서 2시간 동안 유주자의 방출을 유도하였다. 녹말-알긴산 수용액은 유주자액과 1:1로 혼합하여 인공어초 조각시편에 도포한 후 경화제를 스프레이로 분사하여 경화시켰다. 경화 후 음건하여 PES 배지 70 mL에 넣고 산화게르마늄을 5 mg L^{-1} 로 처리

하여 규조류 번식을 방지하였다. 배양조건은 Table 2와 같고 7일 동안 배양 후 현미경 관찰 및 개체수를 측정·분석하였다.

피막 해조류 유주자의 인공어초 적용 연구를 위해 인공어초 조각 시편(1×1cm) 표면 위 해조류 유주자와 혼합된 녹말-알긴산 용액을 도포 한 후 경화제로 염화칼슘을 스프레이로 분사하여 경화시켰다. 경화 후 음건하여 PES 배지 100 mL에 넣고 배양 하였으며. 배양조건은 Table 2와 같고 7일 동안 배양 후 현미경으로 개체수를 관찰하였다.

5. 통계분석

결과분석은 SPSS(Ver. 17)을 이용하여 녹말과 알긴산의 배합비에 따른 미세조류와 해조류의 생존율을 one-way ANOVA를 통해 수행하였다.

결과 및 고찰

1. 피막소재 미세조류 적용

녹말과 알긴산의 배합비에 따른 미세조류 피막은 녹말:알긴산이 10:0과 8:2일 때는 형성되지 않았고, 5:5, 2:8, 0:10일 때 피막이 형성되었다. 형성된 피막의 경우에는 녹말의 함량이 높을수록 피막의 경화가 덜 진행되어 부서짐이 나타났으며 알긴산의 함량이 높을수록 경화가 더 진행되어 부서짐이 거의 나타나지 않은 것을 확인하였다. Choi *et al.*,(1996)의 연구에서 알긴산과 경화제의 농도에 따른 피막의 경도를 측정할 결과에서 같은 농도의 경화제를 사용하였을 때 알긴산의 농도가 높을수록 높은 경도를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이는 본 연구에서 녹말과 알긴산의

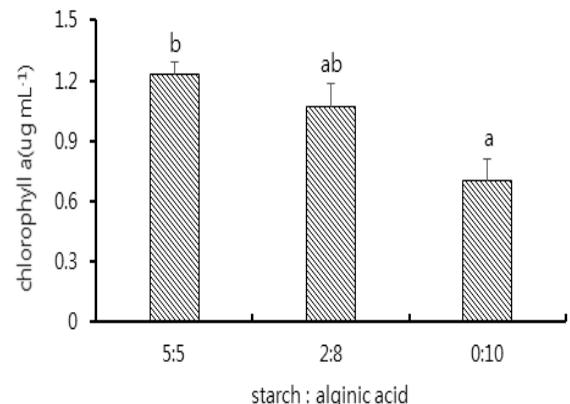


Figure 1. Chlorophyll a content of capsulated microalgae with different ratio
*one-way ANOVA, tukey's test(p<0.05)

배합비가 5:5일 때 보다 0:10일 때 피막의 경화가 더 진행되었다는 것과 유사하다.

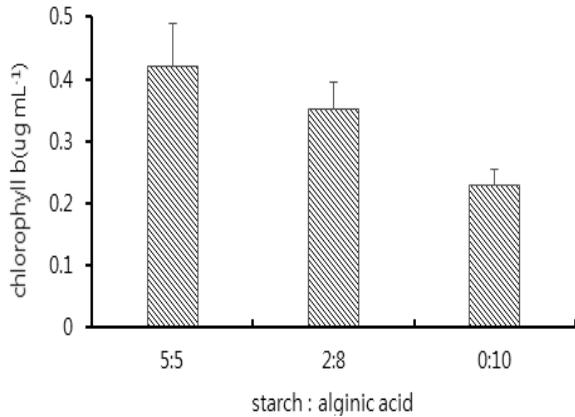


Figure 2. Chlorophyll b content of capsulated microalgae with different ratio

Table 3. Capsule formation and growth rate of microalgae, different ratio between starch and alginate acid (unit : cells mL⁻¹)

	Starch : Alginate acid mixture ratio(w/w)				
	10:0	8:2	5:5	2:8	0:10
Capsule formation	×	×	○	○	○
Growth rate	-	-	8.74×10^5	6.13×10^5	4.92×10^5

형성된 미세조류 피막의 생존율을 분석하기 위해 개체수 및 엽록소 함량을 측정한 결과는 Table 3과 Figure 1, 2와 같이 나타났다. 형성된 피막의 *N. salina*의 개체수는 녹말과 알긴산의 비율이 5:5인 경우 8.74×10^5 cells mL⁻¹, 2:8일 때는 6.13×10^5 cells mL⁻¹, 0:10일 때는 4.92×10^5 cells mL⁻¹로 나타났다. 알긴산만 포함된 피막에 비해 녹말과 알긴산이 포함된 피막에서 미세조류의 개체수가 약 2배 높게 나타났다. 엽록소 a, b를 측정된 결과에서는 녹말:알긴산이 5:5일 때 엽록소 a는 1.231 ± 0.12 ug mL⁻¹, 엽록소 b는 0.420 ± 0.14 ug mL⁻¹로 나타났고, 2:8인 경우에는 엽록소 a는 1.067 ± 0.23 ug mL⁻¹, 엽록소 b는 0.351 ± 0.09 ug mL⁻¹, 0:10일 때 엽록소 a는 0.704 ± 0.21 ug mL⁻¹, 엽록소 b는 0.229 ± 0.05 ug mL⁻¹으로 나타났다. 엽록소 a와 b 모두 녹말과 알긴산의 비율이 5:5일 때 가장 높았으며 0:10인 경우에 비해 약 1.5배 높은 것으로 확인되었다. 녹말과 알긴산의 배합비가 5:5인 피막의 미세조류 개체수 및 엽록소 함량이 가장 높은 것으로 보아, 녹말 포함 시 피막의 내구성은 약하나 녹말의 함유량이 많을수록 미세조류의 생존율이 높은

것으로 확인되었다.

2. 피막소재 해조류 적용

형성된 해조류 피막의 생존율을 분석하기 위해 현미경 관찰 및 엽록소 측정 결과는 Figure 3, 4, 5와 같이 나타났다.

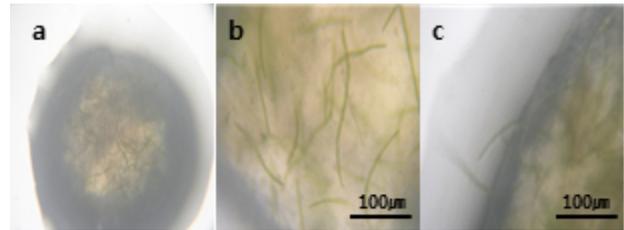


Figure 3. Germination of capsulated macroalga spore observed by optical microscope(a : X100 of *Ulva australis* thallus, b, c : X400 of *Ulva australis* thallus)

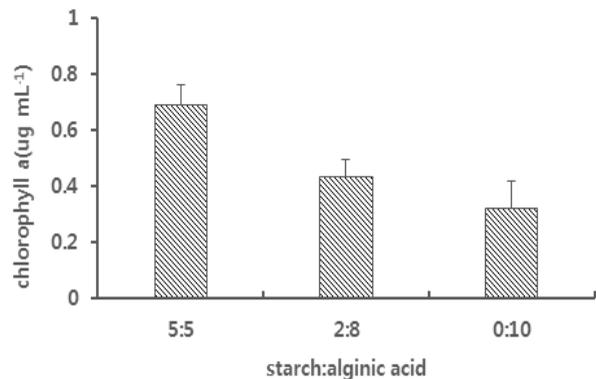


Figure 4. Chlorophyll a content of macroalga spore capsulated with different mixture ratio

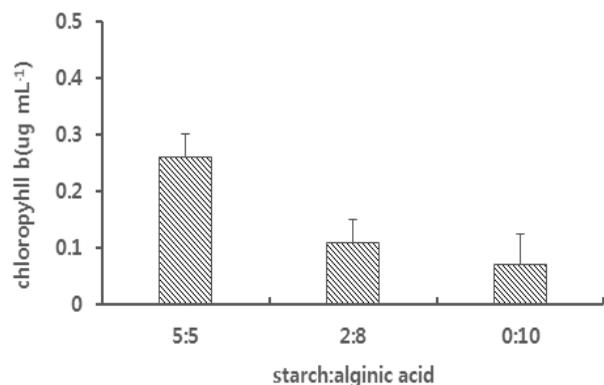


Figure 5. Chlorophyll b content of macroalga spore capsulated with different mixture ratio

광학 현미경으로 관찰한 결과, *U. australis*는 피막에서 내부에서 정상적으로 발아하여 피막을 뚫고 나온 것을 확인할 수 있었다. 엽록소 *a*와 *b* 측정 결과에서는 녹말과 알긴산의 비율이 5:5일 때 엽록소 *a*가 $0.689 \pm 0.07189 \text{ ug mL}^{-1}$, 엽록소 *b*는 $0.261 \pm 0.042 \text{ ug mL}^{-1}$ 로 나타났고, 2:8일 때 엽록소 *a*는 $0.436 \pm 0.062 \text{ ug mL}^{-1}$, 엽록소 *b* $0.109 \pm 0.043 \text{ ug mL}^{-1}$, 0:10일 때는 엽록소 *a*가 $0.319 \pm 0.101 \text{ ug mL}^{-1}$, 엽록소 *b*는 $0.072 \pm 0.052 \text{ ug mL}^{-1}$ 로 나타났다. 녹말:알긴산이 5:5일 때 엽록소가 최대값을 보였으며, 0:10일 때 최소값으로 나타나 약 2배 높은 것을 확인할 수 있었다. Choi *et al.*(1996)의 알긴산을 이용한 지리강활 *Angelica purpuraefolia* 인공종자 피막 연구 결과에서 알긴산의 농도가 높을수록 지리강활 종자의 발아율이 감소한다고 보고하였으며, 이는 본 연구결과에서 알긴산의 농도가 높을수록 *U. australis*의 엽록소 *a*와 *b*가 감소한 것과 유사하다. 따라서, 해조류 피막의 엽록소 *a*와 *b* 모두 녹말과 알긴산의 배합비가 5:5일 때 가장 높게 나타났으며, 미세조류 피막과 같이 녹말 함량이 높을수록, 알긴산의 함량이 낮을수록 생존율이 높게 나타나는 것으로 사료된다.

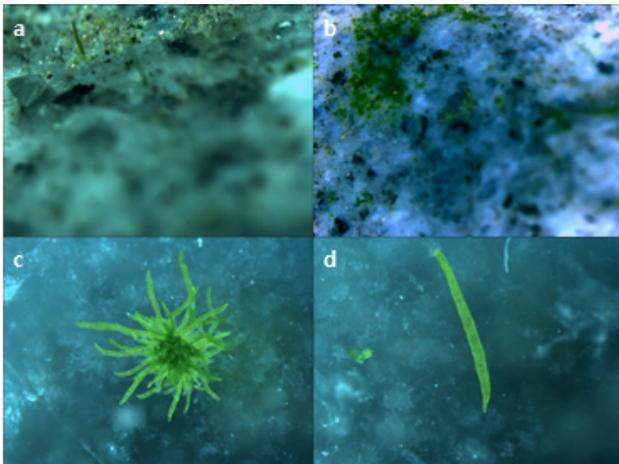


Figure 6. Germination of zoospores observed by dissecting microscopic(a,b : X20, c,d : X80)

3. 피막소재 인공어초 적용

인공어초에 표면에 해조류 유주자를 피막화하여 부착시킨 후 유주자의 발아는 Figure 6과 같이 현미경으로 관찰하였고, 직접계수를 통해 개체수를 측정하였다. 현미경 관찰 결과에서 *U. australis*의 유주자가 발아하여 피막을 뚫고 성장하였으며 헛뿌리가 정상적으로 분화하여 인공어초 조각시편 표면에 착생한 것을 확인하였다. 인공어초 표면에서 발아수는 $99 \text{ individuals cm}^{-2}$ 로 측정되었다.

감사의 글

본 연구는 순천향대학교의 지원으로 수행되었기에 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Callow, M.E., J.A. Callow, J.D. Pickett-Heaps and R. Wetherbee (1997) Primary adhesion of enteromorpha(*Chlorophyta*, *Ulvales*) propagules: quantitative settlement studies and video microscopy1. *Journal of Phycology*. 33(6):938-947.
- Cho, J.K., Y.S. Lim, D.U. Hong and J.K. Kim(2012) Modelling algal transport in coastal areas with marine afforestation. *Journal of the Korean Society for Marine environmental Engineering*. 15(1):1-8.(in Korean with English abstract)
- Choi, E.G., H.B. Park and K.S. Kim(1996) Effects of alginic acid and polyox on seed germination in *Ostericum koreanum* Kitawa and *Angelica purpuraefolia* Chung. *Korean J. Plant Tissue Culture*. 23(2):113-116.(in Korean with English abstract)
- Chung, H.S., K.W. Cho, K.H. Chung, J.H. Kim, J.H. Shin, Y.W. Seo, J.S. Kang and I.K. Lee(1998) Ecological characteristics of algal whitening in coastal zone of Seogwipo area, Cheju Island. *Algae*. 13(3):361-374.(in Korean with English abstract)
- Han, Y.H., J.S. Lee, J.K. Kwak, E.H. Lee and M.G. Cho(1999) High-density cultivation of microalgae using microencapsulation. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 32(2): 186-191.(in Korean with English abstract)
- IPCC.(2007) Climate change 2007 : synthesis report. Contribution of working group I , II and III to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Univ. of Cambridge Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA. pp. 104.
- Jeong, J.A., C.S. Shin and J.K. Kim(2012) Tidal current characteristics around the Geomoondo marine afforestation. *Journal of the Korean Society of Marine Environment & Safety*. 18(1):25-32.(in Korean with English abstract)
- Kim, D.G., S.J. Hwang, O.I. Choi, I.H. Choi, M.I. Han and Y.J. Shin(2011) Effects of climate change on barren ground proliferation in the coast of Jeju. *The Journal of Fisheries Resources Management*. 1(1):1-17.(in Korean with English abstract)
- Kim, D.H.(2010) Global warming effect on marine environments and measure practices against global warming. *Journal of the Korean Society of Marine Environment & Safety*. 16(4): 421-425.(in Korean with English abstract)
- Kim, D.S.(2006) Construction of sea forest based on the cultivation

- technology of brown algae, *Ecklonia stolonifera*(Okamura). Ph. D. Dissertation, Univ. of Kangnung National, Kangneung, 3pp.
- Kim, J.S., H.H. Chaminda Lakmal, J.H. Lee, W.W. Lee and Y.J. Jeon(2014) Anti-inflammatory and anti-cancer effects of sterol-rich fraction from *Nannochloropsis oculata* by using saponification. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 47(6):770-775.(in Korean with English abstract)
- Lee, S.J.(2013) Measures for strengthening the ecosystem environment security in responding to climate change. KEI, Korea, 38pp.(in Korean with English abstract)
- Park, J.K. and H.N. Chang(2000) Microencapsulation of microbial cells. Biotechnology Advances. 18(4):303-319.
- Shin, B.S., H.J. Chung and K.H. Kim(2014) Experimental study on new artificial reef for hydraulic stability. Cooperation Society. 15(1). 555-560.(in Korean with English abstract)
- Terawaki, T., H. Hasegawa, S. Arai and M. Ohno(2001) Management-free techniques for restoration of *Eisenia* and *Ecklonia* bed along the central pacific coast of Japan. Journal of Applied Phycology. 13(1):13-17.
- Wichard, T., B. Charrier, F. Mineur, J.H. Bothwell, O. De Clerck and J.C. Coates(2015) The green seaweed *Ulva*: a model system to study morphogenesis. Frontiers in Plant Science. 6(72):1-8.