

# 나노기포 산소수 및 수소수가 미세조류 배양에 미치는 영향

최수정\* · 김영화\*\* · 정인하\*\*\* · 이재화\*.,\*\*.,†

\*신라대학교 의생명과학대학 생명공학과, \*\*신라대학교 의생명과학대학 제약공학과,  
\*\*\* 한국원자력연구원  
(2014년 4월 4일 접수, 2014년 4월 20일 심사, 2014년 4월 29일 채택)

## Effect of Nano Bubble Oxygen and Hydrogen Water on Microalgae

Soo-Jeong Choi\*, Young-Hwa Kim\*\*, In-Ha Jung\*\*\*, and Jae-Hwa Lee\*.,\*\*.,†

\* Department of Bioscience and Biotechnology, College of Medical and Life Science, Silla University, Busan 617-736, Korea  
\*\*Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical and Life Science, Silla University, Busan 617-736, Korea  
\*\*\*Research Division for Industry & Environment, Korea Atomic Energy Research Institute, Daejeon 305-353, Korea  
(Received April 4, 2014; Revised April 20, 2014; Accepted April 29, 2014)

미세조류 *Nannochloropsis oculata* (*N. oculata*)와 *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*)는 다른 미세조류에 비해 높은 중성지질 함유량으로 인해 바이오 디젤 생산에 중요한 자원이다. 나노기포 산소수, 수소수를 이용해 만든 배지에서 미세조류를 배양하였다. *N. oculata* 배양 결과 세포 성장은 대조군과 비슷하였으며 지질 함량은 대조군에 미치지 못하는 것으로 나타났다. *C. vulgaris* 역시 *N. oculata*와 비슷한 경향을 보였다. 미세조류의 광합성으로 인한 색소의 함량 변화를 알아 보기 위해 클로로필과 카로티노이드 함량을 측정하였다. 클로로필 함량은 나노 기포산소수와 수소수에서 배양한 *N. oculata*가 대조군 보다 약 54%, 30% 증가하였으며 카로티노이드 함량은 각각 21%, 25%씩 증가함을 확인하였다. *C. vulgaris*의 클로로필 함량은 기포산소수와 수소수에서 대조군보다 59%, 39% 증가하였으며 카로티노이드 함량도 49%, 29% 증가하였다.

Microalgae *Nannochloropsis oculata* (*N. oculata*) and *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*) are important sources for biodiesel because of the high content of neutral lipids. Stable nano bubble is maintained for a long time and therefore it is possible for use in biotechnology. In this study, effects of nano bubble oxygen or hydrogen water on the microalgae growth were characterized. The cell growth in nano bubble water was similar to that of control, and the total lipid content was rather low. But, chlorophyll content of *N. oculata* grown in nano bubble oxygen and hydrogen water increased 54% and 30%, and increased 59%, 39% in *C. vulgaris*. Carotenoid content also increased 21%, 25% in *N. oculata* and 49%, 29% in *C. vulgaris* grown in nano bubble oxygen and hydrogen water. From these results, nano bubble water seems to enhance the photosynthetic capacity of microalgae.

**Keywords:** *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella vulgaris*, nano bubble, chlorophyll, carotenoid

## 1. 서 론

미세조류는 빛 에너지와 이산화탄소를 이용하여 광합성을 통해 생산하는 생물로 광합성률과 바이오매스 생산량이 높으며 세포의 성장 또한 빨라 바이오 연료 생산에 적합하다[1]. 미세조류가 함유하고 있는 지질은 바이오 디젤 생산에 이용된다[2]. 바이오 디젤 생산에 이용되는 미세조류는 지질 함량이 높은 *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella* sp.

등이 있다. *Nannochloropsis oculata* (*N. oculata*)는 해수에 존재하는 미세조류로 양식용 사료로 주로 이용되며 지질 함량이 다른 미세조류에 비해 높다고 보고된다[3,4]. *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*) 또한 *N. oculata*와 동일한 환경에서 성장하는 미세조류로 건조중량당 14~30%의 지질을 함유한다고 알려져 있다[5]. *N. oculata*와 *C. vulgaris*는 광합성을 통해 chlorophyll과 carotenoid계 화합물도 함유하고 있으며 *N. oculata*는 lutein, zeaxanthin,  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -carotene을, *C. vulgaris*는 cantaxanthin과 astaxanthin을 함유한다[6].

나노 기술은 주로 환경, 수산양식, 농업분야에서 사용되며, 나노 기술 가운데 나노 버블 연구는 폐수를 정화하는데 이용되고 있다. 나노 버블은 마이크로 버블이 자연상태에서 수축되어 발생하는 것으로 크기가 약 0.5~10  $\mu$ m 범위의 극초미세기포이다[7,8]. 나노 버블을 수처리 이용할 때에 공기 용해효율이 높아 대전작용, 물리적 흡착 효과가

† Corresponding Author: Silla University  
Department of Bioscience and Biotechnology, College of Medical and Life Science, 140 Baegyang-daero, 700 Beon-gil, Sasang-gu, Busan 617-736, Korea  
Tel: +82-51-999-5748 e-mail: jhalee@silla.ac.kr

뛰어나다고 보고되어 있다[9]. 또한 대전 효과가 높아 안정화된 나노 버블은 기포 특성이 장시간 유지되기에 생명공학 분야와 의학적인 응용이 가능하다[10]. 나노 기포수는 산소나 수소 등의 기체를 나노 기포 상태로 물속에 체류시킨 물의 종류로, 포화용해도 이상으로 기체를 물속에 용해시킨다. 산소가 순수한 물에 용해될 때에 용해된 산소 원자 또는 분자는 물 분자와 화학적 결합을 하지 않고 물 분자 격자 사이에 일종의 이물질로 존재한다. 이때 물 분자 내부에 허용 가능한 범위의 이물질 농도를 포화용해도라 하는데, 포화용해도를 초과하는 기체는 물속에 잔류하지 못하고 시간의 경과에 따라 액체 외부로 방출된다. M. Takahashi 등[11]은 미세기포의 크기가 50  $\mu\text{m}$  이상이면 수초 이내에 수면위로 부상하여 대기중으로 확산되지만, 이하일 경우에는 곧바로 수면위로 부상하지 않고 물속에 잔류하여 수개월 이상 수중에 체류할 수 있다고 보고하였다. 또한 물속에 잔류하는 기포 중의 일부는 외부압력과 같은 환경의 변화에 따라 수축 혹은 액체 내 파열된다고 발표하였다. 물속에 오랜기간 동안 체류하는 기포의 경우 물 분자의 브라운 운동, 음의 표면전하를 갖는 것으로 알려진 기포 간 정전기적 반발력, 인접한 물 분자끼리 무수히 반복되는 수소 결합 및 이들의 분해 또는 반데르발스 결합처럼 기포의 부력에 대항하는 여러 현상을 통해 미세기포가 액체 중에 오랜 시간 체류할 수 있다[12].

미세조류를 배양하기 위해 고려하는 요소로 이산화탄소의 주입이나 배지의 pH, 빛 세기 등이 있다. 미세조류의 이산화탄소 첨가 방법은 컬럼이나 마이크로 버블 시스템을 이용한 것으로 여러 연구가 진행되었다. 그 예로, Chiu 등[13]은 컬럼을 이용해서 이산화탄소를 주입하여 *N. oculata*를 배양하였으며 2%의 이산화탄소를 주입하여 배양했을 때에 성장률이 가장 좋았으며 증성지질의 함량 또한 증가함을 보고하였다. Ranjbar 등[14]은 광배양기에 버블 컬럼을 넣어 미세조류를 배양하였으며 이를 통해 고 효율의 astaxanthin의 생산이 가능함을 확인하였다. 광배양기에 airlift loop를 이용한 Zimmerman 등[15]은 Chiu와 달리 *Dunaliella salina* (*D. salina*)를 배양하고 마이크로 버블 시스템을 이용하여 이산화탄소를 주입하였다. 이산화탄소와 산소는 함께 주입되었는데, 이산화탄소를 넣은 세포의 성장은 증가한데 반해 산소를 주입한 세포의 성장은 대조군에 비해 저해됨을 확인하였다. 이처럼 산소를 넣어 미세조류를 배양하였을 경우 그렇지 않은 조건에 비해 세포의 성장은 저해된다. 하지만 최근 미세조류 광배양시 고려되는 빛 세기, 온도, pH와 같은 조건과 달리 산소를 주입하는 것이 세포의 성장에 비 의존적인 조건이라고 발표하였다. 또한 세포의 성장에 영향을 미치는 요소는 광합성 과정의 산소와 빛이 병합되어 반영된 결과라고 하였다. 이를 뒷받침해주는 연구는 Raso 등[16]의 연구로 산소의 주입 양을 달리하여 미세조류의 성장 특성을 분석하였다. Raso 등은 산소의 농도에 따른 *Nannochloropsis* sp. 성장연구를 진행하였고, 배지 내 녹아 있는 산소 농도가 높아질수록 세포의 농도가 높아지며 세포 건조 중량 또한 증가함을 확인하였다. 또한 산소의 주입은 배지 내 pH와 관련이 있는데, J. E. Armstrong 등[17]은 빛을 저해하고 산소와 pH를 조절하여 *Cylindrotheca* sp.를 배양하였으며 산소와 pH가 증가하면 세포의 농도 또한 증가함을 확인하였다. 산소는 생물체가 대사를 하기 위해 필요한 원소이며 수소는 생물체 내에 존재하는 활성산소를 제거하는데 효과적이라고 알려져 있다. 미세조류는 광합성을 통해 생장이 이루어지고, 이를 통해 수소나 지질과 같은 부산물이 생산된다. 위의 연구처럼 산소와 이산화탄소 주입이나 pH 조절을 통해 미세조류를 배양한다면 성장에 영향을 미칠 것으로 생각된다. 본 연구에 이용한 나노기포 산소수와 수소수는 기포형태로 체류하는 미세기포의 크기 및 개체수를 NTS (Nano Particle Tracking Analyzer)를 이용하였다. 이를 이용하여 *N.*

*oculata*와 *C. vulgaris* 배양 실험을 진행하였으며 각 세포의 특성을 분석하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 사용균주 및 배양방법

본 연구에는 *Nannochloropsis oculata* NIES-2145 (Npo-2145)와 *Chlorella vulgaris* (KMMCC 191)를 사용하였다. *N. oculata*는 일본국립환경연구소(Microbial Culture Collection at NIES (NIES))로부터 분양받았으며 *C. vulgaris*는 한국해양미세조류은행에서 분양받았다. F/2 배지를 사용하여 250 mL 삼각플라스크에서 working volume 100 mL로 25  $^{\circ}\text{C}$ , 120 rpm, 광도 3000 lux의 조건에서 배양하였다. 광주기는 12 h : 12 h (명 : 암)으로 명반응 시 형광등을 사용하였다(18). F/2 배지는 1 L의 인공해수에  $\text{NaNO}_3$  150 mg,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  8.69 mg, ferric EDTA 10 mg,  $\text{MnCl}_2$  0.22 mg,  $\text{CoCl}_2$  0.11 mg,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.0196 mg,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.044 mg,  $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  50 mg,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.012 mg, Vitamine B<sub>12</sub> 1 mg, Biotin 1 mg, Thiamine  $\cdot$  HCl 0.2 mg을 첨가하여 제조한 후 121  $^{\circ}\text{C}$ 에서 15 min 멸균, 냉각 후 사용하였다[19].

### 2.2. 나노기포 산소수 및 수소수 제조

나노기포를 배양액에 생성시키기 위해 poly-sulfone으로 제조한 약 100 nm 크기의 표면기공을 갖는 중공사막(PS-001, (주) 퓨어멤)을 사용하여 순도 99.9%의 공업용 산소 및 수소를 증류수에 약 2 h 동안 버블링하였다. 배양액 속에 체류하는 기포의 크기 및 개체수 측정을 위해 영국 Nano Sight Ltd. ([www.nanosight.com](http://www.nanosight.com))에서 제작한 LM10-HS 모델의 Nano Particle Tracking Analyzer를 이용하였다.

버블링 한 나노기포 수소수의 기포 크기를 측정된 결과 미세기포의 평균 직경은 250 nm였으며 가장 많은 기포의 평균 크기는 107 nm, 표준편차(SD)는 148 nm, 10% 내 기포 크기(D10)는 79 nm, 50% 내 기포 크기(D50)는 512 nm, 90% 내 기포 크기(D90)는 478 nm였다. 나노기포 수소수의 미세기포 개수는  $2.05 \times 10^8$ 개로 확인되었다. 나노기포 산소수의 미세기포 평균 직경은 173 nm, 가장 많은 기포의 평균 크기는 129 nm, SD는 78 nm, D10은 75 nm, D50은 172 nm, D90은 266 nm였으며 나노기포 산소수의 미세기포 개수는  $1.75 \times 10^8$ 개였다.

### 2.3. 나노기포 수소수, 산소수 배양

증식기의 *N. oculata*와 *C. vulgaris* 세포를 수확하여 680 nm에서 흡광도를 0.3으로 조정하였다. 수소수와 산소수 배지를 만들기 위해 일반 f/2 배지에 이용하는 인공해수를 3차 증류수가 아닌 나노기포 수소수와 산소수로 대체하여 만들었다. 실험에 사용된 수소수와 산소수는 한국원자력연구원에서 제공 받은 것으로 나노 버블을 이용하여 수소와 산소를 각각 첨가하였다.

### 2.4. 색소 함량 분석

광합성을 통해 증가된 색소 함량 분석을 위해 24일 간 배양한 미세조류 균주의 클로로필과 카로티노이드 함량을 분석하였다. 색소함량 측정은 세포 1 mL을 13000 rpm에서 3 min 원심분리 한 뒤 상등액을 제거하고 methanol 1 mL을 첨가하였다. 60  $^{\circ}\text{C}$ 에서 30 min 반응하고 0  $^{\circ}\text{C}$ 에서 2 min 냉각시킨 후 13000 rpm에서 2 min 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 분리한 상등액은 UV/Vis분광기를 이용해 650, 653, 461, 664 nm파장에서 흡광도를 측정하였다[20].

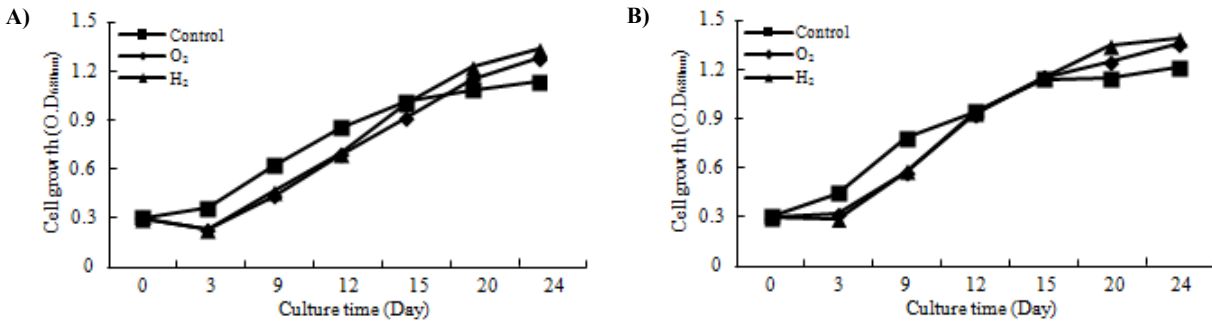


Figure 1. Cell growth of *N. oculata* and *C. vulgaris* in nano-bubble oxygen/hydrogen water (A) *N. oculata*, (B) *C. vulgaris*.

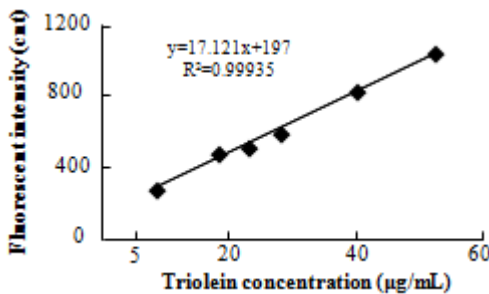


Figure 2. Linear correlation between fluorescence intensity and triolein concentration.

$$\text{Chlorophyll (mg/L)} = (A_{650} \times 25.5) + (A_{655} \times 4)$$

$$\text{Carotenoid (mg/L)} = (A_{461} + (0.046 \times A_{664})) \times 4$$

2.5. 지질함량 분석

배지 조성에 따른 균주의 지질함량을 분석하기 위하여 Chen 등[21]의 방법을 변형하여 측정하였다. 세포의 흡광도를 0.5로 조정한 후 세포 10 μL와 증류수 138 μL, nile red 2 μL 그리고 DMSO 50 μL를 혼합하고 40 °C 배양기에서 10 min 반응하였다. 형광광도계(Infinite F 200 pro, Tecan, Austria)를 이용하여 excitation 495 nm, emission 620 nm에서 형광값(fluorescence intensity)을 측정하였다. nile red로 염색된 세포의 형광값과 미세조류 자체의 형광값을 빼서 나타내었다. 세포내 중성지질 함량 정량을 위해 Bertozzini 등[22]의 방법을 변형하여 실험에 이용하였다. 중성지질의 검량선 작성에 위해 triolein (sigma)를 이용하였다. Triolein의 농도별로 nile red 염색 시행 후 형광값을 측정하였다. 측정된 형광 강도를 이용해 표준 검량선을 작성하였으며 이를 바탕으로 중성지질 함량을 측정하였다[23].

3. 결과 및 고찰

3.1. 나노기포 산소수, 수소수 배지에 따른 세포 성장

나노기포 산소수, 수소수 그리고 3차 증류수를 이용하여 녹인 인공해수를 기본으로 f2 배지를 만들어 실험에 이용하였다. 세 종류의 배지에 동일한 균주를 접종하여 배지에 따른 세포 성장을 살펴보았다. *N. oculata*의 배지 성분에 따른 세포 성장을 보면 기본 3차 증류수로 제조한 f2와 나노기포 산소수, 수소수 배지의 세포 성장은 비슷한 경향을 보였으나 나노기포 산소수와 수소수의 배지 내 미세조류 성장은 점차 증가하였으며(Figure 1(A)), *C. vulgaris* 균주 또한 *N. oculata*와

비슷한 경향을 보임을 확인하였다(Figure 1(B)). 나노기포 산소수와 수소수의 미세조류 생장이 대조군에 비해 증가한 요인으로는 배지의 pH와 용존산소(DO) 함량이 있다. 세 종류의 배지 pH를 측정해보니 수소수를 첨가한 배지는 7.3, 산소를 첨가한 배지는 7.5, 대조군으로 이용된 f2 배지는 7.8로 나타났다. 이러한 배지의 pH 변화는 미세조류 배양에 영향을 미치는 요인으로 윤 등[24]은 bubble column을 이용하여 미세조류를 배양한 실험을 진행하였을 때에 pH 7에 가까운 배지에서 그렇지 않은 배지보다 높은 세포 농도를 보였다. 이는 나노기포 산소수와 수소수를 이용하여 배지 내 pH를 조절하여 미세조류를 배양한다면 대조군에 비해 증가함을 설명할 수 있다. 이 등[25]은 높은 용존산소의 함유는 미세조류 성장을 저해한다고 보고 하였다. 나노기포 산소수와 수소수의 용존산소 함량은 orion versa star 40B pH/se meter kit (Thermo, USA)를 이용하여 측정하였다. 나노기포 산소수의 경우 산소를 주입한 초기에는 용존산소의 함량이 100~150 ppm 정도이며, 1주일 후에는 40~60 ppm으로 감소하며 나노기포 수소수는 1500 ppd (mg/L)에서 1주일 후에는 700~800 ppd까지 감소한다. 이렇게 감소한 용존산소의 함량은 1달 정도 유지되며 상온에서 보관할 경우 함량의 유지기간이 매우 감소한다. *N. oculata*와 *C. vulgaris*는 25 °C에서 배양하는 미세조류이기 때문에 배지 내 용존산소 농도는 빠르게 감소하였을 것이라고 생각한다. 본 연구에서 또한 대조군에 비해 pH가 낮은 나노기포 산소수와 수소수에서 배양한 미세조류의 성장이 약 10% 증가한 것을 확인할 수 있었다.

3.2. 수소수, 산소수 배지에 따른 세포의 중성지질 함량

미세조류 내 지질 함량은 nile red를 이용한 형광 강도를 이용해 측정하였다. 중성 지질 함량을 정량하기 위해서 표준용액으로 triolein을 이용하여 표준 검량선을 작성하였다[23]. 세 종류의 배지에서 배양한 *N. oculata*와 *C. vulgaris*의 형광 강도 수치를 검량선을 이용해 중성지질 함량을 정량하였다(Figure 2). 그 결과 *N. oculata*와 *C. vulgaris* 모두 수소수와 산소수가 아닌 기본배지의 세포에서 중성지질 함유량이 높음을 확인하였다(Figure 3). *N. oculata* 균주는 수소수와 산소수에서 배양이 기본 배지의 절반에 해당하는 지질을 함유하였으며(Figure 3(A)), *C. vulgaris* 균주는 산소수가 수소수에 비해 낮은 지질 함유량을 확인하였다(Figure 3(B)). 미세조류의 배양 환경 요소 가운데 pH를 조절하면 세포 내 유용 물질 함유량은 증가한다고 보고되어져 왔다. F. Han 등[26]은 *Chlorella pyrenoidosa*를 이용하여 배양 실험을 진행하였으며 초기 pH를 조절한다면 세포 내 지질 함유량은 증가한다고 보고하였다. 흔히 미세조류는 배양 환경에서 질소와 같은 필수 영양소의 고갈되거나 배양 환경이 변하는 등의 스트레스를 주었을 때에 세포의 중성지질 함량이 증가한다고 알려져 있다. 오 등[27]은 *Chlorella*를 이용한

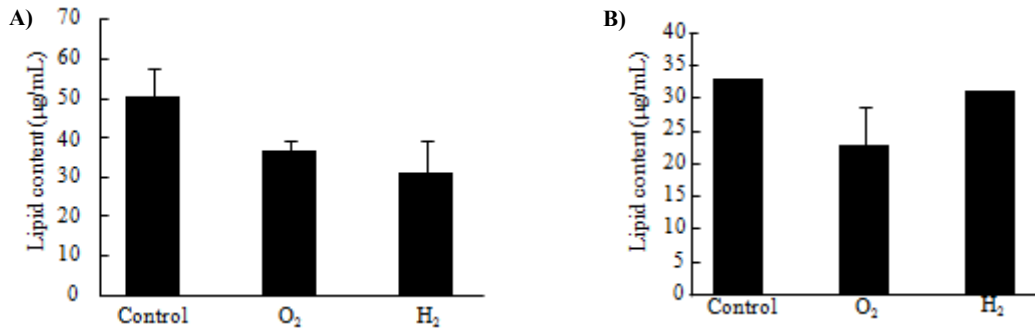


Figure 3. Lipid content of *N. oculata* and *C. vulgaris* in nano-bubble oxygen/hydrogen water (A) *N. oculata*, (B) *C. vulgaris*.

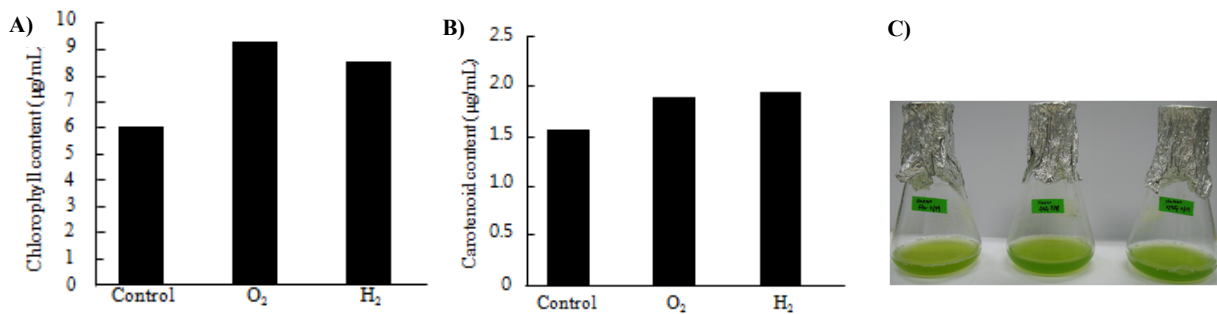


Figure 4. Chlorophyll and carotenoid content of *N. oculata* in nano-bubble oxygen/hydrogen water (A) Chlorophyll content, (B) Carotenoid content, (C) culture of microalgae on nano-bubble oxygen/hydrogen water and control.

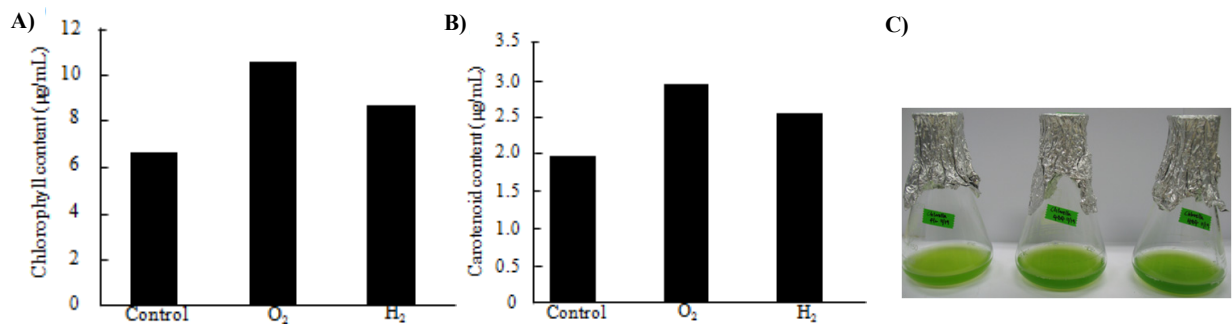


Figure 5. Chlorophyll and carotenoid content of *C. vulgaris* in nano-bubble oxygen/hydrogen water (A) Chlorophyll content, (B) Carotenoid content, (C) culture of microalgae on nano-bubble oxygen/hydrogen water and control.

fed-batch 실험을 하였으며 지속적으로 영양을 공급하면 균체의 농도만 증가하였으며 영양분이 부족한 배양 말기에는 미세조류 내 지질의 농도가 증가함을 확인하였다. 이처럼, 미세조류가 스트레스 하에 노출되면 불리한 조건에 대처하기 위해 지질의 대사를 변경하거나 지질의 합성이 증가하게 된다. 하지만 본 실험의 경우 미세조류의 균체량이 증가하였으며 세포 내 지질 함량은 감소하였다. 이는 미세조류 세포의 배양 환경이 적절하였으며 세포가 생존에 대처하는 스트레스가 적었을 것이라고 판단된다.

### 3.3. 수소수, 산소수 배지에 따른 세포의 색소 함량

미세조류의 광합성 양에 따른 색소 함량을 알아보기 위해 chlorophyll과 carotenoid 함량을 측정하였다. 측정하기 이전 *N. oculata* 와 *C. vulgaris*의 배양액 색을 보니 육안으로 보기에다 나노기포 산소

수와 수소수를 이용해 배양한 세포의 색이 대조군에 비해 선명한 것을 확인할 수 있었다(Figure 4(C), Figure 5(C)). *N. oculata*의 chlorophyll 과 carotenoid 함량을 비교하였다. 먼저 *N. oculata*의 chlorophyll 함량을 비교하면 산소수에서 9.3 µg/mL, 수소수는 8.6 µg/mL로 대조군인 일반배지에 비해 각각 54%, 30% 증가함을 확인하였다(Figure 4(A)). Carotenoid 함량 또한 산소수와 수소수가 대조군으로 이용된 일반 배지에 비해 21%, 25%씩 증가하였다(Figure 4(B)). *C. vulgaris*의 chlorophyll 함량은 산소수가 10.6 µg/mL, 수소수가 8.7 µg/mL로 대조군에 비해 59%, 39% 증가하였으며 carotenoid 함량은 산소수, 수소수 각각 49%, 29% 증가하였다(Figure 5).

위의 결과들은 W. B. Zimmerman(15)과 K. Ying 등(28)의 연구결과와 비슷한 결과이다. W. B. Zimmerman의 연구는 micro bubble을 이용하여 *Dunaliella salina*를 배양하였으며 배양 일수가 길어짐에 따라 세

포 건조중량과 함께 세포 내 색소의 함량또한 증가하였다. K. Ying의 연구는 공기를 주입하며 *Dunaliella salina*를 배양하였으며 공기를 주입하지 않은 대조군은 18일 동안 4.3 mg/L의 클로로필을 생산한데 반해 공기를 주입한 세포에서는 32.7 mg/L의 클로로필을 생산하였다. 이는 기포를 주입하여 미세조류를 배양할 경우 색소의 함량이 약 8배가량 증가함을 확인시켜준다. 이처럼 미세조류 배양 시 기포를 첨가하는 것은 세포 생장이 증가하고 이에 따른 색소의 함량을 증가시킨다. 세포의 성장과 색소의 함량 증가는 광합성에 따른 것으로 미세조류는 성장을 위해 광합성을 한다. 광합성 과정 중에서 chlorophyll과 carotenoid계 화합물이 합성된다. 본 연구에서는 나노기포 산소와 수소를 첨가하여 배양한 미세조류에서 대조군에 비해 높은 색소함량을 확인하였다. 나노기포 산소수와 수소수의 생장이 대조군에 비해 높았음을 확인하였을 때에 색소의 함량이 증가한 것은 당연하다고 판단된다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 나노 버블 시스템을 이용해 산소와 수소를 첨가한 배지에 *N. oculata*와 *C. vulgaris*를 배양하였다. 산소수와 수소수를 이용한 배지에서 배양한 미세조류 균주들의 세포 성장은 아무 것도 첨가하지 않은 배지(대조군)와 비슷하여 큰 차이를 보이지 않았다. 세포 내 지질 함량은 세포를 Nile red로 염색하여 형광강도를 측정하였다. 세 종류의 배지에서 배양한 *N. oculata*의 중성지질 함량은 대조군이 50.1 µg/mL인데 반해 산소와 수소를 첨가한 배지에서는 각각 37.1 µg/mL, 31.5 µg/mL로 감소하였다. *C. vulgaris* 또한 대조군에서는 33.3 µg/mL였으며 수소수를 첨가한 배지는 31.4 µg/mL로 대조군과 비슷한 함량이었으나 산소수 첨가 배지의 지질 함량은 23.1 µg/mL로 대조군에 비해 감소하였음을 확인하였다. 배지에 따른 세포의 클로로필과 카로티노이드 함량을 비교해 보았으며 *N. oculata*와 *C. vulgaris* 모두 대조군 배지 보다 산소와 수소를 첨가한 배지에서 최고 59% 증가하였다. 나노 버블 시스템을 이용해 산소와 수소를 첨가한 배지에서 미세조류를 배양한 결과 세포 내 중성지질 함량은 감소하였으나, 색소의 함량은 증가함을 확인하였다. 나노 버블 시스템을 이용하여 미세조류 배지 내 이온의 양을 증가시켜 pH를 조절한다면 세포 내 광합성 양이 늘어나 색소 함량 또한 증가한다고 생각된다.

#### References

1. A. Widjaja, C.-C. Chien, and Y.-H. Ju, Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*, *J. TICE*, **40**, 13-20 (2009).
2. A. Converti, A. A. Casazza, E. Y. Ortiz, P. Perego, and M. D. Borghi, Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production, *CEP*, **48**, 1146-1151 (2009).
3. J.-H. Kim, H.-J. Park, Y.-H. Kim, H. Joo, S.-H. Lee, and J.-H. Lee, UV-induced mutagenesis of *Nannochloropsis oculata* for the increase of lipid accumulation and its characterization, *Appl. Chem. Eng.*, **24(2)**, 155-160 (2013).
4. H.-J. Park, Y.-H. Kim, and J.-H. Lee, Effect of alginate on the growth of *Nannochloropsis oculata* NIED-2145, *KSBB. J.* **26(3)**, 206-210 (2011).
5. Z.-Y. Liu, G.-C. Wang, and B.-C. Zhou, Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*, *Bioresour. Technol.* **99**, 4717-4722 (2008).
6. S. P. Loh and S. P. Lee, The effect of extraction methods on fatty acid and carotenoid compositions of marine microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Chaetoceros gracilis*, *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.*, **36(2)**, 145-160 (2013).
7. L. Zhang, Y. Zhang, X. Zhang, Z. Li, G. Shen, M. Ye, C. Fan, H. Fang, and J. Hu, Electrochemically controlled formation and growth of hydrogen nanobubbles, *Langmuir*, **22**, 8109-8113 (2006).
8. K. Tanaka and M. Matsumoto, Nano bubble-size dependence of surface tension and inside pressure, *Fluid Dynamics Research*, **40(7-8)**, 546-553 (2008).
9. M. Usei, 마이크로 버블의 호기성 여상법에 의한 하수고도처리, *첨단 환경기술*, 18-24 (2007).
10. L. Koyuncu and H. Afsar, Decomposition of dyes in textile wastewater with ozone, *J. Environ. Sci. Health*, **31**, 1035-1041 (1996).
11. M. Takahashi, K. Chiba, and P. Li, Free-radical generation from collapsing microbubbles in the absence of a dynamic stimulus, *J. Phys. Chem.*, **111**, 1343-1347 (2007).
12. M. Takahashi, Potential of microbubbles in aqueous solutions : electrical properties of the gas-water interface, *J. Phy. Chem.*, **109**, 21858-21864 (2005).
13. S.-Y. Chiu, C.-Y. Kao, M.-T. Tsai, S.-C. Ong, C.-H. Chen, and C.-S. Lin, Lipid accumulation and CO<sub>2</sub> utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO<sub>2</sub> aeration, *Bioresour. Technol.*, **100**, 833-838 (2009).
14. R. Ranjbar, R. Inoue, H. Shiraiishi, T. Katsuda, and S. Katoh, High efficiency production of astaxanthin by autotrophic cultivation of *Haematococcus pluvialis* in a bubble column photobioreactor, *Biochem. Eng. J.*, **39**, 575-580 (2008).
15. W. B. Zimmerman, M. Zandi, H. C. H. Bandulasena, V. Tesar, D. J. Gilmour, and K. Ying, Design of an airlift loop bioreactor and pilot scales studies with fluidic oscillator induced microbubbles for growth of a microalgae *Dunaliella salina*, *Appl. Energ.*, **88**, 3357-3369 (2011).
16. S. Raso, B. V. Genugten, M. Vermue, and R. H. Wijffels, Effect of oxygen concentration on the growth of *Nannochloropsis* sp. at low light intensity, *J. Appl. Phycol.*, **24(4)**, 863-871 (2012).
17. J. E. Armstrong and J. A. Calder, Inhibition of light-induced pH increase and O<sub>2</sub> evolution of marine microalgae by water-soluble components of crude and refined oils, *Appl. Environ. Microbiol.*, **35(5)**, 858-862 (1978).
18. H.-J. Park, E.-J. Jin, T. M. Jung, H. Joo, and J.-H. Lee, Optimal culture conditions for photosynthetic microalgae *Nannochloropsis oculata*, *Appl. Chem. Eng.*, **21(6)**, 659-663 (2010).
19. R. P. L. Guillard and J. H. Ryther, Studies of marine planktonic diatoms. 1. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran, *Can. J. Microbiol.*, **8**, 229-239 (1962).
20. H.-J. Park, Y.-H. Kim, and J.-H. Lee, Characterization of *Arthrospira platensis* mutants generated by UV-B irradiation, *Appl.*

- Chem. Eng.*, **23**, 496 (2012).
21. W. Chen, M. Sommerfeld, and Q. Hu, Microwave-assisted Nile red method for in vivo quantification of neutral lipids in microalgae, *Bioresour. Technol.*, **102**, 135 (2011).
  22. E. Bertozzini, L. Galluzzi, A. Penna, and M. magnani, Application of the standard addition method for the absolute quantification of neutral lipids in microalgae using Nile red, *J. Microbiol. Methods.*, **87**, 17 (2011).
  23. S.-J. Choi, Y.-H. Kim, A. Kim, and J.-H. Lee, *Arthrospira platensis* mutants containing high lipid content by electron beam irradiations and analysis of its fatty acid composition, *Appl. Chem. Eng.*, **24(6)**, 628-632 (2013).
  24. J. H. Yoon, J.-H. Shin, and T. H. Park, Characterization of factors influencing the growth of *Anabaena variabilis* in a bubble column reactor, *Bioresour. Technol.*, **99**, 1204-1210 (2008).
  25. C.-G. Lee and B. O. Palsson, High-density algal photobioreactors using light-emitting diodes, *Biotechnol. Bioeng.* **44**, 1161-1167 (1994).
  26. E. Han, J. Huang, Y. Li, W. Wang, M. Wan, G. Shen, and J. Wang, Enhanced lipid productivity of *Chlorella pyrenoidosa* through the culture strategy of semi-continuous cultivation with nitrogen limitation and pH control by CO<sub>2</sub>, *Bioresour. Technol.*, **136**, 418-424 (2013).
  27. S. H. Oh, J. G. Han, N. Y. Kim, J. S. Cho, T. B. Yim, S. Y. Lee, and H. Y. Lee, Cell Growth and Lipid Production from Fed-batch Cultivation of *Chlorella minutissima* according to Culture Conditions, *KSBB. J.* **24(4)**, 377 (2009).
  28. K. Ying, D. J. Gilmour, Y. Shi, and W. B. Zimmerman, Growth enhancement of *Dunaliella salina* by microbubble induced airlift loop bioreactor (ALB)-the relation between mass transfer and growth rate, *JBNB*, **4**, 1-9 (2013).