

# 나노기포 수소수에서 배양한 *Arthrospira platensis* 특성 확인

서지혜 · 최수정 · 이상훈<sup>\*,\*\*</sup> · 이재화<sup>†</sup>

신라대학교 의생명과학대학 제약공학, \*한국식품연구원 기능성식품연구본부, \*\*과학기술연합대학원대학교 식품생명공학  
(2015년 3월 30일 접수, 2015년 4월 25일 심사, 2015년 5월 29일 채택)

## Characterization of *Arthrospira platensis* Cultured in Nano-bubble Hydrogen Water

Ji-Hye Seo, Soo-Jeong Choi, Sang-Hoon Lee<sup>\*,\*\*</sup>, and Jae-Hwa Lee<sup>†</sup>

Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical & Life Science, Silla University, Busan 617-736, Korea

\*Division of Functional Food Research, Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Republic of Korea

\*\*Department of Food Biotechnology, University of Science and Technology, Daejeon 305-350, Republic of Korea

(Received March 30, 2015; Revised April 25, 2015; Accepted May 29, 2015)

### 초 록

미세조류 *Arthrospira platensis*는 단백질 함량이 높고, 불포화 지방산 등을 다량함유하고 있어 건강보조식품 및 다양한 분야에서 활용되고 있다. 또한 phycocyanin, myxoxanthophyll, zeaxanthin 등의 색소를 함유하고 있어서 항산화물질, 식품 첨가물로도 이용되고 있다. 나노기포 수소수는 수소 기체를 나노기포 상태로 물속에 주입하여 포화용해도 이상으로 용해시킨 것이다. 이런 나노기포 수소수는 항산화능이 높고, 항암효과가 있는 것으로 알려져 있다. *Arthrospira platensis*를 일반 증류수 배지와 수소수로 제조한 배지에서 배양한 후 특성을 확인하였다. 배양 결과, 세포 성장 및 광합성으로 인한 색소인 chlorophyll과 carotenoid의 함량은 수소수 배지에서 배양하였을 경우 대조군에 비해 15% 정도 증가한 것으로 나타난다. 그리고 phycocyanin 역시 7% 정도 증가하였다. 하지만, 지질함량은 수소수 배지 배양과 일반 배지 배양 간에 큰 차이가 없는 것을 확인하였다. 항산화물질의 함량을 확인하기 위해 flavonoid 및 polyphenol의 함량을 측정하였다. Flavonoid는 수소수 배지에서 배양하였을 경우 대조군에 비해 70% 이상 증가함을 보이고 있다. 하지만 polyphenol은 대조군과 유사한 함량을 보이고 있다.

### Abstract

*Arthrospira platensis* (*A. platensis*) has been used in various fields including dietary supplements as it contains a high protein content and large amounts of unsaturated fatty acids. In addition, it has some pigments such as phycocyanin, myxoxanthophyll and zeaxanthin and thus has been used as a food additive and antioxidant substance. Nano-bubble hydrogen is to dissolve more than the saturation solubility in water by injecting the hydrogen gas in the nano-bubble hydrogen water. The nano-bubbles are known to possess higher antioxidant properties in addition to anticancer effects. In this paper, *Arthrospira platensis* was cultured in both a normal medium with distilled water and nano-bubble hydrogen water medium and their properties were compared. The cell growth and the content of chlorophyll and carotenoid in the nano-bubble hydrogen water was 15% higher than that of the control. The level of phycocyanin in nano-bubble hydrogen water was also 7% higher than that of the control. However, there were little differences in the lipid content between the nano-bubble and control. To determine the content of the antioxidants, the level of flavonoid and polyphenol were measured. The level of flavonoid in nano-bubble hydrogen water was found to be more than 70% increased when comparing to that of the control, while the level of polyphenol was similar to each other.

**Keywords:** *Arthrospira platensis*, nano-bubble hydrogen water, carotenoid, chlorophyll, antioxidant

## 1. 서 론

미세조류는 물, 이산화탄소, 빛을 이용하여 성장하고, 황무지, 해안가, 바다 등 어디서든 배양이 가능하다. 또한 지질 단백질, 색소, 비타

민 의약성분 및 다양한 유용물질들을 생산한다고 알려져 있다[1]. 잠재자원으로 부각을 나타내는 미세조류는 주로 식량과 생물사료 또는 생물학적 비료로 이용되어 왔으며, 대표적으로 *Arthrospira*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Nostoc*, *Aphanizomeno* 등이 생명공학분야에 성공적으로 사용되고 있다[2]. 이 중 남조류(cyanobacteria)는 다양한 생리학적, 생화학적인 특징을 가지고 있으며, 이들 중 다수는 식물, 동물 등에서 보기 힘든 불포화지방산을 많이 함유하고 있다.

남조류 중 *Arthrospira platensis*는 알칼리성 호수에서 자생하는 나선형의 미세조류로 단백질 함량은 건조체량의 60~70%에 달한다[3]. *A. platensis*는 광합성을 통해 성장하며, glycolysis, TCA cycle, 지방산

† Corresponding Author: Silla University,  
Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical & Life Science,  
Busan 617-736, Korea  
Tel: +82-51-999-5748 e-mail: jhalee@silla.ac.kr

및 지질 합성을 통해 여러 종류의 유용 물질을 생산한다[4]. *A. platensis*는 엽록소와 같은 지용성 색소(chlorophyll, carotenoid)와 함께 광합성 보조 색소인 phycobiliprotein을 추가적으로 생산하며 phycobiliprotein은 c-phycoyanin, allophycoyanin, phycoerythrin으로 구성된다[5]. *A. platensis*는 phycocyanin을 비롯한 myxoxanthophyll, zeaxanthin과 같은 색소를 다량 함유하고 있으며 이는 항산화, 지질 과산화 등의 효능을 통해 건강기능식품 및 식품첨가물로 이용되고 있다[6]. 이렇듯 *A. platensis*의 지방산은 재생 가능한 에너지원으로 활용 가능하고, 여러 가지 생리활성 물질을 생산하기에, *A. platensis*의 여러 유용한 물질 생산량을 높일 수 있는 배양 조건을 확립하기 위한 연구가 필요하다.

나노기포수는 산소나 수소 등의 기체를 나노기포 상태로 물속에 채류시킨 물의 종류로, 포화용해도 이상으로 기체를 물속에 용해시킨다. 나노기포는 마이크로 기포가 자연 상태에서 수축되어 발생하는 것으로 크기가 약 0.5~10  $\mu\text{m}$  범위의 극초미세기포이다[8]. 나노기포는 여러 방면에 사용 가능한 물질로 인정받고 있는데, 특히 생물학적인 처리나 MEMS (Microelectromechanical systems) 기구들에 유용한 것으로 알려져 있다[9]. 나노기포 연구는 폐수를 정화하는데 많이 이용되고 있는데 나노기포를 수처리에서 이용할 때 공기 용해효율이 높아 대전작용, 물리적 흡착 효과가 뛰어나다고 보고되고 있다[10]. 대전효과가 높아 안정화된 나노기포는 기포 특성이 장시간 유지되기 때문에 생명공학 분야와 의학적인 응용이 가능하다[8].

이런 나노기포 기술을 미세조류 배양에 사용하여, 배양 시 고려해야 하는 요소인 배지의 pH, 항산화능 등과 같은 요소의 차이를 두고 그로 인한 미세조류의 특성을 확인해 볼 수 있다. 미세조류를 배양 시 나노기포를 함유한 배지에서 성장이나 특성이 일반 배지와 차이를 보인다는 기존 연구들이 있다. CO<sub>2</sub>는 배지의 pH를 유지하는데 사용되거나, high value biomaterial을 생산하기 위한 carbon source로 사용된다. Yilu 등[11]은 *Arthrospira platensis* 배양 시스템에 CO<sub>2</sub>를 인위적으로 주입하였을 때 CO<sub>2</sub>를 주입하지 않은 대조군에 비해 40% 높게 성장한 것을 확인할 수 있었다. Kim 등[8]은 나노기포 산소수 및 수소수에서 미세조류 *Nannochloropsis oculata* (*N. oculata*)와 *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*)를 배양하였다. 세포 성장은 대조군과 비슷하였으나 지질 함량은 대조군에 미치지 못하는 것으로 나타났다. 광합성으로 인한 색소의 함량 변화를 확인하니 chlorophyll 함량은 대조군에 비해 증가하고, carotenoid 함량 역시 증가하는 것을 확인하였다. 수소수는 용존 수소가 풍부하여 마이너스 값의 산화환원 전위를 나타낸다. 또한 수소수는 활성수소의 함량이 높기 때문에 음용 시 체내 활성산소 제거 및 항산화 작용을 돕는다는 연구결과들이 보고되고 있다[12]. 수소수는 클러스터가 다른 액체에 비해 작아 물질 속에 잘 침투하는 장점이 있으므로, 활성산소 제거에 탁월한 효과가 있다.

본 연구에서는 나노기포를 함유하고 있는 수소수를 이용하여 배지를 만들어 미세조류 *Arthrospira platensis*를 배양하였을 때 대조군에 비해 어떤 차이가 있는지 확인하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 사용균주 및 배양방법

본 연구에서 사용한 미세조류 *Arthrospira platensis* NIES39 (KCTCAG30033)는 한국생명공학연구원 생물자원센터로부터 분양받았다. 배양에 사용한 배지는 알칼리서 무기배지인 SOT 배지로, 성분은 다음과 같다(Table 1). SOT-1과 SOT-2를 각각 121 °C에서 15 min

Table 1. Components of SOT Medium

	Components	Amounts
SOT-1 (600 mL)	NaHCO <sub>3</sub>	16.8 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g
	NaNO <sub>3</sub>	2.5 g
SOT-2 (400 mL)	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g
	NaCl	1 g
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.04 g
	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01 g
	Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	0.08 g
	A5 trace-metal sol.	1 mL
A5 trace-metal sol. (1 L)	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86 g
	MnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.50 g
	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.22 g
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.21 g
	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.08 g

간 멸균, 냉각시켜 혼합 후 10N NaOH를 이용하여 pH를 9로 조절하여 사용하였다. 온도 35 °C, 교반속도 120 rpm, 광도 6,000 lux의 조건으로 배양하였고, 광주기는 12 h : 12 h (명 : 암)으로 명반응 시 형광등을 사용하였다

### 2.2. 나노기포 수소수 제조

Hiroshima Kasei Ltd.사가 만든 수소 주입기를 이용하여 제작한 수소수를 (주)태창으로부터 구입하여 본 연구에 사용하였다. 이 수소수는 900 nm 이하의 지름을 가진 나노 수소 기체를 함유하고 있고, 전체 기포 중 71%가 나노기포이다. 또한 용존 수소량은 0.8~1.2 ppm이고, 일반 수돗물의 산화환원 전위가 +100~200 mV인데 반해 수소수의 산화환원 전위는 -500~-600 mV이다.

### 2.3. 나노기포 수소수 배양

증식기의 *Arthrospira platensis* 세포를 수확하여 520 nm에서 흡광도를 0.3으로 조정하였다. 수소수 배지를 만들기 위해 SOT배지 제작 시 3차 증류수 대신 수소수로 대체하고 액체 내 수소 잔존량을 보존하기 위해 멸균과정은 생략하였다.

### 2.4. 색소 함량 분석

*A. platensis*의 광합성 색소 함량을 측정하기 위해 12일 배양 후 O.D 값을 0.5로 조정된 세포 1 mL을 준비하였다. 이는 각 sample의 세포수를 동일하게 한 후 색소의 함량을 측정하기 위함이다. 이 세포를 13,000 rpm에서 2 min간 원심분리하여 상등액은 버리고 methanol 1 mL을 첨가하였다. methanol 첨가한 cell pellet을 60 °C에서 30 min간 incubation한 후 0 °C에서 5 min간 냉각시킨다. 이후 13,000 rpm에서 2 min간 원심분리를 통해 상등액만 분리하였다. 분리한 상등액을 650, 654, 461, 664 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다[8]. phycocyanin을 측정하기 위해서 615 nm에서 흡광도를 측정 후, c-phycoyanin을 농도별로 흡광도를 측정하여 작성한 표준검량선을 이용하여 정량하였다.

$$\text{Chlorophyll} = (A_{650} \times 25.5) + (A_{665} \times 4)$$

$$\text{Carotenoid} = [A_{461} + (0.046 \times A_{664})] \times 4$$

2.5. 지질함량 분석

*A. platensis*의 총 지질함량을 측정하기 위해 Chen 등[13]의 방법을 사용하였다. 흡광도 520 nm에서 0.5로 조정된 세포 10 µL와 증류수 138 µL, Nile red 2 µL 그리고 DMSO 50 µL를 혼합하여 40 °C에서 10 min간 반응시켰다. 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[14].

세포 내 중성지질 함량을 측정하기 위해 Bertozzini 등[12]의 방법을 변형하여 측정하였다. 중성지질의 검량선으로는 triolein (Sigma)를 이용하였다. Triolein의 농도를 5, 15, 20, 25, 37.5, 50 µg/mL로 nile red로 염색하여 형광값을 측정하였다. 각 농도에 따른 형광 강도를 이용하여 표준 검량선을 작성한 후 세포 내 중성지질 함량을 결정하였다[13].

2.6. 지질 형광현미경 분석

Nile red로 염색한 세포의 형태를 관찰하기 위해 Malapascua 등[14]의 방법을 이용하여 형광현미경 촬영을 하였다. 세포를 원심분리하여 얻은 pellet에 nile red solution을 500 µL 첨가하여 혼합하고 37 °C에서 5~10 min간 방치하였다. 이후 saline을 이용해 2회 세척 후 형광현미경(Carl Zeiss, Axioskop Plus)을 이용하여 excitation 552nm, emission 636 nm 조건에서 관찰하였다.

2.7. 항산화 물질 측정

동결 건조한 미세조류 100 mg을 0.5 M 인산완충용액(pH 6.8) 5 mL에 넣고, homogenizer (Wheaton, USA)를 이용하여 세포를 분쇄하였다. 분쇄하여 얻은 조추출물액을 4 °C에서 10,000 rpm으로 10 min간 원심분리한 후 상등액을 얻었다. 상등액을 이용하여, total flavonoid content, total polyphenolic content를 측정하였다.

2.7.1. Total flavonoid content

Total flavonoid는 NFRI[15]의 방법을 이용하여 측정하였다. 각 시료 100 µL에 diethylen glycol 1 mL과 1N NaOH 100 µL를 혼합하고, 37 °C에서 1 h 동안 incubation한 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. Total flavonoid content는 naringin (Sigma)을 이용하여 작성한 검량선으로 계산하였다.

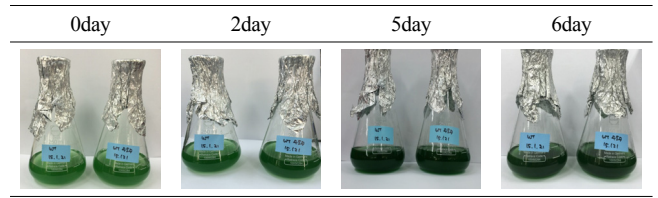
2.7.2. Total polyphenol content

Total polyphenol content는 Folin-Denis[16]방법으로 측정하였다. 시료 50 µL에 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 mL을 가하여 혼합, 3 min간 정치한 후 1 N Folin-ciocalteu(sigma, USA) 50 µL를 첨가하였다. 혼합액을 30 min간 반응 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. Total polyphenol content는 galic acid (Sigma)를 이용하여 표준 검량선을 작성하여 계산하였다.

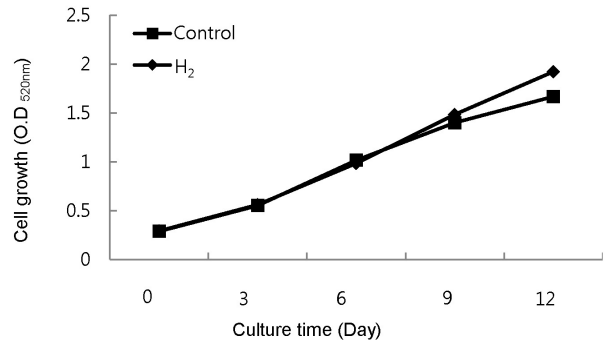
3. 결과 및 고찰

3.1. 나노기포 수소수 배지 배양 시 세포 성장

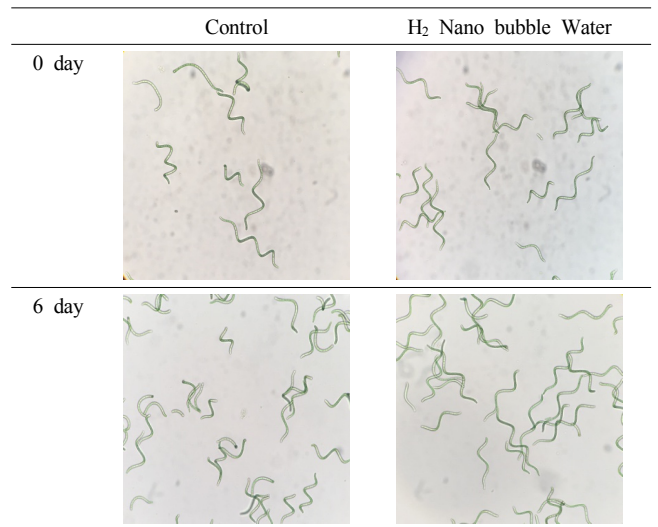
나노기포 수소수, 3차 증류수를 이용하여 SOT배지를 만들어 실험에 이용하였다. 서로 다른 조건의 배지에 동일한 *Arthrospira platensis*를 접종하여 배지에 따른 세포 성장을 살펴보았다. 수소수 배지의 세포 성장은 대조군과 비슷한 경향을 보였지만(Figure 1(a)), 12일째 수소수 배지에서 배양한 미세조류의 성장이 약 15% 정도 높게 나타나



(a)



(b)



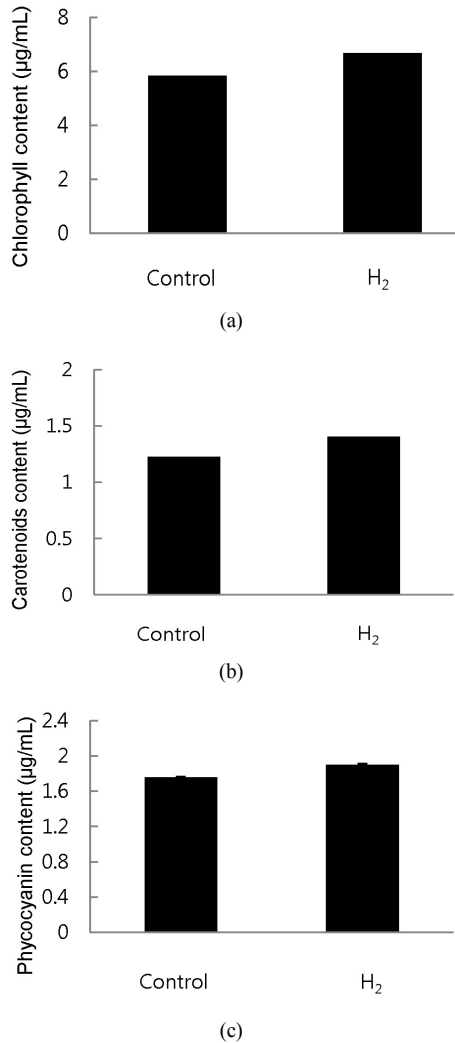
(c)

Figure 1. Cell growth of *A. platensis* in nano-bubble hydrogen water and distilled water. (a) culture of *A. platensis* in nano bubble hydrogen water and distilled water, (b) Microscopic image of *A. platensis*, (c) Optical density graph of cell growth.

는 것을 확인할 수 있었다(Figure 1(b)). 이는 Choi 등[8]이 수소수 배지에서 *C. vulgaris*, *N. oculata*를 배양하였을 때 증류수 배지에서 배양하는 것보다 세포 생장이 약 10% 정도 증가한 것과 유사한 연구 결과이다. *Arthrospira platensis*를 배양 0일째, 6일째 되는 시점에 현미경으로 관찰하니 일반적인 나선형의 모양을 관찰할 수 있었다(Figure 1(c))[17].

3.2. 세포의 색소 함량

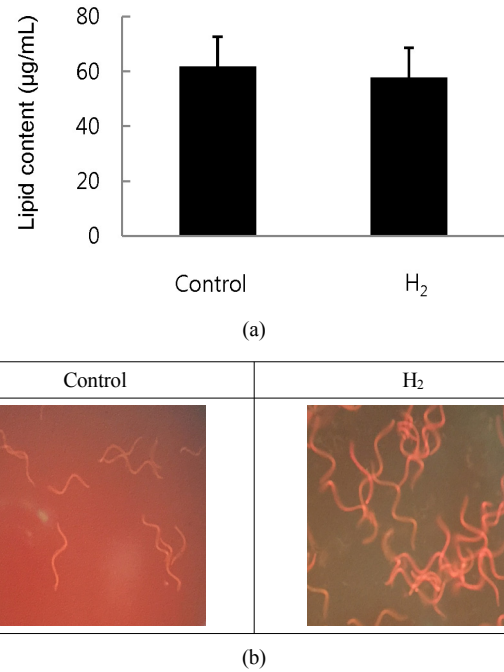
*A. platensis*는 주요 광합성 색소로서 chlorophyll, carotenoid, phycocyanin 등을 가지고 있다. Carotenoid는 천연색소 항산화물질로, 자유라디칼의 생성을 효율적으로 억제한다[14]. Chlorophyll은 식용색소로



**Figure 2.** Chlorophyll and carotenoid content of *A. platensis* in nano-bubble hydrogen water and distilled water (a) Chlorophyll content, (b) Carotenoid content.

많이 쓰이고, 제약 및 화장품 산업에서 널리 쓰이고 있다[18]. Phycocyanin 역시 식용색소 및 화장품소재로 많이 사용되며 항염증 및 항산화 효과가 있는 것으로 밝혀졌다[19]. 미세조류 *Arthrospira platensis*를 수소수 배지와 증류수 배지에서 12일 동안 배양을 한 후, 광합성을 통한 색소 함량을 확인하기 위해 chlorophyll과 carotenoid의 양을 측정하였다. 먼저 chlorophyll의 함량을 비교하면, 수소수 배지에서 배양하였을 때는 6.7 µg/mL로, 대조군인 증류수 배지(5.8 µg/mL)에 비해 약 15% 증가함을 확인할 수 있었다(Figure 2(a)). *Dunaliella salina* 배양 시 공기를 주입했을 때에 chlorophyll 생산량이 32.7 mg/L로 대조군(4.3 mg/L)에 비해 약 7.6배 높은 생산량을 확인하였다. 이는 수소 주입된 배지를 사용한 본 연구에서 chlorophyll 함량이 높게 나타난 것과 비슷한 연구 결과이다. 그러므로 미세조류 배양 시 기포 주입 배지를 사용한 경우, 세포의 색소 함량을 증가시키는 것으로 판단할 수 있다.

수소수배지에서 배양을 하였을 경우의 carotenoid 함량이(1.4 µg/mL) 대조군인 증류수 배지(1.2 µg/mL)와 비교하니 15% 정도 증가하였다(Figure 2(b)). *Arthrospira platensis*는 활성산소 제거능이 있는 β



**Figure 3.** Lipid content of *A. platensis* in nano-bubble hydrogen water and distilled water (a) Lipid content (b) Lipid fluorescence image.

-carotene과 zeaxanthine 등의 carotenoid를 함유하고 있어서 항산화 효과가 있다고 밝혀져 있다[24]. 미세조류 배양 환경의 변화는 미세조류의 대사에 영향을 주어, 색소 등의 합성의 변화를 야기한다고 알려져 있다. 예를 들어, nitrogen이 부족한 배양조건일 경우, carotenoid의 합성이 증가한다[25]. 일반 증류수 배지보다 수소수 배지에서 배양하였을 때 carotenoid의 양이 증가한 것으로 보아, 미세조류의 활성산소 제거능력이 증가한 것으로 판단할 수 있다.

phycocyanin은 수소수 배지에서 배양하였을 경우 대조군에 비해 7% 정도 증가한 것을 확인할 수 있었다(Figure 2(c)). phycocyanin은 항산화능이 있다고 알려져 있기에, 높은 phycocyanin 함량은 미세조류에서의 항산화능을 향상시킬 수 있을 것으로 판단된다.

### 3.3. 세포의 지질 함량

미세조류 *A. platensis*의 지질 함량을 확인하기 위해서 Nile red를 이용하여 측정하였다. Triolein을 이용하여 표준 검량선을 작성하였으며, triolein과 형광 강도 사이에 좋은 직선성( $R^2 = 0.99935$ )을 나타내어 지질 정량에 적합하다고 판단하였다. 증류수배지에서 배양한 것(61.8 µg/mL)에 비해 수소수 배지(57.7 µg/mL)에서 배양하였을 때 7% 정도 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 3(a)). Nile red로 염색한 세포를 형광현미경으로 관찰하였다. 현미경상으로 큰 차이를 보이지 않는다(Figure 3(b)). 미세조류에서 지질함량은 환경적인 스트레스에 의해 영향을 많이 받는다고 알려져 있으며, 특히 영양성분 중 질소원의 결핍에서 지방 축적이 유도되고 배양조건에 따라 그 함량이 크게 달라진다고 알려져 있다[26]. 미세조류가 스트레스 하에 노출되면 불리한 조건에 대처하기 위해 지질의 대사를 변경하거나 지질의 합성이 증가하게 된다[27]. 그리고 미세조류 배지 내의 영양분이 부족하거나 스트레스 하에 노출되면 미세조류의 생장이 늦어진다고 알려져 있다. 하지만 본 연구에서는 수소수 배지에서 배양하였을 경우, 대조군 대비 생장이 증가하였고, 지질의 함량을 큰 차이가 없는 것으로 보아, 수소

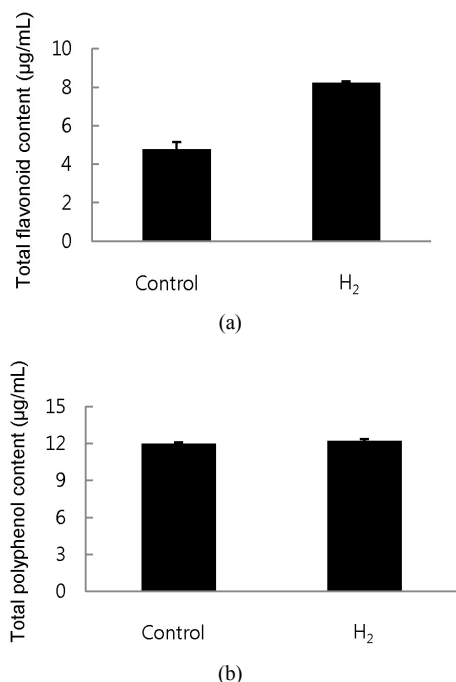


Figure 4. Total flavonoid content (a) and Total polyphenol content (b).

수 배지에서 배양하는 것이 스트레스가 적고 미세조류 세포 배양에 적절한 환경일 것으로 판단된다.

### 3.4. 세포의 항산화물질 함량

미세조류에 함유된 항산화물질인 총 flavonoid 양과, 총 polyphenol 양을 측정하였다. flavonoid는 일반적으로 자유 라디칼을 효과적으로 소거하는 능력이 있는 항산화 물질이다. polyphenol은 항산화물질로, 자유 라디칼 산화 억제제로 알려져 있다[14]. 본 연구에서 총 flavonoid는 배양 조건에 따라 함량의 큰 차이를 보이고 있다. 증류수 배지에서 배양하였을 경우 총 flavonoid의 양은 4.8 µg/mL이고, 수소수 배지에서 배양하였을 때는 8.2 µg/mL로 약 73% 정도 증가한 값을 보이고 있다(Figure 4(a)). 각종 미세조류 중 *A. platensis*에서 flavonoid가 가장 낮은 것으로 알려져 있는데, 본 연구에서 수소수 배지에서 배양할 경우, flavonoid가 증가하기에 이것은 의미있는 연구 결과이다[28]. 하지만, 총 polyphenol의 경우는 증류수 배지에서 배양하였을 경우 12 µg/mL, 수소수는 12.2 µg/mL로 차이를 보이지 않고 있다(Figure 4(b)). 배양환경에 따라 항산화물질의 생성 및 함량의 차이를 확인한 선행연구들이 있다. Meenakshi 등[29]은 미세조류 배양 시 금속을 첨가하였을 때 금속이온이 높을수록 미세조류의 SOD 활성이 증가함을 확인하였다. 스트레스 요인이 미세조류의 생리활성 물질의 생성에 영향을 끼침을 알 수 있다. 수소수에서 배양하는 경우는 미세조류의 성장을 방해하지 않고, 오히려 항산화 물질의 생성이 증가되는 의미있는 결과를 보인다.

## 4. 결 론

본 연구에서는 수소수가 주입된 나노기포 수소수를 미세조류 *A. platensis*를 배양하는데 사용하여 일반 증류수 배지와 차이를 살펴 보았다. 수소수 배지와 증류수 배지에서 배양한 미세조류의 생장은

비슷한 경향을 보였지만 배양 말기 수소수 배지에서의 세포의 생장이 15% 정도 더 높은 것을 확인할 수 있었다. 동일한 세포 수를 이용하여 색소 및 지질 함량을 비교해 보았다. chlorophyll과 carotenoid의 함량은 대조군에 비해 나노기포 수소수에서 배양한 실험군에서 약 15% 증가함을 확인하였으며 phycocyanin은 7% 정도 증가하였다. 하지만 지질 함량은 나노기포 수소수에서 배양한 실험군이 대조군에 비해 약 7% 감소함을 알 수 있었다. 이는 나노기포 수소수를 이용한 미세조류 배양이 세포 내 광합성 대사를 촉진시킨다고 판단할 수 있다. 또한 미세조류에서 생산되는 항산화 물질인 flavonoid와 polyphenol의 함량을 측정해보았다. 나노기포수와 대조군 배지에서 배양한 미세조류 내 항산화 물질 함량을 측정하기 위해 총 flavonoid 및 polyphenol의 함량을 분석하였다. 그 결과 나노기포수를 이용하여 배양한 미세조류 실험군에서 대조군에 비해 총 flavonoid 함량이 약 73% 증가하였지만, 총 polyphenol의 함량에서는 큰 차이가 없음을 확인하였다. 본 연구를 통해 나노기포 수소수를 이용하여 미세조류를 배양하였을 경우 세포 내 지용성 색소, 지질 및 항산화 물질의 함량 증가를 확인할 수 있었다. 수소수 배지에서 미세조류 *A. platensis*를 배양할 경우 미세조류의 세포막에서 전자의 이동으로 진행되는 광합성이[30] 촉진되고 부차적으로 항산화 물질이나 색소들을 생산하는 메커니즘이 활발하게 되어 일반 배지에서 배양하는 경우보다 색소나 항산화물질의 함성이 더 증가하는 것으로 추측할 수 있다. 본 연구 결과를 통해 수소수에서 미세조류를 배양할 경우, 색소나 항산화물질 생성이 증가하였다. 이를 이용하여 향후 화장품 소재 개발이나 항산화능이 증대된 기능성 식품의 개발을 전망해 볼 수 있다.

## 감 사

본 연구는 한국해양과학기술진흥원의 ‘수산 실용화 기술개발 사업’의 지원을 받아 수행하였습니다.

## References

1. D. S. Joo, K. W. Kim, and S. Y. Cho, Physiological properties of extracts and the chemical composition of *Tetraselmis* sp. JK-46 cultured with deep seawater, *Kor. J. Fish Aquat. Sci.*, **44**(1), 1-7 (2011).
2. G. D. Gwak, M. S. Kim, and D. H. Kwak, Particle separation characteristics and harvesting efficiency of *Spirulina platensis* using micro-bubble, *J. Korean Soc. Water Wastewater*, **27**(5), 621-629 (2013).
3. M. R. Walach, M. J. Bazin, S. J. Pirt, and H. H. M. Balyuzi., Computer control of carbon-nitrogen ratio in *Spirulina platensis*, *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 520-528 (1987).
4. A. Kulshreshtha, *Spirulina* in health care management, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **9**(5), 400-405 (2008).
5. P. Datla, *The Wonder Molecule Called Phycocyanin*, Parry Nutraceuticals and Valensa International (2011).
6. K. Hayashi, T. Hayashi, and I. Kojima, A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: in vitro and ex vivo evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **12**(15), 1463-1471 (1996).
7. C.-J. Kim, Y. H. Jung, G. G. Choi, Y. H. Park, Ch. Y. Ahn, and H. M. Oh, Optimization of outdoor cultivation of *Spirulina pla-*

- tensis* and control of contaminant organisms, *Algae*, **21**(1), 133-139 (2006).
8. S. J. Choi, Y. H. Kim, I. H. Jung, and J. H. Lee, Effect of nano bubble oxygen and hydrogen water on microalgae, *Appl. Chem. Eng.*, **25**(3), 324-329 (2014).
  9. M. Matsumoto and K. Tanaka, Nano bubble size dependence of surface tension and inside pressure, *Fluid Dyn. Res.*, **40**(7-8), 546-553 (2008).
  10. S. Saitoh, K. Takahashi, K. Nabeshima, Y. Yamashita, Y. Nakaseko, A. Hirata, and M. Yanagida, Aberrant mitosis in fission yeast mutants defective in fatty acid synthetase and acetyl CoA carboxylase., *J. Cell Biol.*, **134**(4), 949-961 (1996).
  11. Y. Bao, M. Liu, X. Wu, W. Cong, and Z. Ning, In situ carbon supplementation in large-scale cultivations of *Spirulina platensis* in open raceway pond, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **17**, 93-99 (2012).
  12. R. Asada, K. Kageyama, H. Tanaka, H. Matsui, M. Kimura, Y. Saitoh, and N. Miwa, Antitumor effects of nano-bubble hydrogen-dissolved water are enhanced by coexistent platinum colloid and the combined hyperthermia with apoptosis-like cell death, *Oncol. Rep.*, **24**, 1463-1470 (2010).
  13. W. Chena, M. Sommerfelda, and Q. Hu, Microwave-assisted Nile red method for in vivo quantification of neutral lipids in microalgae. *Bioresour. Technol.*, **102**, 135-141 (2011).
  14. Y. H. Kim and J. H. Lee, Isolation of *Arthrospira platensis* mutants producing high lipid and phycobiliproteins, *KSBB*, **27**, 172-176 (2012).
  15. 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**, 17-23 (2011).
  16. S. J. Choi, Y. H. Kim, A. Kim, and J. H. Lee, *Arthrospira platensis* mutants containing high lipid content by electron beam irradiation and analysis of its fatty acid composition, *Appl. Chem. Eng.*, **24**(6), 628-632 (2013).
  17. J. R. Malapascua, H. N. Chou, W. J. Lu, and J. C. Lan, Development of an indirect method of microalgal lipid quantification using a lysochrome dye, Nile red, *Afr. J. Biotechnol.*, **11**(70), 13518-13527 (2012).
  18. E. D. G. Danesi, C. de O. Rangel-Yagui, J. C. M. de Carvalho, and S. Sato, An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*, *Biomass Bioenergy*, **23**, 261-269 (2002).
  19. V. B. Bhat and K. M. Madyastha, C-Phycocyanin: A potent peroxyl radical scavenger in vivo and in vitro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **275**, 20-25 (2000).
  20. NFRI, *Manuals of Quality Characteristic Analysis for Food Quality Evaluation* (2). National Food Research Institute. Skuba. Japan, **61** (1990).
  21. O. Folin and W. Denis., On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents, *J. Biol. Chem.*, **12**, 239-249 (1912).
  22. Y. H. Kim, S. J. Choi, H. J. Park, and J. H. Lee, Electron beam-induced mutants of microalgae *Arthrospira platensis* increased antioxidant activity, *J. Ind. Eng. Chem.*, **20**, 1834-1840 (2014).
  23. 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, *J. Biomater. Nanobiotechnol.*, **4**, 1-9 (2013).
  24. A. Belay, New scientific developments in the health benefits of spirulina (*Arthrospira*): Phycocyanin and its potential health benefits, *Nutr. Res. Pract.*, **7**(3), 165-173 (2004).
  25. 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).
  26. T. M. Mata, A. A. Martins, and N. S. Caetano, Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, *RENEW SUST. ENERG. REV.*, **14**, 217-232 (2010).
  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*, **24**, 377-382 (2009).
  28. K. Goiris, K. Muylaert, D. De Paepe, G. J. E Baart, and L. De Cooman, Detection of flavonoids in microalgae from different evolutionary lineages, *J. Phycol.*, **50**, 483-492 (2014).
  29. M. Choudhary, U. K. Jetley, M. A. Khan, S. Zutshi, and T. Fatma., Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **66**, 204-209 (2007).
  30. A. Klanchu, T. Vorapreeda, W. Vongsangnak, C. Khannapho, S. Cheevadhanarak, and A. Meechai, System biology and metabolic engineering of *Arthrospira* cell factories., *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **3**, 1-8 (2012).