

# 미세조류 및 해조류 유주자의 피막화를 통한 성장 및 생존율 연구<sup>1a</sup>

정상목<sup>2</sup> · 이한성<sup>3</sup> · 강슬기<sup>2</sup> · 손지수<sup>2</sup> · 전재혁<sup>2</sup> · 이한주<sup>2</sup> · 신현웅<sup>2\*</sup>

## Study on the Growth and Survival Rate of Capsulated Microalgae and Macroalgae Zoospores<sup>1a</sup>

Sang-Mok Jung<sup>2</sup>, Han-Seong Lee<sup>3</sup>, Seul-Gi Kang<sup>2</sup>, Ji-Su Son<sup>2</sup>, Jae-Hyuk Jeon<sup>2</sup>, Han-Joo Lee<sup>2</sup>, Hyun-Woung Shin<sup>2\*</sup>

### 요약

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  $8.74 \times 10^5$  cells mL<sup>-1</sup>로 최대 증가를 보였으나, 알긴산만을 이용한 피막에서는  $4.92 \times 10^5$  cells mL<sup>-1</sup>로 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<sup>-2</sup>가 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  $8.74 \times 10^5$  cells mL<sup>-1</sup> while 100% of alginic acid was the lowest rate up to  $4.92 \times 10^5$  cells mL<sup>-1</sup>. 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<sup>-2</sup>. 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  $\text{mg L}^{-1}$  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  $\text{mg L}^{-1}$ 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

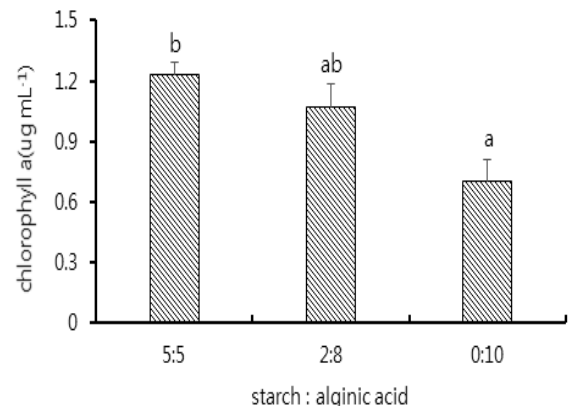


Figure 1. Chlorophyll a content of capsulated microalgae with different ratio  
\*one-way ANOVA, tukey's test(p<0.05)

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

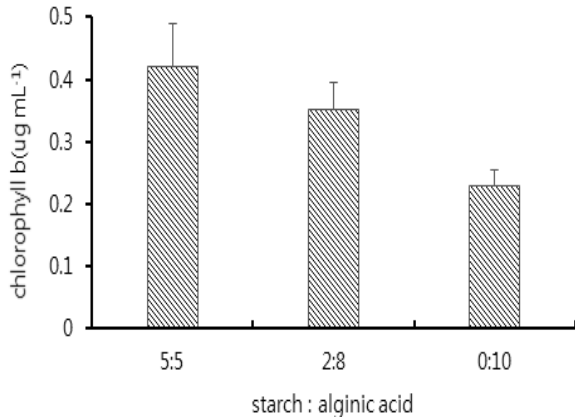


Figure 2. Chlorophyll b content of capsulated microalgae with different ratio

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

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

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<sup>5</sup> cells mL<sup>-1</sup>, 2:8일 때는 6.13×10<sup>5</sup> cells mL<sup>-1</sup>, 0:10일 때는 4.92×10<sup>5</sup> cells mL<sup>-1</sup>로 나타났다. 알긴산만 포함된 피막에 비해 녹말과 알긴산이 포함된 피막에서 미세조류의 개체수가 약 2배 높게 나타났다. 엽록소 a, b를 측정한 결과에서는 녹말:알긴산이 5:5일 때 엽록소 a는 1.231±0.12 ug mL<sup>-1</sup>, 엽록소 b는 0.420±0.14 ug mL<sup>-1</sup>로 나타났고, 2:8인 경우에는 엽록소 a는 1.067±0.23 ug mL<sup>-1</sup>, 엽록소 b는 0.351±0.09 ug mL<sup>-1</sup>, 0:10일 때 엽록소 a는 0.704±0.21 ug mL<sup>-1</sup>, 엽록소 b는 0.229±0.05 ug mL<sup>-1</sup>으로 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.

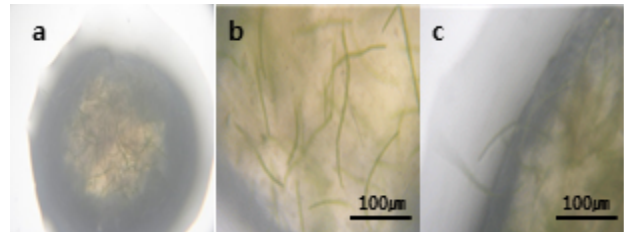


Figure 3. Germination of capsulated macroalga spore observed by optical microscope(a : X100 of *Ulva australis* thallus, b, c : X400 of *Ulva australis* thallus)

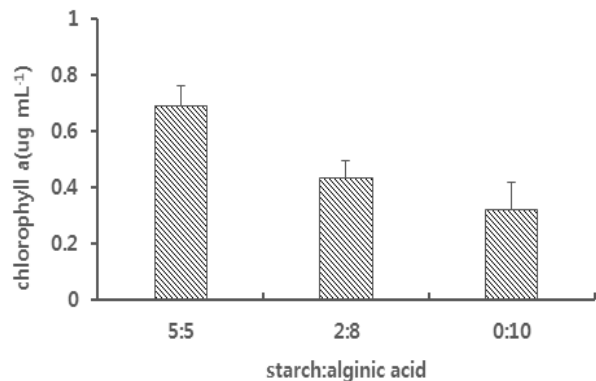


Figure 4. Chlorophyll a content of macroalga spore capsulated with different mixture ratio

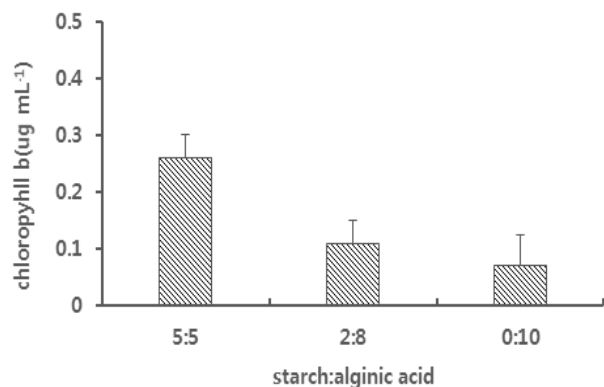


Figure 5. Chlorophyll b content of macroalga spore capsulated with different mixture ratio

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.

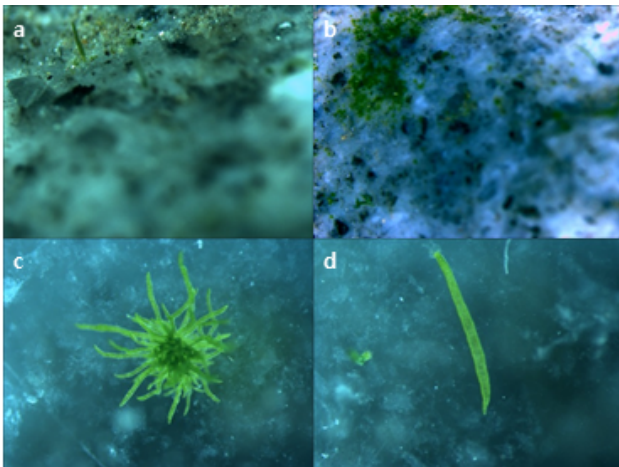


Figure 6. Germination of zoospores observed by dissecting microscopic(a,b : X20, c,d : X80)

### 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.