GOVP1200508303

최 종
연구보고서

미생물생산 생리활성물질에 의한 적조제거제의 산업화

Utilization of Microbial Glycolipid for Algae Bloom Mitigation

2002. 12

인하대학교

해 양 수 산 부

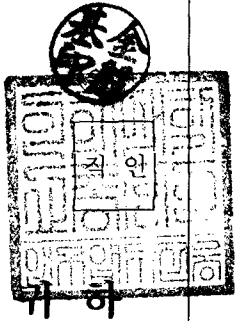
최 종 보 고 서

2002년도 수산특정연구개발사업에 의하여 완료한_
미생물생산 생리활성물질에 의한 적조제거제의 산업화에 관한 연구의 최종보고를 붙임과 같이 제출합니다.

첨부: 1. 최종보고서 8부
2. 최종보고서 디스켓 1매
* 최종보고서 파일은 인터넷 홈페이지(www.kmi.re.kr)로 제출

2002년 11 월 19 일

주관연구기관 인하대학
총괄연구책임 김은기

주관연구기관장 홍 승 용 

해 양 수 산 부 장 관 귀 하

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 " 미생물생산 생리활성물질에 의한 적조제거제의 산업화에 관한 연구 " 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2002 년 11 월 19 일

주관연구기관명 : 인하대학교
총괄연구책임자 : 김 은 기
공 동 연구원 : 최 중 기
공 동 연구원 : 한 경 남

요 약 문

Ⅰ. 제 목

미생물생산 생리활성물질에 의한 적조제거제의 산업화에 관한 연구

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

매년 계속 반복되고 그 강도가 점점 증가하는 적조는 수산업계에 많은 경제적 피해를 주고 있다. 지금까지의 최선의 방지법은 황토를 살포하는 방법이나 효율이 낮고 다량 살포로 인한 환경문제 및 운반 등의 비효율성으로 새로운 방법의 적용이 필요한 시점이다.

본 연구는 적조생물에 아주 낮은 농도에서도 효과적으로 저해시키는 물질을 미생물로부터 생산하여 적조제거에 사용하고자 함이다. 이는 환경적으로 흔적을 남기지 않고 분해되어서 2차 오염의 위험이 없는 점, 그리고 언제라도 값싼 원료를 사용해서 만들 수 있는 장점이 있다. 이러한 물질이 과연 적조제거에 효과적인지, 현장실험에서는 문제가 없는 지 등을 연구, 검토하여 새로운 파라다임의 적조제거제를 상용화하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 크게 3부분으로 구분되어있다. 신규 적조 제거제인 GL을 생산하는 부분, GL이 적조구제에 효율적인가 하는 적조 제거능 조사, GL이 바다환경에 영향을 미치는가하는 환경조사 부분이다. 생산부분은 경제성검토까지 실시하여 기존의 방법에 비하여 경제적인가 하는 부분까지 실시하여 상업화에 대비하였고, 적조 구제능은 현장에 직접 살포하여 실험실의 결과가 실제 현장에서도 적용되는가를 확인하였다. 환경에 미치는 영향은 적조의 직접 피해생물인 어류 및 패류, 그리고 다른 플랑크톤류의 영향을 조사하였다.

Ⅳ. 연구개발결과 및 활용방안

개발된 미생물생리활성물질인 GL은 값싼 원료인 포도당 및 옥수수유등을 이용하여 110 g/L의 높은 생산성을 보여서 생산원가를 낮출 수가 있었다. 적조 구제효율은 5-20 ppm의 낮은 농도에서 90%이상의 구제효율을 보였다. 또한 황토와 혼합사용시 황토사용량을 황토단독시 보다 80% 낮은 20%로 감소시킬 수 있었고 비용도 50% 감소하였다. 어류, 패류에는 영향이 없었으며 다른 생물에 미치는 영향도 미미한 수준이었다. 따라서 기존의 황토사용방법보다 경제적, 환경적으로 훨씬 더 효율적인 적조제거 방법임을 확인하였다.

SUMMARY

(영문요약문)

1. Mitigation of Harmful Algal Blooms by Sophorolipid.

A new method was proposed to control Harmful Algal Blooms (HABs) by using biosurfactant sophorolipid. The effect of sophorolipid on growth, motility, precipitation and recovery of algal cells were investigated for four common HAB species. Results indicated that the motility and growth of algal cells were inhibited significantly at the concentration of 20 and 5 mg/L sophorolipid respectively, and no recovery was observed under the above concentrations. The concentration of 20 mg/L sophorolipid was considered as an effective concentration to mitigate HABs. A sedimentation test suggested that the maximum precipitation occurred at the end of 1 hr, and the algicidal effect of sophorolipid was observed through a microscope. Using a comparative study, sophorolipid showed prominent algicidal capability. Analysis on bio-degradability, toxicity and cost estimation further demonstrated the potential of sophorolipid in future HABs mitigation.

2. Synergistic Effect of Sophorolipid and Loess in In-situ Test

The inhibition effect of sophorolipid and removal efficiency of loess on *C. polykrikoides* and *A. tamarense* were investigated respectively and the combination of sophorolipid and loess in harmful algal blooms mitigation was proposed for the first time. Results showed that the effective sophorolipid concentration to inhibit the motility of *C. polykrikoides* and *A. tamarense* was 10 and 15 mg/L respectively. More than 5 g/L loess was required in order to achieve the removal ratio of more than 80% for both species. The combination of sophorolipid and loess showed synergistic effect. At the optimum ratio of 5 mg/L sophorolipid plus 1 g/L loess for *C. polykrikoides* and 10 mg/L sophorolipid plus 1 g/L loess for *A. tamarense*,

the removal efficiencies on both species were higher than 90%. Sedimentation test was further carried out in order to verify the synergistic effect of sophorolipid and loess combination. Compared with the sophorolipid only group and loess only group, the sedimentation of algal cells was complete and no recovery occurred during the whole experimental period in the sophorolipid and loess combination group. The variation on suspended material indicated that the sedimentation of loess was rapid and the main sedimentation could be finished during the first 30 minutes. The addition of sophorolipid wouldnt affect the sedimentation of loess. These above results proved the effectiveness of the combination of sophorolipid and loess, which was considered as a promising way for harmful algal blooms mitigation.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction 9

1-1 Seek for new mitigation methods 9

1-2 Status of current research 12

1-3 Development of alternative mitigation method ... 14

1-4 Objective of research 15

1-5 Strategy of investigation..... 17

1-6 Applications..... 18

Chapter 2. Experimental methods and Results 19

2-1 Increase in the yield of bioactive material 19

2-2 Mitigation of HAB 24

2-3 Evaluation of environmental impact 59

2-4 Optimized production of bioactive material 88

2-5 Field trial of HAB mitigation 108

References..... 137

목 차

제 1 장 서 론 9
1절 연구개발의 필요성 9
1. 적조발생 현황 및 영향 9
2. 적조로 인해 해양약식의 피해 10
3. 적조발생의 원천적인 봉쇄나 정확한 예측 어려움 11
2절 관련 연구의 현황과 문제점 12
1. 현재 주로 사용하는 황토사용법 12
2. 황토 사용으로 인한 문제점 발생 12
3. 기타 적조 방제를 위한 연구현황 및 문제점 13
3절 새로운 적조방제 연구개발의 필요성 14
4절 연구개발의 목표 및 내용 15
1. 최종목표 15
2. 연차별 연구 개발목표와 내용 16
5절 연구개발 추진체계 17
6절 활용방안 18

제 2 장 연구수행 내용 및 결과 19
1절 미생물 생리활성물질의 생산효율 증대 19
1. 생리활성물질의 생산 19
2. 생리활성물질의 생산 방법 및 유효 형태 19
3. 생리활성물질의 분리 21
4. 활성물질의 생분해도 조사 22

5. 폐쇄생태계(mesocosom)를 이용한 생분해도 조사 23
2절 생리활성물질의 적조구제 효과 24
1. 생리활성물질의 사용성 및 효능 평가 24
2. 생리활성물질의 *Cochlodinium* 에 대한 구제효과 36
3. 현장 적용 시험 44
3절. 생리활성물질에 의한 해양환경 영향 평가 59
1. 박테리아 및 식물플랑크톤에 대한 영향 59
2. 어·패류에 대한 영향평가 64
4절. 최적 생리활성물질(GL)의 대량생산 88
1. 연구목적 88
2. 개요 88
3. 재료 및 방법 93
4. 결과 및 고찰 97
5. 결론 107
5절. 생리활성물질의 현장 적용시험 108
1.실험실 실험을 통한 생리활성물질과 황토의 적조구제 효과조사 ..108
2. 적조발생 해역에 생리활성물질 적용시 나타나는 적조구제 효과 평가 129
3. 적조발생 해역에 서식하는 기타 생물들에 대한 영향성 평가..... 140

참고문헌 **157**

제 1장 서론

1절. 연구개발의 필요성

1. 적조발생 현황 및 영향

가. 해양 플랑크톤은 수온, 빛, 영양염류 등 환경요인의 변동에 따라 광합성, 영양염수급, 이화작용 등의 신진대사가 달라지는데 특히 인간활동에 따라 큰 영향을받는 영양염의 해양 유입 증가로적조 발생이 증가하고 있다.

나. 우리나라 연안 어장은 육상에서 유입되고 이미 해저에 퇴적된 오염물질의 양이 급격히 증가하여 수역 자체의 자정능력으로는 정화가 이루어 지지 않아 적조상습발생, 무산소 수괴 현상 등 환경악화현상을 유발하여 연안서식 생물에 큰 피해를 주고 있다.

다. 현재, 남해연안과 서해연안 및 동해연안의 수질 부영양화 상태가 심각하여 적조현상을 충분히 일으킬 수준이다. 또한 적조발생을 근본적으로 방지할 수 있는 육상오염물질의 규제와 환경기초시설의 확장에는 많은 예산과 시간이 필요하다. 따라서 고생산성 어장, 특히 폐쇄성 또는 반폐쇄성내만에서 적조 유발 가능성이 증가하고 있다.

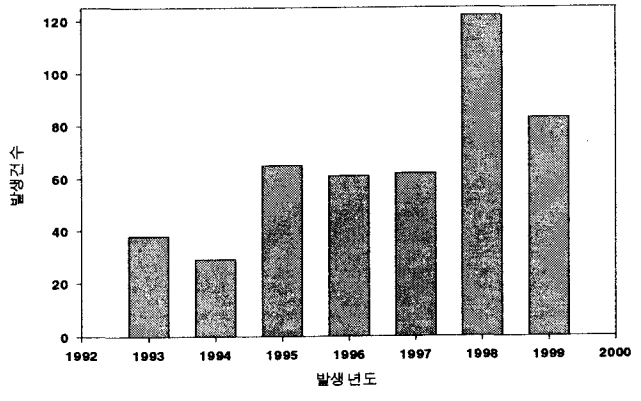


그림 1. 적조 발생 현황

2. 적조로 인해 해양양식의 피해

가. 적조원인

적조가 발생하면 수중의 용존산소가 결핍되어 질식사하거나 적조생물이 생산하는 독소 또는 2차적으로 생긴 황화수소, 메탄가스, 암모니아 등 유독성 물질에 의해 중독사한다. 또한 생산성이 감소되어 어장 가치가 저하한다. 특히 편모조류 중의 몇몇 종은 어패류를 치사시키는 독성을 가지고있다.

나. 적조발생과 피해양상

표 1. 적조발생과 수산피해

구분	피해 양상	피해 원인	
직접피해	질식사	동식물 부유생물의 호흡작용 생물사체 분해시 저층산소 소비 아가미 폐색으로 호흡장애 pH 상승, 탄산 증가로 생리장애 상대적 산소 부족과 수질악화	수중용존 산소 결핍 무산소 수괴 출현 gas 교환 기능 저하 gas 교환 기능 저하 gas 교환 기능 저하
	중독사	적조생물의 독성물질 생산 세균이 생산하는 독성물질 유기물 분해시 유독 성분 생성	biotoxin 생성 biotoxin 생성 유독성분 해산물
간접피해	생산성 감소	회유어 도피, 재생산 부진 부착생물과 경쟁, 해수교환 불량 유기물 퇴적	가입량 저하 성장 둔화 저서생물상 변화
	2차피해	수산식품 가치하락, 해역이용감소 식중독 유발	Halo 효과 건강피해

다. 주요 수산 피해 현황

표 2. 주요 수산피해현황

국가	발생년도	피해액		적조생물	장소
		억원	US $		
한국	1994	5			남해만
	1995	764	95.9 million	*Coclodinium polykrikoides*	동해 남부
	1996	21	2.5 million	〃	〃
	1997	15	1.6 million	〃	〃
	1998	1.6	133 thousend	〃	〃
	1999	3.2	267 thousend	〃	〃
일본	1972	71억엔		*Chattonella*	
	1984	46억엔		*Gymnodinium*	
	1995	10억엔		*Heterosigma*	
노르웨이	1988		40 million	*Chrysochromulina polytepsis*	
중국	1998		35 million $	*Gymnodinium*	
	1999		50 million $	HABs	
미국	1987-1992		50million $ /year		Tolo 항

3. 적조발생의 원천적인 봉쇄나 정확한 예측 어려움

가. 적조발생 예측의 어려움

적조생물의 종류수가 많고 생물마다 발생조건이 복잡, 다양하여 적조발생을 사전에 예측하기가 매우 어렵다. 따라서 적조발생을 예측하기 위해서는 연안수질의 영양염, 수온 등의 정확한 물리,화학적 평가와 적조생물의 생리, 생태적 기작 등이 정확히 파악되어야 하므로 많은 인력과 첨단장비 및 기술이 요구된다.

나. 적조생물의 잠복성

적조생물들은 환경조건이 나쁘면 휴면포자를 형성하여 해저 퇴적물 중에 다량으로 분포하면서 대부분의 연안에 잠복되어 있다. 그리고 발아에 필요한 빛, 수온, 용존

산소 등의 조건이 적절하면 다시 발아하여 적조를 유발할 수 있다. 특히 휴면포자는 산과 열 등 환경변화에 대한 내성이 강해 선박의 입, 출항시 선박 안정용 해수와 더불어 국제적으로 이동, 전파되므로 국제적인 문제를 야기한다.

다. 빠른 이동성

유해성 적조생물의 유독성분은 독성이 강하고 수용성이기 때문에 확산속도가 빠르다. 뿐만 아니라 세포막이 매우 엷어 어패류의 아가미에 닿으면 즉시 파괴되기 때문에 어류가 빠르게 폐사된다. 더욱이 우리나라의 해상 양식장은 고정식이어서 이동이 불가능하고 대규모 여과시설 설비에는 비용이 고가이므로 적조발생시 그 피해 규모가 크다.

2절. 관련 연구의 현황과 문제점

1. 현재 주로 사용하는 황토사용법

가. 황토살포법은 황토의 콜로이드 입자가 적조생물과 응집, 흡착하는 성질을 활용하여 적조를 구제하는 방법이다. 이 방법은 규소, 알루미늄, 철 등으로 이루어 금속화합물 구성비와 황토의 입자별 크기에 따라 구제 효율에 차이가 있다.

2. 황토 사용으로 인한 문제점

가. 환경 문제 야기

황토는 살포 후 일시적인 부유물질 증가로 어장 내 어류의 호흡장애 유발 가능성을 증가시키며, 해양내 용존 무기질소, 화학적 산소요구량 등이 다소 감소하는 경향이 나타난다. 또한 수 회 반복되는 황토의 살포는 해양에 퇴적층을 형성하고 황토 자체의 성분으로 인해 해양 내 물질구성비의 변화와 같은 해양 환경의 변화를 초래 할 수 있다.

나. 황토 적용의 문제

황토는 암석이 화학적 풍화작용을 받아 변질되어 가는 과정에 형성되는 풍화 잔류토를 말한다. 이러한 황토는 풍화산물이므로 본래 암석의 종류와 풍화정도에 따라

색, 성분, 물리·화학적 성질이 다양하다. 따라서 황토 이용시 적조 구제 효율이 일정치 않아 효율적인 황토 선택의 문제점 수반되며 광물에 대한 검토 연구가 필수적으로 수행될 필요가 있다.

다. 자연 훼손

황토는 일반적으로 적조 구제시 200~400g/㎡가 소모되므로 많은 양이 요구된다. 또한 점토질의 황토는 지표층 1m에서만 존재하므로 많은 면적이 필요하다. 그러므로 대량의 황토 채취로 인한 삼림의 파괴현상으로 인해 부수적인 환경 문제들이 파생될 우려가 있다.

라. 경제적 문제

황토는 지역적으로 분포면적이 다르므로 산지와 거리가 먼 지역에서 적조 발생시에는 대량의 황토를 운바하기에 많은 비용이 소모된다. 또한 적조 구제 효율을 증가시키기 위해 분말황토가 사용될 때에는 황토 자체의 경비 이외에 300,000원/톤의 분쇄경비가 추가로 소모되며, 원하는 곳에 정확히 황토를 살포하기 위해서 황토 살포기 및 바지선, 방제선 등과 같은 설비가 요구되므로 적조방제를 위해 많은 비용이 소모된다.

3. 기타 적조 방제를 위한 연구현황 및 문제점

가. 기존 방제법들의 문제점

(1) 물리, 화학적 방법

화학물질 사용에 따른 2차 환경오염물질 유발로 환경 교란을 야기할 수 있으며, 구제물질의 대량생산과 사용, 운송 및 취급에 많은 비용과 시간이 소모된다.

(2) 생물학적 방법

유독성 적조원인 생물과 영양 경쟁관계에 있는 무독성 생물의 분리, 동정, 배양에 많은 시간과 비용이 소모되며 효과적인 무독성 생물의 적용한계성이 있다. 또한 적조 유발 원인생물의 종류가 많아 조건별 적조마다 적절한 해양생물의 적용이 까다로우며 적조생물의 양적 변동 양상에 미치는 포식자의 영향구명이 어렵다.

나. 해양 적조생물의 제거방법과 원리

표 3. 해양 적조생물의 제거방법과 원리

방 법		원 리	응 용 물 질
물리적 방법	초음파 처리법	세포파괴	초음파(160-400KHz)
	오존 처리법	독성중화	오존
	적조생물 제거법	제거, 여과, 원심분리	원심분리기
	전기분해법	세포치사	산성수, 차아염소산나트륨
화학적 방법	화학약품 살포법	세포치사, 파괴	황산 등, 유기화합물
	황토살포법	응집, 침강	황토, 점토
	응집제 살포법	응집, 침강	철염, 계면활성제
생물학적 방법	포식압(천적)	먹이	요각류, 섬모충류
	살조물질	세포파괴, 용해	폴리유로나이드 등
	세균, 바이러스	분해	Cytophaga sp.
	기생생물	기생	
	생물효소	세포막 파괴, 용해	mannosidase

3절 새로운 적조방제 연구개발의 필요성

1. 새로운 적조방제제의 필요

적조 원인 생물의 종류가 많고 종마다 발생조건이 복잡, 다양하므로 대규모화, 광역화, 고밀도화, 유독화되어 가는 조건별 적조에 효과적으로 대처할 수 있는 새로운 구제물질이 요구되는 실정이다.

2. 해양환경을 고려한 적조방제제

해양환경의 보전과 개선이 지구 온난화, 기후변화 등 지구환경 변화와 맞물려 인식

되면서 점차 그 중요성이 확산되고 있다. 따라서 새로이 개발되는 적조 방제제는 기존의 방법들이 지니는 환경오염문제 및 생태계 교란 등을 야기하지 않는 안전성을 고려해야 한다.

3. 신속한 대처 방법

매년 발생하고 있는 적조현상은 대규모의 수산피해를 야기하고 있고 그 심각성이 날로 더해간다. 그러나 적조발생의 정확한 예측이나 원천적인 봉쇄는 어려운 실정이므로 적조현상의 발생 시 신속하게 대처하여 피해를 최소화 할 수 있는 방법이 필요하다.

4. 경제성을 고려한 적조방제

최근 적조 현상의 특징은 광범위한 지역에서 장기간 발생하므로 적조구제를 위해 소모되는 비용도 점차 증가되고 있다. 따라서 이 같은 문제의 해결을 위해 적조발생 시 저가의 비용으로 높은 구제 능력을 지닌 경제적인 적조 방제제가 요구된다.

5. 적조방제제의 잠재적 시장성

인구가 증가되고, 연안지역의 산업화, 도시화에 기인하는 육상오염원의 증가와 수산업, 해운업 등 해양산업이 발달함에 따라 해양으로 유입하는 오염물질이 증가하고 있다. 이에 따른 연안해역의 오염, 부영양화로 한국, 일본, 중국, 그리고 미국을 비롯한 세계 각 지역에서 적조의 발생이 증가되고 있는 실정이다. 따라서 새로운 적조 방제제에 대한 관심 고조되고 있고, 이 같은 수요증가로 효과적인 적조 방제제의 개발은 잠재적인 시장성을 지닌다.

나절. 연구개발의 목표 및 내용

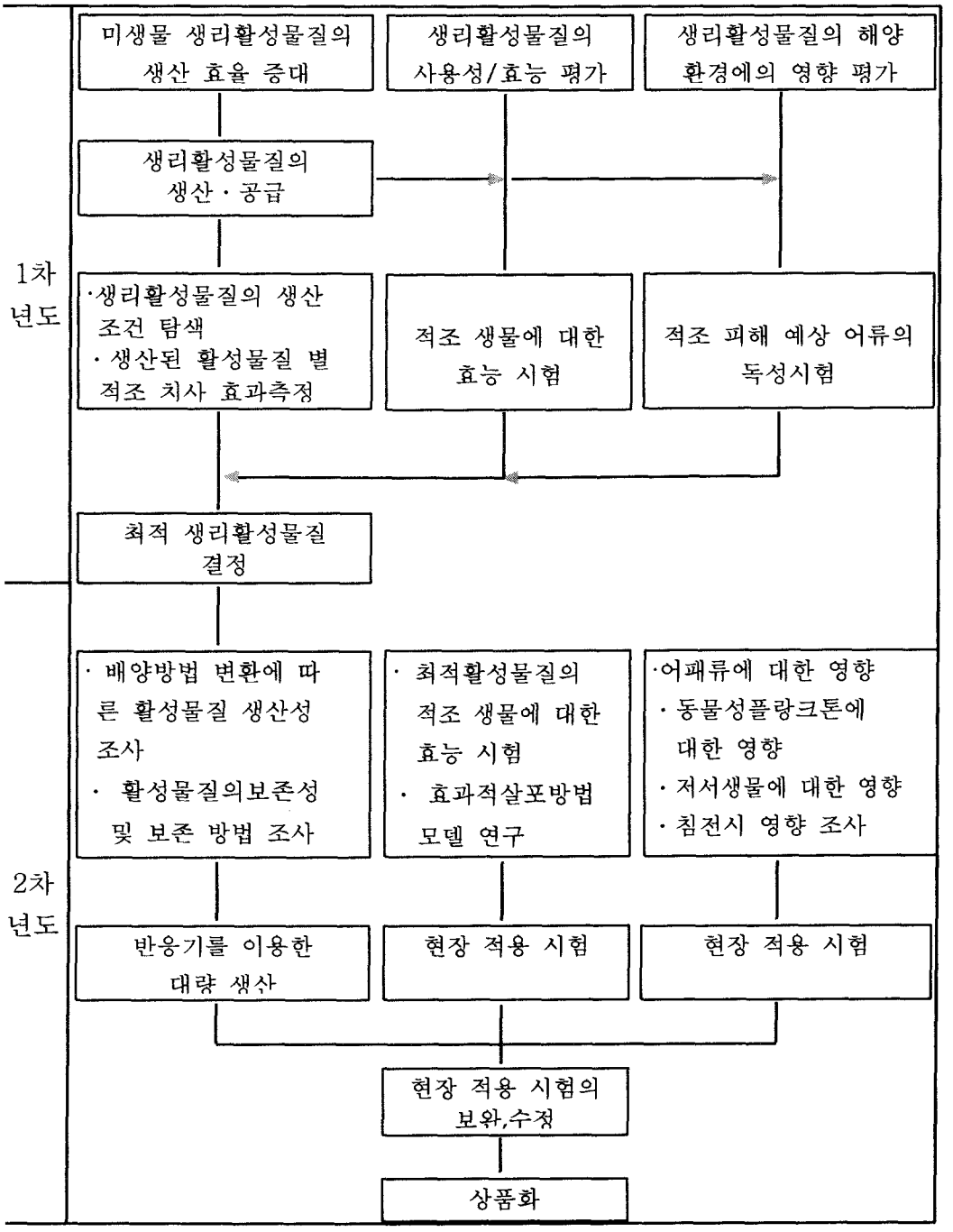
1. 최종목표

미생물이 생산하는 생리활성물질을 이용하여 환경적으로 안전하고 경제성이 있는 효율적인 적조 방제제를 개발하고자 한다

2. 연차별 연구개발목표와 내용

구 분	목 표	내용 및 범위
1차 년도 (2001년)	●미생물 생리활성물질의 생산조건 연구	● 사용균주, 사용기질에 따른 미생물 생리활성 물질의 생산량 비교 ● 질소원에 따른 생산량 비교 ● 무기염류 및 기타 유효물질 첨가에 의한 효율성 비교 ● 배양양식에 따른 생산효율 비교 ● 생리활성 혼합물질의 분리 ● 분리된 생리활성 물질의 적조구제 효능 및 특성 조사 ● 최적 생리활성물질의 조건 결정
	●적조생물에 대한 미생물생리활성물질의 효능 시험	● 적조유발생물의 운동성에 미치는 생리활성물질의 영향 조사 ● 생리활성물질에 의한 적조생물의 구조 및 형태 변화 관찰
	●적조 피해 대상 생물에 대한 영향 조사	● 어패류에 대한 독성 시험 ● 동물성 플랑크톤에 대한 영향 조사 ● 저서생물 군집에 미치는 영향 조사
2차 년도 (2002년)	●최적 생리활성물질의 대량생산	● 대용량 반응기를 이용한 생리활성 물질의 대량 생산 ● 생리활성물질의 보존력 및 보존방법 연구
	●생리활성물질의 현장 적용시험	● 수조실험을 통한 생리활성물질의 적조구제 효과 조사 ● 적조발생 해역에 생라활성물질 적용시 나타나는 적조구제 효과 평가 ● 적조발생 해역에 서식하는 기타 생물들에 대한 영향성 평가 ● 미생물 생리활성물질의 살포 방법 연구
	●현장 실험의 보완 및 수정	● 살포방법의 효과 검토 ● 최적 적용 방법 수립
	● 상업화 추진	● 상업화에 필요한 기초 연구

5절. 연구개발 추진체계


1차 년도
2차 년도
미생물 생리활성물질의 생산 효율 증대
생리활성물질의 사용성/효능 평가
생리활성물질의 해양 환경에의 영향 평가
생리활성물질의 생산·공급
·생리활성물질의 생산 조건 탐색
·생산된 활성물질 별 적조 치사 효과측정
적조 생물에 대한 효능 시험
적조 피해 예상 어류의 독성시험
최적 생리활성물질 결정
· 배양방법 변환에 따른 활성물질 생산성 조사
· 활성물질의보존성 및 보존 방법 조사
· 최적활성물질의 적조 생물에 대한 효능 시험
· 효과적살포방법 모델 연구
·어패류에 대한 영향
· 동물성플랑크톤에 대한 영향
· 저서생물에 대한 영향
· 침전시 영향 조사
반응기를 이용한 대량 생산
현장 적용 시험
현장 적용 시험
현장 적용 시험의 보완,수정
상품화

6절. 활용방안

1. 다양한 미생물에서 생산되는 여러 형태의 생리활성물질을 적조 유발 생물에 처리하여 구제효율을 밝히고 종 특이성을 조사하여 선택적인 적조제어 system에 이용한다.

2. 현재 미생물을 이용한 적조제어기술은 뚜렷하게 보고된 예가 없고, 실험실 수준의 연구가 진행되고 있으며 한국과 일본에서 점토 살포방법을 이용한 제어기술만이 현장에서 적용하고 있는 실정이므로 미생물이 생산하는 적조제어물질을 실제적으로 적조 발생 현장에 적용한다.

3. 적조발생으로 인한 피해지역 및 가두리 양식장 (실내 및 실외)에 적용함으로서 그 피해를 최소화한다.

4. 살포방법의 최적 model을 세우고 이에 따른 각각의 효과를 검증한 후, 제제의 형태를 액상, 반고형상, 고형상 등 상품을 다양한 방법으로 제작하여 적용한다.

5. 적조발생 후 처리 뿐만 아니라 해양의 수온, 영양염류의 변화 등을 지속적으로 관찰하고 그 정보에 따라 적조발생이 예상될 시, 미생물 생리활성 물질을 처리하여 적조의 발생 가능성을 감소시킨다.

제 2장 연구수행 내용 및 결과

1절. 미생물 생리활성물질의 생산효율 증대

1. 생리활성물질의 생산

가 . 방법

사용 균주 : *Candida bombicola* ATCC22214

생산 배지 :

전배양 -> 사면 배지

본배양 -> glucose 100g/l, yeast extract 0.5g/l, KH2P04 0.1g/l, MgS04 · 7H20 0.05g/l, CaC12 · 2H20 0.01g/l, NaCl 0.01g/l, Peptone 0.07g/l

이차기질 -> corm oil (매일 10% / working vol. 공급)

생산 조건 :

- 배양 온도 : 25℃
- 배양시 유입 공기량 : 1 vvm
- 배양시 교반 속도 : 550 rpm
- pH : NaOH로 3.5를 맞춘다.
- 배양시간 : 전배양 3일 , 본배양 8일

나. 결과

생리활성물질의 생산은 *Candida bombicola* ATCC 22214에서 추가기질로 식용유인 corn oil, soybean oil, canola oil, methyl ester 형태인 coconut oil methyl ester와 soybean oil 생성 공정시 생산되는 부산물인 soybean dark oil을 10 %(wt/Vol.)첨가 하였다.

2. 생리활성물질의 생산 방법 및 유효 형태

가. 방법

유가식 배양에서는 초기 포도당의 양을 50, 100, 200 g/L로 달리하여 초기 당의 농

도당 생성에 영향을 미치는 것에 대해 실험하였고, 휴면세포 배양을 이용하여 회분식과 연속배양에서의 생산되는 생리활성물질의 비율을 비교하였다.

나. 결과

유가식으로 배양하였을 때의 생산 형태를 시간대별로 나타낸 그림을 보면 생리활성물질의 생산시기는 세포의 성장이 멈춘 시기부터 급격히 생산되고 초기성장과 생산을 같이 할때는 A 형태의 생리활성물질이 대부분 생산되다가 본격적으로 생산되는 시기부터 대부분 B 형태의 생리활성물질이 생산됨을 알수 있다. 세포의 성장은 멈추고 생산만 하는 휴면세포 배양에서는 대부분이 B 형태의 생리활성물질 만이 생산됨을 보여주고 있다.(아래 Fig. 1-1, 1-2 참조)

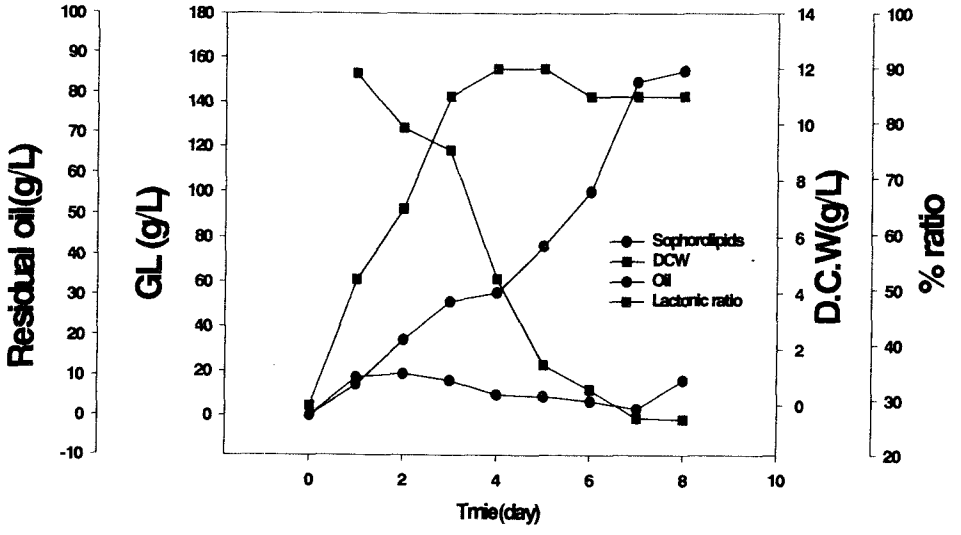


Fig. 1-1 유가식 배양에서 생산되는 시간대별 생리활성물질의 생산량

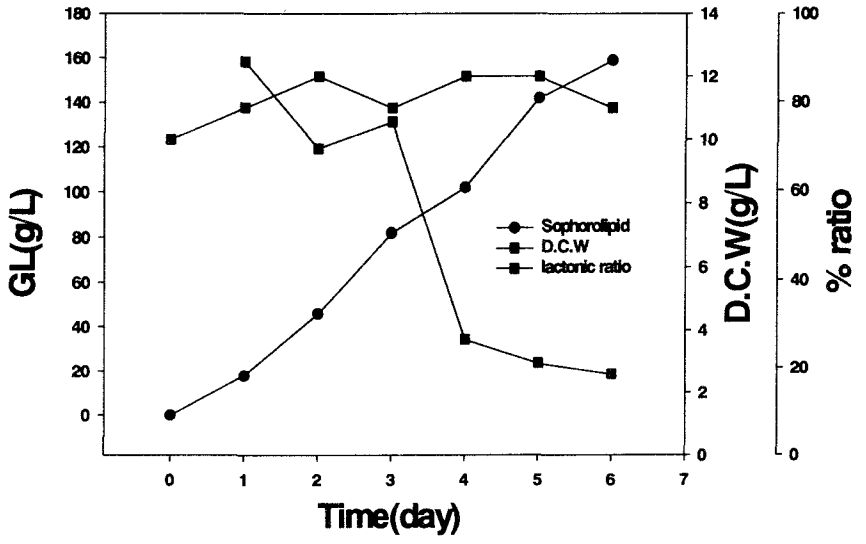


Fig. 1-2 휴면세포 배양에서 생산되는 시간대별 생리활성물질 생산량

3. 생리활성물질의 분리

가. 방법

GL을 배양액으로부터 ethyl acetate(3회)를 사용하여 추출하고, 추출에 사용된 용매는 rotary vaccum evaporator(EYELA)로 제거하여 미정제 GL을 얻었다. 미정제 GL을 다시 hexane을 첨가하여 잔류오일을 제거하고 chloroform으로 용액중의 GL을 추출한 후 정제된 GL의 혼합물을 얻었다.

나. 결과

Fig. 1-3은 corn oil을 2차 기질로 하였을 때 생산된 GL을 chloroform과 methanol을 4:1로 흘려 용출시켜 분리한 GL을 시간대별로 fraction을 받아 TLC/FID를 이용하여 분석한 결과를 도식화한 그림이다. 초기에 24분 정도까지는 Rt값을 0.09정도를 가지는 A형태가 나왔으며, 40분 정도부터는 Rt값 0.13정도를 가지는 B형태의 GL을

얻을수 있었다.

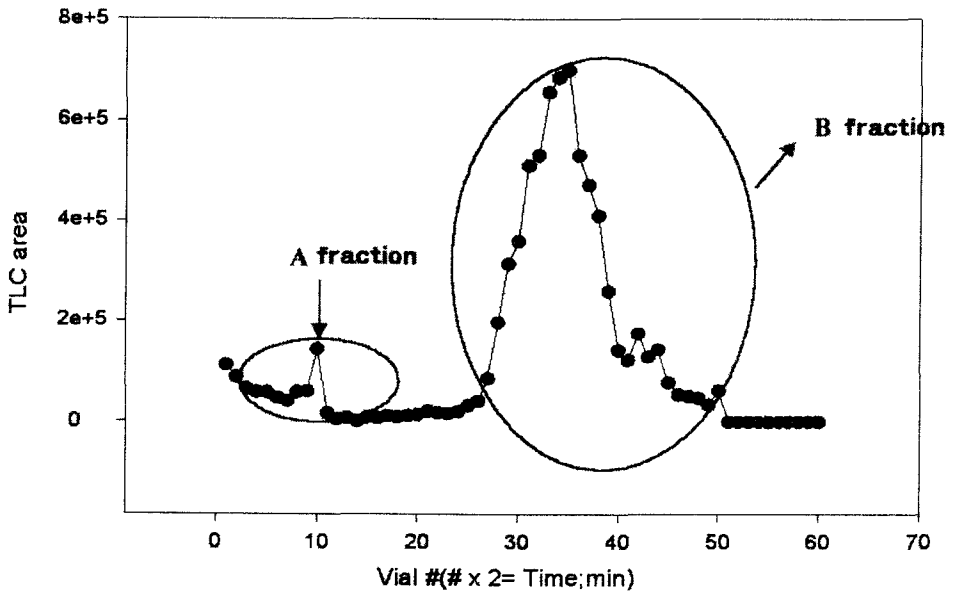


Fig. 1-3 sillica gel chromatography에 의한 GL의 분리 정제

4. 활성물질의 생분해도 조사

가. 방법

적조가 발생한 해수에 처리 시 2차적인 환경오염문제를 야기하지 않는 안전한 적조 방제제의 개발이 요구되고 있으므로 미생물 생리활성물질의 해수에서의 생분해도를 용존산소량으로 측정한다. 시료는 해수에 생리활성물질을 농도별로 첨가하여 5℃, 18 ℃, 30 ℃ 등 여러 조건에서 물질의 분해 효과를 측정한다.

나. 결과

본 연구실에서 생산된 미생물 생리활성물질의 생분해도는 32℃에서는 하루만에

100%, 5℃에서는 8일만에 약 90%가 분해된 것으로 나타나 해수에 적용시 2차적인 환경오염의 우려가 없는 것으로 판단되었다(Table 1-1 참조).

Table 1-1 미생물 생리활성물질의 해수에서의 생분해도

온 도 / 시 간	32 ℃	5 ℃
12 시간	40 %	0 %
24 시간	100 %	0 %
6 일	100 %	70 %
8 일	100 %	90 %

5. 폐쇄생태계(mesocosm)를 이용한 생분해도 조사

가. 방법

실험에 사용된 폐쇄 생태계는 직경1㎥에 깊이 2㎥의 원통형구조로 외부에 5㎛의 망목크기의 mesh를 둘러 주변 해수의 출입은 가능하고 *Cochlodinium*은 폐쇄생태계안에 갖힌 상태를 유지하게 제작되었으며, 표층에 GL을 살포하여 시간과 깊이에 따른 GL의 농도를 측정하여, 실험실에서의 생분해도와 실제 자연계에서의 생분해도를 비교하였다.

나. 결과

본 실험결과 GL 살포 1분 이내에 적조생물의 서식깊이까지 빠른 시간내에 확산이 가능하며, 이에따라 빠른 시간내에 적조생물에 효과적인 저해를 보일것으로 보인다. 또한 살포 10분 후에는 자연정화에 의한 생분해 및 해수의 흐름에 의한 확산에 의해 농도가 저하 및 없어지므로 GL에 의하 2차적인 환경오염이 없는 것으로 판단된다 (Fig. 1-4 참조)

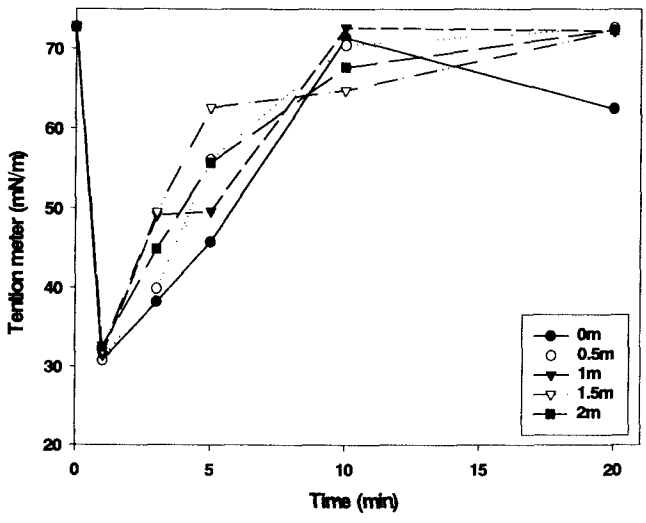


Fig. 1-4 폐쇄생태계(mesocosm)를 이용한 GL의 생분해도

2절. 생리활성물질의 적조구제효과

1. 생리활성물질의 사용성 및 효능 평가

가. 생리활성물질의 적조에의 효과측정

(1) 방법

적조현상을 유발하는 대표적인 편모조류를 실험실 내에서 배양하고 대수성장기에 이른 적조생물에 미생물 생리활성물질을 농도별로 일정량 첨가하여 처리 전과 후의 적조생물이 나타내는 운동성의 변화를 관찰하였다. 또한 현장적조 저해제로 사용하고 있는 황토와의 살조 능력을 비교하였다.

(2) 결과

본 연구실에서 생산된 미생물 유래의 생리활성물질을 이용하여 와편모조류인 *Prorocentrum minimun, Heterosigma akashiwo, Scripsiella trochoidea* 를 대상으로 저해효과를 조사한 결과 10 ppm 이상의 농도에서 5 분 이내에 운동성을 상실하는 뛰어난 저해효과를 나타내어 저농도에서도 와편모조류를 효과적으로 억제 할 수있음이 확인되었다. 또한 현장에서 현장에서 실제 적조 저해제로 사용되고있는 황토를 고농도로 처리하였을때보다 뛰어난 저해효과를 나타냄을 볼 수 있다.(아래 Fig.2-1-1~2-1-3 참조)

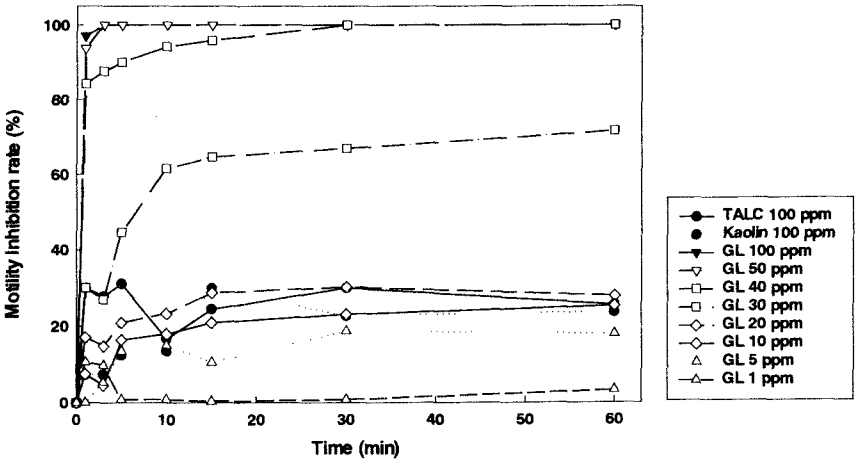


Fig. 2-1-1 *Heterosigma akashiwo*에 대한 미생물 생리 활성물질의 영향

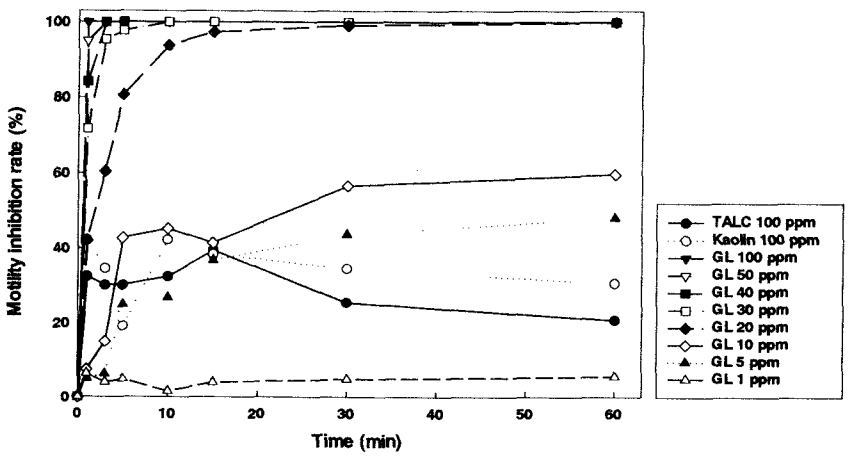


Fig. 2-1-2 *Prorocentrum minimum*에 대한 미생물 생리 활성물질의 영향

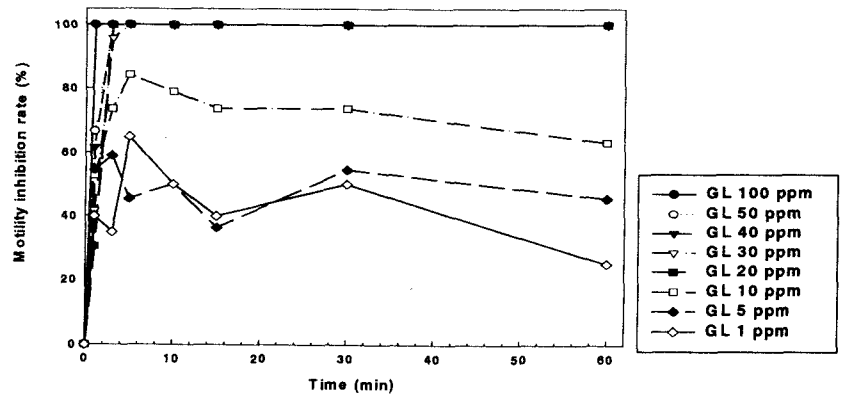


Fig. 2-1-3 *Scripsiella trochoidea*에 대한 미생물 생리 활성물질의 영향

나. 다른 생리활성물질과의 살조 능력 비교

(1) 방법

미생물에 의해 생산이 되는 여러 가지의 생리활성물질을 대수성장기에 이른 적조생물에 미생물 생리활성물질을 일정량 첨가하여 처리 전과 후의 적조생물이 나타내는 운동성의 변화를 관찰하였다.

(2) 결과

동일한 농도에서의 와편모조류 3종에 대한 살조능력의 비교 결과, 다른 미생물 유래의 생리활성물질보다 뛰어난 살조 능력을 보임을 보여, 효과적인 적조 저해물질임을 재확인 할 수 있었다.(아래 Fig. 2-1-4 ~2-1-6 참조)

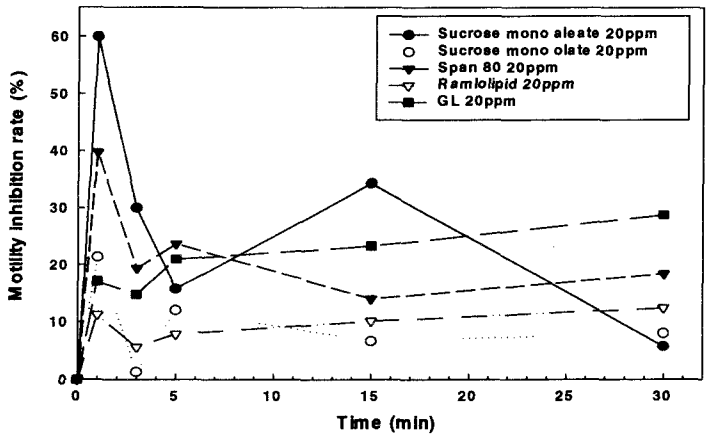


Fig.2-1-4 *H. akashiwo*에 대한 미생물유래 생리활성물질의 영향

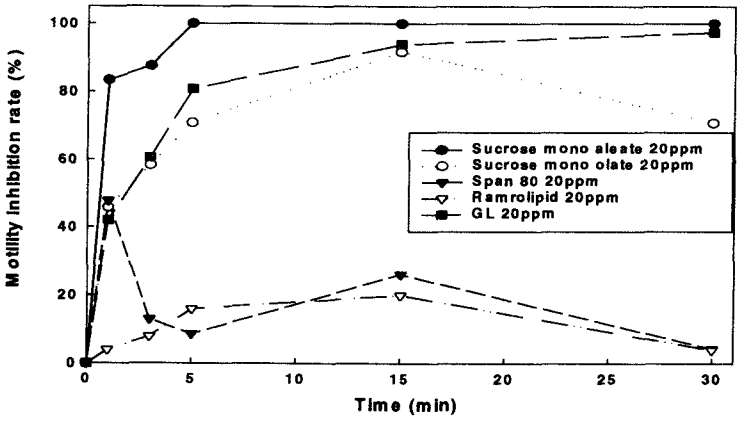


Fig. 2-1-5. *P. minimum*에 대한 미생물유래 생리활성물질의 영향

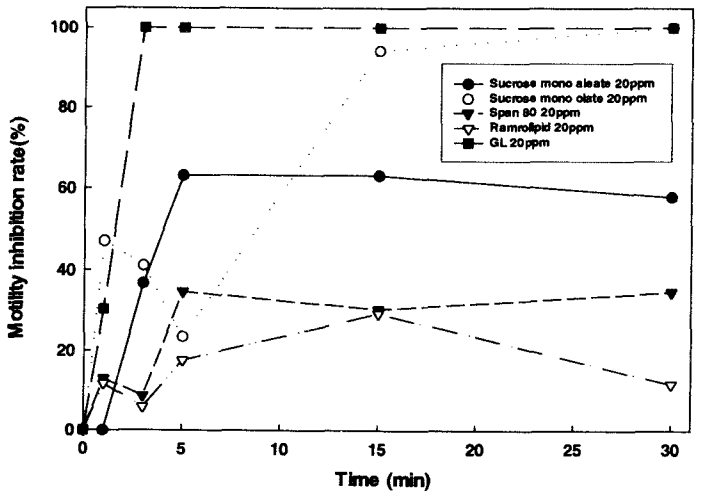


Fig. 2-1-6 *S. trochoidea*에 대한 미생물유래 생리활성물질의 영향

다.생리활성 물질의 침강성 조사

(1) 방법

생리활성물질에 의해 운동성이 상실된 와편모조류의 침강성을 조사하기 위해 높이 1 m의 침전관에 생리활성물질을 20 ppm을 가하여 처리 전과 처리 후의 운동성이 상실된 적조생물의 침강성을 관찰하였다. 또한 황토 500 ppm을 침전관에 첨가하여 생리활성물질과 비교하였다.

(2) 결과

생리활성물질 20 ppm에서의 침전관 실험결과 생리활성물질이 첨가되지 않은 대조구에서는 각 높이(5, 30, 60, 90 cm)에서 적조 생물의 증식이 관찰 된 반면에, 생리활성물질이 첨가된 친전관에서는 적조생물의 감소가 나타났으며, 황토와의 비교실험결과 황토 역시 적조생물의 감소를 가져왔으나, 황토와 같이 침전하지 않은 적조생물은 증식을 하여 표층 5 cm의 샘플 부위에서 채취한 적조생물의수가 증가하는 것을 보이며, 또한 저층 90 cm에 황토의 침전에 의해 운동성이 상실된 적조 생물이 증가하는 것을 보이는 반면 생리활성물질이 첨가된 침전관은 저층 90 cm에서도 적조 생물수가 감소하는 것으로 나타나 생리활성물질에 의한 용균작용이 나타나는 것으로 사료된다.(아래 Fig. 2-1-7, 2-1-8 참조)

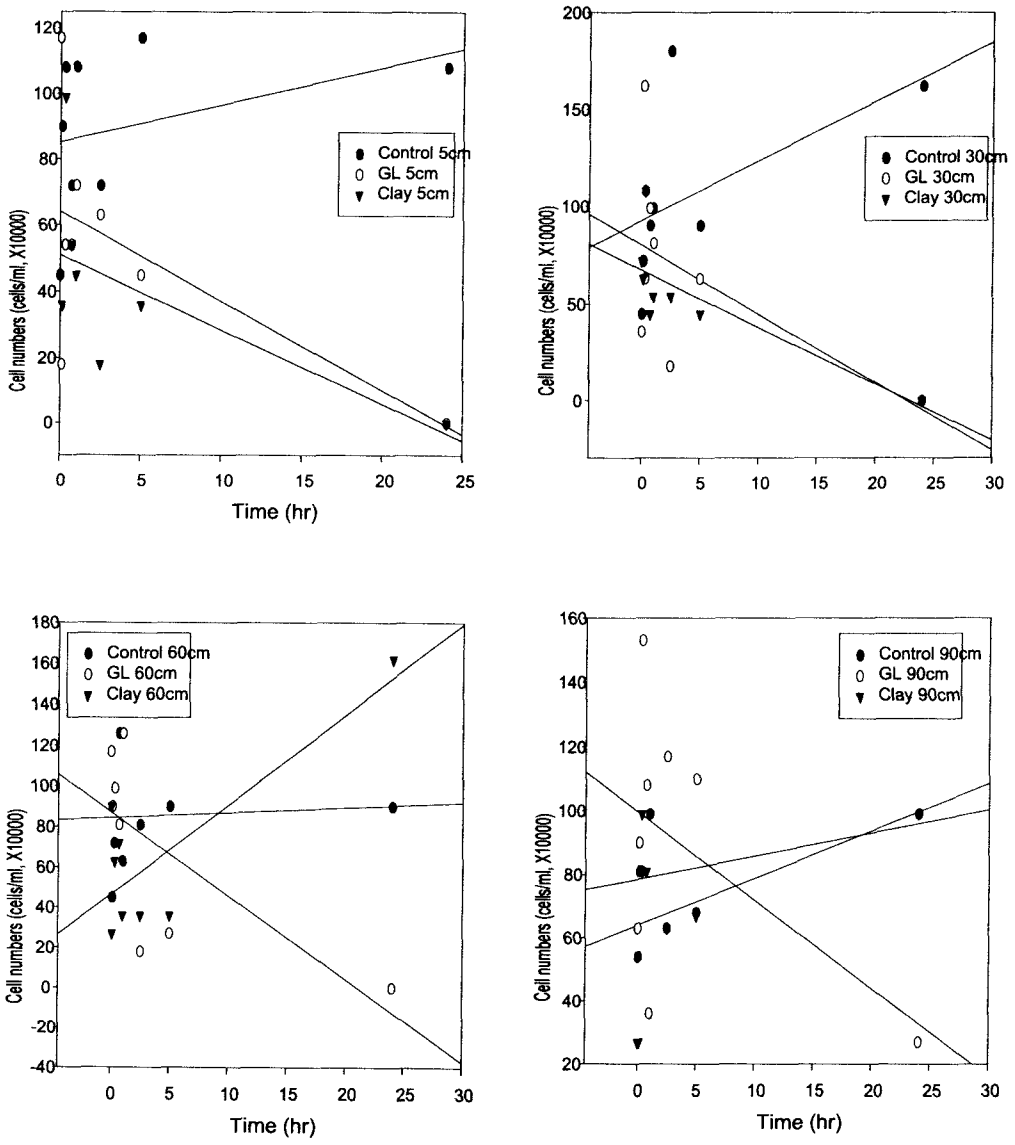


그림 2-1-7. *H. akashiwo*에 대한 침전관 실험

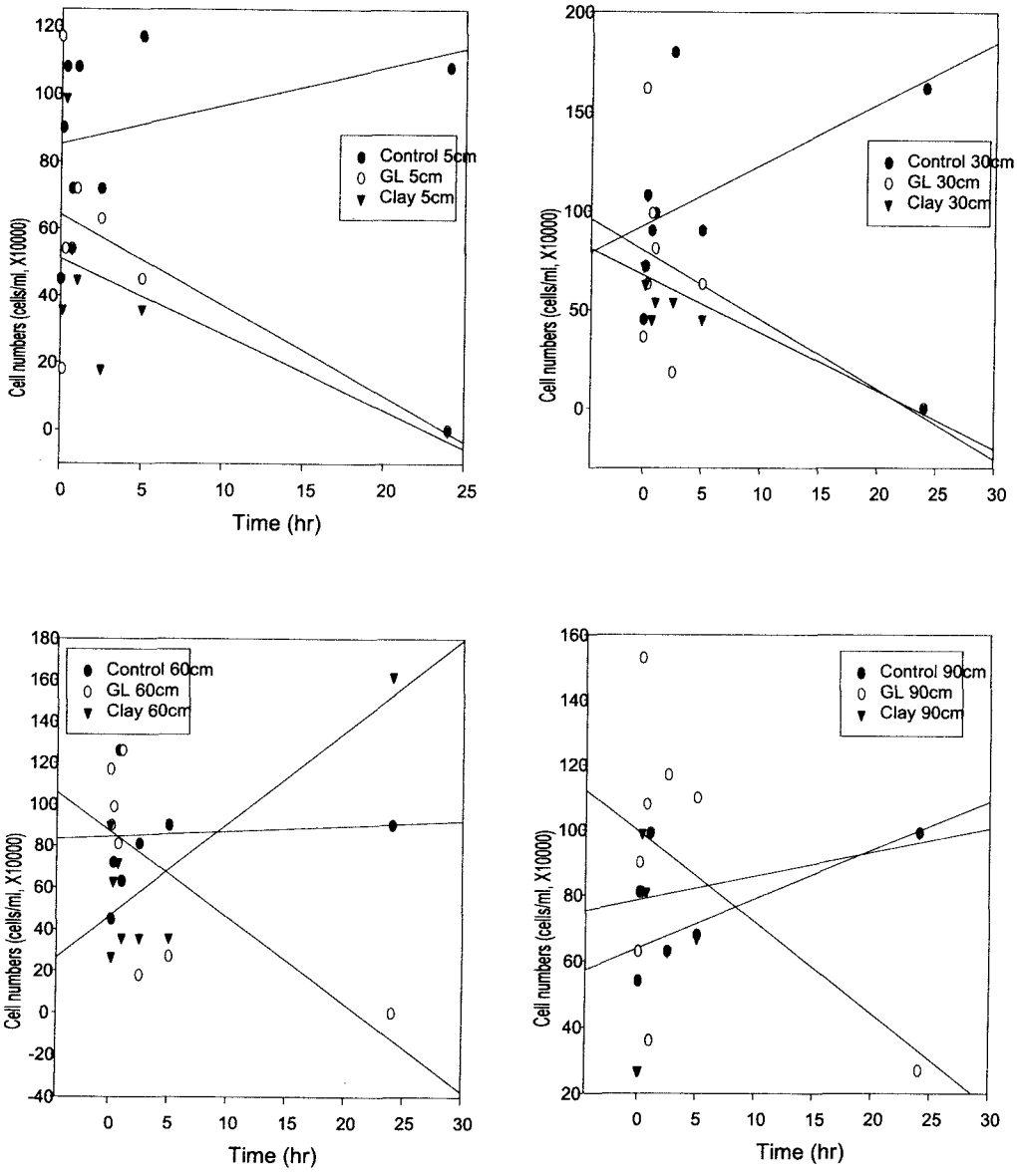


Fig. 2-1-8 *P. minimum*에 대한 침전관 실험

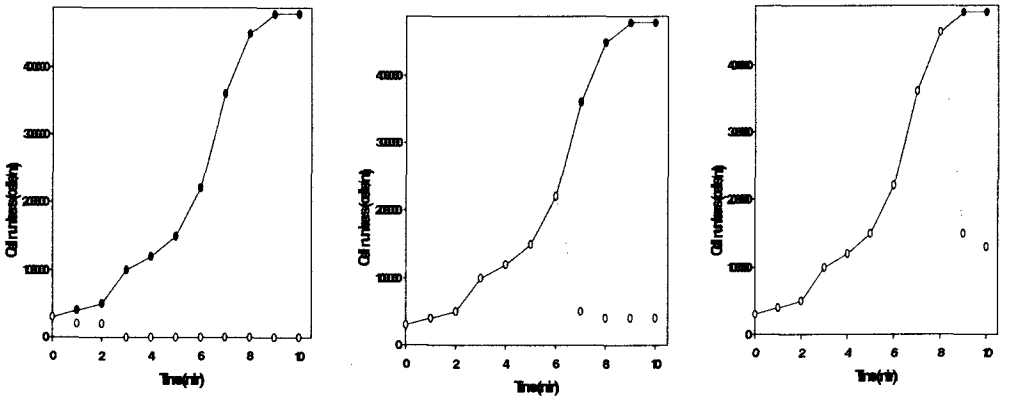
라. 생리활성물질에 의한 적조생물의 용균작용

(1) 방법

침전관 실험에서 나타난 용균작용을 확인하기 위해, 와편모조류의 각 성장단계별로 일정량의 생리활성물질을 첨가하여, 적조생물의 용균작용을 광학현미경하에서 관찰하였다.

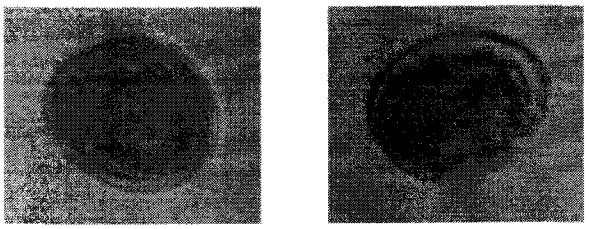
(2) 결과

각 와편모조류의 유도기, 대수기, 정지기에 생리활성물질 20 ppm을 첨가하여 대조구와의 성장비교 결과 각 성장기에 상관이 없이 배양 하루만에 와편모조류가 용균되는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 매 시간마다 샘플을 채취하여 광학현미경하에서 관찰한 결과 *H. akashiwo*는 생리활성물질 접촉 2시간만에 용균작용이 일어났으며, *P minimum*과 *S. trochoidea*는 생리활성물질 접촉 4시간내에 팽윤 작용이 일어났다.(아래 Fig. 2-1-9 ~ 2-1-12 참조)



<유도기> <대수기> <정지기>

Fig. 2-1-9. *P. minimum*에 대한 생리활성물질의 용균작용



〈대조구〉 〈4시간 후〉

Fig. 2-1-10. *P. minimum*에 대한 생리활성물질의 용균작용의 광학현미경 사진

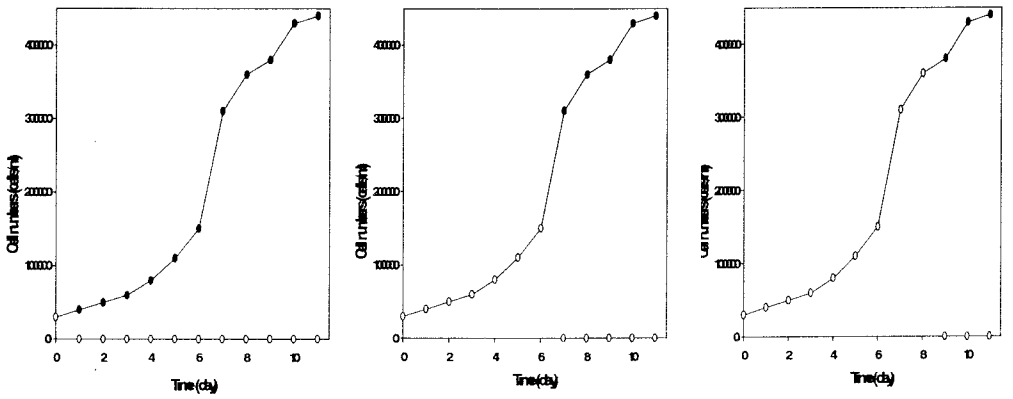
마. 생리활성물질에 의한 성장 저해 효과

(1) 방법

적조생물에 생리활성물질이 첨가되었을 때 성장에 미치는 영향을 알아보기 위해서 생리활성물질을 각 농도별로 첨가하여 15일 동안 배양하면서 실험결과를 관찰하였다. 또한 빛의 유·무에 따른 성장조건을 알아보기 위해 빛이 있는 조건과 빛이 없는 암흑 조건에서 실험을 수행하였다.

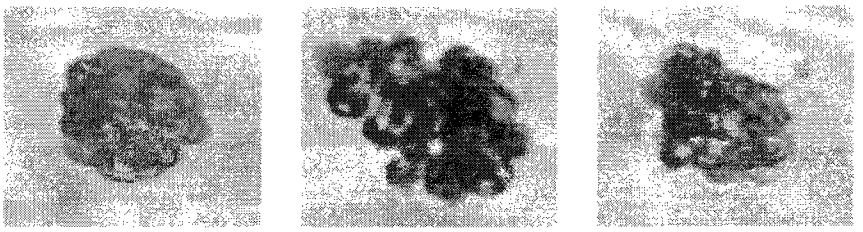
(2) 결과

각 농도에 따른 생장저해 실험결과, *H. akashiwo*, *P. minimum*의 경우 대조구에 비해 1 ppm의 경우 약간의 성장 저해가 나타났으며 5 ppm이상의 생리활성 물질이 첨가되었을 경우 생리활성물질에 의한 용균작용이 나타나 적조생물이 성장을 할 수 없는 것으로 나타났다. 반면 빛이 없는 암흑 조건에서는 대조구의 적조생물은 성장하지 않고 실험동안 일정한 계체수를 유지하는 것으로 나타났으며 빛이 있는 조건과 동일한 저해 현상을 나타나는 것으로 나타났다.(아래 Fig. 2-1-13, 2-1-14 참조)



〈유도기〉 〈대수기〉 〈정지기〉

Fig. 2-1-11 *H. akashiwo*에 대한 생리활성물질의 용균작용



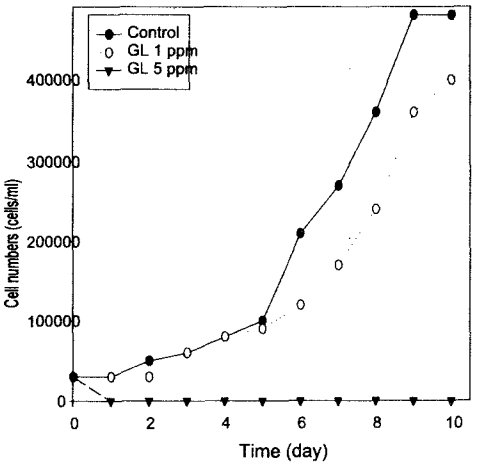
〈대조구〉 〈2시간 후〉 〈4시간 후〉

Fig. 2-1-12 *H. akashiwo*에 대한 생리활성물질의 용균작용의 광학현미경 사진

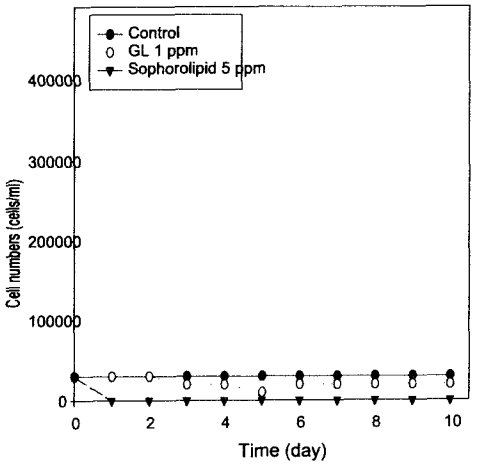
바. 생리활성물질에 저해된 적조생물의 회복성 조사

(1) 방법

실제 해양에서 사용시 생리활성물질이 적조 생물에 장시간 접촉하는 것이 아니기에, 다양한 생리활성물질 농도에서 적조생물의 접촉시간을 3분으로 하여 운동성 회복 및 그에 따른 성장 관계를 조사하였다. 정장서해와 같아 비교하기 위해 빛은 있는 조건과 암 조건에서 각각 조사하였다.



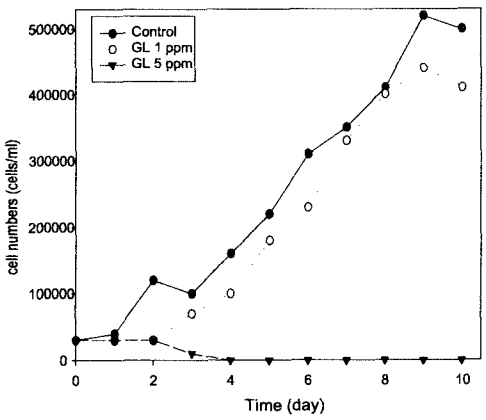
Growth inhibition by various sophorolipid con
on*H. akashiwo*The growth is in light condition.



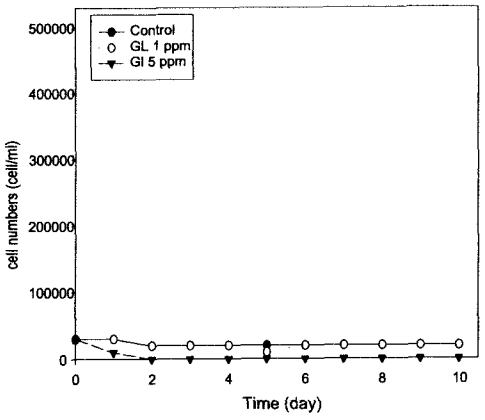
Growth inhibition by various sophorolipid conc
on*H. akashiwo*The growth is in dark condition.

〈명 조건〉 〈암 조건〉

Fig. 2-1-13. *H akashiwo*에 대한 생리활성물질의 성장의 영향



Growth inhibition by various sophorolipid concentratic
on*P. minimum*The growth is in light conditon.



Growth inhibition by various sophorolipid concentration
on*P. minimum*The growth is in dark conditon.

〈명 조건〉 〈암 조건〉

Fig. 2-1-14. *P. minimum*에 대한 생리활성물질의 성장의 영향

(2) 결과

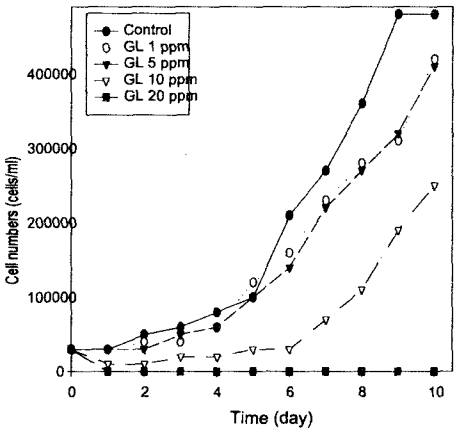
생리활성물질과 적조생물의 접촉시간을 3분으로 정하여 각 농도에서의 운동성 회복 및 성장 조건을 조사한 결과 *H. akashiwo*는 10 ppm이상에서 성장 저해 및 용균 작용이 나타났으며, *P. minimum*은 20 ppm이상에서 성장 저해 및 용균 작용이 나타났다. 하지만 빛이 들어오지 암 조건하에서는 *H. akashiwo*, *P. minimum*이 각각 5 ppm, 10 ppm에서 저해 및 용균 현상이 나타나는 것으로 보아 와편모조류의 운동성 회복에 빛이 관여하는 것으로 사료되며, 실제 해양에서 사용시 생리활성물질의 순간 접촉에 의해 운동성이 상실되어 침전현상이 발생하며, 이에따른 운동성 회복 효과는 현저하게 감소하게 될것으로 보인다.(아래 Fig. 2-1-15, 2-1-16 참조)

2. 생리활성물질의 *Cochlodinium*에 대한 구제효과

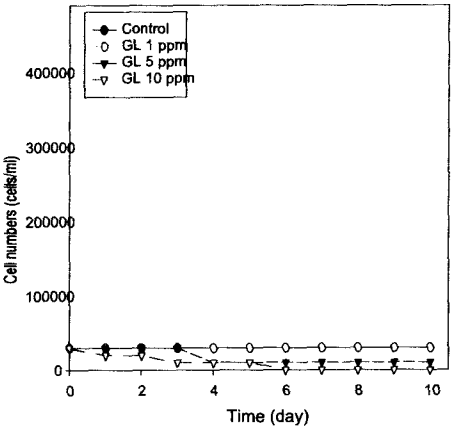
가. 운동성 저해

(1) 방법

실제 우리나라 해안에서 심각해 피해를 발생시키고 있는 *Cochlodinium* 및 *P. minimum*을 실험실내에서 배양하고 대수성장기에 이른 *Cochlodinium* 및 *P. minimum*에 미생물 생리활성물질을 농도별로 일정량 첨가하여 처리전과 후의 적조생물이 나타내는 운동성의 변화를 관찰하였다.



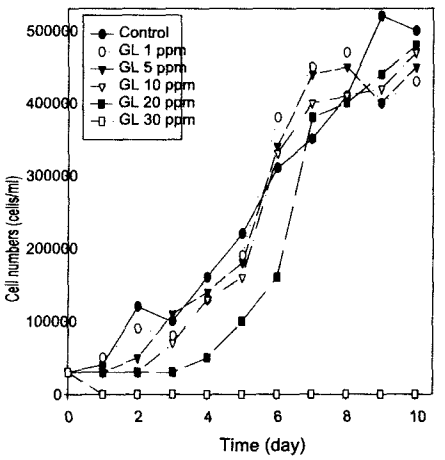
Growth inhibition by contac time (3 min) of various s
concentration on *H. akashiwo*. The growth is in light conditio



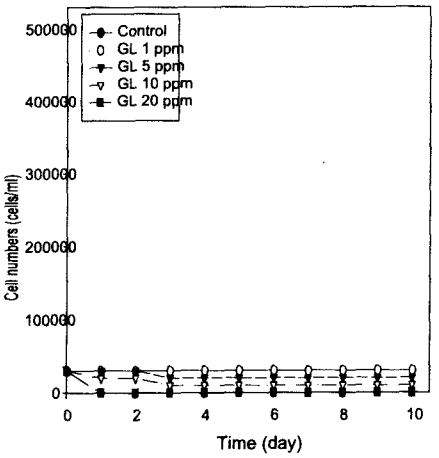
Growth inhibition by contac time (3 min) of various so
concentration on *H. akashiwo*. The growth is in dark condition

〈명 조건〉 〈암 조건〉

그림 2-1-15. *H. akashiwo*에 대한 생리활성물질의 회복성



Growth inhibition by contact time (3min) of vario
concentration on *P. minimum*. The growth is in light condit



Growth inhibition by contact time (3min) of vario
concentration on *P. minimum*. The growth is in dark condit

〈명 조건〉 〈암 조건〉

Fig. 2-1-16. *P. minimum*에 대한 생리활성물질의 회복성

(2) 결과

대량번식에 의한 빈산소수괴의 초래에 의한 수산피해뿐 아니라 독성에 의해 어류에 심각한 피해를 입히고 있는 적조 생물인 *Cochlodinium* 및 *P. minimum*의 GL에 대한 저해효과를 조사한 결과 5ppm에서 10분이내에 40%의 운동성 상실성을 보여주었으며, 또한 10ppm에서는 약 80%정도의 운동성 저해 효과를 나타내고 있어, 저농도에 의한 구제효과를 보여주고 있다(Fig. 2-2-1, 2-2-2)

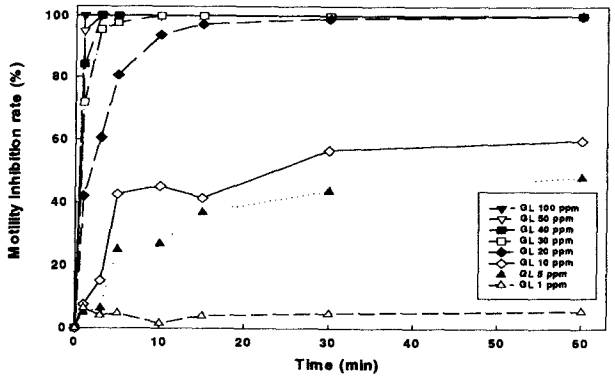


Fig. 2-2-1. *P. minimum*에 대한 미생물 생리 활성물질의 영향

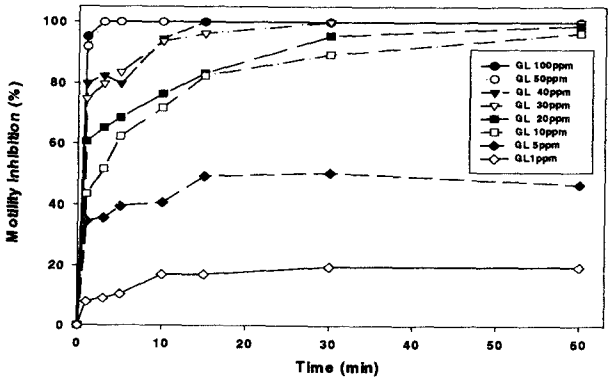


Fig. 2-2-2 *Cochlodinium polykrikoidea*에 대한 미생물 생리 활성물질의 영향

나. 생리활성물질에 의한 침강성 조사

(1) 방법

생리활성물질에 의해 운동성이 상실된 *Cochlodinium* 및 *P. minimum*의 침강성을 조사하기 위해 높이 1 m의 침전관에 생리활성물질을 농도별로 가하여 처리전과 처리후의 운동성이 상실된 적조생물의 침강성을 관찰하였다.

(2) 결과

생리활성물질의 각 농도별 침전관 실험결과 생리활성물질이 첨가되지 않은 대조구에서는 각 높이(5, 30, 60, 90 cm)에서 두 적조생물이 일정한 개체수를 유지하고 있는 반면에, 10 ppm 이상의 생리활성물질이 첨가된 실험구는 5시간 이내에 급격한 cell 수의 감소를 보이고 있는 것으로 분석되고 있다. 또한 5 ppm의 농도에서도 대조구의 저층부와 비교해보았을 때, 저층부의 세포 수가 증가되어 나타나는 것은 일부 생리활성물질에 의해 운동성을 상실한 적조생물이 저층부로 가라앉아 나타나는 현상으로 분석되어진다. 따라서 본 실험에 의해 *Cochlodinium* 역시 1차 반기보고서에 제출되어진 다른 와편모조류와 같이 생리활성물질에 의한 용균현상이 나타나는 것으로 사료된다(Fig. 2-2-3, 2-2-4 참조)

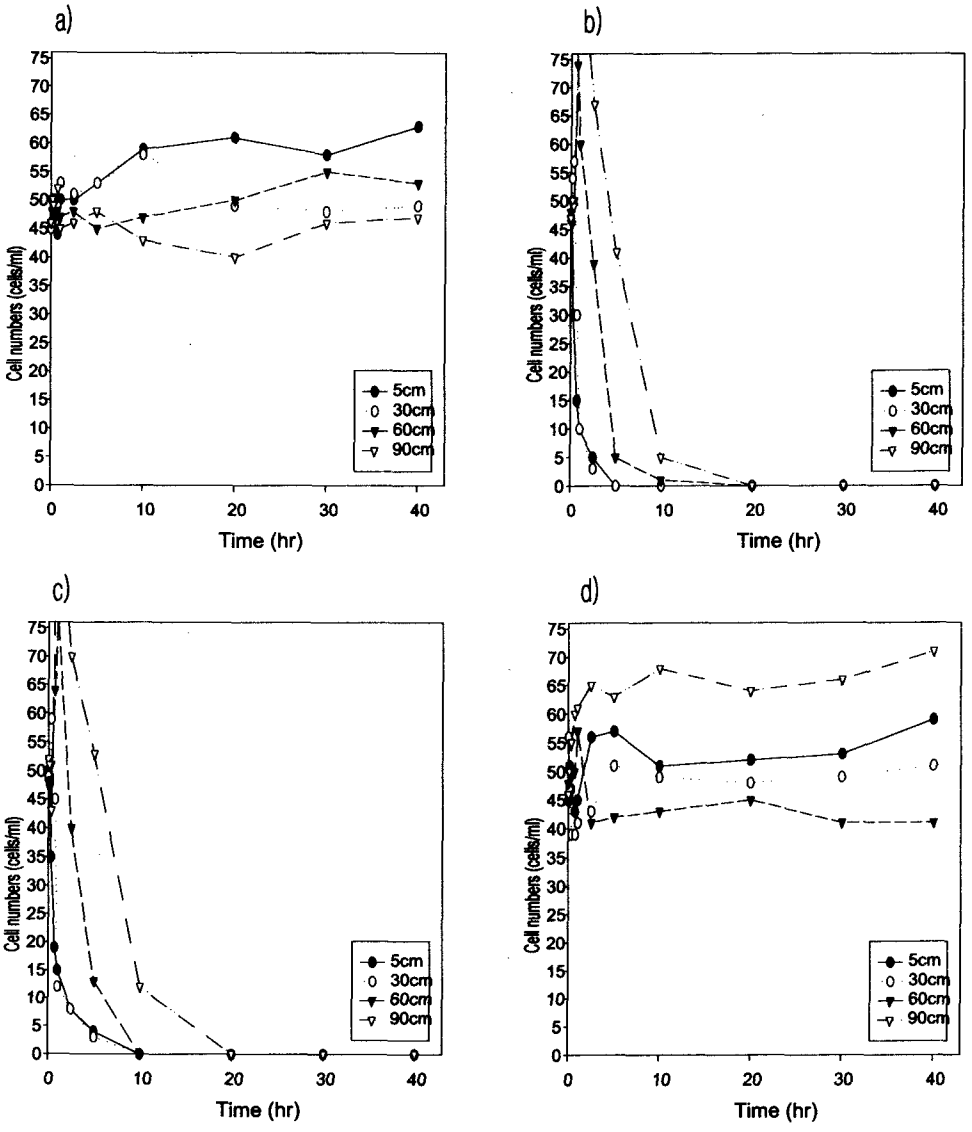


Fig. 2-2-3. *C. polykrikoidea*에 대한 침전관 실험

(a. control, b. GL 20 ppm, c. GL 10 ppm, d. GL 5 ppm)

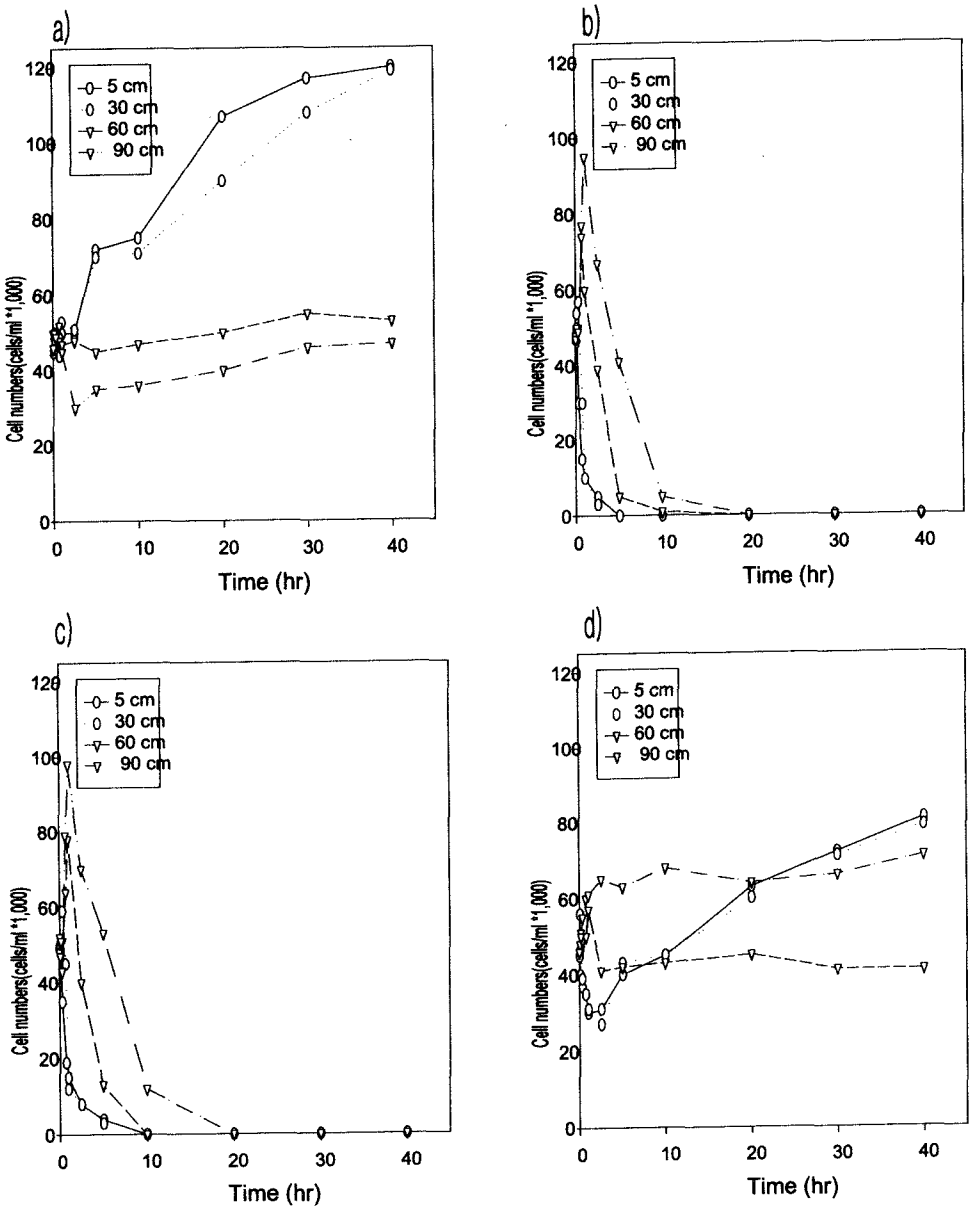


Fig. 2-2-4 *p. minimum*에 대한 침전관 실험

(a. control, b. GL 20 ppm, c. GL 10 ppm, d. GL 5 ppm)

다. 생리활성물질에 의한 용균작용

(1) 방법

침전관 실험에서 나타난 용균작용을 확인하기 위해, 와편모조류의 각 성장단계별로 일정량의 생리활성물질을 첨가하여, 적조생물의 용균작용을 광학현미경하에서 계수하였다.

(2) 결과

대수생 생장기에 이른 적조생물이 생리활성물질 20ppm을 처리한 결과 2시간 이내에 개체수의 감소가 일어났으며, 수 시간 이내에 상당한 개체수의 감소가 나타났다. 또한 50 ppm 이상의 생리활성물질을 처리하였을 경우 수분내에 대부분의 개체수가 감소하며, 급격한 용균작용이 발생되는 것을 확인 하였다(Fig. 2-2-5, 2-2-6 참조)

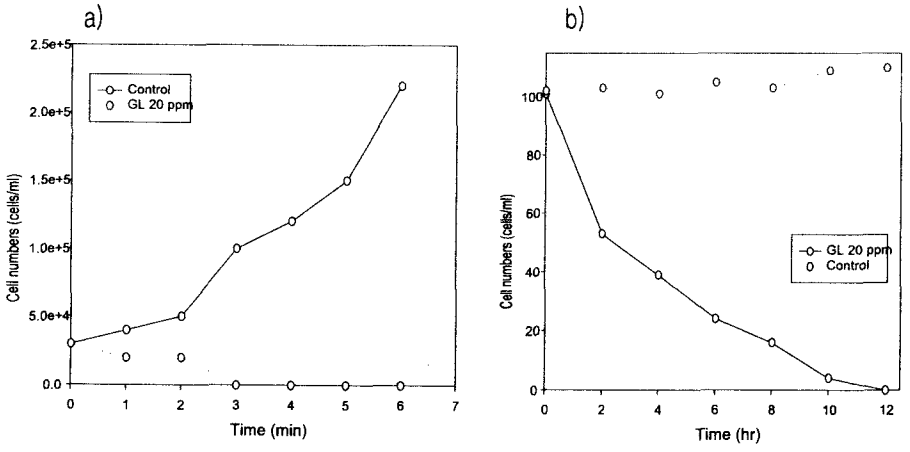


Fig. 2-2-5 생리활성물질의 용균작용

(a. *P. minimum*, b. *C. polykrikoidea*)

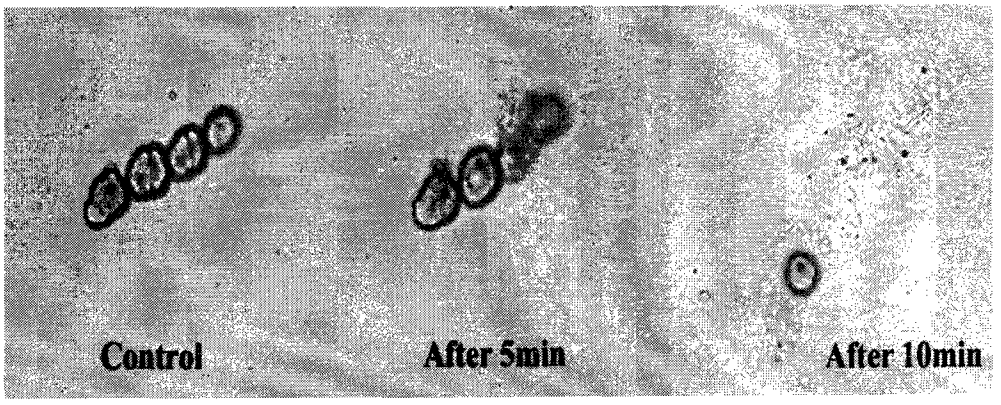


Fig. 2-2-6 *C. polykrikoidea*에 대한 생리활성물질의 용균작용의 광학현미경 사진

라. 생리활성물질에 의한 성장저해 조사

(1) 방법

*Cochlodinium*에 생리활성물질이 첨가되었을 때 성장에 미치는 영향을 알아보기 위해서 생리활성물질을 각 농도별로 첨가하여 8일 동안 배양하면서 실험결과를 관찰하였다.

(2) 결과

각 농도에 따른 생장저해 실험결과, *Cochlodinium*의 경우 대조구에 비해 1 ppm의 경우 약간의 성장 저해가 나타났으며 5 ppm이상의 생리활성물질이 첨가되었을 경우 생리활성물질에 의한 용균작용이 나타나 적조생물이 성장을 할 수 없는 것으로 나타났다(Fig. 2-2-7참조).

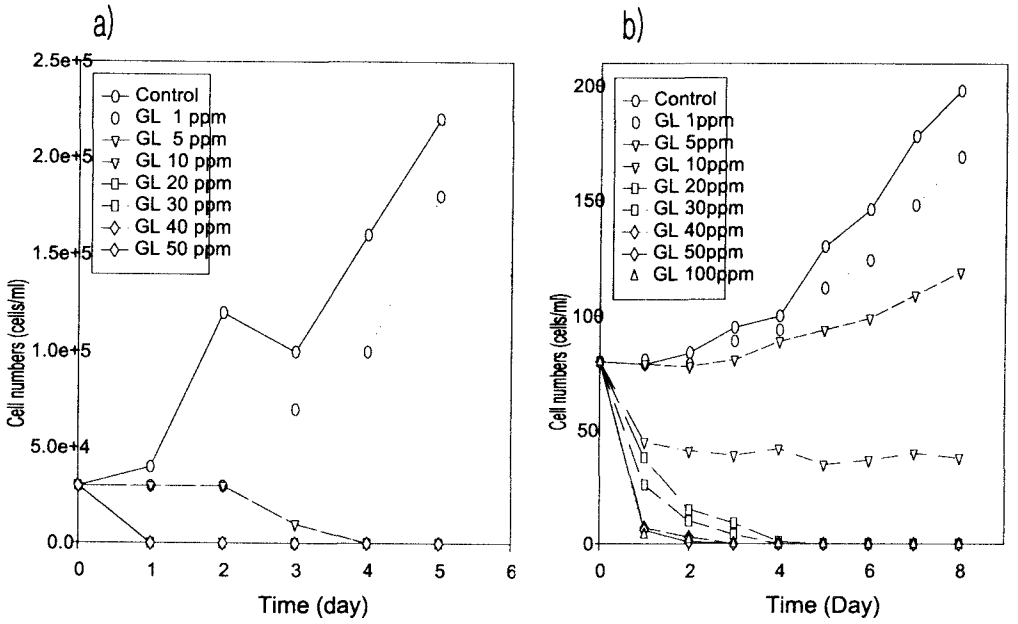


Fig. 2-2-7. 생리활성물질의 성장의 영향

(a. *P. minimum*, b. *C. polukrikoidea*)

3. 현장 적용 시험

가. 폐쇄생태계(Mesocosm)를 이용한 *Cochlodinium*의 운동성 저해실험

(1) *Cochlodinium*의 운동성 저해실험

(가) 방법

폐쇄생태계에 갖힌 *Cochlodinium* 적조를 채집하여 각 5, 10, 20ppm의 GL에서 운동성 저하를 알아보기 위하여 실험실에서와 같은 방법으로 광학현미경하에서 관찰하였다.

(나) 결과

실험실에서 인위적으로 배양된 *Cochlodinium*의 운동성 저해와 미조항에서 채집된

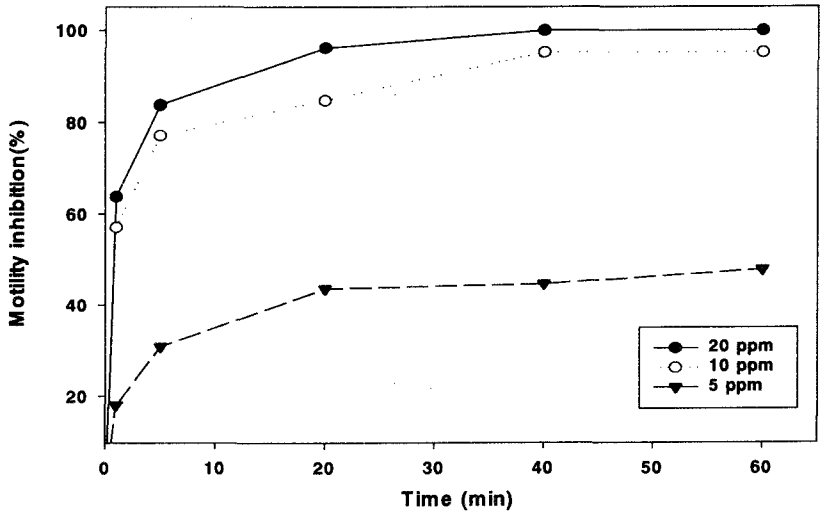


FIg. 2-3-1 미조항에서 채집된 *Cochlodinium* sp.의 운동성 저해

나. GL의 유해성 적조생물 *Cochlodinium polykrikoides*의 구제와 미세생물에 미치는 영향에 관한 MESOCOSM 실험

(1) 서론

최근들어 적조는 큰 규모로 장기화 되면서 수산양식어업에 막대한 피해를 초래하고 있다. 특히 1995년 발생한 *Cochlodinium*적조에 의한 어업피해액은 총 764억원이었으며 매년 지속적으로 일어나 2001년도의 경우 그 피해액은 70억원에 달했다. 적조를 구제하기 위한 많은 연구들이 수행되었지만 높은 비용과 이차 오염문제, 실행의 어려움 등의 이유로 황토살포방법만이 수행되고 있는 실정이다(최 등 1998, 김 2000). 그러나 많은 양의 황토를 적절한 분산장치 없이 해양에 살포함으로써 수괴에 현탁물질 증가, 적조생물과 충분한 접촉없이 황토입자들끼리 floc을 형성하여 침강(김 1999), 적조생물과 함께 침강한 많은 양의 황토에 의한 저서생태계의 혐기화 등(박 1998) 살포 후의 2차 오염이 우려되고 있다. 따라서 해양생태계에 영향을 최소화하

질 증가, 적조생물과 충분한 접촉없이 황토입자들끼리 floc을 형성하여 침강(김 1999), 적조생물과 함께 침강한 많은 양의 황토에 의한 저서생태계의 혐기화 등(박 1998) 살포 후의 2차 오염이 우려되고 있다. 따라서 해양생태계에 영향을 최소화하며 적조생물을 구제할 수 있는 새로운 방법의 개발이 요구되고 있다.

Sophorolipid는 yeast *Candida bombicola*에 의해서 생산되는 biosurfactant glycolipid의 일종이며 독성이 적고 쉽게 생분해되는 특성을 가지고 있다 (Garcia-Ochoa et al. 1999). Lang 등은 효모에서 생산되는 glycolipids의 다양한 미세생물에 대한 영향 테스트를 통하여 MIC(Minimum Inhibitory Concentration) 값을 얻어내었다(Lang et al. 1989).

실험실에서 4종의 HAB species에 대한 sophorolipid의 영향 실험이 선행되었다. 그 결과 sophorolipid 10~20ppm 농도에서 적조생물의 성장에 저해가 있는 것으로 나타났다.

본 연구는 sophorolipid를 이용한 해양에서의 *Cochlodinium* 적조구제효과를 알아보기 위하여 적조발생 현장에서 mesocosm 실험을 수행하여 *Cochlodinium*의 일차생산력과 개체수 변화를 측정하였다. 또한 적조생물 외의 미세생물에 대한 영향을 알아보기 위하여 섬모충류들의 개체수 변화를 측정하였다.

(2) 재료 및 방법

2001년 8월 14일에서 9월 5일 사이 *Cochlodinium*적조가 나타난 남해도 미조리에서 패쇄생태계를 이용하여 Sophorolipid의 적조구제 효과를 실험하였다 (Fig.2-3-2). 반패쇄형 패쇄생태계는 5㎛의 망목을 가진 Nybolt 스크린(원사는 monofilament nylon fabric, 원사의 원료는 polyamide 6, polyamide 66, polyamide 12)으로 만들었다. 패쇄생태계의 규격은 직경이 1m 이고 높이가 1m인 원통형모양이며 용량은 3.14m^3되게 제작하였다. 실험은 2개의 반폐쇄성 패쇄생태계를 선박측면에 고정한 후, 적조생물이 밀집한 수괴를 펌프를 이용 폐쇄생태계를 채운 후 이루어졌다. 폐쇄생태계중 하나에는 Sophorolipid를 넣어 시간에 따른 적조생물의 개체수와 일차생산력 및 박테리아, 섬모충류들의 개체수 변화를 조사하였으며, 다른 폐쇄

생태계는 Sophorolipid를 넣지 않은 상태에서 시간에 따른 일차생산력 및 개체수의 변화를 조사하였다.

(가) 개체수변화

하나의 폐쇄생태계는 대조구로 사용하였으며 다른 하나에는 50ppm의 Sophorolipid를 넣어 시간에 따른(5분, 20분, 40분, 60분, 90분) *Cochlodinium polykrikoides*의 개체수변화와 일차생산력, ciliates, heterotrophic dinoflagellates(HDF)의 개체수 변화 실험을 하였다. *Cochlodinium*의 개체수는 시간별로 폐쇄생태계에서 시료를 채취하여 루골액으로 고정한 후 6시간이내에 Sedgewick-Rafer chamber를 이용 광학현미경하에서 계수하였다. Ciliates와 HDF 개체수는 같은 방법으로 시료를 채취하여 중성포르말린으로 고정 후 계수하였다. 50ppm농도의 Sophorolipid실험이 끝난 후 동일한 방법으로 Sophorolipid 10ppm에서 적조제어 효과를 실험하였다

(나) 엽록소-a

식물플랑크톤의 Chlorophyll-a 분석을 하기 위하여 현장에서 채수한 해수 100ml를 Whatman GF/F로 여과한 후 여과지를 냉장 보관하여 실험실로 운반하였다. 실험실로 운반된 여과지에는 90%의 acetone을 넣고 24시간동안 냉암소에서 보관한 후 분광광도계로 흡광도를 구한 후 UNESCO 계산식으로 계산하였다.

(다) 일차생산력

Sophorolipid의 적조구제 효과를 알아보기 위하여 일차생산력 실험을 하였다. 폐쇄생태계에서 Sophorolipid에 노출된 시간별 일차생산력의 변화를 알아보고자 명암병 방법을 채용하였다. 시간별로 채수된 시료를 60ml 용량의 투명한 polycarbonate bottle과 빛이 차단된 병에 넣은 후 1μCi의 ^{14}C을 첨가하여 표층해수에서 1시간 동안 배양하였다. 배양시간동안 광량은 광량계 (Li-Co quantum meter LI-1000)에서 5분 간격으로 측정된 PAR (Photosynthetically Avaiable Radiation) 값을 사용하였다. 배양이 끝난 시료는 GF/F 여과지를 사용하여 거른 후 냉동 보관하였다. 냉동 보관된

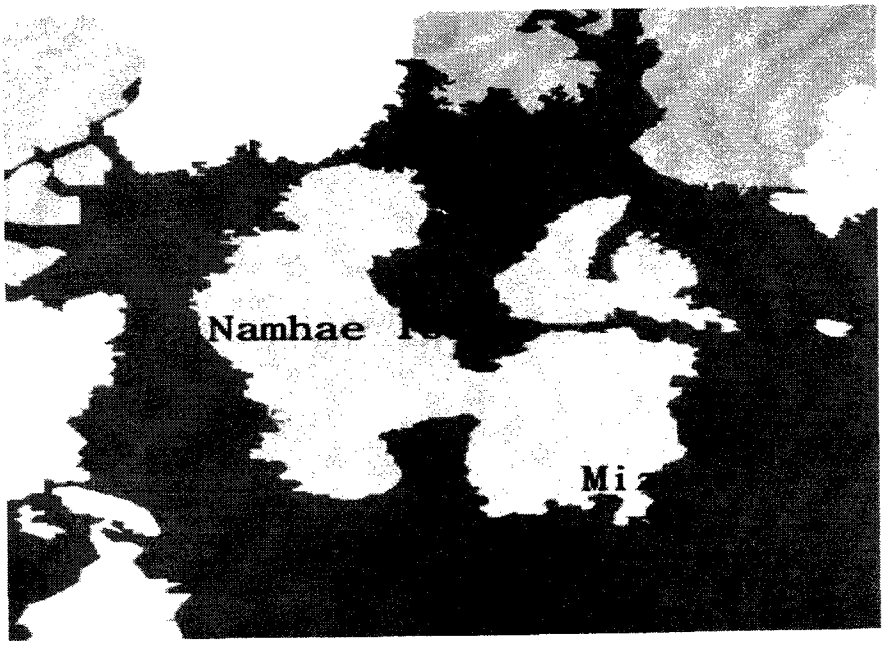


Fig. 2-3-2 The map showing the site of mesocosm test of sophorolipid.

여과지는 실험실로 옮긴 후 염산으로 훈증하였다. 훈증이 끝나면 즉시 scintillation cocktail 15mℓ를 첨가하여 냉암소에 보관한 뒤 실험실에서 Scintillation Counter로 dpm을 측정하였다. Total CO_2를 추정하기 위하여 Parsons *et al.* (1984)의 방법을 따라 시료 100ml에 0.01N HCl 25ml를 첨가하여 전 후의 pH를 측정하였다.

명암병 방법에 의한 일차생산력실험은 배양시간동안 광조건이 변하면 동화율이 변하기 때문에 광에 대한 동화율을 알아보기 위해서는 radial photosynthetron 방법을 채용 P-I 실험을 하였다 (Babin et al., 1994). 현장해수를 실험실로 옮긴후 해수 850mℓ에 ^{14}C 을 첨가하여 잘 섞은 후 10개의 플라스크에 60ml 씩 주입하였다. 밀폐된 상자에 60ml Falcon culture flask를 일렬로 배열하고 한쪽에서 diffused light를 비추어 플라스크 내에 광량의 구배가 생기게 하였다. 광원으로는 Osram의 HQI/T 400W 램프를 사용하였다. 배양은 1시간을 유지하였으며 각 플라스크의 광량은 QSL 100 scalar quantum meter(Biospherical Co)를 써서 측정하였다. 배양이 끝난 시료

의 후처리는 명암병 방법과 동일하게 이루어졌다.

P-I 실험에서 얻어진 결과는 Platt *et al.* (1980)의 모형에 적합화하여 매개변수화 하였다. 광저해 현상이 있을 경우 3 개의 매개변수를 가지고 있는 Platt *et al.* (1980)의 모델을 사용하였다.

$$P = B P^B_s (1 - \exp [-\alpha^B I / P^B_s]) \exp[-\beta^B I / P^B_s]$$

여기서 B는 생체량, 위첨자 ^{B}는 단위 생체량당 매개변수임을 의미한다. P^B는 단위 엽록소 당 광합성량이고, P_m^B는 포화 광도 이상에서의 단위 생체량 당 광합성량, 즉 동화율 (assimilation number)이다. α는 광합성의 광량자 효율과 관련된 매개 변수로 광합성-광도 곡선 중 포화 광도 이하에서의 선형 반응의 기울기를 가리킨다. β는 광저해 정도를 결정짓는 매개 변수이다. P_S^B는 β→0 일때 P^B의 최대값으로 정의된다.

광합성이 최대가 되는 광도를 I_m 라 하면,

$$I_m = \frac{P_s^B}{\alpha} \ln \left(\frac{\alpha + \beta}{\beta} \right)$$

이 때의 최대 광합성값은 (동화율)

$$P_m^B = P_s^B \left(\frac{\alpha}{\alpha + \beta} \right) \left(\frac{\beta}{\alpha + \beta} \right)^{\frac{\beta}{\alpha}}$$

로 주어진다.

(3) 결과 및 고찰

(가) Cochlodinium polykrikoides의 개체수 변화실험

폐쇄 생태계의 대조구에서 시간경과별 *Cochlodinium*의 개체수 변화를 Fig. 2-3-3에 나타냈다. 초기 6890 cells/㎖에서 60분 후 6850 cells/㎖의 개체수로 변화가 거의 없는 것으로 나타났다. Sophorolipid 농도를 50ppm으로 첨가해준 폐쇄 생태계에서의 시간 경과별 *Cochlodinium*의 개체수 변화는 Fig. 2-3-4에 나타냈다. Sophorolipid

50ppm을 첨가하고 5분 후에 5,710 cells/mℓ의 개체수를 나타내다 시간이 경과하며 개체수 감소가 나타나 90분 후에는 1,400 cells/mℓ의 개체수가 나타났다. 이러한 결과는 50ppm의 Sophorolipid가 첨가된 해수에서 90분 내에 약 3/4의 *Cochlodinium*의 세포막이 lysis가 나타나 세포가 파괴되었음을 의미한다. Sophorolipid와의 접촉 시간에 따라 정상적인 세포는 점차 감소하며 세포막이 팽창된 세포들이 20분 경과 후 2,520 cells/mℓ의 개체수를 보이다 90분에는 810 cells/mℓ의 개체수가 나타났다. 이는 Sophorolipid의 영향으로 시간이 경과되며 전체 세포 중 세포막이 팽창하는 세포가 증가하며 이중 일부는 세포가 파괴됨을 나타낸다.

Sophorolipid 농도를 10ppm으로 첨가해준 쇄생태계에서의 시간경과별 *Cochlodinium*의 개체수 변화는 Fig. 2-3-5에 나타냈다. Sophorolipid 10ppm을 첨가한 5분 후에 7,040 cells/mℓ의 개체수를 나타냈으며 60분 후에는 5,920 cells/mℓ의 개체수가 나타났다. 이는 10ppm의 Sophorolipid 농도 하에서 개체수의 큰 변화가 없었음을 나타낸다. 그러나 세포막이 팽창된 세포는 5분경과 후 860 cells/mℓ에서 60분경과 후에는 3,240 cells/mℓ으로 증가 세포의 완전한 파괴 현상은 뚜렷이 나타나지 않으나 세포막이 팽창하는 비정상적인 세포들이 증가함을 보였다.

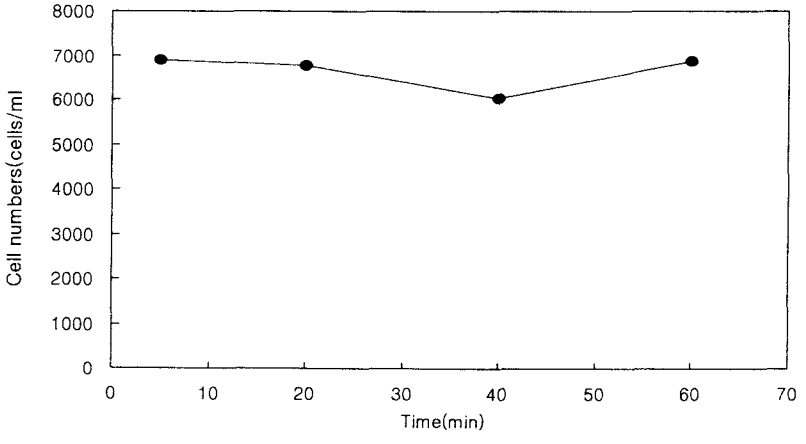


Fig. 2-3-3 Variation of cell numbers on *Cochlodinium polykrikoides* in control.

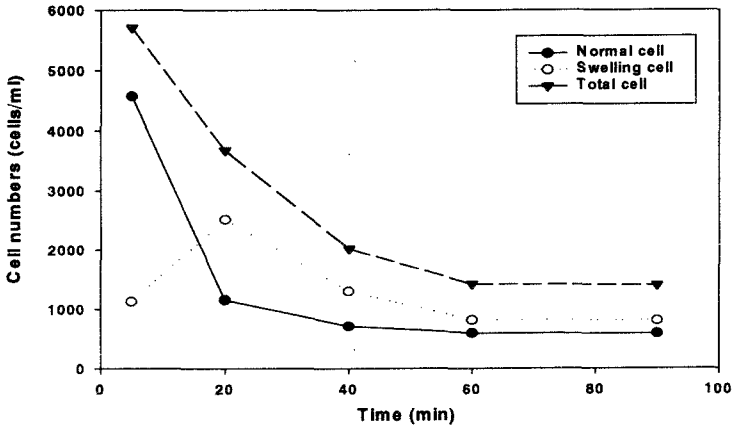


Fig. 2-3-4 Removal Efficiency of *Cochlodinium polykrikoides* by sophrolipid 50ppm with time series.

(나) 일차생산력실험

Sophrolipid 농도를 50ppm으로 첨가해준 폐쇄생태계에서의 시간 경과별로 채수한 해수의 광합성 동화율 변화 결과를 대조구와 같이 Fig. 2-3-6에 나타냈다. Sophrolipid를 첨가하지 않은 해수는 1시간 배양결과 5.89 mgC mgChl-$a^{-1}h^{-1}$의 동화계수를 나타냈다. Sophrolipid 50ppm의 농도로 5분, 20분, 60분 접촉한 후 1시간 배양한 결과는 각각 3.62 mgC mgChl-$a^{-1}h^{-1}$, 1.69mgC mgChl-$a^{-1}h^{-1}$, 0.84 mgC mgChl-$a^{-1}h^{-1}$ 의 동화율을 나타냈다. 대조구에서는 초기 5.76 mgC mgChl-$a^{-1}h^{-1}$에서 60분 후 5.68 mgC mgChl-$a^{-1}h^{-1}$로 큰 변화가 없었다. 이러한 결과는 *Cochlodinium*이 50ppm의 Sophrolipid에 접촉할 시 매우 큰 일차생산력 감소가 나타남을 보이고 있다.

Sophorolipid 농도를 10ppm으로 첨가해준 폐쇄생태계에서의 시간 경과별로 채수한 해수의 광합성 동화율 변화 결과를 대조구와 같이 Fig. 2-3-7에 나타냈다. Sophorolipid를 첨가하지 않은 해수는 1시간 배양결과 6.08 mgC mgChl-$a^{-1}h^{-1}$의 동화계수를 나타냈다. Sophorolipid 10ppm의 농도로 5분, 20분, 60분 접촉한 후 1시간

배양한 결과는 각각 5.52 mgC mgChl-$a^{-1}h^{-1}$, 4.35mgC mgChl-$a^{-1}h^{-1}$, 3.47 mgC mgChl-$a^{-1}h^{-1}$ 의 동화율을 나타내 50ppm으로 첨가해준 폐쇄생태계보다 동화율감소가 작게 나타나고 있다. 대조구에서는 초기 5.87 mgC mgChl-$a^{-1}h^{-1}$에서 60분후 5.72 mgC mgChl-$a^{-1}h^{-1}$로 조금 감소하는 경향이 있으나 이는 폐쇄생태계로 인한 차이로 판단된다.

위의 두 실험은 자연광하에서 배양을 하였으므로 광량 변화에 따른 동화율 감소가 나타날 수 있다. 따라서 *Cochlodinium*의 광량 변화에 따른 동화율의 변화를 알아보고자 현장해수를 실험실로 옮겨 동화율 실험을 수행하였다. 실험결과는 Fig. 2-3-8에 나타냈는데 광이 증가함에 따라 동화율이 증가하다 일정광 이상에서는 동화율의 감소가 나타나고 있다. 폐쇄 생태계 실험시의 배양시간동안 평균 광량은 372~507 μ Ein $m^{-1}sec^{-1}$의 범위를 나타냈다. 이러한 광량 범위에서의 동화율 변화는 6.08~6.17 mgC mgChl-$a^{-1}h^{-1}$의 좁은 범위를 나타냈다. 따라서 폐쇄생태계의 광합성 실험결과는 광량 변화의 영향은 매우 미미하며 동화율 감소는 Sophorolipid의 영향에 의한 결과로 판단된다.

(다) Ciliates, Heterotrophic dinoflagellates(HDF) 개체수변화실험

적조구제를 위하여 sophorolipid를 살포하였을 경우 microorganimsm에 미치는 영향을 알아보기 위하여 *Cochlodinium* 개체수와 일차생산력 실험과 동시에 microorganisms 개체수 변화 실험을 수행하였다. sophorolipid가 세포의 막에 영향을 주어 lysis되는 결과를 나타낸다고 판단하여 microorganisms중에서 비교적 세포막이 약한 ciliates와 HDF를 대상으로 수행하였으며 그 결과를 Fig. 2-3-9에 나타냈다. 대조구에서는 ciliates와 HDF가 각각 평균 7,100cells/ℓ, 3,719cells/ℓ로 나타나며 시간에 따른 개체수의 두드러진 변화가 보이지 않았다. sophorolipid 50ppm을 넣어준 폐쇄생태계에서 ciliates와 HDF가 첨가 5분 후 각각 85%, 35%의 개체수 감소를 나타냈다. ciliates중 oligotrichs의 경우 첨가 5분 후 179cells/ℓ의 개체수가 나타난 이후에는 더 이상 관찰이 되지 않았으며 tintinnids의 경우에는 60분 후 337cells/ℓ가 관찰 되었고 90분 경과 후에는 관찰되지 않았다.

sophorolipid 10ppm 첨가 후 5분만에 ciliates는 tintinnids의 경우 초기 4,423cells/ℓ에서 1,563cells/ℓ로, oligotrichs의 경우 초기 3,077cells/ℓ에서 174cells/ℓ로 크게 감소하였으며 20분 경과 후에는 HDF가 초기 2,284cells/ℓ에서 653cells/ℓ로 감소하였다. 특히 oligotrichs의 경우 5분 이후에는 관찰되지 않아 sophorolipid에 영향을 크게 받는 것으로 나타났다. 또한 HDF, tintinnids, oligotrichs의 순으로 sophorolipid에 크게 반응하는 것으로 나타났다. 이는 sophorolipid가 적조생물의 세포막에 영향을 미쳐 lysis 시킨다고 할 때 세포막이 비교적 약한 oligotrichs가 tintinnids나 HDF에 비하여 더욱 큰 영향을 받았기 때문이라고 사료된다.

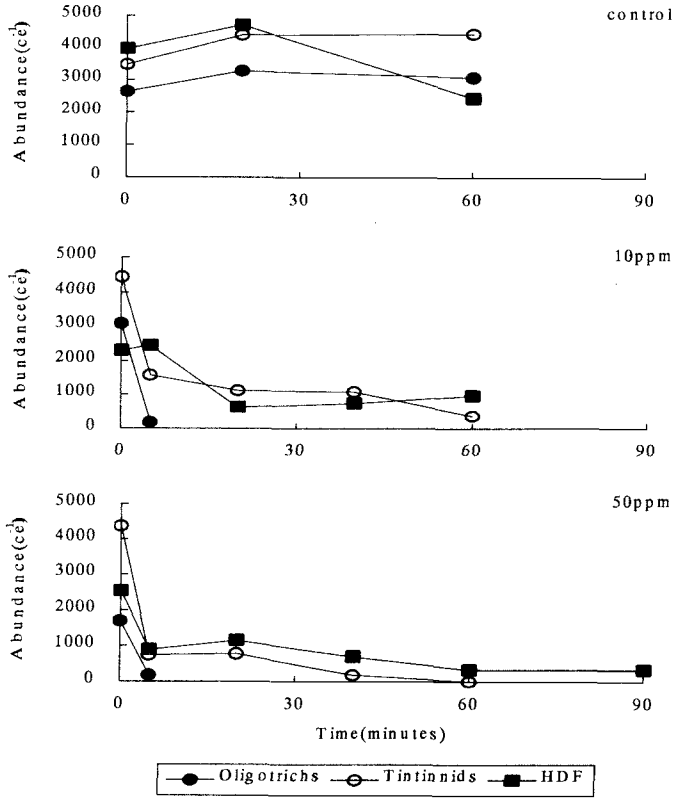


Fig. 2-3-9 The effect of ciliates and heterotrophic dinoflagellates by sophorolipid.

(4) 토의

sophorolipid의 소수성부분은 대개 선형 포화 탄화수소로 이루어지며 친수성부분은 당 또는 아미노산으로 구성된다. Fig. 2-3-10은 sophorolipid의 일반적인 구조식을 보여주고 있다. sophorolipid와 같은 glycolipid surfactant는 추출공정 후, 점도가 매우 높은 반고체성의 물질로 취급이 매우 어렵고 제품으로서의 사용성이 좋지 않은 단점이 있다. 이러한 단점을 해결하고자 여러 문헌에서는 sophorolipid 유도체를 합성하였다. 형성된 몇 가지 유도체를 Fig. 2-3-11에 나타내었다.

Sophorolipid는 *Cochlodinium*종의 세포막에 영향을 주어 삼투현상을 일으켜 세포를 비정상적으로 부풀어 오르게 하여 세포가 lysis되는 결과를 가져오는 것으로 사료되며 그 과정을 Fig. 2-3-12에 나타내었다. Fig. 2-3-12에 a)는 정상적으로 군체를 이루고 있는 *Cochlodinium polykrikoides*이다. sophorolipid에 접촉된 세포는 세포막이 비정상적으로 부풀어오르다가(b) 터져 결국 세포가 완전히 용해된다(c)sophorolipid를 50ppm으로 첨가해준 실험구에서는 20분 후 swelling cells이 급격히 증가하였다가 다시 급격히 감소함을 보였다(Fig. 2-3-4). 이는 높은 sophorolipid 농도로 인하여 빠른 시간 안에 세포의 swelling, lysis 과정이 진행되었음을 나타낸다. 또한 sophorolipid를 10ppm으로 첨가해준 실험구에서는 swelling cells의 초반 급격한 증가와 시간에 따른 지속적인 증가추세를 보였으며 감소추세는 보이지 않았다(Fig. 2-3-5). 이는 sophorolipid 농도에 따라 세포의 lysis에 걸리는 시간이 다르다는 것을 나타낸다.

일차생산력 실험에서 동화계수는 sophorolipid 첨가 5분후부터 급격한 감소를 보이며 시간에 따라 지속적으로 감소하였다(Fig. 2-3-6, 2-3-7). 이는 *Cochlodinium polykrikoides*의 개체수 실험에서 normal cells로 나타났던 세포들도 광합성에 저해를 받고 있음을 나타내며 생리적으로 불안정한 반응을 보이는 것으로 판단된다.

결과적으로 sophorolipid 농도를 10ppm이 되게 첨가해준 실험구에서는 첨가한 5분 후부터 서서히 개체수 감소가 나타나 60분 후에는 64%의 제거효율을 나타냈으며 sophorolipid 50ppm의 실험구에서는 첨가한 5분 후부터 급격한 개체수 감소를 보이며 60분 후 90%의 제거효율을 나타냈다. 개체수 감소뿐만 아니라 일차생산력 실험에

서도 sophorolipid를 첨가한 실험구에서 급격한 동화계수의 감소가 나타나 sophorolipid에 적조구제 효과가 있는 것으로 판단된다.

같은 방법으로 ciliates와 heterotrophic dinoflagellates의 개체수 변화 실험을 수행한 결과 sophorolipid 10ppm과 50ppm에서 개체수 감소가 나타나 sophorolipid에 영향을 받는 것으로 나타났다(Fig. 2-3-9).

위와 같이 해양의 미세생물 먹이망을 구성하는 생물 중 세포막이 비교적 약한 naked type의 *Cochlodinium polykrikoides*와 또 다른 생물군인 ciliates, heterotrophic dinoflagellates는 sophorolipid에 의하여 저해영향을 받는 결과를 나타냈다. 그러나 미세생물 먹이망에 주요 구성생물그룹인 박테리아와 동물플랑크톤 그리고 적조생물 외의 식물플랑크톤등을 대상으로 sophorolipid의 영향도 테스트를 수행하여 sophorolipid가 해양생태계의 미세생물 먹이망 전반에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 정확한 분석이 필요하겠다.

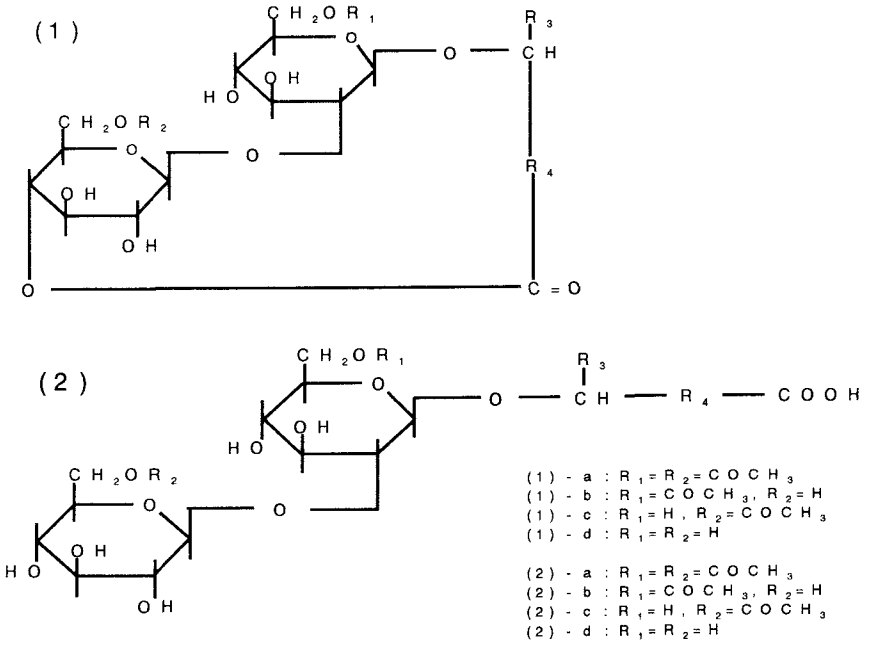


Fig. 2-3-10 Structures of major components of sophorolipid

(1)R3:CH3, R4:(CH2)15

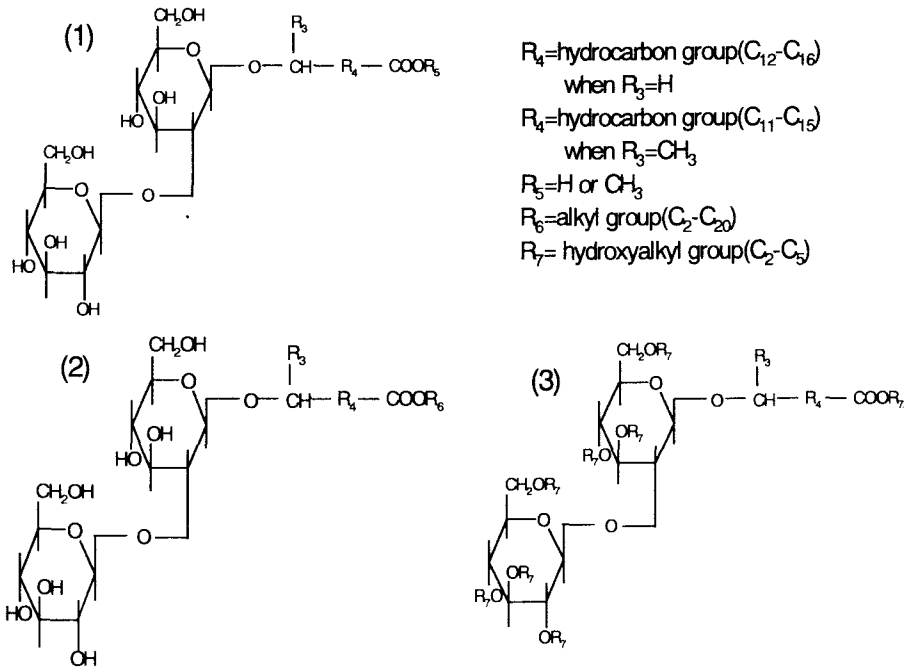
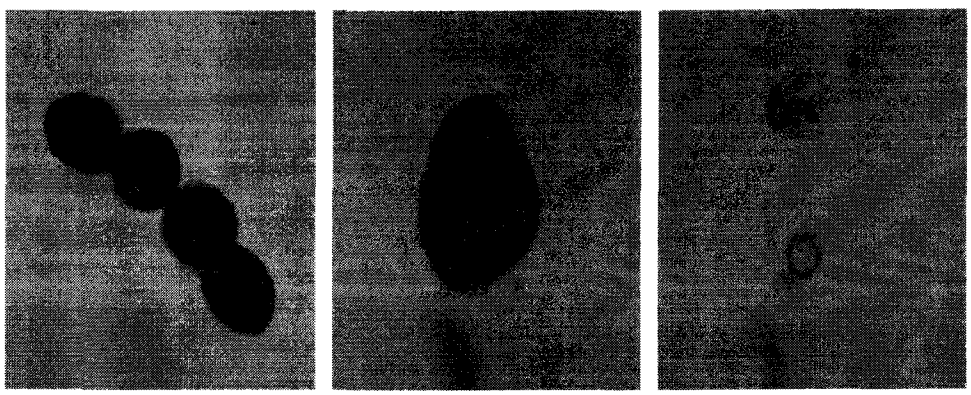


Fig. 2-3-11 Structures of sophorolipid derivtives



a) Normal cell b) Swelling cell c) Lysis

Fig. 2-3-12 Effect of sophorolipid on *Cochlodinium polykrikoides*.

(5) 현장실험사진

현장 사진 (2001.8.23 남해 미조리 해안 메소코좀 실험)

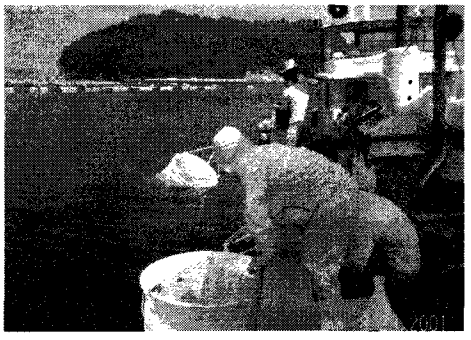


사진1: 2001. 8.23
남해 미조리 해안 (메소코좀 설치)

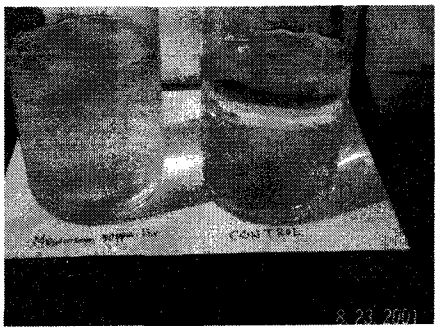
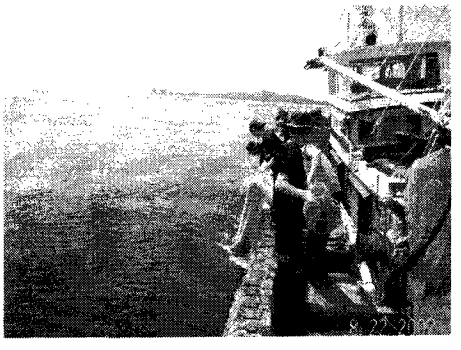


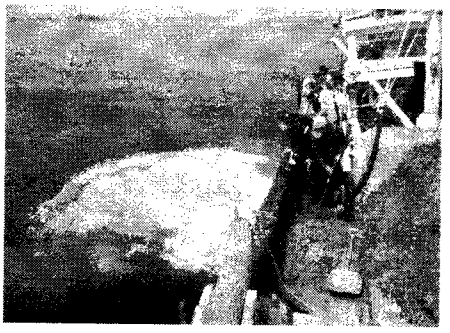
사진 2: 처리시 붉은 색의 적조가 파괴됨

2002. 8. 23 (현장살포 실험)

현장실험 준비

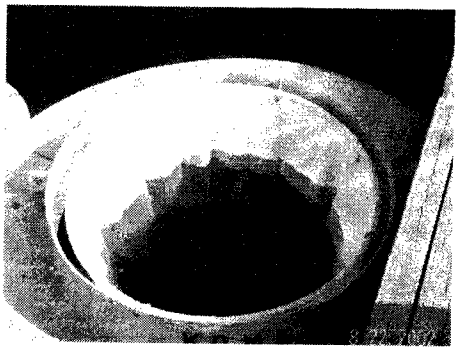


침전효과 실험



황토/황토+GL 혼합물의 비교실험

GL 살포 실험



현장설치 메소코좀 실험

메소코좀 처리결과 비교 사진

3절. 생리활성물질에 의한 해양환경 영향 평가

1. 박테리아 및 식물플랑크톤에 대한 영향

가. 목적

생리활성물질은 세포막이 비교적 약한 적조생물에 영향을 미쳐 세포를 lysis 시키는 것으로 판단된다. 따라서 적조구제를 위하여 생리활성물질을 살포하였을 때 적조생물이 아닌 다른 식물플랑크톤이나 박테리아플랑크톤 등의 부유생물에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구가 수반되어야 하겠다. 본 연구는 실험실 실험을 통하여 생리활성물질이 식물플랑크톤과 박테리아플랑크톤의 성장에 미치는 영향에 대하여 관찰하였다.

나. 실험 재료

(1) 실험 생물

본 실험에 사용된 박테리아플랑크톤은 인천 연안에서 채수한 해수를 Whatman GF/F로 여과하여 부유물질과 식물플랑크톤, 동물플랑크톤 등을 제거한 후 21℃, 5000lux에서 24시간 적응기간을 거쳐 실험에 사용하였다.

식물플랑크톤은 한국해양미세조류은행에서 분양받은 *Skeletonema costatum*(KMCC B-24)과 *Pseudonitzschia pungens*(KMCC B-222)을 f/2 배지에 20℃, 3000lux로 무균상태에서 계대배양하였다.

적조생물은 국립수산진흥원에서 분양받은 *Cochlodinium polykrikoides*와 *Prorocentrum minimum*을 f/2 배지에 22℃, 5000~7000lux로 무균상태에서 계대배양하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) 생리활성물질에 의한 박테리아플랑크톤의 성장변화

(가) 방법

박테리아플랑크톤을 소포로리피드의 다양한 농도(25ppm, 50ppm, 100ppm, 250ppm, 500ppm)에서 배양하여 시간에 따른(1시간, 4시간, 8시간, 24시간, 48시간) 개체수

변화를 관찰하였다. 박테리아플랑크톤 계수를 위한 현미경 slide는 시간별로 채취하여 고정된 시료(2% formalin, v/v)를 사용하여 만들어졌다. 박테리아플랑크톤은 DAPI (4′, 6-diamidino-2-phenylindole; final conc. 10μg ml^{-1})로 염색된 후, black-stained Nuclepore filter(0.2μm pore size) 위에 여과되었다(Porter and Feig, 1980). slide는 냉장보관 되었으며 Nikon 형광현미경(×1000)을 사용하여 박테리아플랑크톤 개체수를 계수하였다.

(나) 결과

소포로리피드를 일정 농도별로 첨가한 실험구와 대조구에서 시간경과별 박테리아플랑크톤의 개체수 변화를 그림.3-1-1에 나타냈다. 초기에 6개 실험구에서 최대 1,849,638cells/ml, 최소 1,517,809cells/ml로 평균 1,718,545cells/ml의 개체수를 나타내었다. 대조구에서 1시간 후 1646854cells/ml, 4시간 후 1714448cells/ml로 개체수의 큰 변화가 없었고 소포로리피드 첨가 실험구에서는 4시간 후 다소 감소하는 경향을 보였다. 8시간 이후 대조구에서 개체수가 다소 증가하였으며 48시간 후에 3,637,826cells/ml로 나타났다. 소포로리피드 농도가 25ppm 되게 첨가한 실험구에서는 48시간 후 10,126,921cells/ml로 개체수가 크게 증가하였으며 소포로리피드 농도가 높을수록 개체수 증가량은 커져 250ppm 첨가 실험구에서는 17,648,372cells/ml로 나타났다. 실험 결과 박테리아플랑크톤은 높은 농도의 소포로리피드에도 성장 저해를 받지 않으며 소포로리피드의 탄소원을 이용하는 박테리아의 성장이 두드러지게 증가하는 것으로 나타났다

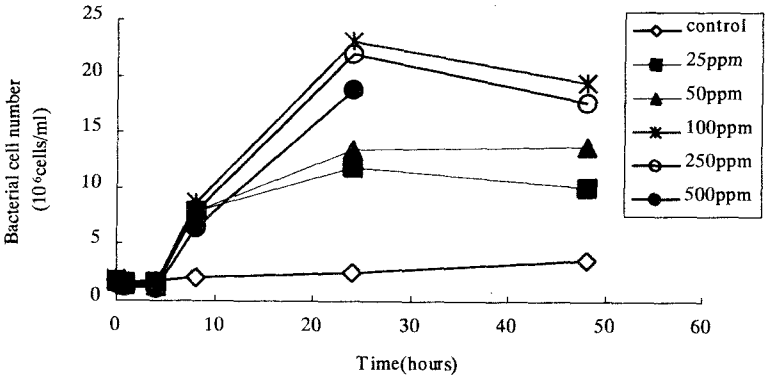


Fig.3-1-1 sophorolipid 첨가 후 시간경과별 박테리아플랑크톤의 개체수 변화

(2) 생리활성물질 첨가 해수에서 적조생물 분해중 박테리아플랑크톤의 성장 변화

(가) 방법

배양중인 적조생물 *Cochlodinium*과 *Prorocentrum*을 24시간 적응기간을 거친 박테리아플랑크톤과 혼합한 후 생리활성물질을 첨가하고 시간에 따른(1시간, 4시간, 8시간 24시간, 48시간) 개체수 변화를 위와 같은 방법으로 관찰하였다.

(나) 결과

소포로리피드 10ppm을 첨가한 실험구와 대조구에서 시간경과에 따른 박테리아플랑크톤의 개체수변화를 그림. 3-1-2에 나타냈다. *Cochlodinium*과 박테리아플랑크톤을 혼합한 대조구에서의 초기 개체수는 3,379,737cells/ml였으며 48시간 후 8,320,298cells/ml로 나타났다. 이는 *Prorocentrum*과 박테리아플랑크톤을 혼합한 대조구에서도 비슷한 경향을 보여 사망한 적조생물 개체를 분해하는 박테리아플랑크톤의 정상적인 개체수 증가양상으로 보인다. 또한 소포로리피드를 첨가한 실험구에서는 *Cochlodinium* 혼합 실험구에서 약 3배, *Prorocentrum* 혼합 실험구에서 약 5배의 개체수 증가를 보여 위 ①번실험과 동일한 양상을 나타냈다.

(3) 생리활성물질에 의한 식물플랑크톤의 성장 변화

(가) 방법

식물플랑크톤을 소포로리피드 5ppm과 10ppm 농도에서 배양하여 시간에 따른 변화를 관찰하였다. 식물플랑크톤의 정량적인 변화를 알아보기 위하여 chlorophyll-a를 분석하였다. chlorophyll-a 분석을 위하여 시간별로 채취한 해수 300㎖를 Whatman GF/F로 여과한 후 여과지를 냉동 보관하였다. 분석 전에 90% 아세톤에 여과지를 넣어 24시간 동안 냉암소에서 보관하였고, 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였으며, UNESCO(1976) 계산식을 통하여 계산하였다.

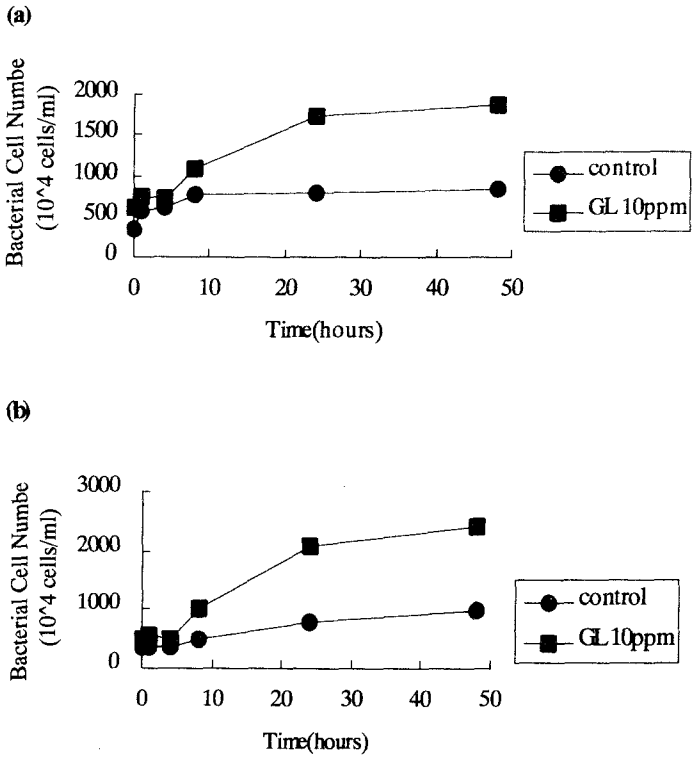


Fig. 3-1-2 sophorolipid 첨가 해수에서 적조생물 분해중 박테리아플랑크톤의 개체수 변화 (a)*Cochlodinium* (b)*Prorocentrum*

(나) 결과

소포로리피드 농도를 5ppm으로 첨가해준 실험구에서 *Skeletonema costatum*의 시간에 따른(1시간, 6시간, 12시간, 24시간 36시간) chlorophyll-a 농도 변화를 그림 3-1-3에 나타냈다. 대조구에서 초기 27.19ug/l, 36시간 후 52.59ug/l의 chlorophyll-a 농도를 보여 높은 성장률을 나타냈다. 반면에 소포로리피드 농도가 5ppm이 되도록 첨가해준 실험구에서 초기 24.42ug/l, 1시간 후 21.26ug/l로 다소 감소함을 보였으며 시간에 따라 지속적으로 감소하여 36시간 후에는 8.59ug/l의 chlorophyll-a 농도를 나타냈다. *Pseudonitzschia pungens*의 경우 대조구에서 초기 17.79ug/l, 48시간 후 28.26ug/l로 나타나 *Skeletonema costatum*과 마찬가지로 세포가 성장함을 보였다. 또한 소포로리피드 농도가 10ppm이 되도록 첨가해준 실험구에서도 초기 13.99ug/l, 48시간 후 23.24ug/l의 농도로 나타나 세포가 성장함을 보였다. 실험 결과 *Skeletonema costatum*은 5ppm의 소포로리피드 농도에서 시간에 따라 다소 감소하는 경향을 보였으나 *Pseudonitzschia pungens*은 10ppm의 소포로리피드 농도에서 대조구와 마찬가지로 세포가 성장함을 보였다. 앞서 수행된 적조생물에 대한 소포로리피드의 성장 저해실험에서 나타난 단시간 내에 적조생물의 세포수가 급격히 감소하는 결과와 비교할 때 *Skeletonema costatum*의 세포수 감소는 미약하며 *Pseudonitzschia pungens*은 오히려 대조구와 마찬가지로 세포수가 증가함을 보여 소포로리피드에 반응하는 정도가 생물 종마다 다르게 나타난 결과로 판단된다.

위 실험에서 나타난 결과에 따라 sophorolipid는 해양 박테리아플랑크톤에 대하여 성장에 저해영향이 미비하며 오히려 sophorolipid의 탄소원을 이용하는 소수종의 박테리아플랑크톤의 성장을 촉진하는 것으로 나타났다. 또한 연안에서 대표적인 우점종으로 나타나는 부유성 규조류 *Skeletonema costatum*과 저서성 규조류 *Nitzschia pungen*에 대한 성장 저해영향 실험에서 나타난 결과로 알 수 있듯이 세포막의 차 이에 따라 조류 종마다 sophorolipid에 대한 반응이 다르게 나타나며 따라서 상대적으로 약한 세포막을 가지고 있는 naked type의 유해성 적조생물 *Cochlodinium polykrikoides*에 대해 보다 높은 저해효과를 나타낼 수 있을 것으로 판단된다.

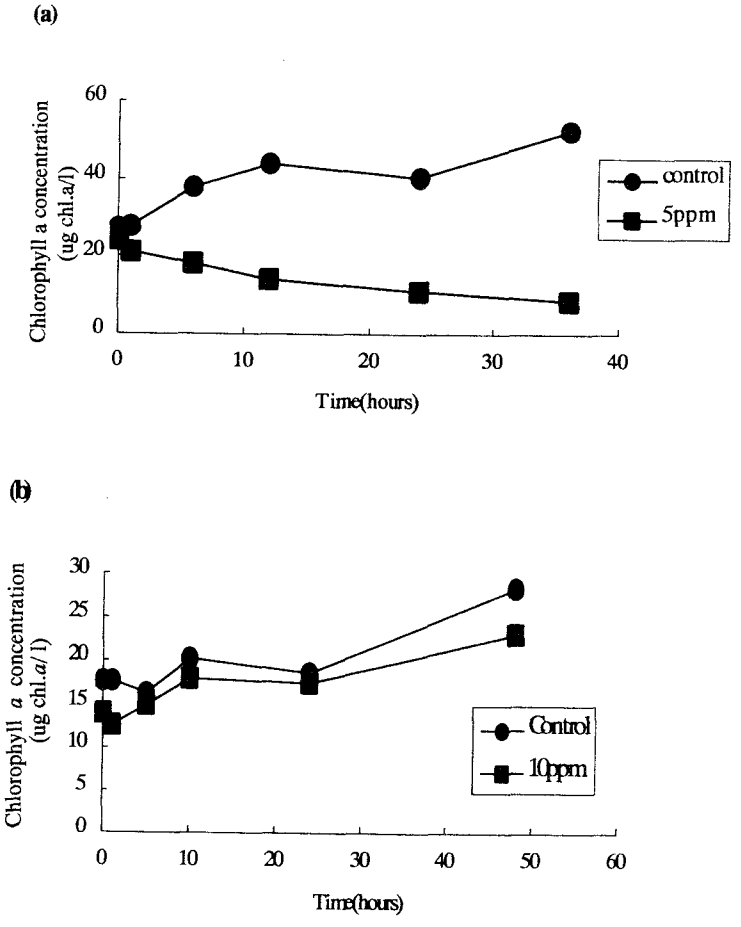


Fig. 3-1-3 sophorolipid 첨가 후 시간경과에 따른 식물플랑크톤 chlorophyll-a 농도변화

(a)*Skeletonema costatum*, (b)*Pseudonitzschia pungens*

2. 어·패류에 대한 영향평가

가. 목적

적조현상은 최근에 계절과 해역에 관계없이 빈번하게 발생하고 있으며, 발생해역

또한 남해안에서 우리나라 전국 연안해역으로 확산되고 있는 실정이다. 특히 유독종에 의하여 대량 발생되는 적조현상은 가두리 양식장에서 대규모로 어류폐사를 일으키기도 하며, 육상 양식장에서도 막대한 피해로 인해 어패류 양식생산에 치명적인 타격을 주고 있다. 이러한 적조의 피해를 막기 위하여 방제대책 방법이 여러 가지로 강구되고 있으며, 현재의 방제대책으로 고려되고 있는 것은 응집제, 황토, 산화물 등의 투여 또는 초음파 처리법, 천적 이용 등이 있고, 미생물에 의한 생물학적 방제도 검토되고 있다(石田, 1994; 박 등, 1998; 이와 박, 1998). 그러나 적조제거제가 수산생물에 미치는 영향에 관한 연구는 나 등(1996)의 부유황토에 의한 적조방제 연구에서 언급되었으며, 이외에는 극히 미약한 실정이다. 최근 미생물생산 생리활성물질인 Sophorolipid(Glyocolipid; GL)가 적조제거제로서 개발되어 적조발생 지역에 이용하고자 하므로 생물검정을 통해 수산 생물에 미치는 영향을 알아보고자 한다.

생물검정 실험은 수산어업 생물에 대한 오염물질이나 기타 유입되는 물질의 피해영향 유무와 정도를 파악하고 그런 물질들에 대한 수산어업생물들의 반응을 얻어내는데 필수적인 수단이라 할 수 있다. 어떤 물질에 의한 생물에 미치는 영향(독성)은 농도와 노출이 일어난 기간이 중요하다. 이러한 영향을 관찰하는 방법으로는 생물체가 죽는 현상이 있을 수도 있고(Lethal toxicity; 치사독성), 죽지 않는 현상이 일어날 수도 있고(Sublethal toxicity; 아치사독성), 단기간인 몇 일 사이에 현상이 일어날 수도 있고(acute toxicity; 급성독성), 장기간인 몇 주 나 몇 달 사이에 현상이 일어날 수고 있다(chronic toxicity; 만성독성)(Michael. 1997). 가장 흔히 사용되는 시험 종료 시점은 사망이고, 전형적인 독성 시험 환경은 알고 있는 독물(독성물질) 농도에 시험 생물을 노출시키고 생물체가 사망하는 시각을 관찰하는 것이다. 노출 환경과 노출기간은 일반화되어 있으며, 물질의 사망농도는 물질의 사망농도한계(median lethal concentration limit: LC)로 표현하기도 한다.

그리고 이것은 일정기간 내에 시험생물체 개체수의 50%를 사망에 이르게 하는 농도로 정의를 한다. 기간은 일반적으로 24 h, 48 h, 72 h, 96 h으로 하고 24 h-LC_{50}, 48 h-LC_{50}, 72 h-LC_{50}, 96 h-LC_{50},으로 표현을 한다. 어떤 물질이 시험생물에 미치는 영향을 관찰하고자 할 때, 종료시점이 사망이 아닌 시험도 많이 있다. 그리고 종료시

점만큼이나 종 선택, 노출기간, 노출농도, 자료분석방법들도 중요하게 고려가 될 사항이다(Carl, 1995).

현재 세계적으로 가장 광범위하게 사용되고 있는 수단으로는 표준 실내 생물검정실험을 들 수 있다. 미국 환경청에서도 오염물질의 연안방출 허용한계농도를 결정하는 데 실험생물의 아영향 및 반수치사농도를 결정하는 생물검정시험의 결과를 이용하고 있다. 적조 발생지역은 연안에서 흔히 나타나고 연안에는 많은 정착성 어류나 패류 그리고 양식장이 밀집해 있다. 따라서 GL에 의한 적조 발생지역에 서식하는 어·패류의 반치사농도 및 노출 후 회복도를 통한 영향예측 평가를 실험실 환경에서 생물검정실험을 통하여 알아보고자 한다.

나. 실험 재료,

(1) 실험 생물

본 실험에 사용한 패류는 진주담치(*Mytilus edulis*)와 새꼬막(*Scapharca subcrenata*)이며, 어류는 숭어(*Mugil cephalus*), 조피볼락(*Sebastes schlegeli*)과 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 사용하여 실험하였다. 진주담치와 새꼬막은 전라남도 여자만에서 채집하였고, 숭어는 강화도 현수산에서 담수로 사육되었진 것을 사용하였다. 조피볼락은 인하대학교 태안배양장 앞바다에서 채집하였으며, 넙치는 남해수산연구소 소속 거제수산종묘시험장에서 구하여 인하대학교 태안배양장 실험실로 운반하여 1 ton FRP 수조에서 각각 관리하였다.

수온은 하루에 1℃씩 상승 시켜 실험수온인 20℃에 맞춘 다음 일주일간의 적응기간을 거후 실험하였다. 특히, 숭어의 경우에는 담수에서 사육되어졌기 때문에 하루에 염분을 3 psu 씩 증가시킨 후, 자연해수(32 psu)에 적응 시켰다. 적응기간 동안의 환수량은 1일 ½회전, 폭기는 200 mℓ/min로 하였다. 실험이 끝난 후, 진주담치와 새꼬막은 각장(shell length: SL), 각고(shell height: SH), 각폭(shell width: SW)을 버니어 캘리퍼스를 이용하여 0.01 mm까지 측정하였으며, 건중량(dry weight: DW)은 육질부만을 선별하여, 증류수로 깨끗이 세척한 후 70℃에서 24시간동안 건조시킨 후 전자저울로 0.001 g까지 측정하였다(Table 3-2-1). 숭어,조피볼락과 넙치(Table

1.1) 또한 개체의 체장(total length: TL)은 0.01㎜, 건중량(dry weight: DW)은 0.001 g까지 측정하였고, 실험에 따라서 승어의 체장(45.32 ± 4.26~78.87 ± 3.85), 건중량(0.251 ± 0.061~3.45 ± 0.18)과 조피볼락의 체장(49.282.65~58.53 ± 3.85)과 건중량(0.273 ± 0.23~0.812 ± 0.183)은 크기 차이가 있었다.

Table 3-2-1. Characteristics of experimental species

	Shell height(mm)	Shell length(mm)	Shell width(mm)	Total weight(g)	Dry weight(g)
Scapharca subcrenata	18.6 ± 0.84	28.7 ± 1.58	23.2 ± 1.18	7.3 ± 0.59	0.401 ± 0.03
Mytilus edulis	22.3 ± 2.59	58.5 ± 8.47	29.5 ± 3.57	13.7 ± 5.23	0.673 ± 0.30
	Total length(mm)			**Dry weight(g)**	
Paralichthys olivaceus	46.81 ± 4.08			1.77 ± 0.06	

(2) 실험수

실험에 사용한 GL은 인하대학교 생물공학과에서 제작한 것으로 냉장고에서 4 ℃로 보관중인 것을 사용하였으며, 황토(Loess)는 적조 발생시에 적조 제거제로 이용하는 GS 코페레이션사의 Natura-F를 사용하였다.

다. 실험 방법

(1) GL에 의한 생물검정

15 ℓ 수조에 승어와 조피볼락은 5개체씩, 넙치는 10개체를 수용하였고, 수온조 500 Water-bath (300×80×40)에 12개의 15 ℓ 수조를 넣은 후 온도조절기를 이용하여 실험수온(2℃)을 유지하도록 하였으며 실험에 사용한 승어와 조피볼락은 활력이 좋은 개체들만을하여 본 실험에 사용하였다(Figure 3-2-1)

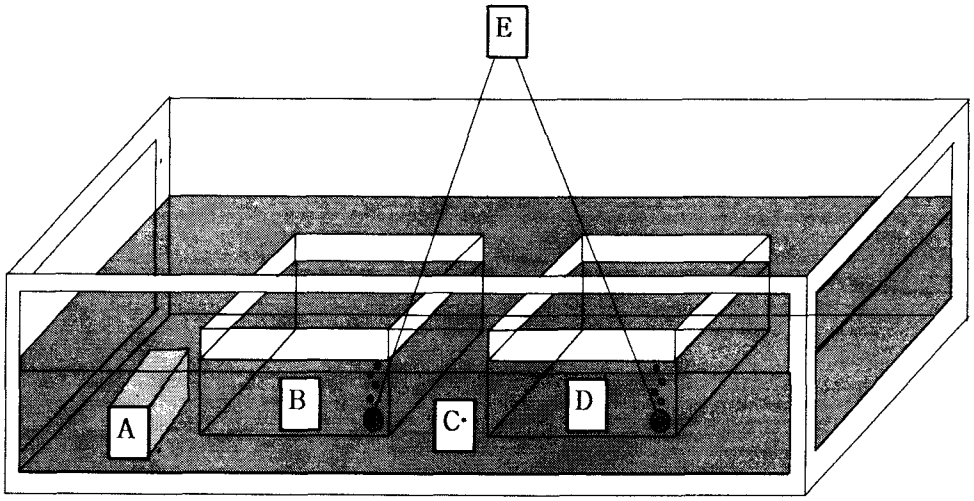


Fig. 3-2-1 Schematic drawing of Water-bath.

A : Water Temperature controller

B : Control Chamber

C : Water bath (0.96 ton)

D : Experiment Chamber

E : Aeration

새꼬막과 진주담치는 패각에 붙어있는 이물질을 제거한 후 어류와 동일한 방법으로 실험하였으며, 각각의 실험구에 10개체씩 수용하였다. 특히, 진주담치의 경우에는 최대한 족사가 손상되지 않도록 하였고 모든 실험은 double setting 하였다. 각 실험은 예비실험으로 얻어진 농도를 이용하여 농도를 설정하였다(Table 3-2-2). 실험에 사용한 GL은 냉장 보관 후 90℃ 증류수에 완전 용해하여 사용하였다. 실험은 10 ㎛ 카트리지 필터로 여과한 해수를 사용하였으며, 광주기는 24L:0D로 하였고, 실험하는 동안 먹이는 공급하지 않았다. 또한 충분한 폭기(500 mℓ/min)를 통해 GL가 침전하는 것을 방지하였다. 실험 생물의 사망 기준은 물리적인 자극을 가하였을 때에 반응이 없는 상태로 설정을 하였으며, GL에 의한 반치사 농도(24 h-LC_{50}) 실험의 농도 구간은 Table 3-2-2에 나타내었다.

Table 3-2-2 Concentration of experimental water

	1	2	3	4	5	6
Mugil cephalus	Control	50 ppm	70 ppm	90 ppm	110 ppm	130 ppm
Sebastes schlegeli	Control	30 ppm	40 ppm	50 ppm	60 ppm	70 ppm
Mytilus edulis	Control	700 ppm	800 ppm	900 ppm	1,000 ppm	1,100 ppm
Scapharca subcrenata	Control	700 ppm	800 ppm	900 ppm	1,000 ppm	1,100 ppm

총 실험 시간은 96시간이였고, 24시간동안 LC_{50}을 측정하였으며, 72시간동안 회복율(Recovery rate)을 실험하였다. 24시간 동안의 LC_{50}의 결과는 2시간마다 사망한 개체를 확인하여 1일에 사망한 개체들을 산정하여 사망률을 구하였다. 각 생물마다 노출에 의한 실험이 종료 된 후에 72시간 동안 회복도를 실험하였으며, 2시간마다 사망하는 개체를 관찰하였다. 실험 값의 자료분석은 CT-TOX multi-method program을 이용하여 Spearman-Karber method로 LC_{50}과 95% 신뢰구간을 구하였다.

(2) GL이 실험생물의 산소소비에 미치는 영향

산소소비율은 밀폐유수식 방법을 사용하여 측정하였다. DO-meter(YSI 600XL)를 이용하여 30분마다 연속적으로 용존산소를 측정하였으며, 측정된 용존산소는 컴퓨터를 이용하여 연속적으로 관찰하였다(Fig. 3-2-2). 관찰 된 결과들은 1시간동안의 용존산소 전·후 값의 차를 계산하여 단위시간당으로 환산하여 표현하고, 표현방법은 단위중량(g)으로 환산한 후 계산하였다. 숭어, 조피볼락과 넙치는 7시간 암흑 상태에서 측정을 하였고, 진주담치는 12시간동안 측정하였다.

(3)황토(Loess)에 의한 생물검정

황토실험은 GL의 실험과 동일한 조건에서 실험하였다. 실험군에서 황토를 첨가한

농노750 ppm으로 하였다.

(4) 황토(Loess)가 실험생물의 산소소비에 미치는 영향

황토실험은 GL의 실험과 동일한 조건에서 실험하였다. 실험군에서 황토를 첨가한 농도는750 ppm으로 하였다. 황토실험에서는 산소소비의 오차를 줄이기 위하여 GL과는 다르게 실험생물 없이 황토 750 ppm 만을 첨가한 산소소비율을 측정하였다.

(5) 적조제거제 혼합

(가) 적조제거제 혼합에 의한 생물검정

GL에 의한 생물검정과 동일한 조건에서 실험하였다. 실험에 설정된 실험수의 농도구간Table 3-2-3과 동일하다.

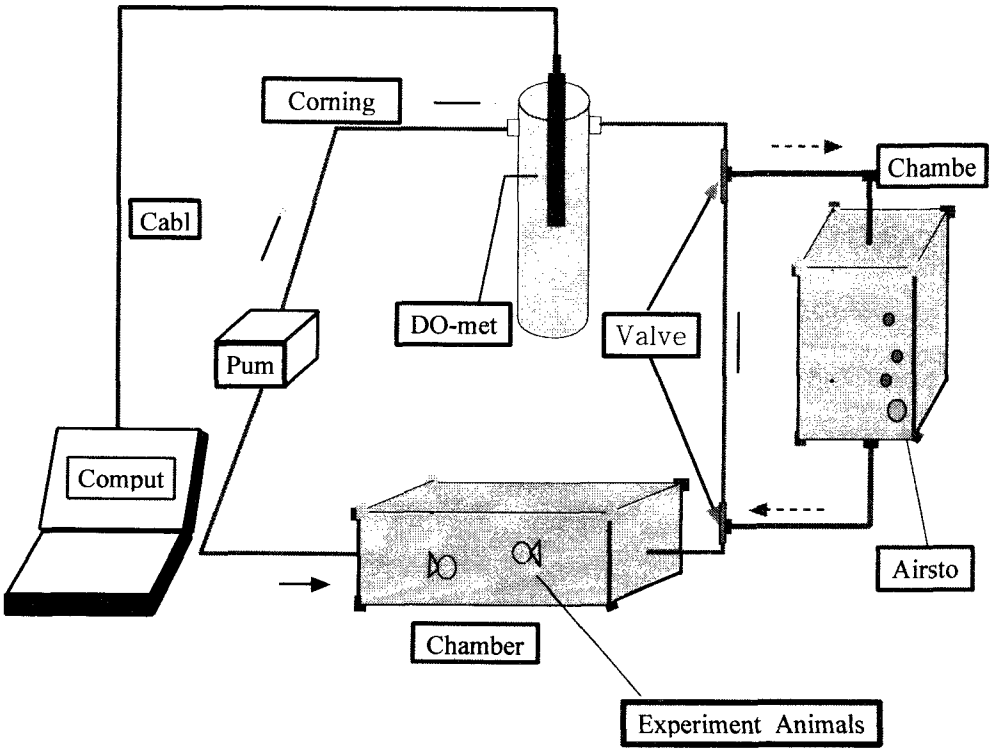


Fig. 3-2-2 Schematic drawing of respirometer system.

Table 3-2-3 Concentration of experimental water

	1	2	3	4
Paralichthys olivaceus	Control	Loess 10,000 ppm	G·L 20 ppm	G·L 5 ppm + Loess 1,000 ppm

(나) 적조제거제 혼합이 실험생물의 산소소비에 미치는 영향

적조제거제 혼합 실험은 GL의 산소소비 실험과 동일한 조건에서 실험하였다. 실험에 설명된 실험수의 농도 구간은 Table 3-2-3과 동일하다.

라. 결 과

(1) GL에 의한 생물검정

(가) 96시간 반치사 농도(96 h-LC_{50})

본 실험은 폐사율을 지표로 하였고 폐사개체를 확인, 분리하여 측정시간별로 계수하여 9시간 폐사량을 산정하여 폐사율을 구하였다.

1) 진주담치

GL에 의한 진주담치의 폐사영향을 조사하기 위해서 1·2차(Table 3-2-4)에 걸쳐서 96시간 반치사농도(96 h-LC_{50})를 구한 결과, 1차 실험에서 진주담치의 독성물질에따른 사망률에서는 대조군을 제외한 모든 실험구에서 GL을 투입직 후, 패각을 완전히 닫아 외부 환경수의 유입을 차단하는 현상을 보였다. 시간이 경과함에 따라 패각을 열고 있는 개체가 확인되었고 24시간이 지난 후에는 전체 농도 구간에서 패각을 열고 있는 개체가 관찰되었다. 사망한개체가 관찰된 것은 실험시작 후 30시간이 경과한 후에 나타났다. 72시간 경과 후에는 200~500 ppm의 농도구간 실험구에서는 한두 개체만 남는 경우가 있었는데 이러한 개체도 족사가 떨어진 상태로 수조 표층에 떠다니는 현상이 관찰되었다. 1차 실험에서의 진주담치의 반치사 농도구간(96h-LC_{50})은 64.5 ppm이었다. 1차 실험 결과 값이 64.5 ppm이었으므로, 2차 실험에서는 이 값을 기준으로 ±20 ppm의 농도 구간으로 실험을 하였다.

Table 3-2-4 Concentrations of 96 hours-LC_{50} of *Mytilus edulis*

	1	2	3	4	5	6
1st experiment	Control	50 ppm	100 ppm	200 ppm	300 ppm	500 ppm
2nd experiment	Control	45 ppm	55 ppm	65 ppm	75 ppm	85 ppm

GL을 투입직 후에는 대조군을 제외한 전 농도구간에서 1차 실험과 같은 현상인 패각을 완전히 닫고 있었으나, 6시간이 경과한 후에 패각이 열려있는 개체가 나타나기 시작하여 12시간 경과 후에는 모든 농도구간의 실험개체에서 패각이 열려있는 현상이 나타났다. 사망한 개체가 관찰된 것은 실험 시작 후 48시간 경과되었을 시기에 55 ppm 이상에서 나타났으며, 그 이하의 농도 구간에서는 72시간 경과 후에 사망한 개체가 나타났다. 2차 실험에서 진주담치의 반치사 농도구간(96 h-LC_{50})은 70.1 ppm 이었다. GL 96시간 반치사 농도에 따른 실험 수온은 20~23.4℃를 유지하였고, 용존산소(DO)의 시간적 변화는 큰 차이를 보이지 않았으며, pH의 시간적 변화 또한 큰 차이를 보이지 않았다.

2) 새꼬막

GL에 의한 새꼬막의 폐사영향을 조사하기 위해서 1·2차(Table 3-2-5)에 걸쳐서 96시간 반치사농도(96 h-LC_{50})를 구한 결과, 1차 실험에서 새꼬막의 GL에 따른 사망률 실험에서 1시간이 지나가기 이전에 대조군을 제외한 모든 실험구의 새꼬막 개체는 패각을 닫고 움직임이 없는 것이 관찰되었다. 12시간이 지나서 500 ppm 실험구에서 처음으로 한 개체가 사망하였고 각 농도 실험구에서 패각을 열고 있는 개체와 닫고 있는 개체의 차이가 보였다.

Table 3-2-5 Concentrations of 96 hours-LC_{50} of *Scapharca subcrenata*

	1	2	3	4	5	6
1st experiment	Control	50 ppm	100 ppm	200 ppm	300 ppm	500 ppm
2nd experiment	Control	140 ppm	150 ppm	160 ppm	170 ppm	180 ppm

42시간이후에는 모든 실험구에서 패각을 열고 있는 개체들이 관찰되었으며, 300~500ppm에서는 패각을 열고 있는 개체보다는 사망하는 개체가 많았다. 300 ppm 보다 낮은 농도의 실험구에서는 반대로 사망하는 개체보다는 패각을 열고 있는 개체가 많았다. 84시간 이후에는 높은 농도 실험구에 있는 개체일수록 물리적인 반응이 느리게 나타났다. 1차 실험에서의 진주담치의 반치사 농도구간(96 h-LC_{50})은 162.3 ppm이었다. 1차 실험 결과 값이 162.3 ppm이었으므로, 2차 실험에서는 이 값을 기준으로 ±20 ppm의 농도 구간으로 실험을 하였다. GL을 투입 후, 1시간 이내에 대조군을 제외한 전 농도구간에서 1차 실험과 같은 현상인 패각을 완전히 닫고 있었으나, 10시간이 경과한 후에 패각이 열려있는 개체가 나타나기 시작하여 20시간 경과 후에는 모든 농도구간의 실험개체에서 패각이 열려있는 현상이 나타났다. 사망한 개체가 관찰된 것은 실험 시작 후 40시간 경과되었을 시기에 160 ppm 이상에서 나타났으며, 그 이하의 농도 구간에서는 62시간 경과 후에 사망한 개체가 나타났다. 2차 실험에서의 진주담치의 반치사 농도구간(96 h-LC_{50})은 168.3 ppm이었다.

(나) 24시간 반치사 농도(24 h-LC_{50})와 72시간 회복율 실험

1) 진주담치

GL에 의한 진주담치에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 3-2-6에 나타내었으며, 사망률을 지표로 하였고 노출기간과 회복기간의 사망개체를 확인, 분리하여 측정구간별로 계수하여 24 h LC_{50}과 72 h 회복율 실험의 사망량을 산정하고 각 실험구의 농도별, 시간별 사망률은 대조구와 비교하여 백분율로 계산하였다. 진주담치의 GL에 따

른 사망률 실험에서는 대조군을 제외한 모든 실험구에서 GL를 투입직 후 패각을 완전히 닫아 외부 환경수의 유입을 차단하는 현상을 보였다. 시간이 경과함에 따라 패각을 열고 있는 개체가 확인되었으며, 3시간이 지난 후에는 전체 농도 구간에서 패각을 열고 있는 것이 관찰되었다.

Table 3-2-6 Mortality and recovery rate of by GL concentration, *Mytilus edulis* time elapse

Conc. (ppm)	LC_{50}		Recovery rate		
	24 h		24 h	48 h	72 h
	No.	Mortality (%)	Mortality (%)	Mortality (%)	Mortality (%)
control	0	0	0	0	0
700	0	0	35	45	45
800	2	10	72	72	72
900	2	10	17	22	22
1,000	6	30	71	79	79
1,100	5	25	53	53	60

24 h LC_{50} 실험에서는 12시간 경과 후, 1,000 ppm 이상에서 처음으로 사망하는 개체가 발생하였다. 24 h-LC_{50} 실험 중에는 사망 개체수가 전체의 절반을 넘는 구간이 없었지만, 72시간 회복율 실험기간 중에 사망하는 개체가 발생하였고, 이 기간에 사망하는 개체수는 LC_{50} 실험 중에 사망하는 개체보다 많은 것으로 나타났다. 72시간 회복율 실험은 LC_{50} 실험 중 사망한 개체수를 뺀 후 측정하였다.

2) 새꼬막

GL에 의한 새꼬막에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 3-2-7에 나타냈으며, 사망율을 지표로 하였고 사망개체를 확인, 분리하여 측정시간별로 계수하여 24시간 LC_{50}

과 72시간 회복율 실험의 사망량을 산정하고 각 실험구의 농도별, 시간별 사망률은 대조구와 비교하여 백분율로 계산하였다.

able 3-2-7 Mortality and recovery rate of by GL concentration, *Scapharca subcrenata* time elapse

Conc. (ppm)	LC_{50}		Recovery rate		
	24 h		24 h	48 h	72 h
	No.	Mortality (%)	Mortality (%)	Mortality (%)	Mortality (%)
control	0	0	0	0	0
700	1	5	11	16	32
800	2	10	0	17	33
900	0	0	0	20	25
1,000	2	10	0	22	22
1,100	0	0	0	30	50

12시간이 지나서 800 ppm 실험구에서 처음으로 한 개체가 사망하였고 각 농도 실험구에서 패각을 열고 있는 개체와 닫고 있는 개체의 차이가 보였다. 42시간이후에는 모든 실험구에서 패각을 열고 있는 개체들이 관찰되었다.

3) 숭어와 조피볼락

GL에 의한 숭어와 조피볼락에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 3-2-8과 Table 3-2-9에 나타냈으며, 사망한 개체를 확인 분리하여 24시간 사망률을 산정하고 농도별 사망률을 대조구와 비교하였다. 조피볼락은 GL에 노출이 된 이전이나, 이후에 동일한 행동을 보였으며, 숭어는 조피볼락보다 움직임이 활발하였다. 실험에 의한 숭어와 조피볼락의 반치사 농도(24 h-LC_{50})는 84.0 ppm, 46.4 ppm 이었고, 숭어·조피볼락의 72시간 동안의 회복율 실험에서 사망한 개체가 없었다.

Table 3-2-8 Mortality and recovery rate of by GL concentration, *Mugil cephalus* time elapse

Conc. (ppm)	LC_{50} 24 h		Recovery rate 48 h	72 h	96 h
	No.	Mortality(%)	Mortality(%)	Mortality(%)	Mortality(%)
control	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0
70	0	0	0	0	0
90	4	80	0	0	0
110	5	100	-	-	-

Table 3-2-9 Mortality and recovery rate of by GL concentration, *Sebastes schlegeli* time elapse

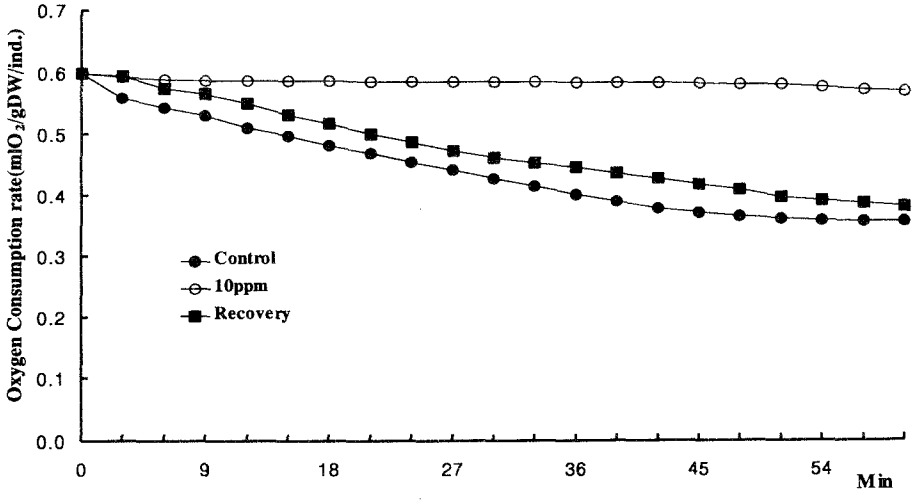
Conc. (ppm)	LC_{50} 24 h		Recovery rate 48 h	72 h	96 h
	No.	Mortality(%)	Mortality(%)	Mortality(%)	Mortality(%)
control	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0
50	5	100	-	-	-
60	4	80	0	0	0
70	5	100	-	-	-

(2) GL이 실험생물의 산소소비에 미치는 영향

대표적인 생리실험인 산소소비율을 측정함으로서 GL가 실험생물에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

(가) 숭어와 조피볼락

숭어 산소소비율은 해수 중에 용존된 량으로 표현(ml l^{-1})하였으며, 대조군 실험군, 회복군으로 나타내었다. GL 10 ppm이 첨가되어진 것이 실험군이다. 위의 결과는 Fig. 3-2-3에 나타내었다.



ig. 3-2-3 Oxygen consumption rate of *Mugil cephalus* by GL(TL:89.69, DW: 3.45g).

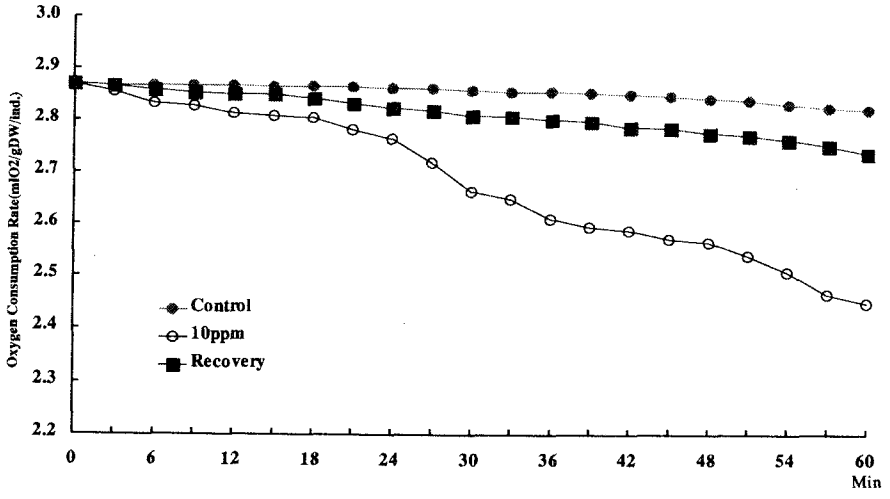


Fig. 3-2-4 Oxygen consumption rate of *Sebastes schlegeli* by Sophorolipid.(TL: 49.28 mm, DW: 0.2728 g)

숭어와 조피볼락의 산소소비율은 단위시간에 대한 단위중량으로 표현(ml $O_2 \cdot g^{-1}$ DW $\cdot hr^{-1}$하였으며, 위의 결과는 Fig. 3-2-5에 나타내었다. 조피볼락은 대조구보다 10 ppm에서의 산소소비율이 높았고, 10 ppm보다는 20ppm에서 높은 수치를 보였다. 숭어도 마찬가지의 경향을 보였고 산소소비율의 수치는 조피볼락보다 높은 수치로 대조구보다는 10 ppm에서 약 2배의 수치가 나왔고, 대조구보다 20 ppm에서는 약 3배 높은 수치를 보였다.

(나) 진주담치

진주담치의 산소소비율은 단위시간에 대한 단위중량으로 표현(ml $O_2 \cdot g^{-1}$ DW $\cdot hr^{-1}$) 하였으며, 위의 결과는 Fig. 3-2-6에 나타내었다. 진주담치의 대조군의 평균 산소소비율은 0.008 ml $O_2 \cdot g^{-1}$ DW $\cdot hr^{-1}$였으며, 10 · 20 ppm의 산소소비율 값은 각각 0.028, 0.037 ml $O_2 \cdot g^{-1}$ DW $\cdot hr^{-1}$로서 대조군보다 높은 값을 나타내었다.

(3)황토(Loess)에 의한 생물검정 (반치사 농도)

황토에 의한 진주담치와 새꼬막의 폐사영향을 조사한 결과는 Table 3-2-10, 3-2-11에 나타내었고 폐사율을 지표로 하였으며 폐사개체를 확인, 분리하여 측정시간별로 계수하여 96시간 폐사량을 산정하여 폐사율을 구하였다.

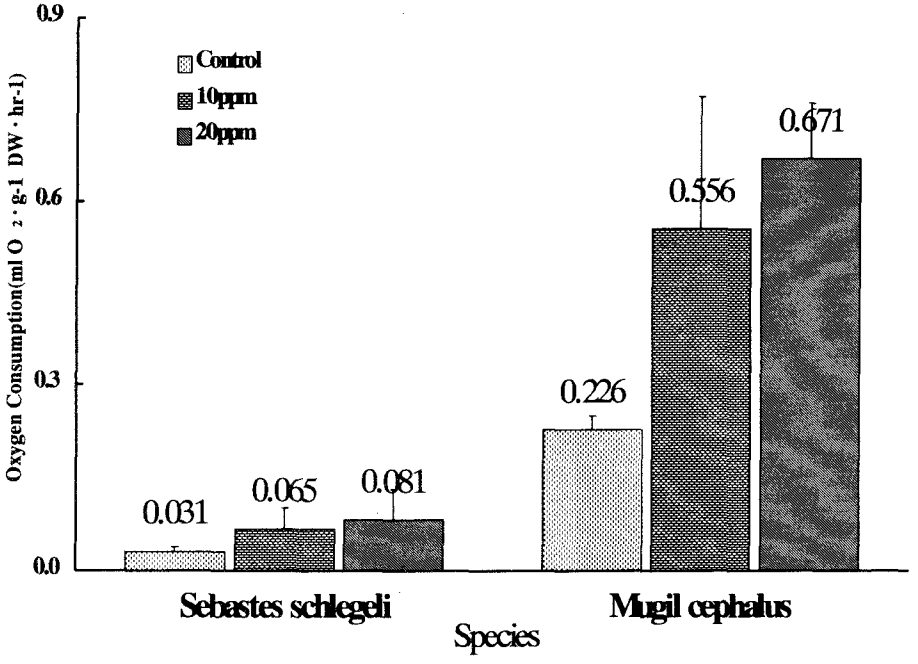


Fig. 3-2-5 Oxygen consumption rate of *Sebastes schlegeli* and *Mugil cephalus* by GL

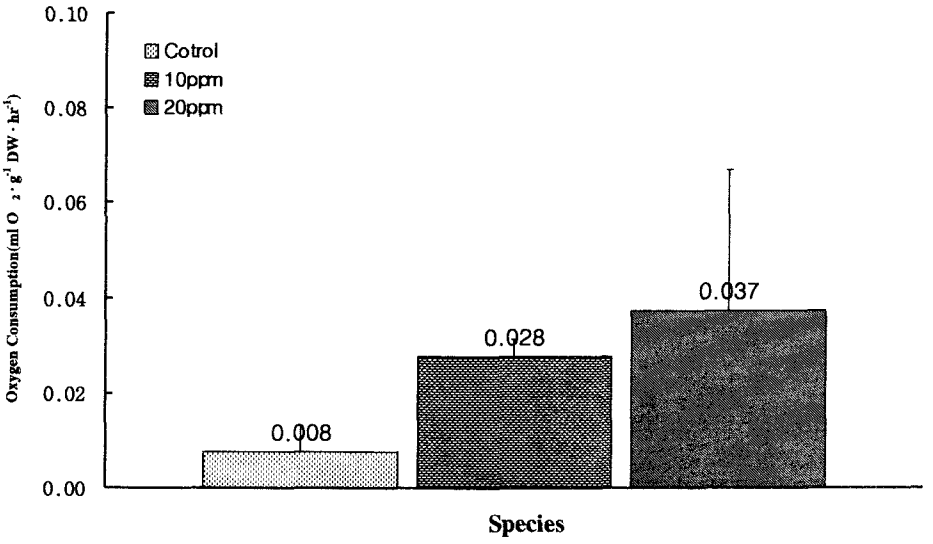


Fig. 3-2-6. Oxygen consumption rate of *Mytilus edulis* by GL

Table 3-2-10. Mortality rate by Loess concentration, of *Mytilus edulis* time elapse

Conc. (ppm)	24 h		48 h		72 h		96 h	
	No.	Mortality (%)	No.	Mortality (%)	No.	Mortality (%)	No.	Mortality (%)
Control	0	0	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0	0	0	0
500	0	0	0	0	0	0	0	0
1,000	0	0	0	0	0	0	0	0
2,000	0	0	0	0	0	0	1	10
3,000	0	0	0	0	0	0	1	10

진주담치의 경우 황토 투입 후 72시간까지 대조군을 포함한 모든 구간에서 사망한 개체가 발견되지 않았으며 96시간 후에는 2,000 ppm과 3,000 ppm에서 각각 한 개체

씩 사망하였다. 2,000 ppm과 3,000 ppm에서 사망한 개체는 황토 투입 후, 약 90시간이 경과하면서부터 서서히 패각이 열리면서 사망하였으며 이외의 농도 구간에서는 특이한 반응이 나타나지 않았다. 황토에의한 진주담치의 반치사 농도구간(96 h-LC_{50})은 구할 수 없었다.

Table 3-2-11. Mortality rate by Loess concentration, of *Scapharca subcrenata*

time elapse

Conc.(ppm)	24 h		48 h		72 h		96 h	
	No.	Mortality (%)	No.	Mortality (%)	No.	Mortality (%)	No.	Mortality (%)
100	0	0	0	0	0	0	0	0
500	0	0	0	0	0	0	0	0
1,000	0	0	0	0	0	0	0	0
2,000	0	0	0	0	0	0	0	0
3,000	0	0	0	0	0	0	0	0
Control	0	0	0	0	0	0	0	0

새꼬막의 경우 황토 투입 후 96시간까지 대조군을 포함한 모든 구간에서 사망한 개체가 발견되지 않았으며, 실험이 종료될 때까지 모든 농도구간에서 특이한 반응이 나타나지 않았다. 진주담치의 경우와 같이 황토에 의한 새꼬막의 반치사 농도구간(96 h-LC_{50})은 구할 수 없었다.

(4) 황토(Loess)가 실험생물의 산소소비에 미치는 영향

(가) 숭어

숭어 산소소비율은 해수 중에 용존 되어있는 량으로 표현(ml l^{-1})하였으며, 대조군 실험군, 회복군으로 나타내었다. 황토 750 ppm이 첨가되어진 것이 실험군이다. 위의

결과는 Fig. 3-2-7에 나타내었다. 숭어 산소소비율을 비교하여 보면 대조군(0.31~0.44 ml/l)과 회복군(0.33~0.44 ml/l)이 비슷한 경향을 보였고, 황토가 750 ppm 첨가되어진 실험군(0.40~0.44 ml/l)의 경우에는 초기에는 산소소비율이 감소를 하는 경향을 보였지만, 그 이후에 대조군이나 회복군과 비슷한 경향을 나타내는 것으로 나타났다.

(나) 조피볼락

조피볼락 산소소비율은 해수 중에 용존 되어있는 량으로 표현(ml l^{-1})하였으며, 대조군, 실험군, 회복군으로 나타내었다. 황토 750 ppm이 첨가되어진 것이 실험군이다. 위의 결과는 Fig. 3-2-8에 나타내었다. 조피볼락은 대조군과 실험군이 비슷한 기울기와 경향을 나타내었고 회복군에서는 산소소비율의 변화가 대조군이나 실험군보다는 크게 나타났다.

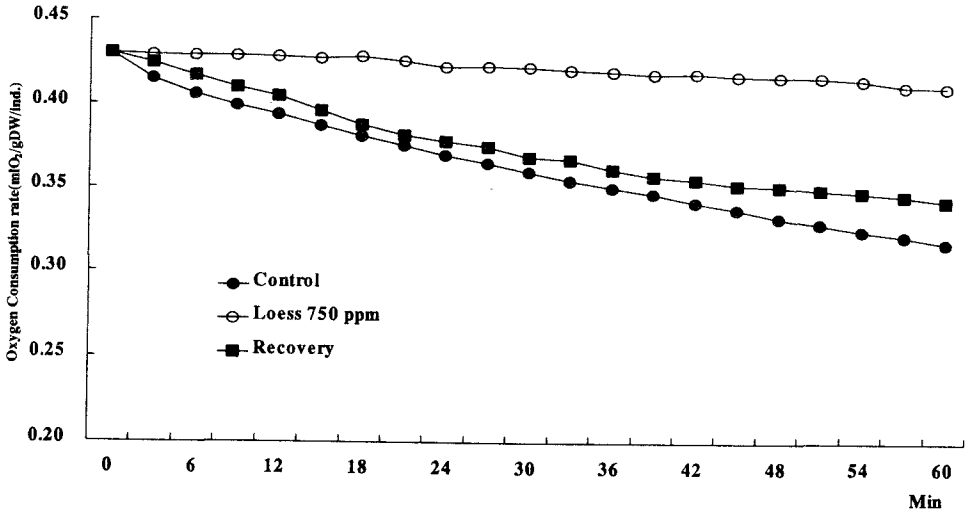
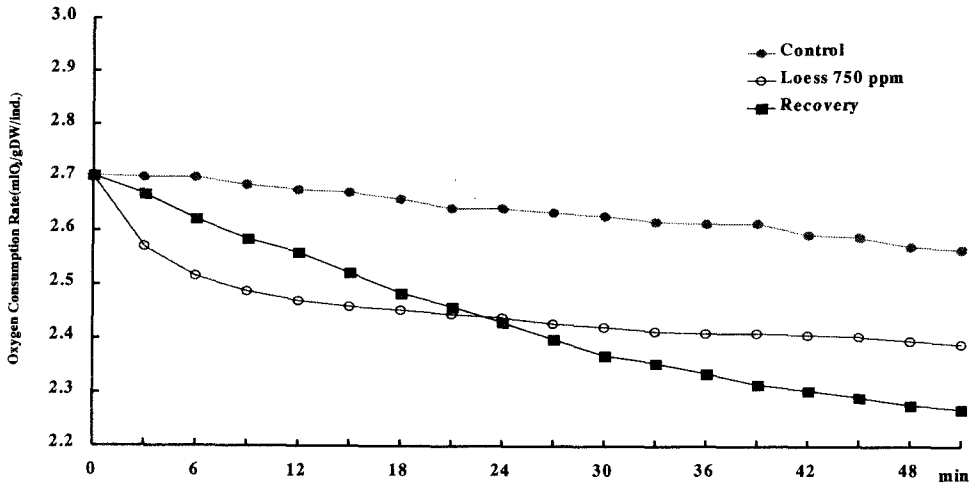


Figure 3-2-7. Oxygen consumption rate of *Mugil cephalus* by Loess(TL: 45.32, DW 2.509).



igure 3-2-8. Oxygen consumption rate of *Sebastes schlegeli* by Loess(TL: 58.53 mm, DW: 0.8124 g).

(5) 적조제거제 혼합

(가) 적조제거제 혼합에 의한 생물검정(반치사 농도)

GL과 Loess가 넙치에 미치는 영향을 조사한 결과로써 혼합하였을 때, 적조생물구제 효율이 가장 높은 구간(혼합구; Loess 1,000 ppm + GL 5 ppm)과 유사한 현상을 보이는 GL(20 ppm)과 Loess(10,000 ppm)의 농도 구간으로 실험을 하여 Table 3-2-12 나타냈으며, 사망한 개체를 확인 분리하여 24시간 사망률을 산정하고 농도별 사망률을 대조구와 비교하였다.

Table 3-2-12 Mortality rate of *Paralichthys olivaceus* by combination as time elapse.

Conc. (ppm)	24 h		48 h		72 h		96 h	
	No.	Mortality (%)	No.	Mortality (%)	No.	Mortality (%)	No.	Mortality (%)
Control	0	0	0	0	0	0	0	0
Loess 10,000 ppm	1	5	3	15	4	20	5	25
G.L 20 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0
Loess 1,000 ppm + G.L 5 ppm	0	0	0	0	0	0	0	0

넙치는 다른 적조제거제와 비교하였을 때 황토에서는 사망을 하는 구간이 있었으나, 대조구를 포함한 GL이나 혼합구에서는 사망까지 이르게 하는 현상을 관찰할 수 없었다. 실험이 종료될 때까지 모든 농도구간에서 특이한 반응이 나타나지 않았다.

(나) 적조제거제 혼합이 실험생물의 산소소비에 미치는 영향

GL과 황토에 의하여 적조생물로부터 구제하였을 때, 넙치에 미치는 영향을 조사한 결과로써 혼합하였을 때, 적조생물구제 효율이 가장 높은 구간(혼합구; Loess 1,000 ppm + GL 5 ppm)과 유사한 현상을 보이는 GL(20 ppm)과 Loess(10,000 ppm)의 농도 구간으로 실험을 하여 Fig. 3-2-9. 나타냈으며, 대조구와 비교하였다. 모든 구간에 *Cochlodinium*적조를 4,000cell/l를 첨가하였다

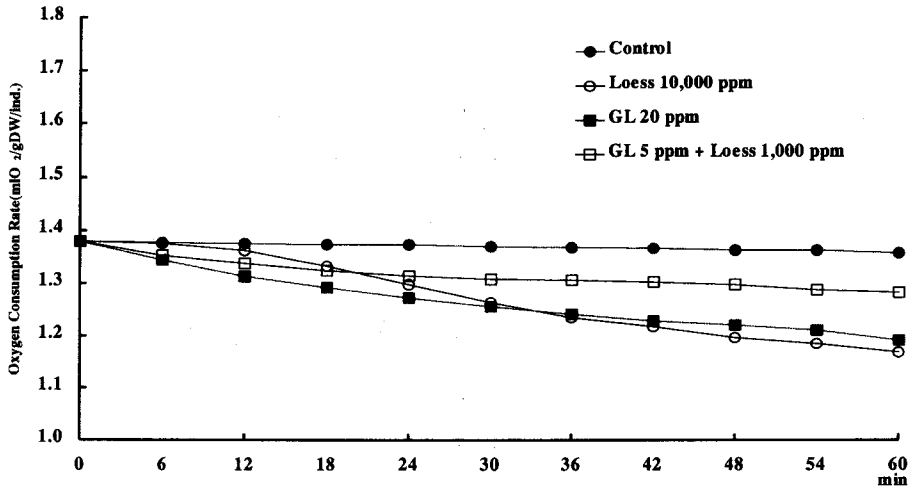


Fig. 3-2-9 Oxygen consumption rate of *Paralichthys olivaceus* by combination(TL: 46.81 mm, DW: 0.1574 g).

Duncan test를 통해 12분, 30분, 60분을 Grouping한 결과, 12분에서는 대조구와 황토구는 A, GL과 혼합구는 B로, 30분에서는 대조구와 나머지 실험구로, 60분 후에는 대조구는 A, 황토구, GL구는 B, 혼합구는 C로 나타났다(Table 3-2-13).

Table 3-2-13. Statistical test of *Paralichthys olivaceus* by combination as time elapse

	12 Min.	30 Min.	60 Min.
Control	A	A	A
Loess 10,000 ppm	A	B	B
GL 20 ppm	B	B	B
GL 5 ppm + Loess 1,000 ppm	B	B	C

마. 고 찰

본 실험에 사용한 적조제거물질에 대한 진주담치와 새꼬막의 영향은 새꼬막보다 진주담치가 낮은 농도에서 폐사가 이루어지는 것으로 보아 진주담치의 경우 새꼬막보다 적조제거제에 민감한 반응을 보이는 결과를 나타냈고, 이러한 결과는 두 실험생물의 생활습성이 다른 것에 기인한 것으로 사료된다. 진주담치와 새꼬막의 형태적 특징과 생활습성을 보면 진주담치는 폐각이 두껍고 꼭대기는 앞쪽에 치우쳐 있고 매부리처럼 꼬부라져 있으며 표면에는 많은 성장맥(成長脈)이 있다. 또한 흑청색의 각피로 덮여 있고 족사(足絲)를 이용하여 바위에 붙어사는 부착성 생물이다. 새꼬막은 폐각은 백색으로 길쭉하고 도톰한 직사각형이며, 표면에 흑갈색의 벨벳 모양의 큐티클로 싸여 있고, 수심이 약 10 m까지의 모래나 흙 속에 사는 잠입성 생물이므로, 부착성 패류와 잠입성 패류의 생활습성에 따른 결과로 보여진다(류종생, 2001) 반치사농도(24 h-LC_{50})실험에서 새꼬막은 실험에서 최고 농도 구간이었던 1,100 ppm에서 10%의 사망률을 보이고 진주담치는 1,000 ppm에서 30%의 사망률을 보이는 것으로 보아서 새꼬막과 진주담치는 1,000 ppm이상에서 반치사 농도(24 h-LC_{50})를 가지는 것으로 추정이 된다. 새꼬막과 진주담치는 이동능력이 거의 없으므로 GL에 노출되었을 경우 패각을 닫는 현상을 보일 것으로 예상되나, 위의 결과에서 보았듯이 24 h-LC_{50} 농도가 1,000 ppm보다 높은 농도이므로 적조가 발생한 현장에서 사용되는 GL의 농도와는 현저한 차이를 보이고 있어 GL에 의한 영향은 거의 없을 것으로 사료된다.

생물검정실험에서는 노출시간과 노출농도 등이 중요하게 고려되는 사항이며, 어류에 대한 실험에서는 24시간 이내에 GL이 분해가 되는 성질을 고려하여 노출시간을 결정하였고, 적조제거제가 어류에 영향을 미치는 농도가 실제 현장에서 적용하는 농도보다 높다는 예비실험의 결과를 고려하여 노출농도를 현장에서 적용하는 농도중심으로 실험하였다. 실험의 종료시점도 적조제거제가 분해하는데 소요되는 시간을 고려하였으며, 실험생물의 사망이 아닌 생리적인 변화나 행동을 관찰하는 실험을 중점적으로 수행하였다. 실험에 사용된 실험어류의 형태적 특징과 생활습성을 보면 숭어는 민감하면서도 내성이 강하고, 유영이 빠른 유영동물로 널리 알려져 있고, 필에서 서식하는 종이다. 조피볼락은 숭어와 비교하였을 때, 활동이 적은 종편형 유영 동

물이고, 암반지역에 서식하는 어종이다. 또한, 조피볼락의 경우에는 적조생물과 조우하였을 때, 오랜 시간동안 생존을 할 수 있는 종으로 알려져 있다(국립수산과학원, 2002). 넙치는 후기자어기(전장 11~15 ㎜)에 몸의 측편화와 눈의 이행이 일어나는 변태를 하여 성어의 형태인 측편형으로 모래에서 저서생활을 하는 종이다(정문기, 1996). GL이 실험생물에 미치는 영향에 대한 실험에서 숭어와 조피볼락의 산소소비율을 비교하였을 때, 숭어 산소소비율이 높게 측정되는 것은 숭어가 GL에 대한 영향이 상대적으로 조피볼락보다 높은 것을 생활습성으로 예상 할 수 있고 실험에서도 그러한 결과를 보였다. 대조군보다 GL을 첨가하였을 때, 산소소비율이 높은 것은 실험 생물 내에 환경수의 변화(10 ppm)를 감지하고 생리적인 변화를 보였다고 사료된다. 이것으로 실제 자연에서 GL과 조우하였을 때 유영생물의 경우에는 도피를 할 것으로 사료된다.

황토가 실험생물에 미치는 영향에 대한 실험에서 조피볼락의 반치사율과 회복률 실험을 종료한 이후에 해부하여 관찰하였을 때, 아가미 부분에 황토가 묻어 있는 것으로 보아 조피볼락이 호흡시에 황토가 아가미에 흡착되어 호흡에 영향을 받는 것으로 사료된다. 어·패류는 잠재적인 화학물질에 노출되었을 때, 화학물질은 대사 작용에 직·간접적으로 작용할 수도 있다. 그 하나의 이유로는 Lamella를 덮고 있는 층의 두께가 증가해서 아가미 막으로의 산소 확산을 감소시킴으로서 호흡을 하기가 어려워지기 때문이다(Brett *et al.*, 1979). 이러한 연구결과에서도 나타나듯이 황토를 투입하고 약1시간 실험동안에는 산소소비율의 차이가 없는 것으로 미루어 보아 조피볼락의 아가미 부분에 황토가 흡착되어 시간 경과 후, 호흡에 영향을 미치는 것으로 보인다.

적조제거제 혼합이 실험생물에 미치는 영향에 대한 실험에서 넙치의 반치사율 실험과 산소소비실험 결과, 넙치는 GL이 해수에 용존되어 있는 것을 감지하였지만, 그로 인하여 사망이 일어나거나, 생리적으로 큰 변화를 일으키지는 않는 것으로 사료된다. 나 등(1996)의 연구에서 황토 1,000 ppm을 살포한 결과 방어의 경우채색이 변한 것을 제외하고는 농어, 넙치, 참돔의 경우는 어떠한 현상도 관찰되지 않은 것으로 나타나 이 보다 낮은 농도의 황토에서의 어류의 산소소비에는 영향을 미치나 사망에

이르는 경우는 없는 것으로 나타났다. 한편, 10,000 ppm 황토구에서 넙치의 사망은 모래 바닥에서 서식하는 넙치가 해수 중에 부유하는 황토의 작은 입자들에 의해서 사망에 이르게 되었던 것으로 사료된다.

4절. 최적 생리활성물질(GL)의 대량생산

(대용량 반응기를 이용한 생리활성 물질의 대량생산)

1. 연구 목적

적조제거용 생리활성물질인 sophorolipids 는 미생물로부터 생산되는 계면활성제이고 이의 가격결정 요인은 원료, 분리비용, 수율이다. 이 중 원료가격은 전체비용의 40-50%를 차지한다. 이는 원료의 50%정도가 직접 계면활성제로 전환되기 때문이다. 따라서 값싼 원료를 사용하는 것이 생산가격을 낮추는 최우선 과제이다. 적조제거목적으로 생산되는 Sophorolipid는 싼 원료를 사용하여야 하며 이를 위해서 부산물을 사용했다. "dark oil"은 대두유(콩기름) 및 옥수수유등 식용유를 정제하는 과정에서 생긴 부산물로 식용으로는 적합하지 못하여 폐기물로 처리되고 있다. 본 연구에서는 효모를 이용하여 식용유 부산물인 soybean dark oil로부터 미생물계면활성제(sophorolipid)를 생산하였고 대용량 예를 들면 50 (300) liter 발효기에서의 생산특성을 보고, 10 ton을 기준으로 한 생산원가를 계산하였다.

2. 개요

가.미생물계면활성제(Biosurfactant)

미생물계면활성제란 yeast, fungi, bacteria등 미생물에 의해 생산되는 생분해성 계면활성제를 의미하며 균주에 따라 세포외 또는 세포내에 생성이 되기도 한다. 미생물계면활성제가 합성계면활성제에 대해 가지는 장점은 첫째, 무독성이며 생분해가 가능하여 이차오염원이 안된다는 것이다. 둘째, 기존의 방법으로는 합성하기 어려운 복잡한 화학구조로 인해서 특수한 목적으로 사용될수 있다는 점이다. 셋째, 표면장력 저하능력, 온도, pH에 대한 안정성등 계면활성제의 물리·화학적 성능면에서 거

의 대등한 결과를 나타낸다는 점이다(Table 4-1). 전세계 계면활성제 시장은 1988년에 20억불, 1994년 현재 약 94억불로 불과 6년 사이 400%이상의 성장률을 기록했으며 그 수요는 해마다 증가하는 추세에 있다.

Table 4-1. Comparision of Biosurfactants with Synthetic Surfactants

	Surface tension (mN/m)	Critical micelle Concetration (mg/L)	1990 Cost ($/kg)a
Producing organism			
R. erythropolis	37	15	12.20
P. aeruginosa	29	15	5.90
T. bombicola	37	82	2.80
B. subtilis	27	11(0.01mM)	20.32
Anionic synthetics			
Detergent alkylate Dodecylbenzene(LABS)	47	590(1.2mM)	1.03
Sodium lauryl sulfate (SLS or SDS)	37	2023-2890 (7-10mM)	0.95(30%) 26.00(98%)

그러나 이들 대분분이 자체적으로 생분해가 되지 않아 이차오염원의 주범이 되고 있는 합성계면활성제로 보고 되었다. 따라서 이러한 문제점을 무독성이며 생분해가 용이한 환경친화적 미생물계면활성제로 대체함으로써 해결하고 더 나아가 미생물계면활성제는 화장품, 의약품, 식품, 세제, 펄프 및 제지, Enhanced Oil Recovery(EOR), 환경정화등 각 분야에서 광범위하게 응용될 수 있다. 미생물계면활성제의 소수성부분은 대개 선형포화탄화수소로 이루어지며 친수성부분은 sugar 또는 amino acid로 구성된다. 미생물계면활성제의 구분은 생산균주에 의해 (1)yeast surfactants, (2)fungal surfactants, (3)bacterial surfactants로 크게 구분할 수 있으며 계면활성제 형태에 따라 (1)glycolipids, (2)lipopeptides and lipoproteins, (3)fatty acids, neutral lipids, and phospholipids, (4)polymeric surfactants, (5)particulate surfactants로 나뉠 수 있다(Table 4-2) 미생물계면활

성제는 미생물생장에 대해 저해작용이 거의 없으며, 생분해성이 좋아 이차오염을 방지할 수 있고 온도, pH, 용해된 염의 종류와 농도 등에 의한 영향이 적다는 특성이 있다.

나. Sophorolipid

*C. bombicola, C. apicola, C. petrophilum*유래의 sophorolipid는 배지내에서 여러 구조의 혼합물 형태로 존재한다. 혼합물 속의 구조들은 MPLC, TLC, NMR등의 분석방법으로 규명되었는데 5′, 5″탄소에 각각 $-COCH_3$가 에스테르결합을 하고 1, 4″탄소가 에스테르결합하여 lactone 구조를 갖는 sophorolipid가 가장 많은 부분을 차지한다. Fig. 4-1은 sophorolipid의 일반적인 구조식을 보여주고 있다. Fig. 4-1에서 R_3는 H 혹은 $-CH_3$이고, R_4는 R_3가 H일 때 탄소수가 12내지 16인 포화 혹은 불포화 탄화수소기이고, R_3가 $-CH_3$일때는 탄소수가 11내지 15인 포화 혹은 불포화 탄화수소기이며, R_1, R_2는 H 혹은 $-COCH_3$이다. sophorolipid는 최소 6가지 이상의 혼합물이다. 그렇기 때문에 Fig. 4-1에 제시된 것과 다른 형태의 sophorolipid에 대해서도 연구·분석되었다. Sophorolipid는 구조내의 acetyl 결합과 lactone 결합이 화학적으로 불안정하여, alkaline hydrolysis에 의해 acid form으로 쉽게 전환되며, 최적 pH 3.5에서 4 g/L의 낮은 solubility 나타낸다. 또한 *C. apicola*로부터 생산되는 sophorolipid는 pH 2에서는 water-soluble 하지만 pH shifting(2→3)에 의해 결정형의 sophorolipid가 생성된다. 그 밖에 sophorolipid는 우수한 분산력 능력을 가진다고 알려졌다. Sophorolipid와 같은 glycolipid surfactant는 추출공정 후, 점도가 매우 높은 반고체성의 물질로 취급이 매우 어렵고 제품으로서의 사용성이 좋지 않은 단점이 있다. 이러한 단점을 해결하고자 여러 문헌에서는 sophorolipid에 polyhydric alcohol을 다량 첨가함으로써 sophorolipid 유도체를 합성하였다. 몇 가지 유도체를 Fig. 4-2에 나타내었다. 이러한 sophorolipid 유도체들은 세제 및 유화제로서 흡습성과 친수성이 뛰어나게 좋은 성질을 갖고 있어 화장품을 비롯하여 화장비누, 치약 및 기타 세제제품에 생체계면활성제 또는 보습제로서 이용되고 있으며 일반 합성계면활성제와는 달리 사용할 때 인체에 대한 부작용이 거의 없으며 생분해

가 뛰어난 우수한 특성을 지닌 물질로 알려졌다.

Table 4-2. Microbial source and properties of important types of microbial surfactans

Biosurfactants	Microorganisms	C-source	Surface tension(mN/m)	CMC	Interfacial tension(mN/m)
Glycolipids					
Rhamnolipids	*P. aeruginosa*	glucose	29		0.25
	Pseudomonas sp.		25-30	0.1-10 mg/l	1
Trehalolipids	*R. erythropolis*		32-36	4 mg/l	14-17
	N. erythropolis		30	20 mg/l	3.5
	Mycobacterium sp.		38	0.3 mg/l	15
Sophorolipids	*T. bombicola*	glucose/oleic acid	33	82 mg/l	1.8
	T. apicola	alkane/carbohydrate	30		0.9
	T. petrophilum				
Cellobiolipids	*U. zeae, U. maydis*		30	20 mg/l	>1.0
Lipopeptides and lipoproteins					
Peptide-lipid	*B. licheniformis*	glucose	27	12-20 mg/l	0.1-0.3
Serrawettin	*S. marcescens*	glycerol	28-33		
Viscosin	*P. fluorescens*	glycerol	26.5	150 mg/l	
Surfactin	*B. subtilis*	glucose	27-32	23-160 mg/l	1
Subtilisin	*B. subtilis*				
Gramicidins	*B. brevis*				
Polymyxins	B. polymyxa				
Fatty acids, neutral lipids, and phospholipids					
Fatty acids	*C. lepus*	kerosene/alkanes	30	150 mg/l	2
Neutral lipids	*N. erythropolis*		32		3
Phospholipids	*T. thiooxidans*				
Polymeric surfactants					
Emulsan	*A. calcoaceticus*				
Biodispersan	*A. calcoaceticus*				
Mannan-lipid-protein	*C. tropicalis*				
Liposan	*C. lipolytica*				
Carbohydrate-protein-lipid	*P. fluorescens*		27	10 mg/l	
	D. polymorphis				
Protein PA	*P. aeruginosa*				
Particulate biosurfactants					
Vesicles and fimbriae	*A. calcoaceticus*				
Whole cells	Variety of bacteria				

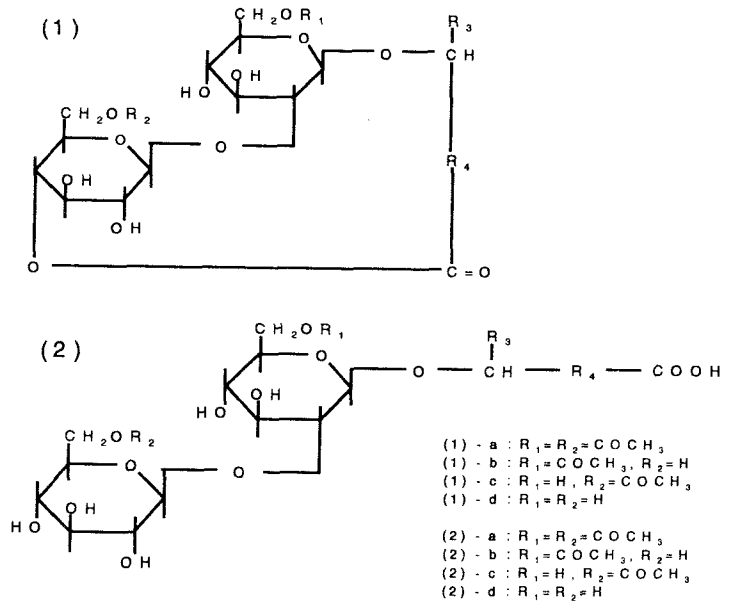


Fig. 4-1. Structures of major components of sophorolipid

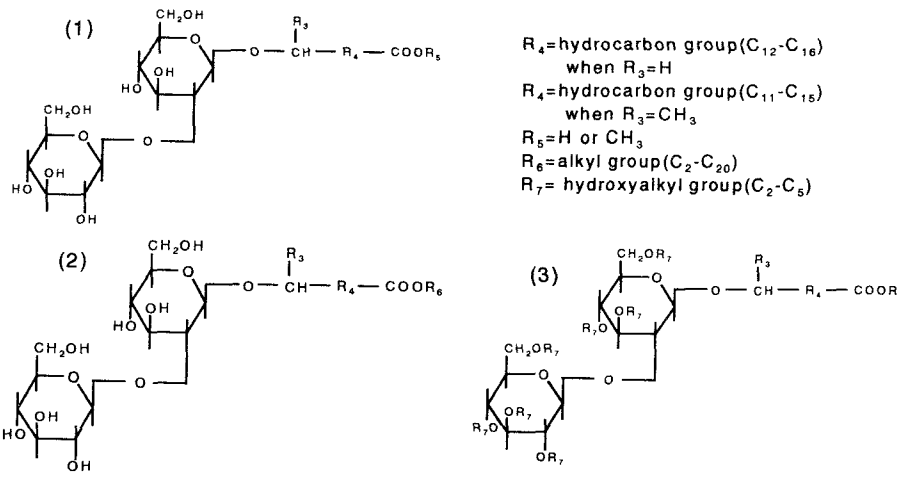


Fig. 4-2. Structures of secondary sophorolipid derivatives

3. 재료 및 방법

가. 균주 및 배양

본 실험에 사용된 균주는 Candida bombicola ATCC 22214, Candida apicola IMET 43747, Torulopsis petrophilum KCCM 11628이고, YM 사면배지 형태로 4℃에 저장, 사용하였다. 기질은 신동방(주)으로부터 제공받은 soybean dark oil, corn oil, soybean oil과 삼립유지(주)에서 제공해 준 canola oil을 10%(wt/vol)씩을 사용하였다. 48시간 계대배양한 종균을 고압 멸균한 2.5L jar fermentor(Korea Fermentor Co., Korea)에 접종하여 유가식 배양으로 7일간 working volume, 1L; 온도, 30℃; pH, 3.5; agitation speed, 550rpm; aeration rate, 1vvm 상태로 운전하였다. 또한 같은 방법으로 50, 300 liter를 사용, 배양하였다. 배양기간 동안 배지내의 sophorolipid 생산량, 균체량과 잔존 glucose 농도을 측정하였다. 균주별 배지조성은 Table 4-3에 나타내었다.

나. Sophorolipid 분리

Sophorolipid를 배양액으로부터 ethyl acetate(3회)를 사용하여 추출하고, 추출에 사용된 용매는 rotary vacuum evaporator()에서 제거하여 미정제 sophorolipid를 얻었다. 미정제 sophorolipid에 다시 hexane을 첨가하여 잔류오일을 제거하고 chloroform으로 용액중의 sophorolipid을 추출한 후 정제된 sophorolipid 혼합물을 얻었다(Fig. 4-3).

다. *Sophorolipid* 특성 규명

(1) 임계 마이셀 농도 (Critical Micelle Concentration) 측정

Sophorolipid의 CMC(Critical Micelle Concentration)는 증류수에 일정량의 sophorolipid를 녹인 다음 Surface tension meter (TensiomatR21, Fisher Scientific, USA)을 이용하여 표면장력을 측정하여 나타내었다.

Table 4-3. Composition of culture medium

Medium / Microorganisms	Component	Content (%)
Candida bombicola ATTC 22214	Glucose	10
	Yeast Extract	0.5
	KH_2PO_4	0.1
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.01
	NaCl	0.01
	Peptone	0.07
Candida apicola IMET 43747	Glucose	10
	Yeast Extract	0.06
	$(NH_4)_2SO_4$	0.3
	NaCl	0.05
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.04
	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	0.04
	K_2HPO_4	0.04
	KH_2PO_4	0.25
Torulopsis petrophilum KCCM 11628	Glucose	10
	Yeast Extract	0.5
	KH_2PO_4	0.1
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.02
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.002
	$FeSO_4$	0.001
	Na_2EDTA or NaCl	0.002
	NH_4NO_3	0.2

(2) 분산력 측정

200ppm의 sophorolipid 수용액에 0.01g, Fe203를 넣고 30초 동안 vortexing 시킨 후 상온에서 정치시켰다. 2시간, 24시간 후 시험관 용액의 표면으로부터 5cm 깊이에서 시료을 취하여 Spectrophotometer(UV-160A, Shimadzu Co., Japan)를 이용하여 optical density(OD640) 값을 측정하여 나타내었다.

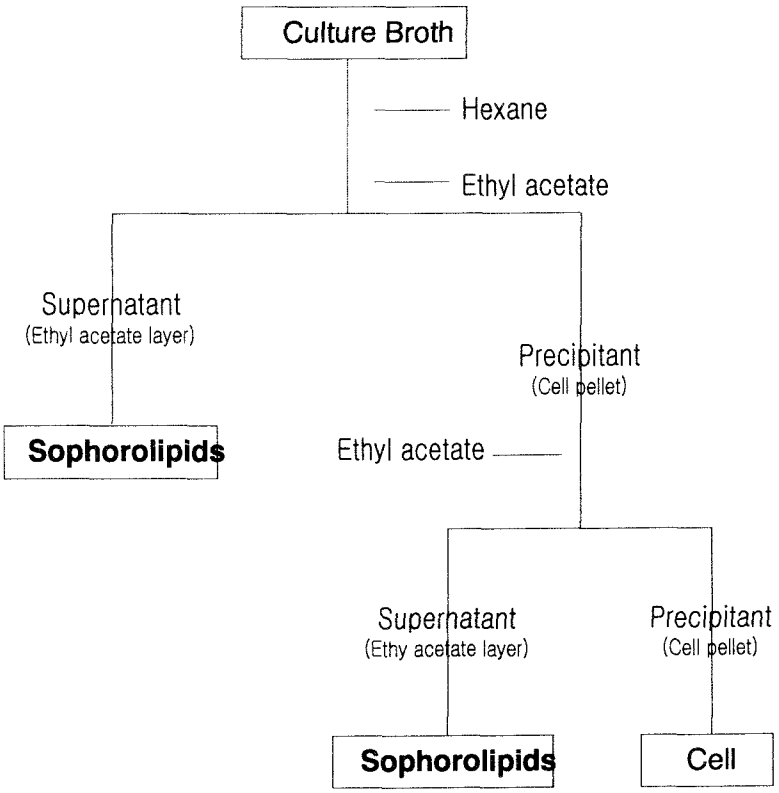


Fig. 4-3. Isolation and purification of sophorolipidS

(3) pH, 온도, 염에 대한 안정성 측정

10mg의 sophorolipid를 NaHCO3, NaOH, KH2PO4, HCl 수용액을 이용하여 만든 pH(2~12) 용액에 녹여 상온에서 12시간, 200ppm의 sophorolipid 수용액을 40~120℃에서 2시간 반응시켰다. 또한 10mg의 sophorolipid를 NaCl과 CaCl2(0~1,000mM) 수용액에 첨가하여 6시간 반응시킨 후 sophorolipid의 표면장력 변화를 측정하였다.

(4) Sophorolipid의 가용화능 측정

1g의 2-methylnaphthalene을 액화한 후, 10mL vial에 넣어 고착, 고형화시킨다. 이 vial에 CMC, 0.5g/L, 1g/L의 계면활성제 용액을 5mL 넣었다. 2-methylnaphthalene이 수용액상으로 포화되어 평형이 이루어지도록 25℃, 48시간동안 교반한 후 48시간 정치시켰다. 그 후 1mL의 시료에 n-hexane, 1mL을 가하여 3분간 교반시키고, 1시간동안 정치시켜 상층부를 회수하여 GC/FID(Column, Silicon OV-101(2m*SUS) ; gas condition , N2(40psi), H2(20psi), air(40psi) ; 온도 gradient , inital temp. = 100℃, final temp. = 240℃, temp. rate = 5℃/min ; injection temp. : 200℃, detection temp. : 240℃)로 분석하였다.

(5) Gas Chromatography(GC/FID)를 이용한 지방산 조성 확인

Sophorolipid 내에 결합한 지방산과 기질 oil의 지방산 조성을 비교하기 위해 1g의 sophorolipid에 0.5N KOH/methanol 15mL를 프라스크에 넣고 혼합 후 sand bath에서 100℃이상에서 3시간 반응시켜 에스테르 결합을 파괴하고 다시 BF3/methanol을 20mL 첨가해 90℃에서 15분간 반응시켜 fatty acid methyl ester를 형성시켰다.

이 용액에 석유에스테르를 40mL 첨가한 후 층분리시키고 상층(석유에스테르)에서 12mL를 취한 후 50mL 메스플라스크에 넣고 hexane으로 나머지를 채운다. 그 후 시료를 취해 SUPELOCOWAX 10(30m*0.53mm*1㎛) column을 사용한 GC/FID로 분석하였다.

(6) TLC/FID 및 IR을 이용한 구조 확인

Sophorolipid는 상온 상압에서 lactone form과 acid form으로 존재하는데 이 비율

을 TLC/FID(Thin Layer Chromatography/Flame Ionization Detector, IATRON Co., Japan) IATROSCAN MK-5과 FT-IR(Fourier Transform Infrared Spectrometer, JASCO Co., Japan)을 사용하여 측정하였다. 먼저 TLC/FID에 의한 분석에서 시료를 5mL의 methanol에 녹인 후 박층 크로마로드 CHROMAROD-SIII에 시료 1㎕를 점적(spotting)하여 100mm의 높이로 50분간 전개하였다. 전개용매는 chloroform : methanol : water를 40 : 35 : 2의 부피비로 혼합하여 사용하였고, 분석조건으로서 H2는 160mℓ/min, Air는 2.0ℓ/min, scan speed는 30초로 하였다. 결과 처리는 IATROCORDER TC-21(IATRON, Japan)을 사용하였으며 attenuation 64mV/F.S., chart speed 10.0cm/min으로 하였다.

FT-IR 분석에서는 수분을 제거한 sophorolipid, 0.01g을 KBr powder, 1g에 균일하게 혼합, 분쇄 후 적정량을 pellet 성형기에 넣고 7ton 압력하에서 1분간 성형하였다. 이 성형된 pellet을 4,000-650cm-1 영역에서 측정하였다.

4. 결과 및 고찰

가. 균주별, 기질별 sophorolipid의 생산성 비교

여러 문헌에서 sophorolipid의 생산 균주는 late exponential 또는 stationary phase에서 carbon, nitrogen 결핍시 다량의 sophorolipid를 생산한다고 알려졌다. 또한 이 시기에 다른 형태의 기질(hydorcarbon, oil등)을 첨가하면 생산성이 한층 증가되는 것을 볼 수 있다. 이러한 경향은 soybean dark oil로부터 배양 시간별 sophorolipid 생산량을 나타낸 Fig. 4-4에서도 잘 나타나 있다.

Fig. 4-5에서는 균주별, 기질별 sophorolipid 생산량과 배양 후 균체량, 잔존 glucose의 양을 보여주고 있는데 C. bombicola가 C. apicola나 T. petrophilum에 비해 훨씬 높은 sophorolipid 생산성을 가지고 있음을 알 수 있다.

나. 농도별 sophorolipid의 표면장력 변화

다양한 농도에서의 표면장력을 측정해 볼 결과 sophorolipid의 최소 표면장력은 기질에 차이가 나지만 대체로 40~50mN/m의 범위를 보였다. 이때의 농도 즉 CMC 또한

80~150mg/L를 나타내었다. soybean dark oil로부터 얻은 sophorolipid는 corn oil(C. apicola 포함)나 canola oil의 것보다 높은 표면장력(48mN/m)과 CMC(150mg/L)를 보여주고 있다(Fig. 4-6) 각 기질별 sophorolipid의 표면장력과 CMC 값을 Table 4-4에 제시했다.

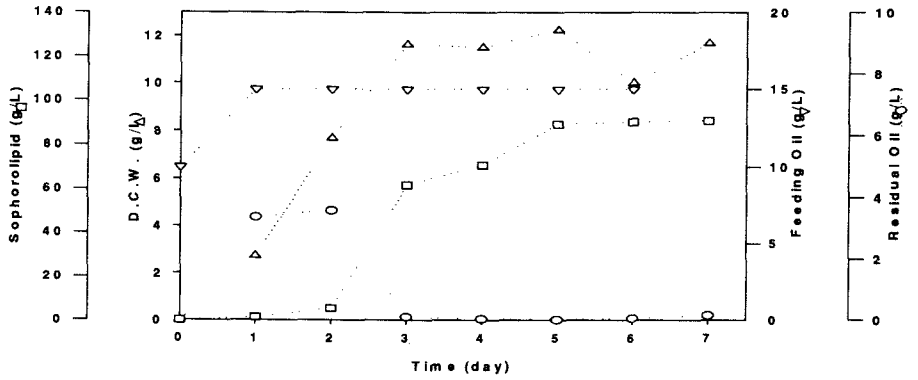


Fig. 4-4. Time course production of sophorolipids by *C. bombicola*
Mediun : 10% initial glucose, feeding 15g soybean dark oil/day(2.5 Liter)

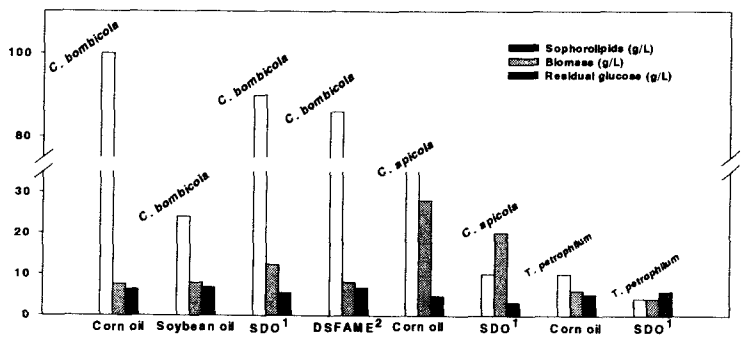


Fig. 4-5. Effects of oils growth and sophorolipids production
SDO[1] : soybean dark oil, DSFAME[2] : distilled soybean fatty acid methyl ester

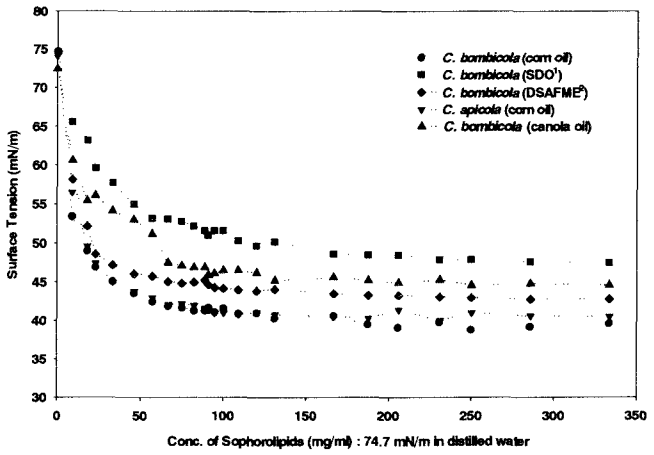


Fig. 4-6. CMC(Criticl Micelle Concentration) of sophorolipids

SDO^1 : soybean dark oil, $DSFAME^2$: distilled soybean fatty acid methyl ester

Table 4-4. CMC, MSR and K_{mw} values of sophorolipids

Sophorolipids	Surface Tension (mN/m)	CMC (ppm)	MSR	Log Kmw
Corn oil	41	82	0.2059113	3.66
Dark oil	48	150	0.2012881	3.56
Distilled Soybean Fatty Acid Methyl Ester	45	94	0.2015109	3.58
Canola oil	45	90		
Corn oil (*C. apicola*)	41	94	0.1871288	3.48

다. 시간에 따른 sophorolipid의 분산력 변화

Sophorolipid 분산력은 이전의 여러 문헌에서 그 우수성이 증명된 바 본 실험에서 사용된 기질별 sophorolipid 역시 분산능이 우수함을 보였다. 산업적으로 널리 이용되는 Tween 80보다는 분산력이 다소 떨어지지만 SDS나 Brij 30보다는 우수하였다 (Fig. 4-7).

라. Sophorolipid 안정성에 대한 pH, 온도, 염의 영향

pH(2~12), 온도(40~120℃), NaCl(0~1,000㎜M), CaCl2(0~1,000㎜M)에 대한 sophorolipid의 표면장력 변화를 Fig. 4-8, 9, 10, 11에 각각 나타내었다. Fig. 4-8에 soybean dark oil로부터 생산된 sophorolipid는 pH 3에서 최소 표면장력을 나타냈고, corn oil로부터 생산된 sophorolipid는 pH 2에서 canola oil로부터 생산된 sophorolipid는 pH 7에서 최소 표면장력을 나타냈다. 그러나 pH 3~6사이에서는 표면장력이 모두 일정했다. 이는 C. bombicola의 최적 pH가 3.5인데 기인하는 것으로 사료된다. 온도에 대한 sophorolipid의 표면장력 변화는 Fig. 4-9에서 살펴본 바와 같이 거의 변함없이 일정하였다. 따라서 sophorolipid는 높은 온도에서 상당히 안정하다고 말할 수 있다. 또한 염에 대한 영향을 나타낸 Fig. 4-10, 11에서 NaCl 의 경우 100㎜M까지는 기질별 sophorolipid의 표면장력에 거의 변화가 없었으나 그 이상의 농도에서는 표면장력이 감소하였다. CaCl2의 경우 corn oil과 canola oil로부터 생산된 sophorolipid는 대체로 일정한 표면장력을 나타냈지만 soybean dark oil로부터 생산된 sophorolipid는 다소 불안정한 표면장력 값을 보였다.

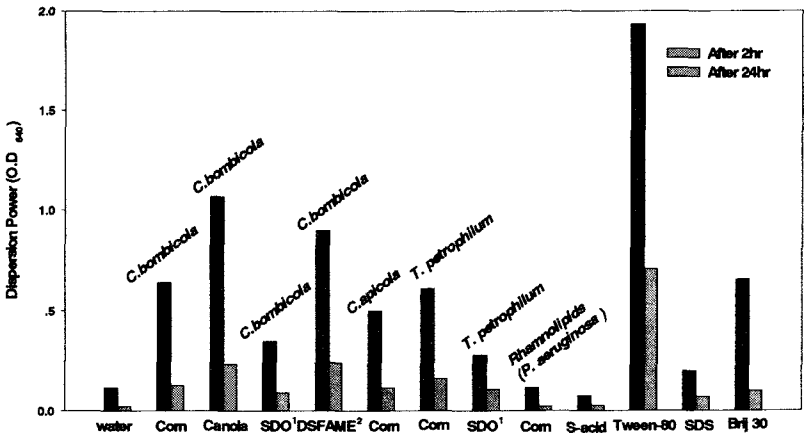


Fig. 4-7. Dispersion power of sophorolipids SDO[1] : soybean dark oil DSFAME[2] : distilled soybean fatty acid methyl ester

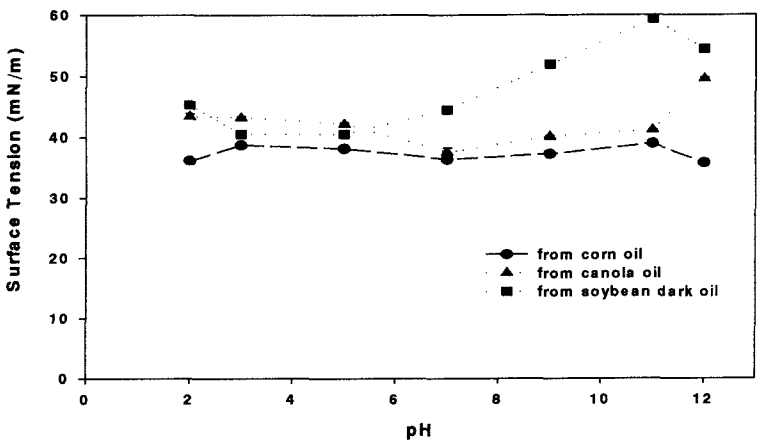


Fig. 4-8. Effect of pH on the stability of sophorolipids

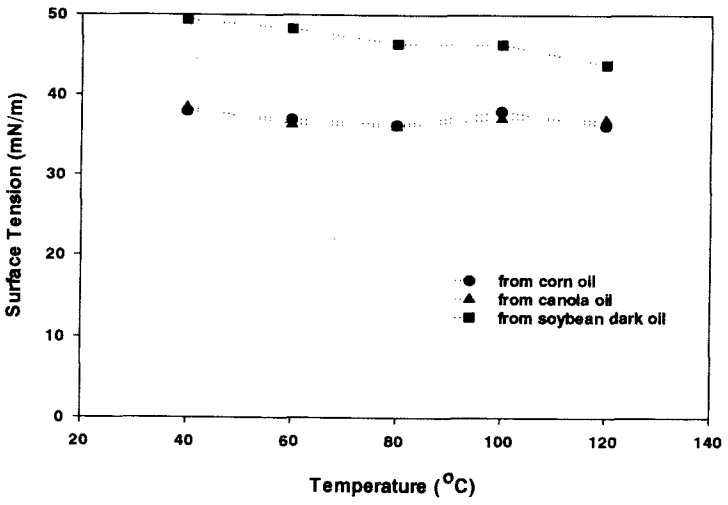


Fig. 4-9. Effect of Temperature on the stability of sophorolipids

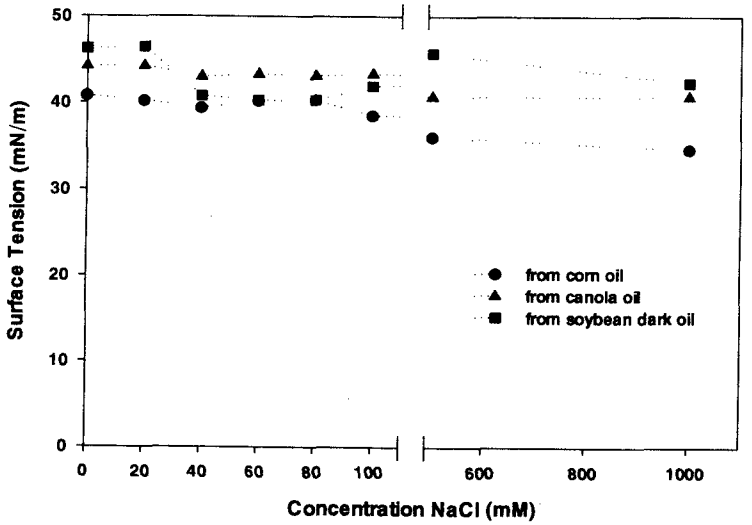


Fig. 4-10. Effect of NaCl on the stability of sophorlipid

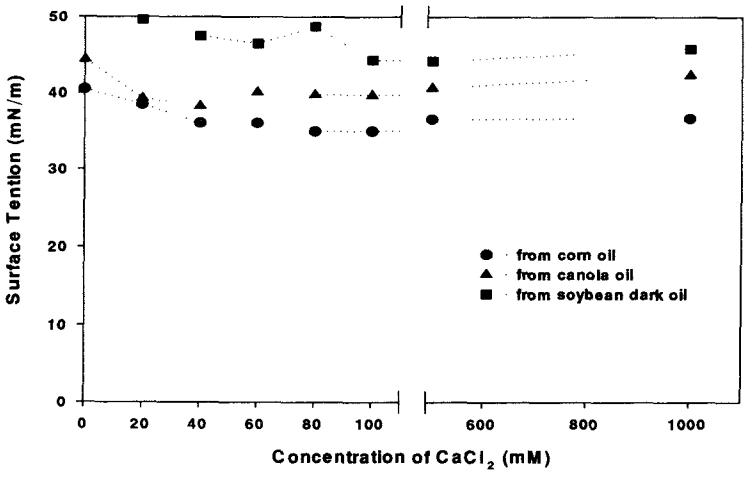


Fig. 4-11. Effect of $CaCl_2$ on the stability of sophorlipids

마. 기질별 sophorolipid의 가용화능 비교

가용화(Solubilization)란 물에 불용이거나 부분적으로 녹는 물질이 계면활성제 micelle 속으로 들어가 녹는 현상을 말한다. 물에 녹기 어려운 oil, 향료 등의 성분을 미세한 입자로 분산시켜 투명한 외관을 갖게하는 가용화 기술은 화장품 분야에서 이미 널리 응용되고 있는 기술중의 하나이다. 그런 가용화의 정도를 나타내는 척도로써 MSR(Molar Solubilization Ratio)과 logKmw(Micelle Water Partition Coefficient)을 사용하였다. Table 4-4에 제시한 기질별 sophorolipid의 MSR과 logKmw 값은 큰 차이없이 비슷하였다.

바. Sophorolipid의 지방산 조성

기질 oil과 생산된 sophorolipid 내의 지방산 조성을 분석한 결과 기질의 주요 지방상인 oleic acid와 linoleic acid가 대부분 sophorolipid 내로 전환되었음을 알 수 있었다(Table 4-5).

사. Sophorolipid의 lactone/acid form ratio

Sophorolipid의 주된 화학구조를 보면 적외선 영역에서 가장 특징적인 작용기(funtional group)로 카보닐기(carbonyl group ; -C=O)를 볼 수 있다. 이것은 일반적으로 1750~1700cm-1에서 나오나 주위 결합이 에스테르(ester)나 카르복실산(carboxylic acid)일 때에는 각각 1750~1730cm-1과 1725~1700cm-1로 다르게 나오므로 이는 생산된 sophorolipid의 형태가 lactone form인지 acid form인지를 알 수 있게 해주며, 같이 형성되는 경우 어느 정도의 혼합비인지를 간접적으로 알 수 있다. Canola oil과 soybean dark oil로부터 생산된 sophorolipid의 TLC/FID와 FT-IR의 분석 peak를 Fig. 4-12에 나타내었다. 본 분석에서 lactone form을 나타내는 에스테르 결합은 1745cm-1 근처에서 강한 peak를 보였으며, acid form을 나타내는 카르복실 결합은 1716cm-1 근처에서 강한 peak를 형성했다. Canola oil에서 생산된 sophorolipid는 lactone/acid form의 비가 거의 비슷했지만 soybean dark oil로부터 생산된 sophorolipid의 경우는 대부분 lactone form으로 이루어졌음을 알 수 있었다

아. 대형 반응기에서의 sophorolipid 생산

(1) 300 liter 배양기

Fig. 4-13에서 처럼 300 liter 배양기를 사용했을 경우, 약 70g/L의 sophorolipid를 7일 후에 얻을 수 있었다. 이는 소형 배양기보다는 작은 양이지만 많은 량의 sophorolipid를 얻는 것이 첫째 목적이었으므로 더 이상의 배양은 진행하지 않았다. 그러나 앞의 결과와 비교할 경우, 또는 상승곡선을 그리고 dLT는 생산량을 볼 때, 더 배양을 할 경우 생산량은 더욱 증가할것으로 판단한다.

(2) 500 liter 배양기

아래 그림에서 처럼 500 liter 사용시 생산량은 130 g/L를 얻었다. 앞서 300 liter 반응기와 유사한 조건임을 감안 할 때 대형반응기에서의 생산량은 120-130 g/L임을 알 수 있다. 또한 300 liter 에서도 반응을 좀더 진행시키면 원하는 량을 얻을 수 있음을 알 수 있다.

Table 4-5. Fatty acids composition of oils and sophorolipids

Oils and Sophorolipids	Fatty acid(%)				
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
Corn oil	9.75	1.65	24.65	61.95	0.59
Sophorolipid	7.83	0.67	27.41	56.50	2.23
Canola oil	5.87	1.69	51.98	28.95	8.74
Sophorolipid	8.78	2.23	50.70	26.38	3.68
Soybean dark oil	6.50	2.63	16.10	65.41	5.78
Sophorolipid	9.20	4.26	22.13	51.10	4.87

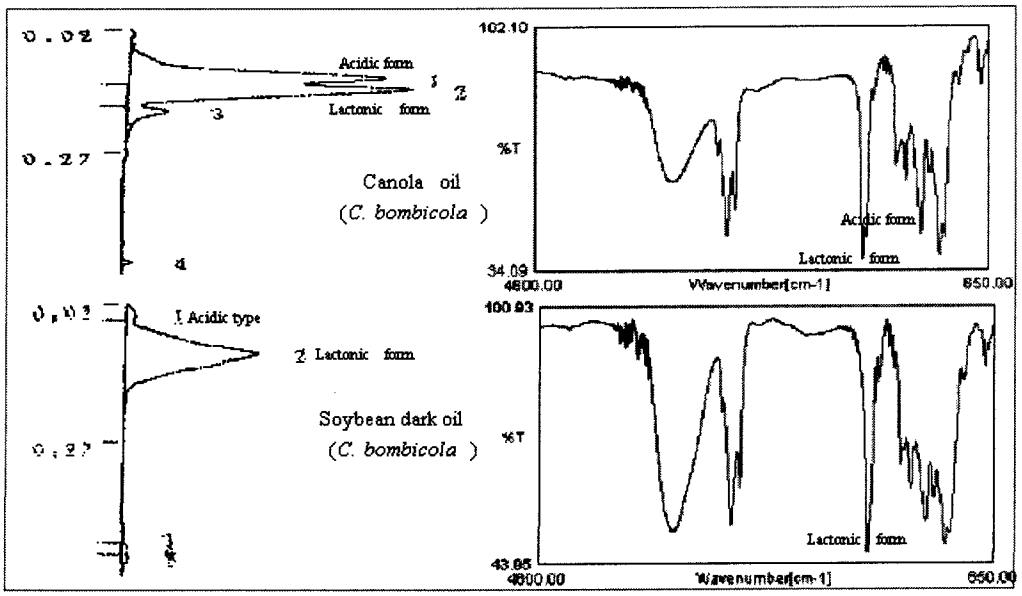


Fig. 4-12. TLC/FID choromatogram and Infrared spectrum of sophorolipids

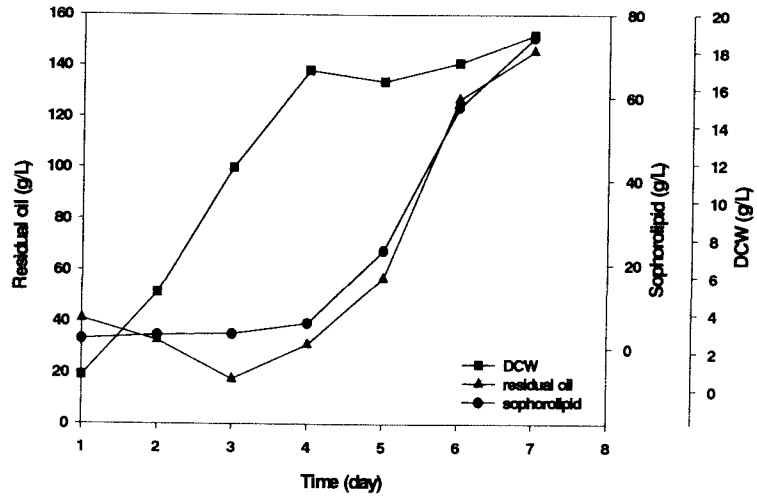


Fig. 4-13 Time-course production of sophorolipid using 300 L fermenter culture condition ;aeration : 1 vvm; agitation : 120 rpm, pH : not controlled DO : not controlled

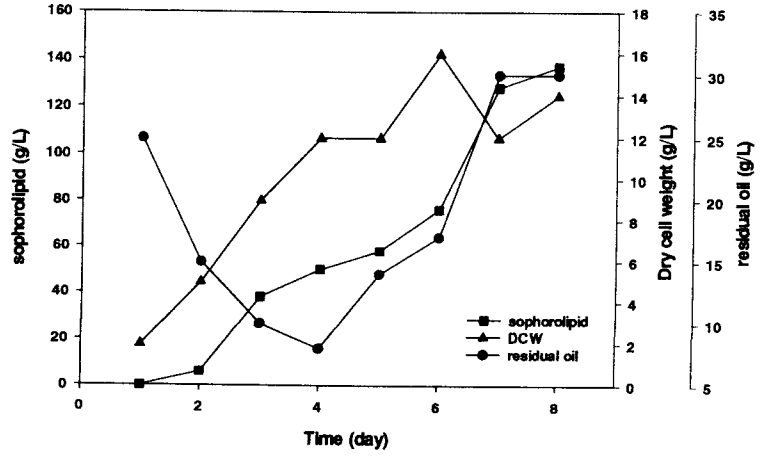


Fig. 4-14 Production of sophorolipid using a 500 L fermenter culture condition ;aeration : 1 vvm; agitation : 120 rpm pH : not control; DO : not control

5. 결 론

본 연구에서는 미생물계면활성제의 생산비용절감 차원에서 Candida sp.유래의 sophorolipid를 식용유 부산물의 한 형태인 soybean dark oil로부터 생산하고, 생산된 sophorolipid 특성을 규명하는 연구를 수행한 결과 다음과 같은 결론을 도출하였다.

가. *Candida bombicola* ATCC 22214는 soybean dark oil로부터 약 90g/L의 높은 수율(0.45)로 sophorolipid를 생산하였다. 이는 다른 oil과 원료원가를 비교하였을 때 soybean dark oil이 2배이상 저렴하므로 생산가격을 그 만큼 절감시킬 것으로 사료된다.

나. Soybean dark oil로부터 생산된 sophorolipid의 최소 표면장력과 CMC는 각각 48mN/m, 150mg/L로 다른 기질로부터 생산된 것보다 다소 높았다.

다. 분산력 실험에서 sophorolipid는 SDS나 Brij 30보다 우수한 성능을 나타냈으며, pH, 온도, 염에 대한 전반적으로 안정한 것으로 나타났다. 특히 pH 3-4에서 가장 좋은 표면활성을 보였는데 이는 생산 균주의 최적 pH가 3.5인 것에 기인하는 것으로 사료된다.

라. soybean dark oil로부터 생산된 sophorolipid의 지방산 조성은 기질 oil의 지방산 조성과 유사하였는데 그 주요 지방산은 oleic acid와 linoleic acid였다. 또한 구조면에서는 lactone/acid form 중 대부분 lactone form으로 밝혀졌다.

마. 50 liter, 혹은 300 liter 에서는 2.5 liter 보다 높은 효율로 Sophorolipid가 생산되었다. (생산량 130 g/L)

5절. 생리활성물질의 현장 적용시험

1. 실험실 실험을 통한 생리활성물질과 황토의 적조구제 효과 조사

가. 계면활성제의 선별

(1) 재료 및 방법

(가) 계면활성제

선별에 사용된 11종류의 계면활성제를 Table 5-1-1에 나타냈다. 사용된 계면활성제 중 sophorolipid는 실험실에서 생산하였고 그 외에는 구입하여 사용하였다. sophorolipid의 생산조건은 다음과 같다 : American Type Culture Collection에서 제공된 효모 *Candida bombicola* ATCC22214는 YM agar slants 에 도말하고 규칙적인 간격으로 옮겨졌다. batch culture에서 배지조성은 다음과 같다(per liter deionized water): glucose 100g, yeast extract 0.5 g, KH2PO4 0.1 g, MgSO4.7H2O 0.05 g, CaCl2.2H2O 0.01 g, NaCl 0.01 g, peptone 0.07 g, corn oil 100 g. 세포는 2.5L jar fermenor를 사용하였고 25℃, 1vvm aeration rate, pH 3.5의 조건 하에서 8일동안 배양되었다. sophorolipid는 배지의 상등액에 동일한 양의 에틸아세테이트로 추출하였고 모든 계면활성제는 실험을 위하여 무균상태로 여과된 자연 해수에 용해시켰다.

(나) 유해성 적조생물의 배양

2종의 유해성 적조생물 *Cochlodinium polykrichoides* 와 *Alexandrium tamarense*를 F/2 medium을 첨가한 seawater 배지를 사용하여 배양하였다. seawater는 0.2 ㎛-pore-size를 가진 cellulose nitrate membrane filter를 이용하여 부유물을 제거하였고, 121℃에서 20분 멸균되었다. 배양에 사용한 배양기는 20℃로 유지하였고, 12-light:12-dark의 상태에서 5000-6000lux의 광도로 빛을 조사하였다.

(다) 계면활성제의 생분해도

계면활성제의 생분해도 실험은 인천항에서 채수한 신선한 해수를 사용하여 수행되었다. 해수는 부유물질과 박테리아를 섭식하여 계면활성제의 생분해에 영향을 미칠

수 있는 동물플랑크톤을 제거하기 위하여 Whatman GF/F로 여과되었다. 생분해도 실험은 두 경우의 온도조건 하에서 수행되었다 : 20℃, 25℃. 200ml의 여과된 해수를 500ml 무균 플라스크에 옮기고 계면활성제를 최종농도 100 mg/L이 되도록 첨가하였다. 각각의 실험구마다 2개의 플라스크로 실험을 수행하였다. 플라스크는 하루에 두 번 흔들어 주었다. 샘플은 표면장력과 해양 박테리아플랑크톤을 측정하기 위하여 매일 채취하였고 실험은 2주동안 진행되었다. 표면장력은 surface tension meter (Fisher Scientific, Surface Tensionmat21)를 이용하여 측정하였고 계면활성제의 생분해도는 표면장력의 방정식으로 계산하였다.

Table 5-1-1. Surfactants used in the primary screening experiments

Number	Short name	Full name	Type
1	GL	Sophorolipid	biosurfactant
2	Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol	nonionic
3	Span 80	Sorbitan monooleate	nonionic
4	Tween 80	Polyoxyethylene sorbitan monooleate	nonionic
5	Tween 81	Polyoxyethylene sorbitan monooleate	nonionic
6	NP-8	Polyoxiethylene nonylpenylether	nonionic
7	LA-3	Laurylamine	nonionic
8	MPS-814S	Esterquart	cationic
9	LAS	Linear alkyl benzene sulfonate	anionic
10	AOS-1416	alpha oleffinsulfornate	anionic
11	CAPB	Cocamidopropyl betaine	amphoteric

(라) 해양 박테리아 플랑크톤의 개체수 측정

박테리아플랑크톤의 개체수는 MB (Marine Broth) plate에 형성된 colony를 계수하여 측정하였다. 각각의 플라스크로부터 0.1 ml의 샘플을 채취하였으며 0.9ml saline에 첨가되었다. 희석에 따라 적정 최종농도로 처리하여 plate에 형성된 colony를 계수하였다. 접종 후 plate는 25℃에서 배양되었다. 각각 샘플에서 박테리아의 농도는 각각의 접종 볼륨과 dilution level에 따라 계산되었다.

(마) 운동성 저해와 세포 lysis 효과

적조생물은 시험관에 일정 농도의 계면활성제와 혼합되어 배양되었다. 적조생물의 개체수는 1ml counting chamber를 사용하여 광학현미경 하에서 계수되었다. 총 세포 개체수는 루골용액으로 고정 후 측정되었다. 운동성 저해율은 (샘플의 운동성 저해 균수/대조구의 총 균수)로 계산 하였다. 세포의 lysis 비율은 (샘플의 총 균수/대조구의 총 균수)로 계산하였다.

(2) 결과 및 고찰

(가) 계면활성제의 1차 선별

본 실험에서 모든 계면활성제의 농도는10 mg/L이고 선별 결과를 Fig. 5-1-1에 나타냈다. 계면활성제의운동성 저해 효과는 매우 다양하게 나타났다. NP-8과 LA-3과 같은 계면활성제는 두 종의 적조생물에서 100%의 매우 뛰어난 저해 효과를 나타냈다. 반면에 몇몇 계면활성제는 적조생물의 운동성 저해에 매우 낮은 효과를 나타내 Tween80등은 40%의 저해효과를 보였다. 첫 번째 선별 결과로 계면활성제 sophorolipid, NP-8, LA-3, AOS-1416과 CAPB가 유해성 적조생물에 높은 저해효과를 보여 두 번째 선별 실험에 선택되었다.

(나) 계면활성제의 2차 선별

두 번째 선별 실험은 적조구제를 위하여 해양환경에 계면활성제를 적용시 2차 오염을 줄이기 위하여 첫 번째 선별에서 선택된 다섯 가지 계면활성제의 생분해도에 따

라 수행되었다. 계면활성제는 10mg/L의 낮은 농도에서 충분한 저해효과가 나타나지만 계면활성제의 생분해 과정을 명확하게 구분하기 위하여 100mg/L의 높은 농도를 실험에 사용하였다. Fig. 5-1-2에서 볼 수 있듯이 계면활성제의 종류와 온도에 따라 분해 시간에 따른 표면장력이 다양하게 나타났다. 시간이 지남에 따라 CAPB의 표면장력이 모든 온도에서 빠르게 증가하였으며 sophorolipid가 다음으로 쉽게 생분해되는 것으로 나타났다. LA-3와 NP-8은 전체 실험기간동안 표면장력이 거의 변하지 않아 해수에서 분해가 되지 않음을 나타냈다. 온도에 따른 결과를 보면 대부분의 계면활성제가 20℃에서 보다 25℃에서 더 빠르게 생분해되어 높은 온도에서 계면활성제의 생분해가 더욱 쉽게 일어남을 보여준다. 유해성 적조의 발생 시기가 고수온기 이므로 이는 적조구제에 사용되는 계면활성제의 생분해를 도울 것이라고 판단된다.

해수에서 계면활성제의 농도와 표면장력과의 관계를 Fig. 5-1-3에 나타냈다. 쉽게 생분해되는 계면활성제인 sophorolipid와 CAPB의 분해율을 Table 5-1-2에 나타냈다. 이 결과는 Fig. 5-1-2로부터 얻어진 결론을 증명한다. 계면활성제의 50% 이상이 1일 후에 분해 되었으며 이는 자연 해수에서 두 가지 계면활성제에 대한 반감기가 24시간을 넘지 않는다는 것을 의미한다. 5~7일 후에는 90% 이상의 계면활성제가 분해 되었다. 위의 결과가 보여주듯이 CAPB는 sophorolipid와 비슷한 생분해도를 보여주며 이는 10가지 계면활성제의 화학합성 중 한 가지의 경우 생분해가 가능함을 나타낸다.

5가지 계면활성제가 생분해되는 동안 해양 박테리아의 개체수 변화를 Fig. 5-1-4에 나타냈다. 초기 며칠 동안은 해양박테리아의 개체수가 증가하나 그 후에는 감소함을 나타냈다. 본 실험에서 계면활성제의 첨가는 계에 중요한 유기탄소의 공급원이 되어 이를 소비하는 몇 종의 박테리아의 성장을 유도하여 계면활성제 생분해의 결과를 가져온 것으로 판단된다. 또한 해양 박테리아의 개체수가 20℃에서보다 25℃에서 높게 나타나 표면장력의 변화와 비슷한 결과를 보여 temperature-activity간의 연관성에 대한 추측을 증명하였다.

(다) CAPB의 세포 lysis 효과

첫 번째와 두 번째 선별실험 결과에 기초하여 보았을 때 CAPB는 높은 적조생물 저해효과와 생분해도로 적조구제에 큰 가능성을 보여주었다. 적조생물의 운동성 저해실험에서 CAPB는 강한 세포 lysis 효과를 보여주었다. Fig. 5-1-5에 CAPB의 *C. polykrikoides*에 대한 운동성 저해효과와 세포 lysis 효과를 나타냈다. 그 결과는 CAPB의 농도와 접촉시간에 따라 세포 lysis 효과가 증가함을 입증한다. CAPB의 농도가 10㎎/L일 때 세포의 lysis 비율은 24시간 후 90%를 넘으며 15㎎/L일때 4시간, 40㎎/L일때는 30분 후에 약 90%의 효과를 보였다. CAPB의 적조생물에 대한 lysis 효과는 적조구제에 중요하며 적조생물 제거에 도움이 될 것으로 판단된다.

위의 선별실험 결과와 앞서 수행된 sophorolipid의 실험 결과에 따라 sophorolipid와 CAPB는 높은 적조생물 제거 혹은 저해 효과와 쉽게 생분해되는 특성으로 11가지 계면활성제중 적조구제에 가장 적합한 것으로 나타났다.

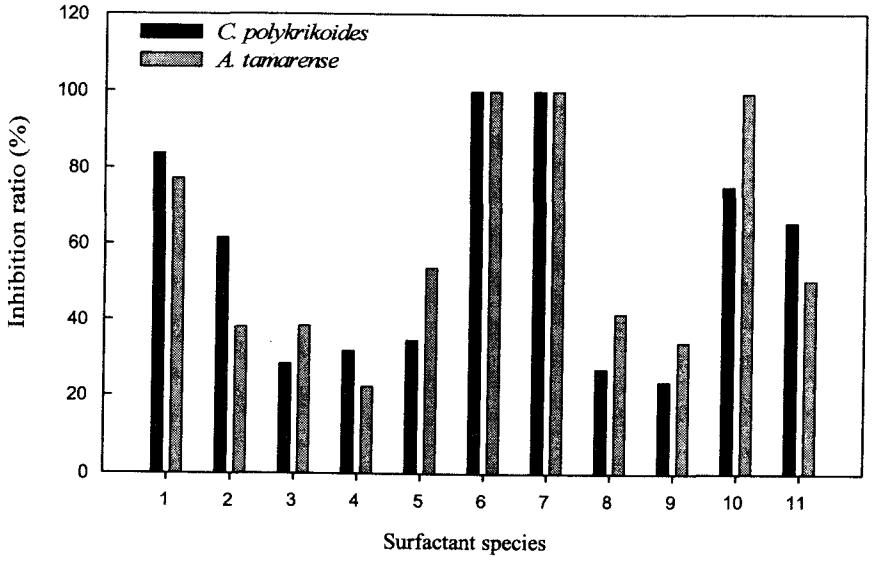
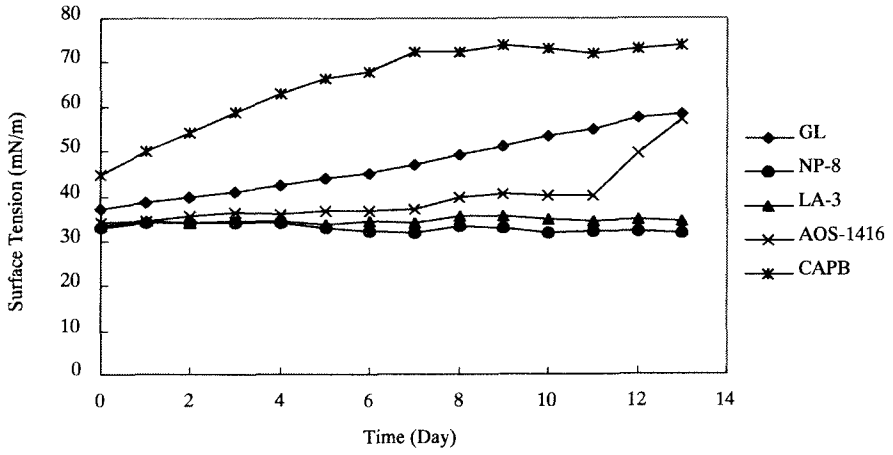
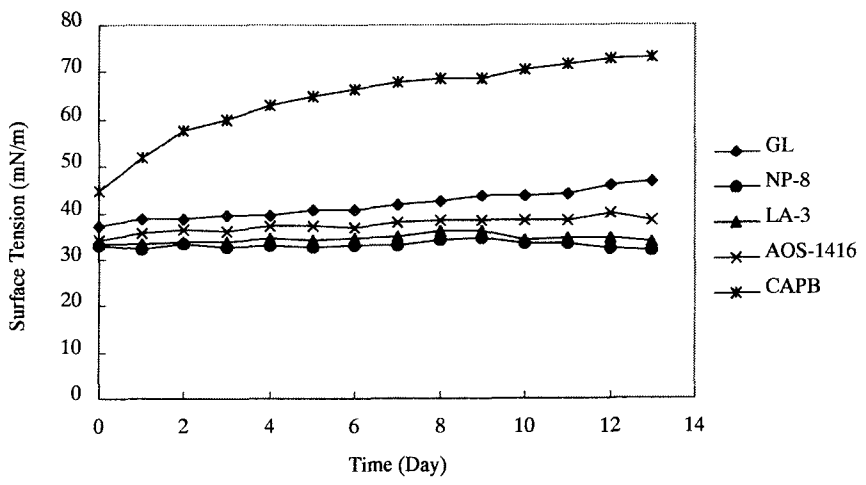


Fig. 5-1-1 Inhibition ratios of 11 surfactants on HABs organisms



(a) 25℃



(b) 20℃

Fig. 5-1-2 Biodegradation of surfactants in seawater (Surfactant concentration 100 mg/l)

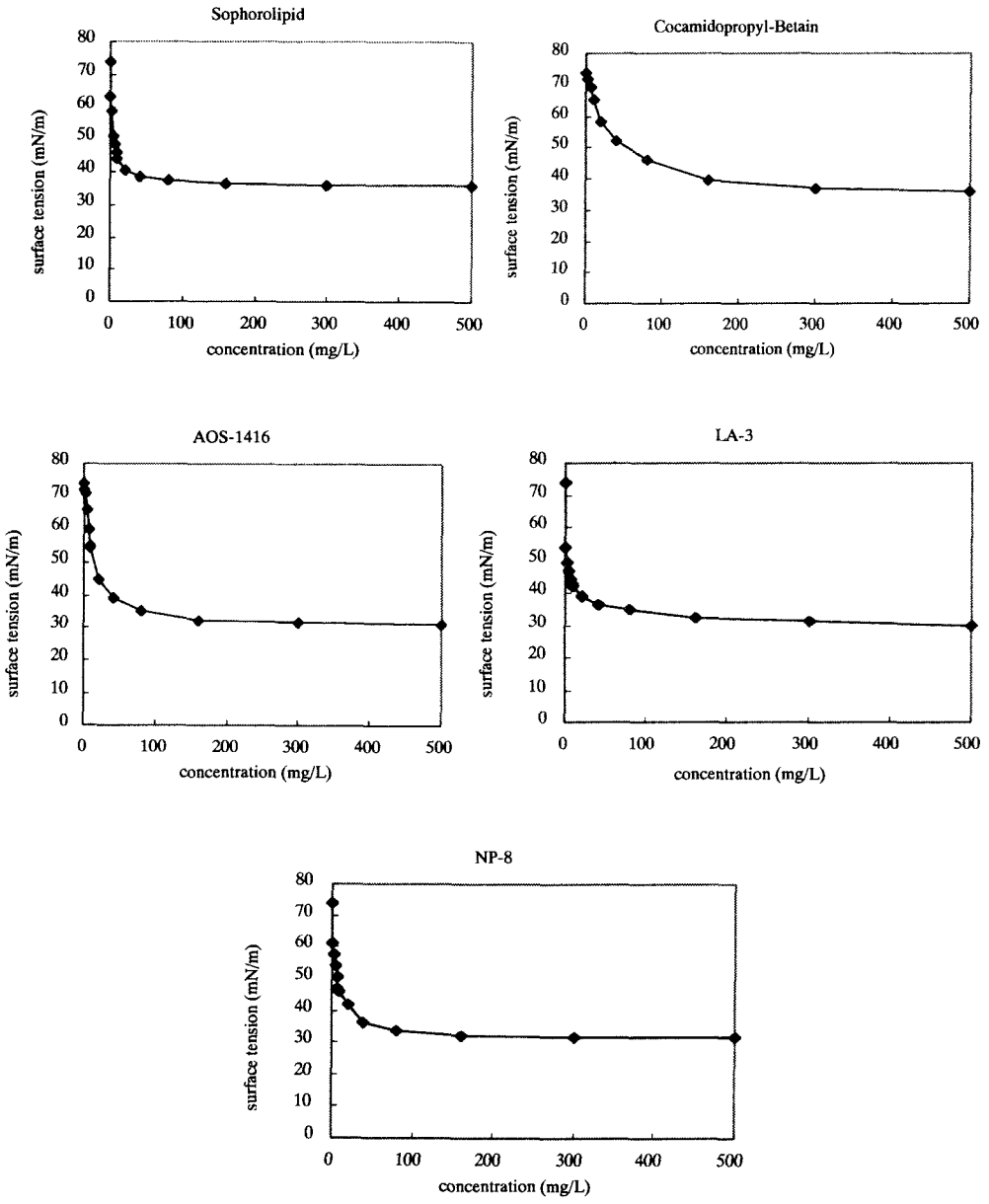
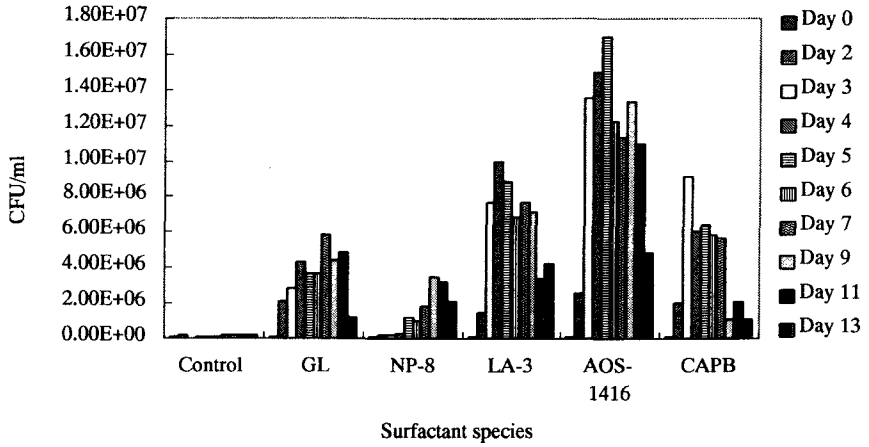


Fig. 5-1-3 Relationship between surfactants concentration and surface tension in seawater

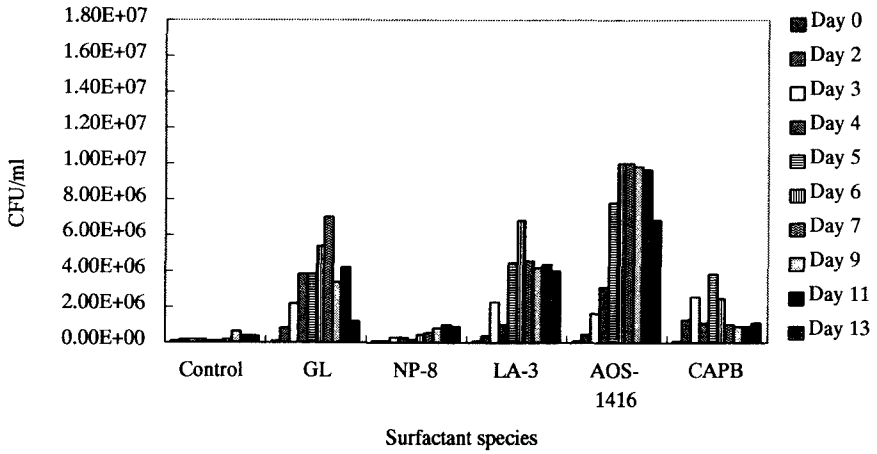
Table 5-1-2. Biodegradation of sophorolipid and CAPB in seawater

(Surfactant concentration: 100 mg/L)

Surfactant	Time	Biodegradation ratio (25℃)	Biodegradation ratio (20℃)
Sophorolipid	1 day	>60%	>50%
	3 days	>80%	>70%
	5 days	>85%	>80%
	7 days	>92%	>85%
CAPB	1 day	>50%	>50%
	3 days	>80%	>80%
	5 days	>90%	>80%
	7 days	>98%	>90%



(a) 25℃



(b) 20℃

Fig. 5-1-4 Variation on marine bacteria number during the biodegradation of surfactants (a) (b)

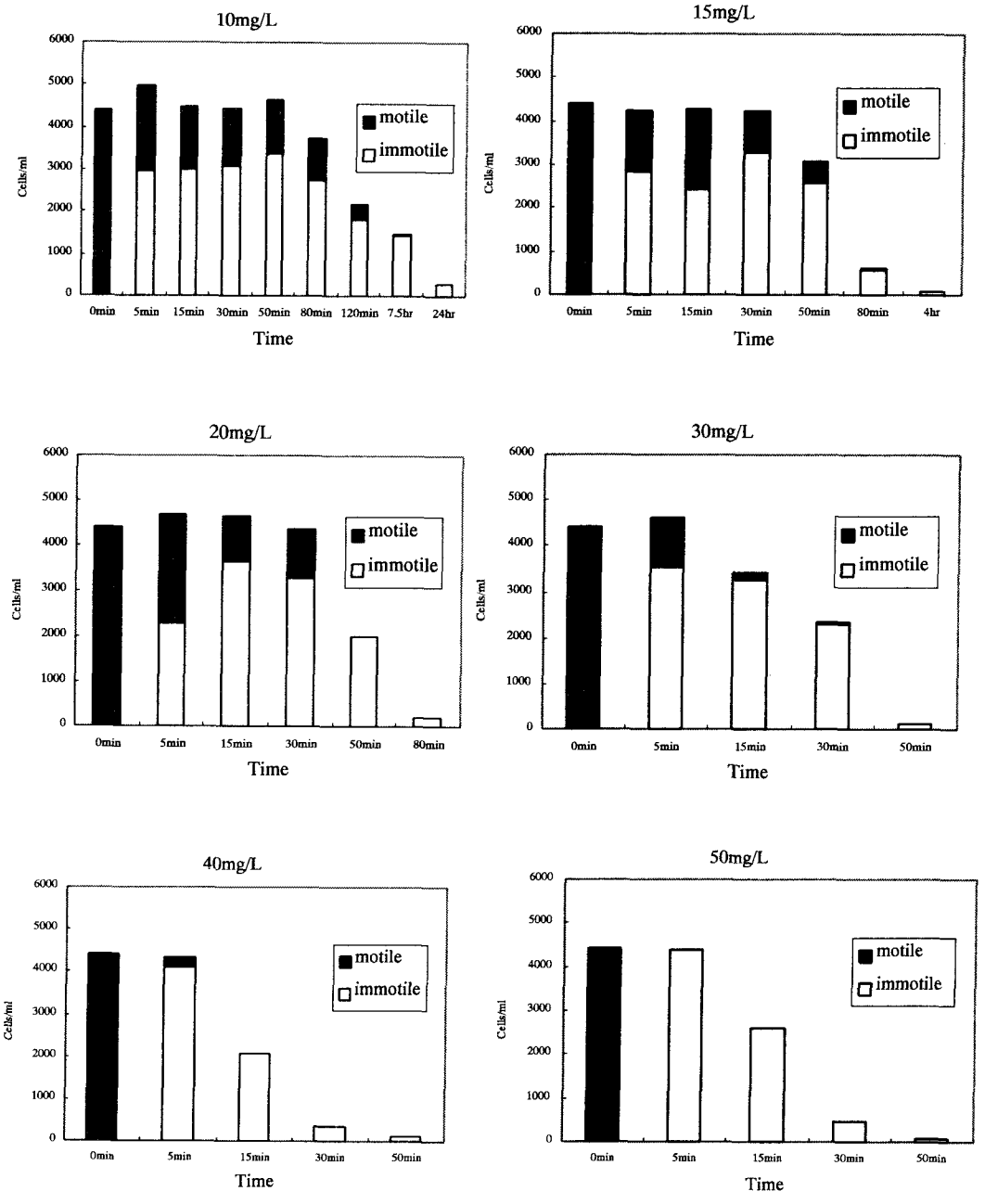


Fig. 5-1-5 Effect of CAPB concentration and contact time on the cell lysis of *C. polykrikoides*

나. 계면활성제의 저장성, 미생물에 대한 저해 영향, 현장적용성 향상

(1) 목적

(가) 소포로리피드의 저장성 실험

(나) 소포로리피드에 의한 여러 적조유발 미생물의 저해조사

(다) 적조생물에 대한 소포로리피드와 황토의 영향

(라) 적조생물에 대한 소포로리피드와 황토의 최적 배합조건 연구

(2) 실험재료 및 방법

(가) 미생물, 배양 조건

Candida bombicola ATCC22214는 YM 사면배지에 도말하고 3개월마다 새 배지에 옮겨서 유지 시켰다. 전배양은 500ml baffled flask에 100ml의 배지에서 배양하였다. 회분식 배양의 배지조성은 glucose 100g/L, yeast extract 0.5 g/L, KH_2PO_4 0.1g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.01g/L, NaCl 0.01g/L, pepton 0.07, corn oil 100g/L이다. 배양기는 2.5L jar fermentor를 사용하였고 8일동안 배양 하였으며 25 ℃, pH 3.5, 1vvm의 조건에서 배양 하였다. 소포로리피드는 cell을 제거한 상등액의 동일한 야의 ethyl acetate를 이용하여 추출하였다.

(나) 적조생물의 배양

적조생물은 *Cochlodinium polykrichoides, Alexandrium tamarense, Scripsiella trochoidea, Heterosigma akashiwo*의 4종을 F/2 medium을 첨가한 seawater 배지를 사용하여 배양 하였다. 사용한 seawater는 0.2㎛ cellulose nitrate membrane filter 사용하여 부유물을 제거 하였고, 121℃, 20분 동안 멸균하여 배지로 이용 하였다. 배양에 사용한 배양기는 20℃로 유지 하였고, 12h-light-12hdark의 상태에서 5000-6000lux의 광도로 빛을 조사 하였다.

(다) 적조생물의 운동성 저해

적조생물을 소포로리피드 및 그 외 계면활성제의 다양한 농도에서 배양하여 운동성

저해를 관찰 하였다. 운동성이 저해된 적조생물은 광학 현미경 하에서 Counting chamber와 Haemacytometer를 이용하여 계수 하였다. 총 균수는 Lugol용액을 이용하여 적조생물을 고정하여 계수 하였다. 운동성 저해율은 운동성 저해균수/총 균수로 계산 하였다.

(라) 적조생물 사멸

적조생물을 다양한 농도의 황토 및 계면활성제와 황토가 배합된 배지에서 배양 하였다. 일정 시간이 지난 후 상등액의 미생물 수를 학 현미경 하에서 Counting chamber와 Haemacytometer를 이용하여 계수 하였다. 총 균수는 Lugol용액을 이용하여 적조생물을 고정하여 계수 하였다. 적조생물 제거율은 운동성 (총균수-상등액의 미생물수)/총 균수로 계산 하였다.

(마) 침강성 조사

적조생물의 침강성은 높이 100cm, 지름 4cm의 침강 튜브를 이용하여 조사하였다. 침강튜브의 매 30cm마다 실리콘 튜브를 이용하여 sampling port를 만들었고 주사기를 이용하여 시료를 채취하였다. 채취된 시료는 각각 적조생물 농도와 소포로리피드 농도의 분석에 이용 되었다.

(3) 결과

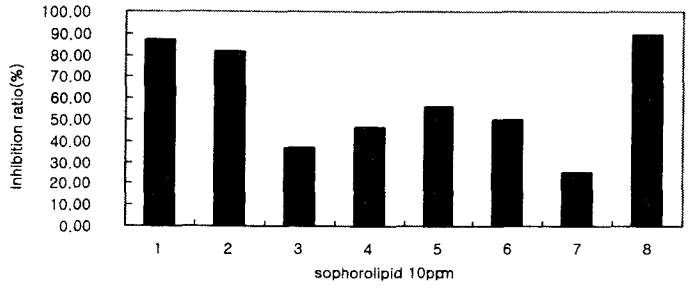
(가) 소포로리피드의 저장성 실험

소포로리피드 보관상태

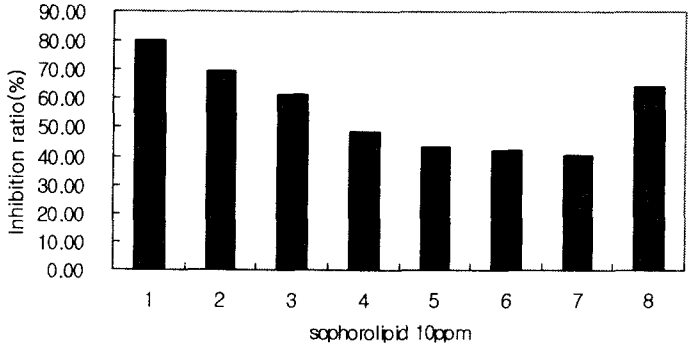
1. 증류수에 녹인, ethyl acetate를 이용하여 추출된 새로운 소포로리피드
2. 바닷물에 녹인, ethyl acetate를 이용하여 추출된 새로운 소포로리피드
3. 11개월 보관된, 자연침강된, 증류수에 녹인 소포로리피드
4. 11개월 보관된, 자연침강된, 5% 알콜이 함유된, 바닷물에 녹인 소포로리피드
5. 11개월 보관된, 자연침강된, 10% 알콜이 함유된, 바닷물에 녹인 소포로리피드
6. 11개월 보관된, 자연침강된, 20% 알콜이 함유된, 바닷물에 녹인 소포로리피드

7. 11개월 보관된, 물을 이용하여 추출된, 바닷물에 녹인 소포로리피드

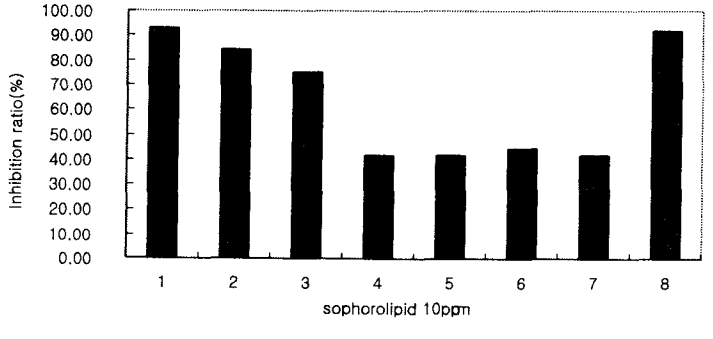
8. 11개월 보관된, ethyl acetate를 이용하여 추출된, 바닷물에 녹인 소포로리피드



C. polykrikoides



A tamarense



S. trochoidea

Fig. 5-1-6 적조생물 4종의 11개월 보관된 소포로리피드에 대한 저해효과

Ethyl acetate를 이용하여 추출한 소포로리피드가 다른 sophorolipid보다 더욱 큰 저해 효과를 보였다(Fig. 5-1-6). 저장 시간은 저해효과에 큰 영향을 미치지 못하였다. 예를 들어, 11개월 저장시킨 10 ppm의 소포로리피드는 새로 추출한 소포로리피드의 90%의 적조생물 저해 효과를 보였다. 증류수에 녹인 소포로리피드는 바닷물에 녹인 소포로리피드 보다 낮은 저해효과를 보였다

(나) 다양한 적조생물에 대한 저해효과

소포로리피드의 최적 저장상태를 위의 실험 결과에 의해 얻었다. 그리고 3종의 적조생물을 저해하는 소포로리피드 농도와 시간을 알 수 있었다. 그림 5-1-7은 3종의 적조생물을 저해하는 최적조건인 10ppm의 소포로리피드 농도에서 15분간 노출시 90%의 운동성이 저해되는 것을 보이고 있다.

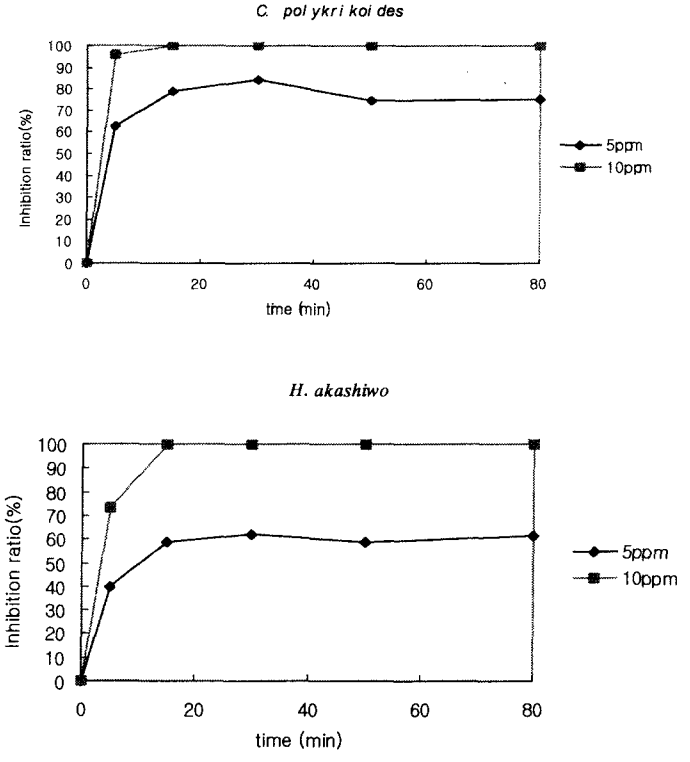
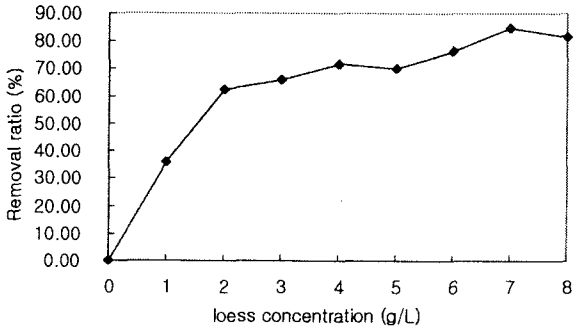


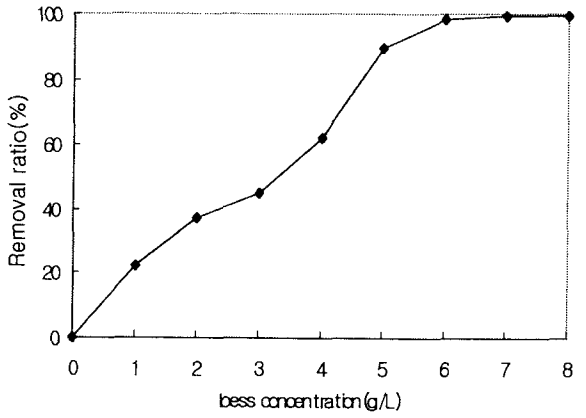
Fig. 5-1-7 다양한 적조생물에 대한 소포로리피드의 저해효과

(다)적조생물의 황토에 의한 제거효과

Fig. 5-1-8은 황토의 농도에 대한 적조생물의 제거효과를 보이고 있다. 결과에 의하면 두 종 모두 80%이상의 적조생물 제거 효과를 보이기 위하여 5g/L이상의 황토가 필요하였다. 결과로 효율적인 적조생물의 제거를 위해서는 소포로리피드보다 더욱 많은 양의 황토가 필요 하였다.



Coagulation curve of loess on *C polykrikoides*



Coagulation curve of loess on *A tamarense*

Fig. 5-1-8 *C. polykrikoides* 과 *A. Tamarense*에 대한 황토의 저해효과

(라) 소포로리피드와 황토의 배합에 의한 저해 효과

소포로리피드와 황토의 적조생물 저해효과의 비교를 통하여, 소포로리피드는 높은 저해효를 보였지만 낮은 침강성을 보인 반면, 황토는 낮은 저해효과를 보인 반면 높은 침강효과를 보였다. 그래서 소포로리피드와 황토는 더욱 효과적일 것으로 여겨졌다. Fig. 5-1-9의 결과에 의하면 *C. polykrikoides*와 *A. tamarense*종의 경우에, 1g/L의 황토를 처리한 시료의 상등액에서의 총 균수는 1000-3700 cell/ml이었지만 5, 10ppm의 소포로리피드를 함께 처리한 대조구의 경우에는 100,500cell/ml의 결과를 보였다. 이는 두 종에서 모두 90%이상의 적조생물 제거효과를 보인 것이었다. 그러므로, 소포로리피드와 황토의 배합은 효과적인 적조생물 제거효과를 보였으며 황토의 양을 줄일 수 있었다. 소포로리피드와 황토의 최적 배합 조건은 *C. polykrikoides*의 경우에는 1g/L의 황토에 5ppm의 소포로리피드를 첨가한 경우였고, *A. tamarense*의 경우에는 1g/L의 황토에 10ppm의 소포로리피드를 첨가한 경우였다.

(마) 침강성 조사

침강성 조사는 대조군, 소포로리피드, 황토, 소포로리피드와 황토의 배합 등의 4개의 실험군을 만들어 조사 하였다. 제작된 침강튜브의 4곳(0,30,60,90cm)에서 시간에 따른 적조생물 수를 측정 하였고, 황토와 황토-소포로리피드배합의 두 실험군에서 확산된 물질의 농도를 측정 하였다. 그림 5-1-10에 따르면, *C. polykrikoides*의 경우에 대조군에서 sampling을 취한 4곳에서 거의 비슷한 농도로 분포 하였다. 5ppm의 소포로리피드와 1g/L를 사용한 각각의 실험군에서 1시간동안 점차적인 침강효과가 표면에서 나타났다. 하지만 그후 표면에서 미생물수가 점차 증가 하였다. 이와는 상이하게 황토-소포로리피드가 배합된 실험군에서는 30분, 150분이 지난 후에도 표면에 어떤 미생물도 관찰할 수 없었고, 150분후 30cm 지점에서도 매우 적은 농도의 미생물이 분포하고 있었다. 이는 적조현상을 효과적으로 제거함을 나타내는 결과 였다. Fig. 5-1-11은 침강상태동안 황토, 소포로리피드, 적조생물등의 총 농도를 보이고 있다. 결과에 의하면, 황토의 침강실험에서 처음 30분동안은 급격한 침강을 보였고 그후 거의 일정함을 보이고 있다. 바닷물에서 황토의 빠른 침강효과는 소포로리

피드가 첨가된 경우에도 변하지 않았다. Fig. 5-1-12과 5-1-13은 *A. tamarense*의 경우역시 *C. polykrikoides*와 유사한 침강효과를 나타냄을 보이고 있다. 황토만을 사용한 경우 150분이된 시점에서 30㎝지점의 미생물이 많이 관찰 되었다. 하지만 황토와 소포로리피드를 혼합하여 사용한 경우에는 30㎝지점에서 어떤 미생물도 관찰하지 못하였다. 이는 두종, *C. polykrikoides, A. tamarense* 모두에서 황토와 소포로리피드를 배합하여 사용하였을 경우 더욱 효과적인 침강효과를 나타냄을 보이는 것이었다.

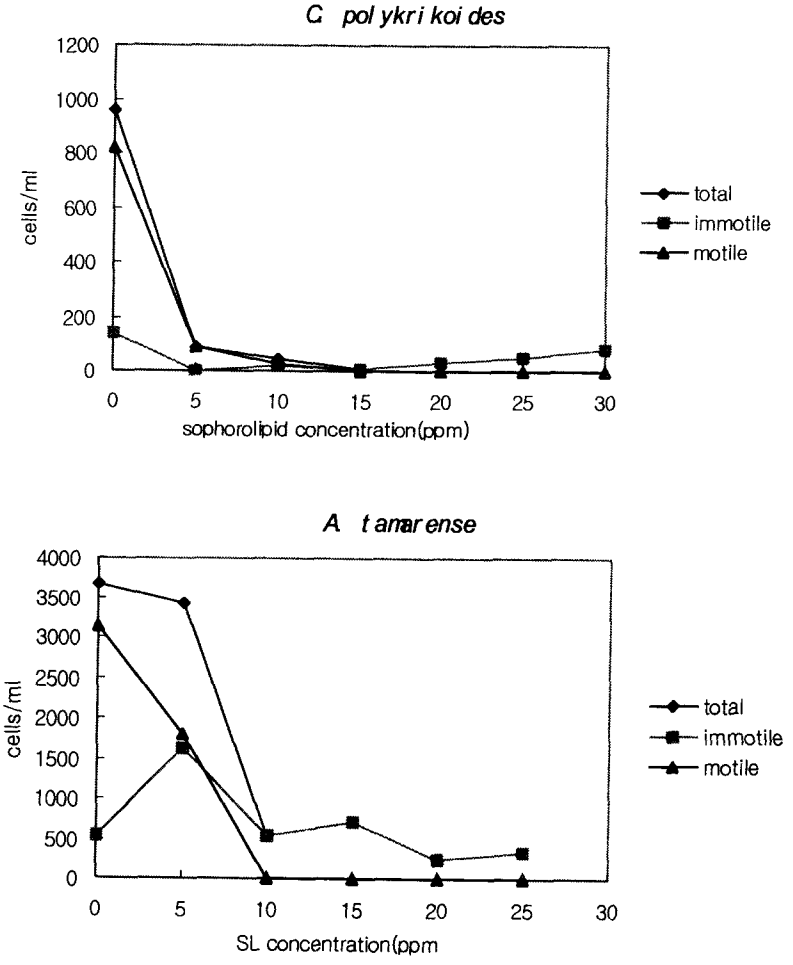
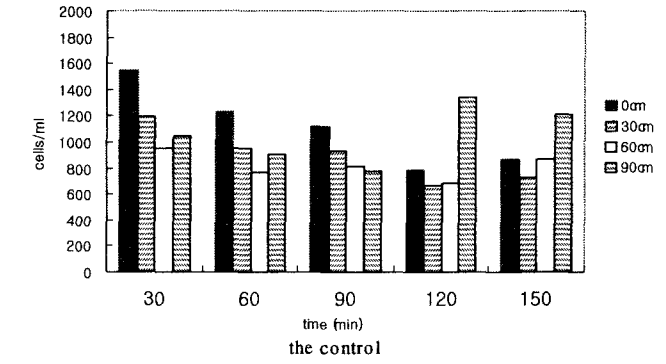
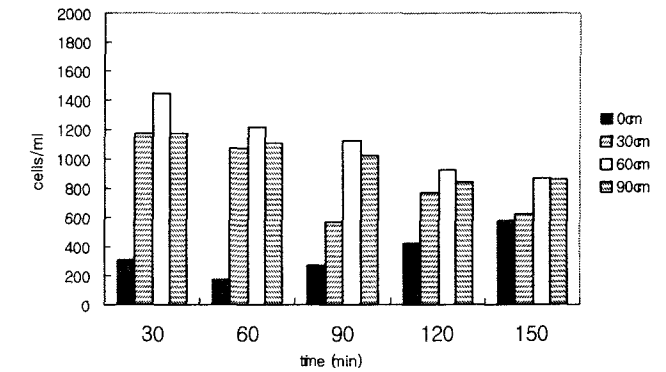


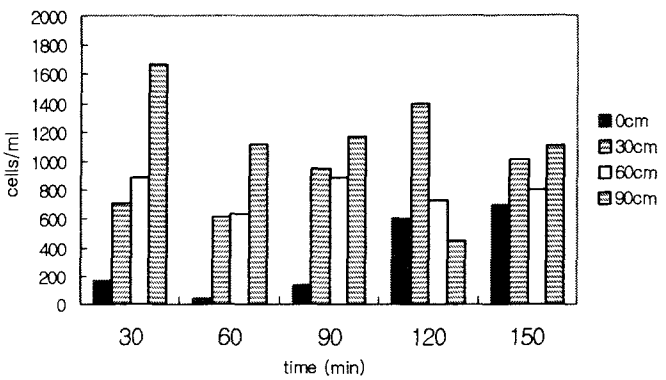
Fig. 5-1-9 소포로리피드와 황토의 배합에 의한 저해효과(Loess concentration: 1g/L)



the control



SL 5ppm



Loess 1g/L

Fig. 5-1-10 Sedimentation test of sophorolipid, loess and their combination on *C. polykrikoides*

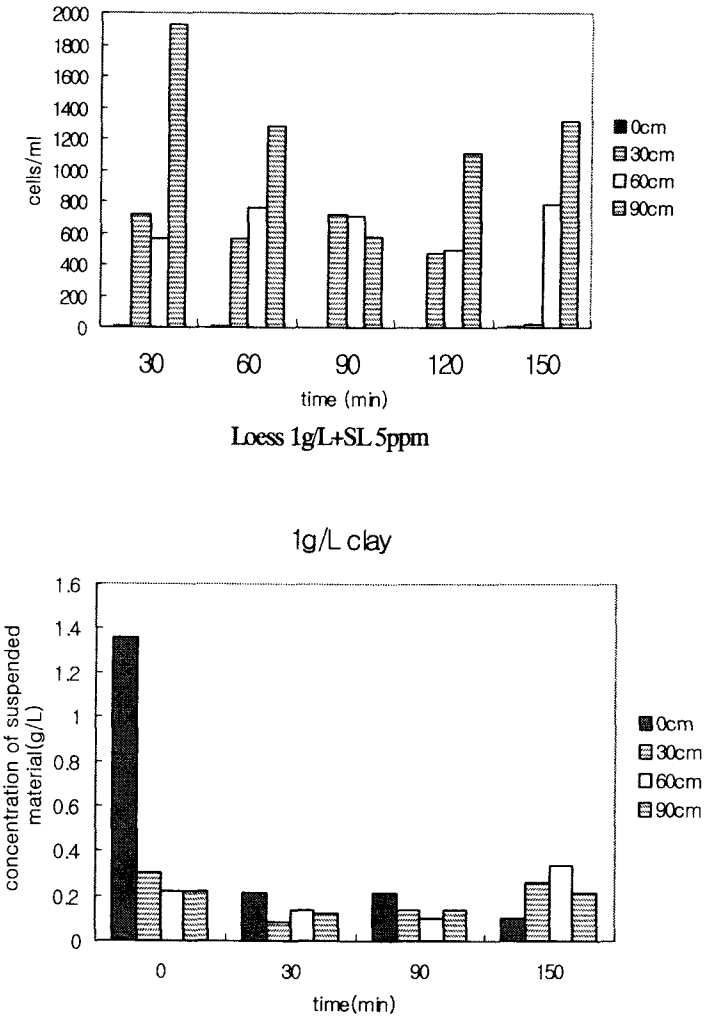


Fig. 5-1-11 Change on suspended material during the sedimentation of *C. polykrikoides*

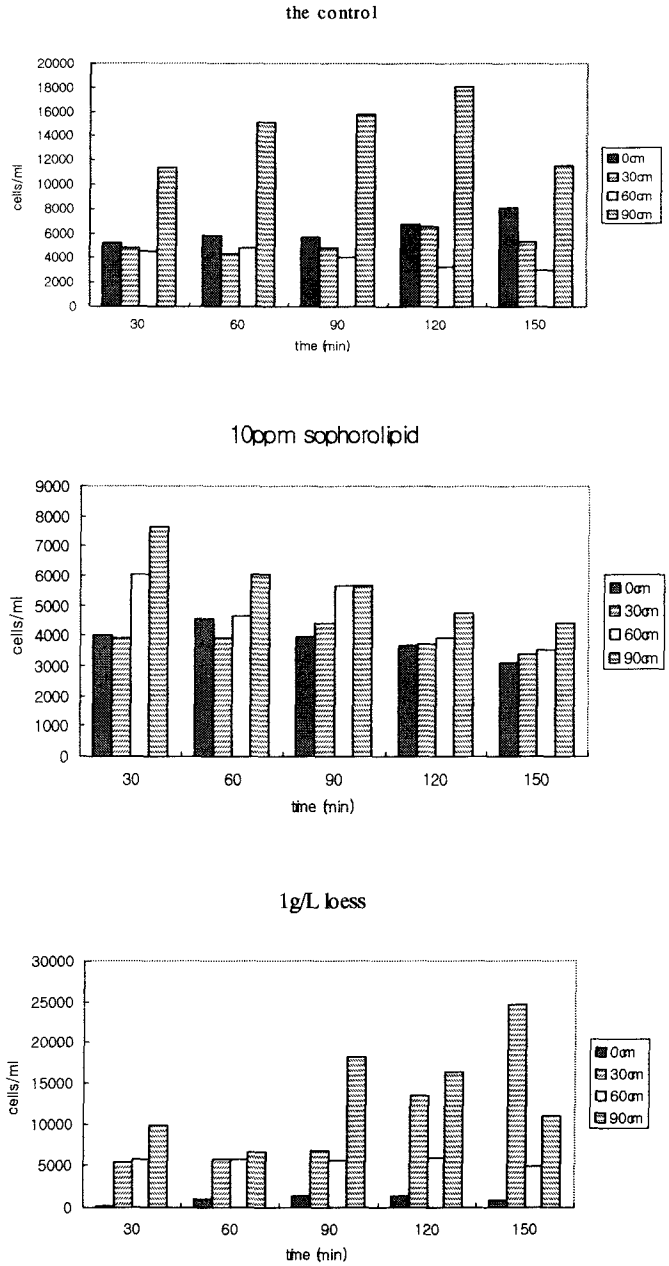


Fig. 5-1-12 Sedimentation test of sophorolipid, loess and their combination on *A. tamarens*

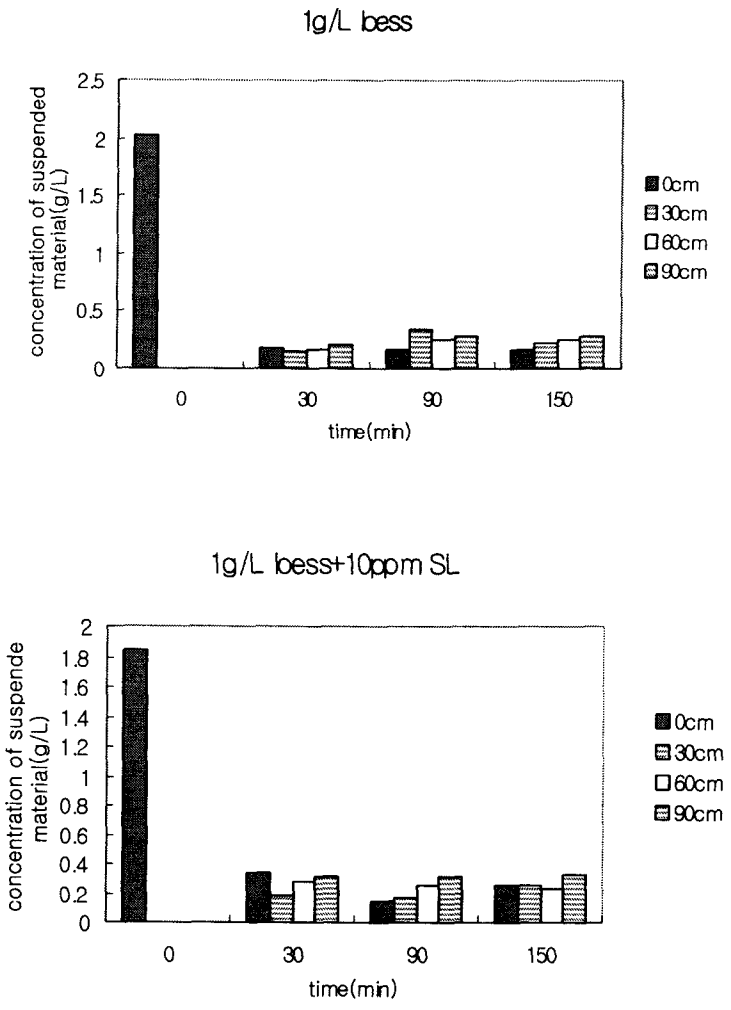


Fig.5-1-13 Change on the concentration of suspended material in the sedimentation of *A. tamarense*

(바) 소포로리피드, 황토-소포로리피드 배합의 적조생물 저해효과 비교

Table 5-1-3 Comparison on the removal effect of sophorolipid, loess and their combination

HAB organisms	Loess (1g/L)	Sophorolipid*	Loess+sophorolipid
C. polykrikoides	36%	79% (5ppm)	96%
A. tamarense	22%	86% (10ppm)	90%

* The values for sophorolipid represent the motility inhibition ratio on algal cells

Table 5-1-4 The concentration of loess, sophorolipid and their combination at the removal ratio (motility inhibition ratio for sophorolipid) of 90%

HAB organisms	loess	Sophorolipid	Loess+sophorolipid
C. polykrikoides	>6g/L	10ppm	1g/L+5ppm
A. tamarense	5g/L	10ppm	1g/L+10ppm

Table 5-1-3과 5-1-4는 소포로리피드와 황토-소포로리피드 배합의 저해효과를 비교한 결과이다. 두 표에서는 황토를 사용한 적조생물 제거효과가 낮은 농도의 소포로리피드를 첨가하였을 경우 급격히 상승됨을 보이고 있다. Table 4-2에 따르면 소포로리피드의 첨가에 의해 황토의 농도를 줄일 수 있고, 이로 인해 적조생물 제거에서 황토의 단점을 극복할 수 있었다.

2. 적조발생 해역에 생리활성물질 적용시 나타나는 적조구제 효과 평가

가.침전관 실험

(1) 재료 및 방법

(가) 연구 장소

2002년 8월 남해 통영 적조발생 현장에서 실험이 수행되었다(Fig.5-2-1).

(나) 유해성 적조생물

해수 샘플의 현미경 분석 결과 20종 이상의 유해성 적조생물이 출현하였으며 와편모류 *Cochlodinium polykrikoides*와 규조류 *Skeletonema costatum* 이 95% 이상의 밀도로 우점하였다. *C. polykrikoides*와 *S. costatum*in 이 표층에서 3000cells/ml~20000cells/ml로 나타났으며 이에 따라 침강성 실험을 두 종에 대하여 수행하였다.

(다) 재료

sophorolipid는 위에 설명된 대로 실험실에서 생산한 것을 사용하였고 황토는 통영으로부터 준비하였다.

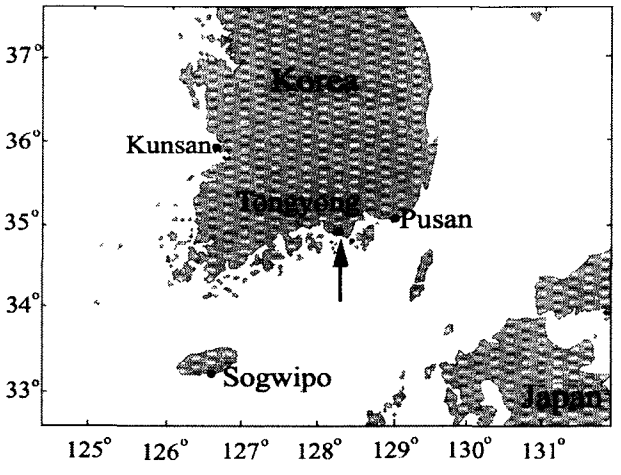


Fig. 5-2-1 Station map showing the site of in situ sedimentation test

(라) 현장에서의 침강성 실험

본 실험을 위해 길이 5m, 직경 10cm로 부피가 40L 되는 관을 4개 사용하였다. 각각의 관은 Group 1을 대조구로 하였으며 Group 2를 10g/L loess로, Group 3을 1g/L loess+5mg/L sophorolipid로, Group 4를 20mg/L sophorolipid로 하였다. 4개의 관을 하나로 묶어 적조발생 현장에 넣고 황토와 sophorolipid를 표층에서 첨가하여 최종 농도가 위에 제시된 대로 되도록 하였다. 샘플은 수심 1m, 3m, 5m에서 얇은 latex 튜브로 연결된 주사기로 시간별로(첨가 후 30분, 45분, 60분)채취되었다. 샘플은 루골용액으로 고정되었으며 1ml을 취하여 현미경 하에서 계수되었다.

(2) 결과 및 고찰

(가) *C. polykrikoides* 의 침강성

*C. polykrikoides*의 침강성 실험 결과를 Fig. 5-2-2에 나타냈다. 대조구에서는 1시간동안 개체수의 변화가 크지 않았다. 3가지 실험구에서는 수심 1m에서 30분 후에 50% 이하로, 45분 후에는 20%로 개체수가 감소했으며 이는 세가지 실험구 모두 *C. polykrikoides* 에 대한 침강효과가 있음을 나타낸다. Group 3에서는 30분 후 수심 3m에서 Group 2보다 조금 높은 개체수가 나타난 것을 제외하면 전 실험기간동안 가장 낮은 세포 농도가 나타났다. 또한 Group 3에서 60분 후 수심 1m와 3m에서 *C. polykrikoides*가 관찰되지 않아 *C. polykrikoides*이 가장 빠르게 완전히 침강하였음을 보여준다. 위 결과는 실험실 실험으로부터 얻어진 결론과 일치하는 것이며 유해성 적조 구제에 sophorolipid와 황토가 시너지 효과가 있음을 증명한다.

(나) *S. costatum*의 침강성

적조발생 해역에서 또 다른 우점종인 *S. costatum*은 *C. polykrikoides*보다 6~8배 많은 개체수를 나타냈다. Fig. 5-2-3에서 볼수 있듯이 *S. costatum*도 sophorolipid와 황토를 혼합하여 살포했을 때 가장 큰 침강효과를 나타냈다. 4개의 Group 중 Group 3에서 가장 높은 침강효과가 나타났고 이는 sophorlipid와 황토의 혼합살포가 규조류에 대해 저해에서 효과가 있음을 증명한다. 위 두 종에 대한 결과로

sophorolipid와 황토는 혼합하여 사용하였을 때 보다 적은 농도로 높은 저해 효과를 볼 수 있음이 나타났다. 황토의 농도는 10g/L에서 1g/L로 감소하여 단지 10%만 사용하였고 sophorolipid의 경우 20mg/L에서 5mg/L로 그 사용 농도가 75% 감소하였다. 게다가 1g/L 황토와 5mg/L sophorolipid 혼합으로 그 침강 효과는 10g/L 황토, 20mg/L sophorolipid만을 사용한 경우보다 증가하였다. 위와 같은 시너지 효과에 대한 매커니즘은 크게 두 가지 부분이 있다. 하나는 sophorolipid는 적조생물의 운동성을 저해하며 따라서 황토에 의하여 쉽게 흡착된 적조생물의 운동에너지를 감소시키고 침강시켜 다시 회복되지 못하게 하는 것이다. 또 다른 하나는 흡착 과정으로써 황토 입자와 조류세포 사이에 electrostatic과 Van der waals가 상호작용 하는 것이다. 황토표면에 sophorolipid가 흡착하여 표면 전하의 분포를 변화시키고 황토 입자의 직경을 증가시킨다. 따라서 황토입자와 적조생물 사이에 응집이 촉진되는 것이다.

(다) 비용

비용은 적조 구제물질로써의 효과와 환경 수용성 외에 적조구제에 실제 사용하기 위한 중요한 요인이다. Table 5-2-1에 황토와 sophorolipid, 그 둘의 혼합물에 대한 비용을 나타냈다. 황토의 경우 기본적으로 재료비와 운반비, 살포비와 저장비를 포함한다. sophorolipid는 200Kg sophoropid/1 ton reactor/7 days culture 생산을 기초로 하였을 때 생산 규모를 10 ton reactor로 한다면 그 비용을 반으로 줄일 수 있게 된다. Table 3에서 보여지듯이 sophorolipid와 황토의 혼합은 각각 황토만 사용했을 때의 28.6%, sophorolipid만 사용했을 때의 40%의 비용이 소요된다. 그러므로 sophorolipid와 황토의 시너지 효과는 적조생물의 침강성에서 뿐만 아니라 적조 구제비용에서도 나타난다.

Table 5-2-1. Cost estimation on three HABs mitigation methods

Methods	Loess	Sophorolipid	Loess+Sophorolipid
Optimum concentration	10g/L	20mg/L	1g/L+5mg/L
Unit price ($/kg)	0.014	5.36	-
Mitigation cost ($/m^3)	0.14	0.1	0.04

결론적으로 현장에서의 침강성 실험은 실험실 실험에서 나타난 sophoropid와 황토의 혼합에 시너지 효과가 있음을 증명한다. 현장 침강성 실험에 기초하여 두가지 HABspecies에 대한 결과와 비용 측정, sophorolipid와 황토의 혼합살포는 유해성 적조구제에 큰 가능성을 보여준다. 따라서 이것이 새로운 적조구제 방법으로 발전되고 적용되기를 기대해 볼 수 있겠다.

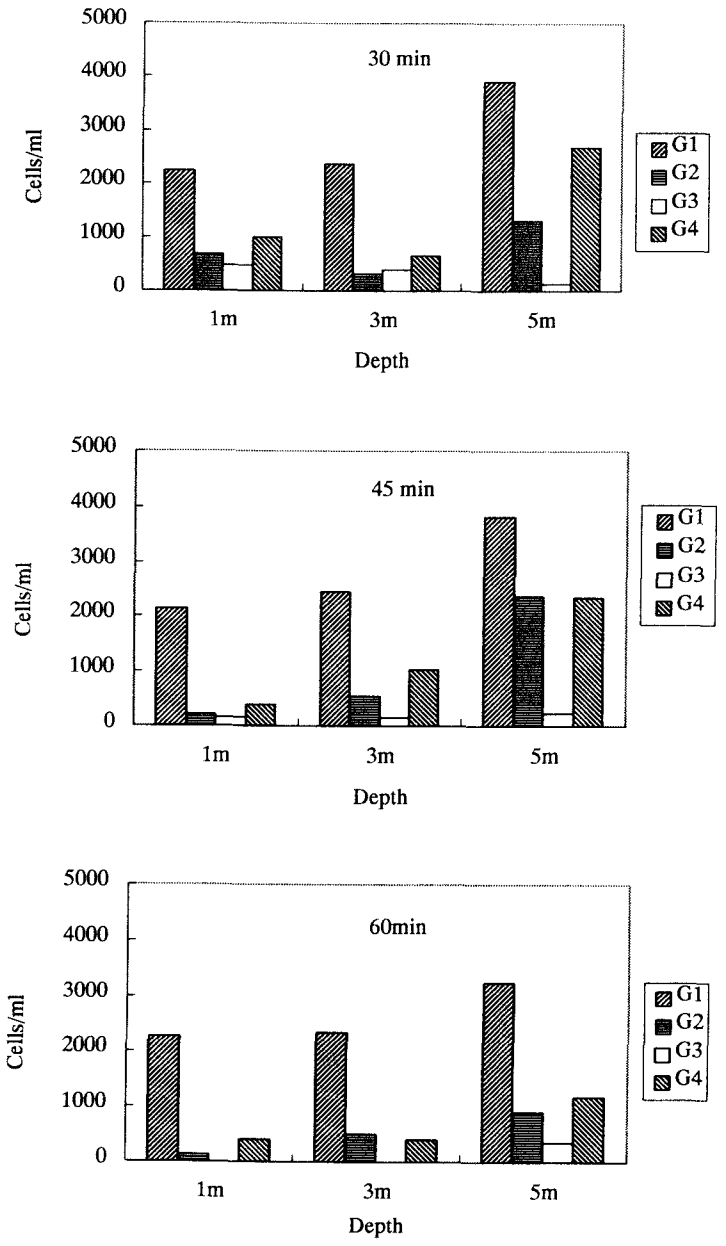


Fig. 5-2-2 Sedimentation test on *C. polykrikoides*

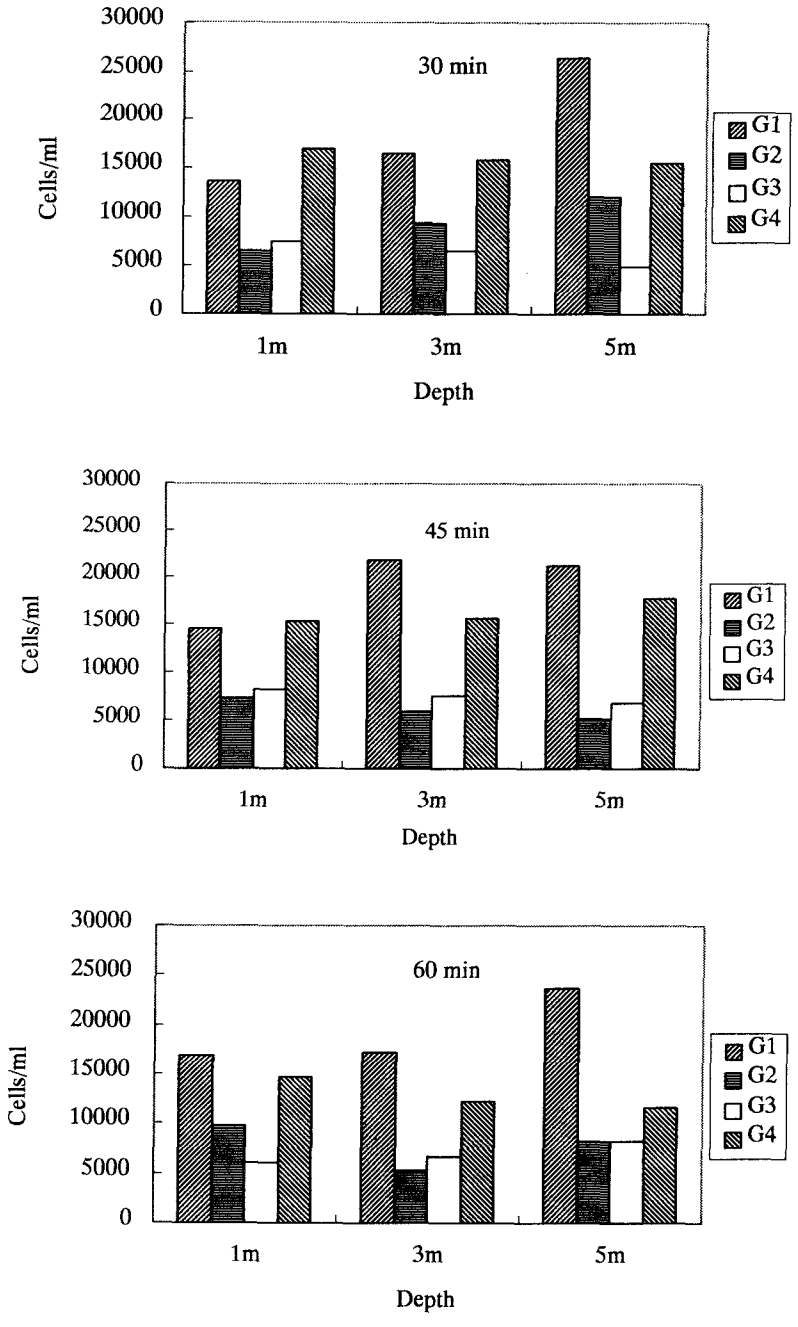


Fig. 5-2-3 Sedimentation test on *S. costatum*

나. 메소코즘, 현장살포 실험

(1) 목적

앞선 연구에서 나타난 결과에 따라 황토를 사용한 적조생물의 높은 침강효과와 낮은 저해효과, sophorolipid를 사용한 적조생물의 높은 저해효과와 낮은 침강효과를 상호보완하기 위하여 황토와 sophorolipid를 혼합하여 사용시 높은 적조구제효과가 있음이 증명되었다. 이에 따라 황토와 sophorolipid를 혼합하여 사용했을 때 실제 적조발생 현장에서 나타나는 적조구제효과를 평가하기 위하여 2002년 8월 *Cochlodinium* 적조가 발생한 통영시 미륵도에서 현장실험을 수행하였다. (Fig. 5-2-4).

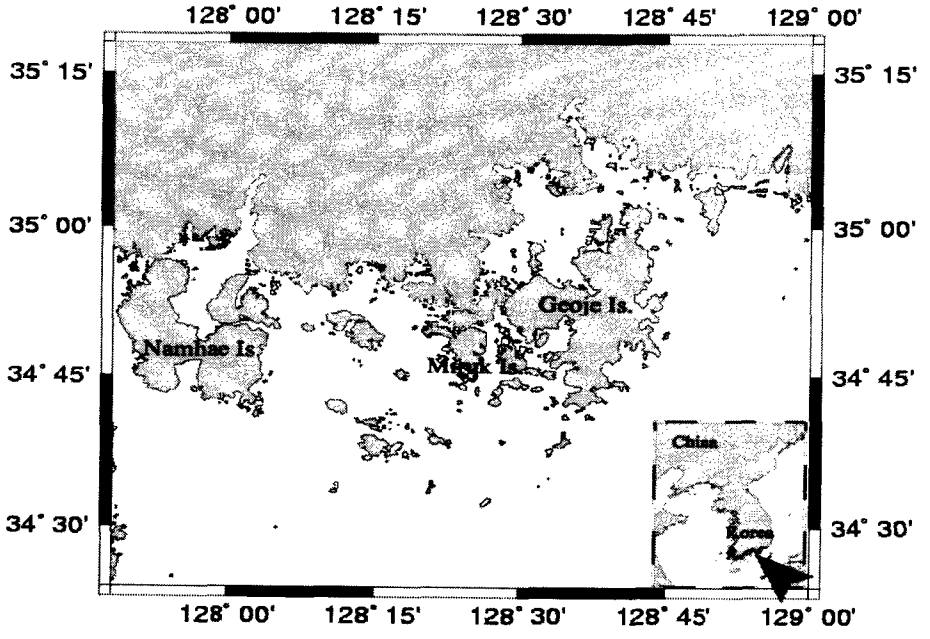


Fig. 5-2-4 적조현장실험 수행지역

(2) 실험재료 및 방법

(가) Mesocosm 실험

반폐쇄형 폐쇄생태계인 mesocosm은 5㎛의 망목을 가진 Nybolt 스크린으로 만들었다. mesocosm의 규격은 직경이 1.2m이고 높이가 3m인 원통형 모양이며 용량은 3.39㎥가 되게 제작하였다. 실험은 mesocosm을 부두에 고정한 후 적조생물이 밀집한 수괴를 채운 후 이루어졌다. mesocosm중 하나에는 sophorolipid와 황토를 혼합하여 넣은 후 표층에서의 시간에 따른 적조생물의 개체수와 일차생산력 변화를 조사하였으며 다른 mesocosm에는 황토를 넣어 실험을 수행하였다.

(나) 현장살포실험

황토, 황토와 sophorolipid 혼합물질을 적조발생 현장에 직접 살포하였을 때 적조구제 효과를 알아보기 위하여 현장살포실험을 수행하였다. 황토살포는 국립수산과학원 황토살포장비를 이용하였다. *Cochlodinium* 적조가 발생한 현장에 각각의 적조구제물질을 20m×20m 면적에 일정농도(Table 5-2-1)로 살포한 후 시간에 따른 표층, 중층, 저층에서 적조생물의 개체수와 chlorophyll-a 농도를 조사하였다. chlorophyll-a 농도는 phaeo-pigment로 보정하여 계산하였다.

(3) 결과 및 고찰

(가) Mesocosm 실험

1)*Cochlodinium polykrikoides*의 개체수 변화 실험

황토 1g/l와 sophorolipid 5mg/l를 혼합하여 mesocosm에 넣고 시간에 따른(첨가전, 첨가직후, 첨가후 15분, 30분, 60분) *Cochlodinium polykrikoides*의 개체수 변화를 관찰한 결과를 그림 5-2-5에 나타냈다. 초기 적조구제물질을 넣기 전 1,554cells/ml의 개체수가 나타났고 적조구제물질 첨가 직후 1,341cells/ml로 다소 감소함을 나타냈다. 15분 경과후 306cells/ml로 약 80%의 개체수 감소를 나타냈으며 60분 경과후에는 78cells/ml로 95%의 개체수 감소를 보였다. 황토 10g/l를 넣은 mesocosm에서 시간에 따른 *Cochlodinium polykrikoides*의 개체수 변화를 관찰한 결과를 Fig.에 나

타냈다. 초기 453cells/ml의 개체수가 나타났고 황토첨가 직후 개체수 감소가 나타나 60분 후에는 126cells/ml로 70%의 개체수 감소를 나타내 황토와 sophorolipid를 혼합하여 넣은 실험구보다 낮은 적조구제 효과를 보였다.

2) 일차생산력실험

황토와 sophorolipid를 각각 1g/l, 5mg/l가 되게 혼합하여 첨가해준 mesocosm에서 시간경과별로 채수한 해수의 C-14 incorporated(dpm) 변화 결과를 그림 5-2-6(a)에 나타냈다. 1시간 배양 결과 적조구제물질 살포 직전에 1536dpm으로 나타났고 살포 후 지속적으로 감소가 나타나 60분 후에는 191dpm으로 87% 감소하였다. loess를 첨가해준 mesocosm에서는 첨가 직전에 243dpm, 60분 경과 후 26dpm으로 89% 감소하여 혼합하여 첨가해준 실험구와 비슷한 감소효율을 보였다(Fig. 5-2-6(b)).

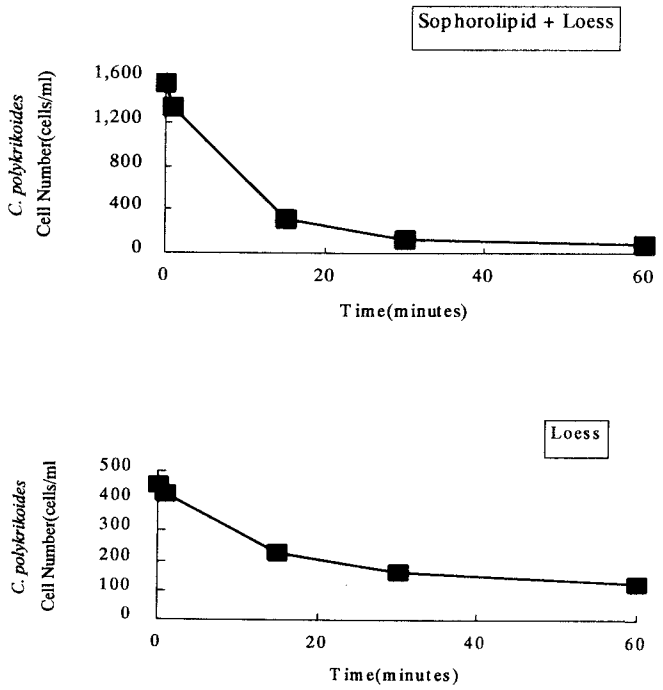


Fig. 5-2-5 적조구제물질에 의한 *C. polykrikoides*의 개체수 변화

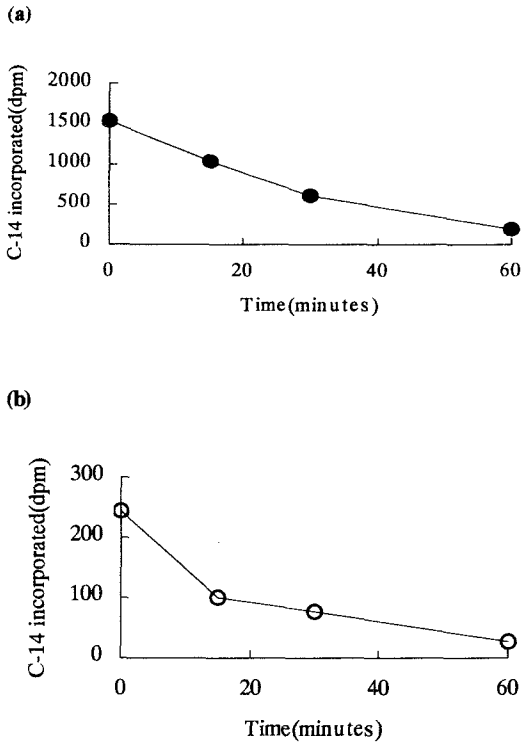


Fig. 5-2-6 적조구제물질에 의한 C-15 incorporated 변화
(a)sophorolipid 5㎎/L + loess 1g/L (b) loess 10g/L

(나) 현장살포

1) *Cochlodinium polykrikoides*의 개체수 변화 실험

황토살포장비를 이용하여 고밀도로 *Cochlodinium* 적조가 발생한 해역에 접근하였다. 20m×20m의 수역에 황토 1g/l와 sophorolipid 5㎎/l를 혼합하여 살포한 후 표층, 중층, 저층에서 시간에 따른(첨가전, 첨가후, 15분, 30분) 개체수 변화를 관찰하였다(Fig. 5-2-7(a)). 초기 표층에서의 *Cochlodinium* 적조발생 밀도는 2,249cells/ml였으며 혼합물질 첨가 직후 1,301cells/ml로 42% 감소효과를 나타냈고 30분 후에는 95%의 감소효과를 보였다. 중층과 저층에서는 *Cochlodinium* 이 극미량 관찰되었다.

위와 같은 방법으로 황토를 10g/l 농도가 되게 살포한 후 시간에 따른(첨가전, 첨가후, 15분, 30분, 60분) 개체수 변화결과를 그림 5-2-7(b)에 나타냈다. 초기 표층에서 *Cochlodinium* 1,200cells/ml가 관찰되었으며 황토 살포 직후 740cells/ml로 38% 감소하였다. 30분후에는 258cells/ml로 78%의 감소효과를 보여 황토와 sophorolipid를 혼합하여 살포한 결과보다 그 효과가 낮은 것으로 나타났다. 60분 후에는 450cells/ml로 개체수가 증가되어 나타났으며 이는 시간이 지남에 따라 주변해수와 혼합된 결과라고 사료된다.

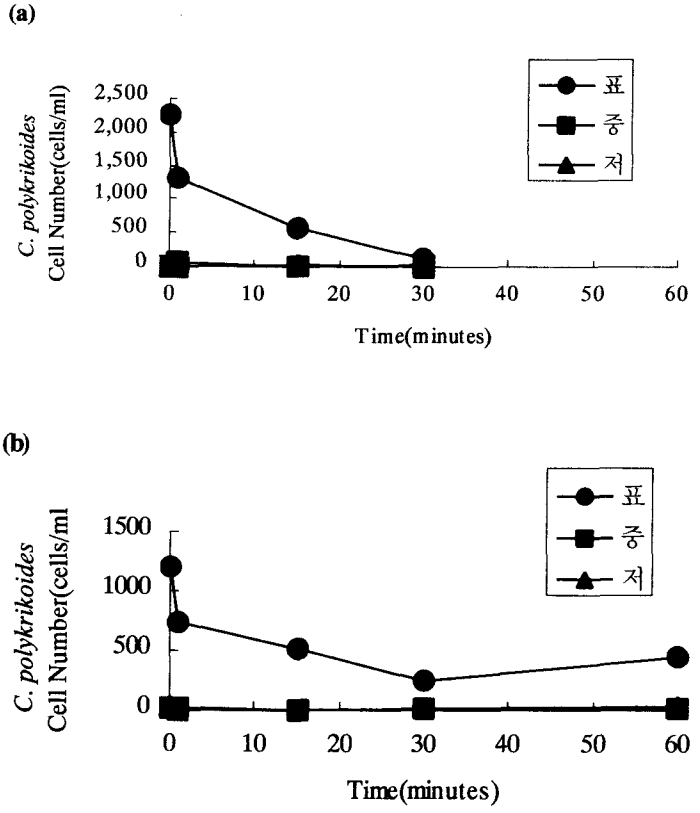


Fig. 5-2-7 적조구제물질에 의한 *C.polykrikoides*의 개체수 변화

(a)sophorolipid 5mg/L + loess 1g/L (b)loess 10g/L

2) chlorophyll-a 농도 변화 실험

loess와 sophorolipid를 혼합하여 살포한 경우 첨가 전 표층에서의 chlorophyll-a 농도가 3.62ug/l였으나 첨가 직후 0.51ug/l로 85%의 높은 제거효율을 보였으며 30분 후에는 0.25ug/l의 농도로 93%의 제거효과를 나타냈다(Fig. 5-2-8 (a)).

chlorophyll-a 농도에 의한 적조 제거효율이 개체수 변화실험 결과보다 높게 나타난 것은 chlorophyll-a 농도 측정시 phaeo-pigment를 측정하여 보정해 주었기 때문에 lysis가 진행되고 있는 많은 세포들이 phaeo-pigment로 반영되었기 때문인 것으로 사료된다. 중층과 저층에서는 개체수 변화실험에서와 같이 낮은 chlorophyll-a 농도를 나타냈다.

sophorolipid는 *Cochlodinium* 종의 세포막에 영향을 주어 삼투현상을 일으켜 세포를 비정상적으로 부풀어 오르게 하여 세포가 lysis되는 결과를 가져오는 것으로 사료된다. 그러나 sophorolipid를 적조가 발생한 현장에 살포하였을 경우 표층에서 잘 가라앉지 않는 특성이 있어 그 영향이 표층에 그쳐 보다 효과적인 적조구제효과를 위해 소량의 황토와 혼합하여 살포하였다. 황토와 sophorolipid를 혼합하여 살포하였을 경우 sophorolipid가 황토 입자에 달라붙어 침강하며 적조생물에 영향을 주어 보다 높은 적조구제효과가 나타났다.

황토 10g/l의 농도가 되게 첨가한 현장살포 실험에서 살포 후 30분 개체수가 78% 감소한 반면(Fig. 5-2-8(b)) 황토 1g/l와 sophorolipid 5mg/l의 농도가 되게 첨가한 실험에서 같은 시간 후 95%의 개체수 감소를 보였다. 황토만을 사용했을 경우보다 살포량이 10분의 1이 감소하였고 소량의 sophorolipid를 첨가한 결과 적조생물 제거효과는 17%가 높았다. 이는 앞서 수행된 실험실 실험과 관을 사용한 현장 침강성 실험의 결과와 일치하는 것으로 sophorolipid와 황토의 혼합 살포는 유해성 적조 구제에 높은 효과가 있는 것으로 판단된다.

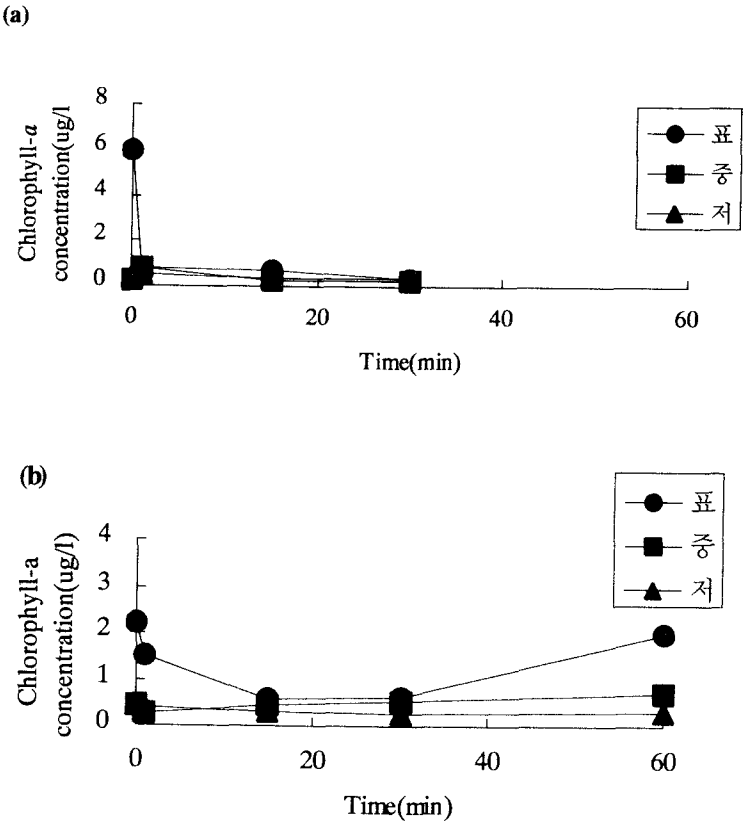


Fig. 5-2-8 적조구제물질에 의한 chlorophyll-a 농도변화
(a)sophorolipid 5mg/L + loess 1g/L (b)loess 10g/L

3. 적조발생 해역에 서식하는 기타 생물들에 대한 영향성 평가

가. 해양 부유생물에 대한 영향 평가

(1) 목적

적조구제를 위하여 sophorolipid, 황토등을 살포하였을 경우 부유생물에 미치는 영향을 알아보기 위하여 *Cochlodinium* 적조에 대한 현장살포 실험, 메소코즘 실험과 동시에 동물플랑크톤과 박테리아의 개체수 변화 실험을 수행하였다.

(2) 실험 재료 및 방법

(가)해양 부유생물의 개체수 변화

1) 동물플랑크톤

동물플랑크톤은 원추형 네트(망목 100㎛)를 이용하여 수심 3m 에서 3회 수직 예인하여 채집하였다. 채집된 동물플랑크톤은 중성 포르말린으로 시료 내 최종농도가 4%가 되도록 고정하였다. 계수를 위해 채집된 동물플랑크톤 시료는 Bogorov 계수 챔버로 옮겨진 후 해부현미경 하에서 계수되었다.

2) 박테리아플랑크톤

박테리아플랑크톤은 Niskin 채수기로 표층해수를 채수하여 중성 포르말린으로 시료 내 최종농도가 2%가 되도록 고정하였다. 계수를 위한 slide를 제작하여 Nikon 형 광현미경(×1000)하에서 박테리아플랑크톤의 개체수를 계수하였다.

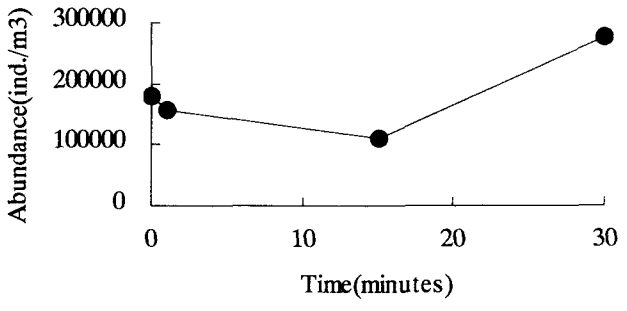
(3) 결과 및 고찰

(가) 동물플랑크톤

sophorolipid와 황토 첨가 후 시간에 따른 동물플랑크톤의 개체수 변화를 Fig. 5-3-1 (a)에 나타냈다. 적조발생 현장에서 동물플랑크톤 개체수는 10만~100만 ind./m^3로 매우 높게 나타났으며 이중 *Noctiluca scintillans*의 우점도가 90% 이상인 것으로 나타났다. 살포 직전 동물플랑크톤 개체수는 180,360ind./m3로 나타났고 살포 직후 157,525ind./m3으로 나타나 소량 감소하였으며 15분 후 112,380ind./m3으로 지속적으로 감소하나 30분 후 276,921ind./m3으로 크게 증가하여 동물플랑크톤의 개체밀도가 높은 주변해수가 유입된 결과로 판단된다. 황토를 살포하였을 때 시간에 따른 동물플랑크톤의 개체수 변화를 Fig. 5-3-1 (b)에 나타냈다. 살포 직전 1,037,771ind./m3의 개체수가 나타났으며 살포 직후 645,494ind./m3, 살포 후 30분 경과 후 340,300ind./m3으로 감소하나 1시간 후 584,238ind./m3으로 증가하여 주변 해수와 희석되었음을 나타낸다.

위 현장실험 결과에서 황토살포실험에서 30분후 67%의 동물플랑크톤 개체수 감소가 나타났으며 loess와 sophorolipid의 혼합 살포실험에서 30분 후 38%의 개체수 감소가 나타나 sophorolipid에 의한 영향보다는 황토에 의한 침강이 동물플랑크톤 개체수 감소에 영향을 미치는 것으로 판단되며 그 영향은 시간이 지남에 따라 주변해수와 혼합되어 일시적으로 나타날 것으로 사료된다.

(a)



(b)

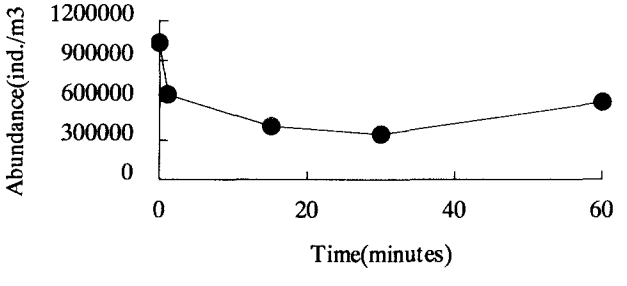


Fig. 5-3-1 적조구제물질에 의한 동물플랑크톤 개체수 변화
(a) sophorolipid 5mg/L + loess 1g/L (b) loess 10g/L

(나) 박테리아플랑크톤

앞서 수행된 메소코즘 실험과 동시에 박테리아플랑크톤의 시간에 따른 개체수 변화 결과를 Fig. 5-3-2 (a)에 나타냈다. 메소코즘에서 박테리아플랑크톤은 최소 912,529cells/ml, 최대 1,290,445cells/ml로 평균 1,056,936cells/ml로 나타났다. 시간에 따라 대조구와 각 실험구간의 일정한 경향성은 나타나지 않아 황토와 sophorolipid를 첨가한 메소코즘 실험 결과 첨가 후 1시간 이내에는 성장에 저해 영향이 미비한 것으로 판단된다.

현장살포실험에서도 마찬가지로 최소 1,401,005cells/ml, 최대 1,751,318cells/ml로 평균 1,611,904cells/ml로 나타나 대조구와 각 실험구간의 경향성이 나타나지 않았으며 위의 메소코즘 실험과 같은 결과를 보였다(Fig. 5-3-2 (b)).

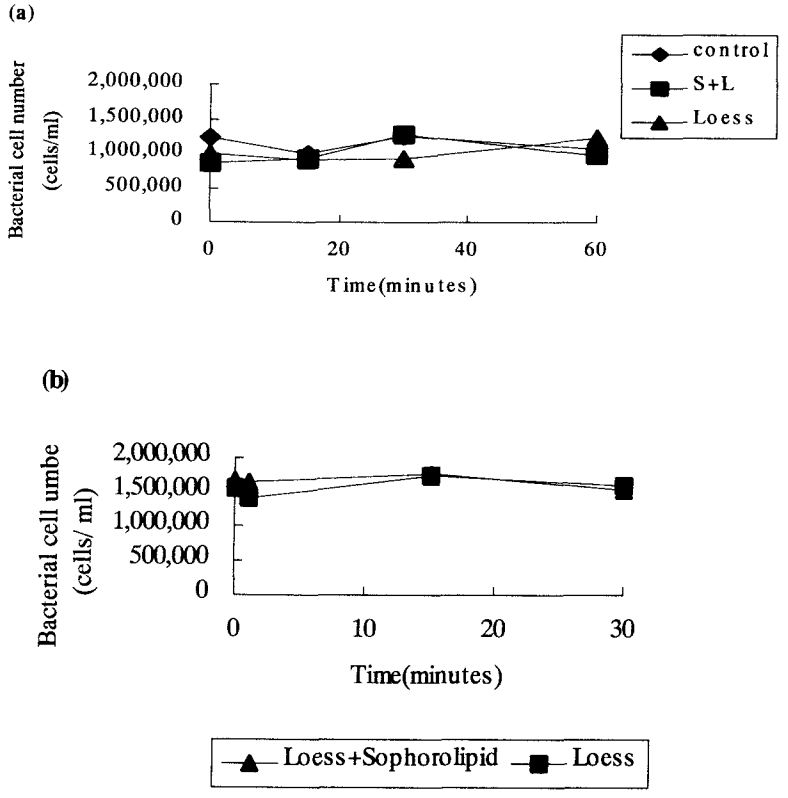


Fig. 5-3-2 적조구제물질에 의한 박테리아플랑크톤 개체수 변화

(a) mesocosm 실험 (b)현장살포 실험

결과적으로 황토와 sophorolipid를 혼합 살포하였을 때와 황토만을 살포하였을 때 동물플랑크톤의 개체수 감소가 나타나나 주변 해수와의 희석으로 그 영향은 일시적으로 나타나며 박테리아플랑크톤의 경우 적조구제물질 살포 후 1시간 이내에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. 또한 넓은 해역에 적조구제를 위하여 황토와 sophorolipid를 살포하였을 경우 황토의 침강성과 sophorolipid의 생분해성, 그리고 주변 해수와의 희석 효과로 인하여 적조 제거 후 이들 물질에 의한 해양생물에 대한 영향은 미약할 것으로 판단된다.

나. 어패류에 대한 영향 평가

(1) 목적

적조현상은 최근에 계절과 해역에 관계없이 빈번하게 발생하고 있으며, 발생해역 또한 남해안에서 우리나라 전국 연안해역으로 확산되고 있는 실정이다. 특히 유독종에 의하여 대량 발생되는 적조현상은 가두리 양식장에서 대규모로 어류폐사를 일으키기도 하며, 육상 양식장에서도 막대한 피해로 인해 어패류 양식생산에 치명적인 타격을 주고 있다. 이러한 적조의 피해를 막기 위하여 방제대책 방법이 여러 가지로 강구되고 있으며, 현재의 방제대책으로 고려되고 있는 것은 응집제, 황토, 산화물 등의 투여 또는 초음파 처리법, 천적 이용 등이 있고, 미생물에 의한 생물학적 방제도 검토되고 있다(石田, 1994; 박 등, 1998; 이와 박, 1998). 그러나 적조제거제가 수산생물에 미치는 영향에 관한 연구는 나 등(1996)의 부유황토에 의한 적조방제 연구에서 언급되었으며, 이외에는 극히 미약한 실정이다. 최근 미생물생산 생리활성물질인 Sophorolipid(Glyocolipid; GL)가 적조제거제로서 개발되어 적조발생 지역에 이용하고자 하므로 생물검정을 통해 수산 생물에 미치는 영향을 알아보고자 한다.

생물검정 실험은 수산어업 생물에 대한 오염물질이나 기타 유입되는 물질의 피해영향 유무와 정도를 파악하고 그런 물질들에 대한 수산어업생물들의 반응을 얻어내는데 필수적인 수단이라 할 수 있다.

현재 세계적으로 가장 광범위하게 사용되고 있는 수단으로는 표준 실내 생물검정 실험을 들 수 있다. 미국 환경청에서도 오염물질의 연안방출 허용한계농도를 결정하

는 데 실험생물의 아영향 및 반수치사농도를 결정하는 생물검정시험의 결과가 이용되고 있다.

적조생물이 제외된 환경인 실험실에서 적조제거제가 생물에 미치는 영향에 대한 실험은 수행되었고, 실제 적조 발생지역에서 적조생물을 첨가한 현장실험을 수행하여 실험실실험을 현장에서 적용하고자 한다. 이러한 현장실험을 수행하여 얻어진 결과를 실험실에서 얻은 결과와 비교하고 적조생물과 적조제거제가 조우하여 발생할 수 있는 다른 영향들을 알아보고자 한다.

(2) 실험 재료

(가) 실험어

2002년 8월 21일에서 8월 24일 사이에 실시한 현장실험에서는 조피볼락(*Sebastes schlegeli*을 사용하여 실험하였다. 조피볼락은 경상남도 통영 가두리에서 채집하였고 양식환경연구소 실험실로 운반하여 0.5 ton FRP 수조에서 관리하였다. 환수량은 1일 ½회전, 폭기는 200 mℓ/min로 하였다. 실험에 사용한 조피볼락의 개체체장(total length: TL)은 0.01mm까지, 건중량(dry weight: DW)은 어체를 증류수로 깨끗이 세척한 후, 80℃에서 24시간동안 건조시킨 후, 전자저울로 0.001 g까지 측정하여 Table 5-2-2에 나타내었다.

Table 5-2-2 Characteristics of *Sebastes schlegeli*

	Total length : mm	Dry weight : g
Sebastes schlegeli	86.00 ± 0.36	3.34 ± 0.69

(나) 적조생물

2002년 8월 21일에 통영 앞바다에 출현한 적조생물인 *Cochlodinium* 100 L를 채수하여 양식환경연구소 실험실로 운반하여 실험에 사용하였다. 실험은 *Cochlodinium* 4,000 cell/l의 조건 하에서 수행하였다.

(다) 실험수

본 실험에 사용한 생리활성물질인 GL은 인하대학교 생물공학과에서 만든 것으로 4 ℃ 냉장고에 보관중인 것을 사용하였으며, 황토(Loess)는 적조 발생시에 적조 제거제로 이용하는 GS 코페레이션사의 Natura-F를 사용하였다.

(3) 실험 방법

1) 적조제거제 혼합에 의한 생물검정 (반치사 농도)

현장실험은 조피볼락으로 실험을 하였고, 실험실에서의 실험과 동일한 방법으로 실험되었고, 다른 차이는 *Cochlodinium* 4,000 cell/l 가 첨가되었고 자연수온에서 실험이 수행이 되었다. 실험 농도구간은 혼합하였을 때 적조생물구제 효율이 가장 높은 구간(Loess 1,000 ppm+ GL 5 ppm)과 유사한 현상을 보이는 GL(20 ppm)과 Loess (10,000 ppm)의 농도 구간으로 실험을 하였고, 대조구와 비교하였다(Fig5-4-1).

Table 5-3 Concentration of experimental water

	1	2	3	4
Sebastes schlegeli	Control	Loess 10,000 ppm	G·L 20 ppm	G·L 5 ppm + Loess 1,000 ppm

Fig. 5-4-1 Experiment of *Sebastes schlegeli* mortality on field

2) 적조제거제 혼합이 실험생물의 산소소비에 미치는 영향

산소소비율은 밀폐유수식 방법을 사용하여 측정하였다. DO-meter(YSI 600XL)를 이용하여 30분마다 연속적으로 용존산소를 측정하였으며, 측정된 용존산소는 컴퓨터를 이용하여 연속적으로 관찰하였다(Fig. 5-4-2; Fig. 5-4-3). 관찰 된 결과들은 1시간 동안의 용존산소 전·후 값의 차를 계산하여 단위시간당으로 환산하여 표현하고, 표현방법은 단위중량(g)으로 환산한 후 계산하였다.

조피볼락과 넙치는 7시간 암흑 상태에서 측정을 하였다. 실험에 설정된 실험수의 농도 구간은 Table 2.2과 동일하고 반치율실험과 같이 *Cochlodinium* 4,000 cell/l가 첨가되었다.

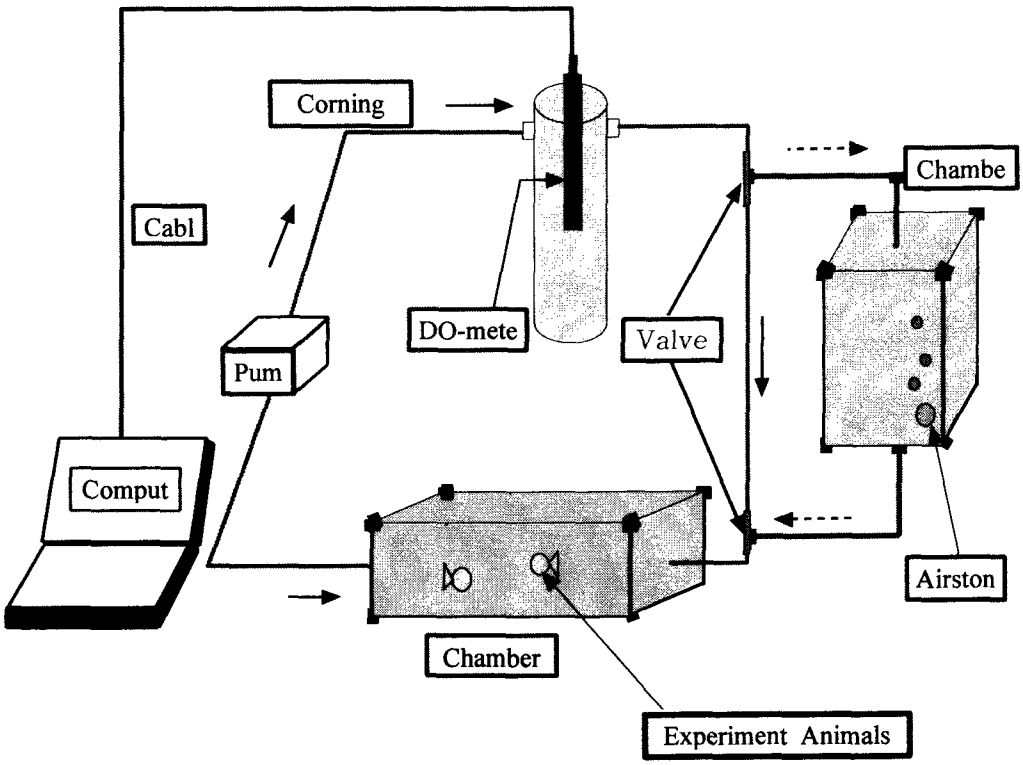


Fig. 5-4-2 Schematic drawing of respirometer system.

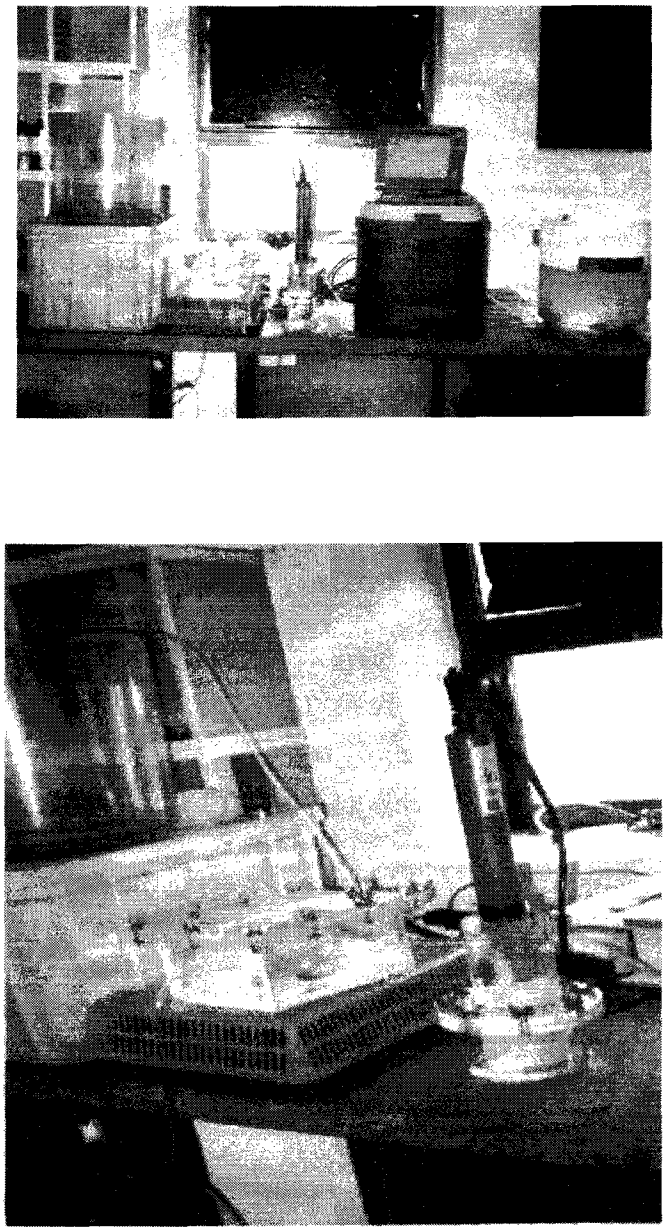


Fig. 5-4-3 Experiment of oxygen consumption of *Sebastes schlegeli* on field

(4) 결 과

(가) 적조제거제 혼합에 의한 생물검정(반치사 농도)

GL과 Loess에 의하여 적조생물로부터 구제하였을 때, 조피볼락 미치는 영향을 조사한 결과로써 혼합하였을 때, 적조생물구제 효율이 가장 높은 구간(Loess 1,000 ppm + GL 5 ppm)과 유사한 현상을 보이는 GL(20 ppm)과 Loess(10,000 ppm)의 농도 구간으로 실험을 하여 Table 5-4-1 나타냈으며, 사망한 개체를 확인 분리하여 24시간 사망률을 산정하고 농도별 사망률을 대조구와 비교하였다. 모든 구간에 *Cochlodinium* 적조를 4,000 cell/l를 첨가하였다.

Table 5-4-1 Mortality and recovery rate of *Sebastes schlegeli* by combination as time elapse

Conc. (ppm)	LC_{50}		Recovery rate		
	24 h		48 h	72 h	96 h
	No.	Mortality (%)	Mortality (%)	Mortality (%)	Mortality (%)
Control	0	0	0	0	0
Loess 10,000 ppm	0	0	0	0	0
G.L 20 ppm	0	0	0	0	0
Loess 1,000 ppm + G.L 5 ppm	0	0	0	0	0

모든 구간에서 24시간 노출된 시간이나 72시간 회복률 실험에서도 사망한 개체는 없었다. 약 1시간 30분이 지난 후에는 안정을 찾아가는 모습을 보였다. 자극에는 거의 반응을 하지않았다. 황토구의 경우에 실험 개시 후, 황토색이 진하여 조피볼락을 관찰이 불가능하였다. 약 2시간 경과 후에는 조피볼락을 관찰할 수 있었는데 바닥에 가만히 앉아 있는 현상을 보였다.

약 12시간 경과 후에는 황토가 들어간 수조는 맑은 노란색을 띄었다. 이 수색을 혼합구와 거의 비슷한 수색이었으나, 투명도가 떨어졌다. 황토구의 경우에는 자극에 대한 반응이 일반 조피볼락과 비슷하였다. 대조구와 GL구는 노란색의 수색을 띠었고 황토보다 큰 입자들이 부유하는 것이 관찰되었다. 다른 실험구에 비교하여 부유하는 입자들이 많았다.

약 17시간 경과 후에는 대조구에서 반응을 하는 개체가 늘어났다. GL구에서는 수조의 중층에서 유영을 하는 개체들이 관찰되었다. 약 20시간 경과 후에는 적조제거제가 첨가되었던, 구간에서는 자극에 정상적인 반응을 보여 환경에 적응되는 것으로 사료된다.

(나) 적조제거제 혼합이 실험생물의 산소소비에 미치는 영향

GL과 Loess에 의하여 적조생물로부터 구제하였을 때, 조피볼락 미치는 영향을 조사한 결과로써 혼합하였을 때, 적조생물구제 효율이 가장 높은 구간(Loess 1,000 ppm + GL 5 ppm)과 유사한 현상을 보이는 GL(20 ppm)과 Loess(10,000 ppm)의 농도 구간으로 실험을 하여 Figure 5-4-4 나타냈으며, 대조구와 비교하였다. 모든 구간에 *Cochlodinium*을 4,000 cell/l를 첨가하였다.

현장실험으로 이루어진 조피볼락 산소소비율을 보면 대조구는 0.32~0.34 ml/l, GL구는 0.31~0.34 ml/l, Loess는 0.31~0.34 ml/l, 혼합구는 0.28~0.34 ml/l)(10,000 ppm)로 변화를 보였지만, Duncan test를 통해 12분, 30분, 60분을 Grouping한 결과, 시간에 따른 농도별로 유의적인 차이가 없었다.

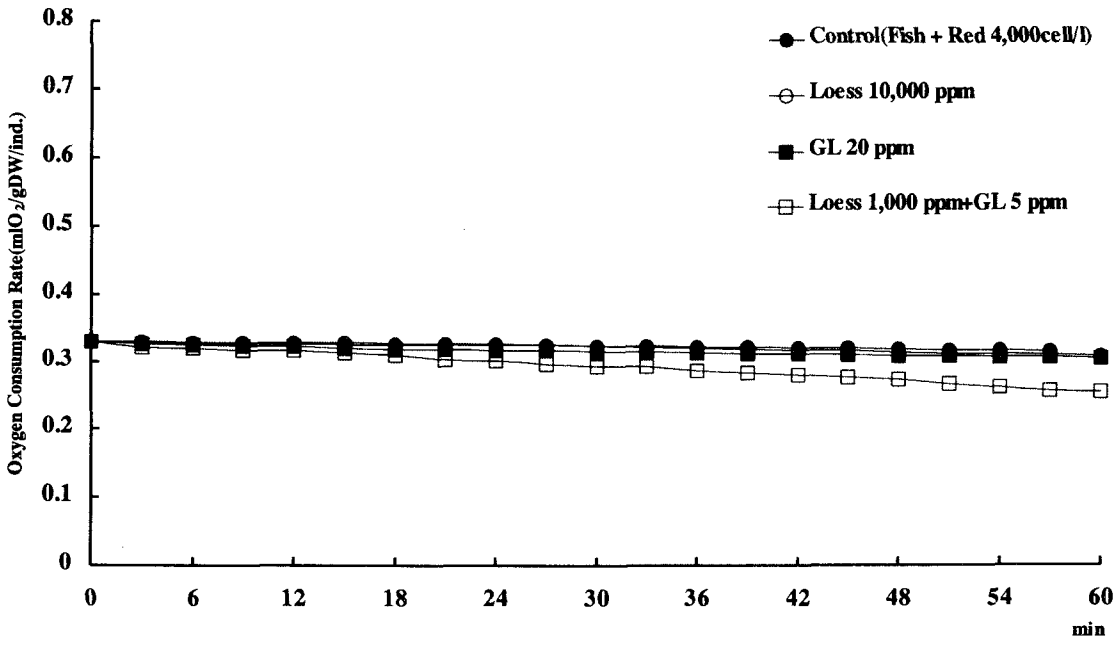


Fig. 5-4-4 Oxygen consumption rate by combination of *Sebastes schlegeli*(TL: 85.30 mm, DW: 3.34 g)

Table 5-3-2 Statistical test of *Sebastes schlegeli* by combination as time elapse

	12 Min.	30 Min.	60 Min.
Control	A	A	A
Loess 10,000 ppm	A	A	A
GL 20 ppm	A	A	A
GL 5ppm + Loess 1,000 ppm	A	A	A

(5) 고 찰

실험에 사용된 실험어류의 형태적 특징과 생활습성을 살펴보면 조피볼락은 활동이 적은 종편형 유영 동물이고, 암반지역에 서식하는 어종이다. 또한, 조피볼락의 경우

에는 적조생물과 조우하였을 때, 오랜 시간동안 생존을 할 수 있는 종으로 알려져 있다(국립수산과학원, 2002; 정문기, 1996).

현장실험은 적조제거제 혼합이 실제로 적조생물과 조우하여 다른 생물에 어떠한 영향을 주는지를 알아보고자 수행한 실험이다.

반치사율 실험에서는 실험초기에 조피볼락은 체색이 변하는 것이 관찰되었는데 적조생물과 적조제거제에 영향을 받은 것이 원인으로 사료된다.

초기에 모든 수조내에 생물 관찰이 불가능하였던 것과는 다르게 약 12시간 경과 후에는 황토가 들어간 수조는 맑은 노란색을 띄었고, 바닥은 황토색으로 덮었고, 황토들이 큰 입자를 이루고 있었다. 이것은 점액물질과 황토가 흡착된 것으로 사료된다. 다른 실험구의 경우에는 약간에 노란빛을 띠는 것이 관찰되었다.

약 13시간 경과 후, GL구의 경우에는 대조구와 색이 비슷하였지만, 부유하는 찌꺼기가 많았고, 다른 실험구와 비교하였을 때 호흡수가 많았다. 부유하는 찌꺼기는 점액물질로 사료된다. 약 17시간 이후부터는 거의 정상적인 상태가 관찰되었고, 환경에 영향을 거의 안 받는 것으로 사료된다.

동일한 오염원에 대해서도 강한 내성을 나타내는 것과 내성이 약한 종이 있고, 실험에 이용이 되는 종의 크기에 따라서도 반응에 차이가 있으며(국립수산과학원. 2002), 본 실험에서 사용한 조피볼락의 경우에는 실험시작에는 채색이 변화가 일어나는 현상이 관찰되지만, 시간이 지날수록 안정을 찾으며, 영향을 받지 않는 것으로 관찰이 되었다. 나 등(1996)의 연구에서 황토 1,000 ppm을 살포한 결과 방어의 경우 채색이 변한 것을 제외하고는 농어, 넙치, 참돔의 경우는 어떠한 현상도 관찰되지 않은 것으로 나타나 이 보다 낮은 농도의 황토에서의 어류의 산소소비에는 영향을 미치나 사망에 이르는 경우는 없는 것으로 나타났다.

Cochlodinium 4,000 cell/l의 해수에서 조피볼락에게 적조제거제가 미치는 영향이 미약하다고 사료된다.

과제보완계획

1. 현장적용실험을 확대하여 산업화가 가능한 구체적인 방안제시가 요구됨

2001, 2002 현장실험결과, 황토와 생리활성물질과 혼합하였을때 가장 좋은 적조제거율을 보였다. 따라서 이를 기초로 하여 황토의 사용량을 줄이고 비용도 절감 할 수가 있게되었다며 이를 산업화에 적용키로 하였다.

구체적인 방안으로는 첫째, UNITEF(대학기술 산업지원단)의 도움으로 대량생산시 수율상승 연구를 통해서 생리활성물질을 대량생산, 확보할 예정이다. 둘째로는 수산진흥원적조회의에서 내년 현장실험시생리활성물질과 황토를 혼합하여 현장에서 공동실험을 할 예정이다.

2. 특허 등록을 통한 상업화 방안 강구 (소요 비용의 경쟁력 산정이 우선 필요함.)

현재 생리활성물질만을 사용한 경우의 특허는 출원하였으며 추가로 황토 + 생리활성물질을 첨가하는 적조제거 방법을 출원할 예정이다(2002. 12). 이 경우 사용방법 자체가 보호를 받을 수 있고 추후 PCT 출원도 가능하다.

3. 본 연구에서 개발된 GL이 해양의 다양한 생물체에도 영향을 줄것으로 예상되므로 현장 적용을 위하여는 이 부분에 대한 확실한 자료 확보가 필요할 것으로 생각됨. GL의 현장적용을 위해서는 살포방법 및 혼합방법 제시가 필요함.

현장살포방법은 생리활성물질 자체가 액체물질로서 황토에 혼합하는 것은 용이하다. 2002.8 통영의 현장실험에서 사용해 본 결과 황토를 산적한 상황에서 필요량 만큼 표면에 살포하고 바닷물로 살포하였다. 이것은 소규모 사용시, 어장 주변에 사용되는 방법이다. 현재 황토살포기가 제작되어 어민에게 배포, 사용될 예정인데 이것은 황토를 바닷물이 들어있는 탱크에 넣은 후 용해시켜 펌프로 분산하는 것이다. 따라서 바닷물에 직접 생리활성물질을 용해시킨 후 살포하게 되면 현장사용에 문제가 없을 것으로 판단한다.

참 고 문 헌

1. Kosaric, N. (1993), Biosurfactants: Production, Properties, Applications, p366, Marcel Dekker, INC., New York.
2. Desai, J. D., and I. M. Banat. (1997), Microbial production of surfactants and their commercial potential[review]. *Microbiol. Mole. Biol. Rev.* 61, 47-64.
3. Lin, S-C. (1996), Biosurfactant: Recent Advances. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 66, 109-120.
4. Georgiou, G., S-C. Lin, and M. M. Sharma, (1992), Surface-active compounds from microorganisms(Review). *Bio/technology.*, 10, 60-65.
5. Kosaric, N. (1990), Biosurfactnats. *Kem. Ind.*, 39, 557-566.
6. Haferburg, D., R. Hommel, R. Claus, and H.-P. Kleber, (1986), Extracellular microbial lipids as biosurfactants. *Adv. in Biochem. Eng./ Biotechnol.*, 33, 53-93.
7. Lee, S. J. and K. D. Nam, (1993), Properties and application of glycolipid. *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, 4, 26-40.
8. Parra, J. L., M. A. Manresa, M. Robert, M. E. Mercade, F. Comelles, and M. P. Bosch,00 (1989), Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants. *JAOCS.*, 66, 141-145.
9. Shigeo, I., and S. Ito. (1982), Sophorolipids from *Torulopsis bombicola* as microbial surfactants. *Biotechnol. Lett.*, 4, 3-8.
10. Ken-ichi, H., N. Tadaatsu, S. Noritoshi, and Y. Koichi, (1971), Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation. *Agr. Biol. Chem.*, 35, 686-692.
11. Abraham, W.-R., H. Meyer, and M. Yakimov, (1998), Novel glycine containing glucolipids from the alkane using bacterium *Alcanivorax borumensis. Biochim. et Biophysic. Acta 1393*, 57-62.
12. Lang, S. and D. Wullbrandt, (1999), Rhamnose lipids - biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51, 22-32.
13. U. S. Patent 4,628,030 Process for the production of rhamnolipid (1986)
14. Helle, S. S., S. J. B. Duff, and D. G. Cooper, (1993), Effect of surfactant on cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.*, 42, 611-617.
15. Guerra, D. I., O. Kappeli, and A. Flechter, (1986), Dependence of *Pseudomona*

aeruginosa continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 443-448

16. Banat, I. M. (1993), The isolation of thermophilic biosurfactant producing *Bacillus sp. Biotechnol. Lett.*, 15, 591-594.
17. Hbid, C., P. Jacques, H. Razafindralambo, M. K. Mpoyo, E. Meurice, M. Paquot, and P. Thnart, (1996), Influence of the production of two lipopeptides, Iturin A and Surfactin S1 on oxygen transfer during *Bacillus subtilis* fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 57/58, 571-579
18. Sim, L., OP. Ward, and Z.-Y. Li, (1997), Production and characterisation of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. *J. Ind. Microbiol. & Biotechnol.*, 19, 232-238.
19. Matsufuji, M., K. Nakata, and A. Yoshimoto, (1997), High production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa growing* on ethanol. *Biotechnol. Lett.*, 19, 1213-1215.
20. Ochsner, U. A., J.eiser, A. Fiechter, and B. Witholt, (1995), Production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactants in heterologous hosts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3503-3506.
21. Makker, RS. and SS. Cameotra, (1997), Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillis subtilis* strain. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 18, 37-42.
22. U. S. Patent 5,037,758 Enhanced production of biosurfactant through the use of a mutated *B. subtilis* strain (1991)
23. Susumu, Ito and S. Inoue. (1982), Sophorolipids from *Torulopsis bombicola*: Possible relation to alkane uptake. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 1278-1283.
24. U. S. Patent 4,215,213 Process for producing a glycolipid ester (1980)
25. Kosaric, N., W. L. Cairns, N. C. C. Gray, D. Stechey, and J. Wood, (1984), The role of nitrogen in multiorganism strategies for biosurfactant production. *JAOCS*, 61, 1735-1743.
26. Cooper, D. G., and D. A. Paddock. (1984), Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 173-176.
27. Asmer, H.-J., A., S. Lang, F. Wagner, and V. Wray. (1988), Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 65, 1460-1466.
28. Casas, J. A., S. García de Lara, and F. García-Ochoa. (1997), Optimization

of a synthetic medium for *Candida bombicola* growth using factorial design of experiments. *Enzyme Microb. Technol.*, 21, 221-229.

29. Davila, A.-M., R. Marchal, and J.-P. Vandecaseele. (1994), Sophorose lipid production from lipidic precursors: predictive evaluation of industrial substrates. *J. Ind. Microbiol.*, 13, 249-257.

30. Brakemeier, A., S. Lang, D. Wulbandt, L. Merschel, A. Benninghoven, N. Buschmann, and F. Wagner. (1995), Novel sophorose lipids from microbial conversion of 2-alkanols. *Biotechnol. Lett.*, 17, 1183-1188.

31. Rau, U., C. Manzke, and F. Wagner. (1996), Influence of substrate supply on the production of sophorose lipids by *Candida bombicola* ATCC 22214. *Biotechnol. Lett..*, 18, 149-154.

32. Stüwer, O., R. Hommel, D. Haferburg, and H.-P. Kleber. (1987), Production of crystalline surface-active glycolipids by a strain of *Torulopsis apicola*. *J. Biotechnol.*, 6, 259-269.

33. Zhou, Q. H., V. Klekner, and N. Kosaric, (1992), Production of sophorose lipids by *Torulopsis bombicola* from safflower oil and glucose. *JAOCS* 69, 81-91.

34 Klekner, V., N. Kosaric, and Q. H. Zhou, (1991), Sophorose lipids produced from sucrose. *Biotechnol. Lett.*, 13, 345-348.

35. Susumu, I., K. Manzo, and I. Shigeo, (1980), Growth of yeasts on n-alkanes: Inhibition by a lactonic sophorolipid produced by *Torulopsis bombicola*. *Agr. Biol. Chem.* 44, 2221-2223.

36. Zhou, Q. H. and N. Kosaric, (1993), Effect of lactose and olive oil intra- and extracellular lipids of *Torulopsis bombicola*. *Biotechnol. lett.*, 15, 477-482.

37. Kor. Patent 94-23921. New sophorolipid derivative and its use.(1994)

38. U. S. Patent 5,656, 747 Process for the quantitative purification of glycolipids.(1997)

39. U. K. Patent 2,002,369 Process for the dehydrating purification of hydrated sophorolipid or a derivative thereof. (1978)

40. U. S. Patent 5,616,479 Method of production of sophorosides by fermentation with fed batch supply of fatty acid esters of oils (1997)

41. Duvnjak, Z., and N. Kosaric. (1987), Deemulsification of petroleum w/o emulsions by selected bacterial and yeast cell. *Biotechnol. Lett.*, 9, 39-42.

42. Kim, W. K., and E. K. Kim. (1992), Effects of culturing parameters on the

production of microbial biosurfactant from *Candida bombicola*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 7, 102-106.

43. Kim, W. K., and E. K. Kim. (1992), Application of biosurfactant(sophorolipid) produced from *Candida bombicola*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 7, 107-111.

44. McCaffrey, W. C., and D. G. Cooper. (1995), Sophorolipids production by *Candida bombicola* using self-cycling fermentation. *J. Ferment. Bioeng.*, 79, 146-151.

45. Hommel, R., O. Stüwer, W. Stuber, D. Haferburg, and H.-P. Klber. (1987), Production of water-soluble surface-active exolipids by *Torulopsis apicola*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 199-205.

46. Hommel, R. K., and K. Huse. (1993), Regulation of sophorose lipid production by *Candida (Torulopsis) apicola*. *Biotechnol. Lett.*, 15, 853-858.

47. Cooper, D. G., and D. A. Paddock. (1983), *Torulopsis petrophilum* and surface activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 426-1429.

48. Davila, A.-M., R. Marchal, and J.-P. Vandecasteele. (1997). Sophorose lipid fermentation with differentiated substrate supply for growth and production phases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47, 496-501.

49. Kim, S. Y., D. K. Oh, K. H. Lee, and J. H. Kim. (1997), Effect of soybean oil and glucose on sophorose lipid fermentation by *Torulopsis bombicola* in continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48, 23-26.

50. Brakemeier, A., D. Wullbrandt, and S. Lang, (1998). Microbial alkyl-sophorosides based on 1-dodecanol or 2-, 3- or 4-dodecanones. *Biotechnol. Lett.*, 20, 215-218.

51. U. S. Patent 4,197,166 Dehydrating purification for a fermentation product (1980)

52. U. S. Patent 4,201,844 Process for producing a hydroxyfatty acid ester (1980)

53. U. S. Patent 4,216,311 Process for producing a glycolipid methyl ester (1980)

54. U. S. Patent 4,297,340 Cosmetic composition for skin and hair treatment (1981)

55. U. S. Patent 4,305,961 Cosmetic composition (1981)

56. Dykes, P. (1998), Surfactants and the skin. *Int. J. Cosmetic Sci.*, 20, 53-61.

57. Kim, E. K. (1991), Production of Biosurfactant. *Biochem. Engineer.* 5, 31-38.
58. Kim, E. K.(1993), Application of Biosurfactant for Environmental Clean-up. *Biochemical Engineering*, 7, 97-103.
59. Kim, D.H, J. B. Lee, Guhn Been Yim and E. K. Kim (1995), Optimized Production of Microbial Surfactant, S-acid, from *Penicillium spiculisporum*, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 10,113-118
60. Jung, H. K., J. B. Lee, G. B. Yim and E. K. Kim (1995), Properties of Microbial Surfactant, S-acid, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 10,71-77
61.Kang, S. H., K. J. Cho, C. S. Han, E. K. Kim (1998), Effects of Microbial surfactants on Bioremediation, Theor. Appl. of Chem. Eng., 4(2), 2945-2948
62.박 주 석, 1970. 한국 근해의 모악류에 관한 연구. 국립 수산진흥원 연구보고. 1~167.
63.윤 석 현, 1996. 인천연안 동물플랑크톤 군집의 시, 공간적 분포에 관한 연구. 인하대 석사학위청구 논문, 92 pp.
64.윤 석 현, 최 중 기, 1997. 인천 연안 동물플랑크톤 군집의 계절적 분포에 관한 연구. 황해연구, 7:91~104.
65. 최희구·김평중·이원찬·윤성종·김학균·이홍재, 1998. 황토의 유해성 적조생물 Cochlodinium 종의 제거효과. J. Korean Fish. Soc. 31(1):109-113.
66. Babin, M., A. Morel and R. Gagnon, 1994. An incubater designed for extensive and senstivity measurements of phytoplankton photosynthetic parameters. Limnol. Oceanogr., 39(3): 694-702.
67. Cheng, Q. & S. Zhang, 1965. The planktonic copepods of the East China Se a. Calanoida. Studia Marina Sinica. 7:20~122.
68. Cheng, Q. et al., 1974. On the plankton copepods of the Yelllow Sea. Cyc lopoida and Harpacticoida. Studia Marina Sinica :27~100.
69. Choi H.G. et al., 1998. Removal efficiency of *Cochlodinium polykrikoides* by yellow loess. J. Korean Fish. Soc. 31(1), 109~113.
70. Garcia-Ochoa,F. and J. A. Casas. 1999. Unstructured kinetic model for sophorolipid production by *Candida bombicola*. *Enzyme and Microbial Technology*. 25: 613-621.

71. Kimmerer, W. J., 1993. Distribution patterns of zooplankton in Tomlaes bay, California. *Estuaries*, 16:254~274.

72. Kim, D, Y., 1985. Taxonomical study on Calanoid Copepod(Crusracaea:Copepod a) in Korean waters, Hanyang Univ. ph. D thesis.

73. Kim S.J. 1999. Settling characteristics of natural loess particles in seawater. J. Korean Fish. Soc. 32(6), 706~712.

74. Kim S.J. 2000. Removal of red tide organisms. J. Korean Fish. Soc. 33(5), 455~462.

75. Lang, S., E. Katsiwela and F. Wagner. 1989. Antimicrobial effects of biosurfactants. *Fat. Sci. Technol.* 91: 363.

76. Mori, T., 1964. The pelagic copepoda from the Neighbouring Waters of Jap an. The Soyo Company Inc.:1~150.

77. Park Y.T., W.J. Lee, 1998. Changes of bacterial population during the decomposition process of red tide dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides* in the marine sediment addition of yellow sea. J. Korean Fish. Soc. 31(6), 920~926.

78. Parson, T.R. Y. Maita and C.M. Lalli, 1984. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis, Pergamon Press. 3-28 pp.

79. Platt, T., C. Gallegos and W.G. Harrison, 1980. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. J. Mar. Res.,38: 687-701.

80. Porter, K.G., and Y.S. Feig. 1980. The use of DAPI for identification and enumeration of bacteria and blue green algae. Limnol. Oceanogr. 25:943-948.

81. UNESCO, 1976. Zooplankton fixation and preservation. UNESCO Press, Paris: 1~350.

82. 국립수산과학원. 2002. 한국의 적조연구 편람. 172pp.

83. 나기환·최우정·전영렬. 1996. 부유황토에 의한 적조방제 연구. 한국양식학회지.

9(3). 239-245.

34. 류종생. 2001. 원색 한국패류도감. 일지사. 196pp

35. 박영태・박지민・정성윤・송병철・임월애・김창훈・이원재. 1998. 적조 생물 살조 세균 탐색.

36. Ⅰ. 유해 적조 생물 *Coclodinium polykrikoides* 살조 세균 *Micrococcus* sp. LG-Ⅰ의 분리와 살조특성 한수지. 31(5). 767-773.

37. 이원재・박영태. 1998. 적조 생물 살조 세균 탐색. Ⅱ. 적조 생물 *Prorocentrum micans* 살조세균*Pseudomonas* sp. LG-2의 분리와 살조특성. 한수지. 31(6). 852-858.

38. 정문기. 1996. 한국어도보. 일지사, 서울, 569 pp.

39. 石田祐三郎. 1994. 赤潮藻の微生物學的防除に關する現想と對策. 赤潮と微生物-環境 にやさしい微生物農藥を求めて (石田祐三郎, 管原), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 9-22.

90. Brett, J. R., Groves, T. D. D., 1979. Physiological energetics. In: Hoar, W. S.,Randall, D. J., Brett, J. R. (Eds.), Fish Physiology. Vol. Ⅷ, Academic Press, London, pp. 279-352.

91. Carl J, Sindermann, 1995. OCEAN POLLUTION Effect on Living Resources and Humans, CRC press, New York, pp 20-21.

92. Michael J. Kennish, 1997. Pollution Impacts on Marine Biotic Communities. CRC press, New York, pp 88-89.