

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “*Nannochloropsis sp.*등 개량 및 고효율의 대량광배양기(PBR)개발을 통한 산업화”의 보고서로 제출합니다.

2010년 11월 30일

주관연구기관명 : 에이엠바이오(주)

주관연구책임자 : 정태만

연 구 원 : 최실호

연 구 원 : 최진영

연 구 원 : 이미란

연 구 원 : 이기영

협동연구기관명 : 신라대 산학협력단

협동연구책임자 : 이재화

요 약 문

I. 제 목

Nannochloropsis sp. 등 개량 및 고효율의 대량광배양기(PBR)개발을 통한 산업화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

해양 미세조류는 양식에서 먹이생물로서 아주 중요한 역할을 하고 있다. 이 연구개발의 목적은 이러한 먹이생물로 이용되는 미세조류의 대량생산 방법을 개발하여 산업화하는 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

상품성이 높은 *Nannochloropsis*와 *Tetraselmis*을 이용한, 공통인자 규명 및 표준 방법을 확립에 우선하여 실험.

- 미세조류의 수집 및 선발(axenic 미세조류 중점)
- 먹이생물로서의 적합성 검토
- 대량 광배양을 위한 배지조건 및 배양인자 조사
- 비닐백 배양으로 PBR 디자인위한 scale-up data 확보
- 축소 PBR 시제품 제작 및 운영문제점 파악
- 생산규모의 PBR 시제품 제작 및 균체생산성 최적화

IV. 연구개발결과

- 시험 및 먹이생물용 균주로서 *Nannochloropsis oculata* (Npo-2145), *Tetraselmis* sp. Tsq-908을 선정하였다. 차선의 균주로서 *Nannochloropsis* sp. (Npq-531), *Tetraselmis suecica* Tss-904를 선정하였다.
- 선별 기준으로, 배양온도 25℃ 이상에서의 성장성, 종균의 오염상태, 세포의 형태 및 크기, 불포화 지방산 함량 등을 고려하였다.

- 세균에 오염된 종균으로부터 순수한 미세조류를 분리하는 방법을 확립하였다.
- 배지의 성분 및 농도, 온도, pH, CO₂의 공급유무, 빛 및 염도 등에 따른 배양적 특성을 조사하였다.
- 여러 가지 형태의 배양 용기를 만들어 시험배양 해보았으며, 간단한 비닐백을 만들어 배양해 보았다.
- 시작품 PBR을 만들어 경험해보면서 보다 현실적인 PBR을 시제품에서 제작할 수 있었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 본 과제에서 얻은 연구결과를 1건은 국내 학술지에 발표하였고 1건은 발표 의뢰 중에 있다.
- 본 과제에서 개발된 기술로 양식용 먹이생물 사업에 진출할 긍정적으로 검토하고 있다.
- PBR 관련 특허 출원을 준비 중에 있다.

Summary

I. Research Project Title

Industrialization of microalgal production through the strain improvement, optimization of culture condition and development of high-efficient PBR.

II. Goal of the Research Project

The marine alga play an important role in the aquaculture as a live feed of shellfish. The objective of this study is developing of core technologies which are needed to commercialize the production of this marine microalge.

III. Scope of Research Project

Using the valuable strains of *Nannchloropsis* and *Tetraselmis* as live feed, investigate preferably common factor with their cultivation and establish standard production method for them.

- Collect the strains from various source and select the candidates for studying and production.
- Consider the suitability for live feed when candidates selected
- Investigate the nutritional and cultural factor for large-scale phototrophic culture
- Reviewed the scale-up data for design of substantial PBR through the small-scale vinyl-bag culture
- Prepare the scale-downed PBR, cultivate the candidate strain with it and estimate the operational problem or trouble
- Make the production-scale PBR, and optimize production condition

IV. Results from Research Project

- Selected *Nannochloropsis oculata* (Npo-2145) and *Tetraselmis* sp. Tsq-908 primarily, as

the candidate for production strain and *Nannochloropsis* sp. (Npq-531), *Tetraselmis suecica* Tss-904 as second best

- Selected the above strains on the basis of potent growth above 25°C, axenicity, the size and shape of cell and PUFA content.
- Established various methods to obtain of pure culture of microalgae from contaminated stock.
- Investigated on the effect of nutritional component and concentration, pH and temperature, light intensity, feeding of carbon dioxide, salinity and etc.
- Accomplished the trial cultivation in various type of culture container or PBR, and then experimented with simple small vinyl-bag, in more details.
- Experienced the scale-downed, bag-type PBR and depending on this experience make modification on the design of planned PBR.

V. Plan of Development Performance and Utilization

- Publishate the data obtained from this project, in the paper, and submitted in another paper.
- Consider to extend the business into the field of a live-feed in aquaculture.
- Plan the patent about PBR.

CONTENTS

CHAPTER 1	The aims of researches	12
Subchapter1.	Aquaculture and microalgae	12
1.	Definition and classification of algae	12
2.	The role of microalgae in aquaculture	14
3.	Microalgae industry needed to aquaculture	16
Subchapter2.	The present status of Korean fisheries and aquaculture	17
1.	The present status of Korean fisheries.	17
2.	The present status of Korean aquaculture.	21
3.	The present status of the nursery system in aquaculture	27
4.	The present status of microalgal culture in fish farm	30
Subchapter3.	The necessities and scopes of researches	31
1.	The necessities of researches	31
2.	The scopes of researches	32
CHAPTER 2	Tecnical Background,.....	34
Subchapter1	The present status of microalgae researches	34
1.	The cultivation media used in microalgal researches	34
2.	The cultivation of microalgae	36
3.	The cultivation facilities or PBR for microalgal culture.'.....	37
Subchapter2	The present status of studies about microalgal application as live-feed.....	45

CHAPTER 3 Research contents and the results	49
Subchapter1. Materials and Methods.....	49
1. Purchasing of the test strain.....	49
2. Liquid culture method	49
3. Solid culture method	51
4. Measurement of microalgal biomass	51
5. Methods of artificial mutation	53
6. Analytical methods of determination of lipid and fatty acid content	53
Subchapter2. Experimental scope and its results	55
1. Selection of strains suitable for live-feed in aquaculture	55
2. Investigation on the effect of nutritional component and concentration	68
3. Vinyl bag culture	76
4. Jar fermenter culture	86
Subchapter3. Scale-downed PBR and trial PBR for production	87
1. Applying of experimental results on the designing and making the planned PBR..	87
2. Completion and operation of the scale-downed, bag-type PBR	87
3. The completion and operation of trial product of PBR	92
CHAPTER 4 Contributions and approaches of technology in many other aspects	94
Subchapter1. Achievement of the aimed goal	94
Subchapter2. Contribution to related area	95
1. Contribution to related area in technical aspect	95
2. Contribution to related area in economical and industrial aspect	96
CHAPTER 5 Achievements and application.....	98
Subchapter1. Industrialization plan.....	98
1. Short-term plan	98
2. Long-term plan	98

Subchapter2. Technology-diffusion plan	99
Subchapter3. Intellectual properties	99
1. Publication in the paper	
2. Internalizing through the intellectual properties, the publication and the patents	99
3. Scheduling for the additional research programme and applications	100
 CHAPTER 6 Technical and scientific information	 101
 CHAPTER 7 Reference	 102

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	12
제1절	수산양식(aquaculture)과 미세조류	12
1.	조류의 정의 및 분류	12
2.	수산양식에서의 미세조류의 역할	14
3.	수산양식에서의 필요한 미세조류 산업	16
제2절	한국 수산업 및 양식산업의 현황	17
1.	한국 수산업의 현황	17
2.	양식산업의 현황	21
3.	양식어업에서의 종묘산업	27
4.	양식장에서의 미세조류 배양 실태	30
제3절	연구 필요성 및 범위	31
1.	연구의 필요성	31
2.	연구의 범위	32
제 2 장	국내외 기술개발 현황	34
제1절	미세조류의 배양 연구 현황	34
1.	미세조류 배양용 배지	34
2.	미세조류 배양	36
3.	미세조류 배양장치 혹은 시설	37
제2절	미세조류의 먹이생물로의 응용 연구 현황	45

제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과.....	49
제1절	실험재료 및 방법.....	49
1.	시험균주의 구입.....	49
2.	액체배양방법	49
3.	고체배양방법	51
4.	조체 바이오매스의 측정	51
5.	돌연변이 방법	53
6.	조체의 지질 및 지방산함량 분석	53
제2절	실험내용 및 결과	55
1.	양식용 먹이생물 적합미세조류 선발	55
2.	대량 광배양을 위한 배지 및 배양조건 인자 조사	68
3.	Vinyl bag culture	76
4.	Jar fermenter culture	86
제3절	시작품 및 시제품의 제작	87
1.	실험 결과의 정리 및 시작품 제작에 반영	87
2.	PBR 시작품의 제작 및 운전	88
3.	PBR 시제품의 제작	92
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	94
제1절	목표 달성도	94
제2절	관련 분야에의 기여도	95
1.	기술적 측면	95
2.	경제 산업적 측면	96
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	98
제1절	실용화-산업화 계획	98
1.	단기적 과제	98
2.	장기적 과제	98

제2절 기술확산 계획	99
제3절 특허, 논문 등 지식 재산권의 확보계획.....	99
1. 논문게재 성과	99
2. 특허 등 지식재산권 확보 계획.....	100
3. 추가연구, 타연구에 대한 활용계획.....	100
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	101
제 7 장 참고문헌	102

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 수산양식(aquaculture)과 미세조류

1. 조류의 정의 및 분류

미세조류 (microalgae)는 조류(algae) 중에서 말 그대로 크기가 작은 미세한 조류를 일컫는다. 따라서 조류가 무엇인가를 알아야 미세조류의 생리적 특성을 이해하고 이를 유용하게 응용할 수 있다.

조류에 관한 정의로서 인터넷이나 문헌을 뒤져 보면 많은 정의가 수록되어 있다. 그중에 마음에 드는 것을 몇 개 표 1-1에 실었다. 즉, 조류는 '식물과 비슷한 개체로서 광합성의 기능을 가진 진핵세포로서 단세포 혹은 다세포의 생물'임을 알 수 있다. 조류의 가장 큰 특징은 광합성을 기능을 가지고 있다는 것이고 이 점이 식물과 특히 비슷하다. 따라서 당연히 엽록소 (chlorophyll)을 함유하고 있으며 종에 따라서 보유하고 있는 엽록소의 종류가 다르다.

그러나 광합성 기능을 가지고, 진핵세포인 점은 식물과 같으나 식물과 달리 조직 분화가 거의 되어 있지 않으므로 뿌리, 줄기, 잎 같은 것이 일반적으로 없다.

또한 지금도 조류의 일종으로서 소개되고 있는 남조류 (blue-green algae)는 상기의 정의에서 진핵세포가 아닌 원핵세포를 가지므로 조류에서 제외되어 남조세균(cyanobacteria)이란 새로운 이름을 얻어 지금은 일반적으로 세균으로 분류되고 있다.

표 1-1. 조류의 정의 (definition of algae)

Definition of Algae

- A **photosynthetic** organism with one or more cell, but **without** any or with very little tissue differentiation, specially regarding vesicular tissues.
 - Unicellular or multicellular **photosynthetic** eukaryotes that generally **lack** roots, stems, leaves, conducting vessels, and complex sex organs.
 - Primitive **chlorophyll-containing** mainly aquatic eukaryotic organisms **lacking** true stems and roots and leaves.
 - Algae (*sing.* alga) are a large and diverse group of simple **plant-like** organisms, ranging from **unicellular** to **multicellular** forms
-

따라서 조류 (algae)는 엄격하게 말하면 분류학적인 용어는 아니며, 관습적으로 사용하는 용어이다. 조류의 생활환경은 일부 육상생활을 하는 것도 있으나 대부분 수중생활을 하며, 햇빛을 이용하여 유기물을 만드는 능력, 즉 광합성의 능력이 있으므로 빈영양 상태의 환경에서도 성장할 수 있다.

조류는 그 크기에 따라서 거대조류 (macroalgae)와 미세조류 (microalgae)로 나눈다. 다시마, 미역 등의 해초류가 속하는 거대조류는 개체를 거대하게 구성하기 위해서는 당연히 다세포의 형태를 가지며 개체를 유지하기 위해서 단단한 물체에 부착하여 생활하는 부착성이다. 반면에 크기가 작은 미세조류는 단세포로 구성되어 있으며 대부분 부유성이나 부착하여 생활하는 미세조류도 있다. 클로렐라, 규조류 등이 이 미세조류에 속한다. 부착성 미세조류로는 *Nitzschia*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Navicula* 등이 있다. *Nitzschia*는 저서생활을 하는 부착성 미세조류로 저서성 미세조류 (benthic microalgae)라 부르기도 한다.

미세조류의 분류는 아직 체계화되어 있지 않은 것 같다. 소개된 문헌 정보 및 인터넷 정보를 보아도 동일한 내용이 없고 저마다 다르게 분류하고 있는 것이 특징이다. 산업적으로 응용성이 높은 미세조류로서 *Cyanophyceae* (남조류, blue-green algae), *Chlorophyceae* (녹조류, green algae), *Bacillariophyceae* (규조포함, including the diatom), *Chrysophyceae* (황금빛조류 포함, including golden algae)를 들고 있으며 (1), 일본 츠클마대학 생물과학계 식물계통 분류학 연구실의 홈페이지에는 조류를 조류를 광합성으로 산소를 발생하는 생물에서 육상식물을 제외한 것으로 정의하고 광합성으로 산소를 발생하는 생물로는 시아노박테리아 및 *Prochloron* 같이 핵을 가지고 있지 않은 원핵생물도 포함하고 있다. 즉, cyanobacteria, 원핵녹조와 같이 '세균 (bacteria)에 속하는 조류', 회색조류 (*Glaucophyceae*), 유클레나조류 (*Euglenophyceae*), 크립프트조류, 와편모조류 및 하프토조류가 속하는 '진핵생물에 속하는 조류 (주로 단세포)' 및 홍조류, 부등모류 (갈조류 등), 녹색식물 (녹조류 등)이 속하는 진핵생물에 속하는 조류 (단세포 또는 다세포)로 분류하고 있다.

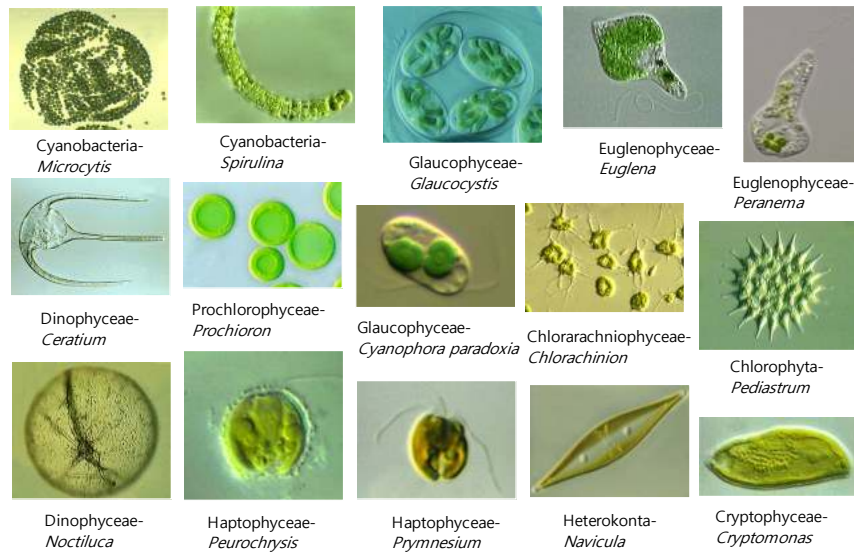


그림 1-1. 츠쿠바대학 식물계통 분류학교실의 홈페이지에 올려진 여러 형태의 미세조류

일반적으로 다음의 분류방법이 좀 더 널리 쓰이는 것 같다. 즉, 분류학적으로는 보통 9개의 문(門)으로 나누는 방법으로서, 남조류 (藍藻類: Cyanophyta) · 크립토히조류 (Cryptophyta) · 황금색조류 (黃金色藻類: Chrysophyta) · 유글레나조류 (Euglenophyta) · 규조류 (矽藻類: Bacillariophyta) · 갈조류 (褐藻類: Phaeophyta) · 홍조류 (紅藻類: Rhodophyta), 녹색식물문의 녹조류 (綠藻類: Chlorophyta) · 차축조류 (車軸藻類: Charophyta) 등이다.

이 중 남조류는 특히 세포구조가 원시적이어서 박테리아류와 함께 원핵생물 (原核生物: Prokaryota)로 불리고 그 밖의 종류들과 구별하고 있다.

2. 수산양식에서의 미세조류의 역할

해양생태계에서 미세조류는 먹이사슬의 최하층에 위치하는 제1차 생산자 (primary producer)이다. 즉 탄산가스와 물 그리고 태양에너지를 이용해서 차상위의 생물에게 에너지원 및 먹이가 될 수 있는 유기물을 합성하고 산소를 공급하는 중요한 역할을 하고 있다. 육상에서의 먹이사슬의 1차 생산자는 주로 식물이 맡고 있으나, 해양에서는 그 역할을 조류 (algae)가 맡고 있다.

이러한 해양생태계에 있어서의 미세조류의 역할을 잘 파악하여 양식에서 이용하는 것이 중요하다. 따라서 자연에서 어떤 미세조류가 차상위자 해양생물의 먹이가 되는지를 잘 파악해야 한다. 양식의 대상인 수산생물의 자연 상태에서의 먹이활동 및 생활습성을 잘 파악해서 이와 유사한 환경과 먹이를 줄 때에 질 좋은 수산물을 대량으로 원하는 때에 생산할 수 있을 것이다.

따라서 어떤 미세조류가 어떠한 양식대상 수산생물의 먹이가 되고, 어떠한 경로를 통하여 섭취되는지에 이미 과거부터 많은 연구가 되어 왔고, 앞으로도 계속 연구가 될 것이다. 양식대상 수산생물의 범위가 향후에도 계속 확대될 것이고 이에 필요한 기초연구로서 양식대

상 수산생물의 먹이 및 습성의 연구가 되면, 미세조류는 수산생태계의 최하층의 1차 생산자로서 모든 양식생물의 먹이의 연장선에 위치해 있으므로 자연적으로 연구대상에 포함되기 때문이다.

수산생물의 양식은 육지에 적응되어 사육, 관리가 쉽고, 사료의 단백질 요구량이 적은 담수산 수산생물부터 먼저 출발하였다. 해수산 수산생물도 연어와 같이 담수에서 번식하는 종류가 먼저 개발되었는데 이는 담수에서 서식하는 수산생물의 인위적 번식조절과 사육, 관리가 수월하기 때문이다(2). 바다는 항상 일정한 항상성을 유지하므로 바다에서 서식하는 생물의 양식은 담수생물에 비하여 그 항상성을 유지하기 위한 관리가 까다로울 수밖에 없다. 또한 바다의 무척추 동물은 변태로 유생 시에 사망률이 높고 성장단계에 따른 상이한 영양을 요구하며 육식성인 경우가 많아서 고단백의 사료로 필요로 하므로 경제적인 부담이 크다(2).

이와 같은 이유로 바다양식은 먹이를 공급할 필요가 없고 관리가 쉬운 해조류(macroalgae)의 양식부터 시작되었고, 그 후 해양 미세조류를 여과 섭식하는 패류 양식이 발전하게 되었다. 조개류 양식은 처음에는 자연산 치패를 수집하여 어장에 살포하는 양식방법으로 시작되었는데 이는 바다의 환경에 의존하는 조방적 양식의 수준이다. 해산 어류와 갑각류의 양식기술은 매우 까다롭고, 고비용의 동물성 사료 및 양식시설이 필요하여 쉽게 시도되지 못한다.

어떠한 해산생물이 양식종으로 개발되기 위해서는 인위적 번식 조절에 의한 인공종묘 생산이 선행되어야 한다. 즉, 양식대상 생물의 종묘의 수급이 원활하지 않으면 시장을 안정적으로 형성시킬 수가 없으므로 지속적 시장형성이 어렵다. 그러므로 원활한 인위적인 종묘생산체제의 확립은 양식산업의 정착에 가장 중요한 필수조건이다.

한 생물이 양식산업의 대상생물로 발전하기 위해서는 크게 3단계의 기술개발이 가능해야 한다. 첫째는 양식대상생물을 살아 있는 상태로의 유지가 가능해야 하고, 둘째는 먹이를 공급하여 성장시킬 수 있어야 하며, 셋째는 인위적인 번식이 가능해야 한다. 해양미세조류는 셋째 단계인 인공종묘 생산 시의 일차 먹이생물로서 가장 중요한 요인이 된다.

인위적인 종묘생산은 친어(brood stock) 관리 및 산란된 난에서 부화한 유생과 자치어의 사육으로 구분할 수 있다. 여기서 유생 및 자치어의 사육에서 가장 근본적인 것은 적합한 먹이생물의 양적 확보이며 이는 곧 미세조류의 대량확보와 연결된다(2)

미세조류가 종묘생산에 먹이생물로 이용되는 경우는 크게 두 가지로 구분할 수가 있다. 먼저 동물성 먹이생물을 대량으로 배양하기 위해서 필요한 해양 미세조류의 배양이 있고,

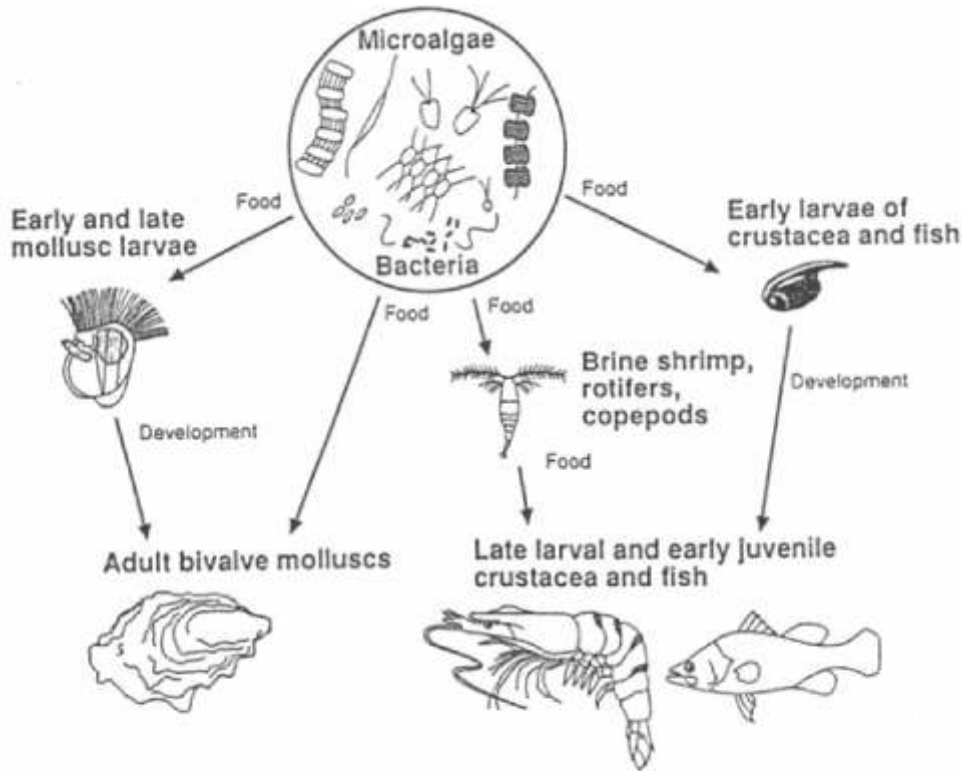


그림 1-2. 수산양식에서의 미세조류의 중요 역할 (The central role of micro-algae in mariculture (3))

두 번째로는 해양미세조류 자체를 먹이로 섭취하는 초식성 무척추동물 (예, 패류, 갑각류, 극피동물 등)의 유생 및 모패 사육을 위한 미세조류의 배양이다.

종묘산업뿐만 아니라 패류, 전복류, 새우류, 성게류나 우렁쉥이 같은 무척추동물은 평생 미세조류를 여과 섭취하는 여과섭취동물 (filter feeder)로서 항상 미세조류를 먹이로 공급해 주어야 한다 (그림 1-2) (2, 4).

최근에는 천연 미세조류를 대체할 수 있는 배합사료를 개발하고자 노력을 경주하고 있으나 아직, 미세조류를 대체할 수 있는 입자의 개발은 이루어지지 않고 있다. 한편으로는 살아 있는 상태의 미세조류 (fresh algae)가 아닌 건조가공을 거쳐 유통기한이 획기적으로 늘릴 수 있는 미세조류 및 그 가공법을 개발하기 위한 연구도 많이 하고 있고 완벽하지 않지만 아직 살아 있는 미세조류 (live algae)를 일부 대체하는 사용되는 건조한 조체분말은 시판되고 있기도 하다.

미세조류의 생산단가가 싸지고, 영양손실이 적고, 유통기한을 획기적으로 개선한 가공법이 개발되어 발전한다면 앞으로 어유, fish meal 등 양어용 사료 원료를 일부 대체할 수 있을 것이다. 이외에도 미세조류는 양식장의 그린효과 (green effect)를 조성하는데 사용되기도 한다.

3. 수산양식에서의 필요한 미세조류 산업

수산양식에 있어서의 미세조류의 역할은 상기에서 충분히 설명했다. 현재 우리나라의 패류 양식장 및 종묘양식장은 미세조류를 자체적으로 배양하여 먹이사료로 이용하고 있으나 오염된 미세조류를 공급함에 따라 생존율을 저하시키거나 심할 경우 폐사까지 시키는 경우가 종종 발생하고 있다. 이와 함께 미세조류의 배양하기 위한 인력의 확보에도 어려움이 있는 등 안정적인 공급에 저해요소로 작용하고 있다.

선진국에서는 이미 이점에 주목하고 미세조류 live-feed를 시판하기 시작하고 있다. 주로 이용되는 미세조류는 *Tetraselmis*, *Nannochloropsis*, *Isochrysis*, *Pediodactylum*, *Chaetoceros* 등이 시판되고 있다. 가장 많이 시판되고 있는 미세조류는 *Tetraselmis*, *Nannochloropsis* 및 *Isochrysis*이다.

외국의 회사가 국내에 시판하고 있는 살아 있는 미세조류 제품은 그 유통기간이 짧기 때문에 가까운 일본의 *Chlorella*를 제외하고는 없는 듯하며 건조분말 제품으로는 로티퍼 등 동물성 플랑크톤의 불포화지방산 영양강화용으로서, 미국으로부터 *Schizochytrium* 건조분말 제품이 들어와 시판되고 있다.

우리나라의 미세조류 제품은 건강기능식품으로 이용되고 있는 *Chlorella*를 제외하고, 일부 벤처기업에서 배양하여 시판하고 있으나 아직까지는 양식생물의 먹이생물로 공급되기보다는 종묘장의 미세조류배양의 seed로서 공급되고 있는 형편으로 그 시장규모는 미미하다고 할 수 있다.

현재까지 우리나라에서 상품성이 있는 *Chlorella* 및 *Schizochytrium*은 종속영양배양법 (heterotrophic culture method)에 의하여 배양되는 미세조류로 당사가 개발하고자하는 과제의 기술과는 다르다.

아직 해양미세조류를 광자가영양배양법 (photoautotrophic culture method)으로 제조하여 산업화하기에는 아직 국내의 기존시장이 너무 좁으나, 언젠가는 시장형성이 되리라고 보고 있으며 획기적인 기술이 개발되면 시장창출이 쉬운 분야로 보인다. 그리고 국내의 좁은 시장만을 볼 것이 아니라 세계시장을 염두에 두고 기술 및 상품개발을 하면 반드시 좋은 기회가 올 것으로 보인다.

제2절 한국 수산업 및 양식산업의 현황

1. 한국 수산업의 현황

우리나라는 3,189개의 섬과 11,542 km의 긴 리아스식 해안선 및 세계 5위 면적 2,393 km²의 갯벌을 가지고 있는 천혜의 수산국으로서 수산자원은 우리국민의 식량자원인 동시에 고급단백질의 공급원으로 활용되고 있다. 따라서 우리국민의 생존적 차원과 직결되는 귀중한 자원이다 (5).

통계청이 발표한 자료에 의하면 지난해 2009년의 우리나라 어업생산량은 318만 2,000톤으로 2008년의 336만 1,000톤에 비해 17만 9,000톤 (5.3%) 감소한 것으로 나타났다. 반면 생산금액은 6조 9,242억 원으로 전년의 6조 3,451억 원보다 5,791억 원 (9.1%)이 증가된 것으로 조사되었다 (표 1-2 참조).

어업형태별로는 연근해어업에 해당하는 일반해면어업이 122만 6,966톤, 천해양식어업 131만 3,355톤, 원양어업 61만 1,950톤, 내수면 어업 3만 71톤이 2009년 생산량으로 집계되었다. 원양어업이 전년 대비 가장 큰 폭 (5만 4,232톤, 8.1%)으로 줄어들었으며 연근해어업 (5만 7,924톤, 4.5%)과 천해양식어업 (6만 7,648톤, 4.9%)도 감소세를 보였다. 반면 내수면어업은 3.1% (891톤) 증가했다 (표1-2 참조).

연근해어업은 갈치, 참조기, 꽃게, 오징어 등이 많이 어획된 반면에 멸치와 고등어, 청어, 삼치류의 어획실적이 줄어들었다. 천해양식어업은 참돔 (+24.8%)과 넙치 (17.8%), 전복 (20.6%), 다시마(7.3%) 등의 생산이 증가한 반면 김 (-6.2%)과 미역 (-18.9%), 우렁챙이 (-7.9%) 등은 고수온 영향으로 양식작황이 부진해 생산이 감소했다. 원양어업은 가다랑어와 명태 등은 생산이 증가했으나, 자원보호를 위해 대서양의 포클랜드 수역 어장폐쇄로 오징어와 꽁치 등은 생산이 큰 폭으로 준 것으로 분석되었다.

어업 총 생산금액은 연근해 어장에서 상품성이 높은 어종인 참조기와 꽃게, 대형고등어 어획과 양식어업에서 생산가격이 낮은 해조류(김·미역 등) 생산은 감소한 반면 가격이 높은 전복과 넙치, 돍류 등의 생산이 증가해 전년 대비 8.4% 증가했다.

표 1-2. 2008년 및 2009년 어업생산 어업별 동향

어업별	생산량 (MT)		2009-2008 생산량 차이(MT)	2009/2008 생산량 증감율(%)	생산금액 (원)		2009-2008 생산금액 차이(MT)	2009/2008 생산금액 증감율(%)
	2008	2009			2008	2009		
계	3,361,255	3,182,342	-178,913	-5.3	6,345,058,101	6,924,248,502	579,190,401	9.1
일반해면어업	1,284,890	1,226,966	-57,924	-4.5	3,222,256,094	3,640,436,977	418,180,883	13.0
천해양식어업	1,381,003	1,313,355	-67,648	-4.9	1,520,122,116	1,846,310,734	326,188,618	21.5
원양어업	666,182	611,950	-54,232	-8.1	1,327,394,939	1,163,750,724	-163,644,215	-12.3
내수면어업	29,180	30,071	891	3.1	275,284,952	273,750,067	-1,534,885	-0.6

(출처: 통계청 사회통계국 농어업통계과)

한편, 2010년 상반기의 어업생산량도 전년 동기 대비 3.7% 감소하고 어업생산 금액은 지난해 같은 기간보다 8.2% 증가한 것으로 발표되었으며 생산량 감소의 원인이 연안수온의 불안정에 따른 회유성 어종인 고등어, 멸치, 오징어 등의 회유량 감소에 따른 어획부진 및 원양어업의 어획실적 저조로 생산량이 감소했다"고 통계청 관계자는 설명하고 생산 금액의 증가는 연근해어업의 생산량 감소에 의한 어가 상승과 갈치 꽃게 참조기 등 고가 어종의 생산증가, 원양어업의 눈다랑어 생산증가 및 오징어 가격의 큰 폭 상승 때문으로 보도되었다.

그림 1-3에서 보는 바와 같이 2004년부터 2008년까지 증가세를 유지해온 우리나라 어업 생산량이 2004년부터 2008년까지는 증가세를 유지하다가 2009년에 감소세로 돌아섰다. 또한 2010년 상반기의 어업생산량도 전년 동기 대비로 감소하고 있음은 근년에 들어와서 심해진 기후변화와 2008년 말의 세계적인 금융위기에 따른 경제불황과도 관련이 있는 것으로 보이나 한편으론 우리나라의 수산업의 구조적인 한계와 연관되어 나타나는 것이 아닌가 생각된다.

우리나라 수산업의 발달 단계는 일제시대를 거쳐 해방 시에서 1960년대 초까지의 초기단계, 1960년대 중반부터 1990년대 중반까지의 성장기, 그리고 1990년대 중반이후부터 2000년 중반까지의 전환기, 2000년 중반 이후부터 현재까지의 재성장기로 대별할 수 있다(5).

1990년대까지의 성장의 견인차는 연근해 어업의 어획 현대화에 의한 생산증가 및 정부의 '잡는 어업에서 기르는 어업으로의 정책전환'에 따른 양식어업의 보급 및 발전으로 획기적인 성장을 이루어 1980년대에는 양식어업이 세계 4위에 이르게 되었고 1994년에는 어업생산량이 347만 톤으로 현재까지 최고의 어업생산량 기록으로 남아 있다.

1994년을 정점으로 해서 1990년대 중반부터는 자원민족주의 대두로 1994년 말의 UN 해양법에 따라 200해리 경제수역이 인정됨에 따라 한일어업협정(1999년) 및 한중어업협정(2001년) 연근해 어업 및 원양어업이 위축되고, 자원남획, 어획강도 증가 및 환경오염으로 인하여 어업생산성 저하와 이윤의 감소되고, 한편으로 1993년 말의 UR 협상강화로 WTO 체제 강화 및 1996년 OECD 가입에 따른 수입자유화로 수산물 수입이 급증하게 되어 어업생산의 침체기가 도래하였다.

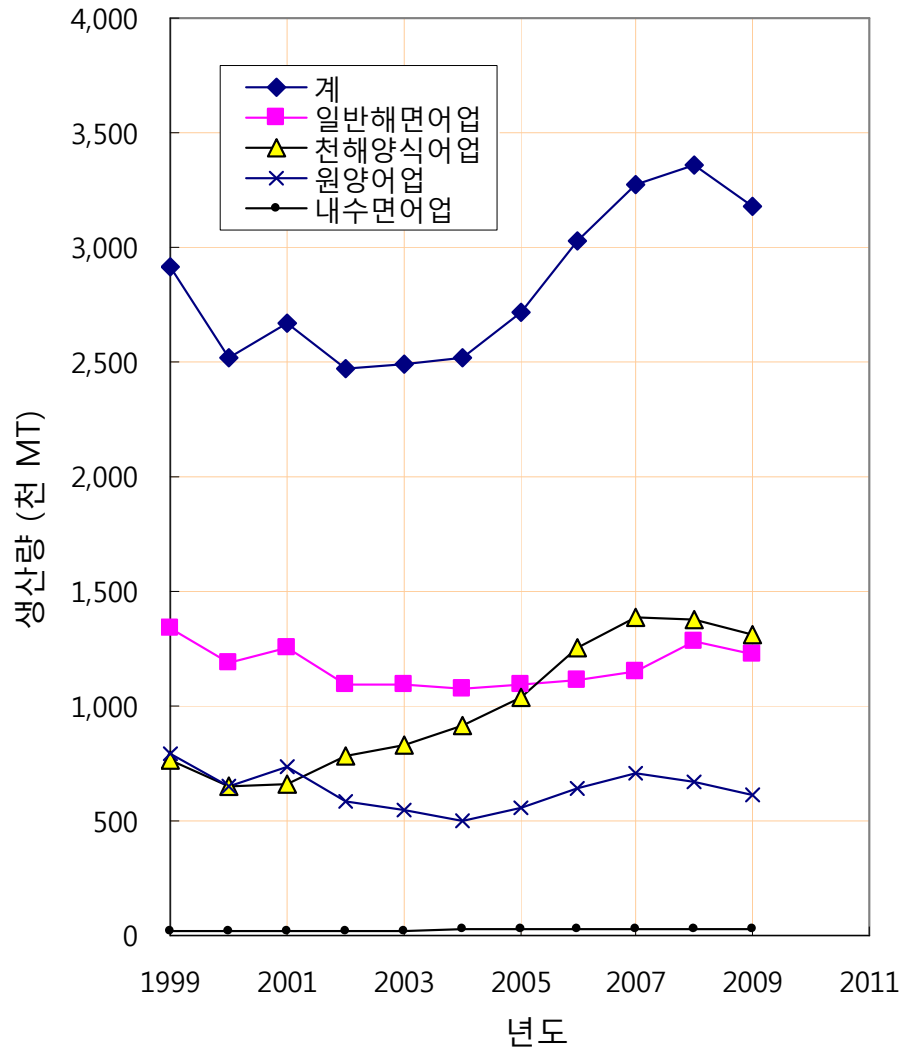


그림 1-3. 지난 10년간 어업별 어업생산량 동향 (data 출처: 통계청 사회통계국 농어업통계과)

2000년도 초부터 어장환경 조성 및 어업자원 조성 사업에 의하여 연근해 어업의 감소세가 둔화되고 양식어업의 비약적인 증가가 견인차가 되어 어업생산량이 증가하기 시작했다. 2006년도부터는 어업생산량이 300만 톤 이상으로 올라서서 2008년에는 336만 톤으로 1994년의 347만 톤의 수준을 거의 회복했다.

2007년부터 2009년까지는 어업생산량의 증가세가 꺾어지고 감소할 기미가 보이는데 이는 생산량의 증가세를 견인해줄 양식어업이 담보상태에 빠진 데 기인하는 것으로 생각된다.

따라서 수산업의 발전을 지속하기 위해서는 두 가지, 즉 어족자원 보호와 획기적인 양식산업의 발전이 반드시 필요하다. 즉, 수산업을 지속가능한 산업으로 계속 육성하기 위해서는 양식산업의 발전이 선행되어야 함을 의미한다.

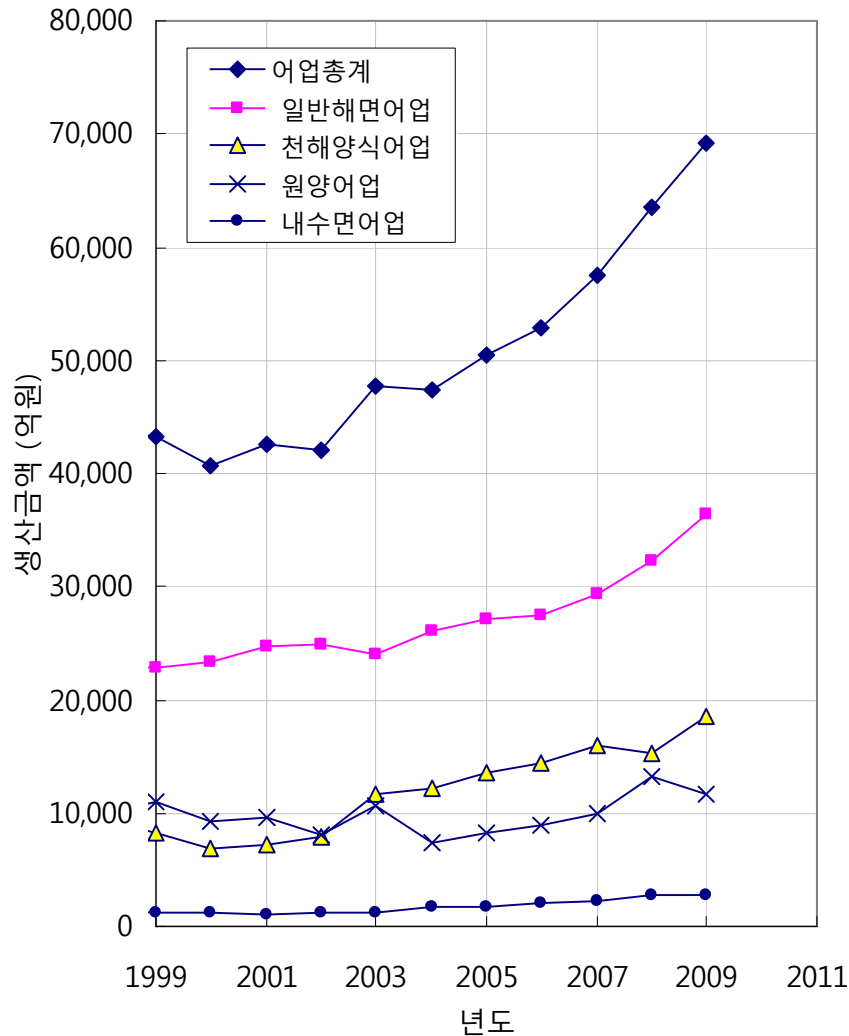


그림 1-4. 지난 10년간 어업별 어업생산금액 동향 (data 출처: 통계청 사회통계국 농어업통계과)

2009년의 어업총생산금액의 규모는 6조 9,242억여 원이고 이중에 연근해어업의 생산금액이 3조 6,404억여 원으로 52.6%를 차지하고, 천해양식어업이 1조 8,463억원 (26.7%), 원양어업은 1조 8,463억여 원을 생산했다 (표 1-2).

그림 1-4의 지난 10년간의 어업별 어업생산금액 동향을 보면 어업생산금액은 생산량의 증감과 관계없이 꾸준히 상승하고 있다. 이는 어가의 상승과 더불어 채산성 있는 수산자원에 어업 생산을 집중하고 있기 때문으로 보인다. 표 1-3을 보면 각 어업별 평균단가를 알 수 있으며 천해양식 영업의 평균단가가 연근해어업 (일반해면어업)보다 평균단가가 낮은 것은 상대적으로 가격이 저렴한 해조류의 생산이 많음에 기인한다.

표. 1-3 2009년 각 어업별 평균단가

어업별	생산량 (MT)	생산금액 (천원)	평균단가 (천원/MT)
계	3,182,342	6,924,248,502	2,175.8
일반해면어업	1,226,966	3,640,436,977	2,967.0
천해양식어업	1,313,355	1,846,310,734	1,405.8
원양어업	611,950	1,163,750,724	1,901.7
내수면어업	30,071	273,750,067	9,103.5

역설적으로 이야기 하면 양식어업에 의하여 가격이 비싼 고급 수산물을 저렴한 가격으로 접할 수 있게 되었다는 것이다. 즉, 고급 수산물의 대중화에 크게 기여했음을 어느 누구도 부인할 수 없을 것이다.

참고로, 2009년의 국내 어업생산량 318만 톤 중에 전남이 98만 5,000 톤으로 30.0%를 차지해 가장 많았으며 다음으로 경남 55만 3,000 톤 (17.4%), 부산 40만 1,000 톤 (12.6%) 순이었다.

2. 양식산업의 현황

수산 양식이 시작된 것은 그 기원이 오래되지만 규모와 대상 수산생물의 수가 늘어나기 시작한 것은 최근의 일이다. 가장 오래된 양식의 기록은 기원전 1800년경 고대 이집트에서 못을 만들어 22종의 물고기를 길렀다는 기록이 있는데 이것이 축제식 양식의 시초라 볼 수 있다. 중국에서는 기원전 500년경에 팡리가 양식을 권장하는 양어경(양어경)을 보급하였고, 로마제국에서는 기원전 100년경에 국립양어장을 만들어 운영하였다는 기록이 있다 (6). 이후 세계 각국에서 양식에 대한 시도와 활동이 활발하게 이루어진 것은 19세기부터라고 보고 있다. 즉, 프랑스의 레미(Remy)가 1842년 송어를 인공부화하여 하천에 방류하면서 양식이 축양, 증식 중심에서 수산생물의 생활사를 조절할 수 있는 단계로 발전하기 시작하였다 (6).

우리나라도 오래전부터 축제식 어류 양식이 성행하였던 것으로 추측된다. 18세기 조선 인조 때에 석화(굴) 및 김의 양식을 엿볼 수 있는 기록이 남아 있어, 이때 이미 어류 외의 수산생물을 양식하기 시작한 것으로 보인다. 이후 양식의 본격적인 산업화는 일제강점기 때인 1920년대에 진해에 국립양어장이 건설되면서 진행되었다 (6).

우리나라의 바다 양식은 1960년부터 수하식 굴 양식이 시작되면서 크게 발전하였고, 그 후 멍게 · 홍합 · 피조개 · 전복 등의 각종 연체동물, 김 · 미역 · 다시마 등의 해조류, 돔 · 방어 · 넙치 등의 어류, 새우 등의 갑각류 등 종류도 다양해졌다. 외래종의 양식으로는 틸라피아 · 초어 · 백련 · 무지개송어 · 채널메기 · 이스라엘잉어(향어) 등이 도입되어 양식되고 있으며, 또한 연안 어장을 목장화하기 위한 인공어초의 투입과 많은 종류의 종묘생산이 대대적으로 진행되어, 한국의 양식업은 선진국 수준에 도달하게 되었다. 뿐만 아니라 각

지역에 수산연구소와 종묘배양장이 설치되어 더한층 양식업의 개발을 도모하는 수준으로 발전하고 있다.

양식업의 비약적인 발전은 양식어업에 의한 생산량의 증가세를 보면 잘 알 수 있다. 세계 양식어업의 생산량은 1950년대 100만 톤 미만 수준에서, 1973년 500여만 톤, 1992년에는 1,900만 톤, 2000년에는 3,400만 톤으로 총어업생산량의 20%에 육박하고 있으며 (6-8), 2004년에는 해초류를 제외하면 4,810만 톤, 해초를 포함하면 5,940톤으로 총어업생산의 절반 수준인 43%를 차지하고 있다 (9).

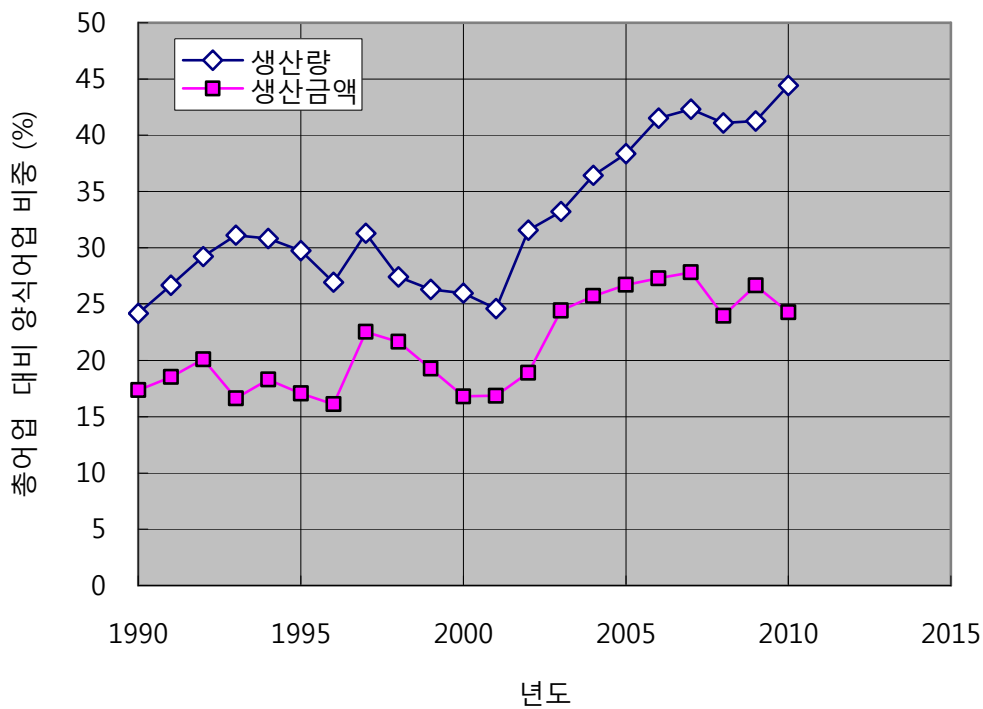


그림. 1-5 양식어업이 어업생산 총계에서 차지하는 비중 (data 출처: 통계청 사회통계국 농어업통계과)

우리나라의 양식어업도 1965년에는 전체 수산물 생산량의 11.9%에 불과했으나 1995년에는 100만 톤을 넘어서면서 30%에 육박하게 되었고 2006년도부터는 40%를 상회하게 되었다 (6) (그림 1-5). 이는 우리나라도 선진국 수준의 수산업 구조를 가지고 있음을 뜻하며 또한

양식기술이 세계적 수준임을 나타내는 지표이다. 우리나라 양식생산량은 2004년 기준으로 세계 13위를 유지하고 있어 우리나라 경제력 규모와 비슷한 순위로 양식산업이 그동안 견실하게 성장해 왔음을 뜻한다 (표 1-4). 한편, 생산량에 비해 생산금액 면에서는 전체 수산물 생산금액의 25~27% 정도를 차지하는 데 그치고 있다 (그림 1-5).

표. 1-4 2004년 세계 20위 양식어업 생산국 (해초류는 배제)

2004 Rank in Production (rank in 2003)	Country	Production 2004 (tons)	Percent of 2004 World AQ Production	Cumulative % of 2004 World AQ Production
1 (1)	China	30,614,968	67.3	67.3
2 (2)	India	2,472,335	5.4	72.8
3 (5)	Vietnam	1,198,617	2.6	75.4
4 (4)	Thailand	1,172,866	2.6	78.0
5 (3)	Indonesia	1,045,051	2.3	80.3
6 (6)	Bangladesh	914,752	2.0	82.3
7 (7)	Japan	776,421	1.7	84.0
8 (9)	Chile	674,979	1.5	85.5
9 (8)	Norway	637,993	1.4	86.9
10 (10)	United States	606,549	1.3	88.2
11 (11)	Philippines	512,220	1.1	89.4
12 (12)	Egypt, Arab Rep. of	471,535	1.0	90.4
13 (13)	Korea, Rep. of	405,748	0.9	91.3
14 (17)	Myanmar	400,360	0.9	92.2
15 (15)	Spain	363,181	0.8	93.0
16 (14)	Taiwan, China	318,273	0.7	93.7
17 (16)	Brazil	269,699	0.6	94.3
18 (18)	France	243,870	0.5	94.8
19 (20)	United Kingdom	207,203	0.5	95.2
20 (21)	Malaysia	171,270	0.4	95.6

(자료 출처: The World Bank Report No. 36622 - GLB (9))

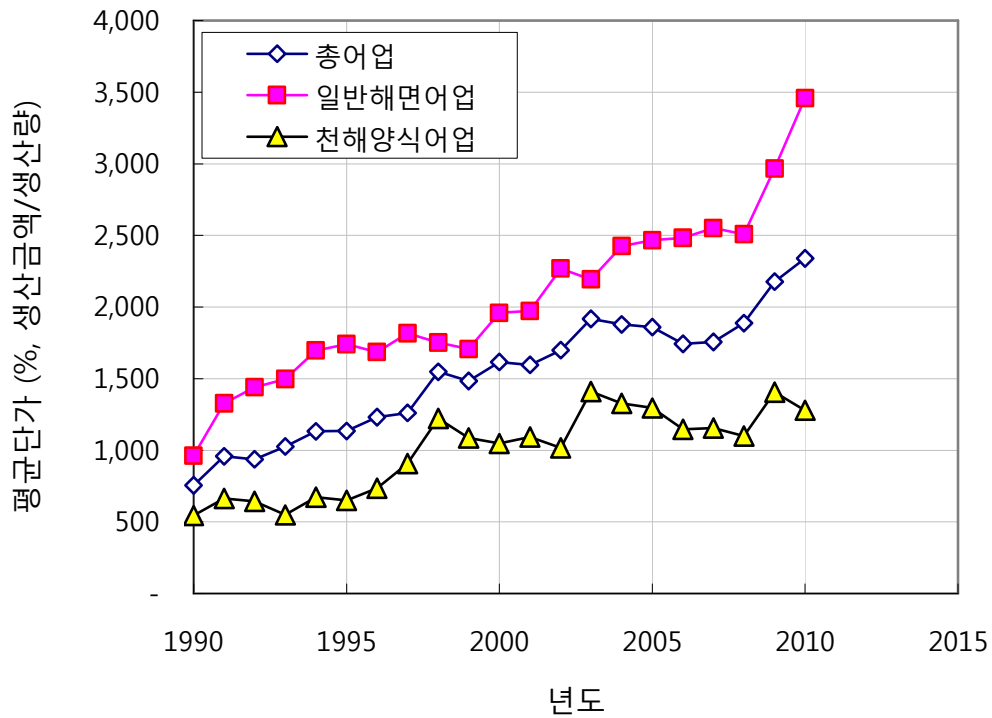


그림 1-6. 양식어업 평균단가의 연도별 증가 비교 (data 출처: 통계청 사회통계국 농어업통계과)

양식어업의 평균단가, 즉 생산금액을 생산량으로 나눈 금액은 앞에서 설명한 바와 같이 해면어업 즉 연근해어업의 평균단가 대비 40~70% 수준에 그치고 있다. 이는 상대적으로 가격이 저렴한 해조류의 생산이 많기 때문임은 이미 앞에서 말했다. 연도별 평균단가의 변화는 그림 1-6에서 보는 바와 같이 일반해면어업의 가파른 상승에 비해 완만한 상승에 그치고 있다.

표 1-5의 우리나라 양식에서 양식대상 품종별 생산현황을 보면 2009년에 양식어업의 생산량은 약 131.3만 톤이고, 그 중에 해조류의 생산이 약 85.9만 톤으로 양식어업생산량의 65.4%를 차지했다. 생산금액으로 보면 2009년 양식어업의 생산금액 9,816억 원에서 해조류 생산금액은 3,192억 원으로 32.5% 정도를 차지하여 생산금액의 점유율은 생산량의 점유율의 반 정도이다.

그 다음으로 생산량이 많은 품종은 패류로서 약 32.7만 톤을 생산하고 생산금액으로서는 4,940억 원을 생산하여 양식어업 총생산량 및 생산금액의 24.9%, 26.8%를 각각 차지했다.

어류 및 갑각류는 생산량이 11만 톤 (8.4%), 2만 톤(0.2%)을 각각 기록하였으나 생산금액 면에서는 9,816억 원 (53.2%) 및 285억 원 (1.5%)를 달성하여 판매단가가 높은 고급 품종임을 알 수 있다 (그림 1-7).

표 1-5. 년도별 천해양식어업의 품종별 생산 현황

	생산량 (천MT)					생산금액 (억원)				
	2005	2006	2007	2008	2009	2005	2006	2007	2008	2009
어 류	81	91	98	99	110	7,232	7,984	8,023	7,646	9,816
갑 각 류	1	2	1	2	2	233	256	162	277	285
패 류	326	391	479	344	327	3,145	3,437	4,473	3,688	4,940
기타수산동물	11	10	15	15	17	197	198	247	224	230
해 조 류	621	765	793	921	859	2,678	2,557	3,090	3,366	3,192
합계	1,041	1,259	1,386	1,381	1,313	13,484	14,432	15,995	15,201	18,463
소계 (해조류 제외)	420	494	593	460	455	10,806	11,875	12,906	11,835	15,271

(출처: <http://fs.fips.go.kr/index.jsp> 어업생산통계시스템)

표 1-6. 최근 무척추 수산동물의 양식어업 생산 현황

품종/연도		2008 년		2009 년		2010 년(11월?)	
		생산량	생산금액	생산량	생산금액	생산량	생산금액
갑 각 류	소계	1,924	27,718,856	1,893	28,518,467	2,585	34,453,420
	흰다리새우	1,794	25,604,623	1,812	27,378,347	2,563	34,074,889
	대하	130	2,114,233	81	1,140,120	22	378,531
패 류	소계	343,704	368,784,868	326,544	494,013,628	240,339	375,260,063
	굴류	249,976	118,444,544	240,911	155,128,837	174,956	92,463,928
	홍합류	67,442	24,533,952	55,035	37,752,736	37,323	20,507,915
	바지락	15,541	25,931,557	17,905	36,022,809	19,658	41,505,529
	전복류	5,146	171,410,142	6,207	233,145,394	5,127	190,938,487
	꼬막류	1,637	5,614,155	2,966	9,029,633	1,151	4,821,457
	피조개	1,903	16,645,927	1,714	16,599,430	1,352	21,789,145
	키조개	1,318	2,893,664	1,320	3,665,723	449	1,403,301
	가리비	421	2,433,839	348	2,353,587	227	1,621,158
	가무락	68	436,801	74	195,929	96	209,011
	동죽	213	374,182	0	0	0	0
	백합류	39	66,105	64	119,550	0	0
	기타패류	0	0	0	0	0	132
기타 수산동물	소계	15,345	22,433,172	16,743	22,981,283	12,174	21,930,665
	우렁챙이	7,826	13,422,822	7,208	13,471,395	6,386	15,176,989
	미더덕	2,620	4,818,276	3,845	5,093,141	2,903	3,372,663
	오만둥이	4,899	4,191,989	5,690	4,416,647	2,885	3,381,013
	성게	0	85	0	0	0	0
	기타수산동물	0	0	0	100	0	0

(출처: <http://fs.fips.go.kr/index.jsp> 어업생산통계시스템)

미세조류를 먹이로서 이용하는 무척추동물의 품종별 양식현황을 표 1-6에 나타내었다. 갑각류에서는 흰다리새우, 패류에서는 굴, 홍합, 바지락, 전복, 꼬막, 피조개 및 가리비가 기타 수산동물로는 우렁챙이, 미더덕, 오만등이가 대량으로 양식되고 있는 품종으로 나타났다.

양식 어류의 평균단가는 1990년대 이후로 계속 낮아지고 있으며 반면에 갑각류는 평균단가를 계속 유지하고 있다. 이는 갑각류는 생산량이 소량이어서 수요에 비해 과잉 생산이 되지 않아서 평균단가가 유지되는 것으로 보이며, 반면에 어류는 생산량이 많아서 판매경쟁이 심해지고 대량생산에 의한 비용절감에 따라 평균단가가 하락하는 것으로 보인다.

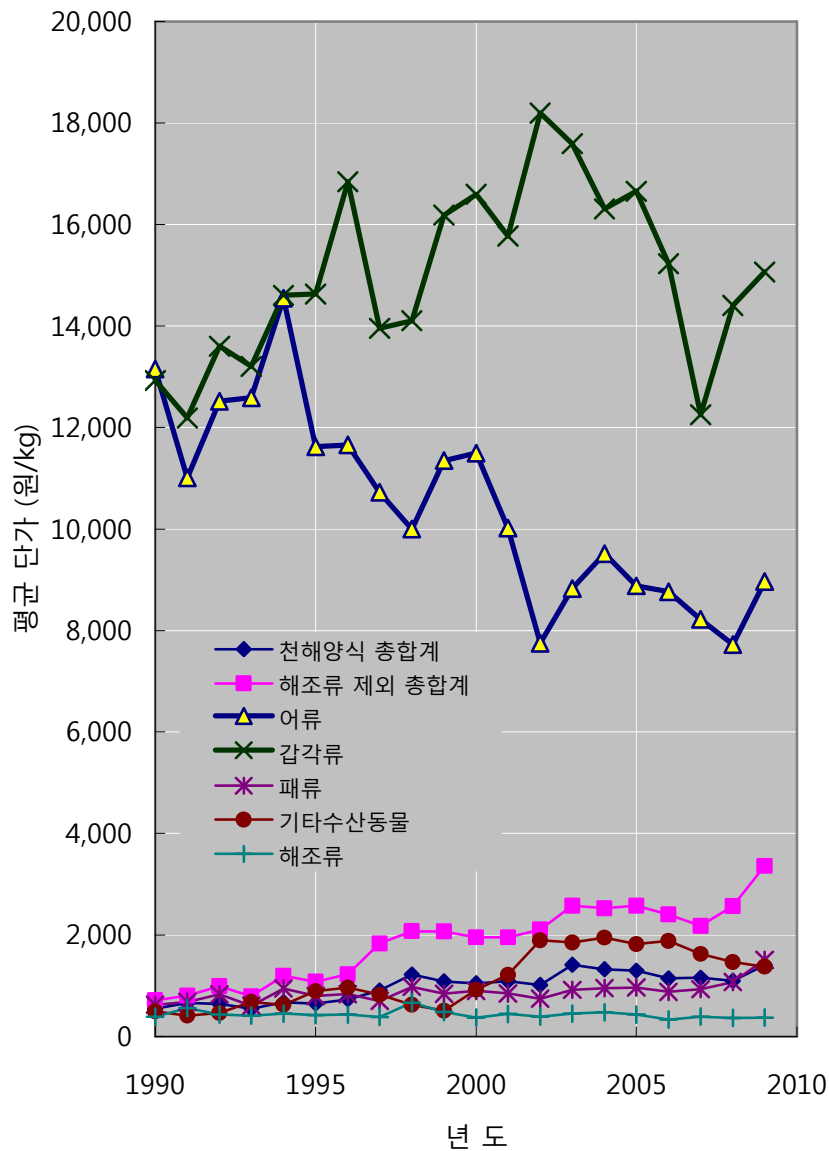


그림 1-7 양식대상 품종별 평균단가의 년도별 변화
(data 출처: 통계청 사회통계국, 농어업통계과)

3. 양식어업에서의 종묘산업

연안의 수산자원을 보호하기 위해서, 먼저 산란·서식장을 조성의 목적으로 1971 사각 콘크리트 인공어초를 투하하면서부터 인공어초시설사업이 시작되었고, 수산자원 조성의 목적으로서 1976년 수산종묘를 바다에 방류하는 수산종묘방류사업이 시작되었다.

수산종묘방류사업은 1985년까지는 국·도립 배양장에서 수산종묘를 직접 생산하고 이를 방류해 왔으나 1986년부터는 민간 배양장에서 종묘를 매입하여 방류하기도 했다. 이에 수산종묘산업이 도약하는 계기의 하나가 되었다 (4, 10).

종묘산업의 발전이 없이는 양식산업의 발전이 없기 때문에 종묘사업은 민간인에게의 분양을 한출으로 하고 정부의 수산종묘산업의 발전을 한 축으로 해서 발전해 온 것으로 보인다. 통계청이 발표한 수산종묘방류실적을 보면 통계가 시작된 1986년부터 1996년까지는 조피볼락, 대하 및 꽃게의 단 3종류만이 통계에 나타난다. 1997년에는 전복, 1998년에 넙치가 추가되고, 2001년에는 내수면어류가, 2007년의 통계에는 22종의 수산생물의 방류실적이 통계에 잡히고 있다. 통계와 달리 농수산부가 인터넷에 올린 정보로는 2002년 19종의 방류품종이 2009년 현재로는 43종으로 확대되었다고 하며 향후 50여개 어종이상으로 확대 예정이라고 밝히고 있습니다. 방류량으로 보면 부동의 1위는 대하로서, 통계가 잡히기 시작한 1986년 0.6 톤, 2005년엔 110 톤으로 최고를 기록하고 2007년에 24톤으로 감소했으나 한해 방류량 10 톤 미만인 다른 방류 품종과는 월등한 차이가 난다 (표 1-7 및 그림 1-8).

제1절에서 기술한바와 같이 미세조류와 관련이 깊은 수산생물은 무척추동물이다. 최근 2007년의 통계에서 나타난 무척추동물의 방류 품종은 대하, 전복, 보리새우, 해삼, 꽃게, 바지락, 북방대합 및 개량조개이다. 이중에 특히 미세조류로서만 종묘를 생산하는 비중이 높은 패류는 전복, 바지락, 북방대합 및 개량조개의 4종이 수록되어 있다(표 1-7 및 그림 1-8). 전복을 제외하고는 최근에야 대량으로 방류되기 시작했다.

양식어업에서 대량생산되는 무척추동물은 2항의 표 1-6에서와 같이 갑각류에서는 흰다리새우, 패류에서는 굴, 홍합, 바지락, 전복, 꼬막, 피조개 및 가리비가 기타 수산동물로는 우렁챙이, 미더덕, 오만둥이인 것으로 나타났다.

앞으로 또 다른 많은 신품종이 개발되겠지만 미세조류를 대량배양방법을 개발하고 있는 입장에서는, 현재 방류용 종묘 및 양식용 종묘로 많이 생산되고 있는 품종에 관심을 가져야 할 것으로 생각된다. 결론적으로 갑각류에서는 흰다리새우, 보리새우, 패류에서는 굴, 홍합, 바지락, 전복, 꼬막, 피조개, 가리비 및 북방대합과 개량조개 등 9종, 기타 수산동물에서는 우렁챙이, 미더덕 및 오만둥이의 먹이가 되는 미세조류에 관심을 가져야 할 것 같다.

표 1-7. 년도별 수산종묘방류실적

수량 (kg)

수산종묘별	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
계	26,362	34,066	30,678	8,369	23,756	17,832	85,257	126,302	100,670	92,267	128,359	84,728
조피볼락	464	479	514	599	1,464	1,741	254	242	999	2,787	1,586	7,701
대하	25,898	33,547	29,838	7,456	22,016	12,883	77,236	110,227	73,435	61,214	89,903	24,660
황복	-	-	-	-	-	-	77	260	340	238	-	-
전복	-	40	85	85	268	529	1,297	3,105	3,415	3,856	3,516	5,003
넙치	-	-	241	229	8	683	1,549	2,518	6,093	4,482	3,843	9,622
감성돔	-	-	-	-	-	-	682	1,791	1,988	2,940	2,598	5,214
돌돔	-	-	-	-	-	-	317	568	909	1,045	2,183	2,694
보리새우	-	-	-	-	-	-	-	2,178	4,719	2,090	1,680	1,873
참돔	-	-	-	-	-	-	652	-	525	648	362	618
농어	-	-	-	-	-	-	-	317	-	-	-	-
해삼	-	-	-	-	-	-	-	-	1,059	1,532	4,310	2,243
쥐치류	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	310
황점볼락	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	45	478
볼락	-	-	-	-	-	-	-	188	464	920	1,887	2,771
가자미류	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	94	-
강도다리	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	702
꽃게	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,751	3,811	9,641
붉은쏨뱅이	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21
바지락	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15
북방대합	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	124
개랑조개	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	65
내수면어류	-	-	-	-	-	1,996	3,193	4,908	6,724	8,744	12,541	10,973

금액(백만원)

수산종묘별	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
계	202	294	321	312	626	1,187	2,662	5,717	8,101	8,958	10,642	15,954
조피볼락	71	80	74	120	270	382	221	110	299	783	674	2,286
대하	131	174	97	37	57	16	343	547	564	205	379	125
황복	-	-	-	-	-	-	55	130	170	100	-	-
전복	-	40	85	84	292	560	1,212	2,423	2,885	2,913	3,122	4,111
넙치	-	-	65	71	7	144	261	1,001	1,968	1,608	1,236	2,196
감성돔	-	-	-	-	-	-	122	385	499	562	514	1,202
돌돔	-	-	-	-	-	-	83	261	348	520	867	780
보리새우	-	-	-	-	-	-	-	59	99	188	30	37
참돔	-	-	-	-	-	-	64	-	125	176	56	82
농어	-	-	-	-	-	-	-	142	-	-	-	-
해삼	-	-	-	-	-	-	-	-	253	358	997	558
쥐치류	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	120
황점볼락	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	198
볼락	-	-	-	-	-	-	-	67	174	284	457	814
가자미류	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	146	-
강도다리	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	640
꽃게	-	-	-	-	-	-	-	-	-	298	711	992
붉은쏨뱅이	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
바지락	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25
북방대합	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30
개랑조개	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18
내수면어류	-	-	-	-	-	86	300	592	716	932	1,433	1,730

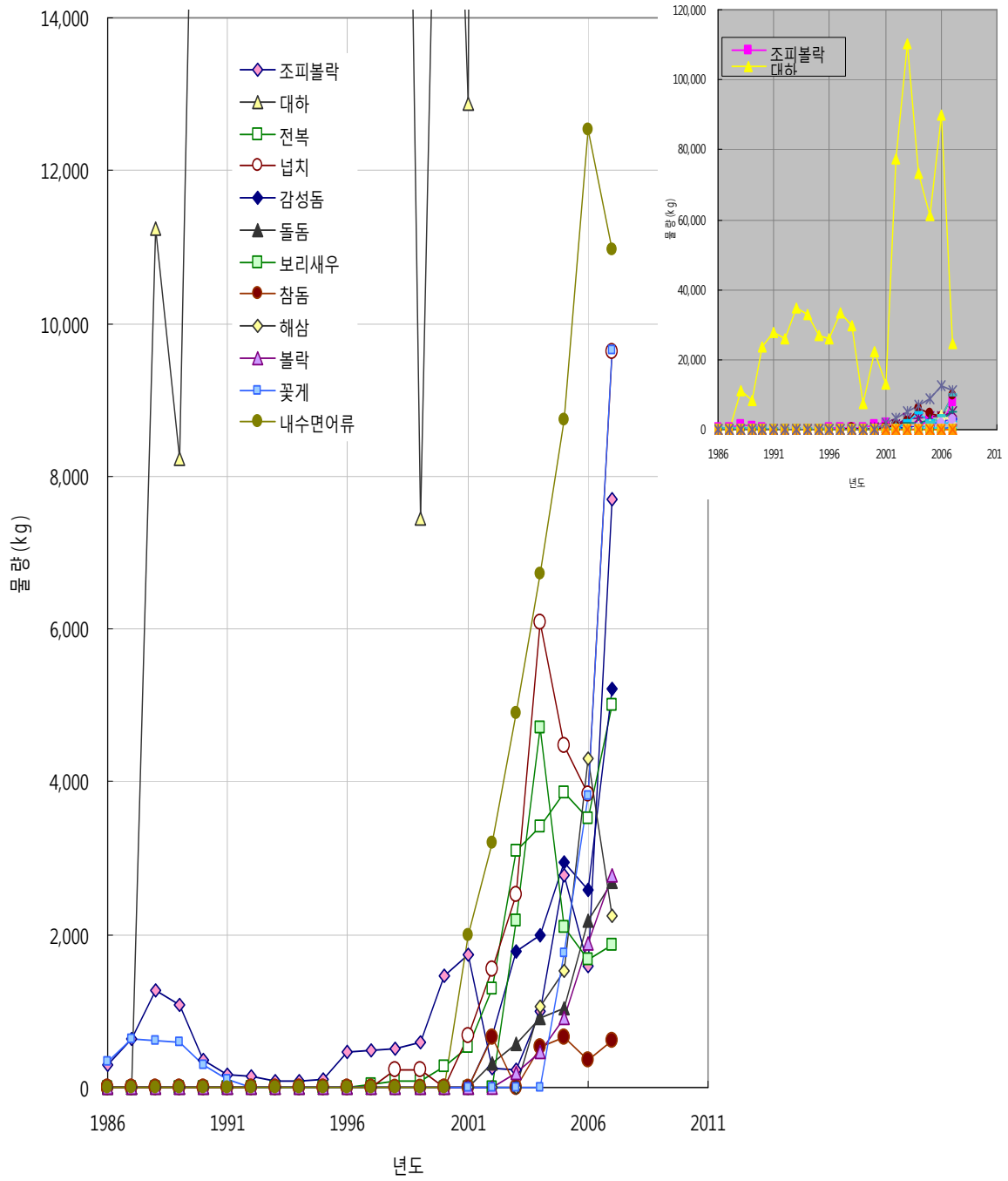


그림 1-8. 년도별 수산종묘방류실적 추이

4. 양식장에서의 미세조류 배양 실태

미세조류는 해양생태계에서 최하층의 1차 생산자 (primary producer)임은 이미 설명했다. 따라서 모든 수산 동물의 먹이 사슬은 미세조류를 일차 영양단계로 해서 시작된다. 일반적으로 미세조류 먹이생물은 부화 직후의 초기성장단계를 위한 것이다. 유생이 성장하여 입이 커지고 활동력이 왕성해지면 미립자 사료 또는 자연 상태에서 채집한 크기가 큰 미세조류를 직접 공급할 수도 있다. 해산 어류일 경우는 난황이 흡수된 직후, 무척추동물일 경우는 초기 부유 유생시기의 섭취된 먹이생물의 질적 및 양적인 상태가 초기 생존율에 매우 중요하다.

우리나라의 종묘만을 전문적으로 양성하는 양식장이 많이 생겨나고 있으나 종묘 이송 시 종묘의 생존율 때문에 가까운 육성장에만 공급할 뿐 먼 곳으로의 이송은 경제적으로 채산성이 없다고 한다. 즉, 종묘장이 성공하려면 가까운 거리에 육성장이 얼마나 많이 확보하고 있는냐가 중요하다고 한다 (11). 이는 아직도 이송 중 생존력을 높일 수 있는 경제적인 기술이 개발되어 있지 않기 때문으로서, 현재 기술로는 종묘를 주문자의 요구대로 적기에 공급하기가 어렵다는 것을 시사한다. 이러한 점 들이 종묘장 대형화에 제약이 되는 것 같고 따라서 많은 양식장이 종묘장과 육성장을 가지고 운영해야 할 뿐만 아니라 종묘의 사육에 필요한 식물성 먹이인 미세조류 및/혹은 동물성 먹이인 로티퍼 같은 것도 직접 배양해야 하는 실정이다. 따라서 각 양식장이 선택과 집중을 통하여 전문화하기가 어려워 채산성이 떨어지는 원인이 되고 있다. 다행히도 담수산 클로렐라를 이용한 동물성 먹이인 로티퍼의 배양은 기업화가 되어 있으나, 해수산 미세조류를 전문적으로 생산하여 공급하는 기업은 많지 않고 활성화되어 있지 않다.

현재 대부분의 양식장에서 미세조류를 자체적으로 배양하여 먹이사료로 이용하고 있으나 미세조류의 배양이 어려워 적기에 공급하지 못하거나, 적절한 배양기술 및 시설을 확보하지 못하여 여러 가지 세균 또는 바이러스에 오염된 미세조류를 공급함으로써 양식대상생물의 생존율을 저하시키거나 심하면 폐사시키는 경우도 있다고 한다. 각 양식장에 필요한 미세조류는 그 양도 많지 않을 뿐만 아니라 필요시기도 한정되어 있어서 고임금의 전문적인 인력을 들 수도 없고, 자동화 시설도 효율성이 떨어지므로 갖출 수가 없다. 따라서 작업이 거의 수동에 의존함에 따라 작업 강도가 강하여 인력확보도 어렵다고 한다. 소위 양식장의 계류 같은 존재인 것 같다.

수산전문 잡지 아쿠아인포의 어느 종묘장 소개에서, 한 종묘장 대표는 “빠른 시일 내에 패류 인공종묘생산에 유용한 제품화된 미세조류가 출시됐으면 합니다. 미세조류가 자가배양해 사용하기에는 비용도 많이 들뿐더러 인력관리에도 에너지를 많이 쓰게 됩니다. 미세조류를 손쉽게 사용할 수 있어야 패류 인공종묘생산시장도 커지고 안정화될 수 있을 것입니다”라고 고충을 이야기했다 (12).



그림 1-9. 양식장의 미세조류 배양시설

제3절 연구 필요성 및 범위

1. 연구의 필요성

수산업에서의 미세조류의 대량생산의 필요성은 제 1절 및 제 2절에서 어느 정도 기술했다. 정리하자면 미세조류는 해양생태계의 1차 생산자로서 모든 해양생물의 영양 및 에너지의 공급원이 된다. 앞으로 수산사업은 '잡는 어업'에서 수산자원을 보존하고 지속가능한 수산업으로 가기 위해서는 '기르는 어업'이 차지하는 비율이 계속 증대 될 것이며 그러한 의미에서 양식업은 세분화되고 전문화되어야만 국제경쟁력에서 우위를 점하여 국제시장을 선도해 나갈 것이다. 즉 축산에서와 같이 수직적인 전문화가 이루어져야 할 것이다.

해양생태계에서의 미세조류가 차지하는 위치의 중요성을 인식하고, 지금까지 많은 연구가 이루어졌지만 아직도 많은 부분이 학문적인 연구에만 머물러 왔었던 것이 현실이다. 특히 미세조류는 양식산업에서의 그 중요성에 비하여 아직 그 경제적인 가치가 크지 않아서, 즉 먹이생물로서의 상품시장이 성숙되지 않아서 학문적으로 연구되었던 지식과 기술이 산업계로 이식되지 않았던 것 같다. 우리나라의 미세조류 관련한 학문적 수준은 세계수준과

비교하여 결코 낮은 것이 아니나 직접 양식장에 방문하여 보면 그 배양하는 수준은 조방적인 수준에 머물러 있다.

또한 미세조류의 산업화가 늦어지다가 보니 산업에 취업하기 위해 미세조류를 전공한 인력은 거의 없으며, 또한 학문적으로 연구하고 있는 인력도 결코 풍부한 것은 아니다. 요즘 biodiesel 관련하여 미세조류에 관심이 증대되고 있으나, 수산관련하여서는 앞으로도 증가할 것 같지는 않다. 왜냐하면 취업의 문은 거의 없을 뿐만 아니라 취업여건도 대도시가 아닌 오지에 근무해야하고, 그나마 취직하였다고 하더라도 미세조류 관련의 업무에만 전념할 수 있을 만큼 충분한 일거리도 없고 다른 업무도 병행해야 하기 때문에 앞으로도 미세조류 전공으로 취업하고자하는 지원자는 그리 많지 않을 것으로 생각된다.

따라서 미세조류를 전문하는 중규모 이상의 산업체가 출현해야만 미세조류 산업이 본격적으로 뿌리를 내릴 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 첨단기술 또는 세계 최고의 기술의 확보보다는 현실적인 시장상황에 맞추어 현장에 맞는 기술을 확보하여 비즈니스 모델을 어떻게 창출해야 하는가에 초점을 맞추었다. 즉 미세조류의 배양면을 보면 국제 수준의 조체농도를 만드는 것보다도 시간당 생산성이 훨씬 중요하다는 사실을 깨달았으며, 대형발효시설보다는 시장에 즉각 대응할 수 있는 소규모의 배양시설을 적절하게 보유하는가가 더 중요하다고 생각되었다. 또한 앞으로의 잠재고객들의 요구도 순수한 오염되지 않는 제품을 요구하나 완벽하게 무오염 제품의 생산은 거의 채산성이 없으므로 어디까지 오염을 어느 정도 수준까지 허용하는가가 더 중요하다고 보았다.

다행히도 산업적으로 유용한 우리나라 연근해에 자생하는 여러 가지 미세조류가 국내의 미세조류 은행에 확보되어 있어, 이 점은 앞으로도 많은 도움이 되리라 생각한다. 다만 무오염 상태 (axenic)의 순수 미세조류 균주의 확보에는 서둘러야 할 것으로 생각되었다.

2. 연구의 범위

먹이생물로서의 미세조류는 한 종류의 미세조류로 구성되는 경우는 거의 드물다. 보통 2~3가지 정도의 먹이생물을 급이하여 양식대상 수산생물을 기른다. 이러한 점을 감안하여 애초에 서로 상이한 성질의 미세조류를 공시균주로 하여 실험하기로 하였다. 그리하여 외국에서 상품화가 된 미세조류를 조사하여 그 중에서 상품화 빈도수가 높은, 즉 상품성이 높은 미세조류를 미리 선정하고 본 연구를 신청하였다. 그 결과 선정된 속이 *Nannochloropsis*와 *Tetraselmis* 이었다.

당사에서 연구범위로 선정한 분야는 다음과 같다.

- 미세조류의 수집 및 선발
- 먹이생물로서의 적합성 검토
- 대량광배양을 위한 배지조건 및 배양인자 조사

- 비닐백 배양으로 PBR 디자인위한 scale-up data 확보
- 축소 PBR 시제품 제작 및 운영문제점 파악
- 생산규모의 PBR 시제품 제작 및 균체생산성 최적화
- 미세조류 품질향상 및 응용법 개발
- 균체 농축 및 상품화 전략 수립

미세조류를 종묘 및 양식대상생물의 먹이사료로 이용하기 위해서는 순수배양과 고농도 대량배양 기술이 한계로 알려져 있다. 먹이생물이 질병을 전파하는 매개물이 되지 않기 위해서는 적어도 배양할 미세조류의 순수 미세조류주 (microalgal strain)를 확보하는 것이 급선무이다. 그러나 조사한 바로는 세계의 대부분의 미세조류 분양기관이 순수한 (axenic) 미세조류를 보유하고 있지 않고 있었다. 따라서 무오염의 미세조류주를 분양하는 기관을 조사하고, 별개로 오염된 (xenic) 미세조류주로부터 순수한 오염되지 않은 미세조류를 분리하는 기술을 갖는 것에 중점을 두고 많은 실험을 했다.

앞에서 이야기 한 바와 같이 미세조류를 먹이생물로 기업화하기 위해서는 수십 가지 종류의 미세조류를 가져야 한다. 따라서 본 연구에서 시험균주로 사용하고 있는 두 종류의 미세조류 외에도 사업화 시에는 많은 미세조류주를 확보할 필요가 있다. 이러한 이유로 본과제에서의 배지조건 및 배양인자의 조사는 두 균주에 모두 영향을 미치는 공통인자를 파악하고자 하였으며, 향후 여러 가지 미세조류를 선발해야 할 경우를 대비하여 test해야 할 인자 및 표준 방법을 확립하는데 우선을 두었다.

국내에서는 기후 및 부지확보에 어려움이 있어 raceway 및 단순한 시멘트 탱크에서의 배양은 처음부터 고려하지 않았다. 따라서 PBR로 미세조류를 배양할 수밖에 없는데 원가확보를 위하여 고밀도 배양 가능성, PBR 설치비 혹은 운영비의 저감을 위한 pBR 디자인 및 배양공정 개발에 초점을 맞추었다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 미세조류의 배양 연구 현황

1. 미세조류 배양용 배지

최초의 해양미세조류의 배양은 1892년 Miguel이 해수에 무기영양염을 첨가하여 조성한 배지로 규조류를 배양하면서부터 시작되었다. 그러나 활발한 연구는 1912년 Pringsheim이 토양추출물을 사용하여 최초로 해양미세조류의 성장을 촉진시키기 위하여 사용한 것이다. 이 방법은 1927년 Schreiber, 1934년 Føyn 등에 의하여 계속 연구개발 되었다. Schreiber는 해수에 질산나트륨 (NaNO₃)과 제1인산 나트륨 (NaH₂PO₄)만을 넣은 매우 간단한 배지를 개발하였는데 Føyn은 여기에 토양추출물을 첨가한 Erdschreiber 배지를 개발함으로써 오늘날까지 널리 사용하는 배지를 만들었다 (11).

이후에 1957년 Provasoli 등이, 1962년엔 Gulliard와 Ryther가, 1971년에 Ukles가 자연해수에 무기물을 첨가한 배지를 개발하였고, 1960년 Lewin과 Lewin, 1966년엔 Gold와 Baren, 1978년에 Starrk 자연해수에 유기물을 첨가한 배지를 개발하였다.

한편 Ukeles는 1971년 천일염으로 제조한 배지를 개발하고, Provasoli 등 (1957), Drrop (1962)과 Lewin (1966)은 인공해수배지를 만들어 조류의 비타민 요구량 등, 영양요구와 생리 등을 밝힘으로서 다양한 해양미세조류의 배양을 가능케 하였다.

표 2-1. 각 배지에 배양한 주요 조류 그룹 (13)

TABLE Main Algal Groups Cultured in the Media

	Medium	Group Cultured
Freshwater Media	BG11 Medium	Freshwater and soil Cyanophyceae
	Diatom Medium	Freshwater Bacillariophyceae
	DY-III Medium	Freshwater Chrysophyceae
	Aronson Medium	<i>Ochromonas</i> sp.
	Cramer and Meyers Medium	Euglenophyceae
	Beijernick Medium	Freshwater Chlorophyceae
	Bold Basal Medium	Broad spectrum medium for freshwater Chlorophyceae Xanthophyceae, Chrysophyceae and Cyanophyceae
	Mes-Volvox Medium	Broad spectrum medium for freshwater algae
Marine Media	Walne's Medium	Broad spectrum medium for marine algae (especially designed for mass culture)
	ASN-III Medium	Marine Cyanophyceae
	CHU-11 Medium	Marine Cyanophyceae
	PCR-S11 Medium	Prochlorophyceae
	f/2 Medium	Broad spectrum medium for coastal algae
	K Medium	Broad spectrum medium for oligotrophic algae
	ESAW Medium	Broad spectrum medium for coastal and open ocean algae

표 2-2. 민물용 배지에 배양한 주요 조류 (14)

TABLE Application of media -fresh water

Medium	Classes Cultured
<i>Defined</i>	
Beijernick	Chlorophyceae
Bold Basal	Chlorophyceae, Chrysophyceae, Cyanophyceae, Rhodophyceae
Bozniak Community	Chlorophyceae, Chrysophyceae, Cyanophyceae, Rhodophyceae
Cg 10	Cyanophyceae
Chu no. 10	Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Chrysophyceae, Cyanophyceae
Rodhe VIII	Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Chrysophyceae, Cyanophyceae
Volvox	Chlorophyceae
Waris	Chlorophyceae
WoodsHole MBL	Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Chrysophyceae, Cyanophyceae
<i>Enrichment</i>	
Modified <i>Porphyridium</i>	Rhodophyceae
<i>Polytomella</i>	Colorless flagellates, Euglenophyceae
Proteose	Chlorophyceae, Chrysophyceae, Cyanophyceae, Euglenophyceae
Soil extract agar	Chlorophyceae, Chrysophyceae, Cyanophyceae, Rhodophyceae
Soil water	Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Colorless flagellates, Chrysophyceae, Cyanophyceae, Euglenophyceae, Rhodophyceae
<i>Trebouxia</i> agar	Chlorophyceae

미세조류를 실험실에서 다양하게 배양이 가능함에 따라 미세조류를 먹이생물로 하는 조개류 등의 양식대상생물의 연구가 활발하게 일어났다 (11). 미세조류의 배양에 사용되는 배지는 표 2-1. ~ 표 2-3과 같다.

표 2-3. 해수용 배지에 배양한 주요 조류 종 (15)

TABLE Application of media -marine

Medium	Species Cultured
<i>Enrichment</i>	
Erdschreiber	Wide variety of organism including both unicellular and benthic species
Grund	Rhodophyceae including Ceramiales and coralline species (Cryptonemiales)
ES	Numerous unicellular and benthic species
f/2'	Wide spectrum of unicellular species
SWM	Benthic and unicellular species of Chlorophyceae, Chrysophyceae, Phaeophyceae and Rhodophyceae
<i>Synthetic</i>	
ASP-2	Axenic culture of a Rhodophyceae and several species of Laminariales (Paeophyceae)
ASP-6	General purpose medium for both unicellular and benthic species including axenic culture of several Rhodophyceae, Phaeophyceae and Chlorophyceae species
ASP-12	Unicellular and Rhodophyceae species
ASP-M	Wide variety of unicellular and benthic species
<i>Muller</i>	Dinoflagellates, several red and brown algae and coenocytic green species. Chlorophyceae <i>Derbesia</i> (Codiales) and <i>Acetabularia</i> (Dasycladales) form reproductive structures

2. 미세조류 배양

대부분의 미세조류는 광자가영양성장 (photoautotrophic growth) 뿐만 아니라 타가영양성장 (heterotrophic growth)도 가능한 혼합영양성장 (mixotrophic growth)을 한다. 여기서 타가 및 혼합영양성장은 비타민 같은 미량으로 필요한 성장인자 (growth factor)뿐만 아니라 탄소원 및 질소원으로 유기화합물을 이용할 수 있는 것을 말하며, 이와 관련하여 많은 미세조류에서 혼합영양성장 및 타가영양성장에 관한 연구가 수행되었다.

Chlorella vulgaris 같은 민물의 미세조류는 이미 타가영양성장을 이용한 산업적 배양법이 개발되어 건강기능식품으로 판매되고 있는지 오래되었고, *Schizochytrium* 및 *Cryptochytrium* 도 DHA의 생산목적으로 타가영양배양법을 택하고 있다. *Chlorella vulgaris*의 경우에는 원래 서식처가 민물이나, *Schizochytrium* 및 *Cryptochytrium*는 서식처는 해양이기 때문에 해수를 사용하지 않는 타가영양배양법을 개발함으로써 전통적인 탱크배양법으로 배양이 가능하게 되었다. 해수를 사용하면 탱크를 부식시켜서 경제성이 떨어지기 때문에 해수를 배제한 배양방법을 개발했다.

이외에 혼합 혹은 타가 영양성장이 가능한 것으로 연구되었던 것은 *Brachiomonas submarina* (16), *Chlorella pyrenoidosa* (17, 18), *Chlorella sorokiniana* (19), *Chlorella minutissima* (20), *Hematococcus pluvialis* (21, 22), *Micractinium pusillum* (23), *Scenedesmus obliquus* (17), *Tetraselmis suecica* (24) 의 녹조류 및 남조류 *Spirulina platensis* (25), 규조류 *Phaeodactylum tricornutum* (26, 27, 28, 29), 진안점조류 *Nannochloropsis* sp. (30, 31), 유글레나조류 *Euglena gracilis* (32), 와편모조류(Dinophyceae, dinoflagellate) *Karlodinium micrum* (33), *Fragilidium subglobosum* (34) 등으로 많은 조류가 mixotroph임을 보여 준다. 대양의 상층부의 90% 이상의 조류를 포함한 생물개체가 mixotroph일 것으로 추측하고 있다 (35). 이와 같이 조류의 혼합영양의 생활방식 (life style)을 응용하려는 연구가 많이 되고 있다 (16~34).

상기의 *Chlorella vulgaris*, *Schizochytrium* 및 *Cryptochytrium* 같이 전적으로 타가영양법 (heterotrophic)으로만 배양할 수 있는 조류는 아직도 극히 드물다. 또한 전적으로 광합성에 의존하여 무기물로부터 성장에 필요한 모든 생화학적 화합물을 합성하는 조류도 드물다 (36). 즉 적어도 비타민 같은 미량의 생육인자를 필요로 하는 경우가 많다. 대부분의 미세조류가 광합성에 의한 자가영양성장을 근간으로 하고, 타가영양성장은 보조적인 mixotroph의 생활방식을 택하고 있기 때문에 조류를 잘 배양하기 위해서는 광합성이 가능한 효율적인 광배양장치 혹은 시설이 반드시 필요하고 배지에 비타민 같은 생육인자를 첨가할 필요가 있다.

미세조류의 배양에 있어서 조류의 성장을 조절하기 위한 가장 중요한 인자는 영양성분의 양 및 질, 빛, pH, 혼합 (turbulence), 염도 (salinity) 및 온도이다 (36). 각 인자의 가장 최적 수준 뿐만 아니라 각 인자의 허용범위도 종에 따라 특이적 (species-specific)이며 여러 가지 인자 사이에는 상호 관련이 있을 수 있으며 어떤 조건에서 최적의 인자 수준이 다른 조건에서 꼭 최적인 것은 아니다 (36). 따라서 많은 set의 인자조건을 검토할 필요가 있다.

온도는 미세조류 수집장소의 온도와 가장 가깝게 유지하는 것이 가장 이상적이다. 즉, 극지

방의 조류는 10℃ 이하, 온대는 10~20℃, 열대는 20℃ 이상이다. 가장 흔히 배양되고 있는 미세조류의 종의 허용온도는 배양배지조성 및 배양하는 종 및 주에 따라 변할 수는 있지만 대개 16~27℃이고, 그 중간 값인 18~20℃를 가장 많이 사용한다. 많은 수의 종에서 16℃ 이하에서는 생육이 느려지고, 35℃ 이상에서는 치명적이다 (36).

식물에서와 같이 미세조류에서도 빛은 광합성반응의 에너지원으로서 세기 (intensity), 광스펙트럼의 질 (spectral quality) 및 광주기 (photoperiod)를 고려해야 한다. 빛의 세기는 매우 중요한 역할을 하며 배양액의 깊이 (depth)와 배양 조체의 밀도 (density)에 따라 요구량이 다르다. 깊이와 세포농도가 증가하면 빛의 세기는 당연히 증가시켜야 한다. 너무 강한 세기는 photoinhibition을 초래할 수도 있다. 가장 자주 이용되는 빛의 세기는 100~200 $\mu\text{E sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ 이다. 이는 한 낮 (full daylight)의 빛의 세기 2000 $\mu\text{E sec}^{-1} \text{m}^{-2}$ 의 약 5-10%에 해당한다. 빛은 자연광 혹은 광합성에 가장 활성적인 청색(blue) 혹은 적색(red) 스펙트럼의 형광이면 된다. 명암 주기, Light/Dark (LD) cycle은 최대 16:8, 보통 14:10 혹은 12:12이다 (36).

배양되고 있는 대부분의 미세조류 종의 pH 범위는 7-9 사이이고 최적 범위는 8.2-8.7이다. 통기에 의해서 pH는 올라가며, 특히 고밀도 배양에서는 한계치인 pH 9에서 이산화탄소를 첨가하여 떨어뜨리는 것이 좋다.

해양의 미세조류는 염도의 변화에 대해서는 극도로 내성이 있으나 (tolerant), 대부분의 종은 서식처의 염도보다 약간 낮은 염도에서 가장 잘 자란다. 20-24 g l^{-1} 의 염도가 최적이다(36).

혼합(mixing)은 조체의 침강을 방지하기 위해서 필요하며 모든 세포가 빛 및 배지에 동등하게 노출되도록 하는 것이 이상적이다. 이렇게 하여 온도 층 형성 (thermal stratification)의 방지 및 배지와 air사이의 가스교환의 향상을 기할 수 있다. 고밀도 배양에서는 공기의 CO₂ 농도 0.03%로는 조류의 성장을 제한할 수 있기 때문에 순수 이산화탄소를 보충해주면 (예, 공기 부피의 1%의 비율) 좋다. CO₂ 공급은 CO₂/HCO₃⁻의 형태로 물의 pH에 대한 완충력을 높인다. 모든 미세조류가 한 혼합에 내성이 있는 것은 아니므로 주의할 필요가 있다 (36).

3. 미세조류 배양장치 혹은 시설

가. 개방형 대 폐쇄형 배양시스템

조류를 이용하여 상업적인 유용물질 혹은 biomass를 생산하여 상점의 판매대에 올리기 위해서는 배양 장치 혹은 시설의 설계 및 최적화는 필수적인 단계이다.

배양장치는 생산물 및 미세조류의 strain에 따라 달라진다. 생육이 빠른 미세조류나 높은 pH나 높은 염도 같은 극단적인 환경 (extreme condition)에 성장이 가능한 미세조류는 개방된 배양장치 (open system)를 이용할 수 있다. 반면에 제약산업에서의 적용되는 미세조류 혹은 산물의 생산에는 대부분 단일종의 미세조류 배양 (monoalgal culture) 혹은 무균 배양 (axenic culture) 이 요구된다. 따라서 이런 기준을 만족시키고 효율적인 비용으로 생산할 수 있는 폐쇄된 배양장치 (closed system)이 개발되어야 한다 (37).

전통적인 발효산업에서와 마찬가지로 미세조류의 배양에서도 작은 배양시설로 많은 생산을 할 수 있는, 즉 단위배양시설 당 생산성이 높아서 궁극적으로 배양단계의 생산비용뿐만 아니라 다운스트림의 비용까지도 감소시킬 수 있어야 한다. 이렇게 하기 위해서는 고밀도의 배양외에 높은 고효율의 광이용 (light utilization)이 수반되어야 한다. 고밀도의 배양은 적당한 반응기의 설계 및 공정 최적화가 되어야 달성될 수 있다 (38). 이런 이유로 가장 중요한 scale-up 및 운전의 인자인 빛 및 물질 전달 (light and mass transfer)과 전단과 혼합 속도 (shear and mixing rates)에 지식을 쌓을 필요가 있다. 이들의 인자는 상호 밀접하게 관련이 있으며 생산시스템의 생산성과 효율을 결정한다 (37).

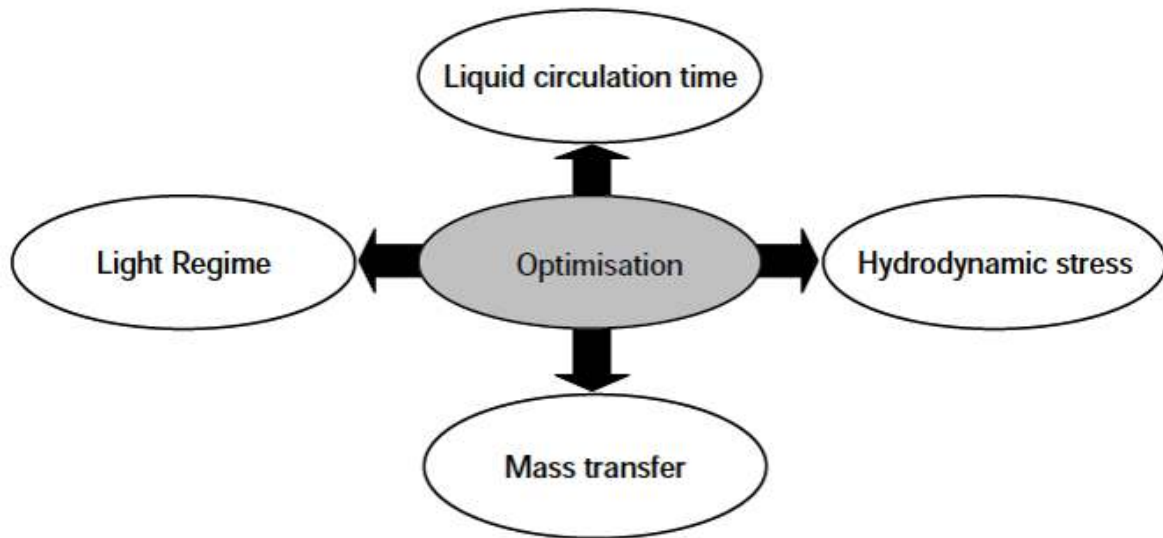


그림 2-1. 광배양기 (photobioreactor)의 scale-up 인자 (37).

미세조류의 배양은 호수나 연못 같은 개방된 배양시스템 (open-culture system)과 광배양기 (photo-bioreactors, PBRs)로 불리는 고도로 제어할 수 있는 폐쇄된 배양시스템 (closed-culture system)에서 할 수 있다. 개방된 배양시스템은 설비투자 및 운전비용이 적고, 대용량의 폐쇄된 시스템과 비교하여 내구성이 있으며 폐쇄된 시스템에 비하여 대규모의 생산용량을 확보할 수 있다. 반면에 연못 (pond)는 영양분을 균질화하기 위해 많은 에너지가 들고, 성장에 필요한 충분한 태양에너지를 받아들이기 위해 수위를 15 cm (혹은 150L/m²) 이하로 유지해야 한다.

또한 기후에 민감하고, 수온, 증발 및 조명의 조절이 불가능하며, 대량의 미세조류를 생산 할 수 있으나 더 넓은 토지가 필요하고, 다른 미세조류나 세균에 오염되기 쉽다. 그리고 대기가 단지 0.03-0.06%의 CO₂를 함유하고 있기 때문에 물질전달의 제한(mass transfer limitation)이 미세조류의 세포성장을 늦출 것으로 예상된다 (39).

PBR은 배양할 미세조류의 생물학적 및 생리학적 특성에 맞게 최적화할 수 있는 유연한 시스템 (flexible system)으로서 open pond에서 자랄 수 없는 미세조류의 종도 배양할 수 있게끔 한다. PBR에서는 대기와 배양 미세조류 사이의 가스 및 오염원 (예, 미생물, 먼지)의

직접적인 교환이 반응기의 벽에 의해서 제한되거나 혹은 허용되지 않는다.

모양 혹은 디자인에 따라서 PBR은 open pond에 비해 몇 가지 장점을 가진다. 즉, pH, 온도, 혼합, 이산화탄소 및 산소 같은 배양조건 및 성장요인의 더 잘 제어할 수 있고, 증발을 방지하며, 이산화탄소의 손실을 감소시켜 보다 높은 미세조류 밀도 혹은 세포농도, 보다 높은 체적생산성 (volumetric productivity, g/L d)을 얻도록 하고, 안전하고 보호된 환경을 제공하여 오염을 방지하거나 혹은 경쟁 미생물의 침입을 최소화한다 (39).

표 2-3에 PBR과 pond사이의 몇가지 배양조건 및 성장인자를 비교했다.

표 2-4. 미세조류 대량배양을 위한 개방 및 폐쇄 시스템의 상호비교 (39).

A comparison of open and closed large-scale culture systems for microalgae.

Culture systems for microalgae	Closed systems (PBRs)	Open systems (Ponds)
Contamination control	Easy	Difficult
Contamination risk	Reduced	High
Sterility	Achievable	None
Process control	Easy	Difficult
Species control	Easy	Difficult
Mixing	Uniform	Very poor
Operation regime	Batch or semi-continuous	Batch or semi-continuous
Space required	A matter of productivity	PBRs ~ Ponds
Area/volume ratio	High (20–200 m ⁻¹)	Low (5–10 m ⁻¹)
Population (algal cell) density	High	Low
Investment	High	Low
Operation costs	High	Low
Capital/operating costs ponds	Ponds 3–10 times lower cost	PBRs > Ponds
Light utilization efficiency	High	Poor
Temperature control	More uniform temperature	Difficult
Productivity	3–5 times more productive	Low
Water losses	Depends upon cooling design	PBRs ~ Ponds
Hydrodynamic stress on algae	Low–high	Very low
Evaporation of growth medium	Low	High
Gas transfer control	High	Low
CO ₂ losses	Depends on pH, alkalinity, etc.	PBRs ~ Ponds
O ₂ inhibition	Greater problem in PBRs	PBRs > Ponds
Biomass concentration	3–5 times in PBRs	PBRs > Ponds
Scale-up	Difficult	Difficult

PBR은 이런 장점에도 불구하고 가까운 장래에 대량의 옥외 raceway pond에서 얻어질 수 있는 생산물 및 공정에 의미심장한 충격을 줄 것으로는 기대되지 않는다. PBR은 숙의해서 풀어야 할 몇 가지 약점을 가지고 있다. 주요 제한요소는 과열 (overheating), bio-fouling, 산소 축적, scale-up의 어려움, 고비용의 건설, 운전 및 미세조류 조제 배양, 그리고 shear stress와

광주기(photo-stage) 시 사용되는 물질의 열화에 의한 cell damage 등이다 (39).

PBR에서 생산되는 조체 생산 비용은 pond보다 한자리수 더 높다. 어떤 경우에는 미세조류 종(species)과 응용에 따라서 양식용도에 매력적일 만큼 비용이 낮을 수 있는 반면에 다른 경우에 있어서는 PBR에서 달성한 보다 높은 세포농도 및 생산성이 높은 투자 및 운전 비용을 보상해 주지 않는다 (39).

나. 개방형 대 폐쇄형 배양시스템

PBR은 회분식 (batch mode) 혹은 연속식 (continuous mode)로 운전할 수 있다. 회분식에 반하여 연속식은 몇 가지 장점이 있다.

- 연속식의 반응기는 회분식보다 고도의 제어장치를 가지고 있다.
- 연속식에서는 희석율 (dilution rate)을 달리함으로써 생육속도를 조절 할 수 있고, 장기간 유지할 수 있으며 조체농도를 조절할 수 있다.
- 연속식 반응기의 steady-state 때문에 결과는 신뢰성이 있고 쉽게 재현할 수 있으며 희망했던 산물의 품질을 보다 쉽게 달성할 수 있다.
- 연속반응은 시스템의 연구 및 분석의 기호를 증가시킨다.

그러나 어떤 형태의 생물반응, 예를 들면 생육과 무관한 생산물,에는 연속식이 적당하지 않다. 이런 이유로 연속배양 시에 feed-batch culturing 및 연소적인 영양공급이 요구되는 경우가 자주 발생한다. 미세조류의 벽면 부착 성장 및 세포 집적 (aggregation)으로 인해 wash-out 되거나 혹은 최적의 steady-state 생육을 방해할 수도 있다.

다른 문제점으로는 생육이 빠른 strain의 출현으로 원래의 생산 strain을 잃어버릴 수가 있으며, 섬유상의 미세조류 (filamentous)에서는 점성과 이질적인 성질로 인해 계속 유지하는 것이 어려울 수도 있다. 장기간의 성장기간으로 인해 오염위험이 증가할 뿐만 아니라 반응기의 신뢰성 및 일관성을 확보하기 위해 필요이상의 고급 장비에 초도비용을 크게 지불할 가능성도 있다 (39).

다. PBR의 개발 현황

PBR은 디자인과 운전 mode에 따라서 분류할 수 있다. 최근에 많은 서로 다른 디자인이 개발되고 있다. 즉, serpentine형, manifold(多岐)형, helical (나선)형 및 flat(판)형이 개발되고 있으나 다음의 주요 카테고리에 포함된다 (40).

- (1) 판형(flat) 혹은 관형 (tubular),
- (2) 수평형 (horizontal), 경사형 (inclined), 수직형 (vertical) 혹은 나선형 (spiral),
- (3) 다기형 (manifold) 혹은 serpentine형

이들 카테고리에서 생산성에 중요한 역할을 하는 산란광 (diffused light) 및 반사광 (reflected light)을 사용하기 위해서 다른 각도 (different angle)로 방향을 맞추고 (oriented) 기울이는 것 (tilted) 이 향상된 반응기이다 (41). 표 2-4에 대표적인 PBR에 대한 잇점 및 단점을 나타내었다.

표 2-5. 대표적인 PBR의 잇점 및 단점 (39~41)

Reactors	Prospect (Advantage)	Limitation (Disadvantage)
Tubular reactor	<ul style="list-style-type: none"> - Suitable outdoor culture - Relatively cheap - Large illumination surface area - Fairly good biomass productivity 	<ul style="list-style-type: none"> - Fouling - Some degree of wall growth - Dissolved oxygen and CO₂ along the tube - pH gradient
Vertical bubble columns and airlift cylinders	<ul style="list-style-type: none"> - Substantially increased radial movement of fluid that is necessary for improved light-dark cycling - Low surface/volume, but substantially greater gas hold-ups than horizontal reactors - Much more chaotic gas-liquid flow - High mass transfer, - Good mixing with low shear stress, - Low energy consumption, - High potential for scalability, - Easy to sterilize, - Readily tempered, - Good for immobilization of algae. - Consequently, cultures suffer less from photoinhibition and photo-oxidation, - And experience a more adequate light-dark cycle. 	<ul style="list-style-type: none"> - Their cost, - Small illumination surface area, - Their construction requires sophisticated materials, - Shear stress to algal cultures, - Since diameter and height cannot be much increased, a large number of units are needed to build a commercial plant.
Vertical plate photobioreactors mixed by air bubbling	<ul style="list-style-type: none"> - Even better than bubble columns in terms of productivity and ease of operation. - Flat-plates allow large illumination surface area, suitable for outdoor cultures, - Good for algae immobilization, - Relatively cheap, - Easy to clean up - Readily tempered - Vertical flat plates of 1000-2000 L in volume can be successfully operated for long periods, hence having potential for scale up 	<ul style="list-style-type: none"> - Difficulty in controlling culture temperature, - Some degree of wall growth, - Scale-up require many compartments and support materials, - Possibility of hydrodynamic stress to some algal strains
(Packed flat panels mixed by air bubbling)	<ul style="list-style-type: none"> - Potentially achieve very high overall ground-areal productivities through lamination of solar light. 	

매우 높은 생산성과 태양에너지 이용효율에 다다르기 위해서 다양한 광선로 (light path)로 PBR을 만들고, 서로 다른 type의 펌프 혹은 공기 방울 (air bubbling)로 혼합한다. 광주기 (photo-stage) 동안에 사용되는 재질의 type이 PBR을 적절하게 건설하기 위한 가장 중요한 토대가 된다. 플라스틱 혹은 판유리 (glass sheet), 접을 수 있거나 고정된 tube 같은 재질은 독성이 없어야 하고 높은 투명도, 높은 기계강도, 높은 내구성 및 화학적 안정성을 가져야 하고 비용이 적게 들어야 한다 (38). 세척의 편함과 옥외에 노출되는 플라스틱의 투명도는 심사숙고할 운전 시의 이슈이다 (39).



Figure 3 Open-pond raceway cultivation method of microalgae
 (Mass cultivation facilities of microalgae in the Miyakojima farm of Micro Algae Corporation). In the open pond, water containing algal cells and nutrients circulate around a racetrack. A study to develop a low cost cultivation method is conducted using the facilities.

그림 2-2. 개방형 배양시설 open pond의 모습들. Raceway형이 대부분임.



그림 2-3. 옥외 및 옥내에 설치된 tubular type의 PBR.



그림 2-4. 실험실의 panel형 PBR.



그림 2-5. column 또는 bag 형태로 보이는 여러가지 PBR

제2절 미세조류의 먹이생물로의 응용 연구 현황

미세조류를 먹이생물로 해양 수산 동물을 키운 예는 국내외에서 많이 보고되고 있다. 국내의 양식동물에 맞는 미세조류가 무엇인지 찾기 위하여 한국양식학회에서 발행하는 '한국양식학회지'와 동협회에서 발행하는 또 다른 잡지 '한국양식'을 조사하여 표로 만들어 보았다.

동물성 플랑크톤의 먹이생물로 많이 이용된 미세조류는 *Tetraselmis*가 단연 앞서고, 그 뒤로

표 2-6. 동물성플랑크톤의 먹이생물로 미세조류 사용

대상해양생물	먹이생물 미세조류	비고	출처*
Rotifer (<i>Brachionus plicatilis</i>)	<i>Chlorella ellipsoidea</i> UTEX247 (해수산) <i>Chlorella stigmatophora</i> UTEX993(해수산) <i>Chlorella variegata</i> UTEX 255 <i>Chlorella pyrenoidosa</i> UTEX 26 <i>Chlorella protothecoides</i> UEX25 <i>Chlorella vulgaris</i> UTEX259		회지 v2n2_91 (1989)
부착성요각류 Benthic Copepod (<i>Tigriopus japonicus</i>)	<i>Amphora</i> sp. (NFUP-29) <i>Chlorella ellipsoidea</i> (NFUP-27) <i>Nannochloris oculata</i> (NFUP-22) <i>Navicula incerta</i> (NFUP-1) <i>Phaeodactylum tricorutum</i> (NFUP 2) <i>Tetraselmis suecica</i> (NFUP-27) 빵효모, 유지효모		회지 v6n3_147 (1993)
Rotifer (<i>Brachionus plicatilis</i>)	<i>Nannchloropsis oculata</i>	1.0~2.0x10 ⁶ cells/ml	회지 v8n1_59 (1995)
한국산 Rotifer (<i>Brachionus plicatilis</i>)	<i>Chlorella ellipsoidea</i> (KMMCC-C-C-21) <i>Nannochloris oculata</i> (KMMCC-C-C-31) <i>Tetraselmis suecica</i> (KMMCC-C-P-4) <i>Pavlova liutheri</i> (KMMCC-C-H-4) 농축 클로렐라 효모, 해산 클로렐라 등	12.0x10 ⁸ cells/ 2day 25.0x10 ⁸ cells/ 2day 0.6x10 ⁸ cells/ 2day 4.0x10 ⁸ cells/ 2day	내구란 생산과 부화율
한국산 rotifer (<i>Brachionus plicatilis</i>)	<i>Chlorella</i> sp. (KMMCC-C-27) <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		회지 v9n4_329 (1996) 회지 v9n4_321 (1996)
한국산 rotifer (<i>Brachionus plicatilis</i>)	<i>Nannochloropsis oculata</i> (KMMCC-C-31)	2.5x10 ⁸ cells/ day	회지 v9n3_195 (1996) 회지 v9n3_187 (1996) 회지 v9n4_345 (1996) 회지 v9n4_321 (1996)
Marine rotifer (<i>Brachionus plicatilis</i>)	<i>Chlorella ellipsoidea</i> (KMMCC-C-20)		회지 v9n4_453 (1996)
한국담수산 윤충 (<i>Brachionus calyciflorus</i>)	담수산 <i>Chlorella</i>	5x10 ⁶ cell/ml	회지 v10n4_449 (1997)
Rotifer (<i>Brachionus rotundiformis</i> Koshiki strain) 코페포다 (<i>Apocyclops</i>)	<i>Tetraselmis suecica</i>		회지 v11n4_449 (1998)
무균로티퍼 (<i>Brachionus rotundiformis</i>)	<i>Nannochloropsis oculata</i>		회지 v11n1_91 (1998)
copepoda (<i>Tigriopus japonicus</i>)	<i>Nannochloropsis oculata</i>		회지 v11n1_113 (1998)
담수산 Rotifer (<i>Brachionus calyciflorus</i> Pallas)	담수산 농축 <i>Chlorella</i> , Baker's yeast	1.92x10 ⁸ cell/1,000 rotifer 3 times /day	회지 v13n2_147 (2000)
기수산 cyclopoid copepod	<i>Tetraselmis suecica</i>		양식 v16n2p4 (2004)
기수산 cyclopoid요각류 (<i>Apocyclops royi</i>)	<i>Isochrysis galbana</i> <i>Tetraselmis suecica</i> <i>Phaeodactylum tricorutum</i> 담수산 농축 <i>Chlorella</i> 빵효모	건조중량 7.3μg /d	회지 v18n1_52 (2005)
해산 요각류 (<i>Tigriopus japonicus</i>)	<i>Isochrysis galbana</i> <i>Prymnesium parvum</i> (적조,독성) <i>Prymnesium patelliferum</i> (적조, 독성)		회지 v18n2_86 (2005)
cyclopoid 요각류 (<i>Paracyclopsina nana</i>)	<i>Tetraselmis suecica</i>	1x10 ⁴ cells/d	회지 v18n1_19 (2005)

* 회지: 한국양식학회지, 양식: 한국양식

표 2-7. 패류 먹이생물로 미세조류 사용 -1 (다음2에 계속)

대상해양생물	먹이생물 미세조류	비고	출처*
동족	<i>Coscinodiscus</i> spp. <i>Coscinodiscus marginatus</i> <i>Rhizosolenia setigera</i> <i>Thaalsiosira</i> spp. <i>Thaalsiothrix frsuenfeldii</i>		먹이조사 회지 v8n2_99 (1995)
비단가리비 (<i>Chlamys farreri</i>)	<i>Isochrysis galbana</i> <i>Chaetoceros calcitrans</i>	1,500*10 ⁴ cells/ml	회지 v8n4_307 (1995)
참굴(<i>Crassostrea gigas</i>) 유생	<i>Navicula incerta</i> (NFUP-1, UTEX 2046) <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (NFUP 2, SERI-S/Paeo-1) <i>Chaetoceros simplex</i> (NFUP 8, Japan) <i>Skeletonema costatum</i> (NFUP 47) <i>Thaalsiosira pseudonana</i> (NFUP 89, Sea Salter Co.) <i>Nitzschia closterium</i> (NFUP 12) <i>Thaalsiosira weissflogii</i> (NFUP 65) <i>Isochrysis aff. Galbana</i> (NFUP14)	1.0x10 ⁴ cells/ml/d (D상 유생) 2.0x10 ¹⁰ cells/ml/d (각정기 유생)	회지 v8n4_355 (1995)
바지락 (<i>Ruditapes philippinarum</i>)	<i>Eucampia zodiacus</i> <i>Skeletonema costatum</i> <i>Leptocylindrus danicus</i>		먹이조사 회지 v9n3_223 (1996)
바윗굴 (<i>Crassostrea nippona</i>)	<i>Isochrysis galbana</i>	5,000~20,000 cells/ml	회지 v10n2_97 (1997)
코끼리조개 (<i>Panope japonica</i>) D상	<i>chaetoceros calcitrans</i>	10 ⁴ cell/ml	회지 v10n1_25 (1997)
코끼리조개 (<i>Panope japonica</i>) 각정기, 유생	<i>chaetoceros calcitrans</i>	5x10 ⁴ cell/ml	회지 v10n1_25 (1997)
코끼리조개 (<i>Panope japonica</i>)	<i>Nitzschia longissima</i> <i>Rizosolenia alata</i>		먹이조사 회지 v10n2 (1997)
참굴 (<i>C. gigas</i>) 모패	<i>Tetraselmis suecica</i> (KMCC C-8) <i>Isochrysis aff. galbana</i> (KMCC H-1)	25x10 ⁴ cells/ml 50x10 ⁴ cells/ml	회지 v11n2_183 (1998)
참굴 (<i>C. gigas</i>) 유생	<i>Isochrysis aff. galbana</i> (KMCC H-1)	5x10 ⁴ cells/ml	
개량조개 (<i>M. chinensis</i>) 모패	<i>Tetraselmis suecica</i> (KMCC C-8) 자연발생 규조류	50x10 ⁴ cells/ml 30x10 ⁴ cells/ml	회지 v11n2_183 (1998)
개량조개 (<i>M. chinensis</i>) 유생	<i>Isochrysis aff. galbana</i> (KMCC H-1)	50x10 ⁴ cells/ml	
먹이생물 많이 사용하고 있는 5종	<i>Tetraselmis tetrathele</i> <i>Tetraselmis suecica</i> <i>Tetraselmis subcordiformis</i> <i>Tetraselmis</i> sp. (Haeundae) <i>Tetraselmis</i> sp. (China)		회지 v11n2_231 (1998)
키조개 (<i>Atrina pectinata japonica</i>)	<i>Skeletonema costatum</i> <i>Chaetoceros debilis</i> <i>Chaetoceros decipiens</i>		회지 v11n2_193 (1998)
진주담치 (<i>Mytilus edulis</i>), 홍합 (<i>Mytilus coruscus</i>), 굴 (<i>Crassostrea gigas</i>), 진주조개 (<i>Pinctata fucata martensii</i>)의 성체	<i>Chlorella ellipsoidea</i> (KMCC-C-20) <i>Paeodactylum tricornutum</i> (KMCC-B-128)	5x10 ⁴ cells/ml/D	회지 v13n2_119 (2000)
진주담치 (<i>Mytilus edulis</i>), 홍합 (<i>Mytilus coruscus</i>), 굴 (<i>Crassostrea gigas</i>), 진주조개 (<i>Pinctata fucata martensii</i>)의 D형/유생/부착기	<i>Pavlova lutheri</i> (KMCC-H-4) <i>Isochrysis galbana</i> (KMCC-H-3)	2/5/10 x10 ⁴ cells/ml/D	
참전복 (<i>halotis discus hannaï</i>) 치패	부착성규조류 (Benthic diatom) <i>Calonesis schrderi</i> (KMCC B-39) <i>Hantzchia marina</i> (KMCC B-37) <i>Navicula incerta</i> (KMCC B-11) <i>Nitzschia closterium</i> (KMCC B-9) <i>Nitzschia</i> sp. (KMCC B-11) <i>Paeodactylum tricornutum</i> (KMCC B-13) <i>Rhaphoneis</i> sp. (KMCC B-41)		회지 v13n2_163 (2000)
해가리비 (<i>Amusium japonicum japonicum</i>) 모패	<i>Isochrysis galbana</i> <i>Pavlova lutheri</i>	5x10 ⁴ cells/mlx2회/일 5x10 ⁴ cells/mlx2회/일	
해가리비 (<i>Amusium japonicum japonicum</i>) 유생	배양한 미세조류	1~6x10 ⁴ cells/mlx2회/일	회지 v11n3_371 (1998)
해가리비 (<i>Amusium japonicum japonicum</i>) 치패	3종	15~20x10 ⁴ cells/ml 유지	

* 회지: 한국양식학회지, 양식: 한국양식

*Chlorella*와 *Nannochloopsis*를 사용한 예가 많았다. 패류에서는 *Chaetoceros*, *Isochrysis* *Phaeodactylum*가 조금 많이 출현하나 *Pavlova*, *Nitzschia*, *Tetraselmis*, *Navicular* 등 타 미세조류의 사용빈도와 크게 차이나는 것은 아니다. 패류는 로티퍼, 코피포다 등 요각류 사육보다 다양한 미세조류를 사용하는 것 같다.

전체를 보아도 수많은 미세조류 중에서 먹이생물로 많이 이용되는 속은 몇 가지 안된다. *Tetraselmis*, *Chlorella*, *Nannochloopsis*, *Chaetoceros*, *Isochrysis* *Phaeodactylum*, 이외에 *Pavlova*, *Nitzschia*, *Tetraselmis*, *Navicular*, *Amphora*, *Skelitonema* 등이 눈에 띈다.

표 2-8. 패류 먹이생물로 미세조류 사용 -2 (앞의1로부터 계속)

대상해양생물	먹이생물 미세조류	비고	출처
양식 굴	<i>Isochrysis galbana</i> <i>Chaetoceros calcitrans</i> <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	1.0x10 ⁵ cell/ml/D	인공종묘 양식 v12n1P100 (2000)
조개류 종묘생산	<i>Isochrysis galbana</i> <i>Pavlova lutheri</i> <i>Thalassiosira pseudonana</i> <i>Phaeodactylum tricornutum</i> <i>Chaetoceros</i> sp. <i>Tetraselmis</i> spp. <i>Nitzschia closterium</i> 중국산 <i>Chlorella salina</i> 중국산 <i>Tetraselmis subcordiformis</i> 중국산 <i>Isochrysis galbana</i> 중국산		종묘 회지 v13n2_107 (2000)
참전복 (<i>halotis discus hanna</i>) 치패	부착성규조류 (Benthic diatom) <i>Caloneis schroderi</i> (KMCC B-39) <i>Navicula incerta</i> (KMCC B-3) <i>Nitzschia closterium</i> (KMCC B-9) <i>Rhaphonensis</i> sp. (KMCC B-41) <i>Hantzschia marina</i> (KMCC B-37) <i>Navicula</i> sp. (KMCC B-38) <i>Nitzschia</i> sp (KMCC B-11) <i>Phaeodactylum tricornutum</i> (KMCC B-13)		회지 v13n2_153 (2000)
기수재첩 (<i>Corbicula japonica</i>) D상	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	1x10 ⁴ cells/ml	인공종묘 회지 v15n1_23 (2002)
기수재첩 (<i>Corbicula japonica</i>) 각정기 유생	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	5x10 ⁴ cells/ml	
백합 (<i>Meretrix lusoria</i>) 양식 유생	<i>Isochrysis galbana</i>	4~6x10 ⁴ cells/ml	양식 v14n2p66 (2002)
백합 (<i>Meretrix lusoria</i>) 양식 치패	<i>Isochrysis galbana</i> <i>Monochrysis</i> sp.	6~30x10 ⁴ cells/ml	양식 v14n2p66 (2002)
북방대합 (<i>Spisula sachalinensis</i>) 치패	<i>Isochrysis galbana</i> <i>Pavlova lutheri</i> <i>Chaetoceros calcitrans</i> <i>Nannochloropsis oculata</i> - 폐사		회지 v15n2_111 (2002)
비단가리비 (<i>Chlamys farreri</i>) 유생	<i>Isochrysis galbana</i> <i>Pavlova lutheri</i> <i>Chaetoceros calcitrans</i> <i>Nannochrysis oculata</i>		양식 v14n2p52 (2002)
Purple Washington Clam (<i>Saxidonus purpuratus</i>)	<i>Isochrysis galbana</i>	4.6x10 ⁴ ~ 2.6x10 ⁶ cells/ml	회지 v15n4_253 (2002)
북방대합 (<i>Spisula sachaliensis</i>)	<i>Isochrysis galbana</i> <i>Pavlova lutheri</i> <i>Chaetoceros calcitrans</i>	1:1:1 혼합	회지 v16n4_229 (2003)
이매패 (비단가리비, 바지락)	<i>Mesodinium rubrum</i> (광합성 섬모류)		회지 v17n2_115 (2004)
홍합 (<i>Mytilus coruscus</i>)	<i>Tetraselmis</i> sp. <i>Isochrysis galbana</i>		회지 v17n2_103 (2004)
살조개 (<i>Protothaca jedoensis</i>)	<i>Isochrysis galbana</i> <i>Pavlova lutheri</i> <i>Chaetoceros calcitrans</i>		회지 v18n4_260 (2005)

* 회지: 한국양식학회지, 양식: 한국양식

표 2-9. 기타 수산생물의 먹이생물로 미세조류 사용

대상해양생물	먹이생물 미세조류	비고	출처*
대하 (<i>Penaeus chinensis</i>) -zoea,	<i>Chaetoceros simplex</i> (NFUP D-16) <i>Skeletonema costatum</i> (NFUP D-24) <i>Thalassiosira weissflogii</i> (NFUP D-20)	3종 1:1:1 비율 투입	회지 v6n3_159 (1993)
대하 (<i>Penaeus chinensis</i>) -zoea	<i>Amphora normanii</i> (NFUP D-16) <i>Chaetoceros simplex</i> (NFUP D-16) <i>Nitzschia closterium</i> (NFUP D-9) <i>Phaeodactylum tricorutum</i> (NFUP D-14) <i>Skeletonema costatum</i> (NFUP D-24) <i>Thalassiosira weissflogii</i> (NFUP D-20)		회지 v6n3_159 (1993)
은어 (<i>Plecoglossus altivelis</i>)	rotifer, Artemia nauplius - <i>Chlorella ellipsoidea</i> (NFUP-27) <i>C. ellipsoidea</i> - green effect <i>Spirulina platersis</i> dry powder -green effect <i>Rhodospseudomonas capsulata</i> -green effect	 5×10^5 cells/ml 5×10^5 cells/ml 5×10^5 cells/ml	회지 v7n3_135 (1994)
북쪽말동성게 (<i>Strongylocentrotus intermedius</i>)	<i>Isochrysis galbana</i> <i>Chaetoceros calcitrans</i> <i>Pavlova lutheri</i>	100~500* 10^4 cells/ml	회지 v8n4_317 (1995)
붉바리 (<i>Epinephelus akaara</i>) 자어	Rotifer (<i>Tetraselmis tetrahele</i> (KMCC, P-4)) Rotifer (<i>Chlorella</i> (KMCC, C-31)) Rotifer (<i>Nannochloropsis oculata</i> (KMCC, C-31))		회지 v11n4_565 (1998)
한국산 개불 (<i>Urechis unicinctus</i>)	<i>Chaetoceros calcitrans</i>	5×10^4 cells/ml/D	회지 v12n3_193 (1999)
해삼 (<i>Stichopus japonicus</i>) 유생	<i>Chaetoceros calcitrans</i> <i>Pavlova lutheri</i> <i>Isochrysis galbana</i>	0.5~ 3×10^4 cells/ml/d	회지 v12n1_39 (1999)
Sea Urchin (<i>Strongylocentrotus intermedius</i>)	<i>Cochlodinium polykrikoides</i>		회지 v15n2_79 (2002)

* 회지: 한국양식학회지, 양식: 한국양식

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 실험재료 및 방법

1. 시험균주의 구입

한국미세조류은행 (KMCC, www.kmcc.re.kr), 미국 The Provasoli-Guillard NationalCenter for Culture for Marine Phytoplankton (CCMP, www.bigelow.org) 및 일본국립환경연구소 (NIES, www.nies.go.jp)에서 구입하여 사용하였다. 일본국립환경연구소에서 분양 받은 균주를 제외하고는 액체배양액의 형태로 분양을 받았으며, 일본환경연구소에서 분양 받은 균주는 사면배양한 형태로 받았다 (표3-1 참조).

표 3-1. 분양받은 시험균주

Strain	당사약칭	Culture Condition	Remarks
<i>Tetraselmis suecica</i> KMCC P004 (CCAP 66/22A)	Tss-004	f/2, 20°C, 2700 lux, L:D=10:14, 1W(60D)	Size(μm) 6.3±1.6(4~10), 5.6±0.6(5~7)
<i>Nannochloropsis sp.</i> KMCC EUS002	Npq-002	f/2, 20°C, 2700 lux, L:D=10:14, 1W(40D)	S i z e (μ m) 2.7±0.6 (1~4)
<i>Nannochloropsis oculata</i> NIES-2145	Npo-2145	ESM(agar), 20°C, 10-20 μmol photons/m ² /sec	axenic
<i>Nannochloropsis sp.</i> CCMP 531	Npq-531	f/2-Si, f/2 agar, 22-2 6°C	axenic
<i>Tetraselmis suecica</i> CCMP 904 (CCAP 66/22D)	Tss-904	L1, f/2-Si, f/2 agar, 11-16°C	axenic
<i>Tetraselmis sp.</i> CCMP 908	Tsq-908	L1, f/2-Si, f/2 agar, 22-26°C	axenic

2. 액체배양방법

가. 배지

f/2 배지 (표 3-2참조)를 기본으로 하여 각2X~5X 희석한 f/4~f/10 배지를 사용하였으며, 다른 한편으로는 f/2의 2배 농축배지인 f배지를 기본으로 2f~5f의 배지를 사용하였다. 한편, 때에 따라서는 f/2 배지를 modification한 f/2m배지를 기본으로 하고 이를 희석하거나 농축한 f/4m~f/10m배지, 3fm배지 등을 사용하였다. 그 밖에 NIES가 추천한 토양 추출물이 들어가는 ESM 배지를 사용하였으나 효과가 크지 않고 만들기가 번거로워 사용하지 않았다.

나. flask 혹은 시험관 배양방법

배양은 광원이 장착된 shaking incubator에서는 25℃에서 3,000 lux 이상의 빛을 12 시간 이상 조사하여 10~15일 배양하였으며, 때에 따라서는 창가의 햇빛이 드는 남쪽공간을 이용하여 실온(15~25℃)에서 매일 1회 이상 혼합해주어 조체가 침전되는 것을 방지하면서 배양하였다. 추운 겨울에는 창가를 피하여 스탠드 등을 이용하여 배양하기도 했다.

표 3-2. f/2 배지 (Guillard and Ryther 1962 (42), Guillard 1975 (43))

Component	Stock Solution	Quantity	Molar Concentration in Final Medium
NaNO ₃	75 g/L dH ₂ O	1 mL	8.82 x 10 ⁻⁴ M
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	5 g/L dH ₂ O	1 mL	3.62 x 10 ⁻⁵ M
Na ₂ SiO ₃ 9H ₂ O	30 g/L dH ₂ O	1 mL	1.06 x 10 ⁻⁴ M
Trace metal solution	(see recipe below)	1 mL	---
Vitamin solution	(see recipe below)	0.5 mL	---
Filtered natural seawater	---	to 1 L	---

* f/2 Trace Metal Solution*

Component	Primary Stock Solution	Quantity	Molar Concentration in Final Medium
FeCl ₃ 6H ₂ O	---	3.15 g	1.17 x 10 ⁻⁵ M
Na ₂ EDTA2H ₂ O	---	4.36 g	1.17 x 10 ⁻⁵ M
CuSO ₄ 5H ₂ O	9.8 g/L dH ₂ O	1 mL	3.93 x 10 ⁻⁸ M
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	6.3 g/L dH ₂ O	1 mL	2.60 x 10 ⁻⁸ M
ZnSO ₄ 7H ₂ O	22.0 g/L dH ₂ O	1 mL	7.65 x 10 ⁻⁸ M
CoCl ₂ 6H ₂ O	10.0 g/L dH ₂ O	1 mL	4.20 x 10 ⁻⁸ M
MnCl ₂ 4H ₂ O	180.0 g/L dH ₂ O	1 mL	9.10 x 10 ⁻⁷ M
Distilled Water	---	to 1 L	---

* Guillard and Ryther 1962의 원래배지에서 사용하는 ferricsequestrene을 Na₂EDTA 2H₂O 및 Na₂EDTA 2H₂O로 대체함

* f/2 Vitamin Solution

Component	Primary Stock Solution	Quantity	Molar Concentration in Final Medium
Thiamine HCl (Vit. B ₁)	---	200 mg	2.96 x 10 ⁻⁷ M
Biotin (Vit. H)	1.0 g/L dH ₂ O	1 mL	2.05 x 10 ⁻⁹ M
Cyanocobalamine (Vit. B ₁₂)	1.0 g/L dH ₂ O	1 mL	3.69 x 10 ⁻¹⁰ M

Shaking incubator에서의 배양은 주로 배양인자의 영향을 관찰할 때에 사용하였으며 실온에서의 배양은 실험시설이 부족한 관계로 균주의 보존을 위하여 병행 실시하거나 간단한 실험을 하기 위해 사용하였다.

Flask 및 시험관에서의 배양은 비닐백과 달리 무균적으로 배양할 수 있는 잇점이 있다.

다. 비닐백 (Vinyl bag)에서의 배양

비닐백은 시중에서 PE 또는 PP film을 구입하여 제작하였고, 배양은 항온항습실에서 온도 20~25℃에서 compressor 또는 air pump로 무균 공기를 air flow meter 및 유량조절밸브를 이용하여 정량적으로 공급하면서 배양하였다.

비닐백 배양은 대량배양할 수 있는 잇점이 있으나 재질 및 조작상 완전히 무균적으로 배양할 수 없는 단점이 있다.

3. 고체배양방법

가. 배지

기본적으로는 액체배지에서와 같이 f계배지를 사용하였다. 대개 agar는 1.8%를 첨가하였다. 때에 따라서는 복합배지로 SzS agar배지 (표 3-3 참조)를 사용하기도 했다.

나. 배양

배양은 광원이 장착된 incubator에서는 25℃에서 10~15일 배양하였으며, 때에 따라서는 창가의 햇빛이 드는 남쪽공간을 이용하여 실온(15~25℃)에서 배양하거나 스탠드 등을 이용하여 배양하였다.

표 3-3. SzS 배지

Component	Quantity
Glucose	10 g
Yeast extract	5 g
Agar	18 g
Filtered sea water	1 L

4. 조체 바이오매스의 측정

가. OD (Optical Density)

적당히 희석하여 Spectrophotometer를 이용하여 660 nm, 680nm, 700 nm에서 흡광도를

측정하였다.

나. CV (Cell Volume)

Cell volume은 시료 1 ml를 무게를 알고 있는 eppendorf tube에 취하고 이를 10,000 rpm에서 5분 원심분리한 후에 상정액을 제거하고 무게를 칭량하여 eppendorf tube의 무게를 뺀 다음 %(w/v) 농도로 나타내었다. 엄밀하게 이야기하면 Wet Cell Weight라고 할 수 있다.

다. 건조균체량 (DCW, Dry Cell Weight)

시료 20ml를 취하여 0.45 μ m pore size의 filter 및 진공펌프를 이용하여 여과하고 그 여과지를 105 $^{\circ}$ C에서 3h 건조하고 데시케이터에서 방냉한다. 그리고 건조한 여과지의 무게를 잰 다음에 여과지의 원래 무게를 뺀 값을 건조균체량으로 나타내었다.

또한 OD와 건조균체간의 상관관계선을 구하여 OD를 건조균체량으로 환산하는 방법도 사용했다 (그림1 참조).

No.	여과지 무게 (g) A	여과량 (ml)	여지+균체량 (g) B	B-A	건조균체량 (g/L)	Absorbance 680 nm
1	0.1066	15	0.1681	0.0615	4.1000	14.600
2	0.1066	20	0.1518	0.0452	2.2600	7.300
3	0.1070	20	0.1328	0.0258	1.2900	3.480
4	0.1073	20	0.1236	0.0163	0.8150	1.780
5	0.1075	20	0.1187	0.0112	0.5600	0.900
6	0.1080	20	0.1182	0.0102	0.5100	0.450
7	0.1080	20	0.1165	0.0085	0.4250	0.225
8	0.1082	45	0.1150	0.0068		

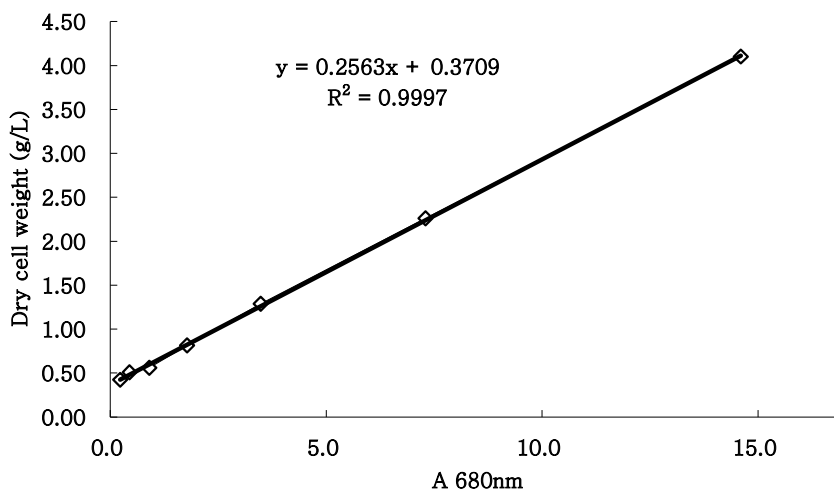


그림 3-1. 건조균체중량과 흡광도 (Optical density) 사이의 상관관계를 구하기 위한 데이터 측정치 및 상관관계선 (*Nannochloropsis oculata* NIES-2145(Npo-2145))

5. 돌연변이 방법

오 등 (44)이 구축한 방법에 준해서 화학 및 물리화학적 변이유발제인 EMS와 자외선(UV) 방법을 사용하였다.

가. EMS법

돌연변이 유기제로 EMS (Ethyl Methane sulfonate)를 이용하여 미세조류의 개량을 시도하였다. 조체 30ml을 원심 분리한 후, 멸균된 배지를 이용하여 조체를 2번 세척한다. 그리고 그 조체를 배지 40ml에 희석 후, EMS 용액 10ml (농도별(W/V)로 만듦)과 섞어 25℃에서 1시간 진탕배양을 한다. 후에 EMS를 배지로 세척하여 제거하고, 4℃에서 overnight한 후, 1% agar media에 접종한다.

나. UV법

돌연변이를 일으킬 조체를 자외선 광원으로부터 20cm 거리를 두고, 조사시간을 0~80 min, 20 min 간격으로 UV를 처리하였다.

6. 조체의 지질 및 지방산함량 분석

가. 조체의 수확 및 건조

배양액을 원심분리기 또는 filter등 일반적인 방법을 이용하여 수확하고 동결건조 혹은 건조균체함량 측정방법과 동일 방법으로 건조한다. 좋은 실험 결과를 얻기 위해서는 동결건조하는 편이 좋다.

나. 지방산추출 및 함량 측정

소량의 경우엔 Bligh & Dyer (45)의 방법을 이용하였고, 대량의 경우에는 Soxhlet 추출장치를 이용하였다. 함량은 지방이 추출된 용기무게에서 -추출 전에 미리 측정해 놓은 용기 무게를 빼서 순수한 지방산의 무게를 구하고, 실험 시작 시 취한 시료무게에 대비하여 % 농도를 구함으로써 얻는다.

다. 지방산의 methyl ester화

지방산의 ester화는 BF₃ 용액을 사용하는 방법을 따랐다. 즉, 질소가스 하에서 추출한 지방 25mg에 0.5N의 메탄올성 수산화나트륨용액 (NaOH Methanol) 1.5ml를 넣고 100℃에서 5분 동안 가열한다. 상온(30~40℃)으로 냉각한 후에 14% BF₃ Methanol 2ml를 넣고 질소로 충전하여 100℃에서 2분 동안 가열한다. 30~40℃로 식힌 후 1ml의 hexane을 넣고 N₂ gas로 충전 후 30초 vortexing하고 포화생리식염수 5ml을 넣고 3분정도 방치하여 상이 분리되도록 한 후, 지방산에스테르가 녹아 있는 hexane 층을 뽑아내기 쉽도록 포화생리식염수를 적당히 채

제2절 실험내용 및 결과

1. 양식용 먹이생물 적합미세조류 선발

가. 1차 분양받은 균주의 계대배양

KMCC에서 1차적으로 분양받은 *Tetraselmis suecica* KMCCP004 (당사에서는 약어로 Tss-004로 명명)와 *Nannochloropsis sp.* KMCC EUS 002 (당사에서는 약어로 Npq-002로 명명)를 순수분리 및 균주보존의 목적으로 SzS agar, f/2m 및 f/2m+ Yeast 0.2%, Glucose 0.1% 배지에서 28~30°C incubator 혹은 shaking incubator에서 암배양으로 액체 및 고체배양을 시도하는 한편, 실온(25~30°C)의 창가에 광배양을 2차례 시도하였으나 배양 25일 후에도 생육하지 않았다 (표 3-5참조). f/2 배지 대신에 f/2m 배지를 사용한 이유는 다른 미세조류 실험에서 사용하는 금속이온용액 및 비타민용액을 같이 사용하기 위해서 변경했다. f/2배지와 f/2m배지의 차이는 표4와 같다.

이와 같은 원인으로 배양온도 (20°C 광배양시설이 없어서 배양하지 못함) 혹은 f/2 와 f/2m 배지의 영양요소의 차이로 압축했으나 이 후의 기온이 낮은 계절에서의 실온배양에서 f/2m배지에서 생육함이 관찰되었다 (data 나타내지 않음). 즉, 배양온도 혹은 그 외의 다른 요인에 의해 생육하지 않았던 것으로 추측된다.

표 3-4. f/2 배지와 f/2m 배지의 성분의 차이

Component	unit	f/2	f/2m
NaNO ₃	g/l	0.075	0.075
NaH ₂ PO ₄ -1aq	g/l	0.005	0.005
Na ₂ SiO ₃ -9aq	g/l	0.03	0.03
Am5 ^{*1}	ml/l		0.1
f/2 Trace metal sol'n ^{*2}	ml/l	1	
Vt sol'n ^{*3}	ml/l		0.5
f/2 Vt sol'n ^{*4}	ml/l	0.5	
Seawater			

*1 Am5: H₃BO₃ 2.9 g/l, MnCl₂ 1.8 g/l, ZnSO₄ 2.2 g/l, CuSO₄ 0.08 g/l, Na₂MoO₄ 0.4 g/l
Co(NO₃)₂ 6aq 0.05 g/l

*2 f/2 Trace metal solution: FeCl₃-6aq 3.15 g/l, Na₂EDTA-2aq 4.36 g/l, CuSO₄-5aq 9.8 mg/l,
Na₂MoO₄ 6.3 mg/l, ZnSO₄-7aq 22.0 mg/l, CoCl₂-6aq 10.0 mg/l, MnCl₂-4aq 180.0 mg/l

*3 Vt Soution: Cyanocovalamine(Vt B₁₂) 0.01 g/l, Biotin(Vt H) 0.01 g/l, Thiamine-HCl(Vt B₁) 0.2 g/l

*4 f/2 Vt Solution: Cyanocobalamine 0.001 g/l, Biotin 0.001 g/l, Thiamine-HCl 0.2g/l

조류가 성장하는데 요구되는 화학적인 영양소를 조사해 본 결과 대량영양소인 황(Sulphur)과 미량영양소인 Mg⁺⁺ 그리고 금속이온을 chelating하는 EDTA화합물이 첨가되지 않아 생육하지 않았을 가능성에 대비하여 F/2m 배지에 MgSO₄(0.03%), EDTA(0.05%) 및 ammonium ferric citrate (0.0012%)를 첨가하여 f/2m2 배지로 명명하고, 미세조류 생육 촉진 및 오염을

확인하기 위해서 포도당 (0.5%), Yeast extract (0.2%)를 첨가한 배지도 조제하여 좀 더 낮은 온도로 배양하기 위하여 연구소가 아닌 사무실의 창가에서 액체정지배양 및 plate에서 streaking method으로 순수분리 및 계대배양을 시도했다.

표 3-5. 14일 배양결과 (배양조건; 실온(22 ~30℃)에서 광배양)

Strain	Liquid medium				Plate medium				비고
	f/2m	f/2m2	f/2m2+G	f/2m2+GY	f/2m	f/2m2	f/2m2+G	f/2m2+GY	
Npq-002	-	+	汚(7.28)*	w	-	汚	汚	汚	+ 및 w에 오염균이자람.
Tss-004	-	+	汚(7.27)*	++	-	汚	汚	w	+, ++ 및 w에 오염균이자람.

※ -: 성장안됨, w: 미약하게성장, +: 성장, ++: 많이성장, 汚: 오염균만 성장, *(7.28)은 종료 pH, f/2m은 전실험의 결과.

표 3-6. 11일 배양결과 (배양조건; 실온(18 ~25℃)에서 광배양)

[Strain] 배양일	Liquid medium			Liquid medium의 멸균전의 pH9.02			Plate medium		
	f/2m2	f/2m2+G	f/2m2+G+Y	f/2m2	f/2m2+G	f/2m2+G+Y	f/2m2	f/2m2+G	f/2m2+G+Y
[Npq-002]									
1일	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3일	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4일	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5일	w	-	-	w	-	-	-	-	-
7일	+	-	+	+	-	+	-	-	-
9일	+	-	+	+	-	+	-	-	-
[Tss-004]									
1일	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3일	-	-	w	-	-	w	-	-	-
4일	-	-	w	-	-	w	-	-	-
5일	w	-	+	w	-	+	-	-	-
7일	+	-	+	+	-	+	-	-	-
9일	+	-	++	+	-	+	-	-	w

※ -: 성장안됨, w: 미약하게성장, +: 성장, ++: 많이성장, 汚: 오염균성장

표 3-5 및 표 3-6에서와 같이 액체배지에서의 생육은 Tss-004와 Npq-002 모두 f/2m2 배지에서 생육하였으나 분양 받은 미세조류가 세균에 오염되어 있음을 알 수 있었다. 특이한 것은 포도당 첨가 시 오염균만 생육하고 미세조류가 생육하지 않았으나 그 배지에 yeast extract 첨가 시 미세조류의 생육이 회복된 것이다.

생육속도는 Tss-004가 Npq-002보다 다소 빠르며, 포도당과 yeast extract 첨가한 배지에 생육이 빠름을 알 수 있었다 (표 3-6 참조).

고체배지에서의 생육은 액체배양보다 매우 느렸으며, 2주간의 관찰기간동안 Npq-002의 생육은 관찰되지 않았으며, Tss-004가 9일 이상 배양 시 미약하나마 생육했음을 확인되었다. 따라서 plate에 의한 Tss-004의 colony isolation은 한달 정도 걸릴 것으로 예상되며, Npq-002의 경우는 얼마의 기간이 소요될지 확신할 수 없었다.

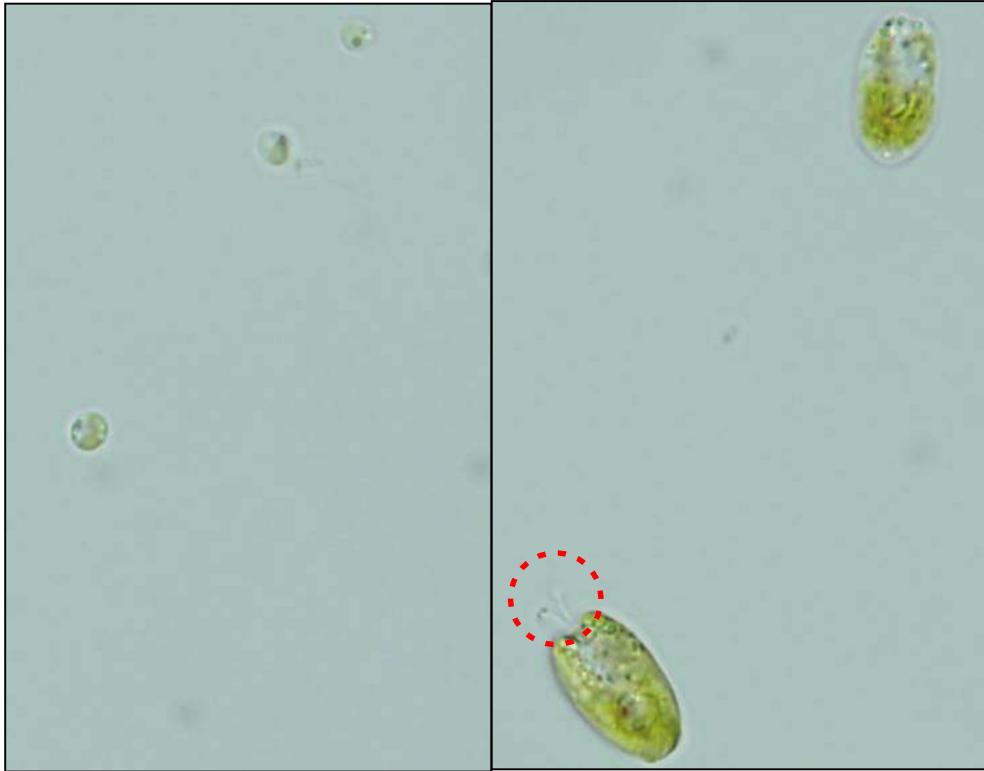


그림 3-3. Npq-002(좌) 및 Tss-004 (우)의 현미경사진[F/2m2 액체배지에서 11일 배양, 배율 100x10], 점선안은 Tss-004의 flagella.

현미경 관찰에서 Tss-004는 *Tetraselmis*속 미세조류의 특징인 운동성과 flagella (그림 3-3 오른쪽 참조)가 관찰되었으며 Npq-002는 *Nannochloropsis*속 균의 특징인 size가 작은 구형의 단세포 (그림 3-3 왼쪽 참조)가 관찰 되었다.

나. 분양 균주의 순수분리 및 배양

몇 차례의 실험에서 f/2m2계 배지에서 미세조류가 생육함을 확인하였다. 한편으로 모든 배양에서 오염균이 함께 생육하고 있음이 확인되어서 미세조류만을 순수배양하기 위해 여러 가지 순수분리법을 시도하였다.

(1) 수분유지 평판 배양

분양받은 Tss-004 및 Npq-002 미세조류로부터 균을 유지시키고 미세조류를 순수분리할 목적으로 평판배양을 실시한 결과, 액체배양과 달리 장기간에도 균체의 생육이 저조하고 또한 평판이 마르는 단점이 있어서 평판배지 일부를 파내어 well을 만들고 거기에 멸균해수를 보충하여 배양했다. 배양조건은 실온에서 태양광 또는 형광등 하에서 2주 이상 배양했다. 그 결과 Tss-004는 colony가 분리되었으나 Npq-002는 오염균이 동반 성장한 관계로 colony 분리가 쉽지 않았다 (그림 3-4 및 그림 3-5 참조). Tss-004의 colony를 현미경 관찰 시 막대

균으로 보이는 오염균이 출현하여 (그림 3-4의 우측 그림에서 점선 내) 그 당시는 오염균으로 생각했으나 후에 오염균이 아닌 Tss-004의 flagella 혹은 ghost cell로 생각할 수 있는 여지가 남아 있다. 한편 Npq-002의 오염균은 단간균으로 관찰되었다 (그림 3-4의 우측 그림).

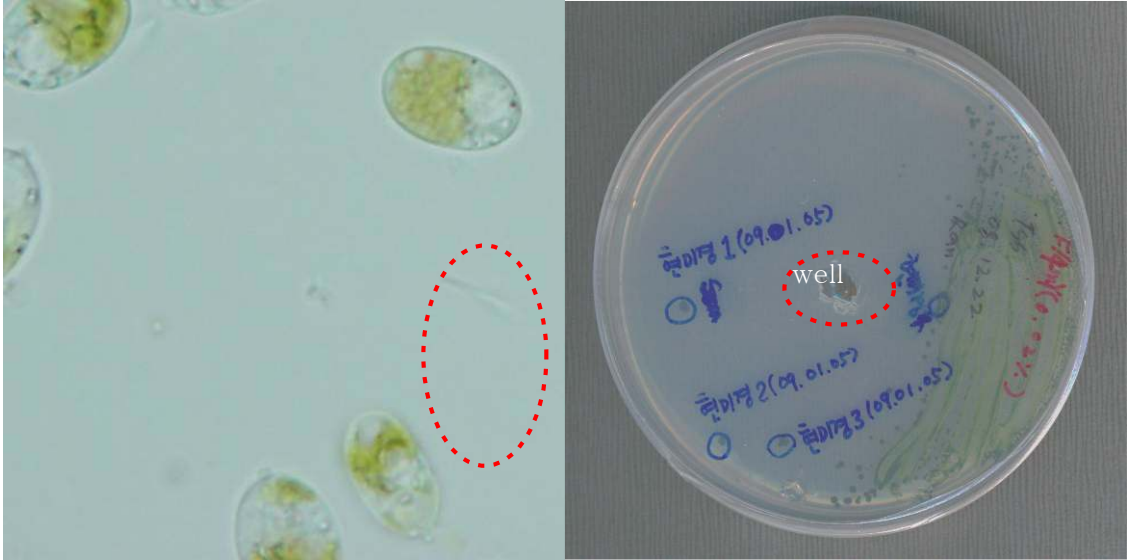


그림 3-4. f/4m+Y (yeast extract 0.02%) 배지에서의 Tss-004의 평판배양모습 (좌) 및 출현 콜로니로부터의 세포의 현미경 사진 (우)

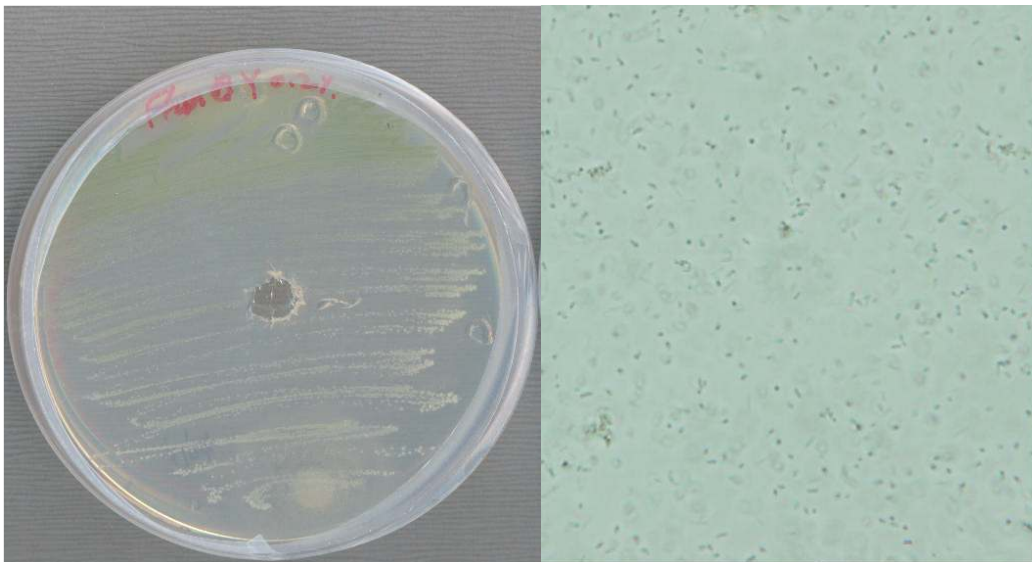


그림 3-5. f/2m2+Y (yeast extract 0.2%) 배지에서의 Npq-002의 평판배양 모습(좌)과 오염균의 현미경사진(우) (점선안은 Npq-002가 오염균과 혼재해 생육한 부분)

(2) 항생물질을 이용한 순수분리 배양

먼저 단일 항생물질을 사용한 액체배양을 반복한 결과 내성주가 출현하여 실험을 중단하고 항생물질을 조합한 평판배양실험으로 항생물질 및 colony isolation 방법을 병행하는 것으로 방향을 바꾸었다.

f/2m2 +Glucose 1%, Yeast extract 0.2% 배지에 항생물질을 2 그룹(표 3-7 참조)으로 조제하여 평판배지를 만들고 Tss-004 및 Npq-002를 배양하였다.

Tss-004 실험구에서는 plate상으로는 오염균이 없으나 현미경 관찰 시는 그림 4와 같은장간균이 보였다. 이 오염균은 당시에 *flagella* 혹은 *Tetraselmis*가 분열후의 남은 껍질인지 의심되었다. 현재로서는 오염균이 아닐 가능성이 더 높은 것으로 보인다 (그림3-6).

Npq-002 실험구에서는 오염균은 성장하고, *Nannochloropsis*는 성장하지 않아서 중단했다. 몇 차례의 실험에서 *Nannochloropsis sp.* EUS004는 특히 고체배양에서 생육이 늦음이 확인되었다.

표 3-7. 순수분리에 이용한 항생물질 그룹

A group	B group
Ampicillin sodium salt 5.9 mg/l	Penicillin G sodium salt 5.3 mg/l
Tetracycline hydrochloride 9 mg/l	Streptomycin sulfate 5.6 mg/l
Gentamycin sulfate salt 11 mg/l	Kanamycin A monosulfate 5.0 mg/l

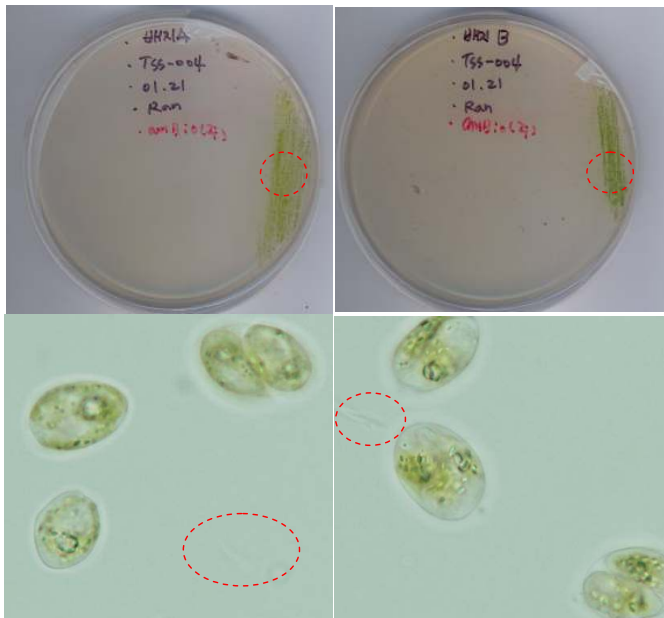


그림 3-6. f/2m2+G,Y 배지에 항생제 A그룹 (왼쪽열) 및 B그룹 (오른쪽열) 첨가한 배지에서 생육상태 및 현미경 관찰결과 (20°C, 7일, 광배양)

(3) 빈영양배지와 희석법을 이용한 순수분리

해양 미세조류는 서식환경이 대부분 빈영양상태로 알려져 있고 반면에 세균은 비교적 영양상태가 좋은 환경에서는 폭발적으로 생육한다. 따라서 배양배지의 영양분을 감량함으로써 오염균의 생육을 지연시키거나 도태되게 하면 배양액내에 미세조류의 숫자가 상대적으로 많거나 순수한 미세조류 배양액을 얻을 확률이 높아진다. 한편 희석법은 배양액의 미세조류 및 오염균의 숫자를 파악하고 미세조류 1개만 접종될 확률로 희석하여 많은 새로운 배지에 접종하면 미세조류만 순수배양된 배양액을 얻을 확률이 높아지는 점을 이용하는 것이다.

본 실험에서는 Npq-002는 항생물질 첨가배양에서 비교적 오염균이 적은 배양액을 선택하고, 낮은 rpm(1,200~2,500)에서 1분 정도 원심분리하여 상정액을 취함으로써 침전되는 고형분을 제거하고, 상정액을 이번에는 높은 rpm(10,000 rpm)으로 원심분리하여 상정액을 버린 후에 바닥의 균체를 취하여 멸균된 생리식염수에 현탁시킨 것을 희석법의 균주원으로 사용했다. 한편, Tss-004는 수분첨가 평판배양에서 분리된 colony를 취하여 생리식염수에 희석한 것을 희석할 배양액으로 하였다.

상기에서 준비된 균체현탁액을 hemacytometer를 이용하여 균체수를 조사해 본 결과 250,000~600,000개/ml 정도이었다. Eppendorf tube를 이용하여 이를 각각 10^{-4} ~ 10^{-6} 희석하여 각각 100 μ l씩 900 μ l의 f/2m2 배지 5배 희석액에 첨가하고 실온에서 정지배양하였다. 그 결과 10^{-5} 에서 Npq-002는 9개중 4개에서 생육이 일어나고, 5개는 생육하지 않았다. Tss-004에서는 10^{-5} 에서 8개중 7개가 생육하며 1개는 생육하지 않았다.

생육한 Npq-002 4개 시료 중 2개에서는 오염균이 관찰되었으나 2개에서는 관찰되지 않아서 f/2m2 5배 희석배지에서 배양한 다음에 오염균이 잘자라는 f/2m2 +yeast extract 0.2% 배지에 이식한 결과 단간균 형태의 오염균이 모두 관찰되었다. 한편 Tss-004에서 생육한 7개 시료는 현미경 관찰시 논란이 된 긴 막대 모양의 오염균(?)이 모두 관찰되었다.

(4) 오염균과 미세조류의 염농도에 대한 내성 차이를 이용한 순수분리

f/2m2+yeast extract 0.2%를 기본으로 하여 NaCl 1~4% 첨가하고 실온(21~25 $^{\circ}$ C)에서 정지배양하였다. 이미 사용한 해수의 소금농도를 3.3%로 보고 감안할 경우 NaCl 실제농도는 4.3%~8.3%이다.

Tss-004는 8일 배양 후 관찰에서는 NaCl 1~3% 첨가까지는 생육이 되었고, 4% 첨가는 29일 배양까지도 생육하지 않았으나 그 후 36일째에 생육했음이 관찰되었다 (그림 3-7 참조). 모두 현미경 관찰 시 장간균 (오염균?) 모양이 관찰되었으나 이는 Tss-004에서 떨어져 나온 flagella로 생각된다.

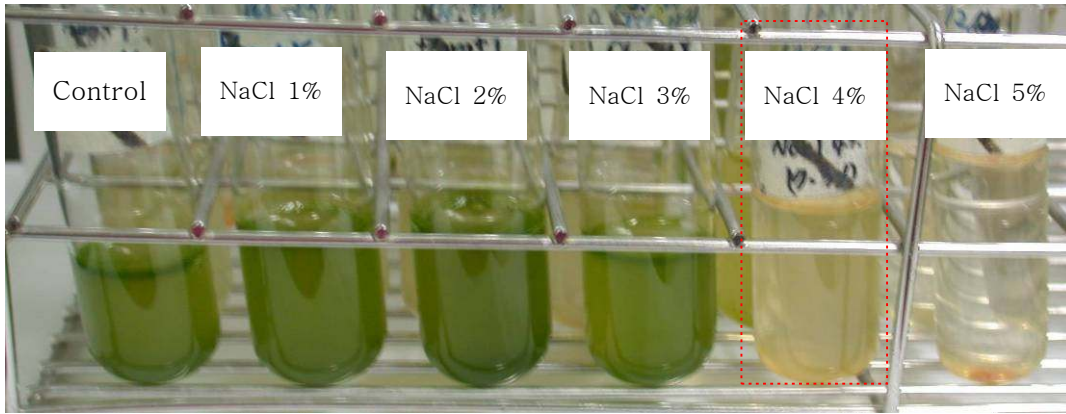


그림 3-7. NaCl 첨가 농도에 따른 Tss-004의 생육 (29일배양)

Npq-002도 8일 배양 후 관찰에서는 Tss-004와 마찬가지로 NaCl 1~3% 첨가구에서만 생육했으나 후에 4% 첨가구에서도 생육했다. 그러나 먼저 생육한 1~3% 실험군의 Npq-002는 배양 시간이 경과하면서 녹색이 탈색되어 29일 경의 관찰에서는 녹색이 거의 사라졌다 (그림 3-8 참조). NaCl 4% 배양액을 오염균이 잘 자라는 f/2m2 + yeast extract 0.2% 배지에 이식한 후 배양한 결과 단간균 형태의 오염균이 성장했다.

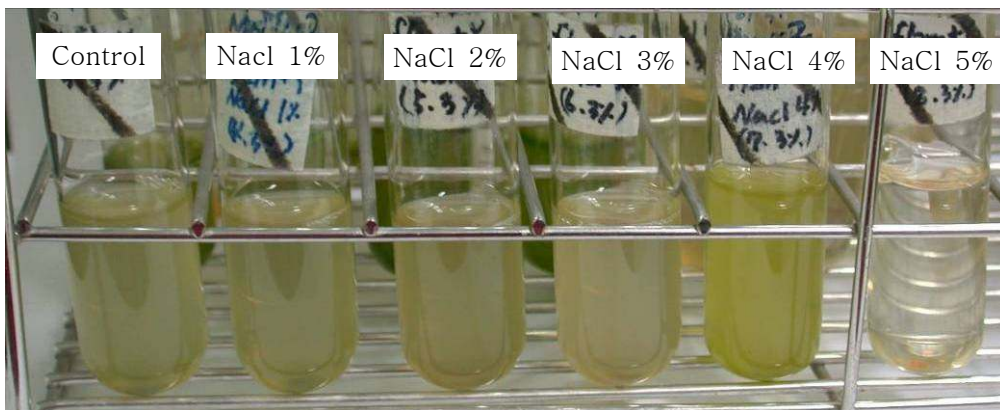


그림 3-8. NaCl 첨가 농도에 따른 Npq-002의 생육 (29일배양)

재실험으로서 f/2m2 + yeast extract 0.2% 배지를 기본으로 하여 NaCl 4%~5% 첨가하는 실험을 실시하였다. 실온에서 24일 배양하고 배양액을 현미경으로 관찰한 결과 상기 실험과 약간 다른 결과를 얻었다 (표 3-8 참조). 즉, Tss-004는 NaCl 5% 첨가구에서도 자랐으며, Npq는 반대로 NaCl 4% 첨가구에서 자라지 않았고, 오염균이 NaCl 4~5% 첨가구에서 생육했다. 이는 오염균이 NaCl에 대하여 내염성이 더 강하다고 할 수 있다.

이 실험 결과로 볼 때 Tss-004는 약 7.3%~8.3%의 NaCl 농도에서도 생육이 가능함을 나타내고, Npq-002는 5.3~6.3%의 NaCl 농도에서 생육이 가능한 것으로 보인다.

표 3-8. NaCl 첨가농도에 따른 미세조류 생육 영향 (24일 배양)

Strain	측정구분	NaCl 0%	NaCl 4%	NaCl 5%
Tss-004	액체배양생육정도	++	+	+
	현미경관찰	Tss/오염균	Tss/오염균	Tss/오염균
Npq-002	액체배양생육정도	++	-	-
	현미경관찰	Npq/오염균	오염균	오염균

* 녹색도로서 생육여부 표시: ++ 생육양호, + 생육, - 생육없음

Npq-002는 NaCl 4, 5% 첨가시 오염균만 생육

(5) 기타 순수분리를 위한 실험

상기 (1)~(4)의 방법을 조합해 사용해 보았으나 별 소득은 없었다. 그리고 살균력이 있는 phytoncide 첨가, 조체표면에 부착하여 공생하는 오염균을 가정하여 detergent 처리 등을 실시했으나 성공하지 못했다.

앞으로 시간이 주어진다면 고체배양에서 빨리 성장시킬 수 있는 방법의 개발이 시급하고 항생물질 첨가 및 희석법을 병행하면 좋은 결과를 얻을 수 있으리라 생각된다.

다. Axenic 균주의 분양

(1) axenic 균주의 분양처의 조사 및 분양

상기와 같이 여러 실험을 통하여 xenic 균주로부터 axenic 균주를 분리하기 위해 노력을 했으나 그 결과는 쉽지 않았다. 따라서 세계의 algae 분양기관을 조사해 보았고, 아울러 axenic 균주의 분양 가능성도 조사해보았다 (표 3-9 참조). 그 결과 미국 CCMP 및 일본 NIES에서 우리가 원하는 axenic 균주를 찾을 수 있었다. 상기 기관들에서 4종의 *Tetraselmis* 속 및 *Nannochloropsis* 속의 axenic 균주를 분양 받을 수 있었다 (표 3-10 참조).

분양 시 선택기준은 첫째로는 axenic한 것이고, 두 번째로는 *Tetraselmis suecica* 1종, 그 외 *Tetraselmis* 속 균주 1종, *Nannochloropsis oculata* 1종 및 그 외 *Nannochloropsis* 속 균주 1종으로 하고, 세 번째로는 배양온도가 될 수 있는 한 높은 온도 (25-30°C)에서 배양이 가능할 것으로 정하고, 구입했다.

(2) Axenic 균주의 평가 및 시험균주로의 선택

분양받은 axenic 균주, *Nannochloropsis oculata* NIES-2145 (Npo-2145로 약칭), *Nannochloropsis* sp. CCMP 531 (Npq-531로 약칭), *Tetraselmis suecica* CCMP 904 (Tss-904로 약칭), *Tetraselmis* sp. CCMP 908 (Tsq-908)와 신라대가 보유하고 있는 *Tetraselmis chuii* (Tsc-S로 약칭)의 성장곡선을 상호 비교해 보았다. 배양조건은 시험관에 4 ml의 F 배지를 사입하여 멸균하고 각 종배양액을 10%되게 접종한 후에 3,000 lux (L/D=12/12), 24°C, 180rpm의 shaking incubator에서 배양하였다.

표 3-9. 주요 조류 분양기관

조류분양기관 (Algae Culture Collection)	인터넷 주소 (Web site)	Axenic 정보여부*
The Provasoli-Guillard National Center for Culture for Marine Phytoplankton (CCMP)	ccmp.bigelow.org	Yes
Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP)	www.ccap.ac.uk	No
Universty of Toronto Culture Collection (UTCC)	www.botany.utoronto.ca / utcc	No
일본국립환경연구소 Microbial Culture Collection at NIES (NIES)	www.nies.go.jp	Yes
일본 Algae Resource Database	www.shigen.nig.ac.jp	No
Culture Collection of Algae of Charles University of Prague (CAUP)	botany.natur.cuni.cz / algo / caup.html	No
The Culture Collection of Algae at the University of Texas Austin	www.utex.org	No

* 인터넷사이트에서 axenic 혹은 xenic 정보 제공 여부

표 3-10. Axenic 분양받은시험균주

Strain	당사약어	Culture Condition	Remarks
<i>Nannochloropsis oculata</i> NIES-2145	Npo-2145	ESM(agar), 20℃, 10-20 μmol photons/m2/sec	axenic
<i>Nannochloropsis sp.</i> CCMP 531	Npq-531	f/2-Si, f/2 agar, 22-26℃	axenic
<i>Tetraselmis suecica</i> CCMP 904 (CCAP 66/22D)	Tss-904	L1, f/2-Si, f/2 agar, 11-16℃	axenic
<i>Tetraselmis sp.</i> CCMP 908	Tsq-908	L1, f/2-Si, f/2 agar, 22-26℃	axenic

그 결과 *Nannochloropsis* 중에서는 Npo-2145의 성장이 뛰어났으며 *Tetraselmis*속 중에서는 Tss-904와 Tsq-908의 생육이 비슷하였다.

따라서 차기 시험균으로서 Npo-2145를 *Nannochloropsis*속 중에서 선택하고 Tsq-908을 *Tetraselmis*속의 균에서 선택했다. Tsq-908은 CCMP 분양기관에서 추천 배양온도가 22-26℃ 인 반면에, Tss-904는 11-16℃이기 때문에 선택기준인 높은 배양온도를 택한다는 기준에서 Tsq-908을 택했다.

Tsc-S는 axenic하다는 증거가 명확하지 않아서 선별 대상에서 제외했다.

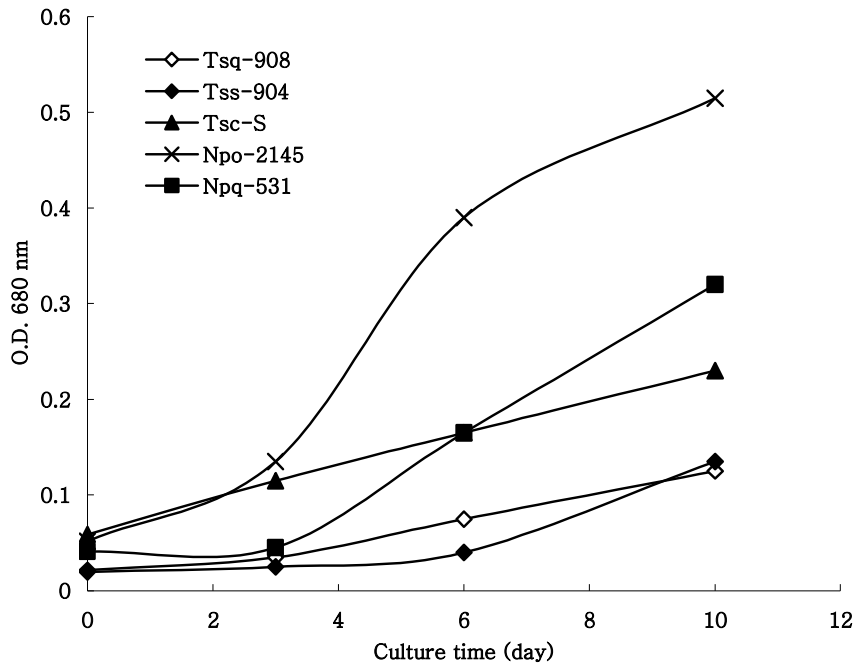


그림 3-9. Axenic 균주 4종의 성장곡선 (24°C배양, 상세한 것은 본문 참조)

다. 변이처리에 의한 균주 개량 가능성의 타진

(1). EMS 처리에 따른 *Nannochloropsis oculata*의 생존율 측정

먼저 EMS의 변이처리 효능을 알아보기 위하여 *Nannochloropsis oculata* Npo-2145을 변이 대상으로 택하고 EMS 처리실험을 하였다. 우선, EMS 농도에 따른 *N. oculata* Npo-2145의 생

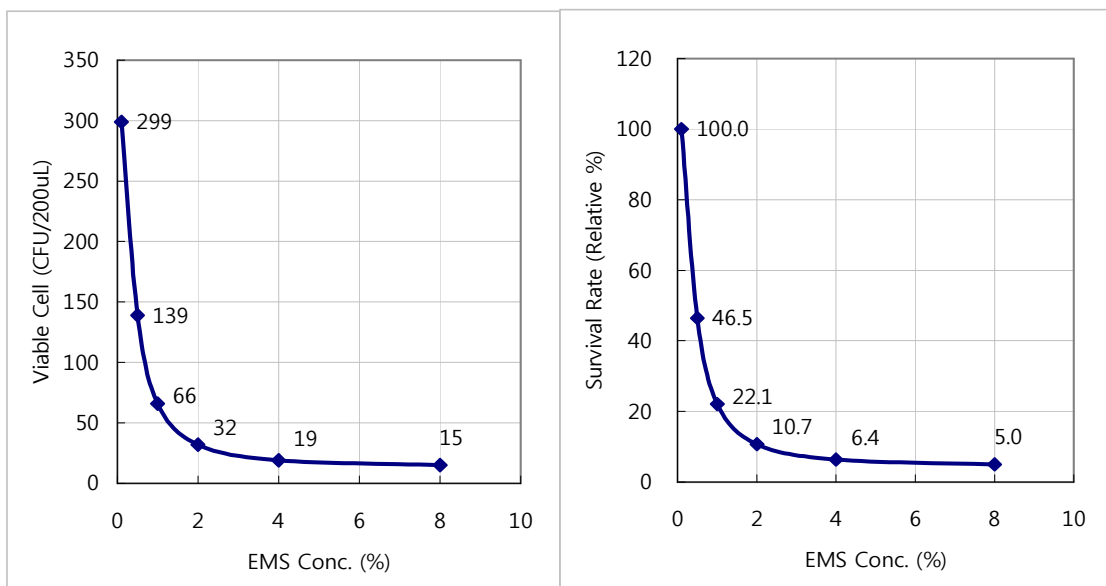


그림 3-10. EMS 처리 시의 *N. oculata* Npo-2145의 생존율

존율을 측정 하였다. EMS 농도를 0%, 0.5%, 1%, 2%, 4%, 8%로 하여 상기의 방법대로 *N. oculata* Npo-2145의 현탁액을 처리한 다음에 MRS 고체배지에 도말하고 25℃, 180 rpm, 2,500 lux의 광조건 하에서 배양 하여 colony의 수를 측정하였으며 (그림 3-10의 왼쪽), EMS 무첨가균의 colony수와 대비하여 각 EMS 농도에서의 생존률(%)로 환산 하였다(그림 3-10의 오른쪽). 그 결과 EMS 농도가 증가하면 생존율이 급격히 감소하나 EMS 4~8%에서는 생존율이 5% 이상으로 변함이 없다.

(2) EMS 처리 후 얻은 변이주의 생육능 실험

EMS mutation 방법으로 얻은 colony 들 중에서 크기가 큰 colony를 선별하여 MRS 액체 배지에 접종하고, 25℃, 180 rpm, 2,500 lux의 광조건 하에 50 mL Falcon tube에 배양 하였다. 7일을 주기로 균체농도를 측정한 결과, *N. oculata* Npo-2145의 EMS 변이주에서 성장이 좋은 변이주를 선별할 수 없었다. 이는 EMS 농도별 생존율 곡선 (그림 3-10)에서 보는 바와 같이 EMS 4~8%의 구간에서의 생존율의 변화가 없는 것으로 보아 EMS 내성주가 쉽게 유도 되는 것으로 판단되며, 획득된 내성의 성질은 성장과는 관련이 없음을 뜻한다고 추론할 수 있다.

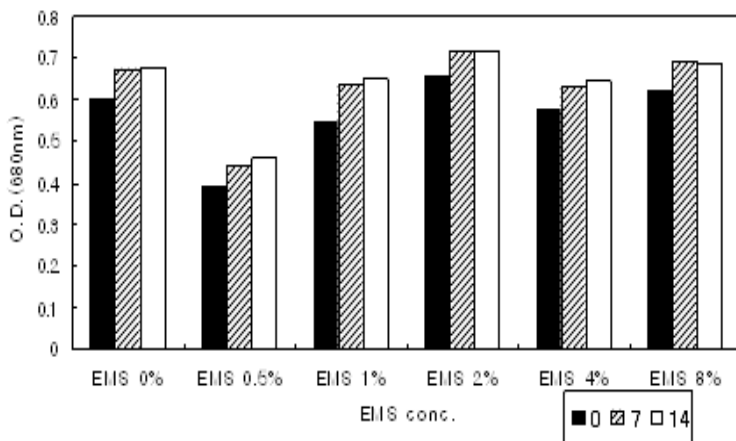


그림 3-11. 각 EMS 농도처리에서 선별된 strain의 성장

한편으로는 EMS에 의해서 변이가 일어나기는 하나 back -mutation이 쉽게 일어난다고도 추론할 수 있다. 이 경우엔 EMS의 변이유발제로서의 효과는 없음을 뜻하며, 이는 그림 3-10과 같이 고농도의 변이주가 생육이 그다지 나쁘지 않음이 증명한다. 따라서 EMS 변이에 의한 생육 우수주의 선별은 쉽지 않다고 판단되며 앞으로 이 균주에 대한 대사를 잘 연구하여 그에 맞는 선택압을 걸어주는 균주 개발전략이 필요하다.

(3) UV 처리 후 선별한 변이주의 성장률 측정

Nannochloropsis oculata Npo-2145를 고체평판배지에 식균한 다음에 UV광원으로부터 20cm 거리를 두고, UV 조사시간을 0 ~ 80 min UV를 처리하여 개량된 변이주를 얻고자 하였다. UV처리 시간에 따라 살아남은 *N. oculata* 변이주의 성장을 측정한 결과, 처리시간이 길어질수록 대체적으로 *N. oculata* 변이주의 성장률이 떨어지는 경향을 보였다. 이는 UV변이 처리가 효과가 있으나 우리가 원하지 않은 방향으로 변이가 일어났음을 뜻할 수도 있다.

그러나 16일 이후 대부분의 변이주가 성장이 증가하는 것이 관찰되었다. 그 중에서 20, 40 min을 처리한 실험군에서 성장률이 좀 더 좋아졌음이 확인되어 어느 정도 효과가 있음이 관찰되었다. 그러나 대조구와 큰 차이는 보이지는 않아서 일단 보관만 하기로 하고 후의 실험은 친주로 진행하였다.

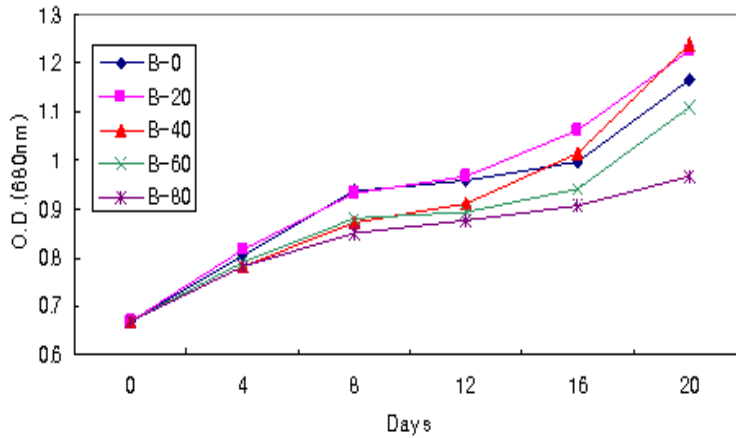


그림 3-12. UV 처리 변이주의 성장곡선

라. 양식용 먹이생물 적합미세조류 선발

상기에서 배양한 균주의 세포크기를 알기 위해 현미경으로 사진을 찍었다 (그림 3-13 참조). *Nannochloropsis*계통은 그 특징인 size가 적은 구형의 단세포가 관찰되었고, *Tetraselmis*계통은 운동성과 flagella가 관찰되어 *Tetraselmis*속 특징을 가지고 있었다. *Nannochloropsis*는 직경이 2.3~2.53 μm , 2.7~3.3 μm 으로 측정된 구형이었고 *Tetraselmis*는 8.6~9.4 x 15.4~17.4 μm , 7.9~8.3 x 10.6~15.6 μm 의 타원형으로 측정되어서 수산 양식용 먹이 생물로서 그 크기는 크게 문제가 되지 않을 것으로 생각되었다.

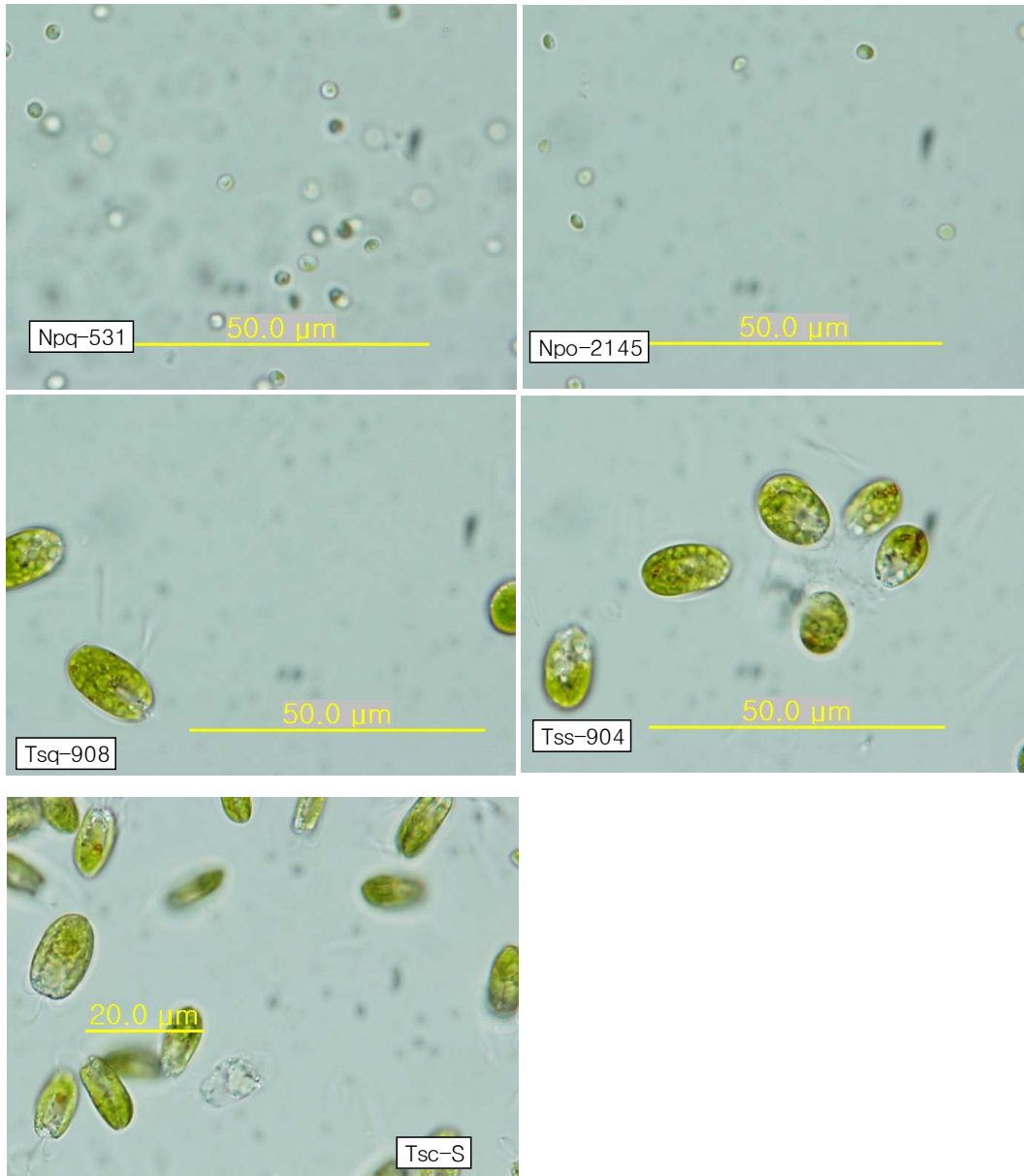


그림 3-13. Axenic 균주 4 종 및 Tsc-S의 세포형태 현미경 사진 (F배지, 24℃, 10일배양, 100x10)

표 3-11. Axenic 균주 4종의 단세포 크기 및 형태

균주	단세포의 크기 및 형태
Npq-531 (<i>Nannochloropsis</i> sp.)	2.7~3.3 μ m의 구형
Npo-2145 (<i>Nannochloropsis oculata</i>)	2.3~2.5 μ m의 구형
Tsq-908 (<i>Tetraselmis</i> sp.)	8.6~9.4 x 15.4~17.4 μ m의 타원형 (편모제외 크기)
Tss-904 (<i>Tetraselmis suecica</i>)	7.9~8.3 x 10.6~15.6 μ m의 타원형 (편모제외 크기)

2. 대량 광배양을 위한 배지 및 배양조건 인자 조사

가. f/2배지에서의 trace metal 및 vitamin의 강화 효과

빛에 의한 영향을 최소화하기 위하여 시험관에 소량의 규모로 실험을 진행함으로써 미세 조류 생육 후에도 미세조류에 의한 빛가림 현상을 배제하여 빛이 충분히 조사되도록 진행하였다. 즉, 4 ml의 배지를 시험관에 사입하고 440 μ l를 종배양액을 접종하여 접종량이 10% 되게 하였다. 시험관은 shaking incubator에서 약 35 $^{\circ}$ C 각도로 눕혀서 빛이 잘 조사되도록 함과 동시에 조체의 침전이 일어나지 않도록 하였다. 온도는 25 $^{\circ}$ C, rpm은 180으로 하고, 시험관에 도달하는 빛의 세기는 3,000 lux였다.

시험결과는 표 10과 같으며 trace metal solution 및 vitamin solution의 단독 혹은 동시 증강효과는 Npo-2145 및 Tsq-908 모두에서 없었다.

한편, f-Si, f/2-Si 및 f/4-Si 실험군을 비교해 보면 성장의 뚜렷한 차이가 두 균주 모두에서 보인다. 이는 조체를 장시간 배양하여 고밀도로 키우기 위해서는 배지에 들어가는 영양분 전체를 증강시켜 주어야 함을 말한다.

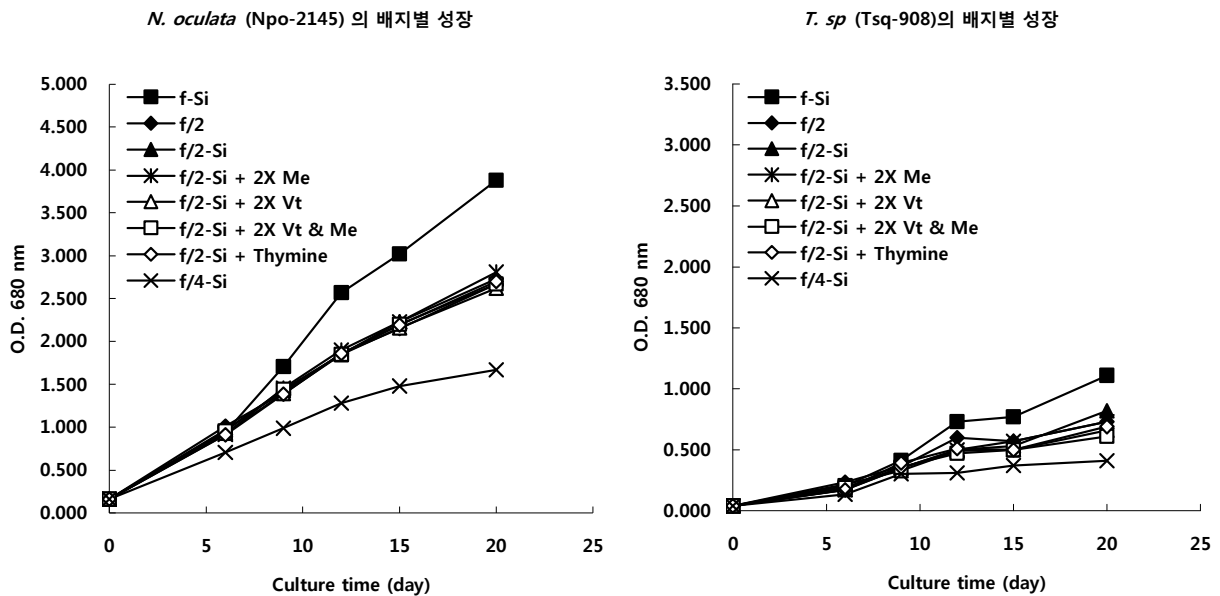


그림 3-14. Npo-2145 (좌) 및 Tsq-908(우)의 각종배지에서의 생육비교 (25 $^{\circ}$ C, 3,000 lux, 180 rpm, Me: Trace metal solution, Vt: Vitamin solution, -Si: 규산염제외)

나. f/2 배지 농도의 증강효과

상기 1차실험에서 배지농도 전체를 증강시키면 효과가 있음을 알았다. 이에 따라 f/2 배지를 기본으로 배지전체농도를 증강시키는, 즉 배지를 농축시킨 농축배지가 미세조류의 성장에 미치는 영향을 실험했다. 배양 방법은 (5)에서와 동일하게 했다.

한편 f/2배지는 원래 Guillard and Ryther (1962, 37), Guillard (1975, 38)가 만든 F배지를 2

배 희석하여 만들어졌다. 2배 희석하면 f/2, 4배 희석하면 f/4, 10배희석하면 f/10, 이런 식으로 표시하는 것이 일반적인 관례이다. F배지는 소문자로 f, 또는 대문자 F로 표기하기도 한다.

본 실험에서는 F배지를 기준으로 2배 농축한 것은2f, 4배 농축한 것은 4f 등으로 표시했다. 실험결과는 그림11과 같으며 대체로 배지의 농축도가 높을수록 배양 후반에서 Npo-2145, Tsq-908 두 균주 공히 성장차가 많음을 알 수 있었다. 두 균주 공히 배양 15일에 최고 OD가 3.0 근처에 도달할 수 있음을 알 수 있었다.

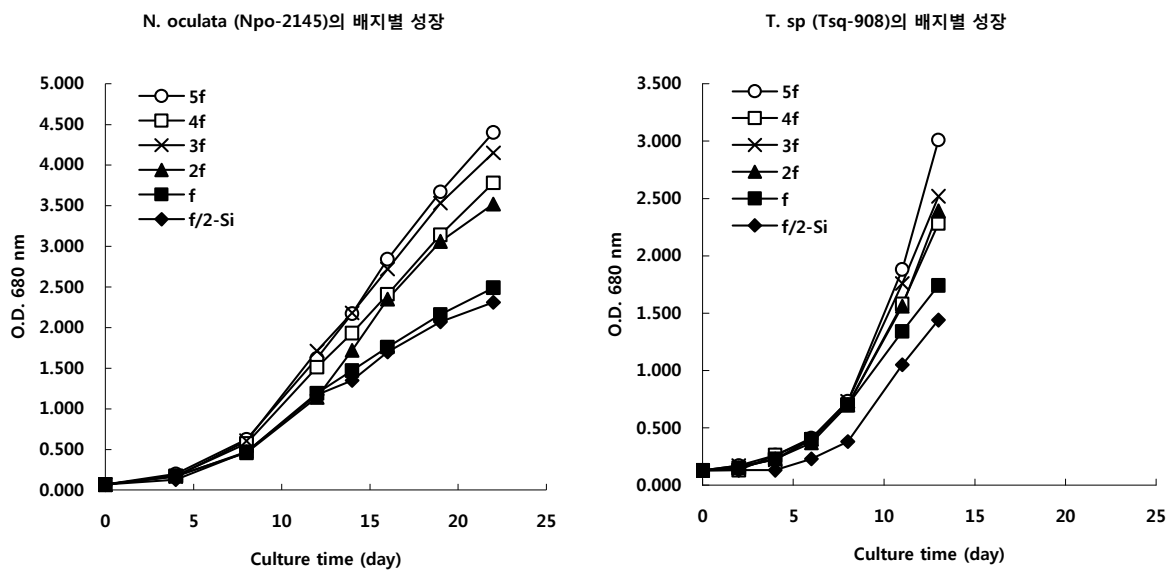


그림 3-15. Npo-2145 (좌) 및 Tsq-908(우)의 각종배지에서의 생육비교(25℃,3,000 lux, 180 rpm, -Si: 규산염 제외)

다. 온도의 영향

미세조류의 생육 온도 범위는 제 2장에서 언급한 바와 같이 대체로 16~27℃로 알려져 있으나 (36), 산업적으로는 배양온도가 높을수록 유리하고 그 이유는 가온하는 것이 냉각하는 것보다 비용이 대체로 싸기 때문이다. 또한 생물의 대사는 높은 온도에서 빨라지기 때문에 생산성이 향상되는 경우가 많으므로 여러모로 이득이 많다. 상기 실험에서 얻은 결과를 반영하여 3F배지, 3,000 lux, L/D=12/12, 180rpm의 조건으로 25℃, 30℃, 35℃에서의 배양 상태를 확인해 보았다. 그 결과 통설대로 25℃에서 생육이 제일 좋았고, 30℃이상 부터는 생육이 민감하게 저해 받음이 확인되었다 (그림 3-16, 3-17).

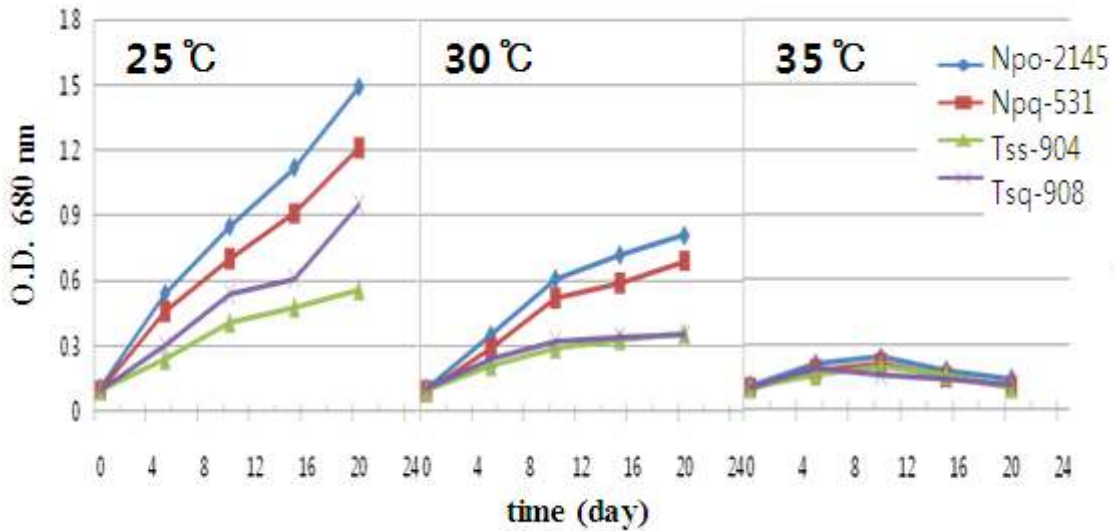


그림 3-16. 온도가 성장에 미치는 영향

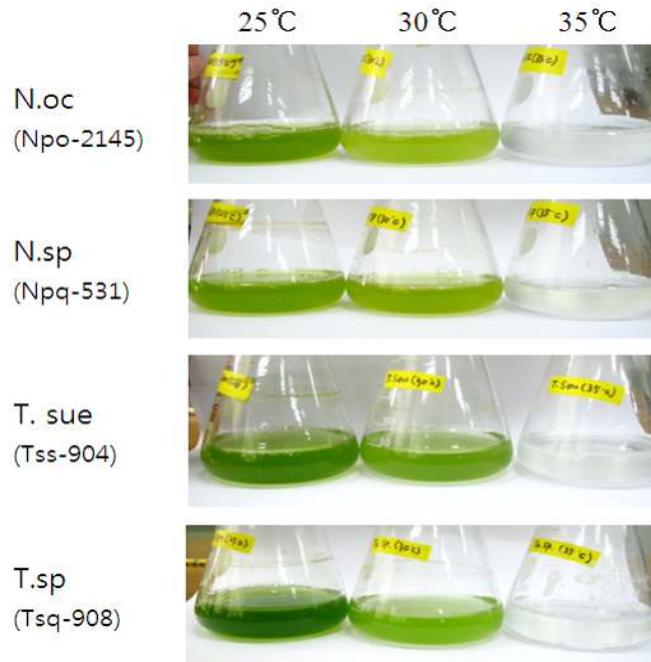


그림 3-17. 온도의 영향.

라. pH의 영향

미세조류의 생육에 적당한 pH 범위는 마찬가지로 제 2장에서 언급한 바와 같이 7-9°C이고 최적은 8.2-8.7로 알려져 있다 (36). 이를 확인하기 위하여 *Nannochloropsis*의 2종을 가지고 초기 pH 조절을 통하여 rm 영향을 알아 보았다. 배양조건은 3F배지에서 25°C, 3,000 lux, L/D=12/12, 180rpm의 조건으로 했다. 그 결과로서 pH 7.5~8.5사이는 허용하나 pH 6.5 및 9.5는 생육에 저해를 주는 것으로 나타났다

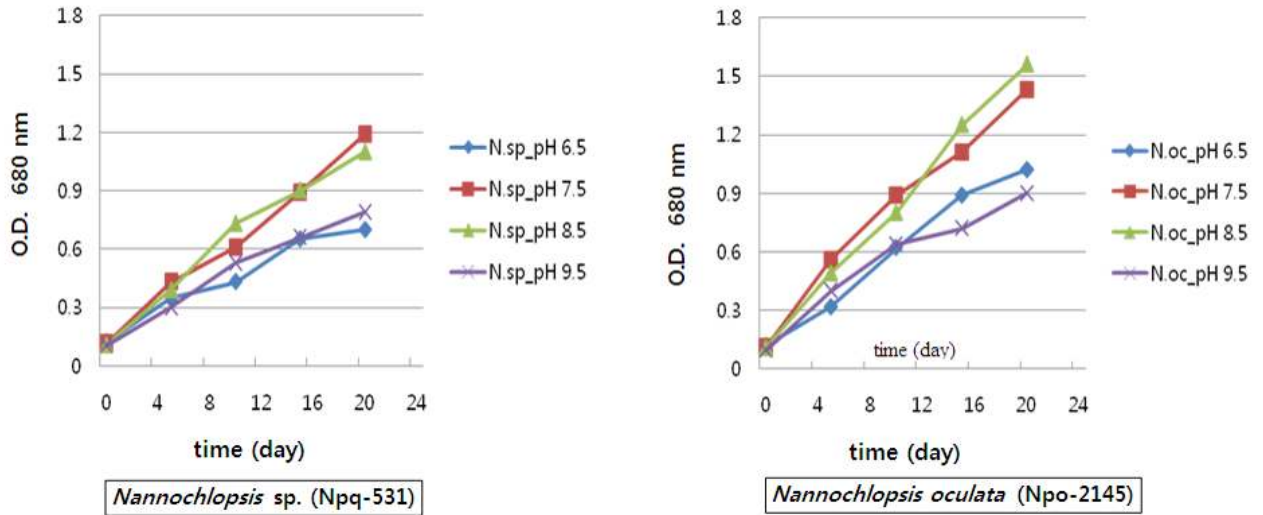


그림 3-18. 초기 pH가 성장에 미치는 영향

마. CO₂의 영향

CO₂ 영향실험은 *Spirulina plantensis*의 배양조건을 바탕으로 *N. oculata* Npo-2145로 실험을 진행하였다 (46). CO₂는 미세조류의 광합성에 의해서 성장 시 탄소원으로 이용된다. 따라서 지속적인 탄소원의 공급은 당연히 미세조류의 성장에 좋은 영향을 줄 것으로 생각되었고 결과도 그렇게 확인되었다. 한편으로는 CO₂의 공급은 탄소원의 공급에 그치지 않고 배양액의 pH에 영향을 미치므로 pH의 변화를 살펴보았다. CO₂를 공급하지 않은 배지에서는 pH의 급상승과 함께 생육이 거의 정지되는 것으로 나타났으나, CO₂를 공급할 경우에는 CO₂ 공급에 따른 탄산의 이로 인해서 pH가 거의 6.8이하로 유지되었다. pH가 최적을 벗어났음에도 불구하고 CO₂를 공급하지 않은 군보다 성장이 계속 유지되었다. 만약에 필요량 이상의 CO₂의 공급에 의한 pH의 하락이 유도되었다면 적절한 CO₂를 공급할 때는 조체생산성이 더욱 증가할 것으로 기대된다. 여기서 data는 나타내지 않았지만 CO₂의 공급으로 조체내의 엽록소 함유량이 높아짐도 확인되었다. 이는 일정량의 CO₂의 공급은 생육의 촉진뿐만 아니라 엽록소 함량의 증가에 중요한 요소가 됨을 보여준다 (47의 문헌에 발표).

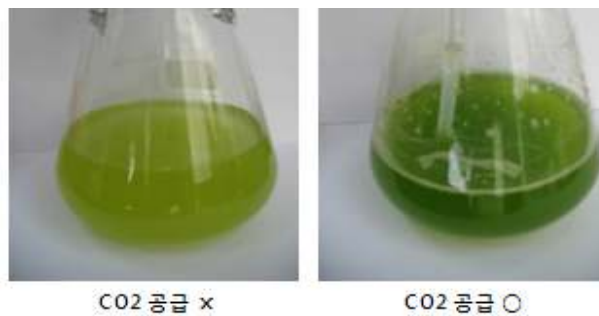


그림 3-19. CO₂ 공급 유무에 따른 14일 배양 후 생육의 차이

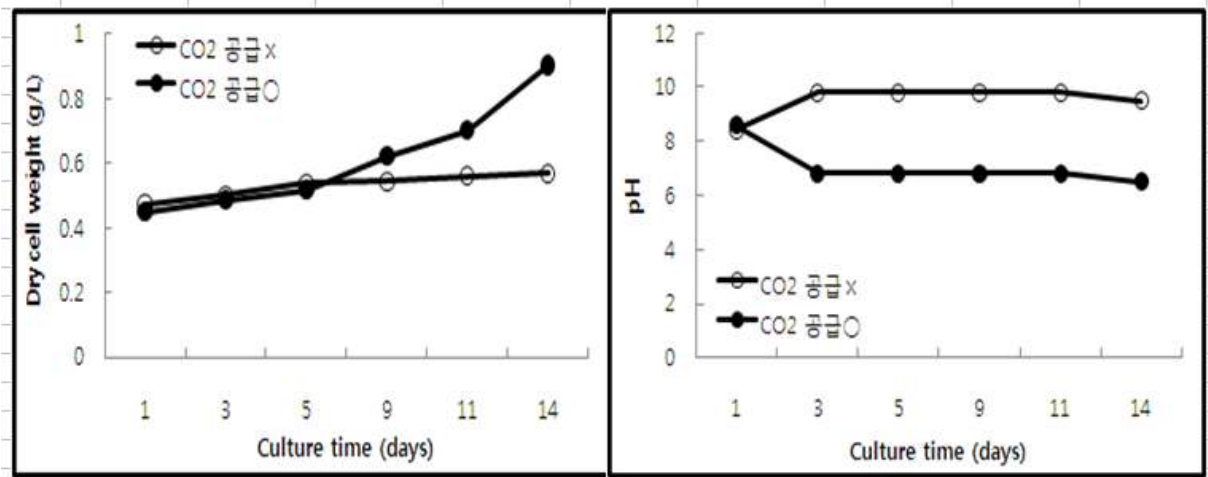


그림 3-20. CO₂ 공급 유무에 따른 생육의 차이

바. CO₂ 공급시의 완충액의 첨가 효과

마항에서 CO₂ 공급시 pH의 급격한 하락을 막을 수 있다면 조체생산성이 더욱 좋아질 것으로 예상하고 소극적인 방법으로 완충액을 첨가하여 그 가능성을 점검해 보았다. *N. oculata* Npo-2145로서 중성대의 phosphate buffer 및 tris buffer를 각각 0.1mM, 5mM 첨가한 균을 가지고 배양 실험을 하였다. 그 외의 조건은 마항과 동일하다. 그 결과 당연히 CO₂를 첨가한 균이 CO₂를 첨가하지 않은 균보다 조체 생산성이 뛰어났으며 CO₂ 첨가균을 비교해 보면 두 가지 완충액을 첨가한 균, 즉 완충력이 클수록 생육이 좋다. 이 실험에서 CO₂의 첨가는 조체생산성 향상에 절대적임을 다시 확인 시켜주고 있고, 그 위에 pH를 조절해 주면 더 좋은 결과를 얻을 수 있을 것이라는 기대감을 갖게 한다.

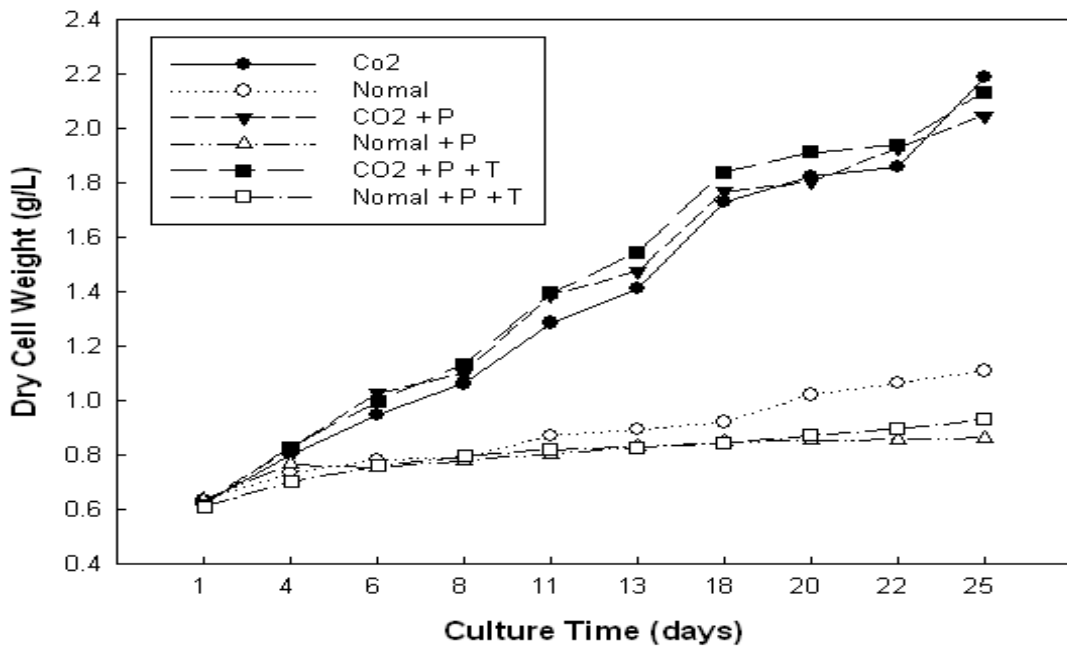


그림 3-21. 완충액 첨가 시 생육에 미치는 영향

사. 고체 배양에서 agar 농도가 미치는 영향

4종의 axenic 균주를 agar 농도에 따른 영향을 보았다. f/2-Si, f/2 에 도달 접종하고 실온 스탠드 형광등하의 3,000 lux에서 배양했다. 그 결과는 표12와 같다. 규산염 (Si염)을 제외하고 agar를 통상보다 낮추어 배양한 실험구가 4종 균주 모두에서 성장이 빠르고 양호했다.

Agar%가 낮은 것은 상대적으로 수분함량이 많기 때문에 반 액체배양의 형태를 취하기 때문에 좋지 않은가 한다. 장기간 배양으로 수분이 고갈되어 마르는 것도 방지해 줄 수 있는 것도 한 원인 일 것이다. 규산염의 제외가 왜 좋은가는 명확하지 않다. 제외시 pH의 경시변화를 확인해 볼 필요가 있다.

표 3-12. Axenic 균주 4종의 도말 평판 배양

(실온배양, 3,000 lux, 15일배양)

균주	기본배지 항목 agar%	f/2-Si		f/2
		1.50%	0.90%	0.90%
Npq-531	성장정도	+	+++	+
	조체 색	연함	선명	연함
	colony형성여부	없음	연녹색 미세 colony	없음
Npo-2145	성장정도	+	+++	+
	조체 색	연함	선명	연함
	colony형성여부	없음	연녹색 미세 colony	없음
Tsq-904	성장정도	+	++	++
	조체 색	연함	선명	연함
	colony형성여부	없음	진녹색 작은 colony	없음
Tss-908	성장정도	+	++	++
	조체 색	연함	선명	연함
	colony형성여부	없음	진녹색 작은 colony	없음

아. *Tetraselmis*속 균주의 타가영양 배양 (heterotrophic culture) 가능성 확인

*Tetraselmis*가 타가영양배양이 가능하다는 정보를 입수하고 그 가능성을 체크하고자 본 실험을 실시하였다.

Si염을 첨가하거나 첨가하지 않은 f/2m2+ glucose 1%, yeast extract 0.2%에 Tss-004 균을 접종하고 25℃, 180rpm으로 shaking incubator에서 7일 배양한 결과 생육이 되었으나 왕성하지는 않으며 현미경으로 관찰한 세포는 보통 광배양 시의 세포에서의 엽록소 함량보다 적어서 인지 녹색을 거의 띠지 않았다 (그림 3-22).

또한 현미경 관찰에서 Si가 첨가된 균에서는 운동성이 활발하게 있음이 관찰되었으나 첨가되지 않은 균에서는 운동성이 관찰되지 않았다. 미국의 분양기관인 CCMP에서는 *Tetraselmis*의 배양배지로 f/2-Si배지를 권장하고 있어 Si염과 운동성의 관계가 있다고 결론을 내리기엔 아직 이른 것 같다.

*Tetraselmis*뿐만 아니라 *Nannochloropsis sp.*를 가지고 mixotrophic culture 및 heterotrophic culture을 했다는 다수의 논문이 발표되었으므로 앞으로 좀 더 검토해 봐야 할 것이다.

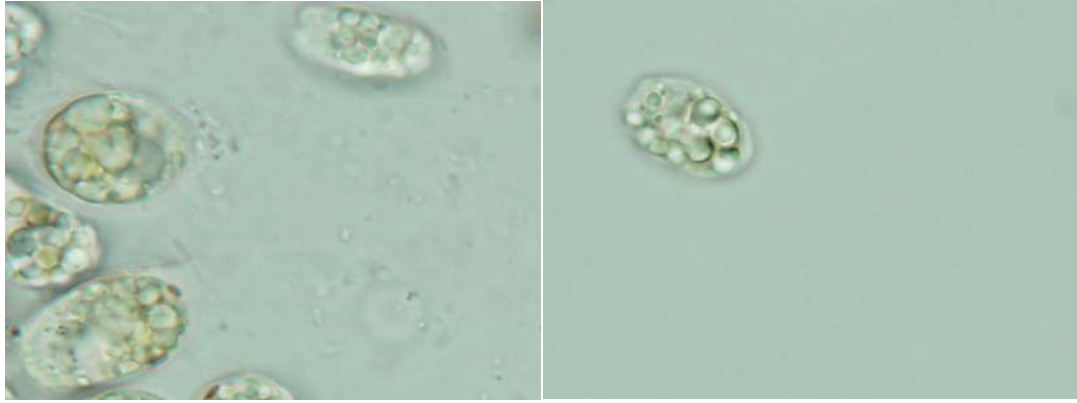


그림 3-22. Tss-004를 암배양한 경우의 조체 현미경 사진 (f/2m2+GY 배지, 25°C, 180rpm 7일 배양, 좌는Si 첨가배지, 우는 Si 무첨가배지)

타가영양배양 혹은 혼합영양배양 가능성을 염두에 두고 몇 가지 탄소원에 대한 영향을 보기 위하여 f/2배지 포도당, 글리세린를 0.4% 첨가하고 광배양 및 암배양을 실시해 보았다. 그 결과 광배양에서 *Tetraselmis* 계통의 균주는 glucose 및 glycerin 첨가시 생육이 좋거나 비슷한 성장을 하는 반면에 *Nannochloropsis* 계통은 glucose 첨가 시 생육이 현저히 저해를 받으며 glycerin 첨가 시는 저해현상 없는 특이한 점이 발견되었다. 암배양에서는 *Tetraselmis* 가 약간의 생육 흔적을 보이거나 *Nannochloropsis*는 그렇지 않았다. 이상의 결과로 볼 때 *Tetraselmis*는 glucose 및 glycerin 이용능이 있는 것으로 판단되며 *Nannochloropsis*는 그 능력이 거의 없는 것으로 판단된다. 따라서 *Tetraselmis*는 mixotrophic growth가 가능한 것으로 사료 되었다. 두 속 모두 암배양으로는 성장하지 않아서 전적으로 타가영양에 의한 생육은 기대할 수 없다. 한편 실험상 flask에 CO₂ 공급가능성을 두고 dufjrkw1 탄산가스 발생시약을 첨가해 보았으나 영향이 없거나 오히려 생육이 저해 되었다.

표 3-13. 광배양에서의 여러 가지 탄소원 첨가 시 생육영향

(1) 광배양결과(7일배양)

	Tss-904			Tsq-908			별균후	
	O.D	pH	비고	O.D	pH	비고	O.D	pH
무첨	0.6721	8.26	+++	0.4919	8.07	+++	0.038	8.07
Glucose	0.8309	6.77	+++	0.4227	7.28	+++	0.0333	7.37
Glycerin	0.8086	7.66	+++	0.5492	7.88	+++	0.0599	7.7
NaHCO ₃	0.2769	9.14	+	0.4321	9.49	+	0.1552	8.98
CaCO ₃	0.388	9.16	+	0.6812	7.55	+	0.9712	7.69
Na ₂ CO ₃	2.2026	9.3	-	2.19	9.42	-	2.2026	9.4

	Npo-2145			Npq-531			별균후	
	O.D	pH	비고	O.D	pH	비고	O.D	pH
무첨	0.3802	8.44	+++	0.2663	8.66	++	0.038	8.07
Glucose	0.0185	7.16	+	0.0792	7.3	+	0.0333	7.37
Glycerin	0.301	8.23	++	0.2663	8.26	++	0.0599	7.7
NaHCO ₃	0.1015	9.04	-	0.4771	9.53	+	0.1552	8.98
CaCO ₃	0.7782	7.67	-	0.8824	7.77	-	0.9712	7.69
Na ₂ CO ₃	2.2043	9.38	-	2.21	9.36	-	2.2026	9.4

※ O.D : 660nm, 희석안함.

표 3-14. 암배양에서의 여러 가지 탄소원 첨가 시 생육영향

(2) 암배양결과(7일배양)

	Tss-904	Tsq-908	Npo-2145	Npq-53
무첨	-	-	-	-
Glucose	+	+	?	?
Glycerin	+	+	?	?
NaHCO ₃	-	-	-	-
CaCO ₃	-	-	-	-
Na ₂ CO ₃	-	-	-	-

자. Yeast extract의 첨가 효과

순수분리실험에서 f/2m2배지에 yeast extract를 첨가하면 미세조류의 배양이 빠름을 알 수 있었기 때문에 yeast extract를 첨가한 배지를 기본배지로 하여 순수분리시험을 많이 했다. 그러나 당시 공시균주는 오염상태로 yeast extract를 첨가한배지에서는 오염균이 먼저 자라는 경향이 있어서 yast extract의 직접 첨가 효과인지 오염균의 생육에 의한 효과인지 확신할 수 없었다.

따라서 이번에는 신라대에 보유하고 있던 *Tetraselmis*계 균주를 가지고 yeast extract의 첨가 효과를 살펴보았다. 배양 조건은 24도, 180 rpm, 12:12 (L:D), 4000 lux(LED)로 실시하였고 그 결과는 그림 3-23과 같다.

Medium	<i>Tetraselmis. sp.</i>	<i>Tetraselmis tetraathele</i>
1. f/2	+	+
2. f/2m2	++	++
3. f/2m2+Y0.02%	+++	+++
4. f/4m+Y0.02%	+++	+++
5. f/4m2+Y0.2%	탁한 배양액	탁한 배양액

그림 3-23. f/2 및 f/2m 배지에서의 yeast extract 첨가 효과

그 결과, 배양 초기에는 yeast extract의 첨가량이 가장 많은 5번 조건에서 오염균의 생육이 빨라 가장 먼저 탁한 배양액상태를 나타내었으며, 녹색도로 성장을 판단한다면 그림 3-18과 같이 5번 조건과 3번조건이 생육이 타 조건보다 양호함을 알 수 있었으며. 2번과 4번의 생육이 비슷한 것으로 보아서 yeast extract 0.02%는 f/4m2배지 1x의 효과가 있는 것으로 보인다.

즉, yeast extract의 첨가로 생육촉진효과를 얻을 수 있음은 분명하나 다만 yeast extract 첨가시 오염균이 먼저 성장하기 때문에 오염된 미세조류를 가지고는 yeast extract 첨가의 효과를 정량적으로 구하기는 힘들다.

배양 후반기에 들면서 3, 5에서 가장 진한 녹색을 나타내면서 성장하였다. 이 경우 조체의 성장과 함께 조체의 색소생산이 우수했음을 현미경을 통해 확인할 수 있었다

차. 조도가 미치는 영향

현 시설상 액체배양으로 조도가 조류성장에 미치는 영향을 파악하기 어려워 평판배지를 가지고 광원과 평판과의 거리를 조절하므로써 평판에 닿는 조도를 변화시켜 조도가 미치는 영향을 조사하고자 하였다.

표 3-13과 같이 생육이 조도에 의한 영향이 없는 것 같은 data가 나왔다. 이는 아직 실험조류의 성장이 빠른 고체배지를 만들지 못했기 때문에 변별력이 떨어진 결과로 보인다. 3,000 lux 이상이면 현재의 고체배지가 가진 생육능력을 충분히 발휘할 수 있을 것으로 보인다. 앞으로 더 실험해 볼 분야이다.

표 3-15. Npo-2145의 f/2 평판배지에서의 조도에 따른 생육

3,000	3,500	4,000	4,500	5,100	5,500	6,200	7,500	10,000
+++	+++	+	+	+	+++	+	+++	+

주1) ++: 생육 약, +++: 4일후 균체 생육 확인됨

주2) Plate당 1loop 전주, 실온배양 (23~30°C)

3. Vinyl bag culture

가. 1차 비닐백 제작 및 성장비교

처음 제작된 비닐백은 PE 필름재질로 봉투를 만들되 하부는 V자 형태가 되도록 실링하고, 봉투상부에 air in, air out 및 sampling 포트를 부착한 플라스틱 뚜껑을 (그림 3-24의 상좌) 만들어 부착하는 형태였다. 뚜껑이 없는 상태의 봉투에 멸균된 배지사입 및 seed 접종을 무균 작업대에서 행하고, 이후 뚜껑을 조립하여 광배양실에 설치한다 (그림 3-24). Air in port에는 air filter, air flow meter (조절valve가 부착된 일체형) 및 compressor가 연결되어 무균 공기를 공급량을 조절해서 공급할 수 있게 했다. 이 비닐백의 장점은 뚜껑에 부착된 port를 통하여 air 공급 및 샘플링이 쉬운 반면에 배양용량을 크게 하기 어려운 점이다.

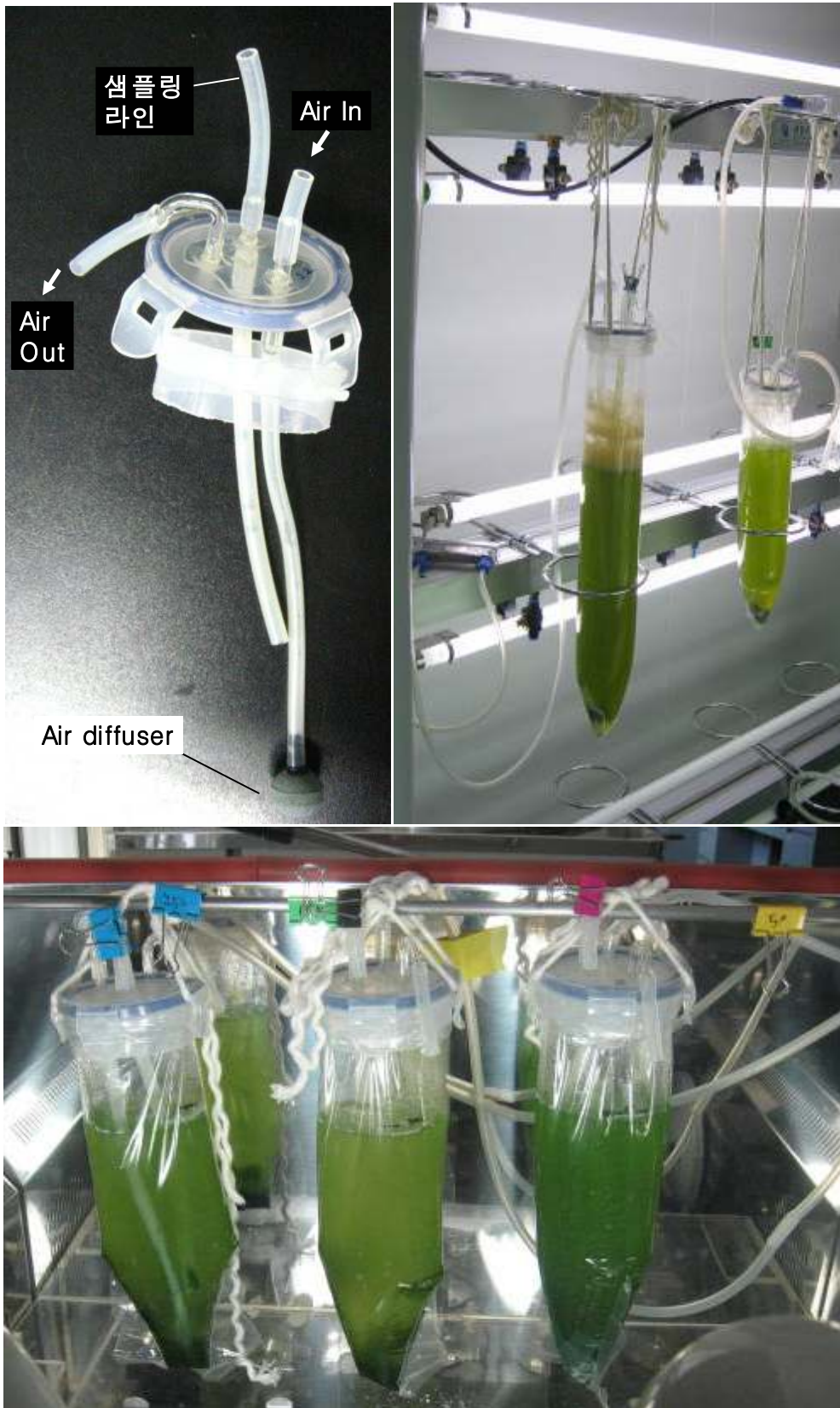


그림 3-24. 뚜껑이 있는 비닐백 (상좌: 플라스틱 뚜껑, 상우 및 하: 설치된 모습)

이렇게 제작된 비닐백과 그림 3-25의 Pyrex 유리 광배양장치 (glass reactor)를 이용하여 광배양을 행하고, 시험관에서 행한 광배양 결과와 성장곡선을 비교해 보았다 (그림 3-26 참조).



그림 3-25 : 뚜껑이 있는PE-vinyl bag (좌) 및 glass reactor(우)의 광배양 모습

그림 3-26에서 보이는 그래프와 같이 시험관, glass reactor, 뚜껑이 있는 비닐백 순으로 생육이 좋으나 그 차이는 그다지 크지 않다. 즉 이정도 차이로 훨씬 좋다고 할 수는 없다. 반면에 시험관의 결과는 비닐백에서 그대로 재현될 가능성이 높다. 뒤집어 말하면, 물론 더 많은 실험을 해봐야겠지만 지금의 실험결과로는 비닐백으로 시험관 이상의 획기적인 결과는 기대하기 어려울 것이다. 앞으로 시험관에서 성적이 좋은 배지로 비닐백 실험을 하여 이부분은 다시 한번 검증할 것이다.

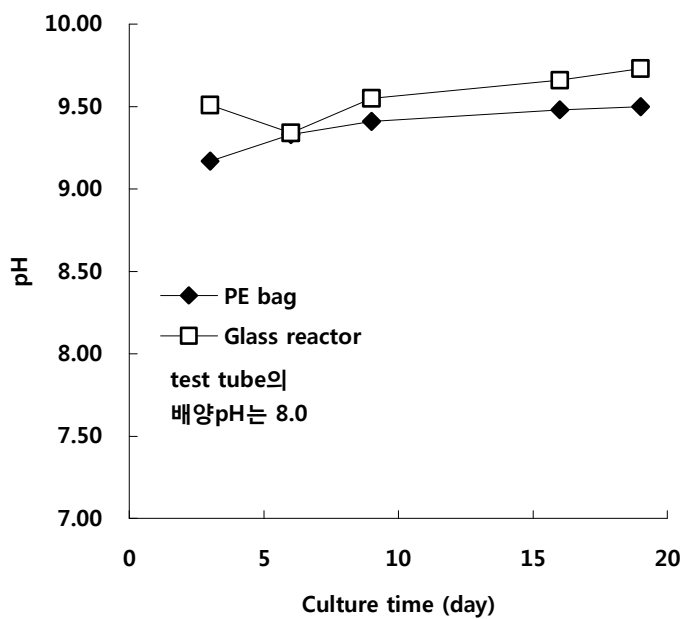
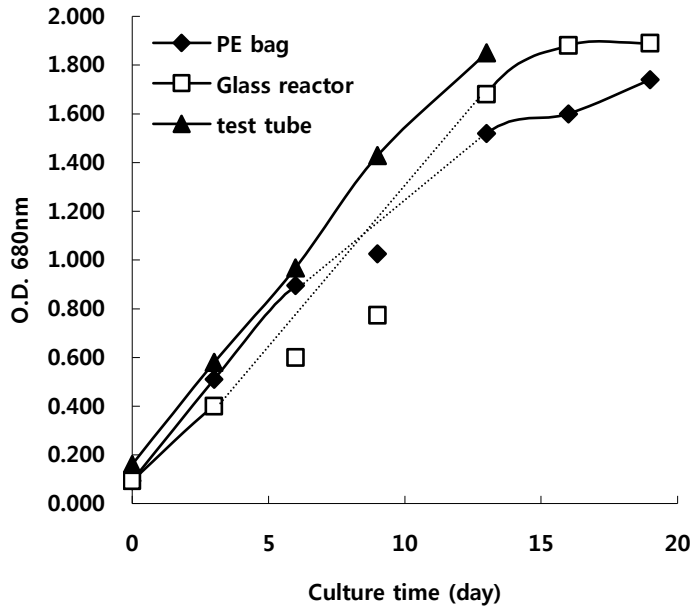


그림 3-26. Npo-2145의 각종 배양기에서의 성장곡선 및 pH 변화

- ① (상 그래프) PE bag & Glass reactor: f/2-Si배지, 10%접종, 7,000~2,000 lux, L:D=24:0, 운전량 1L, aeration 0.1vvm, 21℃
- ② (하 그래프) Test tube:: f/2-Si배지, 10% 접종, 3,000 lux, L:D=12:12, 운전량4ml, 18rpm, 24℃

나. 2차 비닐백 제작 및 해수 대체 가능성 실험

이후에 새로운 비닐백 제조를 위하여 비닐이 재질을 조사한 결과 PE 필름은 멸균이 불가능

하나 가격이 싸고, PP는 멸균이 가능하나 가격이 비싸다는 사실을 알았다. 그리고 여러 가지 비닐백의 타입을 조사한 결과, 무균은 보장되지 않지만 만들기 쉬운 영국의 스완지대학의 비닐백 배양을 참고로 하여 새로운 타입을 비닐백을 만들어왔다. (그림 3-27 및 3-28 참조)



그림 3-27. 영국 스완지 대학의 비닐백 배양 모습

새롭게 만든 비닐백은 폭 30cm의 polyethylene (PE) film을 길이 40~50 cm로 자르고 밑부분을 sealing기를 이용하여 sealing한 다음 무균실에서 살균한 배지 2-3 L에 seed를 접종하고 bag에 부은 다음에 위부분을 모아서 S자의 걸개를 끼우고 tie로 묶는다. 이렇게 만든 비닐백을 온도가 조절되는 room내에 있는 형광등이 설치된 배양대의 S자 걸개에 걸어서 설치한다. 다음으로 사전에 조립하여 멸균한 silicon 재질의 air hose 및 air filter를 vinyl bag의 액이 없는 위부분을 칼로 찢어서 그림과 같이 air hose를 bag내로 밀어 넣고 air pump와 연결한다. Bag의 찢은 부분은 tape를 붙여서 잘 밀봉한다. 배양상태를 확인하기 위한 sampling은 air hose를 주입할 때와 마찬가지로 멸균한 10 ml의 pipet를 액이 닿지 않는 부위에 칼로 찢어서 sampling하고 다시 그 부위를 tape를 붙여서 밀봉한다 (그림 3-28).

이 PBR의 장점은 설치 및 운전이 쉽고 또한 가격이 저렴한 PE film을 1회용으로 사용하기 때문에 배양이 끝난 후에 세척이 필요없다. 반면에 mixing이 좋지 않아서 조체가 쌓이는 경우가 있고, 물질전달이 원활하지 않아서 생육이 느린 점이 단점으로 생각된다.

2차로 제작한 비닐백의 성능을 알기 위하여 인공해수의 사용 가능성을 겸하여 실험해보았다. 균주는 *N. oculata* Npo-2145를 사용하고, f/2-Si배지, 10% 접종, 7,000~2,000 lux, L:D=24:0, 운전량 2L, aeration 0.1vvm, 25°C로 하영 배양해 보았다. 그 결과는 그림 3-29 및

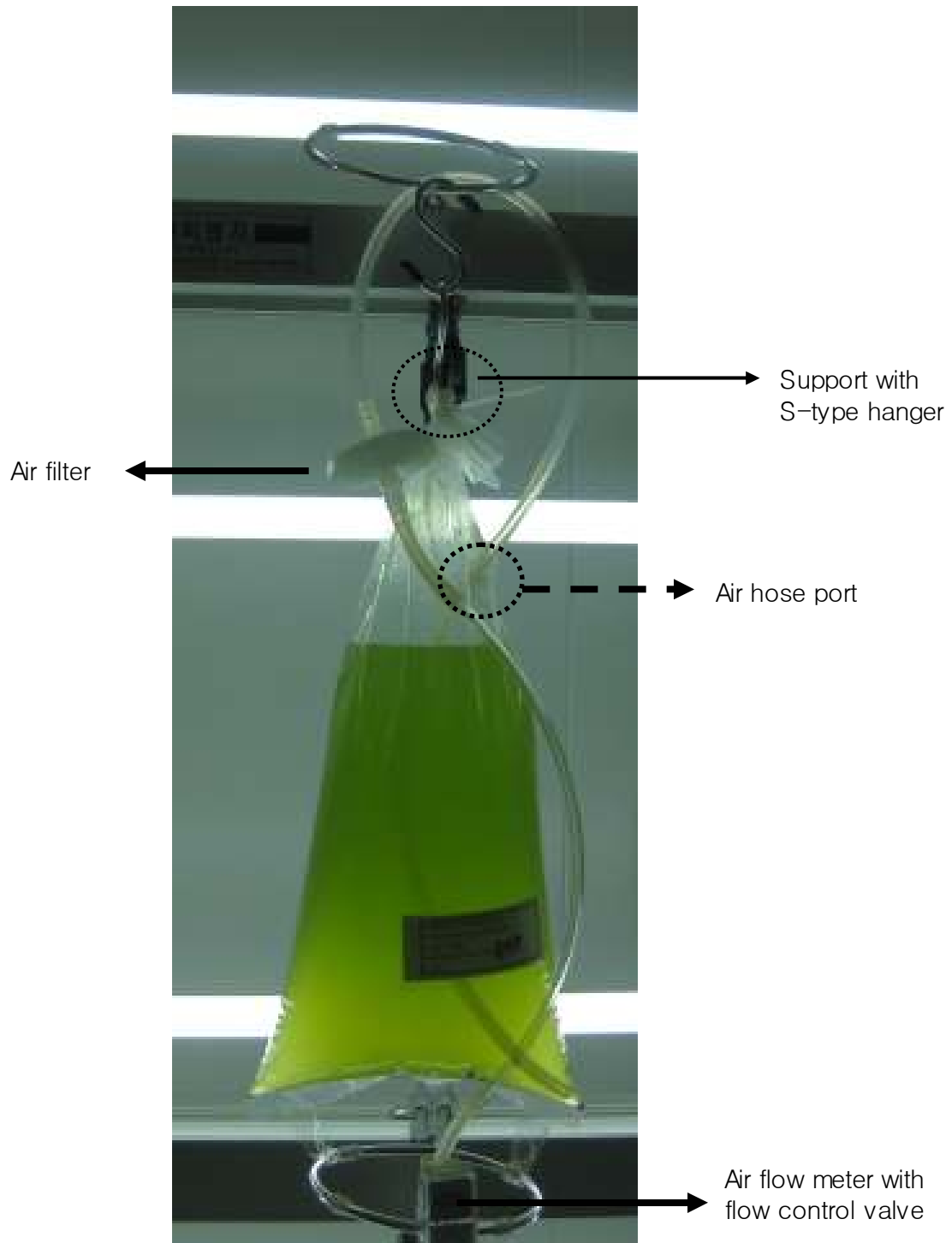


그림 3-28 간편하게 운전할 수 있는 비닐백



그림 3-29. 2차로 제작한 비닐백을 이용한 성장성 및 인공 해수 사용가능성 체크

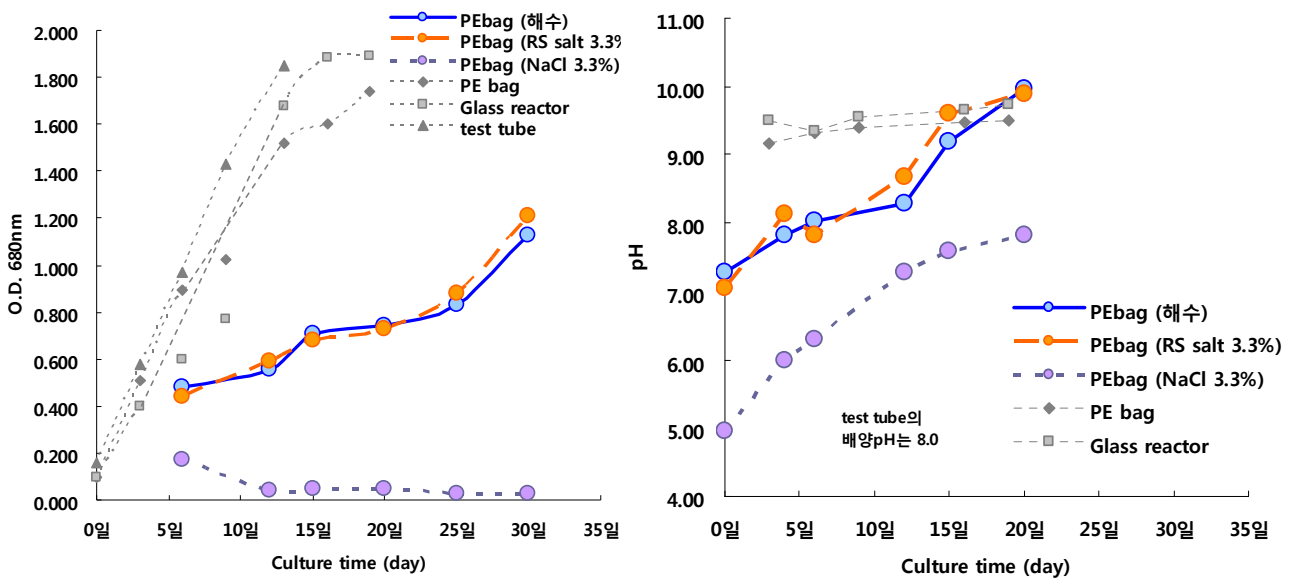


그림 3-30. 2차 제작 비닐백에서의 성장 및 pH변화 비교

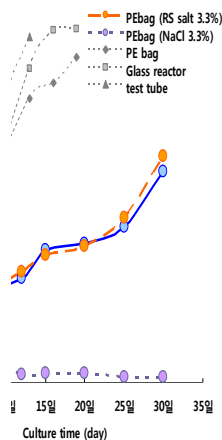
3-30에 나타내었다. 그 결과 약간씩 조건의 차이는 있으나 다른 용기에 비하여 생육 속도가 현저히 늦어짐을 확인되었다. 비교대상의 타실험이 배양액량이 적어서 mixing이 좋고, 증발량이 많아서 상대적으로 잘 자라는 것으로 생각 되었다. 또한 초기생육이 늦은 것으로 보아서 seed의 문제점도 있었던 것으로 생각된다. 이는 앞으로 대용량의 설계 시에 참고해야 할 중요한 포인트가 된다.

한편 해수 사용 시와 인공해수 사용 시의 생육의 속도 및 pH의 변화는 거의 동일 하여서 앞으로의 실험에 인공해수의 사용할 수 있는 근거가 마련되었다.

다. 이산화 탄소 공급에 따른 비닐백에서의 미세조류 성장성 확인

비닐백은 기존의 유리 flask에서 보다 빛의 투과율이 높아 고농도 미세조류 배양이 가능한 장점이 있다. 또한 flask에서 보다 공기 및 탄산가스의 공급이 비교적 쉽다.

Room대신에 incubator에서 비닐백 배양을 시도하였다. 3,000lux의 광량을 조사하고, 5% (vol/vol, CO₂/Air)의 이산화탄소 함유하는 공기를 0.1 vvm (vol/vol·min)으로 공급하였다. *T. suecica* Tss-904의 seed 배양액을 10% 첨가하고 생육곡선을 작성하여 보았다. 건조조체량은 OD값을 측정하여 환산식에 의하여 환산하였다.



Tetraselmis suecica Tss 904 14일 #

그림 3-32의 그래프를 보면 약 14일 정도의 배양에서 건조조체중량으로 약 1g/l, OD로서는 약 2.5 정도에 해당한다. 이는 그림 3-30에서의 *N. oculata* Npo-2145가 30일간의 배양에서 결코 이르지 못한 숫자이다. 그림 3-29와 그림 3-31을 비교해도 금방 알 수 있다. 즉, *T. suecica* 14일의 배양액은 사진으로만 보아도 viscosity가 상당히 증가했음을 알 수 있다.

생육이 왕성할 수 있었던 것은 이산화 탄산가스의 공급이 가장 큰 이유가 아닌가 생각 된다.

pH의 경시변화를 보면 8일경에 9-8 정도로 peak를 보이다가 이후 하락하여 8을 정도로 유지된다. pH가 9을 넘어가면 생육이 저해받는 것으로 보인다 *N. oculata* Npo-2145의 경우에는 그림 3-30을 보면 그 정도의 pH에 영향을 받지 않는 것 같다.

그림 3-31. 14일 배양한 Tss-904의 배양액

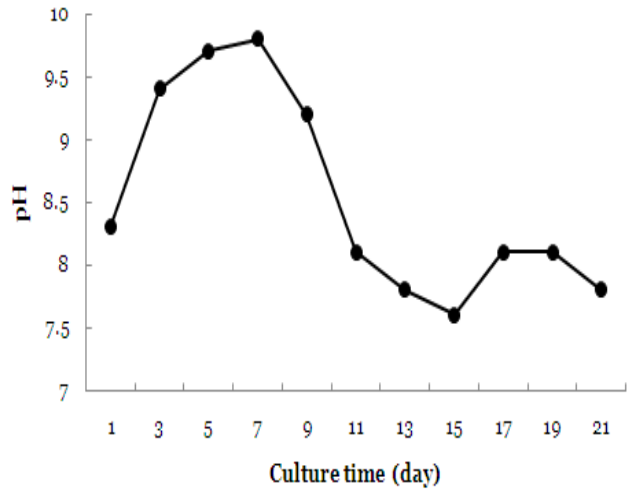
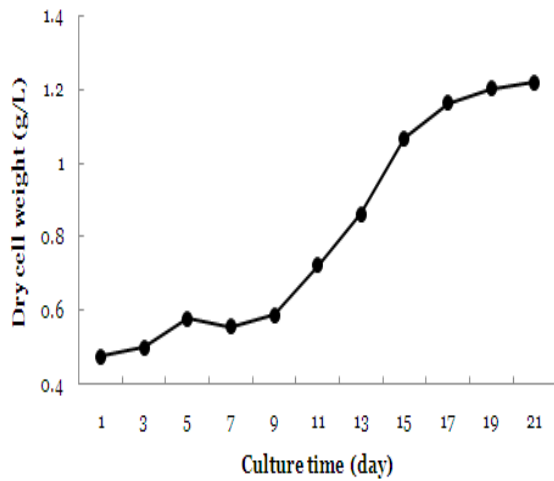


그림 3-32 *T. suecica* Tss-904의 비닐백에서의 배양 시 건조균체량 및 pH의 변화

N. oculata Npo-2145을 동일한 방법으로 배양한 결과를 그림 3-33에 나타내었다. 초기 균체량은 0.8 g/L로 다소 높은 지점에서 출발했다. 배양 11일 이후에 정지기로 들어갔으나 17일째부터 배지를 feed하기 시작한 결과 조체의 증가가 눈에 띈다. *N. oculata* Npo-2145의 경우에

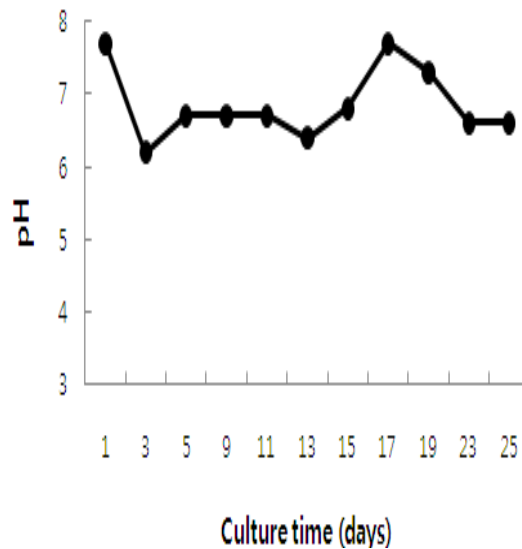
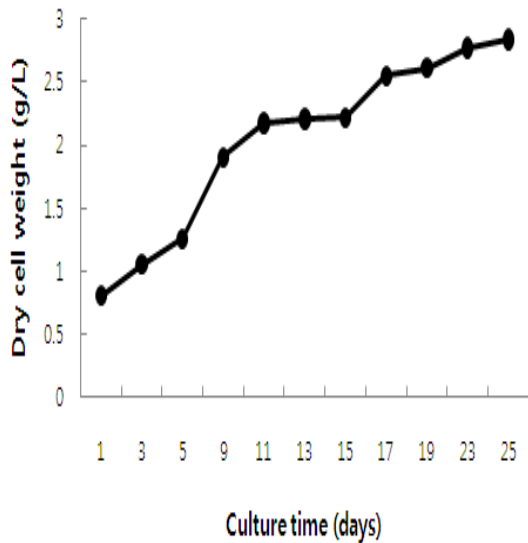


그림 3-33 *N. oculata* Npo-2145의 비닐백에서의 배양 시 건조균체량 및 pH의 변화

다. 무기 질소원의 첨가의 영향

배지내 질소원 NaNO_3 의 농도별에 따른 배양을 통해 *N. oculata* Npo2145 와 *T. suecica* Tss-904의 성장에 미치는 영향을 모색하고자 하였다. 질소원 농도별에 따른 성장촉진 효과는 크게 없지만 저해하지 않음은 확인된다.

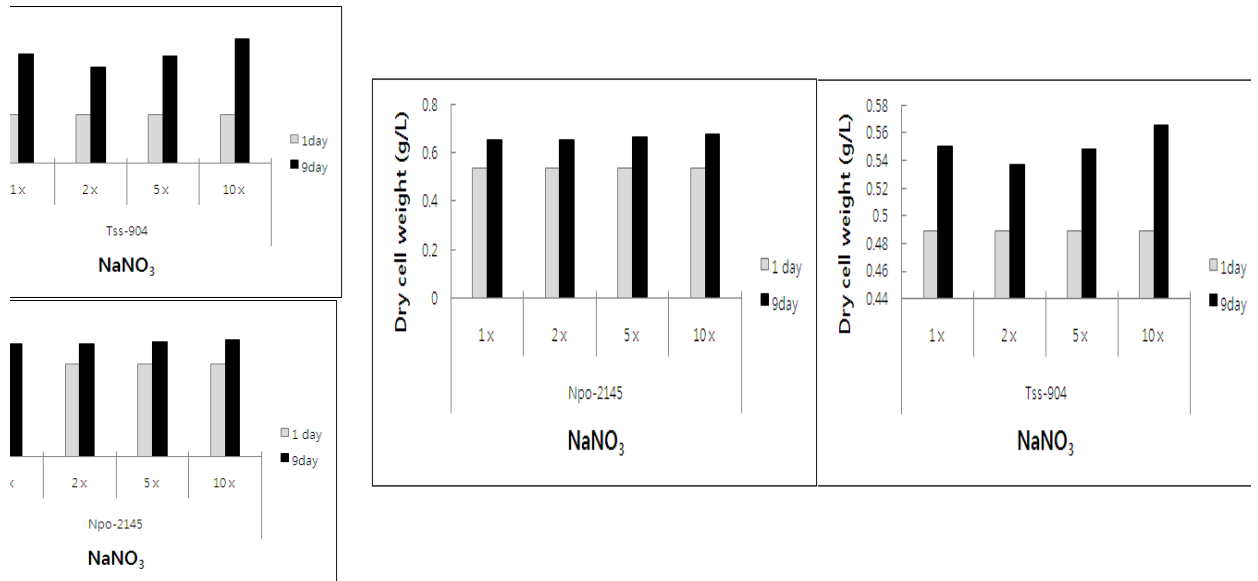


그림 3-34. 질소원의 증량이 *N. oculata* Npo-2145 및 *T. suecica* Tss-904의 생육에 미치는 영향
라. 광원 (빛 파장)에 따른 성장 양상 비교

배양기 내의 조명을 백색 LED, 일반형광등과 식물성장용 적색형광등을 설치하며 *Nannochloropsis sp.* Npq-531의 성장 효율을 비교해 보았다. 그 결과 일반적으로 LED에서 미세조류의 성장이 높아진다는 결과와는 달리 식물 성장용 형광등에서 더 높은 성장률을 보였다. 이는 식물성장용 형광등이 red 불빛을 띄어 미세조류의 빛 투과율이 높아 백색 LED보다 더 높은 성장률을 보인 것으로 보인다.

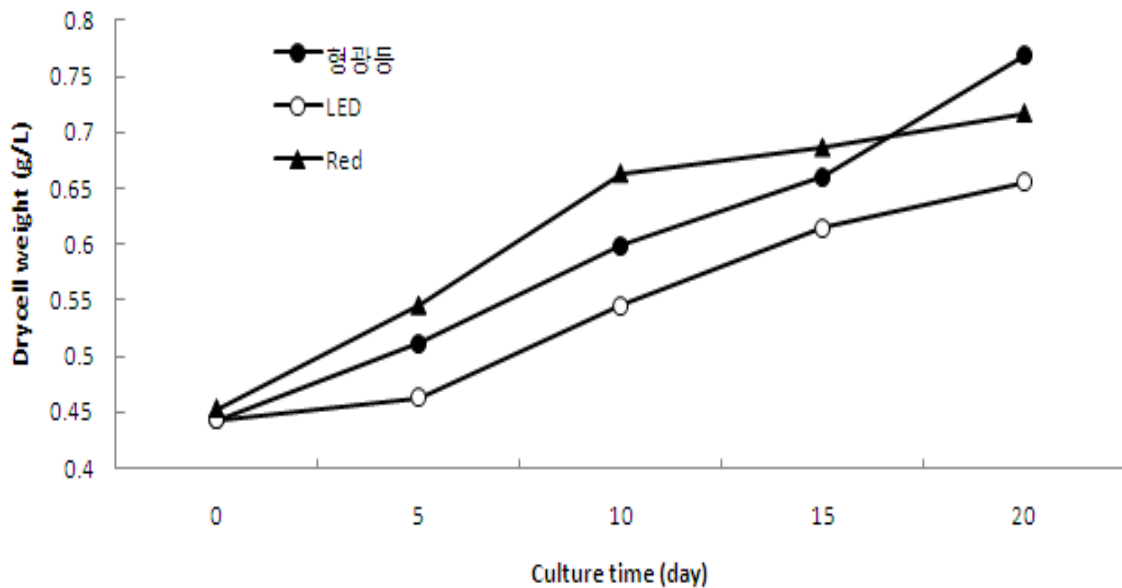


그림 3-35. 광원 종류에 따른 미세조류 성장효율

4. Jar fermenter culture

해수의 염도 때문에 일반적으로 jar fermenter에서는 배양하지 않는다. 그러나 jar fermenter에서는 배양이 안정적이기 때문에 둘레에 형광등을 설치하고 *T. suecica* Tss-904를 3F에 Yeast extract 0.4%, glucose 0.4%를 첨가하고 배양했다. 그리고 둘레에 형광등을 3구를 수직으로 설치하고 그 둘레에 알루미늄 포일로 차양을 쳐서 빛이 반사되도록 했다. Jar 표면에서 조도를 측정된 결과 38,000 lux가 되었다. Seed는 1% 접종했고 pH는 조절하지 않았으며 5일 후에 pH 7.5에서 암모니아수를 첨가하여 8.0으로 조절했으나 곧 떨어져 이후 조절 하지 않았다. 11일 후에 OD가 4.0로 측정되었으며 환산하면 DCW로는 약 2.5g/l가 된다.

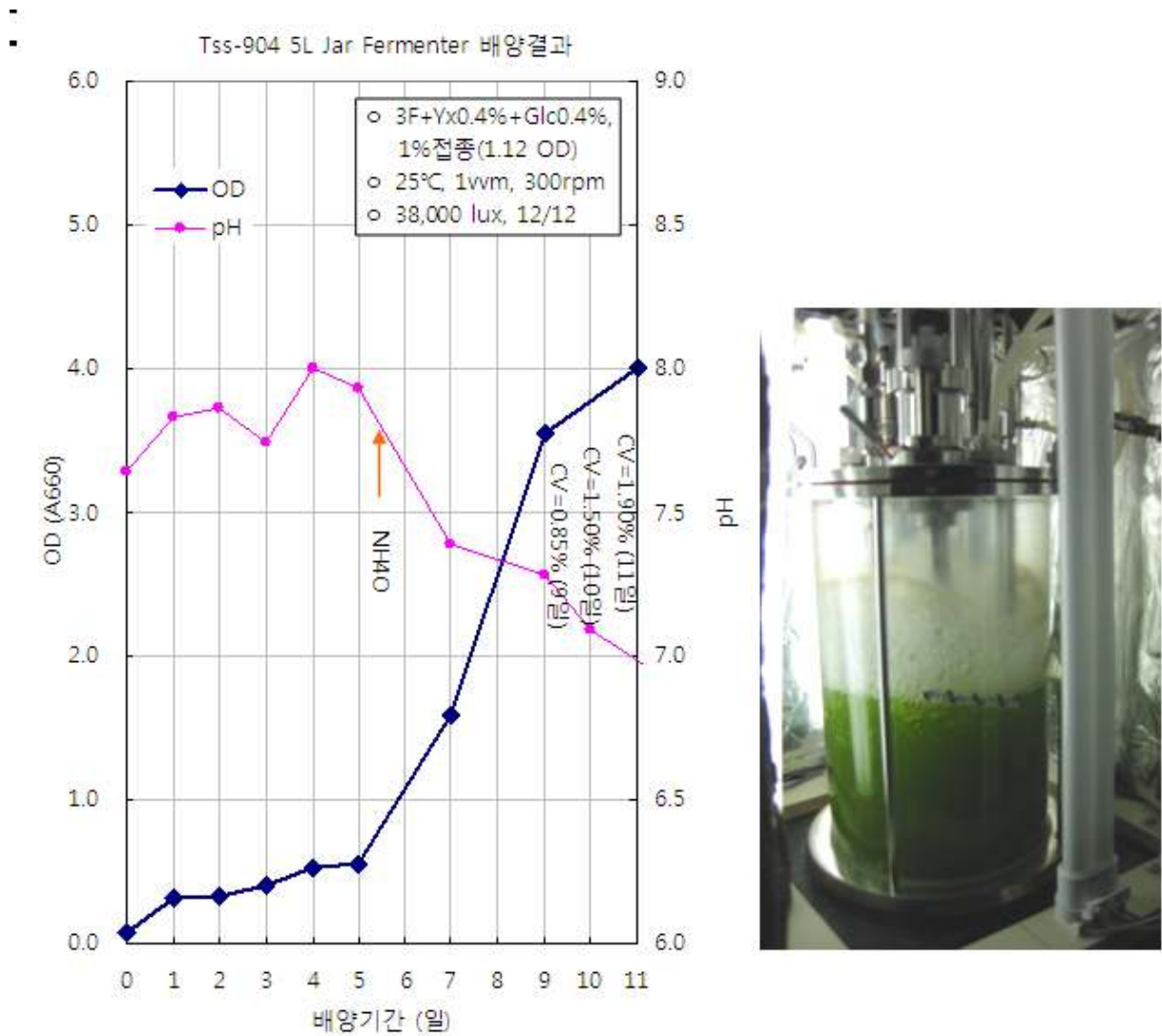


그림 3-36. 5L Jar fermenter에서의 배양

제3절 시작품 및 시제품의 제작

1. 실험 결과의 정리 및 시작품 제작에 반영

이제까지의 실험에서 교과서에 나와 있는 인자를 검토해 보았고 기본적인 data를 얻었다. 정리해 보면 다음과 같다.

(1) 종균은 무균상태의 순수한 axenic strain을 확보하고 유지하여야 한다.

종균이 오염이 되어 있으면 특히 바실러스 계통의 세균으로 오염되어 있으면 순수한 미세조류 strain을 유지하기가 어렵다는 것이 본 실험에서 느낀 점이다. 바실러스의 생육이 좋고 아직 미세조류를 잘 키울수 있는 고체배지가 없기 때문에 처음부터 무균의 strain을 확보하여 유지하는 것이 훨씬 비용이 싸다. 특히 *Nannochloropsis*속은 *Tetraselmis*속에 비하여 고체배양이 어렵다는 것을 느꼈다.

(2) 생육의 최적은 25℃부근으로 사료된다.

우리나라의 여름철 기온에 비하여 온도가 낮으므로 따라서 비용이 많이 드는 여름철의 냉방이 문제가 될 것이다. PBR 시설의 설계시에 고려해야 할 문제로 생각된다. 나아가 30℃부근에서 생육이 왕성한 균주를 확보한다면 더할 나위 없이 많은 경제적인 잇점을 줄 것이다. 불행하게도 당사가 확보하고 있는 균주는 모두 30℃ 부근에서 생육저해를 받음이 확인되었다.

(3) 최적의 pH는 7.5에서 8.5 정도 생각된다.

일단 미세조류의 배지는 첨가되는 영양성분이 적어서 완충력이 적기 때문에 pH의 변화가 심한 것 같다. 고밀도로 미세조류를 배양하기 위해서는 이산화탄소의 공급이 필수적이고 이산화탄소의 공급으로 pH를 낮추는 것이 현실로 CO₂를 정교하게 공급하여 pH의 하락을 맞는것도 하나의 방안이다. 이외에 산의 첨가, 대사 시 산성으로 변하게 하는 물질의 첨가 등을 생각해 볼 수 있으나 여의치 않다.

(4) 배지는 f/2 배지를 기본으로 하고 경우에 따라서는 yeast extract 등 생육촉진물질을 첨가한다.

f/2 배지는 거의 합성배지로서 비타민을 제외하면 무기물로 구성되어 있다. 또한 미세조류도 이러한 빈영양상태에 적응하도록 진화되어 왔기 때문에 생육이 느린 단점이 있다. 따라서 산업화하기 위해서는 생산성을 올리는 것이 관건이며 이는 무엇보다도 생육속도를 빠르게 해야 할 것이다. 최근 이에 주목한 연구가 많이 되고 있고, 미세조류가 변화무상한 자연에 적응하기 위하여 광합성에 의한 자가영양적 성장뿐만 아니라 경우에 따라서 타가영양성장도 병행하는 혼합영양 성장이 가능한 종이 대부분인 것으로 밝혀졌다. 이에 맞추어 본 연구에서도 검토해본 결과 *Tetraselmis*속은 타가영양적 성장을 병행할 수 있음이 밝혀졌으나 *Nannochloropsis*는 그렇지 않음이 확인되었다.

기본적으로 f/2배지만으로는 영양분이 적어서 고밀도 배양은 어려울 것 같다. 적어도

3f이상의 농축된 배지를 사입할 필요가 있다. 고농도의 배지를 사용할 경우에 초기 lag time이 길어지나 질 좋은 seed를 공급하고, 접종량을 늘린다면 가능할 것으로 본다.

(5) 고밀도 배양을 하기 위해서는 탄산가스의 공급이 필수적이다.

본 실험에서 탄산가스의 첨가가 미세조류의 생육을 많이 촉진시킴을 확인 하였다. 앞으로 산업화 시에 값싼 탄산가스의 확보도 중요한 포인트가 될 것이다. 아울러 효율적으로 탄산가스를 PBR에 공급할 수 있는 소프트웨어의 확보도 중요할 것이다.

(6) 효율 좋은 PBR 확보도 중요하다.

몇 가지 원시적인 PBR을 제작하여 운전해 보았지만 발효조 만큼 효율적이지는 않았다. 물론 광합성이라는 근본적인 대사적인 차이에 기인하지만, 무균적인 운전이 불가능하여 재현성이 떨어지는 단점이 있었다. 더구나 조류의 배양주기는 매우 길기 때문에 시간낭비가 심한 단점이 있었다. 따라서 시제품 제작시는 무균적 운전을 최우선으로 고려해 보고자 한다.

실험에서는 나온 결론은 아니지만 미세조류를 먹이생물로 공급하기 위해서는 다양한 미세조류를 확보하여 공급해야 하므로 PBR의 설계도 여기에 맞추어야 할 것으로 보인다. 유용물질을 생산하기 위해서는 한 가지 미세조류로 대량생산하여하는 것이 오히려 cost를 낮출 수 있어 바람직하나 먹이생물의 경우엔 보통 3가지 이상의 미세조류를 혼합하여 판매해야 하기 때문에 소량 다품종 생산방식에 맞는 시설 및 운전 노하우, 기술을 갖추어야 할 것으로 생각된다. 이것이 산업화를 더디게 하는 주요인이 아닌가 생각한다.

2. PBR 시작품의 제작 및 운전

가. 시작품 제작 배경

비닐백은 값이 싸서 일회용으로 사용할 수가 있고 투광도가 유리보다 좋다는 장점도 있으며, 또한 일회용으로 사용하기 때문에 사용 후 청소를 할 필요가 없다. 즉, 일회용으로 사용함에 따라 전회에 일어난 오염, 미세조류의 벽면 부착 등에 대하여 바른 대응이 가능하는 등 잇점이 많다. 반면에 배양액을 담을 경우 모양을 원하는 대로 유지하기 어려워, 따라서 혼합, 물질전달에 문제점이 있을 수도 있다 또한 샘플링 시나 장착시 air hose를 끼우기 위해 매번 비닐을 찢어야 하고 하는 등의 단점도 있다. .

그럼에도 불구하고 잇점이 많아서 디자인의 기본 컨셉은 이미 본 실험에서 사용하고 있었던 비닐백 (그림 3-37) 을 scale-up 하는데 두고, 오염방지를 강화하기 위하여 비닐백의 뚜껑 (lid)를 잘 제작하여 공기가 누설되지 않도록 하는데 있었다. 또한 비닐의 모양을 유지하기 위하여 LED 판넬이 비닐백의 모양을 유지하는데에 도움이 되도록 설계했다.



그림 3-37 기존 사용하고 있는 비닐백의 모습.

따라서 시작품의 컨셉은 기본적으로 장래의 에너지가격의 상승에 대비하고 향후 가격이 인하될 것으로 예상되는 LED 조명을 기본 장착하는 것이다. 또한 비닐백 안으로 광량 전달이 잘 되도록 하기 위해서는 비닐백 위아래의 lid를 어떻게 제작하느냐가 관건인 것 같았다. 바람직하게는 lid가 가름한 타원형이 가장 바람직한 것으로 생각되었다.

그리하여 국내에서 제작 가능한 업체와 비밀유지계약을 맺고 제작 미팅이 가진 결과 타원형의 lid는 기술상 만들기 어렵다고 하며, 굳이 만든다면 금형 등 여러 부품을 함께 디자인하여야 하기 때문에 비용이 많이 든다고 하여 원형의 lid로 바꾸기로 하였다. 그렇게 하여 설계된 안이 그림 3-37과 같다. 원래의 오리지날 안은 국내의 제작 여건상 제작할 수 없었고 modify하여 제작해야만 했었다.

그러는 도중에 협력 회사가 부도가 나면서 제3의 파트너를 찾아서 제작하게 된 PBR이 아래의 그림 3-39와 같다.

이 PBR은 pH 조절이 가능하고, 비닐백을 찢지 않고도 샘플링을 할 수 있으나 장착이 매우 불편하다는 단점이 있다. 즉 비닐백을 뚜껑에 장착 시 각종 센서선 때문에 장착이 매우 불편하다는 큰 단점이 돌출되었다. 온도 조절은 외부에 의존해야 하기 때문에 온도조절이 가

능한 room이나 인큐베이터 내에 PBR이 위치해야 한다.

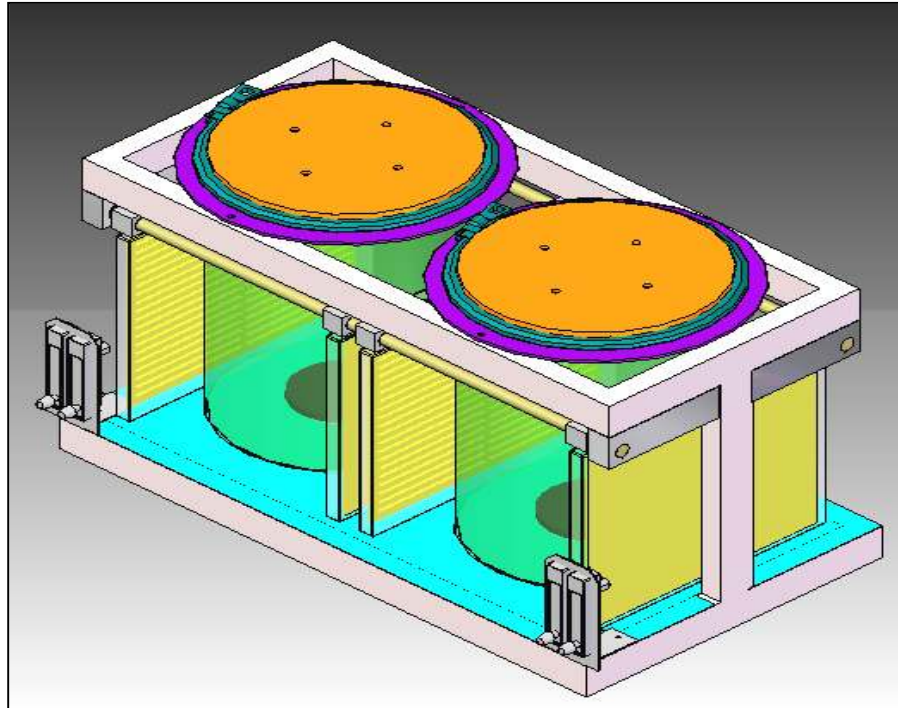


그림 3-38. B사가 디자인한 안

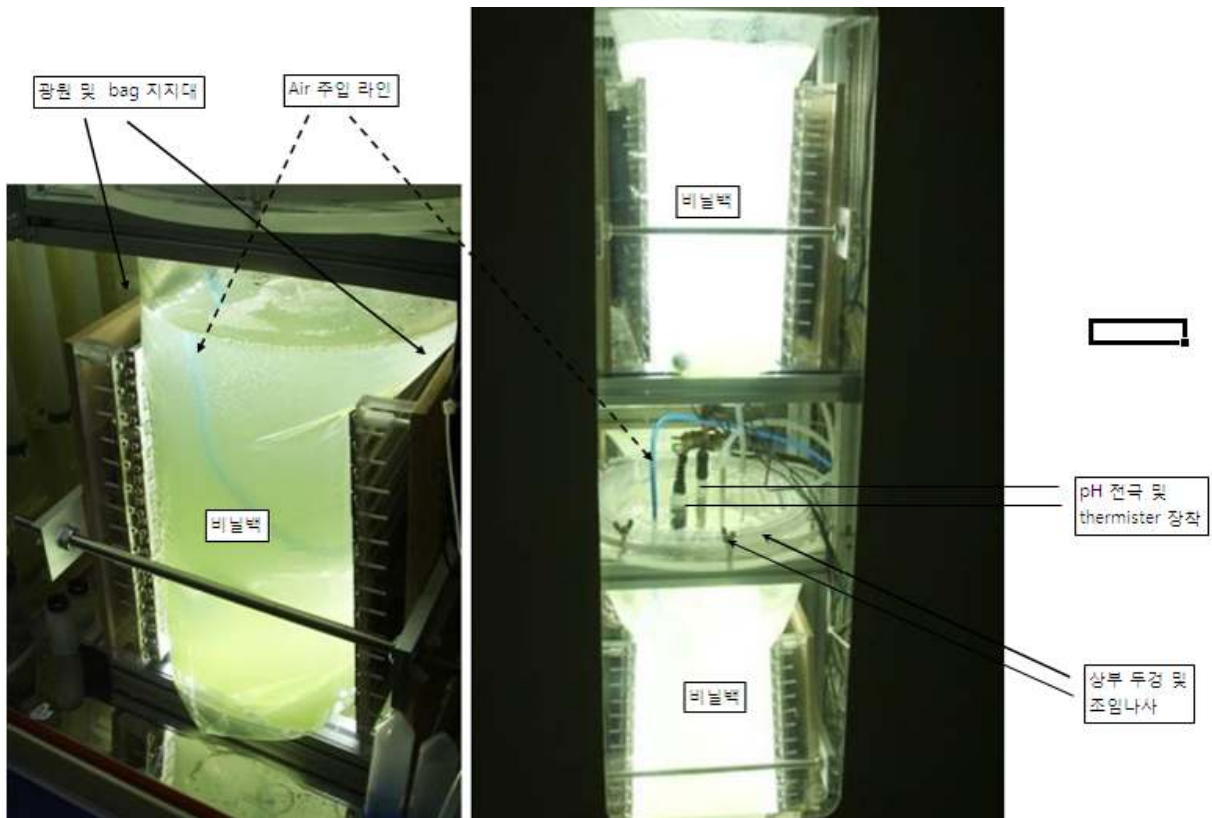


그림 3-39. 제작된 시제품 pBR

나. 시작품 운전 성적

시작품 PBR에서의 Npo-2145 및 Tss-904를 f/2 및 3F배지에서 배양한 성적을 그림 3-40에 나타내었다. Npo는 9.5시간에 1.25~1.3 g-DCW/L의 성적을 보였으며 Tss-904는 9.5시간에 0.8~0.9 g-DCW/L 성장했다. 배양조건은 25°C, 7,000 Lux, LD=16:8, 접종량은 10%, 운전량은 2.5L로 운전 했다. 1% CO₂농도의 공기를 0.1 vvm의 량으로 공급했다. 성적은 신라대의 성적과 비슷한 결과를 얻었다.

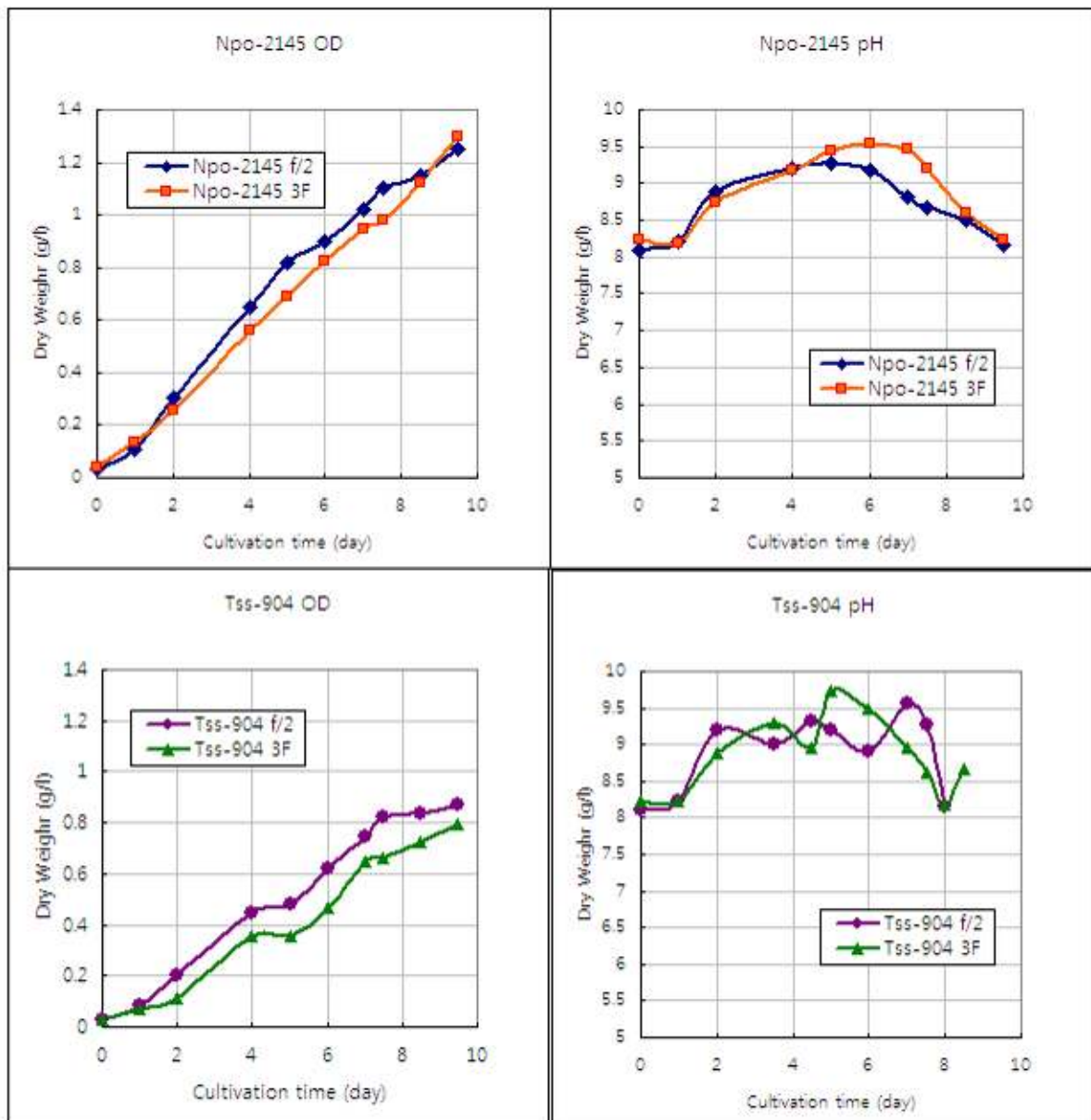


그림 3-40. *N. oculata* Npo-2145 및 *T. suecica* Tss-904의 시작품 PBR에서 성장 경시변화

3. PBR 시제품의 제작

PBR 시제품의 운저에서 가장 큰 애로 사항은 조립하기 무척 불편하다는 것이다. 한번 쓰고 나서 비닐백과 뚜껑 조립시 시행착오를 많이 겪는 문제점이 있었다.

따라서 이번에는 다소 오염의 위험을 증가시키더라도 운전하기 쉬운 원래의 비닐백 PBR로 디자인하기로 하였다.

앞에서도 논했지만, 아직 PBR이 open pond에 비해서 원가가 10배나 높다고 한다 (39). 따라서 경쟁력을 가지기 위하여 조류배양실에 자연 채광이 가능하도록 만들어 실험해 보기로 하였다.

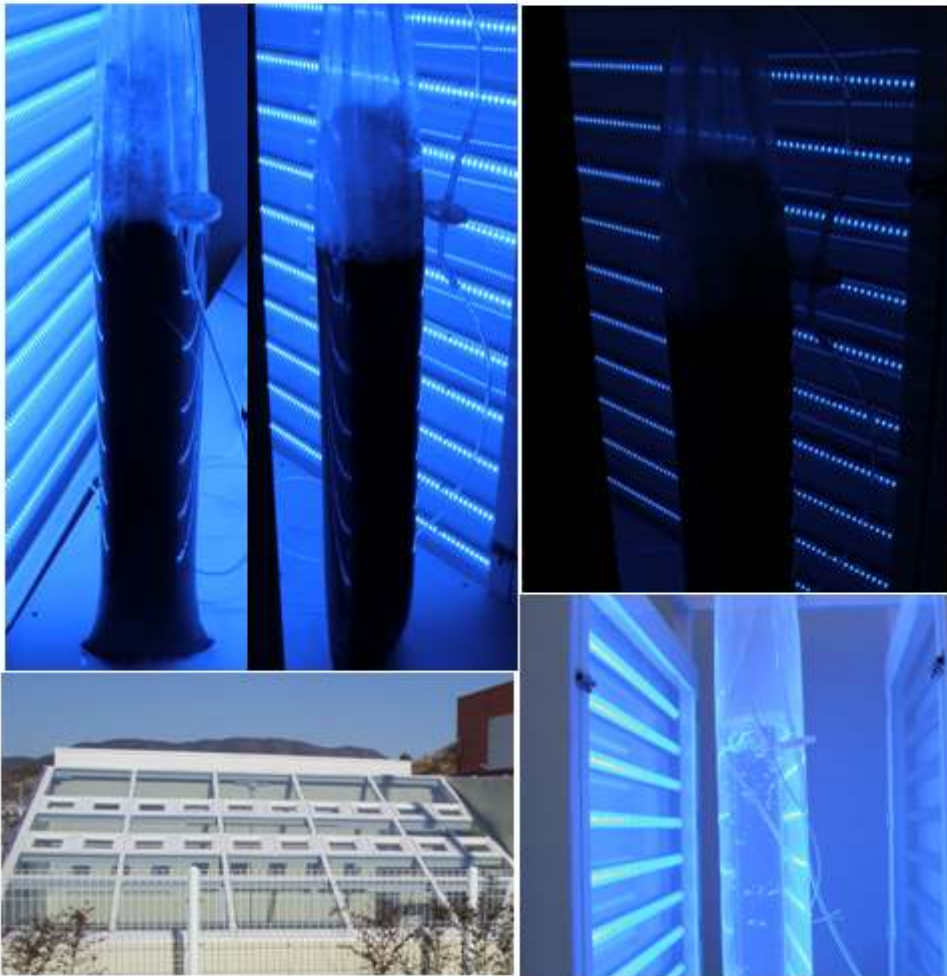


그림 3-41. 청색 LED 광선과 비닐백 및 조류배양 실험실 전경

시제품 PBR에서의 Npo-2145 및 Tss-904를 f/2 기본배지에서 배양해 보았다 (3-42). Npo는 10시간에 약 1.5 g-DCW/L의 성적을 보였으며 Tss-904는 10시간에 약 1.0 g-DCW/L으로 시제품보다 조금 좋은 수준이다. 배양조건은 23~25°C, 7,000 Lux, LD=16:8, 접종량은 10%, 운전량은 5 L로 운전 했다. 1% CO₂농도의 공기를 0.1 vvm의 량으로 공급했다.

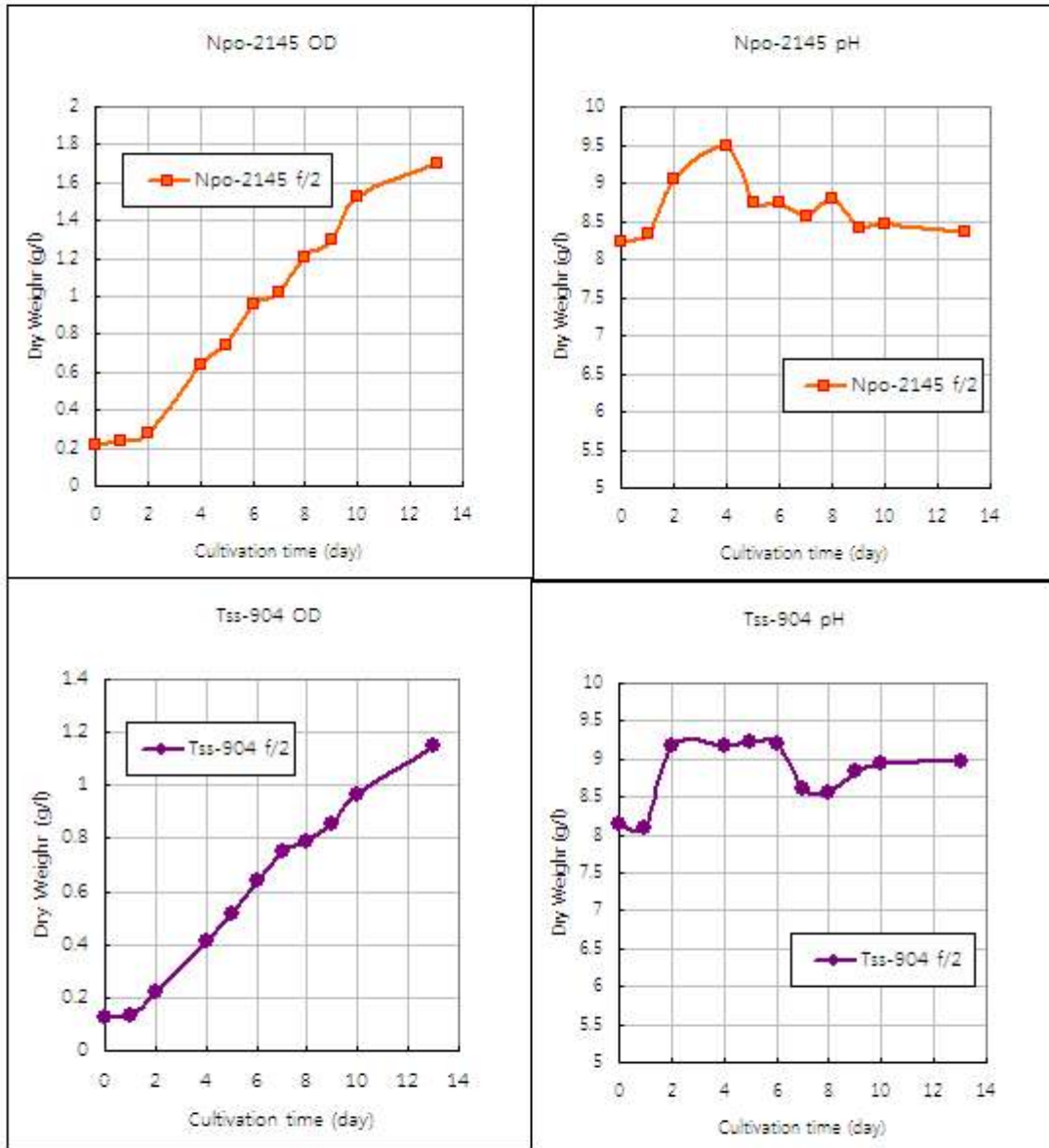


그림 3-42. *N. oculata* Npo-2145 및 *T. suecica* Tss-904의 시제품 PBR에서 생육 형태

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 목표 달성도

개발 목표		
<p>■최종목표 : 미세조류 선발 및 개량과 고효율 생물반응기개발</p>		
1차 년도	<p>1. 목표</p> <ul style="list-style-type: none"> - 양식용 먹이생물로 적합한 미세조류 선발 및 대량배양 공정 개발 대상종; <i>Nannochloropsis oculata</i>, <i>Tetraselmis</i> sp 	달성
	<p>2. 세부개발내용</p> <p>[미세조류 선정 및 개량]</p> <ul style="list-style-type: none"> - 성장률 및 영양적 가치(PUFA, 색소, 단백질, 탄수화물 등)가 우수한 미세조류 선발 - 양식 먹이생물로서 적합성 검토 : 크기, 형태, 영양성분, 소화성, 운동성, 대량배양 가능성에 대한 검토 <p>[대량광배양 공정개발]</p> <ul style="list-style-type: none"> - 대량 광배양을 위한 배지 및 배양조건 인자 조사 - Vinylpack culture의 시도로 PBR 제작 및 대량광배양 data 확보 - PBR 시제품 제작 - PBR에서 균체 생산성 증가 도모 	대부분 달성 일부 미흡
2차 년도	<p>1. 목표</p> <ul style="list-style-type: none"> - 고효율 대량 배양공정 개발 계속 및 실용성 검토 <p>2. 세부개발내용</p> <p>[대량 광배양 공정 개발]</p> <ul style="list-style-type: none"> - PBR에서 연속 배양을 통한 미세조류 생산의 극대화. - 배양된 미세조류의 회수를 위한 공정의 개발 - 미세조류의 품질 향상 (안정성, 응집성 등) 및 응용법 개발 - 생산된 미세조류의 고부가 상품화 모색 	대부분 달성 일부미흡

평가항목 (주요성능 Spec. 등)	단위	개발목표치		달성여부	수행기관 (주관/공동개발/위탁)
		1차	2차		
		가중치 (%)	가중치 (%)		
1. 미세조류 Biomass/PBR	g/L	2.5	5.0	70% 달성	주관/위탁
		40%	40%		
2. 미세조류 oil함량	% (DW)	N: 35 T: 15	N: 40 T: 20	달성	주관/위탁
		30%	30%		
3. PBR 개발 (1 ~ 3 tons), Vinyl pack culture에 대한 biomass 생산성 증가율	times	15	25	70% 달성	주관/위탁
		15%	15%		
6. 광 에너지 생체 전환율 (PBR)	%	9	12	달성	주관/위탁
		15%	15%		

제2절 관련 분야에의 기여도

미세조류는 해양생태계의 1차 생산자로서 해양생물은 물론이고 나아가 육상생물의 기초 영양원이 되는 귀중한 자원이다. 그 동안 미세조류의 진가가 일부 생태학자에게만 인식되었을 뿐 크게 주목을 받지 못했다. 그러나 지금은 상황이 바뀌어 이제는 대중에게조차도 낯설지 않은 이름이 되어 가고 있다. 이는 미세조류가 어느 듯 인류의 생활에 중요한 요소가 되어가고 있다는 뜻일 것이다. 요즘 한창 이슈가 되고 있는 지구온난화, 지속가능한 에너지 등 오늘날 인류가 안고 있는 문제를 명쾌하게 해결해줄 해결사로서 기대가 높아지고 있기 때문일 것이다.

1. 기술적 측면

최근 미세조류의 용도가 많이 늘어나고 있다. 미세조류가 응용되는 분야를 크게 나누어 보면,

- ① 양식업의 발달과 함께 전통적으로 응용되어 오고 있었던 먹이생물분야,
- ② 건강기능식품, 의약품, 화장품 등에 쓰이는 유용물질 분야
- ③ 장래의 지속가능한 (sustainable) 연료로서 각광을 받고 있는 biodiesel과 수소 와 관련 된 Biofuel 분야
- ④ 생태계에서의 미세조류의 역할을 응용하여 오수 처리 분야 등의 환경분야
- ⑤ 지구온난화 관련한 이산화탄소의 제거 혹은 저감 분야

로 대별할 수 있을 것이다.

이와 같이 다양한 분야로 그 유용성을 넓혀가고 있는 미세조류에 관한 연구는 한 10 년 전까지만 해도 연구하는 사람이 별로 많지 않았다. 따라서 미세조류에 관련된 지식은 널리 보급되지 않았고 지금까지도 제대로 알고 있는 사람이 드물다.

본 과제의 목적은 먹이생물의 배양을 위한 미세조류 개량과 생리 및 배양학적인 특성연구를 통하여 그 배양방법 및 배양장치를 개발하는 것이다. 따라서 미세조류에 관련된 기초적인 지식의 확보가 근간을 이루므로 미세조류의 타응용분야에도 쉽게 적용할 수 있는 파급력이 큰 기술이다.

이번 과제를 수행하면서 인터넷으로 문헌을 검색해 보면 미세조류의 연구가 어디에 집중되어 있는가를 알 수 있었다. Biofuel과 관련된 연구는 2008년 이후 폭발적으로 늘어나고 있음을 피부로 느낄 수 있었고 그 다음으로 이산화탄소 저감기술의 개발에 연구가 많음을 알 수 있었다. 두 기술 모두 앞으로 꼭 필요한 기술이 될지는 확신할 수는 없지만 현재 연구자가 많이 몰려 있다는 사실만으로 앞으로 근간의 기술이 될 가능성이 많다.

미세조류를 먹이생물로서 이용하는 분야는 여타 미세조류 응용분야보다 역사가 길다. 사실 현재도 미세조류 연구자는 수산과 관련을 맺고 있는 경우가 많으나 아직까지 미세조류 먹이생물 사업은 활성화되어야 할 분야로 남아 있다.

2. 경제 산업적 측면

서구에서는 광생물배양기(PBR)를 이용해 미세조류를 대량으로 생산하여 수산용 먹이생물로 공급하는 회사가 4~5개 정도 활동하고 있는 것으로 보이고 있으며, 우리나라에서 직접생산하여 실수요자에게 공급하고 있는 회사는 5개 정도가 있었으나 3개 정도의 회사가 클로렐라를 생산하고 있고 나머지는 몇 가지 미세조류를 생산하여 판매하고 있으나 그 판매액은 미미한 수준으로 보인다.

클로렐라를 제외한 수산용 미세조류의 사업은 평균 수요가 대부분이고, 상품을 구입하여 바로 해양생물의 실제 먹이생물로 사용하는 부분은 크지 않다고 들었다.

이번 과제를 기회로 수산용 먹이 생물의 수요는 패류를 포함한 해양무척추동물의 종묘산업이

가장 큰 것으로 생각된다. 아직도 미세조류 먹이생물의 산업화가 될 수 없는 부정적인 이유가 긍정적인 것보다 더 많은 것 같다. 수요는 있으나 시장은 형성되지 않는 그러한 시장인 것 같다. 즉, 구매자의 입장에서는 싸고 품질 좋은 미세조류를 적기에 공급해 주면 구매하고 가격이 비싸면 직접 배양하여 사용하겠다는 불안한 시장이다.

대부분의 종묘장, 혹은 양식장은 먹이생물로서 미세조류를 2~3종을 원하는 경우가 많고, 원하는 종도 각각 다른 경우가 많다. 공급자의 입장에서 보면, 그렇지 않아도 좁은 미세조류 시장을 여러 가지의 미세조류에 의해 나누어지므로 매력이 없는 시장이 된다. 이러한 이유로 먹이생물 시장에서 제2의 로티퍼, 클로렐라 같은 대형 상품이 등장하지 않고 있다.

종묘장이나 어민의 이러한 욕구를 충족하기 위해서는 여러 종류의 미세조류를 배양할 수 있는 기술을 갖추어야 하며, 다른 한편으로는 수산생물을 기르는 방법을 표준화하여, 그에 필요한 영양성분을 규정하고, 그에 맞는 먹이생물의 품질을 규정함으로써 먹이생물의 종류를 단순화한다면 채산성이 맞는 대형제품이 몇몇출현할 것으로 본다.

궁극적으로 언젠가는 모든 미세조류 먹이생물이 시장에서 수급되는 시대가 오겠지만, 지금 우리가 수행하고 있는 미세조류의 배양기술이 성공적으로 마무리된다면 당연히 그 시대가 앞당겨질 것임은 자명하다. 이렇게 되면 어민이나 수산업자는 미세조류의 안정적인 공급을 보장받을 수 있어서, 불안정한 자체생산으로부터 해방될 것이다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제1절 실용화-산업화 계획

1. 단기적 과제

광배양에 의해 생산되는 미세조류의 산업화의 1차적인 목표는 당연히 해양양식생물의 먹이 생물(live feed)로 산업화하는 것이다. 이는 당사의 해양바이오 산업의 전략과 부합하며 이미 기술을 확보해 놓고 있는 타가영양적 배양 (탱크배양, 암배양)에 의해 생산하는 미세조류 사업 과도 상호보완적이다.

광배양과 암배양은 발효배양시설은 서로 다르지만 그 이후의 공정은 동일한 설비를 사용할 수 있으며 더 매력적인 것은 탱크배양에 의한 미세조류도 수산용으로 많이 팔리고 있고, 당사에서도 우선 진출하고자 하는 시장이므로 판매루트가 같다는 점이다.

일 년 전, 미세조류 시험생산 판매에서 배운 것은 미세조류시장은 “신선함”이 생명이라는 점이다. 미세조류 먹이생물은 주로 유생상태의 해산생물에게 가장 많이 먹인다. 따라서 신선도를 유지하지 못하면 약한 유생이기 때문에 병들거나 죽을 확률이 높다. 따라서 냉장 시설은 균체 회수부터 소비자에게 전달될 때까지 신경써야 한다. 또한 신선도를 중요시하기 때문에 당연히 제품의 오염은 없어야 한다.

전술한 바와 같이 아직도 이 시장은 소품종 다량일 경우가 많다. 이 시장에서 강자가 될려면 이번 실험에서 생산기술을 확보한 *Nannochloropsis*, *Tetraselmis* 외에 *Chaetoceros*, *Isochrysis*, *Phaeodactylum*, *Nitzschia*, *Navicula*, *Paolova* 같은 속의 미세조류의 생산기술도 개발해야 할 것이다.

또 한 가지 이시장의 특징은 수요가 년 중 일어나는 것이 아니라 일 년 중의 4~6 개월에 한정되어 있어서 그 때에 년 판매량의 80% 이상을 판매한다고 한다. 따라서 성수기에는 어떻게 시설 및 , 노동력을 결집하여 수요에 대처하는가가 관건이 되고, 비성수기에는 남아도는 시설과 유희노동력으로서 무엇을 할 것인가가 고민이 되는 시장 특성을 가지고 있다.

2. 장기적 과제

이절의 서두에서 이야기 한 바와 같이 장기적으로는 이 기술을 심화시키면 할 일이 많다. 현재로서 가장 유망한 분야는 biofuel이 아닌가 생각한다. Biofuel 중에서도 biodiesel이 중기적으로 유망하고, 장기적으로는 수소화 산업시대에 대비한 미세조류를 이용한 수소생산일 것이다. 가능성이 큰 만큼 risk도 크므로 차분히 대응할 필요가 있다.

당사가 만약에 biofuel에 진입한다면 미세조류의 개량, 선별 및 배양이 주가 될 공산이 크다. 또한 biodiesel에서 생성되는 glycerin을 발효에 이용하는 방법 등 바이오관련 분야에 뛰어 들 것으로 보인다. 미세조류에 의한 수소생산은 아직 별다른 기술을 가지고 있지 않으나 지금부터 준비하여 진입시기 및 방법 등 전략을 먼저 짜는 것이 순서로 생각된다.

요즘 세계도처에서 biofuel에 관한 논문이 홍수를 이루고 있다고 해도 과언이 아니다. 주요 연구 분야는 균주의 개량 또는 선별하는 기술, 미세조류의 혼합영양적성장을 적극적으로 이용한 생산성 향상, 미세조류를 배양하는 시설의 디자인, location 및 운전 노하우, 그리고 생산된 지방산으로부터 biodiesel을 추출하고 그 부산물을 이용하는 방법에 관한 것까지 실로 다양한 분야에서 연구가 이루어지고 있다.

이외에도 미세조류를 이용한 건강기능식품용 소재 및 화장품, 의약품의 생산의 연구 및 사업 전개도 고려해 볼 만하다. 당사는 식품기업으로서 이 분야의 속성을 많이 알고 있으므로 상당히 유리한 고지에 있다.

지구온난화에 대비한 이산화 탄소 저감 등 환경관련 기술은 당사와 약간 거리를 두고 있는 것으로 보인다. 그러나 이분야는 현재에도 괜찮지만 앞으로도 유망분야임이 틀림없을 것 같으므로 관심을 가져볼 만하나 선부른 행동은 금물이라 생각한다.

제2절 기술확산 계획

미세조류 분야는 당사의 향후 사업방향의 한 축으로 삼고 있는 분야로서 먼저 사업성 있는 기술의 확보가 우선이다. 그리고 기술력을 앞세워 시장에서 우위를 점하고, 당사 보유 기술을 적극적으로 홍보하는 마케팅 전략을 적극적으로 펼칠 것이다.

따라서 당사 기술의 교육 및 지도, 홍보 등은 마케팅 전략 하에서 신중하게 펼칠 것이다.

제3절 특허, 논문 등 지식 재산권의 확보계획

1. 논문게재 성과

본 과제와 관련하여 1건은 발표가 되었고 1건은 제출 중에 있다.

계재 연도	논문명	저자			학술 지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신 저자	공동 저자				
2010	광합성 미세조류 <i>Nannochloropsis oculata</i> 의 최적배양 조건	박현진	이재화	진은정, 정태만, 주현	공업 화학회	21(6) 논문번호 :KH2010-095	국내	
2010	Optimum Conditions of <i>Nannochloropsis oculata</i> in Batch Culture	진은정	이재화	김지윤	한국생물 공학회		국내	

2. 특허 등 지식재산권 확보 계획

기술 마케팅에 하는데 있어서 지식재산권의 유용성은 말할 나위가 없다. 특히 배타적인 소유권이 인정되는 특허권은 판매에 있어서 상당한 위력을 발휘한다. 따라서 당사는 미세조류의 사업에 있어서 적극적으로 특허등록을 할 예정이다. 우선은 PBR 관련하여 1건의 특허를 출원하는 것이 목표이다. 나아가 균주 관련한 특허를 확보하는데 힘쓸 것이다.

3. 추가연구, 타연구에 대한 활용계획

미세조류의 판매에 있어서 어려웠던 점은 출시한 제품이 반품되어 돌아 왔을 때이다. 본과 제로 만들어진 미세조류도 생산하여 배송의 편리함과 원가 절감을 위하여 배양액을 농축할 것으로 사료된다. 농축을 시켜놓을 때의 균체의 변질은 배양 종료액보다 훨씬 심한 것 같다. 따라서 부패의 속도를 늦출 수 방안에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

또 한 가지는 미세조류 종균의 보존 문제에 관한 것으로서, 이번 과제의 미세조류뿐만 아니라 다른 미세조류의 연구에서도 느낀 점으로 미세조류는 보관 및 보존이 어려워 자칫하다가 균주를 죽여 버리든가, 분리 복원하는데 한달씩 걸린 적이 있었다. 따라서 미세조류주의 효율적인 보관방법 및 단기적으로 활성 좋게 보관하여 고객 주문 도착시 인도기간을 하루라도 줄일 수 있는 기술을 개발하고 싶다. 미세조류 실험의 재현성이 떨어지는 경우는 미세조류의 seed 관리가 어려워 활성 좋은 seed를 매번 확보하지 못하기 때문인 경우가 많다.

타연구에의 응용은 이미 많이 전달했다. 이장의 서두에서 미세조류의 응용분야에 대해서 말한 바와 같이 많은 방면의 다양한 연구에 활용할 수 있을 것으로 판단된다. 당상의 여건상 biofuel 및 유용물질의 연구가 먹이생물의 가장 가까이 와 있는 연구가 아닌가 한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

특별히 개인적으로 친분이 있어서 수집된 정보는 없다. 단지 미세조류와 관련하여 정보를 찾다 보니 유독 눈에 많이 띄는 정보가 biofuel에 관한 정보다. 인터넷에서 key word를 'photobioreactor' 혹은 'mixotroph'라고 쳐도 뜨는 정보의 반 이상이 biofuel인 것 같다.

이렇게 하여 biofuel 관련 정보를 따로 지정된 folder에 저장해 놓고 정보검색이 끝난 후에 그 안의 file들을 보면 70~80%가 2008~2010년 사이에 발간된 정보임을 알 수 있다.

최근 3년간에 출간된 정보가 대부분을 점유하고 있어서 biofuel에 관한 연구가 근년에 들어와 많은 연구가 이루어지고 있음을 느낄 수 있다.

제 7 장 참고문헌

- 1 Carlsson, A., van Bien, J., Moeller, V. and Clayton, D. (2007): Micro- and macro-algae, Utility for industrial applications, Dianna Bowel (ed.), CPL Press, p3~11
- 2 허성범 (2002): 먹이생물 미세조류, *한국양식*, 제14권, 제2호, 4~20쪽
- 3 Brown, M. R., Jeffrey, S. W., Volkman, J. K., and Dunstan, G. A., (1997): Nutritional properties of microalgae for mariculture, *Aquaculture* Volume 151, p315-331
- 4 해양수산부 (2002): 수산자원조성사업 발전방안
- 5 박인석 (2002): 한국 수산업의 현황과 과제, *한국양식*, 제14권, 제1호, 5~9쪽
- 6 http://www.kordi.re.kr/chongseo/vol9/vol9_03.asp
박홍식 (2005): 해양생물의 현지내·외 양식, *해양과학 총서 9 해양바이오* (이홍금, 이유경역음), 한국해양연구원, 38~48쪽
- 7 강형덕 (2007): 지구촌 이슈, 세계 양식현황과 양식업이 나아갈 방향, *지구촌 해양·수산* (자료 FAO 보고서), 한국해양수산개발원, 제 400호 (2007.12.25), 1~5쪽
- 8 2006년 세계 양식업 생산 동향 (자료 FAO, State of World Aquaculture 2006) (2007), *한국양식*, 제19권, 24~27쪽
- 9 Aquaculture (2006): Changing the face of the waters meeting the promise and challenge of sustainable aquaculture, The World Bank Report No. 36622 - GLB
- 10 해양수산부 (각연도): 수산업동향에 관한 연차보고서
- 11 허성범 (2006): 먹이생물미세조류, 한국의 조류 생태와 응용 (이인규편저), *아카데미서적* 269~270쪽
- 12 편집자 (2010): 한국해양 패류 인공종묘생산 산업화 선도, *Aquainfo*, 2010 February, 26~37쪽
- 13 Barsnati, L. and Gualtieri, P. (2006): Algae, CRC Press, p229~234

- 14 Nichols, H. W. (1973): Growth media-freshwater, Handbook of Phycological Methods, J. R. Stein (ed.), p12
- 15 McLachlan, J. (1973): Growth media-marine, Handbook of Phycological Methods, J. R. Stein (ed.), p42-47
- 16 Tsavalos, A. J. and Day, J. G. (1994): Development of media for the mixotrophic/heterotrophic culture of *Brachiomonas submarina*, *Journal of Applied Phycology*, **Volume 6**, Number 4, p431-433
- 17 Dvořáková-Hladká, J. (1966): Utilization of organic substrates during mixotrophic and heterotrophic cultivation of algae , *Biologia Plantarum* **Volume 8**, Number5, p354-361
- 18 Yang C., Hua Q. and Shimizu K. (2000): Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. , *Biochemical Engineering Journal*, **Volume 6** Number 2, p87-102
- 19 Lee, Y.-K., Ding, S.-Y. , Hoe C.-H. and Low, C.-S. (1996): Mixotrophic growth of *Chlorella sorokiniana* in outdoor enclosed photobioreactor, *Journal of Applied Phycology*, **Volume 8**, Number 2, p163-169
- 20 오성호, 한재건, 김나영, 조정섭, 임태빈, 이신영, 이현용 (2009): 유가식 배양에서 배양조건에 따른 *Chlorella minutissima*의 생육 및 지질생산 , *KSBB Journal*, **24권**, 377-382쪽
- 21 Jeon, Y.-C., Cho, C.-W. and Yun, Y.-S. (2006): Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*., *Enzyme and Microbial Technology*, **Volume 39**, p490-495
- 22 Goksan, T., Ak, I. and Gokpinar, S. (2009): An alternative approach to the traditional mixotrophic cultures of *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae), *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **Volume 20**, Number 9, p1276-1282
- 23 Bouaraba, L., Dautab, A. and Loudikia M. (2004): Heterotrophic and mixotrophic growth of *Micractinium pusillum* Fresenius in the presence of acetate and glucose: effect of light and acetate gradient concentration., *Water Research*, **Volume 38**, p2706-2712
- 24 Cid, A., Abalde J., & Herrero C. (1992): High yield mixotrophic cultures of the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher (Prasinophyceae) , *Journal of Applied*

- 25 Zhang, X.-W., Zhang Y.-M. and Chen, F. (1998): Kinetic models for phycocyanin production by high cell density mixotrophic culture of the microalga *Spirulina platensis*., *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **Volume 21**, Number 6, p283-288
- 26 Garcia, M.C. C., Sevilla, J.M. F., Fernandez, F.G. A., Grima, E. M. and Camacho, F. G. (2000): Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile., *Journal of Applied Phycology*, **Volume 12**, p239–248
- 27 Sevilla, J. M. F., García, M. C. C., Mirón, A. S., Belarbi, EH., Camacho, F. G. and Grima, E. M. (2004): Pilot-plant-scale outdoor mixotrophic cultures of *Phaeodactylum tricornutum* using glycerol in vertical bubble column and air lift photobioreactors: Studies in Fed-Batch Mode, *Biotechnology Progress*, **Volume 20**, Issue 3, p728–736
- 28 García, M. C. C., Camacho, F. G., Mirón, A. S., Sevilla, J. M. F., Chisti, Y. and Grima, E. M. (2006): Mixotrophic production of marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum* on various carbon sources, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **Volume 16**, Number 5, p689–694
- 29 Morais, K. C. C., Ribeiro R. L. L., Santos K. R., Taher D. M., Mariano, A. B. and Vargas, J. V. C. (2009): *Phaeodactylum tricornutum* microalgae growth rate in heterotrophic and mixotrophic conditions., *Engenharia Térmica (Thermal Engineering)*, **Volume 8**, Number 1, p84-89
- 30 Dasa, P., Leia, W., Azizb, S. S. and Obbarda, J. P. : Enhanced algae growth in both phototrophic and mixotrophic culture under blue light , *Bioresource Technology*, Article in Press,
- 31 Xu, F, Cong, W., Cai, Z.-L. and Ouyang, F. (2004): Effects of organic carbon sources on cell growth and eicosapentaenoic acid content of *Nannochloropsis* sp., *Journal of Applied Phycology*, **Volume 16**, p499–503
- 32 Yamane, Y., Utsunomiya, T., Watanabe, M. and Sasaki, K. (2001): Biomass production in mixotrophic culture of *Euglena gracilis* under acidic condition and its growth energetics., *Biotechnology Letters*, **Volume 23**, Number 15, p1223-1228
- 33 Adolf, J. E., Stoecker, D. K. and Harding Jr, L. W. (2006): The balance of autotrophy and heterotrophy during mixotrophic growth of *Karlodinium micrum* (Dinophyceae),

- 34 Hansen, P. J., Skovgaard, A., Glud, R. N. and Stoecker, D. K. (2000): Physiology of the mixotrophic dinoflagellate *Fragilidium subglobosum*. II. Effects of time scale and prey concentration on photosynthetic performance., *Marine Ecology Progress Series*, **Volume 201**, p137–146
- 35 Schoonhoven, E. : Ecophysiology of mixotrophs,
<http://www.bio.vu.nl/thb/education/Scho2000.pdf>
- 36 Barsnati, L. and Gualtieri, P. (2006): *Algae*, CRC Press, p213-214
- 37 Barbosa, M. J. G. V. : *Microalgal photobioreactors: Scale-up and optimisation* (2003), Ph.D. Thesis (Wageningen University, The Netherlands), p10-11
- 38 Richmond, A. (2000): Microalgal biotechnology at the millennium: A personal view, *Journal of Applied Phycology*, **Volume 12** ,p441-451
- 39 Mata, T. M., Martins, A. A. and Caetano, N. S. : Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. (2010), *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **Volume 14** p217–232
- 40 Richmond, A. (2004): *Handbook of microalgal culture, biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science Ltd.
- 41 Ugwu, C. U., Aoyagi, H. and Uchiyama, H. (2008): Photobioreactors for mass cultivation of algae., *Bioresource Technolog*, **Volume 99**, Number 10, p4021–4028.
- 42 Guillard, R.R.L. and J.H. Ryther (1962): Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Canadian Journal of Microbiology*, **Volume 8**, 229-239.
- 43 Guillard, R.R.L. (1975): Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates in “Culture of Marine Invertebrate Animals.” (eds: Smith W.L. and Chanley M.H.) Plenum Press, New York, USA.pp26-60.
- 44 오희목, 심상준, 강창덕, 김준표, 한민호, 김윤화, 신대회, 한창민 (2008): 이산화탄소 저감 및 처리기술개발사업: 이산화탄소를 이용한 고부가 유용물질 생산을 위한 고효율 광합성 미세조류의 개발, 성균관대학교 산학협력단, 교육과학기술부, 과제관리번호 M102KP010019-07K1601-01920

- 45 Bligh, E.G. and Dyer, W.J. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemical Physiology*. **Volume 37**, p911-917
- 46 Y. M. Kim, J. Y. Kim, S. M. Lee, J. M. Ha, T. H. Kwon, and J. H. Lee, (2010): *Spirulina platensis* NIES 39를 이용한 polyethylene bag 반응기 에서의 이산화탄소 고정화, *Applied Chemical Engineering.*, **Volume 21**, p272-277
- 47 박현진, 진은정, 정태만, 주현, 이재화 (2010): 광합성 미세조류 *Nannochloropsis oculata*의 최적배양조건, *공업화학*, **제21권**, 제6호, 659-663쪽

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림수산식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림수산식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.