

발간등록번호

11-1541000-001490-01

**녹색 광생물 기술을 기반으로 한
다기능성 먹이생물의 대량생산 기술개발**

(Mass-production of multifunctional aquaculture live-feeds
in renovative photo-bioreactors)

국립군산대학교
전라북도 수산기술연구소

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “녹색 광생물 기술을 기반으로 한 다기능성 먹이생물의 대량생산 기술개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012 년 6 월 일

주관연구기관명 : 군산대학교 · 전북 수산기술연구소

주관연구책임자 : 김 형 섭

세부연구책임자 : 조 수 근

세부연구책임자 : 노 정 래

연 구 원 : 양지혜, 정규민, 유철영, 최경신
김호연, 박희원, 안예지, 최대엽
이 경, 이아람, 라혜강, 강이구
정효진, 김주희

협동연구기관명 : 동림피엔디(부설)자연환경연구센터

협동연구책임자 : 임 환 철

요 약 문

I. 제 목

녹색 광생물 기술을 기반으로 한 다기능성 먹이생물의 대량생산 기술개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 어패류 종묘생산시 생산성 향상을 위한 다기능성 먹이생물로서 은편모류 광생물 먹이 종주 개발
- 광생물 먹이의 대량배양 및 생산체계 확립으로 새로운 농축 먹이생물 시제품, 표준색소 화합물의 추출·생산 및 기능성 물질 탐색 기술개발

III. 연구개발 내용 및 범위

- 국내 연안에서 새로운 다기능성 광생물 먹이종주를 확보하고, 우수 종주에 대한 최적 성장조건을 규명하며, 제조된 순환형 배양액을 적용하여 친환경적 광생물 대량배양 기반기술의 개발
- 확보된 광생물 먹이종주에 대한 동물 먹이생물(rotifer)과 이매패류 유생의 성장효과를 검증하여 우수 종주로 선발하고, 우수 종주를 대량배양한 후 동물 먹이생물 영양강화 효과 및 이매패류 성장효과 입증
- 확보된 광생물 먹이종주의 대량배양 후 영양성분을 분석하여 우수 종주로 선발하기 위한 기초 자료를 제공하고, 우수 종주로 선발된 광생물 먹이종주의 높은 영양성분이 함유된 조건을 규명하며, 고밀도 대량배양을 위한 신기능 광생물반응기(photo-bioreactor)를 개량하여 대량배양 공정을 확립하고, 농축기술을 도입하여 농축 광생물 먹이 시제품 생산
- 우수성이 입증된 광생물 먹이종주로부터 비엽록소 계열 색소화합물을 추출하는 기술을 확립하여 chlorophyll 및 carotinoid 계열 표준색소 시제품을 제작하고, 기능성 물질을 탐색하여 새로운 생리활성물질 탐색기술의 확립

IV. 연구개발 결과

- 국내 연안에서 12종류의 광생물 먹이종주를 순수분리하여 확보함과 동시에 계대배양하고 있으며, 이들 먹이종주를 대상으로 수온, 염분, 광도, 영양염(질산염, 인산염)에 대한 환경적응 및 성장특성을 분석하여 최적 배양조건을 확인하였고, 동일 종내에서 성장반응에 대한 종내 특이성을 발견하였음.
- 소규모 배양에서 대량 배양까지 일련의 배양기술을 확립하였고, 일반 영양성분, 아미노산 및 지방산 분석으로 해산 어패류에 적합한 광생물 먹이종주를 확보하였으며, 기존의 먹이생물과 비교분석을 통해 영양가가 우수함을 입증하였음.
- 신규 광생물 먹이는 기존 먹이생물에 비해 윤충류의 성장 및 포란율을 향상시켰고, 윤충류의 영양강화제로 활용 가치가 높으며, 이때패류 유생에 혼합 공급하였을 때 유생의 성장 및 생존율을 향상시켰음.
- 국내 연안에서 분리한 광생물로부터 은편모류의 특징적인 색소체 7종류를 분리 정제하여 시제품으로 개발하였고, 일부 색소체는 은편모류에서만 나타나는 색소체로 이생물의 동정 및 표준 색소체로 활용 가능함.
- 광생물 먹이는 항산화 효과가 약하게 나타나 기능성물질 탐색을 시도하였지만 활성성분의 양이 매우 소량이라 화합물을 분리하지 못하였으나, 대신 은편모류에서 나타나는 특이한 지방산 부류로 보고된 바 있는 betain 계열 지방산 1종을 재확인 할 수 있었음.
- 우수종주를 대상으로 대량배양을 통한 농축기술을 적용해 양식현장에서 사용하기 편리하도록 시제품을 생산하였으며, 이들 시제품의 보관방법에 대한 검토를 완료하였음.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 본 연구를 통해 개발된 다기능성 광생물 먹이는 수산양식용 먹이생물 및 영양강화제로 개발하고, 표준색소 화합물을 추출하여 상품화함으로써 수산양식산업, 특히 패류 인공종묘생산을 활성화시키고, 고부가가치의 생물추출 화합물 및 건강보조식품으로 확대하여 국내 생물산업의 경쟁력을 높일 수 있음.
- 신기능을 가진 고밀도 대량배양용 광생물반응기를 고안하고 실용화함으로써 청정개발체제(CDM)사업과 연계된 광생물반응기 조형물로 응용하여 엑스포 등에 전시하거나 도시녹색사업과 연계시킴으로써 이산화탄소를 저감시키는 친환경적인 사업으로 확장시킬 수 있음.

SUMMARY

I . Title

Mass-production of multifunctional aquaculture live-feeds in renovative photo-bioreactors

II. Purpose and Necessity of Research and Development

- Development of cryptomonads and other unutilized organisms as multifunctional live feeds which can improve the productivity in the seed production of marine aquaculture
- Development of the mass culture of phototrophic live feeds and production of a new concentrated live feeds on this established method. Furthermore, exploration of new functional compounds, along with analysis and isolation of pigments from feed organisms.

III. Contents and Ranges of Research and Development

- Screening of available strains for the new multifunctional live feeds and establishment of the optimum growth condition for the best selected strain. Development of mass culture in an environment-friendly way like a circularly culture media system.
- Selection of an excellent strain after investigating the growth efficiency of rotifer and bivalve larvae on the screened live feeds. And check of the effect of bivalve larval growth and survival rate, and the nutrition enrichments of the live feeds from the mass culture of the selected strain.
- On the basis of the nutritional analysis for the mass culture of the selected live feeds, finding the conditions for high nutrient components and improvement of the photo-bioreactor for high-density massive cultivation to setup the mass cultural process. Moreover, on the application of the concentration technique, production of the condensed live feeds as a test products.
- Isolation of pigments like chlorophylls and carotenoids from the qualified live feeds and listing them as the test products. Furthermore, setup of the exploratory technique for finding functional compounds.

IV. Result of Research and Development

- Establishment of 12 strains of phototrophic live feed with a single cell isolation method in Korean coastal waters, and detection of the optimal culture conditions (temperature, salinity, light intensity, nitrate and phosphate) for mass culture and intraspecific variability in their growth.
- Confirmation of a series of culture processes for mass culture of phototrophic live feeds using the upgraded photo-bioreactor, and discovery of optimal live feeds with a high nutritional value for marine aquaculture.
- Confirming that the selected phototrophic live feeds can improve the growth rate and egg production of rotifer, and they can be used for enriching the rotifer. Growth and survival rates of bivalve larvae also were enhanced under mixing with the existing microalgae.
- Isolation and purification of the seven pigments characteristic of cryptophyte. These can be used as standard pigments. Unfortunately, despite the live feeds showed a moderate antioxidant activity on the extract of the organisms, the active compounds could not be isolated owing to a tiny amount. Instead, a betain lipid compound, DGTA class was successfully purified which may be used as an indicator of cryptophyte species.
- Completion of a new condensed-cryptophycean live feeds as a test products using application of the concentration technique of microalgae and suggestion of its storage conditions.

V. Achievement of Research and Development and Design of Achievement Application

- The multifunctional phototrophic organisms selected in this study will be developed as a new live feeds or nutritional enrichments for marine aquaculture. Besides, the extraction of standard pigments can escalate the value of the live feeds, together with the production of high value-added compounds and supplementary health food in the marine bio-technical industry.
- Design and substantiation of a high-density mass cultivating photobioreactor can be used as a bioreactor sculpture related to the clean development mechanism (CDM), e.g the exhibition in diverse exposition, and also extend to environment-friendly businesses, like CO₂ reduction, in association with the City Green Project.

CONTENTS

Chapter 1. Outline of the research & development project

Section 1. Necessity and purpose of the project

1. Purpose of the project
2. Necessity of the project

Section 2. Contents and scope of the project

1. Development of new multi-functional live feeds
2. Setup of a high-density massive cultivation system
3. Function test of the targeted live feeds
4. Application of the concentration technology and production of the test products

Chapter 2. Status of domestic and foreign technology

Section 1. Status of foreign technology

Section 2. Status of domestic technology

Chapter 3. Contents and results of the research

Section 1. Development of new multifunctional phototrophic live feeds

1. Isolation of pure strains corresponding to multifunctional live feeds
2. Studies on the environmental adaptability of the live feeds
3. Studies on the growth response of the live feeds

Section 2. Setup of massive cultivation system for phototrophic live feeds

1. Setup of the medium-sized cultural system
2. Analysis of general nutritional value
3. Application of high-density mass culture technology
4. Analysis of amino acids and fatty acids

Section 3. Function test of the targeted live feeds

1. Function test on the marine aquaculture
 - A. Function test of the live feeds on rotifers

- B. Function test of the live feeds on bivalve larvae
- 2. Exploration of functional materials and pigment extractions
 - A. Exploration of bioactive compounds
 - B. Analysis and isolation of pigments

Section 4. Application of the concentration technology and production of the test products

- 1. Comparison of the concentration efficiency in harvesting the culture materials
- 2. Storage method for the concentrated biomass
- 3. Production of the test products

Chapter 4 Achievement of the research and contribution of the related fields

Section 1. Achievement of the research

Section 2. Contribution to the development of the related fields

Chapter 5. Products of the research and plans to utilize them

Section 1. Products of the research

Section 2. Plans to utilize the products

Chapter 6. Foreign scientific technique information collected during the research periods

Chapter 7. References

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	1
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성	1
1. 연구개발의 목적	1
2. 연구개발의 필요성	1
제 2 절 연구개발 내용 및 범위	3
1. 신규 다기능성 광생물 먹이 개발	3
2. 고밀도 대량배양 기술 확립	3
3. 광생물 먹이의 기능성 검증	3
4. 농축기술 적용 및 시제품 생산	4
제 2 장 국내·외 기술개발 현황	5
제 1 절 국외 기술개발 현황	5
제 2 절 국내 기술개발 현황	7
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	8
제 1 절 신규 다기능성 광생물 먹이 개발	8
1. 신규 광생물먹이 종주 순수분리	8
2. 환경적응 특성	9
3. 성장반응 특성	16
제 2 절 광생물 먹이의 대량배양기술 확립	27
1. 대량 배양체계 확립	27
2. 일반 영양성분 분석	33
3. 고밀도 대량배양기술 적용	35
4. 우수종주의 일반 영양성분, 아미노산 및 지방산 분석	42
제 3 절 광생물 먹이의 기능성 검증	51
1. 수산양식 기능성 검증	51
가. 윤충류에 대한 먹이생물 기능성 검증	51
나. 이매패류 유생에 대한 먹이생물 기능성 검증	62

2. 기능성 물질 및 색소 추출	69
가. 활성물질 탐색	69
나. 색소체 분석 및 분리	72
제 4 절 농축기술 적용 및 시제품 생산	83
1. 배양체 수확시 농축효율 비교	83
2. 농축배양체의 보관법	84
3. 시제품의 제작	87
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	89
제 1 절 연구개발 목표의 달성도	89
제 2 절 관련분야의 기술발전에 대한 기여도	91
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	92
제 1 절 연구개발 성과	92
제 2 절 성과활용 계획	92
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	94
참고문헌	95

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

어패류 종묘생산시 생산성 향상을 위한 다기능성 먹이생물로서 우리나라 연안에서 계절에 따라 우점종으로 출현하는 은편모류를 순수분리하여 새로운 광생물 먹이종주로 개발하고, 이 광생물 먹이종주를 대상으로 대량배양 및 생산체계를 확립함으로써 새로운 농축 먹이생물 시제품, 표준색소 화합물의 추출·생산 및 기능성물질 탐색기술 개발에 목적이 있다.

2. 연구개발의 필요성

광생물 기술은 태양, 물, 이산화탄소를 주 영양원으로 하는 생물산업으로 지구온난화에 따른 온실가스를 저감함과 동시에 이들 생물재료로부터 인류에게 유용한 여러 가지 물질을 추출할 수 있는 대표적인 친환경 기술이다. 현재 우리나라에서 광합성 미세조류는 해산 어패류 종묘생산을 위한 먹이생물과 *Chlorella*와 *Spirulina* 등과 같이 생물체를 이용한 건강보조식품으로 상용화되었고, 기타 astaxanthin과 같은 색소, 이산화탄소 저감 및 바이오에너지로까지 확대되어 연구를 진행하고 있다.

특히, 광생물을 이용한 기술은 이미 수산양식 분야에 도입되어 종묘생산시 필수적인 생물로 인식되어 널리 활용되고 있고, 세계 수산물 소비량이 급속도로 증가하는 반면에 어획량은 한계에 이른 점을 고려할 때 양식산업의 중요성이 지속적으로 증가할 것으로 예상되며, 양식산업의 근간이 되는 종묘생산량도 더불어 증가하여 광생물 먹이의 수요량이 더 많아질 것으로 판단된다.

국내에서 사용되고 있는 광생물 먹이는 담수산 및 해수산 농축 클로렐라로 담수산 농축 클로렐라의 경우 해산어류 및 갑각류 종묘생산시 동물먹이생물인 윤충류를 배양할 때 사용되거나 영양성분이 적합하지 않아 이차적으로 영양강화 제품을 구입하여 사용하는

번거로움이 있다. 해산 클로렐라의 경우는 어류 종묘생산시 세포농도가 담수산 클로렐라에 비해 매우 낮아 윤충류 배양에 부적합하기 때문에 수질 및 자치어의 안정 및 직간접적인 먹이 등 green water용으로만 사용하고 있고, 이매패류 종묘생산에 이용하기에는 이매패류의 유생의 섭식률 및 생존율이 매우 낮다는 단점이 있다.

최근 국내 연안에서 이매패류의 자연채묘가 불안정하기 때문에 패류 양식산업을 안정화시키기 위해서는 인공종묘생산이 필수적인데, 이를 위해서는 무엇보다도 최적의 광생물 먹이를 적절하게 투여해야만 한다. 현재 활용되고 있는 광생물 먹이는 대부분 국내 연안에서 독자기술로 확보된 종이 아닌 외국에서 분양받은 종들로 이들 외국 분양 종들은 대량배양이 불가능하거나, 일부 종묘생산업자의 배양기술 숙련도에 따라 배양기술이 일반화되어 있지 않아 먹이배양에 따른 인력, 시간, 장소 등의 단점으로 패류 종묘생산업이 확대되지 못하는 이유가 되기도 하며, 해삼류와 같은 다양한 종류의 해산 여과섭식성 유생의 종묘생산기술 개발에도 많은 문제점을 내포하고 있다.

따라서, 영양성분이 높고 대량배양이 용이하며, 다양한 색소 및 기능성 다당류 등이 다량으로 함유된 다기능성 광생물 먹이를 국내연안에서 순수 독자 기술로 분리하고, 신개념의 광생물반응기(photo-bioreactor)를 활용해 대량배양할 필요가 있다. 이렇게 대량배양된 광생물 먹이를 이용해 윤충류 및 *Artemia nauplii*에 대한 이차적인 영양강화를 최소화시키고 green water용과 이매패류 유생에 직접 공급할 수 있는 제품으로 제작할 수 있는 기술을 개발할 필요가 있다.

이러한 다기능성 광생물 먹이는 수산양식산업 뿐만 아니라 향후 건강보조식품으로 개발이 가능하고, 연구용 표준색소 및 기능성 다당류 등으로 확대시킬 수 있어 배양 및 추출기술을 진일보시킬 수 있을 것으로 판단된다. 또한 광생물은 광 에너지와 온실가스의 주범인 이산화탄소를 이용하기 때문에 친환경적으로 배양할 수 있는 장점이 있어 수산양식업이 환경 친화적인 산업으로 발전할 수 있는 계기가 될 수 있을 뿐만 아니라 향후 청정개발체제(CDM)의 확대에 대비할 필요가 있어 광생물 먹이의 대량생산을 위한 기술 개발이 절실하다.

제 2 절 연구개발의 내용 및 범위

1. 신규 다기능성 광생물 먹이 개발

우리나라 연안에서 신규 다기능성 먹이생물로 개발 가능한 분류군인 은편모류를 순수분리하여 5종주 이상을 확보하고, 외부환경(수온, 염분)에서 적응력과 성장이 가장 빠른 종주를 선택하기 위한 기초자료로 활용한다. 성장 및 적응력이 빠르고 광생물 먹이로 가능하며, 영양가가 높은 최우수 종주의 다양한 광도 및 영양염(질산염, 인산염) 변화에 대한 성장실험을 통해 최적 성장조건을 규명하며, 대량배양시 활용할 수 있도록 순환형 배양액 적용기술을 개발한다.

2. 고밀도 대량배양 기술 확립

순수분리하여 확보된 은편모류를 대량배양한 후 탄수화물, 단백질, 지방 등의 일반 영양성분을 분석하여 우수 종주 선택을 위한 기초 자료로 활용하고, 최종적으로 선택된 우수 종주에 대한 아미노산 및 지방산 조성 등의 영양성분을 분석하여 이들의 효용성을 입증한다. 농축의 효율성을 증대시키기 위한 고밀도 대량배양 조건을 탐색함과 동시에 신기능 광생물반응기를 개량하여 적용하고 단계별 대량생산 공정을 확립함으로써 실제 활용 가능한 기술을 확립한다.

3. 광생물 먹이의 기능성 검증

광생물 먹이의 수산양식용 기능성을 검증하기 위해 확보된 은편모류를 대상으로 어류 및 갑각류 종묘생산시 필요한 동물먹이생물인 윤충류의 성장 및 포란율을 확인하고, 이매패류 유생의 성장 및 생존율을 비교하여 우수종주로 선택하기 위한 기초자료로 활용한다. 또한 우수종주를 대상으로 윤충류와 이매패류 유생의 성장 및 생존율을 검증하고, 특히 기존의 주요 먹이생물로 알려진 광생물 먹이와 비교하여 새로운 종주의 우수성을

입증한다. 또한 대량배양된 우수종주를 먹이로 공급한 후 윤충류의 영양성분을 분석하여 전달효율을 검증한다.

확보된 신규 광생물 종주의 색소함량 분석 및 기능성 물질을 탐색하여 기초자료로 확보하고, 우수종주의 색소함량을 분석하여 효율성을 증대시키며, 기능성 물질의 함량변화를 추적한다. 또한 새로운 기능성물질을 탐색하는 기술을 확립하여 활용 가능성을 증대시킨다.

4. 농축기술 적용 및 시제품 생산

고밀도 대량배양 후 응집 및 원심분리 등의 효율적인 농축방법을 적용하여 농축 광생물 먹이 시제품을 제작하며, 시제품의 세포특성 및 영양성분이 유지될 수 있는 조건을 찾아내 기술이전 후 제품이 생산될 수 있도록 모든 생산과정을 체계화시킨다. 또한 고밀도로 대량배양된 광생물 먹이의 chlorophyll 및 carotinoid 계열의 다양한 색소를 추출할 수 있는 색소추출 공법을 확립함과 동시에 표준색소 화합물 시제품을 생산한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

은편모류(Cryptophyceae)의 세포모양은 한쪽이 패인 납작한 콩모양으로 비대칭적인 특징을 가지고 있고, 사출포(ejectosome 또는 trichocyst)로 둘러져 있는 세로홈(gullet 또는 furrow)의 위쪽에서 2개의 편모가 나오며, 크기는 2~40 μ m까지 다양한 크기를 가진다. 전 세계적으로 약 200여 종이 담수와 해수, 기수역 심지어 눈 속 등 수분이 있는 모든 환경에서 서식하고(Klaveness 1988, Javornicky and Hindak 1970, Metfies and Medlin 2007), 수계에서 적조를 일으키기도 한다(Nishijima 1990, Novarino 2003). 최근 해양 일차생산자 중 매우 작은 크기의 미세플랑크톤에 주목하면서 국내 연안에서도 은편모류가 시기적으로 우점하는 분류군으로 확인되고 있고, 포항시 형상강 하구역에서는 거의 매년 은편모류에 의한 적조가 발생하기도 한다(국립수산과학원 적조속보).

은편모류는 chlorophyll a, c2, xanthophyll을 가지고 있고, phycobiliprotein 색소체 중 phycocyanin 또는 phycoerythrin 두 가지 중 한 가지를 갖는데, 이에 따라 색소체들의 조화나 농도가 갈색, 붉은색, 푸른색 등 여러 가지로 나타나 다양한 색깔을 가지는 은편모류가 존재하게 된다. 이러한 다양한 광합성 색소의 결합으로 저광도에서도 생존할 수 있다. 특히 색소체를 가진 해양 섬모류 중 다수 종과 대부분의 와편모류 종들은 은편모류 기원의 색소체를 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Hansen and Fenchel, 2006; Hackett, 2003). 이처럼 은편모류는 다양한 원생생물에게 색소체를 제공하여 이들에게 기능적인 해양 일차생산자 역할을 하게 해줄 뿐 아니라, 다양한 기원의 색소체보충 종류들 가운데서도 광합성 기능이 유독 오래 지속되는 유형의 색소체를 제공한다.

제 1 절 국외 기술개발 현황

은편모류와 같은 광합성 미세조류는 해양생태계에서 먹이사슬의 가장 하부에 위치하는 일차생산자로서, 수산양식 분야에서는 여과섭식성 이매패류의 전 생활사와 어류 및 갑각류의 유생시기, 종묘생산시 동물먹이생물의 직접적인 먹이원 또는 영양강화와 수질 및 사육동물의 안정화를 위한 첨가제(green water), 색소 및 영양보조제 제조를 위한 생물원료 등 다양하게 이용되고 있어 수산양식 산업에서 매우 중요한 생물이다.

외국의 경우, 수산종묘를 생산하기 위해 부유성 미세조류인 착편모조류(*Isochrysis*속, *Pavlova*속), 담녹조류(*Tetraselmis*속), 규조류(*Thalassiosira*속, *Phaeodactylum*속, *Chaetoceros*속 등), 진정안점조류(*Nannochloropsis*속) 등을 대량배양하여 농축시킨 살아있는 먹이생물로, 또는 미세분말로 제품화하여 첨가제로 활용하고 있다. 그러나 본 연구에서 개발하고자하는 은편모류를 이용한 제품은 현재까지 상업적으로 생산되고 있지 않기 때문에 광생물 먹이개발에 따른 기술적 우위를 차지할 수 있을 것이다.

은편모류의 먹이가치에 대해서는 최근 연구가 활발히 진행되고 있는데, 수산양식용 먹이로 활용하기 위해 일반 영양성분을 포함한 아미노산 및 지방산 조성에 관한 연구(Volkman et al. 1989, Brown 1991, Brown et al. 1997, Renaud et al. 1999, Dunstan et al. 2005)에서 종주에 따라 단백질 53~64%, 지질 18~28%, 탄수화물 9~24%를 함유하는 것으로 분석되었고, 특히 해산동물에 필요한 고도불포화지방산 함량이 높은 것으로 보고되었다. 또한 은편모류를 참굴(Brown et al. 1998, McCausland et al. 1999)과 가리비류(Tremblay et al. 2007)에 공급한 결과, 기존의 광생물 먹이보다 성장률이 좋거나 타 광생물 먹이와 혼합할 경우 지질함량을 향상시킨 보고가 있어, 본 연구과제를 통해 개발된 은편모류 광생물 먹이는 기존의 광생물 먹이와 더불어 사용할 경우 이매패류 유생의 성장 및 생존율을 향상시킬 수 있을 것으로 판단된다.

또한 은편모류를 동물플랑크톤인 요각류의 먹이로 공급하여 성장 및 알 생산력을 증가시켰고(Stottrup et al. 1999, McKinnon et al. 2003, Knuckey et al. 2005, Dahl et al. 2009), 어류 및 갑각류 종묘생산시 동물먹이로 이용되는 *Artemia*의 영양을 증진시켰으며(Thin et al. 1999, Seixas et al. 2009, Seixas et al. 2010), 기타 갯민숭달팽이류(Avila et al. 1997), 갯지렁이류(Almeda et al. 2009), 염통성게류(Schiopu et al. 2006)에 공급한 사례가 있어, 해양의 다양한 동물에 먹이가 되고 있음을 의미하고 있다. 따라서 본 연구과제를 통해 개발된 은편모류 광생물 먹이는 수산양식 분야의 여러 방향으로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

한편, 은편모류의 생리에 관련된 여러 연구 중에서 영양염과 광도에 따른 색소의 종류 및 농도에 관한 연구(Eriksen and Iversen 1995, Sciandra et al. 2000, Cruz et al. 2006, Silva et al. 2009)가 있으나, 이들 은편모류로부터 표준색소 추출에 관한 연구는 없으므로, 국내 연안에서 분리된 종주로부터 색소의 종류 및 농도를 분석하고, 이를 추출·분리하여 제품으로 개발한다면 전량 수입에 의존하고 있는 분석용 표준색소의 수입대체 효과가 있을 것이다.

제 2 절 국내 기술개발 현황

우리나라에서 광생물 먹이는 크게 어류와 이매패류 종묘생산시 이용되고 있는데, 어류 종묘생산의 경우, 동물먹이생물인 윤충류를 배양하기 위해 국내에서 시판되고 있는 담수산 농축 클로렐라 제품을 사용하고 있으나, 해산 자치어가 요구하는 영양소가 절대적으로 부족하기 때문에 이차적으로 영양강화를 통해 영양을 보충하고 있다. 또한 일부 업체에서 이를 해결하기 위해 판매되고 있는 해산 클로렐라(*Nannochloropsis* sp.)는 주로 자치어 수조의 수질안정용으로만 활용되고 있다. 이매패류 종묘생산의 경우에는 대부분이 외국에서 분양받아 한국미세조류은행 또는 국립수산과학원에서 계대배양 중인 종을 자체적으로 대량배양하여 사용하고 있는 실정으로, 때에 따라 원활하게 광생물 먹이가 공급되지 않아 종묘생산에 많은 어려움을 겪고 있을 뿐만 아니라 광생물 먹이가 다량으로 요구되는 이매패류의 어미관리에서도 많은 고충을 겪고 있는 실정이다.

한편, 국내에서 은편모류를 수산양식을 위한 광생물 먹이로서 응용한 사례는 없으나, 은편모류를 섭식하는 와편모류(Jeong et al. 2007)와 섬모류 *Mesodinium rubrum*에 관한 연구(Yih et al. 2004)가 있고, 은편모류를 섭식한 *M. rubrum*을 이매패류 치패 및 성패에 먹이생물로 적용한 사례(Yih et al. 2004, 김 등, 2004)와 은편모류의 염분, 온도, 광도 등 성장조건(하 2009)에 관한 연구가 있으며, 우리나라 전 연안에서 은편모류가 항시 또는 일정 시기에 우점하는 식물플랑크톤으로 존재한다는 여러 연구가 보고되고 있기 때문에 광생물 먹이로서의 이용 가능성은 충분히 입증되었다고 판단할 수 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 신규 다기능성 광생물먹이 개발

1. 신규 광생물먹이 종주 순수분리

새로운 광생물 먹이의 순수분리를 위해 우리나라 서해 및 남해와 제주해역(그림 1-1)에서 해수를 채수한 후, 실험실에서 은편모류를 대상으로 미세관 피펫을 이용하여 광학현미경(Olympus BX-50) 하에서 1세포씩 분리한 다음, 30psu로 조절되고 규소성분을 제외시킨 f/2 배양액(f/2-Si)이 담긴 24-well culture plate에 넣고, 20°C, 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 배양하였다. culture plate에서 타 well에 비해 성장이 빠른 것으로 확인된 종주는 실험실 배양시스템(20°C, 연속광(L:D=24:0), 50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)에서 연안해수를 30psu로 조절한 후, f/2-Si 배양액을 사용하여 계대배양을 통해 종주를 유지시키면서 실험에 사용하였다.

본 연구에서 확보한 신규 광생물 먹이종주는 총 12개 종주로 18S rDNA 유전자 분석을 통해 CR-MAL03 (*Rhinnomonas* sp.)과 CR-MAL10 (*Chroomonas* sp.)을 제외한 나머지 10개 종주가 *Teleaulax amphioxeia*로 분석되었고, 채집당시 수온은 5.4~28.9°C, 염분은 20.3~32.5psu이었다(표 1-1).

표 1-1. 본 연구에서 분리한 광생물 은편모류 종주

종주번호	종명	채집장소	수 온 (°C)	염 분 (psu)
CR-MAL01	<i>Teleaulax amphioxeia</i>	Gomso Bay, BUAN.	7.8	30.1
CR-MAL02	<i>Teleaulax amphioxeia</i>	Gomso Bay, BUAN.	12.0	30.3
CR-MAL03	<i>Rhinnomonas</i> sp.	Mohang, TAEAN	11.5	30.8
CR-MAL04	<i>Teleaulax amphioxeia</i>	Geum River Estuary, GUNSAN	5.4	20.6
CR-MAL05	<i>Teleaulax amphioxeia</i>	Sungsan port, SEOGUIPO	19.5	31.8
CR-MAL06	<i>Teleaulax amphioxeia</i>	Heuksan-do, SHINAN	15.2	32.5
CR-MAL07	<i>Teleaulax amphioxeia</i>	Masan port, MASAN	16.7	31.2
CR-MAL08-1	<i>Teleaulax amphioxeia</i>	Saemangeum, GIMJE	10.5	26.8
CR-MAL08-2	<i>Teleaulax amphioxeia</i>	Saemangeum, GIMJE	10.5	26.8
CR-MAL09	<i>Teleaulax amphioxeia</i>	Keyado, GUNSAN	21.5	30.3
CR-MAL10	<i>Chroomonas</i> sp.	Simwon, GOCHANG	28.9	20.3
CR-MAL11	<i>Teleaulax amphioxeia</i>	Simwon, GOCHANG	28.9	20.3

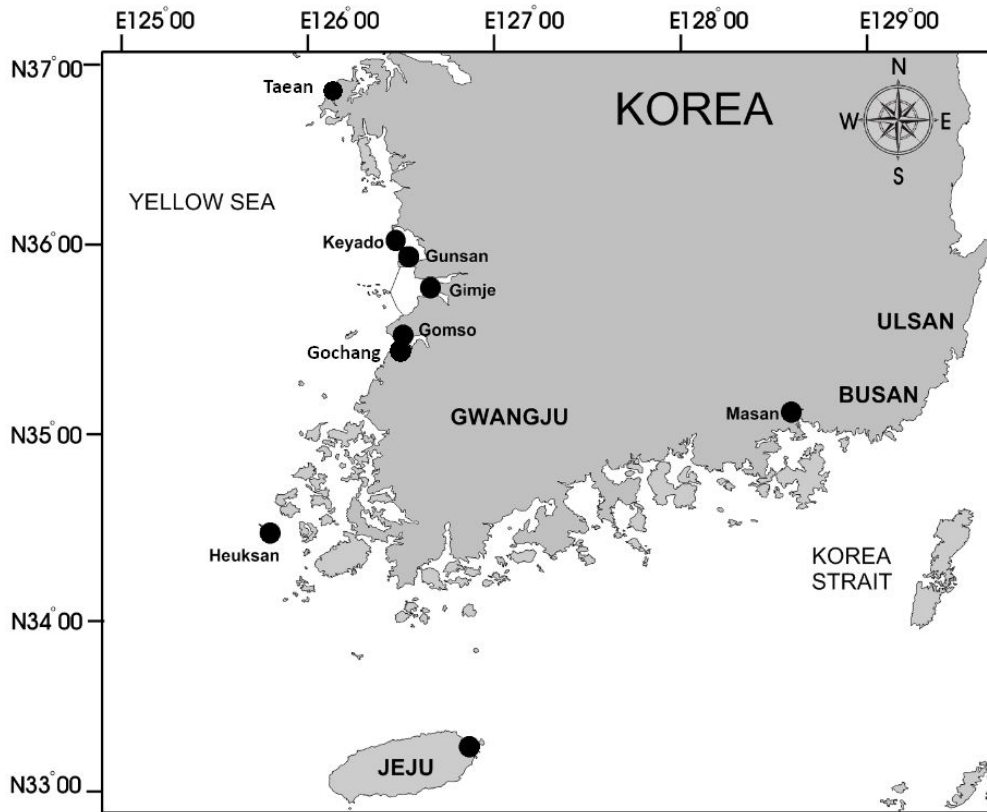


그림 1-1. 본 연구에서 분리한 광생물 은편모류 채집 정점.

2. 환경적응 특성

가. 재료 및 방법

실험실 배양시스템에서 계대배양 중이던 순수분리 광생물 먹이종주 중 CR-MAL05부터 CR-MAL11까지 총 8개 종주를 대상으로 온도(15, 20, 25, 30, 35°C)와 염분(10, 15, 20, 25, 30, 35psu)의 변화에 따른 환경적응 특성을 파악하기 위해 실험환경 적응기간 없이 바로 실험에 이용하였다. 매 실험시 광도 $100 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, 연속광(L:D=24:0), f/2-Si 배양액을 기준조건으로 하였다.

실험용 해수는 제주도 서남방 45km 지점에서 채수한 대마난류역 외해수로서 약 1년간 냉암소에 보관한 해수이었고, 유리섬유여과지(GF/F)로 여과한 후 사용하였으며, f/2-Si 배양액의 stock solution을 첨가하고 고온·고압 멸균한 후 사용하였다. 실험용기는 500ml PC병으로 400ml의 실험 배양수를 채우고, 은편모류 초기농도를 $5,000 \text{ cells ml}^{-1}$ 로 조절한 후 매일 5ml를 subsample하여 세포농도를 광학현미경 하에서 계수하였으며, 3반

복구를 두어 10일간 실험을 수행하였다.

초기 저농도에서 시작된 배양체는 잠복기를 거쳐 지수성장을 하는데 본 실험에서는 배양체의 성장곡선에서 성장 정지기에 이르렀을 때의 생물량을 최대 생물량(maximum biomass yield)으로, 일간 성장률(specific growth rate)은 지수성장(exponential growth) 기간 중 일별 세포밀도를 근거로 하여 회귀곡선식을 구하여 지수 값으로 정하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 수온에 따른 적응 특성

은편모류 8개 종주의 온도별 성장특성을 파악하기 위해 수온 15, 20, 25, 30, 35℃ 등 5개 실험구에서 10일간 배양·실험하였다. 고온인 35℃에서는 모든 종주가 성장을 하지 못하고 사멸하는 것으로 나타났고, 30℃에서는 모든 종주가 느린 성장을 보였으나, CR-MAL11은 오히려 15℃ 실험구에 비해 성장이 우수하였다(그림 1-2). 그 외의 모든 온도 조건에서는 종주별로 각기 다른 성장특성을 보였다. 모든 종주는 15~25℃ 실험구에서 성장률의 차이를 보였으나 정상적인 성장곡선을 보여주었다. 일간 성장률은 모든 종주가 15℃ 이상에서 온도가 상승할수록 감소하는 경향을 보였다. 그러나 CR-MAL11 종주는 다른 종주에 비해 상대적으로 낮은 일간 성장률을 보였고, 15~30℃ 실험구간 모두 유사한 결과를 보여 온도변화에 강한 적응력이 있는 것으로 판단된다(그림 1-3).

각 종주별 최대 생물량은 CR-MAL07과 CR-MAL11이 20℃에서 각각 $791 \times 10^3 \text{ cells ml}^{-1}$ 과 $1,174 \times 10^3 \text{ cells ml}^{-1}$ 로 나타났고, 나머지 종주는 15℃에서 최대 생물량을 보였다(표 1-2). 최대 일간 성장률을 보인 온도는 모든 종주가 15℃ 실험구로 나타났으나, CR-MAL10 종주는 25℃에서 CR-MAL11 종주는 20℃에서 가장 높게 나타났다.

2) 염분에 따른 적응 특성

은편모류 종주에 따른 염분별 적응특성을 알아보기 위하여 옥외배양시 측정될 수 있는 염분 범위(10, 15, 20, 25, 30, 35psu)의 6개 실험구에서 약 10일간 실험을 하였다. 가장 낮은 염분인 10psu에서 CR-MAL09 종주가 실험 7일째 이후 급격한 감소를 보인 것 외에는 대부분의 종주들이 실험 8일째까지는 성장을 하지만 그 이후에 감소하는 경향을 나타내어 모든 종주는 염분변화에 강한 것으로 판단된다(그림 1-4). 일간 성장률 역시 모든 종주가 모든 실험구에서 유사한 값을 보여주었으나, CR-MAL10 종주는 고염분인 35psu에서 다소 낮은 일간 성장률을 보였다(그림 1-5).

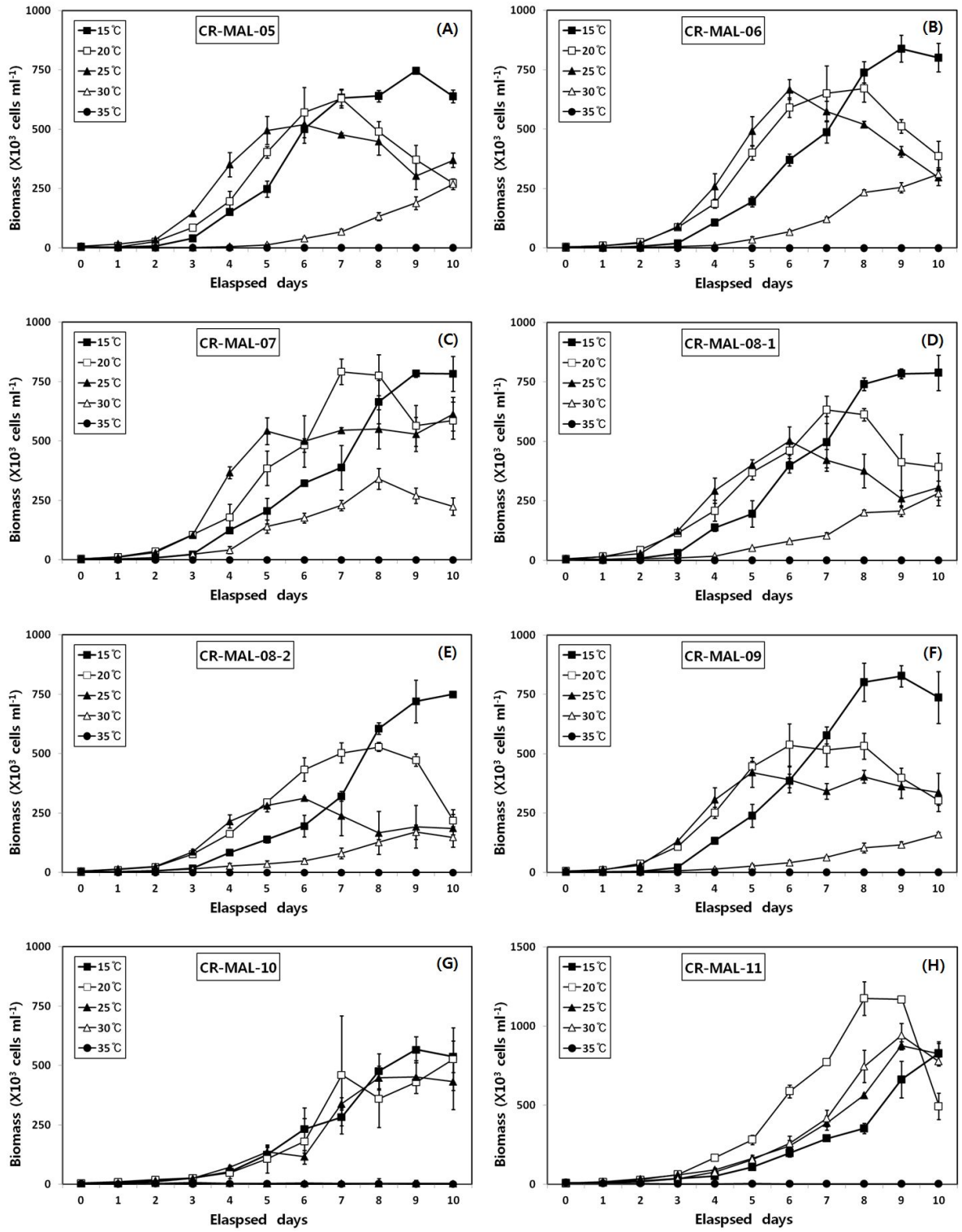


그림 1-2. 광생물 은편모류의 온도에 따른 일별 성장

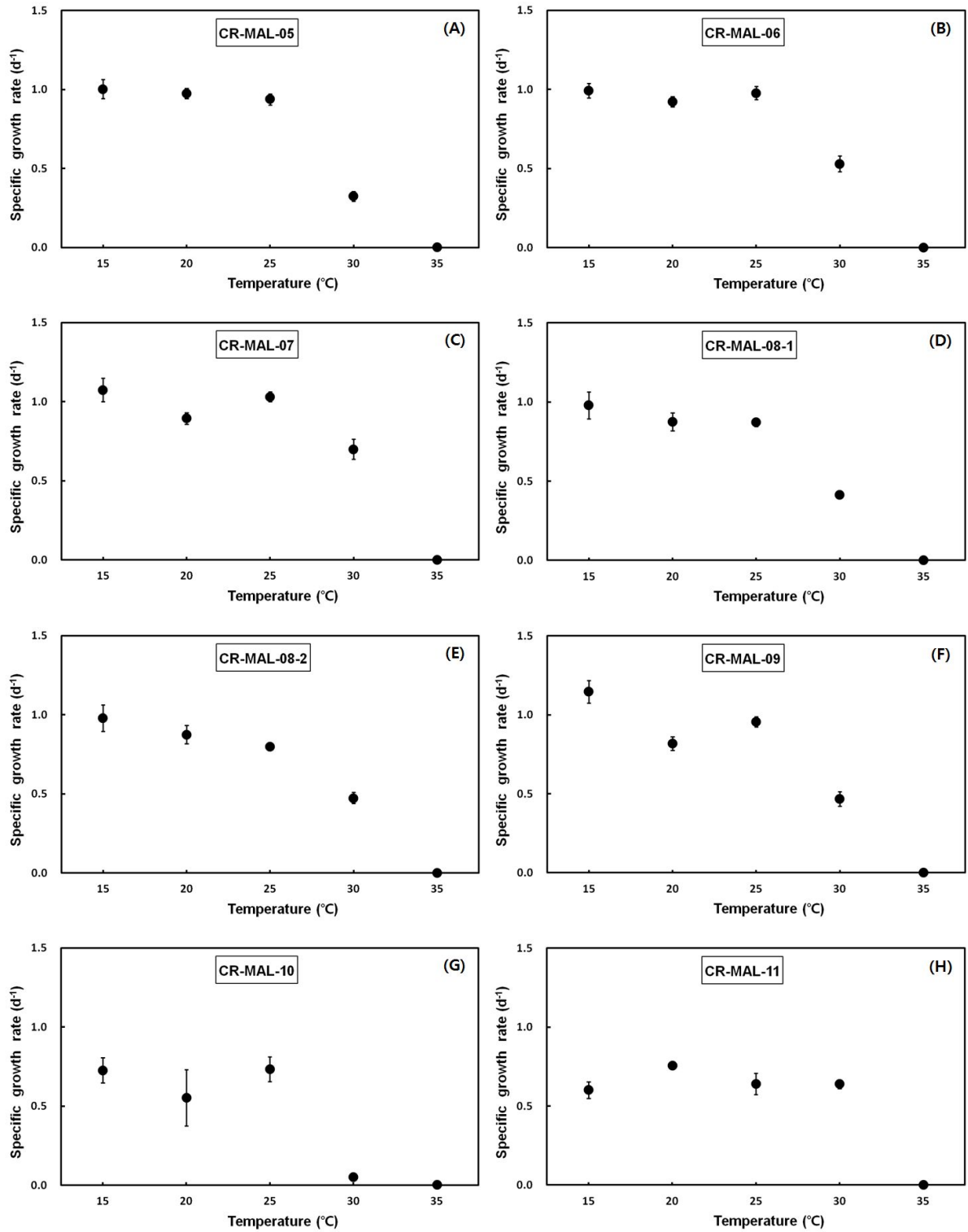


그림 1-3. 광생물 은편모류의 온도에 따른 일간 성장률

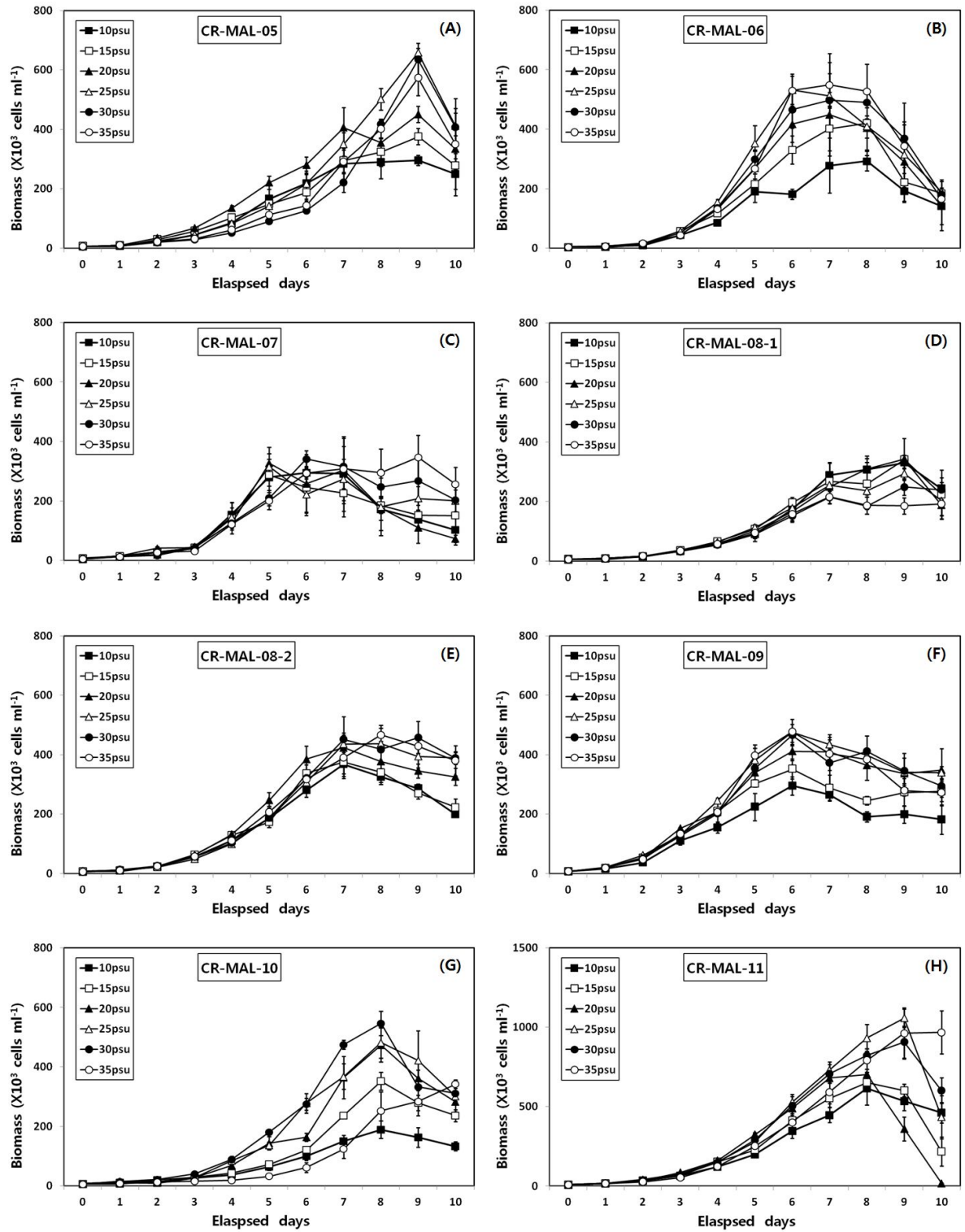


그림 1-4. 광생물 은편모류의 염분에 따른 일별 성장

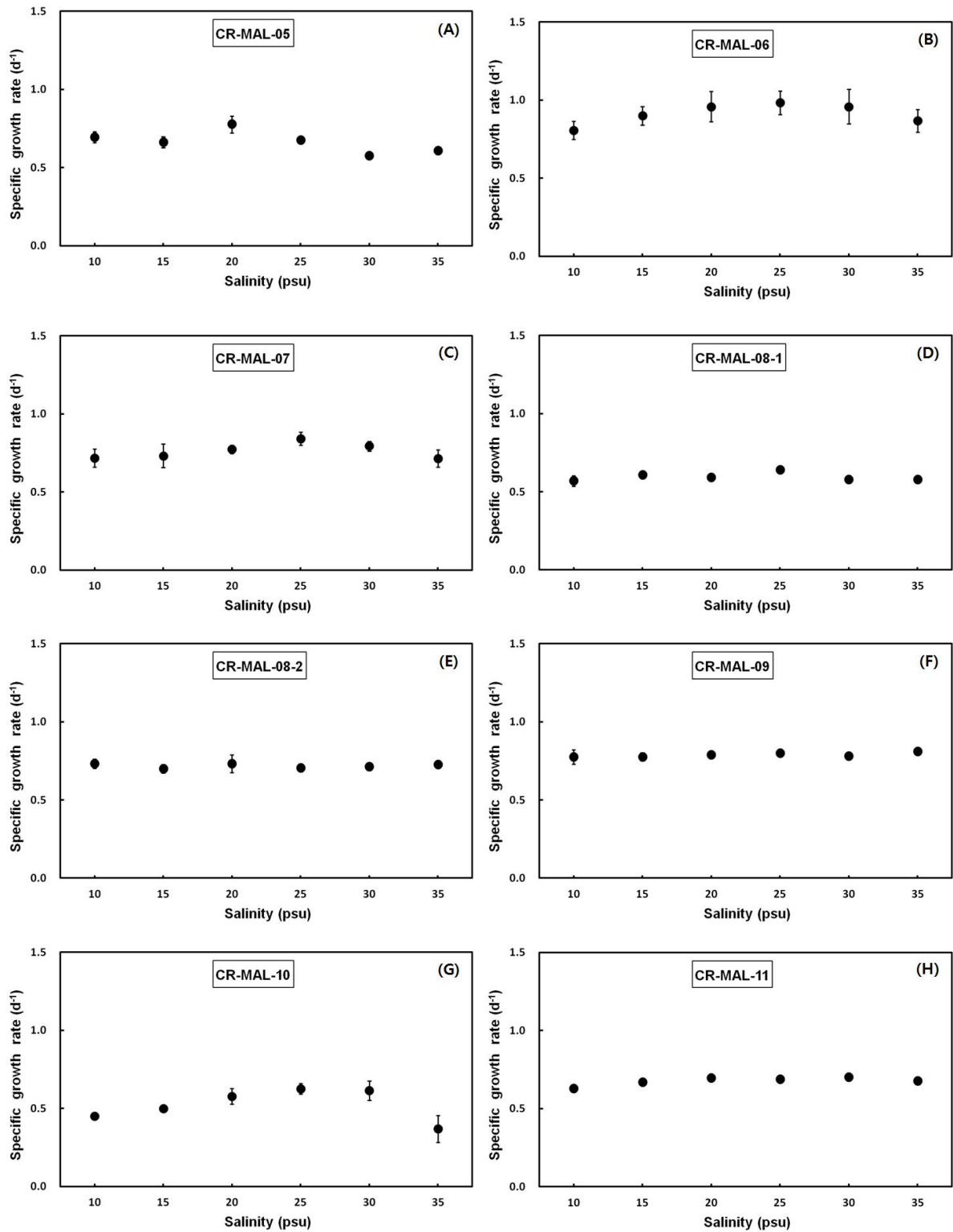


그림 1-5. 광생물 은편모류의 염분에 따른 일간 성장률

표 1-2. 광생물 은편모류의 온도에 따른 최대 생물량 및 일간성장률

종주번호	최대 생물량		최대 일간성장률	
	세포농도 ($\times 10^3 \text{ cells ml}^{-1}$)	온도 ($^{\circ}\text{C}$)	일간 성장률 (d^{-1})	온도 ($^{\circ}\text{C}$)
CR-MAL05	746	15	1.002	15
CR-MAL06	839	15	0.992	15
CR-MAL07	791	20	1.075	15
CR-MAL08-1	784	15	0.979	15
CR-MAL08-2	749	15	0.948	15
CR-MAL09	827	15	1.145	15
CR-MAL10	567	15	0.734	25
CR-MAL11	1,174	20	0.756	20

각 종주별 최대 생물량은 종주에 따라 다르게 나타났는데, CR-MAL08-1은 15psu에서, CR-MAL05, CR-MAL06, CR-MAL09, CR-MAL11은 25psu에서, CR-MAL07과 CR-MAL10은 30psu에서, CR-MAL08-2는 35psu에서 가장 높은 생물량을 나타냈고, 일간 성장률도 CR-MAL11은 30psu에서, CR-MAL05와 CR-MAL08-2는 20psu에서, 나머지 종주는 25psu에서 가장 높은 일간 성장률을 보였다(표 1-3).

표 1-3. 광생물 은편모류의 염분에 따른 최대 생물량 및 일간 성장률

종주번호	최대 생물량		최대 일간성장률	
	세포농도 ($\times 10^3 \text{ cells ml}^{-1}$)	염분 (psu)	일간성장률 (d^{-1})	염분 (psu)
CR-MAL05	658	25	0.776	20
CR-MAL06	531	25	0.984	25
CR-MAL07	341	30	0.843	25
CR-MAL08-1	342	15	0.634	25
CR-MAL08-2	466	35	0.731	20
CR-MAL09	476	25	0.799	25
CR-MAL10	546	30	0.627	25
CR-MAL11	1,058	25	0.702	30

3. 성장반응 특성

가. 재료 및 방법

실험실 배양시스템에서 계대배양 중이던 CR-MAL05부터 CR-MAL11까지 총 8개 종주를 대상으로 광도(20, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$), 영양염(질산염, 인산염) 농도 (0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0배-f/2-Si 배양액 기준, 표 1-5)의 변화에 따른 성장적응 특성을 실험하였다. 매 실험시 수온 20°C, 염분 30psu, 광도 100 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, 연속광(L:D=24:0), f/2-Si 배양액을 기준조건으로 하였다.

실험용 해수 및 실험용기 등의 실험방법은 수온 및 염분에 대한 환경적응 특성 실험과 동일하게 진행하였고, 실험용 해수의 질산염과 인산염 농도는 각각 1.26 μM 과 0.10 μM 이었다(표 1-4). 또한 성장이 우수한 종주인 CR-MAL07과 CR-MAL8-2를 대상으로 순환형 배양액인 가축분뇨 발효액비의 첨가농도(0, 0.1, 0.3, 0.5, 1%)에 따른 성장실험을 추가하였고, 이에 대한 성장 특성을 토대로 환경적응 특성 실험에서와 같이 최대 생물량 및 일간 성장률을 계산하였다.

표 1-4. f/2-Si 배양액 기준에 따른 질산염과 인산염 농도

f/2-Si 배양액 농도 기준	질 산 염 (μM)	인 산 염 (μM)
0 배	1.26	0.1
0.5 배	440	18
1.0 배	880	36
2.0 배	1,760	72
5.0 배	4,400	180

나. 결과 및 고찰

1) 광도에 따른 성장반응

은편모류 종주별 최적 성장 광도를 규명하기 위하여 20, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 5등급의 광도 조건에서 9일간 배양·실험 하였다. 모든 종주가 가장 낮은 광조건인 20 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 가장 낮은 성장을 보였고, 광도가 증가할 수록 성장이 원활하게 이루어졌으나, CR-MAL10 종주는 고휘도인 200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 오히려 성장이 감소하는 광저해현상이 나타났으며(그림 1-6), 일간 성장률 역시 같은 경향을 보였다(그림 1-7)

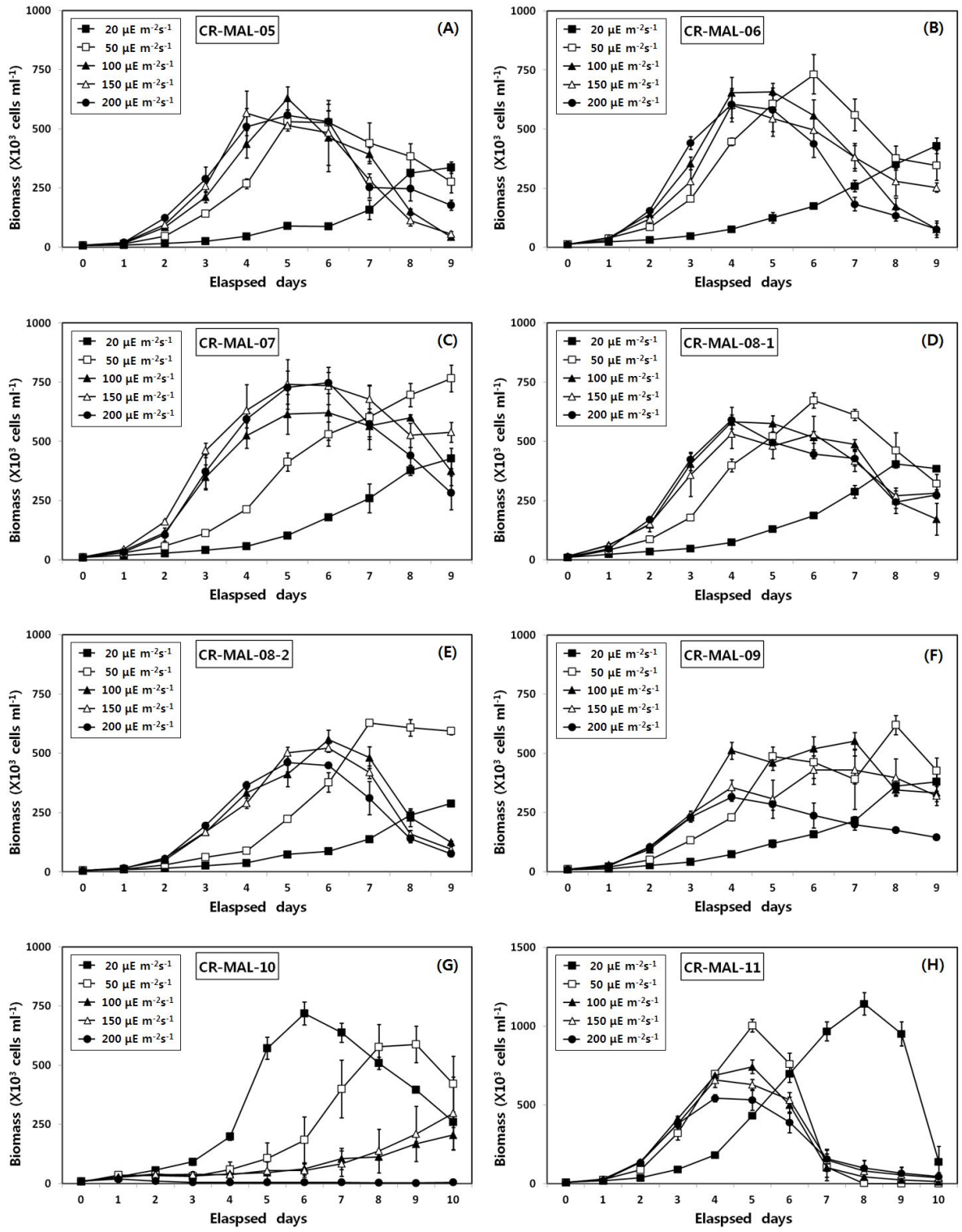


그림 1-6. 광생물 은편모류의 광도에 따른 일별 성장

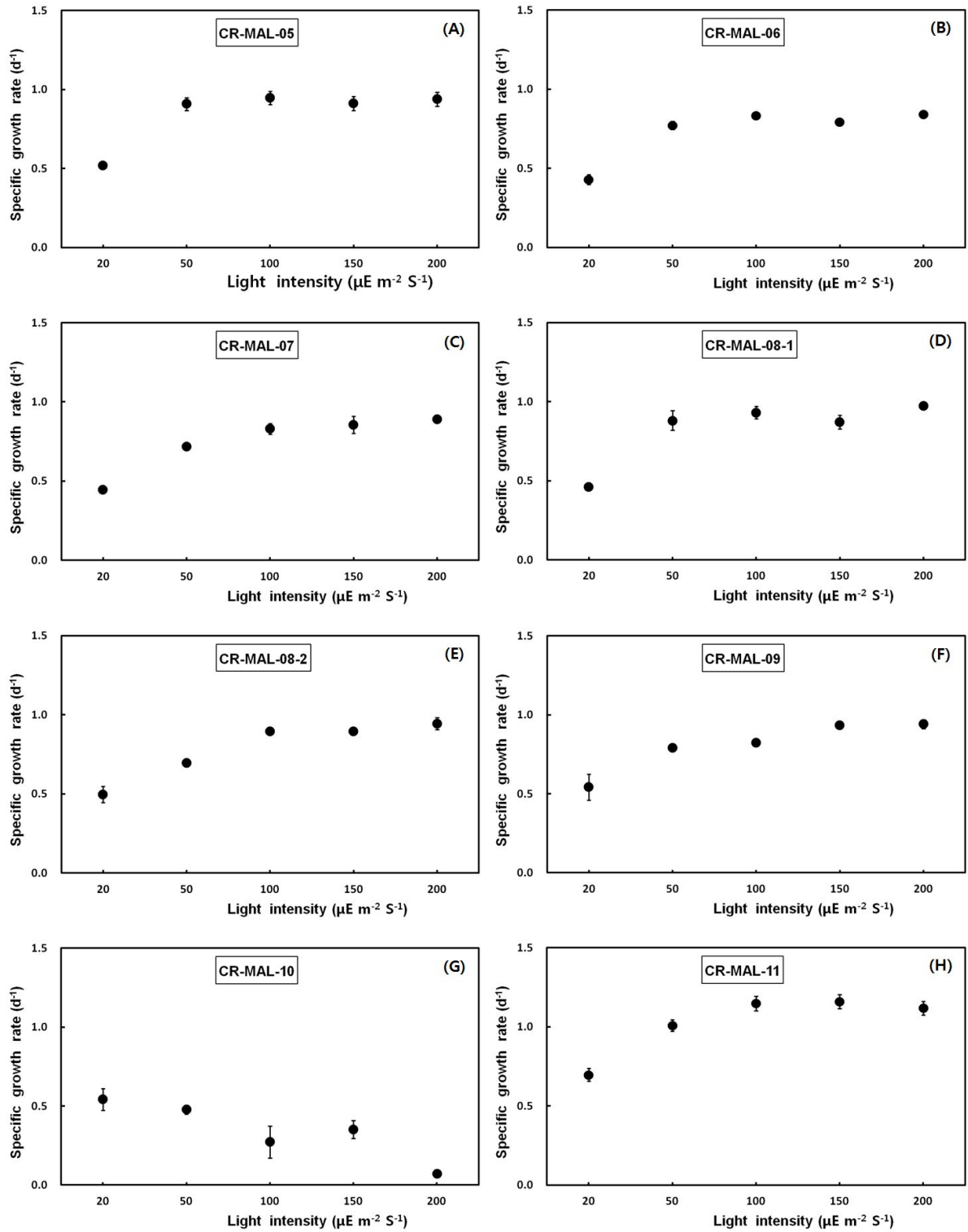


그림 1-7. 광생물 은편모류의 광도에 따른 일간성장률

각 광도에 따른 최대 생물량은 종주에 따라 다르게 나타났는데, CR-MAL07은 가장 높은 고광도인 $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{S}^{-1}$ 에서, CR-MAL05는 $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{S}^{-1}$ 에서, CR-MAL10과 CR-MAL11은 가장 낮은 저광도인 $20\mu\text{E m}^{-2} \text{S}^{-1}$ 에서, 나머지 종주는 $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{S}^{-1}$ 에서 생물량이 가장 많았다(표 1-5). CR-MAL10은 가장 낮은 광도에서 일간 성장률이 가장 높아 낮은 광도를 선호하는 종주로 판단되며, CR-MAL05는 $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{S}^{-1}$ 에서, CR-MAL11은 $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{S}^{-1}$ 에서, 나머지 종주는 가장 높은 광도인 $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{S}^{-1}$ 에서 일간 성장률이 가장 높게 나타나, 초기 지수성장기 때 고광도가 효과적인 것으로 판단된다.

표 1-5. 광생물 은편모류의 광도에 따른 최대 생물량 및 일간 성장률

종주번호	최대 생물량		최대 일간성장률	
	세포농도 ($\times 10^3 \text{ cells ml}^{-1}$)	광도 ($\mu\text{E m}^{-2} \text{S}^{-1}$)	일간성장률 (d^{-1})	광도 ($\mu\text{E m}^{-2} \text{S}^{-1}$)
CR-MAL05	629	100	0.947	100
CR-MAL06	733	50	0.842	200
CR-MAL07	748	200	0.889	200
CR-MAL08-1	673	50	0.974	200
CR-MAL08-2	629	50	0.945	200
CR-MAL09	619	50	0.942	200
CR-MAL10	718	20	0.542	20
CR-MAL11	1,141	20	1.159	150

2) 질산염 농도에 따른 성장반응

최적 성장을 위한 적정 영양염 농도를 규명하기 위하여 질산염 농도에 따른 9일간의 실험 결과, 모든 종주가 질산염을 첨가하지 않은 실험구에서 낮은 성장을 보였고, 질산염을 f/2 배양액 기준 0.5배($440\mu\text{M}$) 이상 첨가했을 때부터 성장이 원활하게 이루어졌으나, 종주에 따른 반응은 다소 다르게 나타났다(그림 1-8). 일간 성장률에서 CR-MAL07은 f/2 배양액 기준 5배($4,400\mu\text{M}$)를 첨가했을 때 지수성장시 높은 일간성장률을 보임으로써 질산염 농도에 대한 빠른 성장반응을 보였고, 나머지 종주는 f/2 배양액 기준 0.5배($440\mu\text{M}$) 이상 첨가할 경우 지수성장기와 유사한 일간 성장률을 보임으로써 CR-MAL07 종주와는 대조적인 다른 성장반응 특성을 나타냈다(그림 1-9).

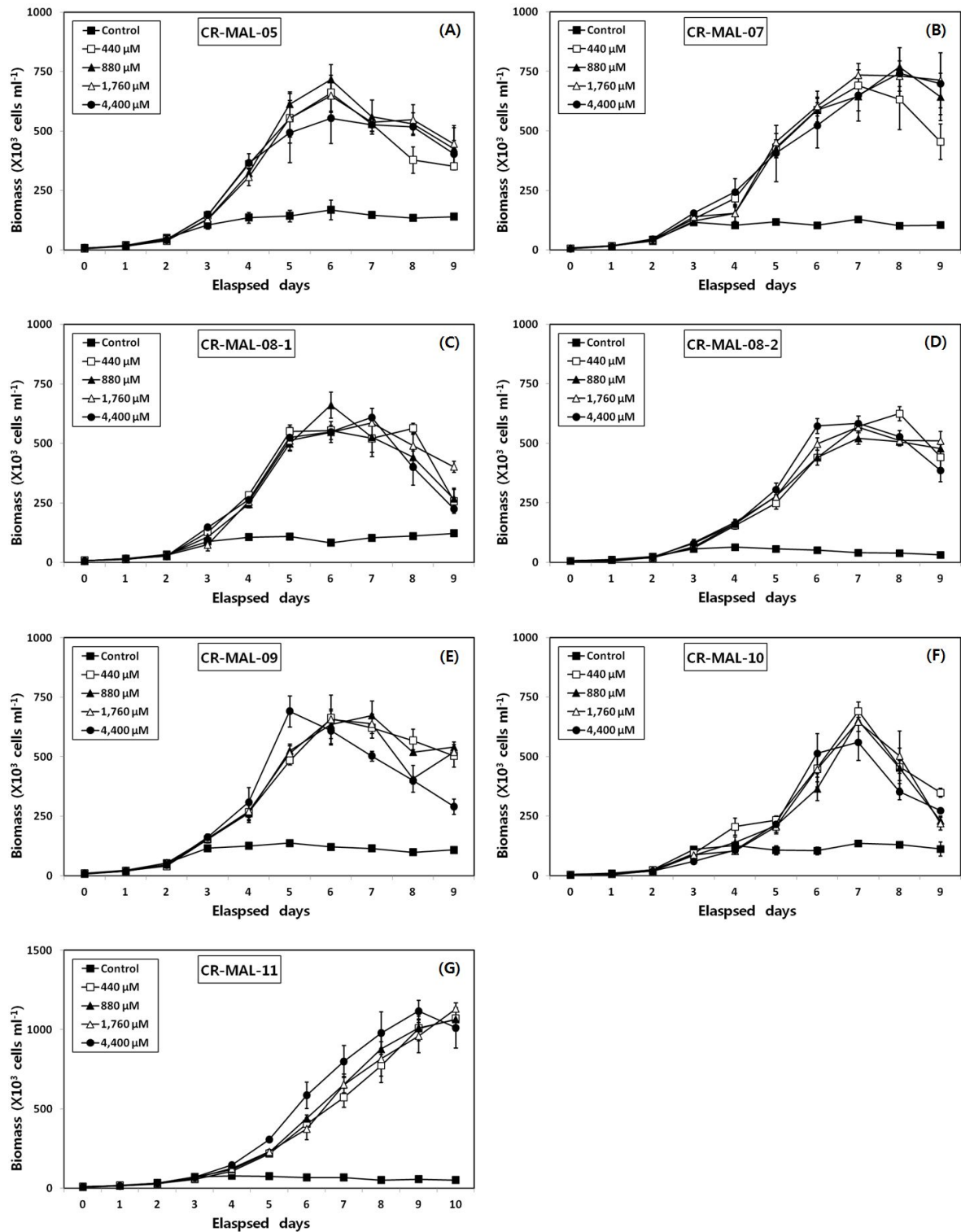


그림 1-8. 광생물 은편모류의 질산염 농도에 따른 일별 성장

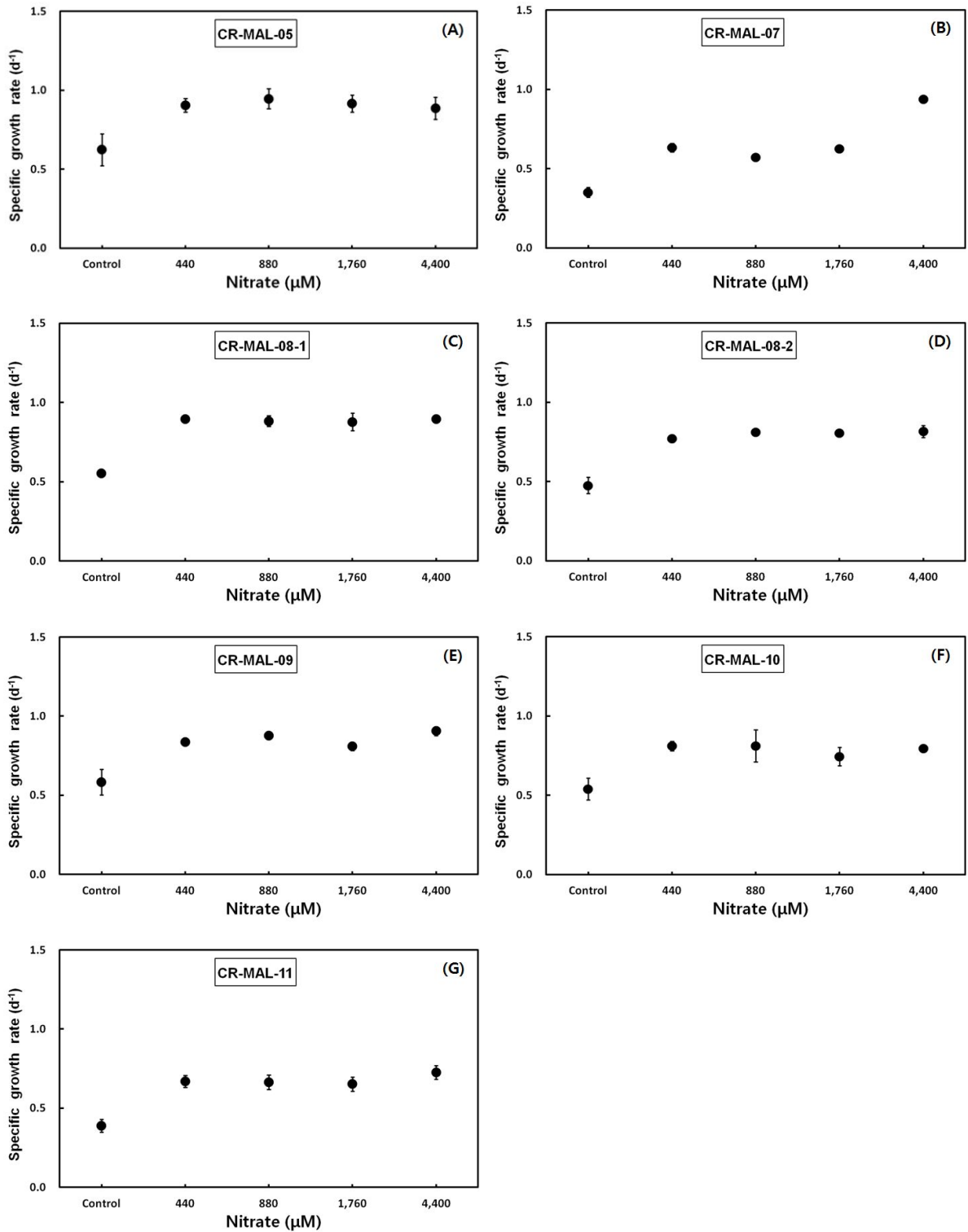


그림 1-9. 광생물 은편모류의 질산염 농도에 따른 일간 성장률

질산염 농도에 따른 각 종주별 최대 생물량을 보면(표 1-6), CR-MAL08-2와 CR-MAL09는 f/2 배양액 기준 5배에 달하는 농도(4,400 μ M)에서 최대 생물량을 보였고, CR-MAL11은 f/2 배양액의 2배 농도(1,760 μ M)에서, 나머지 종주는 f/2 배양액의 질산염 농도(1,760 μ M) 수준에서 최대 생물량을 보였다. 또한 지수성장기 때 일간 성장률은 CR-MAL05와 CR-MAL10은 f/2배양액 기준에서, 나머지 종주는 f/2 배양액의 5배 높은 농도에서 최대 일간성장률을 보임으로써 배양초기에 높은 농도의 질산염을 잘 흡수하여 성장하는 것으로 판단된다.

표 1-6. 광생물 은편모류의 질산염 농도에 따른 최대 생물량 및 일간 성장률

종주번호	최대 생물량		최대 일간성장률	
	세포농도 ($\times 10^3$ cells ml $^{-1}$)	질산염 (μ M)	일간성장률 (d $^{-1}$)	질산염 (μ M)
CR-MAL05	717	880	0.945	880
CR-MAL07	768	880	0.938	4,400
CR-MAL08-1	662	880	0.897	4,400
CR-MAL08-2	584	4,400	0.817	4,400
CR-MAL09	691	4,400	0.901	4,400
CR-MAL10	652	880	0.812	880
CR-MAL11	1,130	1,760	0.726	4,400

3) 인산염 농도에 따른 성장반응

최적 성장을 위한 적정 인산염 농도를 규명하기 위하여 인산염 농도에 따라 9일간 실험을 실시하였다. 모든 종주에서 인산염을 첨가하지 않은 실험구는 인산염을 f/2 배양액 기준 0.5배(18 μ M) 이상 공급한 실험구와 뚜렷한 차이를 나타냈다(그림 1-10). 인산염 농도에 따른 일간 성장률 역시 각 종주에 따라 다른 성장반응을 보였는데, 인산염을 f/2 배양액 기준 0.5배 이상 첨가할 경우에는 큰 차이를 보이지 않았으나, CR-MAL07는 f/2 배양액 기준 5배(180 μ M)를 첨가했을 때 가장 높은 일간 성장률을 보였다(그림 1-11).

f/2 배양액 기준 5배를 첨가했을 때 최대 생물량 및 최대 일간성장률을 보인 종주는 CR-MAL07, CR-MAL09, CR-MAL11로 이들 3개 종주는 인산염의 농도가 높을 때 성장이 활발한 것으로 인식되고, 모든 종주는 적어도 f/2 배양액 수준 이상의 농도를 첨가할 때 최대 생물량 및 최대 일간성장률을 보였다(표 1-7).

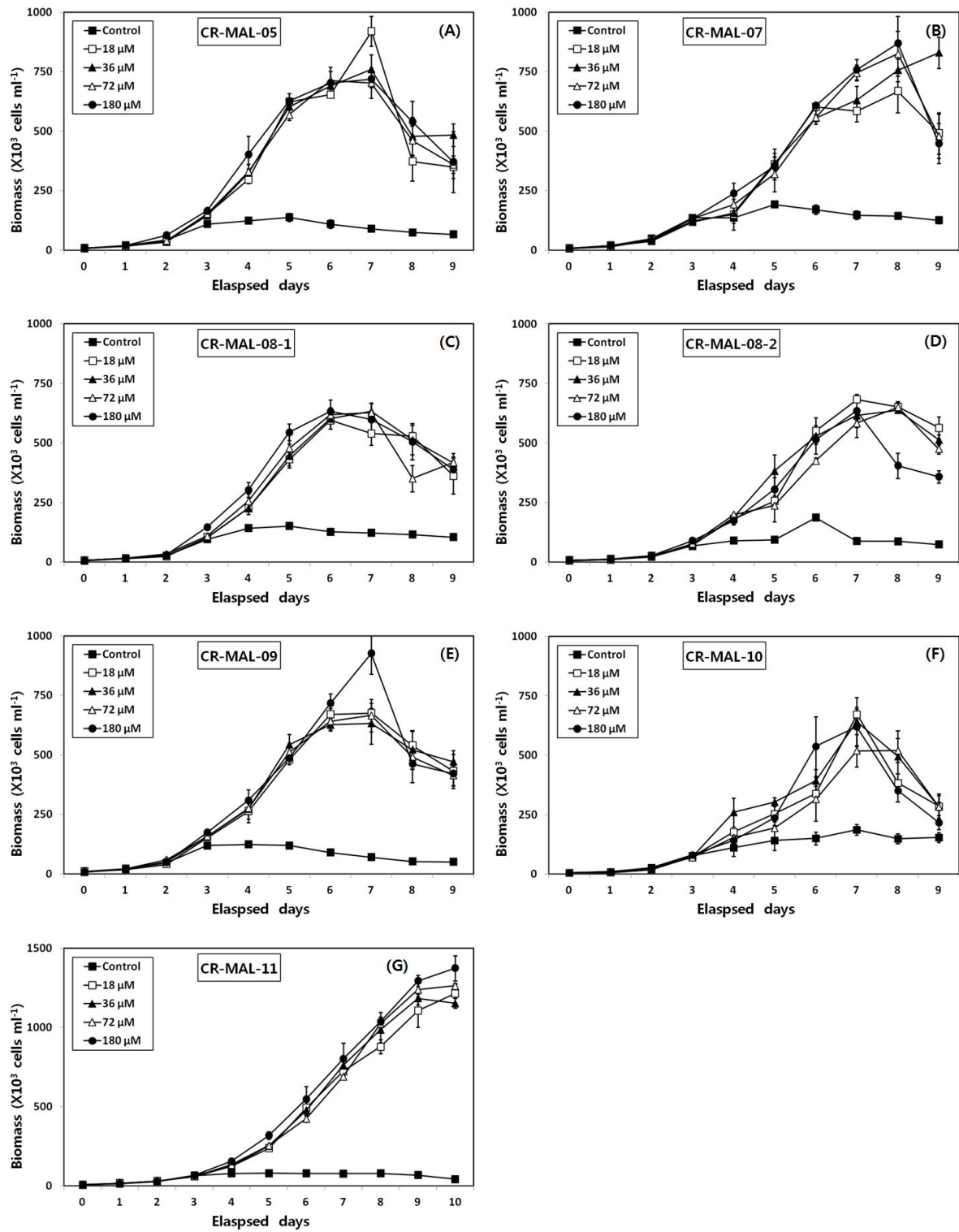


그림 1-10. 광생물 은편모류의 인산염 농도에 따른 일별 성장

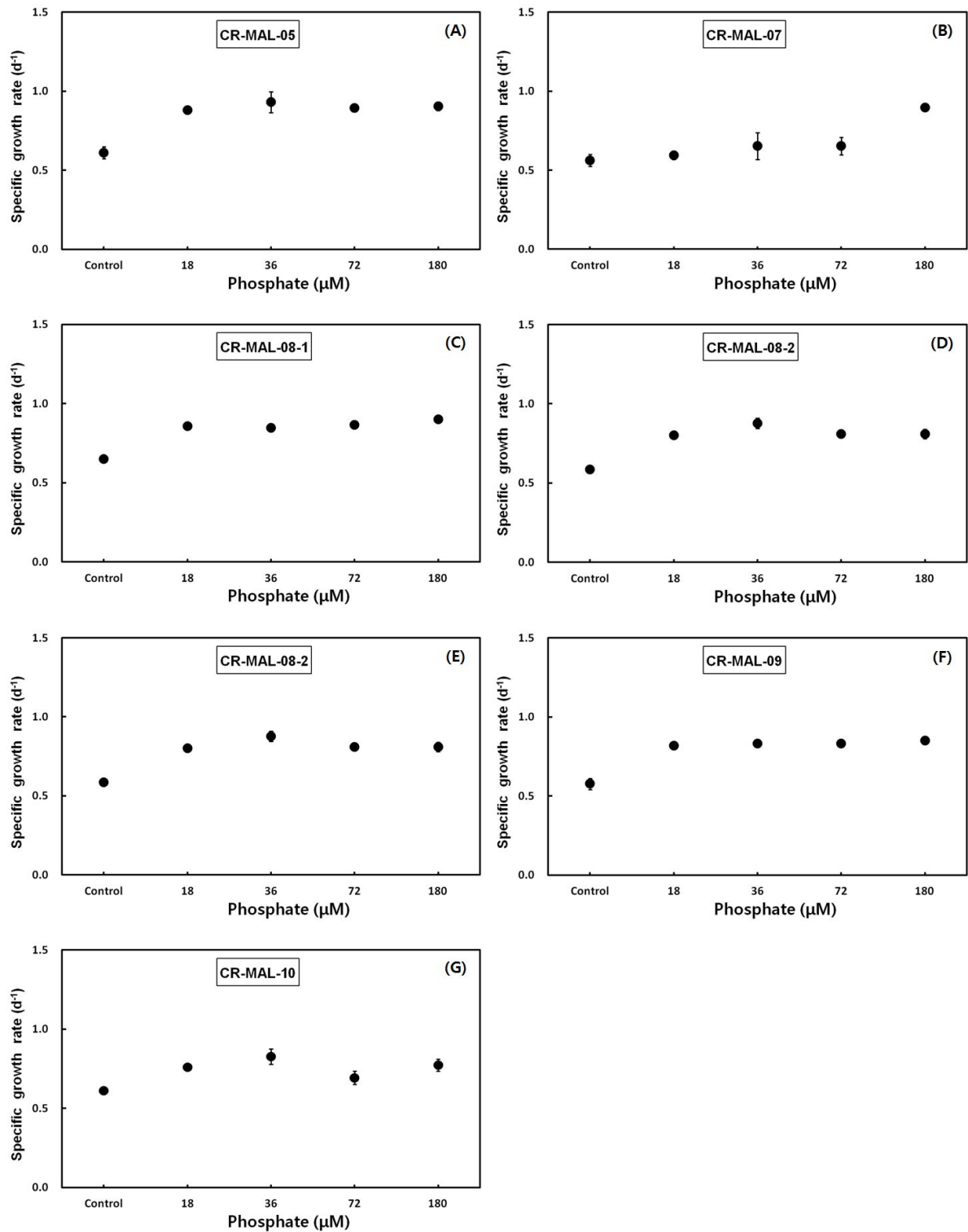


그림 1-11. 광생물 은편모류의 인산염 농도에 따른 일간성장률

표 1-7. 광생물 은편모류의 인산염 농도에 따른 최대 생물량 및 일간 성장률

종주번호	최대 생물량		최대 일간성장률	
	세포농도 ($\times 10^3 \text{ cells ml}^{-1}$)	인산염 (μM)	일간성장률 (d^{-1})	인산염 (μM)
CR-MAL05	919	18	0.930	36
CR-MAL07	868	180	0.895	180
CR-MAL08-1	633	36	0.900	180
CR-MAL08-2	681	18	0.876	36
CR-MAL09	926	180	0.849	180
CR-MAL10	672	18	0.828	36
CR-MAL11	1,375	180	0.727	180

4) 순환형 배양액 농도에 따른 성장반응

우수 광생물 먹이종주인 CR-MAL07과 CR-MAL08-2를 대상으로 순환형 배양액인 가축분뇨 발효액비의 첨가농도(0, 0.1, 0.3, 0.5, 1%)에 따른 성장실험에서 CR-MAL07는 1% 추가 공급시 성장이 가장 우수하였고, CR-MAL08-2는 0.5% 첨가시 성장 반응이 뚜렷하게 나타났다(그림 1-12). 발효액비의 농도가 증가할 수록 일간성장률이 증가하였으나, 두 종주 모두 3% 첨가시에는 오히려 낮게 나타났는데, 이는 3% 발효액비 첨가시 배양실험병의 색이 갈색으로 바뀌어 광합성을 위한 충분한 빛이 투과되지 못했기 때문인 것으로 판단된다. 또한 두 우수종주의 최대 생물량 및 지수성장시 최대 일간성장률은 CR-MAL07은 1%에서, CR-MAL08-2는 0.5%에서 가장 높게 나타났다(표 1-8).

표 1-8. 광생물 은편모류의 축산분뇨 발효액비 농도비율에 따른 최대 생물량 및 일간성장률

종주번호	최대생물량		최대 일간성장률	
	세포농도 ($\times 10^3 \text{ cells ml}^{-1}$)	비율 (%)	일간성장률 (d^{-1})	비율 (%)
CR-MAL07	260	1.0	0.553	1.0
CR-MAL08-2	217	0.5	0.794	0.5

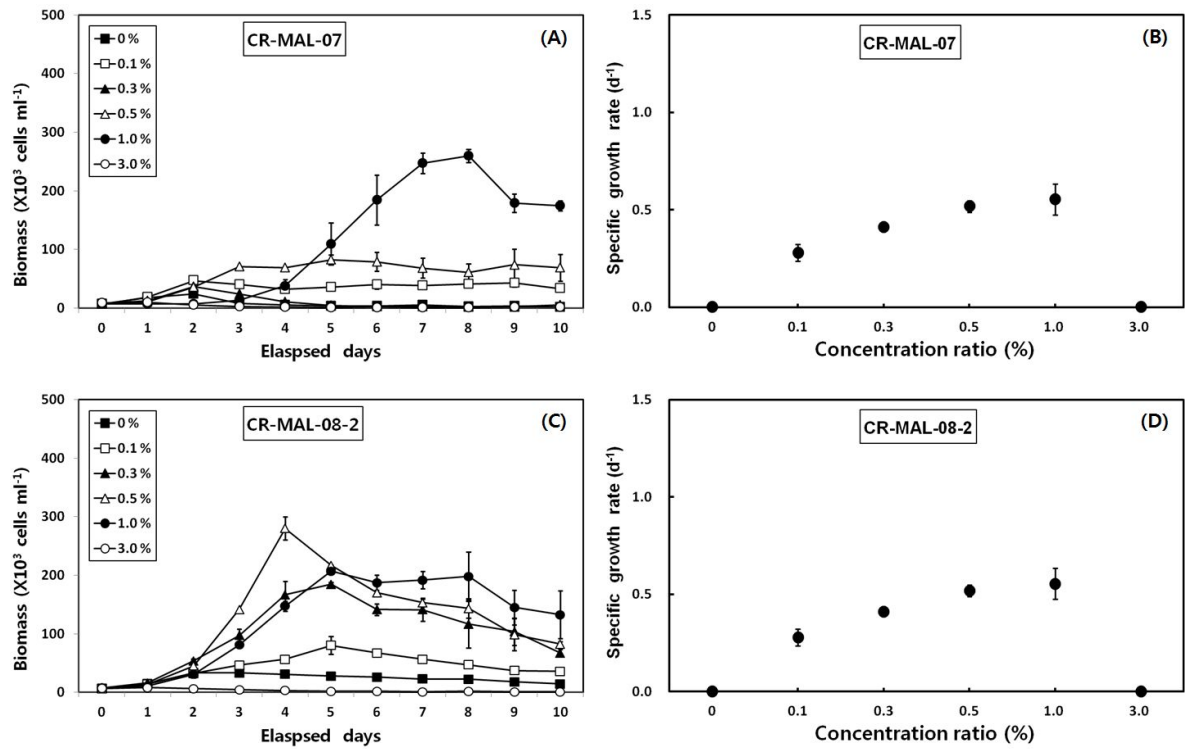


그림 1-12. 광생물 은편모류의 축산분뇨 발효액비 농도비율에 따른 일별 성장 및 일간성장률

제 2 절 광생물먹이의 대량배양기술 확립

1. 대량 배양체계 확립

가. 연구수행 방법

확보된 광생물 먹이인 은편모류 배양체를 성장반응 실험을 통해 얻어진 정보를 기초로 최적의 배양조건 및 성장상태를 유지하여 소규모 배양체로부터 중규모 및 대량(500L) 배양체로 확립하고자 하였다. 대량배양은 개선된 500L급 미세조류 대량배양 장치(광생물 반응기)를 통하여 실시하였고, 오염방지 및 최적 성장상태로 유지·관리하여, 배양체의 고밀도 증식 및 지속적 배양이 가능하도록 하였다. 각 종주별 대량 배양체는 생물특성을 유지하는 범위에서 최대 세포밀도를 보이는 시점을 기준으로 수확했으며, 수확시 농축방법은 고속연속원심분리기를 사용하였다.

나. 연구수행 결과

1) 중규모 배양체 확립

종주별 계대배양용 보존 배양체(100ml)를 f/2-Si 멸균해수 배양액이 담긴 500ml PC 병에 옮겨 소규모 배양단계에서 중규모(20L) 배양이 가능한 2L병 단계까지 주기적으로 계대배양을 하였으며, 계대배양시 배양량의 증가 시기는 은편모류 각 종주의 성장단계에서 대수증식기 중기에 해당하는 시점($200 \times 10^3 \sim 300 \times 10^3$ cells ml^{-1})을 기준으로 수행하였다. 이때 배양조건은 온도 20℃, 염분 30psu, 광도 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 이었다.

소규모 배양체의 계대배양을 통해 얻어진 사전 정보를 기초로 하여, 배양조건 및 최적 성장상태를 유지하면서 각 종주별로 중규모(20L) 배양체를 확립하고, 확립된 중규모 배양체는 다른 생물로부터의 오염방지 및 최적 성장상태 유지를 위하여 지속적으로 유지·관리하였고, 대량(500L) 배양에 앞서 증량을 위한 최적 세포농도 및 상태를 파악하였다 (그림 2-1).



그림 2-1. 광생물 은편모류의 중규모 배양체 확립

2) 대량 배양체 확립

가) 광생물반응기

광생물반응기는 배양에 필요한 환경(빛, 수온 등)의 인위적 조절 및 배양조 관리가 간편하고, 외부 오염을 최소화하면서 배양생물이 최적의 상태로 유지 및 성장할 수 있도록 고려하여 제작되었다.

은편모류 대량배양을 위한 배양조는 원통형으로 직경 0.8m, 높이 1.0m 이상의 500리터급 대량배양 장치로서, 유해물질의 유출이 적은 폴리카보네이트(Polycarbonate) 재질로 제작하여 생물화학적으로 안정적인 배양체의 유지 및 시각적 관찰이 가능하며, 광량과 온도 등 외부 환경요인의 조절을 용이하게 하였다.

원통형 수조의 중앙부에는 세로 방향으로 램프가 내장된 관을 삽입하여 배양생물의 효과적인 광합성을 위한 광량을 공급하도록 하였고, 배양조의 재질이 투명하기 때문에 고밀도로 배양될 경우, 부족한 빛을 수조 밖에서 램프를 설치할 수 있게 만들어져 있다.

수조 내부의 바닥면 중앙에는 폭기(Aeration)장치가 갖추어져 있어 배양체의 효율적인 교반을 통해 배양생물이 빛과 영양염류 등의 배양환경을 균등히 제공받을 수 있도록 하였고, 폭기장치는 공기정화장치(탄소카트리지필터와 자외선램프로 구성)를 통하여 멸균된 공기가 내부로 공급되도록 설계되어 있어 공기를 통한 오염원을 차단할 수 있다.

배양조의 하단에는 내부에서 외부로 배수가 가능한 파이프가 설치되어 있어, 대량 배양체의 농축을 위한 회수 및 배양조의 관리를 용이하도록 고안하였다(그림 2-2~3).

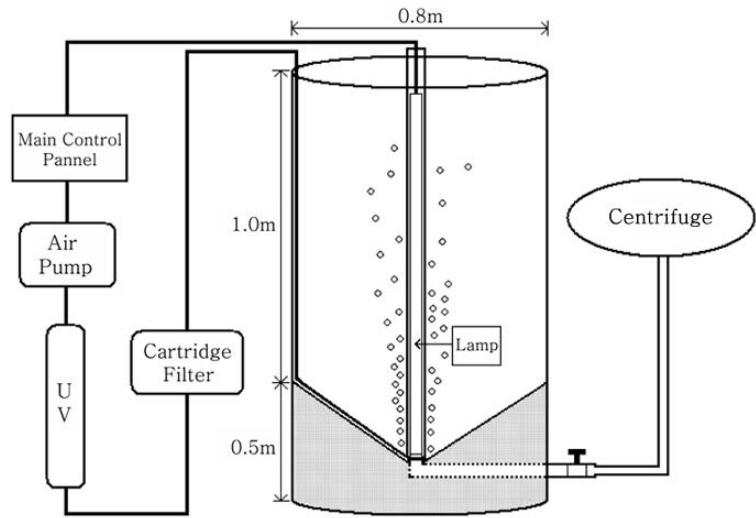
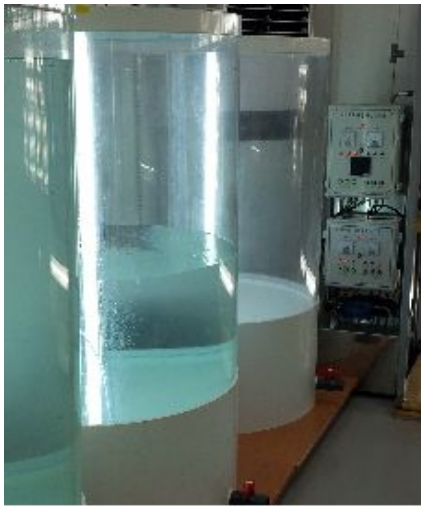


그림 2-2. 광생물 은편모류 대량배양을 위한 광생물반응기



그림 2-3. 광생물 반응기가 진열된 배양실

나) 대량 배양체계 구축

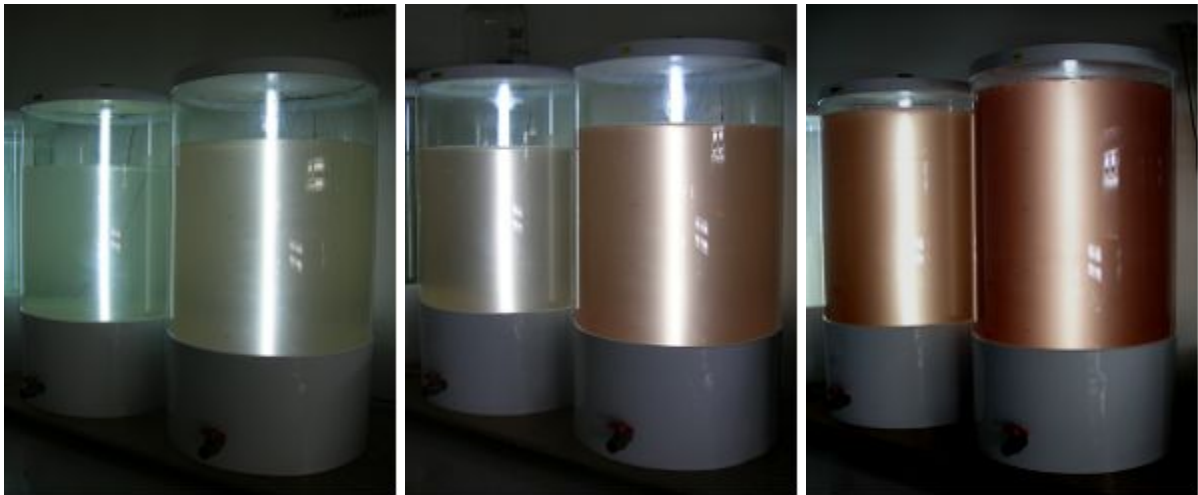
대량배양용 해수는 전북 군산시 연안해수이며, 1차 여과처리(모래·활성탄 여과장치)된 염분농도 30psu 이상의 해수를 공급받아 사용하였고, 대량배양실로 운반된 해수는 카드리지필터(입자규격 $1\mu\text{m}$)를 이용하여 미세입자를 제거한 후, 2~3일간 자외선 처리하거나 필요에 따라 가열처리하여 배양이 가능한 무균상태로 준비하였다. 대량배양을 위한 배양실 및 광생물반응기의 배양환경은 중규모 배양체와 유사한 조건(온도 20°C , 염분 30psu, 광도 $100\ \mu\text{E m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$)을 제공하도록 설정하고, 고밀도 대량배양을 위하여 대량배양 중기 이후 광원추가 설치 및 폭기량을 조절할 수 있도록 하였다.

대수증식 단계($200\times 10^3\sim 400\times 10^3\ \text{cells ml}^{-1}$)의 준비된 중규모 배양체를 접종가능 용량(40~100L)으로 확보한 시점을 최적 적용시기로 결정하였으며, 광생물반응기의 멸균배양액에 대수증식이 가능한 세포농도($10\times 10^3\sim 20\times 10^3\ \text{cells ml}^{-1}$)가 되도록 약 10~20%(v/v)로 중규모 배양체를 접종하였다. 광생물반응기에 접종한 이후 각 은편모류 종주별 생물특성(세포의 크기, 모양 및 움직임)을 최대한 유지하도록 관리하였고, 시간경과에 따른 세포수 변화를 광학현미경을 통해 관찰 및 계수하였다.

다) 종주별 대량 배양체의 확립

각각의 은편모류 종주를 대상으로 중규모(20L) 배양과정을 거쳐 대량배양(500L)을 시도하였으며(그림 2-4), 이 중 9개 종주(CR-MAL01, CR-MAL02, CR-MAL03, CR-MAL04, CR-MAL05, CR-MAL06, CR-MAL07, CR-MAL08-1, CR-MAL08-2)에 대하여 대량 배양체를 확립하였다.

대량배양 환경에서 은편모류 배양체의 성장유형은 배양초기(1~3일)까지는 뚜렷한 세포농도 증가 경향이 없었으나, 이 성장잠복기를 지난 후에는 하루에 2배 이상의 세포분열 속도를 보이며 급격히 세포농도가 상승하는 경향을 나타내었고, 이는 소규모·중규모 배양체에서의 성장유형과 동일하였다(그림 2-5). 각 종주별 대량 배양체의 배양종료 시점은 배양체의 성장유형상 대수증식기 말기를 기준으로 하였고, 배양소요 시간은 배양종주별 성장특성 및 초기 접종농도의 차이에 따라 다르게 나타났다.



(A) 대량배양 초기

(B) 대량배양 중기

(C) 대량배양 말기

그림 2-4. 광생물반응기를 이용한 대량배양 과정

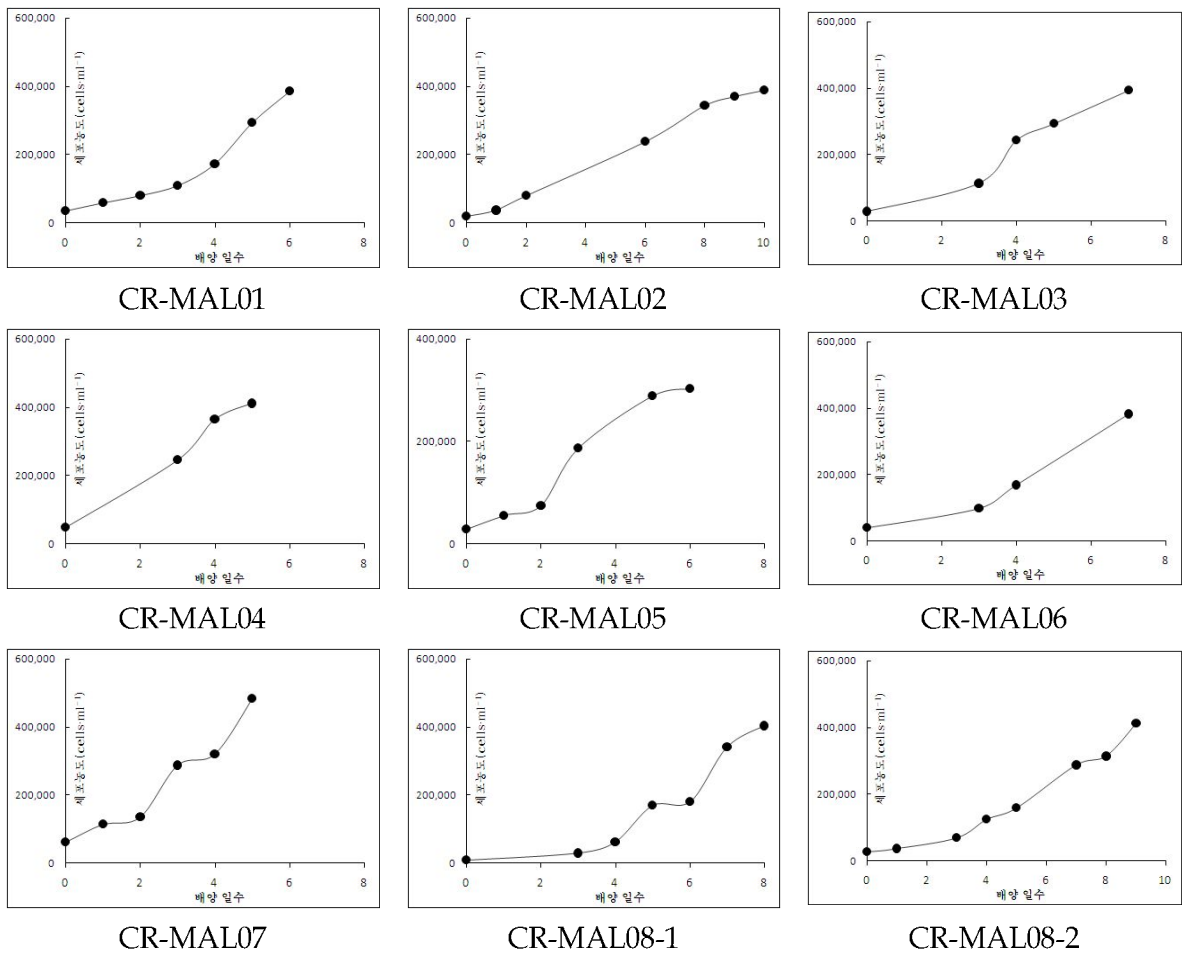


그림 2-5. 종주별 대량배양시 세포의 성장과정

3) 배양체 수확

가) 수확시기의 결정

배양체 농축을 위한 각 종주별 수확 시기는 대량 배양체의 배양종료 시점에 맞추어, 생물특성을 유지하면서 높은 성장속도 및 세포밀도를 보이는 대수증식기 말기를 기준으로 하였다. 이때 배양체 종주별 수확당시 세포밀도는 $303 \times 10^3 \text{ cells ml}^{-1}$ (CR-MAL05)~ $484 \times 10^3 \text{ cells ml}^{-1}$ (CR-MAL07) 범위이었다(표 2-1).

표 2-1. 광생물 은편모류 수확시 세포농도

종주번호	세포밀도 ($\times 10^3 \text{ cells ml}^{-1}$)	종주번호	세포밀도 ($\times 10^3 \text{ cells ml}^{-1}$)
CR-MAL01	386	CR-MAL06	382
CR-MAL02	389	CR-MAL07	484
CR-MAL03	394	CR-MAL08-1	403
CR-MAL04	411	CR-MAL08-2	413
CR-MAL05	303		

나) 배양체 수확 과정

대량 배양체의 수확은 고속연속원심분리기를 이용하여 배양체 내 수분(해수)을 일정 비율로 제거한 후, 배양체를 얻을 수 있도록 농축하는 과정이다. 광생물반응기와 시료주입 펌프로 연결된 고속연속원심분리기는 높은 회전속도(10,000rpm이상)로 장시간 동안 안정적 가동이 가능하며, 액상의 대량 배양체를 고밀도로 농축(최대 10,000배 이상)하는 것이 가능한 고효율의 농축장치로 각각의 대량 배양체는 1,000배 수준으로 농축하여 최종 용량이 500ml가 되도록 하였고, 각 종주별 농축 배양체의 세포농도는 약 $300 \times 10^6 \sim 400 \times 10^6 \text{ cells ml}^{-1}$ 범위이었다. 최종 농축 배양체는 영양성분 분석을 위하여, 즉시 암소에 냉장 및 냉동보관 처리하였다.

2. 일반 영양성분 분석

가. 연구수행 방법

대량 배양체로 확립된 9개 광생물 은편모류 종주를 대상으로, 먹이생물로서 영양학적 가치가 높은 우주종주를 선별하기 위하여 종주별 농축 배양체의 일반 영양성분(단백질, 지방, 탄수화물) 분석을 공인된 분석기관에 의뢰하였고, 성분분석을 위한 각 농축 배양체는 세포분해 및 성분 변질을 막기 위하여 화학적으로 안정한 PC병에 담아 암소에 냉동 보관한 후, 가급적 빠른 시간 내에 분석기관에 전달하였다.

일반 영양성분의 분석은 전라북도 생물산업진흥원에 의뢰하여 수행했으며, 분석결과는 성적서로 발급받았다. 일반 영양성분(단백질, 지방, 탄수화물) 분석을 위한 시험방법은 최신 식품공전(식품의약품안전청 고시 제2011-20호) 제 10항 일반 시험법에 따라 수행하였고, 항목별 시험법은 표 2-2와 같으며, 일반 영양성분의 시험결과는 검체 100g에 대한 질량 또는 백분율로 표시하였다.

표 2-2. 일반 영양성분별 분석 시험법

성분	분석 시험법
수분	건조감량법(상압가열건조법)
회분	고온(550~600℃)에서 회화처리 후 질량측정
(조)단백질	세미마이크로킬달법
(조)지방	에테르추출법
탄수화물	시료 100g중 수분, 회분, 단백질 및 지방의 양을 감하여 얻은 양

나. 연구수행 결과

1) 농축배양체의 일반 영양성분 함량

분석대상인 은편모류 농축 배양체는 액상의 검체로서, 9종류의 배양체에서 평균 수분 함량은 검체 100g에 대하여 약 95%, 회분 함량은 약 3% 내외로 나타났다. 배양생물인 은편모류는 전형적인 해양 미세조류로서 배양환경이 염분농도 약 30psu의 해수라는 점이 반영된 결과이다. 3대 영양소(단백질, 지방, 탄수화물)의 성분함량(mg/검체100g) 분석 결과, 단백질은 130~810 mg/100g, 지방은 10~290 mg/100g, 탄수화물은 370~1,600 mg/100g으로 다양하게 나타났다(표 2-3).

표 2-3. 광생물 먹이종주별 농축 배양체의 일반 영양성분 분석 결과

종주번호	단백질 (mg/100g)	지방 (mg/100g)	탄수화물 (mg/100g)
CR-MAL01	810	170	370
CR-MAL02	440	280	810
CR-MAL03	340	290	820
CR-MAL04	130	230	790
CR-MAL05	250	80	950
CR-MAL06	500	80	930
CR-MAL07	630	60	860
CR-MAL08-1	590	10	1,600
CR-MAL08-2	630	140	750

3대 영양소의 성분함량 비율(%)은 각 먹이종주에 따라 다소 차이를 보였는데(그림 2-6), 고단백질(40% 이상)의 배양체는 CR-MAL01, CR-MAL07, CR-MAL08-2이었고, 고지방(18% 이상)의 배양체는 CR-MAL02, CR-MAL03, CR-MAL04이었으며, 고탄수화물(60% 이상)의 배양체는 CR-MAL04, CR-MAL05, CR-MAL06, CR-MAL08-1이었다.

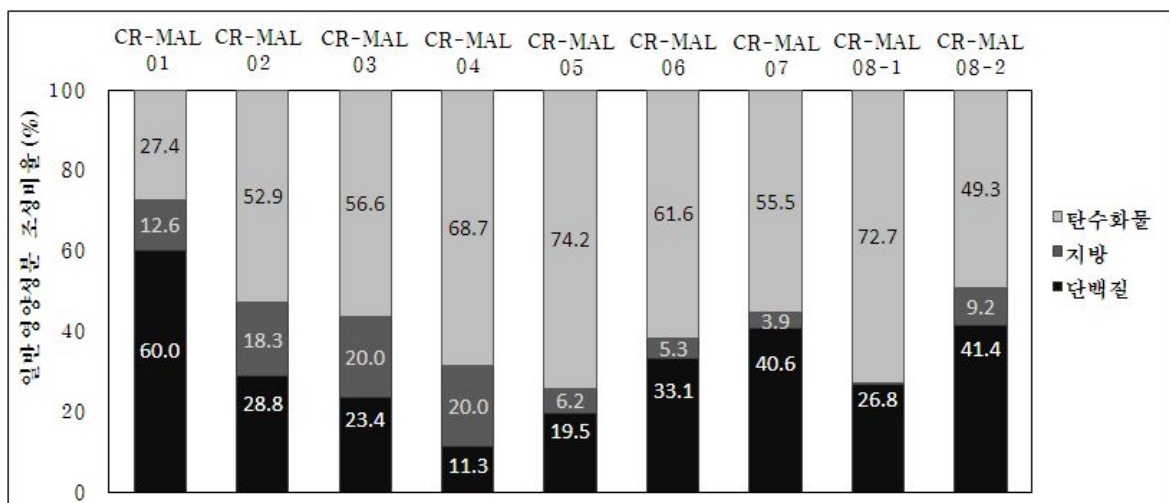


그림 2-6. 종주별 농축배양체의 일반영양성분 조성비(수분 및 회분을 제외한 조성율, %)

2) 우수 종주의 선정

은편모류 농축 배양체 CR-MAL01, CR-MAL07, CR-MAL08-2 종주는 일반 영양성분 중 단백질이 각각 60.0%, 40.6%, 41.4%의 함량 비율로서 다른 종주에 비하여 높은 단백질 함량비를 보였고(그림 2-6), 영양성분 중 단백질은 생물조직, 효소, 호르몬 등의 주 구성성분임은 물론 체내 합성이 용이하지 않은 필수아미노산을 공급해주는 영양소로서, 영양학적 가치가 가장 높은 성분이다.

고단백질의 은편모류 배양체는 양식용 먹이생물 및 영양보충제로서 활용하기 위한 연구가치가 높은 것으로 판단되며, 본 연구의 대상 배양종주 중 CR-MAL01, CR-MAL07, CR-MAL08-2의 3개 종주를 우수 종주로 선정하였다.

3. 고밀도 대량배양기술 적용

가. 연구수행 방법

대량 배양체 확립과정 및 일반 영양성분 분석 과정을 통해 우수한 종주로 선정한 은편모류 배양종주를 대상으로, 배양액의 종류에 따른 성장속도를 측정하고 최대 세포밀도를 나타내는 조건을 탐색함으로써, 일반 배양조건보다 더 높은 배양밀도를 유도할 수 있는 효율적 배양기술을 수립하고, 이를 적용하여 향후 우수 광생물 먹이종주의 대량생산을 위한 비용절감 효과를 보고자 하였다.

1) 연구 대상종의 선정

일반 영양성분(단백질, 지방, 탄수화물) 분석 결과, 단백질 함량비가 높은 배양종주(CR-MAL01, CR-MAL07, CR-MAL08-2) 중에서 최대 세포밀도까지 도달하는 성장속도가 빠르고 비교적 높은 세포밀도를 보이는 종주(CR-MAL07)를 우선적으로 선정한 후, 색소체 및 기타 기능성물질의 추출 가능성이 높은 종주(CR-MAL07, CR-MAL08-2)를 고려하여 선정하였다.

고밀도 대량배양을 위한 연구대상 종주로 CR-MAL07과 CR-MAL08-2 종주를 최종 선정하였고, 기존 은편모류 배양종주와 다른 색소체(녹색)를 가지는 것으로 판단되는 신규 분리종주 CR-MAL10을 연구대상 종주로 추가하여 연구를 수행하였다. .

2) 대량배양 환경

대량배양을 실시하기 위한 일반적인 과정은 배양체계 확립 과정에서의 방법과 유사

하나, 배양액(배지)의 종류를 달리하여 실시하였다. 배양환경은 확립된 배양체의 배양조건과 동일한 표준조건(온도 20℃, 염분 30psu, 광도 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)을 제공하도록 설정하고, 배양체의 성장능력을 증가시키고 고밀도 대량배양이 가능하도록 대량배양 중기 이후 광원추가 설치 및 폭기량을 조절하였다. 광원의 추가로 인하여 대량 배양조 내부로 공급되는 광량은 최소 100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 최대 200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 범위이며, 배양후기 세포밀도 증가에 따른 광량의 부족을 해소하고 활발한 광합성을 유도하여 최대의 배양밀도를 얻고자 하였다.

대수증식 단계($200 \times 10^3 \sim 400 \times 10^3 \text{ cells ml}^{-1}$)의 준비된 중규모 배양체를 접종가능 용량(40~100L)으로 확보한 시점을 최적의 대량배양 적용시기로 결정하고, 광생물반응기에 준비된 각기 다른 배양액 성분의 평균배양액에 대수증식이 가능한 세포농도($10 \times 10^3 \sim 20 \times 10^3 \text{ cells ml}^{-1}$)가 되도록 약 10~20%(v/v)로 중규모 배양체를 접종하였다.

광생물반응기에 초기 접종한 이후 각 은편모류 종주별 생물특성(세포의 크기, 모양 및 움직임)을 최대한 유지하도록 관리하였고, 시간경과에 따른 세포수 변화를 현미경 검경을 통해 관찰 및 계수하였다.

3) 배양액 조건

배양액(영양염) 종류에 따라 최대 성장조건의 탐색 및 영양성분 함유 조건을 알아보기 위하여, 질소·인·기타 미량성분 등의 함유량 및 조성률이 다른 4종류(f/2-Si, 복합·요소비료, 복합·유안비료, 가축분뇨 발효액비)의 배양액을 사용하였고, 배양액의 종류와 제조에 따른 성분별 최종 농도는 표 2-4와 같다.

배양액의 원료 중 f/2-Si 배양액은 미세조류의 성장에 필요한 필수 영양원소인 질소와 인은 물론, 비타민, 미량금속 등 다양한 성분으로 구성된 해양 미세조류 배양의 표준 배양액이고, 복합·요소비료는 시판되고 있는 농업용 복합비료와 요소비료를 혼합한 것으로, 수산양식용 광생물먹이 배양을 위한 대규모 옥외배양시 널리 사용되는 비료원이며, 배양액 1톤을 기준으로 복합비료 120g과 요소비료 160g의 혼합비율로 제조하였다. 또한 복합·유안비료는 복합비료와 유안비료를 혼합한 것으로, 복합·요소비료와는 질소원만 다르며 혼합 비율은 동일하게 제조하였다.

가축분뇨 발효액비는 가축분료를 발효시켜 제조된 친환경성 농축액상 비료이며, 재생액체비료 고유의 진한 색상을 띠고 있었고, 이전의 소규모 성장반응 실험 결과를 고려하여 최종 배양액 농도를 1%가 되도록 제조하였다.

표 2-4. 대량배양에 사용된 배양액의 종류와 주요성분 및 농도

원소	f/2-Si	복합 · 요소	복합 · 유산	가축분뇨 발효액비				
질소(N)	NaNO ₃	883	Total Nitrogen	1542	Total Nitrogen	1542	Total Nitrogen	20.4
			Urea, CO(NH ₂) ₂	5254	(NH ₄) ₂ SO ₄	5254		
인(P)	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	36	Water soluble Phosphate	697	Water soluble Phosphate	697	Total Phosphate	1.6
칼륨(K)	-	-	Water soluble Potassium oxide	553	Water soluble Potassium oxide	553	ND	
미량금속	FeCl ₃ · 6H ₂ O	11.7	Iron EDTA chelated	0.213	Iron EDTA chelated	0.213	ND	
			Water soluble Magnesium	69.1	Water soluble Magnesium	69.1		
	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	11.7						
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.04	Copper EDTA chelated	0.168	Copper EDTA chelated	0.168		
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.03	Water soluble Molybdenum	0.001	Water soluble Molybdenum	0.001		
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.08	Zinc EDTA chelated	0.180	Zinc EDTA chelated	0.180		
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.9	Manganese EDTA chelated	0.190	Manganese EDTA chelated	0.190		
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.04						
기타	-	-	Water soluble Boron	1.0	Water soluble Boron	1.0	ND	
비타민	Vitamin B12	0.3						
	Biotin	0.002	-		-		ND	
	Thiamine HCl	0.004						

(숫자는 농도단위로서 μM이며, ND는 데이터가 없음을 의미함.)

4) 최적 수확시기 결정을 위한 성장특성 분석

최대 세포밀도의 배양체를 최적의 시기에 수확하기 위하여 배양체의 성장상태를 수시로 확인하였으며, 매일 동일한 시간에 계수용 샘플을 채취하여 Lugol 용액으로 고정한 다음, 세포를 직접 광학현미경하에서 계수하여 시간에 따른 배양체의 성장을 분석하고, 최적의 수확시기 및 배양소요 시간을 결정하였다. 효율적인 배양조건의 탐색 및 연구대상 종주의 최대 성장능력을 알아보기 위하여, 배양기간 중 시간경과에 따른 생물량 증감결과를 근거로 성장률을 계산하였다.

성장률(μ)은 단위시간(일)에 따른 성장속도를 의미하며, 계산식은 아래와 같다.

$$\text{성장률}(\mu) = (\ln N - \ln N_0) / t$$

N_0 : 초기 세포수

N : t 시간 경과 후의 세포수

나. 연구수행 결과

1) 배양액 종류에 따른 대량배양

가) 대량배양 실시

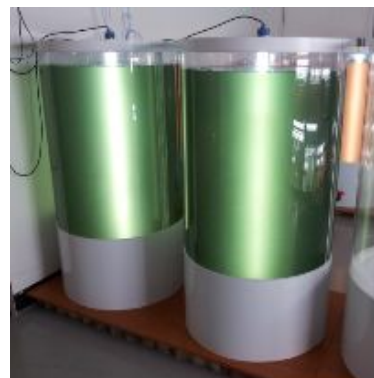
은편모류 3개 종주(CR-MAL07, CR-MAL08-2, CR-MAL-10)의 중규모(20리터)의 배양체를 접종가능 용량(40~100L)으로 확보한 후, 4종류(f/2-Si, 복합·요소비료, 복합·유안비료, 축산액체비료)의 배양액이 준비된 500L급 광생물반응기에 접종하여 대량배양을 실시하였다(그림 2-7).



CR-MAL07



CR-MAL08-2



CR-MAL10

그림 2-7. 종주별 대량 배양 과정

나) 배양액 종류에 따른 영향

4종류의 배양액 조건 중에서 f/2-Si, 복합·요소비료, 가축분뇨 발효액비를 이용하여 제조된 3종류의 배양액 환경에서는 은편모류 종주 모두에서 뚜렷한 성장 및 건강한 세포 상태를 보였다. 복합·유안비료 배양액에서는 배양체의 성장이 전혀 일어나지 않았으며, 배양초기 대부분의 세포가 사멸하여 배양체 확립이 불가능하였다. 복합·유안 비료는 질소, 인, 칼륨이 주성분으로 구성된 농업작물용 수용성 복합비료에 황산암모늄이 주성분인 유안비료를 첨가해 조제된 것으로서 은편모류 대량배양체 확립을 위한 배양액의 원료로는 부적합한데, 고농도의 암모니아가 세포사멸을 유도한 것으로 판단된다(그림 2-8).

이후의 모든 결과 자료는 f/2-Si, 복합·요소비료, 가축분뇨 발효액비 배양액 환경에서의 연구결과이다.

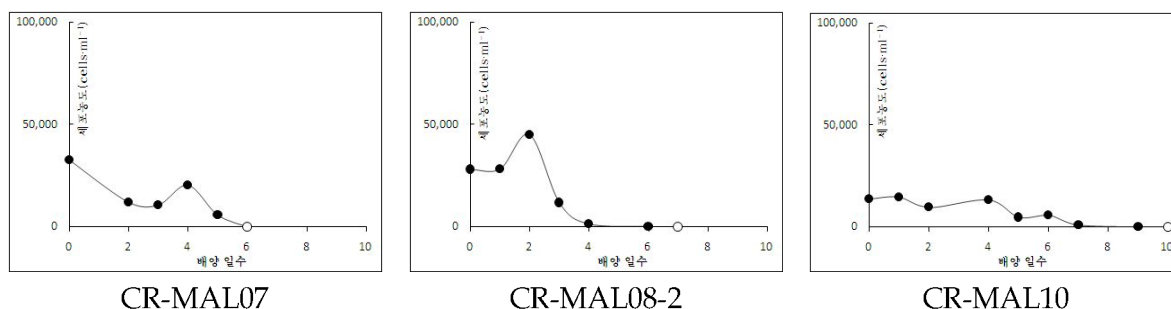


그림 2-8. 복합·유안비료 배양액 환경에서의 배양체 성장

2) 배양액 종류에 따른 종주별 성장특성

가) 종주별 세포밀도

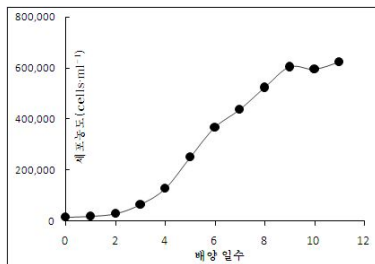
은편모류 종주 3종류 모두 전반적으로 유사한 성장패턴을 보였으나, 배양액 환경에 따라 일정 구간에서의 성장속도 차이에 의해 배양체 최대밀도에 도달하는 시점이 각기 다양하게 나타났다(그림 2-9). 대체적으로 f/2-Si 배양액 환경에서 모든 은편모류가 좋은 성장과 높은 세포밀도를 보였으며, 이는 배양액의 주요성분을 나타낸 표 2-4에서 보는 바와 같이 f/2-Si 배양액이 복합-요소 비료에 비하여 총 질소량은 적으나 미세조류 성장에 필요한 다양한 성분들을 함유한다는 점에서 기인된 차이로 보인다.

은편모류 종주 3종류 모두 f/2-Si 배양액 환경에서 $530 \times 10^3 \sim 620 \times 10^3$ cells ml⁻¹ 이상의 최대 세포밀도를 나타냈고, CR-MAL07과 CR-MAL08-2 종주는 가축분뇨 발효액비 배양액 환경에서 상대적으로 $450 \times 10^3 \sim 490 \times 10^3$ cells ml⁻¹의 낮은 세포밀도를 보였으며, CR-MAL10 종주는 복합·요소비료 배양액 환경에서 480×10^3 cells ml⁻¹로 최대 세포밀도

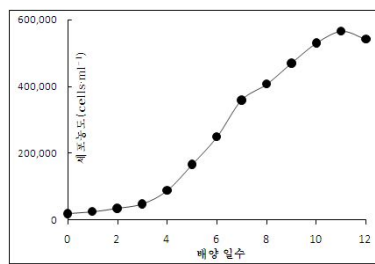
에 미치지 못하는 성장을 보였다. 각 배양액 환경조건에 따른 은편모류 종주별 성장과정 및 최대 세포밀도는 그림 2-9와 표 2-5에 나타내었다. .

표 2-5. 종주별 배양액 조건에 따른 최대 세포농도

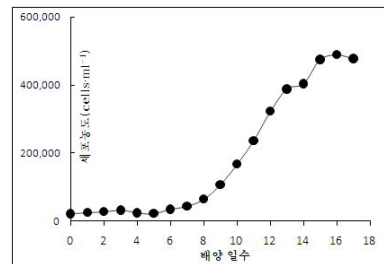
배양액 조건 종주명	f/2-Si ($\times 10^3$ cells m^{-1})	복합·요소비료 ($\times 10^3$ cells m^{-1})	가축분뇨 발효액비 ($\times 10^3$ cells m^{-1})
CR-MAL07	623	565	489
CR-MAL08-2	526	458	446
CR-MAL10	636	481	616



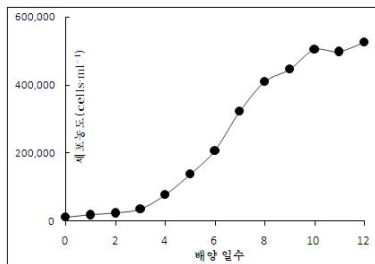
CR-MAL07 (f/2-Si)



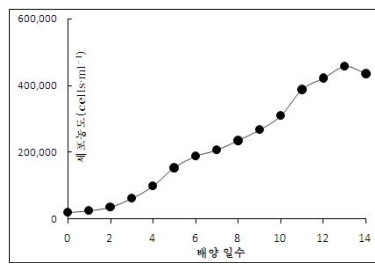
CR-MAL07(복합·요소비료)



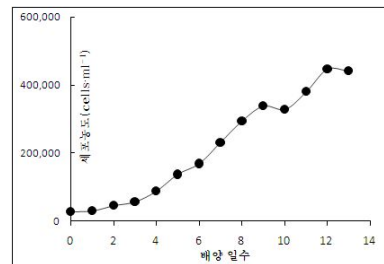
CR-MAL07(가축분뇨 발효액비)



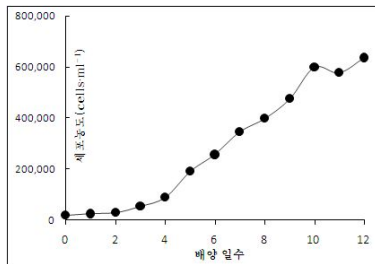
CR-MAL08-2 (f/2-Si)



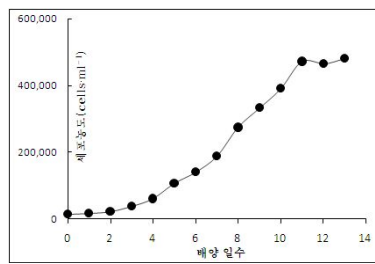
CR-MAL08-2(복합·요소비료)



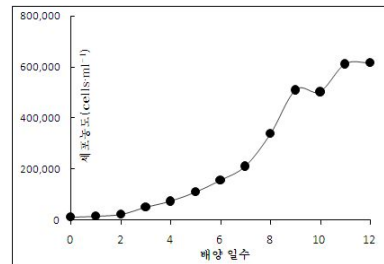
CR-MAL08-2(가축분뇨 발효액비)



CR-MAL10 (f/2-Si)



CR-MAL10 (복합·요소비료)



CR-MAL10(가축분뇨 발효액비)

그림 2-9. 종주별 배양액 조건에 따른 성장과정

나) 종주별 성장률

은편모류 배양체는 대량배양시 초기를 지나 중기(대수증식기)에 접어들면서 급격히 생물량이 증가하는데, 단위시간(일)당 성장속도는 그 중 고유의 성장특성을 나타내는 지표가 되며, 각 배양조건에 따른 종주별 최대 성장률은 표 2-6과 같다. 최대 세포농도를 보인 배양액 조건과 유사하게, 최대 성장률 또한 전반적으로 f/2-Si 배양액 조건에서 비교적 높은 수치를 보였으며, CR-MAL07과 CR-MAL10 종주는 f/2-Si 배양액 조건에서 각각 0.805, 0.798의 최대 성장률을, CR-MAL08-2 종주는 가축분뇨 발효액비 배양액 조건에서 0.763의 최대 성장률을 기록하였다. 이는 세포수가 두 배로 증가하는 소요시간이 1일 미만(약 20~22시간)이라는 의미로서, 효율적 대량 배양을 위한 우수종주로 판단할 수 있는 지표가 된다.

표 2-6. 종주별 배양액 조건에 따른 최대 일간성장률(μ)

종주명	배양액 조건		
	f/2-Si	복합·요소비료	가축분뇨 발효액비
CR-MAL07	0.805	0.559	0.447
CR-MAL08-2	0.759	0.594	0.763
CR-MAL10	0.798	0.640	0.511

3) 고밀도 대량배양을 위한 조건 및 우수종주

가) 배양액 조건의 영향

미세조류 배양체의 성장을 위한 기본 환경인자는 물, 온도, 빛, 영양염, 배양조 구조 및 물리적 요인 등으로 다양하고, 이 중 충분한 빛, 영양염, 이산화탄소의 공급은 광합성 효율을 증가시키고 성장을 촉진시키는 중요한 요소이다. 본 연구에서 대량 배양은 충분한 광량의 공급과 폭기를 통해 이산화탄소(CO₂)를 공급하여 배양체의 성장을 극대화하고, 최대 세포밀도를 나타낼 수 있는 배양액 조건을 탐색함으로써 500x10³ cells ml⁻¹ 이상 높은 세포밀도의 배양결과를 얻었다.

표준 배양액인 f/2-Si 배양액과 비교적 가격이 저렴하고 대규모 사용이 용이한 복합·요소비료 및 가축분뇨 발효액비 배양액을 조건으로 하여 성장특성을 분석해 본 결과, 전반적으로 표준 배양액인 f/2-Si 배양액 조건에서 배양체의 세포밀도가 높았으며, 생물

의 성장속도도 높았다. f/2-Si 배양액의 경우 다량의 영양염 농도, 질소, 인, 비타민 등과 같이 성장을 촉진시키는 성장인자가 충분하고 미량 영양염 조성이 좋은 배양액으로서, 상대적으로 농축산용 비료를 이용한 배양액에 비하여 생물성장을 극대화시킨 것이라 판단된다.

나) 고밀도 대량배양을 위한 우수종주

대량의 배양체를 연속적으로 생산하기 위해서는 우선적으로 배양생물이 최대 성장속도를 가지고 최대 세포밀도를 보이는 성장능력을 보유하여야 하는데, 전반적으로 모든 종주가 f/2-Si 배양액 조건에서 높은 세포밀도와 성장률을 기록했으나, CR-MAL07 종주의 경우 다른 배양액 조건에서와 확연히 다른 높은 세포밀도와 성장률을 보임으로써, 고밀도 연속 대량배양을 위한 잠재적 우수종주로 판단된다.

4. 우수종주의 일반 영양성분, 아미노산 및 지방산 분석

가. 연구수행 방법

배양액 종류에 따라 고밀도로 배양된 각각의 은편모류 종주 배양체를 농축하여 수확한 후, 일반 영양성분(단백질, 지방, 탄수화물), 아미노산 및 지방산 함량과 조성을 분석하여 최대 영양성분을 함유하는 조건 및 배양종주를 선별하였다.

1) 배양체의 수확

배양체 농축을 위한 각 종주별 수확방법은 '대량 배양체 확립' 과정에서의 방법과 동일하며, 수확시기는 대수증식기 말기를 기준으로 농도변화 추이를 관찰하여 배양체의 성장이 정지하지 않는 범위 내에서 최대농도를 보이는 시점으로 결정하였다. 고속원심분리기를 통하여 수확한 각각의 최종 농축배양체(그림 2-10)는 세포의 분해 및 성분의 변질을 막기 위하여 화학적으로 안정한 용기인 PC병(1L)에 담아 암소에 냉동 보관하였다.

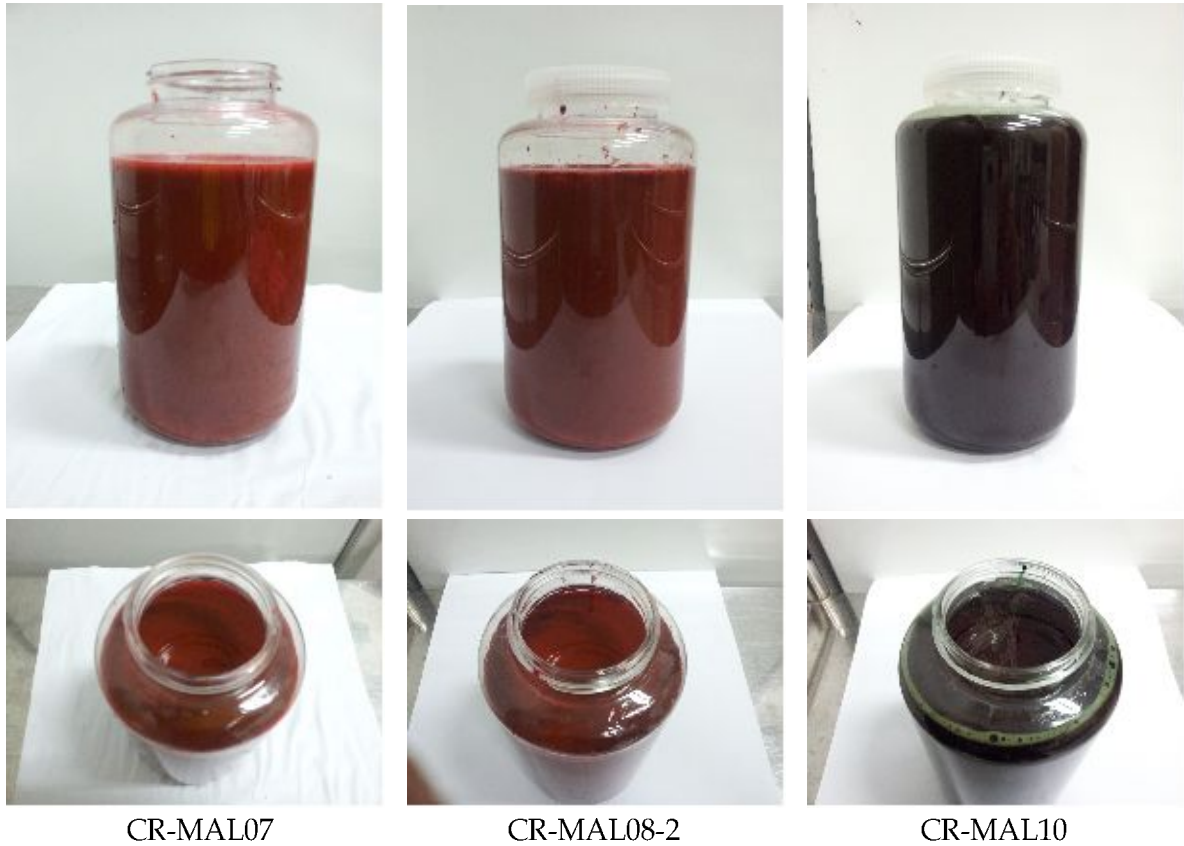


그림 2-10. 종주별 최종 농축배양체

2) 분석 의뢰 및 분석 항목별 시험법

3종류의 배양액 조건에 따라 대량 배양체로 확립된 3개 은편모류 종주를 대상으로, 최대 영양성분 함유 조건을 파악하고, 먹이생물로서 영양학적 가치 및 향후 건강보조식품으로의 응용 가능성을 판단하기 위하여 종주별 농축 배양체의 일반 영양성분(단백질, 지방, 탄수화물), 아미노산 및 지방산의 분석을 공인된 분석기관에 의뢰하였고, 성분분석을 위한 각 농축 배양체는 세포분해 및 성분변질을 막기 위하여 화학적으로 안정한 PC병에 담아 암소에 냉동 보관한 후, 가급적 빠른 시간 내에 분석기관에 전달하였다. 분석은 신라대학교 식품분석센터에 의뢰하였으며, 분석결과는 성적서로 발급받았다.

일반 영양성분(단백질, 지방, 탄수화물), 아미노산 및 지방산의 분석을 위한 시험방법은 최신 식품공전(식품의약품안전청 고시 제2012-17호) 제 10항 일반시험법에 의거하였으며, 항목별 시험법은 표 2-7과 같다. 분석결과의 표기는 일반영양성분 및 아미노산 항목은 검체 100g당 성분함유량(mg)으로 나타냈고, 지방산 항목은 총 지방산량에 대한 조성률(%)로서 나타냈다.

표 2-7. 일반 영양성분, 아미노산 및 지방산의 분석 항목별 시험법

성 분	분석 시험법
수 분	건조감량법(상압가열건조법)
회 분	고온(550~600℃)에서 회화처리 후 질량측정
(조)단백질	단백질 분석기를 이용하는 방법
(조)지 방	뢰제 · 곱트리브법
탄수화물	탄수화물 분석법(식품공전 1.1.4항 탄수화물)
아미노산	아미노산 자동분석기에 의한 정성 및 정량
지 방 산	제2법(1.1.5.4. 지방산)

나. 연구수행 결과

1) 일반 영양성분

배양조건에 따라 종주간 다소 차이를 보였으나, 전반적으로 f/2-Si 배양액과 복합·요소비료 배양액과 같은 질소원이 풍부했던 조건에서 비교적 단백질 함량 및 영양성분조성비가 좋은 결과를 보였고, 가축분뇨 발효액비 배양액 조건에서는 단백질 함량이 낮고 탄수화물 함량이 높은 경향을 보였다.

CR-MAL07 은편모류 농축배양체는 f/2-Si 배양액 조건에서 검체 100g당 약 1.3g의 단백질 함량을 보였으며, 이는 수분 및 회분을 제외한 성분조성비로 보면 단백질 함유량이 65%를 상회하는 높은 수치로서 최대 영양성분(고단백질)함유 조건 및 종주로 판단된다. 각 배양액 조건별 일반영양성분 함유량 및 성분 조성률은 표 2-8과 표 2-9와 같다.

표 2-8. 종주별 배양액 조건에 따른 일반 영양성분 분석 결과 (성분함량mg/검체100g)

일반성분	CR-MAL07			CR-MAL08-2			CR-MAL10		
	f/2-Si	복합-요소 비료	가축분뇨 발효액비	f/2-Si	복합-요소 비료	가축분뇨 발효액비	f/2-Si	복합-요소 비료	가축분뇨 발효액비
단백질	1290	500	840	820	570	780	850	840	500
지방	250	120	160	200	120	120	230	100	80
탄수화물	420	390	750	760	880	1170	960	800	1040

표 2-9. 최대 영양성분 함유(고단백질) 배양액 조건 및 일반 영양성분 조성률
(수분 및 회분을 제외한 성분조성율, %)

종주번호	최대 영양성분 함유 배양액 조건	일반영양성분 조성률(%)		
		탄수화물	단백질	지방
CR-MAL07	f/2-Si	21.4	65.8	12.8
CR-MAL08-2	f/2-Si	42.7	46.1	11.2
CR-MAL10	복합·요소 비료	47.3	49.7	5.9

2) 아미노산

은편모류 농축 배양체의 구성 아미노산 함유량 분석결과, 해산어류에 필요한 10종류의 필수아미노산 모두를 포함하여 총 18종류의 아미노산이 은편모류 배양체로부터 검출되었다. 아미노산 중 필수아미노산의 비율은 모든 종주에 근사한 범위인 50%내외로 나타났다. f/2-Si배양액 조건의 CR-MAL08-2이 가장 높은 51.5%, 복합·요소비료 배양액 조건의 CR-MAL07이 가장 낮은 44.5%의 비율을 보였으며, 모든 종주가 f/2-Si 배양액 조건에서는 상대적으로 높은 필수아미노산 함량 비율을 보였다(표 2-10, 그림 2-11).

3) 지방산

일반 영양성분 결과를 근거로 은편모류 농축배양체의 지방성분 비율은 5~10% 내외로서, 다른 일반성분에 비하여 높은 조성비율은 아니나, EPA, DHA, 리놀레닌산(EPA, DHA의 전구물질) 등의 오메가3-불포화지방산을 비롯하여 다양한 양질의 지방산을 함유하고 있는 것으로 나타났다(표 2-11). 지방산 중 불포화지방산의 비율도 종주에 따라 최소 41.2%(CR-MAL07, 복합·요소비료조건)에서 최대 56.6%(CR-MAL10, f/2-Si 배양액 조건) 범위로 일반적인 미세조류보다 높은 비율을 보이며, 포화지방산을 제외한 미분류 기타 지방산 성분이 40% 내외임을 감안할 때, 불포화지방산의 비율이 보다 더 높을 가능성이 있다(그림 2-12). 오메가3-지방산(DHA, EPA, Linolenic Acid)의 조성비는 최소 37.4%(CR-MAL07, 복합·요소비료 조건)에서 최대 50.6%(CR-MAL10, f/2-Si 배양액 조건) 범위로 불포화지방산 성분의 대부분인 약 90%를 구성하였다.

표 2-10. 종주별 배양액 조건에 따른 아미노산 함량분석 결과 (성분별 함량mg/검체100g)

아미노산	CR-MAL07			CR-MAL08-2			CR-MAL10		
	f/2-Si	복합요소 비료	가축분뇨 발효액비	f/2-Si	복합요소 비료	가축분뇨 발효액비	f/2-Si	복합요소 비료	가축분뇨 발효액비
Alanine	66.0	22.0	61.0	70.2	41.4	62.7	92.6	64.4	48.1
Arginine*	47.0	26.0	43.0	35.6	28.4	43.8	40.5	37.1	24.9
Aspartic acid	93.0	33.0	86.0	76.4	56.5	82.8	96.5	76.0	48.7
Cystine	11.0	3.0	9.0	-	6.2	11.1	-	8.3	0.9
Glutamic acid	86.0	30.0	81.0	74.8	50.5	75.1	106.0	69.1	50.7
Glycine	47.0	17.0	46.0	51.9	27.7	42.9	62.4	40.7	29.0
Histidine*	16.0	6.0	14.0	18.4	9.1	13.6	19.7	10.8	10.3
Isoleucine*	27.0	9.0	23.0	49.7	21.1	30.5	45.9	26.5	18.1
Leucine*	63.0	22.0	57.0	71.9	42.6	62.5	80.8	57.0	41.5
Lysine*	57.0	19.0	47.0	37.5	36.2	50.6	68.6	54.7	37.7
Methionine*	15.0	1.0	13.0	-	10.7	16.4	-	16.8	1.4
Phenylalanine*	38.0	14.0	36.0	42.5	24.2	36.8	44.7	32.7	22.6
Proline	42.0	13.0	38.0	47.1	23.7	33.4	42.1	31.9	15.1
Serine	51.0	17.0	44.0	30.9	31.0	45.5	36.2	39.4	17.4
Threonine*	44.0	15.0	41.0	52.7	26.8	38.1	56.5	33.1	11.2
Tryptophan*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tyrosine	41.0	13.0	39.0	-	22.2	33.1	-	27.9	-
Valine*	43.0	13.0	40.0	64.8	34.8	49.1	75.7	47.3	35.6

* 표시 성분은 어류의 필수아미노산임

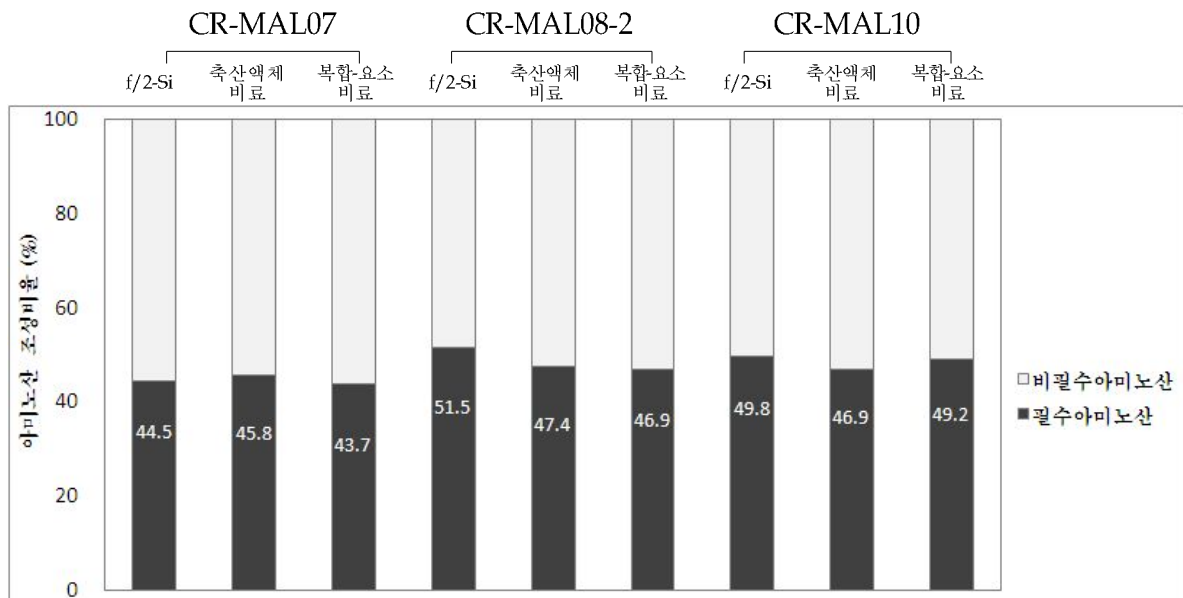


그림 2-11. 종주별 배양액 조건에 따른 구성 아미노산 중 필수아미노산 함량 조성비(%)

표 2-11. 종주별 배양액 조건에 따른 지방산분자의 조성 비율(%)

지방산	탄소수: 중합수	CR-MAL07			CR-MAL08-2			CR-MAL10		
		f/2-Si	복합-요소 비료	가축분뇨 발효액비	f/2-Si	복합-요소 비료	가축분뇨 발효액비	f/2-Si	복합-요소 비료	가축분뇨 발효액비
Caproic Acid	C6:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lauric Acid	C12:0	-	-	-	-	0.4	0.3	-	0.7	1.8
Myristic Acid	C14:0	1.7	0.4	3.1	1.3	0.6	2.0	2.3	0.8	2.6
unid. fatty acid.1	C15:0	0.1	0.2	0.2	-	-	-	-	-	-
Palmitic Acid	C16:0	6.9	9.7	7.4	9.1	6.3	8.0	12.2	6.9	9.4
Palmitoleic Acid	C16:1	0.5	0.2	1.4	4.1	0.3	-	-	-	-
Heptadecanoic Acid	C17:0	-	-	-	2.2	-	-	-	-	-
Stearic Acid	C18:0	0.2	0.3	0.3	1.3	-	0.5	-	-	0.4
Oleic Acid	C18:1	0.6	1.5	1.2	3.1	0.6	4.2	2.6	-	0.4
Linoleic Acid	C18:2	1.2	1.3	4.1	1.7	2.4	6.3	3.4	2.4	2.8
unid. fatty acid.2	C18:3	-	0.8	0.9	-	-	-	-	-	-
Linolenic Acid	C18:3	10.3	7.7	9.7	18.4	14.4	10.6	26.9	20.4	28.8
Eicosadienoic Acid	C20:2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Docosadienoic Acid	C22:2	-	-	-	-	1.4	0.5	-	-	-
EPA	C20:5	20.9	15.3	16.0	17.0	18.3	20.7	14.1	19.9	12.8
DHA	C22:6	13.2	14.3	13.3	11.3	11.8	9.6	9.7	8.9	6.3
기타 지방산		44.2	48.0	42.6	30.6	43.4	36.8	28.9	39.7	34.3

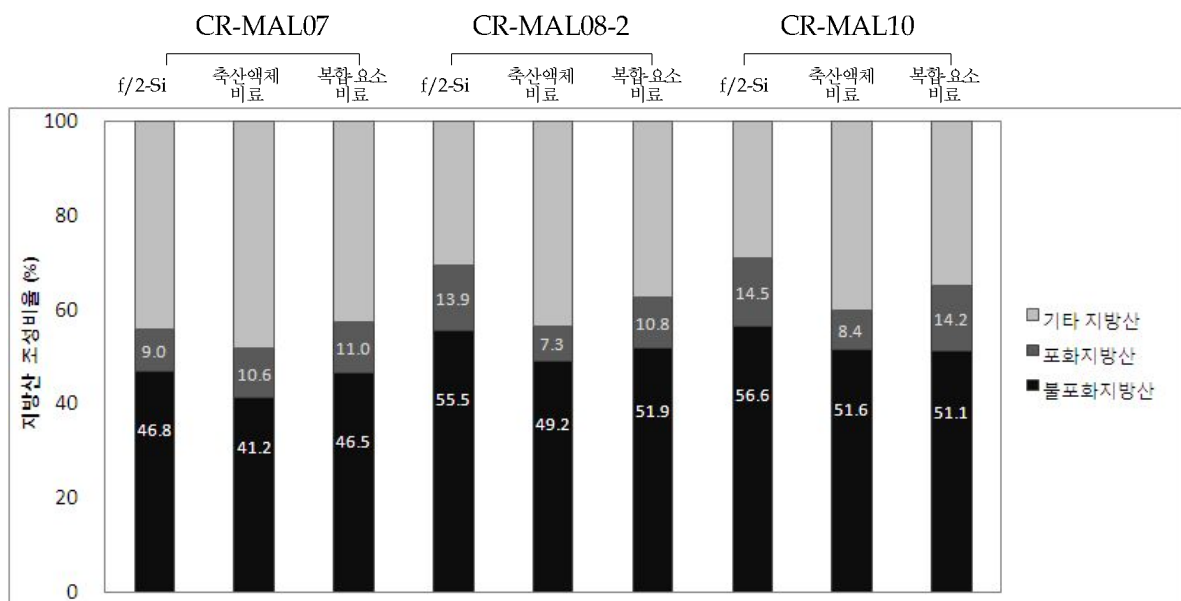


그림 2-12. 종주별 배양액 조건에 따른 총지방산 함량 중 불포화지방산 조성비(%)

CR-MAL10 농축 배양체는 모든 배양액 조건에서 50% 이상의 불포화 지방산 조성비를 보였고 CR-MAL07, CR-MAL08-2에 비하여 오메가3-지방산인 리놀레닌산(Linolenic Acid)의 조성비율이 49%로 가장 높았으며, CR-MAL07 농축배양체는 복합·요소비료 조건에서 DHA가 14.3%, f/2-Si 조건에서 EPA가 20.9%로서 가장 높은 조성비를 보였다(표 2-11).

4) 영양성분과 먹이생물로서의 가치

가) 먹이생물의 품질

본 연구에서 은편모류 고밀도 배양체는 먹이생물로서의 질을 평가하는데 있어 일차적 성분인 단백질 함량이 최소 40%이상으로 매우 높은 편이며, 필수아미노산과 불포화지방산을 비롯하여 다양한 영양성분들을 함유하고 있으므로 고품질 먹이생물로의 잠재적 응용가치가 높다고 평가할 수 있다.

나) 타 먹이생물과의 비교

D사의 농축클로렐라 제품은 어패류 종묘생산 등 수산양식에 있어 현재 가장 널리 사용되고 있고 시중에 판매·유통되고 있는 광생물먹이 제품이다. 은편모류 농축 배양체의 먹이생물로서의 가치를 평가하기 위해 본 연구에서는 시중에 유통 중인 D사의 농축클로렐라(이하 D-Chl로 표기) 제품의 영양성분을 분석하고, 결과 자료를 은편모류 농축 배양체와 비교하였다. 분석방법은 은편모류의 방법과 동일하며 일반 영양성분(단백질, 지방, 탄수화물), 아미노산, 지방산 항목에 대한 결과를 얻었다.

클로렐라는 배양방법이 단순하고 생물특성상 분열 및 증식속도가 빨라서 배양액 단위부피당 세포질량이 매우 크므로 영양성분 분석 결과에서 각 성분별 절대 함량은 은편모류 배양체보다 상대적으로 높게 나타났다(표 2-12). 그러나 각 영양성분별 조성률을 은편모류 농축 배양체와 비교하면, 일반 영양성분의 경우 조성비가 거의 유사하였고, 필수아미노산의 조성률과 불포화 지방산 조성률 면에서는 오히려 은편모류 농축 배양체의 영양성분이 더 우수한 것으로 나타났다(그림 2-13).

지방산의 경우, 은편모류 농축 배양체에서 다양한 지방산이 존재하며(표 2-11), DHA와 EPA를 포함하여 높은 불포화 지방산 조성률(56%)을 보인 반면, 농축클로렐라의 분석에서는 지방산이 다양하게 검출되지 않았고 불포화 지방산 조성률(2.5%)이 매우 낮았으며, 특히 DHA와 EPA는 검출되지 않았다(표 2-12). 은편모류 농축 배양체는 다양한 영양성분들이 고루 함유된 양질의 먹이생물로서 가치가 충분하다고 판단된다.

표 2-12. 농축클로렐라 제품의 일반 영양성분, 아미노산 및 지방산 함량

일반 영양성분		아미노산		지방산	
성분명	함량(mg)	성분명	함량(mg)	성분명	조성률(%)
단백질	7310	Alanine	465.0	Caproic Acid	8.4
지방	1140	Arginine*	299.0	Lauric Acid	-
탄수화물	2760	Aspartic acid	448.0	Myristic Acid	0.9
		Cystine	43.0	unid. fatty acid.1	1.8
		Glutamic acid	533.0	Palmitic Acid	72.3
		Glycine	306.0	Palmitoleic Acid	-
		Histidine*	106.0	Heptadecanoic Acid	-
		Isoleucine*	143.0	Stearic Acid	2.6
		Leucine*	423.0	Oleic Acid	1.4
		Lysine*	456.0	Linoleic Acid	-
		Methionine*	110.0	unid. fatty acid.2	-
		Phenylalanine*	241.0	Linolenic Acid	-
		Proline	293.0	Eicosadienoic Acid	1.1
		Serine	208.0	Docosadienoic Acid	-
		Threonine*	233.0	EPA	-
		Tryptophan*	-	DHA	-
		Tyrosine	184.0	기타 지방산	11.5
		Valine*	232.0		

※ 검체 100g에 대한 함량(mg) 또는 조성률(%)이며, 아미노산 항목 중 *표시는 어류필수아미노산

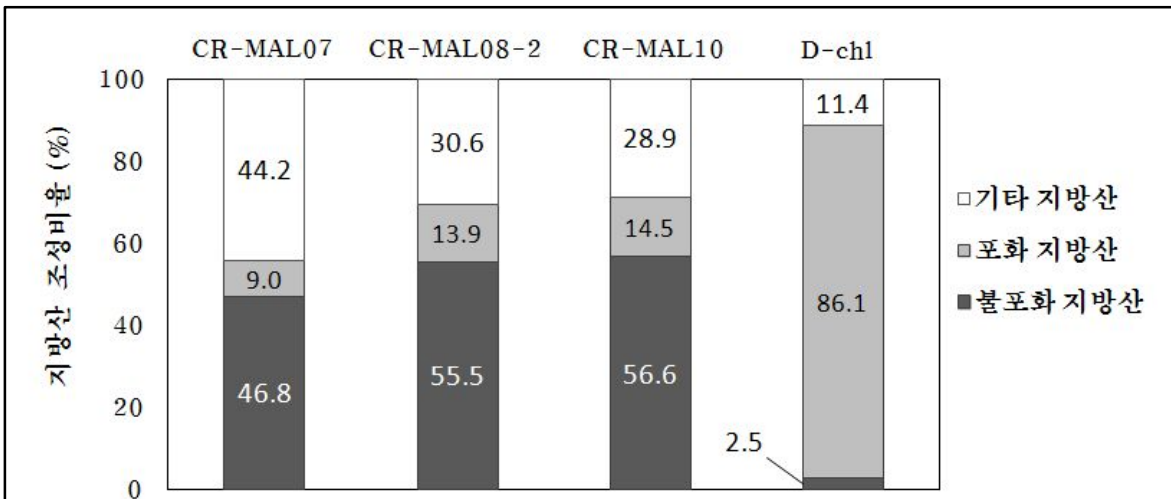
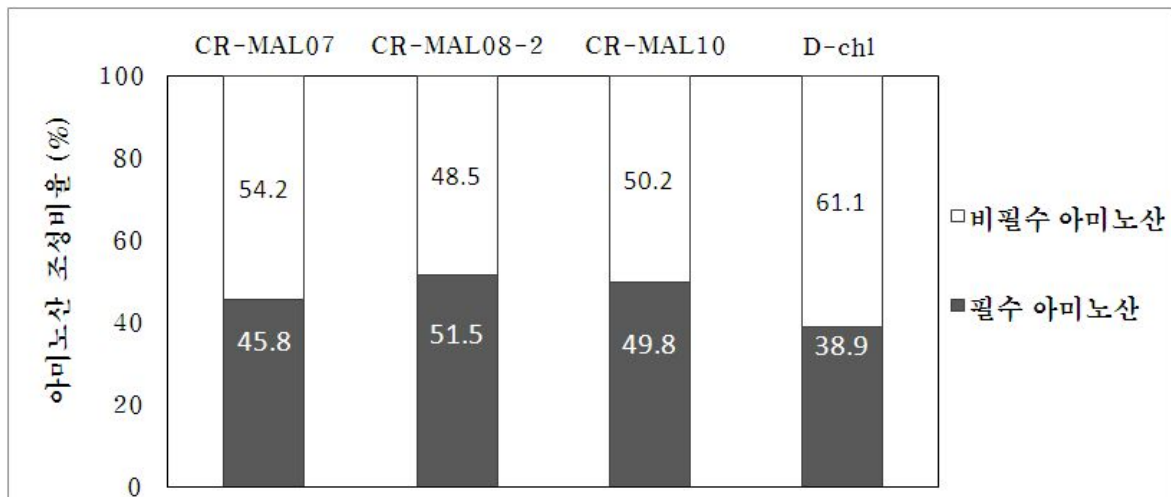
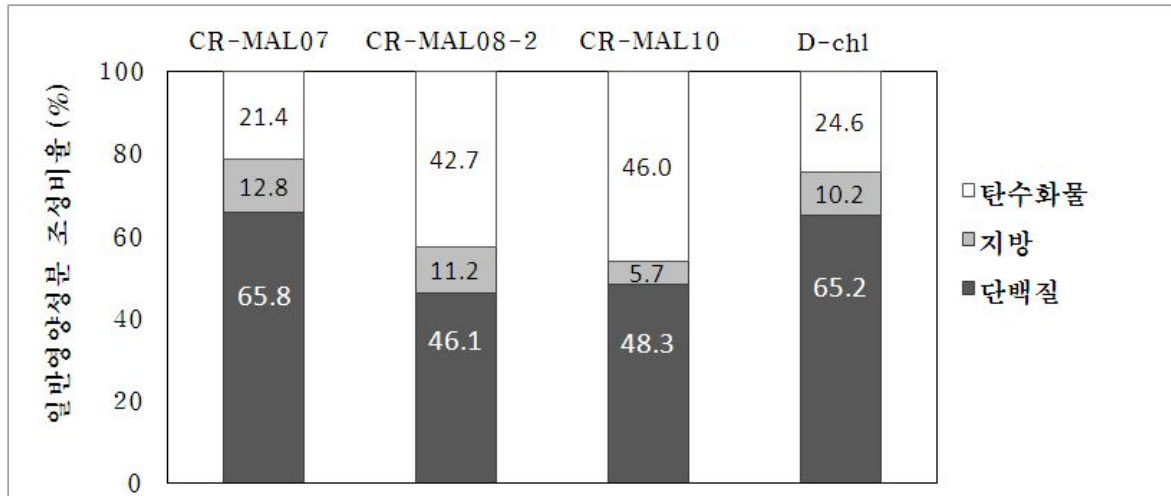


그림 2-13. 농축클로렐라 제품과 은편모류 농축배양체의 주요 영양성분 조성률(%) 비교

제 3 절 광생물먹이의 기능성 검증

1. 수산양식 기능성 검증

가. 윤충류에 대한 먹이생물 기능성 검증

1) 재료 및 방법

가) 윤충류의 섭식률

어류 및 갑각류 종묘생산시 이용되고 있는 동물먹이생물인 윤충류 *B. plicatilis*(강릉원주대학교 해양생명공학부 먹이생물연구실 분양제공)를 대상으로 신규 광생물 먹이 9개 종주(CR-MAL 01, 07, 08-1, 08-2, 09)에 대한 먹이농도별 섭식률을 측정하기 위해 ml 당 25,000, 50,000, 100,000, 150,000, 200,000 세포의 은편모류를 100 ml 삼각플라스크(배양수 80 ml)에 채우고, 윤충류 *B. plicatilis*를 ml 당 2 개체로 접종한 후 시간 경과(0.5, 1, 2, 3, 6, 12, 24시간)에 따른 광생물 먹이종주의 농도 변화를 확인하였다. 시간 경과에 따라 배양수 중 먹이가 고루 분포하도록 한 후 1 ml 를 취하여 루골 용액으로 고정한 다음, Sedgwick-Rafter chamber를 이용하여 광학현미경하에서 3회 반복 계수한 후 평균 값을 산출하여 ml 당 농도로 환산하였다. 수온(25°C) 및 염분(30 psu)을 설정하고, 광주기는 24시간 연속적으로 유지하였다. 먹이농도 변화에 따른 윤충류 *Brachionus plicatilis*의 섭식률(Grazing rate) 산출은 다음과 같은 Michaelis-Menten 식에 대입하여 도식화하여 자료를 분석하였다.

$$GR = V(C_0 - C_T) / N \times T$$

V : 부피 (ml)

C_0 와 C_T : 각각 초기 및 최종 먹이농도 (cell ml^{-1})

N : 윤충류의 개체수

T : 배양시간 (hr)

나) 윤충류의 성장 및 포란율

윤충류의 성장 및 포란율을 측정하기 위해 광생물 먹이 9개 종주(CR-MAL 01, 02, 04, 05, 06, 07, 08-1, 08-2, 09)를 이용하여 ml 당 2.0×10^5 세포의 먹이를 공급하였으며, 수온(25°C)과 염분(30 psu)을 설정한 후 윤충류를 ml 당 5 개체를 접종하였다. 윤충류의 계수는 매일 1 ml 씩 추출하여 해부현미경 하에서 이루어졌으며, 계수된 개체는 시험관에 채수

용하였다. 실험 7일 동안 연속광(L:D=24:0)에서 배양하였다. 대상 종의 일간 성장률 (Specific growth rate, r)의 계산은 Rico-Martinez and Dodson (1992)의 식에 의해 계산되었다.

$$r=(1/T)\ln(N_T/N_0)$$

N_T : 시간 t 에서 윤충류의 개체수

N_0 : 윤충류의 초기 개체수

T : 배양시간 (days)

다) 윤충류의 성장 및 포란율 비교

윤충류의 성장 및 포란율을 비교하기 위해 신규 광생물 먹이 종주 CR-MAL08-2와 기존의 해산클로렐라 *Chlorella ellipsoidea* (한국미세조류은행 KMMCC-2)를 선택하였다. CR-MAL08-2 종주는 ml 당 5.0×10^5 세포로, *C. ellipsoidea*는 ml 당 2.0×10^5 세포로 하여 윤충류에 각각 공급하였다(각 먹이의 탄소량을 측정한 결과, *C. ellipsoidea*의 탄소량이 CR-MAL 08-2보다 2.5배 높았다). 수온(25°C)과 염분(30 psu)을 설정한 후 윤충류를 ml 당 5 개체로 접종하였다. 윤충류의 계수는 매일 1 ml 씩 추출하여 해부현미경 하에서 이루어졌으며, 계수된 개체는 시험관에 재수용 하였다. 실험 7일 동안 연속광(L:D=24:0)에서 배양하였다. 대상 종의 일간 성장률(Specific growth rate, r)의 계산은 Rico-Martinez and Dodson (1992)의 식에 의해 계산되었다.

리) 영양강화 효과

윤충류의 기존 먹이로 사용되고 있는 시판용 농축클로렐라((주)대상)와 신규 광생물 먹이종주 CR-MAL08-2를 이용하였다. 수온(25°C)과 염분(30 psu)을 설정한 후 윤충류의 섭식시간을 3시간으로 설정하여 영양강화를 하였다. 바로 동결건조 한 후 군산대학교 식품생명공학 수산가공학 실험실에 의뢰하여 윤충류의 아미노산과 지방산 영양성분을 분석하였다.

마) 통계처리

모든 실험결과는 one-way ANOVA test를 실시한 후 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)를 실시하여 평균 간의 유의성($P=0.05$)을 SPSS program (ver. 12.0)으로 검정하였다.

2) 결과 및 고찰

가) 윤충류의 섭식률

광생물 먹이 종주(CR-MAL 01, 07, 08-1, 08-2, 09)에 대한 농도별 24 시간 후 윤충류의 섭식률을 조사한 결과는 다음과 같다(표 3-1). 각 종주별 최대 섭식률은 유의한 차이를 발견하지 못하였으나, CR-MAL08-1 실험구를 제외한 나머지 실험구에서 먹이 농도가 증가할수록 윤충류의 시간 당 섭식률은 증가하는 경향을 보였다. 광생물 먹이 종주별 섭식률은 $1.50 \times 10^6 \sim 1.84 \times 10^6$ cells ind.⁻¹ hr⁻¹의 범위를 보였으며, 최고 섭식률을 보인 실험구는 CR-MAL09에서 가장 높은 섭식률을 나타냈다. 다음으로는 CR-MAL08-2 실험구에서 1.82×10^6 cells ind.⁻¹ hr⁻¹의 섭식률을 보였으며, CR-MAL07 실험구에서는 1.66×10^6 cells ind.⁻¹ hr⁻¹의 섭식률을 나타냈다. CR-MAL01 실험구에서는 1.53×10^6 cells ind.⁻¹ hr⁻¹의 섭식률을 보였고, 가장 낮은 섭식률을 나타낸 실험구는 CR-MAL08-1로 1.50×10^6 cells ind.⁻¹ hr⁻¹의 섭식률을 나타냈다(그림 3-1~2).

표 3-1. Grazing rate of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed the different strains of the cryptophyte at different cell densities after 24 hours

Strain No.	Food concentration (cells ml ⁻¹)				
	25,000	50,000	100,000	150,000	200,000
CR-MAL01	5.89×10^4	2.83×10^5	2.79×10^5	9.31×10^5	1.53×10^6
CR-MAL07	1.89×10^5	4.48×10^5	8.73×10^5	1.49×10^6	1.66×10^6
CR-MAL08-1	8.24×10^4	3.31×10^5	1.05×10^6	1.50×10^6	7.49×10^5
CR-MAL08-2	2.31×10^5	4.39×10^5	9.66×10^5	1.39×10^6	1.82×10^6
CR-MAL09	1.50×10^5	2.98×10^5	9.01×10^5	1.43×10^6	1.84×10^6

나) 윤충류의 성장 및 포란율

광생물 먹이 종주(CR-MAL 01, 02, 04, 05, 06, 07, 08-1, 08-2, 09)에 따른 윤충류 성장률의 실험 결과는 표 3-2와 그림 3-3~6에 나타낸 바와 같다.

모든 실험구에서 시간이 경과함에 따라 윤충류의 성장이 증가하는 경향을 보였으며, 최고 밀도를 보인 실험구는 CR-MAL01과 08-1, 08-2로 배양 7일째 ml당 44~50 개체로 가장 높은 개체수를 나타냈다($P < 0.05$). CR-MAL02와 09 실험구에서 배양 6일째 각각 ml당 35 개체와 32 개체를 나타내었고, 가장 낮은 성장을 보인 CR-MAL05 실험구는 배양 7일째 ml당 11 개체로 가장 낮은 개체 성장을 보였으나($P < 0.05$), ml당 13과 14 개체를

보인 CR-MAL 06, 04 실험구와 유의적인 차이를 보이지 않았다($P>0.05$)(그림 3-3~4).

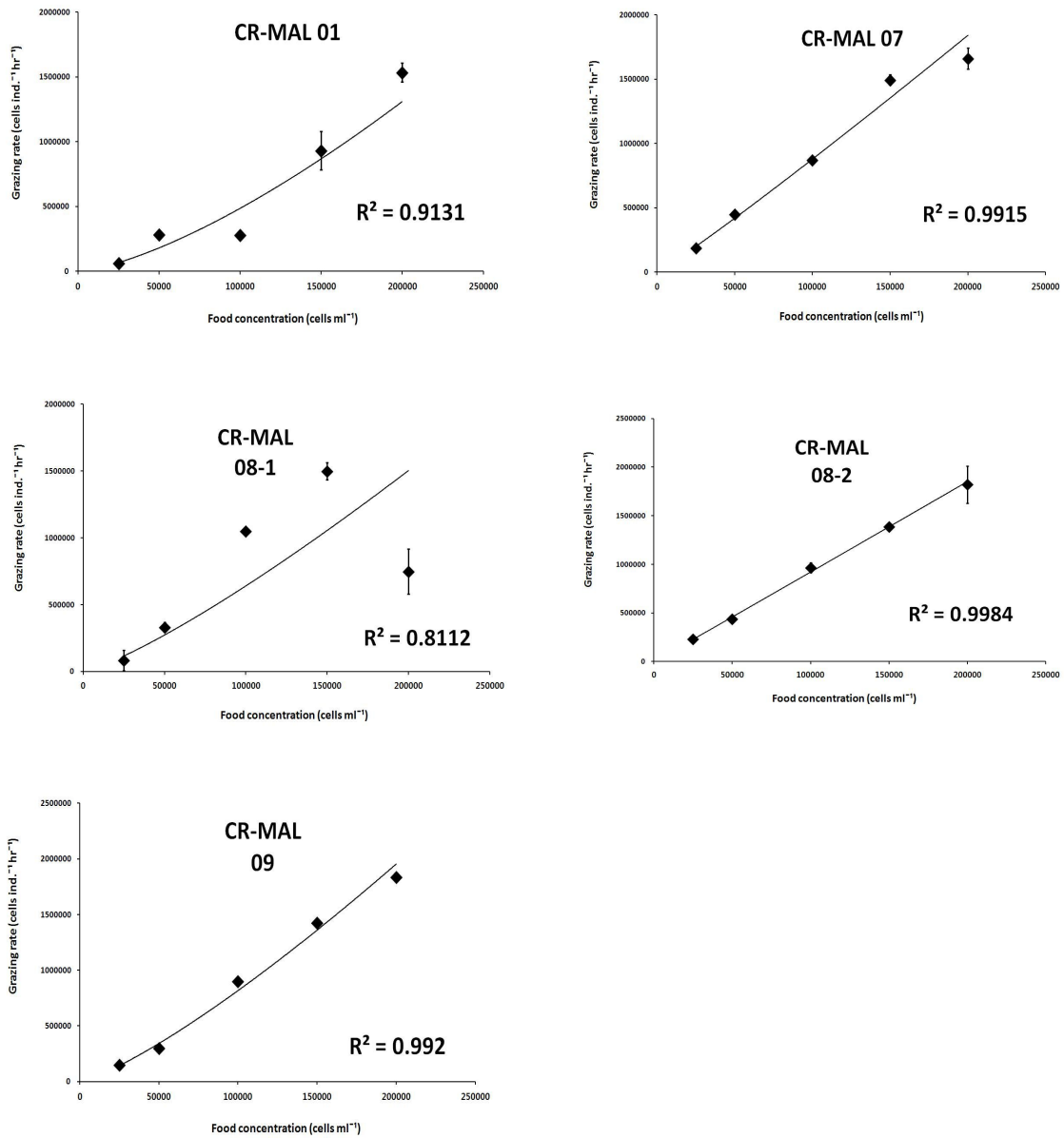


그림 3-1. Grazing rate of the rotifer fed the different strains of the cryptophyte (CR-MAL 01, 07, 08-1, 08-2, 09) at different cell densities after 24 hours.

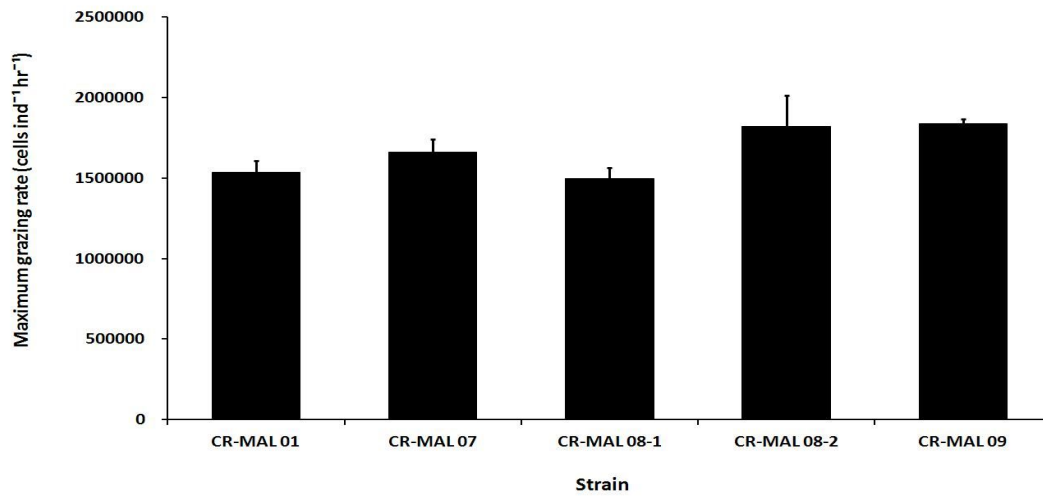


그림 3-2. Maximum grazing rate of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed the different strains of the cryptophyte (CR-MAL 01, 07, 08-1, 08-2, 09) after 24 hours.

최고 밀도에 따른 포란율은 CR-MAL01 실험구에서 37.2%로 가장 높은 포란율을 나타냈으나, CR-MAL05 실험구를 제외한 나머지 실험구와 유의적인 차이를 보이지 않았다 ($P>0.05$). CR-MAL05 실험구에서는 20.6%로 가장 낮은 포란율을 보였다($P<0.05$)(그림 3-5).

최고 밀도에 따른 개체 성장률(r)은 CR-MAL02와 08-2 실험구에서 0.33으로 가장 유의적으로 높은 성장률을 나타냈다($P<0.05$). 다음으로는 CR-MAL 1과 08-1, 그리고 09 실험구로 0.32와 0.31의 성장률을 나타냈지만, 0.26을 나타낸 CR-MAL07 실험구와는 유의적인 차이를 보이지 않았다($P>0.05$). 가장 낮은 개체 성장률을 보인 실험구는 최고밀도와 포란율에서 낮은 값을 나타낸 CR-MAL 05 실험구로 0.11을 나타냈다(그림 3-6).

표 3-2. Maximum density, fecundity rate and specific growth rate (means±S.D.) of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed the different strains of the cryptophyte

Strain	Maximum density (ind. mL ⁻¹)	Fecundity rate (%)	Specific growth rate (r)
CR-MAL 01	44±4.85 ^a	37.2±4.72 ^a	0.31±0.016 ^{ab}
CR-MAL 02	35±3.58 ^b	32.3±7.41 ^{ab}	0.32±0.017 ^a
CR-MAL 04	14±0.68 ^{cd}	23.5±6.72 ^{ab}	0.21±0.009 ^c
CR-MAL 05	11±0.68 ^d	20.6±7.60 ^b	0.11±0.009 ^d
CR-MAL 06	13±2.25 ^{cd}	28.6±6.27 ^{ab}	0.19±0.037 ^c
CR-MAL 07	20±3.61 ^c	23.6±10.25 ^{ab}	0.26±0.034 ^b
CR-MAL 08-1	44±3.95 ^a	29.9±5.30 ^{ab}	0.31±0.013 ^{ab}
CR-MAL 08-2	50±1.55 ^a	26.3±3.37 ^{ab}	0.33±0.004 ^a
CR-MAL 09	32±2.11 ^b	31.1±5.26 ^{ab}	0.31±0.011 ^{ab}

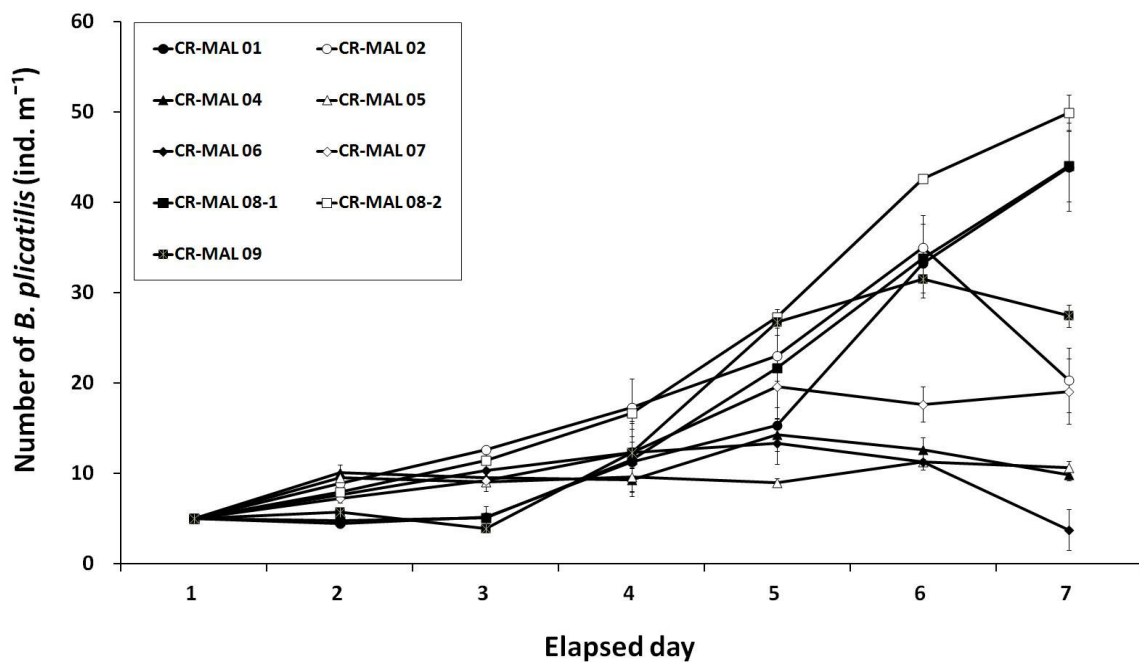


그림 3-3. Change in the number of individuals of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed the different strains of the cryptophyte.

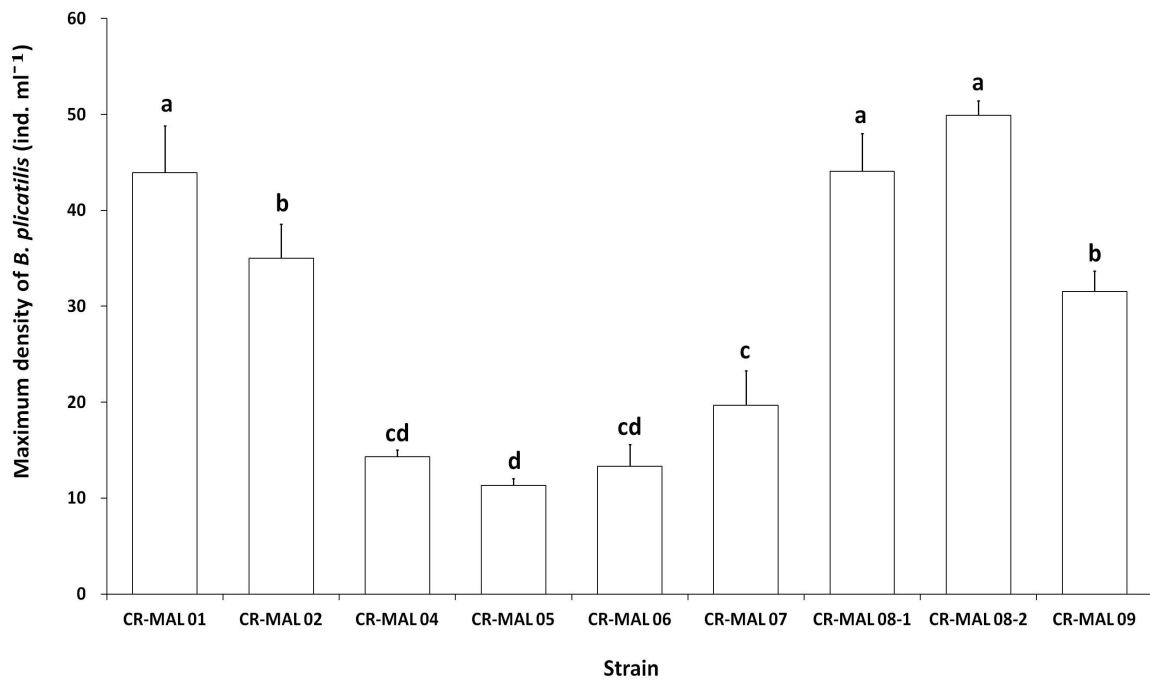


그림 3-4. Maximum density of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed the different strains of the cryptophyte.

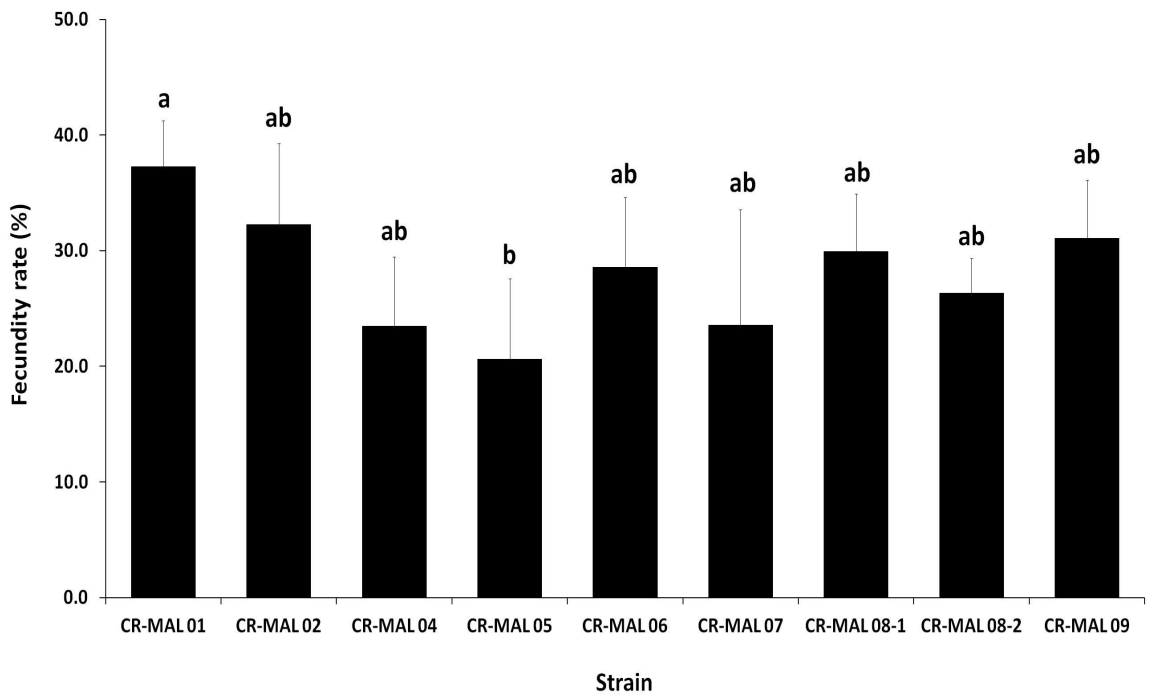


그림 3-5. Fecundity rate of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed the different strains of the cryptophyte.

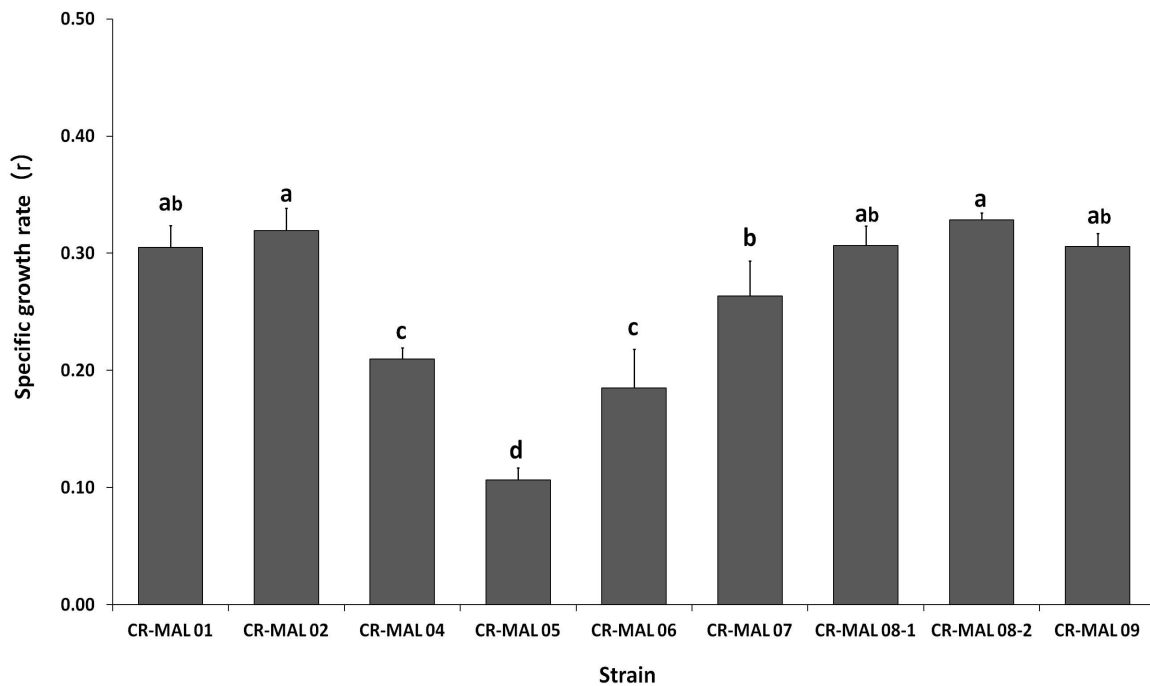


그림 3-6. Specific growth rate of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed the different strains of the cryptophyte.

다) 윤충류의 성장 및 포란율 비교

성장이 좋은 광생물 먹이종주 CR-MAL08-2(실험구)과 *Chlorella ellipsoidea*(대조구)를 각각 섭이한 윤충류 성장률의 실험 결과는 표 3-3과 그림 3-7에 나타낸 바와 같다.

실험구와 대조구 모두에서 시간이 경과함에 따라 윤충류의 성장이 증가하는 경향을 보였으며, 각 최고 밀도는 배양 7일째 ml 당 67 개체와 52개체로 대조구의 담수산 윤충류의 밀도가 약간 높았다($p < 0.05$). 최고 밀도에 따른 개체 성장률(r)은 대조구의 담수산 윤충류가 0.37로 실험구 0.34으로 유의적으로 약간 높은 성장률을 나타냈다($p < 0.05$). 최고 밀도에 따른 포란율은 실험구인 은편모류에서는 42.5%, 대조구에서는 40.2%였으나 유의적인 차이를 나타내지는 않았다($p > 0.05$). 실험구 *Teleaulax amphioxeia* CR-MAL 08-2 종주는 대조구 *C. ellipsoidea*보다 낮은 성장률을 나타냈으나, 포란율 실험에서는 대조구보다 높은 포란율을 나타냈다.

표 3-3. Maximum density, fecundity rate and specific growth rate (means \pm S.D.) of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed on the cryptophyte CR-MAL08-2 and *Chlorella ellipsoidea*.

Strain	Maximum density (ind. ml ⁻¹)	Fecundity rate (%)	Specific growth rate (r)
CR-MAL 08-2	52 \pm 1.55	42.5 \pm 2.37	0.34 \pm 0.004
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	67 \pm 2.11	40.2 \pm 2.26	0.37 \pm 0.011

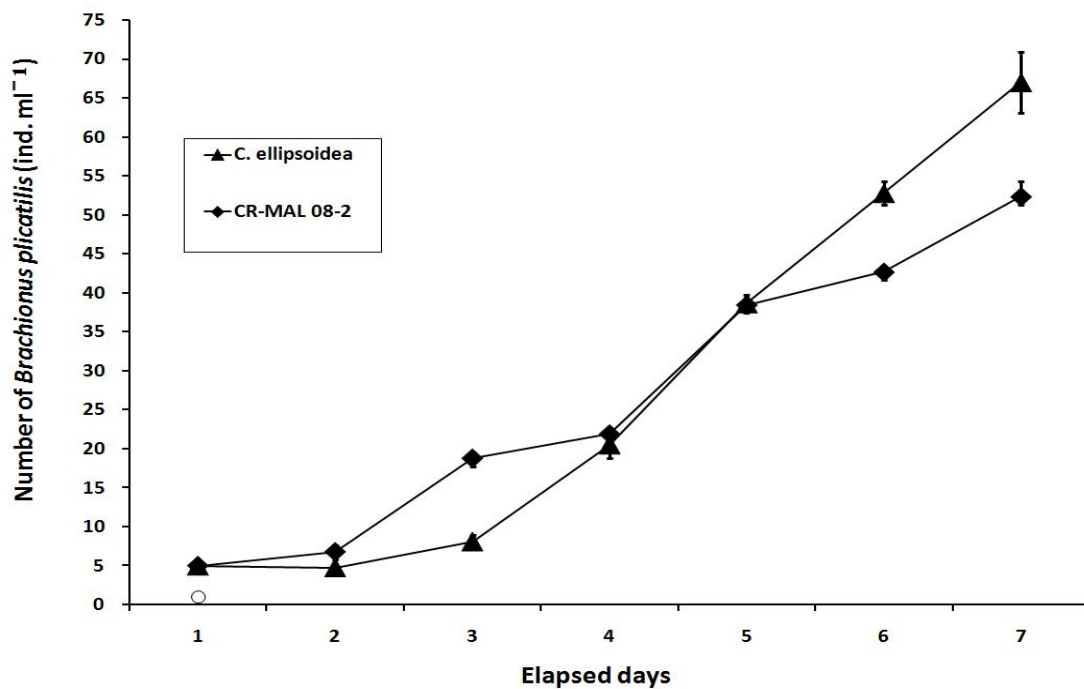


그림 3-7. Change in the number of individuals of the rotifer *Brachionus plicatilis* fed each of the two different diets, the cryptophyte *Teleaulax amphioxeia* CR-MAL 08-2 and *Chlorella ellipsoidea*.

라) 영양강화 효과

은편모류 우수종주인 CR-MAL08-2의 윤충류에 대한 영양강화 효과를 알아보기 위해 윤충류의 아미노산과 지방산의 조성을 비교하여 표 3-4와 표 3-5에 나타내었다.

은편모류(CR-MAL 08-2)로 영양강화한 윤충류의 아미노산 성분함량은 담수산 클로렐라와 거의 유사하였다(표 3-4). 한편, 지방산 조성은 영양강화 후 증가하였으며, 특히 해산어에 필수적인 C20:5n3과 C22:6n3과 같은 고도불포화지방산의 총량은 증가하였으며, 특히, C20:5n3은 약 5배의 증가량을 보였던 반면 C22:6n3는 미량으로 나타났다(표 3-4).

표 3-4. Amino acids composition of *Brachionus plicatilis* fed each of the two different diets of the cryptophyte CR-MAL 08-2 and freshwater *Chlorella*

Amino acids(%)	freshwater <i>Chlorella</i>	CR-MAL 08-2
ASP	5.36 ±0.69	4.60 ±0.50
SER	2.26 ±0.10	2.20 ±0.24
GLU	6.30 ±0.70	5.60 ±0.61
GLY	1.56 ±0.11	1.48 ±0.16
HIS	0.54 ±0.07	0.55 ±0.09
ARG	2.27 ±0.22	2.04 ±0.32
THR	1.12 ±0.09	1.09 ±0.13
ALA	2.25 ±0.14	2.04 ±0.17
PRO	1.91 ±0.10	1.91 ±0.21
TYR	1.34 ±0.10	1.37 ±0.13
VAL	1.14 ±0.06	1.10 ±0.11
MET	0.36 ±0.13	0.56 ±0.07
LYS	5.94 ±0.46	5.83 ±0.45
ILE	0.84 ±0.05	0.82 ±0.09
LEU	2.46 ±0.13	2.36 ±0.25
PHE	1.35 ±0.11	1.37 ±0.16
Total	37.00	34.92

표 3-5. Fatty acids composition of *Brachionus plicatilis*. fed each of the two different diets of the Cryptophyte CR-MAL08-2 and freshwater *Chlorella*

Fatty acid	Content (mg/100g)	
	Freshwater <i>Chlorella</i>	CR-MAL 08-2
C14:0	87.5 (2.2)	91.3 (2.2)
C15:0	66.0 (1.7)	71.2 (1.8)
C16:0	1139.8 (29.0)	1177.0 (29.0)
C16:1	100.2 (2.5)	-
C17:0	51.8 (1.3)	50.5 (1.2)
C17:1	32.5 (0.8)	34.1 (0.8)
C18:0	238.0 (6.0)	251.5 (6.2)
C18:1 n9c	204.4 (5.2)	218.9 (5.4)
C18:1 n9t	102.2 (2.6)	109.4 (2.7)
C18:2 n6	1197.1 (30.4)	1256.7 (31.0)
C18:3 n6	9.8 (0.2)	11.0 (0.3)
C18:3 n3	131.8 (3.4)	144.4 (3.6)
C20:0	13.7 (0.3)	12.0 (0.3)
C20:1 n9	86.6 (2.2)	93.9 (2.3)
C20:2	205.8 (5.2)	223.3 (5.5)
C20:3 n6	89.6 (2.3)	103.8 (2.6)
C20:4 n6	13.9 (0.4)	14.2 (0.4)
C20:5 n3	5.6 (0.1)	24.9 (0.6)
C22:0	19.4 (0.5)	16.2 (0.4)
C22:1 n9	9.1 (0.2)	31.3 (0.8)
C22:2	8.9 (0.2)	10.9 (0.3)
C23:0	29.4 (0.7)	30.0 (0.7)
C24:0	31.9 (0.8)	47.1 (1.2)
C22:6 n3	-	trace
C24:1 n9	59.3 (1.5)	33.9 (0.8)
ΣFA	3934.4 (100%)	4057.5 (100%)
Σn-3 HUFA	137.4(3.49%)	169.2(4.17%)
Σn-6 HUFA	113.4(2.88%)	129.0(3.17%)

나. 이매패류 유생에 대한 먹이생물 기능성 검증

1) 재료 및 방법

가) 바지락 유생의 성장 및 생존율

바지락 *Ruditapes philippinarum* D형 유생을 대상으로 한 실험에서는 광생물 먹이 6개 종주(CR-MAL 02, 05, 06, 07, 08-1, 08-2)를 이용하여 ml 당 1.0×10^4 세포의 먹이를 공급하였으며, 3L 비커(배양수 2L)에 바지락을 ml 당 1 개체로 접종하였다. 수온과 염분은 각각 20°C 와 30 psu를 유지하였고, 광주기는 24시간 연속적으로 유지하였다. 실험은 12일간 시행하였으며, 실험이 종료된 후에 바지락 유생의 성장(각장·각고)과 생존율을 조사하였다.

나) 참굴 유생의 성장 및 생존율에 대한 비교

참굴 *Crassostrea gigas*의 D형 유생을 대상으로 한 실험에서는 우수 광생물 먹이 2개 종주(CR-MAL08-2와 07)와 *Chaetoceros* sp.와 *Isochrysis* aff. *galbana* 등 4개 종주를 이용하여 총 7개의 실험구로 ml 당 3.0×10^4 세포의 먹이를 공급하였으며, 1L 비커(배양수 800 ml)에 참굴을 800 ml 당 20개체로 접종하였다. 수온과 염분은 각각 20°C 와 30 psu를 유지하였고, 광주기는 24시간 연속적으로 유지하였다. 실험은 10일간 시행하였으며, 실험이 종료된 후에 참굴 유생의 성장(각장·각고)과 생존율을 조사하였다.

2) 결과 및 고찰

가) 바지락 유생의 성장 및 생존율

광생물 은편모류 6개 종주(CR-MAL 02, 05, 06, 07, 08-1, 08-2)를 공급하여 바지락 *Ruditapes philippinarum* 유생의 성장과 생존율을 비교해 본 결과는 표 3-6과 그림 3-5~7에 나타내었다.

각장에 대한 결과를 살펴보면, CR-MAL08-1 종주에서 평균 각장 크기가 $156.9\mu\text{m}$ 로 유의적으로 가장 높은 성장을 나타냈다($P < 0.05$). 그러나 평균 각장 $156.4\mu\text{m}$ 를 나타낸 CR-MAL08-2 종주와 $155.0\mu\text{m}$ 를 나타낸 CR-MAL06 종주와는 유의한 차이를 보이지 않았다($P > 0.05$). CR-MAL 07을 공급한 종주는 평균 각장이 $153.2\mu\text{m}$ 를 나타냈으며, 가장 낮은 성장을 보인 실험구는 CR-MAL02와 05 종주로 평균 각장이 각각 $149.8\mu\text{m}$ 와 $149.5\mu\text{m}$ 로 유의적으로 낮은 성장을 나타냈다($P < 0.05$)(그림 그림 3-5).

바지락 유생의 각고 성장 결과를 살펴보면, CR-MAL08-1과 08-2 종주에서 평균 각고 크기가 $137.4 \sim 137.5\mu\text{m}$ 로 유의적으로 가장 높은 성장을 나타냈다($P < 0.05$). 그러나 평균 각고 $134.8\mu\text{m}$ 를 나타낸 CR-MAL06 종주와 유의적인 차이는 보이지 않았다($P > 0.05$).

CR-MAL07을 공급한 종주는 평균 각고 133.2 μm 를 나타냈으며, 가장 낮은 성장을 보인 종주는 CR-MAL05와 02 종주로 각각 평균 각고가 128.5 μm 와 129.6 μm 로 유의적으로 낮은 성장을 나타냈다($P < 0.05$)(그림 3-6).

바지락 유생의 생존율은 각 종주별로 유의한 차이는 없었으나 CR-MAL08-2 종주에서 41.1%로 가장 높은 생존율을 보였다. 비교적 낮은 성장을 보였던 CR-MAL02와 07 종주에서 각각 40.7%와 39.5%로 높은 생존율을 나타냈고, CR-MAL08-1을 공급한 종주는 36.2%의 생존율을 나타냈으며, CR-MAL06 종주는 35.1%의 생존율을 보였다. 가장 낮은 성장을 보였던 CR-MAL 05를 공급한 종주에서는 34.6%로 가장 낮은 생존율을 나타냈다(그림 3-7).

표 3-6. Shell length, shell height and survival rate (mean \pm S.D.) of the manila clam *Ruditapes philippinarum* larvae fed the different strains of the cryptophyte

Strain No.	Shell length (μm)	Shell height (μm)	Survival rate (%)
CR-MAL02	149.8 \pm 3.47 ^c	129.6 \pm 5.32 ^c	40.7 \pm 6.14
CR-MAL05	149.5 \pm 3.34 ^c	128.5 \pm 1.85 ^c	34.6 \pm 6.08
CR-MAL06	155.0 \pm 2.67 ^{ab}	134.8 \pm 1.74 ^{ab}	35.1 \pm 5.96
CR-MAL07	153.2 \pm 2.83 ^b	133.2 \pm 2.84 ^b	39.5 \pm 6.00
CR-MAL08-1	156.9 \pm 2.49 ^a	137.5 \pm 2.71 ^a	36.2 \pm 6.74
CR-MAL08-2	156.4 \pm 2.06 ^{ab}	137.4 \pm 0.93 ^a	41.1 \pm 4.82

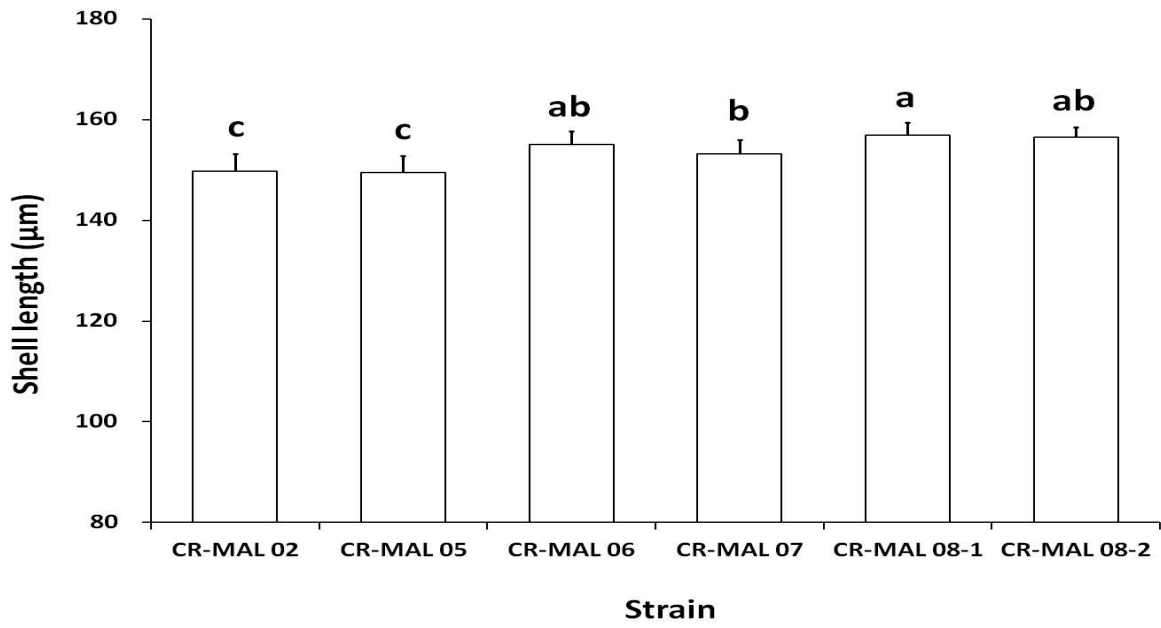


그림 3-8. Shell length of the manila clam *Ruditapes philippinarum* larvae fed the different strains of the cryptophyte.

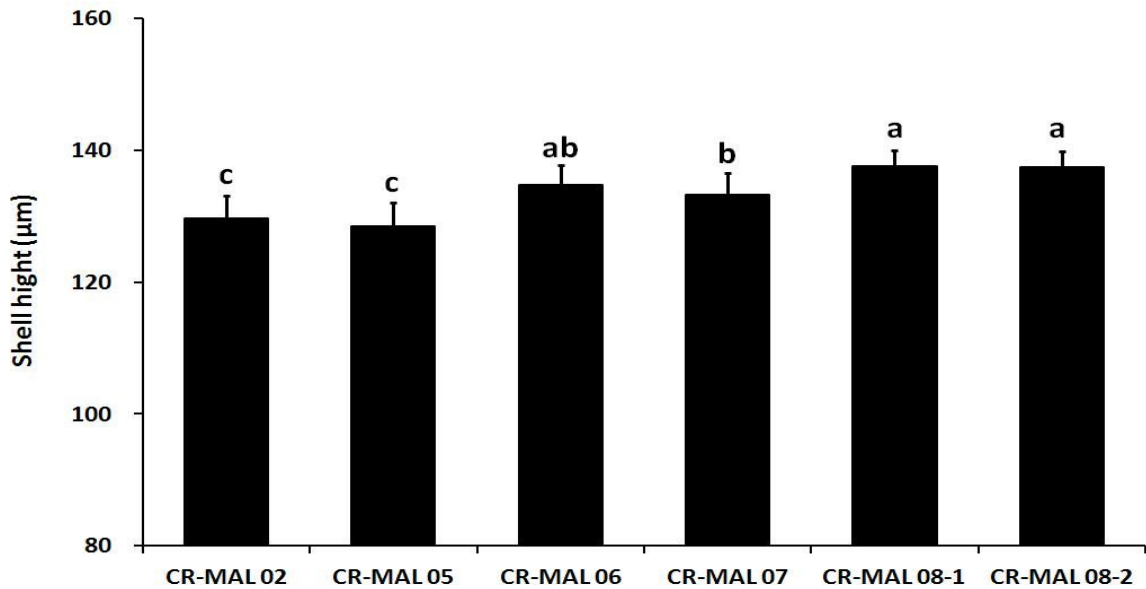


그림 3-9. Shell height of the manila clam *Ruditapes philippinarum* larvae fed the different strains of the cryptophyte.

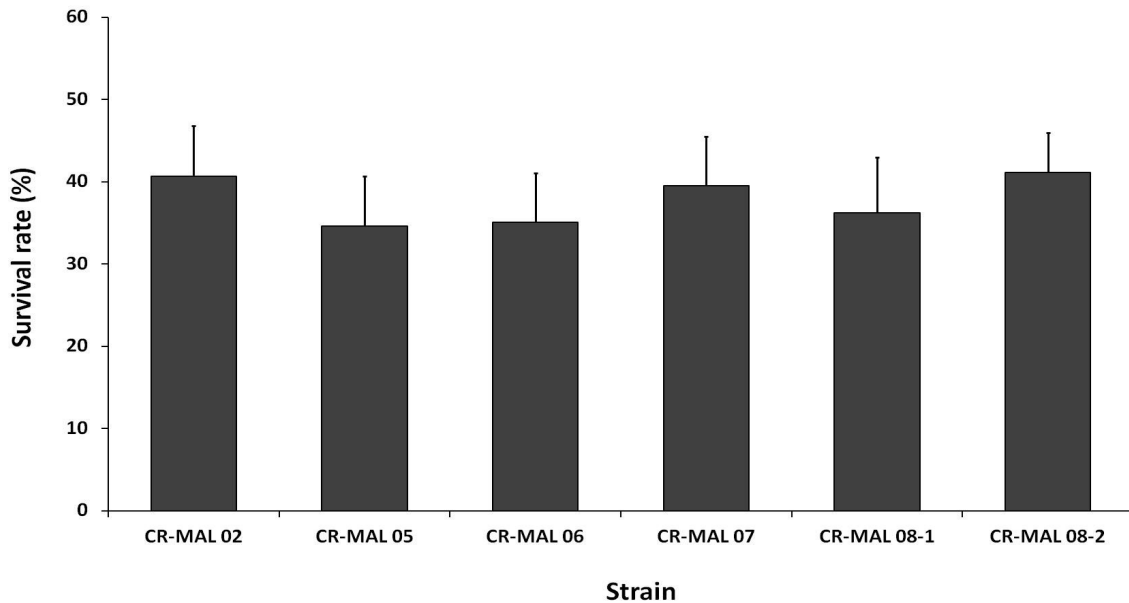


그림 3-10. Survival rate of the manila clam *Ruditapes philippinarum* larvae fed the different strains of the cryptophyte.

나) 참굴 유생의 성장 및 생존율에 대한 비교

광생물 은편모류 2개 종주(CR-MAL 07, 08-2)와 *Chaetoceros* sp., *Isochrysis* aff. *galbana* 4종류의 먹이를 공급하여 참굴(*Crassostrea gigas*) 유생의 성장과 생존율을 비교해 본 결과는 표 3-7과 그림 3-11~13에 나타내었다.

먹이 공급 형태는 다음과 같이 7가지 방법(① *Chaetoceros* sp., ② *Isochrysis* aff. *galbana*, ③ CR-MAL 08-2, ④ CR-MAL 07, ⑤ CR-MAL 08-2 + *I. aff. galbana*, ⑥ CR-MAL 07 + *I. aff. galbana*, ⑦ CR-MAL 08-2 + CR-MAL 07 + *I. aff. galbana*)으로 급이하였다.

각장에 대한 결과를 살펴보면, ⑤ CR-MAL 08-2+*I. aff. galbana*을 공급한 실험구에서 평균 각장 크기가 $143.5\mu\text{m}$ 로 유의적으로 가장 높은 성장을 나타냈다($P < 0.05$). 그 다음으로 ② *Isochrysis* aff. *galbana*, ③ CR-MAL 08-2 실험구에서는 각각 평균 각장 $129\mu\text{m}$ 와 $120.7\mu\text{m}$ 을 나타냈으며, ⑦ CR-MAL 08-2+CR-MAL 07+*I. aff. galbana*을 공급한 실험구는 평균 각장 $113.3\mu\text{m}$ 를 나타냈다. 그 다음으로는 평균 각장 $101.65\mu\text{m}$ 와 $101.25\mu\text{m}$ 를 나타낸 ⑥ CR-MAL 07+*I. aff. galbana*과 ④ CR-MAL 07 실험구였고, 가장 낮은 성장을 보인 것은 ① *Chaetoceros* sp.을 공급한 실험구로써 평균 각장이 $91.25\mu\text{m}$ 였다(그림 3-11).

표 3-7. Growth and survival rate of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae fed different diets including the cryptophyte CR-MAL 08-2 and 07

Food organisms	Shell length (±S.D) (μm)	Shell height (±S.D) (μm)	Survival rate (%)
<i>Chaetoceros</i> sp.	91.25±2.47 ^f	80.3±2.2 ^e	9.8±2.14 ^e
<i>Isochrysis</i> aff. <i>galbana</i>	129.5±1.34 ^b	114.6±1.5 ^b	63±4.08 ^a
CR-MAL08-2	120.8±2.67 ^c	109.35±2.7 ^{bc}	50.4±0.96 ^b
CR-MAL07	101.3±2.3 ^e	91.9±2.42 ^d	20.4±2.22 ^d
CR-MAL08-2 + <i>I.</i> aff. <i>galbana</i>	143.5±2.4 ^a	130.8±0.71 ^a	62.1±5.85 ^a
CR-MAL07 + <i>I.</i> aff. <i>galbana</i>	101.7±3.6 ^e	94.2±2.3 ^d	30.3±4.2 ^c
CR-MAL08-2+CR-MAL07+ <i>I.</i> aff. <i>galbana</i>	113.3±2.5 ^d	103.2±3.2 ^e	35.2±4.24 ^c

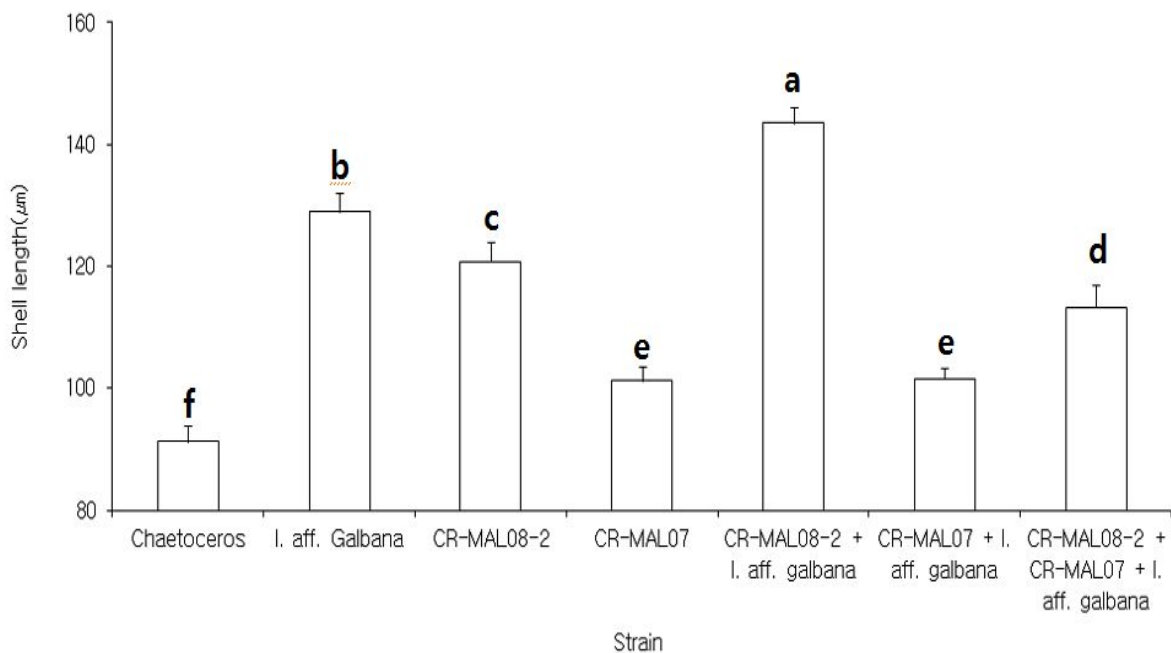


그림 3-11. Shell length of the Pacific oyster *Crassostrea giga* larvae fed different diets including the cryptophyte (CR-MAL 08-2, 07), *Chaetoceros* sp., and *Isochrysis* aff. *galbana*.

바지락 유생의 각고 성장 결과는 각장 성장과 유사한 결과를 나타냈다. 즉, ⑤ CR-MAL 08-2+*I. aff. galbana*을 공급한 실험구에서 평균 각고 크기가 130.8 μm 로 유의적으로 가장 높은 성장을 나타냈으며($P < 0.05$), 그 다음으로 ② *Isochrysis aff. galbana*을 공급한 실험구는 평균 각고 114.6 μm 를 나타냈으며, ③ CR-MAL08-2과 ⑦ CR-MAL08-2+CR-MAL 07+*I. aff. galbana*에서 평균 각고 109.3 μm 와 103.2 μm 를 나타냈다. 가장 낮은 각고 성장을 보인 곳은 ① *Chaetoceros sp.*을 공급한 실험구로 평균 각고가 80.25 μm 를 나타냈다(그림 3-12).

참굴 유생의 생존율은 ② *Isochrysis aff. galbana* 실험구에서 63%로 가장 높은 생존율을 보였다. 각장과 각고에서 가장 높은 성장을 보였던 ⑤ CR-MAL 08-2+*I. aff. galbana* 실험구는 62.1%를, 그 다음으로는 ③ CR-MAL08-2 실험구는 50.4%, ⑦ CR-MAL 08-2+CR-MAL07+*I. aff. galbana*과 ⑥ CR-MAL07+*I. aff. galbana* 실험구는 각각 30.3%, 35.2%의 생존율을 보였다. 가장 낮은 각장 및 각고 성장을 보였던 ① *Chaetoceros sp.* 실험구에서 9.8%로 가장 낮은 생존율을 나타냈다(그림 3-13).

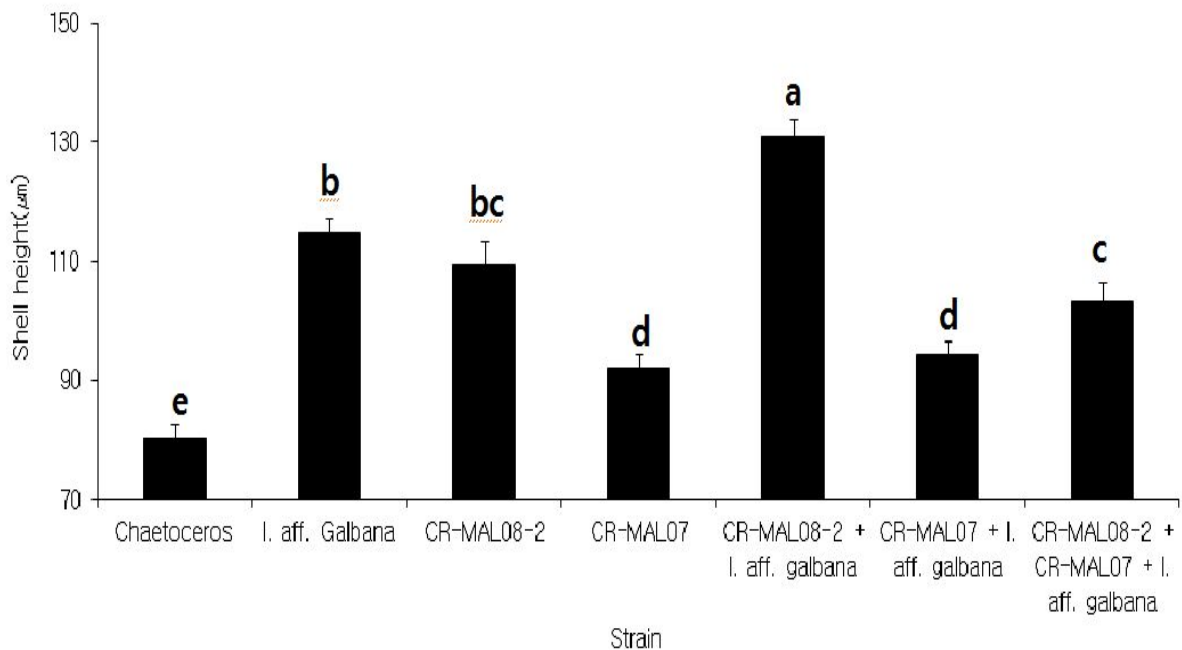


그림 3-12. Shell hight of the Pacific oyster *Crassostrea gigla* larvae fed different diets including the cryptophyte (CR-MAL 08-2, 07), *Chaetoceros sp.*, and *Isochrysis aff. galbana*.

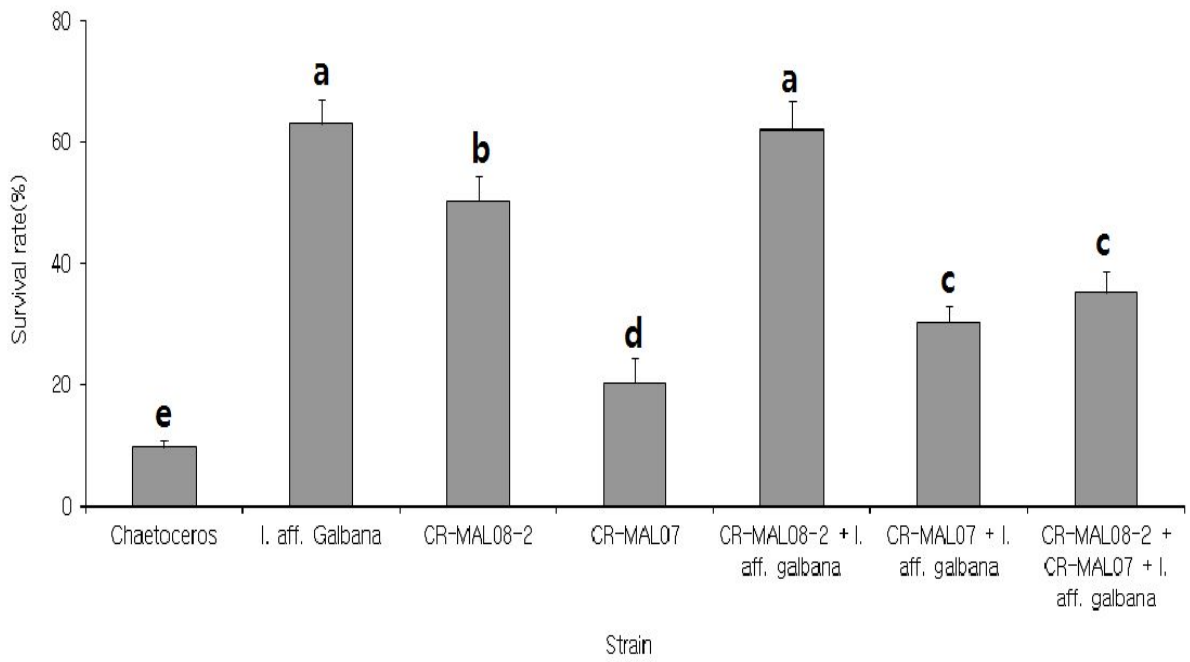


그림 3-13. Survival rate of the Pacific oyster *Crassostrea gigla* larvae fed different diets including the cryptophyte (CR-MAL 08-2, 07), *Chaetoceros* sp., and *Isochrysis* aff. *galbana*.

2. 기능성 물질 및 색소 추출

가. 활성물질 탐색

1) 물질추출 방법

광생물 신규 종주로부터 기능성 화합물 탐색을 위하여 연구 대상의 종주를 2L규모로 배양한 후 이를 GF/C 여과지를 사용하여 여과하였고, 여과된 여과지를 100% MeOH 용매 200ml에 넣어 24시간 씩 2회 ultra sonication을 사용하여 추출하였다. 그 후 부유물질을 제거하기 위하여 cotton을 이용하였고, 여과액을 감압농축기(evaporator)로 농축 후 소금(salt)과 유기물질을 분배하기 위하여 H₂O과 butanol로 partition을 실시한 후, 이어 butanol층을 다시 농축하여 지방산을 제거하기 위해 85%MeOH 과 n-hexane을 사용하여 partition을 실시하였고 최종적으로 85%MeOH 층을 얻었으며, 이 85% MeOH 분액에 대하여 항산화 및 항진균 활성 검사를 실시하였다.

2) 활성검사 방법 및 결과

항진균 활성은 진균류인 *Candida albicans*를 페트리디쉬에 YM 고체배지에 배양하여 디스크 확산법 (Disc Diffusion Method)을 수행하였고, 양성대조군으로 Amphotericin-B와 음성대조군으로 DMSO 용액을 사용하였으며, 디스크 확산법에 의해 형성된 clean zone의 크기를 측정하여 활성의 정도를 측정하였다. 추출된 물질의 항산화 활성을 보기 위하여 활성 라디칼 소거법을 이용하였는데, 이 때 사용된 방법은 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryldrazyl) 라디칼 소거능을 실험하였고, DPPH 용액을 80 μ g/ml in MeOH로 조제하고 측정하고자 하는 각 종주의 추출물을 200ppm, 20ppm, 2ppm의 농도로 만든 후 여기에 각각 DPPH용액을 40 μ l씩 넣어 spectrophotometer 517nm파장으로 흡광도를 측정하였다. 이 실험에서 양성대조군으로 Ascorbic acid와 음성대조군으로 100% MeOH용액을 사용하였다.

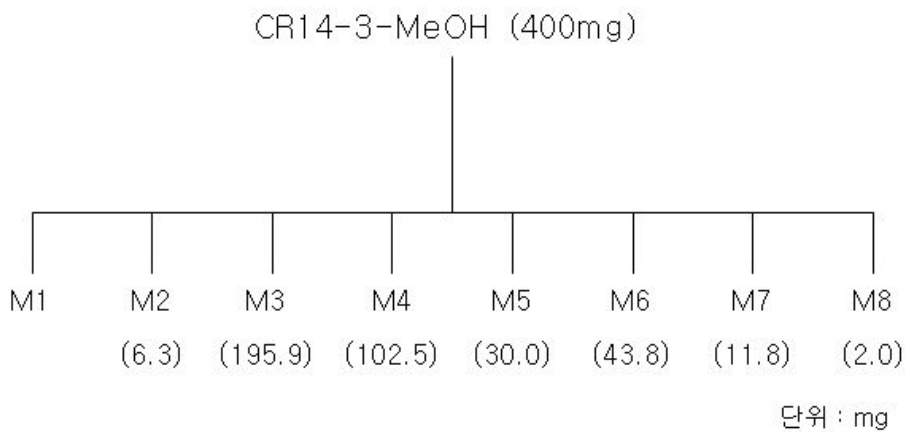
사용된 신규 광생물 먹이 9개 종주의 추출물에 대하여 항진균 활성을 측정한 결과 모든 종주가 뚜렷한 활성을 보여 주지 않았고, 9개 종주에 대한 항산화 활성의 결과 값은 아래의 표 3-8과 같이, CR-MAL03, CR-MAL07 그리고 CR-MAL08-2 종주의 추출물에서 비록 효과가 크지 않지만 DPPH 소거능을 보여 주었다.

표 3-8. 신규 종주 배양체별 추출물 농도에 따른 항산화 활성도

종주번호	추출물 농도		
	200ppm	20ppm	2ppm
CR-MAL01	13%	5%	0%
CR-MAL02	9%	3%	2%
CR-MAL03	33%	5%	0%
CR-MAL04	11%	2%	3%
CR-MAL05	10%	2%	-3%
CR-MAL06	9%	2%	-2%
CR-MAL07	22%	3%	2%
CR-MAL08-1	13%	3%	0%
CR-MAL08-2	44%	3%	0%
Ascorbic acid	100%	100%	74%

3) 메탄올 추출로부터 활성 물질 탐색

CR-MAL08-2 종주를 대량배양한 후 이들 배양체로부터 얻어진 메탄올 추출물에 대하여 약한 활성 라디칼 소거 활성을 보여주어 추출물을 sepadex LH20 레진을 사용하여 아래 도식대로 8개의 분액으로 나누었다.



8개의 분액에 대하여 활성 라디칼 소거능 테스트를 한 결과 아래의 표 3-9에서 주어진 대로 양이 매우 적은 M2 분액에서 약한 활성을 보여 주었다.

표 3-9. 8개 분액에 대한 활성 라디칼 소거능 테스트 결과

	40mg (200ppm)	4mg (20ppm)	0.4mg (2ppm)
ascorbic acid (대조군)	87%	90%	94%
CR-MAL08-2-MeOH-M2(보정)	70%	22%	18%
CR-MAL08-2-MeOH-M3(보정)	24%	7%	4%
CR-MAL08-2-MeOH-M4(보정)	52%	24%	9%

약한 라디칼 소거능을 보여준 분액의 양이 적어 추가적인 분리를 진행할 수 없어 활성 추적 탐색은 더 이상 진행할 수 없었다. 그 외 다른 분액에 대하여 수소 NMR 분광기를 활용하여 각 분액에 대하여 성분을 조사한 결과 대부분의 양은 지방산으로 나타났으며 M7과 8은 chlorophyll c1으로 밝혀졌다. 대부분 일반적으로 잘 알려진 지방산으로 구성되어 있었으며 특징적으로 불포화 지방산이 많이 함유되어 있었다. 그 중 cryptomonas에서만 분리되고 있는 DGTA (Diacylglycerol-O-(hydroxymethyl)(N,N,N-trimethyl)-alanine) 계열의 지방산을 분리할 수 있었다.

가) DGTA (1) 구조 재확인

M2 분액으로부터 분리된 지방산 화합물 1은 질량분석 결과 856 ([M+H]=856)으로 주어져 분자량이 855로 나타났다(그림 3-14). 화합물 1의 수소 NMR 스펙트럼에서 5.3ppm과 2.8 ppm에서 강한 신호를 보여 주고 있었으며 0.9ppm에서 삼중선의 메틸 신호와 3.1ppm에서 강한 단일선을 보여 주었다. 그리고 탄소 NMR 스펙트럼에서 128-130ppm 부근에 중첩된 탄소신호의 관측은 화합물 1이 불포화도가 높은 지방산의 특징을 나타내었다.

이 외에 화합물 1의 큰 특징은 3.5-4.5ppm 사이 수소 신호가 여러 개가 나타나고 있는 데 이것은 일반적인 글라이세롤계의 지방산에서 나타나는 신호와 큰 차이를 보여 주고 있다. 이들의 수소 신호와 탄소 신호를 관측하여 이들 간의 관계를 위하여 2D NMR 실험을 실시하여 그들 간의 연결성을 밝혀내었다. 그 결과 아래와 같은 구조를 규명하였으며 측정된 수소와 탄소 신호를 각각 지정할 수 있었다.

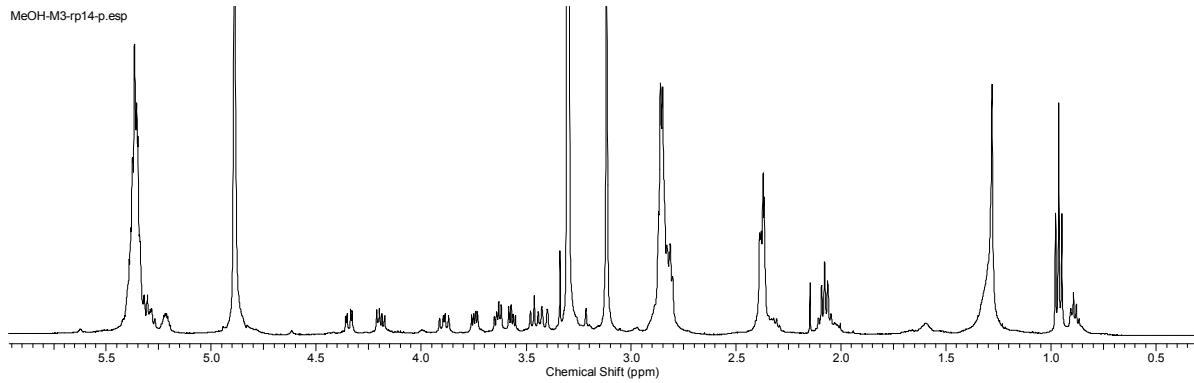
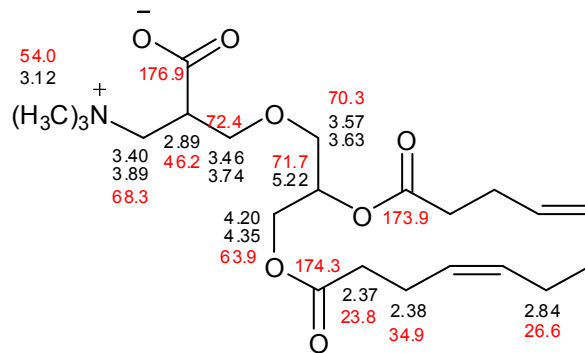


그림 3-14. 화합물 1의 수소 NMR 스펙트럼



위 구조에서 볼 수 있듯이 trimethyl ammonium 작용기가 있으며 46.2ppm에 있는 메틴 탄소에 카르복실산이 연결되어 있으며 이 탄소 양 옆에 각각 메틸렌기가 붙여 있다. 그리고 71.7ppm과 63.6ppm에 각각 에스터 결합으로 불포화 탄소 사슬이 각각 연결되어 있었다.

두 개의 불포화 탄소 사슬은 수소 NMR 스펙트럼이 동일하여 두 사슬이 동일한 길이로 주어져 있는 것으로 추정되며 위 구조를 갖는 화합물 1의 분자 구조는 문헌 검색 결과 기존에 *Cryptomoas*속에서 보고된 적은 있는 Betain 구조로 밝혀졌다.

나. 색소체 분석 및 분리

1) 색소체 분석

12종주의 은편모류로부터 성장 특징과 항산화 효과로부터 선정된 은편모류 CR-MAL08-2에 대하여 500L 규모로 대량 배양하여 해수를 여과한 후 은편모류의 생물량 4g(건조중량)을 얻었다. 건조된 생물체에 대하여 아세톤 용매 200mL를 사용하여 1일간 추출하고, 그 다음 메탄올 용매 200mL를 넣어 다시 1일간 추출 과정을 거쳤다. 아세톤

용매에서 추출된 유기물질 양은 약 200mg으로 주어졌으며 메탄올은 약 400mg의 유기 조추출물을 확보하였다.

두 용매로 로부터 추출된 추출물에 대하여 색소체를 분석하였다. 색소체 분석은 아래 조건으로 HPLC를 이용하였다.

- HPLC : Agilent 1200 series
- Column : Agilent Eclipse XDB-C8 (150×4.6mm) 3.5 μ m
- 검출기 : DAD (190 - 800nm)
- 측정 파장 : 450nm
- 측정온도 : 50℃
- 전개 용매 : solvent A - 70 : 30(MeOH : 28mM ammonium acetate pH 6.5)
solvent B - 100% MeOH
- 유속 : 1ml / min
- 주입량 : 10 μ l (추출시료 : 초기 전개 용매 = 1:4)
- 용매 기울기 : 0분 - 95% A, 5% B
50분 - 5% A, 95% B
53분 - 5% A, 95% B
54분 - 95% A, 5% B
59분 - 95% A, 5% B

광생물 먹이종주 CR-MAL08-2의 생물체에 대한 추출물의 색소체는 여러 종류가 분석되지 않았으나, 그 중 함량이 많은 성분 3개와 매우 적은 함량의 색소체 3종류가 분석되었다. 이들 색소체의 종류는 표준 색소체와 머무름 시간을 비교하여 색소체를 추정하였다(그림 3-16).

은편모류의 색소체는 많은 양의 alloxanthin, chlorophyll a와 c1이 분석되었다. 그리고 연구된 CR-MAL08-2의 생물체로부터 특징적으로 소량의 monodoxanthin과 crocoxanthin이 들어 있는 것으로 분석되었으며, α -carotene도 분석되었다. 아세톤 추출물과 메탄올 추출물에서 공통으로 alloxanthin, monodoxanthin, crocoxanthin, α -carotene이 분석되었으나 chlorophyll c1은 메탄올 추출물에서만 나타났다(그림 3-17).

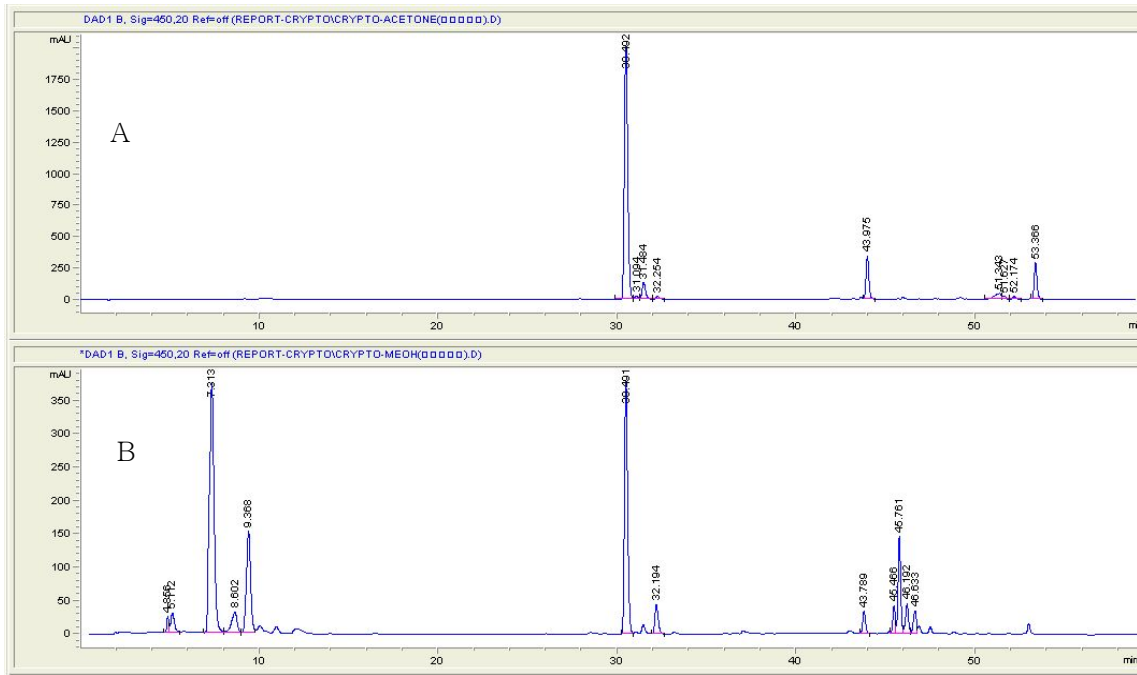


그림 3-16. 아세톤 추출물(A)과 메탄올 추출물(B)에 대한 색소체 분석

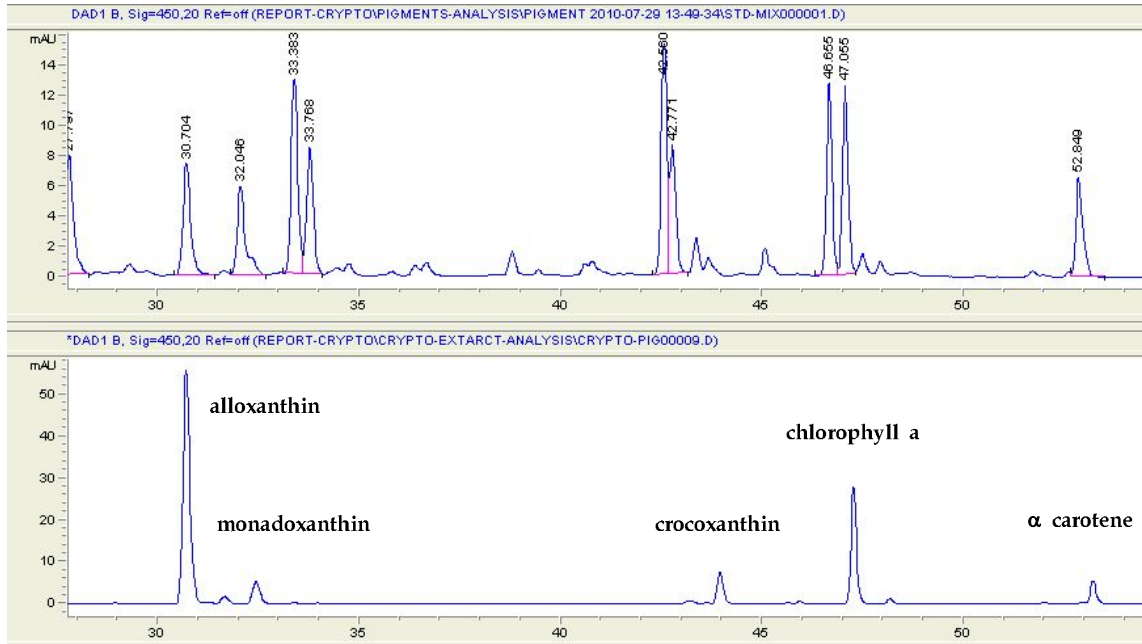


그림 3-17. 표준 색소체 (상)로부터 CR-MAL08-2 (하)의 색소체 분석

2) 색소체 분리

가) 아세톤 추출물로부터 색소체 분리

색소체 분석에서 주어진 색소체를 분리하기 위하여 먼저 아세톤 추출물 200mg 중 50mg에 대하여 실리카 카트리지를 이용하여 극성 물질을 여과하여 아래의 조건으로 실리카 HPLC로 아래와 같이 색소체를 분리하였다.

- Column : YMC SIL (250 × 10mm) 5 μ m
- 검출기 : RI
- 전개 용매 : 20% 에틸아세테이트 : 80% 헥산
- 유속 : 1ml / min

이 결과 그림 3-18과 같이 크로마토그램이 주어졌으며 그 중 1번(노란색), 7번(열은 초록색), 9번(열은 초록색)이 색소체이며 나머지는 지방 성분으로 밝혀졌다.

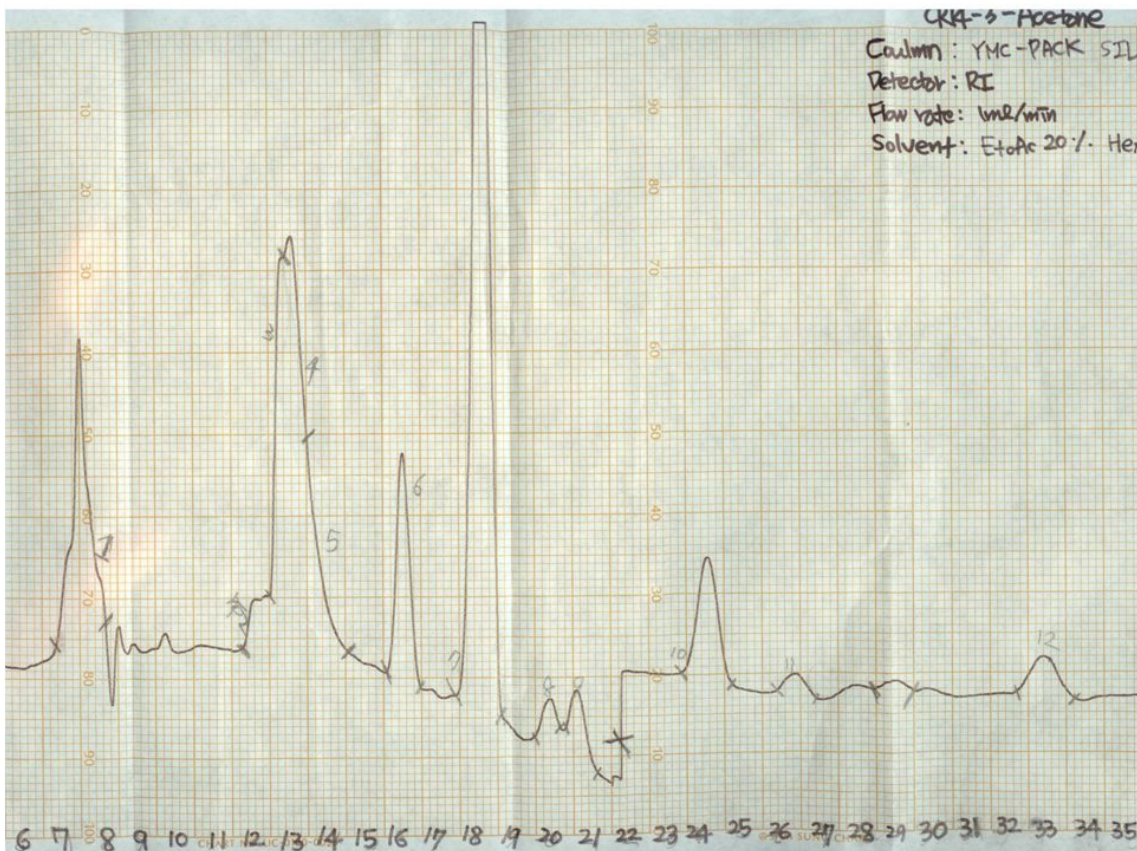
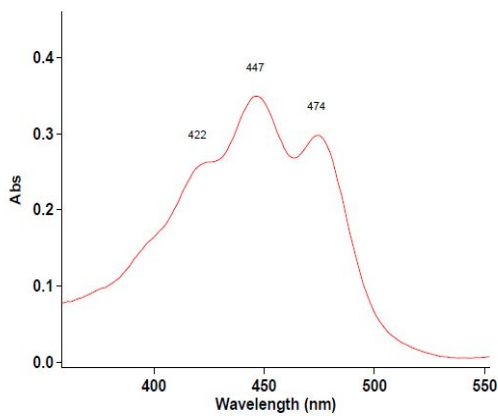
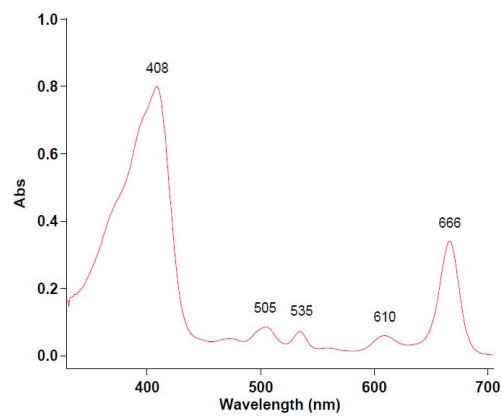


그림 3-18. HPLC를 이용한 에틸아세테이트 분액으로부터 색소체 분리

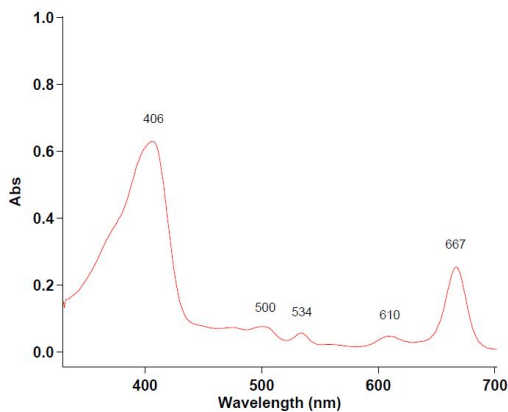
HPLC로 아세톤 추출물 50 mg을 분리한 결과 1번, 7번 그리고 9번이 색깔을 띠고 있어 색소체로 주어졌다. 이 성분들에 대하여 색소체를 확인하기 위하여 아세톤 용매로 UV spectrum을 측정한 결과 1번이 a-carotene이며 7번이 pheophytin A, 9번은 pyropheophytin A로 밝혀졌다. 아세톤 추출물 50 mg에 대하여 분리한 결과 a-carotene 이 2 mg, pheophytin A가 3 mg, pyropheophytin A가 1 mg씩 각각 주어졌으며 pheophytin A와 pyropheophytin A가 UV 스펙트럼에서 매우 비슷하여 식별이 어려워 깨끗하게 정제된 7번 색소체에 대하여 NMR을 측정하여 두 화합물을 확인할 수 있었다. 세 종류의 색소체에 대한 UV spectrum을 나타내었으며(그림 3-19), 7번 분액에 대한 수소 NMR 스펙트럼이다(그림 3-20). 그림 3-20에서 주어진 수소 NMR 스펙트럼과 다른 2D NMR 실험을 통하여 pheophytin A의 구조를 확인할 수 있었다.



(a) 1번 - a carotene



(b) 7번 - pheophytin A



(c) 9번 - pyropheophytin A

그림 3-19. 아세톤 분액에서 분리된 색소체에 대한 UV 스펙트럼

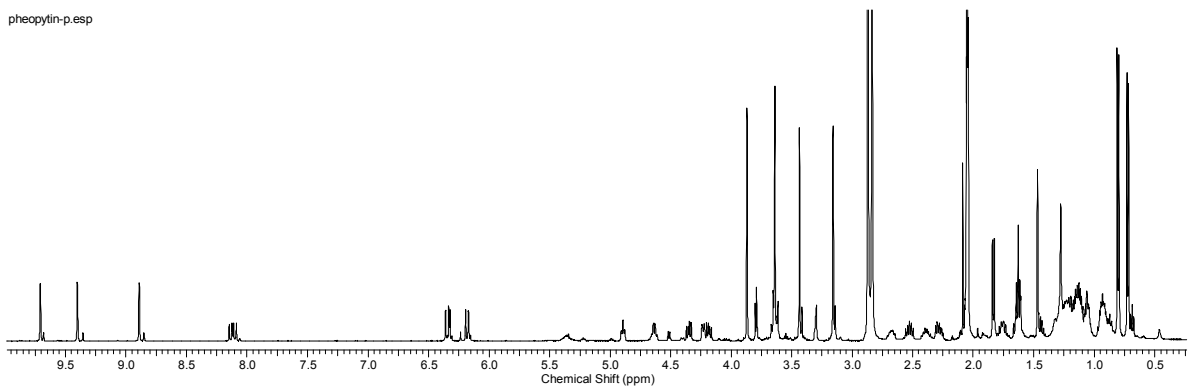


그림 3-20. pheophytin A에 대한 수소 NMR 스펙트럼

나) 메탄올 분액으로부터 색소체 분리

아세톤 추출물보다 비교적 극성이 강하여 메탄올 분액 400mg 중 100mg에 대하여 색소체 분리는 다음과 같은 조건의 역상 HPLC를 이용하였다.

- 컬럼 : Gemini C6 phenyl (150 × 4.6 mm)
- 검출기 : UV (380nm)
- 전개 용매 : solvent A - 100% H₂O
solvent B - 100% MeOH
- 유속 : 1ml / min
- 용매 기울기 : 0분 - 10% A, 90% B
20분 - 5% A, 95% B
25분 - 0% A, 100% B
50분 - 0% A, 100% B

앞의 경우와 동일하게 위의 조건으로 반복하여 색소체를 분리하였다. 그림 3-21에 주어진 대로 2번, 3-2, 4-1, 5 분액이 색을 띠어 색소체임을 확인하였고 이들 분액 각각에 대하여 UV 스펙트럼을 측정하여 색소체 동정을 하였다. UV 스펙트럼으로부터 2번 분액은 2mg 이상 비교적 양이 많이 분리되어 alloxanthin이라는 사실을 확인하였으나 노란색을 띠는 3-2, 4-1 분액은 양이 적을 뿐 아니라 지방산과 혼합되어 있다는 NMR 측정 결과 이를 확인할 수 있었다. 그러나 4-1 분액은 색소체가 대부분 한 개의 색소체로 구성되어 있다는 것을 UV스펙트럼에서 확인할 수 있었으며 이 색소체는 crocoxanthin이라는 다

른 생물에서 혼하지 않은 색소체로 밝혀졌다. 이 결과는 ESI-MS 측정결과 분자량이 550 ($[M+Na]=573$)과 일치되는 것을 확인할 수 있었다(그림 3-22). 한편 3-2 분액은 UV스펙트럼에서 alloxanthin과 매우 유사하나 적은 양으로 monodoxanthin 성분이 혼합된 것을 ESI-MS 측정결과 분자량 568 ($[M+Na]=591$)에서 확인할 수 있었다.

일반적으로 생물체로부터 색소체 추출은 아세톤 용매를 이용하고 있다. 본 연구에서도 아세톤 및 메탄올 추출물에서 공통적으로 들어 있는 색소체를 분리할 수 있었다. alloxanthin이 대부분을 차지하고 있었으나 아세톤 추출물에서는 chlorophyll a를 분리할 수 없었다. 대신 chlorophyll a에서 Mg 성분이 떨어져 나간 pheophytin a와 유사 pyropheophytin a를 얻을 수 있었다. 대신 메탄올 추출물에서는 chlorophyll a와 극성이 큰 chlorophyll c1를 각각 분리할 수 있었다.

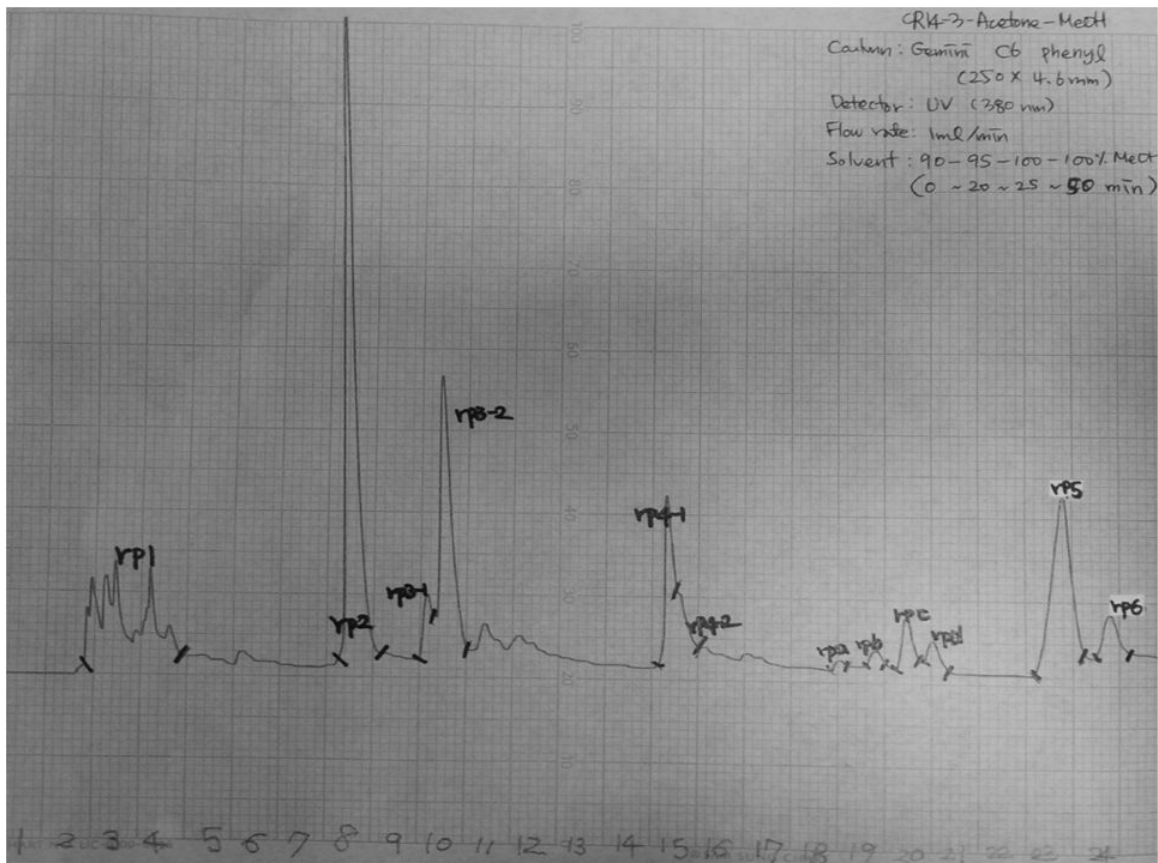
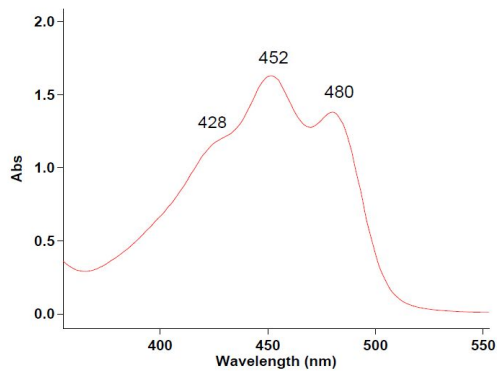
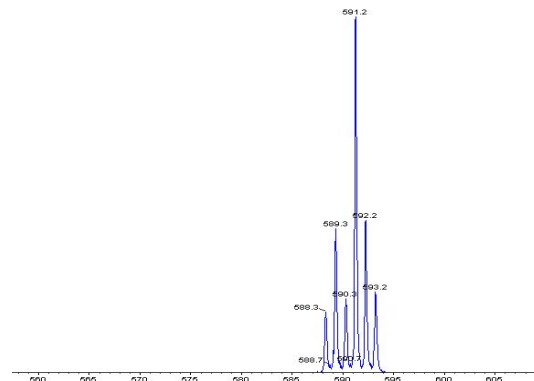


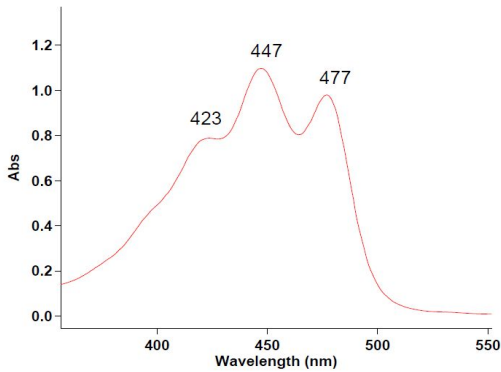
그림 3-21. HPLC를 이용한 메탄올 분액으로부터 색소체 분리



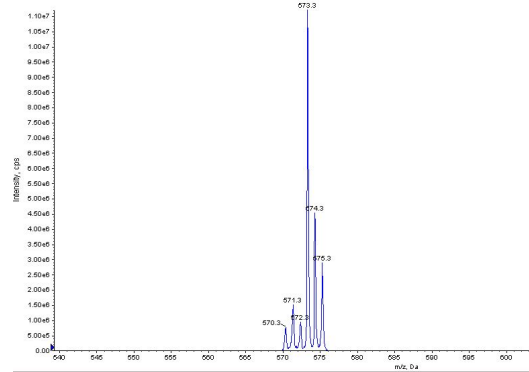
(a) 3-2번 분액에 대한 UV -monadoxanthin



b) 3-2 번 분액에 대한 MS 분석



(c) 4-1번 분액에 대한 UV - crocoxanthin

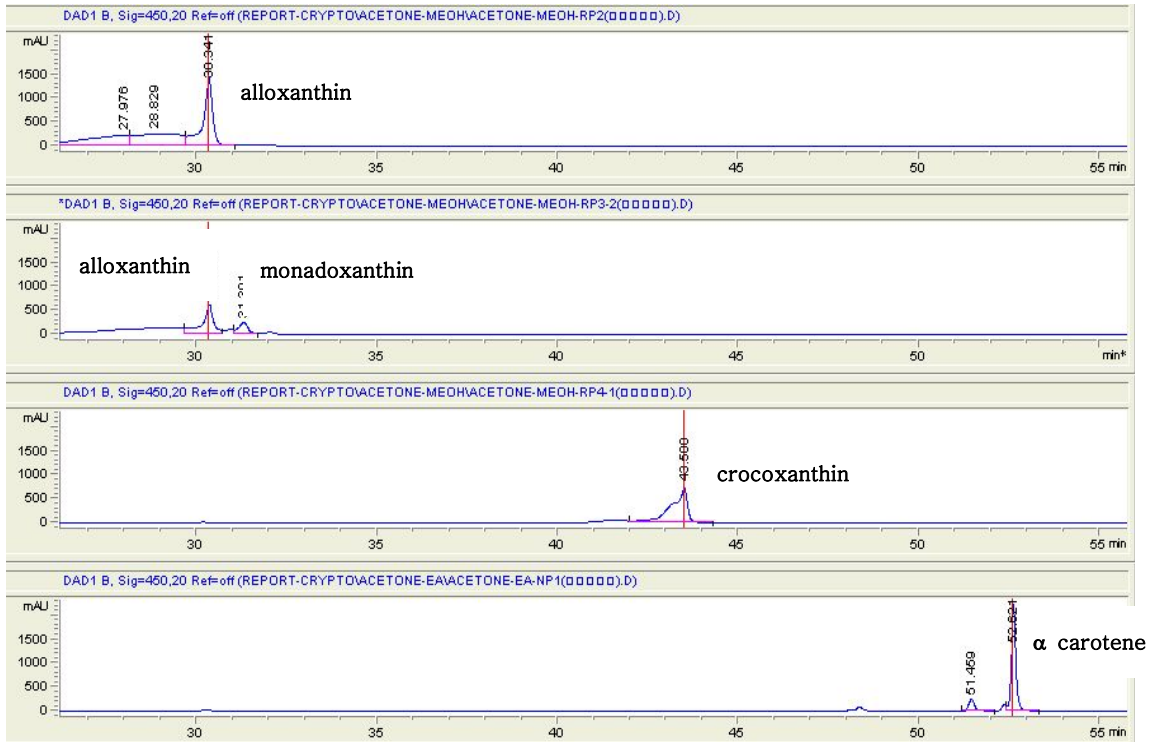


d) 4-1번 분액의 MS 분석

그림 3-22. 메탄올 추출물에서 분리된 색소체에 대한 UV과 MS 스펙트럼

본 연구에서 7개의 색소체를 분리·확인하였다. 이들 색소체를 위하여 사용된 생물체는 cryptomonadales 목에 속하는 *Teleurax*이며, 문헌에 따르면 Cryptomonadales에 속하는 종은 chlorophyll a를 가장 많이 함유하고 있고, 다음으로 chlorophyll c1과 alloxanthin이 많이 있다고 알려져 있다. 그리고 소량으로 monadoxanthin과 crocoxanthin 및 α -carotene이 분석되고 있는 데, 이 결과는 본 연구 결과와 동일하게 주어지고 있다. 그러나 본 연구에서 분리된 pheophytin a와 pyropheophytin a는 생물체가 만들어내 것이 아니라 실리카 컬럼을 사용하여 분리하는 과정에서 chlorophyll a가 변형되어 만들어진 것으로 추정할 수 있다. 아세톤과 메탄올 추출물 전체에서 약 1/3 혹은 1/4정도에서 색소체를 분리하였다. 이는 많은 양을 고순도로 분리하면 색소체가 쉽게 분해되기 때문에 일부분만을 하였으며 본 연구를 통하여 고순도의 색소체를 분리하는 방법을 정립하였다. 특히 monadoxanthin과 crocoxanthin, α -carotene은 쉽게 얻을 수 없는 색소체로 희소성이 크다고 할 수 있다. 그림 3-23과 그림 3-24는 분리된 색소체 각각에 대하여 표준 색소체 분석과 같은 조건으로 분석하였으며 이와 함께 각각의 색소체에 대한 UV 스펙트럼을 비교하였다. 그리고 최종적으로 분리된 색소체를 그림 3-25에 나타내었다.

(a)



(b)

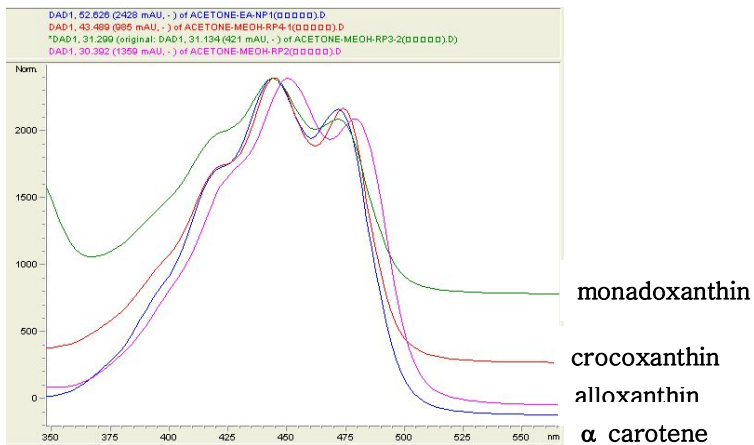
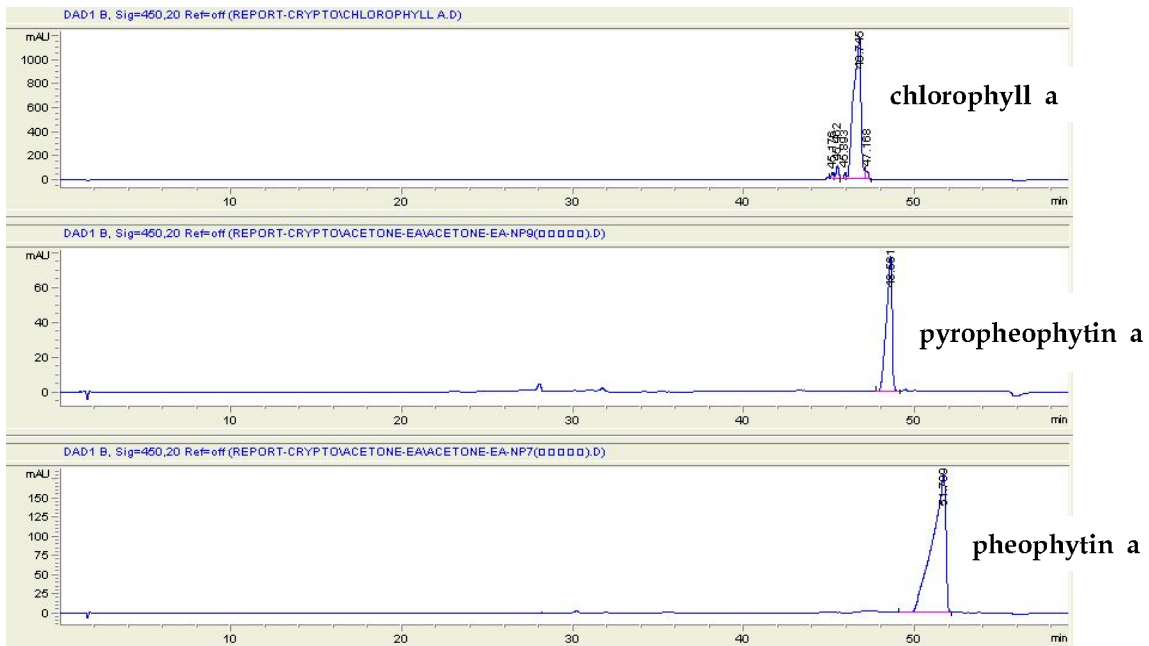


그림 3-23. 분리된 carotenoid 계 색소체 확인 (a) HPLC 크로마토그램 (b) UV 스펙트럼

(a)



(b)

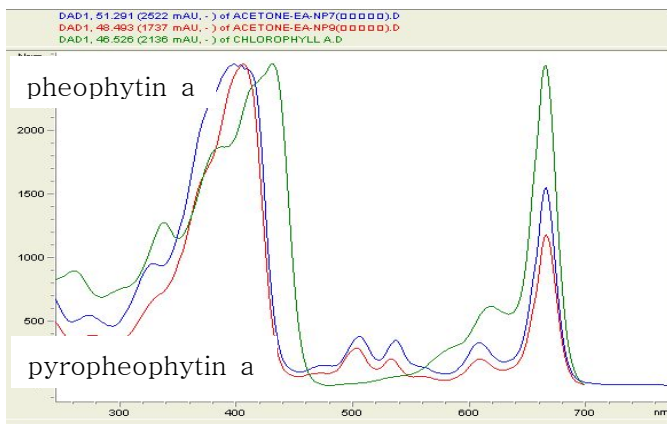


그림 3-24. 분리된 chlorophyll계 색소체 확인 (a) HPLC 크로마토그램 (b) UV 스펙트럼

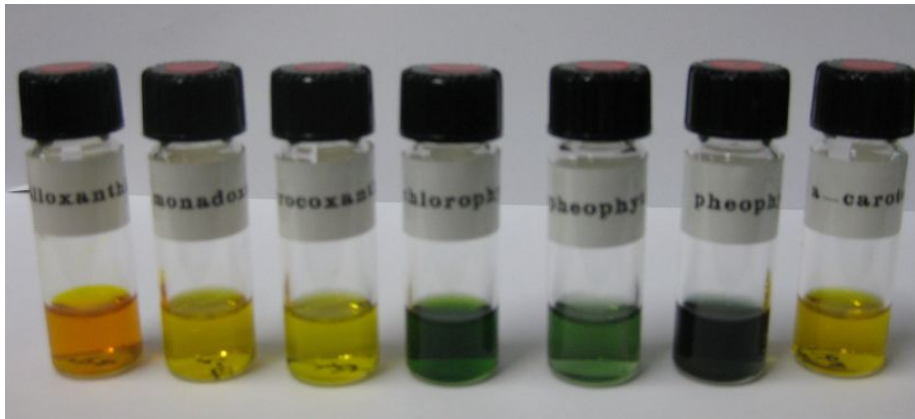


그림 3-25. 광생물 은편모류 CR-MAL08-02로부터 분리된 색소체

제 4 절 농축기술 적용 및 시제품 생산

1. 배양체 수확시 농축효율 비교

본 연구에서 확보한 해양 미세조류인 은편모류는 편모를 가지고 운동하는 약 $5\mu\text{m}$ 크기의 세포입자로서, 입자의 개념으로 봤을 때 매우 작고 세포벽이 물리·화학적 충격으로부터 저항력이 낮아 대량 배양체를 높은 회수율로 농축하기가 쉽지 않고 다양한 농축법의 적용이 곤란하다.

유리섬유여과지(Glass-fiber filter) 등을 통한 물리적 농축법은 95%에 가까운 세포입자 회수율을 얻을 수 있지만, 막대한 소요시간으로 인하여 비효율적이므로 대규모의 대량 배양체의 농축에는 적합하지 않으며, pH 조절 등을 통한 세포입자 침강·회수 방법은 세포막이 매우 연약하고 화학적으로 민감한 은편모류 세포에게 적절하지 않으며, 농축배양체의 영양성분 상태를 보장할 수 없으므로 살아있는 먹이생물로 활용하기 위한 수확방법이 아닌 것으로 나타났다.

고속원심분리기를 이용한 배양체 농축방법은 1ton의 시료를 최고 5시간 내로 처리가 가능하며, 여타 물리적 여과농축 방식과 비교하여도 높은 85%를 상회하는 회수율을 보인다(표 4-1). 이 회수율은 파손되지 않은 건강한 세포입자의 계수를 통해 산출된 결과로서 고속원심분리기의 회전압력을 통해서도 배양체 세포입자의 대부분이 회수되었다고 판단된다. 본 연구진행 중 수확직전의 모든 대량 배양체는 세포농도, 원심분리기로 공급되는 펌핑속도, 원심분리기의 회전속도 등을 확인하고 조절하여, 은편모류 세포가 파괴되지 않고 유실없이 높은 회수율을 얻을 수 있도록 하였다.

표 4-1. 고속원심분리기를 통한 배양체 농축효율(수확전후의 세포농도 차이로 계산한 회수율, %)

종주번호	수확직전 배양체①	수확 후 농축(1000배)배양체②	회수율(%)
CR-MAL07	597,000 cells · ml ⁻¹	517,600 × 10 ³ cells · ml ⁻¹	86.7
CR-MAL08-2	571,000 cells · ml ⁻¹	489,200 × 10 ³ cells · ml ⁻¹	85.6

$$\text{회수율(\%)} = \text{②}/(\text{①}\times 1000)\times 100$$

2. 농축배양체의 보관법

가. 보관온도 테스트

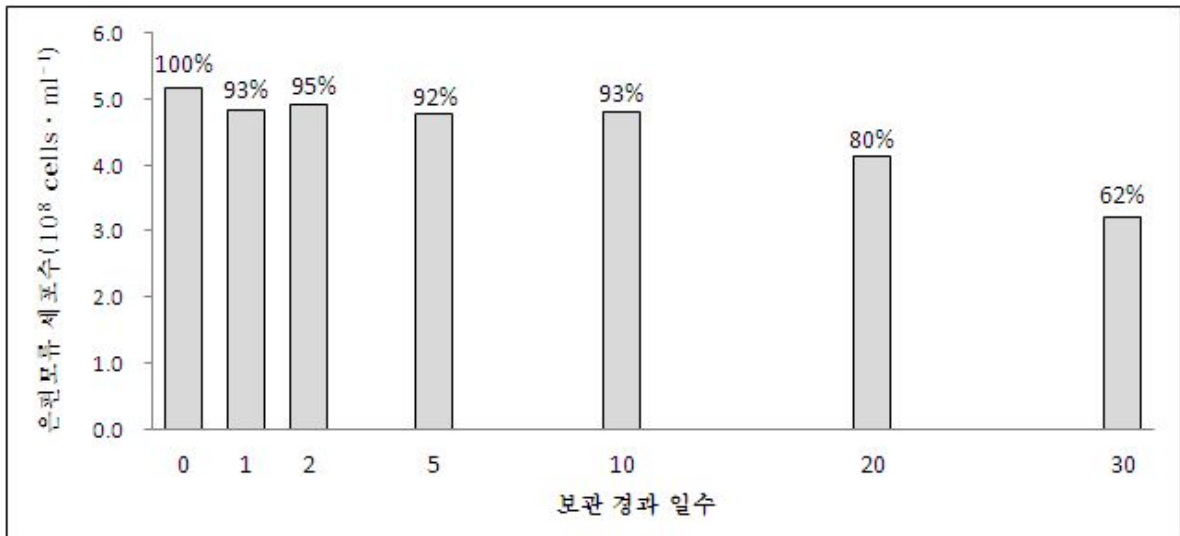
농축배양체가 수산 양식용 먹이 및 기타 식품 등으로 활용되기 위해서, 기본적으로 제품으로서 농축배양체의 품질을 유지할 수 있는 보관방안을 탐색하여야 한다. 고속원심분리기를 통하여 농축된 은편모류 배양체는 고농도의 유기입자 덩어리이므로 변질이 되지 않도록 냉암소 보관, 청결유지 등의 기본적인 관리방법이 요구된다.

향후 다양한 가치의 제품으로서 활용가능성을 고려하여, 적정 영양성분 유지가 가능한 보관온도 조건 및 기간을 알아보기 위해 ㉠냉장보관(5℃ 이하), ㉡상온보관(10~15℃), ㉢해동상태(급속냉동후)에서의 은편모류 세포입자의 보존율을 현미경 관찰을 통해 확인하였다(그림 4-1~2).

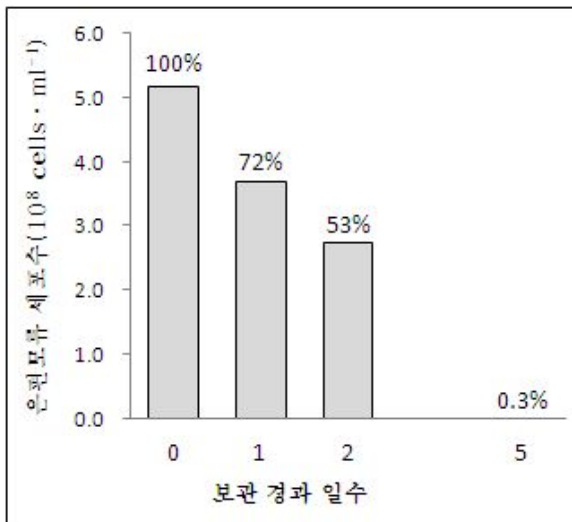
나. 보관테스트 결과 및 보관방법

은편모류 농축배양체는 5℃ 이하 냉장보관을 했을 때, 20일 경과시까지 80%이상의 세포입자 보존율을 보였고 30일 이상 냉장보관시에는 세포입자의 분해로 인한 유기물 덩어리 등의 증가와 변질이 우려되며, 세포보존율도 60% 수준으로 현저히 떨어졌다. 상온보관(10~15℃)시에는 배양체 세포입자의 파괴 및 유기물분해 속도가 급격하므로 농축배양체의 상온노출은 피해야 할 것으로 보인다. 배양체의 급속냉동은 영양성분의 보존을 최대한 방지해 줄 것으로 보이나, 해동 직후 수일 이내 분해로 인한 변질산물이 증가하고 세포상태가 불량해지므로, 입자성 먹이로서 활용되기 위해서 적절한 보관법이 아닌 것으로 판단된다.

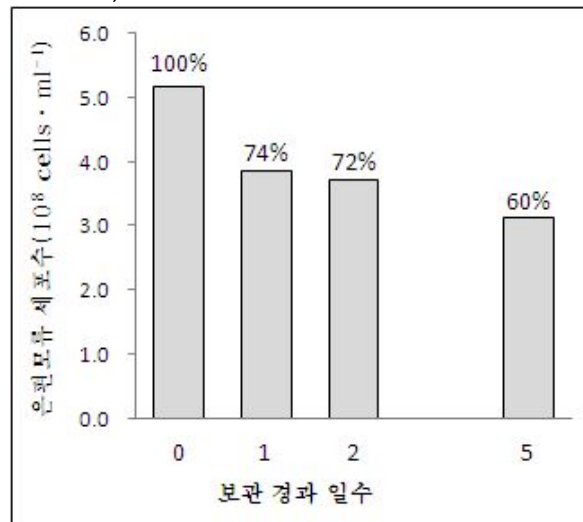
대부분의 액상사료나 식품에서의 일반적 기준에 근거하여, 상온보관은 제품의 품질을 보장할 수 없으며, 먹이생물제품으로서 품질가치가 떨어지므로 보관을 위해서 반드시 냉장이 가능한 보관시설이 준비되어야 하며, 가장 효율적 보관온도 조건은 얼지 않는 범위 내에서 5℃ 이하 냉장보관을 하도록 하고, 제품의 변질을 고려하여 20일 이상 냉장보관한 제품사용은 지양하도록 해야 한다.



냉장보관(5°C 이하)

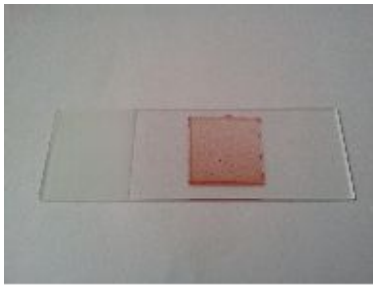


상온보관(10~15°C)



해동 상태

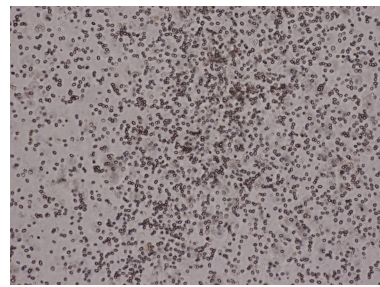
그림 4-1. 농축배양체의 보관환경에 따른 세포 입자수 변화와 보존율(%)



농축배양체 현미경 관찰



배양체 수확 직전



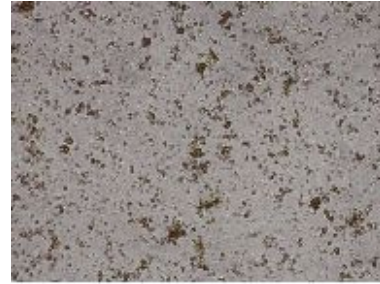
농축 직후



냉장보관(5°C 이하) - 10일째



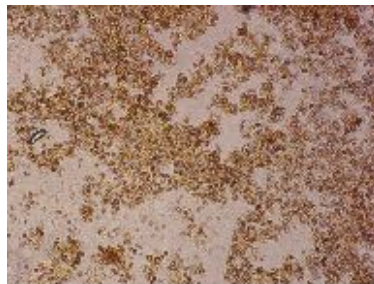
냉장보관(5°C 이하) - 20일째



냉장보관(5°C 이하) - 30일째



상온보관(10~15°C) - 5일째



해동 직후



해동 후 냉장보관 - 5일째

그림 4-2. 농축배양체의 보관방법에 따른 상태 변화(현미경 100배율 관찰)

3. 시제품의 제작

가. 시제품 제작 과정

1) 시제품 대상 배양종

광생물 은편모류 종주 CR-MAL07과 CR-MAL10은 대량 배양환경에서 성장속도가 가장 빠르며 최적조건의 배양액 적용시 고밀도 대량배양이 가능하고, 영양성분 면에서 일반 영양성분은 물론 아미노산, 지방산 조성 비율이 우수하였다. CR-MAL07과 CR-MAL10 종주를 시제품 생산을 위해 대량배양이 필요한 대상으로 선별하였다.

2) 대량배양 및 농축

최대영양성분 함유조건의 배양체를 얻기 위하여 CR-MAL07과 CR-MAL10 두 배양종주에 대하여 최적의 배양액 조건(f/2-Si), 충분한 광량을 공급하고 지속적으로 관찰·관리하여 최대 세포밀도의 배양체를 적정시기에 수확하였다. 고속연속원심분리기를 이용하여 대량 배양체를 농축(1000배)하여, 1L 용량의 농축 배양체를 얻었고, 이때의 세포밀도는 1ml당 4.5억~5.5억 세포 수준이었다.

3) 제품 용기 및 라벨 제작

농축배양체를 담아야 할 용기는 1L 용량의 PE(폴리에틸렌)재질의 무균병을 선택하여 취급을 용이하게 하였고, 용기 전면에는 제품라벨을 제작하여 부착하였으며, 제품라벨에 표기된 정보는 제품번호, 제품명, 제품의 상태, 용도, 원료명, 일반 영양성분 함량, 제품중량, 보관 주의사항, 제조 소재지 등을 명기하였다.

나. 시제품 완성

본 시제품의 명칭은 '액상농축은편모류'이며, 어패류 종묘생산시 고품질의 첨가용 먹이로서 또는 미세조류 기원의 각종 기능성 물질을 탐색함에 있어 사용이 간편하고 효율적 연구재료로서의 가치가 있는 미세조류 고농축 세포배양체이다. 완성된 시제품의 이미지는 그림 4-3과 같다.



그림 4-3. '액상농축 은편모류' 시제품

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 연구개발 목표의 달성도

1. 1차년도 (2010. 07. ~2011. 06.)

세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
신규 다기능성 광생물 먹이 순수분리 및 환경적응 특성 분석	광생물먹이 순수분리	100	국내 연안산 12개 종주 순수분리 신규 배양종주 12개 계대배양
	환경적응 특성 분석	100	수온(8종주) 및 염분(8종주) 농도 변화에 대한 환경적응 특성 분석
광생물 먹이로서 종주별 기능성 검증	윤충류의 섭식률 및 성장률 검증	100	신규 종주별 농도별 섭식률 분석 신규 종주별 성장률 및 포란율 분석 (9개 신규 종주 분석)
대량배양 및 일반 영양성분 분석	소·중·대량 배양체계 확립	100	소(100ml)→중규모(20L) →대량(500L) 대량배양 체계 확립
	일반 영양성분 분석	100	농축 배양체의 일반 영양성분 분석 (9개 신규종주 분석)
색소 및 기능성 물질 탐색	색소체 추출 및 분석	100	유기물 추출 및 색소체 분석
	기능성 물질 탐색	100	항산화 및 항진균 효과 검사

※ 모든 항목에서 100% 이상 초과달성하였음

2. 2차년도 (2011. 07. ~2012. 06.)

세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
최적 배양조건 및 순환형 배양액 적용 기술 개발	우수종주의 광도 및 영양염 변화에 따른 최적 성장조건 규명	100	우수 종주의 최적 배양조건 (광도, 영양염 농도) 탐색 (7개 신규종주 실시)
	최우수 종주의 순환형 배양액 적용기술 개발	100	경제적인 배양액 탐색 (가축분뇨 발효액비 적용)
	고밀도 배양기술 확립	100	최대 배양밀도 조건 탐색
수산양식 기능성 검증	윤충류의 성장 및 포란율 비교 검증	100	기존 최대 성장효율 조건 탐색 (기존 제품과 비교 분석)
	이매패류 유생의 성장 및 생존율 검증	100	신규 종주별 이매패류 유생에 대한 성장 및 생존율 검증
	기존의 광생물 먹이와 비교 분석	100	신규 종주의 우수성 검증 (굴류 유생에 대한 검증)
	농축 광생물 먹이의 적용방법 개발	100	농축제품의 사용방법 활용 (영양강화에 따른 성분 분석)
고밀도 대량배양 기술 개발 및 농축 시제품 생산	고밀도 대량배양 기술 적용	100	최대 배양밀도 조건 분석
	배양조건별 일반 영양 성분, 아미노산 및 지방산 분석	100	영양염 변화에 따른 최대 영양성분 함유 조건 탐색 (3개 종주 분석)
	농축기술 적용 및 시제품 생산	100	시제품 생산
표준색소 시제품 생산과 기능성 물질 탐색	표준 색소체 5종류 분리 시제품 생산	100	7개 표준 색소체 분리 및 정제
	신규 화합물 분리 및 구조 분석	100	활성 물질 분리 및 구조 분석

※ 모든 항목에서 100% 이상 초과달성하였음

제 2 절 관련분야의 기술발전에 대한 기여도

1. 기술적인 측면

- 계대배양 중인 소규모 배양에서 대량 배양까지 배양과정을 체계적으로 확립하고, 농축 시제품 생산 및 보관 기술까지 확보함으로써 향후 다양한 종류의 광생물 먹이를 개발 하는데 기여할 수 있다.
- 광생물 은편모류로부터 색소체의 탐색 및 분리 기술과 신규성 있는 물질의 탐색, 분리, 구조분석 기술은 표준색소 제조 및 기능성물질 개발 분야에 기여할 수 있다.

2. 경제적 · 산업적 측면

- 국내 연안산 광생물 우수 선발종주를 대량배양한 기술을 보급함으로써 현재 사용되고 있는 외국산 생물 종주를 대체하여 기술종속적 관계를 탈피하고 기술료와 관련된 문제점을 해결해 나갈 수 있다.
- 국내 이매패류 및 해삼류 종묘생산시 수입되고 있는 외국산 광생물 먹이를 대체할 수 있어 수입대체 효과가 있고, 동물먹이생물의 직접 배양에 따른 영양분 충족으로 영양 강화를 위한 시간 및 인건비를 줄일 수 있어 수산양식 산업의 생산성을 향상시킬 수 있다.
- 일부 색소는 항산화, 면역강화 기능 및 자외선 차단 효과 등이 우수하여 의약품 및 정밀화학 원료로도 이용되므로 이를 분석하기 위한 표준색소 제품시장과 광생물의 다양한 색소체를 활용한 전시산업을 활성화시키는데 기여할 수 있다.

3. 사회 · 문화적 측면

- 국내 연안에서 순수분리하여 광생물 먹이종주를 확보함으로써 대국민에 대한 수산생물 자원의 중요성을 인식시키는데 크게 기여할 수 있다.
- 지구온난화 및 에너지 자원 감소에 따라 CO₂의 감축 및 바이오연료의 중요성이 확대되면서 많은 나라에서 미세조류를 포함한 광생물에 대한 관심도가 커지고 있음을 고려할 때, 미세조류를 수산양식용 먹이뿐만 아니라 건강보조식품, 의약품, 바이오연료 등 다양한 분야에 활용할 수 있는 기회를 제공하였다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

- 국내 연안에 서식하는 은편모류 12개 종주를 단종배양체로 확립함으로써 향후 은편모류의 기초 생물학적 또는 산업적 응용연구를 위한 중요한 수산생물 자원을 확보하였고, 동일 종내에서 종주에 따라 성장반응 및 영양성분이 각기 다름을 확인하는 종내 특성을 밝혀냈다.
- 계대배양을 통한 소규모 배양에서 대량 배양까지 일련의 배양과정을 확립하고, 산업적으로 다양한 분야에 활용 가능한 농축 시제품으로까지 개발함과 동시에 이로부터 색소를 추출하는 기술을 확립함에 따라 향후 미세조류를 활용한 산업화의 토대를 마련하였다.
- 동물먹이생물인 윤충류 및 이매패류 유생에 영양학적으로 우수한 은편모류를 공급하는 체계를 확보함으로써 기존의 광생물 먹이와는 달리 직접적인 먹이원, 영양강화제 및 착색제로도 동시에 사용할 수 있는 다기능성의 차별화된 활용가치를 확인하였다.
- 은편모류로부터 지금까지 알려지지 않은 신규성 화합물을 분리하고, 구조를 분석함으로써 향후 해양생물로부터 물질분리 및 구조분석 분야에 새로운 활로를 개척할 수 있는 교두보를 확보하였다.

제 2 절 성과활용 계획

1. 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

- 광생물 먹이인 은편모류의 종주 계대배양 및 대량생산 기술과 색소체 추출을 통한 표준색소 제조 기술은 생산설비가 가능한 업체를 선정하여 기술이전을 통한 산업화를 계획하고 있다.

2. 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등

- 필요할 경우, 국내의 해산 어패류 등 종묘생산 어업인에게 은편모류 종주를 분양하여 종묘생산시 널리 활용될 수 있도록 배양방법을 교육하고, 현장에서 배양기술을 지도할 계획이다.

3. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

- 수산양식을 위한 광생물 먹이와 다양한 색소추출을 위한 생물재료로서 우수종주 1개 품종에 대해 지식재산권을 출원할 계획이다.
- 은편모류의 환경 및 성장반응 특성, 대량배양을 통한 영양성분의 우수성, 윤층류 및 이매패류 유생에 대한 기능성, 신규후보 물질에 대한 추출 및 구조 분석 등에 대한 연구 결과를 국내외 학회지에 논문으로 투고할 예정이다.

4. 추가연구, 타 연구에 활용 계획 등

- 개발된 광생물 먹이 은편모류를 분말화하여 사료에 첨가하거나 동물 먹이생물에 투여하여 초기 어류의 색소발현을 유도할 수 있는 착색제로의 활용 연구와 고단백질을 함유한 건강보조식품으로서의 활용가치 등에 대한 추가적인 활용연구가 필요하다.
- 이와 같은 추가적인 활용연구는 현재보다 더 높은 밀도의 대량배양을 위한 생물학적·배양기술적 추가연구가 필요하고, 이를 통해 수확시 고속원심분리를 통해 수반되는 과다경비 소요 문제를 해결함으로써 경제성을 현재보다 더 높일 수 있을 것이다.
- 지방함량이 높은 은편모류 종주는 바이오디젤 생산 연구에, 탄수화물 함량이 높은 은편모류 종주는 바이오에탄올 생산 연구에 활용할 수 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 본 연구과제에서 개발한 은편모류를 이용한 수산양식용 먹이생물로서 활용하기 위한 기술개발에 관한 보고는 찾아보기 어려웠다.
2. 최근 화석연료의 고갈 및 기후변화와 관련된 저탄소 녹색성장 신기술과 연계된 바이오 에너지(디젤, 에탄올 등) 개발 및 다양한 종류의 생리활성물질 추출 및 DHA나 EPA와 같은 고도불포화지방산을 생산하는 건강보조식품 개발을 위해 미세조류의 대량배양 및 효율적인 수확방법 등에 관한 연구가 국내외에서 활발하게 진행되고 있었다.
3. 그러나 국내의 경우, 미세조류를 이용한 활발한 연구에도 불구하고 대부분 외국에서 사용하고 있는 종을 들여와 대량배양 및 수확 공정을 개선하여 경제성을 높이는 연구에 국한되어 있고, 국내에 자생하는 종을 탐색하여 다기능성 미세조류로 개발하기 위한 연구는 부족한 편이었다.

참 고 문 헌

- 김형섭, 명금옥, 조수근, 이원호. 2004. 광합성 섬모류 *Mesodinium rubrum* MR-MAL01의 유용성-(1) 이매패류 종묘생산을 위한 먹이생물 유용성. 한국양식학회지 17, 115-121.
- 하나. 2009. 은편모류 종주의 적정 성장조건과 은편모류 기원 색소체 획득 와편모류 *Dinophysis acuminata*의 독성 유출 조건. 군산대학교 석사학위논문, pp.112.
- Alila C, Grenier S, Tamse CT and Kuzirian AM. 1997. Biological factors affecting larval growth in the nudibranch mollusc *Hermisenda crassicornis* (Eschscholtz, 1981). J Exp Mar Bio Ecol 218, 243-262.
- Almeda R, Pedersen TM, Jakobsen HH, Alcaraz M, Calbet A and Hansen W. 2009. Feeding and growth kinetics of the planktotrophic larvae of the spionid polychaete *Polydora ciliata* (Johnston). J Exp Mar Bio Ecol 382, 61-68.
- Brown MR, Jeffrey SW, Volkman JK and Dunstan DA. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. Aquaculture 151, 315-331.
- Brown MR, McCausland MA and Kowalski K. 1998. The nutritional value of four Australian microalgal strains fed to Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat. Aquaculture 165, 281-293.
- Brown MR. 1991. The amino acid and sugar composition of sixteen species of microalgae used in mariculture. J Exp Mar Biol Ecol 145, 79-99.
- Cruz FLD, Valenzuela-Espinoza E, Millan-Nunez R, Trees CC, Santamaria-del-Angel E and Nunez-Cabrero F. 2006. Nutrient uptake, chlorophyll a and carbon fixation by *Rhodomonas* sp. (Cryptophyceae) cultured at different irradiance and nutrient concentrations. Aquacult Eng 35, 51-60.
- Dahl U, Lind CR, Gorokhova E, Eklund B and Breitholtz M, 2009. Food quality effects on copepod growth and development: Implications for bioassays in ecotoxicological testing. Ecotoxicol Environ safe 72, 351-357.
- Dunstan GA, Brown MR and Volkman JK. 2005. Cryptophyceae and rhodophyceae; chemotaxonomy, phylogeny, and application. Phytochemistry 66, 2557-2570.

- Eriksen NT and Iversen LJJ. 1995. Photosynthetic pigments as nitrogen stores in the cryptophyte alga *Rhodomonas* sp. *J Mar Biotechnol* 3, 193-195
- Jeong HJ, Ha JH, Yoo YD, Park JY, Kim JH, Kang NS, Kim TH, Kim HS and Yih W. 2007. Feeding by the *Pfiesteria*-like Heterotrophic Dinoflagellate *Luciella masanensis*. *J Eukaryot Microbiol* 54, 231-241.
- Knuckey RM, Semmens GL, Mayer RJ and MA Rimmer. 2005. Development of an optimal microalgal diet for the culture of the calanoid copepod *Acartia sinhiensis*: Effect of algal species and feed concentration on copepod development. *Aquaculture* 249, 339-351.
- McCausland MA, Brown MR, Barret SM, Diemar JA and Haesman MP. 1999. Evaluation of live microalgae and microalgal pastes as supplementary food for juvenile Pacific oysters *Crassostrea gigas*. *Aquaculture* 174, 323-342.
- McKinnon AD, Duggan S, Nichols PD, Rimmer MA, Semmens G and Robino B. 2003. The potential of tropical paracalanid copepods as live feeds in aquaculture. *Aquaculture* 223, 89-106.
- Renaud SM, Thinh LV and Parry DL. 1999. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species of tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. *Aquaculture* 170, 147-159.
- Schiopu D, George SB and Castell J. 2006. Ingestion rates and dietary lipids affect growth and fatty acid composition of *Dendraster excentricus* larvae. *J Exp Mar Bio Ecol* 328, 47-75.
- Sciandra A, Iazzara L, Claustre H and Babin M. 2000. Response of growth rate, pigment composition and optical properties of *Cryptomonas* sp. to light and nitrogen stress. *Mar Ecol Prog Ser* 201,107-120.
- Seixas P, Rey-Mendez M, Valente LMP and Otero A. 2010. High DHA content in *Artemia* is ineffective to improve *Octopus vulgaris* paralarvae rearing. *Aquaculture* 300, 156-162.
- Seixas P, Coutinho P, Ferreira M and Otero A. 2009. Nutritional value of the cryptophyte *Rhodomonas lens* for *Artemia* sp. *J Exp Mar Bio Ecol* 381, 1-9.

- Silva AF, Lourenco SO and Chaloub RM. 2009. Effects of nitrogen starvation on the photosynthetic physiology of a tropical marine microalga *Rhodomonas* sp. (Cryptophyceae). *Aquat Bot* 91, 291-297.
- Stottrup JG, Bell JG and Sargent JR. 1999. The fate of lipids during development and cold-storage of eggs in the laboratory-reared calanoid copepod, *Acartia tonsa* Dana, and in response to different algal diets. *Aquaculture* 176, 257-269.
- Thinh LV, Renaud SM and Parry DL. 1999. Evaluation of recently isolated Australian tropical microalgae for the enrichment of the dietary value of brine shrimp, *Artemia* nauplii. *Aquaculture* 170, 161-173.
- Tremblay R, Cartier S, Miner P, Pernet F, Quere C, Moal J, Muzellec ML, Mazuret M and Samain JF. 2007. Effect of *Rhodomonas salina* addition to a standard hatchery diet during the early ontogeny of the scallop *Pecten maximus*. *Aquaculture* 262, 410-418.
- Volkman JK, Jeffrey SW, Nichols PD, Rogers GI and Garland CD. 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 128:219-240.
- Yih W, Kim HS, Jeong HJ, Myung G and Kim YG. 2004. Ingestion of cryptophyte cells by the marine photosynthetic ciliate *Mesodinium rubrum*. *Aquat Microb Ecol* 36, 165-170.
- Yih W, Kim HS, Myung G and Kim YG. 2004. Rapid feeding on live organisms of the phototrophic ciliate *Mesodinium rubrum* by Farrer's scallop *Chlamys farreri*. *Mar Biotechnol* 6, S142-S145.

주 의

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