

GOVP1199810420

639.3
L293L

최 종
연구보고서

농축식물먹이생물(Chlorella 류) 개발의 산업화

Industrialization of Condensed Phyto-food
Organism (Chlorella)

연구기관

부경대학교 양식학과

농 립 부

최 종 보 고 서

1996년도 농림수산특정 연구사업에 의하여 완료한 "농축식물먹이생물 (Chlorella류) 개발의 산업화" 에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

- 첨부 : 1. 최종보고서 8부
2. 최종보고서 디스켓 1매

1997. 11. 10

주 관 연 구 기 관 : 부 경 대 학 교

총 괄 연 구 책 임 자 : 허 성 범 (인)

주 관 연 구 기 관 장 : 직인

농림부 장관 귀하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 " 농축식물먹이생물(Chlorella류) 개발의 산업화 " 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1997. 11. 10

주관연구기관명 : 부 경 대 학 교

총괄연구책임자 : 허 성 범

연 구 원 : 배 진 희

연 구 원 : 김 철 원

연 구 원 : 허 영 백

연 구 원 : 전 창 영

협동연구기관명 : 국립수산진흥원

남 해 배 양 장

협동연구책임자 : 민 광 식

여 백

요 약 문

I. 제 목

농축 식물 먹이생물 (Chlorella 류) 개발의 산업화

II. 연구개발의 목적 및 중요성

한 어종의 양식업이 산업화되기 위해서는 계획적인 종묘의 수급이 필수적이며, 이 경우 대량 인공종묘생산을 위해서는 일차적으로 적합한 식물 먹이생물이 대량으로 확보되어야 한다. 그러나 식물 먹이생물의 대량배양에는 기술적인 어려움은 물론, 많은 공간, 시간 및 인력이 필요하여 대량 종묘를 생산하는 과정에서 많은 현장으로 사향이 산재하여 있다.

현재 우리 나라에서는 해산어류 (넙치, 조피볼락, 은어, 참돔 등), 갑각류 (보리새우, 대하), 복족류 (전복) 등의 종묘가 연간 약 2~3억 마리 정도 생산되는 것으로 추정되고, 이매패류의 인공채묘는 앞으로 급격히 증가할 추세이다. 국내에서의 종묘생산을 위한 식물먹이생물의 확보 문제는 어종에 따라 다소 차이는 있으나, 전체 비용의 약 30%를 상회하고 있고, 시설면적의 측면에서도 전 사육시설 면적의 약 15%가 먹이생물 배양 면적으로 추정된다.

최근 우리 나라에서는 집약적인 양식산업과 연안 자원조성의 목적으로 유용 해산어류, 새우류 및 패류의 대량 인공종묘생산을 필요로 하고 있으나, 질적으로 우수한 식물먹이생물의 양적 확보의 어려움으로 필요한 종묘를 충분히 공급하지 못하고 있는 실정이며, 앞으로도 이와 같은 종묘의 수요는 계속하여 급증할 것으로 전망된다.

이미 국내에서는 해산어류 종묘생산시 필수적인 Rotifer의 대량배양을 위하여 일본으로부터 농축 Chlorella를 수입하고 있는 실정이며, 수입규모는 연간 100 M/T, 약

20억원(평균단가 : 20,000원/Kg, 세포농도 : 150억 cell/ml)이 소요되고 있다. 또 국내 종묘업계의 활성화에 따라 외국산 식물 먹이생물이 고가의 큰 규모로 수입될 전망이며, 이에 따른 외국회사들의 제품 홍보가 적극적으로 전개되고 있다. 또한 식물 먹이생물이 인간의 식량 또는 건강보조식품으로 활용됨에 따라 이에 의한 수입규모가 급격히 증가하고 있는 실정이기도 하다.

이와 같은 관점에서 볼 때, 국내 양식생산업자들이 경제적이며, 쉽고 안전하게 활용할 수 있는 농축 식물먹이생물(Chlorella류)의 개발은 현 시점에서 조속히 연구 개발하여 산업화시켜야 할 과제이며, 이 과제의 연구개발은 식물 먹이생물과 관련된 환경, 양식사료, 식품 및 생물공학 등의 타 산업분야에도 많은 기술정보를 제공할 수 있어 국가적으로 시급히 해결되어야 할 기술 개발 과제이다.

Ⅲ. 연구개발내용 및 범위

본 연구의 개발 내용은 크게 다음과 같이 구분 요약할 수 있다.

1. Chlorella류의 순수분리

농축 Chlorella를 개발하기 위하여 우리 나라 연안과 담수에 서식하는 Chlorella를 순수 분리하였고 현재 담수산 11 종, 해수산 49종을 순수 보관하고 있으며 본 연구 소재로 활용하였다.

2. Chlorella류의 유전적 변이 확인

Chlorella류가 매우 미세하여 현미경으로 구분이 어려워서 대표적인 18 strain을 대상으로 DNA의 유사도를 비교 분석하여 구분하였고, 그 결과를 이미 한국수산학회지에 보고하였다(Cho et al., 1996).

3. 대량배양을 위한 최적 배지 개발

경제적인 대량 배양용 배지를 개발하기 위하여 물론 농업용 비료를 이용한 경제적이고 효율적인 배지를 개발하였다.

4. 대량배양

Chlorella의 대량배양을 위하여 계절에 따른 성장 특성과 체계적인 접종 방법 및 수확량 등을 연구하여 대량배양방법을 system화 하였다.

5. 영양분석

대량배양용 Chlorella의 영양분석과 이를 이용한 rotifer의 영양을 파악하기 위하여 일반성분, 아미노산, 지방산 성분을 조사하였고 이를 이용한 어류 먹이효율을 파악하였다.

6. Chlorella 수확 및 농축 방법

효율적인 농축 방법을 파악하기 위하여 연속원심분리기, 공막분리장치, 입자분리기등을 사용하여 서로 비교하였고, 가장 효율적인 입자 분리기(HFG, 5016 HK)를 사용할 때 분리 횟수에 따른 농축 정도와 세포의 생존율 등을 조사하여 Chlorella의 수확 및 농축방법을 개발하였다.

7. 저장기술개발

농축 Chlorella의 효율적인 보관을 위하여 보관 온도, 농도 및 기간에 따른 세포의 생존율을 측정하였다. 또 보다 장기간 보관을 목적으로 항생제 효과를 조사하였다.

8. 먹이효율조사

농축 Chlorella의 보관방법에 따른 rotifer의 성장을 측정하므로써 먹이효율을 조사하였고 실험제조한 농축 Chlorella를 이용하여 rotifer의 내구란 대량생산을 위한 먹이효율 및 낚치 자어를 대상으로 한 먹이효율등을 조사하였다.

9. Heterotrophic Chlorella배양

이미 확보한 Chlorella를 대상으로 heterotrophic 또는 mixotrophic한 strain을 탐색한 후 acetic acid, urea, glucose등을 이용한 배지별 성장실험을 실시하였다. 또 대

량배양을 위하여 100 ℓ 규모의 culture chamber를 제작 실험하여 heterotrophic 종의 대량배양 방법을 연구하였다.

10. Pilot-scale 생산 및 기술전수

농축 Chlorella의 생산기술에 관한 내용을 이화유지(주)에 전수하고 있으며 실험 생산한 해수산 autotrophic Chlorella 농축제품을 이화유지(주)의 영업부를 통하여 전국의 해산어류 부화장에 무상 공급하였다. 그 결과 매우 좋은 반응을 얻고 있으며 이화유지(주)에서는 본격적인 대규모 제품생산을 위하여 투자 계획중이다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구 개발의 결과 국내 양식업자들을 위한 경제적이고 편리한 농축 Chlorella를 생산할 수 있게 되었고 그 활용 범위는 앞으로 더욱 커질 것이며 현재 양식어민들의 농축 먹이생물에 대한 현장애로 사항이 큰 만큼 개발된 제품의 수요는 급 신장할 것이다.

본 연구에서 도출한 기술을 기초로 전복, 소라등의 종묘생산을 위한 부착성 규조류의 농축, 조개류 종묘생산을 위한 유용 식물먹이생물의 농축등 관련 연구가 수행된다면 앞으로 농축먹이생물의 산업화가 더욱 크게 발전할 것으로 기대된다.

SUMMARY

Recently, aquaculture is a new industry in every country. To become commercial industry of an aquacultural species, artificial seedling production is primary conditions. In this case, phytoplankton culture is very important for larvae culture.. With regard to phytofood organism in seedling production, Chlorella is widely used for rotifer which is the basic zoo-food organism in marine fish larvae culture.

Chlorella is easy in handling and can be cultured in high density. The nutritional value of this unicellular algae is high. So, this microalgae is widely used in seedling production, particularly in rotifer culture. In Korea, according to development of marine fish culture industry, the demand of Chlorella increases rapidly, and its cost is very high.

However, the mass culture of this microalgae is very expensive, and high mortality occurs frequently in mass culture. So, the consumption of concentrated commercial Chlorella products increases continuously.

Nowaday, concentrated Chlorella are mainly imported from Japan and its price is very high with about US\$20/Kg. The annual consumption in domestic market is about US\$2 millions.

The purpose of this study is development of the technique of concentrated Chlorella to substitute imported product from Japan.

At first, the native Chlorella strains are isolated from the Korean coastal water. We isolated 50 marine strains and 11 freshwater strains. Now, 50 domestic and 11 foreign Chlorella strains are kept in the laboratory. To understand the genetic

variations the representative 18 strains were analysed on random amplified polymorphic DNA, and we identified the *Chlorella* strain used in the study.

For mass culture of *Chlorella*, the economic media should be developed. For this study agriculture fertilizer was tested on the growth of *Chlorella* and its effect was compared with other media. Two kinds of fertilizer "Yoso and Bokhap" were tested, and 163.7mg of "Yoso" and 117.6mg of "Bokhap" were optimum concentration in 1 ℓ of seawater culture volume.

With regard to concentration technique of cultured *Chlorella*, three equipments, AML flow basket, Ultrafiltration Membrane Modules Superane and Separator (HFG, 5016HK) were tested. However, first two equipments were not suitable because of small size of *Chlorella*. The ultrafiltration membranes were easily clogged and AML flow basket takes too much time to isolate the nanoplankton as *Chlorella*. We can condense *Chlorella* using separator step by step. The volume of *Chlorella* reduces about 70% by a concentration with separator. The exponential equation between the density of condensed *Chlorella*(y) and time of concentration(x) was calculated as $Y=ae^{-1.1904x}$ (a=initial density).

In this research the storage method was carried out. The survival rate as a growth of *Chlorella* kept in different storage conditions was tested with the control group. The survival rate of *Chlorella* depends on storage period, temperature and density. the condensed *Chlorella* kept for longer period showed lower survival rate. and lower density of *Chlorella* showed higher survival rate. Until 3 months of storage, there were not significance between *Chlorella* treated with antibiotic and control. But, from 4 months of storage, antibiotic group showed higher survival rate than control group. The survival rate of condensed *Chlorella* with 500 ppm of oxytetracycline kept for 6 months was 1.22 times higher

than that of control. So, for long term storage of condensed Chlorella antibiotic addition will be effective.

With regard to dietary value of condensed Chlorella the chemical composition as amino acid and fatty acid was at first analysed, and it was also tested on the growth and resting egg of rotifer, *Brachionus plicatilis*. The dietary value of condensed Chlorella made in the this research was better than that of Japanese commercial products at the point of nutrition, growth and resting egg production of rotifer.

Among the strains kept in the laboratory, heterotrophic Chlorella was screened, and the growth of several heterotrophic Chlorella strains were compared with different media as urea, acetic acid, sodium acetate and glucose.

Finally, we produced the condensed marine Chlorella in pilot-scale. The experimental products were supplied to hatchery through E-Wha Oil company. This products were practically used at many commercial and national hatcheries, for the purpose of ① green water in hatchery, ② live food for rotifer, ③ enrichment materials for rotifer and Artemia, ④ inocula for mass culture of Chlorella. We collected the opinion from hatchery on our experiment products, and we are going to produce high quality and economic condensed Chlorella.

여 백

CONTENTS

ABSTRACTS	3
SUMMARY	7
CONTENTS	11
Chapter 1 Introduction	19
Section 1 Purpose of research	19
Section 2 Foreign and domestic technical status	21
Section 3 Scope of research	23
Section 4 Expectation effect of research	24
Chapter 2 Select of suitable species for mass culture	27
Section 1 Isolation of Chlorella	27
Section 2 Genetic variation of Chlorella	27
Section 3 Select of suitable species for mass culture	30
Chapter 3 Optimum media for mass culture	37
Chapter 4 Seasonal media with agriculture fertilizer	41
Section 1 Culutre experiment with different temperatures and seasons in small scale	41
a. Cultivation at 10℃	42

b. Cultivation at 25℃	43
c. Cultivation at 30℃	47
Section 2 Mass culture in outdoor by season	51
a. Mass culture in spring	51
b. Mass culture in summer	57
c. Mass culture in autumn	57
d. Mass culture in winter	57
e. Comparison by season	67
Chapter 5 Method for concentration	73
Section 1 Mass culture	73
Section 2 Concentration	73
Chapter 6 Method for storage of condensed Chlorella	83
Section 1 Short term storage by temperature and density	83
a. Growth of Chlorella kept in 10 day	84
b. Growth of Chlorella kept in 20 day	89
c. Growth of Chlorella kept in 30 day	94
d. Specific growth rate of Chlorella	98
Section 2 Growth in long term storage kept in different period	102
a. Growth with storage density	102
b. Growth with storage period	103
c. Antibiotic effect in long term storage	104
Chapter 7 Dietary value of condensed Chlorella	107
Section 1 Chemical composition of Chlorella	107

Section 2 Dietary value with different storage periods	107
Section 3 Growth of rotifer with condensed Chlorella	112
a. Comparison of rotifer growth	113
b. Fercundity of rotifer	113
Section 4 Dietary value for resting egg production of rotifer	117
a. Resting egg formation and hatchability with phytofood organisms	118
b. Resting egg formation and hatchability with condensed food organisms ..	119
c. Mass production of resting egg of L-type rotifer	124
d. Mass production of resting egg of S-type rotifer	127
Chapter 8 Heterotrophic Chlorella	131
1. Cultivation with antibiotic and vitamin	132
a. Effect of antibiotic	132
b. Effect of vitamin	133
2. Select of heterotrophic Chlorella species and suitable light intensity and media	134
a. Select of heterotrophic Chlorella	134
b. Suitable light intensity	136
c. Suitable media	137
Chapter 9 Experimental production in pilot scale	139
Reference	145
Appendix - I. Process of marine condensed Chlorella	147
Appendix - II. Published papers	153

여 백

목 차

요 약 문	3
SUMMARY	7
CONTENTS	11
제 1 장 서 론	19
제 1 절 연구개발의 목적	19
제 2 절 국·내외 기술 현황	21
제 3 절 연구개발의 범위	23
제 4 절 연구개발의 기대효과	24
제 2 장 대량배양에 적합한 Chlorella종의 선택	27
제 1 절 Chlorella류의 순수분리	27
제 2 절 Chlorella류의 유전적 변이 조사	27
제 3 절 대량배양에 적합한 Chlorella종의 선택	30
제 3 장 대량배양을 위한 최적 배지 개발	37
제 4 장 농업용 비료를 이용한 계절별 배지 개발	41
제 1 절 온도별 계절별 배지를 위한 소규모 배양실험	41
가. 10℃ 배양실험	42
나. 25℃ 배양실험	43
다. 30℃ 배양실험	47

제 2 절 계절별 옥외 대량 배양실험	51
가. 춘계 대량 배양실험	51
나. 하계 대량 배양실험	57
다. 추계 대량 배양실험	57
라. 동계 대량 배양실험	57
마. 계절별 비교	67
제 5 장 농축 방법	73
제 1 절 대량 배양	73
제 2 절 농축	73
제 6 장 농축 Chlorella 저장 방법	83
제 1 절 온도와 밀도를 달리한 단기간 저장	83
가. 10일 경과 후 저장 온도와 저장밀도에 따른 성장	84
나. 20일 경과 후 저장온도와 저장밀도에 따른 성장	89
다. 30일 경과 후 저장온도와 밀도에 따른 성장	94
라. 저장기간에 따른 7일간 성장률	98
제 2 절 장기보관에 따른 성장	102
가. 저장밀도에 따른 성장	102
나. 저장기간에 따른 성장	103
다. 장기 저장시 항생제 첨가 효과	104
제 7 장 농축 Chlorella 의 먹이 효율	107
제 1 절 Chlorella의 영양성분	107
제 2 절 농축 Chlorella의 보관기간에 따른 먹이효율	107
제 3 절 농축 Chlorella를 이용한 rotifer 성장	112

가. Rotifer의 성장 비교	113
나. Rotifer의 포란율과 평균포란수 조사	113
제 4 절 Rotifer 내구란 생산을 위한 농축 Chlorella의 먹이효율	117
가. 식물먹이생물에 따른 내구란 생산과 부화율	118
나. 농축된 먹이종류에 따른 내구란 생산과 부화율	119
다. 먹이종류에 따른 L-type rotifer의 내구란 대량생산	124
라. S-type rotifer의 내구란 대량생산	127
제 8 장 Heterotrophic Chlorella 의 개발	131
1. 항생제 및 Vitamin을 첨가한 배양	132
가. 항생제 첨가 배양	132
나. Vitamin 첨가 배양	133
2. Heterotrophic Chlorella의 탐색과 적정 조도와 배지	134
가. Heterotrophic Chlorella 탐색	134
나. 적정조도 탐색	136
다. 적정배지 탐색	137
제 9 장 Pilot scale의 시험	139
참고문헌	145
부록 - I. 해산 농축 Chlorella 제조 과정	147
부록 - II. 관련 투고 논문	153

여 백

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적

한 어종의 양식업이 산업화되기 위해서는 계획적인 종묘의 수급이 필수적이며, 이 경우 대량 인공종묘생산을 위해서는 일차적으로 적합한 식물 먹이생물이 양적으로 확보되어야 한다. 그러나 식물먹이생물의 대량배양에는 기술적인 어려움은 물론, 많은 공간, 시간 및 인력이 필요하여 대량 종묘를 생산하는 과정에서 많은 현장 애로 사항이 산재하여 있다.

현재 우리 나라에서는 해산어류(넙치, 조피볼락, 은어, 참돔 등), 갑각류(보리새우, 대하), 복족류(전복) 등의 종묘가 연간 약 2~3억 마리 정도 생산되는 것으로 추정되고, 이매패류의 인공채묘는 앞으로 급격히 증가할 추세이다. 국내에서의 종묘생산을 위한 식물먹이생물의 확보문제는 어종에 따라 다소 차이는 있으나, 전체 비용의 약 30%를 상회하고 있고, 시설면적의 측면에서도 전 사육시설 면적의 약 15%가 먹이생물 배양 면적으로 추정된다.

최근 우리 나라에서는 집약적인 양식산업과 연안 자원조성의 목적으로 유용 해산어류, 새우류 및 패류의 대량 인공종묘생산을 필요로 하고 있으나, 질적으로 우수한 식물 먹이생물의 양적 확보의 어려움으로 필요한 종묘를 충분히 공급하지 못하고 있는 실정이며, 앞으로도 이와 같은 종묘의 수요는 계속하여 급증할 것으로 전망된다.

이미 국내에서는 해산어류 종묘생산시 필수적인 Rotifer의 대량배양을 위하여 일본으로부터 농축 Chlorella를 수입하고 있는 실정이며, 1994년의 수입규모는 연간 100 M/T, 약 20억원(평균단가 : 20,000원/Kg, 세포농도 : 150억 cells/ml)이 소요되고 있다. 또 국내 종묘업계의 활성화에 따라 외국산 식물 먹이생물이 고가의 큰 규모로

수입될 전망이며, 이에 따른 외국회사들의 제품홍보가 적극적으로 전개되고 있다. 또한 식물 먹이생물이 인간의 식량 또는 건강보조식품으로 활용됨에 따라 이에 의한 수입규모도 급격히 증가하고 있는 실정이다.

이와 같은 관점에서 볼 때, 국내 양식 중요생산업자들이 경제적이며, 쉽고 안전하게 활용할 수 있는 농축 식물 먹이생물의 개발은 현 시점에서 조속히 연구 개발하여 산업화 시켜야할 과제이며, 이 과제의 연구개발은 식물 먹이생물과 관련된 환경, 양식사료, 식품 및 생물공학 등의 타 산업 분야에도 많은 기술정보를 제공할 수 있어 국가적으로 WTO를 대비하여 시급히 해결되어야할 기술 개발 과제이다

이와 같은 연구개발의 필요성은 기술력, 경제적, 사회적 측면에서 중요하다. 우선 기술적 측면에서 보면 모든 생물은 같은 종류라 할지라도 지역적 환경의 특성에 따라 많은 생태적 차이를 갖고 있다. 따라서 우리 나라의 양식생물 역시 우리 나라 연안에서 서식하는 식물 먹이생물의 영양학적 특성과 깊은 관련이 있을 수 있다. 그러나 현재 국내에서 식물 먹이생물로 사용하는 종류는 거의 모두가 외국에서 분리된 종들이다. 이와 같은 관점에서 국내 환경에서 인위적 대량배양이 수월하고 먹이효율이 탁월한 국산 식물 먹이생물의 순수분리 및 확보가 개발되어야만 한다.

한편, 유용 식물 먹이생물들의 대량배양에 적합한 환경요인의 구명이 미흡하며, 일시적으로 급작스럽게 대량 폐사하는 원인 등에 대한 기술대책이 전무한 실정이다. 또, 국내에서도 지역에 따라 기온, 수온, 일조량 등이 다르므로 각 지역에 맞는 식물 먹이생물의 개발이 시도되어야 한다. 또 이들 종류의 대량 배양 후 수확, 농축 및 저장하는 기술과 식물 먹이생물의 먹이효율을 향상시키기 위한 영양강화에 대한 연구 등은 국내에서 전혀 시도되지 않은 실정이다.

한편, 경제적 측면에서는 해산 어패류의 중요생산시 먹이생물 확보를 위한 비용은 총 생산단가의 약 30%를 차지할 정도로 매우 높다. 해산어류 중요생산의 경우만 보더라도 Rotifer 대량배양을 위하여 최근 일본으로부터 농축 Chlorella를 수입하여 사용하는 양식업체가 급증하고 있으며, 최근 문제되는 이매패류의 인공채묘 사업을 전

망할 때 국내 먹이생물의 시장은 매우 빠른 속도로 대형화되고 있는 추세이다. 따라서 국내에서 농축 식물 먹이생물을 신속히 개발하여 산업화할 경우 그 수요는 매우 클 것이며, UR을 대비한 국내 양식산업의 경쟁력 제고에 중요한 역할을 할 수 있을 것이다.

또 사회적 측면에서 보면 우리 나라의 식생활 구조를 볼 때 수산물이 차지하는 비중은 매우 높다. 1인당 수산물 소비량은 연간 약 36 Kg으로 경제향상에 따라 계속 증가하고 있으며, 세계적으로도 매우 높은 수준이다. 이와 같은 수산물 소비의 현상은 경제수준이 발전할 수록 증가할 것이고, 화려한 수산식품의 고부가 가치는 계속 증폭될 것이 확실하다. 그러나, 최근 우리 나라에서는 연안 매립, 간척, 임해공단으로부터의 오염 부하량 증가로 전체적인 연안환경은 악화되고 있어 연안 수산물의 양적 확보는 많은 어려움이 따를 것으로 전망된다.

따라서 인위적인 집약적 양식산업은 사회, 경제학적 측면에서 계속 확장될 것이며, 이 경우 원활한 종묘생산을 위한 일차먹이인 농축 식물 먹이생물의 개발은 매우 시급한 과제라 할 수 있다.

제 2절 국·내외 기술 현황

식물 플랑크톤의 순수배양에 관한 연구는 1940년대 영국에서부터 시작되어 1960년대부터 구미 및 일본에서 본격적인 산업으로 등장하였다. 식물 부유생물은 대량으로 배양하여 인간의 식량, 의약품 원료로 활용하며, 공업원료, 양식용먹이생물, 독성생태학의 실험생물, gas exchange를 이용한 군사적 목적(잠수함, 우주선) 및 폐수처리 등의 환경산업에 활용하고 있다. 이러한 산업적 활용을 위하여 순수분리를 통한 식물 부유생물의 수집과 배양에 대한 연구는 대학 또는 국립연구소에서 국가적인 차원으로 이루어지고 있다. 서구의 국가에서는 이미 오래 전에 연안환경오염과 기후적인

여건으로 이매패류 종묘의 확보가 인공채묘에 의하여 이루어져 왔다. 따라서 이들 선진국에서는 식물 먹이생물의 배양 및 농축 기술 등이 이미 오래 전부터 실용화 되어왔다.

일본의 경우, 1964년에 "일본 Chlorella 주식회사"가 설립되어 Chlorella를 식량원료로 개발하였고, 최근에는 양식 종묘생산용 먹이생물 공급의 목적으로 농축 Chlorella를 대량생산하여 수출하고 있다. 또, 미국의 Cyanotech, Unisyn 등의 회사에서 *Spirulina*를 대량배양하여 의약품 및 공업원료로 수출하고 있고, 최근 Coast Oyster Company, SP Engineering Technology, Bio-Marine, Inc., Innovative Aquaculture Products 등의 회사에서 해산 어패류의 종묘생산을 위하여 농축 규조류와 녹조류 등을 판매하고 있다. 또 미국의 Market 회사에서는 Heterotrophic microalgae를 배양조를 이용하여 대량 생산하여 양식업자에게 농축 판매하고 있다. 이와 같이 구미 선진국에서는 농축 식물 부유생물의 제품이 여러 분야에서 이미 산업화 되어 있다.

서구와 일본의 경우 이미 약 30여년 전부터 식물먹이생물을 대량으로 배양 농축하여 패류 부화장 및 양식업체등에 공급하는 업종이 성행하여 왔으나, 국내의 경우는 이매패류의 채묘가 자연 채묘에 의존하여 왔기 때문에 특별히 농축 식물 먹이생물의 개발이 이루어지지 않는 실정이다. 그러나 국내에서도 식물 먹이생물에 대한 배양수집과 기초 생물학적 연구는 이미 충분히 수행되어 왔고, 최근에 이매패류 인공채묘의 필요성이 대두되면서 식물 먹이생물의 대규모의 배양이 연구 개발되고 있는 실정이다.

이와 같은 측면에서 농축 식물먹이생물 개발에 대한 국내의 기술수준은 외국에 비하여 낮은 실정이긴 하나, 이는 기술의 후진성 때문이라기 보다는 인공채묘의 필요성이 없었던 이유로 개발이 지연되어 왔다고 볼 수 있다. 따라서 최근과 같이 어패류의 종묘생산이 활성화되어 농축 식물먹이생물의 수요가 급증할 경우 본 기술개발과제는 국내 연구진에 의하여 충분히 단시일내에 개발 가능하다.

현재 국내에서 이용되는 식물 먹이생물들은 주로 외국에서 도입된 것이 많은데,

이는 우리 나라의 지역별, 계절별 기후 조건에 적합하지 않은 경우가 많아 우리 나라 연안에서 서식하는 적합한 식물 먹이생물의 개발이 절대적으로 필요하다. 또 식물 먹이생물의 종류에 따라서는 영양염의 요구 및 생리생태 특성이 매우 특이하나 이에 대한 기초 연구자료가 매우 부족한 상태이다.

한편, 아직도 식물 먹이생물의 대량배양은 전문 지식과 충분한 경험이 요구되고 있어 일반 양식 종묘업자들이 수행하기에는 많은 어려움이 있다. 따라서 일반 종묘업자들은 계획적인 종묘생산을 위해서는 농축된 식물 먹이생물을 구입하여 사용하는 것이 보다 합리적이며, 경제적이다.

제 3 절 연구개발의 범위

이와 같은 농축 식물먹이생물의 산업화를 위하여 일차적으로 종묘생산업계에서 가장 널리 사용되는 *Chlorella*를 중심으로 연구 개발한다. 이를 위하여 ①적정 식물 먹이생물을 순수분리하고자 한다. 한국의 지역적 특성에 적합한 국산식물 먹이생물의 분리, 확보가 충분하지 못한 실정이므로 한국산 식물 먹이생물의 충분한 증자를 확보하고자 한다. ②대량배양을 위한 물리, 화학, 생물학적 환경요인을 구명하고자 한다. *Chlorella*의 최고의 성장을 위한 환경요인(영양염, 빛 수온, 염분, 접종량 등) 구명이 미흡하므로 환경요인별 *Chlorella*의 최적 성장률을 조사하고자 한다. ③각 식물 먹이생물에 대한 단백질, 지방 등의 기초화학분석과 아미노산, 불포화지방산 등의 구체적인 영양가 분석이 미흡하므로 각 식물먹이생물의 화학분석을 통한 영양가를 밝힌다. ④대량 배양된 *Chlorella*의 수확기술과 농축농도 및 저장 환경요인과 이에 따른 식물 먹이생물의 생존율 등의 조사가 미흡하므로 고 농도의 식물 먹이생물 *Chlorella*를 경제적으로 장기간 보관할 수 있는 기술 개발한다. ⑤ 대량배양하여 농축된 *Chlorella*의 영양강화 및 먹이효율을 조사하여 부족한 영양 및 성장 인자(예, 비

타민, 지방산, 항생제 등)를 파악하고 영양가를 향상시킬 수 있는 방법 개발과 실제의 rotifer 또는 어패류 종묘에 적용한 먹이효율을 확인 실험한다. ⑥마지막으로 적합한 업체를 선정하여 제품 개발이 산업화될 수 있도록 기술 개발된 것을 전수하여 경제적인 농축 식물먹이생물 Chlorella를 상품화할 계획이다.

제 4 절 연구개발의 기대효과

본 연구개발을 통하여 우선 기술적인 측면에서는 질적으로 우수한 식물 먹이생물의 양적 확보, 어패류의 대량 종묘생산 기술 향상, 경제적인 대량 종묘공급을 통한 양식산업의 활성화, 대량 종묘방류를 통한 연안 자원조성 기술 향상, 한국산 식물 먹이생물의 순종 확보 및 유전자 Bank 확립, 해양 식물 부유생물의 생리, 생태 특성 구명, 식물 부유생물을 이용한 타 산업 (환경관리, 생물공학, 식품, 사료산업 등)에 정보제공, 식물 부유생물의 순수분리를 통한 생리-생태 연구가 활성화되어 천해양식장의 환경관리 대책에 정보제공 등의 기대효과가 가능하다. 경제적 측면에서는 종묘 생산업체의 생산단가 절감을 통한 양식산업의 국가 경쟁력 제고, 현재 연간 약 20 억원 정도의 규모로 수입되는 외국산 먹이생물 제품의 국산화 대체, 연간 약 100 억 원 정도의 시장규모로 확대될 미래 국내 먹이생물 시장의 개발, 외국으로의 먹이생물 수출산업 개발등의 효과가 기대된다. 이와 같은 연구 개발로 궁극적으로는 계획적인 종묘생산을 통한 연안 어민들의 양식업 활성화로 복지어촌 구축, 식물 부유생물을 이용한 타 산업의 개발에 파급효과가 클 것이며, 식물 부유생물의 순수분리를 통한 기초연구가 활성화되어 천해양식장의 환경관리 대책 및 순수 해양기초과학 발전에 정보 제공등의 파급효과가 예상된다. 또 본 연구개발로 인한 직·간접적인 활용방안으로는 어류, 갑각류 및 패류의 대량 인공 종묘생산 기술 확립, 연안 자원조성을 위한 종묘 대량 방류, 식품 및 미립자 사료의 개발, 의약품 및 특수 공업원료의

확보, 식물 부유생물을 이용한 환경관리산업으로의 활용, 기타 해양생물에 대한 순수 연구(생활사, 분류, 생태독성학, 오염 등)에 활용, 식물 먹이생물을 각 초등 교육기관에 분양하여 해양과학 교육 자료로 활용 가능함 등을 기대할 수 있을 것이다.

여 백

제 2 장 대량배양에 적합한 Chlorella종의 선택

제 1 절 Chlorella류의 순수분리

1. 순수분리 방법

우리 나라 연안에서 채집한 해양식물부유생물 중에서 Chlorella를 순수분리하였다. 채집 방법은 부경대학교 실습선 또는 연안조사의 목적으로 실습중인 선박을 이용하여 20 μ m의 식물부유생물 net를 사용하여 표층의 부유생물을 채집하였다. 채집된 표본은 실험실(해운대 동백섬 수산과학연구소)에서 희석법, 한천도말법, capillary pipette방법을 이용하여 식물부유생물을 순수분리하였다.

2. 순수분리된 strain 확보

위와 같은 방법으로 순수분리된 Chlorella류와 기존 보유중인 Chlorella류의 확보 결과는 Table 2-1 과 같다. 이중 담수산 11 strain, 해수산 50 strain이며 국내에서 순수분리된 종은 50 strain 이며 외국산은 11 strain이 확보되었다. 이들 strain은 필요로 하는 연구기관, 산업체 또는 교육기관 등에 무상분양하고 있다.

제 2 절 Chlorella류의 유전적 변이 조사

Chlorella류는 매우 미세하여 광학 현미경으로 구분이 어려워 유전학적인 방법을

Table. 2-1. Chlorella strain isolated for this study

Strain No.	Species	Source		Habitat
		Source	Original strain designation	
KMCC FC-1	<i>C. vulgaris.</i>	-	UTEX 259	Fresh water
KMCC FC-3	<i>C. vulgaris.</i>	Nacdong		"
KMCC FC-4	<i>C. pyrenoidosa</i>	-	UTEX 26	"
KMCC FC-5	<i>C. ellipsoidea</i>	-	UTEX 247	"
KMCC FC-6	<i>C. ellipsoidea</i>	-	UTEX 20	"
KMCC FC-11	<i>Chlorella</i> sp.	-	Japan	"
KMCC FC-12	<i>Chlorella</i> sp.	-	"	"
KMCC FC-13	<i>Chlorella</i> sp.	-	"	"
KMCC FC-15	<i>Chlorella</i> sp.	Jinhae	-	"
KMCC FC-16	<i>Chlorella</i> sp.	Jinhae	-	"
KMCC FC-21	<i>Chlorella</i> sp.	Andong	-	"
KMCC C-11	<i>Chlorella</i> sp.	Masan	-	Marine
KMCC C-12	<i>Chlorella</i> sp.	Nacdong	-	"
KMCC C-19	<i>C. stigmatophora</i>	-	UTEX 993	"
KMCC C-20	<i>C. ellipsoidea</i>	-	Japan	"
KMCC C-21	<i>C. ellipsoidea</i>	-	UTEX 247	"
KMCC C-22	<i>C. vulgaris.</i>	Nacdong	-	"
KMCC C-23	<i>Chlorella</i> sp.	Kamcheon	-	"
KMCC C-24	<i>Chlorella</i> sp.	Suncheon	-	"
KMCC C-25	<i>Chlorella</i> sp.	Suncheon	-	"
KMCC C-26	<i>Chlorella</i> sp.	Suncheon	-	"
KMCC C-27	<i>Chlorella</i> sp.	Yeocheon	-	"
KMCC C-28	<i>Chlorella</i> sp.	Nacdong	-	"
KMCC C-29	<i>Chlorella</i> sp.	Nacdong	-	"
KMCC C-30	<i>Chlorella</i> sp.	Nacdong	-	"
KMCC C-34	<i>Chlorella</i> sp.	Masan	-	"
KMCC C-38	<i>Chlorella</i> sp.	Haewundae	-	"
KMCC C-39	<i>Chlorella</i> sp.	Haewundae	-	"
KMCC C-57	<i>Chlorella</i> sp.	Haewundae	-	"
KMCC C-58	<i>Chlorella</i> sp.	Deukryang	-	"
KMCC C-59	<i>Chlorella</i> sp.	Deukryang	-	"
KMCC C-63	<i>Chlorella</i> sp.	Wando	-	"
KMCC C-64	<i>Chlorella</i> sp.	Kunsan	-	"

Table. 2-1. Continued

Strain No.	Species	Source		Habitat
		Source	Original strain designation	
KMCC C-65	<i>Chlorella</i> sp.	Deukryang	-	Marine
KMCC C-66	<i>Chlorella</i> sp.	Deukryang	-	"
KMCC C-67	<i>Chlorella</i> sp.	Deukryang	-	"
KMCC C-69	<i>Chlorella</i> sp.	Deukryang	-	"
KMCC C-70	<i>Chlorella</i> sp.	Nacdong	-	"
KMCC C-75	<i>Chlorella</i> sp.	Nacdong	-	"
KMCC C-80	<i>Chlorella</i> sp.	Youngkang	-	"
KMCC C-84	<i>Chlorella</i> sp.	Deukryang	-	"
KMCC C-85	<i>Chlorella</i> sp.	Deukryang	-	"
KMCC C-86	<i>Chlorella</i> sp.	Deukryang	-	"
KMCC C-87	<i>Chlorella</i> sp.	Deukryang	-	"
KMCC C-88	<i>Chlorella</i> sp.		Tailand	"
KMCC C-93	<i>Chlorella</i> sp.	Boreneo	-	-
KMCC C-94	<i>Chlorella</i> sp.	Philiphine	-	-
KMCC C-95	<i>Chlorella</i> sp.	Jodo	-	-
KMCC C-103	<i>Chlorella</i> sp.	Narodo	-	-
KMCC C-105	<i>Chlorella</i> sp.	Taejongdae	-	-
KMCC C-106	<i>Chlorella</i> sp.	Boreneo	-	-
KMCC C-107	<i>Chlorella</i> sp.	Jaba	-	-
KMCC C-108	<i>Chlorella</i> sp.	Taehanhaehyop	-	-
KMCC C-110	<i>Chlorella</i> sp.	Puzon	-	-
KMCC C-111	<i>Chlorella</i> sp.	Taehanhaehyop	-	-
KMCC C-113	<i>Chlorella</i> sp.	Daemann	-	-
KMCC C-114	<i>Chlorella</i> sp.	Namhae	-	-
KMCC C-119	<i>Chlorella</i> sp.	Daebyon	-	-
KMCC C-125	<i>Chlorella</i> sp.	Puzon	-	-
KMCC C-127	<i>Chlorella</i> sp.	Haewundae	-	-
KMCC C-128	<i>Chlorella</i> sp.	Jinhae	-	-
KMCC C-130	<i>Chlorella</i> sp.	Taehanhaehyop	-	-

이용하였다. 확보중인 *Chlorella* 중 대표적이라 판단되는 18 strain을 대상으로 random amplified polymorphic DNA(RAPD) technique을 이용하여 DNA의 유사도를 비교 분석하였다. 이들 18종의 채집장소와 일반성분 분석은 Table 2-2와 같고 유전자의 유사도 분석 결과는 Table 2-3과 같다. 이 결과는 이미 한국수산학회지 제 29권 제 6호(761-769)에 게재한 바 있다.

제 3 절 대량배양에 적합한 *Chlorella*종의 선택

대량배양에 적합한 *Chlorella*의 종 선택을 위하여 해수산과 담수산의 *Chlorella*종 분류학적 위치가 확실하고 대표적인 담수산 6종, 해수산 2종을 선택하여 조사하였다. 배지는 f/2, Erdschreiver, complexal, S.K., Wai 배지를 사용하였고 담수산은 0%, 해수산은 30%, 조도는 3,500 lux 연속조명하에서 20℃로 맞추어 성장실험하였다. 각 배지의 조성은 Table 2-4 와 같다.

이 실험 결과 담수산에서는 *C. vulgaris*가 해수산에서는 *C. ellipsoidea*가 성장이 양호하였다. *C. vulgaris*는 complexal배지에서 배양 10일째 2308×10^4 cells/ml 까지 *C. ellipsoidea*는 f/2배지에서 배양 10일째 306×10^4 cells/ml 까지 성장하였다(Table 2-5). 따라서 이 두 종류를 대상으로 일반 화학성분 분석을 한 결과 해수산은 담수산에 비하여 지질이 높은 것으로 나타났다. 또 아미노산 분석에서는 해수산은 Glu.가 높고 담수산은 NH₃가 상대적으로 높게 나타났다(Table 2-6) 그러나, 성장자체는 담수산인 *C. vulgaris*가 훨씬 양호하였다. 따라서 담수산 *Chlorella*의 최적 조도와 염분 적용 정도를 파악하기 위하여 25℃하에서 3,000, 4,500, 6,000 lux를 기준으로 0, 5, 10, 15%하에서 LD cycle 24:0과 18:6을 설정하여 배양실험하였다. 그 결과 성장이 가장 양호한 조건은 0%, 6,000 lux(24:0 LD)였으나 15% 에서도 성장의 감소없이 적용이 가능하였다(Table 2-7).

Table. 2.-2. List of species collection sites and chemical composition for the genetics variation in *Chlorella* species

Collection number	Species	Collection sites	Chemical composition ¹		
			Protein	Lipid	Ash
KMCC C-19	<i>C. stigmatophora</i>	UTEX 993	20.10	1.80	47.09
KMCC C-20	<i>C. ellipsoidea</i>	Japan	26.46	8.66	38.67
KMCC C-21	<i>C. ellipsoidea</i>	UTEX 247	29.48	0.12	32.67
KMCC C-22	<i>C. vulgaris</i>	Nacdong	33.11	1.03	30.05
KMCC C-23	<i>Chlorella</i> sp.	Kamcheon	41.16	6.85	30.05
KMCC C-24	<i>Chlorella</i> sp.	Suncheon	23.66	10.85	41.18
KMCC C-25	<i>Chlorella</i> sp.	Suncheon	30.87	3.69	34.68
KMCC C-26	<i>Chlorella</i> sp.	Suncheon	31.70	3.77	30.80
KMCC C-27	<i>Chlorella</i> sp.	Yeocheon	24.96	2.21	37.66
KMCC C-28	<i>Chlorella</i> sp.	Nacdong	26.65	4.93	34.46
KMCC C-29	<i>Chlorella</i> sp.	Nacdong	21.64	7.44	35.62
KMCC C-30	<i>Chlorella</i> sp.	Nacdong	21.60	6.99	31.71
KMCC C-31	<i>Nannochloris oculata</i>	UTEX LB 1988	33.55	1.87	40.76
KMCC C-32	<i>Nannochloris salina</i>	Seri-2	25.02	8.38	37.99
KMCC C-33	<i>Nannochloris</i> sp.	Israel	35.19	3.65	29.49
KMCC FC-4	<i>C. pyrenoidosa</i>	UTEX 26		N.D. ³	
KMCC FC-5	<i>C. ellipsoidea</i>	UTEX 27		N.D. ³	
KMCC FC-6	<i>C. ellipsoidea</i>	UTEX 20		N.D. ³	

¹ Hur and Lee.(1996) Chemical composition of microalgae. J. Aquaculture, 9(4) in press.

² Fresh water *Chlorella* acclimatized in sea water.

³ Not determined.

Table 2-3. Calculated F values among *Chlorella* species based on band sharing Analysis for primer OPA 12

	C-19	C-20	C-21	C-22	C-23	C-24	C-25	C-26	C-27	C-28	C-29	C-30	C-31	C-32	C-33	FC-4	FC-5	FC-6	
C-19	-																		
C-20	0.266	-																	
C-21	0.333	0.364	-																
C-22	0.421	0.000	0.125	-															
C-23	0.166	0.000	0.000	0.181	-														
C-24	0.400	0.200	0.307	0.666	0.250	-													
C-25	0.077	0.000	0.200	0.333	0.800	0.444	-												
C-26	0.181	0.000	0.000	0.200	0.000	0.286	0.000	-											
C-27	0.166	0.000	0.000	0.181	1.000	0.250	0.800	0.000	-										
C-28	0.444	0.153	0.250	0.555	0.000	0.266	0.000	0.200	0.000	-									
C-29	0.380	0.266	0.444	0.500	0.154	0.235	0.143	0.166	0.154	0.100	-								
C-30	0.352	0.444	0.461	0.266	0.250	0.166	0.222	0.000	0.250	0.133	0.588	-							
C-31	0.470	0.307	0.375	0.444	0.363	0.266	0.444	0.000	0.363	0.222	0.400	0.266	-						
C-32	0.285	0.222	0.500	0.428	0.000	0.363	0.000	0.000	0.000	0.285	0.375	0.000	0.000	-					
C-33	0.066	0.200	0.307	0.400	0.250	0.333	0.250	0.286	0.250	0.533	0.235	0.333	0.133	0.000	-				
FC-4	0.588	0.000	0.266	0.117	0.000	0.285	0.181	0.000	0.000	0.235	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-			
FC-5	0.076	0.000	0.200	0.166	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.181	-		
FC-6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Table 2-4. Composition of media for the experiment

<u>f/2 medium (Guillard and Ryther : 1962)</u>			
NaNO ₃	150 mg	Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	60 mg
Na ₂ HPO ₄	8.69 mg	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.012 mg
Ferric EDTA	10 mg	B ₁₂	1.0 mg
MnCl ₂	0.22 mg	Biotin	1.0 mg
CoCl ₂	0.11 mg	Thiamin	0.2 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.0196 mg	Sea water	1000 ml
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.044 mg		
<u>S.K. medium(Sorokin and Krauss : 1958)</u>			
KNO ₃	1.25 g	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.0144 g
KH ₂ PO ₄	1.25 g	MoO ₃	0.0071 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.00 g	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.0157 g
CaCl ₂	0.0835 g	Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.0049 g
H ₃ BO ₃	0.1142 g	EDTA	0.5 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.0498 g	Distilled water	1000 ml
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.0882 g		
The pH of the medium is 6.8			
<u>Erdschreiber medium(1927)</u>			
NaNO ₃	100 mg	Soil extract	50 ml
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	20 mg	Sea water	1000 ml
<u>Wai medium (1955)</u>			
KNO ₃	1.5 g	Wai solution*	1.0 ml
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.5 g	Distilled Water	1000 ml
KH ₂ PO ₄	1.2 g		
* Wai solution			
Ca	30 g	Mo	4 g
Cu	4 g	Zn	20 g
Fe	10 g	Mn	4 g
		B	20 g
		Co	1 g
		D.W.	1000 ml
		36N H ₂ SO ₄	2 drops
<u>Complezal</u>			
Total nitrogen	10 %	Soluble Magnesium	0.3 %
Soluble Phosphate	4 %	Soluble Copper	0.02 %
Soluble Potassium	6 %	Soluble Iron	0.05 %
Soluble Boron	0.05 %	Soluble Molybdenum	0.01 %
Soluble Manganese	0.1 %		

Table 2-5. Cell number of Chlorella at different media (Marine Chlorella : 20°C, 30%, 3,500 lux, LD=24:0, Fresh water Chlorella : 20°C, 30%, 3,500 lux, LD=24:0)

Species	Day medium	(Unit: × 10 ⁴ cells/ml)										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Marine Chlorella	<i>C. ellipsoidea</i>	10	15	17	20	33	50	76	110	173	237	306
	Erd.	10	14	14	15	19	35	54	92	163	221	297
	Comp.	10	10	11	13	16	17	22	30	43	50	54
Fresh- water Chlorella	<i>C. stigmatophora</i>	10	13	13	14	14	23	16	14	10	10	9
	Erd.	10	10	10	11	12	22	36	32	15	14	12
	Comp.	10	6	4	4	2	1	1	-	-	-	-
Fresh- water Chlorella	<i>C. vulgaris</i>	10	20	23	31	44	91	234	416	605	786	893
	Erd.	10	16	17	19	38	92	214	287	291	340	372
	Comp.	10	11	20	60	116	416	1037	1513	2000	2143	2308
Fresh- water Chlorella	<i>C. pyrenoidosa</i>	10	14	19	32	51	56	87	129	118	98	77
	Erd.	10	12	12	14	16	20	30	43	33	28	19
	Comp.	10	14	14	15	16	39	41	77	82	120	147
Fresh- water Chlorella	<i>C. variegata</i>	10	12	17	33	43	68	161	254	485	591	680
	Erd.	10	10	11	14	18	30	38	45	33	30	30
	Comp.	10	11	11	12	22	52	84	154	150	141	133
Fresh- water Chlorella	<i>C. protothecoides</i>	10	18	24	54	63	101	139	141	136	129	127
	Erd.	10	10	13	19	21	26	37	75	40	39	36
	Comp.	10	13	13	15	24	40	52	94	110	126	138

Table 2-6. General nutrient composition and amino acid analysis :

Composition	Species		Chlorella ellipsoidea	Chlorella vulgaris	Species Composition		Chlorella ellipsoidea	Chlorella vulgaris
	Moisture	Cr. Pro.			Cr. Fat	Ash		
General Nutrient Composition (%)	7.47	46.08	10.45	22.93	15.18	27.34		
Amino acid Analysis (g/100g of Chlorella)	Lys.	2.28	2.08	3.09	3.52			
	NH3	0.74	5.97	3.27	3.59			
	Asp.	5.01	4.41	2.38	1.90			
	Ser.	1.86	1.80	6.54	5.30			
	Pro.	2.43	2.01	2.69	2.57			
	Ala.	3.44	3.60	2.51	1.99			
	Met.	1.05	1.92	2.03	1.48			
	Leu.	4.09	3.80	0.51	0.78			
	Phe.	2.16	1.99					

Table 2-7. Cell number of *Chlorella vulgaris* at 25°C under different conditions of light intensity, salinity and light period

Light intensity	Day												L:D	
	Sal.		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9		10
3000 lux	0 ‰		5	5	5	5	5	9	12	50	103	125	130	24:0
	5 ‰		5	5	5	5	5	8	8	22	20	12	11	
	10 ‰		5	5	5	5	5	5	5	12	15	9	8	
	15 ‰		5	5	5	5	5	5	5	10	13	9	8	
4500 lux	0 ‰		5	5	8	11	64	196	431	774	1009	1056	1100	24:0
	5 ‰		5	5	8	19	27	44	76	120	145	127	123	
	10 ‰		5	5	7	12	28	31	35	96	105	91	90	
	15 ‰		5	5	5	5	7	8	8	24	49	40	41	
6000 lux	0 ‰		5	5	7	11	64	224	345	826	1100	1298	1350	24:0
	5 ‰		5	5	7	12	24	35	75	99	95	90	92	
	10 ‰		5	5	6	8	21	29	49	74	72	68	67	
	15 ‰		5	5	5	55	5	6	9	31	51	42	44	
3000 lux	0 ‰		5	5	9	9	15	21	31	37	63	95	128	18:6
	5 ‰		5	5	5	5	5	7	11	5	5	5	5	
	10 ‰		5	5	5	5	5	5	5	7	11	9	8	
	15 ‰		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
4500 lux	0 ‰		5	5	7	12	18	25	157	631	972	1179	1287	18:6
	5 ‰		5	5	6	9	11	19	31	16	15	15	14	
	10 ‰		5	5	5	7	10	16	21	14	14	13	11	
	15 ‰		5	5	5	9	12	17	25	38	33	31	26	
6000 lux	0 ‰		5	5	6	12	21	50	277	561	803	1253	1300	18:6
	5 ‰		5	5	5	8	11	16	21	10	6	6	6	
	10 ‰		5	5	5	5	6	9	14	9	7	5	5	
	15 ‰		5	5	5	5	5	5	5	16	17	13	11	

제 3 장 대량배양을 위한 최적 배지 개발

앞에서의 실험결과 해수산 Chlorella를 배양하기에 적합한 배지는 f/2배지로 나타났다. 그러나 Chlorella를 대량배양을 하기에는 f/2배지는 비용이 많이 들므로 경제적인 배지 개발이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 농업용 요소와 복합비료를 이용하였다. 요소비료의 질소 함량은 46%, 복합비료의 질소함량은 21%, 인함량 17%, 칼리 함량 17%의 제품이므로 Schreiber배지의 질산염과 인산염의 농도를(NaNO_3 100mg, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 20mg, 해수 1 l)를 기준으로 비료의 양을 환산하면 해수 1 l 당 복합비료 117.6, 요소비료 163.7 g 으로 계산된다. 이러한 비료 농도는 질소와 인의 측면에서 Erdschreiber 배지의 1.0배에 해당된다.

우선 농업비료의 활용가능성을 파악하기 위하여 f/2, Schreiber배지, 농업용 비료(요소, 복합비료) 및 액체 비료인 complexal을 이용하여 Chlorella의 성장을 비교하였다. 배양조건은 25°C, 5,000 lux 연속조명하에서 접종농도 35×10^4 cells/ml로 하여 250 ml flask(100 ml 수량)에서 5일간 배양하였다. 매일 동일 시간에 세포의 성장을 계수하였고 2회 반복 실험하였다. 세포 계수는 깊이 0.1 mm의 hemocytometer를 사용하였고 specific growth rate(SGR)는 Guillard(1973)의 방법을 적용하여 구하였다.

$$\text{SGR} = 3.322 \times \frac{\log(N_2/N_1)}{t_2 - t_1}$$

(t_1, t_2 : 접종 후 일수, N_1, N_2 : 접종 후 t_1, t_2 일때의 세포수)

그 결과를 보면 f/2배지에서 성장률이 0.3245로 가장 높았고 Schreiber배지보다는 차라리 농업용 비료(0.2814)가 더 좋았다. complexal배지(0.2206)만을 사용하는 것은 성장이 가장 낮았으며 농업용 비료(50%) + complexal(50%)의 배지(0.2813)는 농업용 비료만을 사용한 것에 비하여 큰 차이가 없었다(Table 3-1). 따라서 f/2배지를 대조

Table 3-1. Growth of *Chlorella ellipsoidea* with different media

Culture day	Cell density($\times 10^4$ cells/ml)				
	1	2	3	4	5
0	35	36	36	36	35
1	66	47	43	53	41
2	80	67	50	68	60
3	84	69	66	76	64
4	101	81	72	85	82
5	130	84	86	94	92
6	147	100	91	124	97
7	169	131	105	141	137
S.G.R.	0.3245	0.2662	0.2206	0.2814	0.2813

1. f/2 ; 2. Schreiber ; 3. Complezal ; 4. Fertilizer ; 5. Fertilizer(50%) + Complezal(50%)

구로 볼 때 가장 적합한 배지는 농업용 비료로 나타났다.

이와 같은 결과를 참고할 때 적합한 비료의 함량을 파악하기 위하여 실험구를 ① f/2, ② f/2(75%) + 비료 1.0배(25%), ③ f/2(50%) + 비료 1.0배(50%), ④ f/2(25%) + 비료 1.0배(75%), ⑤ 비료 1.0배, ⑥ 비료 1.5배, ⑦ 비료 2.0배 로 구분하여 실험하였다. 5일간 실험결과는 Table 3-2 와 같이 대조구인 f/2에서 specific growth rates (S.G.R.)가 0.3837로 가장 높았고 f/2가 많이 들어간 순으로 성장이 좋았다. 또 비료만을 넣은 것은 f/2보다 성장이 낮았고 비료를 많이 넣은 것일수록 성장이 좋지 못했다.

이와 같은 결과를 참고할 때 대량 배양의 목적으로 사용될 수 있는 배지는 농업용 비료 1.0배가 적합한 것으로 확인할 수 있었다. 보다 가장 적합한 비료의 농도를 재 확인하기 위하여 ① f/2, ② 비료 1.0배, ③ 비료 1.5배, ④ 비료 (질산염 1.5배, 인산염 1.0배), ⑤ 비료 1.25배로 재 구분하여 성장을 실험하였다(Table 3-3). 그 결과 f/2은 성장률 0.3786으로 가장 높았고 비료 1.25배는 0.3407로 비교적 높았다. 비료 1.5배는 가장 낮은 성장률 (0.2660)을 나타내었고, 질산염 1.5배, 인산염 1.0배는 0.2809로 비교적 낮았다.

Table 3-2. Growth of *Chlorella ellipsoidea* with f/2 media and fertilizer

Culture day	Cell density ($\times 10^4$ cells/ml)						
	1	2	3	4	5	6	7
0	35	35	35	35	35	35	35
1	66	61	61	60	53	50	45
2	78	74	72	68	64	57	54
3	87	85	79	79	84	66	59
4	110	101	95	94	83	81	64
5	134	101	95	94	83	81	64
S.G.R.	0.3837	0.3617	0.3403	0.3297	0.2891	0.2703	0.2082

1. f/2 ; 2. f/2(75%)+Fertilizer(25%) ; 3. f/2(50%)+Fertilizer(50%) ;
 4. f/2(25%)+Fertilizer(75%) 5. Fertilizer 1.0 times ; 6. Fertilizer 1.5 times ;
 7. Fertilizer 2.0 times

Table 3-3. Growth of *Chlorella ellipsoidea* with different concentration of fertilizer

Culture day	Cell density ($\times 10^4$ cells/ml)				
	1	2	3	4	5
0	35	35	35	35	35
1	67	53	47	53	60
2	78	63	55	62	69
3	91	75	64	69	76
4	105	81	74	78	93
5	130	98	88	90	114
S.G.R.	0.3786	0.2971	0.2660	0.2809	0.3407

1. f/2 ; 2. Fertilizer 1.0 times ; 3. Fertilizer 1.5 times ;
 4. Fertilizer(N 1.5 times, P 1.0 times) ; 5. Fertilizer 1.25 times

이와 같은 일련의 실험결과를 참고할 때 Schreiber배지의 질산염과 인산염 농도를 기준으로 한 농업용 비료는 1.25배를 사용하는 것이 가장 효율적이고 경제적인 배지로 판단되었다. 현재, 보다 성장이 양호한 배지개발을 위하여 다양한 영양염을 첨가하여 실험하고 있다.

제 4 장 농업용 비료를 이용한 계절별 배지 개발

해산 *Chlorella*의 대량 배양을 현장에서 양식어민들이 용이하게 활용할 수 있도록 농업용 비료를 이용한 온도와 계절에 따른 배지조성과 추가 시비효과를 조사하였다.

제 1 절 온도별 계절별 배지를 위한 소규모 배양실험

국립수산진흥원 남해수산종묘배양장에서 배양하고 있던 *C. ellipsoidea*를 실험에 사용하였다. 실험배지로는 우선 3가지 배지 즉, Schreiber 배지(BAS), 복합비료, 요소비료 및 캄프살(중양농자재)을 혼합한 배지(COV), 그리고 복합비료와 요소비료를 혼합한 배지(CUC, CUV, CUM, DEL)를 준비하였다(Table 4-1). 비료배지를 만들 때 복합비료(N함량: 21%, P함량: 17%, K함량: 17%)와 요소비료(N함량: 46%)의 혼합 시비구는 복합비료 117.6 mg/해수1ℓ, 요소비료 163.7 mg/해수1ℓ의 농도였으며, 복합비료, 요소비료 및 캄프살의 혼합 시비구는 복합비료 58.8 mg/해수1ℓ, 요소비료 81.9 mg/해수1ℓ 및 캄프살 0.25 ml/해수1ℓ의 농도였다.

Table 4-1. Media for the culture of *Chlorella ellipsoidea*

Codes	Initial supplement	Additional supplement
BAS	Schreiber medium	Schreiber medium
COV	Pokhap + Yoso + Complezal	Pokhap + Yoso + Complezal
CUC	Pokhap + Yoso	Pokhap + Yoso
CUV	Pokhap + Yoso	Vitamine solution
CUM	Pokhap + Yoso	Mineral solution
DEL	Pokhap + Yoso	-- ¹

¹ No additional supplement

고압멸균술(autoclave)에서 멸균한 상기 3가지 실험배지 중 복합비료와 요소비료를 혼합한 배지를 4개 준비하고 나머지 배지는 한개씩 준비하여 모두 6개의 500 ml 플라스크에 300ml씩 각각 담고 50×10^4 cells/ml로 접종하였다. 온도 10, 25, 30°C의 배양기에 조도 4,000 lux의 연속광 조건에서 염분도는 30‰로 하여 정체배양하였다. 매일 세포수를 조사하고 pH를 측정하였다.

세포수가 증가하여 정체기에 이르렀을 때 각 배지구에 추가시비를 실시하였다 (Tables 4-1, 4-2). 6가지 배지구 즉, Schreiber 배지에 다시 이를 추가시비한 배지구 (BAS), 복합비료, 요소비료 및 캄프살을 혼합한 배지에 다시 이들을 추가시비한 배지구 (COV), 복합비료와 요소비료를 혼합한 배지에 다시 이들을 추가시비한 배지구 (CUC), 복합비료와 요소비료를 혼합한 배지에 vitamin을 추가시비한 배지구 (CUV), 복합비료와 요소비료를 혼합한 배지에 mineral을 추가시비한 배지구 (CUM), 그리고 복합비료와 요소비료를 혼합한 배지에 추가시비를 하지 않은 배지구 (DEL)에서 추가 시비 후 세포수의 증감을 조사하였다. 또한 2일 후의 세포수로부터 specific growth rate를 구하였다. BAS, COV 및 CUC 배지구에서는 접종초기 시비량의 10%를 추가 시비하였고 CUV과 CUM에서는 Table 4-2에 나타낸 농도의 vitamin과 mineral을 추가시비하였다. 실험은 2 반복구로 실시하였다. 10, 25, 30°C에서 위와 같은 실험의 결과를 다음과 같다.

가. 10°C 배양실험

*C. ellipsoidea*는 접종 후 11일째부터 빠른 증가 추세를 나타내었다(Fig. 4-1). 정체기로 들어서는 시기인 30일째까지 모든 배지구에서 세포수의 증가 경향은 유사하였으며 specific growth rate는 0.138 ~ 0.145의 범위였다(Fig. 4-2). 30일째에 추가 시비를 실시한 결과, 2일 동안의 specific growth rate는 0.063 ~ 0.191의 범위로서 DEL 배지구에서 가장 높았으므로 추가시비의 효과는 나타나지 않았다. 최대세포수는 CUV 배지구에서 $4,770.5 \times 10^4$ cells/ml이었다. 배양기간 동안 pH는 8.16~10.28

Table 4-2. Chemical composition of BAS medium and additional supplement of nutrient for CUV and CUM media in culture of *Chlorella ellipsoidea*

<u>Schreiber medium for BAS</u>		
NaNO ₃	100	mg
Na ₂ HPO ₄	20	mg
Distilled water	50	ml
Sea water	1,000	ml
<u>Vitamin solution of Conway medium for CUV</u>		
(100ml/1000 l Sea water)		
B ₁₂ (Cyanocobalamin)	10	mg
B ₁ (Thiamin)	200	mg
Distilled water	200	ml
<u>Mineral solution of Conway medium for CUM</u>		
(1ml/1000 l Sea water)		
ZnCl ₂	2.1	g
CoCl ₂ · 6H ₂ O	2.0	g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0.9	g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	2.0	g
Distilled water	100.0	ml

의 범위로서, 세포수가 빠르게 증가하는 동안 pH 역시 증가폭이 컸다(Fig. 4-2).

나. 25℃ 배양실험

*C. ellipsoidea*는 접종 후 3일째부터 빠른 성장을 보였다(Fig. 4-3). 접종 후 14일째 정체기로 들어서는 시기까지 모든 배지구에서 세포수의 증가 경향은 유사하였으며 specific growth rate는 0.295 ~ 0.308의 범위였다(Fig. 4-7). 14일째에 추가시비

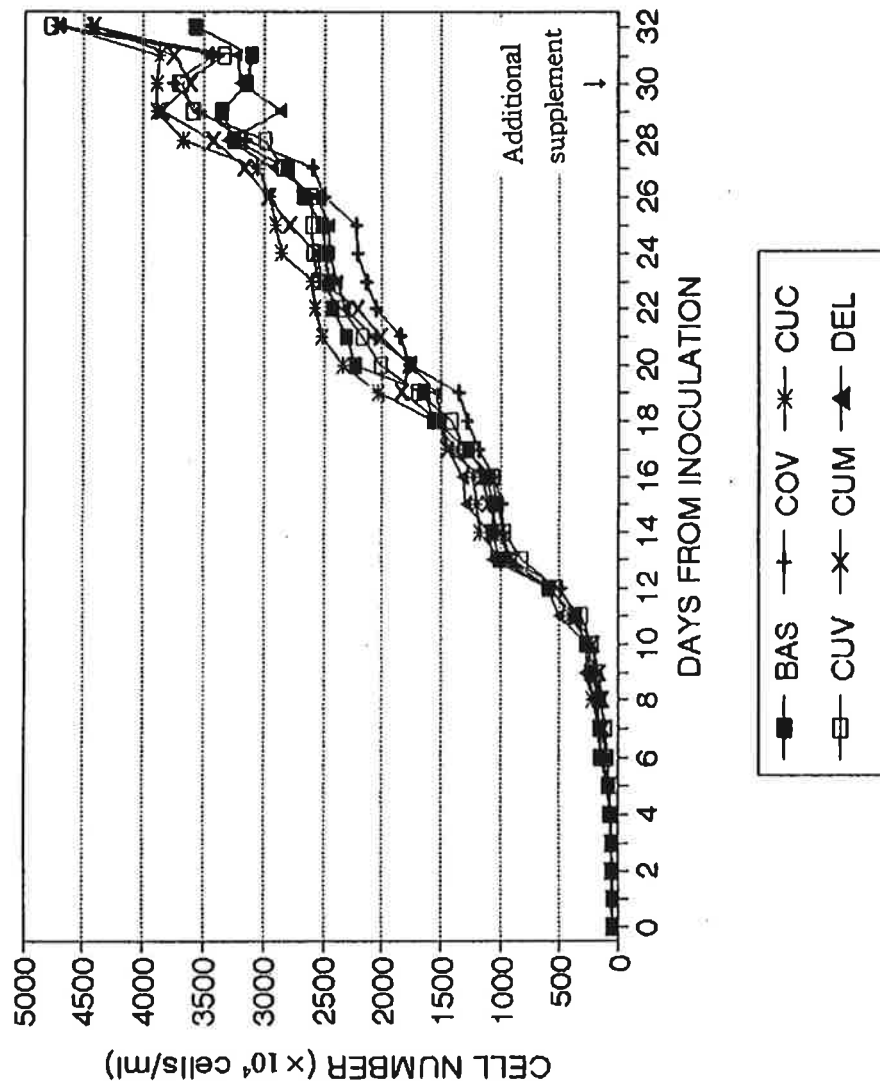


Fig. 4-1. Growth of *Chlorella ellipsoidea* with different media at 10°C incubator culture

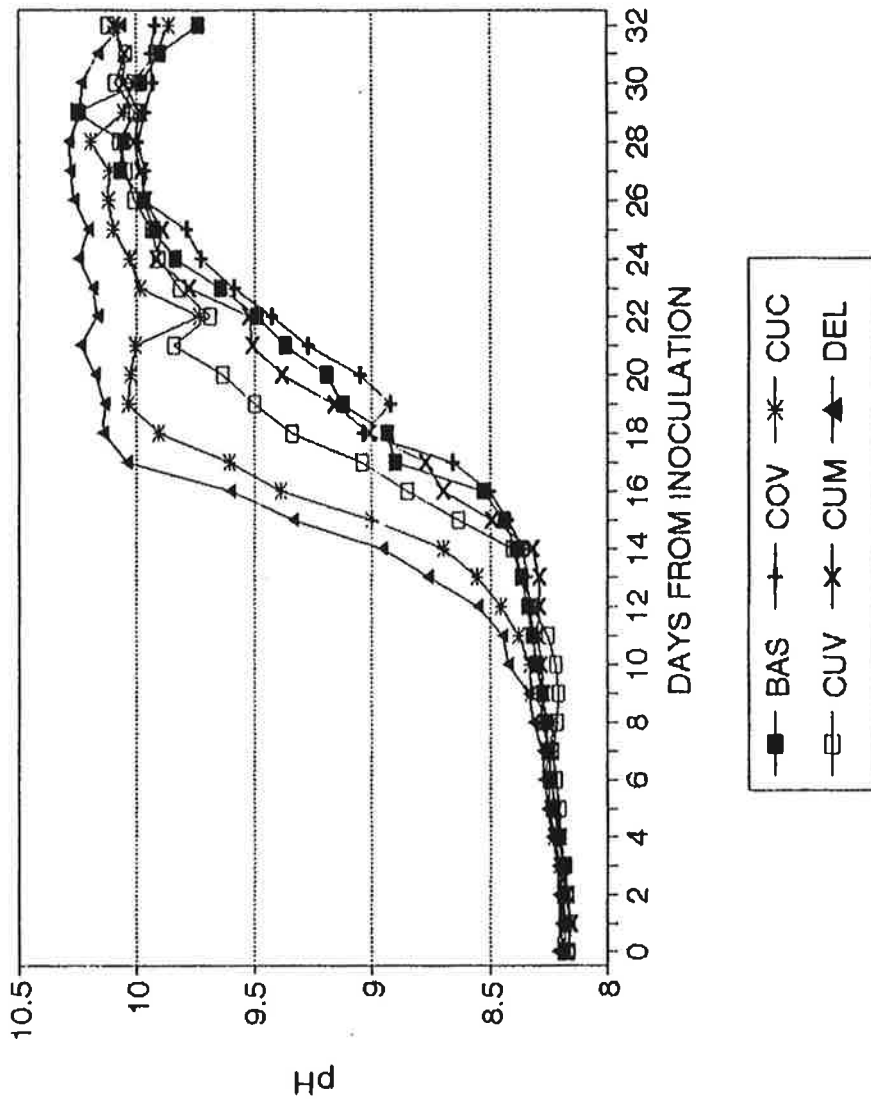


Fig. 4-2. Variation of pH with different media at 10°C incubator culture.

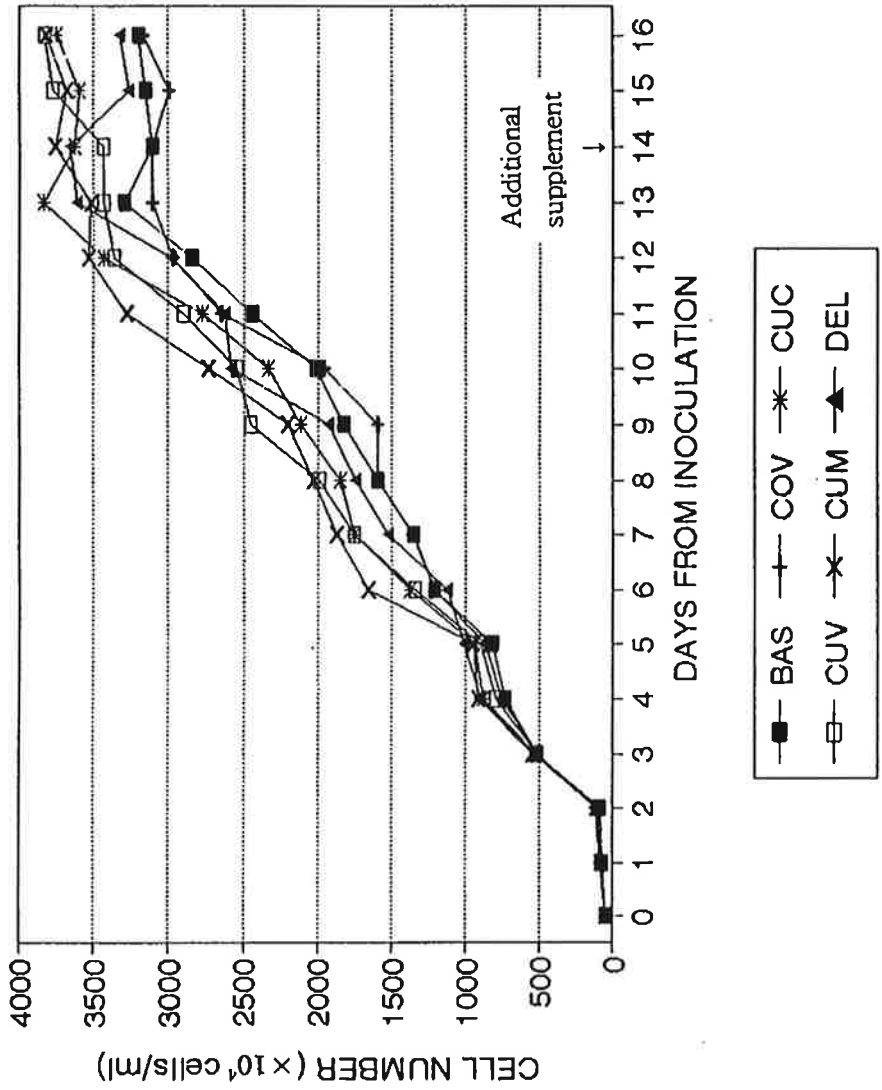


Fig. 4-3. Growth of *Chlorella ellipsoidea* with different media at 25°C incubator culture.

를 실시한 결과, 2일 동안의 specific growth rate는 DEL 배지구에서 -0.048로 나타났고 나머지 배지구에서는 0.009 ~ 0.054의 범위로 나타났다. 따라서 추가시비의 효과가 나타났다고 할 수 있으며 특히 CUV 배지구에서 가장 뚜렷하였다. 최대세포수는 CUC 배지구에서 $3,831.5 \times 10^4$ cells/ml이었다. 배양기간 동안 pH는 8.12 ~ 9.70으로서, 접종 후 2일부터 4 ~ 6일까지는 큰 폭으로 증가하였으나 이후에는 점차 감소하였다(Fig. 4-4).

다. 30℃ 배양실험

*C. ellipsoidea*는 접종 후 3일째부터 빠르게 증가하였다(Fig. 4-5). 접종 후 15일째 정체기로 들어서는 시기까지 모든 배지구에서 세포수의 증가 경향은 유사하였으며 specific growth rate는 0.253 ~ 0.266의 범위였다(Fig. 4-7). 15일째에 추가시비를 실시한 결과, 2일 동안 세포수가 증가한 배 지구는 CUC 배 지구로서 specific growth rate가 0.021이었고 나머지 배 지구에서는 세포수가 감소하여 specific growth rate는 -0.024 ~ -0.061의 범위로 나타났다. 따라서 추가시비의 효과는 CUC 배 지구에서만 나타났다. 최대세포수는 CUV 배 지구에서 $2,750.5 \times 10^4$ cells/ml이었다. 배양기간 동안 pH는 8.12 ~ 9.55로서, 접종 후 4일부터 6 ~ 8일까지는 pH의 큰 폭으로 증가하였으나 이후에는 점차 감소하였다(Fig. 4-6).

이와 같이 10℃, 25℃ 및 30℃ 배양실험에서 추가시비 전의 specific growth rate는 각각 0.138 ~ 0.145, 0.295 ~ 0.308 및 0.253 ~ 0.266의 범위로서 모든 배 지구에서 세포수의 증가속도는 큰 차이가 없었다. 온도별로는 25℃에서 가장 빠르게 증가하였다. 10℃에서는 접종 후 10일까지 세포수가 거의 증가하지 않다가 그 이후부터 증가하였으며, 30℃에서는 초기 증가속도는 유사하였으나 더 빨리 정체기로 들어섰으며 쇠퇴기도 빨랐다(Figs. 4-1, 4-3, 4-5).

추가시비 전에는 온도에 따라 배 지구별로 큰 차이가 없었으나 추가시비 후에는 차이가 나타났다. 10℃ 배양실험에서는 추가시비의 효과가 없었으나, 25℃ 배양실험에

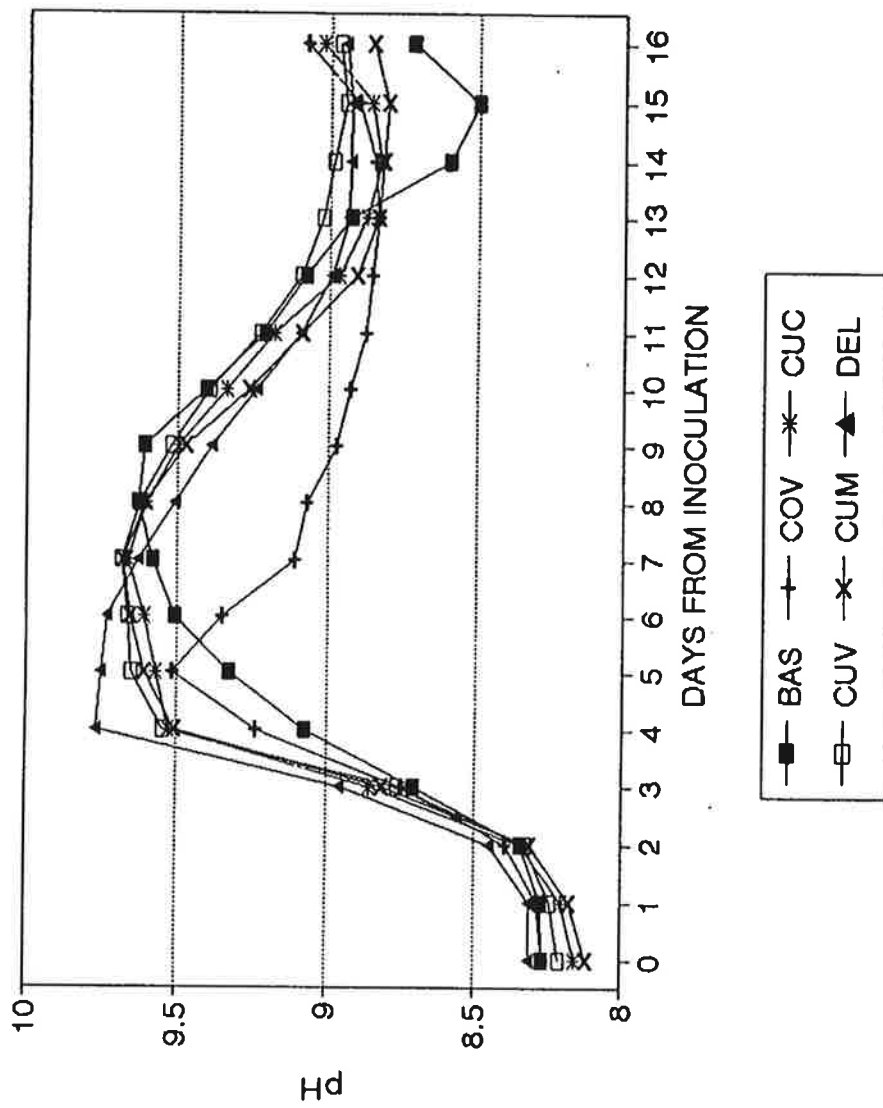


Fig. 4-4. Variation of pH with different media at 25°C incubator culture.

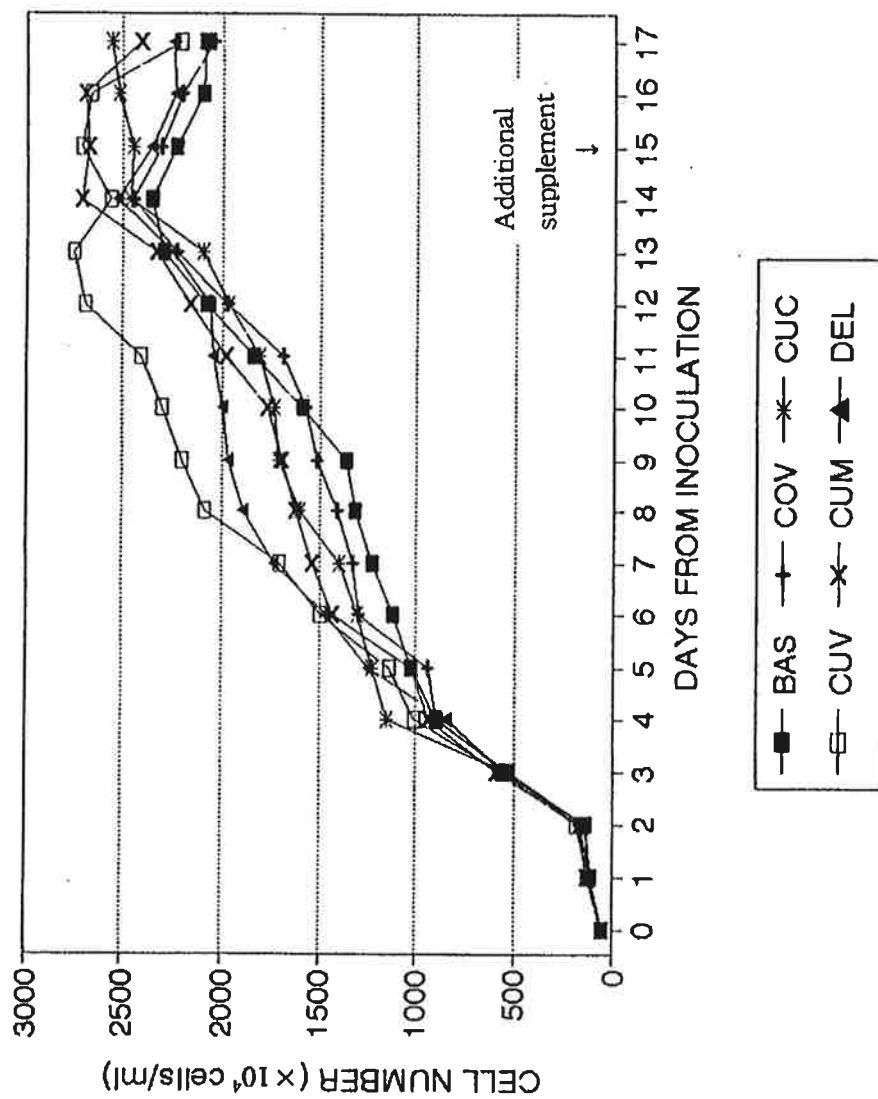


Fig. 4-5. Growth of *Chlorella ellipsoidea* with different media at 30°C incubator culture.

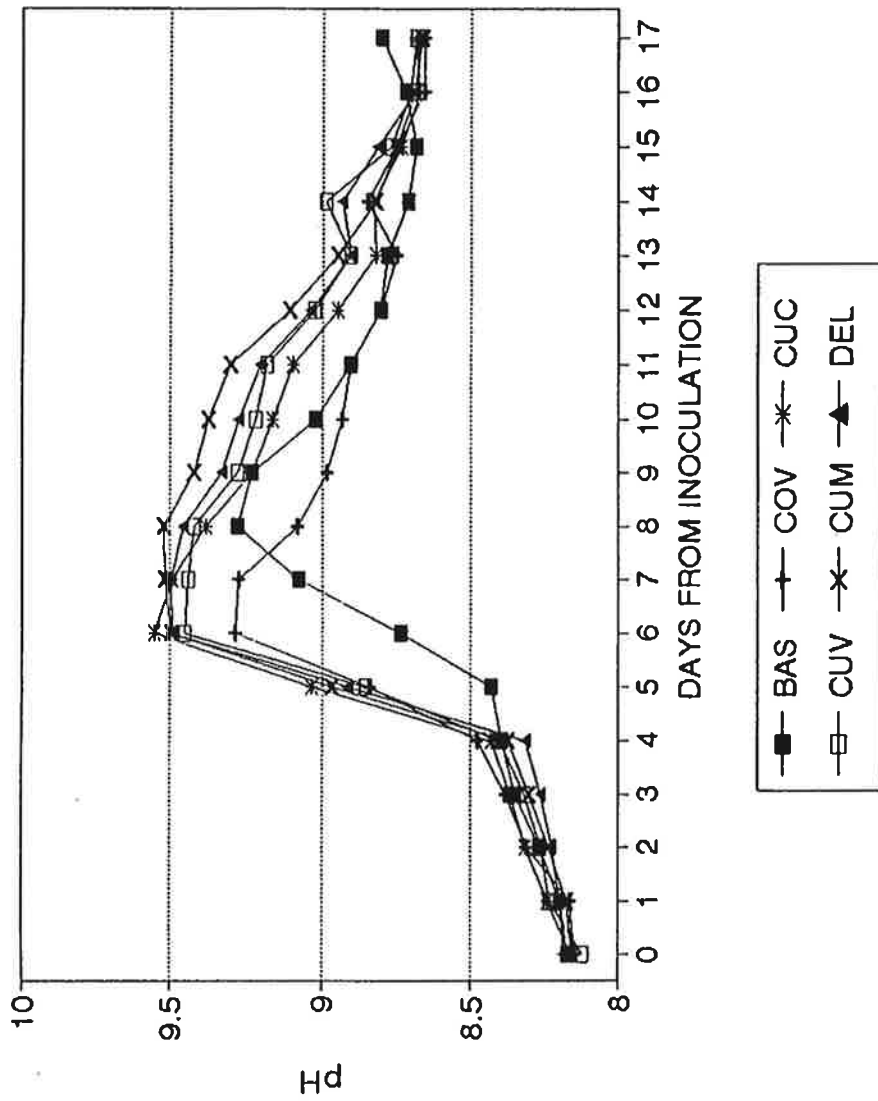


Fig. 4-6. Variation of pH with different media at 30°C incubator culture.

서는 CUV 배지구에서 추가시비의 효과가 뚜렷하였고 나머지 배지구에서는 약하게 나타났으며, 30℃ 배양실험에서는 CUC 배지구에서 추가시비의 효과가 약하게 나타났다. 특히 CUC 배지구에서는 25℃와 30℃에서 효과가 나타났다(Fig. 4-7).

제 2 절 해산 *Chlorella ellipsoidea*의 계절별 옥외 대량 배양실험

계절별 옥외 대량 배양실험은 춘계 '96년 5월 31일부터 '96년 6월 14일까지, 하계 '96년 8월 1일부터 '96년 8월 17일까지, 추계 '96년 11월 15일부터 '96년 12월 9일까지, 그리고 동계 '97년 2월 20일부터 '97년 3월 17일까지 실시하였다.

여과해수를 1.2톤 FRP 수조에 1톤씩 각각 담고 *C. ellipsoidea*를 500×10^4 cells/ml로 접종하였다. 초기시비와 추가시비는 소규모 배양실험에서와 동일하게 실시하였고(Tables 4-1, 4-2), 매일 10시경에 세포수를 조사하여 specific growth rate를 구하였으며 온도, 조도, pH 등의 환경조건을 측정하였다. 실험은 2 반복구로 실시하였다.

가. 춘계 대량 배양실험

*C. ellipsoidea*는 접종 후 3일째부터 빠르게 성장하였다(Fig. 4-8). 접종 후 12일째 정체기로 들어서는 시기까지의 specific growth rate는 0.162 ~ 0.191의 범위로서 큰 차이가 없었으나 COV 배지구에서는 0.162로서 다른 배 지구에 비하여 낮았다(Fig. 4-24). 12일째에 추가시비를 실시한 결과, 2일 동안 세포수가 증가한 배 지구는 CUC, CUV 및 DEL 배 지구였는데 DEL 배 지구의 specific growth rate는 0.007에 불과하였고 CUC와 CUV 배 지구의 경우는 각각 0.100과 0.049였으므로 추가시비의 효과를 볼 수 있었다. 최대세포수는 CUV 배 지구에서 $5,466.0 \times 10^4$ cells/ml이었다. 춘계 배양 실험 기간 동안 수온은 18.4 ~ 22.5℃, 조도는 10,400 ~ 101,450 lux, pH는 8.19 ~ 9.35의 변화 범위를 나타내었다(Figs. 4-9, 4-10, 4-11).

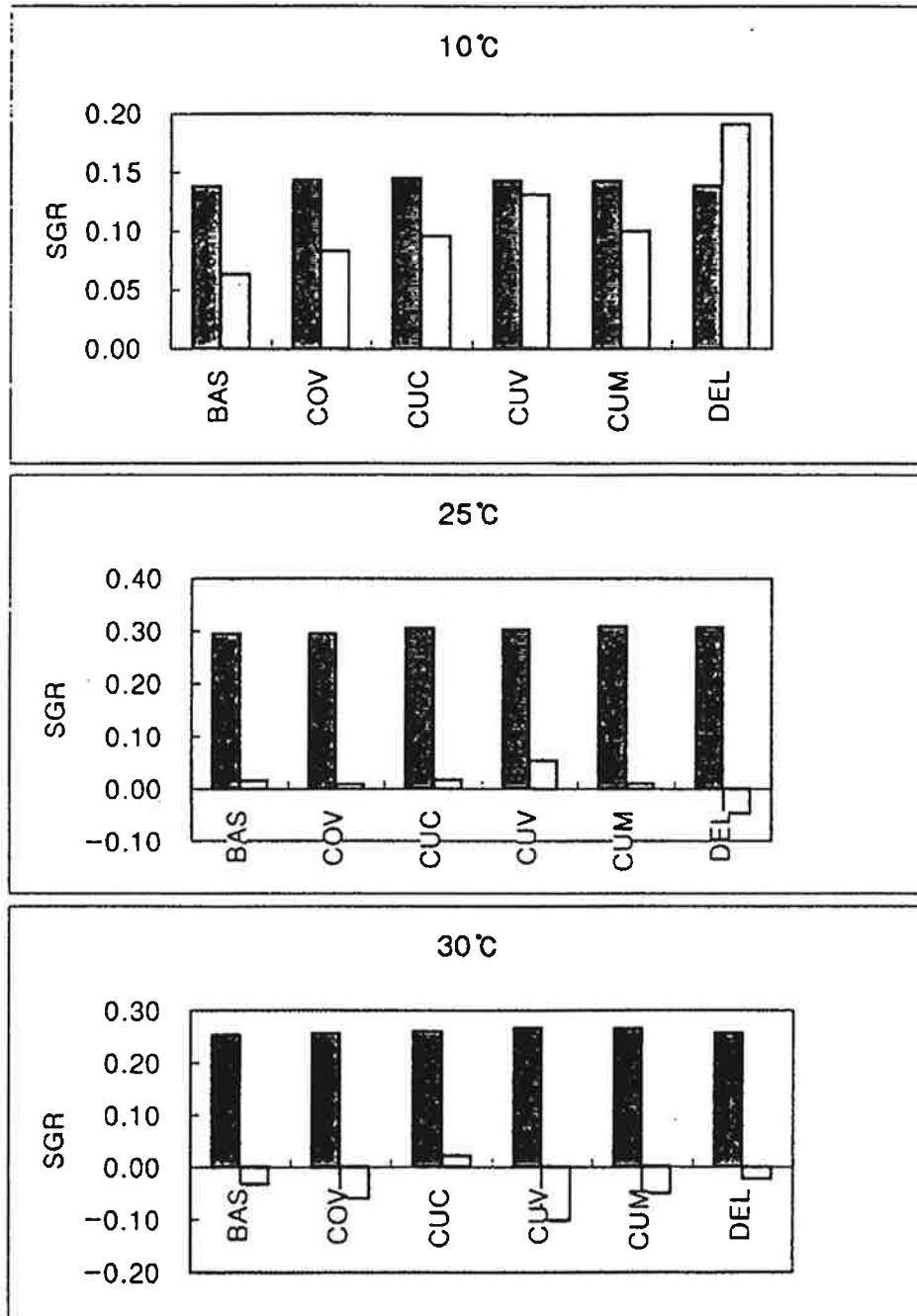


Fig. 4-7. Specific growth rate (SGR) of *Chlorella ellipsoidea* with different media at incubator culture. ■ : SGR for days before additional supplement, □ : SGR for two days after additional supplement.

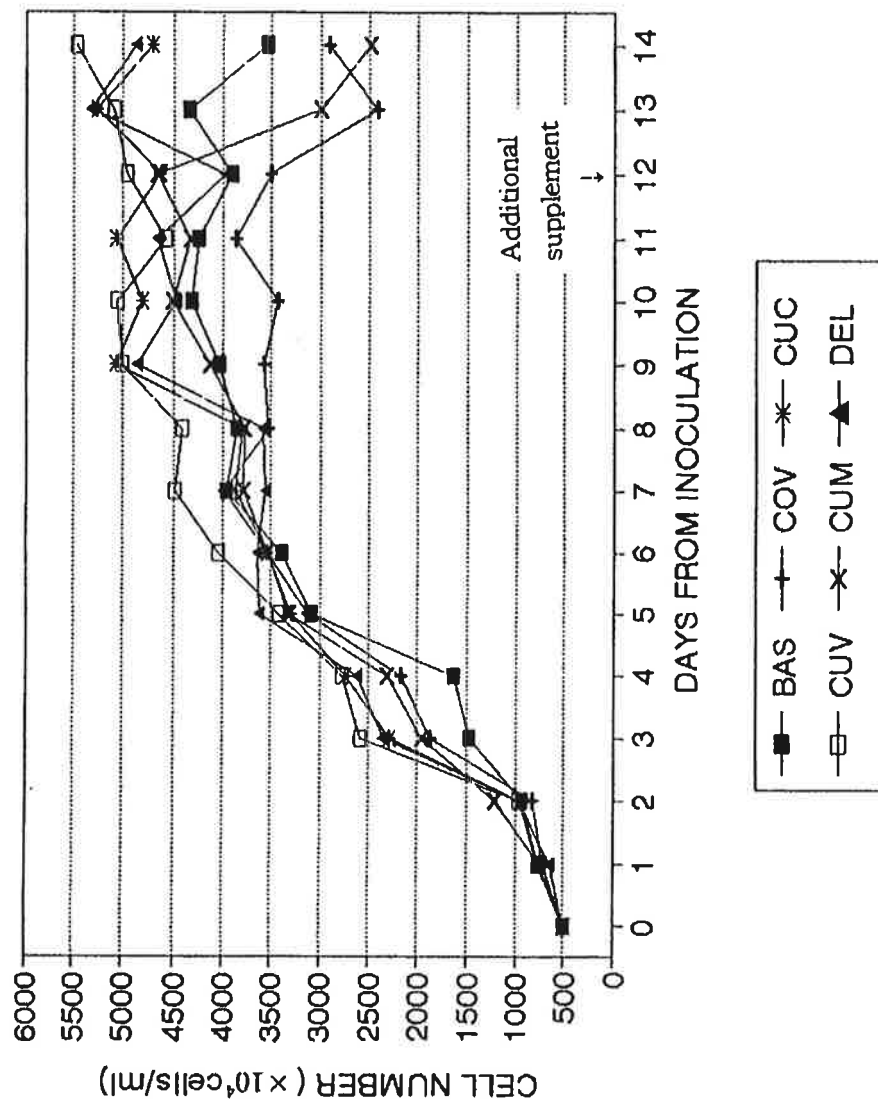


Fig. 4-8. Growth of *Chlorella ellipsoidea* with different media at outdoor culture, inoculated on May. 31, 1996.

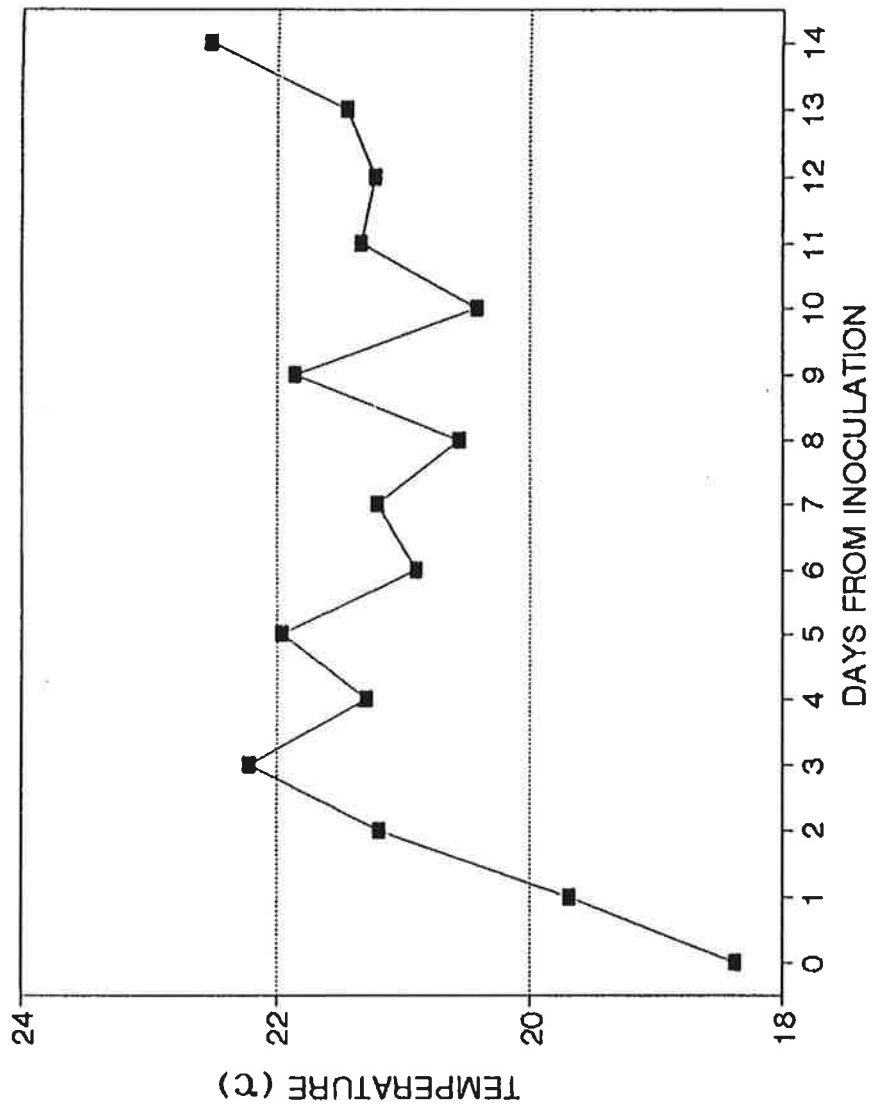


Fig. 4-9. Variation of water temperature with different media at outdoor culture, inoculated on May. 31, 1996.

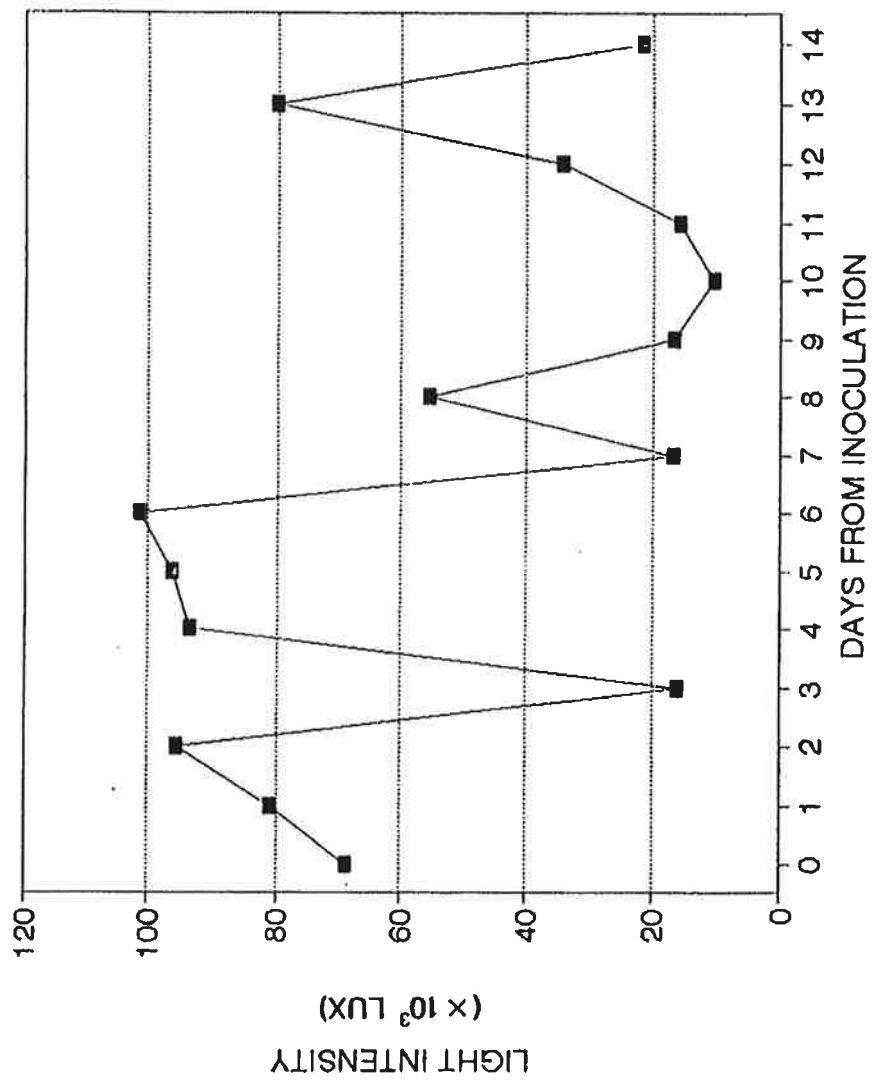


Fig. 4-10. Variation of light intensity with different culture media at outdoor culture, inoculated on May. 31, 1996.

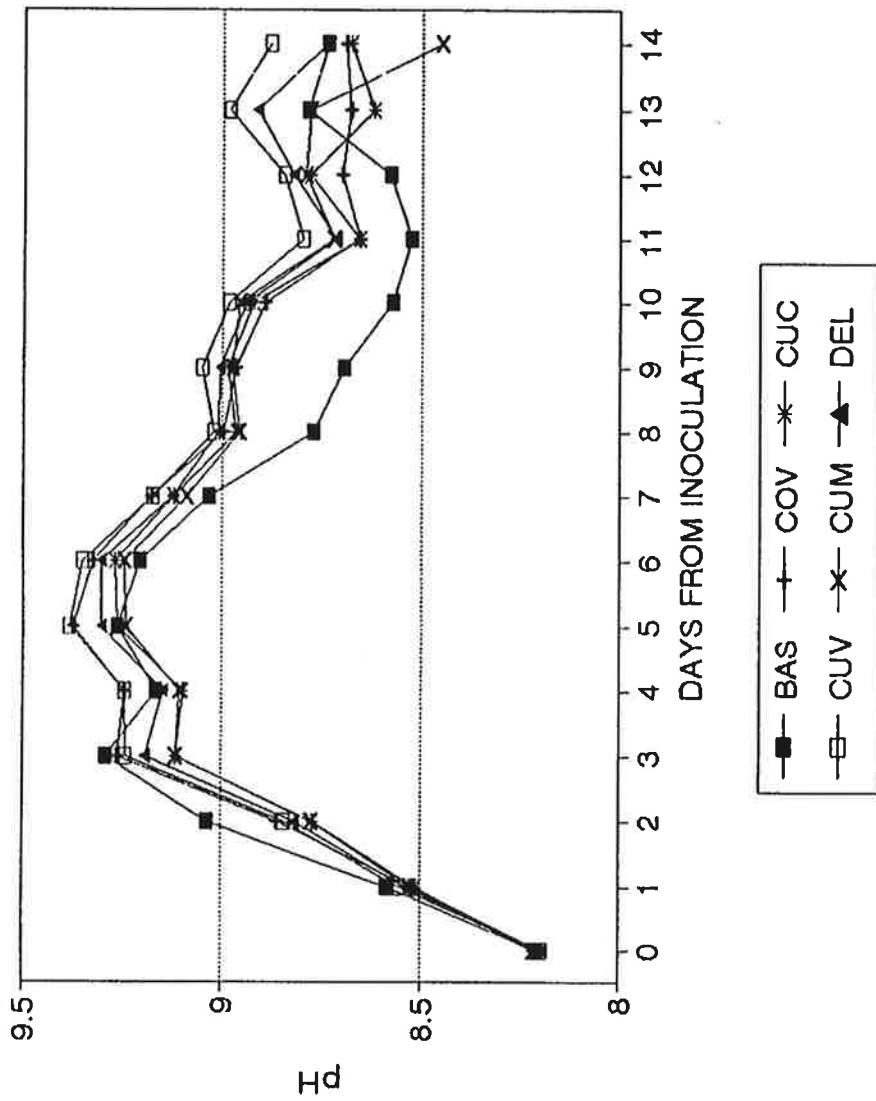


Fig. 4-11. Variation of pH with different media at outdoor culture, inoculated on May. 31, 1996.

나. 하계 대량 배양실험

*C. ellipsoidea*는 접종 직후 빠르게 성장하였으며 접종 후 8일에서 10일까지는 일정한 정체기를 보인 후 다시 증가 경향을 나타내었다(Fig. 4-12). 접종 후 14일째 정체기로 들어서는 시기까지의 specific growth rate는 0.120 ~ 0.145의 범위로서 큰 차이가 없었으나 CUC 배지구의 경우 0.140으로 최고값을 보였다(Fig. 4-24). 14일째에 추가시비를 실시한 결과, 모든 배지구에서 세포수가 감소하였으므로 추가시비의 효과는 없었다. 최대세포수는 CUV 배지구에서 $3,862.5 \times 10^4$ cells/ml이었다. 하계 배양실험 기간 동안 수온은 26.5 ~ 30.3°C, 조도는 27,000 ~ 110,000 lux, pH는 8.19 ~ 9.78의 변화 범위를 나타내었다(Figs. 4-13, 4-14, 4-15).

다. 추계 대량 배양실험

*C. ellipsoidea*는 접종 후 3일째부터 빠르게 증가하였다(Fig. 4-16). 접종 후 22일째 정체기로 들어서는 시기까지의 specific growth rate는 0.080 ~ 0.090의 범위로서 큰 차이가 없었다(Fig. 4-24). 22일째에 추가시비를 실시한 결과, DEL과 CUM 배지구의 specific growth rate는 각각 -0.019와 -0.001로서 세포수가 감소하였고 나머지 배지구에서는 0.052 ~ 0.115의 범위로서 세포수가 증가하였다. 따라서 BAS, COV, CUC 및 CUV 배지구에서 추가시비의 효과를 볼 수 있었다. 최대세포수는 BAS 배지구에서 $4,106.5 \times 10^4$ cells/ml이었다. 추계 배양실험 기간 동안 수온은 3.5 ~ 16.8°C, 조도는 6,875 ~ 76,150 lux, pH는 8.18 ~ 9.89의 변화 범위를 나타내었다(Fig. 4-17, 4-18, 4-19).

라. 동계 대량 배양실험

*C. ellipsoidea*는 접종 후 14일째부터 빠르게 증가하였다(Fig. 4-20). 접종 후 23일째 정체기로 들어서는 시기까지의 specific growth rate는 0.073 ~ 0.082의 범위로서 큰 차이가 없었으나 BAS 배지구의 경우 0.082로 최고값을 보였다(Fig. 4-24). 23일

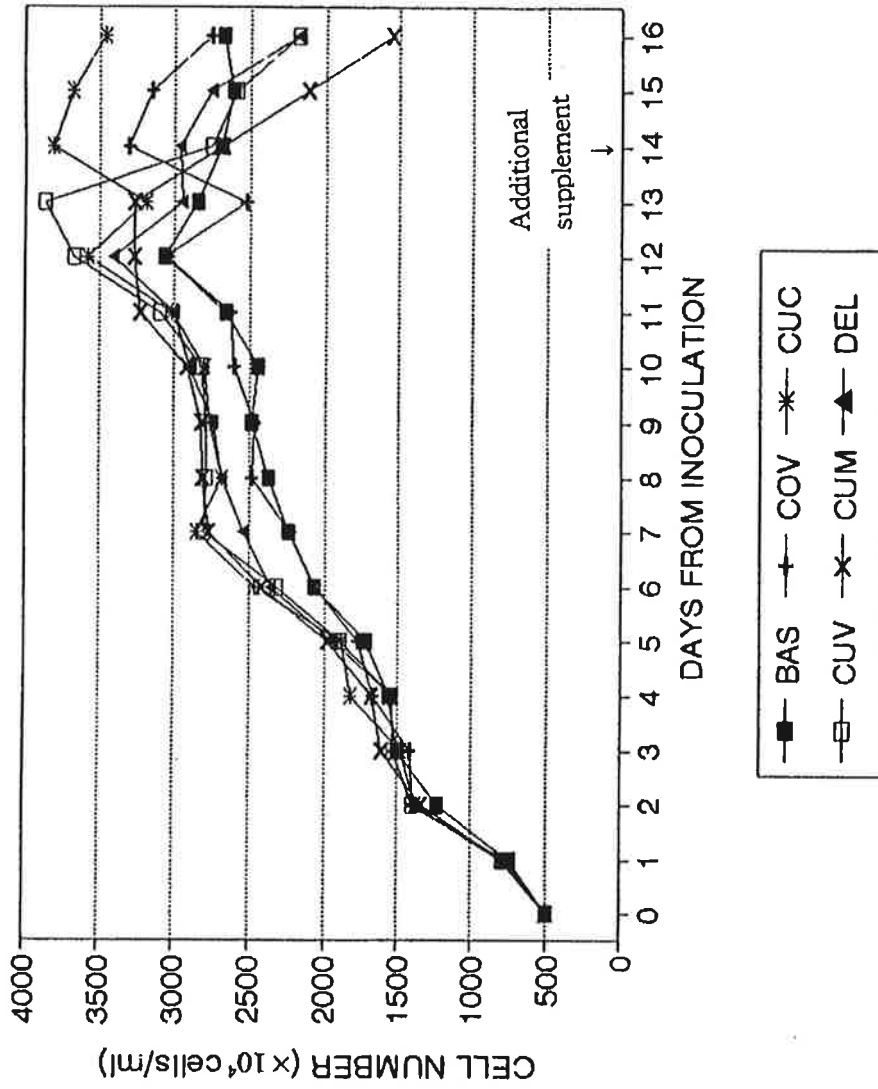


Fig. 4-12. Growth of *Chlorella ellipsoidea* with different culture media at outdoor culture, inoculated on Aug. 31, 1996.

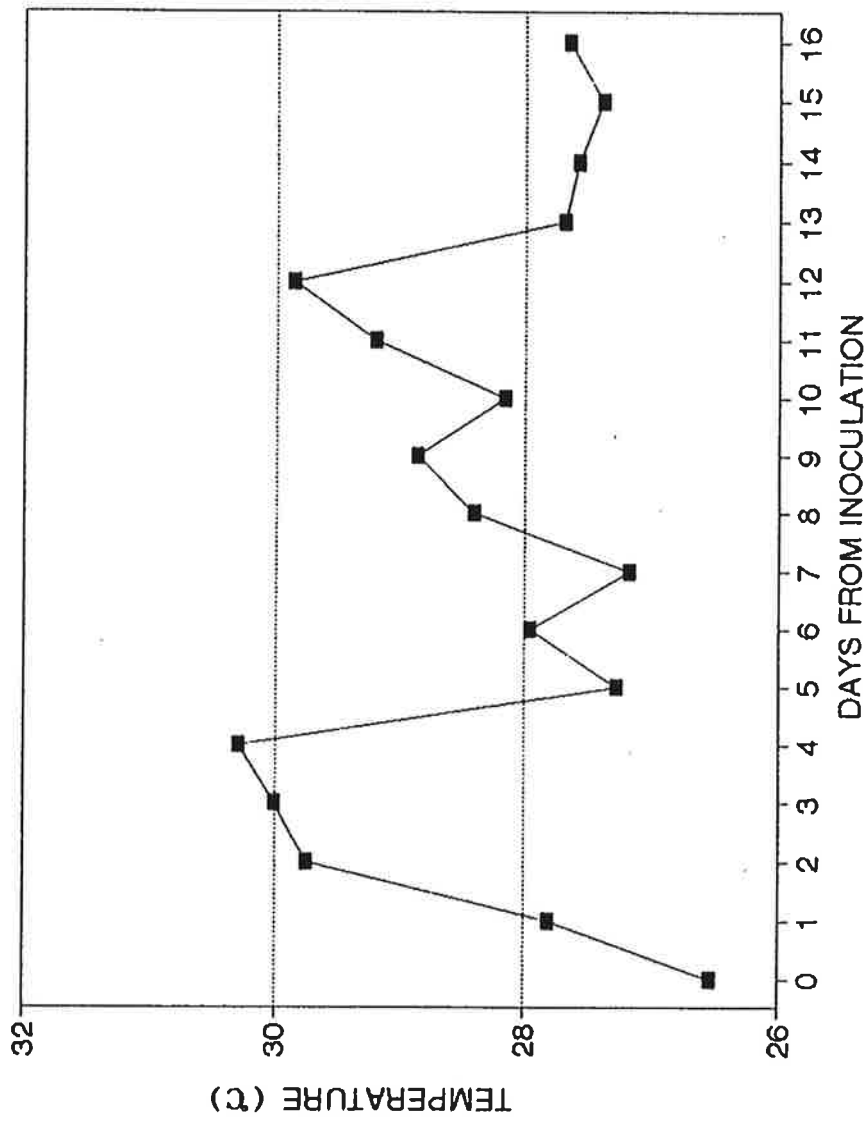


Fig. 4-13. Variation of water temperature with different culture media at outdoor culture, inoculated on Aug. 31, 1996.

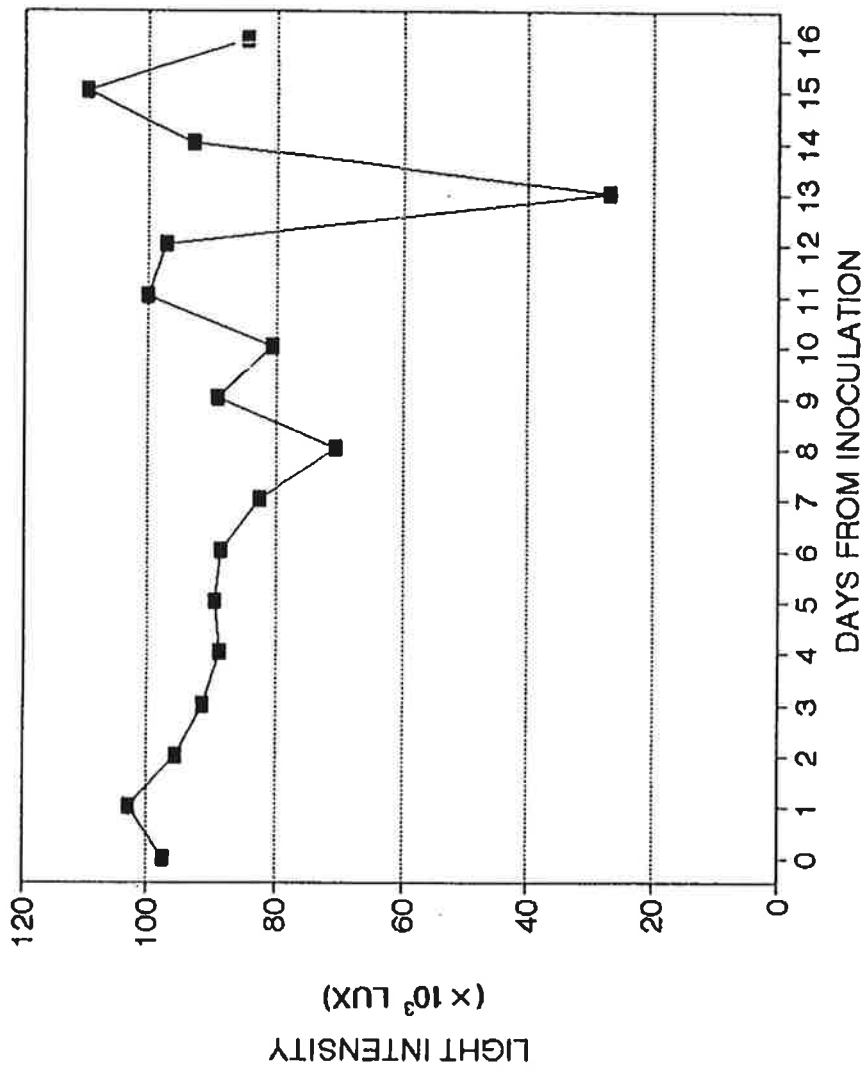


Fig. 4-14. Variation of light intensity at outdoor culture, inoculated on Aug. 31, 1996.

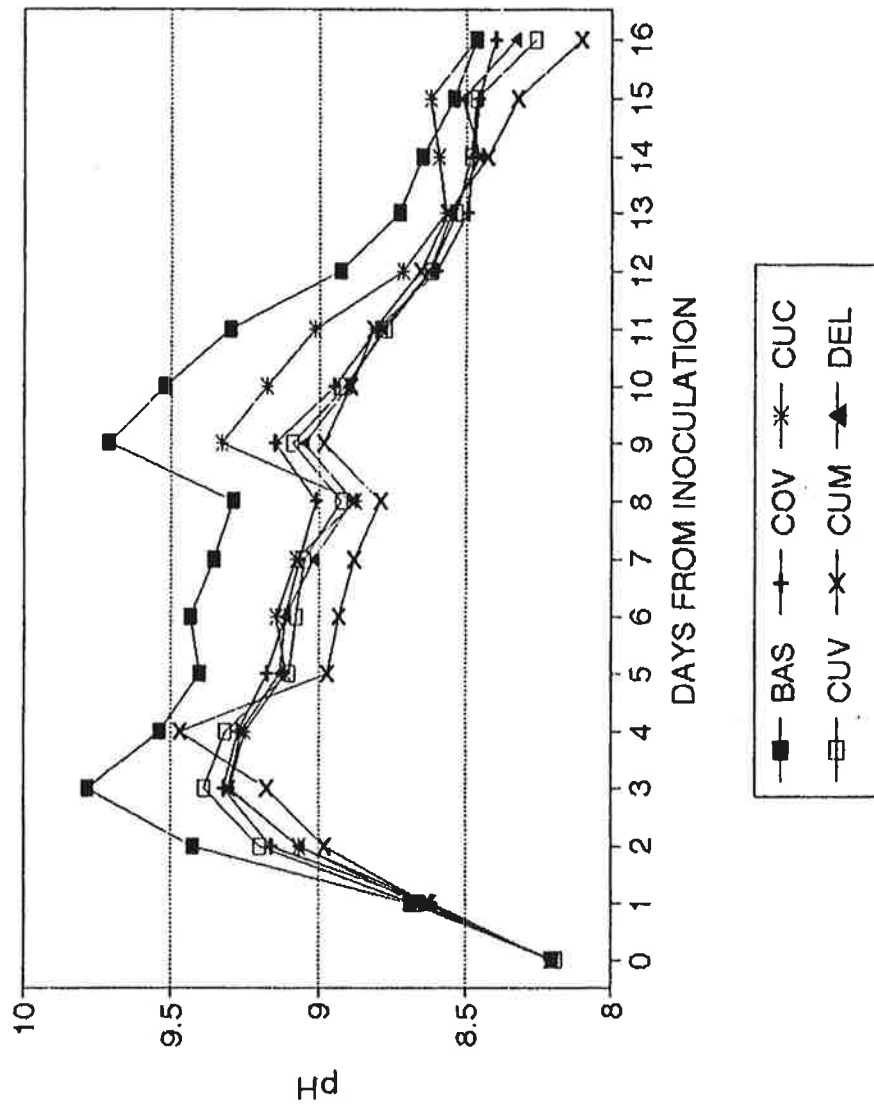


Fig. 4-15. Variation of pH with different media at outdoor culture, inoculated on Aug. 31, 1996.

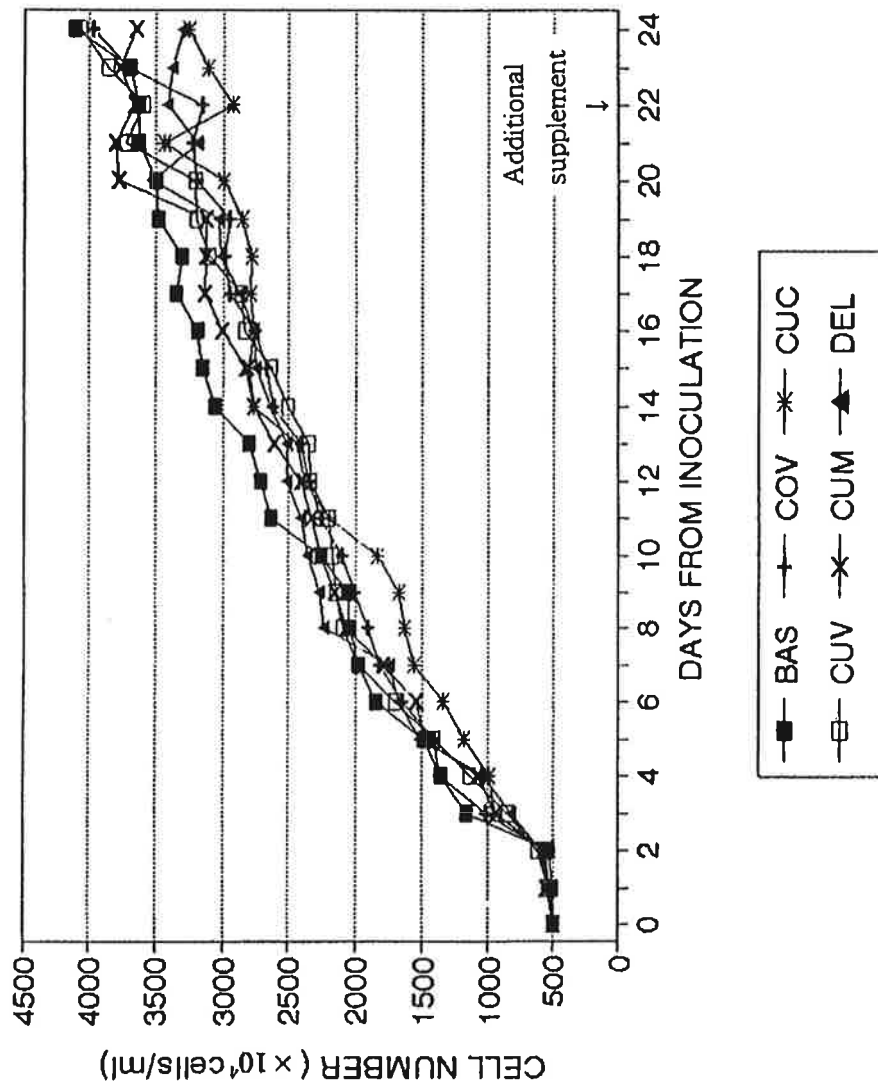


Fig. 4-16. Growth of *Chlorella ellipsoidea* with different media at outdoor culture, inoculated on Nov. 15, 1996.

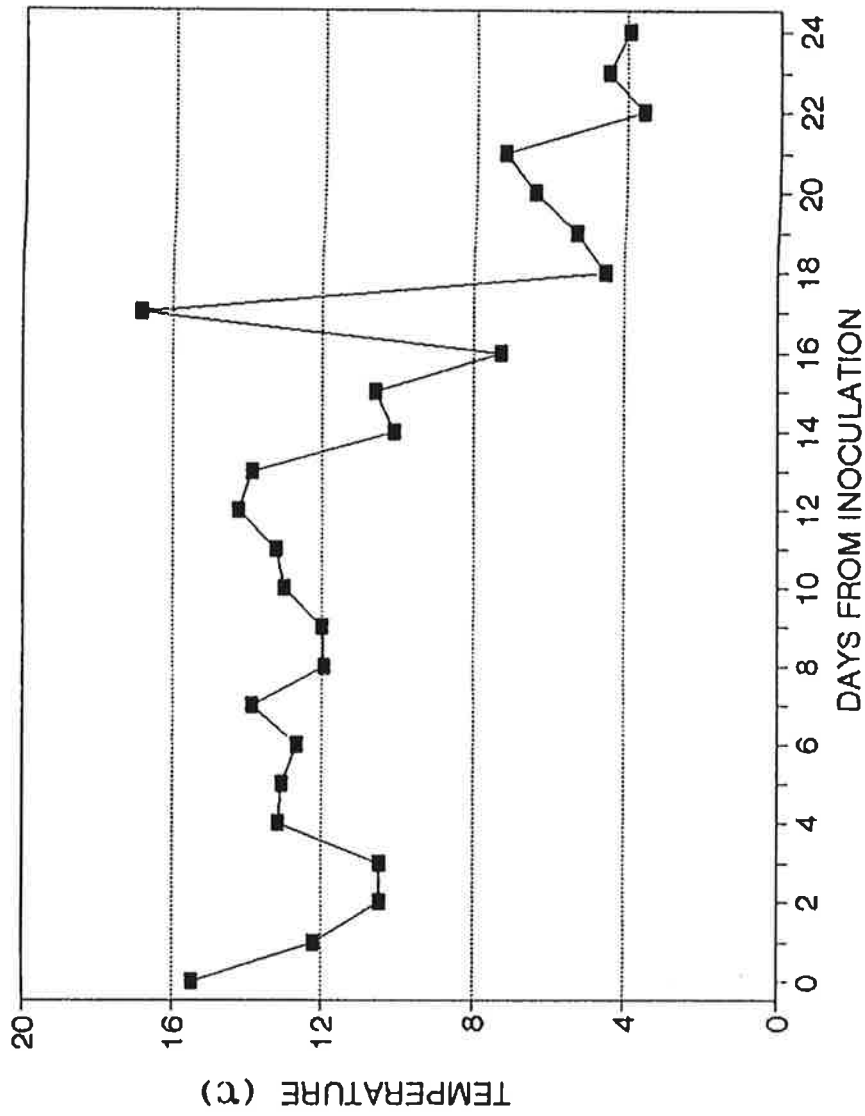


Fig. 4-17. Variation of water temperature at outdoor culture, inoculated on Nov. 15, 1996.

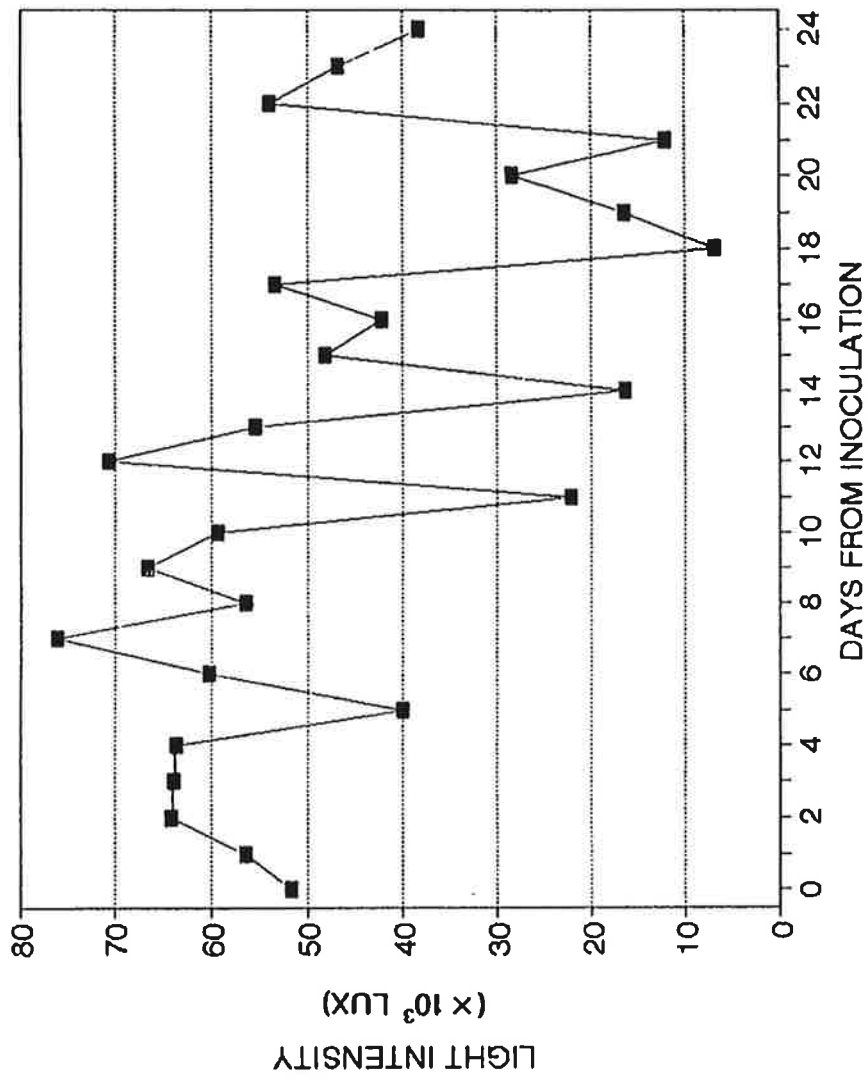


Fig. 4-18. Variation of light intensity at outdoor culture, inoculated on Nov. 15, 1996.

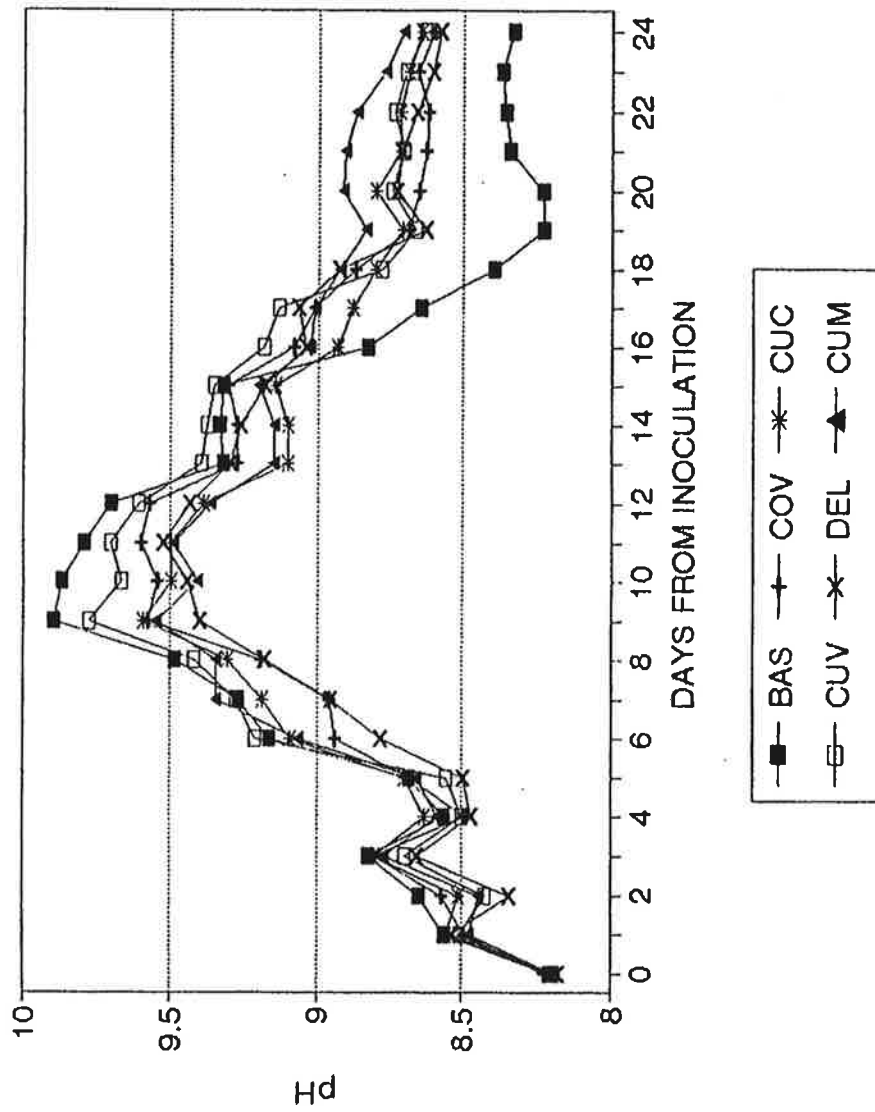


Fig. 4-19. Variation of pH with different media at outdoor culture, inoculated on Nov.15. 1996.

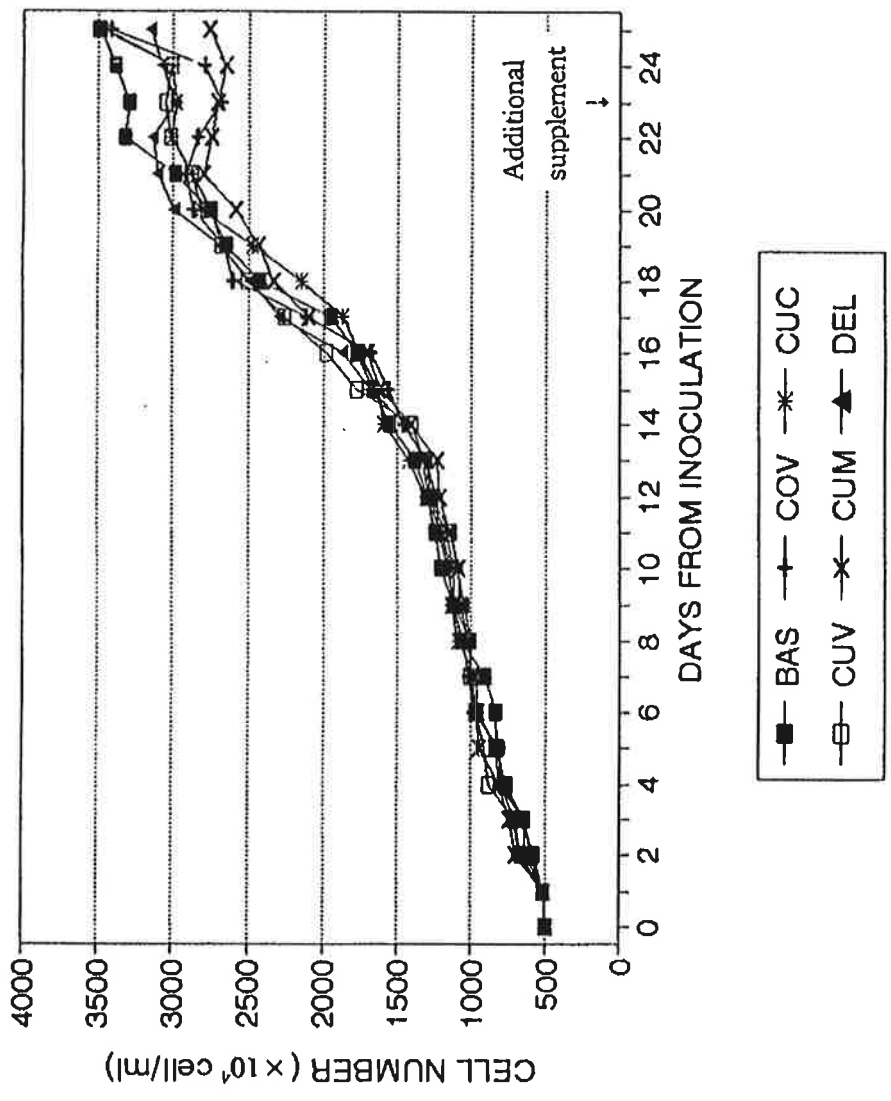


Fig. 4-20. Growth of *Chlorella ellipsoidea* with different media at outdoor culture, inoculated on Feb. 20, 1997.

제에 추가시비를 실시한 결과 모든 배지구에서 세포수가 증가하였는데, DEL 배지구의 specific growth rate는 0.026이었으나 COV, CUC 및 CUV 배지구에서는 각각 0.123, 0.073 및 0.069로서 DEL 배지구의 경우보다 2배 이상 높았으므로 추가시비의 효과를 볼 수 있었다. 최대세포수는 CUV 배지구에서 $3,490.0 \times 10^4$ cells/ml이었다. 동계 배양실험 기간 동안 수온은 4.1 ~ 10.8℃, 조도는 9,870 ~ 40,200 lux, pH는 8.17 ~ 10.16의 변화 범위를 나타내었다(Fig. 4-21, 4-22, 4-23).

마. 계절별 비교

대량 배양실험에서도 추가시비 전의 specific growth rate는 배지구별로 대체적으로 유사하게 나타났으나, 춘계 대량 배양실험의 경우 COV 배지구에서 다른 배지구에 비하여 낮은 값을 보였고 동계 대량 배양실험의 경우는 BAS 배지구에서 높은 값을 보였다. 즉, 추가시비 전까지는 춘계에 Schreiber 배지구와 복합비료 및 요소비료 혼합 배지구에서 성장에 높았고 하계와 추계에는 모든 배지구의 성장이 유사하였으며 동계에는 Schreiber 배지구에서 성장이 높았다. 그러나, 추가시비 후에는 그 양상을 달리하여, 춘계에 CUC와 CUV 배지구에서, 추계에 BAS, COV, CUC 및 CUV 배지구에서, 그리고 동계에 COV, CUC 및 CUV 배지구에서 추가시비의 효과를 볼 수 있었다

춘계는 기온상승기, 하계는 고수온기, 추계는 기온하강기, 그리고 동계는 저수온기로서 계절별 대량배양은 온도의 영향을 크게 받을 것으로 예상되며, 따라서 대량 배양실험 결과와 소규모 배양실험을 비교해 볼 필요가 있다. 춘계는 수온범위가 18.4 ~ 22.5℃로서 세포수의 증가경향은 25℃의 경우와 가장 유사하였으며 specific growth rate는 0.162 ~ 0.191의 범위였고 최대개체수는 $5,466.0 \times 10^4$ cells/ml로서 다른 계절보다 높았다. 하계는 수온범위가 26.5 ~ 30.3℃로서 세포수의 증가경향은 30℃와 유사하였으며 specific growth rate와 최대개체수도 춘계보다 낮았다. 추계와 동계는 수온범위가 각각 3.5 ~ 16.8℃ 와 4.1 ~ 10.8℃였으며 specific growth rate

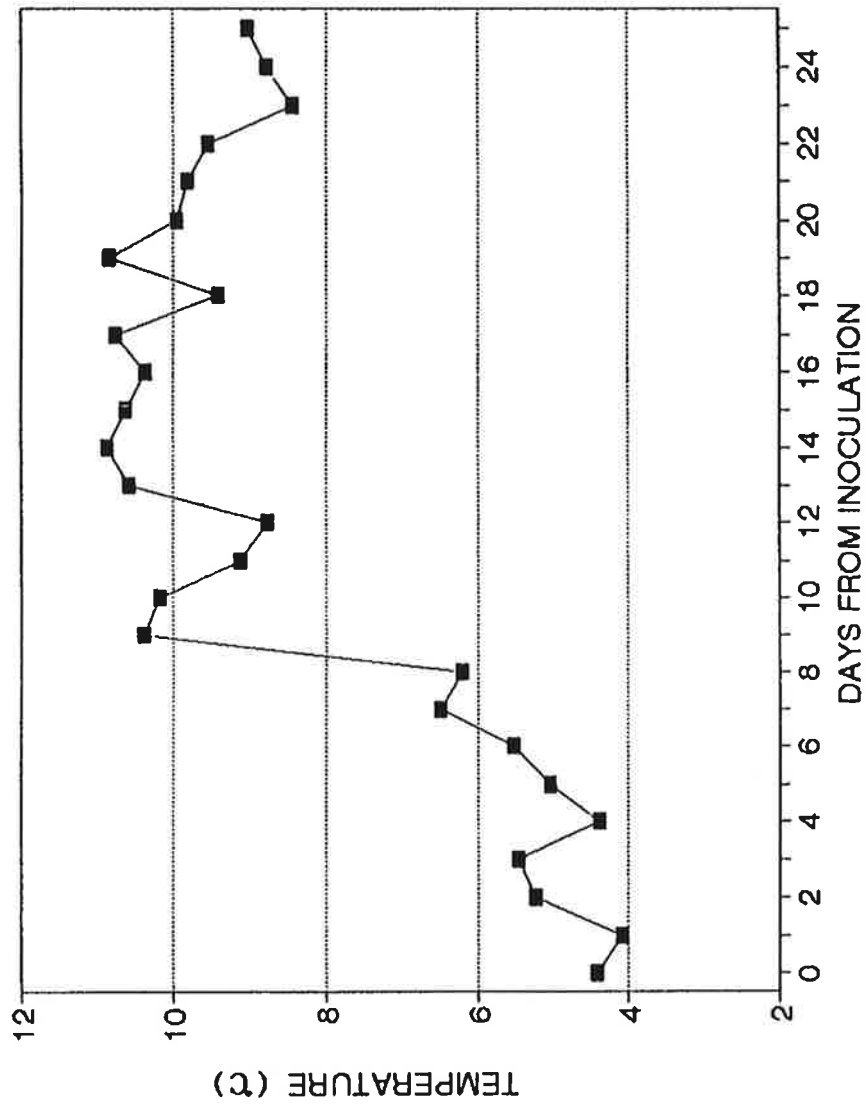


Fig. 4-21. Variation of water temperature at outdoor culture, inoculated on Feb. 20, 1997.

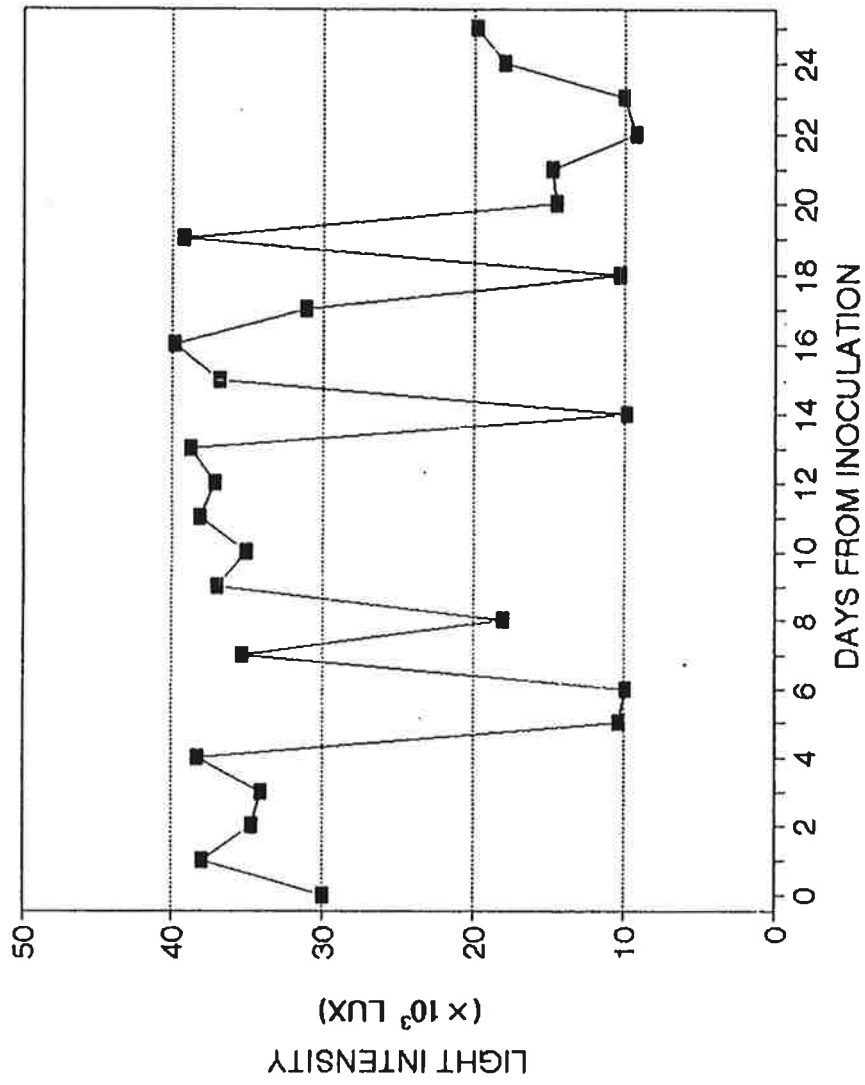


Fig. 4-22. Variation of light intensity at outdoor culture, inoculated on Feb. 20, 1997.

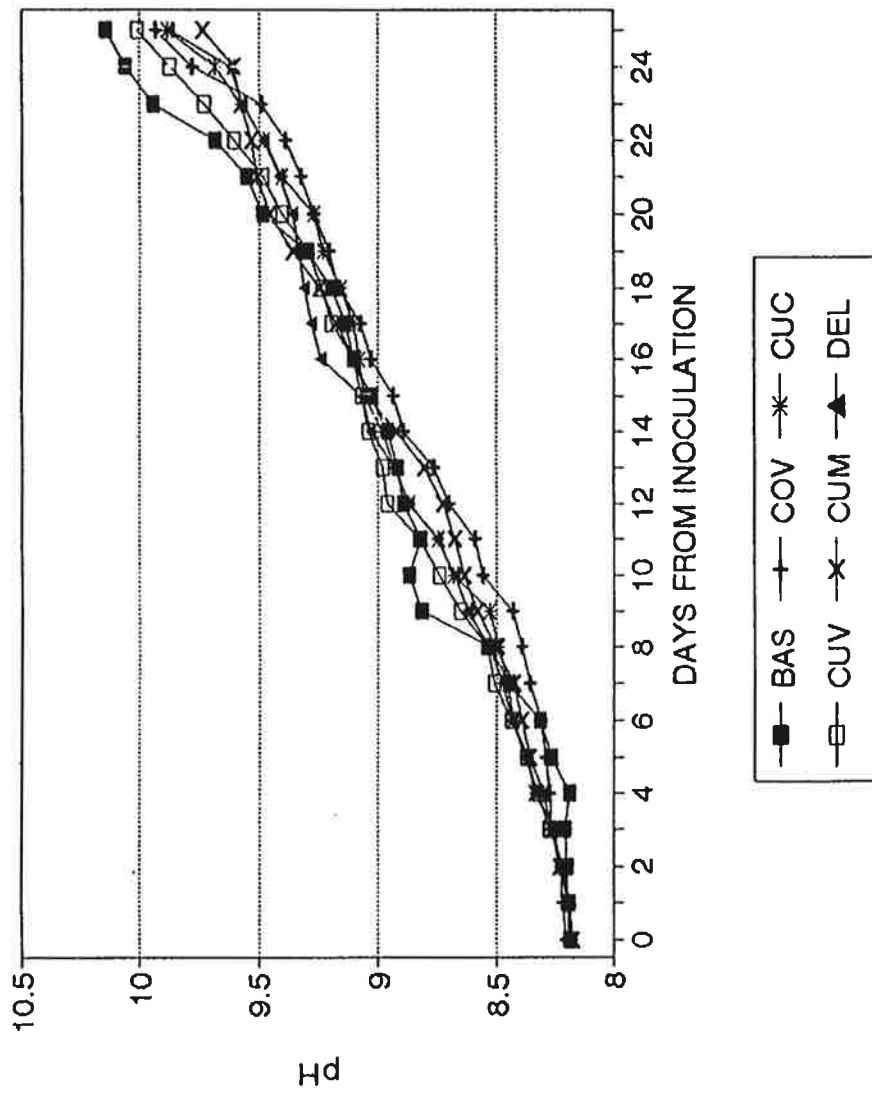


Fig. 4-23. Variation of pH with different media at outdoor culture, inoculated on Feb. 20. 1997.

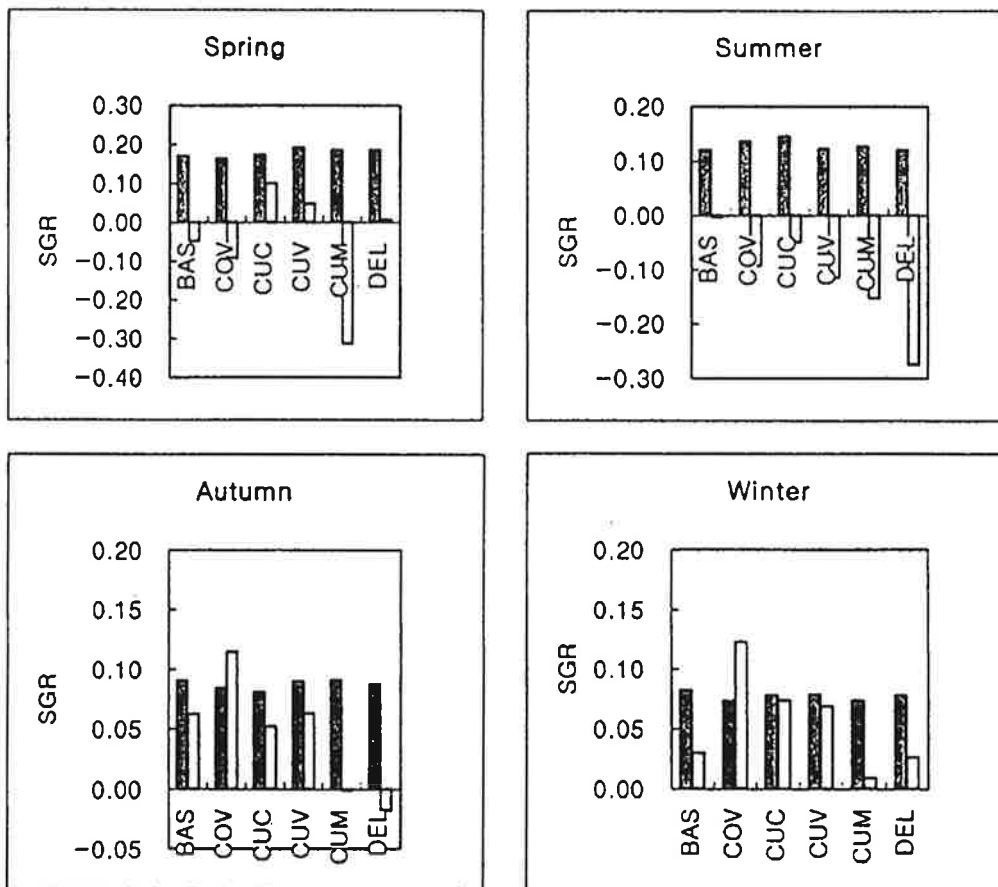


Fig. 4-24. Specific growth rate (SGR) of *Chlorella ellipsoidea* with different media at outdoor culture. ▨ : SGR for days before additional supplement, □ : SGR for two days after additional supplement.

는 각각 0.080 ~ 0.090, 0.073 ~ 0.082의 범위로 춘계와 하계에 비하여 낮았다. 특히 동계에는 세포수의 증가는 10℃ 소규모 배양실험에서와 같이 접종 초기의 증가속도가 느렸다. 계절별 옥외대량 배양실험에서는 조도의 변화도 뚜렷하여 춘계 10,400 ~ 101,450, 하계 27,000 ~ 110,000, 추계 6,875 ~ 76,150 및 동계 9,870 ~ 40,200의 범위였는데, 춘계와 하계의 specific growth rate가 추계와 동계에 비하여 높은 값을 나타낸 것은 온도 뿐 아니라 조도의 영향도 있었을 것으로 추정되었다.

추가시비를 실시한 결과, 계절에 따라 효과를 나타낸 배지구가 달랐으며 특히 CUC와 CUV 배지구에서는 하계를 제외한 계절에 모두 효과가 나타났다. 배양실험과 계절별 옥외 대량 배양실험에서 배지구별 추가시비 후의 효과가 달리 나타난 것은 옥외실험에서는 온도, 조도 등의 환경 조건이 일정하지 않고 변화폭이 심하기 때문일 것으로 판단되었다.

결론적으로, 추가시비를 하지 않을 경우 춘계에는 캄프살이 포함된 COV 배지구가 적합치 않고 하계와 추계에는 상관없으며, 동계에는 BAS 배지구 즉 Schrieber 배지구가 가장 적합하였다. 추가시비를 할 경우에는 계절에 관계없이 CUC 또는 CUV 배지구를 사용하는 것이 좋을 것으로 사료되었다.

제 5 장 농축 방법

제 1 절 대량 배양

농업용 비료를 이용하여 50 M/T 규모의 원형 FRP 수조 3개를 이용하여 대량 배양을 옥외에서 실시하였다. 접종시 염분은 30‰로 조절하였고 빛과 온도는 자연 조건하에서 행하였으며, 매일 오전 10시에 수온과 세포의 성장을 조사하였다.

옥외 대량배양에서는 뚜렷한 성장의 경향을 볼 수는 없었다. 이와 같이 옥외 대량 배양에서 일정한 경향을 파악할 수 없었던 이유로 자연적인 강우로 인한 영양염과 염분변화가 가장 큰 원인으로 판단된다. 일반적으로 여름에는 고온에 따른 폐사, 적조생물유입등에 따른 변종 등이 문제점으로 나타났고, 겨울철에는 안전성은 있으나 낮은 수온으로 성장이 낮은 문제점을 보였다. 배지의 농도는 앞 실험에서와 같이 Schreiber 배지의 질산염과 인산염을 기준으로 1.0~1.5배 사이가 무난하였다. 대량배양시의 배양 자료는 Table 5-1과 같다.

제 2 절 농축

위와 같이 대량배양한 Chlorella의 농축은 AML flow basket, Separator(HFG, 5016HK), 그리고 공막장치(Ultrafiltration Membrane Modules Superane, 선경인더스트리社)를 이용하여 세포분리하였다. 우선 공막장치는 Chlorella가 너무 미세하여 막이 쉽게 막히는 현상때문에 부적합하였고 AML flow basket 경우도 Chlorella가 너무 미세하여 유실되는 세포가 많아 부적합하였다. 따라서 Separator을 사용하여 점진적으로 농축하는 방법이 가장 적합하였다. Separator를 이용하여 21회에 걸쳐 50M/T tank에서 대량배양된 Chlorella를 농축한 결과는 Table 5-2와 같다.

Table 5-1. Mass culture data of Chlorella in 50 M/T.

Culture day	Vessel No.	Temp(°C)		Density(cell/ml)		Volume (ton)	S.G.R.	Fertilizer (Schreiber ×)
		Range	Mean	Initial	Final			
95.12.12 ~ 12.19	1			2040×10^4	1780×10^4	45	-0.0281	2.0
	2	1.2 ~ 10.0	5.6	2090×10^4	2140×10^4	45	0.0047	1.5
	3			2040×10^4	3100×10^4	45	0.0862	1.0
96. 2.17 ~ 3.16	1			754×10^4	2047×10^4	50	0.0497	1.2
96. 2.17 ~ 3.18	2	5.5 ~ 10.5	8	770×10^4	2343×10^4	50	0.0518	1.5
96. 2.17 ~ 3.21	3			886×10^4	2473×10^4	50	0.0436	1.7
96. 4.25 ~ 5.28	1			1187×10^4	2887×10^4	50	0.0414	1.5
96. 4.25 ~ 6. 5	2	17 ~ 25	21	1109×10^4	2390×10^4	50	0.0277	1.5
96. 4.25 ~ 6. 9	3			1033×10^4	1660×10^4	50	0.0156	1.5
96. 6.16 ~ 7.19	1	20 ~ 26.5	21.9	810×10^4	2006×10^4	50	0.0396	1.5
96.10.30 ~ 12.10	1			280×10^4	2581×10^4	45	0.0782	1.5
96.10.30 ~ 12.12	2	6 ~ 17	11.5	290×10^4	2156×10^4	45	0.0673	1.5
96.10.30 ~ 12.14	3			283×10^4	2124×10^4	45	0.0646	1.5

Table 5-1. Continued

Culture day	Vessel No.	Temp(°C)		Density(cell/ml)		Volime (ton)	S.G.R.	Fertilizer (Schreiber ×)
		Range	Mean	Initial	Final			
96.12.19 ~ 97.2.19	1			171×10^4	2258×10^4	42	0.0600	1.5
96.12.19 ~ 97.2.24	2	2.0 ~ 8.5	5.3	131×10^4	2280×10^4	43	0.0564	1.5
96.12.19 ~ 97.2.27	3			184×10^4	2846×10^4	42	0.0564	1.5
97. 8. 1 ~ 8.20	1			954×10^4	1345×10^4	45	0.0171	1.0
97. 8. 1 ~ 8.22	2	23.8 ~ 30.6	27.2	182×10^4	401×10^4	45	0.0543	1.0
97.10. 9 ~ 97.10.21	1			1262×10^4	1867×10^4	50	0.0471	1.0
97.10. 9 ~ 97.10.23	2	15 ~ 18	16.5	1080×10^4	2145×10^4	50	0.0707	1.0
97.10. 9 ~ 97.10.26	3			1000×10^4	1962×10^4	50	0.0572	1.0

Table 5-2. Variation of cell density and volume of Chlorella with concentration

Harvesting day	Concentration (cell density(cell/ml) / volume(ton))						
	Initial	1st	2nd	3rd	4th	5th	6th
96. 2. 7	3120×10^4 30	934×10^5 10	2887×10^5 4	1384×10^6 1	477×10^7 0.3	1289×10^7 0.07	
96. 3. 20	2473×10^4 50	1230×10^5 12	661×10^6 4	1290×10^6 1.3	527×10^7 0.6	1223×10^7 0.2	
3. 25	2200×10^4 50	1016×10^5 13	377×10^6 4.5	1250×10^6 1.2	384×10^7 0.4	1218×10^7 0.11	
3. 29	2237×10^4 50	809×10^5 19	275×10^6 9.5	628×10^6 3	210×10^7 0.9	755×10^7 0.22	
96. 5. 30	2887×10^4 45	1307×10^5 19	2923×10^5 7	1073×10^6 2	460×10^7 0.55	1420×10^7 0.17	
6. 6	2390×10^4 44	903×10^5 16	2269×10^5 7	749×10^6 1.2	216×10^7 0.75	755×10^7 0.16	1233×10^7 0.042
6. 9	1660×10^4 43	640×10^5 16	1284×10^5 6.5	490×10^6 3	226×10^7 0.55	473×10^7 0.155	788×10^7 0.058
96. 7. 19	2006×10^4 50	1054×10^5 14	3310×10^5 4	1043×10^6 1	3069×10^6 0.35	1146×10^7 0.085	
10. 6	1319×10^4 45	411×10^5 12	1205×10^5 3.5	505×10^6 0.9	1688×10^6 0.28	630×10^7 0.075	

Table 5-2. continued

Harvesting day	Concentration (cell density(cell/mL) / volume(ton))						
	Initial	1st	2nd	3rd	4th	5th	6th
96. 12. 12	2581×10^4 45	870×10^5 12	2090×10^5 4	1906×10^6 0.45	434×10^7 0.185		
12. 14	2156×10^4 45	635×10^5 16	1029×10^5 4.6	679×10^6 1.5	2538×10^6 0.42	1288×10^7 0.084	
12. 16	2124×10^4 45	646×10^5 14.5	1744×10^5 5.4	670×10^6 1.5	1963×10^6 0.45	825×10^7 0.1	
97. 2. 19	2258×10^4 42	758×10^5 12	2874×10^5 4.3	1121×10^6 1.8	259×10^7 0.53	874×10^7 0.25	1163×10^7 0.07
2. 24	2280×10^4 43	879×10^5 12	2516×10^5 4.8	1159×10^6 2.2	199×10^7 0.68	756×10^7 0.29	1723×10^7 0.078
2. 27	2846×10^4 42	1138×10^5 12	4514×10^5 3.7	2158×10^6 0.98	505×10^7 0.49	1660×10^7 0.47	
97. 5. 9	2780×10^4 43	1475×10^5 12	4775×10^5 5	1531×10^6 2.3	560×10^7 1.8	1712×10^7 0.45	253×10^8 0.041
5. 4	2570×10^4 43	1624×10^5 13	2313×10^5 4.3	1365×10^6 1.2	868×10^7 0.25	1151×10^7 0.07	265×10^8 0.032
4. 30	2573×10^4 42	908×10^5 11.6	4125×10^5 4.5	1525×10^6 1.9	746×10^7 0.57	1844×10^7 0.072	261×10^8 0.03

Table 5-2. continued

Harvesting day	Concentration (cell density(cell/mL) / volume(ton))							
	Initial	1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	7th
97. 8. 20	$\frac{1345 \times 10^4}{53}$	$\frac{335 \times 10^5}{14.2}$	$\frac{1764 \times 10^5}{3.9}$	$\frac{586 \times 10^6}{0.7}$	$\frac{2026 \times 10^6}{0.35}$	$\frac{506 \times 10^7}{0.055}$	$\frac{1463 \times 10^7}{0.031}$	
8. 23	$\frac{401 \times 10^4}{45}$	$\frac{216 \times 10^5}{16}$	$\frac{544 \times 10^5}{6.5}$	$\frac{156 \times 10^6}{2.7}$	$\frac{320 \times 10^6}{0.99}$	$\frac{147 \times 10^7}{0.39}$	$\frac{570 \times 10^7}{0.077}$	$\frac{239 \times 10^8}{0.022}$
97. 9. 15	$\frac{1289 \times 10^4}{98}$	$\frac{475 \times 10^5}{20.3}$	$\frac{1293 \times 10^5}{12.6}$	$\frac{488 \times 10^6}{3.4}$	$\frac{1730 \times 10^6}{0.68}$	$\frac{766 \times 10^7}{0.28}$	$\frac{186 \times 10^8}{0.044}$	
9. 20	$\frac{1813 \times 10^4}{75}$	$\frac{668 \times 10^5}{16.1}$	$\frac{1590 \times 10^5}{4.3}$	$\frac{736 \times 10^6}{1.5}$	$\frac{360 \times 10^7}{0.37}$	$\frac{791 \times 10^7}{0.083}$	$\frac{178 \times 10^8}{0.03}$	
97. 9. 24	$\frac{1725 \times 10^4}{47}$	$\frac{716 \times 10^5}{13.5}$	$\frac{1333 \times 10^5}{3.8}$	$\frac{530 \times 10^6}{1.2}$	$\frac{240 \times 10^7}{0.38}$	$\frac{464 \times 10^7}{0.08}$	$\frac{177 \times 10^8}{0.021}$	
97. 9. 26	$\frac{2868 \times 10^4}{45}$	$\frac{1315 \times 10^5}{11}$	$\frac{2794 \times 10^5}{3.5}$	$\frac{1039 \times 10^6}{0.7}$	$\frac{510 \times 10^7}{0.18}$	$\frac{151 \times 10^8}{0.038}$		

농축 회수에 따른 농축량의 변화를 보면 Table 5-3과 같다. 각 농축 회마다의 용량의 평균 변화를 보면 22 ~ 46% 범위였다. 또 각 농축 회마다의 용량 변화를 24회의 평균값을 구해보면 28 ~ 36% 범위로서 평균 31.2%로 나타났다. 이와 같은 결과

Table 5-3. Variation of volume in percent by concentration number

No.	Concentration No.							Mean
	1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	7th	
1	33	40	25	30	23			3.33
2	24	33	32	46	33			33.86
3	26	35	27	33	28			29.62
4	38	50	31	30	24			34.81
5	42	37	29	28	31			33.21
6	36	44	17	62	21	26		34.56
7	37	41	46	18	28	37		34.65
8	28	29	25	35	24			28.17
9	27	29	26	31	27			27.89
10	27	33	11	41				22.47
11	26	29	33	28	20			28.98
12	32	37	28	30	22			29.89
13	29	36	42	29	47	28		35.15
14	28	40	46	31	43	27		35.70
15	29	31	26	50	96			46.36
16	28	42	46	78	25	9.1		37.99
17	30	33	28	21	28	46		30.96
18	28	39	42	30	13	46		32.85
19	27	27	18	50	16	56		32.38
20	36	41	42	37	39	20	29	34.59
21	21	62	27	20	41	16		31.11
22	21	27	35	25	22	36		27.72
23	29	28	32	32	21	26		27.90
24	24	32	20	26	21			24.62
Mean	29.78	36.39	30.55	35.05	28.94	31.12	28.57	31.49

를 볼 때 separator로 농축한 경우 농축횟수에 따른 용량의 감소는 약 68%인 것으로 판단된다.

이와 같은 기본 자료를 이용하여 농축회수에 따른 세포밀도의 농축정도를 분석해보면 Fig. 5-1과 같다. Fig. 5-1의 24회에 걸친 모든 자료를 이와 같이 최초 세포농도에 따라 농축횟수에 따른 농축밀도의 정도는 다소 차이가 있었다. 24회에 걸쳐 농축횟수에 따른 농도의 변화를 계산한 지수식의 기울기 값을 평균하면 1.1974로 나타났다. 따라서 $Y=ae^{1.1974x}$ 의 지수식을 기준으로 최초 세포농도 a값을 대입하면 농축횟수(x)에 따른 세포밀도를 계산할 수 있다. 농축 시작시 세포농도를 대입하면 각 농축 회수 때마다 농축된 세포밀도를 파악할 수 있고 평균 30%의 농축율을 고려하면 농축 Chlorella의 양과 농도를 조절할 수 있다.

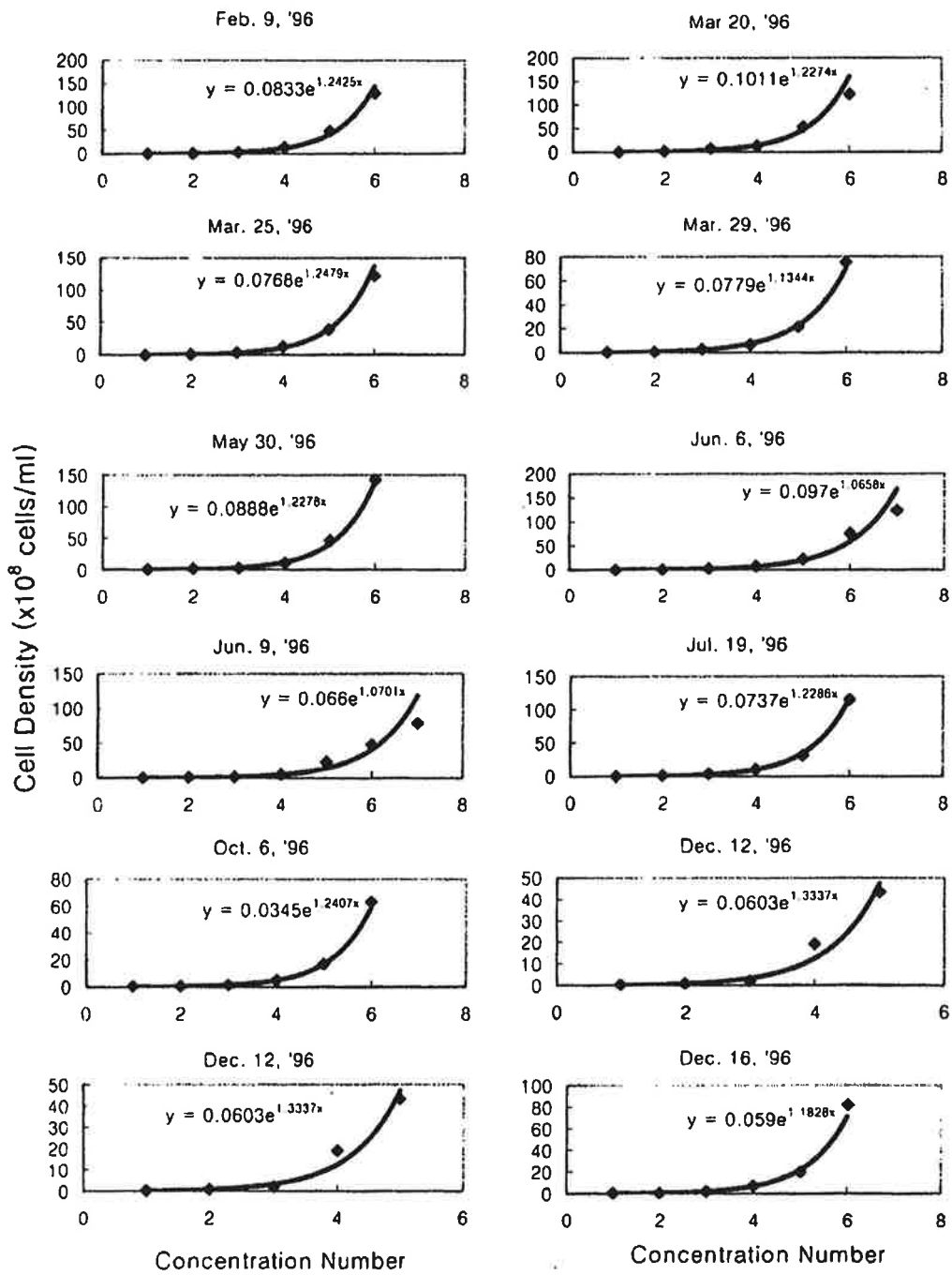


Fig. 5-1. Variation of equation between concentration number and cell density with different initial densities.

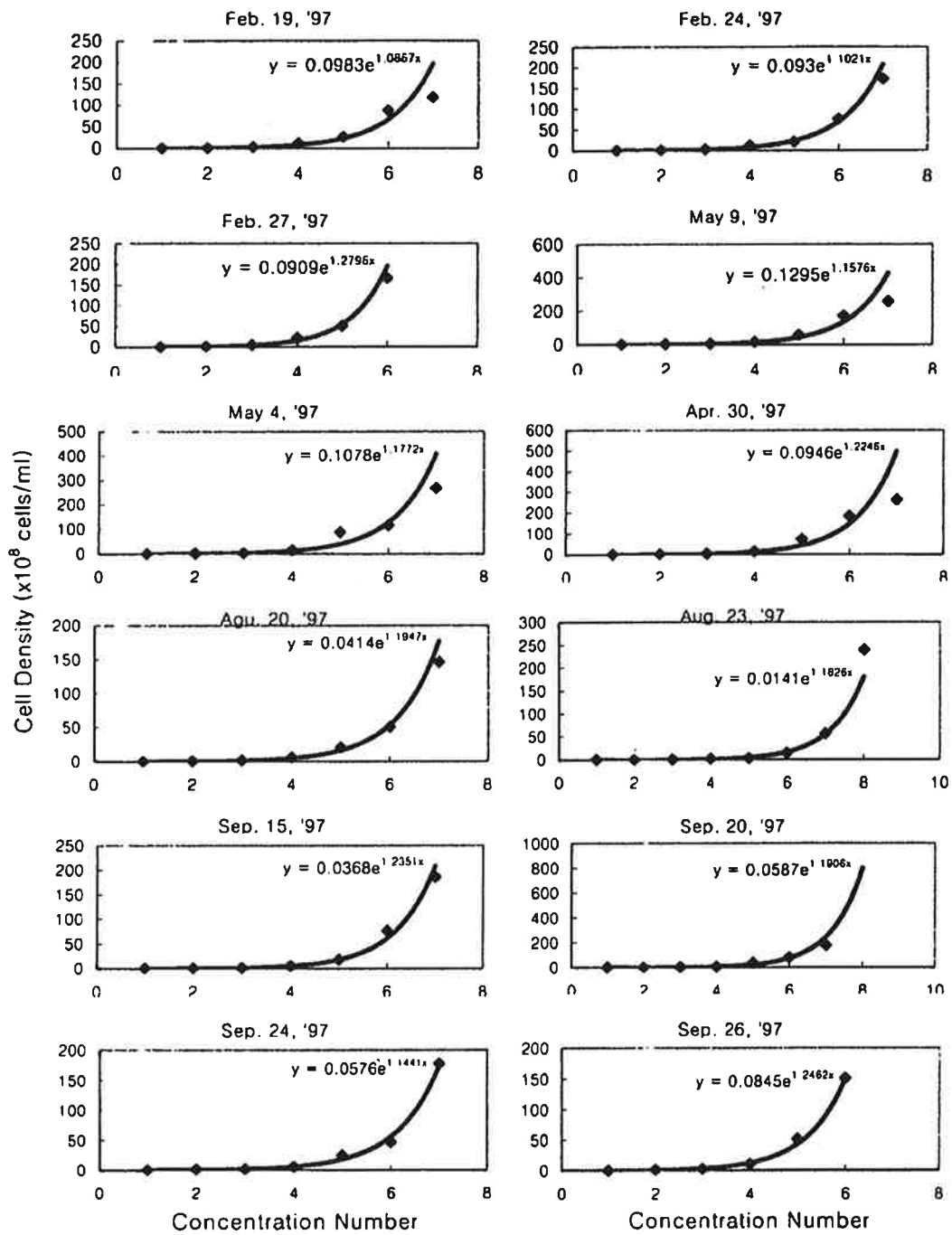


Fig. 5-1. continued

가. 10일 경과 후 저장 온도와 저장밀도에 따른 성장

온도와 밀도가 각각 다른 저장환경에서 10일 경과 후 배양한 성장 결과는 Table 6-1, Fig. 6-1, 6-2, 6-3, 6-4, 6-5와 같다. 1g/ml의 밀도로 저장온도 20℃, 4℃, 0℃, -35℃에서 저장한 농축 *Chlorella*의 7일간의 온도별 성장은 20℃에서 저장한 실험구의 s.g.r.이 가장 높은 0.9934로 나타났다. -35℃에 저장된 농축 *Chlorella*는 성장이 전혀 보이지 않았다. 4℃와 0℃에서 저장한 *Chlorella*를 비교하면 4℃에서 저장한 농축 *Chlorella*가 0℃에서 저장한 *Chlorella*보다 초기성장 및 s.g.r. 값이 높은 값으로 나타났다.

1g/5ml의 밀도로 저장온도 20℃, 4℃, 0℃, -35℃에서 10일간 저장한 농축 *Chlorella*의 7일간 온도별 성장은 1g/ml의 밀도에서와 마찬가지로 20℃에서 저장한 실험구의 s.g.r.이 가장 높은 0.9534로 나타났다. -35℃에 저장된 농축 *Chlorella*는 성장이 보이지 않았다. 4℃와 0℃에서 저장한 *Chlorella*를 비교하면 4℃에서 저장한 농축 *Chlorella*의 s.g.r.이 0℃에서 저장한 *Chlorella*보다 높게 나타났다.

1g/10ml의 밀도로 저장온도 20℃, 4℃, 0℃, -35℃에서 10일간 저장한 농축 *Chlorella*의 7일간 온도별 성장은 4℃에서 저장한 실험구의 초기성장 및 s.g.r.이 가장 높은 0.9580으로 나타났다. 20℃와 0℃의 실험구는 4℃에서 저장한 실험구와는 큰 성장차이를 보이지 않았다. -35℃에 저장한 농축 *Chlorella*는 성장이 보이지 않았다.

1g/20ml의 밀도로 저장온도 20℃, 4℃, 0℃, -35℃에서 10일간 저장한 농축 *Chlorella*의 7일간 온도별 성장은 4℃에 저장한 실험구의 s.g.r.이 가장 높은 0.9658로 나타났다. 초기 성장은 20℃와 0℃가 높았으나 배양 6일째부터 4℃의 성장이 높았다. -35℃에 저장한 농축 *Chlorella*는 성장이 보이지 않았다.

1g/30ml의 밀도로 저장온도 20℃, 4℃, 0℃, -35℃에서 10일간 저장한 농축 *Chlorella*의 7일간 온도별 성장은 20℃에서 저장한 실험구의 초기성장 및 s.g.r.이 가장 높은 0.9697로 나타났다. 4℃와 0℃에 저장한 농축 *Chlorella*는 초기 성장과 s.g.r.에 있어서 차이를 나타내지 않았다. -35℃에 저장한 농축 *Chlorella*는 성장을 보이지

Table 6-1. Growth of concentrated *Chlorella* preserved under different temperature and density for 10days

(unit: x 10⁴cells/ml)

Storage vol.	Storage temp. (°C)	Culture days								s.g.r
		0	1	2	3	4	5	6	7	
1g/ml	20	20	41	74	252	1483	1890	2406	2479	0.9934
	4	20	41	89	431	1141	1684	1750	1895	0.9380
	0	20	20	75	344	968	1561	1654	1795	0.9269
	-35	20	8	16	11	12	14	13	14	-0.0772
1g/5ml	20	20	25	60	207	1085	1505	1990	2041	0.9534
	4	20	30	75	309	1020	1860	1884	2001	0.9493
	0	20	25	64	317	1060	1354	1636	1938	0.9426
	-35	20	12	11	9	13	13	10	12	-0.1053
1g/10ml	20	20	21	33	192	719	1655	1899	1938	0.9426
	4	20	38	81	399	1085	1705	1876	2088	0.9580
	0	20	28	72	250	930	1430	2034	2075	0.9567
	-35	20	9	10	10	9	10	5	7	-0.2164
1g/20ml	20	20	45	110	423	1469	1494	1789	1878	0.9361
	4	20	29	90	412	1118	1381	1978	2169	0.9658
	0	20	58	118	580	1431	1620	1840	1930	0.9418
	-35	20	13	12	13	10	10	5	4	-0.3592
1g/30ml	20	20	27	84	283	1035	1629	2073	2210	0.9697
	4	20	35	93	465	1229	1659	1771	1993	0.9484
	0	20	34	78	345	1051	1661	1773	1988	0.9479
	-35	20	10	14	6	7	10	9	7	-0.2091
control		20	25	38	286	1248	1496	1838	2320	0.9797

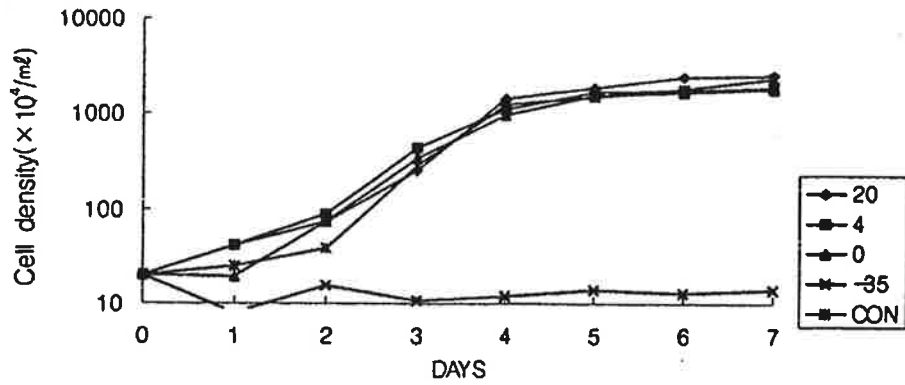


Fig. 6-1. Growth of concentrated *Chlorella* preserved under different temperature of 1g/ml density for 10days.

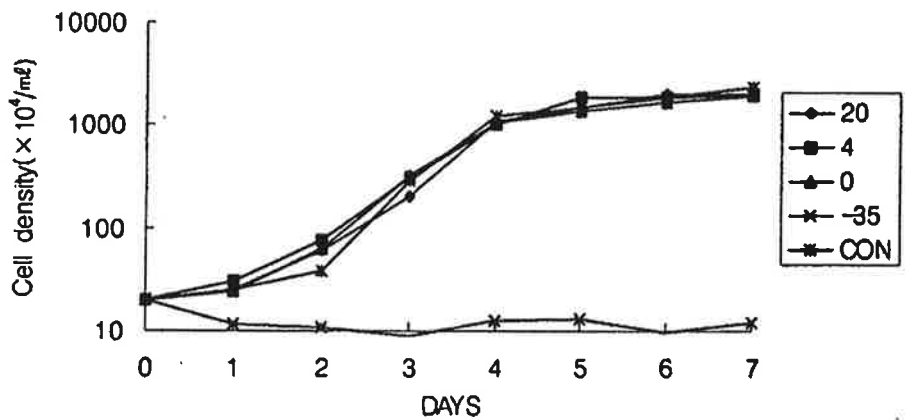


Fig. 6-2. Growth of concentrated *Chlorella* preserved under different temperature of 1g/5ml density for 10days.

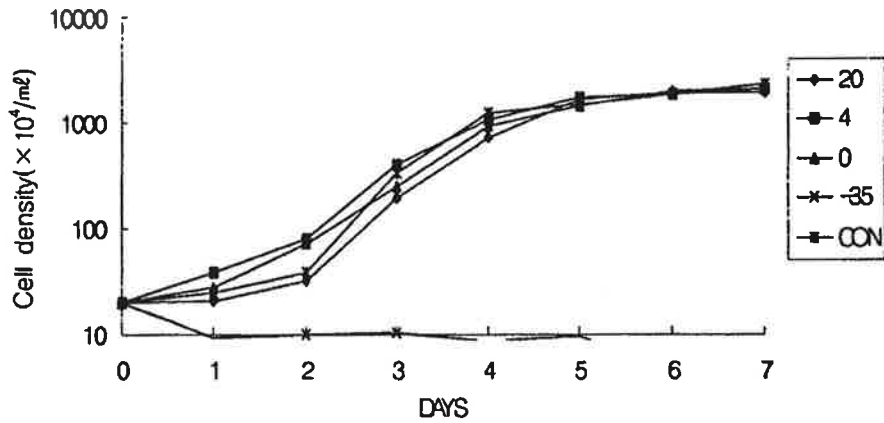


Fig. 6-3. Growth of concentrated *Chlorella* preserved under different temperature of 1g/10ml density for 10days.

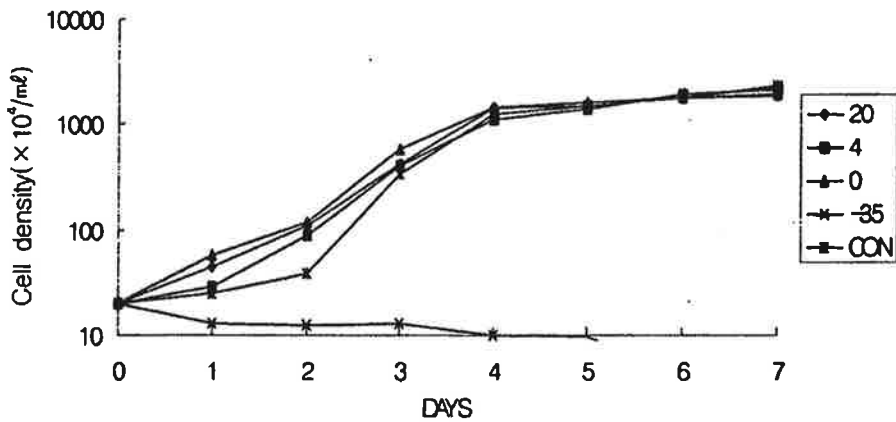


Fig. 6-4. Growth of concentrated *Chlorella* preserved under different temperature of 1g/20ml density for 10days.

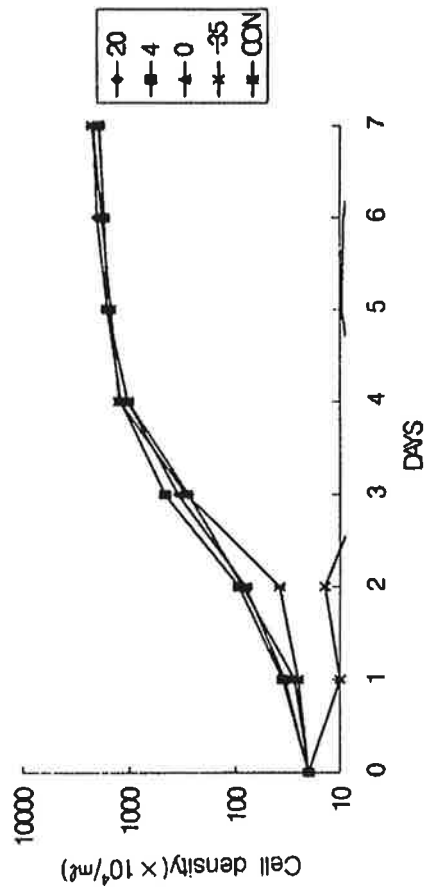


Fig. 6-5. Growth of concentrated *Chlorella* preserved under different temperature of 1g/30ml density for 10days.

않았다. 10일간 저장밀도와 저장온도가 다른 실험구는 대조구에 비해 모두 낮은 성장을 나타내었다. 저장밀도에 따라서는 성장의 차이를 나타내지 않았다.

나. 20일 경과 후 저장온도와 저장밀도에 따른 성장

온도와 밀도가 각각 다른 저장 환경에서 20일 경과 후 배양한 농축 *Chlorella*의 성장 결과는 Table 6-2, Fig. 6-6, 6-7, 6-8, 6-9, 6-10과 같다.

1g/ml의 밀도로 저장온도 20℃, 4℃, 0℃, -35℃에서 20일간 저장한 농축 *Chlorella*의 7일간의 온도별 성장은 0℃에서 가장 높은 s.g.r.인 0.9673으로 나타났으나, 20℃ 및 0℃와는 서로 다른 성장의 차이는 나타나지 않았고 비슷한 성장을 보였다. 1g/5ml의 밀도로 저장온도 20℃, 4℃, 0℃, -35℃에서 20일간 저장한 농축 *Chlorella*의 7일간의 온도별 성장은 0℃에서 가장 높은 s.g.r.인 0.9643으로 나타났다. 20℃와 4℃에 저장한 실험구는 비슷한 s.g.r.를 나타내었다. 1g/10ml의 밀도로 저장온도 20℃, 5℃, 0℃, -35℃에서 20일간 저장한 농축 *Chlorella*의 7일간 온도별 성장은 0℃에서 가장 높은 s.g.r.인 0.9551로 나타났으나 20℃, 4℃에 저장한 실험구와 비슷한 성장을 나타냈다. 1g/20ml의 밀도로 저장온도 20℃, 4℃, 0℃, -35℃에서 20일간 저장한 농축 *Chlorella*의 7일간 온도별 성장은 4℃에서 가장 높은 s.g.r.인 0.9630으로 나타났으나 20℃, 0℃에 저장한 실험구와 비슷한 성장을 나타냈다.

1g/30ml의 밀도와 저장온도 20℃, 5℃, 0℃, -35℃에서 20일간 저장한 농축 *Chlorella*의 7일간 온도별 성장은 20℃에서 가장 높은 s.g.r.인 0.9621로 나타났다. 4℃와 0℃에 저장한 실험구는 비슷한 s.g.r.을 나타냈다. 모든 밀도구간에서 -35℃에 저장한 농축 *Chlorella*는 성장을 나타내지 않았다. 20일간 저장온도와 저장밀도가 다른 실험구는 대조구에 비해 초기성장은 낮았으나 s.g.r.은 대조구의 값인 0.8142보다 모두 높은 값을 보였다. 저장밀도에 따라서는 성장의 차이를 나타내지 않았다.

Table 6-2. Growth of concentrated *Chlorella* preserved under different temperature and density for 20days

(unit: x 10⁴cells/ml)

Storage vol.	Storage temp. (°C)	Culture days								s.g.r
		0	1	2	3	4	5	6	7	
1g/ml	20	20	30	61	212	1236	1668	1863	2041	0.9534
	4	20	27	75	327	1208	1581	1893	2099	0.9591
	0	20	25	53	276	1349	1725	1846	2184	0.9673
	-35	20	16	14	15	13	11	13	11	-0.1186
1g/5ml	20	20	28	43	199	1080	1611	1928	1975	0.9466
	4	20	26	64	302	1205	1576	1745	1958	0.9447
	0	20	23	54	252	1376	1455	1960	2153	0.9643
	-35	20	19	16	17	20	23	24	21	0.0101
1g/10ml	20	20	25	44	224	1043	1521	1814	1933	0.9421
	4	20	26	57	273	1280	1568	1774	2025	0.9517
	0	20	24	55	261	1238	1366	1925	2059	0.9551
	-35	20	20	22	20	19	14	15	17	-0.0396
1g/20ml	20	20	29	66	264	1253	1676	1820	2069	0.9561
	4	20	32	77	339	1330	1460	1923	2139	0.9630
	0	20	38	84	435	1420	1555	1755	2128	0.9619
	-35	20	22	23	19	18	18	21	20	0.0026
1g/30ml	20	20	25	56	235	1181	1630	1959	2130	0.9621
	4	20	32	77	289	1280	1558	1764	1986	0.9477
	0	20	38	84	409	1414	1575	1723	1984	0.9475
	-35	20	20	18	17	17	18	20	18	-0.0275
control		20	36	170	407	873	885	954	1039	0.8142

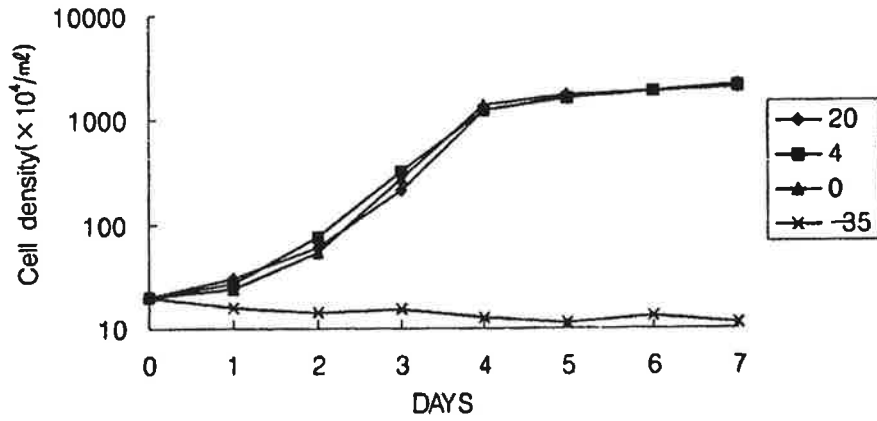


Fig. 7. Growth of concentrated *Chlorella* preserved under different temperature of 1g/ml density for 20days.

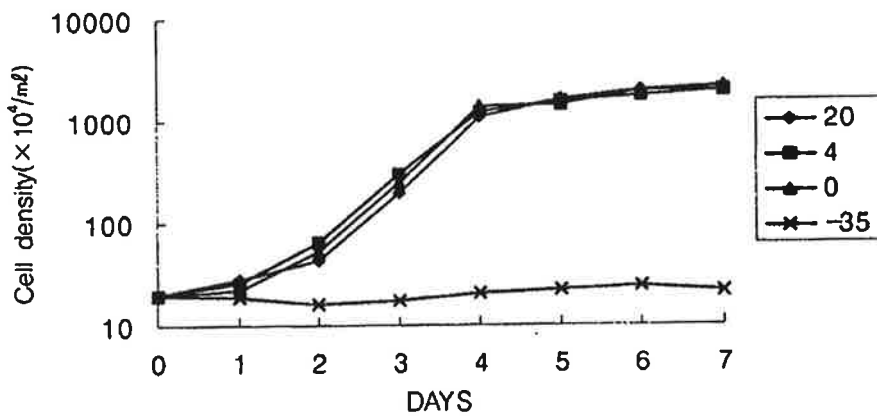


Fig. 6-7. Growth of concentrated *Chlorella* preserved under different temperature of 1g/5ml density for 20days.

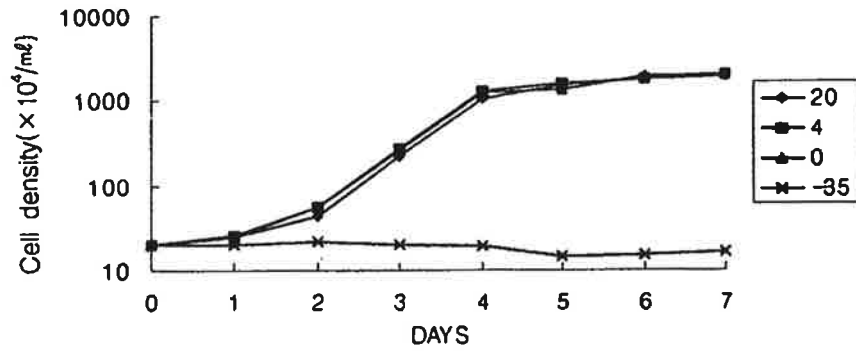


Fig. 6-8. Growth of concentrated *Chlorella* preserved under different temperature of 1g/10ml density for 20days.

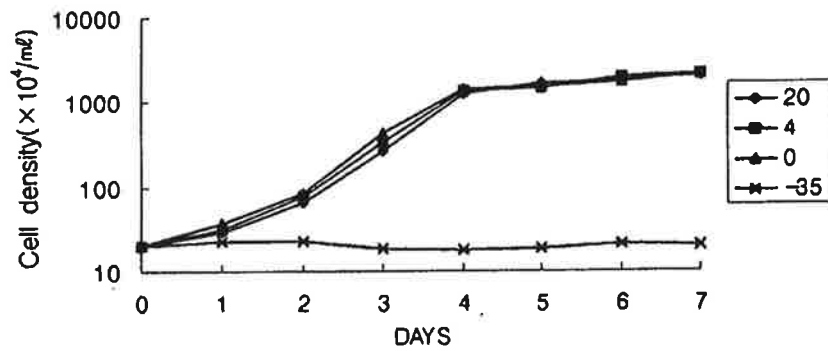


Fig. 6-9. Growth of concentrated *Chlorella* preserved under different temperature of 1g/20ml density for 10days.

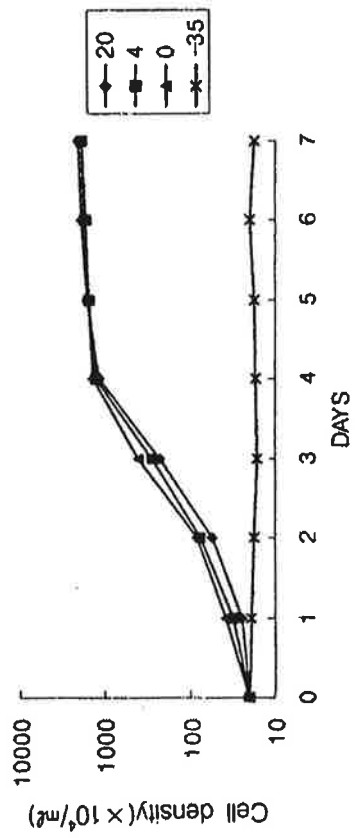


Fig. 6-10. Growth of concentrated *Chlorella* preserved under different temperature of 1g/ml density for 20days.

다. 30일 경과 후 저장온도와 밀도에 따른 성장
온도와 밀도가 각각 다른 저장환경에서 30일 경과 후 배양한 농축 *Chlorella*의 성장
결과는 Table 6-3, Fig. 6-11, 6-12, 6-13, 6-14, 6-15와 같다. 1g/ml의 밀도로 저장

Table 6-3. Growth of concentrated *Chlorella* preserved under different temperature and density for 30days

(unit: x 10⁴cells/ml)

Storage vol.	Storage temp. (°C)	Culture days								s.g.r
		0	1	2	3	4	5	6	7	
1g/ml	20	20	24	35	83	260	561	1018	1218	0.8468
	4	20	27	44	104	373	646	1010	1194	0.8428
	0	20	22	42	136	509	1033	1404	1585	0.9012
1g/5ml	20	20	25	35	82	245	674	1231	1330	0.8651
	4	20	25	40	100	322	636	891	1336	0.7826
	0	20	25	35	62	157	309	636	893	0.7828
1g/10ml	20	20	28	36	101	350	748	1044	1259	0.8538
	4	20	25	42	135	462	941	1210	1350	0.8681
	0	20	24	34	73	135	222	489	716	0.7375
1g/20ml	20	20	37	61	134	425	1034	1409	1707	0.9165
	4	20	23	58	171	537	1088	1386	1380	0.8727
	0	20	28	61	127	582	1169	1384	1551	0.8968
1g/30ml	20	20	23	35	71	165	220	639	1228	0.8487
	4	20	36	63	169	456	850	1231	1215	0.8464
	0	20	32	50	130	344	738	1348	1536	0.8948
control		20	21	38	150	548	1029	1248	1465	0.8850

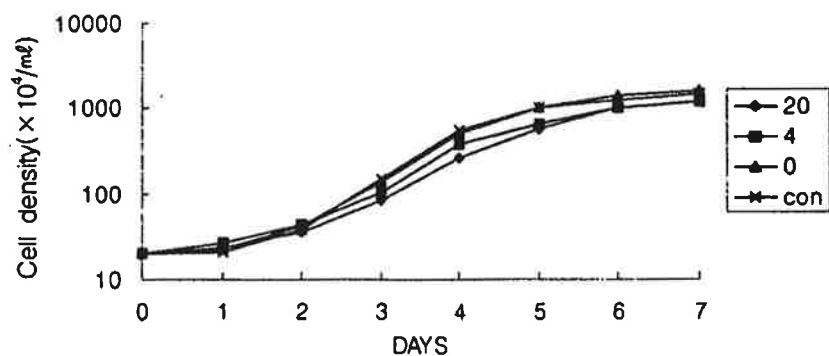


Fig. 6-11. Growth of concentrated *Chlorella* preserved under different temperature of 1g/ml density for 30days.

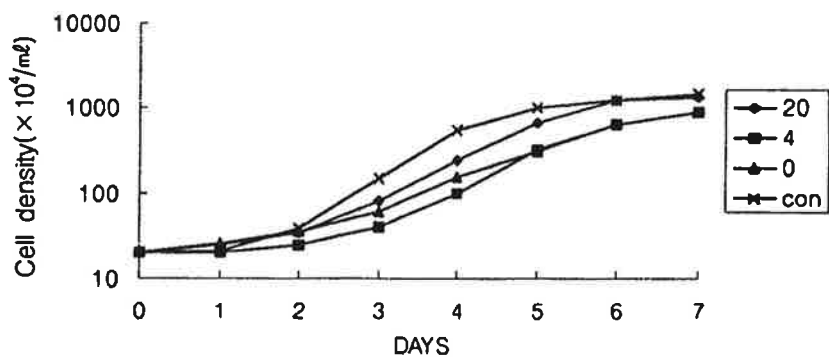


Fig. 6-12. Growth of concentrated *Chlorella* preserved under different temperature of 1g/5ml density for 30days.

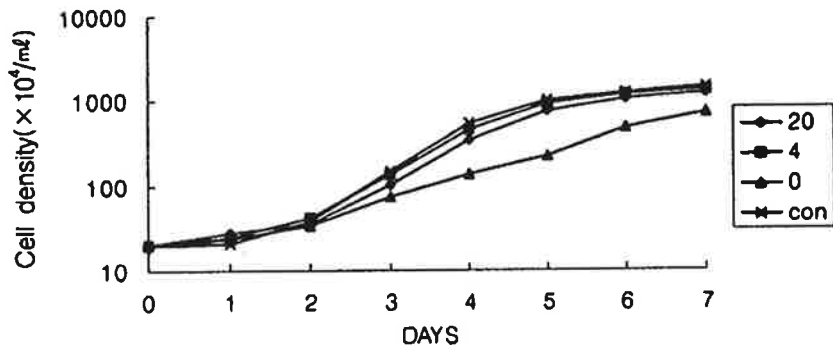


Fig. 6-13. Growth of concentrated *Chlorella* preserved under different temperature of 1g/ml density for 30days.

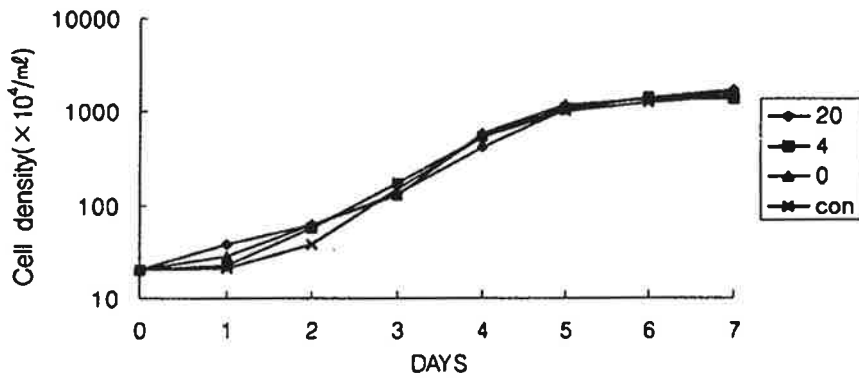


Fig. 6-14. Growth of concentrated *Chlorella* preserved under different temperature of 1g/20ml density for 30days.

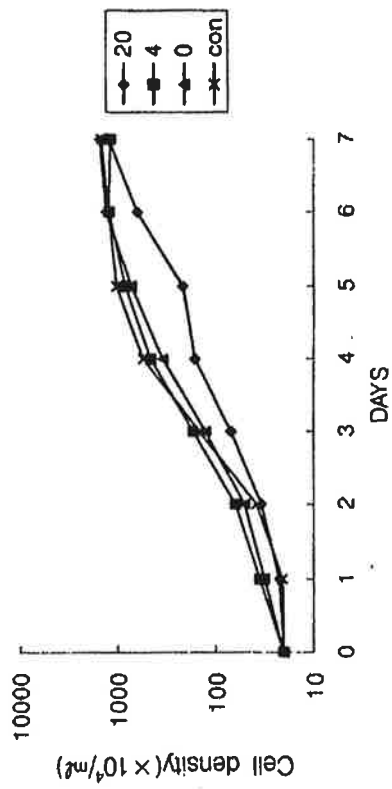


Fig. 6-15. Growth of concentrated *Chlorella* preserved under different temperature of 1g/30ml density for 30days.

온도 20℃, 4℃, 0℃에서 30일간 저장한 농축 *Chlorella*의 7일간 온도별 성장은 0℃에서 가장 높은 s.g.r.인 0.9012로 나타났다. 20℃와 4℃에 저장한 실험구는 비슷한 s.g.r.을 나타내었다.

1g/5ml의 밀도로 저장온도 20℃, 4℃, 0℃에서 30일간 저장한 농축 *Chlorella*의 7일간 온도별 성장은 20℃에서 가장 높은 s.g.r.인 0.8651로 나타났다. 4℃와 0℃에 저장한 실험구는 비슷한 s.g.r.을 나타내었다.

1g/10ml의 밀도로 저장온도 20℃, 4℃, 0℃에서 30일간 저장한 농축 *Chlorella*의 7일간 온도별 성장은 4℃에서 가장 높은 s.g.r.인 0.8681로 나타났다. 0℃에 저장한 실험구는 가장 낮은 s.g.r.인 0.7375를 나타냈다.

1g/20ml의 밀도로 저장온도 20℃, 4℃, 0℃에서 30일간 저장한 농축 *Chlorella*의 7일간 온도별 성장은 20℃에서 가장 높은 s.g.r.인 0.9165로 나타났으나 4℃와 0℃에 저장한 실험구와 비슷한 s.g.r.을 보였다.

1g/30ml의 밀도로 저장온도 20℃, 4℃, 0℃에서 30일간 저장한 농축 *Chlorella*의 7일간 온도별 성장은 0℃에서 가장 높은 s.g.r.인 0.8948로 나타났다. 20℃와 4℃에 저장한 실험구는 비슷한 s.g.r.을 보였다. 30일간 저장온도와 저장밀도가 다른 실험구는 대조구에 비해 초기성장은 낮았으나, s.g.r.은 비슷한 값을 나타냈다. 저장밀도에 따라서는 성장의 차이를 나타내지 않았다.

라. 저장기간에 따른 7일간 성장률

농축 *Chlorella*를 밀도와 온도를 달리하여 저장한 후 배양하였을 경우 저장기간별 7일간 s.g.r.은 Fig. 6-16, 6-17, 6-18, 6-19, 6-20과 같다. Fig. 6-16, 6-17, 6-18, 6-19, 6-20에서 보는 바와 같이 농축 *Chlorella*를 저장 밀도와 온도를 달리하여 10, 20, 30일 저장한 *Chlorella*를 배양하였을 경우 7일간의 s.g.r.은 저장기간이 경과할수록 낮은 값을 보이는데, 저장 10일, 20일째까지는 성장의 차이를 보이지 않았으나 30일째부터는 s.g.r. 값이 낮아졌다.

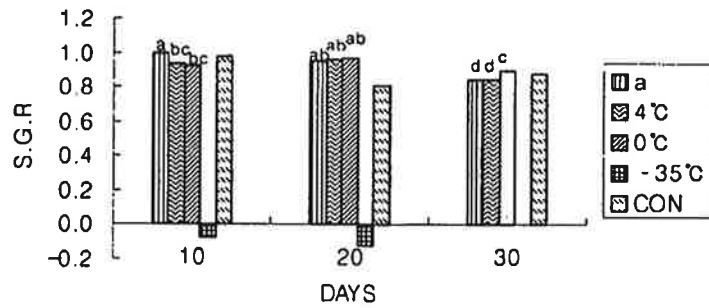


Fig. 6-16. Specific growth rate of concentrated *Chlorella* preserved under different temperature of 1g/ml density for 7 days.

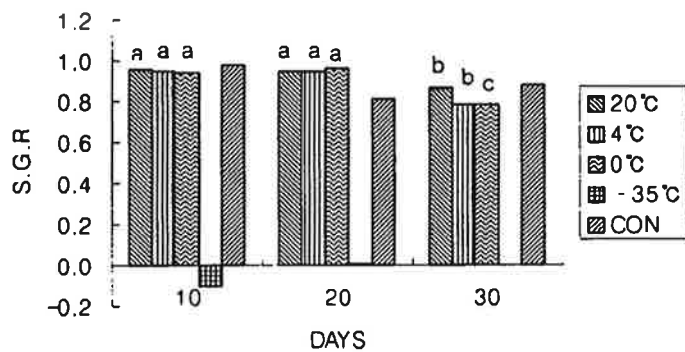


Fig. 6-17. Specific growth rate of concentrated *Chlorella* preserved under different temperature of 1g/5ml density for 7 days.

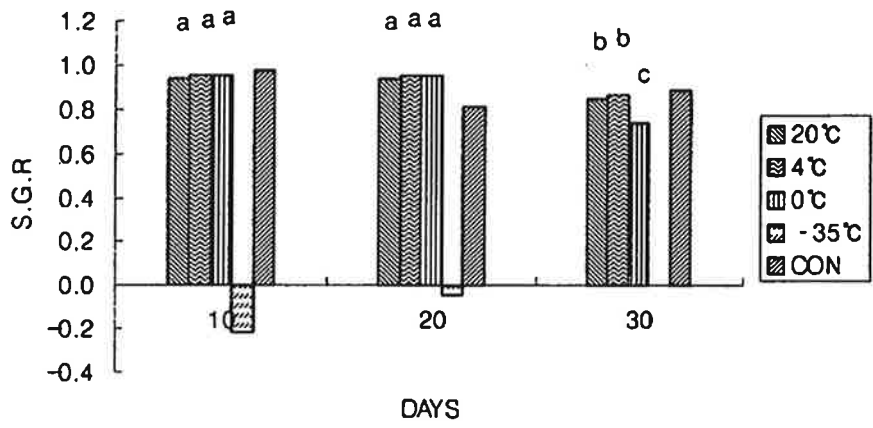


Fig. 6-18. Specific growth rate of concentrated *Chlorella* preserved under different temperature of 1g/10ml density for 7 days.

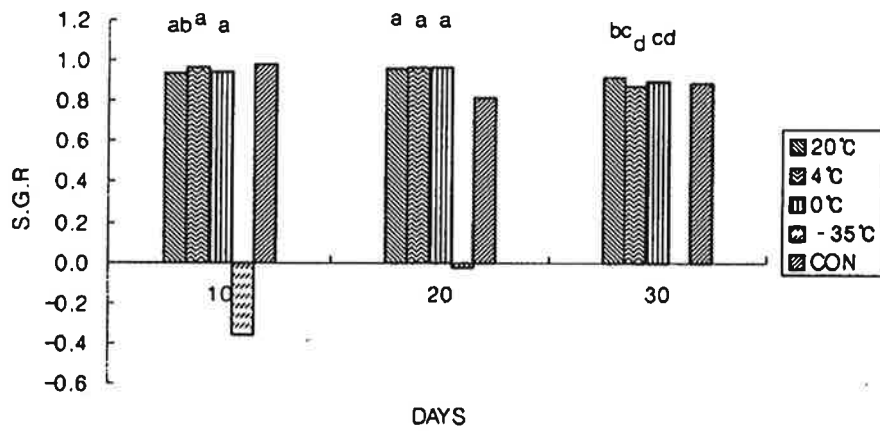


Fig. 6-19. Specific growth rate of concentrated *Chlorella* preserved under different temperature of 1g/20ml density for 7 days.

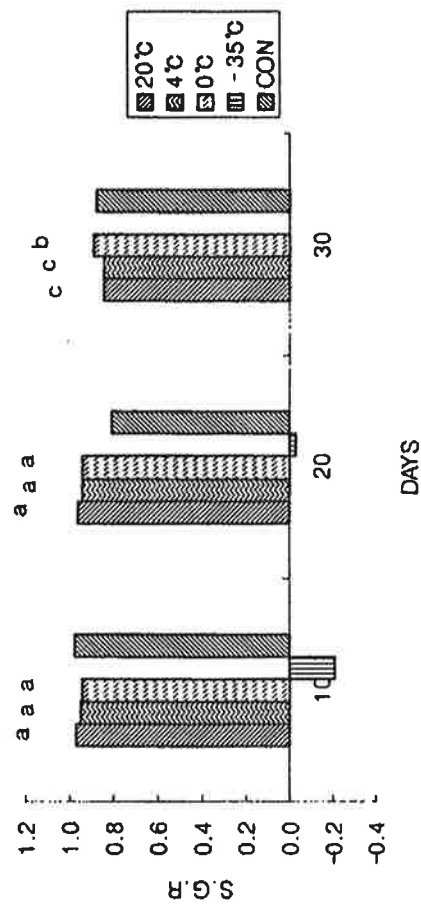


Fig. 6-20. Specific growth rate of concentrated *Chlorella* preserved under different temperature of 1g/30ml density for 7 days.

제 2 절 장기보관에 따른 성장

가. 저장밀도에 따른 성장

50톤까지 옥외에서 대량배양한 *Chlorella*를 원심분리하여 밀도별로 저장하였는데 원심분리를 하지 않은 실험구의 밀도는 $2.846 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ (A)이고, 1차 원심분리한 것의 밀도는 $1.138 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ (B)이며, 2차 원심분리한 것의 밀도는 $4.514 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ (C)이고, 3차 원심분리한 것은 $2.158 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ (D)이며, 4차 원심분리한 것은 $5.056 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ (E)이고, 5차 원심분리한 밀도는 $1.660 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ (F)였다. A, B, C, D, E, F 밀도 실험구는 250ml 용기 100ml씩 2개를 2℃ 냉장고에 보관하였다. 밀도를 달리하여 저장된 *Chlorella* 농축액을 1, 2, 3, 4, 5, 6개월 경과 후 각각 배지에 접종하여 7일간 성장을 측정하였다.

성장 측정시 접종 밀도는 10^5 cells/ml , 250ml 삼각플라스크에 100ml 용량의 배지를 넣어 접종하였고, 배양은 f/2 배지에 25℃, 30‰, 5,000 lux의 환경에서 하였다.

Table 6-4. Specific growth rate of *Chlorella* kept in different densities and periods in month

Month	Specific growth rate					
	A	B	C	D	E	F
1	0.4552	0.444	0.4503	0.4353	0.4285	0.4171
2	0.4449	0.4395	0.4303	0.4226	0.4159	0.4017
3	0.4290	0.4386	0.4042	0.4125	0.4064	0.3713
4	0.4396	0.4297	0.4213	0.4134	0.3998	0.3489
5	0.4129	0.4039	0.3947	0.3824	0.3624	0.3359
6	0.4008	0.3780	0.3723	0.3345	0.3167	0.2953

A: control($2.486 \times 10^4 \text{ cells/ml}$) B: 1st concentration($1.138 \times 10^5 \text{ cells/ml}$)
 C: 2nd concentration($4.514 \times 10^5 \text{ cells/ml}$) D: 3rd concentration($2.158 \times 10^6 \text{ cells/ml}$)
 E: 4th concentration($5.056 \times 10^6 \text{ cells/ml}$) F: 5th concentration($1.660 \times 10^7 \text{ cells/ml}$)

한편, 세포밀도를 달리한 농축 *Chlorella*의 성장률의 비교는 Table 6-4와 같다. 전체적으로 보아 밀도가 가장 낮은 A 실험구(대조구, $2,846 \times 10^4$ cells/ml)는 성장이 가장 높고 밀도가 가장 높은 F 실험구($1,660 \times 10^4$ cells/ml)는 성장이 가장 낮았으며 밀도가 높을수록 성장이 낮은 것으로 나타났다. 이와 같은 현상은 시간이 지날수록 뚜렷한 차이를 보이고 있어 6개월 보관시 F 실험구는 A 실험구에 비하여 약 73%의 성장률을 보였다(Fig. 6-21). 따라서 높은 밀도로 보관할수록 장기간 보관시 성장률은 감소함을 알 수 있었다.

나. 저장기간에 따른 성장

Separator로 5차에 걸쳐 농축한 밀도 166×10^8 cells/ml의 *Chlorella*를 10 l의 플라스틱 용기에 밀봉하여 2℃의 냉장고에 암흑상태로 저장하였다. 저장 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8개월 경과 후 10 l의 용기를 잘 흔들어 *Chlorella*를 채취하여 f/2 배지에 1×10^7 cells/ml의 밀도로 접종하여 7일간 성장을 측정하였다. 배양온도는 25℃였고, 조도는 5,000 lux로 2반복 실험을 실시하였다. 대조구는 옥외에서 배양 중인 동일 strain

Table 6-5. Specific growth rate of concentrated *Chlorella* kept at 2℃ in long term period.

Storage month	Experiment	Control
1	0.3959	0.4363
2	0.3544	0.4246
3	0.2947	0.4284
4	0.2907	0.4370
5	0.2531	0.4341
6	0.1927	0.4307
8	0.1447	0.4288

Chlorella 를 사용하였다. 저장 후 8개월까지 보관한 농축 *Chlorella*의 성장률 실험결과는 Table 6-5과 같다. 시간이 지날수록 실험구의 성장률은 감소하고 있다. 1개월 보관 후 성장률은 대조구의 약 91%에 달했으나 3개월, 6개월, 8개월이 지나면 성장률은 대조구의 69%, 45%, 34%의 수준으로 감소하였다. 따라서 가능하면 빠른 시일 안에 사용함이 효과적이다.

다. 장기 저장시 항생제 첨가 효과

밀도가 166×10^8 cells/ml되는 농축 *Chlorella*에 항생제인 OTC를 24% 함유하고 있는 옥시마이신(삼우화학공업 주식회사 제품)을 100ppm, 500ppm 첨가하였으며, 대조구는 항생제를 첨가하지 않은 실험구를 사용하였다. 3실험구의 저장은 250ml sample 병에 100ml씩 넣어 각각 2개를 2℃에 냉장보관 하였다. 항생제 첨가 농도를 달리하여 저장된 *Chlorella* 농축액을 1, 2, 3, 4, 5, 6개월 경과 후 각각 배지에 접종하여 7일간 성장을 측정하였다. 성장 측정시 접종밀도는 10^7 cells/ml, 250ml 삼각플라스크에 100ml 용량의 배지를 넣어 접종하였고, 배양은 f/2 배지에 25℃, 30%, 5,000 lux의 환경에서 하였다.

이와 같이 장기간 보관시의 성장률의 감소를 해결하기 위하여 옥시마이신을 첨가한 *Chlorella*의 성장률을 보면 Table 6-6과 같다. 3개월까지는 항생제를 처리한 것과 대조구가 큰 차이를 보이지 않았으나 4개월부터는 항생제 처리구의 성장률이 더 높았으며 100ppm보다는 500ppm에서 성장률이 더 양호했다. 6개월을 보관할 경우 100ppm이나 500ppm에서 보관한 *Chlorella*는 대조구의 성장에 비하여 1.14배, 1.22배 성장이 더 높았다.

이와 같은 결과를 볼 때 4개월 이상 장기간 보관후 사용할 농축 *Chlorella*는 항생제의 처리도 한 방법이 될 수 있을 것으로 판단된다.

Table 6-6. Specific growth rate of concentrated Chlorella with oximycin in long term period

Storage month	Oximycin(ppm)		
	0	100	500
1	0.4313	0.4417	0.4380
2	0.4209	0.4335	0.4314
3	0.4298	0.4224	0.4250
4	0.3375	0.3845	0.4079
5	0.3215	0.3504	0.3718
6	0.2944	0.3368	0.3596

여 백

제 7 장 농축 Chlorella 의 먹이 효율

제 1 절 Chlorella의 영양성분

1차적으로 Chlorella strain에 따른 영양성분을 조사하였다. 14 strain의 조단백, 지질, 회분을 조사한 결과는 Table 7-1과 같다. 조단백, 조지질의 함량이 가장 높은 strain은 KMCC- C-23로서 strain에 따라 큰 차이를 보였다. 또 일반적으로 조지질이 높은 4 strain을 대상으로 불포화지방산을 조사한 결과 n-3 불포화 지방산은 KMCC-C-27에서 36.3%로 가장 높았으며 EPA + DHA 함량 역시 KMCC-C-27에서 34.3%로 가장 높았다(Table 7-2). 이와 같이 Chlorella의 strain에 따라 영양가치는 큰 차이가 있었다.

한편, 일본산 농축 Chlorella와 본 실험에서 실험 제조한 Chlorella와의 일반 영양 분석의 결과는 Table 7-3과 같다. 일반적으로 본 실험에서 배양한 농축 Chlorella는 지질의 함량이 8.9%로 일본산에 비하여 다소 높았으며 일본산 제품 중에도 해수산인 Marine α 는 지질이 5.5%로 높았다. 태국산 Chlorella는 지질이 1.8%로 낮았다.

제 2 절 농축 Chlorella의 보관기간에 따른 먹이효율

1660×10^7 cells/ml 의 농도로 농축하여 보관한 해수산 Chlorella를 대상으로 보관 기간에 따른 먹이효율을 조사하였다. Chlorella의 보관은 2°C 냉장상태에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 개월 경과후 rotifer(*Brachionus plicatilis* L-type)에 공급하여 성장을 조사하였다. 대조구로는 옥외에서 배양한 Chlorella를 이용하여 성장을 비교하였다.

Table 7-1. Chemical composition of *Chlorella*

Strain No.	D.M.	Moist	Protein	Lipid	Ash
KMCC-C-11	88.58	11.42	17.42	3.84	49.42
KMCC-C-19	90.72	9.28	27.60	2.92	33.53
KMCC-C-20	92.07	7.93	26.30	5.55	30.21
KMCC-C-21	92.10	7.90	34.34	1.97	21.24
KMCC-C-22	91.31	8.69	27.77	3.95	26.97
KMCC-C-23	90.69	9.31	46.88	8.64	20.53
KMCC-C-24	91.37	8.63	28.34	4.42	29.58
KMCC-C-25	91.91	8.09	28.37	3.39	31.87
KMCC-C-26	93.96	6.04	20.74	4.27	39.17
KMCC-C-27	93.16	6.84	32.26	8.18	17.66
KMCC-C-28	94.43	5.57	20.41	4.40	33.91
KMCC-C-29	92.36	7.64	36.63	2.83	25.39
KMCC-C-30	93.07	6.93	33.99	4.29	19.74
KMCC-C-39	87.35	12.65	14.56	3.68	50.26

KMCC-C-11 *Chlorella* sp. ; KMCC-C-19 *C. stigmatophora* ; KMCC-C-20 *C. ellipsoidea*
 KMCC-C-21 *C. ellipsoidea* ; KMCC-C-22 *C. vulgaris* ; KMCC-C-23 *C. sp.*;
 KMCC-C-24 *C. sp.*; KMCC-C-25 *C. sp.*; KMCC-C-26 *C. sp.*; KMCC-C-27 *C. sp.* ;
 KMCC-C-28 *C. sp.*; KMCC-C-29 *C. sp.* ; KMCC-C-30 *C. sp.*; KMCC-C-39 *C. sp.*

Table 7-2. Fatty acid composition(% area) of Chlorella strain

Fatty acid	KMCC-C-20	KMCC-C-23	KMCC-C-24	KMCC-C-27
8:0	0.2	0.2	0.1	0.1
10:0	0.2	0.2	0.1	-
12:0	0.3	0.1	0.2	-
13:0	0.3	0.9	0.3	-
14:0	4.2	0.7	3.5	4.3
14:1n-1	0.2	0.9	0.3	0.3
15:1	-	-	0.1	0.1
16:0	24.3	19.7	26.9	19.4
16:1n-7	19.0	1.0	18.5	15.1
17:0	-	-	-	0.1
17:1	-	0.2	0.4	0.3
18:0	0.6	0.2	1.0	0.7
18:1	10.2	3.7	12.1	4.9
18:2n-6	5.7	15.4	4.9	2.9
18:3n-6	-	0.2	0.4	0.8
18:3n-3	0.2	22.2	0.2	0.2
18:4n-3	-	0.2	0.1	0.1
18:4n-6	-	-	-	-
19:1	0.5	-	-	-
20:0	-	-	0.1	0.2
20:1	-	-	-	-
20:2n-6	-	-	0.1	0.6
20:3n-6	0.5	-	0.4	0.3
20:3n-3	0.4	-	2.4	0.9
20:4n-6	3.1	-	-	3.7
20:4n-3	-	-	0.2	0.1
20:5n-3	19.2	-	18.8	33.8
22:0	-	-	0.2	1.0
22:1	-	-	-	0.3
22:2n-6	-	-	-	0.7
22:4n-3	-	-	-	0.1
22:5n-3	-	-	-	0.3
22:6n-3	-	-	-	0.5
Others	10.8	34.2	8.6	8.2
Saturated	30.1	22	32.3	24.8
Monoenes	30	5.81	31.4	20.7
Total n-3	19.8	22.4	21.6	36.3
Total n-6	9.3	15.6	5.95	9.94
n-3 HUFA	19.7	-	21.3	36.0
EPA+DHA	19.2	-	18.8	34.3

Table 7-3. Chemical composition of concentrated Chlorella of different products
(unit : %)

Product	Moisture	Protein	Lipid	Ash
Japanese				
Uni Chlorella	5.01	54.84	0.99	9.34
V12 (Samhae)	2.92	54.49	5.07	6.64
Fresh green 600	3.67	58.45	0.84	8.40
Marine α	1.18	41.13	5.22	34.22
Thailand strain	1.97	25.70	1.79	15.85
Present study	3.85	47.20	8.86	7.54

Rotifer는 25°C, 20%, 3,000 lux에서 배양하였고 접종농도는 50 개체/ml 로 250ml flask(100ml 분량)에서 7일간 배양하여 매일 성장량을 조사하였다(Table 7-4, Fig. 7-1).

Table 7-4. Specific growth rate of rotifer fed on concentrated Chlorella in different storage period

Storage period (month)	Specific growth rate	
	Experiment	Control
1	0.4627	0.5020
2	0.4133	0.5090
3	0.3566	0.4978
4	0.3368	0.4866
5	0.3117	0.4934
6	0.2452	0.4866
8	0.2314	0.4986

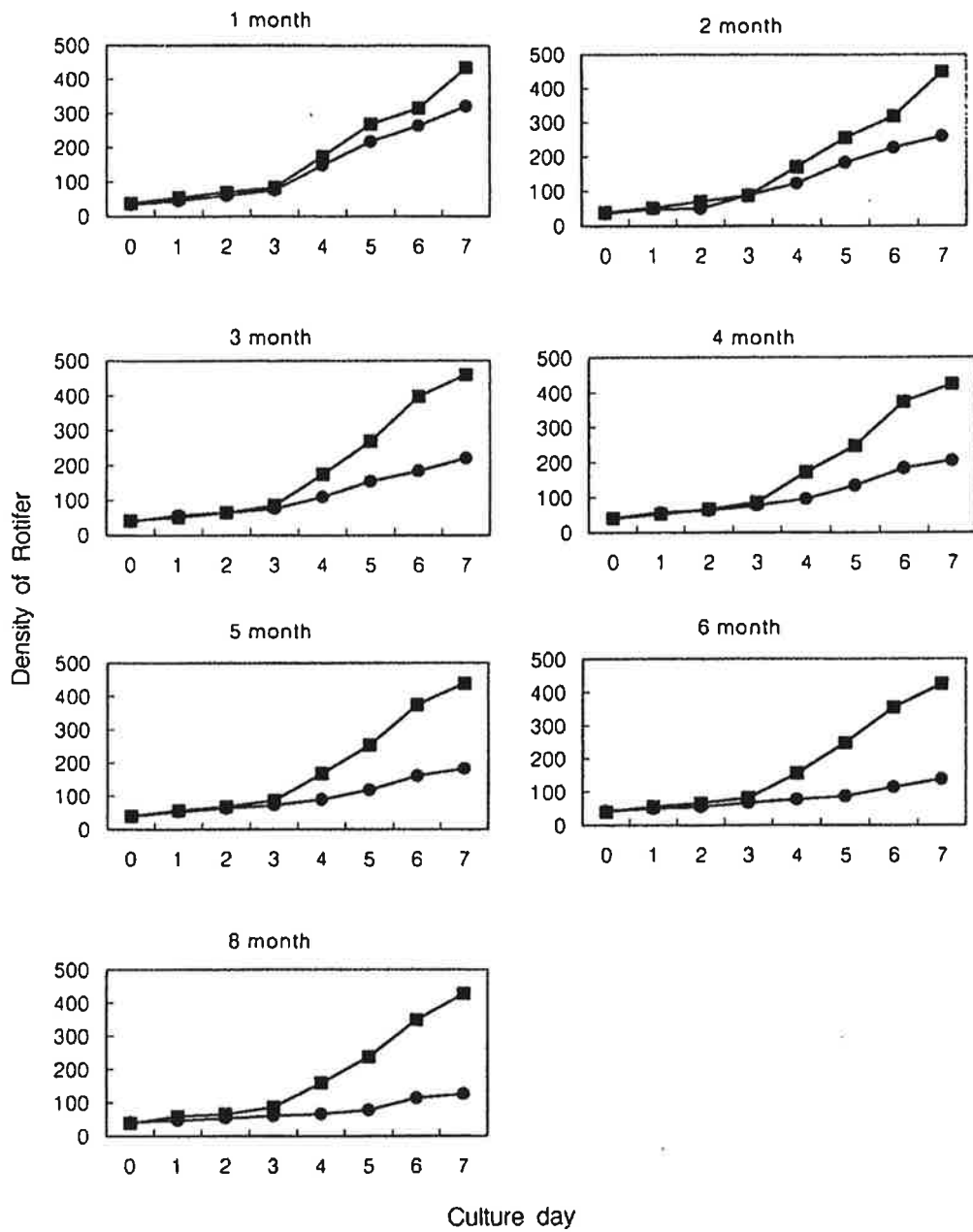


Fig. 7-1. Growth of rotifer fed concentrated *Chlorella* kept in different Months(■ : control, ● : concentrated *Chlorella*).

1개월 경과서의 Chlorella의 성장률을 보면 대조구의 92%의 성장률을 보였으나 3, 6, 8 개월로 시간이 경과함에 따라 실험구의 성장률은 대조구의 72%, 50% 46%로 감소하고 있다. 이와 같은 먹이효율의 결과를 볼 때 가능하면 빨리 소모하는 것이 효율적이다.

한편, 항생제(옥시마이신)를 첨가하여 보관한 농축 Chlorella를 대상으로 위와 동일한 방법으로 rotifer를 배양하여 대조구와 비교한 결과는 Table 7-5와 같다.

Table 7-5. Growth of rotifer fed concentrated Chlorella kept with oxymycin

Month	Specific growth rate		
	0 ppm	100 ppm	500 ppm
1	0.4445	0.4718	0.4885
4	0.3368	0.4562	-
5	0.3193	0.3244	0.3915
6	0.2922	0.2846	0.3552

100 ppm과 500 ppm으로 처리한 실험구는 처리하지 않은 대조구에 비해 rotifer의 성장률이 높았다. 500 ppm은 100 ppm 에 비하여 시간이 지날수록 더 높은 성장률을 보였다. 그러나 모든 실험구에서 시간이 지날수록 rotifer의 성장은 감소하였다. 그러나 100 ppm의 경우 5개월까지는 대조구에 비하여 효과가 있었으나 6개월에는 대조구와 차이가 없었다. 1개월 보관 후 100 ppm과 500 ppm에서 보관한 Chlorella의 먹이효율은 대조구에 비하여 6%, 10% 이상의 성장률을 보였으며 500 ppm의 항생제 처리하여 6개월 보관한 경우 대조구에 비하여 22%이상의 성장률을 보였다.

제 3 절 농축 Chlorella를 이용한 rotifer 성장

국산 농축 Chlorella는 본 실험에서 제작한 실험제품을 사용하였고 일본산 농축 Chlorella는 담수산 Chlorella를 재료로 이미 제품화된 Fresh green 600(クロレラ주식회사 제조, コエスシ주식회사 판매)을 사용하였다. 이들 농축 Chlorella의 먹이효율을 비교하기 위하여 L-type Rotifer (*Brachionus plicatilis*)를 실험대상종으로 하였다. 400 l FRP 사각 수조에 염분도 15‰의 여과해수를 350 l 담고 Rotifer를 10마리/ml의 농도로 접종하였으며 온도는 25℃로 유지하였다. 두 종류의 농축 Chlorella를 각각 20×10^4 cells/ml/day씩 공급하면서 매일 Rotifer의 개체수를 조사하고 이로부터 specific growth rate를 구하였다. 또한 Rotifer의 포란율과 평균포란수도 조사하였다. 실험은 2 반복구로 실시하였다.

가. Rotifer의 성장 비교

국산 농축 Chlorella와 일본산 농축 Chlorella 두 종류를 각각 먹인 rotifer의 수는 접종 후 5일까지 유사한 증가 경향을 보였다(Table 7-6, Fig. 7-2). 그러나, 6일째부터 국산 농축 Chlorella를 공급한 rotifer의 경우 급속히 증가되어 10일째 최대개체수가 182마리/ml로서 일본산 농축 Chlorella를 공급한 경우 9일째 98마리/ml보다 1.94배 많았다. 평균 specific growth rate도 국산 농축 Chlorella를 공급한 경우는 0.419로서 일본산 농축 Chlorella를 공급한 경우인 0.326보다 높게 나타났다.

나. Rotifer의 포란율과 평균포란수 조사

국산 농축 Chlorella와 일본산 농축 Chlorella 두 종류를 각각 먹인 rotifer의 포란율과 평균포란수는 3 ~ 4일 주기로 증감이 반복되면서 시간이 경과함에 따라 감소하였는데, 국산 농축 Chlorella를 공급한 경우의 포란율과 평균포란수가 일본산 농축 Chlorella를 공급한 경우보다 대체로 높았다(Table 7-6, Fig. 7-3). 국산 농축 Chlorella를 공급한 rotifer의 경우는 접종 후 2일과 5일째 39%로 최고의 포란율을 보였으며 일본산 농축 Chlorella를 공급한 경우에는 접종 1일 후 41%로 최고의 포란

Table 7-6. Growth and egg production of rotifer, *Brachionus plicatilis* L-type cultured for 11 days with different diets

Diets	Days from inoculation											
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Cell number (/ml)	KCC ¹ 10	16	19	44	46	68	102	126	149	151	182	182
	JCC ² 10	14	18	30	47	64	84	93	85	98	96	96
Percentage of egg-carrying rotifers (%)	KCC -	28	39	29	29	39	29	13	29	26	15	16
	JCC -	41	38	31	24	36	17	11	22	24	16	17
Number of eggs (/ind.)	KCC -	0.3	0.5	0.3	0.3	0.4	0.3	0.1	0.3	0.3	0.2	0.2
	JCC -	0.4	0.4	0.3	0.2	0.4	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2
Specific growth rate	KCC Average 0.419	0.678	0.248	1.074	0.202	0.564	0.585	0.305	0.242	0.019	0.269	0.000
	JCC Average 0.326	0.485	0.363	0.737	0.648	0.445	0.392	0.017	0.129	0.076	-0.030	0.000

¹ Concentrated *Chlorella ellipsoidea* made at Institute of Fisheries Science in Pukyung National University

² Fresh Green 600 made in Japan

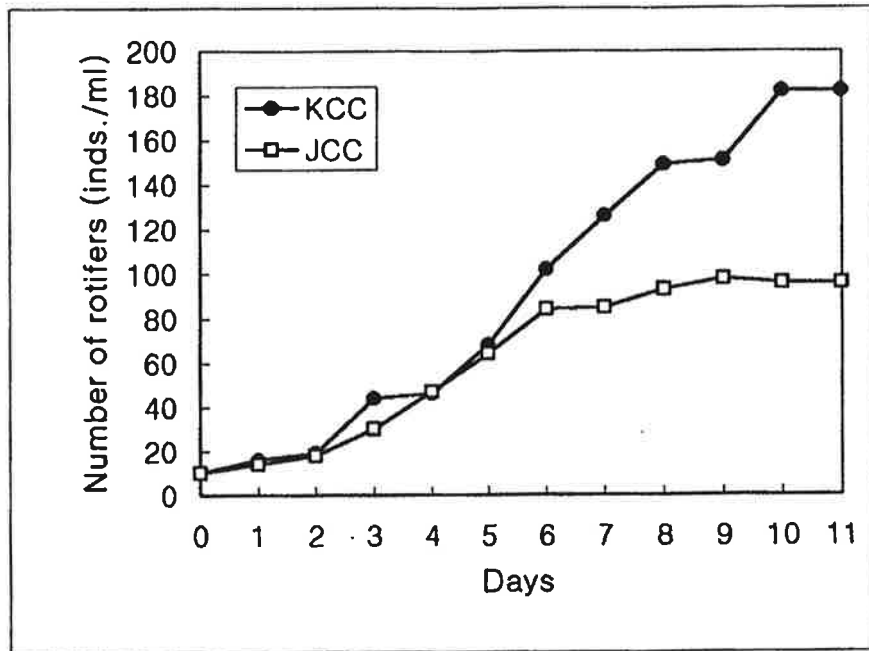


Fig. 7-2. Growth of rotifer, *Brachionus plicatilis* L-type with different diets.

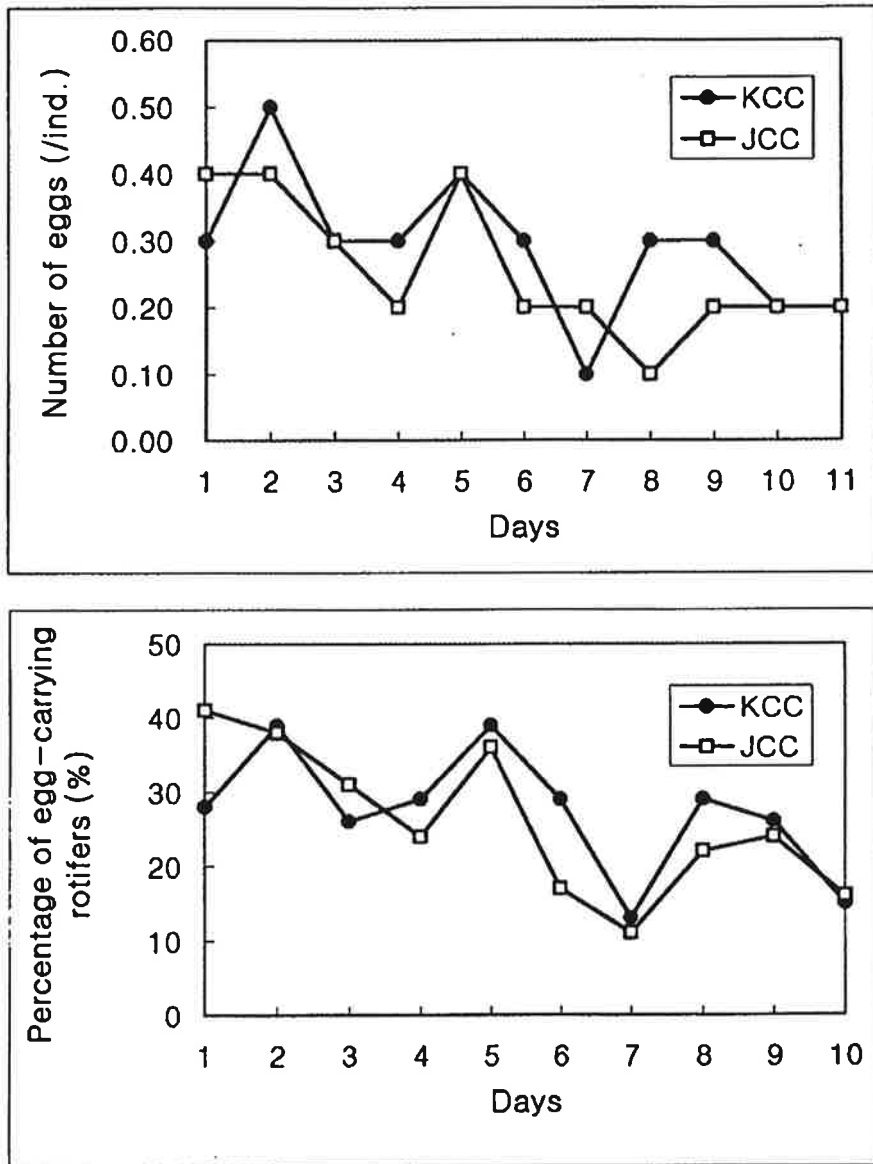


Fig. 7-3. Egg production of rotifer, *Brachionus plicatilis* L-type with different diets.

율을 보였다. 평균포란수는 국산 농축 Chlorella를 공급한 경우에 접종 후 2일째 0.5개로 최고값을 나타냈으며 일본산 농축 Chlorella를 공급한 경우에는 접종 후 1일, 2일 및 5일째 0.4개로 최고값을 나타내었다.

한편, 일본산 농축 Chlorella 본 실험에서 제조한 농축 Chlorella로 rotifer를 배양한 후 rotifer의 영양분석결과는 Table 7-7과 같다. 해산 이패매패류 종묘생산시 중요한 역할을 하는 지방의 경우 본 제품으로 배양한 rotifer는 일본 수입산에 비하여 체내 지질함량이 더 높은 것으로 나타나 먹이효율의 측면에서 일본산에 비하여 우수한 것으로 나타났다.

Table 7-7. Chemical composition of rotifer fed different concentrated Chlorella products.

Chlorella products		Moist(%)	Protein(%)	Lipid(%)	Ash(%)
Japanese products	Fresh green	8.29	58.12	7.54	10.75
		7.08	58.15	6.12	11.68
	Uni Chlorella	9.48	57.93	8.44	12.03
		12.76	55.84	6.05	1.59
	V 12 (Samhae)	11.34	54.90	5.99	11.92
		10.93	57.42	10.34	10.94
	Marine α	7.40	57.44	6.34	15.64
		11.00	54.73	9.28	15.72
Present study		8.32	56.50	9.70	12.45
		6.01	55.59	9.82	10.30

제 4 절 Rotifer 내구란 생산을 위한 농축 Chlorella의 먹이효율

본 실험에서 대량 제조한 농축 Chlorella를 대상으로 rotifer의 내구란을 대량생산한 먹이효율을 조사하였다. 우선 식물 먹이생물에 따른 내구란 생산과 부화율은 조사한 후 농축된 Chlorella에 따른 내구란 생산과 부화율을 조사하였다. 또 이를 기초

로 먹이종류에 따른 내구란 대량 생산실험을 통하여 먹이효율을 조사하였다.

가. 식물먹이생물에 따른 내구란 생산과 부화율

Rotifer는 전남 고흥군 재두 염전에서 분리한 S-type rotifer, *B. plicatilis*(C-S) strain(허·박, 1996) 을 사용하였다. 28℃, 염분 15 ppt에서 형성된 내구란을 3개월 동안 4℃에 냉장보관한 후 28℃, 15 ppt, 2,000 lux에서 36시간 동안 부화시켜 갓 태어난 female 20개체를 30ml(배양수 20ml) 시험관에 접종하였다. 실험에 사용된 식물 먹이생물은 부경대학교 한국해양미세조류은행에서 분양받은 것으로 먹이 종류와 공급량은 Table 7-8과 같다. 먹이생물은 Conway 배지(Walne, 1966)로 배양한 다음, 원심분리기로 세포만을 농축하여 공급하였다. 배양조건은 수온 28℃, 염분 15 ppt, 조도 2,000 lux로 하였다.

Table 7-8. Density of the microalgae for S-type rotifer

Microalgae	Amount of food density/2day
<i>Chlorella ellipsoidea</i> (KMCC-C-21)	12.0×10^8 cells/ml
<i>Nannochloris oculata</i> (KMCC-C-31)	25.0×10^8 cells/ml
<i>Tetraselmis suecica</i> (KMCC-P-4)	0.6×10^8 cells/ml
<i>Paulova lutheri</i> (KMCC-H-4)	4.0×10^8 cells/ml

시험관에서 rotifer 개체수는 실험 2일째부터 난을 달고 있지 않은 female (?우), 처녀생식을 하는 female (우우), male을 생산하는 female (♂우), 내구란을 생산하는 female (D우), 그리고 male (♂)로 구분하여 매일 조사하였다. 난을 달고 있지 않은 female (?우)은 0.5 ml multi culture plate에 한 개체씩 10개체를 독립적으로 수용한 후 배양하면서 female로의 형태변화를 조사하였다. 이때 각 형태의 female 비율을 최초 시험관속에서의 ?우개체수에 적용하여 각 형태의 female개체수로 환산하였다. 각 female의 형태는 Hagiwara et al. (1988)의 방법에 의했다.

유성생식률 (mixis rate, $(\uparrow 우 + D우) / 우우 \times 100$)과 수정률 ($D우 / (\uparrow 우 + D우) \times 100$)은 Hagiwara et al. (1988)의 방법에 따라 계산하였다. 그리고 배양기간 중 rotifer의 최고밀도(개체수/ml)와 성장률(specific growth rate, r)을 조사하였다(박·허, 1996). 실험은 9일간 하였고 실험 종료시 망목 50 μm seive를 이용하여 총 내구란수를 조사하였다. Rotifer 배양 실험구는 1일 2회 흔들어 주었고 2회 반복 실험하였다. 식물 먹이생물 종류에 따라 형성된 내구란의 부화율은 내구란을 증류수에 3개월동안 4°C 냉장고에서 보관하여 내구란 100개를 5 ml(배양수 4 ml) multi culture plate에 수용하여 15 ppt, 28°C, 3,000 lux 조건하에서 36시간 경과후 부화율을 조사하였고 실험은 2회 반복하였다.

4 종류의 식물 먹이생물에 따른 rotifer의 내구란 생산은 Table 7-9와 같다. 실험기간 최고밀도는 *N. oculata*를 공급한 실험구가 7일째 825개체/ml로 가장 높게 나타났고 다음은 *C. ellipsoidea*로 9일째 730개체/ml로 나타났지만 두 실험구는 서로 유의적인 차이가 없었다. 그러나 운동성인 편모를 지니고 있는 *P. lutheri*와 *T. suecica*를 공급한 실험구는 5일째 각각 343, 332개체/ml로 최고 밀도에 도달한 후 6일째부터 감소하였다. 그러나 성장률은 *P. lutheri*, *T. suecica*공급구가 각각 1.160, 1.161로 다른 실험구보다 높게 나타났다. 먹이에 따른 유성생식률은 *P. lutheri*공급구가 22.9%로 가장 높게 나타났지만 다른 실험구와는 유의성이 없었다. 수정률은 *N. oculata*를 공급한 실험구가 가장 높은 60.1% 였지만 *C. ellipsoidea*를 공급한 실험구를 제외하고는 유의적인 차이는 보이지 않았다. 먹이 생물에 따른 rotifer 내구란 생산은 *N. oculata*가 3,760개/20ml로 가장 많이 생산 되었고, 다음은 *P. lutheri*실험구(1,910개/20ml)이며 *C. ellipsoidea*를 공급한 실험구가 592개/20ml로 가장 적은 생산을 보였다.

나. 농축된 먹이종류에 따른 내구란 생산과 부화율

Rotifer는 실험 1에 사용한 동일한 strain으로 28°C, 15 ppt, 3,000 lux로 부화시켜 36시간후 갓 부화한 15개 rotifer clone을 30ml (배양액 25ml) 시험관에 1개체씩 각각

Table 7-9. *Brachionus plicatilis* S-type. Growth and production of resting eggs of Korean rotifer cultured under different microalgae

Microalgae	Maximum rotifer density (inds./ml)	Specific growth rate (r)	Mixis rate (%)	Fertilization rate (%)	Total number of resting eggs/20ml	Number of resting eggs/ml	Number of resting eggs/ml/ 10 ⁴ rotifers
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	730 ± 65.0 ^b	0.824 ± 0.0565 ^a	17.56 ± 5.05 ^a	19.5 ± 1.45 ^a	592 ± 182.5 ^a	30 ± 9.0 ^a	376 ± 140.0 ^a
<i>Nannochloris oculata</i>	825 ± 130.0 ^b	0.960 ± 0.0575 ^{ab}	17.4 ± 1.35 ^a	60.1 ± 4.35 ^b	3,760 ± 255.0 ^b	188 ± 13.0 ^b	2,214 ± 186.5 ^b
<i>Paulova lutheri</i>	343 ± 42.5 ^a	1.160 ± 0.0250 ^b	22.9 ± 0.75 ^a	50.5 ± 13.80 ^{ab}	1,910 ± 935.0 ^{ab}	96 ± 46.5 ^{ab}	2,660 ± 1035.0 ^a
<i>Tetraselmis suecica</i>	332 ± 95.0 ^a	1.161 ± 0.1100 ^b	16.7 ± 1.35 ^a	45.7 ± 8.30 ^{ab}	915 ± 420.0 ^a	59 ± 21.0 ^a	1,728 ± 947.0 ^a

Values in the same column within the same letter are not different ($p < 0.05$).

수용하여 내구란 생산이 가장 높은 clone을 선택하여 실험에 사용하였다. 먹이 실험구는 유지효모구(이화유지주식회사), 빵효모구(삼립주식회사), 해수산 *C. ellipsoidea* (KMCC-C-21)를 대량배양하여 농축시킨 해수산 *Chlorella*구(120×10^8 cells/ml), 해수산 *C. ellipsoidea* (KMCC-C-21)를 세포만 농축하여 -30°C 에 냉동보관한 냉동 *Chlorella* 구, 빵효모(30%)+냉동 *Chlorella* (70%) 혼합구, 빵효모(70%)+냉동 해수산 *Chlorella*(30%) 혼합구, 일본 해수산 냉장 *Chlorella* 구(상품명 Marine α), 일본 크로레라주식회사에서 제조한 두 종류의 일본 담수산 *Chlorella* 구(상품명 Uni *Chlorella*-판매원, 사이엔스, 상품명, Fresh green 600-판매원, 웨스시주식회사)로 모두 9개 실험구였다. 먹이 공급량은 rotifer 25개체/ml를 기준으로 각 먹이의 건조중량 $15 \mu\text{g}/\text{day}$ 로 공급하였다. Rotifer는 250ml 삼각플라스크(배양액 200ml)에 9~10개체/ml로 접종하였고 수온 28°C , 염분 15 ppt, 조도 2,000 lux에서 1일 2회 배양 용기를 흔들어서 주었으며 실험기간은 9일간으로 3회 반복하였다. Rotifer 개체수와 성장률, 유성생식률, 수정률 조사는 실험 1과 동일하였다.

농축된 먹이생물 종류에 따라 형성된 내구란을 염분 15 ppt, 2°C 에서 3개월동안 보관한 후 5 ml(배양수 4 ml) multi culture plate에 내구란 300~400개 수용하여 15 ppt, 28°C , 2,000 lux 에서 36시간 경과후 부화율을 조사하였고 실험은 4회 반복하였다.

농축 먹이생물에 따른 S-type rotifer의 최대밀도, 성장률, 유성생식률, 수정률 및 내구란 생산은 Table 7-10과 같다. Rotifer 최고밀도는 일본 담수산 농축 *Chlorella*인 Uni *Chlorella*가 717개체/ml로 가장 높게 나타났다. 빵효모(30%)+냉동 *Chlorella* (70%)의 혼합구는 608개체/ml로 일본 담수산 *Chlorella* Fresh Green 600 (627개체/ml)보다 낮게 나타났지만 유의적인 차이는 없었고 빵효모(70%)+냉동 *Chlorella* (30%)의 혼합구(522개체/ml)보다는 높게 나타났다. 냉장, 냉동 해수산 *Chlorella*는 각각 398, 386개체/ml로 일본 해수산 Marine α (273개체/ml)보다는 높게 나타났다. 효모류인 빵효모는 323개체/ml로 유지효모 (225개체/ml)보다 높게 나타났다.

Table 7-10. Growth, sexual reproduction and production of resting egg of Korea rotifer, *Brachionus plicatilis* S-type cultured for 9 days with different diets

Diets	Maximum density (inds./ml)	Specific growth rate (r)	Mixis rate (%)	Fertilization rate (%)	Number of resting eggs (inds./ml)	Number of resting eggs of ($\times 10^4$ rotifers)	Number of resting eggs/1mg (dry weight) diet
ω -yeast	225 \pm 10.0 ^a	0.338 \pm 0.0178 ^a	22.0 \pm 0.94 ^{bc}	50.1 \pm 12.31 ^{bc}	48 \pm 14.5 ^a	2,251 \pm 642.0 ^b	67 \pm 16.2 ^b
Baker's yeast	323 \pm 9.3b ^c	0.351 \pm 0.0098 ^b	20.2 \pm 0.53 ^b	47.7 \pm 1.71 ^{bc}	55 \pm 2.9 ^a	1,705 \pm 105.9 ^b	55 \pm 4.7 ^{ab}
Frozen*** <i>Chlorella ellipsoidea</i>	386 \pm 12.2 ^c	0.446 \pm 0.0037 ^c	27.5 \pm 2.39 ^{cd}	24.6 \pm 4.73 ^a	68 \pm 1.7 ^{ab}	1,776 \pm 96.4 ^b	79 \pm 6.7 ^{bc}
Refrigerated**** <i>Chlorella ellipsoidea</i>	398 \pm 61.2 ^c	0.414 \pm 0.0270 ^{bc}	33.1 \pm 0.20 ^d	62.5 \pm 9.24 ^c	115 \pm 16.1 ^b	2,983 \pm 489.2 ^{bc}	119 \pm 15.0 ^c
*BY 30% + **FC 70%	608 \pm 21.1 ^c	0.402 \pm 0.0035 ^b	30.6 \pm 2.24 ^d	56.7 \pm 6.69 ^{bc}	263 \pm 14.5 ^c	4,355 \pm 368.7 ^{dc}	181 \pm 12.8 ^d
*BY 70% + **FC 30%	522 \pm 14.8 ^d	0.387 \pm 0.0026 ^b	26.0 \pm 3.58 ^{bcd}	63.1 \pm 7.93 ^c	283 \pm 29.2 ^c	5,566 \pm 697.0 ^c	213 \pm 20.3 ^d
Marine α ®	273 \pm 22.4 ^{ab}	0.345 \pm 0.0092 ^a	11.7 \pm 3.23 ^a	34.7 \pm 1.61 ^{ab}	11 \pm 4.4 ^a	434 \pm 155.3 ^a	14 \pm 5.2 ^a
Uni <i>Chlorella</i> ®	717 \pm 28.5 ^c	0.418 \pm 0.0042 ^{bc}	27.4 \pm 2.88 ^{bcd}	45.0 \pm 2.58 ^{abc}	283 \pm 41.0 ^c	3,813 \pm 556.4 ^{cd}	179 \pm 22.9 ^e
Fresh Green 600®	627 \pm 16.7 ^c	0.405 \pm 0.0027 ^b	22.1 \pm 0.74 ^{bc}	43.4 \pm 5.80 ^{abc}	263 \pm 8.8 ^c	4,201 \pm 51.6 ^{cd}	171 \pm 6.5 ^d

Values in the same column within the same letter are not different ($p < 0.05$)

* Baker's yeast

** Frozen *Chlorella ellipsoidea*

*** 7 culturing days

**** 8 culturing days

성장률은 냉동 *Chlorella*가 0.446으로 가장 높게 나타났고 냉장 *Chlorella*와 담수산 Uni *Chlorella*가 각각 0.414, 0.418로 높게 나타났지만 이들간의 유의적인 차이는 없었다. 빵효모+냉동 *Chlorella* 혼합구와 담수산 Fresh Green 600의 성장률은 0.387~0.405로 나타났다. 또 유지효모, 빵효모, Marine α 는 비교적 성장률이 0.338~0.351로 비교적 낮게 나타났다.

유성생식물은 해수산 농축 *Chlorella*(33.1%), 빵효모(30%)+냉동 *Chlorella*(70%)의 혼합구(30.6%), 담수산 Uni *Chlorella*(27.4%), 빵효모(70%)+냉동 *Chlorella*(30%)의 혼합구(26.0%), 냉동 *Chlorella*(27.5%)순으로 높게 나타났지만 서로간의 유의성은 나타나지 않았다. 유지효모(22.0%)는 빵효모(20.2%)보다 유성생식률이 높았지만 유의적인 차이는 없었다. Marine α 는 유성생식률이 가장 낮은 11.7%로 나타났다.

수정률은 빵효모(70%)+냉동 *Chlorella*(30%)의 혼합구가 가장 높은 63.1%로 나타났지만 냉장 *Chlorella*(62.5%), 빵효모(30%)+냉동 *Chlorella*(70%)의 혼합구(56.7%), 유지효모(50.1%), 빵효모(47.7%), Uni *Chlorella* (45.0%), Fresh Green 600(43.3%)과 유의적인 차이는 나타나지 않았고 냉동 *Chlorella*와 Marine α 는 각각 24.6, 34.7%의 수정률로 낮았으며 이들 서로간의 유의적인 차이는 없었다.

먹이에 따른 m^2 당 내구란 생산은 빵효모(70%)+냉동 *Chlorella*(30%)의 혼합구와 담수산 Uni *Chlorella*가 283개/ m^2 로 가장 높게 나타났고, 빵효모(30%)+냉동 *Chlorella*(70%)의 혼합구와 Fresh Green 600이 263개/ m^2 로 많이 나타났다. 그러나 이들 먹이간의 유의적인 차이는 없었다. 해수산 냉장 *Chlorella*는 115개/ m^2 로 냉동 *Chlorella* 68개/ m^2 보다 많았지만 두 실험구간에는 유의적인 차이는 없었다. 그러나 유지효모와 빵효모는 각각 48개/ m^2 , 55개/ m^2 로 비교적 적게 나타났고 해수산 Marine α 는 가장 적은 11개/ m^2 로 나타났다.

Rotifer 10,000개체당 내구란 생산은 빵효모(70%)+냉동 *Chlorella*(30%)의 혼합구와 빵효모(30%)+냉동 *Chlorella*(70%)의 혼합구가 각각 5,566, 4,355개로 가장 많이 나타났지만 서로간의 유의적인 차이는 없었다. 담수산 *Chlorella*류인 Uni *Chlorella*와

Fresh Green 600이 3,813, 4,201개로 해수산 냉장 *Chlorella* 2,983개와는 유의적인 차이는 없었다. 그러나 냉동 *Chlorella*보다 유의적으로 높게 나타났다. 유지효모와 빵효모는 각각 2,251개, 1,705개였지만 서로간의 유의적인 차이는 없었고 해수산 Marine α 는 434개로 가장 적게 나타났다.

건조 농축 먹이 1mg당 내구란 생산은 빵효모(70%)+냉동 *Chlorella*(30%)의 혼합구와 빵효모(30%)+냉동 *Chlorella*(70%)의 혼합구가 각각 213, 181개로 다른 먹이보다 많이 나타났고 담수산 *Chlorella*인 Uni *Chlorella*와 Fresh green 600이 각각 179, 171개로 나타났지만 이들간에는 유의적인 차이는 없었다. 해수산 농축 *Chlorella*는 냉동 *Chlorella* 보다 많았지만 유의적인 차이는 없었고, 유지효모(67개)는 빵효모(55개)보다 많았지만 유의적인 차이는 없었다. 이들 효모류는 해수산 Marine α (14개)보다는 유의적으로 높게 나타났다.

농축된 먹이 종류에 따른 부화율은 유지효모가 가장 높은 67.4%였고 다음으로 일본 담수산 Uni *Chlorella*가 60.7%로 나타났지만 이들간의 유의적인 차이는 없었다. 일본 담수산 Fresh Green 600은 같은 종류인 Uni *Chlorella* 보다 적은 40.6%로 낮게 나타났다. 냉동 *Chlorella*와 빵효모(30%)+냉동 *Chlorella*(70%)의 혼합구는 각각 43.3%와 45.5%로 이들간의 유의적인 차이는 없었으나 냉장 *Chlorella* (37.8%)와 빵효모(70%)+냉동 *Chlorella*(30%)의 혼합구(37.8%)보다 높게 나타났다. 가장 낮은 부화율은 빵효모로 32.8%였다.

다. 먹이종류에 따른 L-type rotifer의 내구란 대량생산

실험에 사용된 L-type rotifer는 전북 옥구군 옥구에서 분리한 O-L strain으로 20℃, 15 ppt에서 생산된 내구란을 4℃에서 3개월간 보관하여 28℃, 10 ppt, 2,000 lux에서 부화시켰다. 200 l FRP 부경대학교 한국해양미세조류은행에서 분양받은 해수산 *Chlorella* sp. (KMCC-C-27)을 대량배양한 후 수돗물을 이용하여 염분 10 ppt로 조정된 후 부화시킨 rotifer를 접종하였다. 200 l FRP 수조에서 수온을 20℃로 유

Table 7-11. Result on reproduction of the rotifer, *Brachionus plicatilis*, L-type with different diets in 1m³ tank

Diets	Maximum density (inds./ml)	Specific growth rate (r)	Mixis rate (%)	Fertilization rate (%)	Number of resting eggs ($\times 10^6$)	Number of resting eggs ($\times 10^6$) / (10^8 rotifers)	Number of resting eggs ($\times 10^3$) / 1g(dry weight)diet	Culturing day	Temperature (°C)
<i>Chlorella</i> sp.+Yeast (I)	185	0.241	21.1	82.9	62	33	106	15	21.2
<i>Chlorella</i> sp.+Yeast (II)	166	0.287	19.1	85.9	47	28	94	15	21.4
Mean	175.5 $\pm 9.15^*$	0.264 $\pm 0.023^*$	20.1 $\pm 1.0^{NS}$	84.4 $\pm 1.50^{NS}$	54.5 $\pm 7.59^{NS}$	30.5 $\pm 2.66^{NS}$	100 $\pm 6.10^{NS}$		21.3 ± 0.1
Yeast (I)	101	0.201	21.1	60.1	31	31	70	15	21.3
Yeast (II)	109	0.205	10.4	77.8	29	27	64	15	21.9
Mean	105 ± 4.00	0.203 ± 0.002	15.8 ± 5.35	69.0 ± 8.85	30 ± 8.78	28.5 ± 1.92	67 ± 3.24		21.6 ± 0.3

* $p < 0.05$

NS, Not Significant

지만 유의적인 차이는 없었다. 총 내구란 생산, 10^8 rotifer 당 내구란 생산과 건조 먹이 1g 당 내구란 생산은 농축 냉장 *Chlorella* + 빵효모의 혼합구가 각각 54.5×10^6 개, 30.5×10^6 개, 100×10^3 개였고, 빵효모 단독구가 각각 30.5×10^6 개, 28.5×10^6 개, 67×10^3 개로 나타났으나 서로 유의적인 차이는 없었다.

라. S-type rotifer의 내구란 대량생산

실험에 사용된 S-type rotifer는 전남 고흥군 재두(C-S) 염전에서 채집하여 순수 분리한 strain으로 수온 28°C , 염분 15 ppt에서 생산된 내구란을 4°C 에서 3개월간 보관하였다. 이 내구란을 28°C , 15 ppt, 3,000 lux에서 부화시켜 36시간 후 갓 부화한 rotifer를 15개 clone으로 구분하여 15ml 시험관(배양액 10ml)에 각각 수용하였다. 실험조건은 28°C , 15 ppt, 2,000 lux 로 하였고 먹이생물로는 부경대학교 한국해양미세조류은행에서 분양받은 *Nannochloris oculata* (KMCC-C-31)을 배양한 후 원심분리하여 세포만을 농축하여 $2,000 \times 10^4$ cells/ml/day 공급하였다. 실험시간 16일 동안 하루에 두 번씩 시험관을 흔들며 침전 먹이를 현탁되게 하였고 내구란 가장 높은 clone을 선택하여 사용하였다. 1.2m^3 FRP(배양수 1m^3) 수조에서는 clone 6을 이용하였고, 4m^3 콘크리트 원형수조에서는 clone 6을 다시 위와 같은 방법으로 선택한 clone 63을 이용하였다. 각 clone은 실험시작전에 28°C , 15 ppt, 200 l FRP 수조에서 농축 *C. ellipsoidea* (KMCC-C-21)를 먹이로 사용하여 배양하였다. 수온 조절은 1m^3 수조($30.6 \sim 32.1^\circ\text{C}$)에서는 1kw 전기히터 2개로, 4m^3 수조($27.5 \sim 28.5^\circ\text{C}$)에서는 보일러를 이용하였다.

먹이 종류는 1m^3 수조에서는 농축 냉장 *Chlorella*를 단독으로 공급하였고 4m^3 수조에서는 빵효모 (70%) + 냉동 *Chlorella* (30%)를 혼합 공급하였다. 먹이 공급량은 rotifer 25개체/ml를 기준으로 각 먹이의 건조중량으로 $15\mu\text{g}/\text{day}$ 로 공급하였다. 농축 *Chlorella* 는 m^3 당 복합비료 60g와 요소비료 20g로 4m^3 수조에서 배양한 것을 연속 원심분리기로 130×10^8 cells/ml로 농축한 후 냉장실(4°C)에 보관하여 사용하였

다. 냉동 *Chlorella*는 농축 냉장 *Chlorella*를 다시 연속 원심분리기를 사용하여 *Chlorella* 세포만을 수확하여 냉동고(-30℃)에 보관하여 사용하였다. 초기 rotifer 접 종밀도는 5~10개체/ml로 하였다.

S-type rotifer 내구란 대량생산은 Table 7-12와 같다. 1m³ 수조에서 농축 냉장 *Chlorella*를 공급한 실험에서는 rotifer 최고밀도는 107~149개체/ml로 나타났고 성장률은 0.511~0.644범위였다. 유성생식률과 수정률은 각각 10.4~36.7%, 66.8~81.4%로 나타났다. 총 내구란 생산은 50~104×10⁶개로 실험구에 따라서 2배정도 차이가 나타났다. 10⁸ rotifers와 건조 먹이 1g당 내구란 생산은 각각 47~82×10⁶개, 136~260×10³개로 나타났다.

4m³ 수조에서 S-type rotifer의 최고 밀도와 성장률은 각각 41~146개체/ml, 0.372~0.613으로 실험구에 따라서 차이가 많았다. 유성생식률과 수정률은 각각 29.3~58.4%, 64.4~90.9%였고 총 내구란 생산은 149~567×10⁶개로 나타났다. 10⁸ rotifer와 건조 먹이 1g당 내구란 생산은 각각 36~123×10⁶개, 131~338×10³개로 차이가 심하게 나타났다.

Table 7-12. Growth and production of resting eggs of the Korean rotifer, *Brachionus plicatilis* S-type with different diets in 1m³ and 4m³ tank

Volume (m ³)	Food	Maximum density (inds./ml)	Specific growth rate (r)	Mixis rate (%)	Fertilization rate (%)	Number of resting eggs ($\times 10^6$)	Number of resting eggs ($\times 10^6$) /10 ⁸ rotifers	Number of resting eggs ($\times 10^3$) /1g (dry weight) diet	Culturing day	Temperature (°C)
1	Refrigerated <i>Chlorella</i>	107	0.511	10.4	66.8	50	47	136	7	32.1
		125	0.644	28.6	79.0	78	62	181	7	31.9
		149	0.544	36.7	71.1	86	58	224	7	30.6
		125	0.644	36.7	81.4	104	82	260	7	32.0
4	Frozen <i>Chlorella</i> (30%) + Baker's yeast (70%)	146	0.613	29.3	86.9	210	36	131	8	27.5
		41	0.436	58.4	90.9	149	91	233	6	27.6
		68	0.373	47.7	78.0	268	99	299	7	27.7
		92	0.416	40.6	81.6	433	118	338	7	27.9
		115	0.372	38.7	64.4	567	123	328	7	28.5

여 백

제 8 장 Heterotrophic Chlorella 의 개발

광합성을 하는 autotrophic Chlorella의 경우 영양가치의 면에서는 좋으나 대량생산시 빛 공급에 따른 면적의 소요와 또 일시적으로 폐사하는 안전성에 큰 어려움이 있다. 따라서, 좁은 면적에서 배양조를 이용하여 인위적인 환경조절에 의한 heterotrophic Chlorella의 개발이 중요하다. 이 경우 Chlorella 공급의 안전성과 경제적인 측면에서 유익하다. 따라서 본 연구에서는 실내에서 기후에 영향을 받지 않고 사계절 Chlorella의 생산을 가능하게 하기 위해 우리 나라 실정에 적합한 Heterotrophic Chlorella를 개발하여 실제 Chlorella의 농축산업에 사용할 수 있는 방안을 모색하고자 하였다.

본 실험에 사용된 Chlorella는 부경대학교 양식학과 내 한국해양미세조류은행에서 보존하고 있는 담수산 Chlorella 중에서 8종을 선택하여 사용하였다(Table 8-1).

Table 8-1. The list of species for the experiment

Strain No.	Species	Source	Stock Media
KMCC FC-1	<i>Chlorella vulgaris</i>	UTEX 259	S.K.
KMCC FC-3	<i>Chlorella vulgaris</i>	Nacdong	S.K.
KMCC FC-4	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	UTEX 26	S.K.
KMCC FC-5	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	UTEX 247	S.K.
KMCC FC-6	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	UTEX 20	S.K.
KMCC FC-11	<i>Chlorella</i> sp.	Fresh Green	S.K.
KMCC FC-12	<i>Chlorella</i> sp.	Uni Chlorella	S.K.
KMCC FC-15	<i>Chlorella</i> sp.	Jinhae	S.K.

본 원종은 S.K.배지를 이용하였고, 조도는 4,000 lux로 하였으며, LD cycle은 24:0으로 보관되었다.

1. 항생제 및 Vitamin을 첨가한 배양

가. 항생제 첨가 배양

Urea가 첨가된 배지에 8종을 접종하여 실험을 실시한 결과 실험 2일째 모든 실험 구에서 bacteria의 번식으로 인해 *Chlorella*의 번식이 없어서, 그중 bacteria의 번식이 가장 많았던 *Chlorella* sp.(KMCC FC-12)을 선택하여 항생제를 첨가하여 실험하였다. 실험에 사용된 항생제는 OTC를 24%함유하고 있는 옥시마이신(삼우화학공업주식회사 제품)으로 200, 500ppm을 각각 첨가하였으며, 대조구는 항생제를 첨가하지 않았다. 접종 밀도는 100×10^4 cells/ml, 250ml flask에 100ml 용량의 배지를 넣었고, S.K. 배지, 34°C, 3000 lux의 환경에서 12일간 배양하였다.

성장은 매일 Hemacytometer를 사용하여 400배 현미경하에서 반복하여 세포를 계수하였다. 항생제의 농도가 각각 다른 배지에서 12일간 배양한 성장 결과는 Table 8-2와 같다. 500ppm에서 배양된 *Chlorella*가 S.G.R. 이 가장 높은 0.5189로 나타났고, 200ppm에서 0.4945, 대조구에서 0.4499로 항생제의 농도에 비례하는 성장률을 보였다.

Table 8-2. The growth of xenic *Chlorella* on antibiotic substance

Antibiotic substance	days												S.G.R.	
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		12
100ppm	107	362	885	945	1095	1419	1900	2169	2231	2850	3338	3950	4513	0.4499
200ppm	99	1181	1671	1710	1950	2069	2406	2563	3044	3394	4050	5675	6050	0.4945
500ppm	109	1391	2605	2631	2906	3150	3219	3688	4688	4813	5638	7000	8163	0.5189

나. Vitamin 첨가 배양

대상종은 앞의 실험과 같이 *Chlorella* sp.(KMCC FC-12)로서, vitamin의 종류와 농도는 Table 8-3과 같다. 접종 밀도는 100×10^4 cells/ml, 250ml flask 100ml 용량, 배지는 Urea-B, S.K. 배지에 34°C, 3000 lux의 환경에서 3일간 배양하였다.

Table 8-3. The volume of vitamin

Vitamin	Concentration	
	× 1	× 5
Thiamin, HCl	0.1mg/ℓ	0.5mg/ℓ
Biotin	0.5μg/ℓ	2.5μg/ℓ
Cyanocobalamin	0.5μg/ℓ	2.5μg/ℓ

Vitamin을 1배, 5배로 첨가하여 배양한 실험에서 조도 6,000 lux에서 vitamin을 첨가하지 않은 실험구가 S.G.R.이 0.4693으로 가장 높게 나타났다(Table 8-4).

Table 8-4. The growth of xenic *Chlorella* on vitamin (×0:control, ×1: 1times, ×5: 5times)

Light	($\times 10^4$ cells/ml)					
	6000 lux			0 lux		
Vitamin	×0	×1	×5	×0	×1	×5
0	117	111	113	114	122	114
1	149	134	146	105	111	107
2	215	192	185	97	115	117
3	310	273	266	89	93	113
S.G.R.	0.4693	0.4350	0.4141	-0.1146	-0.1300	-0.0021

2. Heterotrophic *Chlorella*의 탐색과 적정 조도와 배지

가. Heterotrophic *Chlorella* 탐색

대상종은 위 실험의 담수산 *Chlorella* 8종을 사용하였고, 모든 종은 본 실험부터 모두 penicillin G 350ppm, streptomycin 200ppm, Chloramphenicol 40ppm을 이용하여 무균처리하여 사용하였다. 접종밀도는 100×10^4 cells/ml, 250ml flask 100ml 용량, 배지는 Urea-C, Urea-B, Urea-C에 Acetic acid 0.2% 첨가한 배지, Urea-C에 Sodium Acetate 0.5G/l 첨가한 배지를 사용하였으며(Table 8-5), 30℃, 암흑상태에서 7일간 배양하였다.

Table 8-5. The Composition of Urea-B(Endo et al., 1974)
Urea-C (Endo et al., 1977)

	Urea-B	Urea-C
Urea	6000	1000
KH ₂ PO ₄	1000	200
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1000	200
CaCl ₂	30	100
FeSO ₄ · 7H ₂ O	15	5
A ₅ solution	3	1
H ₃ BO ₃		114.2
ZnSO ₄ · 7H ₂ O		88.2
MnCl ₂ · 4H ₂ O		14.2
MoO ₃		7.1
CuSO ₄ · 5H ₂ O		15.7
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O		4.9
Citric acid		250

Table 8-6. The growth of eight *Chlorella* on different Media

	Media	Days								S.G.R
		0	1	2	3	4	5	6	7	
FC-1	Urea-C	102	108	120	133	140	139	152	159	0.0915
	Urea-B	101	97	96	84	91	86	87	92	-0.0192
	Acetic Acid	107	107	111	111	108	110	113	109	0.0038
	Sodium Acetate	106	113	118	126	131	137	142	138	0.0544
FC-3	Urea-C	103	110	125	135	135	155	162	170	0.1033
	Urea-B	104	100	99	90	90	86	89	87	-0.0368
	Acetic Acid	100	97	102	102	112	118	123	109	0.0178
	Sodium Acetate	107	132	127	133	141	143	152	158	0.0803
FC-4	Urea-C	103	103	113	109	117	118	121	116	0.0245
	Urea-B	108	104	105	99	94	95	98	94	-0.0286
	Acetic Acid	106	109	117	116	116	116	117	120	0.0256
	Sodium Acetate	102	108	120	134	133	140	152	148	0.0767
FC-5	Urea-C	107	120	121	129	132	138	142	146	0.0641
	Urea-B	101	100	95	99	89	85	84	82	-0.043
	Acetic Acid	108	109	112	115	119	117	110	105	-0.0058
	Sodium Acetate	106	114	121	122	135	138	129	136	0.0514
FC-6	Urea-C	101	108	120	135	137	151	163	168	0.1049
	Urea-B	97	95	90	90	90	89	82	86	-0.0248
	Acetic Acid	103	110	107	117	115	116	120	119	0.0298
	Sodium Acetate	105	115	123	129	131	137	142	149	0.0721
FC-11	Urea-C	106	115	116	111	119	123	132	129	0.0405
	Urea-B	101	96	96	89	90	88	94	89	-0.0261
	Acetic Acid	104	105	113	111	117	112	108	115	0.0207
	Sodium Acetate	103	117	118	140	151	170	189	203	0.1398
FC-12	Urea-C	106	117	115	116	123	118	128	132	0.0452
	Urea-B	100	97	94	91	87	87	82	93	-0.015
	Acetic Acid	107	117	125	122	123	128	132	129	0.0385
	Sodium Acetate	103	115	117	135	144	171	189	201	0.1378
FC-15	Urea-C	109	110	123	128	142	149	162	172	0.0940
	Urea-B	98	95	89	87	85	81	76	82	-0.0367
	Acetic Acid	107	114	126	128	136	140	152	146	0.0641
	Sodium Acetate	103	118	131	143	170	195	231	252	0.1844

Urea-C배지에서 *Chlorella ellipsoidea* (KMCC FC-6)가 S.G.R 0.1049, Urea-B배지에서 *Chlorella sp.* (KMCC FC-12)가 S.G.R. -0.015, Urea-C배지에 Acetic Acid 첨가된 배지에서 *Chlorella sp.* (KMCC FC-15)가 S.G.R. 0.0641, Urea-C배지에 Sodium Acetate 첨가된 배지에서 *Chlorella sp.* (KMCC FC-15)가 S.G.R. 0.1844로 각각 가장 높게 나타났다(Table 8-6). 전반적으로 각 배지에서 성장이 양호한 종은 *Chlorella sp.* 2종 (KMCC FC-12, 15)으로 나타났다.

나. 적정조도 탐색

본 실험에 사용된 종은 *Chlorella sp.* 2종(KMCC FC-12, FC-15)으로 앞의 실험을 통해 선택하였으며, 실험배지는 Urea-C배지에 Sodium Acetate를 0.5g/l 첨가하여 사용하였다. 조도는 0, 100, 1,000, 2,000 lux로 하였으며 다른 조건은 전과 동일하다. *Chlorella sp.* (KMCC FC-12, 15)를 이용하여 조도 0, 100, 1,000, 2,000 lux에서 실험하였을 때, *Chlorella sp.* (KMCC FC-15)가 조도 2,000 lux에서 S.G.R. 0.9276 으로 가장 성장이 좋게 나타났다.

Table 8-7. The growth of *Chlorella* on different light intensity

Light (lux)	species	Days							S.G.R.
		0	1	2	3	4	5	6	
0	FC-12	109	117	452	320	257	219	144	0.0670
	FC-15	101	114	207	180	141	132	127	0.0551
100	FC-12	107	124	206	265	314	361	337	0.2759
	FC-15	102	151	237	245	251	266	259	0.2241
1,000	FC-12	107	178	612	718	830	880	777	0.4767
	FC-15	104	213	343	373	409	407	364	0.3012
2,000	FC-12	109	274	951	935	1027	1309	1360	0.6069
	FC-15	102	555	1180	1919	2551	2641	4831	0.9276

모든 실험구가 조도가 높을수록 좋은 성장률을 보였다(Table 8-7). 조도 0 lux, *Chlorella* sp. (KMCC FC-12)의 경우, 접종 5일째까지 S.G.R. 0.2013으로 성장을 보이다가, 6일째 급격한 감소를 보였다.

다. 적정배지 탐색

본 실험에 사용된 종은 *Chlorella* sp. 2종(KMCC FC-12, FC-15)으로 앞의 실험을 통해 선택하였으며, 실험배지는 Urea-C배지에 Sodium Acetate와 Glucose의 농도를 달리하여 실험하였다(Table 8-8). 조도는 0, 2000lux에서 실험하였으며, 다른 조건은 전과 동일하다.

Table 8-8. The volume of added sodium acetate and glucose

	(g/ℓ)		
Sodium Acetate	0.5	1.0	1.5
Glucose	0.5	1.0	1.5

Sodium Acetate 첨가 배지가 Glucose 첨가 배지에 비해 성장률이 높게 나타났으며, Sodium Acetate 1.5g/ℓ 첨가 배지에서 *Chlorella* sp.(KMCC FC-15)가 S.G.R. 0.2151로 높은 성장을 나타냈다(Table 8-9).

Table 8-9. The growth of Chlorella on sodium acetate and glucose

Species	lux	Media	amount	Days						S.G.R.	
				0	1	2	3	4	5		6
FC-12	0	Sodium Acetate	0.5g/ℓ	101	104	108	112	121	118	117	0.0354
			1.0g/ℓ	99	104	107	104	114	109	112	0.0297
			1.5g/ℓ	98	104	115	113	117	121	118	0.0447
		Glucose	0.5g/ℓ	101	107	106	98	107	112	102	0.0024
			1.0g/ℓ	98	102	104	105	96	112	108	0.0234
			1.5g/ℓ	92	98	89	95	102	104	96	0.0102
	2,000	Sodium Acetate	0.5g/ℓ	104	124	126	142	148	182	188	0.1424
			1.0g/ℓ	101	135	141	157	176	189	204	0.1690
			1.5g/ℓ	100	142	151	166	168	192	221	0.1907
		Glucose	0.5g/ℓ	105	112	118	116	121	128	130	0.0514
			1.0g/ℓ	102	105	114	109	120	127	125	0.0489
			1.5g/ℓ	105	107	125	114	132	129	136	0.0622
FC-15	0	Sodium Acetate	0.5g/ℓ	107	112	109	120	117	118	117	0.0215
			1.0g/ℓ	109	107	101	108	112	114	117	0.0170
			1.5g/ℓ	104	104	112	114	109	116	123	0.0403
		Glucose	0.5g/ℓ	105	102	117	98	107	105	112	0.0155
			1.0g/ℓ	108	112	107	95	112	108	102	-0.0137
			1.5g/ℓ	104	102	101	96	112	108	114	0.0221
	2,000	Sodium Acetate	0.5g/ℓ	102	121	142	145	168	187	205	0.1678
			1.0g/ℓ	104	124	154	174	198	221	225	0.1856
			1.5g/ℓ	103	134	168	169	204	226	252	0.2151
		Glucose	0.5g/ℓ	103	112	121	119	138	142	162	0.1089
			1.0g/ℓ	107	121	132	129	143	142	152	0.0844
			1.5g/ℓ	108	123	134	135	148	145	162	0.0975

제 9 장 Pilot scale의 시험생산

본 연구에서는 50M/T 규모로 Chlorella를 대량배양한 후 Separator(HFG 5016HK)로 ml당 약 150억 cells/ml 이상으로 농축하여 2ℓ 또는 10ℓ 무균통에 넣어 시험제작하였다. 배양에서부터 농축 그리고 보관방법 및 상업성 분석에 이르기까지 모든 과정을 이화유지공업(주)의 연구원에게 기술 전수하였다.

본 연구에서 시험 제작된 농축 Chlorella는 이화유지공업(주)의 영업부를 통하여 전국의 어류종묘부화장에 무상으로 분양 홍보하였으며 사용후의 설문지를 입수하였다. 무상으로 분양한 시험제작품의 현황은 표 9-1 과 같다.

표 9-1. 실험생산된 농축 Chlorella 무상 분양 현황

분양 날짜	분양기관	농축밀도 ($\times 10^8$ cells/ml)	규격(ℓ)	수량	비고
97. 10. 31	이화유지	150	10	12	
	"	150	5	1	
97. 9. 30	남해배양장	150	10	5	
	양현준	150	10	2	
9. 28	이화유지	170	2	79	
8.27	일동산업	190	2	1	
	이화유지	"	2	25	
	거제배양장	"	2	1	
8. 25	거제배양장	230	2	1	
7. 25	이화유지	120	10	5	
7. 29	명선교역	80	20	2	
4. 10	김성구(부경대)	170	1	1	
3. 13	이상민(순천향대)	170	10	1	
3. 12	"	170	10	2	
2. 11	수산진흥원	120	10	2	

한편 표 9-2와 같은 양식으로 전국의 부화장에 설문 조사한 후 회신된 설문지는 17 회로서 본 실험 제품이 대체로 양호하며 유익하다는 평가를 받고 있다(표 9-3). 특히 본 제품은 Chlorella 대량배양을 위한 seed, rotifer의 영양강화, 사육 수조내의 green water, rotifer 사육, 배양중인 Chlorella의 폐사시 긴급 활용 등의 목적으로 폭 넓게 활용되고 있다. 중요생산업자로부터 회수한 설문의 내용은 다음과 같이 요약되며 이들이 지적한 문제점을 차후 상품개발시 보완할 예정이다.

표. 9-2. 실험제품에 대한 설문지 서식

해 산 농 축 클 로 렐 라

제품안내(제조일 97년 월 일)

본 제품은 농림수산기술관리센터에서 지원하는 현장애로 연구과제의 결과로서 부경대학교 수산과학연구소에서 이화유지(주)의 시설지원으로 생산한 제품입니다.

본 제품은 해산 *Chlorella ellipsoidea* 종으로서 단백질 46%, 지질 24%, EPA+DHA 34%를 함유한 고영양성 클로렐라 종류입니다. 본 제품은 1ml당 약 150억개의 클로렐라로 농축된 상태이며 제조일로부터 약 3개월간 냉장보관이 가능합니다. 그러나 가능한 빠른 시일 안에 사용함이 좋습니다.

본 제품은 ① 해산 클로렐라의 대량배양

② 담수산 농축클로렐라로 배양한 로티퍼의 2차 배양

③ 자·치어 사육수조의 Green water등에 사용하면 매우 경제적이고 편리합니다.

본 제품 1ℓ를 10톤의 해수 클로렐라 배양 수조에 넣고 요소비료 1,700g, 복합비료 1,200g을 시비하면 약 10일후에 1ml당 2천만개의 클로렐라로 대량 배양이 가능합니다(겨울: 약 3주 소요).

본 연구소에서는 해산 클로렐라 이외에도 패류 및 어류의 먹이생물로 널리 이용되는 규조류, 녹조류, 황색편모조류등의 농축생산이 가능합니다. 본 제품을 사용하신 후 아래의 설문지에 기록하시어 보내주시면 제품 개발에 큰 도움이 되겠습니다.

절 취 선

사용자 주소 :

성명 :

전화번호 :

사용후 효과 및 의견

연간 필요할 수 있는 농축 먹이생물의 현황

종류 :

시기 :

수량(ml당 100억 세포 기준) : (liter)

회신처 : 612-021 부산시 해운대구 우1동 714-1 부경대학교 수산과학연구소

허 성 범 교수 Tel : 051-620-6097, Fax : 051-741-4228

또는, 604-030, 부산시 사하구 신평동 370-7, 이화유지공업주식회사(주)

영 업 부 Tel : 051-291-4208~11, Fax : 051-204-1169

표 9-3. 설문지 회신 내용

사용 일자	사용자	소속	주소	장점	단점	보완사항	소요예상 수량(ml당 100억 세포 기준)	소요 예상시기
97.2.11	김경걸	국립수산 진흥원	부산 기장군 기장읍 시랑리 408-1	해수에서의 2차 배양이 필요없음				
97.3.28	김우현	대성수산			농도가 기존제품에 비해 떨어짐			
97.4.1	손형우	용해수산		해수산이므로 배양의 빈거로움과 공간을 줄이는데 유효				
97.4.3	김덕용	경래수산		기존 제품보다 찌꺼기가 적다	농도가 기존제품에 비해 떨어짐			
97.7.30	이종백	원풍수산	0455-73-5693		농도가 기존제품에 비해 떨어짐	별군이 더 잘되었으면 함		

표 9-3. 계속

사용 일자	사용자	소속	주소	장점	단점	보완사항	소요예상 수량(㎥당 100억 세포 기준)	소요예 상 시기
96.8.26	이금주	신일수산	충남 보령시 남포면 월전리 590	기존제품사용시 보다 수조가 청결해짐				
97.2.11	김경길	국립수산 진흥원	부산 기장군 기장읍 시랑리 408-1	해수에서의 2차 배양이 필요없음				
96.6.23	정명래		경북 울진군 원남면 오산리 40	기존 제품에 비해 재 배양이 가능		가격이 수입품에 저렴하였으면 함	600-800 ℓ	8월에서 의년 6월
97	최인규		전남 여천군 화양면 안포리 335	재배양이 가능하며, 자어탱크에 사용해도 이상없음	농도가 기존제품에 비해 떨어짐		100 ℓ	8월에서 10월
97.8.5	장성일		경북 포항시 남구 대포면 강사1리 124	기존제품에 비해 배양이 양호			200 ℓ	9월에서 의년 3월

표 9-3. 계속

사용 날자	사용자	소속	주소	장점	단점	보안사항	소요예상 수량(㎡당 100억 세포 기준)	소요예상 상 시기
97	한기성	해인수산	충남 태안군 남면 당임리	기존제품에 비해 배양이 양호 찌꺼기가 발생하지 않으며 수질정화 효과가 있는 것으로 사료됨			100 ℓ	년중
	정재호		충남 태안군 고남면 고남리 5구 3번지					년중
	문성호		충남 태안군 소원면 의항 164	기존 제품에 비해 효과 좋음		대량배양이 되었으면 함		년중
	김동진	은정수산	충남 태안군 안면읍 창기리	Seed용으로 효과가 있음				년중
	정해원	청호수산	전남 여천군 돌산읍 우두리	10일 정도 보관 후 사용해도 상태 양호	전체적인 보관기간이 짧다		100 ℓ	년중
	나해준	세보수산	경남 통영군 산양면 달아	해수에 재 접종시 성장이 양호			60 ℓ	년중
	박정욱	태영수산	경남 통영군 산양읍 연화리 433-3	재 접종시 성장 양호, 보관 상태 양호	전체적인 보관기간이 짧다		100 ℓ	년중

참 고 문 헌

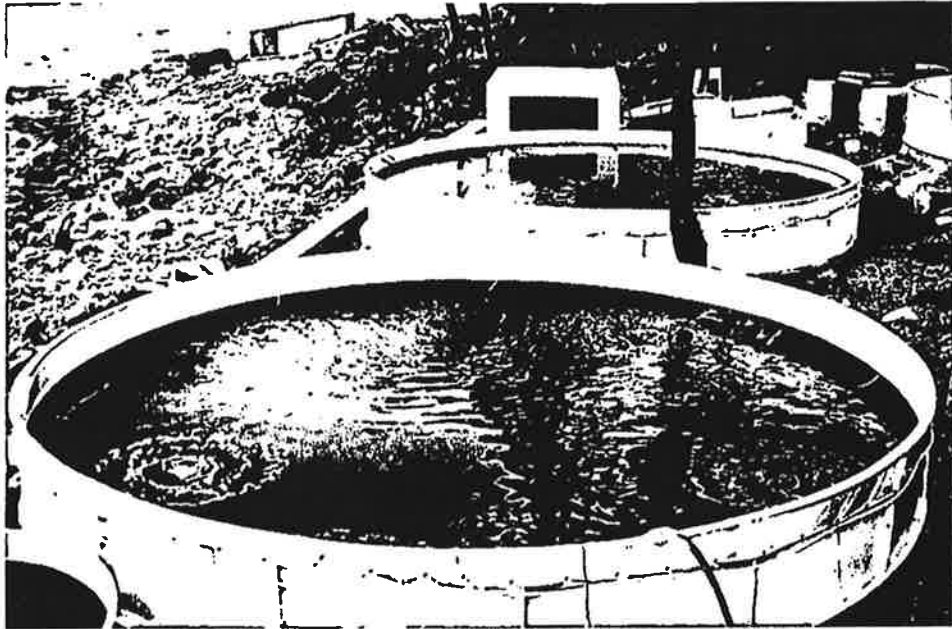
- Cho, J. J., Y. T., Kim, S. B., Hur and Y. T., Kim, 1996. Random amplified polymorphic DNA(RAPD) identification of genetic variation in *Chlorella* species. J. of the Korean Fisheries Society, 29(6); 761-769.
- Endo, H., Hosoya, H. and Koibuchi, T., 1977. Growth yields of *Chlorella regularis* in dark-heterotrophic continuous culture using acetate. Journal of Fermentation Technology, 55:369-79
- Endo, H., Nakajima, K., Chino, R. and Shirota, M., 1974. Growth characteristics and cellular components of *Chlorella regularis*, heterotrophic fast growing strain. Agricultural and Biological Chemistry, 39, 9-18
- Erdschreiber, E., 1927. Die reinkultur von marinem phytoplankton und deren bedeutung fur die erforschung der produktionsfahigkeit des meerwassers. Wiss. Meeresuntersuch. N.F., 16:1-34.
- Guillard, R.R.L., 1973. Division rates. In, Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements(J.R. Stein, ed.). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 289-311.
- Guillard, R.R.L. and J.H. Ryther, 1962. Studies of marine plankton diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve). Gran. Can. J. Microbiol., 8:229-239.
- Hagiwara, A., A. Hino and R. Hirano, 1988. Effects of temperature and chlorinity on resting egg formation in the rotifer *Brachionus plicatilis*. Nippon Suisan Gakkaishi, 54:569-575.

- Hur, S.B. and Park, H.G., 1996. Size and resting egg formation of Korean Rotifer, *Brachionus plicatilis* and *B. calyciflorus*. J. of Aquaculture, 9:187-194.
- Hur, S.B. and Park, H.G., 1996. Mass production of resting egg of Korean Rotifer *Brachionus plicatilis*(L and S type). J. of Aquaculture, 9:345-351.
- Park, H.G. and S.B., Hur, 1996. Resting egg Production of six strains of Korean Rotifer, *Brachionus plicatilis*(S-type). J. of Aquaculture, 9:195-203.
- Park, H.G. and S.B., Hur, 1996. Production and hatching rate of Resting egg of Korean Rotifer, *Brachionus plicatilis*(S-type) with different diets. J. of Aquaculture, 9:329-337.
- Sorokin, C. and Krauss, R.W., 1958. The effect of light intensity on the growth rates of green algae. Plant Physiol., 33:109-113.
- Walne, P.R., 1966. Experiments on the large-scale culture of the larvae of *Ostrea edulis* L. Fish. Invest. Min. Agric. Fish. London, Ser. 2, 25. 53pp.

부록 - I .

해산 농축 *Chlorella ellipsoidea* 제조과정

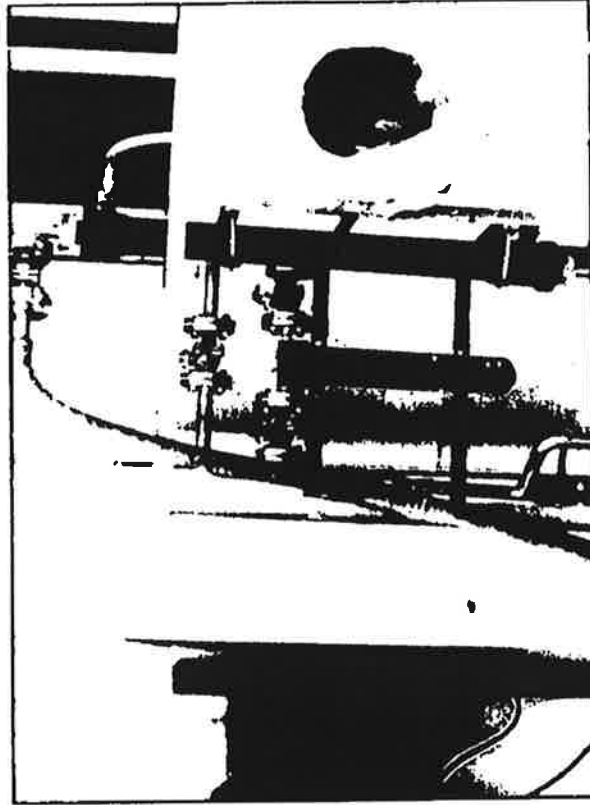
여 백



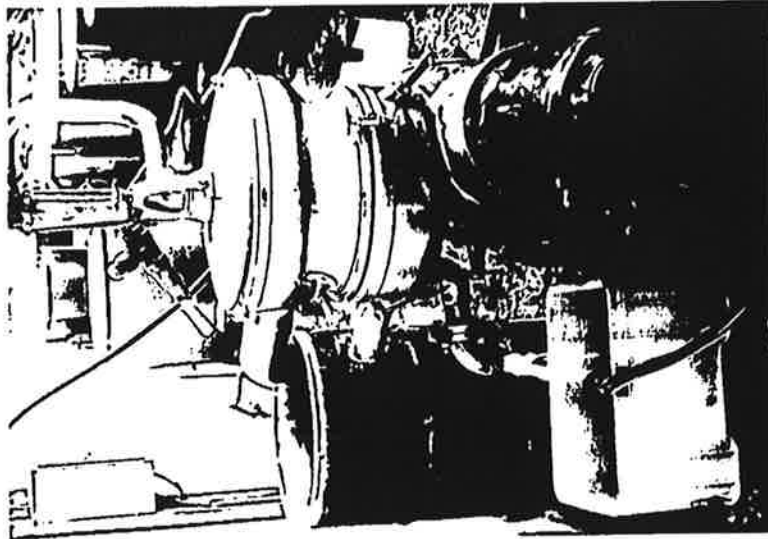
해산 *C. ellipsoidea* 대량 배양



세포 수확 방법



공막장치(선경社)에 의한 수확 방법



HFG. 5016HK 원심분리기에 의한 수확방법



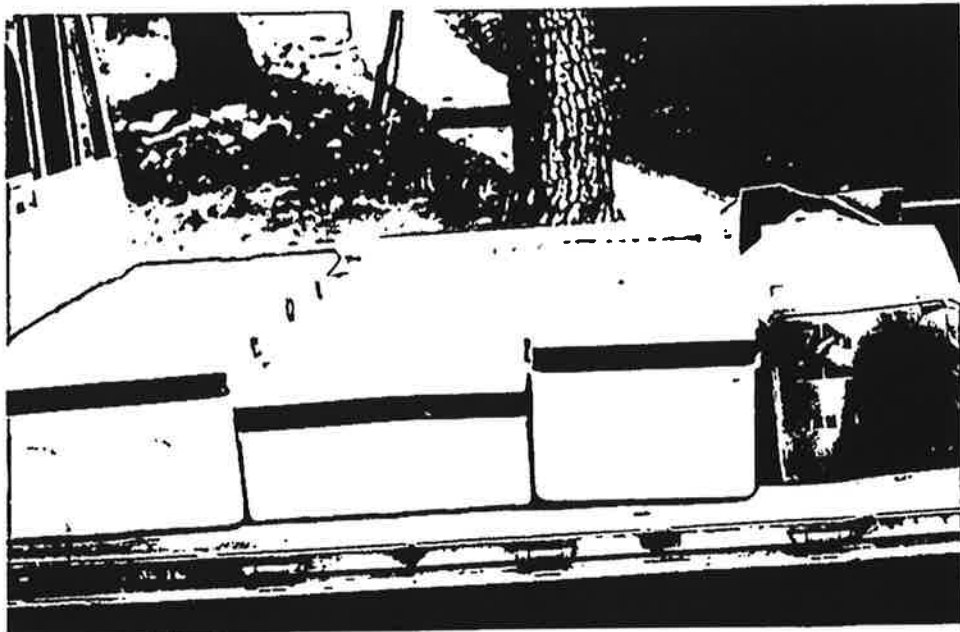
AML에 의한 수확방법



농축 Chlorella 분배



농축 Chlorella ice box 분배



농축 Chlorella 수송

부록 - II.

관련 투고 논문

여 백

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Identification of Genetic Variation in *Chlorella* species

Jung Jong CHO, Yong-Tae KIM*, Sung Bum HUR** and Young Tae KIM
Department of Microbiology, **Department of Aquaculture, Pukyong National University,
Pusan 608-737, Korea
*Department of Chemistry, Aoyama Gakuin University, Setagaya-Ku, Tokyo 113, Japan

한국수산학회지 제29권 제6호(1996년 11월) 별책

Reprinted from
JOURNAL OF THE KOREAN FISHERIES SOCIETY VOL. 29, NO. 6
November 1996
PUSAN, KOREA

여 백

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Identification of Genetic Variation in *Chlorella* species

Jung Jong CHO, Yong-Tae KIM*, Sung Bum HUR** and Young Tae KIM

Department of Microbiology, **Department of Aquaculture, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

*Department of Chemistry, Aoyama Gakuin University, Setagaya-Ku, Tokyo 113, Japan

The random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was used to characterize 18 reference strains of microalgae, mostly *Chlorella* species, collected from various localities around Korea peninsular. Eighteen strains consist of four genera of the family marine *Chlorella* from 12 samples, two genera of fresh water *Chlorella* from three samples, and three genera on *Nannochloris*. Twenty 10-mer anonymous primers were screened for amplification of genomic DNA extracted from samples using the CTAB extraction method.

Nineteen of these oligonucleotide primers were positive or band producing. Three of 20 random primers (OPA 10, OPA 12, and OPA 18) resulted in both clear band and a high degree of reproducibility and showed some potential to be used to discriminate individual samples of both genetically hetero- and homogeneous populations, in determining phylogenetic relationships between species within a genus and developing individual fingerprints for each samples.

Key words : *Chlorella*, polymerase chain reaction, polymorphic DNA, polymorphisms

Introduction

The family of *Chlorella* is one of the most important microalgae groups in marine environments. Some members of this family are important as live foods to culture rotifers and larvae in aquaculture. Members of the *Chlorella* often predominating in sea water have been shown to have the nutritive elements, mainly highly unsaturated fatty acids and amino acids that are required for fish larvae and crustaceans (Snell et al., 1983; Watanabe et al., 1983; 1984).

Recently, genetic engineering and genetic manipulation techniques have been used in applied biotechnology programs for agriculture and aquaculture. Especially, a new technique using the polymerase chain reaction (PCR) (Innis et al., 1990) has been developed to differentially amplify anonymous regions of genomic DNA fragments using oligonucleotide primers, referred as random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Williams et al., 1990; Hadrys et al., 1992). Amplifica-

tion fragment length polymorphism (AFLP) have been proven useful in identifying both inter- and intra-specific genomic DNA variation and in determining genetic compatibility profiles (Kapaun et al., 1992; Hadrys et al., 1992; Baird et al., 1992). Taxonomic studies are important to ensure that microalgae of interest are correctly identified and recognized to enhance utilization of microalgae resources for the development of phyeculture and aquaculture industry.

The family of *Chlorella* is highly differentiated. The phenotype of this family exhibits complexity and variability on several factors: temperature, intra- and inter-individual, salinity, environment and geographical distribution, and chemical composition (Hur and Kim, 1988; Oh-Hama and Miyachi, 1988). Phenotypic classification systems of this family results taxonomic inconsistencies and arises many problems. To complement the existing classification systems, new genetic and molecular approaches are recently introduced (Dutcher and Kapaun, 1994; Ho et al., 1995). The

RAPD technique for fingerprinting or comparing polymorphisms in arbitrary nucleotide sequences could be used for the discrimination among individuals.

The present investigation was conducted to access the usefulness of the polymerase chain reaction using anonymous nucleotide primers in differentiation and characterization of *Chlorella* species. The amplification product banding patterns would provide comparisons between genomic profiles and analysis of similarity matrix data.

Materials and Methods

Materials

Collection data for 13 samples of the *Chlorella* and *Nannochloris* species obtained from localities around Korea Peninsular and are given in Table 1. In addition, 5 other *Chlorella* samples collected from other countries were used for comparison purpose. Preliminary identification based on morphological characteristics was carried out with the photomicroscope (Hur, 1992). Restriction enzymes were purchased from New England Biolabs Inc. and United States Biochemicals Corp. T4 DNA ligase and *Taq* DNA polymerase were purchased from United States Biochemicals Corp.

Preparation, preservation and culture of samples
Chlorella and *Nannochloris* species were cultivated in an *f/2* medium (Guillard and Ryther, 1962) at 20°C and 26°C, respectively, with aeration under continuous illumination (ca. 5,000 lux) using a cool-white fluorescent lamp. Cells were harvested using a centrifuge and stored at -25°C.

DNA Isolation

Genomic DNA was isolated using the CTAB extraction method (Ho et al., 1995; Rogers et al., 1988; Murray and Thompson, 1980). Approximately, 5g (wet weight) of samples was ground in liquid nitrogen before addition of 30 ml of 1x CTAB (cetyltrimethyl

ammonium bromide) extraction buffer [1% (w/v) CTAB, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0), 0.7 M NaCl, 1% polyvinylpyrrolidone (PVP)] and incubated for 15 min at 65°C. An equal volume of chloroform-isoamylalcohol (24 : 1) was added, mixed and centrifuged at 11,000 g for 3 min. The top aqueous phase was collected and one tenth volume of CTAB solution [10% (w/v) CTAB, 0.7 M NaCl] was added to the top aqueous phase. A second chloroform-isoamylalcohol extraction was performed and centrifuged again. One volume of the top phase was added to two volumes of CTAB precipitation buffer [1% CTAB, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)], and placed on ice for 30 min and then centrifuged at 11,000 g for 3 min. The pellet was resuspended in 100 µl TE buffer [0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)] containing 1 M NaCl and heated to 65°C for 5 min. DNA was precipitated, washed, dried and dissolved in TE buffer.

Random amplified polymorphic DNA PCR (RAPD-PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) amplification was performed in 25 µl volume containing 2.5 µl 5x *Taq* DNA polymerase buffer (USB), 100 µM each of dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 5 pmol primer (Operon Kit A, Operon Technologies Inc., California, USA), 200 ng of genomic DNA and 2.5 mM MgCl₂ and 1.0 unit *Taq* DNA polymerase.

Amplification was performed in a Ericom DNA Delta Cycler I programmed for 45 cycles of 1 min denaturation at 95°C, 1 min annealing at 30°C (when screening for primers) or 37°C (all other experiments) and 2 min extension at 72°C (Kim and Richardson, 1993; 1994). Twenty microlitres of the reaction products were separated by electrophoresis through 1.5% agarose gels and stained with ethidium bromide.

Agarose gels were photographed with a Kodak Polaroid camera over a UV transilluminator (312 nm) using 667 film.

Table 1. List of species, habitat and collection sites

Collection number	Species	Collection sites	Chemical composition ¹		
			Protein	Lipid	Ash
KMCC C-19	<i>C. stigmatophora</i>	UTEX 993, USA	20.10	1.80	47.09
KMCC C-20	<i>C. ellipsoidea</i>	Japan	26.46	8.66	38.67
KMCC C-21	<i>C. ellipsoidea</i> ²	UTEX 247, USA	29.48	0.12	32.67
KMCC C-22	<i>C. vulgaris</i>	Nacdong	33.11	1.03	30.05
KMCC C-23	<i>C. sp.</i>	Kamcheon	41.16	6.85	30.05
KMCC C-24	<i>C. sp.</i>	Suncheon	23.66	10.85	41.18
KMCC C-25	<i>C. sp.</i>	Suncheon	30.87	3.69	34.68
KMCC C-26	<i>C. sp.</i>	Suncheon	31.70	6.77	30.80
KMCC C-27	<i>C. sp.</i>	Yecheon	24.96	2.21	37.66
KMCC C-28	<i>C. sp.</i>	Nacdong	26.65	4.93	34.46
KMCC C-29	<i>C. sp.</i>	Nacdong	21.64	7.44	35.62
KMCC C-30	<i>C. sp.</i>	Nacdong	21.60	6.99	31.71
KMCC C-31	<i>Nannochloris oculata</i>	UTEX LB 1988, USA	33.55	1.87	40.76
KMCC C-32	<i>Nannochloris salina</i>	Seri-2, USA	25.02	8.38	37.99
KMCC C-33	<i>Nannochloropsis sp.</i>	Israel	35.19	3.65	29.49
KMCC FC-4	<i>C. pyrenoidosa</i>	UTEX 26, USA		N.D. ³	
KMCC FC-5	<i>C. ellipsoidea</i>	UTEX 27, USA		N.D. ³	
KMCC FC-6	<i>C. ellipsoidea</i>	UTEX 20, USA		N.D. ³	

¹ Hur and Lee. (1996) Chemical composition of microalgae. J. Aquaculture, 9 (4) in press.

² Fresh water *Chlorella* acclimatized in sea water.

³ Not determined.

DATA Analysis

Band sharing analysis was carried out for RAPD data using pairwise comparison of the samples according to the formula of Nei and Li (1979). The formula of coefficient similarity is $F = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$, where n_x is the total number of DNA fragments from sample X, n_y is the total number of DNA fragments from sample Y and n_{xy} is the number of DNA fragments that were identical in the two samples. In a comparison of two samples, F values close to 1.0 indicate high degree of genetic similarity. An F values of 1.0 indicate that the two samples are identical.

Results

In order to assess the usefulness of the polymere

ase chain reaction using random amplified polymorphic DNA (RAPD) primers in the differentiation and characterization of *Chlorella* and *Nannochloris* species collected from various localities around the Korea peninsular, DNA from samples given in Table 1 were isolated by the CTAB extraction method as described in "Materials and Methods." Chemical compositions of the collected *Chlorella* and *Nannochloris* species are also listed in Table 1. As shown in Fig. 1, genomic DNA was successfully isolated and purity of DNA was an OD_{260/280} ratio ranging from 0.85 to 1.3

Twenty 10-mer anonymous primers were screened for amplification of genomic DNA extracted from samples using the template DNA from *Chlorella ellipsoidea* (KMCC C-20). Of the 20 primers screened, Nineteen of these oligonucleotide primers were able to generate amplification products or band producing, ex-



Fig. 1. Genomic DNA isolated from *Chlorella* and *Nannochloris* species.
Lane M indicates a molecular weight marker, lane 1, KMCC C-19 (*C. stigmatophora*); lane 2, KMCC C-20 (*C. ellipsoidea*); lane 3, KMCC C-21 (*C. ellipsoidea*); lane 4, KMCC C-22 (*C. vulgaris*); lane 5, KMCC C-23 (*C. sp.*); lane 6, KMCC C-24 (*C. sp.*); lane 7, KMCC C-25 (*C. sp.*); lane 8, KMCC C-26 (*C. sp.*); lane 9, KMCC C-27 (*C. sp.*); lane 10, KMCC C-28 (*C. sp.*); lane 11, KMCC C-29 (*C. sp.*); lane 12, KMCC C-30 (*C. sp.*); lane 13, KMCC C-31 (*Nannochloris oculata*); lane 14, KMCC C-32 (*Nannochloris salina*); lane 15, KMCC C-33 (*Nannochloropsis sp.*); lane 16, KMCC FC-4 (*C. pyrenoidosa*); lane 17, KMCC FC-5 (*C. ellipsoidea*); lane 18, KMCC FC-6 (*C. ellipsoidea*).



Fig. 2. PCR amplification of genomic DNA from KMCC C-20 (*Chlorella ellipsoidea*) with primers OPA-01-OPA-20.
Lane M indicates a molecular weight marker; lane 1 was RAPD bands using the primer OPA 01; lane 2, OPA 2; lane 3, OPA 3; lane 4, OPA 4; lane 5, OPA 5; lane 6, OPA 6; lane 7, OPA 7; lane 8, OPA 8; lane 9, OPA 9; lane 10, OPA 10; lane 11, OPA 11; lane 12, OPA 12; lane 13, OPA 13; lane 14, OPA 14; lane 15, OPA 15; lane 16, OPA 16; lane 17, OPA 17; lane 18, OPA 18; lane 19, OPA 19; lane 20, OPA 20.

hibiting varying degrees of polymorphism among isolates (Fig. 2).

Polymorphic DNA loci from *Chlorella* and *Nannochloris* samples were detected by three of the primers (OPA 10, OPA 12, and OPA 18) and resulted in both clear band resolution and a high degree of reproducibility (Fig. 3, 4, 5). These primers are GC rich and their sequences are listed in Table 2. The sizes of DNA fragments amplified with the three primers ranged from 0.2 to 3.0 kb. The number of PCR products generated varied from 0 to 15, depending on the

Table 2. Useful RAPD primers: sequences and GC contents

Primer	Sequence	GC content(%)
OPA-9	GGGTAACGCC	70
OPA-10	GTGATCGCAG	60
OPA-11	TCGGCGATAG	60
OPA-12	AGGTGACCGT	60

combination of sample and primer used.

Especially, Fig. 5 shows a reproducible RAPD profile of different sizes of amplification products gene-

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Identification of Genetic Variation in *Chlorella* species



Fig. 3. PCR amplification of genomic DNA from *Chlorella* and *Nannochloris* species with the primer OPA-10. Lane M indicates a molecular weight marker. The number above the lanes corresponds to lane explanation in Fig. 1.

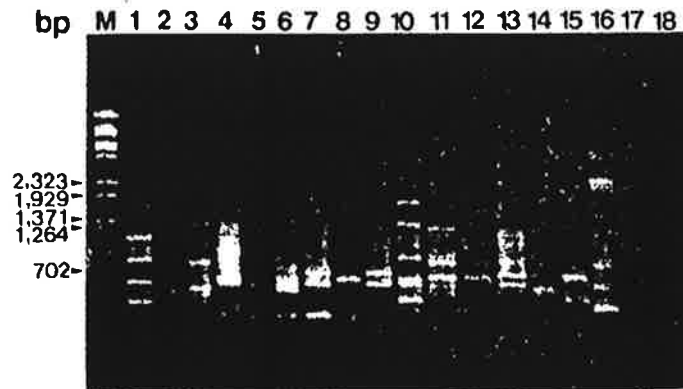


Fig. 4. Random amplified DNA polymorphisms of 18 samples of genomic DNA from *Chlorella* and *Nannochloris* species with primers OPA-12. Lane M indicates a molecular weight marker. The number above the lanes corresponds to lane explanation in Fig. 1.

rated using primer OPA-12 and tested samples. The DNA banding patterns resulted from the primer provide evidence for both genetically hetero- and homogeneous populations in different species and isolates.

Although use of the single primer revealed polymorphic loci, no species-specific bands were apparent (Fig. 4). However, there was at least one characteristic band or PCR product unique to the individual populations of each species. There are bands that are

shared by samples within the species as well as bands unique to individual samples. There are also bands that are restricted to or unique to only one or a few samples.

OPA-12 primer failed to generate any amplification product only with the template DNA from KMCC FC-6 (Fig. 4; lane 18).

The degree of similarity between various RAPD-PCR patterns for different samples was assessed by



Fig. 5. Reproducibility of RAPD-PCR. Individual PCR amplifications using DNA from KMCC C-20 (*Chlorella ellipsoidea*) using the primer OPA-18.

calculation F (coefficient of similarity) values according to the method of Nei and Li (1979). These calculations were based on the degree of sharing of bands among the samples (Table 3). The calculated value of F among the samples within *Chlorella* and *Nannochloris* species ranged from 0 to 1.0. An F value of 1.0 indicates that the two samples are identical. Some of the samples in the group are totally different ($F=0$) and the highest F value was obtained with 3 samples KMCC C-23 and C-25 and C-27. Interestingly, these 3 samples of *Chlorella* species were collected from 3 different localities at the southern coast of the Korea peninsular (Table 1). Especially, C-25 and C-27 are genetically identical even though the chemical composition are different each other (Table 1). Interestingly, *Chlorella* and *Nannochloris* species collected from different localities also shared some genetic similarity (Table 3).

To assess the reproducibility of RAPD-PCR, PCR amplifications were performed on multiple identical samples. The DNA bands patterns produced by RAPD-PCR showed good reproducibility although some minor variability was noted (Fig. 5).

Discussion

RAPD-PCR is a relatively simple and reliable technique for genomic mapping, identification of isolates, screening of molecular markers, and applications in population biology. In this experiment, RAPD polymorphism generated with arbitrary primers gave reliable phylogenetic grouping of *Chlorella* and *Nannochloris* species collected from different localities around the Korea peninsular. Genetic diversity within a collection of eighteen isolates was analyzed based on their polymorphisms with RAPD-PCR markers. The band pattern analysis by the RAPD method revealed polymorphism within species of *Chlorella* and *Nannochloris* and established DNA fingerprints useful for phylogenetic characterization.

The DNA banding patterns of *Chlorella* and *Nannochloris* species from the investigated sites provide evidence for both genetic homogeneity and diversity within individual populations, as well as differences between geographically separated populations. Members of the *Chlorella* collected in sea water show to have good balanced nutritive elements (Table 1), mainly highly unsaturated fatty acids and aminoacids that are required for fish larvae and crustaceans. To maintain and screen for good strains of *Chlorella* for aquacultural applications, it is worthy identifying and characterizing the genetic variation in *Chlorella* species.

The presence of tough cell walls causes several problems associated with DNA extraction from *Chlorella* species. However, the CTAB method used in this study gave good results as it may be the most efficient method in removing cell walls. The obtained DNA was relatively intact and was readily amplified by PCR. In order to differentiate acute genetic variation in tested samples, it is important to have the reproducibility of RAPD patterns. When extreme care were taken in conducting the RAPD procedure, the major banding pattern for a particular combination of primer and DNA was reproducible for replicates in experiments.

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Identification of Genetic Variation in *Chlorella* species

Table 3. Calculated F values among *Chlorella* species based on band sharing Analysis for primer OPA 12

	C-19	C-20	C-21	C-22	C-23	C-24	C-25	C-26	C-27	C-28	C-29	C-30	C-31	C-32	C-33	FC-4	FC-5	FC-6
C-19	-																	
C-20	0.266	-																
C-21	0.333	0.364	-															
C-22	0.421	0.000	0.125	-														
C-23	0.166	0.000	0.000	0.181	-													
C-24	0.400	0.200	0.307	0.666	0.250	-												
C-25	0.077	0.000	0.200	0.333	0.800	0.444	-											
C-26	0.181	0.000	0.000	0.200	0.000	0.286	0.000	-										
C-27	0.166	0.000	0.000	0.181	1.000	0.250	0.800	0.000	-									
C-28	0.444	0.153	0.250	0.555	0.000	0.266	0.000	0.200	0.000	-								
C-29	0.380	0.266	0.444	0.500	0.154	0.235	0.143	0.166	0.154	0.100	-							
C-30	0.352	0.444	0.461	0.266	0.250	0.166	0.222	0.000	0.250	0.133	0.588	-						
C-31	0.470	0.307	0.375	0.444	0.363	0.266	0.444	0.000	0.363	0.222	0.400	0.266	-					
C-32	0.285	0.222	0.500	0.428	0.000	0.363	0.000	0.000	0.000	0.285	0.375	0.000	0.000	-				
C-33	0.066	0.200	0.307	0.400	0.250	0.333	0.250	0.286	0.250	0.533	0.235	0.333	0.133	0.000	-			
FC-4	0.588	0.000	0.266	0.117	0.000	0.285	0.181	0.000	0.000	0.235	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-		
FC-5	0.076	0.000	0.200	0.166	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.181	-	
FC-6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

This is the first report on the use of a PCR-based polymorphism assay to differentiate and characterize the *Chlorella* species. Since genetic variation of the species starts from a minor nucleotide change and its accumulation, we applied the RAPD technique which provides highly sensitive detection in distinguishing nucleotide difference. We have detected large genetic variation among the *Chlorella* species. The degree of genetic similarities between various RAPD-PCR patterns for various samples were calculated by F (coefficient of similarity) values. Distance matrix analysis indicates considerable genetic variation among the *Chlorella* species (Table 3). The calculated F value among the samples within *Chlorella* and *Nannochloris* species ranged from 0 to 1.0, indicating that some of the samples in the group are totally different genotypes and the two samples were identical, although the samples were collected from different localities and differed in chemical composition. Also, *Chlorella* and *Nannochloris* species collected from different localities showed some genetic similarity, suggesting that the isolates are genetically related to the inter-species. Thus, some specific RAPD bands found in Fig. 4 simply tell us that dynamic nucleotide mutations have been occurred from the isolates.

The present study suggests that RAPD-PCR is useful in discriminating individual samples within the specific genotypes. It may also be useful in determining phylogenetic relationships between species within a genus and in developing individual fingerprints for each samples. However, additional studies using various molecular techniques should be conducted in order to draw a clear conclusion about taxonomic status of the *Chlorella* and *Nannochloris* species.

Acknowledgments

This study was supported by the Research Center for Ocean Industrial Development (RCOID) designated by Korea Science and Engineering Foundation

(KOSEF), Korea.

References

- Baird, E., S. Cooper-Bland, R. Waugh, M. De maine, and W. Powell. 1992. Molecular characterization of inter- And intra-specific somatic hybrids of potato using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Mol. Gen. Genet.*, 233, 469~475.
- Dutcher, J. A. and D. F. Kapraun. 1994. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) identification of genetic variation in three species of Porphyra (Bangiales, Rhodophyta). *J. of Appl. Phycology*, 6, 267~273.
- Guillard, R. and J. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella* and *Detonula confervacea* (Cleve). *Can. J. Microbiol.*, 8, 229~239.
- Hadrj, H., M. Balick, and B. Schierwater. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.*, 1, 55~66.
- Hirayama, K. and S. Ogawa. 1972. Fundamental studies on physiology of rotifer for its mass culture I. Filter feeding of rotifer. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 38, 1207~1214.
- Hirayama, K., K. Takagi, and H. Kimura. 1979. Nutritional effect of eight species of marine phytoplankton on population growth of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 45, 11~16.
- Hirayama, K., K. Watanabe, and T. Kusano. 1973. Fundamental studies on physiology of rotifer for its mass culture III. Influence of phytoplankton density on population growth. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 39, 1123~1127.
- Ho, C.-L., S.-M. Pang, and T. Pang. 1995. Molecular characterization of *Sargassum polycystum* and *S. siliquosum* (Phaeophyta) by polymerase chain

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Identification of Genetic Variation in *Chlorella* species

- reaction (PCR) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) primers. *J. of Appl. Phycology*, 7, 33~41.
- Hur, S. B. 1992. culture collection of marine microalgae. *J. of Aquaculture*, 5, 81~91.
- Hur, S. B. and H. J. Kim. 1988. Chlorella cultivation for mass culture of rotifer, *Brachionus plicatilis* I. Selection of suitable Chlorella species. *J. of Aquaculture*, 1, 135~143.
- Innis, M. A. and D. H. Gelfand. 1990. in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, Academic Press, San Diego, pp. 3~12.
- Kapraun, D. F., J. A. Dutcher and J. Lopez-Bautista. 1992. Nuclear genome characterization of the carageenophyte *Agardhiella subulata* (Rhodophyta). *J. appl. Phycol.*, 4, 129~137.
- Kim, Y. T. and C. C. Richardson. 1993. Bacteriophage T7 gene 2.5 protein: and essential protein for DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90, 10173~10177.
- Kim, Y. T. and C. C. Richardson. 1994. cidic carboxyl-terminal domain of gene 2.5 protein of bacteriophage T7 is essential for protein-protein interactions. *J. Biol. Chem.*, 269, 5270~5278.
- Murray, M. G., and W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.*, 8, 43~47.
- Nei, M., and W. H. Li. 1979. Mathematical model for study genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 74, 5267~5273.
- Rogers, S. O., S. Rehner, C. Bledsoe, G. J. Mueller, and J. F. Ammirai. 1989. Extraction of DNA from basidiomycetes for ribosomal DNA hybridizations. *Can. J. Bot.*, 67, 1235~1243.
- Snell, T. W., Bieberich, C. J. and Fuerst, R., 1983. The effects of green and blue-green algal diets on the reproductive rate of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*, 31, 21~30.
- Watanabe, T., C. Arakawa, C. Kitajima, and S. Fujita. 1984. Effect of nutritional quality of broodstock diets on reproduction of red sea bream. *Bull Jap. Soc. Sci. Fish*, 50, 495~501.
- Watanabe, T., C. Kitajima, and S. Fujita. 1983. Nutritional value of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture*, 34 : 115~143.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Raffalski, and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18, 6531~6535.

Received October 17, 1996

Accepted November 2, 1996

여 백

먹이에 따른 한국산 S-type Rotifer, *Brachionus plicatilis*의
내구란 생산과 부화율*

박흥기 · 허성범
부경대학교 양식학과

**Production and Hatching Rate of Resting Egg of Korean Rotifer,
Brachionus plicatilis (S-type) with Different Diets***

Heum Gi Park and Sung Bum Hur
Department of Aquaculture, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

韓國養殖學會誌 第9卷 第4號(1996年 11月 別刷)

Reprinted from the
JOURNAL OF AQUACULTURE VOL. 9 NO. 4
November 1996

여 백

먹이에 따른 한국산 S-type Rotifer, *Brachionus plicatilis*의 내구란 생산과 부화율*

박흥기 · 허성범
부경대학교 양식학과

Production and Hatching Rate of Resting Egg of Korean Rotifer, *Brachionus plicatilis* (S-type) with Different Diets*

Heum Gi Park and Sung Bum Hur

Department of Aquaculture, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Dietary values of phytoplanktons, concentrated *Chlorella* and commercial yeasts were investigated for the resting egg production of the Korean rotifer, *B. plicatilis* S-type. The hatching rate of the resting egg of the rotifer fed on different diets was also studied.

The highest production of the resting egg was 3,760 eggs/20 ml with *N. oculata*. However, the hatching rate was not significant among 4 phytoplankton species.

The highest production of resting eggs among 9 diet groups (ω -yeast, baker's yeast, 2 refrigerated Marine *Chlorella*, frozen Marine *Chlorella*, frozen *Chlorella* (70%)+baker's yeast (30%), frozen *Chlorella* (30%)+baker's yeast (70%), 2 refrigerated freshwater *Chlorella*) was 283 eggs/ml in the frozen *Chlorella* (30%)+baker's yeast (70%) and the refrigerated freshwater *Chlorella*. The highest number of resting egg from 10,000 rotifers and 1 mg dry weight diet was 5,566 eggs and 2,131 eggs in the frozen *Chlorella* (30%)+baker's yeast (70%). However, the highest hatching rate of the resting eggs was 67.4% in ω -yeast.

In this study, the results suggest that the baker's yeast with a small amount of frozen *Chlorella* seems to be good feeding regime for the economical production of resting eggs.

Key words : Rotifer, *Brachionus plicatilis*, Resting egg, Mixis rate, Hatching rate

서 론

Rotifer, *Brachionus plicatilis*는 해산어류 종묘생산시 초기 먹이생물로 많이 이용되고 있다. Rotifer의 생활사는 male에 관계없이 amictic female이 난를 생산하는 처녀생식과 수컷이 출현하여 미수정 mictic female과 교미에 의해 수정란(resting egg)을 형성하는 유성생식으로

나누어 진다(日野, 1981; Pourriot and Snell, 1983; 古澤, 1989).

Rotifer 내구란은 strain보관 뿐만아니라 rotifer를 대량배양하기 위한 seed로서 이용될 수 있고 Artemia처럼 부화시켜 직접 어류자어의 먹이로서 공급이 가능하며 어류종묘생산시 효과적인 먹이생물로 이용될 수 있다(Hagiwara et al., 1993b). 일반적으로 내구란 형성 요인은 정확하게 밝

* 본 연구는 농림수산특정연구과제(현장애로)의 연구비 지원에 의해 수행되었음.

혀져 있지 않지만 지금까지는 strain과 clone에 따른 내적요인(Hino and Hirano, 1976, 1977, 1985, 1988; Snell and Hoff, 1985; Hagiwara et al., 1988b; Hagiwara and Hino, 1989, 1990)과 수온(Hino and Hirano, 1984; Snell and Hoff, 1985; Hagiwara et al., 1988a; Hagiwara and Lee, 1991), 염분(Lubzens et al., 1985; Snell and Hoff, 1985; Snell, 1986; Hino and Hirano, 1988; Hagiwara et al., 1988a, 1989), 먹이밀도 및 종류(Snell and Hoff, 1985, 1987; Snell and Boyer, 1988; Hamada et al., 1993), 배양밀도(Hino and Hirano, 1976; Snell and Boyer, 1988), 사육수 교환(Hino and Hirano, 1976), 암모니아 농도(Snell and Boyer, 1988; Hamada et al., 1993) 등의 외적 요인이 있는 것으로 보고되고 있다.

내구란 형성은 rotifer 생활사(日野, 1981; Pourriot and Snell, 1983; Hagiwara and Hirayama, 1993)의 연속적인 단계에서 생산되며 rotifer의 개체밀도와 유성생식률이 증가하여 내구란 생산이 증가된다(Hagiwara et al., 1988a, 1989, Snell and Boyer, 1988). 그러나 rotifer의 개체밀도가 증가되면서 먹이 부족 현상이 일어나게되며 먹이량이 부족하면 rotifer의 생활사 정지로 많은 내구란을 생산할수 없다(Hagiwara and Lee, 1991; Hagiwara and Hirayama, 1993; Hagiwara, 1994; Hamada et al., 1993). 또한 rotifer 연속배양방법에 따른 사육수의 첨가나 교환은 유성생식률을 낮게하여 내구란 생산을 저하시키고(Hino and Hirano, 1977) 먹이종류와 밀도가 유성생식에 영향을 주며(Snell and Boyer, 1988) 이때 형성된 내구란은 부화

률에 영향을 미친다(Hagiwara and Hino, 1990)고 보고 되어져 있다. 그러므로 효과적인 내구란 생산을 위해서는 높은 개체밀도 유지와 유성생식률을 증가시키기 위한 알맞은 영양가를 지닌 농축된 먹이를 충분히 공급해주어야 한다. 이러한 관점에서 Hamada et al., (1993)은 L과 S-type rotifer를 대상으로 농축된 먹이에 따른 내구란 생산을 보고하였다.

본 연구는 한국산 rotifer, *Brachionus plicatilis* S-type의 내구란을 대량생산하기위해 rotifer 배양에 이용되고 여러 종류 식물플랑크톤과 농축된 먹이를 대상으로 가장 적합한 먹이를 파악하기위해 실시하였다.

재료 및 방법

1. 식물 먹이생물에 따른 내구란 생산과 부화율
Rotifer는 전남 고흥군 재두 염전에서 분리한 S-type rotifer, *B. plicatilis* (C-S) strain (허·박, 1996)을 사용하였다. 28℃, 15 ppt에서 형성된 내구란을 3개월 동안 4℃에 냉장보관한 후 28℃, 15 ppt, 2,000 lux에서 36시간 동안 부화시켜 갓 태어난 female 20개체를 30 ml (배양수 20 ml) 시험관에 접종하였다. 실험에 사용된 식물 먹이생물은 부경대학교 한국해양미세조류은행에서 분양받은 것으로 먹이 종류와 공급량은 Table 1과 같다. 먹이생물은 Conway배지(Walne, 1966)로 배양한 다음, 원심분리기로 세포만을 농축하여 공급하였다. 배양조건은 수온 28℃, 염분 15 ppt, 조도 2,000 lux로 하였다.

시험관에서 배양된 rotifer 개체수는 실험 2일째부터 난을 달고 있지 않은 female (?♀), 처녀생식을 하는 female (우♀), male을 생산하

Table 1. Live food used for the study

Live Food	Amount of food density/2 day
<i>Chlorella ellipsoidea</i> (KMMCC-C-C-21)	12.0×10 ⁸ cells
<i>Nannochloris oculata</i> (KMMCC-C-C-31)	25.0×10 ⁸ cells
<i>Tetraselmis suecica</i> (KMMCC-C-P-4)	0.6×10 ⁸ cells
<i>Pavlova lutheri</i> (KMMCC-C-H-4)	4.0×10 ⁸ cells

는 female (♂♀), 내구란을 생산하는 female (D♀) 그리고 ♂ (male)의 개체수를 매일 조사하였다. ?우는 0.5 ml multi culture plate에 한개체씩 10개체를 독립적으로 수용한 후 배양하면서 female의 형태변화를 조사하였다. 이때 각 형태의 female 비율을 최초 시험관속에서 ?우개체수에 적용하여 각 형태의 female 개체수로 환산하였다. 각 female의 형태는 Hagiwara et al. (1988a)의 방법에 의했다.

유성생식률(mixis rate, (♂♀ + D♀)/우우 × 100)과 수정률(D♀/(♂♀ + D♀) × 100)은 Hagiwara et al. (1988a)의 방법에 따라 계산하였다. 그리고 배양기간 중 rotifer의 최고밀도(개체수/ml)와 성장률(specific growth rate, r)를 조사하였다(박·허, 1996). 실험은 9일간 하였고 실험 종료시 망목 50 µm seive를 이용하여 총 내구란수를 조사하였다. Rotifer 배양 실험구는 1일 2회 흔들어서 주었고 2회 반복 실험하였다.

식물 먹이생물에 따라 형성된 내구란의 부화율은 내구란을 증류수에 3개월동안 4℃ 냉장고에서 보관하여 내구란 100개를 5 ml (배양수 4 ml) multi culture plate에 수용하여 15 ppt, 28℃, 3,000 lux 조건하에서 36시간 경과후 부화율을 조사하였고 실험은 2회 반복하였다.

2. 농축된 먹이종류에 따른 내구란 생산과 부화율

Rotifer는 실험 1에서 사용한 동일한 strain으로 내구란을 28℃, 15 ppt, 3,000 lux로 부화시켜 36시간후 갖 부화한 15개 rotifer clone을 30 ml (배양액 25ml) 시험관에 1개체씩 각각 수용하여 내구란 생산이 가장 높은 clone을 선택하여 실험에 사용하였다. 먹이 실험구는 유지효모구(이화유지주식회사), 빵효모구(삼립식품주식회사), 해수산 *C. ellipsoidea* (KMMCC-C-21)를 대량배양하여 농축시킨 해수산 *Chlorella* 구(120 × 10⁸ cells/ml), 해수산 *C. ellipsoidea* (KMMCC-C-21)를 세포만 농축하여 -30℃에 냉동보관한 냉동 *Chlorella* 구, 빵효모(30%) + 냉동 *Chlorella* (70%) 혼합구, 빵효모(70%) +

냉동 해수산 *Chlorella* (30%) 혼합구, 일본 해수산 농축 *Chlorella* 구(상품명 Marin α), 일본 크로레라주식회사에서 제조한 두 종류의 일본 담수산 *Chlorella* 구(상품명 Uni *Chlorella* - 판매원, 사이엔스, 상품명 Fresh green 600 - 판매원, 그로스시주식회사)로 모두 9개 실험구였다. 먹이 공급량은 rotifer 25개체/ml를 기준으로 각 먹이의 건조중량 15 µg/day로 공급하였다. Rotifer는 250 ml 삼각플라스크(배양수 200 ml)에 9~10개체/ml로 접종하였고 수온 28℃, 염분 15 ppt, 조도 2,000 lux에서 1일 2회 배양용기를 흔들어 주었으며 실험기간은 9일간으로 3회 반복 실험하였다. Rotifer 개체수와 성장률, 유성생식률, 수정률 조사는 실험 1과 동일하였다.

농축된 먹이생물에 따라 형성된 내구란을 염분 15 ppt, 2℃에서 3개월동안 보관한 후 5 ml (배양액 4 ml) multi culture plate에 내구란 300~400개 수용하여 15 ppt, 28℃, 2,000 lux에서 36시간 경과후 부화율을 조사하였다. 실험은 4회 반복하였다.

이들 결과는 SPSS for Window program을 사용하여 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)로 평균간의 유의성을 검정하였다.

결 과

4 종류의 식물 먹이생물에 따른 rotifer의 내구란 생산은 Fig. 1과 Table 2와 같다. 실험기간 최고밀도는 *N. oculata*를 공급한 실험구가 7일째 825개체/ml로 가장 높게 나타났고 다음은 *C. ellipsoidea*로 9일째 730개체/ml 나타났지만 두 실험구는 유의적인 차이가 없었다. 그러나 운동성인 편모를 지니고 있는 *P. lutheri*, *T. suecica*를 공급한 실험구는 5일째 각각 343, 332개체/ml로 최고 밀도로 도달한후 6일째부터 감소하였다. 그러나 성장률은 *P. lutheri*, *T. suecica* 공급구가 각각 1.160, 1.161로 다른 실험구보다 높게 나타났다. 먹이에 따른 유성생식률은 *P. lutheri* 공급구가 22.9%로 가장 높게 나타났지만 다른

Table 2. Growth and resting egg production of Korean rotifer, *Brachionus plicatilis* S-type with different microalgae

Species	Maximum rotifer density (inds./ml)	Specific growth rate	Mixis rate (%)	Fertilization (%)	Number of resting eggs/20 ml	Hatching percentage
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	730± 65.0 ^b	0.824±0.0565 ^a	17.56±5.05 ^a	19.5± 1.45 ^a	592±182.5 ^a	40.0±8.0 ^a
<i>Nannochloris oculata</i>	825±130.0 ^b	0.960±0.0575 ^{ab}	17.4 ±1.35 ^a	60.1± 4.35 ^b	3,760±255.0 ^b	61.0±0.0 ^a
<i>Pavlova lutheri</i>	343± 42.5 ^a	1.160±0.0250 ^b	22.9 ±0.75 ^a	50.5±13.80 ^{ab}	1,910±935.0 ^{ab}	43.5±2.5 ^a
<i>Tetraselmis suecica</i>	332± 95.0 ^a	1.161±0.1100 ^b	16.7 ±1.35 ^a	45.7± 8.30 ^{ab}	915±420.0 ^a	50.5±8.5 ^a

Values in the same column within the same letter are not different, P<0.05.

실험구와는 유의성이 없었다. 수정률은 *N. oculata*를 공급한 실험구가 가장 높은 60.1% 였지만

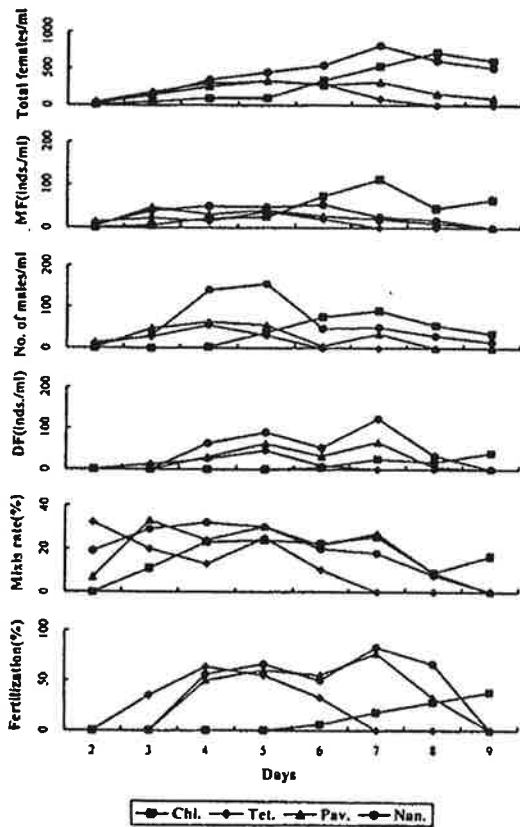


Fig. 1. Variations of population of the S-type rotifer, *Brachionus plicatilis* fed on different live foods (Chl. ; *Chlorella ellipsoidea*, Tet. ; *Tetraselmis suecica*, Pav. ; *Pavlova lutheri*, Nan. ; *Nannochloris oculata*, MF ; mictic female producing resting egg).

*C. ellipsoidea*를 공급한 실험구를 제외하고는 유의적 차이를 보이지 않았다. 먹이종류에 따른 rotifer 내구란 생산은 *N. oculata*가 3,760개/20 ml로 가장 많이 생산 되었고, 다음은 *P. lutheri* 실험구(1,910개/20 ml)이며 *C. ellipsoidea*를 공급한 실험구는 592개/20 ml로 가장 낮은 생산을 보였다.

먹이 생물에 따른 내구란의 부화율은 *N. oculata*를 먹이로 공급하여 형성된 내구란이 61%로 가장 높게 나타났고, *T. suecica* 50.5%, *P. lutheri* 43.5%, *C. ellipsoidea* 40.0% 순으로 나타났지만 서로 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

농축 먹이 종류에 따른 S-type rotifer의 최대밀도, 성장률, 유성생식률, 수정률 및 내구란 생산은 Table 3과 같다. Rotifer 최대밀도는 일본 담수산 농축 *Chlorella*인 *Uni Chlorella*가 717 개체/ml로 가장 높게 나타났다. 빵효모(30%) + 냉동 *Chlorella*(70%) 혼합구는 608개체/ml로 일본 담수산 *Chlorella* Fresh green 600 (627 개체/ml) 보다 낮게 나타났지만 유의적인 차이는 없었고 빵효모(70%) + 냉동 *Chlorella* (30%) 혼합구(522개체/ml)보다는 높게 나타났다. 냉장, 냉동 해수산 *Chlorella*는 각각 398개체/ml, 386 개체/ml로 일본 해수산 *Marine a* (273개체/ml) 보다는 높게 나타났다. 효모류인 빵효모는 323 개체/ml로 유지효모(225개체/ml)보다 높게 나타났다.

성장률은 냉동 *Chlorella*가 0.446로 가장 높게 나타났고 냉장 *Chlorella*와 담수산 *Uni Chlorella*가 각각 0.414, 0.418로 높게 나타났지만 이들간의 유의적인 차이는 없었다. 빵효모+냉동

Table 3. Growth, sexual reproduction and production of resting egg of Korean rotifer, *Brachionus plicatilis* S-type cultured for 9 days with different diets

Diets	Maximum density (inds./ml)	Specific growth rate (r)	Mixis rate (%)	Fertilization (%)	Number of resting eggs (inds./ml)	Number of resting eggs/($\times 10^4$ rotifer)	Number of resting eggs/1 mg (dry weight) diet	Hatching rate (%)
ω -Yeast	225 \pm 10.0 ^a	0.338 \pm 0.0178 ^a	22.0 \pm 0.94 ^{bc}	50.1 \pm 12.31 ^{bc}	48 \pm 14.5 ^a	2,251 \pm 642.0 ^b	67 \pm 16.2 ^b	67.4 \pm 1.78 ^d
Baker's Yeast	323 \pm 9.3 ^{bc}	0.351 \pm 0.0098 ^a	20.2 \pm 0.53 ^b	47.7 \pm 1.71 ^{bc}	55 \pm 2.9 ^a	1,705 \pm 105.9 ^b	55 \pm 4.7 ^{ab}	32.8 \pm 2.83 ^a
Frozen <i>Chlorella</i> ^a	386 \pm 12.2 ^c	0.446 \pm 0.0037 ^c	27.5 \pm 2.39 ^{cd}	24.6 \pm 4.73 ^a	68 \pm 1.7 ^{ab}	1,776 \pm 96.4 ^b	79 \pm 6.7 ^{bc}	43.3 \pm 1.83 ^c
Refrigerated <i>Chlorella</i> ^{**}	398 \pm 61.2 ^c	0.414 \pm 0.0270 ^{bc}	33.1 \pm 0.20 ^d	62.5 \pm 9.24 ^c	115 \pm 16.1 ^b	2,983 \pm 489.2 ^{bc}	119 \pm 15.0 ^c	37.8 \pm 1.17 ^{ab}
BY (30%)+FC (70%)	608 \pm 21.1 ^c	0.402 \pm 0.0035 ^b	30.6 \pm 2.24 ^d	56.7 \pm 6.69 ^{bc}	263 \pm 14.5 ^c	4,355 \pm 368.7 ^{de}	181 \pm 12.8 ^d	45.5 \pm 1.67 ^c
BY (70%)+FC (30%)	522 \pm 14.8 ^d	0.387 \pm 0.0026 ^b	26.0 \pm 3.58 ^{bcd}	63.1 \pm 7.93 ^c	283 \pm 29.2 ^c	5,566 \pm 697.0 ^c	213 \pm 20.3 ^d	36.4 \pm 0.68 ^{ab}
Marine α	273 \pm 22.4 ^{ab}	0.345 \pm 0.0092 ^a	11.7 \pm 3.23 ^{ab}	34.71/ 1.61 ^{ab}	11 \pm 4.4 ^a	434 \pm 155.3 ^a	14 \pm 5.2 ^a	
Uni <i>Chlorella</i>	717 \pm 28.5 ^f	0.418 \pm 0.0042 ^{bc}	27.4 \pm 2.88 ^{bcd}	45.0 \pm 2.58 ^{abc}	283 \pm 41.0 ^c	3,813 \pm 556.4 ^{cd}	179 \pm 22.9 ^a	60.7 \pm 0.83 ^d
Fresh green 600	627 \pm 16.7 ^e	0.405 \pm 0.0027 ^b	22.1 \pm 0.74 ^{bc}	43.4 \pm 5.80 ^{abc}	263 \pm 8.8 ^c	4,201 \pm 51.6 ^{cd}	171 \pm 6.5 ^a	40.6 \pm 1.92 ^{bc}

Values in the same column with the same letter are not different, P<0.05.

BY : baker's yeast.

FC : frozen *Chlorella*.

* : 7 culture day.

** : 8 culture day.

Chlorella 혼합구와 담수산 Fresh green 600의 성장률은 0.387~0.405로 나타났다. 또 유지효모, 빵효모, Marine α 는 성장률이 0.338~0.351로 비교적 낮게 나타났다.

유성생식률은 해수산 농축 *Chlorella* (33.1%), 빵효모(30%)+냉동 *Chlorella* (70%) 혼합구(30.6%), 담수산 Uni *Chlorella* (27.4%), 빵효모(70%)+냉동 *Chlorella* (30%) 혼합구(26.0%), 냉동 *Chlorella* (27.5%)순으로 높게 나타났다지만 서로간의 유의성은 나타나지 않았다. 유지효모(22.0%)는 빵효모(20.2%)보다 유성생식률이 높았지만 유의적인 차이는 없었다. Marine α 는 유성생식률이 11.7%로 가장 낮았다.

수정률은 빵효모(70%)+냉동 *Chlorella* (30%) 혼합구가 가장 높은 63.1%로 나타났지만 냉장 *Chlorella* (62.5%), 빵효모(30%)+냉동 *Chlorella* (70%) 혼합구(56.7%), 유지효모(50.1%), 빵효모(47.7%), Uni *Chlorella* (45.0%), Fresh green 600 (43.3%)과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 냉동 *Chlorella*와 Marine α 는 각각 24.6%, 34.7%의 수정률로 낮았으며 이들 서로간의 유의적인 차이는 없었다.

먹이에 따른 ml당 내구란 생산은 빵효모(70%)+냉동 *Chlorella* (30%) 혼합구와 담수산 Uni *Chlorella*가 283개/ml로 가장 높게 나타났고 빵효모(30%)+냉동 *Chlorella* (70%) 혼합구와 Fresh green 600이 263개/ml로 높게 나타났다. 그러나 이들 먹이간의 유의적인 차이는 없었다. 해수산 냉장 *Chlorella*는 115개/ml로 냉동 *Chlorella* 68개/ml보다 높았지만 두 실험구간에는 유의적인 차이는 없었다. 그러나 유지효모와 빵효모는 각각 48개/ml, 55개/ml로 비교적 낮게 나타났고 해수산 Marine α 는 가장 낮은 11개/ml로 나타났다.

Rotifer 10,000개체당 내구란 생산은 빵효모(70%)+냉동 *Chlorella* (30%) 혼합구와 빵효모(30%)+냉동 *Chlorella* (70%) 혼합구가 각각 5,566, 4,355개로 가장 높게 나타났지만 서로간의 유의적인 차이는 없었다. 담수산 *Chlorella*류인 Uni *Chlorella*와 Fresh green 600은 각각 3,813개, 4,201개로 해수산 냉장 *Chlorella* 2,983개와는 유의적인 차이는 없었다. 그러나 냉동 *Chlorella*보다 유의적으로 높게 나타났다. 유지효모와 빵효모는 각각 2,251개, 1,705개였지만 서로간의

유의적인 차이는 없었고 해수산 Marine α는 434개로 가장 낮게 나타났다.

건조 먹이 1 mg당 내구란 생산은 빵효모(70%) + 냉동 *Chlorella* (30%) 혼합구와 빵효모(30%) + 냉동 *Chlorella* (70%) 혼합구가 각각 213개, 181개로 다른 먹이보다 높게 나타났고 담수산 *Chlorella*인 Uni *Chlorella*와 Fresh green 600이 각각 179개, 171개로 나타났지만 이들 간에는 유의적인 차이는 없었다. 해수산 농축 *Chlorella*는 냉동 *Chlorella* 보다 높았지만 유의적인 차이는 없었고, 유지효모(67개)는 빵효모(55개)보다 높았지만 유의적인 차이는 없었다. 그러나 이들 효모류는 해수산 Marine α (14개)보다는 유의적으로 높게 나타났다.

농축된 먹이 종류에 따른 부화율은 유지효모가 가장 높은 67.4%였고 다음으로 일본 담수산 Uni *Chlorella*가 60.7%로 나타났지만 이들간의 유의적인 차이는 없었다. 일본 담수산 Fresh green 600은 같은 종류인 Uni *Chlorella* 보다 적은 40.6%로 낮게 나타났다. 냉동 *Chlorella*와 빵효모(30%) + 냉동 *C.hlorella* (70%)의 혼합구는 각각 43.3%와 45.5%로 이들간의 부화율은 유의적인 차이는 없었으나 냉장 *Chlorella* (37.8%)와 빵효모(70%)와 냉동 *Chlorella* (30%)의 혼합구(37.8%)보다는 높게 나타났다. 가장 낮은 부화율은 빵효모의 32.8%였다.

고 찰

Rotifer의 먹이로서 *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella* sp., *Tetraselmis* sp. 등의 식물먹이생물과 효모류로서 빵효모, 유지효모 등이 널리 이용되고 있다(平田, 1989b). 최근에는 비타민 A, C, D, E의 첨가(Satuito and Hirayama, 1986), 지방산의 첨가(Hirayama and Satuito, 1991), B₁₂를 생산하는 *Chlorella* (力山 等, 1990) 또는 bacteria (Yu et al., 1988, 1989; 山内, 1993)가 rotifer 증식을 향상 시킨다는 보고 등이 있다. Rotifer 내구란 생산은 배양 환경상

태가 양호할때 높은 개체수 증가로 내구란이 많이 생산된다고 보고하였다(Lubzens et al., 1985; Hagiwara et al., 1988a, 1989; Snell, 1986; Snell and Boyer, 1988). 따라서 많은 내구란을 생산하기 위해서는 rotifer의 성장이 양호한 먹이를 선택하여야한다.

먹이생물에 따른 내구란 생산 실험에서 *N. oculata*로 배양한 rotifer의 최고밀도는 평균 825개체/ml로 다른 먹이생물 실험구보다 높았고 내구란 생산도 3,760개/20 ml로 높게 나타났다. 운동성 편모를 지닌 *P. lutheri*와 *T. suecica*를 공급한 실험구가 성장이 저조했던 이유는 원심분리후 편모의 탈락으로 운동력이 저하되었기 때문에 빠른 시간내에 침강하여 바닥에 싸여 있어 rotifer가 먹이로 섭취하기 부적합했기 때문으로 생각된다.

平田(1989a)은 먹이의 질과 양은 미수정 mictic female의 male 산란수와 산란한 male의 연령, 정자수, 운동력(수정능력) 등에 영향을 미친다고 보고 하였다. Snell and Hoff (1987)는 *Tetraselmis* sp.와 *Chlorella* sp.를 혼합공급하였을 때 *Chlorella* sp. 단일 공급보다 미수정 mictic female에서 산란한 male의 수정률이 높다고 하였다. Snell et al. (1987)은 rotifer 배양수의 암모니아, pH 등과 같은 수질환경이 male과 미수정 mictic female의 수정률에 매우 중요한 역할을 하며 이온화 되지않은 암모니아가 증가할수록 rotifer의 활력은 감소하고, pH 7에서 활력이 가장 높다고 하였다.

본 실험의 경우 *C. ellisoidea* 실험구에서도 male을 생산하는 mictic female과 male이 다른 실험구보다 6~9일 사이에 높게 나타났지만 수정률의 저하로 적은 내구란이 생산된 것으로 생각된다. 그러나 이러한 수정률 저하가 먹이생물에 따른 male의 수정능력저하인지 6~9일 사이의 환경악화에 의한 male의 수정능력 저하인지는 본 실험에서는 알 수 없었다.

*B. plicatilis*의 내구란 생산은 충분한 먹이 공급 부족시 생활사의 정지로 많은 내구란을 생산할

수 없다(Hagiwara and Hirayama, 1993; Snell and Boyer, 1988), 또 rotifer 배양시 사육수의 교환은 낮은 유성생식률을 유발시켜 내구란 생산이 저하된다고 보고하였다(Hino and Hirano, 1977). 따라서 Hagiwara and Lee (1991), Hagiwara and Hirayama (1993), Hamada et al. (1993) 등은 사육수 교환없이 충분한 먹이공급을 위해서는 농축된 먹이가 필요하다라고 보고하였다.

본 실험에서도 이러한 농축된 먹이생물과 효모류를 대상으로 내구란 실험을 실시한 결과, rotifer 성장이 225~717개체/ml로 나타났고, 빵효모+*Chlorella* 혼합구의 먹이와 일본 담수산 *Chlorella*가 비교적 유성생식물과 내구란 생산이 높게 나타났다. 본 실험에서 이용한 일본 담수산 *Chlorella*는 B₁₂를 보강한 것(Maruyama et al., 1989)으로 해수산 냉동, 냉장 *Chlorella*와 비교할 때 유성생식물에서는 차이가 없지만, rotifer 10⁴ 개체와 건조 먹이 1 mg당 내구란 생산은 일본 담수산 *Chlorella*가 높게 나타났다. 그러나 S-type rotifer의 먹이생물에 따른 내구란 생산은 배양수중의 bacteria 분포가 유성생식물과 내구란 생산에 많은 영향을 미친다(Hamada et al., 1993)는 보고가 있어 이러한 원인이 먹이생물에 포함된 B₁₂의 영향인지는 본 실험에서는 알수가 없었다.

Hamada et al. (1993)은 농축 먹이생물과 효모류를 대상으로 rotifer의 내구란 생산을 조사한 결과 보존하지 않고 바로 농축한 먹이인 *Nannochloropsis oculata*가 가장 좋은 먹이생물이라고 하였다. 그러나 Hagiwara et al. (1993a)은 이러한 먹이 공급은 비용이 높기 때문에 농축한 *N. oculata*와 가격이 싼 빵효모를 혼합하여 공급한 결과 오히려 *N. oculata* 만 공급한 것보다 많은 내구란을 생산하였다고 보고 하였다.

본 실험에서도 빵효모+*Chlorella* 혼합구가 rotifer 10⁴ 개체와 건조 먹이 1 mg당 내구란 생산이 냉동, 냉장 *Chlorella*보다 높게 나타났다. Hirayama and Satuito (1991)는 지방산이 rotifer의

성장을 증가시킨다고 보고한 바 있으나, 본 실험에서는 담수산 *Chlorella*나 빵효모에 비하여 지방산이 높은 해수산 Marine α, 유지효모, 냉동 *Chlorella*에서 오히려 rotifer의 성장이 저조하게 나타났다. 또한 냉동, 냉장 *Chlorella*에 있어서 각각 배양 7일과 8일째 rotifer가 대량 폐사되거나 활력이 낮아지는 경향을 보였다.

Hagiwara and Hino (1990)는 *Tetraselmis* sp.와 *Chlamydomonas* sp.에 의해 형성된 내구란의 부화율과 부화된 rotifer의 생존지수가 *Tetraselmis* sp.에서 월등하게 높았다고 보고하였지만 Hamada et al. (1993)은 여러 종류의 농축한 먹이 생물에 의해 형성된 내구란의 부화율은 차이가 나지 않았다고 보고하였다. 그러나 본 실험의 경우, 먹이생물에 따라서는 rotifer 내구란의 부화율은 유의적인 차이는 나타나지 않았고, 농축 먹이생물에 따른 내구란 부화율은 차이를 보여 상반된 결과를 보였다. 앞으로 rotifer 내구란의 부화율에 영향을 미치는 먹이생물과 환경요인의 영향에 대해서 보다 구체적인 연구가 수행되어야 할 것이다.

요 약

한국산 rotifer, *B. plicatilis*, S-type를 대상으로 식물부유생물, 농축 *Chlorella* 및 효모류에 대한 내구란 생산과 먹이 종류에 따라 생산된 내구란의 부화율을 조사하였다. 4 종류(*Chlorella ellipsoidea*, *Nannochloris oculata*, *Tetraselmis suecica*, *Pavlova lutheri*) 가운데 *N. oculata*는 3,760개/20 ml로 가장 많은 내구란을 생산하였다. 그러나 식물부유생물 종류에 따른 부화율의 유의적인 차이는 없었다.

9 종류의 농축먹이(유지효모, 빵효모, 두 종류의 해수산 농축 냉장 *Chlorella*, 해수산 냉동 *Chlorella*, 냉동 해수산 *Chlorella* (70%)+빵효모(30%), 냉동 해수산 *Chlorella* (30%)+빵효모(70%), 두 종류의 냉장 담수산 *Chlorella*)에서 내구란 생산이 가장 많은 먹이는 냉동 *Chlorella*

(30%)+빵효모(70%)와 냉장 담수산 *Chlorella*에서 각각 283개/ml로 나타났다. Rotifer 10⁴ 개체와 건조 먹이 1 mg당 내구란 생산은 냉동 *Chlorella* (30%)+빵효모(70%)에서 각각 5, 566개와 2,131개로 가장 높게 나타났다. 농축 먹이에 따른 내구란의 부화율은 유지효모가 67.4%로 가장 높았다. 본 연구의 결과, 경제적인 내구란 생산을 위하여 빵효모와 농축 냉동 *Chlorella*를 혼합하여 공급하는 것이 효과적인 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

- Duncan, D. B., 1955. Multiple-range and multiple F tests. *Biometrics*, 11 : 1-42.
- Hagiwara, A. 1994. Practical use of rotifer cyst. *The Israel Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 46 : 13-21.
- Hagiwara, A., K. Hamada, A. Nishi, T. Imaizumi and K. Hirayama, 1993a. Mass production of rotifer (*Brachionus plicatilis*) resting eggs in 50 m³ tanks. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59 : 93-98.
- Hagiwara, A., K. Hamada, A. Nishi, T. Imaizumi and K. Hirayama, 1993b. Dietary value of neonates from rotifer *Brachionus plicatilis* resting eggs for red sea bream larvae. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59 : 99-104.
- Hagiwara, A. and A. Hino, 1989. Effect of incubation and preservation on resting egg hatching and mixis in the derived clones of the rotifer, *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, 186/187 : 415-421.
- Hagiwara, A. and A. Hino, 1990. Feeding history and hatching of resting eggs in the marine rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56 : 1965-1971.
- Hagiwara, A., A. Hino and R. Hirano, 1988a. Effects of temperature and chlorinity on resting egg formation in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54 : 569-575.
- Hagiwara, A., A. Hino and R. Hirano, 1988b. Comparison of resting egg formation among five Japanese stocks of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 54 : 577-580.
- Hagiwara, A. and K. Hirayama, 1993. Preservation of rotifers and its application in the finfish hatchery. *Proceedings of Finfish Hatchery in Asia '91. TML Conference Proceedings*, 3, p. 61-71. Tungking Marine Laboratory, Taiwan Fisheries Research Institute, Tungking, Pingtung, Taiwan.
- Hagiwara, A. and C. S. Lee, 1991. Resting eggs formation of the L-type and S-type rotifer *Brachionus plicatilis* under different water temperature. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57 : 1645-1650.
- Hagiwara, A., C. S. Lee, G. T. Miyamoto and A. Hino, 1989. Resting egg formation and hatching of the S-type rotifer *Brachionus plicatilis* at varying salinities. *Mar. Biol.*, 103 : 327-332.
- Hamada, K., A. Hagiwara and K. Hirayama, 1993. Use of preserved diet for rotifer (*Brachionus plicatilis*) resting egg formation. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59 : 85-91.
- Hino, A. and R. Hirano, 1976. Ecological studies on the mechanism of bisexual reproduction in the rotifer *Brachionus plicatilis*. General aspects of bisexual reproduction inducing factors. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 42 : 1093-1099.
- Hino, A. and R. Hirano, 1977. Ecological studies on the mechanism of bisexual reproduction in the rotifer *Brachionus plicatilis*. Effects of cumulative parthenogenetic generation on the frequency of bisexual reproduction. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 43 : 1147-1155.
- Hino, A. and R. Hirano, 1984. Relationship between water temperature and bisexual reproduction rate in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 50 : 1481-1485.
- Hino, A. and R. Hirano, 1985. Relationship between water temperature given at the time of fertilized egg formation and bisexual reproduction pattern in the deriving strain of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 51 : 511-514.
- Hino, A. and R. Hirano, 1988. Relationship between water chlorinity and bisexual reproduction rate in the rotifer *Brachionus plicatilis*.

- catilis*. Nippon Suisan Gakkaishi, 54 : 1329-1332.
- Hirayama, K. and C. G. Satuito, 1991. The nutritional improvement of baker's yeast for the growth of the rotifer, *Brachionus plicatilis*. Rotifer and Microalgae Culturer Systems. Proceedings of a U. S.- Asia Workshop. p. 151-162. Honolulu, Hawaii, USA.
- Lubzens, E., G. Minkoff and S. Marom, 1985. Salinity dependence of sexual and asexual reproduction in the rotifer *Brachionus plicatilis*. Mar. Biol., 92 : 123-126.
- Maruyama, I., Y. Ando, T. Maeda and K. Hirayama, 1989. Uptake of vitamin B₁₂ by various strains of unicellular algae *Chlorella*. Nippon Suisan Gakkaishi, 55 : 1785-1790.
- Pourriot, R. and T. W. Snell, 1983. Resting eggs in rotifer. Hydrobiologia, 104 : 213-224.
- Satuito, C. G. and K. Hirayama, 1986. Fat-soluble vitamin requirements of the rotifer *Brachionus plicatilis*. p 619-622. The First Asian Fisheries Forum. Asian Fisheries Society, Manila, Philippines.
- Snell, T. W., 1986. Effect of temperature, salinity and food level on sexual and asexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Rotifera). Mar. Biol., 92 : 157-162.
- Snell, T. W. and E. M. Boyer, 1988. Thresholds for mictic female production in the rotifer *Brachionus plicatilis* (Müller). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 124 : 73-85.
- Snell, T. W., M. C. Childress, F. H. Boyer and F. H. Hoff, 1987. Assessing the status of rotifer mass cultures. J. World Aquacult. Soc., 18 : 270-277.
- Snell, T. W. and F. H. Hoff, 1985. The effect of environmental factors on resting egg production in the rotifer *Brachionus plicatilis*. J. World Maricult. Soc., 16 : 484-497.
- Snell, T. W. and F. H. Hoff, 1987. Fertilization and male fertility in the rotifer *Brachionus plicatilis*. Hydrobiologia, 147 : 329-334.
- Yu, J., A. Hino, R. Hirano and K. Hirayama, 1988. Vitamin B₁₂-producing bacteria as a nutritive complement for a culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Nippon Suisan Gakkaishi, 54 : 1873-1880.
- Yu, J., A. Hino, M. Ushio and M. Maeda, 1989. Function of bacteria as vitamin B₁₂ producers during mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. Nippon Suisan Gakkaishi, 55 : 1799-1806.
- Yu, J. and K. Hirayama, 1986. The effect of un-ionized ammonia on the population growth of the rotifer in mass culture. Nippon Suisan Gakkaishi, 52 : 1509-1513.
- Walne, P. R., 1966. Experiments on the large-scale culture of the larvae of *Ostrea edulis* L. Fish. Invest. Min. Agric. Fish. London, Ser. 2, 25. 53pp.
- 박흥기·허성범, 1996. 염분에 따른 한국산 Rotifer, *Brachionus plicatilis* (S-type) 6 strains의 내구란 생산. 한국양식학회지, 9 : 195-203.
- 허성범; 박흥기, 1996. 한국산 Rotifer, *Brachionus plicatilis*와 *B. calyciflorus*의 크기 및 내구란 형성. 한국양식학회지, 9 : 187-194.
- 平田都夫, 1989a. 耐久卵の形成條件とふ化條件. p. 51-54. 初期餌料生物-シオミズツボウムシ(福所邦彦 平山和次). 恒星社厚生閣, 東京, 日本.
- 平田都夫, 1989b. 飼料の種類と給餌法. p. 73-85. 初期餌料生物-シオミズツボウムシ(福所邦彦 平山和次). 恒星社厚生閣, 東京, 日本.
- 古澤 優, 1989. 生活史. p. 22-28. 初期餌料生物-シオミズツボウムシ(福所邦彦 平山和次). 恒星社厚生閣, 東京, 日本.
- 日野明德, 1981. シオミズツボウムシの分類, 變異および生活史について. 栽培技研, 10 : 109-123.
- 力山功·金丸彦一郎·中村展男·安藤洋太郎·平山和次, 1990. ビタミン含有クロレラ給餌によるシオミズツボウムシの開放培養. 水産増殖 38 : 227-231.
- 山内悟, 1993. 抗菌剤の添加によるシオミズツボウムシの増殖促進効果. 日本誌, 59 : 1001-1006.

여 백

한국산 Rotifer, *Brachionus plicatilis* (L과 S-type)의 내구란 대량생산*

허성범 · 박희기

부경대학교 양식학과

**Mass Production of Resting Egg of Korean Rotifer,
Brachionus plicatilis (L and S-type)***

Sung Bum Hur and Heum Gi Park

Department of Aquaculture, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

韓國養殖學會誌 第9卷 第4號(1996年 11月 別刷)

Reprinted from the
JOURNAL OF AQUACULTURE VOL. 9 NO. 4
November 1996

여 백

한국산 Rotifer, *Brachionus plicatilis* (L과 S-type)의 내구란 대량생산*

허성범 · 박흠기
부경대학교 양식학과

Mass Production of Resting Egg of Korean Rotifer, *Brachionus plicatilis* (L and S-type)*

Sung Bum Hur and Heum Gi Park

Department of Aquaculture, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Mass production of resting egg of the rotifer, *Brachionus plicatilis* was carried out in 1 m³ tank for L-type rotifer and in 1 m³ and 4 m³ tank for S-type rotifer. L-type rotifer was fed on concentrated *Chlorella*+baker's yeast and only baker's yeast for 15 days. S-type rotifer was fed on concentrated *Chlorella* in 1 m³ tank for 7 days and frozen *Chlorella*+baker's yeast in 4 m³ for 6~8 days.

Total number of resting egg and number of resting egg from 10⁴ rotifers and 1 g dry weight diet for L-type rotifer fed on *Chlorella*+baker's yeast were 54.5×10⁶ eggs, 30.5×10⁶ eggs and 100×10³ eggs, respectively. These were higher than those of rotifer fed on baker's yeast only.

Total number of resting egg and number of resting egg from 10⁴ rotifers and 1 g dry weight diet for S-type rotifer fed on concentrated *Chlorella* in 1 m³ tank were 50~104×10⁶ eggs, 47~82×10⁶ eggs and 136~260×10³ eggs, respectively. In 4 m³ tank with frozen *Chlorella*+baker's yeast, these were 149~567×10⁶ eggs, 36~123×10⁶ eggs and 131~338×10³ eggs, respectively.

This result suggests that S-type rotifer are better than L-type rotifer for the mass production of resting egg of the Korean rotifer.

Key words : Rotifer, *Brachionus plicatilis*, Resting egg, Mass production

서 론

해산어류 종묘생산시 가장 널리 이용되는 초기 먹이 생물은 윤충류의 일종인 rotifer, *Brachionus plicatilis*이며 이러한 먹이생물의 질적 및 양적 확보는 가장 중요한 과제이다. 福所·平山(1989)는 rotifer에 대한 생물학적인 특징, 대량배양 방법, 사료에 대한 가치 등을 보고하였다. 그러나

rotifer의 대량 배양시 이온화되지 않은 암모니아, pH, COD 증가와 산소 결핍에 따른 수질 변화 (Yu and Hirayama, 1986) 및 유해 세균의 이상 증식(山内, 1993)은 rotifer 증식을 감소시켜 양적인 확보에 따른 계획적인 먹이공급 부족으로 종묘생산을 불안정하게 한다. 또 rotifer의 배양 관리에 따른 인건비 지출은 종묘생산 단가의 큰 부분을 차지하고 있다(Hagiwara and Lee,

* 본 연구는 농림수산특정연구과제(현장애로)의 연구비 지원에 의해 수행되었음.

1991). 따라서 안정적이고 경제적인 rotifer의 확보는 해산어류 종묘생산에 있어 매우 중요하다.

이와 같은 이유로 Lubzens et al. (1990)은 rotifer amictic female 2,000개체/ml를 4°C로 22일 동안 냉장 보관한 예가 있고 Okamoto et al. (1987), Toledo and Kurokura (1990)와 Toledo et al. (1991)은 amictic female egg를 동결 보존한 바 있다. Rotifer의 내구란은 종의 유전적 형질을 효율적으로 보관 할 수 있을 뿐만 아니라 Artemia cyst처럼 쉽게 부화시켜 자어에 직접 공급할 수 있는 장점이 있다(Hagiwara and Hirayama, 1993; Hagiwara et al., 1993 b). 따라서 최근에는 rotifer의 유성생식에 의해 생산된 내구란을 대량생산하여 먹이생물로 사용하는 연구가 활발하다. L-type과 S-type rotifer의 내구란을 1 m³ 수조(Hagiwara and Lee, 1991), 4 m³ 수조(新村 等, 1979)와 50 m³ 수조(Hagiwara et al., 1993a)에서 농축된 먹이를 이용하여 대량 생산한 예가 있다.

본 연구는 한국산 rotifer, *B. plicatilis* L-type과 S-type rotifer를 이용하여 1 m³와 4 m³ 수조에서 농축 먹이에 따른 내구란의 대량생산 실험 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 1 m³ 수조에서 먹이 종류에 따른 L-type rotifer의 내구란 대량생산

실험에 사용된 L-type rotifer는 전북 옥구군 옥구에서 분리한 O-L strain (허·박, 1996)으로 20°C, 15 ppt에서 생산된 내구란을 4°C에서 3개월간 보관하여 28°C, 10 ppt, 2,000 lux에서 부화시켰다. 200 l FRP 수조에 부경대학교 한국해양미세조류은행에서 분양받은 해수산 *Chlorella* sp. (KMMCC-C-27)를 대량배양한 후 수돗물을 이용하여 염분 10 ppt로 조정한 후 부화시킨 rotifer를 접종하였다. 200 l FRP 수조에서 수온을 20°C로 유지하여 rotifer가 150 개체/ml로 될 때까지 농축 *Chlorella*를 먹이로

배양한 후 실험수조에 접종하였다. 실험은 1.2 m³ (배양수 1 m³) FRP 수조에서 배양 *Chlorella*에 수돗물을 섞어서 10 ppt로 조정하였으며 이때 *Chlorella* 밀도는 2500×10⁴ cells/ml이었고 rotifer 접종 밀도는 3~5개체/ml였다. 수온은 21.1~21.9°C로 유지하였다.

먹이는 농축 냉장 *Chlorella*와 빵효모(*Saccharomyces cerevisiae*)를 이용하였다. 매일 rotifer 10개체/ml을 기준으로 농축 냉장 *Chlorella* (495×10⁴ cells)+빵효모(건조중량 0.6 µg)을 혼합 공급하였고 빵효모 단일구는 건조중량 0.9 µg을 공급하였다. 먹이 공급 시기는 실험 5일째 부터 시작하였고 공급횟수는 매일 3회(10:00, 16:00, 23:00)로 하였다. 농축 냉장 *Chlorella*는 4 m³수조에서 m³당 복합비료 60 g과 요소비료 20 g으로 배양한 것을 연속 원심분리기로 농축한 후 냉장실(4°C)에 보관하여 사용하였고 빵효모는 삼립유지회사 제품을 사용하였다.

Rotifer의 개체밀도, 성장률, 유성생식률, 수정을 조사는 박·허(1996)의 방법을 따랐다. 내구란 수확은 실험 종료시 145, 125, 50 µm seive를 이용하였다.

2. 1 m³과 4 m³에서 S-type rotifer의 내구란 대량생산

실험에 사용된 S-type rotifer는 전남 고흥군 재두(C-S) 염전에서 채집하여 순수 분리한 strain (허·박, 1996)으로 수온 28°C, 염분 15 ppt에서 생산된 내구란을 4°C에서 3개월간 보관하였다. 이 내구란을 28°C, 15 ppt, 3,000 lux에서 부화시켜 36시간후 갓 부화한 rotifer를 15개 clone으로 구분하여 15 ml 시험관(배양액 10 ml)에 각각 수용하였다. 실험조건은 수온 28°C, 염분 15 ppt, 조도 2,000 lux로 하였고 먹이생물로는 부경대학교 한국해양미세조류은행에서 분양받은 *Nannochloris oculata* (KMMCC-C-31)을 배양한 후 원심분리하여 세포만을 농축하여 2,000×10⁴ cells/ml/day 공급하였다. 실험기간 16일동안 하루에 두번씩 시험관을 흔들어서 침전

된 먹이를 현탁되게 하였고 내구란 생산이 가장 높은 clone을 선택하여 사용하였다. 1.2 m³ FRP (배양수 1 m³) 수조에서는 clone 6을 이용하였고, 4 m³ 콘크리트 원형수조에서는 clone 6을 다시 위와 같은 방법을 이용하여 선택한 clone 63을 이용하였다. 각 clone은 실험시작전에 28℃, 15 ppt, 200 l FRP 수조에서 농축 *Chlorella ellipsoidea* (KMMCC-C-21)를 먹이로 사용하여 배양하였다. 수온 조절은 1 m³ 수조(30.6~32.1℃)에서는 1 kw 전기히터 2개로, 4 m³ 수조(27.5~28.5℃)에서는 경유 보일러를 이용하였다.

먹이 종류는 1 m³ 수조에서는 농축 냉장 *Chlorella*를 단독으로 공급하였고 4 m³ 수조에서는 빵효모(70%) + 농축 냉동 *Chlorella* (30%)를 혼합 공급하였다. 먹이 공급량은 rotifer 25개체/ml를 기준으로 각 먹이의 건조중량 15 µg/day로 공급하였다. 농축 *Chlorella*는 m³ 당 복합비료 60 g과 요소비료 20 g으로 4m³ 수조에서 배양한 것을 연속 원심분리기로 130×10⁸ cells/ml로 농축한 후 냉장실(4℃)에 보관하여 사용하였다. 냉동 *Chlorella*는 농축 냉장 *Chlorella*를 다시 연속 원심분리기를 사용하여 *Chlorella* 세포만을 수확하여 냉동고(-30℃)에 보관하여 사용하였다. 초기 rotifer 접종개체는 5~10개체/ml로 하였다.

결 과

1. 1 m³ 수조에서 먹이 종류에 따른 L-type rotifer의 내구란 대량생산

1 m³ 수조에서의 먹이종류에 따른 내구란 생산 결과는 Fig. 1과 Table 1과 같다. 배양 5일째까지는 비슷한 성장을 보였지만 배양 8일째부터 농축 냉장 *Chlorella* + 빵효모 혼합구가 단독구보다 성장이 양호하였다. 농축 냉장 *Chlorella* + 빵효모 혼합구에서의 최고밀도와 성장률은 각각 175.5개체/ml, 0.264로 빵효모 단독구의 105개체/ml, 0.203보다 높게 나타났다. 또한 농축

냉장 *Chlorella* + 빵효모 혼합구에서 배양 7일째 male의 출현이 20개체/ml로 나타났으나 빵효모 단독구에서는 실험 전기간 동안 10개체/ml 이하로 낮게 나타났다. 내구란을 생산하는 mictic female의 밀도는 실험 9일까지는 모든 실험구에서 비슷하게 나타났지만 9일 이후 부터 종료 시까지는 농축 냉장 *Chlorella* + 빵효모 혼합구가 최고 22~38개체/ml로 빵효모 단독구의 3~10개체/ml보다 높게 나타났다. 농축 냉장 *Chlorella* + 빵효모 혼합구에서의 유성생식물과 수정률은 각각 20.1%, 84.4%로 빵효모 단독구의 15.8%,

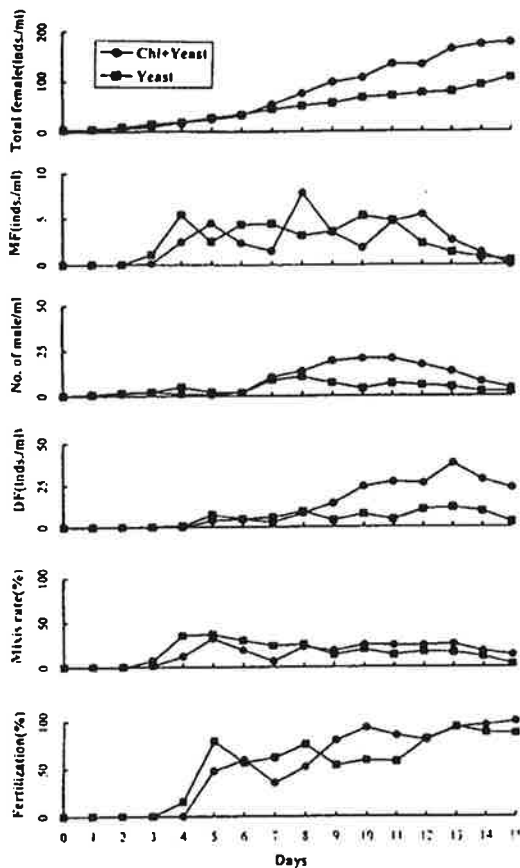


Fig. 1. Daily variations of population of the L-type rotifer, *Brachionus plicatilis* fed on different diets in 1 m³ tank (Chl+Yeast: *Chlorella* sp. + Baker's yeast, Yeast: Baker's yeast, MF: mictic female, DF: mictic female producing resting egg).

Table 1. Result on reproduction of the rotifer, *Brachionus plicatilis*, L-type with different diets in 1 m³ tank

Food sources	Maximum density (inds./ml)	Specific growth rate	Mixis rate (%)	Fertilization (%)	Number of resting eggs (×10 ⁶)	Number of resting eggs (×10 ³)/10 ⁶ rotifers	Number of resting eggs (×10 ³)/1 g (dry weight) diet	Culture day	Temperature (°C)
<i>Chlorella</i> +Yeast (I)	185	0.241	21.1	82.9	62	33	106	15	21.2
<i>Chlorella</i> +Yeast (II)	166	0.287	19.1	85.9	47	28	94	15	21.4
Mean	175.5±9.15*	0.264±0.023*	20.1±1.0 ^{NS}	84.4±1.50 ^{NS}	54.5±7.59 ^{NS}	30.5±2.66 ^{NS}	100±6.10 ^{NS}		21.3±0.1
Yeast (I)	101	0.201	21.1	60.1	31	31	70	15	21.3
Yeast (II)	109	0.205	10.4	77.8	29	27	64	15	21.9
Mean	105.0±4.00	0.203±0.002	15.8±5.35	69.0±8.85	30.5±8.78	28.5±1.92	67±3.24		21.6±0.3

* : P<0.05.

NS : no significant.

Table 2. Growth and production of resting eggs of the rotifer, *Brachionus plicatilis* S-type with different diets in 1 m³ and 4 m³ tank

Volume (m ³)	Food	Maximum density (inds./ml)	Specific growth rate	Mixis rate (%)	Fertilization (%)	Number of resting eggs (×10 ⁶)	Number of resting eggs (×10 ³)/10 ⁶ rotifers	Number of resting eggs (×10 ³)/1 g (dry weight) diet	Culture day	Temperature (°C)
1	Concentrated <i>Chlorella</i>	107	0.511	10.4	66.8	50	47	136	7	32.1
		125	0.644	28.6	79.0	78	62	181	7	31.9
		149	0.544	36.7	71.1	86	58	224	7	30.6
		125	0.644	36.7	81.4	104	82	260	7	32.0
4	Forzen <i>Chlorella</i> (30%) + Baker's Yeast (70%)	146	0.613	29.3	86.9	210	36	131	8	27.5
		41	0.436	58.4	90.9	149	91	233	6	27.6
		68	0.373	47.7	78.0	268	99	299	7	27.7
		92	0.416	40.6	81.6	433	118	338	7	27.9
		115	0.372	38.7	64.4	567	123	328	7	28.5

69.0% 보다 높게 나타났지만 유의적이 차이는 없었다. 내구란 총 생산량, 10⁶ rotifer 당 내구란 생산과 건조 먹이 1 g 당 내구란 생산은 농축 냉장 *Chlorella*+빵효모 혼합구가 각각 54.5×10⁶ 개, 30.5×10⁶개, 100×10³개였고, 빵효모 단독구가 각각 30.5×10⁶개, 28.5×10⁶개, 67×10³ 개로 나타났으나 서로 유의적인 차이는 없었다.

2. 1 m³과 4 m³에서 S-type rotifer의 내구란 대량생산

S-type rotifer 내구란 대량생산은 Table 2와 같다. 1 m³ 수조에서 농축 냉장 *Chlorella*를 공급한 실험에서는 rotifer 최고밀도는 107~149 개체/ml로 나타났고 성장률은 0.511~0.644 범위였다. 유성생식률과 수정률은 각각 10.4~36.7%, 66.8~81.4%로 나타났다. 총 내구란 생산

은 50~104×10⁶개로 실험구에 따라서 2배 정도 차이가 나타났다. 10⁶ rotifers와 건조 먹이 1 g당 내구란 생산은 각각 47~82.2×10⁶개, 136~260×10⁶개로 나타났다.

4 m³ 수조에서 S-type rotifer의 최고 밀도와 성장률은 각각 41~146개체/ml, 0.372~0.613으로 실험구에 따라서 차이가 많았다. 유성생식률과 수정률은 각각 29.3~58.4%, 64.4~90.9%였고 총 내구란 생산은 149~567×10⁶개로 나타났다. 10⁶ rotifer와 건조 먹이 1 g당 내구란 생산은 각각 36~123×10⁶개, 131~338×10⁶개로 차이가 심하게 나타났다.

논 의

Rotifer 내구란 대량생산은 속村 等(1979)이

L-type rotifer을 대상으로 11일 동안 4 m³ 수조에서 3.2×10⁷개의 내구란을 생산하였다. 이들은 접종초기 낮은 수온(4~15℃)에서 rotifer의 유성생식률을 증가시킨 후 수온(23~30℃)을 상승시켜 내구란 생산 단계를 빠르게 하였다.

Hamada et al. (1993)은 농축된 여러 먹이 생물과 빵효모를 이용하여 내구란을 생산한 결과 *Nannochloropsis oculata*를 바로 농축하여 먹이로 공급한 결과 L-type과 S-type rotifer에서 모두 많은 내구란을 생산 하였다. 또 30 ℓ에서 L-type rotifer의 내구란 생산은 16×10⁶개로 S-type 1.4×10⁶개보다 높게 나타났는데 이것은 Hawaii S-type rotifer의 경우 비교적 높은 수온(29~32℃)과 염분(32 ppt)으로 이온화되지 않은 암모니아 축적(0.51~1.14)에 의한 내구란 형성 시기의 성장 둔화로 S-type이 L-type보다 내구란 형성이 다소 어려운 점이 있다고 보고 하였다(Hamada et al., 1993). Snell and Childress (1987), Snell and Boyer (1988)과 Hagiwara et al. (1993a)은 이온화되지 않은 암모니아, pH와 COD 농도 증가 등으로 배양수의 환경이 악화되면 mictic female의 산란수가 낮아지고 male의 활력 저하로 미수정 mictic female과의 교미에 영향을 미치기 때문에 배양수의 환경변화는 매우 중요하다고 보고하였다. 본 실험에서도 L-type rotifer의 경우 배양 4일 이후부터 유성생식률이 저하되고 male의 수가 빵효모 단독 구에서 낮게 나타나는 경향을 보였다. Hamada et al. (1993)은 rotifer 내구란 생산은 먹이 종류에 따라서 다르며 농축 *N. oculata*만 사용시 경제적으로 가격이 높기 때문에 가격이 싼 빵효모와 함께 공급하였을 때 많은 내구란을 생산하여 생산 단가를 낮출 수 있다고 보고하였다(Hagiwara et al. 1993a).

Snell (1986)이 S-type rotifer의 경우 30℃ 이상일때 유성생식률 감소로 인하여 내구란 생산이 감소한다고 보고하였고 Hagiwara et al. (1993a)은 농축 *N. oculata*와 냉동 *N. oculata*만 사용하는 것보다 빵효모와 같이 혼합하여 사용

하였을 때 많은 내구란을 생산하였다고 보고하였다. 본 연구에서도 4 m³ 수조가 1 m³ 수조보다 유성생식률, 수정률, 내구란 생산이 높았는데 이러한 이유는 1 m³ 수조가 수온이 더 높았기 때문인 것으로 생각된다. 또 1 m³ 수조가 4 m³ 수조보다 내구란 생산이 낮았던 이유도 *Chlorella* 만의 단독 먹이를 공급하였기 때문으로 생각된다.

Hagiwara et al. (1994)은 B₁₂를 생산하는 bacteria가 rotifer의 유성생식률을 증가 시킨다고 보고하였다. 또한 Hamada et al. (1993)와 山内(1993)는 rotifer의 배양환경에 따라서 bacteria 분포가 다양하게 변화되기 때문에 비교적 배양수온이 높은 S-type rotifer의 경우 bacteria에 따라서 rotifer의 성장에 많이 영향을 받는다고 하였다. 본 실험의 결과 S-type rotifer의 경우 내구란 생산이 매우 변화가 심하게 나타나는 원인은 배양수조 마다 이러한 bacteria의 분포에 따른 영향이 있지 않았나 생각된다.

Hagiwara et al. (1993a)은 L-type rotifer를 이용하여 40 m³ 수조에서 빵효모와 냉동 *N. oculata*를 먹이로 11일 동안 최고 4,550×10⁶개의 내구란을 생산하였는데 이것을 1 m³당 내구란 생산으로 환산하면 113×10⁶개이다. 본 실험에서 L-type rotifer의 경우 1 m³에 최고 62×10⁶개로 Hagiwara et al. (1993a)의 결과보다 낮았다. 그러나 S-type rotifer의 내구란 생산은 4 m³ 수조에서 빵효모+냉동 *Chlorella*를 먹이로 공급하여 7일 동안 최고 567×10⁶개를 생산하였는데 1 m³당 내구란 생산으로 환산하면 141×10⁶개로 Hagiwara et al. (1993a)의 결과보다 훨씬 높게 나타났다. 이와같이 본 실험에 사용된 S-type rotifer가 L-type rotifer보다 많은 내구란을 생산하여 L-type rotifer가 내구란 대량생산에 유리하다는 Hamada et al. (1993)와는 반대 결과를 보였다. 이러한 결과는 실험에 이용한 strain, 먹이 종류 및 공급량 등에 따른 차이라고 생각될 수 있고 본 실험에 이용한 S-type rotifer strain이 낮은 염분인 15 ppt에서 배양되어 암모니아 축적이 비교적 낮지 않았나 생각된다. 본 실험에서

S-type rotifer은 배양기간 7일로 L-type rotifer를 이용한 Hagiwara et al. (1993a)의 배양기간 11일과 본 실험의 L-type rotifer 배양기간 16일보다 짧았고 7일 정도의 배양기간이 내구란 생산에 더 효율적인 것으로 생각된다.

본 실험에서의 내구란 대량생산 결과가 다른 연구보고와 비교해 볼때 비교적 높게 나타났다. 앞으로 수질안정과 영양이 높고 경제성있는 먹이를 개발하여 4 m³ 이상의 대규모 수조에서 S-type rotifer를 대상으로 내구란 생산에 대한 연구를 더 구체적으로 수행할 필요가 있다고 생각된다.

요 약

한국산 *B. plicatilis*, L-type rotifer와 S-type rotifer의 내구란 대량생산은 L-type rotifer의 경우 15일 동안 농축 *Chlorella*+빵효모 혼합구와 빵효모 단독구로 하였고 S-type rotifer는 7일 동안 1 m³ 수조에서 농축 *Chlorella*로, 6~8일 동안 4 m³ 수조에서 냉동 농축 *Chlorella*+빵효모로 대량생산하였다.

L-type rotifer 내구란 대량생산 실험에서 농축 *Chlorella*+빵효모 혼합구가 총 내구란 생산 54.5 × 10⁶개, 10⁸ rotifers 당 내구란 생산 30.5 × 10⁶개, 먹이 건조 중량 1 g당 내구란 생산 100 × 10³개로 빵효모 단독구 보다 높게 나타났다.

S-type rotifer의 내구란 대량생산은 4 m³ 수조에서 냉동 농축 *Chlorella*+빵효모를 먹이로 총 내구란 생산 149~567 × 10⁶개, 10⁸ rotifers 당 내구란 생산 36~123 × 10⁶개, 먹이 건조 중량 1 g당 내구란 생산 131~338 × 10³개를 생산하여 1 m³ 수조에서 농축 *Chlorella*를 단독 먹이로 생산한 경우 보다 높았다.

참 고 문 헌

Guillard, R. R. L. and J. H. Ryther, 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I.

Cyclotella nana Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve). *Gran. Can. J. Microbiol.*, 8 : 229-239.

Hagiwara, A., K. Hamada, S. Hori and K. Hirayama, 1994. Increased sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Rotifera) with the addition of bacteria and rotifer extracts. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 181 : 1-8.

Hagiwara, A., K. Hamada, A. Nishi, T. Imai-zumi and K. Hirayama, 1993a. Mass production of rotifer (*Brachionus plicatilis*) resting eggs in 50 m³ tanks. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59 : 93-98.

Hagiwara, A., K. Hamada, A. Nishi, T. Imai-zumi and K. Hirayama, 1993b. Dietary value of neonates from rotifer *Brachionus plicatilis* resting eggs for red sea bream larvae. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59 : 99-104.

Hagiwara, A. and K. Hirayama, 1993. Preservation of rotifers and its application in the finfish hatchery. *Proceedings of Finfish Hatchery in Asia '91. TML Conference Proceedings*, 3, p. 61-71. Tung Kang Marine Laboratory, Taiwan Fisheries Research Institute, Tung Kang, Pingtung, Taiwan.

Hagiwara, A. and C. S. Lee, 1991. Resting eggs formation of the L-type and S-type rotifer *Brachionus plicatilis* under different water temperature. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57 : 1645-1650.

Hamada, K., A. Hagiwara and K. Hirayama, 1993. Use of preserved diet for rotifer (*Brachionus plicatilis*) resting egg formation. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59 : 85-91.

Hino, A. and R. Hirano, 1976. Ecological studies on the mechanism of bisexual reproduction in the rotifer *Brachionus plicatilis*. General aspects of bisexual reproduction inducing factors. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 42 : 1093-1099.

Lubzens, E., G. Kolodny, B. Perry, N. Galai, R. Sheshinski and Y. Wax, 1990. Factors affecting survival of rotifers (*Brachionus plicatilis* O. F. Müller) at 4°C. *Aquaculture*, 91 : 23-47.

Okamoto, S., M. Tanaka, H. Kurokura and S. Kasahara, 1987. Cryopreservation of parthenogenetic eggs of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53 : 20

- 93.
- Snell, T. W., 1986. Effect of temperature, salinity and food level on sexual and asexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Rotifera). Mar. Biol., 92 : 157-162.
- Snell, T. W. and M. Childress, 1987. Aging and loss of fertility in male and female (Rotifera). International Journal of Invertebrate Reproduction and Development, 12 : 103-110.
- Snell, T. W. and E. M. Boyer, 1988. Thresholds for mictic female production in the rotifer *Brachionus plicatilis* (Müller). J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 124 : 73-85.
- Toledo, J. D. and H. Kurokura, 1990. Cryopreservation of the euryhaline rotifer *Brachionus plicatilis* embryos. Aquaculture, 91 : 385-394.
- Toledo, J. D., H. Kurokura and H. Nakagawa, 1991. Cryopreservation of different strains of the euryhaline rotifer *Brachionus plicatilis* embryos. Nippon Suisan Gakkaishi, 57 : 1347-1350.
- Yu, J. and K. Hirayama, 1986. The effect of un-ionized ammonia on the population growth of the rotifer in mass culture. Nippon Suisan Gakkaishi, 52 : 1509-1513.
- 박홍기·허성범, 1996. 염분에 따른 한국산 Rotifer, *Brachionus plicatilis* (S-type) 6 strains의 내구란 생산. 한국양식학회지, 9 : 195-203.
- 허성범·박홍기, 1996. 한국산 Rotifer, *Brachionus plicatilis*와 *B. calyciflorus*의 크기 및 내구란 형성. 한국양식학회지, 9 : 187-194.
- 福所邦彦·平山和次, 1989. 初期餌料生物-シオミズツボウムシ. 恒星社厚生閣, 東京, 日本. pp. 240.
- 山内悟, 1993. 抗菌剤の添加によるシオミズツボウムシの増殖促進効果. 日本誌, 59 : 1001-1006.
- 今村茂生·立昌一·東橋英雄, 1979. 温度刺激によるシオミズツボウムシの耐久卵採取方法について. 栽培技研, 8 : 53-61.