



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

수 산 학 석 사 학 위 논 문

자가영양과 혼합영양 배양에 따른
진안점조류 *Monodus subterraneus*와
*Nannochloropsis oceanica*의
성장 및 영양조성 비교



2013년 8월

부경대학교 산업대학원

수 산 양 식 학 과

조 민 진

수 산 학 석 사 학 위 논 문

자가영양과 혼합영양 배양에 따른
진안점조류 *Monodus subterraneus*와
*Nannochloropsis oceanica*의
성장 및 영양조성 비교

지도교수 허 성 범

이 논문을 수산학석사 학위논문으로 제출함.

2013년 8월

부경대학교 산업대학원

수 산 양 식 학 과

조 민 진

조민진의 수산학석사 학위논문을 인준함

2013 년 8 월



주 심 농학박사 김창훈 (인)

위 원 이학박사 강성민 (인)

위 원 이학박사 허성범 (인)

목 차

Abstract	iii
I . 서 론	1
II . 재료 및 방법	2
1. <i>M. subterraneus</i> 의 최적배양 환경 요인	2
1. 1. 배지, 온도 및 조도별 성장률	2
1. 2. 영양배양별 성장률과 건조중량	4
1. 3. 염분별 성장률 변화	4
2. 영양배양별 <i>M. subterraneus</i> 와 <i>N. oceanica</i> 의 성장과 영양비교 . . . 6	
2. 1. 성장률과 건조중량	6
2. 2. 영양분석	6
3. Rotifer에 대한 <i>M. subterraneus</i> 와 <i>N. oceanica</i> 의 먹이효율 7	
4. 통계처리	8
III . 결과	9
1. <i>M. subterraneus</i> 의 최적 배양환경 요인	9
1. 1. 배지, 온도 및 조도별 성장률	9
1. 2. 영양배양별 성장률과 건조중량	14
1. 3. 염분에 따른 성장률	15
2. 영양배양별 <i>M. subterraneus</i> 와 <i>N. oceanica</i> 의 성장과 영양 19	
2. 1. 세포 성장률, 크기 및 건조중량	19
2. 2. 영양분석	25

3. Rotifer에 대한 <i>M. subterraneus</i> 와 <i>N. oceanica</i> 의 먹이 효율	29
IV. 논의	31
V. 결론	35
VI. 감사의 글	37
VII. 참고 문헌	38



Growth and nutrient composition of Eustigmatophyceae *Monodus subterraneus*
and *Nannochloropsis oceanica* in autotrophic and mixotrophic culture

Min Jin Jo

Department of Aquaculture
Graduate School of Industry
Pukyong National University

Abstract

Eicosapentaenoic acid (EPA) is one of the most important n-3 highly unsaturated fatty acids (HUFA). EPA produced from marine organisms is widely used in nutraceuticals. Freshwater Eustigmatophyceae *Monodus subterraneus* is known to have high amount of EPA compared to marine Eustigmatophyceae *Nannochloropsis oceanica*.

In this study, the optimum culture conditions such as media, temperature, light in autotrophic culture condition for *M. subterraneus* are investigated. The growth and composition of nutrient as amino acids and fatty acids of *M. subterraneus* were also examined and compared to those of *N. oceanica*. And the dietary value of these microalgal species for rotifer *Brachionus plicatilis* was tested.

The optimum media, temperature, and light intensity for *M. subterraneus* in autotrophic culture were JM media, 25°C, and 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively. The growth, cell size and weight, and biomass of *M.*

subterraneus cultured with glucose 2% in mixotrophic condition were higher than those in autotrophic condition. With regard to nutrient composition, *M. subterraneus* cultured in autotrophic condition showed higher contents of amino acids and fatty acids than *N. oceanica* in autotrophic condition did. And those of *M. subterraneus* cultured in mixotrophic condition were the lowest. The dietary value for *B. plicatilis* fed *M. subterraneus* cultured in autotrophic condition was better than that fed *N. oceanica*.



I . 서 론

다가불포화지방산 (PUFA, polyunsaturated fatty acid)는 심혈관, 암 및 염증성 질환 등의 다양한 질병과 장애 치료에 유용하다(Simopoulos, 1989). 이 중 EPA (20:5n3, eicosapentaenoic acid)와 DHA (22:6n3, docosahexanoic acid)와 같은 n-3 고도불포화지방산 (HUFA, highly unsaturated fatty acid)은 어류에서 주로 생산되며, 어획해역과 어류의 먹이 유형에 따라 영향을 받는다(Yamada *et al.*, 1987). PUFA의 수요가 많아질수록 어류이외에 미세조류와 같은 다른 생물로부터의 생산이 요구되고 있다(Cohen and Cohen, 1991).

미세조류는 성장하는 동안 PUFA를 형성하지만, 담수 미세조류는 해양 미세조류에 비해 EPA와 DHA를 많이 생산하지 않는다(Bajpai and Bajpai, 1993). *Monodus subterraneus* 는 담수산 Eustigmatophyceae (진안점조류)로 다불포화지방산 EPA 함량이 가장 높은 조류 중 하나로(Iwamoto and Sato, 1986) *Isochrysis* sp. 보다 EPA 함량이 높다(Liu and Lin, 2001). 또 해수산 Eustigmatophyceae의 대표적인 종인 *Nannochloropsis oceanica*는 아미노산과 지방산 함량이 높고 비타민 B, C, D 및 K 가 풍부하며, 세포의 크기가 작고 세포벽이 없어서 rotifer나 유생사육에 먹이생물로는 물론 바이오디젤(Kilian *et al.*, 2011) 및 EPA(Fang *et al.*, 2004) 추출 등의 소재로 널리 이용되고 있다. 또 *M. subterraneus*는 자가영양 뿐만 아니라 혼합영양으로도 성장이 가능하다(Lam, 2000).

본 실험에서는 *M. subterraneus*의 대량생산을 위한 배지, 온도, 조도, 염분 등의 최적배양환경과 자가영양 및 혼합영양 배양에 따른 성장과 biomass를 조사하고, 또 해수산 진안점조류의 대표종인 *N. oceanica* 와 비교하였다. 또 먹이생물로 널리 이용되는 rotifer를 대상으로 이들 두 진안점조류의 먹이효율을 비교하여 먹이생물로서의 *M. subterraneus*의 활용가능성을 파악하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. *M. subterraneus*의 최적배양 환경요인

1. 1. 배지, 온도 및 조도별 성장률

실험에 사용한 *M. subterraneus*는 UTEX 151 (The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin) 담수 종으로, 부경대학교 해양 바이오신소재학과 한국미세조류은행 (KMMCC, Korea marine microalgae culture center)에서 분양받아 이용하였다. 배지는 *M. subterraneus*의 배양에 널리 이용되는 BG-11배지(Allen and Stanire, 1968; Table 1)와 본 실험에서 선택한 JM 배지(Thompson *et al.*, 1988; Table 2)를 대상으로 성장률을 비교 하였다.

배양 온도는 25℃와 28℃, 조도는 연속조명으로 60, 80, 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 로 구분하여 성장률을 조사하였다(Liu and Lin, 2001). 250 mL 플라스크에 100 mL 배지를 분주하고 대수기 성장상태의 세포를 10 % 되게 접종하였으며, 14일간 3반복으로 정치배양 하였다. 세포밀도는 매일 동일한 시간에 혈구계산판 (haemocytometer)으로 3반복 계수하였다. 성장률은 배양 기간 동안 최대 세포 밀도 일을 기준으로 일간성장률 (specific growth rate, SGR)을 계산하였다(Guillard, 1973; $\text{SGR/day} = 3.322 \times \log (N_2/N_1)/(t_2-t_1)$, N_2 : t_2 시의 세포 수, N_1 : t_1 시의 세포 수).

Table 1. Chemical composition of BG-11 medium (Allen *et al.*, 1968)

Compound	Concentration(g/L)
NaNO ₃	1.5
K ₂ HPO ₄	0.04
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.075
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.036
Citric acid	0.006
Ferric ammonium citrate	0.006
Na ₂ -EDTA	0.001
Na ₂ CO ₃	0.02
Trace-element solution	1.0mL
H ₃ BO ₃	2.86
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.222
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.39
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.079
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.00494

Table 2. Chemical composition of JM medium (Thompson *et al.*, 1988)

Stocks		per 200 mL
(1)	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	4.0 g
(2)	KH ₂ PO ₄	2.48 g
(3)	MgSO ₄ ·7H ₂ O	10.0 g
(4)	NaHCO ₃	3.18 g
(5)	EDTAFeNa	0.45 g
	EDTANa ₂	0.45 g
(6)	H ₃ BO ₃	0.496 g
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.278 g
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.20 g
(7)	Cyanocobalamin	0.008 g
	Thiamine HCl	0.008 g
	Biotin	0.008 g
(8)	NaNO ₃	16.0 g
(9)	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	7.2 g
Medium		per litre
	Stock solutions 1 - 9	1 mL each

1. 2. 영양배양별 성장률과 건조중량

배지, 온도, 조도의 실험 결과 나타난 최적배양환경요인을 바탕으로 *M. subterraneus*의 영양배양별 성장을 조사하였다. 자가영양 배양은 $80 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 의 연속조명과 L:D cycle 12:12 두실험구로 구분하였다. 혼합영양 배양은 자가영양에서와 같이 $80 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 의 연속조명과 L:D cycle 12:12로 구분하고 2% glucose를 탄소원으로 넣고 배양하였다. 타가영양 배양은 탄소원으로 2%의 glucose를 넣고 L:D cycle 0:24의 상태로 암배양하였다. 따라서 모두 5개 실험구로 구분하였다.

Glucose는 증류수에 녹여 50% 용액으로 만들어 고압증기멸균 후 클린 벤치 상에서 멸균한 JM배지에 첨가하였다. 250 mL 플라스크에 100 mL JM배지를 분주하고 각 배지 당 4 mL의 glucose를 첨가하여 농도가 2%가 되게 하였다. 모든 실험구는 대수기 성장상태의 원종을 배지의 10% 되게 접종하여 9일간 배양하였다. 세포밀도는 혈구계산판을 이용하여 앞에서와 동일한 방법으로 매일 세포수를 3반복으로 측정하여 SGR을 계산하였다.

세포 크기는 접종일과 실험 9일째 각각 무작위로 30개체의 장축과 단축을 측정(Moticam pro 205A, Motic)하여 평균 세포의 크기를 구하였다. 세포의 건조량은 실험 종료시 $1.2 \mu\text{m}$ glass microfiber filter (GF/C, Whatman)를 60°C 에서 2시간동안 건조하여 중량을 측정한 후 시료당 배양액 30 mL를 여과하여 다시 2시간 건조 한 후 세포의 건조량을 2반복 측정하였다.

1. 3. 염분별 성장률 변화

*M. subterraneus*의 염분내성을 알아보기 위해 온도는 25℃, 조도는 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 연속조명, JM media에서 배양 중이던 *M. subterraneus*를 원심분리 하여 배양수를 제거한 후 다시 0 psu, 15 psu, 33 psu의 JM배지와 의 15 psu, 33 psu의 f/2배지(Guillard and Ryther, 1962; Table 3)에 100×10^4 cells/mL이 되도록 재접종 하였다. 염분이 다른 JM과 f/2배지는 증류수와 해수를 이용하여 조절하였다. 배지와 염분이 다른 5종류의 배지를 250 mL 플라스크에 100 mL 분주한 후 동일한 온도와 빛 조건에서 7일간 배양 후 세포수와 성장률을 측정하여 염분별 성장률 변화를 조사하였다. 실험은 3반복으로 실시하였다.

Table 3. Chemical composition of f/2 medium (Guillard and Ryther, 1962)

Component	Concentration
NaNO ₃	150.0 mg
NaH ₂ PO ₄ ·9H ₂ O	8.69 mg
Ferric EDTA	10.0 mg
MnCl ₂	0.22 mg
CoCl ₂	0.11 mg
CuSO ₄ ·7H ₂ O	0.0196 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.044 mg
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	50.0 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.012 mg
Vitamine B12	1.0 μg
Biotin	1.0 μg
Thiamine HCl	0.2 μg
Filtered seawater	1 L

2. 영양배양별 *M. subterraneus*와 *N. oceanica*의 성장과 영양 비교

2. 1. 성장률과 건조중량

자가영양과 혼합영양 배양방법으로 담수산 진안점조류 *M. subterraneus*와 해수산 진안점조류 *N. oceanica*를 배양하여 성장을 비교하였다. *N. oceanica* (KMMCC-359)는 한국해양미세조류은행에서 분리 배양된 종으로 EPA함량이 높아(Fang *et al.*, 2004, Bae and Hur, 2011a) rotifer의 먹이생물로 널리 활용되는 종이다. *N. oceanica*의 배양은 f/2배지, 25℃, 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 의 조건으로 하였다(Bae and Hur, 2011b).

앞에서와 같이 자가영양 2실험구, 혼합영양 2실험구로 구분하여 3반복으로 실험하였다. 실험조건은 실험1의 방법과 동일하였고 세포수는 3일간격으로 접종 후 9일째까지 3회에 걸쳐 측정하였다. 앞에서와 동일한 방법으로 세포 개체수를 측정하여 SGR을 계산하였다. 세포 크기도 접종일과 9일째에 측정하여 비교하였다. 건조중량은 배양액의 50 mL를 여과하여 앞에서와 동일한 방법으로 측정하였다.

2. 2. 영양분석

*M. subterraneus*와 *N. oceanica*는 각각 JM과 f/2배지를 이용하여 25℃에서 3 L 규모로 정치배양 하였다. 자가영양은 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 연속조명 하에서 L:D cycle 24:0과 12:12, 혼합영양은 glucose 2%, 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 연속조명 하에서 L:D cycle 24:0과 12:12로 배양하였다. 대수기 성장상태의 세포를 원심분리기로 수확한 후 분석 시까지 -80℃에 보관하였다.

아미노산은 시료 50 mg을 시험관에 넣고 6 N HCL을 가하여 밀봉한 후 110℃로 24시간 동안 가수분해 하였다. 건조 후 0.02 N HCl 5 mL를 넣고

혼합한 뒤 0.45 μm syringe filter로 여과하였다. 여과 후 용액을 20 μL 취하여 amino acid analyzer (HSAAA, Hitachi L-8800, Japan)를 이용하여 ninhydrin방법으로 분석하였다. 지방산 분석은 lipid class에서 추출된 지질을 Metcalfe *et al.*(1996)의 방법에 따라 BF_3 -methanol로 methylation 시킨 후 auto sampler가 장착된 gas chromatograph (6890 plus, Agilent, U.S.A)로 분석하였다. GC의 분석조건으로 column은 ω -wax column (30 m $\times$ 0.1 mm I.D length, 0.1 μm thickness, Supleco, U.S.A)을 사용하였고, 표준 지방산은 37 component FAME mix. (Supleco, U.S.A)를 사용하였다. Carrier gas 는 N_2 (30 mL/min)를 사용하였고, oven 온도는 200 $^{\circ}\text{C}$ 에서 230 $^{\circ}\text{C}$ 까지 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 증가시켰고, injector와 온도는 모두 250 $^{\circ}\text{C}$ 로 설정하였다.

3. Rotifer에 대한 *M. Subterraneus*와 *N. oceanica*의 먹이 효율

먹이효율실험은 부경대학교 해양바이오신소재학과 유용플랑크톤은행 (CCUMP, Culture collection of useful marine plankton)에서 받은 *Brachionus plicatilis* (Large type, L: 243.4 $\pm$ 23.3 μm , W: 154.6 $\pm$ 13.1 μm)를 대상으로 조사하였다. 1.2 μm glass microfiber filter (GF/C, Whatman)로 여과한 여과해수와 증류수를 섞어 염분을 15 psu로 만든 후 1 L 비이커에 배양액 500 mL를 넣고 로티퍼를 20 개체/mL로 접종하였다.

먹이로 공급한 두 미세조류 종은 세포의 크기 차이를 고려하여 *M. subterraneus*는 5×10^4 cells/mL/rotifer/day, *N. oceanica*는 10×10^4 cells/mL/rotifer/day로 실험기간 중 먹이가 항상 충분히 남아있을 정도로 공급하였다. Rotifer 배양 온도는 25 $^{\circ}\text{C}$, 조도는 20 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 연속조명하에서 통기배양하며 매일 동일한 시간에 mL당 개체수를 sedwick rafter

chamber를 이용하여 측정하고 SGR을 측정하였다. 측정 시 3% 중성 포르말린을 이용하여 고정시켜 측정하였다.

4. 통계처리

모든 결과의 통계 처리는 SPSS Statistics program (version 17.0, SPSS Inc.: Chicago, U.S.A)을 사용하여 One-way ANOVA-test를 실시한 후, Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)로 최소 유의차 검정 ($P<0.05$)을 실시하였다.



III. 결 과

1. *M. subterraneus*의 최적 배양환경 요인

1. 1. 배지, 온도 및 조도별 성장률

배지별 실험에서 JM배지는 25℃, 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 14일일 때 최고 2,967 cells/mL의 밀도로 급속히 증가하였다. JM배지의 실험구 중 25℃, 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 를 제외한 나머지 3 실험구 모두 최고밀도 2,000 cells/mL 이상 성장하였다. 그에 반해 BG-11 배지 실험구에서는 25℃, 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 를 제외한 나머지 실험구에서는 최고밀도가 1,000 cells/mL 이하였다. (Fig. 1)

온도별 실험에서 25℃에서는 JM배지, 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 2,967 cells/mL의 최고밀도를 보인 반면 28℃에서는 2,075 cells/mL의 밀도를 보였다. 각 실험구의 최고밀도를 비교해보면 JM배지, 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 실험구와 BG-11배지, 60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 를 제외한 나머지 실험구에서 25℃ 조건에서 배양 시 더 높았다.(Fig. 2)

조도별 실험에서는 60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서는 최고 2,120 cells/mL (25℃, JM배지), 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서는 최고 2,967 cells/mL (25℃, JM배지), 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서는 최고 1,907 cells/mL (28℃, JM배지)를 보여 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 가장 높은 성장을 보였다. 60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 실험구에서도 JM배지에서 배양 시에도 최고밀도 2,120 cells/mL를 보였지만, 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 조건의 실험구보다는 BG-11 배지에서 배양 시 낮은 성장률을 보여 덜 효율적이었다.(Fig. 3)

*M. subterraneus*의 최적 배양환경 요인 실험에서 최고 밀도시점을 기준으로 SGR값의 결과는 Fig. 4와 같다. 성장률은 25℃, 28℃ 실험구 모두 JM

배지가 기존에 알려진 BG-11 배지보다 높은 값을 보였다. 25℃에서는 JM 배지, 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 0.536으로 가장 높았으며, 같은 조건 60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서 0.502로 그 다음으로 높았다. 다른 조도에서는 SGR값이 높은 것에 비해 25℃, 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 에서는 JM배지, BG-11배지 모두 0.383, 0.398로 가장 낮았다. 이 결과 *M. Subterraneus*의 최적배양환경은 25℃, JM배지, 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 로 파악되었다.



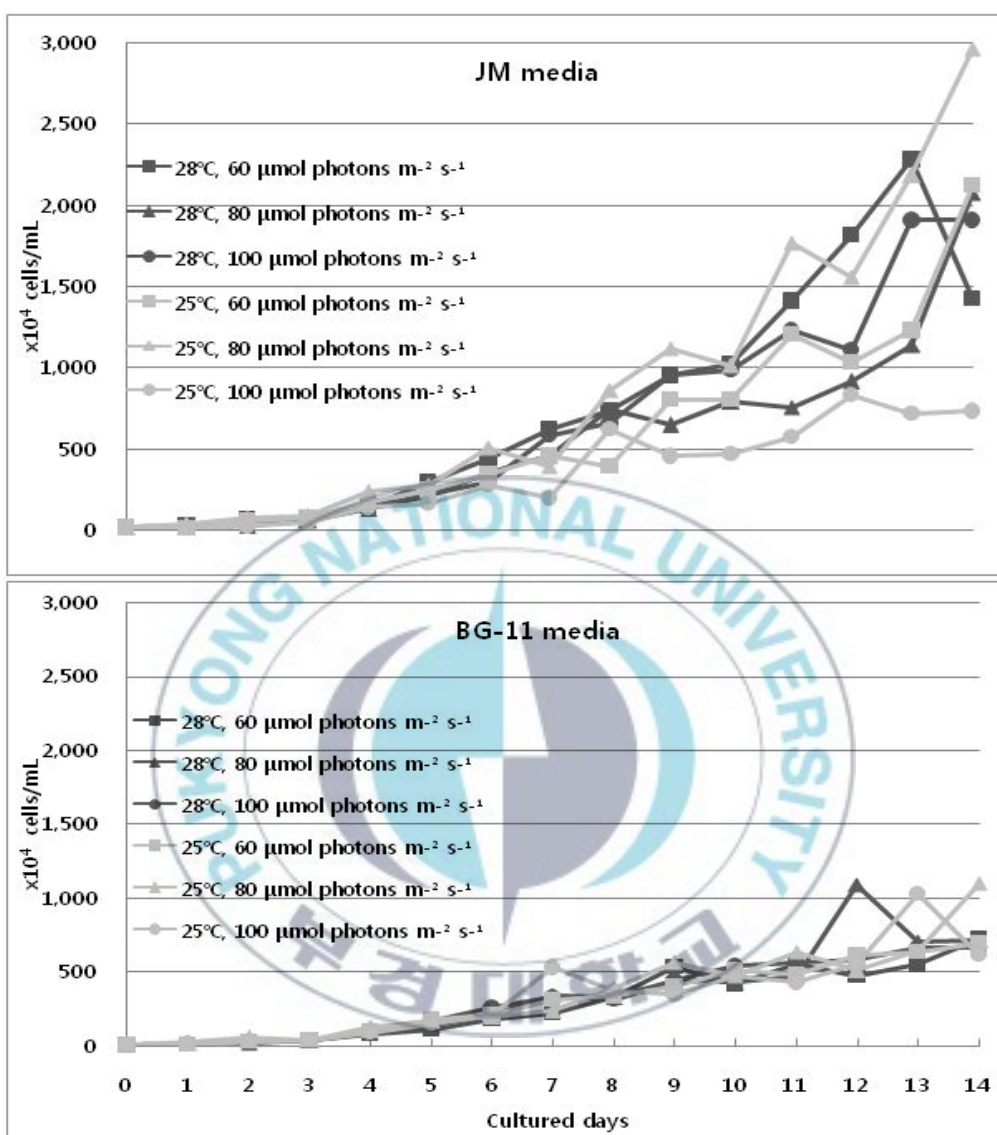


Fig. 1. Cell density of *Monodus subterraneus* cultured in JM media and BG-11 media with different temperatures and light intensities.

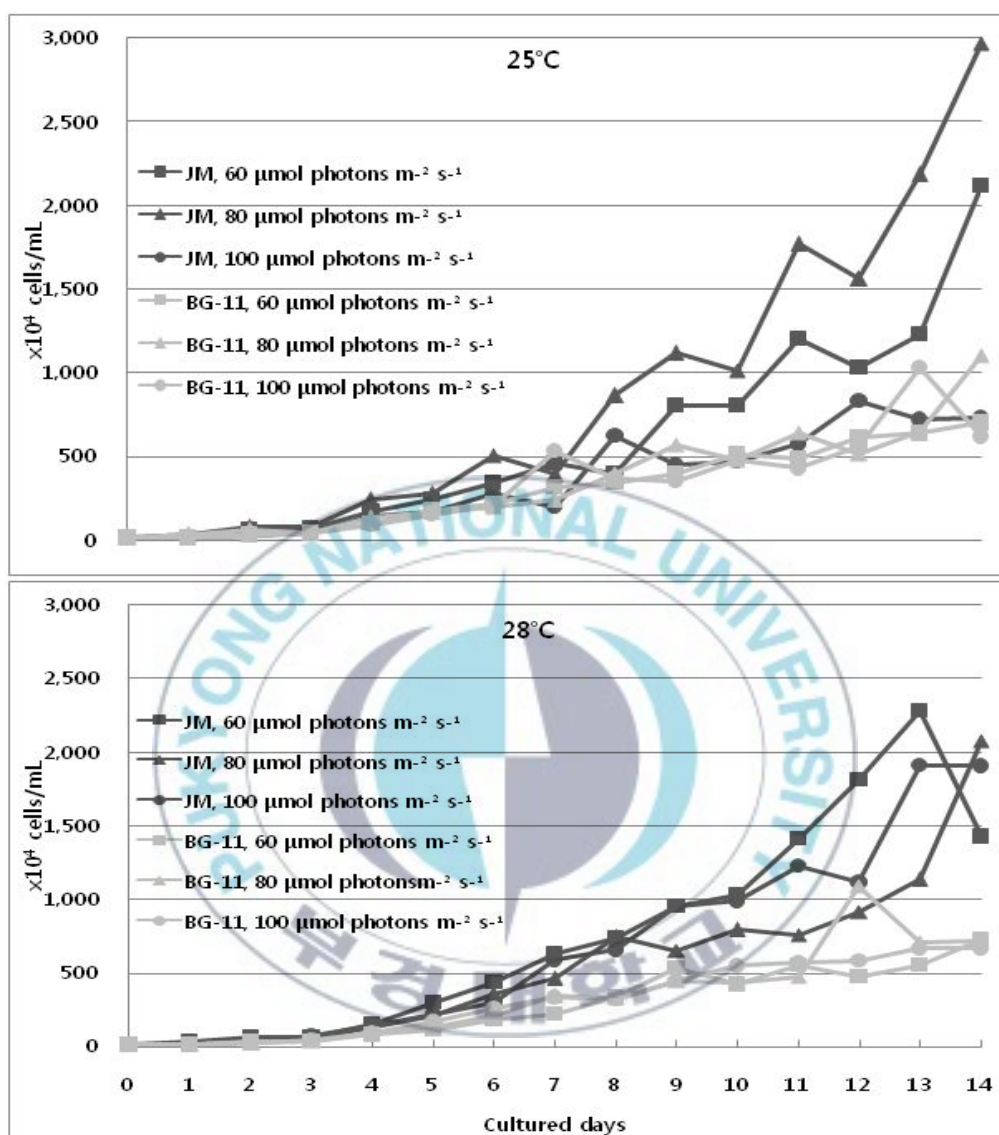


Fig. 2. Cell density of *Monodus subterraneus* cultured at 25°C and 28°C with different media (JM and BG-11) and light intensities.

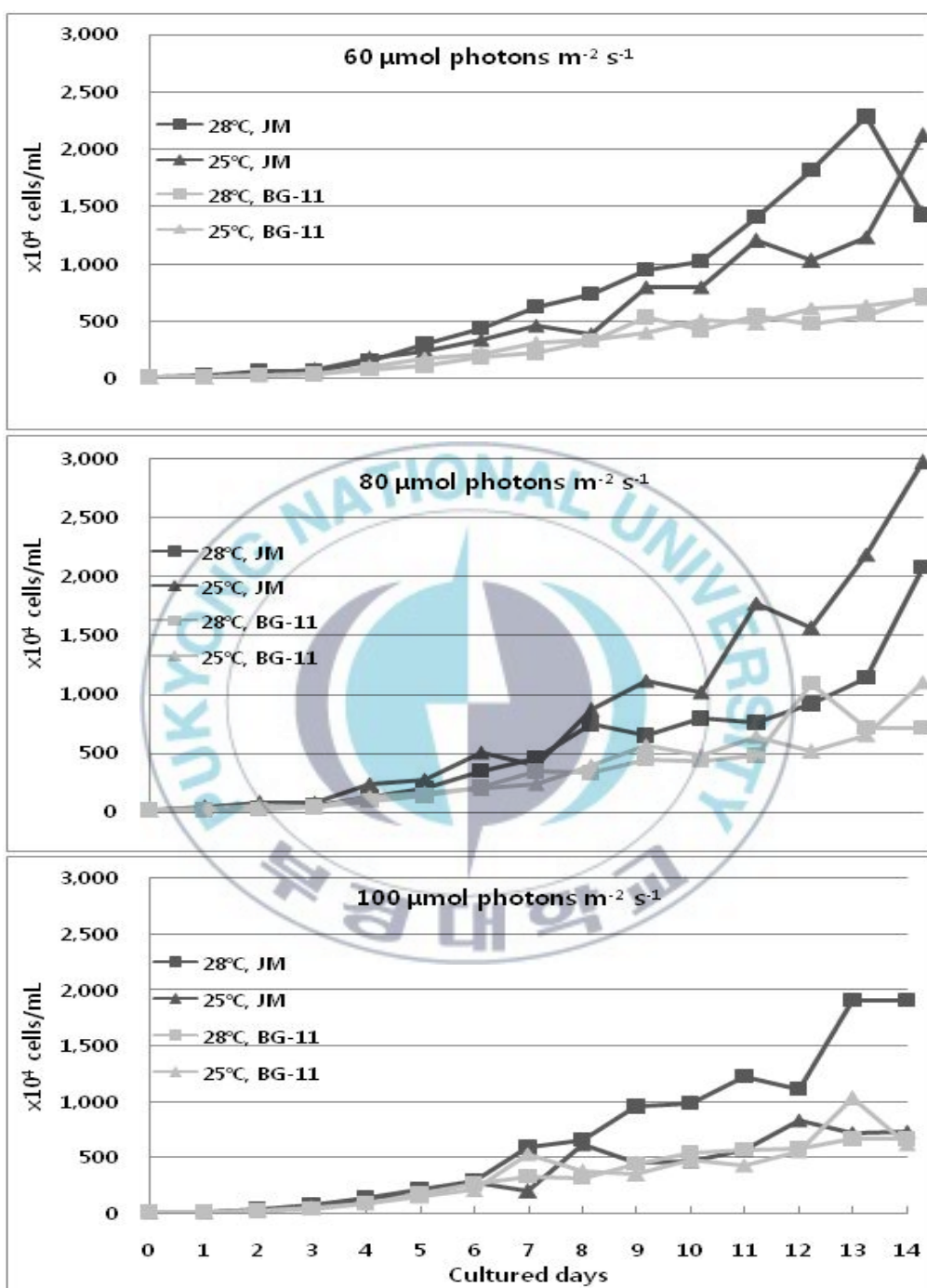


Fig. 3. Cell density of *Monodus subterraneus* cultured under 60, 80 and 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ with different temperatures and media (JM and BG-11).

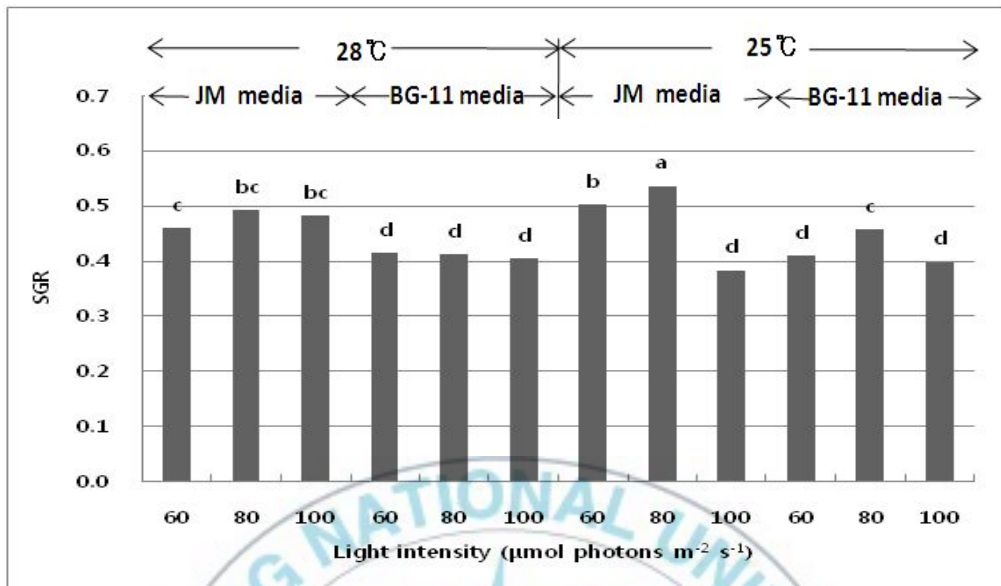


Fig. 4. Specific growth rate of *Monodus subterraneus* cultured with different culture conditions. Different letters on the bar mean significantly difference ($P<0.05$).

1. 2. 영양배양별 성장률과 건조중량

*M. subterraneus*를 자가영양, 혼합영양 및 타가영양으로 배양한 결과, 세포밀도의 변화는 Fig. 5와 같다. 실험 7일째까지는 자가영양으로 24시간 연속조명한 실험구의 세포밀도가 833 cells/mL로 혼합영양으로 24시간 연속조명한 실험구의 598 cells/mL보다 높았으나, 8일째부터 혼합영양으로 24시간 연속조명한 실험구의 세포밀도가 급격하게 증가하며, 9일째의 1,894 cells/mL에 달해 자가영양으로 24시간 연속조명한 실험구의 세포밀도 1,048 cells/mL 보다 월등히 높은 밀도를 보였다. 그러나 타가영양으로 배양한 경우는 성장이 일어나지 않았다.

배양 9일을 기준으로 한 세포의 성장률은 혼합영양 24시간 연속조명에서 0.718로 다른 실험구에 비해서 유의하게 월등히 높았다. 또 타가영양에서는 -0.078의 성장률을 보여 *M. subterraneus*는 타가영양이 불가능한 것으로 나타났다. 24시간 연속조명한 것은 12시간 조명한 실험구에 비하여 자가영양과 혼합영양 배양 모두에서 유의하게 높은 성장률을 보였다 ($P<0.05$)(Fig. 6).

배양액 300 mL의 세포를 수확하여 건조중량을 측정한 결과, 혼합영양 실험구가 자가영양 실험구에 비해서 약 10배 이상 높았고, 24시간 연속조명한 실험구가 12시간 조명한 실험구보다 더 높은 건조중량을 보였다(Fig. 7). 세포 크기에서도 혼합영양으로 배양한 세포는 자가영양으로 배양한 세포에 비하여 더 큰 경향을 보였다(Table. 4). 세포 당 건조량은 혼합영양 실험구가 자가영양 실험구에 비해 유의하게 높았다. 혼합영양으로 24시간 조명한 실험구가 0.0353 ng으로 가장 높았고 12시간 조명한 0.0289 ng에 비하여 유의하게 높은 건조량을 보였다. 자가영양으로 배양한 것은 0.0021~0.0027 ng으로 L:D cycle에 따른 유의한 차이가 없었다(Fig. 8).

1. 3. 염분에 따른 성장률

*M. subterraneus*의 염분변화에 따른 성장률은 Fig. 9에 나타내었다. 접종 일로부터 7일 후 측정한 결과, 기존에 배양 중이던 대조구 JM 0 psu 배지에서 SGR은 0.326 (최고밀도 518×10^4 cells/mL)로 가장 높았다. 그 다음으로 f/2 15 psu 배지에서 SGR은 0.229 (최고밀도 369×10^4 cells/mL)로 높았다. 33 psu에서 보다는 15 psu에서 JM배지에서보다 f/2배지에서의 성장률이 더 높은 경향을 보였다.

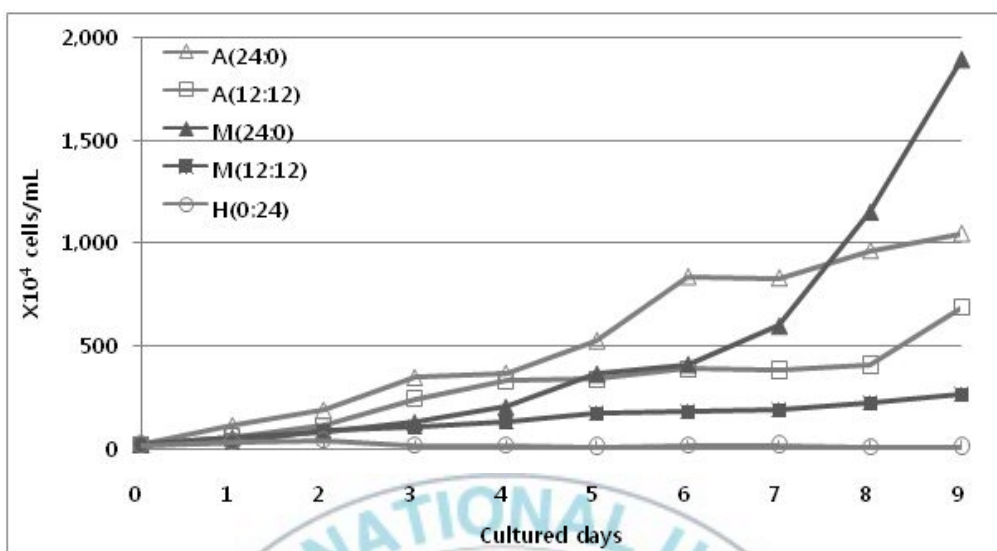


Fig. 5. Cell density of *Monodus subterraneus* cultured with different trophic culture conditions (A: autotrophic, M: mixotrophic, H: heterotrophic, 24:0 and 12:12 = L:D cycle, G: glucose 2%).

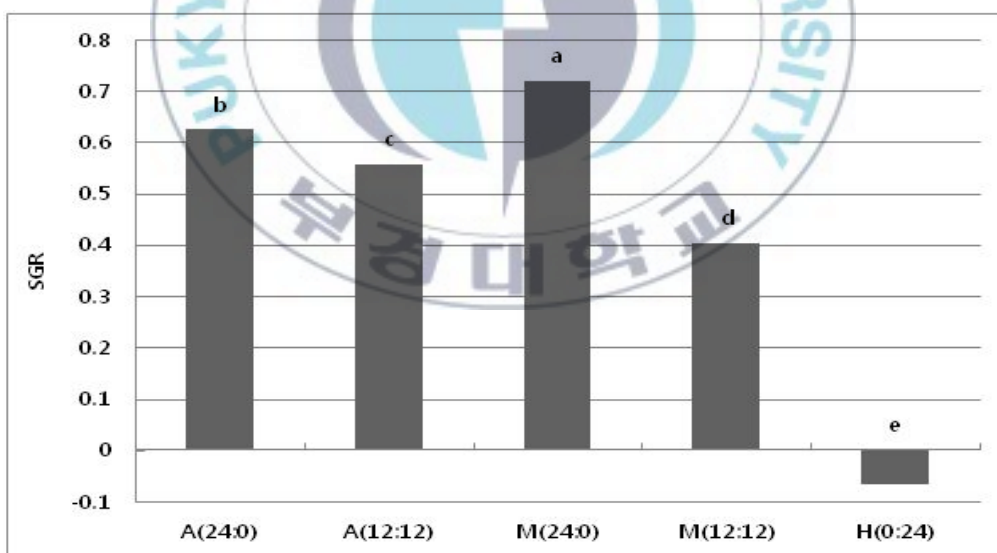


Fig. 6. Specific growth rate of *Monodus subterraneus* cultured with different trophic conditions (A: autotrophic, M: mixotrophic, H: heterotrophic, 24:0 and 12:12 = L:D cycle). Different letter on the bar mean significantly difference ($P < 0.05$).

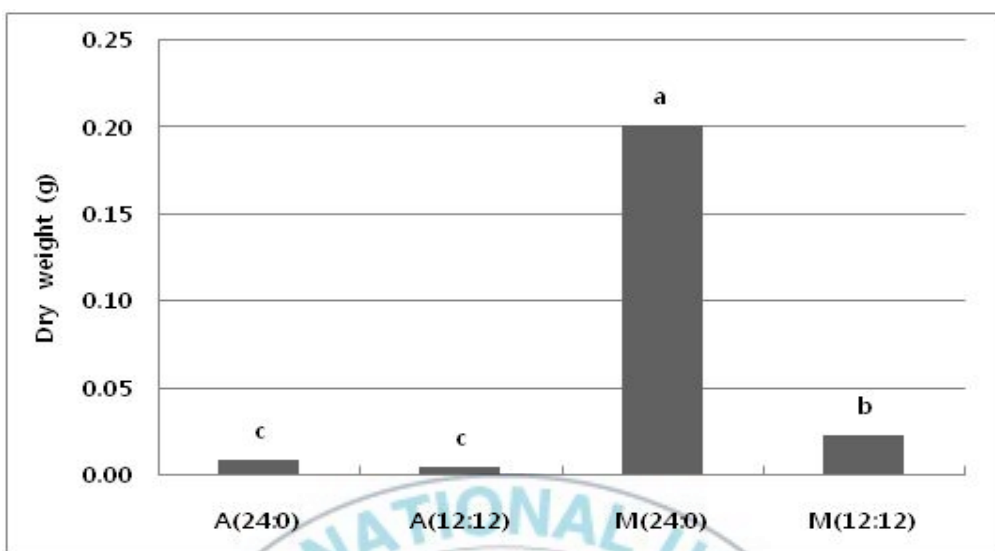


Fig. 7. Biomass in dry weight from 300mL of *Monodus subterraneus* cultured with different trophic conditions (A: autotrophic, M: mixotrophic, 24:0 and 12:12 = L:D cycle). Different letter on the bar mean significantly difference ($P<0.05$).

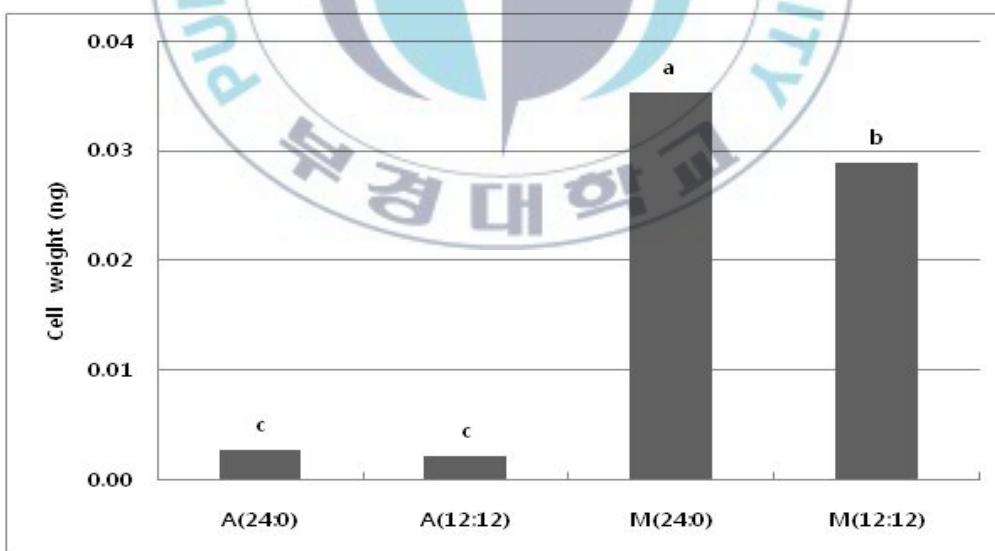


Fig. 8. Cell weight of *Monodus subterraneus* cultured with different trophic conditions (A: autotrophic, M: mixotrophic, 24:0 and 12:12 = L:D cycle). Different letter on the bar mean significantly difference ($P<0.05$).

Table. 4. Cell size and dried cell weight of *Monodus subterraneus* cultured with different trophic conditions (A: autotrophic, M: mixotrophic, 24:0 and 12:12 = L:D cycle)

Culture	Length (μm)	Width (μm)	Weight/cell (ng)
A(24:0)	6.45 $\pm$ 0.99 ^b	3.66 $\pm$ 0.50 ^b	0.0027 $\pm$ 0.00028 ^c
A(12:12)	5.98 $\pm$ 0.77 ^c	3.31 $\pm$ 0.33 ^c	0.0022 $\pm$ 0.00035 ^c
M(24:0)	7.52 $\pm$ 0.91 ^a	3.65 $\pm$ 0.81 ^b	0.0353 $\pm$ 0.00163 ^a
M(12:12)	7.80 $\pm$ 0.83 ^a	4.99 $\pm$ 0.74 ^a	0.0289 $\pm$ 0.00177 ^b

Different letters in the same column mean significantly difference ($P<0.05$).



Fig. 9. Specific growth rate of *Monodus subterraneus* cultured with different salinities media. Different letters on the bar mean significantly difference ($P<0.05$).

2. 영양배양별 *M. subterraneus*와 *N. oceanica*의 성장과 영양

2. 1. 세포 성장률, 크기 및 건조중량

*M. subterraneus*와 *N. oceanica*를 자가영양과 혼합영양으로 배양한 결과 세포밀도의 변화는 Fig. 10과 같다. *M. subterraneus*의 경우, 24시간 연속조명은 12시간 조명보다 자가영양과 혼합영양 모두 더 높은 성장률을 보였다. 24시간 연속조명하에 2% glucose를 첨가하여 배양한 실험구에서는 세포밀도 1,564 cells/mL에 달해 다른 실험구에 비해서 월등히 높았다. 또한 혼합영양으로 배양한 실험구가 자가영양 실험구에 비해서 광주기에 상관없이 성장률이 더 높았다. 그에 반해 *N. oceanica*는 24시간 연속조명하에 배양한 자가영양 실험구에서 세포밀도가 2,227 cells/mL, 12시간조명에 배양한 자가영양 실험구가 3,311 cells/mL로 혼합영양으로 배양한 실험구에 비해 세포밀도가 더 높았다. *M. subterraneus*와는 반대로 12시간조명하에 배양한 실험구가 24시간 연속조명 실험구보다 세포밀도가 1.5배가량 높았다. 배양 9일을 기준으로 한 SGR은 *M. subterraneus*의 경우, 24시간 연속조명하에 2% glucose를 첨가한 실험구가 0.441로 가장 높았으며, *N. oceanica*의 경우에는 12시간조명 조건하에 탄소원을 첨가하지 않은 실험구가 0.561로 가장 높았다. (Fig. 11)

배양액 500 mL당 세포를 수확하여 건조중량을 측정한 결과, *N. oceanica*는 자가영양과 혼합영양배양의 건조중량은 24시간 연속조명이나 12시간조명 실험구 모두 0.107~0.129 g으로 차이가 없었다. 그러나 *M. subterraneus*는 혼합영양의 경우 24시간 연속조명과 12시간 조명 실험구에서 각각 0.449 g, 0.232 g으로 자가영양 실험구의 0.045 g, 0.029 g에 비해 건조중량이 약 10 배 높게 측정되었으며, 24시간 조명실험구는 12시간 실험구에 비하여 건조중량이 더 높은 경향을 보였다(Fig. 12).

세포당 건조량을 측정한 결과, *N. oceanica*는 자가영양과 혼합영양배양의 세포당 건조중량은 24시간 연속조명이나 12시간조명 실험구 모두 0.0036~0.0050 ng으로 차이가 없었다. 그에 반해 *M. subterraneus*는 혼합영양의 경우 24시간 연속조명과 12시간 조명 실험구에서 각각 0.0237 ng, 0.0293 ng으로 자가영양 실험구의 0.0118 ng, 0.0134 ng에 비해 건조중량이 약 2 배 높게 측정되었으며, 24시간 조명실험구는 12시간 실험구에 비하여 세포당 건조량 또한 더 높은 경향을 보였다(Fig. 13).

또한 세포크기에서도 자가영양 실험구 (3.33~3.68 μm)와 혼합영양 실험구 (3.69~4.59 μm)의 크기가 거의 유사한 *N. oceanica*와는 달리 *M. subterraneus*는 12시간 조명하의 자가영양 실험구 (6.24~6.78 μm)와 혼합영양 실험구 (6.85~7.25 μm)의 세포크기는 장축의 크기변화가 뚜렷했다(Fig. 14).

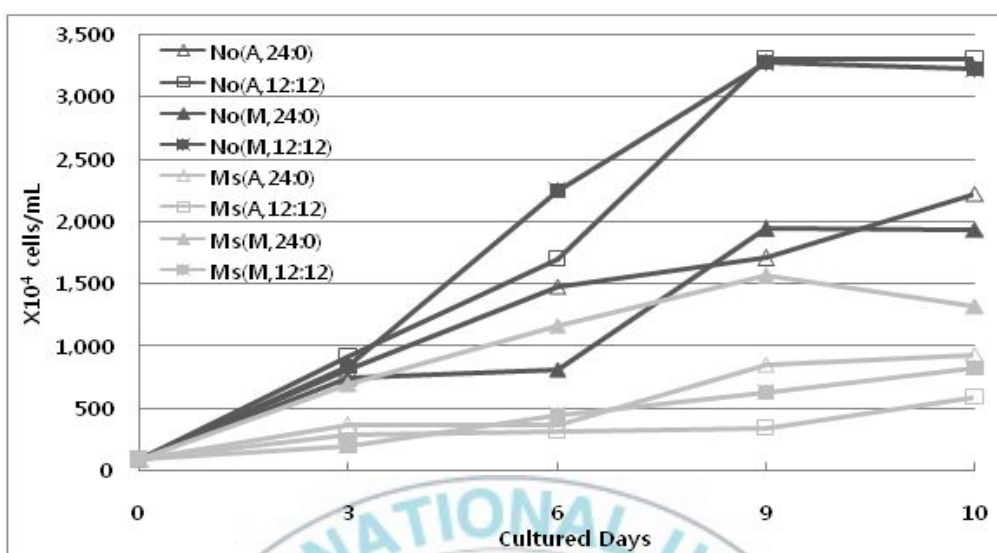


Fig. 10. Cell density of *Nannochloropsis oceanica* and *Monodus subterraneus* cultured with different trophic culture conditions (No: *N. oceanica*, Ms: *M. subterraneus*, A: autotrophic, M: mixotrophic, 24:0 and 12:12 = L:D cycle).

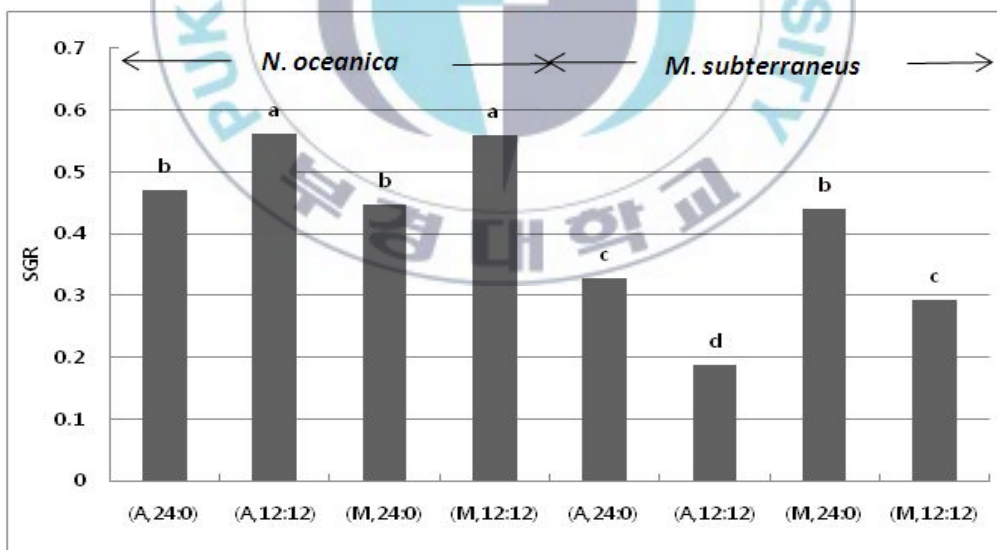


Fig. 11. Specific growth rate of *Monodus subterraneus* and *Nannochloropsis oceanica* cultured with different trophic conditions (A: autotrophic, M: mixotrophic, 24:0 and 12:12 = L:D cycle). Different letters on the bar mean significantly difference ($P<0.05$).

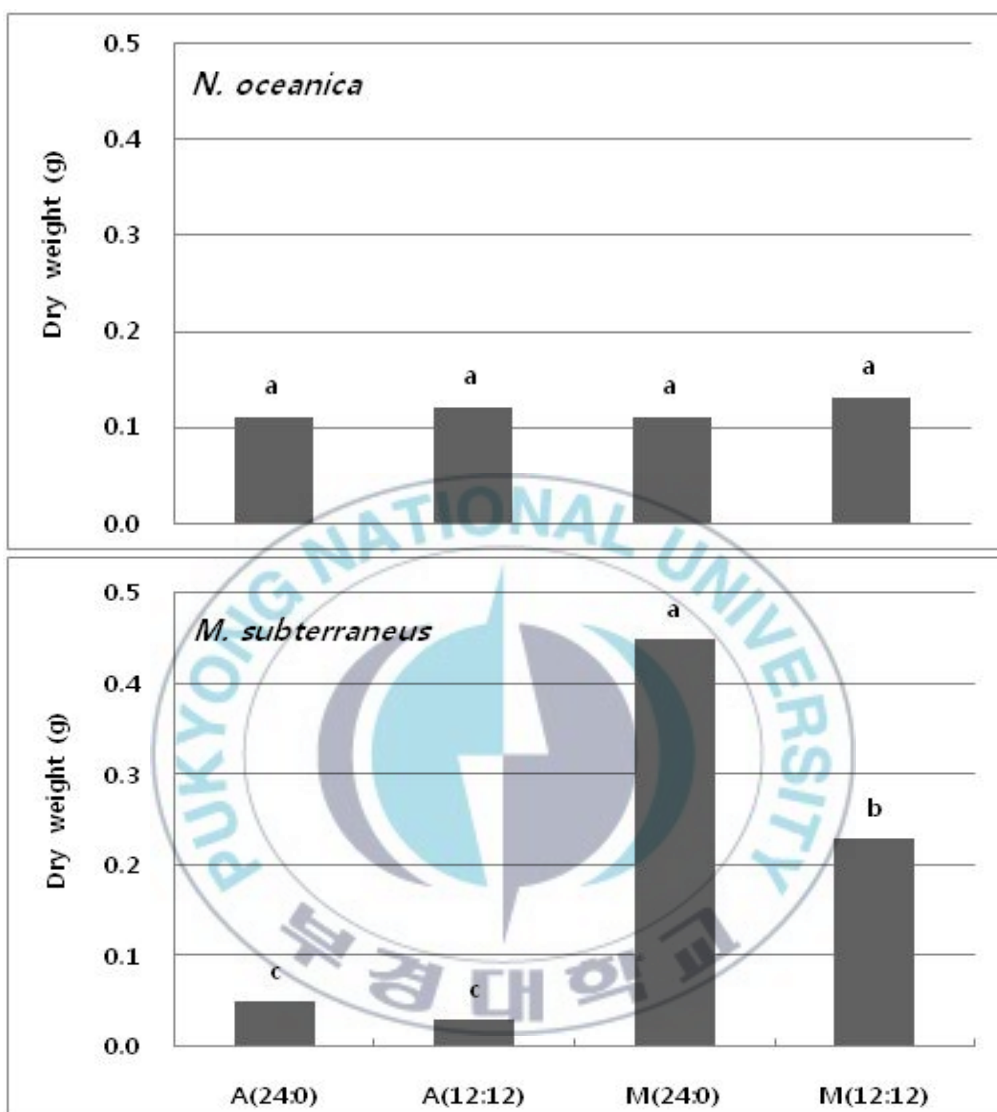


Fig. 12. Biomass in dry weight from 500mL of *Nannochloropsis oceanica* and *Monodus subterraneus* cultured with different trophic conditions (A: autotrophic, M: mixotrophic, 24:0 and 12:12 = L:D cycle). Different letters on the bar mean significantly difference ($P < 0.05$).

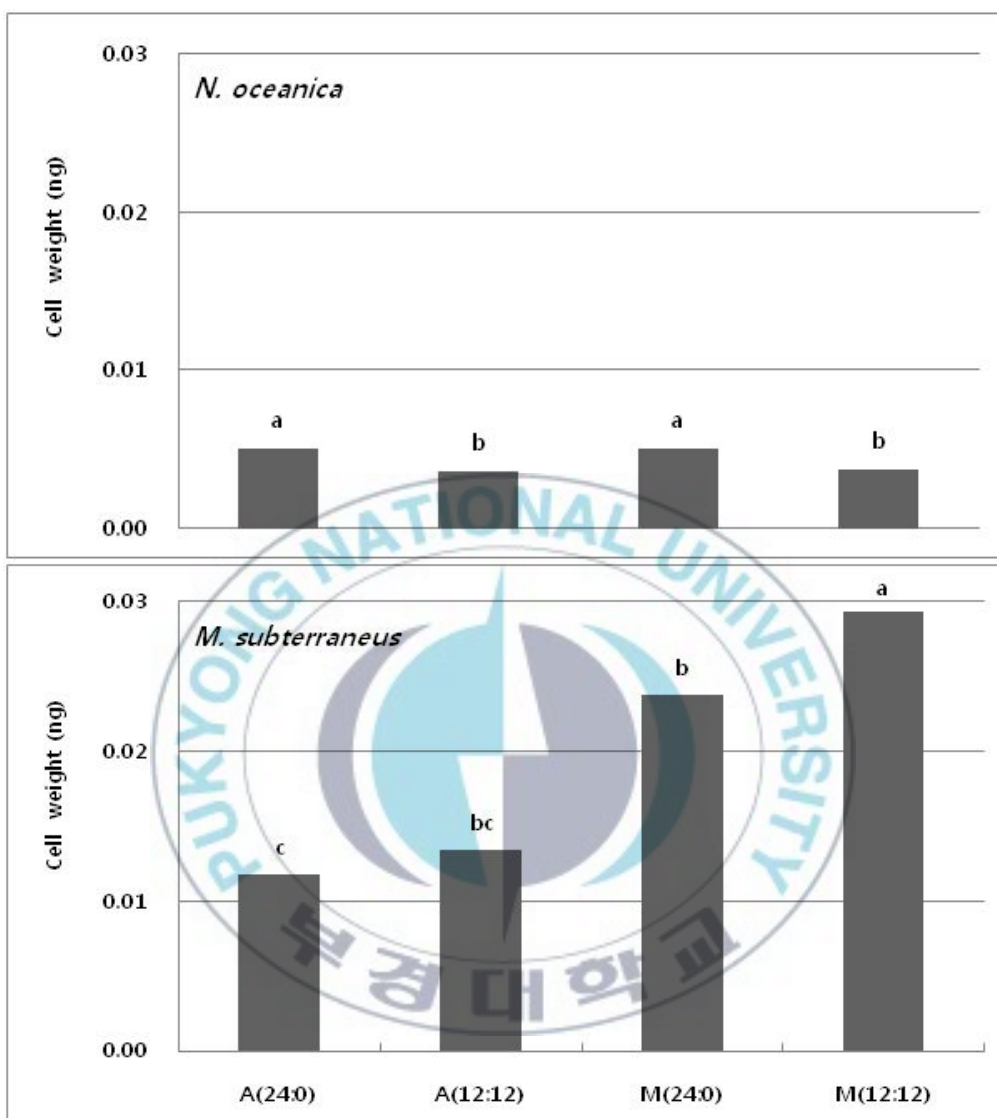


Fig. 13. Cell dry weight of *Nannochloropsis oceanica* and *Monodus subterraneus* cultured with different trophic conditions (A: autotrophic, M: mixotrophic, 24:0 and 12:12 = L:D cycle). Different letters on the bar mean significantly difference ($P < 0.05$).

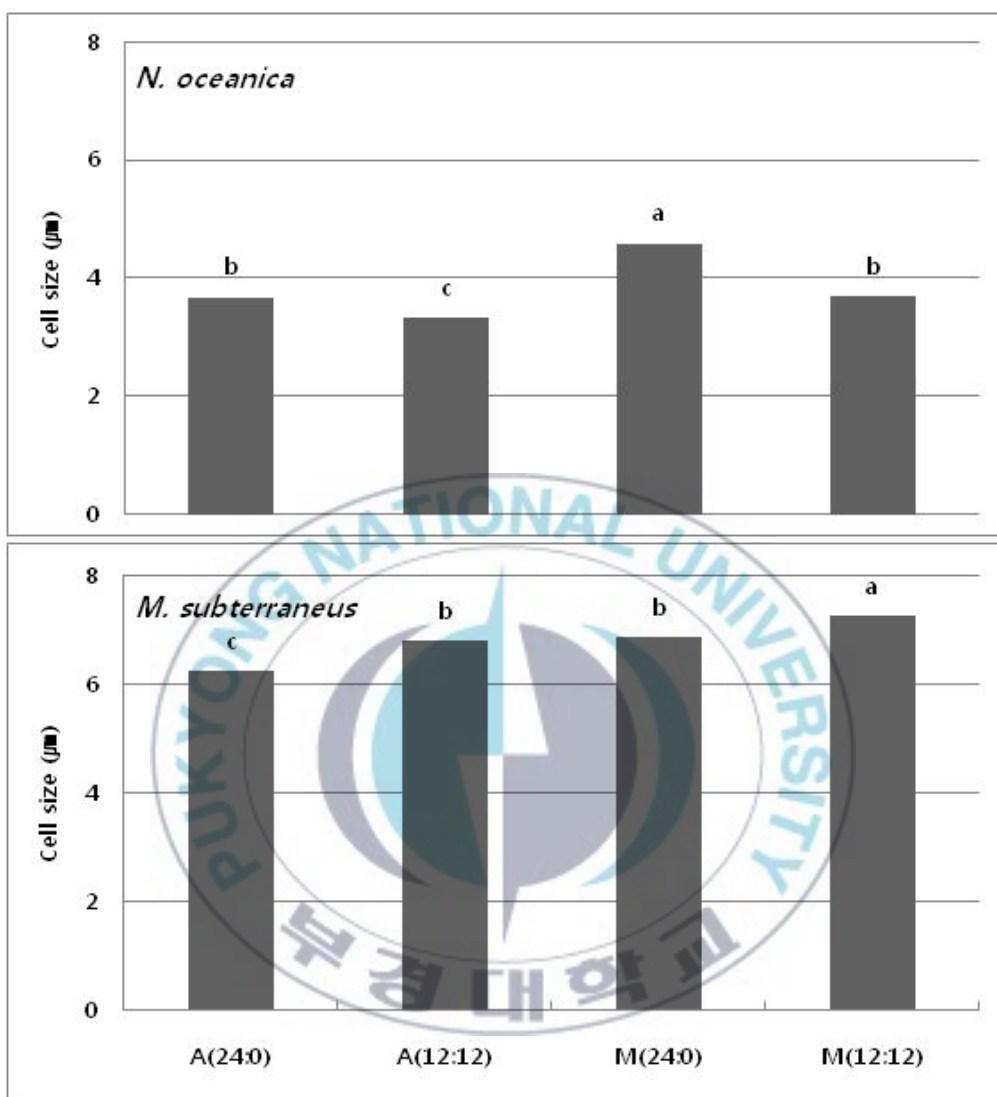


Fig. 14. Cell size of *Nannochloropsis oceanica* and *Monodus subterraneus* cultured with different trophic conditions (A: autotrophic, M: mixotrophic, 24:0 and 12:12 = L:D cycle). Different letters on the bar mean significantly difference ($P < 0.05$).

2. 2. 영양분석

*M. subterraneus*와 *N. oceanica*의 배양방법에 따른 아미노산 조성 and 단백질 함량은 Table 5에 나타내었다. *M. subterraneus*의 경우 전체 아미노산 조성 중 glutamic acid가 4.5~10 µg/mg로 가장 높았다. Cysteine은 0.4~0.6 µg/mg로 가장 낮았다. 단백질 함량 함량은 24시간 연속조명에서 자가영양으로 배양한 *M. subterraneus*가 36%로 가장 높았으며, 12시간 조명하에서 자가영양으로 배양한 경우는 9%로 가장 낮았다. 필수 아미노산 함량 또한 24시간 연속조명에서 자가영양으로 배양한 것은 12%로 가장 높았으며, 12시간 조명하에서 자가영양으로 배양한 *M. subterraneus*가 3%로 가장 낮았다. 24시간 연속조명의 경우는 자가영양이 혼합영양보다 유의하며 높았고 12시간 조명 실험구에서는 혼합영양이 자가영양보다 높은 단백질 비율을 보였다.

*N. oceanica*의 경우 전체 아미노산 조성 중 glutamic acid가 5.8~12.3 µg/mg로 가장 높았다. Cysteine은 0.3~0.8 µg/mg로 가장 낮았다. 단백질 함량 함량은 12시간 조명하에서 혼합영양으로 배양한 *N. oceanica*가 24%로 가장 높았으며, 24시간 연속조명에서 자가영양으로 배양한 경우는 20%로 가장 낮았다. 필수아미노산 함량 또한 12시간 조명하에서 혼합영양으로 배양한 *N. oceanica*가 7.7%로 가장 높았으며, 24시간 연속조명에서 자가영양으로 배양한 경우는 6%로 가장 낮았다. 조명조건에 관계없이 필수아미노산과 단백질 함량 모두 혼합영양이 자가영양보다 유의하게 높았다.

*M. subterraneus*와 *N. oceanica*의 배양방법에 따른 지방산 조성은 Table 6과 같다. *M. subterraneus*의 경우 전체 지방산 조성 중 EPA가 24시간 연속조명과 12시간 조명에서 혼합영양방법으로 배양한 *M. subterraneus*를 제외한 나머지 6실험구에서 건조중량당 14~24 µg/mg로 가장 높았으며, 그다음으로는 palmitic acid (C16:0)이 14~20 µg/mg로 유사하게 높았다.

EPA 함량은 24시간 연속조명에서 자가영양으로 배양한 *M. subterraneus*에서 24 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 가장 높았다. 24시간 연속조명과 L:D cycle 12:12하에서 혼합영양으로 배양한 *M. subterraneus*에서는 palmitic acid (C16:0) 함량이 12~13 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 가장 높았으며, 그에 반해 EPA함량은 5~6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 낮게 나타났다. DHA함량은 24시간 연속조명하에서 자가영양으로 배양한 *N. oceanica*에서만 2.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 나타났다.

총 지질 함량은 24시간 연속조명하에서 자가배양으로 배양한 *M. subterraneus*에서 345 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 가장 높았으며, L:D cycle 12:12 하에서 자가배양으로 배양한 *M. subterraneus*는 325 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 그다음으로 높았다.

포화지방산 (saturated fatty acids) 함량은 L:D cycle 24:0 하에서 자가배양으로 배양한 *M. subterraneus*에서 52.14 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 유의하게 높았고 ($P<0.05$), L:D cycle 12:12 하에서 자가배양으로 배양한 *M. subterraneus*에서 51.37 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 그다음으로 높았으며, 24시간 연속조명 하에서 혼합영양으로 배양한 *M. subterraneus*에서 가장 낮았다 ($P<0.05$). 단일불포화지방산 (monosaturated fatty acids) 함량은 24시간 연속조명하에서 자가배양으로 배양한 *M. subterraneus*에서 31.46 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 가장 높았고, L:D cycle 12:12 하에서 자가배양으로 배양한 *M. subterraneus*에서 30.81 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 그다음으로 높았으며 24시간 연속조명하에서 자가영양으로 배양한 *N. oceanica*에서 가장 낮았다. PUFA 함량 또한 24시간 연속조명하에서 자가배양으로 배양한 *M. subterraneus*에서 242.18 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 가장 높았으며, L:D cycle 12:12 하에서 혼합영양으로 배양한 *N. oceanica*에서 가장 낮게 나타났다 ($P<0.05$).

Table. 5. Amino acids contents ($\mu\text{g}/\text{mg}$ in dry matter) of *Monodus subterraneus* and *Nannochloropsis oceanica* cultured with different culture conditions under $80 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at 25°C

Amino Acid ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	<i>Monodus subterraneus</i>				<i>Nannochloropsis oceanica</i>			
	Autotrophic		Mixotrophic		Autotrophic		Mixotrophic	
	12:12	24:00	12:12	24:00	12:12	24:00	12:12	24:00
Threonine	3.2 $\pm$ 1.7 ^{bcd}	4.3 $\pm$ 0.6 ^{ab}	2.6 $\pm$ 0.3 ^{cd}	2.7 $\pm$ 0.4 ^{bcd}	4.1 $\pm$ 1.2 ^{abc}	2.3 $\pm$ 0.7 ^d	5.3 $\pm$ 0.6 ^a	2.3 $\pm$ 0.8 ^d
Valine	2.7 $\pm$ 1.4 ^{bc}	3.8 $\pm$ 0.5 ^{ab}	2.7 $\pm$ 0.3 ^{bc}	2.5 $\pm$ 0.4 ^{bc}	3.5 $\pm$ 1.1 ^{abc}	2.1 $\pm$ 0.6 ^c	4.8 $\pm$ 0.7 ^a	2.1 $\pm$ 0.8 ^c
Methionine	0.6 $\pm$ 0.4 ^{bc}	0.4 $\pm$ 0.0 ^{cd}	1.2 $\pm$ 0.1 ^a	0.9 $\pm$ 0.3 ^{ab}	0.4 $\pm$ 0.2 ^{cd}	0.2 $\pm$ 0.1 ^d	1.1 $\pm$ 0.2 ^a	0.2 $\pm$ 0.1 ^d
Isoleucine	2.0 $\pm$ 1.1 ^{bc}	2.9 $\pm$ 0.4 ^{ab}	1.8 $\pm$ 0.2 ^c	1.7 $\pm$ 0.3 ^c	2.4 $\pm$ 0.7 ^{abc}	1.4 $\pm$ 0.4 ^c	3.3 $\pm$ 0.5 ^a	1.4 $\pm$ 0.5 ^c
Leucine	5.1 $\pm$ 2.7 ^{bc}	6.9 $\pm$ 1.1 ^{ab}	3.7 $\pm$ 0.4 ^c	3.4 $\pm$ 0.4 ^c	6.4 $\pm$ 1.9 ^{ab}	3.5 $\pm$ 1.0 ^c	8.7 $\pm$ 1.0 ^a	3.6 $\pm$ 1.3 ^c
Phenylalanine	3.1 $\pm$ 1.6 ^{bc}	3.9 $\pm$ 0.6 ^{ab}	2.0 $\pm$ 0.2 ^c	1.9 $\pm$ 0.2 ^c	3.5 $\pm$ 1.1 ^{ab}	1.9 $\pm$ 0.5 ^c	4.6 $\pm$ 0.6 ^a	2.0 $\pm$ 0.7 ^c
Lysine	4.0 $\pm$ 2.1 ^{bcd}	5.4 $\pm$ 0.8 ^{ab}	2.2 $\pm$ 0.2 ^d	2.3 $\pm$ 0.2 ^{cd}	4.2 $\pm$ 1.2 ^{bc}	2.9 $\pm$ 0.8 ^{cd}	6.5 $\pm$ 0.8 ^a	2.9 $\pm$ 1.1 ^{cd}
Aspartic acid	5.9 $\pm$ 3.0 ^{ab}	5.1 $\pm$ 3.7 ^b	4.5 $\pm$ 0.4 ^b	4.6 $\pm$ 0.5 ^b	6.9 $\pm$ 2.1 ^{ab}	3.8 $\pm$ 1.1 ^b	9.0 $\pm$ 1.1 ^a	3.9 $\pm$ 1.4 ^b
Serine	3.1 $\pm$ 1.6 ^{bc}	4.1 $\pm$ 0.6 ^{ab}	2.0 $\pm$ 0.2 ^c	2.3 $\pm$ 0.3 ^c	3.8 $\pm$ 1.1 ^{ab}	2.1 $\pm$ 0.6 ^c	4.9 $\pm$ 0.6 ^a	2.2 $\pm$ 0.8 ^c
Glutamic acid	7.8 $\pm$ 4.0 ^{bc}	10.1 $\pm$ 1.5 ^{ab}	4.5 $\pm$ 0.5 ^c	4.5 $\pm$ 0.3 ^c	10.3 $\pm$ 3.0 ^{ab}	5.9 $\pm$ 1.7 ^c	12.3 $\pm$ 1.4 ^a	5.8 $\pm$ 2.1 ^c
Glycine	3.4 $\pm$ 1.7 ^{ab}	4.4 $\pm$ 0.7 ^{ab}	2.3 $\pm$ 0.2 ^b	2.2 $\pm$ 0.2 ^b	4.3 $\pm$ 1.3 ^{ab}	2.3 $\pm$ 0.7 ^b	5.6 $\pm$ 0.7 ^a	2.4 $\pm$ 0.9 ^b
Alanine	4.6 $\pm$ 2.4 ^{bc}	5.9 $\pm$ 0.9 ^{abc}	5.0 $\pm$ 0.5 ^{bc}	4.4 $\pm$ 0.7 ^{bc}	6.2 $\pm$ 1.8 ^{ab}	3.4 $\pm$ 1.0 ^c	8.4 $\pm$ 1.0 ^a	3.5 $\pm$ 1.3 ^c
Cysteine	0.5 $\pm$ 0.3 ^{bc}	0.6 $\pm$ 0.1 ^b	0.1 $\pm$ 0.0 ^{bc}	0.4 $\pm$ 0.1 ^{bc}	0.5 $\pm$ 0.2 ^{bc}	0.3 $\pm$ 0.1 ^c	0.8 $\pm$ 0.1 ^a	0.3 $\pm$ 0.1 ^c
Tyrosine	1.8 $\pm$ 1.0 ^{bc}	2.2 $\pm$ 0.2 ^{ab}	1.2 $\pm$ 0.2 ^{bc}	1.1 $\pm$ 0.5 ^{bc}	2.2 $\pm$ 0.9 ^{ab}	1.1 $\pm$ 0.4 ^{bc}	2.9 $\pm$ 0.4 ^a	1.1 $\pm$ 0.6 ^c
HN3	1.2 $\pm$ 0.5 ^{ab}	1.5 $\pm$ 0.3 ^{ab}	1.5 $\pm$ 0.2 ^{ab}	1.6 $\pm$ 0.4 ^a	1.3 $\pm$ 0.3 ^{ab}	1.1 $\pm$ 0.1 ^{ab}	1.6 $\pm$ 0.2 ^a	1.0 $\pm$ 0.2 ^b
Histidine	1.3 $\pm$ 0.6 ^{bc}	1.7 $\pm$ 0.3 ^{ab}	0.9 $\pm$ 0.1 ^c	0.9 $\pm$ 0.1 ^c	1.6 $\pm$ 0.4 ^{ab}	0.9 $\pm$ 0.2 ^c	1.9 $\pm$ 0.2 ^a	0.9 $\pm$ 0.2 ^c
Arginine	4.1 $\pm$ 2.2 ^{ab}	5.7 $\pm$ 0.8 ^a	3.3 $\pm$ 0.3 ^b	3.0 $\pm$ 0.6 ^b	4.8 $\pm$ 1.4 ^{ab}	2.7 $\pm$ 0.8 ^b	6.2 $\pm$ 0.8 ^a	2.7 $\pm$ 1.0 ^b
Proline	3.2 $\pm$ 1.8 ^b	4.1 $\pm$ 0.8 ^b	2.6 $\pm$ 0.4 ^b	2.0 $\pm$ 0.5 ^b	7.9 $\pm$ 2.4 ^a	4.1 $\pm$ 1.4 ^b	9.4 $\pm$ 1.3 ^a	4.2 $\pm$ 1.8 ^b
Protein(%)	9.0 $\pm$ 6.2 ^d	36.0 $\pm$ 8.2 ^a	16.9 $\pm$ 1.1 ^{bc}	13.0 $\pm$ 3.1 ^{cd}	22.2 $\pm$ 0.8 ^b	20.0 $\pm$ 1.0 ^{bc}	24.4 $\pm$ 1.8 ^b	20.5 $\pm$ 1.6 ^b
EAA(%)	2.9 $\pm$ 2.0 ^d	12.1 $\pm$ 2.2 ^a	5.6 $\pm$ 0.4 ^{bc}	4.3 $\pm$ 1.0 ^{cd}	6.8 $\pm$ 0.3 ^b	6.0 $\pm$ 0.3 ^{bc}	7.7 $\pm$ 0.6 ^b	6.3 $\pm$ 0.45 ^{bc}

12:12 and 24:0 = L:D cycle.

Different letters in the same row mean significantly difference ($P < 0.05$).

Table. 6. Fatty acid contents ($\mu\text{g/mg}$ in dry matter) of *Monodus subterraneus* and *Nannochloropsis oceanica* cultured with different culture conditions under $80 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at 25°C

Fatty acid ($\mu\text{g/mg}$)	<i>Monodus subterraneus</i>				<i>Nannochloropsis oceanica</i>			
	Autotrophic		Mixotrophic		Autotrophic		Mixotrophic	
	12:12	24:00	12:12	24:00	12:12	24:00	12:12	24:00
C10:0	6.3 $\pm$ 2.5 ^a	6.3 $\pm$ 3.9 ^a	6.3 $\pm$ 1.6 ^a	6.0 $\pm$ 2.8 ^a	3.6 $\pm$ 0.6 ^a	2.6 $\pm$ 2.3 ^a	2.5 $\pm$ 0.4 ^a	4.5 $\pm$ 1.8 ^a
C11:0	2.9 $\pm$ 1.1 ^a	2.9 $\pm$ 1.7 ^a	1.9 $\pm$ 1.8 ^{ab}	-	1.6 $\pm$ 0.3 ^{ab}	1.8 $\pm$ 0.2 ^{ab}	0.8 $\pm$ 0.7 ^b	2.0 $\pm$ 0.8 ^{ab}
C12:0	4.6 $\pm$ 1.7 ^a	-	2.1 $\pm$ 3.7 ^{ab}	-	1.7 $\pm$ 1.5 ^{ab}	1.1 $\pm$ 1.8 ^b	1.4 $\pm$ 1.2 ^{ab}	1.8 $\pm$ 1.7 ^{ab}
C13:0	2.8 $\pm$ 0.8 ^a	2.6 $\pm$ 1.4 ^{ab}	1.2 $\pm$ 1.1 ^{bc}	0.4 $\pm$ 0.8 ^c	1.6 $\pm$ 0.2 ^{abc}	1.5 $\pm$ 0.2 ^{abc}	1.0 $\pm$ 0.1 ^c	1.7 $\pm$ 0.6 ^{abc}
C14:0	5.4 $\pm$ 1.7 ^a	4.9 $\pm$ 2.4 ^a	4.5 $\pm$ 1.1 ^a	1.1 $\pm$ 1.8 ^b	3.6 $\pm$ 0.8 ^{ab}	3.5 $\pm$ 0.5 ^{ab}	2.9 $\pm$ 0.6 ^{ab}	4.0 $\pm$ 1.3 ^a
C14:1	2.5 $\pm$ 0.9 ^a	2.3 $\pm$ 1.3 ^a	1.3 $\pm$ 1.1 ^a	2.1 $\pm$ 1.0 ^a	1.5 $\pm$ 0.2 ^a	1.7 $\pm$ 0.1 ^a	0.9 $\pm$ 0.2 ^a	1.7 $\pm$ 0.8 ^a
C15:0	2.1 $\pm$ 0.7 ^{ab}	2.3 $\pm$ 1.2 ^a	2.3 $\pm$ 0.4 ^a	1.9 $\pm$ 0.8 ^{ab}	1.2 $\pm$ 0.2 ^{ab}	1.3 $\pm$ 1.7 ^{ab}	0.9 $\pm$ 0.2 ^b	1.5 $\pm$ 0.5 ^{ab}
C15:1	2.2 $\pm$ 0.8 ^a	1.9 $\pm$ 1.2 ^{ab}	2.0 $\pm$ 0.5 ^{ab}	1.8 $\pm$ 0.8 ^{ab}	1.2 $\pm$ 0.2 ^{ab}	1.2 $\pm$ 0.1 ^{ab}	0.8 $\pm$ 0.1 ^b	1.4 $\pm$ 0.6 ^{ab}
C16:0	18.8 $\pm$ 3.2 ^a	19.9 $\pm$ 5.2 ^a	12.5 $\pm$ 2.6 ^a	12.6 $\pm$ 2.2 ^a	14.4 $\pm$ 3.6 ^a	14.3 $\pm$ 2.8 ^a	20.0 $\pm$ 3.9 ^a	18.3 $\pm$ 7.4 ^a
C16:1	14.5 $\pm$ 1.1 ^a	13.4 $\pm$ 3.0 ^a	6.9 $\pm$ 1.2 ^b	6.6 $\pm$ 1.2 ^b	9.2 $\pm$ 2.5 ^{ab}	9.3 $\pm$ 2.5 ^{ab}	14.2 $\pm$ 3.3 ^a	12.2 $\pm$ 5.1 ^a
C17:0	2.2 $\pm$ 0.8 ^b	2.3 $\pm$ 1.2 ^b	4.1 $\pm$ 0.6 ^a	2.2 $\pm$ 0.8 ^b	1.2 $\pm$ 0.2 ^b	1.3 $\pm$ 0.2 ^b	1.1 $\pm$ 0.2 ^b	1.5 $\pm$ 0.6 ^b
C17:1	2.0 $\pm$ 0.6 ^{bc}	1.9 $\pm$ 1.1 ^{bc}	5.3 $\pm$ 1.0 ^a	2.4 $\pm$ 0.9 ^b	1.1 $\pm$ 0.2 ^c	1.2 $\pm$ 0.0 ^{bc}	1.0 $\pm$ 0.12 ^c	1.3 $\pm$ 0.6 ^{bc}
C18:0	3.0 $\pm$ 1.2 ^{ab}	3.2 $\pm$ 1.6 ^{ab}	3.4 $\pm$ 0.6 ^a	2.9 $\pm$ 1.1 ^{ab}	1.8 $\pm$ 0.4 ^{ab}	1.9 $\pm$ 0.2 ^{ab}	1.5 $\pm$ 0.3 ^b	2.1 $\pm$ 0.8 ^{ab}
C18:1n9	8.8 $\pm$ 2.7 ^{ab}	10.4 $\pm$ 3.8 ^{ab}	11.2 $\pm$ 2.9 ^a	8.1 $\pm$ 2.7 ^{ab}	6.6 $\pm$ 0.9 ^{ab}	7.2 $\pm$ 1.1 ^{ab}	5.5 $\pm$ 0.9 ^b	8.5 $\pm$ 3.3 ^{ab}
C18:2n6	5.1 $\pm$ 1.4 ^a	5.6 $\pm$ 2.5 ^a	4.0 $\pm$ 0.8 ^{ab}	4.1 $\pm$ 1.6 ^{ab}	3.3 $\pm$ 0.4 ^{ab}	3.8 $\pm$ 0.5 ^{ab}	2.4 $\pm$ 0.3 ^b	4.7 $\pm$ 1.8 ^{ab}
C18:3n6	1.1 $\pm$ 1.2 ^a	1.9 $\pm$ 1.1 ^a	1.8 $\pm$ 0.4 ^a	1.7 $\pm$ 0.7 ^a	1.1 $\pm$ 0.2 ^a	1.2 $\pm$ 0.2 ^a	0.8 $\pm$ 0.1 ^a	1.4 $\pm$ 0.5 ^a
C18:3n3	1.1 $\pm$ 1.1 ^{ab}	1.8 $\pm$ 1.1 ^a	1.8 $\pm$ 0.4 ^a	-	0.6 $\pm$ 0.5 ^{ab}	0.4 $\pm$ 0.7 ^b	0.7 $\pm$ 0.2 ^{ab}	0.7 $\pm$ 0.7 ^{ab}
C20:0	-	1.0 $\pm$ 1.8 ^{bc}	-	1.1 $\pm$ 2.0 ^{bc}	2.6 $\pm$ 0.4 ^{ab}	2.9 $\pm$ 0.3 ^{ab}	1.9 $\pm$ 0.3 ^{abc}	3.2 $\pm$ 1.2 ^a
C20:1n9	1.0 $\pm$ 1.7 ^a	0.6 $\pm$ 1.1 ^a	-	1.1 $\pm$ 1.0 ^a	1.0 $\pm$ 0.8 ^a	-	-	0.5 $\pm$ 0.9 ^a
C20:2	0.9 $\pm$ 1.5 ^{ab}	0.8 $\pm$ 0.7 ^{ab}	-	1.9 $\pm$ 1.0 ^a	0.8 $\pm$ 0.7 ^{ab}	1.3 $\pm$ 0.1 ^{ab}	0.5 $\pm$ 0.4 ^{ab}	1.4 $\pm$ 0.6 ^{ab}
C20:3n6	-	1.8 $\pm$ 1.6 ^{ab}	-	-	0.8 $\pm$ 1.3 ^b	2.0 $\pm$ 1.7 ^{ab}	-	3.1 $\pm$ 1.2 ^a
C21:0	3.4 $\pm$ 1.1 ^a	3.4 $\pm$ 1.9 ^a	3.1 $\pm$ 0.7 ^a	3.2 $\pm$ 1.2 ^a	2.2 $\pm$ 0.3 ^a	2.4 $\pm$ 0.3 ^a	1.9 $\pm$ 0.2 ^a	2.9 $\pm$ 1.1 ^a
C20:3n3	4.4 $\pm$ 0.6 ^{ab}	5.0 $\pm$ 1.5 ^a	2.7 $\pm$ 0.3 ^b	2.9 $\pm$ 0.8 ^b	3.5 $\pm$ 0.3 ^{ab}	2.7 $\pm$ 0.3 ^b	3.8 $\pm$ 0.3 ^{ab}	3.6 $\pm$ 1.6 ^{ab}
C20:4n6 (AA)	1.1 $\pm$ 1.1 ^{ab}	1.9 $\pm$ 1.2 ^a	-	-	-	0.4 $\pm$ 0.7 ^b	0.3 $\pm$ 0.5 ^b	-
C22:0	-	-	-	4.0 $\pm$ 4.2 ^a	0.7 $\pm$ 1.1 ^b	0.9 $\pm$ 1.6 ^{ab}	-	1.5 $\pm$ 1.6 ^{ab}
C20:5n3 (EPA)	20.2 $\pm$ 1.1 ^{ab}	24.3 $\pm$ 2.5 ^a	5.6 $\pm$ 0.7 ^c	5.4 $\pm$ 0.9 ^c	19.4 $\pm$ 1.2 ^{ab}	14.0 $\pm$ 0.8 ^b	20.3 $\pm$ 2.0 ^{ab}	19.1 $\pm$ 11.4 ^{ab}
C22:1n9	-	0.9 $\pm$ 1.5 ^a	-	-	-	2.8 $\pm$ 4.9 ^a	-	0.9 $\pm$ 1.6 ^a
DHA	-	-	-	-	-	4.8 $\pm$ 0.2 ^a	-	-
Saturated	4.0 $\pm$ 1.1 ^a	3.8 $\pm$ 1.5 ^a	3.2 $\pm$ 0.9 ^a	2.7 $\pm$ 0.8 ^a	2.8 $\pm$ 0.5 ^a	2.8 $\pm$ 0.4 ^a	2.8 $\pm$ 0.6 ^a	3.5 $\pm$ 1.1 ^a
Mono unsaturated	3.9 $\pm$ 0.9 ^a	3.9 $\pm$ 1.2 ^a	3.3 $\pm$ 0.5 ^a	2.8 $\pm$ 0.7 ^a	2.6 $\pm$ 0.5 ^a	2.6 $\pm$ 0.5 ^a	2.8 $\pm$ 0.6 ^a	3.3 $\pm$ 1.4 ^a
Poly unsaturated	1.8 $\pm$ 0.7 ^{ab}	2.4 $\pm$ 0.6 ^a	1.5 $\pm$ 0.3 ^{ab}	1.5 $\pm$ 0.6 ^{ab}	1.4 $\pm$ 0.2 ^{ab}	1.6 $\pm$ 0.5 ^{ab}	1.2 $\pm$ 1.1 ^b	2.1 $\pm$ 0.8 ^{ab}
DHA/EPA	-	-	-	-	-	0.3 $\pm$ 0.0 ^a	-	-
EPA/AA	4.7 $\pm$ 0.8 ^a	5.0 $\pm$ 0.9 ^a	2.1 $\pm$ 0.4 ^b	1.9 $\pm$ 0.2 ^b	5.6 $\pm$ 0.3 ^a	5.3 $\pm$ 0.4 ^a	5.4 $\pm$ 0.2 ^a	5.2 $\pm$ 1.0 ^a
n-3 HUFA	24.7 $\pm$ 1.3 ^a	29.5 $\pm$ 5.3 ^a	10.6 $\pm$ 1.2 ^b	8.6 $\pm$ 2.1 ^b	22.2 $\pm$ 1.6 ^a	21.7 $\pm$ 1.4 ^a	22.9 $\pm$ 2.0 ^a	22.7 $\pm$ 12.7 ^a
Total lipid ($\mu\text{g/mg}$ in dry matter)	324.8 $\pm$ 70.6 ^{ab}	345.2 $\pm$ 101.7 ^a	235.6 $\pm$ 46.6 ^{ab}	205.6 $\pm$ 56.9 ^b	240.4 $\pm$ 34.0 ^{ab}	250.9 $\pm$ 39.2 ^{ab}	243.5 $\pm$ 36.4 ^{ab}	295.2 $\pm$ 114.5 ^{ab}

12:12 and 24:0 = L:D cycle.

Different letters in the same row mean significantly difference ($P < 0.05$).

3. Rotifer에 대한 *M. subterraneus*와 *N. oceanica*의 먹이효율

*M. subterraneus*와 *N. oceanica*를 먹이로 각각 공급하여 배양한 rotifer *Brachionus plicatilis*의 성장 결과는 Fig. 15.와 같다. 총 7일을 배양한 결과 *N. oceanica*를 먹이로 공급한 실험구는 5일째 최고밀도인 67 개체/mL로 최고였고, 6일째 부터는 감소하였다. 자가영양 방법으로 배양한 *M. subterraneus*를 먹이로 공급한 실험구에서는 6일째에 70 개체/mL로 *N. oceanica*를 먹이로 공급한 실험구보다 더 높은 밀도를 보였다. 7일 후에는 개체수가 줄어들었다. 그에 반해 혼합영양으로 배양한 *M. subterraneus*를 공급한 실험구에서는 4일째에 최고밀도가 측정되었지만, 42 개체/mL에 불과했으며, 5일째 부터는 개체수가 줄어들었으며 실험 7일째에는 28개체/mL까지 감소하였다. 실험 7일째를 기준으로 한 SGR값은 자가영양 방법으로 배양한 *M. subterraneus*를 먹이로 공급한 실험구에서 0.239로 자가영양 방법으로 배양한 *N. oceanica*를 먹이로 공급한 실험구의 0.185보다 유의하게 높았다.

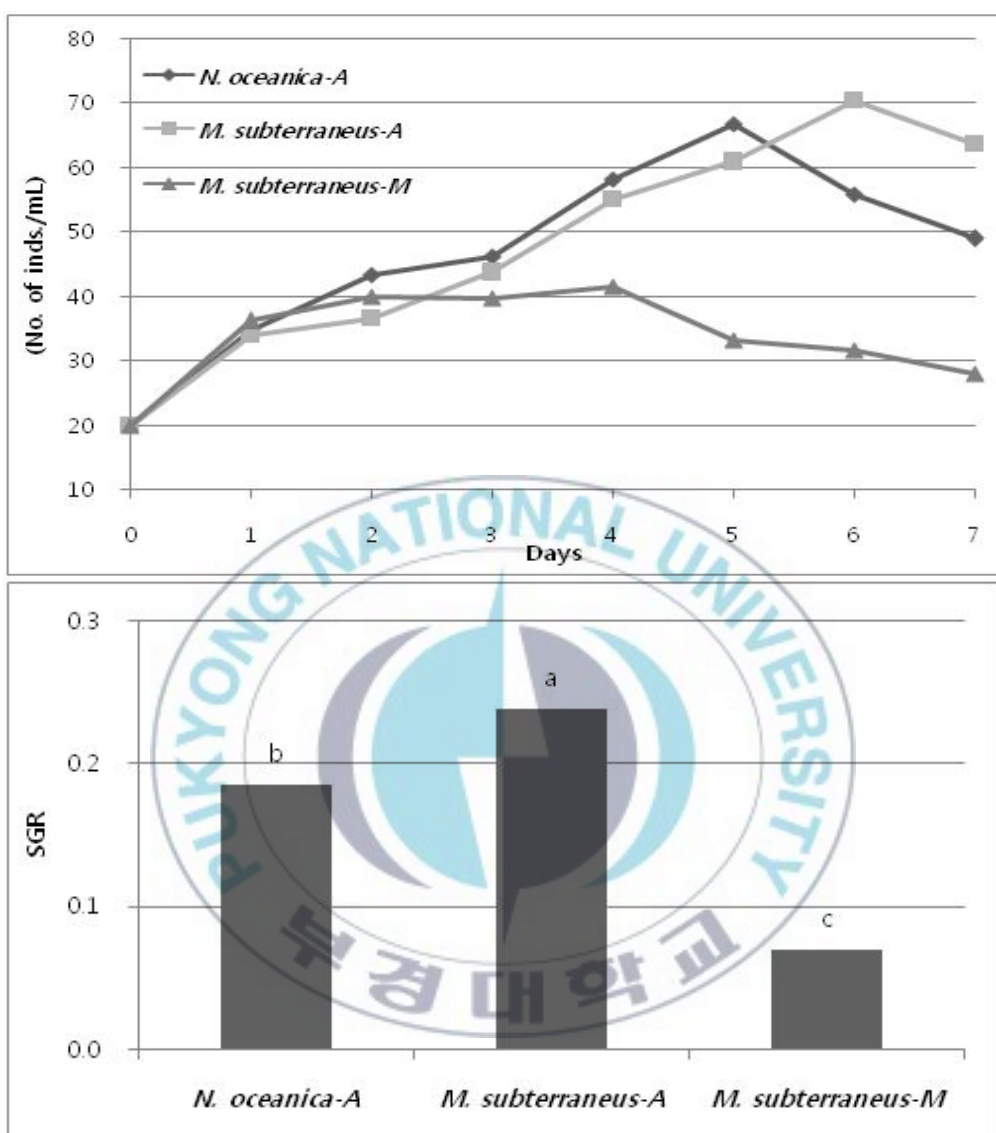


Fig. 15. Cell density and Specific growth rate of *Brachionus plicatilis* fed *Nannochloropsis oceanica* or *Monodus subterraneus* (A: autotrophic, M: mixotrophic). Different letters on the bar mean significantly difference ($P < 0.05$).

IV. 논의

미세조류는 양식의 먹이생물을 포함한 많은 산업분야에 활용된다. EPA와 같은 PUFA는 심장혈관문제, 암 및 염증성 질환 등의 다양한 질병과 장애의 치료에 널리 이용되므로(Samuelsson, 1983), 그 수요 또한 중요한 문제로 떠올랐다. 현재 EPA의 공급은 주로 어류의 오일에서 추출하므로 어류의 가격과 품질의 변동에 따라 공급량이 달라질 수 있으며 또한 농약과 중금속에 따른 오염도 문제되고 있다. 따라서 미세조류로부터 경제적이고 안정적인 EPA 생산의 필요성이 대두되고 있다. 이러한 관점에서 EPA 생산에 적합한 미세조류를 찾고, 그에 맞는 배양환경을 조사하여 하루빨리 효율적인 대량배양이 이루어져야한다(El *et al.*, 2000). 담수산 진안점조류인 *M. subterraneus*는 해수종 못지않게 EPA 함량이 높아 유용할 것으로 알려져 왔다(Iwamoto and Sato, 1986). 따라서 *M. subterraneus*의 효율적인 배양방법과 EPA 함량에 대한 다양한 실험이 이루어지고 있다. *M. subterraneus*의 EPA 함량은 성장단계에 따라 다르며 또한 온도, 배지, PH, 조도 등의 외부적인 환경에 따라서도 다른 것으로 보고된 바 있다(Cohen, 1994, Khozin and Cohen, 1996).

본 연구에서는 일차적으로 *M. subterraneus*의 최적배양 환경조건을 알아보기 위해 배지, 온도, 조도에 따른 성장률을 조사했다. *M. subterraneus*의 배양에 널리 이용되는 BG-11배지(Liu and Lin, 2001)와 proteose 배지로 *M. subterraneus*를 배양한 결과 BG-11배지가 더 효율적인 성장을 보인다고 하였다. 따라서 본 조사에서 BG-11 배지를 담수배지로 잘 알려진 JM배지와 성장률을 비교한 결과, JM배지는 BG-11배지에 비해서 일간성장률이 훨씬 높아 JM배지가 *M. subterraneus*의 대량배양에 적합할 것으로 판단되었다.

온도를 25℃와 28℃로 나누어 배양한 결과, 25℃에서 배양 시 세포의

모양 변형도 적었고, 세균의 증식도 덜했으며 성장률 역시 28℃에 비해서 더 높았다. 조도의 경우 60, 80, 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 구간으로 나누어 성장률을 측정한 결과 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 실험구에서 가장 높은 성장률을 보였다. 따라서 *M. subterraneus*의 배양은 JM배지, 25℃, 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 의 조건이 적합할 것으로 판단되었다. *M. subterraneus*는 혼합영양배양이 가능한 것으로 알려져 있어(Liu and Lin, 2001), 이와 같은 최적배양환경조건을 토대로 *M. subterraneus*의 영양배양방법에 따른 성장을 조사하였다.

Glucose는 다른 유기물 acetate 나 pyruvate에 비해서 *M. subterraneus*의 혼합영양에 가장 효과적인 탄소원 유기물로, 배지에 1% 공급 시 4~5일째에 최대밀도로 성장한다(Lam, 2000). 따라서 본 조사에서는 9일 동안 배양할 것을 고려하여 glucose의 농도를 2%로 공급하였다. 그 결과 L:D cycle 24:0 연속조명 광조건 하에서 glucose 2%를 첨가하여 배양한 혼합영양 실험구가 SGR값이 0.718로 가장 성장률이 높았으며 그다음으로는 L:D cycle 24:0 광 조건에 탄소원을 첨가하지 않은 자가 영양 실험구가 0.621로 성장률이 높았다. 하지만 L:D cycle 12:12의 광조건에서 탄소원을 첨가한 실험구는 0.554로 같은 탄소원을 제공한 연속조명 조건의 혼합영양 실험구보다 훨씬 성장률이 낮았다. 이와 같이 혼합영양의 경우 빛의 조건은 성장에 큰 영향을 주는 것으로 판단된다. 이와 같은 결과로 보아 *M. subterraneus*는 자가영양과 혼합영양 배양에서 모두 성장이 가능하지만 빛과 탄소원 모두 충분히 제공되었을 때 그 성장률이 훨씬 높아진다는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 24시간 연속 암 조건에서 배양한 타가영양 실험구에서는 성장이 전혀 이루어지지 않는 결과로 보아 *M. subterraneus*는 타가영양 방법으로는 성장이 되지 않음을 알 수 있었다.

*M. subterraneus*의 최적 배양환경 실험과 영양성 실험을 바탕으로 같은

분류군인 해수산 진안점조류 *N. oceanica*와의 배양방법에 따른 성장을 비교한 결과, 총 세포밀도에서는 *M. subterraneus*가 *N. oceanica*보다는 훨씬 낮았다. *N. oceanica*는 혼합영양 배양에서보다 자가영양 배양에서 성장이 좋는데 비해 *M. subterraneus*는 자가영양 배양보다 혼합영양 배양에서 더 높은 성장률을 보였다. *M. subterraneus*는 연속조명 하에서 전체적으로 높은 성장률을 보였다. 이와 같이 *M. subterraneus*는 성장에 있어서 빛이 필수적이며, 탄소원을 공급받아 성장에 이용함에 있어서도 빛이 필수적이며 효과적으로 활용된다는 것을 알 수 있었다. 또한 세포 당 건조중량 결과를 보면, 모든 실험구의 세포당 건조중량의 차이가 거의 없는 *N. oceanica*에 비해 *M. subterraneus*는 혼합영양 방법으로 배양한 세포의 건조중량이 자가영양 배양방법의 세포보다 훨씬 높았다.

영양방법을 달리 하여 배양한 *M. subterraneus*와 *N. oceanica*를 수확하여 아미노산과 지방산을 분석한 결과, 필수아미노산과 단백질 함량 모두 24시간 연속조명에서 자가영양으로 배양한 *M. subterraneus*에서 가장 높았으며, 이는 같은 배양방법의 *N. oceanica*보다 더 높았다. 지방산분석에서는 총지질함량, 단일불포화지방산, 다가불포화지방산 모두 24시간 연속조명에서 자가영양으로 배양한 *M. subterraneus*에서 가장 높았으며 포화지방산 함량도 L:D cycle 12:12에서 자가배양 방법으로 배양한 *M. subterraneus*에서 가장 높았다. 특히 EPA의 경우 24시간 연속조명에서 자가영양 방법으로 배양한 *M. subterraneus*에서 가장 높았고, 그 다음으로 L:D cycle 12:12에서 자가영양 방법으로 배양한 *M. subterraneus*에서 높았다. 이 값은 *N. oceanica*의 실험구 중에서 가장 높은 값을 보인 L:D cycle 12:12에서 혼합배양 방법으로 배양한 *N. oceanica*와 유의하게 같았다. *M. subterraneus*는 혼합배양 방법으로 배양한 실험구는 EPA함량이 낮았지만 자가영양 방법으로 배양한 경우, *N. oceanica*의 EPA함량보다 높거나 유사했다.

Rotifer *B. plicatilis*를 대상으로 *M. subterraneus*와 *N. oceanica*의 먹이효율을 조사한 결과, 배양 시 최고밀도는 자가영양으로 배양한 *M. subterraneus*를 공급한 실험구에서 70 개체/mL로 가장 높았으며, 자가영양으로 배양한 *N. oceanica*를 먹이로 공급한 실험구에서 67 개체/mL로 그 다음으로 높았다. 그러나 탄소원을 공급하여 혼합영양방법으로 배양한 *M. subterraneus*를 먹이로 공급한 실험구에서는 4일째 최고밀도 42 개체/mL로 측정된 뒤 바로 감소하는 추세를 보여 가장 낮은 먹이효율을 보였다.

이로써 담수산 진안점조류인 *M. subterraneus*의 최적배양조건을 더욱 구체적으로 파악하여, 혼합영양배양 방법을 통한 성장률을 극대화할 필요가 있다. 또 혼합영양배양은 자가영양 배양에 비하여 아미노산, 지방산 등의 영양함량이 떨어지는 경향이 있으므로(Kim and Hur, 2013) 혼합영양 배양 후 영양함량을 증가시킬 수 있는 배양방법에 대한 연구도 필요하다. *M. subterraneus*는 이미 널리 알려진 해수산 *Nannochloropsis* 종과 더불어 담수종의 먹이로의 활용가능성을 기대해 볼 수 있으며, 아미노산과 지질의 함량이 높아 종 자체에서의 영양분 추출, 특히 EPA의 활용을 통한 상업적 이용가능성도 볼 수 있다.

V. 결론

EPA는 가장 중요한 고도 불포화 지방산의 하나이다. 해양생물에서 생산되는 EPA는 현재 기능성 식품에 널리 사용된다. 담수산 진안점조류 *M. subterraneus*는 같은 분류군인 해수산 진안점조류 *N. oceanica*만큼이나 높은 EPA함량을 가지고 있는 종으로 알려져 있다.

본 연구에서는 *M. subterraneus*의 배지, 온도, 조도 별로 성장 실험을 한 결과 JM배지, 25℃, 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 가 적합하였다. 이러한 최적 배양 조건을 바탕으로 한 자가, 혼합, 타가영양배양에 따른 성장률을 실험한 결과 *M. subterraneus*의 성장에 있어서는 빛은 필수적이며 탄소원도 효율적으로 이용한다는 것을 알 수 있었다. 또한 빛이 없는 암조건에서는 탄소원을 공급하여도 성장을 하지 않았다.

영양배양방법에 따른 *M. subterraneus*와 *N. oceanica*의 성장률을 비교한 결과, *M. subterraneus*는 연속조명하에 탄소원을 공급하여 혼합영양 배양할 때 다른 실험구에 비해 월등히 높은 성장이 일어났으며, *N. oceanica*는 그와는 반대로 L:D cycle 12:12으로 탄소원 공급 없이 자가영양 배양할 때가 더 성장률이 높았다. 또한 세포당 건조중량은 배양방법에 따라 거의 차이가 없는 *N. oceanica*에 비해 *M. subterraneus*는 혼합영양 배양은 자가영양 배양보다 약 2배 높았다. 이로써 *M. subterraneus*의 효율적인 배양을 위해서는 80 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 24시간 연속조명이 가장 효율적이며, 탄소원의 공급으로 그 효과는 극대화되며 이 때 공급되는 탄소원은 glucose 2%가 적합한 것으로 나타났다.

그러나 영양분석 결과에서는 *M. subterraneus*는 24시간 연속조명하에서 자가영양 으로 배양한 세포는 필수아미노산, 단백질함량, 총 지질함량, 고도불포화지방산의 함량이 모두 가장 높게 나타났고 탄소원을 공급해 배양

한 혼합영양에서는 낮게 나타났다. 이는 같은 방법으로 배양한 *N. oceanica*의 분석결과보다 높았다. 또 rotifer *B. plicatilis*를 대상으로 실험한 결과에서도 자가영양으로 배양된 *M. subterraneus*를 공급한 rotifer의 성장은 *N. oceanica*를 공급한 rotifer보다 더 고밀도로 성장하였다. 이와 같은 결과를 종합할 때 담수산 *M. subterraneus*는 해수산 *N. oceanica*를 대체할 수 있는 새로운 먹이생물로 개발가능성이 있다.



VI. 감사의 글

먼저 항상 부족한 저에게 학문에 대한 관심과 사고의 폭을 넓혀 주시고, 더 많이 알 수 있도록 지도해 주시며 이 논문이 완성될 수 있기까지 연구과정을 거쳐 결과를 얻을 수 있도록 세심하게 가르쳐 주시고 충고해 주신 허성범 교수님께 가장 먼저 감사의 뜻을 전합니다.

또한 석사과정을 마칠 때까지 많은 가르침을 주신 장영진 교수님, 김창훈 교수님, 김동수 교수님, 배승철 교수님, 김종명 교수님, 남윤권 교수님, 공승표 교수님, 강성민 교수님께도 진심으로 감사의 마음을 전합니다.

바쁜 와중에도 실험하는데 있어서 많은 도움을 준 진희 언니, 주연이 언니, 기숙이 언니, 진희, 정현이, 도영이, 유림이, 태경이, 건우에게 감사하다는 말을 전하고 싶습니다. 또 지금은 떨어져 있지만 항상 마음으로 응원해주는 혜정이 언니, 성진이, 대근이, 은지에게도 고마움을 전합니다.

힘들 때마다 옆에서 항상 든든한 버팀목이 되어준 내 친구 지은이, 혜영이, 세희, 수영이를 비롯하여 먼저 손내밀어주고 응원해준 여러 친구들과 상재오빠를 비롯한 과선·후배, 또 H.I.K 오빠들에게도 고맙다고 전하고 싶습니다.

끝으로 바쁘다는 핑계로 잘 챙겨드리지 못했지만, 항상 그 자리에서 묵묵히 지켜봐 주시고, 일과 공부에 전념할 수 있도록 도와주신 부모님과 언제나 내편이 되어주며 곁에 있어주는 오빠에게 이 논문을 바칩니다.

VII. 참고 문헌

- Allen MM and Stanire RY. 1968. Growth and division of some unicellular blue-green algae. J. Gn. Microbiol. 51 : 199-202
- Bae JH, Hur SB. 2011a. Development of economical fertilizer - based media for mass culturing of *Nannochloropsis oceanica*, Fish Aquat Sci 14(4) : 317-322
- Bae JH, Hur SB. 2011b. Selection of suitable species of *Chlorella*, *Nannochloris*, and *Nannochloropsis* in high and low-temperature seasons for mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*, Fish Aquat Sci 14(4) : 323-332
- Bajpai P, Bajpai PK, 1993. Eicosapentaenoic acid (EPA) production from microorganism: Biotechnology 30(2) : 161-183.
- Becker EW. 1994. Biotechnology and microbiology. Cambridge: Cambridge University Press
- Bold HC. 1942. The cultivation of algae. Bot. Rev. 8 : 90-6.
- Cohen Z. 1994. Production potential of eicosapentaenoic Acid by *Monodus subterraneus*. Journal of the American Oil Chemists' Society 71 : 941-945.
- Cohen Z. 1999. *Monodus subterraneus*. chemicals from microalgae, Taylor & Francis, London, 25-40.
- Cohen Z, Cohen S. 1991. Preparation of eicosapentaenoic Acid (EPA) concentrate from *Porphyridium cruentum*. Journal of the American Oil Chemists' Society 68: 16-19.

- Cohen Z, Norman HA, Heimer YM. 1995. Microalgae as a source of ω -3 fatty acids. In Simopoulos AP (ed.), Plants in Human Nutrition, Vol. 77. Karger, Basel, 1-32.
- Duncan DB. 1955. Multiple range and multiple F test. Biometrics 11 : 1-42.
- El HB, Emilio M and Yusuf C. 2000. A Process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. Enzyme and Microbial Technology 26 : 516 - 29.
- Fang X, Zhao ling C, Wei C and Fan O. 2004. Growth and fatty acid composition of *Nannochloropsis* sp. grown mixotrophically in fed-batch culture. Biotechnology Letter 26 : 1319-1322.
- Guillard RL. 1973. Growth measurement. In: Handbook of phycological methods. J.R. Stein, ed. Cambridge University press, London, 302-306.
- Hibberd DJ. 1981. Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae). Botanical Journal of the Linnean Society 82 : 93-19.
- Hu Q, Hu Z, Cohen Z and Richmond A. 1997. Enhancement of eicosapentaenoic acid (EPA) and γ -linolenic acid (GLA) production by manipulating algal density of outdoor cultures of *Monodus subterraneus* (Eustigmatophyte) and *Spirulina platensis* (Cyanobacteria). European Journal of Phycology 32 : 81 - 6.
- Iwamoto H, Sato S. 1986. Production of EPA by freshwater unicellular algae. Journal of the American Oil Chemist Society" 63 : 434 - 440.
- Khozin, I. and Cohen, Z. 1996 Differential response of microalgae to the

- substituted pyridazinone, sandoz 9785, reveal different pathways in the biosynthesis of eicosapentaenoic acid. *Phytochemistry* 42 : 1025-1029
- Kilian O, Benemann CSE, Niyogi KK and Vick B. 2011. High-efficiency homologous recombination in the oil-producing algae *Nannochloropsis* sp. *Proc Natl Acad USA* 108 : 21265-21269
- Kim and Hur. 2013. Growth and fatty acid composition of three heterotrophic *Chlorella* species. *Algae* 28(1): 101-109
- Lam P. 2000. The growth and fatty acid formation of *Monodus subterraneus* under mixotrophic conditions. The university of Hong Kong
- Liu CP, Lin LP. 2001. Ultrastructural study and lipid formation of *Isochrysis* sp. CCMP 1324. *Botany Bulletin Academic Sinica* 42 : 207 - 214.
- Lu C, Rao K, Hall D and Vonshak A. 2001. Production of eicosapentaenoic acid (EPA) in *Monodus subterraneus* grown in a helical tubular photobioreactor as affected by cell density and light intensity. *Journal of Applied Phycology* 13 : 517-522.
- Metcalf DD, Astwood JD, Townsend R, Sampson HA, Taylor SL, Fuchs RL. 1996. Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 36: S165-S186
- Miller DA, Fogg GE. 1957. Studies on the growth of Xanthophyceae in pure culture: I. The mineral nutrition of *Monodus subterraneus* Peterson. *Archiv. Flu. Mikrobiologie* 28 : 1 - 17.
- Molina GE, Sanchez PJA, Garcia SJL, Garcia CF and Alonso DL. 1993. n-3

- PUFA productivity in chemostat cultures of microalgae. Microbiology Biotechnology 38 : 599-605.
- Ning Z, Chengwu Z, Cohen and Richmond. 2000. Production of cell mass and eicosapentaenoic acid (EPA) in ultrahigh cell density cultures of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae). Printed in the United Kingdom 35 : 127-133.
- Oliver K, Christina SE, Benemann, Krishna K, Niyogi and Bertrand V. 2011. High - efficiency homologous recombination in the oil - producing alga *Nannochloropsis* sp., Proc Natl Acad Sci USA. 108(52) : 21265 - 21269.
- Rambjor GS, Walen AI, Windsor SL and Harris WS. 1996. Eicosapentaenoic acid is primarily responsible for hypotriglyceridemic effect of fish oil in humans. Lipids 31: 45-49.
- Samnelsson B. 1983. Science 220 pp.568-575
- Sevilla JMF, Grima EM, Camacho FG, Fernandez FGAv and Perez JAS. 1998. Photolimitation and photoinhibition as factors determining optimal dilution rate to produce eicosapentaenoic acid from cultures of the microalga *Isochrysis galbana*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50 : 199-205.
- Shi XM, Liu HJ, Zhang XW and Chen F. 1999. Production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* at various glucose concentrations in heterotrophic cultures. Process Biochemistry. 34 : 341-437.
- Shi XM, Jiang Y. and Chen F. 2002. High - Yield production of lutein by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic fed - batch culture. Biotechnol Proc 18 : 723-727.

- Simpoulos AP. 1989. Summary of the NATO Advanced Research Workshop on Dietary ω 3 and ω 6 fatty acids : Biological effects and nutritional essentiality. J. Nutr. 119 : 521-528
- Simpoulos AP. 1991. ω -3 Fatty acids in health and disease and in growth and development. Am. J. Clin. Nutr. 54 : 438-463.
- Sukenik A, Carmeli Y, Berner T, 1989, Regulation of fatty acid composition by irradiance level in the Eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. J. Phycol. 25 : 686-692.
- Thompson AS, Rhodes JC and Pettman I. 1988. Culture collection of algae and protozoa : catalogue of strains. Ambleside. Cambria. U.K.
- Tripathi U, Sarada R and Ravishankar GA. 2002. Effect of culture conditions on growth of green alga *Haematococcus pluvialis* and astaxanthin production. Acta Physiol Plant. 24 : 323-329.
- Wen ZY and Chen F. 2003. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. Biotechnol Adv. 21 : 273-294.
- Wu ZY and Shi XM. 2007. Optimization for high - density cultivation of heterotrophic *Chlorella* based on a hybrid neural network model. Lett Appl Microbiol. 44 : 13-18.
- Xiong W, Li XF, and Wu QY. 2008. High - density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio - diesel production. Microbiology and Biotechnology 78 : 29 - 36.
- Yamada H, Shimizu S and Shinmen Y. 1989. Agric Biol Chem 51: 785-790
- Yokochi T, Honda D, Higashihara T and Nakahara T. 1998. Optimization of

docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. Appl
Microbiol Biotechnol. 49 : 72-76.

