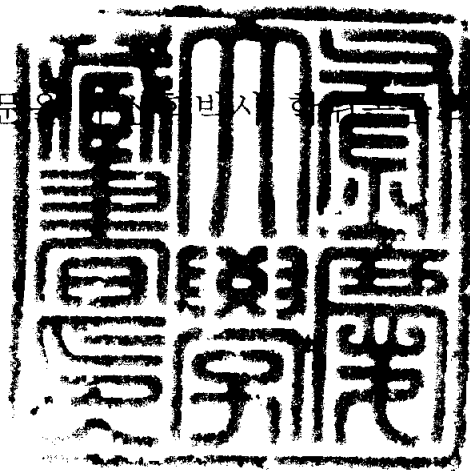


수산학박사 학위논문

*Chlorella*와 *Nannochloris*의 계절별 대량
배양을 위한 적종 선택과 배지 개발

지도교수 허 성 범

이 논문을 허성범 박사 학위논문으로 제출함



2004년 8 월

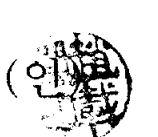
부경대학교 대학원

수산생물학과

배 진 희

배진희의 수산학박사 학위논문을 인준함

2004년 6월 일

주	심	이 학 박 사	손 철 현	(인) 
부	심	수산학박사	박 흠 기	(인) 
위	원	이 학 박 사	조 재 윤	(인) 
위	원	수산학박사	남 윤 권	(인) 
위	원	이 학 박 사	허 성 범	(인) 
대학원장		이 학 박 사	홍 성 윤	(인)

목 차

Abstract	i
서 론	1
재료 및 방법	5
1. Rotifer 대량 배양을 위한 계절별 미세조류 선택	5
1-1. 해수산 <i>Chlorella</i> 와 <i>Nannochloris</i> 의 성장	5
1-2. 기수산과 담수산 <i>Chlorella</i> 의 성장	7
1-3. 선택된 6종 <i>Chlorella</i> 와 <i>Nannochloris</i> 의 성장	8
1-4. 고수온과 저수온에서 6종 <i>Chlorella</i> 와 <i>Nannochloris</i> 의 성장	8
1-5. Rotifer에 대한 6종 <i>Chlorella</i> 와 <i>Nannochloris</i> 의 먹이 효율	8
1-6. 영양 성분 분석	9
2. <i>Chlorella</i> 의 대량 배양을 위한 최적 경제 배지 개발	10
2-1. 배지 종류에 따른 <i>Chlorella</i> 의 성장	10
2-2. 농업용 비료의 농도에 따른 <i>Chlorella</i> 의 성장	10
2-3. Vitamin 첨가에 따른 <i>Chlorella</i> 의 성장	11
2-4. 단일 미량 원소의 첨가 효과	11
2-5. 혼합 미량 원소의 첨가 효과	12
2-6. Oyster powder의 첨가 효과	13
2-7. 배양기간 동안 f/2와 농업용 비료 배지의 수질 변화	14
2-8. 농업용 비료 배지의 희석과 NaNO ₃ 첨가에 따른 <i>Chlorella</i> 의 성장	14

2-9. 비료 배지로 배양시 중간시비에 따른 <i>Chlorella</i> 의 성장	15
2-10. NaNO_3 첨가 농도에 따른 <i>Chlorella</i> 의 성장	15
2-11. 공업용 시약과 시약용 시약 첨가에 따른 <i>Chlorella</i> 의 성장	16
3. 3종류 <i>Chlorella</i> 와 <i>Nannochloris</i> 의 대량 배양을 위한 공업용 시약 배지의 효과	16
3-1. 염분과 온도에 따른 3종류 <i>Chlorella</i> 와 <i>Nannochloris</i> 의 성장	17
3-2. 15‰과 30‰에서 3종류 <i>Chlorella</i> 와 <i>Nannochloris</i> 의 영양 성분 비교 ..	17
3-3. 넙치 자어에 대한 먹이 효율	18
결 과	19
1. Rotifer 대량 배양을 위한 계절별 미세조류 개발	19
1-1. 해수산 <i>Chlorella</i> 와 <i>Nannochloris</i> 의 성장	19
1-2. 기수산과 담수산 <i>Chlorella</i> 의 성장	22
1-3. 선택된 6종 <i>Chlorella</i> 와 <i>Nannochloris</i> 의 성장 및 영양 성분	26
1-4. 고수온과 저수온에서 6종 <i>Chlorella</i> 와 <i>Nannochloris</i> 의 성장	29
1-5. Rotifer에 대한 6종 <i>Chlorella</i> 와 <i>Nannochloris</i> 의 먹이 효율 및 영양 성분	33
2. <i>Chlorella</i> 의 대량 배양을 위한 최적 경제 배지 개발	37
2-1. 배지 종류에 따른 <i>Chlorella</i> 의 성장	37
2-2. 농업용 비료의 농도에 따른 <i>Chlorella</i> 의 성장	38
2-3. Vitamin 첨가에 따른 <i>Chlorella</i> 의 성장	40
2-4. 단일 미량 원소의 첨가 효과	42
2-5. 혼합 미량 원소의 첨가 효과	47

2-6. Oyster powder의 첨가 효과	50
2-7. 배양기간 동안 f/2 와 농업용 비료배지의 수질 변화	52
2-8. 농업용 비료 배지의 희석과 NaNO ₃ 첨가에 따른 <i>Chlorella</i> 의 성장	54
2-9. 비료 배지로 배양시 중간시비에 따른 <i>Chlorella</i> 의 성장	57
2-10. NaNO ₃ 첨가 농도에 따른 <i>Chlorella</i> 의 성장	60
2-11. 공업용 시약과 시약용 시약 첨가에 따른 <i>Chlorella</i> 의 성장	60
 3. 3종류 <i>Chlorella</i> 와 <i>Nannochloris</i> 의 대량 배양을 위한 공업용 시약 배지의 효과	63
3-1. 염분과 온도에 따른 3종류의 <i>Chlorella</i> 와 <i>Nannochloris</i> 의 성장	63
3-2. 15‰과 30‰에서 3종류 <i>Chlorella</i> 와 <i>Nannochloris</i> 의 영양 성분 비교 ..	67
3-3. 낚치 자어에 대한 먹이 효율	72
 고 찰	73
 국문요약	87
 감사의 글	91
 참고문헌	93

Selection of seasonal optimum *Chlorella* and *Nannochloris* species and development of media for mass culture

Jean Hee BAE

*Department of Fisheries Biology, Graduate School,
Pukyong National University, Busan 608-737, Korea*

Abstract

In order to find seasonal optimum microalgae for mass cultivation of rotifer, *Chlorella* and *Nannochloris* were investigated, and agricultural fertilizer media was developed for mass culture of these microalgae species. 16 strains of *Chlorella* and *Nannochloris* from KMCC (Korean Marine Microalgae Culture Center) were chosen in consideration of sampling area and size of microalgae.

The growth rates of 16 strains of *Chlorella* and *Nannochloris* (five marine *Chlorella*, five marine *Nannochloris*, three estuary *Chlorella* and three freshwater *Chlorella*) were compared at different salinities (15‰ and 30‰) at 25°C.

At different salinities, among the 5 marine *Chlorella* strains, C-23 *C. vulgaris* (isolated from Gamcheon bay in Busan), C-12 *C. vulgaris* (isolated from Nacdong river) and C-20 *C. ellipsoidea* (purchased from Japan)

showed the higher growth rate than other marine *Chlorella* strains at 15‰, but C-23 and C-12 achieved higher growth rate than other marine *Chlorella* strains at 30‰. Among 5 marine *Nannochloris* strains, the growth rates of C-31 *N. oculata* (purchased from University of Texas, UTEX), C-87 *Nannochloris* sp. (isolated from Deukryang bay) and C-189 *Nannochloris* sp. (isolated from Puan) were higher than those of other strains at both 15‰ and 30‰. EC-1 *C. vulgaris* (isolated from Hwajinpo) among 3 estuary *Chlorella* also exhibited the highest growth rate at both 15‰ and 30‰.

At the concern of nutritional analysis, crude protein content of C-31 and C-12 was 42.9% and 42.4%, respectively. The crude lipid content was high in C-12 (2.64%), C-31 (2.58%) and EC-1 (2.43%).

In the cultivation at high and low temperatures, C-87 showed the higher growth rate than the other strains at high temperature over 30°C. However, at low temperature about 10°C, the growth rates of EC-1 and C-12 were higher than those of the other *Chlorella* and *Nannochloris* strains.

When rotifers were fed on three *Chlorella* (C-12, C-20 and EC-1) and *Nannochloris* (C-31, C-87 and C-189), the growth of rotifers fed on C-12 was the highest, 300 individual/ml. The highest eicosapentaenoic acid (EPA), 15.3% and docosahexaenoic acid (DHA), 9.4% was obtained in rotifers fed on C-12 and EC-001, respectively. From this observation, we noticed that C-87 and C-12 was excellent microalgae for the mass culture in summer and winter seasons, respectively.

For the mass culture of microalgae, the economical media should be

developed. Thus, this study of agriculture fertilizer was tested on the growth of *Chlorella*; and its effect was compared with other media. The suitable amount of fertilizer media was 1.25 times that of Schreiber media. When 6 trace elements (Co (CoCl_2), Cu ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), Zn ($\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), Mo ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), Fe (FeCl_3), Mn (MnCl_2)) were separately added to the fertilizer media (1.25 times), respectively, supplement of 2 times of Cu and 2 times of Zn 2.0 into f/2 media (basic) showed higher growth rate than that of other trace elements. In growth of *Chlorella* cultured with supplement of the mixed trace elements to the fertilizer, the highest growth rate was obtained in the combination of Fe+Mn. And the optimum amount of Cu was 3 times of f/2 media.

In the result of the water analysis of media, the amount of ammonia ($10.0039 \text{ mg/}\ell$) and total-P ($14.3491 \text{ mg/}\ell$) of the fertilizer media were higher than those of f/2 media ($0.0646 \text{ mg/}\ell$, $1.5013 \text{ mg/}\ell$).

When we diluted fertilizer media to the concentration of phosphate on the basis of f/2 media, the best growth was found in the diluted fertilizer media, 1.25 times/5 with addition of NaNO_3 . When different concentrations of NaNO_3 were added to the diluted fertilizer, the optimum amount of NaNO_3 was $200 \text{ mg/}\ell$. Therefore, the optimum industrial fertilizer media for mass culture of *Chlorella* was composed of compound fertilizer $0.0417 \text{ mg/}\ell$, urea fertilizer $0.034 \text{ mg/}\ell$, NaNO_3 $200 \text{ mg/}\ell$ and CuSO_4 $0.0588 \text{ mg/}\ell$.

To develop economical fertilizer media, the growth of *Chlorella* cultured with laboratory and industrial reagent was compared. The specific

growth rate of *Chlorella* in both reagent media was not significantly different from that in f/2 media.

To understand the salinity effect on the growth of three strains of *Chlorella* and *Nannochloris* which were developed as an optimum strain for mass culture in summer and winter seasons, the microalgae were cultured at 15‰ and 30‰ with the industrial fertilizer media (compound fertilizer 0.0417 mg/ℓ, urea fertilizer 0.034 mg/ℓ, NaNO₃ 200 mg/ℓ and CuSO₄ 0.0588 mg/ℓ).

At 10°C, the growth of C-12 and EC-1 was not significantly different at 15‰ and 30‰. At 30°C, the growth of C-87 was higher at 15‰ than at 30‰, and that of C-12 was higher at 30‰ than at 15‰. At 20°C, C-87 showed high growth at 15‰, but C-12 showed similar growth at both 15‰ and 30‰.

With regard to nutritional analysis of three strains of the microalgae cultured with the industrial fertilizer media at 15‰ and 30‰, crude protein and lipid content of EC-1 cultured at 10°C were high at 30‰, but that of C-12 at 20°C were higher at 15‰. High crude protein and lipid content of C-87 cultured at 30°C was obtained at 30‰ and 15‰, respectively. Total n-3 highly unsaturated fatty acids (HUFA) content of three strains was high at 15‰ and EPA content of C-12 cultured at 20°C was the highest, 25% at 15‰. Docosahexaenoic acid (DHA) content of C-87 at 30°C was the highest, 1.22% at 15‰. Total amino acid content of C-87 at 30°C was higher than that of C-12 at 20°C and EC-1 at 10°C in both 15‰ and 30‰. Total amino acid content of C-12 and C-87 was higher at 15‰ than

at 30‰, but that of EC-1 was higher at 30‰ than at 15‰.

When larval flounder was fed on rotifers cultured with each strain of C-12 and EC-1, the growth and survival of larvae did not show the significant difference between two feeding regimes.

Taking into consideration the results obtained in the study, we can suggest that C-87 *Nannochloris* sp. and C-12 *Chlorella vulgaris* are optimum microalgae species for the mass culture in summer and winter season, respectively. And the industrial fertilizer media composed of compound fertilizer 41.7 g, urea fertilizer 34.4 g, industrial NaNO_3 200 g and industrial CuSO_4 0.0588 g per 1 ton water at 15‰ are the recommendable for the economical mass culture of the microalgae.

서론

해양생태계에서 미세조류는 기초 생산자로서 태양 에너지를 이용하여, 무기물을 유기물로 전환하여, 다음 단계 생물을 생존하게 하는 매우 중요한 역할을 하고 있다. 미세조류 배양에 관한 연구는 1892년대부터 시작되었으며, 우리나라에서는 1960년부터 조개류의 먹이 생물로 이용하기 위해서 연구가 시작되었다(정 등, 1965; 유 1962; Lee et al., 1967).

미세조류는 대량으로 배양하여 인간의 식량, 의약품 원료로 활용하며, 공업원료, 양식용 먹이생물, 독성생태학의 실험생물, 가스 교환을 이용한 군사적 목적 및 폐수 처리 등의 환경 산업에 활용하고 있다(Simon, 1978; Wilson, 1978; Soeder, 1980; Laing and Helm, 1981).

최근 우리 나라에서는 양식 산업과 연안 자원 조성을 목적으로 유용 해산 어류, 갑각류 및 패류의 대량 인공 종묘 생산을 필요로 하고 있으나, 이들 종묘 생산을 위해서는 영양가가 높고 대량 배양이 가능한 먹이 생물의 확보가 시급하다.

먹이 생물로서 미세조류 배양에 대한 연구는 수온, 염분, 빛 등의 환경 요인에 따른 성장(Webb and Chu, 1982; Fabregas et al., 1984; Oliveira et al., 1999; Thompson, 1999)과 영양염의 변화에 따른 성장(Fabregas et al., 1985a, b; Utting, 1985) 등 많은 연구가 보고되고 있다. 이러한 연구는 주로 조개류와 갑각류의 주요 먹이생물인 황갈색 편모조류인 *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*와 규조류인 *Skeletonema costatum*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Chaetoceros* spp., *Nitzschia* spp., *Navicula* spp., *Talassiosira* spp. 등의 먹이 효율에 대하여 많이 보고되고 있다(Watanabe and Ackman, 1974; Sakshang

and Holm-Hansen, 1977; Fernandez-Reiriz et al., 1983; Knauer and Southgate, 1999).

한편, rotifer, *Brachionus plicatilis*는 크기가 작고, 운동성이 느리며, 고밀도 배양이 가능하여 해산 어류와 갑각류 종묘 생산시 가장 일반적으로 이용되고 있는 동물성 먹이 생물이다. 1960년대에 최초로 rotifer가 먹이생물로서 개발된 이후 다양한 어류의 종묘 생산시 중요한 초기 먹이로 이용되고 있으며, rotifer 배양을 위해서 미세조류(Hirayama et al., 1979; Fontaine and Revera, 1980; Lubzens and Fisrlen, 1980; Pourriot, 1980; Gilberto and Mazzola, 1981; Witt et al., 1981; Ben-Amotz and Fishler, 1982; Fukusho et al., 1985), 효모(Hirayama and Watanabe, 1973; Kitajima et al., 1979), 박테리아 (Bogdan et al., 1980; Yasuda and Taga, 1980)등이 먹이 생물로 이용되어 왔다.

일반적으로 rotifer 대량 생산을 위해서 두가지 형태의 먹이 생물 즉, *Chlorella*, *Nannochloris*와 *Tetraselmis*와 같은 미세조류와 빵효모와 같은 대체 먹이가 주로 이용되고 있다. 그러나, 빵 효모는 rotifer 성장에 필요한 영양 성분이 결핍되어 있어(Hirayama and Funamoto, 1983) 대부분의 경우 살아 있는 미세조류와 혼합하여 사용하고 있다.

오래전부터 *Nannochloropsis oculata*는 rotifer의 먹이 생물로 널리 이용되고 있었으나, 이 종류는 겨울, 여름이나 우기 등 시기에 대량 배양하기에는 날씨의 영향을 많이 받는 미세조류로서, rotifer를 대량 배양하기에는 충분하지 않은 것으로 알려져 있다. *T. tetraselmis*는 1981년 싱가포르에서 처음 소개되었으며, *N. oculata*의 여름철 대체 먹이 생물로 이용되기 시작하였으나 (Okauchi and Fukusho, 1984), *N. oculata*와 마찬가지로 계절과 날씨에 민감한 단점이 있다.

*Chlorella*는 단백질원의 함량이 높은 식량자원으로 주목받고 있으며, 제2차 세계대전 후 세계 각국에서 대량배양에 대한 연구가 되어왔다. 일본에서

田宮에 의해 1951년부터 徳川生物研究所에서 연구가 시작되었고, 1957년부터는 財團法人日本 *Chlorella* 研究所에서 대량 배양의 연구가 행해졌으며, 이후 1964년부터 의학 및 식량 자원으로 이용하기 위한 상업적인 *Chlorella* 생산이 시작되었다(山口, 1992).

*Chlorella*는 성장이 빠르며, 배양이 용이하고 염분 변화에 내성이 강한 장점을 가지고 있어 널리 이용되고 있으며, 또 이와 유사한 종으로 알려진 *Nannochloropsis oculata*가 rotifer의 먹이 생물로서 이용되어 왔다. *C. vulgaris*와 *N. oculata*는 분류학적으로 각각 Chlorophyceae와 Eustigmatophyceae에 속하며, 유사한 세포 형태 때문에 *N. oculata*는 *marine Chlorella*로 명명되어 *Chlorella* 속으로 분류된 적도 있었지만, 분류학적 위치가 다른 종이다. 이 종은 전자현미경에 의한 초미세구조와 영양학적 성분을 기초로 현재의 *Nannochloropsis oculata* Droop (Hibberd)로 재분류되었으며, Eustigmatophyceae에 속하게 되었다(Maruyama et al., 1986).

*Chlorella*는 rotifer 뿐만 아니라, 요각류, 조개류 및 갑각류 등의 먹이 생물로 종묘 생산시 직접 또는 간접적으로 이용되고 있으며(Hirata, 1977, 1980; Kadowaki et al., 1980), 양식 산업 외에 비타민, 고도 불포화 지방산, 단백질 및 천연 색소 등의 고부가가치 소재의 공급원으로도 이용될 수 있어 효율적인 이용을 위한 다양한 연구가 진행되어 오고 있다(Becker, 1981; Harting et al., 1988).

*Chlorella*를 포함한 미세 조류의 성장은 배양 환경에 따라 많은 영향을 받으며, 특히 염분과 온도는 이들 배양에 있어서 매우 중요한 요인이다(Nakanishi and Monshi, 1965; Ogata and Matsui, 1965; Hirata et al., 1981).

미세조류의 대량 배양시 실내 배양에서 이용되는 배지를 사용하면 많은 비용이 소요되어 어류나 조개류의 종묘 생산 단가가 높아지게 된다. 이러한

이유로 미세조류의 대량 배양에는 농업용 비료와 토양 추출물을 포함한 여러 가지 비료 배지에 대한 연구가 보고되었다(Loosanoff and Engle, 1942; Witt et al., 1981; De Pauw et al., 1983; Gonzalez-Rodriguez and Maestrini, 1984; Fabregas et al., 1987; Herrero et al., 1991; Valenzuela-Espinoza et al., 1999). 또한 농업용 비료 배지를 이용한 미세 조류의 생화학적 성분 변화에 대한 연구(Wikfors, 1986; Brown, 1991; Herrero et al., 1991)가 보고되고 있으나, 농업용 비료만을 사용할 경우 f/2배지와 같은 실내 실험 배양에서 사용되는 배지에 비해 성장률이 낮다는 단점이 있다. 또한, 해수산 *Chlorella*는 수온 30℃이상의 고수온기이거나, 10℃ 이하의 겨울철 등에서 그 성장 상태가 매우 불안정하여 이 시기의 종묘 생산시 많은 어려움이 따르고 있는 실정이다(米田, 1983; 福所, 1984).

따라서 본 연구는 해산 어류, 갑각류 및 조개류 종묘 생산시 초기 먹이 생물로서 이용되는 rotifer 먹이 생물인, *Chlorella*와 *Nannochloris* 종류의 계절별 대량 배양에 적합한 종류를 조사하고, 경제적이고 안정적인 *Chlorella* 대량 배양을 위한 농업용 비료 배지를 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

1. Rotifer 대량 배양을 위한 계절별 미세조류 선택

Rotifer 대량 배양에 적합한 미세조류를 개발하기 위하여 이용된 미세조류는 부경대학교 한국해양미세조류은행(KMCC, Korea Marine Microalgae Culture Center)에서 보유하고 있는 *Chlorella*와 *Nannochloris* 종류 130종 중에서 채집 해역, 크기 등을 고려하여 해수산 *Chlorella* 5종, 해수산 *Nannochloris* 5종, 기수산과 담수산 *Chlorella* 각각 3종으로 총 16종을 선정하여 분양 받아 이용하였다(Table 1).

이들 16종은 f/2 배지(Guillard and Ryther, 1962; Table 2)로 25℃, 15‰, 5,000 lux 연속 조명하에서 배양하였으며, 성장 측정은 hemacytometer를 사용하여 세포를 계수하고, Guillard (1973)의 방법으로 specific growth rate (s.g.r.)를 계산하였다[s.g.r. = $3.322 \times \log(N_2/N_1)/(t_2 - t_1)$, (t_2, t_1 : 접종 후 배양 일수, N_2, N_1 : 접종 후 t_2, t_1 일 때의 세포 밀도)].

1-1. 해수산 *Chlorella*와 *Nannochloris*의 성장

5종의 해수산 *Chlorella*의 성장은 염분 15‰과 30‰, 수온 25℃에서 250 ml 삼각 flask를 이용하여 배양하였으며, 초기 밀도 100×10^4 cells/ml를 접종하여 배지 100 ml 용량으로 10일간 배양하였다.

해수산 *Nannochloris* 5종의 성장은 해수산 *Chlorella*와 동일한 배양 조건 하에서 7일간 3반복으로 배양하였다.

Table 1. List of *Chlorella* and *Nannochloris* species used in the study

KMCC* NO.	Species	Size (μm)	Sampling area
C-12	<i>Chlorella vulgaris</i>	2.8 $\pm$ 0.95	Nacdong riv.
C-20	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	1.9 $\pm$ 0.63	Japan
C-23	<i>Chlorella vulgaris</i>	3.1 $\pm$ 1.22	Gamcheon
C-42	<i>Chlorella salina</i>	1.3 $\pm$ 0.0	China
C-58	<i>Chlorella vulgaris</i>	2.1 $\pm$ 0.60	Deukryangman
C-31	<i>Nannochloris oculata</i>	2.1 $\pm$ 0.60	UTEX**
C-64	<i>Nannochloropsis</i> sp.	2.3 $\pm$ 0.43	Kusan(salt farm)
C-79	<i>Nannochloris</i> sp.	1.9 $\pm$ 0.63	Hwajinpo
C-87	<i>Nannochloris</i> sp.	1.8 $\pm$ 0.62	Deukryangman
C-189	<i>Nannochloris</i> sp.	2.3 $\pm$ 0.43	Puan
EC-1	<i>Chlorella vulgaris</i>	2.3 $\pm$ 0.47	Hwajinpo
EC-4	<i>Chlorella vulgaris</i>	2.4 $\pm$ 0.68	Nacdong
EC-9	<i>Chlorella vulgaris</i>	2.3 $\pm$ 0.91	Sooyoung
FC-1	<i>Chlorella vulgaris</i>	3.3 $\pm$ 1.17	UTEX
FC-15	<i>Chlorella vulgaris</i>	3.7 $\pm$ 1.16	Jinhae
FC-38	<i>Chlorella</i> sp.	3.4 $\pm$ 1.64	PKNU***

* KMCC : Korea Marine Microalgae Culture Center, C : Marine, KMCC EC : Estuary, KMCC FC : Fresh water

** UTEX : The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin

*** PKNU : Pukyong National University.

1.2. 기수산과 담수산 *Chlorella*의 성장

다른 염분 환경에서 기수산과 담수산 *Chlorella*의 성장을 알아보기 위하여, 기수산 *Chlorella* 3종은 f/2 배지(100%)로, 0‰, 15‰ 및 30‰에서, 담수산 3종은 0‰과 15‰에서 배양하였다. 염분 조절은 S.K. 배지(Sorokin and Krauss, 1958; Table 2)와 S.K. (50%)+f/2배지(50%), f/2배지(100%)로 각각 0, 15, 30‰로 조절하였다. 조명조건과 초기 접종 밀도는 해수산 *Chlorella*와 *Nannochloris* 실험과 동일하였다.

Table 2. Chemical composition of f/2 and S.K. media

f/2 media		S.K. media	
NaNO ₃	150.0 mg	KNO ₃	1.25 mg
NaH ₂ PO ₄ · 9H ₂ O	8.69 mg	KH ₂ PO ₄	1.25 mg
Ferric EDTA	10.0 mg	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.00 mg
MnCl ₂	0.22 mg	CaCl ₂	0.084 mg
CoCl ₂	0.11 mg	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.05 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.0196 mg	Krauss trace metal	0.1 ml
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.044 mg	H ₃ BO ₃	2.86 g
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	50.0 mg	MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.81 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.012 mg	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.022 g
Vitamine B ₁₂	1.0 µg	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.079 g
Biotin	1.0 µg	MoO ₃	0.015 g
Thiamine · HCl	0.2 µg	Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	59.0 g
Filtered seawater	1 ℓ	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.04 g
		Distilled water	1 ℓ
		HCl	5 drops
		Distilled water	1 ℓ

1-3. 선택된 6종 *Chlorella*와 *Nannochloris*의 성장

1-1과 1-2의 두 실험에서 성장이 우수한 6종(C-12, C-20, C-31, C-87, C-189, EC-001)을 선택하여, 다시 25℃, 15‰, 5,000 lux 연속 조명하에서 초기 접종 밀도 100×10^4 cells/ml로 7일간 3반복으로 배양하여 성장을 측정하였다.

1-4. 고수온과 저수온에서 6종 *Chlorella*와 *Nannochloris*의 성장

선택된 6종 *Chlorella*와 *Nannochloris*를 고온기에 해당하는 32℃, 30℃와 저온기에 해당하는 10℃에서, 15‰, 5,000 lux 연속조명하에서 초기 접종 밀도 100×10^4 cells/ml로 10일간 3반복으로 배양하여 고온기와 저온기 조건에서 성장을 조사하였다.

1-5. Rotifer에 대한 6종 *Chlorella*와 *Nannochloris*의 먹이 효율

Rotifer, *Brachionus plicatilis* (L-type)에 대한 먹이효율을 조사하기 위하여 26℃, 15‰, 초기 접종 밀도 10 개체/ml로 250 ml 삼각 flask (100 ml 수량)에서 rotifer를 5일간 배양하였다. 선택된 6종 *Chlorella*와 *Nannochloris*의 공급량은 cell volume을 기준으로 C-31 *Nannochloris oculata*를 기준으로 크기가 작은 C-31, C-87, C-189은 $3,000 \times 10^4$ cells/ml, 중간 크기인 C-12, C-20은 $2,250 \times 10^4$ cells/ml, 크기가 가장 큰 EC-1은 $1,500 \times 10^4$ cells/ml의 밀도로 먹이를 공급하였다.

Rotifer의 성장은 매일 입체 현미경하에서 개체수를 계수하였으며, 실험 종료 후 성장률(specific growth rate, r)을 조사하였다[r = $(1/T) \ln(N_T/N_0)$ (T = 접종 이후 rotifer가 최고밀도에 도달하기까지의 배양일수; N_T = T days 때의 rotifer 최고밀도; N_0 = 최초 rotifer 밀도)].

1-6. 영양 성분 분석

6종 *Chlorella*와 *Nannochloris*와 이들을 먹이로 공급하여 배양한 rotifer의 영양성분을 분석하기 위하여 미세조류와 rotifer를 수확하여 분석전까지 -80°C 에서 냉동 보관하였다. 일반성분 중 조단백질은 Kjeldahl법(AOAC, 1995)에 의한 질소정량법($\text{N} \times 6.25$)으로, 수분은 분쇄한 샘플들을 125°C 에서 2시간 건조(AOAC, 1995)하여 정량 분석하였으며, 회분은 전기회화로를 사용하여 600°C 에서 3시간 동안 태운 후 정량 분석하였다. 그리고, 지방성분은 soxhlet 추출법(ether 추출법)으로 분석하였다. 구성 아미노산은 시료 20 mg을 test tube에 넣고 6N HCl 15 ml를 가하여 밀봉한 후 110°C 에서 24시간 가수분해하였다.

이 분해액을 여과한 후 감압 건조하여 HCl을 완전히 제거한 다음, sodium dilution buffer (pH 2.2)로 25 ml되게 정량하고, 이 용액을 일정량 취하여 아미노산 자동분석기 S433 (Sykam, Germany)를 이용하여 ninhydrin 방법으로 분석하였다. 분석조건은 다음과 같다: Column size: 4 mm $\times$ 150 mm, absorbance: 570 nm and 440 nm, reagent flow rate: 0.25 ml/min, buffer flow rate: 0.45 ml/min, reactor temperature: 120°C , reactor size: 15 m, analysis time: 65 min. 추출한 지방의 methylation은 Metcalfe et al. (1966)의 방법에 의해 분석하였다.

지방산 methylation은 Feries Silica Capillary Column을 장착한 SRI 8610 Gas chromatography에 의해 분석하였다. 캐리어 기체는 질소를 사용하였고, detection은 FID 모드를 사용하였다. 분석조건은 다음과 같다. Instrument : SRI 8610C gas chromatograph, column: quadrex, 30 M, bonded carbowax 0.25 mm I.D $\times$ 0.25 μm film, cat. No.: 007-CW-30-0.25F, injector temperature : 250°C , detector temperature : 280°C , flow (gas pressure) : 18 psi. helium, split : 1 : 50 도출된 크로마토그램은 분석 프로그램인 peak simple에 의하

여 분석하였다.

2. *Chlorella*의 대량 배양을 위한 최적 경제 배지 개발

*Chlorella*의 대량 배양시 경제적인 배지를 개발하기 위하여 농업용 요소와 복합비료를 이용하여 실험하였다. 요소 비료의 질소 함량은 46%, 복합비료의 질소, 인, 칼리의 함량은 각각 21%, 17%, 17%인 제품을 이용하였다. Schreiber (1927) 배지의 질산염과 인산염의 농도(NaNO_3 100 mg, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 20 mg, 해수 1ℓ)를 기준으로 비료의 양을 환산하면 해수 1ℓ 당 복합비료 117.6 mg, 요소 비료 163.7 mg에 해당하므로, 이러한 비료 농도를 질소와 인의 측면에서 Schreiber 배지의 1.0 배로 기준하여 본 연구에서 사용하였고, *Chlorella*는 KMCC C-20을 대상으로 실험하였다.

2-1. 배지 종류에 따른 *Chlorella*의 성장

농업용 비료의 활용 가능성을 파악하기 위하여, ① f/2 배지, ② Schreiber 배지, ③ 액체 비료인 complesal (中央農資材), ④ 농업용 비료(복합, 0.1176 g/ℓ + 요소, 0.1637 g/ℓ: 1.0배) 및 ⑤ 농업용 비료(1.0배) 50%+ complesal 액체 비료 50%를 이용하여 *Chlorella*의 성장을 비교하였다. 배양 조건은 250 ml 삼각 플라스크, 25℃, 0%, 5,000 lux 연속 조명하에서 접종 밀도는 35×10^4 cells/ml 였으며, 7일간 2반복으로 배양하였다.

2-2. 농업용 비료의 농도에 따른 *Chlorella*의 성장

농업용 비료의 적합한 농도를 파악하기 위하여 ① f/2 배지, 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 2.0배로 구분하여 5일간 위와 동일한 조건에서 배양하여 성장을 측정하였다.

다음은 가장 적합한 비료의 농도를 알아보기 위하여 ① f/2, ② 비료 1.0배(질산염, 인산염 각각 1.0배 기준), ③ 비료 1.5배(질산염, 인산염 1.5배), ④ 비료(질산염 1.5배, 인산염 1.0배: 복합비료 0.1176 g/ℓ, 요소비료 0.2724 g/ℓ), ⑤ 비료 1.25배(질산염, 인산염 1.25배 기준)로 다시 구분하여 5일간 성장 변화를 조사하였다.

또, 농업용 비료에 액체 비료인 complexal을 첨가할 경우 그 성장 변화를 알아 보기 위하여, ① f/2 배지, ② 비료 1.25 배, ③ 비료 1.0 배(75%)+complexal (25%), ④ 비료 1.25 배(75%)+complexal (25%), ⑤ 비료 1.25 배(50%)+complexal (50%), ⑥ 비료 1.25 배(25%)+complexal (75%)로 구분하여 25℃, 15‰, 5,000 lux 연속 조명하에서 7일간 성장을 측정하였다.

2-3. Vitamin 첨가에 따른 *Chlorella*의 성장

농업용 비료 배지에 f/2 배지의 비타민을 첨가하여, *Chlorella*의 성장에 대한 영향을 알아 보기 위하여, ① f/2배지, ② 비료 1.0배 (NaNO₃ 100 mg/ℓ, Na₂HPO₄ 20 mg/ℓ), ③ 비료 1.5배 (NaNO₃ 150 mg/ℓ, Na₂HPO₄ 20 mg/ℓ), ④ 비료 1.5배 (NaNO₃ 150 mg/ℓ, Na₂HPO₄ 10 mg/ℓ), ⑤ ②+mixed vitamin (f/2 첨가 기준; vitamin B₁₂ 1.0 μg/ℓ, biotin 1.0 μg/ℓ, thiamin · HCl 0.2 mg/ℓ), ⑥ ②+B₁₂, ⑦ ②+thiamin · HCl로 25℃, 5,000 lux 연속 조명하에서 접종 밀도 35×10⁴ cells/ml로 7일간 2반복으로 배양하였다.

2-4. 단일 미량 원소의 첨가 효과

*Chlorella*의 대량 배양에 이용되는 농업용 비료 배지에 미량 원소를 첨가.

하고, 이들이 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 코발트(Co, 0.110 mg/ℓ: 1.0배), 구리(Cu, 0.0196 mg/ℓ: 1.0배), 아연(Zn, 0.044 mg/ℓ: 1.0배), 몰리브데넘(Mo, 0.012 mg/ℓ: 1.0배)의 미량 원소를 f/2 배지에 첨가되는 함량을 기준으로 하여 각각 0.5배, 1.0배, 1.5배, 2.0배로 구분하여 비료 1.25배 배지(복합 비료: 0.147 g/ℓ, 요소 비료: 0.205 g/ℓ)에 첨가하여, 25℃, 15%, 5,000 lux 연속 조명하에서 7일간 2반복으로 배양하였다.

지금까지 실험에 사용된 농업용 복합 비료는 질소 함량이 22%, 인 함량이 12%인 새로운 복합 비료를 사용하게 되어, 다시 Schreiber (1927) 배지의 질산염과 인산염의 농도를 기준으로 비료의 양을 환산하여, 해수 1 ℓ 당 복합 비료 166.7 mg/ℓ, 요소 비료 137.6 mg/ℓ의 농도로 Schreiber 배지의 1.0배로 기준하여 사용하였다.

위 실험에서 결과가 좋았던 구리 2.0배(0.0392 mg/ℓ), 아연 2.0배(0.088 mg/ℓ)와 철(Fe, 10 mg/ℓ: 1.0배)과 망간(Mn, 0.22 mg/ℓ: 1.0배)을 같은 농도(0.5~2.0배)로 비료 배지에 첨가하여 앞의 실험과 동일한 조건에서 8일간 3반복으로 배양하였다.

위의 실험에서 농업용 비료에 첨가된 모든 미량 원소 중에서 가장 좋은 성장을 나타낸 구리성분의 정확한 첨가 농도를 파악하기 위하여 ① f/2 배지, ② 비료 1.25배(복합 비료: 0.208 g/ℓ, 요소 비료: 0.172 g/ℓ), ③ 비료 1.25배 + CuSO₄ 2.0배(0.0392 mg/ℓ), ④ 비료 1.25배 + CuSO₄ 3.0배(0.0588 mg/ℓ), ⑤ 비료 1.25배 + CuSO₄ 4.0배(0.0784 mg/ℓ), ⑥ 비료 1.25배 + CuSO₄ 5.0배(0.0980 mg/ℓ)로 구분하여, 25℃, 15%, 5,000 lux 연속조명하에서 7일간 3반복으로 배양하였다.

2-5. 혼합 미량 원소의 첨가 효과

농업용 비료에 5종의 미량 원소(철, 망간, 아연, 구리, 코발트)를 혼합하여 ① f/2 배지, ② 비료배지 1.25배(복합 비료: 0.208 g/ℓ, 요소 비료: 0.172 g/ℓ), ③ ②+FeCl₃, ④ ③+MnCl₂, ⑤ ④+ZnSO₄·7H₂O, ⑥ ⑤+CuSO₄·5H₂O, ⑦ ⑥+CoCl₂로 구분하였다. f/2 배지에 이용되는 5종의 미량 원소를 f/2배지 첨가 농도 1.0배를 기준으로 비료 배지에 혼합 첨가하여 미량 원소 요구량을 알아보기 위하여 위와 동일한 조건하에서 7일간 3반복으로 배양하였다.

또한, 비료 1.25배 배지에 철, 망간과 구리만을 대상으로 ① f/2 배지, ② 비료 1.25 배, ③ ②+FeCl₃+MnCl₂+CuSO₄·5H₂O, ④ ②+ FeCl₃+MnCl₂, ⑤ ②+FeCl₃+CuSO₄·5H₂O, ⑥ ②+MnCl₂+ CuSO₄·5H₂O와 같이 구분하여 25℃, 15%, 연속 조명하에서 초기 접종 밀도 100×10⁴ cells/ml로 7일간 배양하였다.

2-6. Oyster powder의 첨가 효과

농업용 비료에 대한 *Chlorella*의 성장 효과를 향상시키기 위하여 천연 굴 껍질로 만든 oyster powder (해성 [727] 2호 천연칼슘, Table 3)를 농업용 비료 배지에 첨가하여 그 가능성을 조사하였다. 배지는 ① f/2 배지, ② f/2+ oyster powder 추출액, ③ 비료 1.25배(복합 비료: 0.208 g/ℓ, 요소 비료: 0.172 g/ℓ), ④ ③+oyster powder 추출액, ⑤ ③+FeCl₃+MnCl₂+ oyster powder 추출액으로 구분하였다. f/2 배지와 농업용 비료에 oyster powder 추출액을 f/2 배지의 규소(Si)의 함량(50 ml/ℓ)을 기준으로 첨가하여 성장 변화를 조사하였다. Oyster powder 추출액은 oyster powder 100 g을 증류수 200 ml에 혼합하여 비이커에 넣고 73℃에서 2시간 30분 동안 끓여 식힌 후 상등액을 GF/C filter로 여과하여 사용 전까지 냉장 보관하였으며, 이 추출액을 f/2 배지 950 ml에 50 ml을 넣어 사용하였다. *Chlorella*의 배양은 25℃, 15%, 5,000 lux 연속 조명하에서 9일간 3반복으로 배양하였다.

Table 3. Chemical composition of commercial oyster powder (source of data : Haesung Co.)

Composition	Concentration	Composition	Concentration
CaO	51.6%	P ₂ O ₅	0.03%
organic matter	5.65%	K ₂ O	0.04%
moisture	0.48%	Mn	90 ppm
SiO ₂	3.54%	B	20 ppm
MgO	0.31%	Zn	20 ppm
Fe	0.16%	Cu	3 ppm

2-7. 배양기간 동안 f/2와 농업용 비료 배지의 수질 변화

f/2와 농업용 비료배지에서 *Chlorella* 배양기간 중의 배지내 수질의 변화를 알아보기 위하여, f/2배지와 농업용 비료 1.25배 배지로 250 ml 삼각 flask, 25°C, 15‰, 5,000 lux 연속 조명하에서 16일간 3반복으로 *Chlorella*를 배양하였다. 수질 분석을 위한 시료는 2일에 1회씩 전량 수확하여 GF/F filter (0.45 μ m) 로 여과한 후 여과된 배양액만 수거하여, NO₃-N (질산염), NO₂-N (아질산염), NH₄-N (암모니아) 및 PO₄-P (인산염)을 Strickland and Parsons (1972)의 방법에 의하여 수행하였다.

2-8. 농업용 비료 배지의 희석과 NaNO₃ 첨가에 따른 *Chlorella*의 성장

실험 2-8의 결과에서 총 인의 함량을 기준으로 비료 1.25 배 배지를 1/5 과 1/9로 희석하고, 질산염을 f/2 배지 기준으로 NaNO₃를 150 mg/ ℓ 첨가하여, ① f/2 배지, ② 비료 1.25 배+NaNO₃, ③ 비료 1.25 배/5(5배 희석, 복합 비료: 0.0147 g/ ℓ , 요소 비료: 0.034 g/ ℓ)+ NaNO₃, ④비료 1.25 배/9(9배 희석, 복합

비료: 0.023 g/ℓ, 요소 비료: 0.019 g/ℓ))+NaNO₃로, 250 ml 삼각 플라스크, 25℃, 15%, 5,000 lux 연속 조명하에서 초기 접종 밀도 300×10⁴ cells/ml로 12일간 배양하여 성장을 측정하였다.

다음으로 농업용 비료 배지의 적정 희석 비율을 알아보기 위하여, 비료 1.25배(복합 비료: 0.208 g/ℓ, 요소 비료: 0.172 g/ℓ) 배지를 1/2.5, 1/5, 1/7.5로 희석하고, 질산염을 f/2 배지 기준으로 NaNO₃를 150 mg/ℓ 첨가한 다음, 미량 원소 중 가장 첨가 효과가 우수하였던 구리 0.0588 mg/ℓ (f/2 배지 농도 기준 3.0 배)를 첨가하여 ① f/2 배지, ② 비료 1.25 배, ③ 비료 1.25 배/2.5(복합 비료: 0.083 g/ℓ, 요소 비료: 0.069 g/ℓ)+NaNO₃, ④ ③+CuSO₄ 3.0 배, ⑤ 비료 1.25 배/5(복합 비료: 0.042 g/ℓ, 요소 비료: 0.034 g/ℓ)+NaNO₃, ⑥ ⑤+CuSO₄ 3.0 배, ⑦ 비료 1.25 배/7.5(복합 비료: 0.028 g/ℓ, 요소 비료: 0.023 g/ℓ)+NaNO₃, ⑧ ⑦+CuSO₄ 3.0 배로 구분하여 위의 실험과 동일한 환경에서 8일간 3반복으로 배양하였다.

2-9. 비료 배지로 배양시 중간시비에 따른 *Chlorella*의 성장

위의 2-9 실험에서 8일간 배양한 후 성장률이 가장 높은 비료 1.25 배/5 +NaNO₃ (150 mg/ℓ)+CuSO₄ 3.0 배 (0.0588 mg/ℓ) 실험구에 중간 시비 효과를 알아보기 위하여, 대조구인 f/2 배지와 비료 1.25 배/5+NaNO₃ (150 mg/ℓ) +CuSO₄ 3.0 배 (0.0588 mg/ℓ)배지를 각각 100%, 75%, 50%, 25%를 첨가하였다. 각 실험구는 tissue cell chamber에 8일간 배양된 *Chlorella*를 4.5 ml 씩 넣고, 25℃, 15%, 5,000 lux 연속 조명하에서 13일간 3반복으로 배양하였다.

2-10. NaNO₃ 첨가 농도에 따른 *Chlorella*의 성장

희석된 농업용 비료 배지에 질소 공급원으로 첨가하는 NaNO₃의 적정 첨

가 농도를 알아보기 위하여, 대조구인 f/2 배지와 비료 1.25 배/5+NaNO₃+CuSO₄ 3.0 배에 NaNO₃를 150 mg/ℓ, 200 mg/ℓ, 250 mg/ℓ 및 300 mg/ℓ를 각각 투여하였으며, 실험 2-10과 동일한 배양 조건에서 10일간 배양하여 성장을 측정하였다.

2-11. 공업용 시약과 시약용 시약 첨가에 따른 *Chlorella*의 성장

앞의 실험에서 경제적인 대량 배양용 비료 배지로 개발하기 위하여 공업용과 특급 시약용 NaNO₃와 CuSO₄에 대한 *Chlorella*의 성장 차이를 알아보기 위하여, 대조구인 f/2 배지와 특급 시약용(비료 1.25 배/5+NaNO₃+CuSO₄ 3.0 배)배지와 공업용 시약(비료 1.25 배/5+NaNO₃+CuSO₄ 3.0 배) 배지로 구분하여 수온 25℃, 염분 15‰, 5,000 lux에서 7일간 3반복으로 배양하여 성장을 측정하였다.

3. 3종류 *Chlorella*와 *Nannochloris*의 대량 배양을 위한 공업용 시약 배지의 효과

Rotifer 대량 배양을 위해 계절별로 대량 배양이 적합하다고 판단된 미세 조류로 선택되어진 3종 *Chlorella vulgaris* (C-12), *Chlorella vulgaris* (EC-1), *Nannochloris* sp. (C-87)을 대상으로 공업용 시약 비료 (복합 비료 0.042 g/ℓ, 요소 비료 0.034 g/ℓ, NaNO₃ 200 mg/ℓ, CuSO₄ 3.0 0.0588 mg/ℓ)로 배양하여 배양 환경에 따른 영양 성분의 변화와 넙치 자어의 먹이로 공급하였을 경우 그 먹이 효율을 알아보고자 하였다.

3-1. 염분과 온도에 따른 3종류 *Chlorella*와 *Nannochloris*의 성장

3종류 *Chlorella*와 *Nannochloris*는 C-12는 10℃, 20℃ 및 30℃, C-87은 20℃와 30℃, EC-1은 10℃에서 각각 염분 15‰과 30‰, 5,000 lux에서 250 ml flask로 공업용 시약 비료배지에서 14일간 3반복으로 배양하여 성장의 차이를 비교하였다.

또, C-12와 EC-1 *Chlorella*의 10℃에서의 성장의 차이를 비교하기 위하여 각각 공업용 시약 비료 배지와 f/2로 수온 10℃, 염분 15‰에서 위의 실험과 동일한 조건에서 배양하여 성장을 측정하였다.

3-2. 15‰과 30‰에서 3종류 *Chlorella*와 *Nannochloris*의 영양 성분 비교

3종류 *Chlorella*와 *Nannochloris* (C-12, EC-1, C-87)는 염분에 따른 영양 성분을 비교하기 위하여, 앞의 실험에서 각 종의 최적 배양 온도로 판단되어진 20℃, 10℃, 30℃에서 염분 15‰과 30‰에서 공업용 시약 비료 배지로서 10 ℓ 아크릴 용기에서 5,000 lux에서 배양하였다. 각 *Chlorella*는 성장의 대수기 직후 수확한 후 분석 전까지 -80℃에서 보관하였다. 건중량은 wheaton vacuum pump system을 사용한 방법으로 Whatman GF/C filter를 이용하여 약 $2,000 \times 10^4$ cells를 filtration하고 60℃ dry oven에서 24시간 동안 통풍 건조 후 10-5 g까지 중량을 측정하여 cell당 건중량으로 계산하였다.

지질은 flame ionization detector가 장착된 thin layer chromatography (TLC/FID MARK Vnew, Iatron Laboratories, Tokyo, Japan)를 이용한 Parrish (1987)의 방법을 사용하였다. 지방산은 lipid class에서 추출된 지질을 14% BF₃-methanol (Sigma, USA)로 methylation 시킨 후 capillary column (HP-INNOWax, 30 m×0.32 mm×0.5 μm, USA)이 장착된 gas chromatograph (6890 plus, Agilent, USA)로 분석하였다. 총 단백질 함량은 원소분석기

(Elemental analyzer, CHNS-O Mode, CE instruments EA 1110)를 이용하여 상온진공건조를 통해 얻은 시료의 C, H, N의 함량 중 N의 함량 ($N\% \times 6.25 = \text{protein}(\%)$)으로 계산하였다(Coultate, 1989). 아미노산은 high speed amino acid analyzer (L - 8800, Hitachi)를 이용하여 측정하였다.

3.3. 넙치 자어에 대한 먹이 효율

넙치(*Paralichthys olivaceus*) 자어에 대한 선택된 2종류 *Chlorella* (C-12와 EC-1) 먹이 효율을 알아보기 위하여 제주도에서 가져온 수정란으로 1 ton 수조에서 19℃로 부화시킨 후 입이 열린 자어를 실험에 사용하였다. 실험구는 10℃에서 배양한 C-12 *C. vulgaris*와 EC-1 *C. vulgaris*를 각각 L-type rotifer (28℃, 15‰)에 먹이로 공급하여 배양한 후 넙치 자어의 먹이로 사용하였다. 실험은 250 ℓ (해수량 150 ℓ) FRP 원형수조에서 자어 밀도는 ℓ 당 6~7마리로 실험구마다 1,000마리를 수용하여 7일간 성장을 비교하였다. 실험 기간 중 수온은 자연수온으로 19±0.5℃였다. 또, 2종류 *Chlorella*를 실험구마다 매일 100×10^4 cells/ml로 green water를 만들어 주었으며, rotifer 공급밀도는 5~10 개체/ml로 유지하였다. 2일 간격으로 죽은 자어를 수거하였고, 실험 종료 후 모두 수거하여 최종 생존율과 전장을 측정하였으며, 실험은 3회 반복하였다.

4. 통계분석

모든 실험 결과는 One-way ANOVA test를 실시하였으며, 처리 평균간의 유의성($P < 0.05$)은 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)로 SPSS (version 11) program을 사용하여 검정하였다.

결 과

1. Rotifer 대량 배양을 위한 계절별 미세조류 개발

1. 1. 해수산 *Chlorella*와 *Nannochloris*의 성장

5종의 해수산 *Chlorella*를 15‰와 30‰에서 각각 10일간 배양한 결과, 30‰에서는 C-23 *C. vulgaris* (감천)이 배양 7일만에 세포 밀도 $5,107 \times 10^4$ cells/ml로 가장 높았으며, 다음으로 C-42 *C. vulgaris* (중국)과 C-20 *C. ellipsoidea* (일본)이 각각 $4,686 \times 10^4$ cells/ml와 $4,657 \times 10^4$ cells/ml로 높게 나타났다. 성장률은 0.7812~0.8072였으며, C-12와 C-20의 성장률은 서로 유의적인 차이는 보이지 않았다(Fig. 1).

15‰에서는 C-20과 C-12 *C. vulgaris* (낙동) 각각 $5,865 \times 10^4$ cells/ml와 $5,894 \times 10^4$ cells/ml로 가장 높았으며, C-42가 $5,216 \times 10^4$ cells/ml로 가장 낮은 세포 밀도를 나타내었으며, 성장률은 0.8100~0.8375로 C-12와 C-20이 다른 3종에 비해 유의적으로 높은 성장률을 보였다(Fig. 2).

15‰와 30‰에서 배양한 5종 해수산 *Chlorella*에서 C-23은 30‰에서, 다른 4종의 *Chlorella*는 15‰에서 더 좋은 성장을 보였으며, 5종 모두 15‰이 30‰에 비하여 비교적 높은 성장률을 나타내었다. 5종 해수산 *Chlorella*에서는 rotifer 대량 배양에 적합한 15‰에서 성장이 가장 양호한 2종 C-12와 C-20을 선택하였다.

해수산 *Nannochloris* 5종을 15‰와 30‰의 염분 조건에서 7일간 배양한 결과, 30‰에서는, C-31 *N. oculata* (UTEX)가 배양 7일만에 $11,229 \times 10^4$ cells/ml로 가장 높은 세포 밀도를 보였으며, 다음으로, C-87 *N. sp.* (득량만)

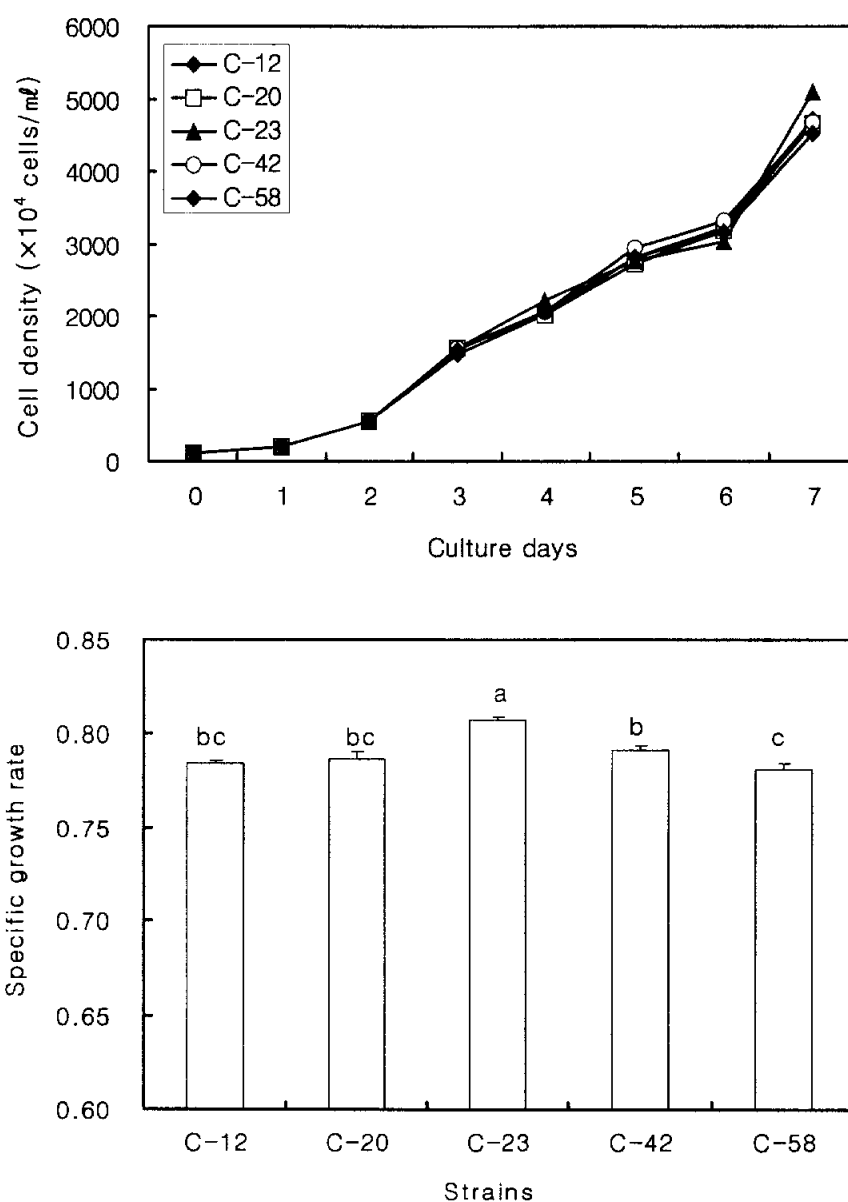


Fig. 1. Cell density (up) and specific growth rate (bottom) of five strains of marine *Chlorella* at 30‰, 25°C and 5,000 lux (C-12: *C. vulgaris*, C-20: *C. ellipsoidea*, C-23: *C. vulgaris*, C-42: *C. salina*, C-58: *C. vulgaris*).

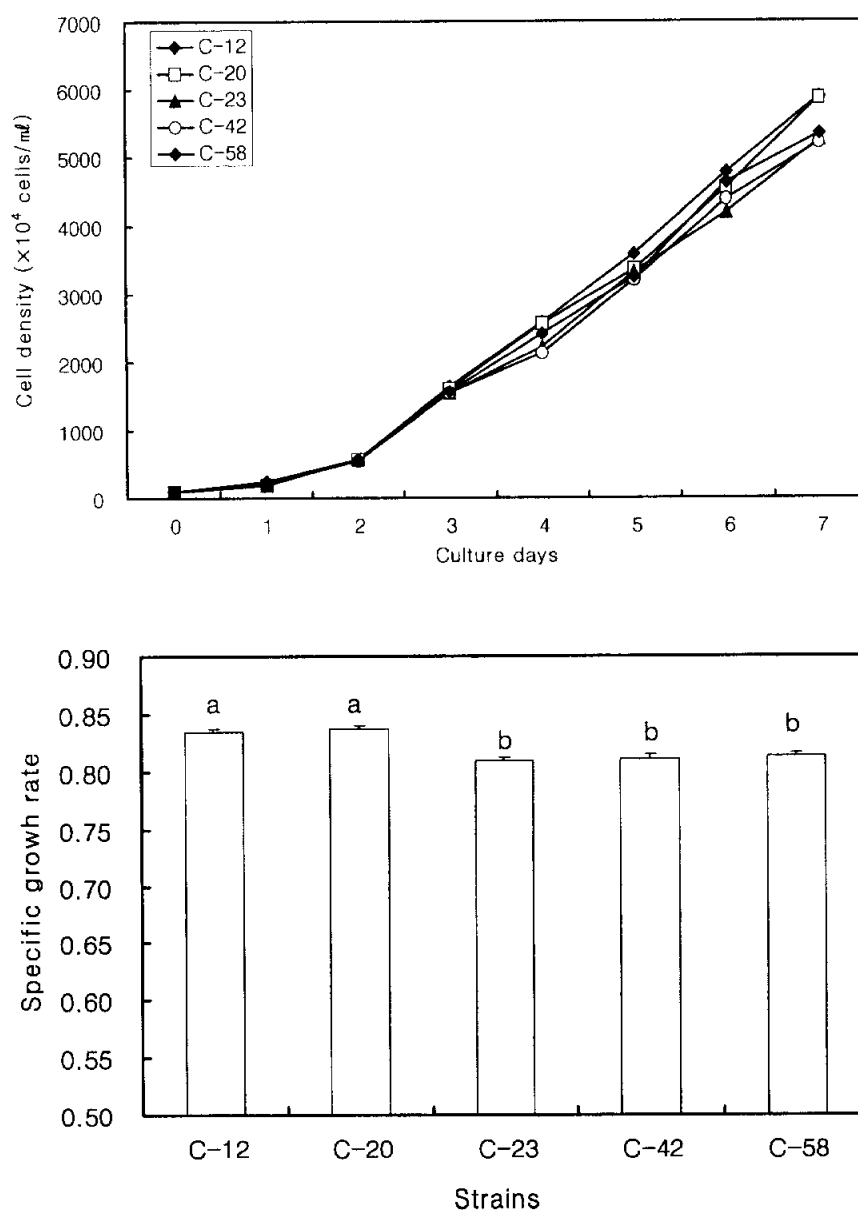


Fig. 2. Cell density (up) and specific growth rate (bottom) of marine *Chlorella* at 15‰, 25°C and 5,000 lux (C-12: *C. vulgaris*, C-20: *C. ellipsoidea*, C-23: *C. vulgaris*, C-42: *C. salina*, C-58: *C. vulgaris*).

과 C-189 *N. sp.* (부안)이 각각 $10,519 \times 10^4$ cells/ml와 $10,733 \times 10^4$ cells/ml로 높은 성장을 나타내었고, 성장률은 0.9447~0.9734로서 C-64 *Nannochloropsis sp.* (군산)와 C-79 *Nannochloris sp.* (화진포)는 C-31에 비해 유의적으로 낮은 성장률을 나타내었다(Fig. 3).

15‰에서는 30‰에서와 유사하게 C-31, C-87 및 C-189가 각각 $10,104 \times 10^4$ cells/ml, $10,146 \times 10^4$ cells/ml와 $10,075 \times 10^4$ cells/ml로 높은 세포 밀도를 나타내었으며, 성장률이 0.9393~0.9404로 30‰에 비하여 비교적 낮은 성장률을 나타내었으나, 5종 *Nannochloris*간의 성장률은 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 4). *Nannochloris*에서도 rotifer 대량 배양에 적합한 15‰에서 성장률이 더 높았던 C-31, C-87과 C-189를 선택하였다.

1-2. 기수산과 담수산 *Chlorella*의 성장

기수산 *Chlorella* 3종을 염분 0, 15 및 30‰에서 7일간 배양한 결과(Fig. 5), EC-1 *C. vulgaris* (화진포)가 15‰과 30‰에서 세포 밀도가 각각 $6,419 \times 10^4$ cells/ml과 $6,166 \times 10^4$ cells/ml로 가장 높았으며, EC-4 *C. vulgaris* (낙동)은 15‰과 30‰에서 각각 $4,360 \times 10^4$ cells/ml와 $5,354 \times 10^4$ cells/ml로, EC-9 *C. vulgaris* (수영)은 15‰과 30‰에서 각각 $4,529 \times 10^4$ cells/ml와 $4,491 \times 10^4$ cells/ml로 0‰에서 보다 높은 세포 밀도를 나타내었다.

기수산 *Chlorella* 3종은 모두 15‰과 30‰에서 유의적으로 높은 성장률을 나타내었으며, EC-1이 15‰과 30‰에서 각각 0.8600과 0.8495로 유의적으로 가장 높은 성장률을 보였다. 그러나, EC-4와 EC-9 *Chlorella*는 배양하는 기간 동안 서로 뭉치는 형태의 개체들이 보였고, 이러한 형태의 개체들이 많이 출현하게 되면 rotifer의 먹이로 공급시에 rotifer가 섭취하기 쉽지 않을 것으로 판단되어 기수산 *Chlorella*는 EC-1만을 선택하였다.

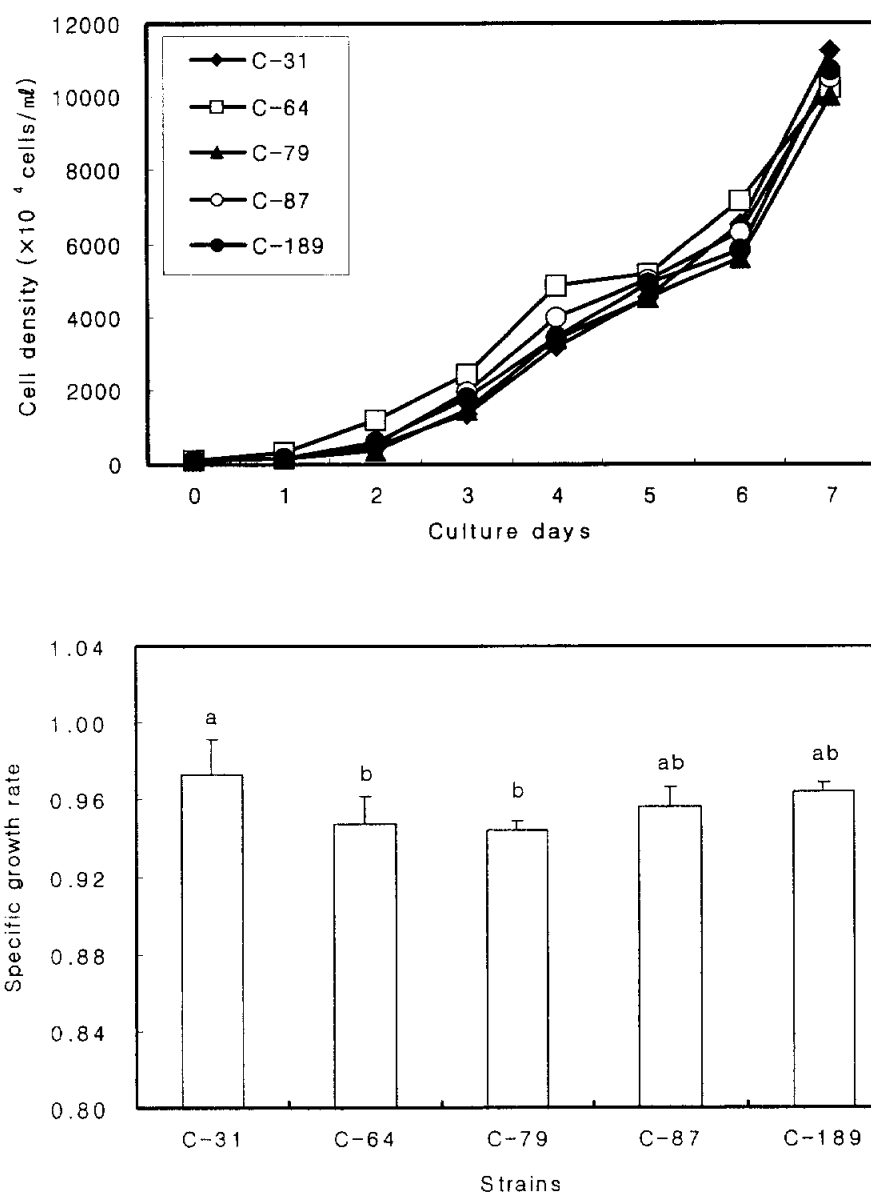


Fig. 3. Cell density (up) and specific growth rate (bottom) of marine *Nannochloris* at 30‰, 25°C and 5,000 lux (C-31: *Nannochloris oculata*, C-64: *Nannochloropsis* sp., C-79: *Nannochloris* sp., C-87: *Nannochloris* sp., C-189: *Nannochloris* sp.).

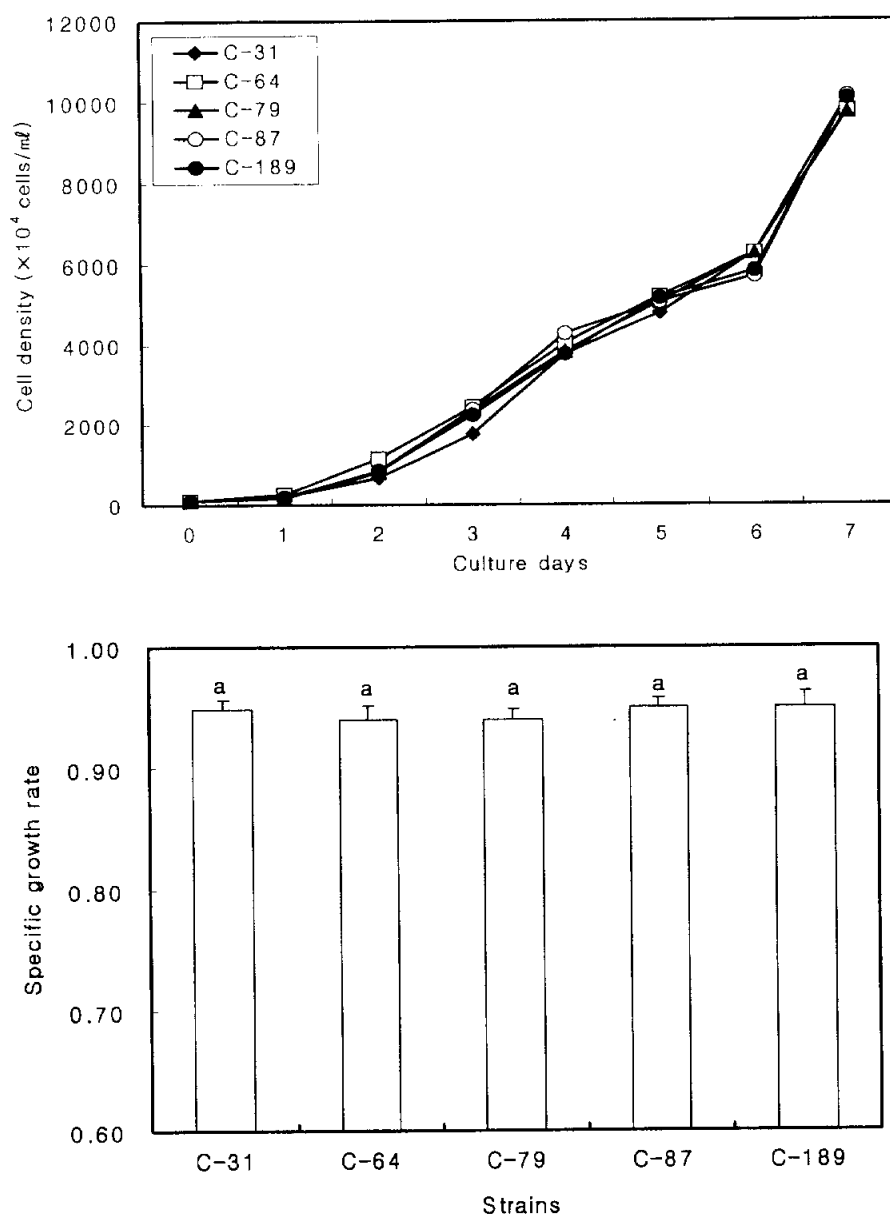


Fig. 4. Cell density (up) and specific growth rate (bottom) of marine *Nannochloris* at 15‰, 25°C and 5,000 lux (C-31: *Nannochloris oculata*, C-64: *Nannochloropsis* sp., C-79: *Nannochloris* sp., C-87: *Nannochloris* sp., C-189: *Nannochloris* sp.).

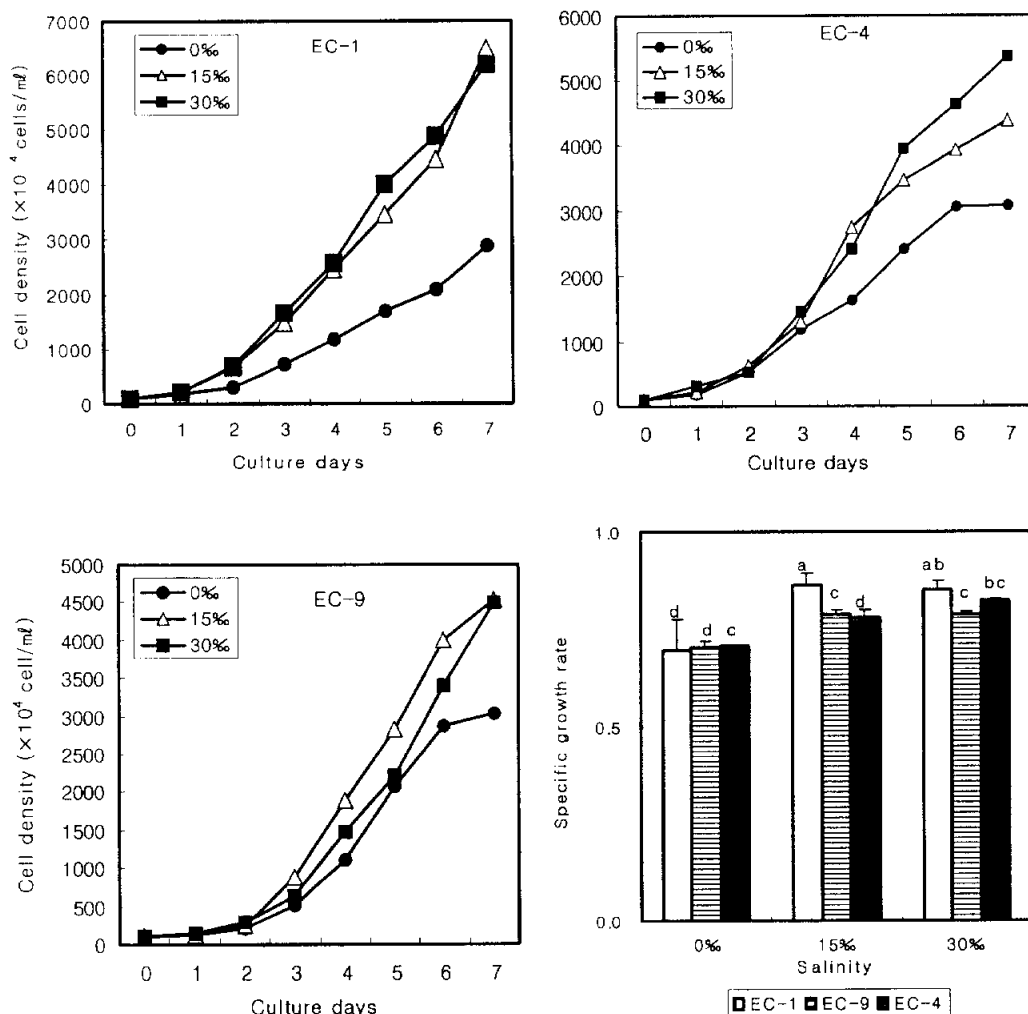


Fig. 5. Growth of three estuary *Chlorella* species at different salinities under 25°C and 5,000 lux (EC-1: *Chlorella vulgaris*, EC-4: *C. vulgaris*, EC-9: *C. vulgaris*).

0‰과 15‰에서 7일동안 배양한 담수산 *Chlorella* 3종은 0‰에서는 FC-15 *C. vulgaris* (진해)가 8일째 $2,420 \times 10^4$ cells/ml로 가장 높은 세포 밀도를 나타내었고, 성장률은 0.5515~0.5601로 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 6). 그러나, 15‰에서는 접종 후 개체들이 뭉치는 경향을 나타내었으며, 2일째부터 세포 밀도가 모두 감소하였다. 따라서, 담수산 *Chlorella*는 rotifer의 적정 배양 염분인 15‰에서는 성장이 저조한 것으로 판단되어 제외하였다.

이상의 실험에서 16종의 *Chlorella*와 *Nannochloris* 중에서 성장률이 높았던 해수산 *Chlorella* 2종, C-12, C-20, 해수산 *Nannochloris* 3종, C-31, C-87, C-189, 담수산 1종 EC-1의 6종을 우선적으로 선정하였다.

1-3. 선택된 6종 *Chlorella*와 *Nannochloris*의 성장 및 영양 성분

선정된 6종(C-12, C-20, C-31, C-87, C-189, EC-1)을 15‰, 25℃의 동일한 조건에서 7일간 배양한 결과는 Fig. 7과 같다. 해수산 *Chlorella* 2종 C-12와 C-20의 세포 밀도는 각각 $5,266 \times 10^4$ cells/ml, $5,569 \times 10^4$ cells/ml로, 성장률은 유의적으로 차이가 없었으며, 해수산 *Nannochloris* 중에서는 C-87의 세포 밀도가 $6,987 \times 10^4$ cells/ml로 가장 높았으며, 성장률은 0.8577~0.8753으로 해수산 *Chlorella*에 비하여 비교적 높았다. 또, 기수산인 EC-1의 성장은 세포 밀도 $4,416 \times 10^4$ cells/ml, 성장률 0.7807로서 해수안에 비해서는 유의적으로 낮은 성장률을 나타내었다.

이들 6종의 일반성분인 조단백질과 조지방의 함량은 Table 4와 같다. 조단백질은 C-31이 42.9%, C-12가 42.4%로 비교적 높았으며, 조지방 함량은 C-12, C-31 및 EC-1이 각각 2.6%, 2.6% 및 2.4%로 높게 나타났다.

총 아미노산 함량(Table 5)은 6종의 *Chlorella*와 *Nannochloris* 중 C-189가 72.97%로 가장 높았으며, 다음으로 C-20과 C-87이 각각 55.58%와 55.39%

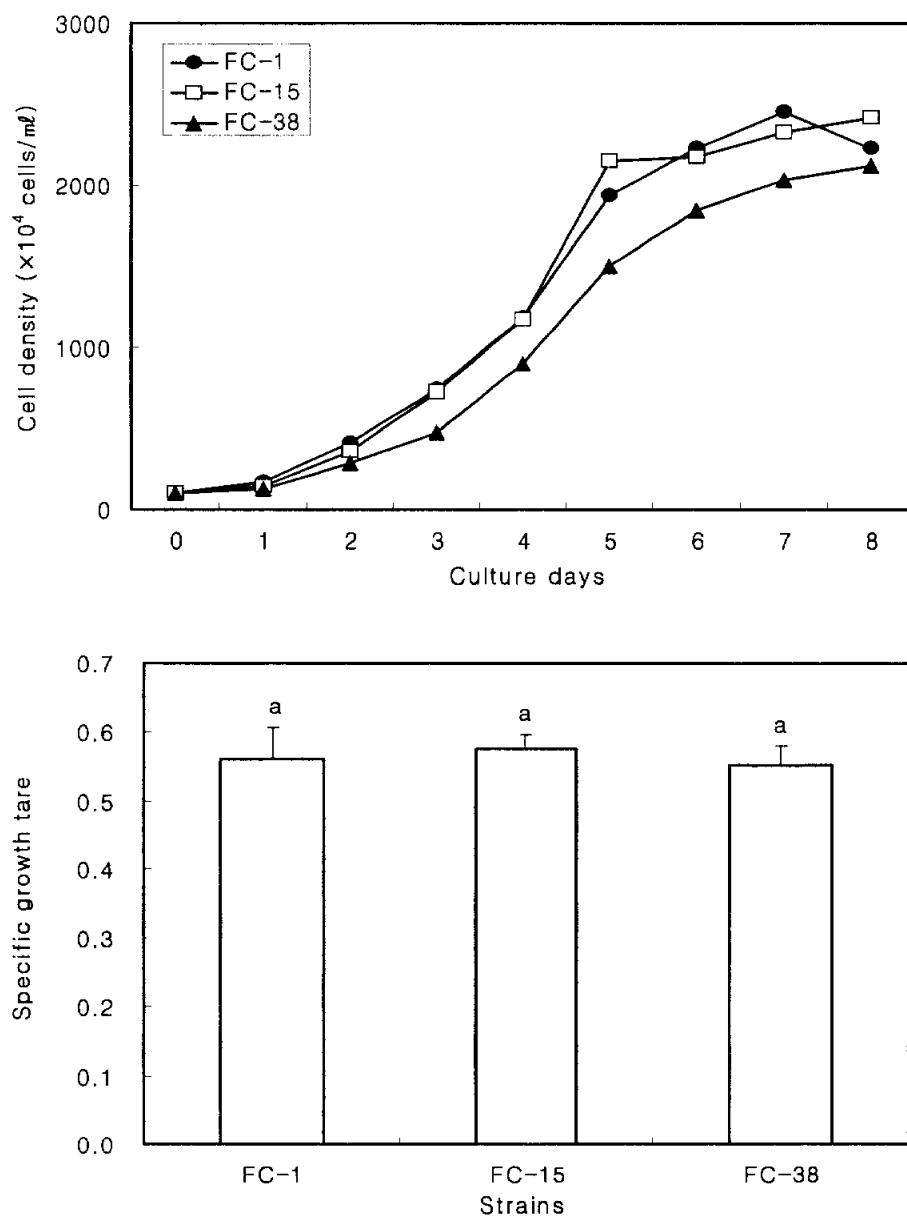


Fig. 6. Cell density (up) and specific growth rate (bottom) of three freshwater *Chlorella* species at 0‰, 25°C and 5,000 lux (FC-1: *C. vulgaris*, FC-15: *C. vulgaris*, FC-38: *Chlorella* sp.).

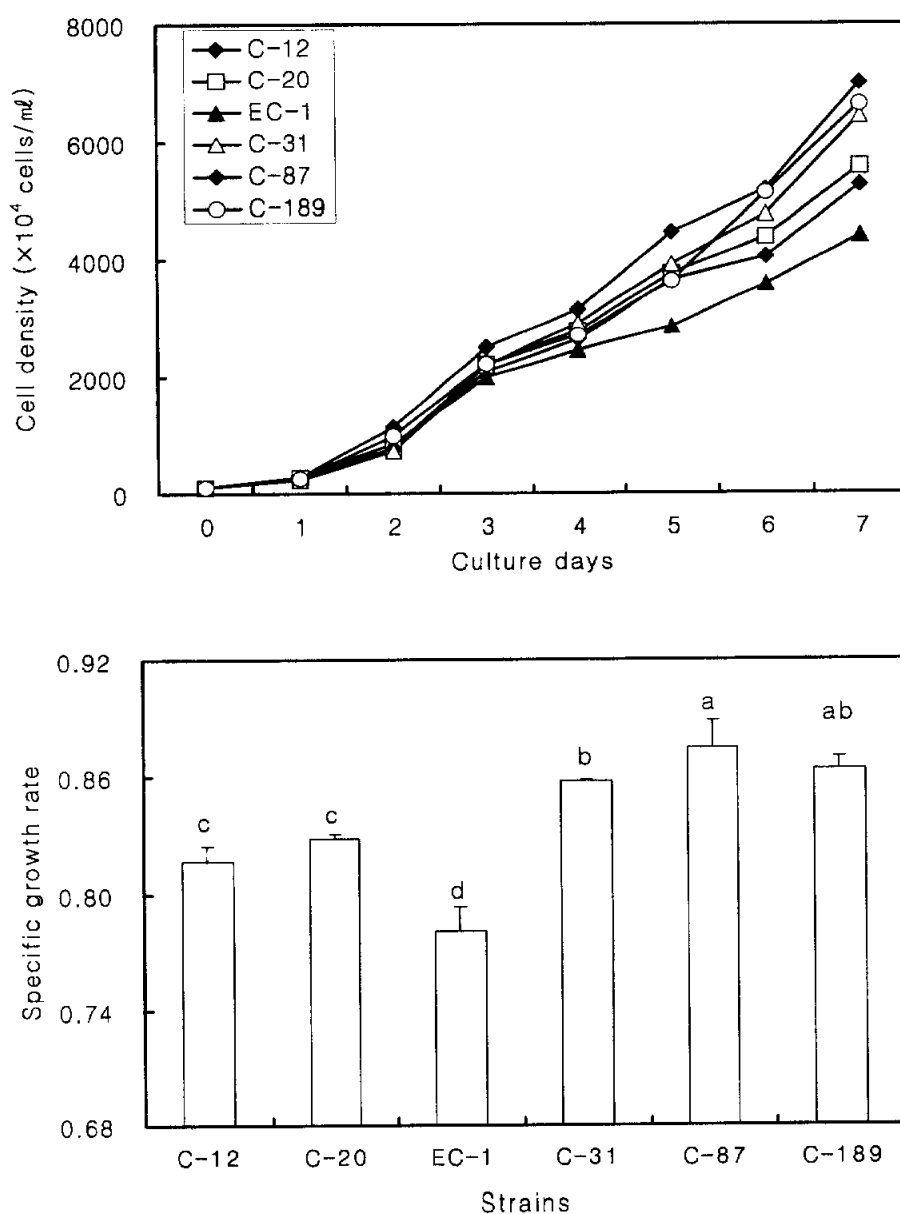


Fig. 7. Cell density (up) and specific growth rate (bottom) of six species of *Chlorella* and *Nannochloris* at the 25°C, 15‰, 5,000 lux (C-12: *C. vulgaris*, C-20: *C. ellipsoidea*, EC-1: *C. vulgaris*, C-31: *N. oculata*, C-87: *Nannochloris* sp., C-189: *Nannochloris* sp.).

Table 4. Proximate chemical composition of six species of *Chlorella* and *Nannochloris*

(unit : % in dry matter)

KMCC NO.	Species	Sample area	Protein	Lipid
C-12	<i>Chlorella vulgaris</i>	Nacdong	42.4	2.6
C-20	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	Japan	37.7	1.2
C-31	<i>Nannochloris oculata</i>	UTEX 1988	42.9	2.6
C-87	<i>Nannochloris</i> sp.	Deukryangman	41.9	1.0
C-189	<i>Nannochloris</i> sp.	Puan	40.6	1.5
EC-1	<i>Chlorella vulgaris</i>	Hwajinpo	37.5	2.4

였다. 비필수 아미노산은 glutamine과 aspartate 함량이 비교적 높게 나타났으며, 필수 아미노산 중에서는 leusine 함량이 높게 나타났다.

지방산 성분(Table 6)은 6종의 *Chlorella*와 *Nannochloris* 모두에서 16:1, 16:0, 14:0 및 15:1의 함량이 높게 나타났으며, PUFA 함량은 C-189와 C-87에서 50.44%와 49.78%로 가장 높았고 C-12도 43.99%로 비교적 높게 나타났다. EPA (20:5n-3)는 C-12에서 34.88%로 가장 높았고, C-87은 0.35%로 가장 낮았다. DHA (22:6n-3)는 C-12와 C-87에서만 각각 0.29와 0.02%의 함량을 나타내었다.

1-4. 고수온과 저수온에서 6종 *Chlorella*와 *Nannochloris*의 성장

6종의 *Chlorella*와 *Nannochloris*를 여름철 고수온기에 해당하는 30℃와 32℃, 겨울철 저수온기인 10℃에서 성장을 측정한 결과는 Fig. 8과 같다. 30℃에서는 C-31과 C-87이 배양 10일만에 각각 $7,951 \times 10^4$ cells/ml와 $7,775 \times 10^4$

Table 5. Amino acid composition of six species of *Chlorella* and

Nannochloris

(% in sample)

Amino acid	C-12	C-20	C-31	C-87	C-189	EC-1
Asp.	4.39	5.02	4.81	5.59	7.49	5.02
Thr.	2.22	2.62	2.11	2.54	3.42	2.04
Ser.	1.93	2.16	1.96	2.37	3.10	2.33
Glu.	6.96	8.12	7.95	9.36	13.05	6.77
Pro.	7.29	6.40	3.37	3.36	3.89	2.70
Gly.	2.59	3.23	2.58	3.04	4.08	2.87
Ala.	3.08	3.61	3.80	5.21	6.20	3.94
Val.	2.93	3.39	2.71	3.10	3.87	2.60
Ile.	2.15	2.72	1.59	2.48	3.13	2.18
Leu.	4.07	5.06	3.56	4.76	6.38	4.28
Tyr.	1.84	1.98	3.01	2.05	2.68	1.70
Phe.	2.74	2.97	3.18	3.25	4.29	2.55
His.	1.12	1.31	1.51	1.76	2.52	1.42
Lys.	3.07	3.66	2.75	3.40	4.61	2.73
Arg.	3.16	3.33	2.14	3.14	4.29	2.59
Total	49.53	55.58	47.03	55.39	72.97	45.71

C-12: *C. vulgaris*, C-20: *C. ellipsoidea*, EC-1: *C. vulgaris*,

C-31: *N. oculata*, C-87: *Nannochloris* sp., C-189: *Nannochloris* sp.

Table 6. Fatty acid composition of six species of *Chlorella* and *Nannochloris*

	(% fatty acid)					
Fatty acid	C-12	C-20	C-31	C-87	C-189	EC-1
8:0	0.41	0.20	0.66	0.16	0.09	0.40
10:0	0.26	0.20	-	0.16	-	-
11:0	0.07	-	0.45	0.04	0.19	0.21
12:0	0.29	0.30	-	0.74	-	-
13:0	0.87	0.30	0.42	0.04	0.22	0.23
14:0	4.28	4.20	3.61	4.80	3.50	2.25
14:1	0.64	0.20	1.23	0.48	0.36	1.20
15:0	0.29	-	0.68	0.59	0.27	0.37
15:1	0.19	-	1.42	0.12	0.40	0.61
16:0	17.49	24.30	9.24	26.83	15.40	10.96
16:1	25.75	19.00	1.54	5.33	8.69	3.04
17:0	0.18	-	6.97	0.28	1.18	7.55
17:1	0.74	-	16.14	8.48	3.24	11.66
18:0	0.19	0.60	1.10	2.08	2.99	0.99
18:1	3.31	10.20	6.23	10.14	29.59	5.64
18:2	4.50	5.70	1.29	15.41	5.73	2.924
18:3	0.32	0.20	14.28	23.65	4.98	22.32
20:0	0.06	-	32.26	0.02	8.21	24.64
20:1	0.05	-	-	0.02	4.12	0.94
20:2	0.05	-	1.47	0.08	1.66	-
20:3	0.16	0.90	-	0.04	0.11	-
20:4	0.38	3.10	-	0.04	-	-
21:0	4.07	-	-	-	0.71	0.34
20:5n-3	34.88	19.20	0.38	0.35	6.28	3.74
22:0	-	-	-	0.03	-	-
22:1	0.02	-	0.635	0.02	-	-
22:2	0.10	-	-	0.04	2.09	-
24:0	0.03	-	-	0.02	-	-
22:6n-3	0.29	-	-	0.02	-	-
others	-	11.30	-	-	-	-
Saturated	24.49	30.1	55.37	35.75	32.76	47.93
Monounsaturated	27.39	19.20	20.96	14.47	16.81	17.45
PUFA	43.99	39.30	23.66	49.78	50.44	34.63
TOTAL	100	100	100	100	100	100

C-12: *C. vulgaris*, C-20: *C. ellipsoidea*, EC-1: *C. vulgaris*,
C-31: *N. oculata*, C-87: *Nannochloris* sp., C-189: *Nannochloris* sp.

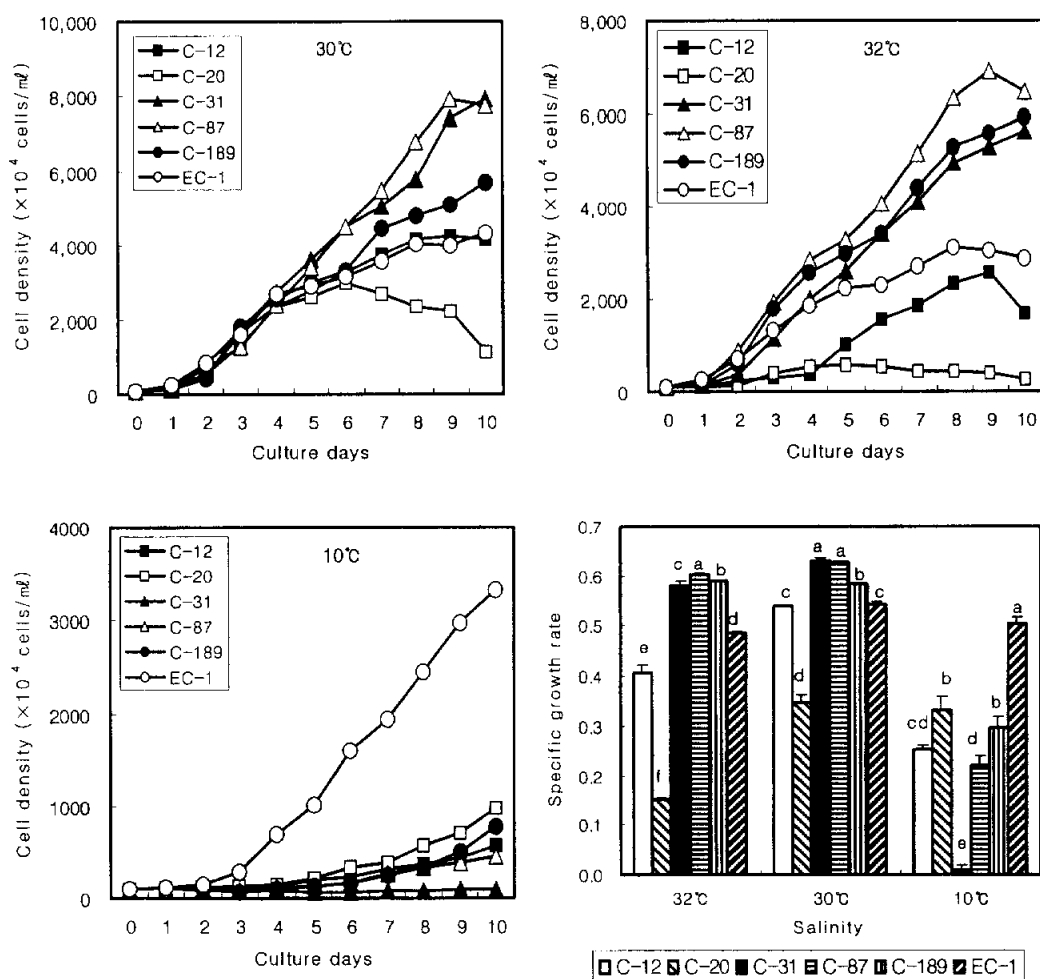


Fig. 8. Cell density and specific growth rate of six species of *Chlorella* and *Nannochloris* at the 32°C, 30°C and 10°C (C-12: *C. vulgaris*, C-20: *C. ellipsoidea*, EC-1: *C. vulgaris*, C-31: *N. oculata*, C-87: *Nannochloris* sp., C-189: *Nannochloris* sp.).

cells/ml로 가장 높은 세포 밀도를 보였으며, 다음으로 C-189가 5695×10^4 cells/ml로 높게 나타났다. 32℃에서는 C-87과 C-189의 세포 밀도가 $6,475 \times 10^4$ cells/ml와 $5,932 \times 10^4$ cells/ml로 가장 높았다. 그러나, C-20은 30℃와 32℃에서 각각 실험 시작 후 5일째와 6일째까지는 세포 밀도가 증가하였으나, 그 이후부터는 감소하였으며, 특히 32℃에서는 최고 세포 밀도가 578×10^4 cells/ml로 다른 *Chlorella*와 *Nannochloris*에 비하여 매우 낮은 세포밀도를 나타내었다. 30℃에서의 성장률은 0.3483~0.6313 사이로 C-31과 C-87이 0.6313과 0.6281로 성장률이 가장 높았고, C-20은 0.3483으로 가장 낮았다. 32℃에서는 성장률이 0.1521~0.6017로 각 종마다 유의적으로 큰 차이를 보였으며, 30℃에서와 같이 C-87이 0.6017로 가장 높았고 C-20은 0.1521로 가장 낮은 성장률을 나타내었다.

반면 10℃에서 배양하였을 경우, EC-1을 제외한 해수산 *Chlorella*와 *Nannochloris* 5종은 세포밀도 $107 \sim 986 \times 10^4$ cells/ml, 성장률은 0.0109~0.3303으로 낮게 나타났으며, EC-1은 최고 세포밀도가 $3,316 \times 10^4$ cells/ml, 성장률은 0.5052로서 매우 높게 나타났다.

1-5. Rotifer에 대한 6종 *Chlorella*와 *Nannochloris*의 먹이 효율 및 영양 성분

6종의 *Chlorella*와 *Nannochloris*를 L-type rotifer, *Brachionus plicatilis*의 먹이로 공급하여 성장을 조사한 결과 배양 5일만에 C-12와 C-20에서 각각 301 개체/ml, 272 개체/ml로 높은 개체수를 나타내었고, 성장률은 0.6808~0.5332의 범위로 C-12와 C-20가 0.6806과 0.6605에서 유의적으로 가장 높았고, C-189와 EC-1은 0.5332와 0.5376으로 가장 낮았다(Table 7).

이상과 같은 결과에서 고수온기에 해당하는 30℃와 32℃에서 성장이 우수했던 C-87, 저수온 10℃에서 월등하게 성장이 좋았던 EC-1 그리고 rotifer의

Table 7. Growth of rotifer fed on each species of *Chlorella* and

Nannochloris

Culture days	(unit: inds./ml)					
	C-12	C-20	C-31	C-87	C-189	EC-1
0	10	10	10	10	10	10
1	17	16	16	16	15	16
2	31	32	29	31	27	31
3	93	85	63	75	73	71
4	230	179	115	141	120	136
5	301	272	198	191	144	147
S.G.R.	0.6806 ^a	0.6605 ^a	0.5966 ^b	0.5903 ^b	0.5332 ^c	0.5376 ^c

C-12: *C. vulgaris*, C-20: *C. ellipsoidea*, EC-1: *C. vulgaris*,

C-31: *N. oculata*, C-87: *Nannochloris* sp., C-189: *Nannochloris* sp.

먹이 효율에서 rotifer의 성장이 가장 높았던 C-12, 3종류로 각각 배양한 rotifer의 아미노산과 지방산을 분석한 결과는 Table 8, 9와 같다. 아미노산 성분은 비필수 아미노산에서는 glutamine과 aspartate 함량이 비교적 높게 나타났다으며, 필수 아미노산 중에서는 leusine의 함량이 높게 나타났다. 총 아미노산 함량은 EC-1을 공급한 rotifer에서 57.14%로 가장 높았으며, C-12를 먹이로 한 rotifer에서 가장 낮은 50.54%였다. 지방산 성분에서는 총 PUFA는 EC-1를 공급한 rotifer에서 63.49%로 가장 높았으며, EPA는 C-12를 먹이로 한 rotifer에서 15.27%로 가장 높았고, DHA는 EC-001을 공급한 rotifer에서 9.39%으로 가장 높았다.

Table 8. Amino acid composition of rotifer fed on each species of
Chlorella and *Nannochloris*

(% in sample)			
Amino acid	C-12	C-87	EC-1
Asp.	5.47	6.01	5.97
Thr.	2.24	2.21	2.59
Ser.	2.68	2.72	3.10
Glu.	7.69	8.03	8.85
Pro.	3.87	3.85	4.08
Gly.	2.03	2.45	2.57
Ala.	2.32	2.77	3.13
Val.	3.10	3.58	3.67
Ile.	2.54	2.86	3.02
Leu.	4.08	4.50	4.83
Tyr.	2.54	2.09	2.44
Phe.	3.17	2.95	3.20
His.	1.24	1.39	1.37
Lys.	4.09	4.44	4.34
Arg.	3.48	4.16	3.99
Total.	50.54	54.02	57.14

C-12: *C. vulgaris*, C-87: *Nannochloris* sp., EC-1: *C. vulgaris*.

Table 9. Fatty acid composition of rotifer fed on each species *Chlorella*
and *Nannochloris*

(% fatty acid)			
Fatty acid	C-12	C-87	EC-1
8:0	0.07	0.05	0.05
10:0	0.06	0.03	-
11:0	-	-	-
12:0	0.40	0.14	0.06
13:0	0.47	0.54	0.55
14:0	4.49	2.94	2.27
14:1	0.40	0.85	-
15:0	0.56	0.56	-
15:1	-	0.17	-
16:0	14.32	15.94	12.63
16:1	16.14	9.26	8.35
17:0	0.49	0.47	0.51
17:1	0.80	0.63	0.26
18:0	3.06	3.29	2.98
18:1	1.85	1.38	-
18:2	11.0	24.60	41.62
18:3	4.77	8.10	4.16
20:0	-	7.38	0.68
20:1	0.77	2.08	3.75
20:2	1.36	2.08	2.43
20:3	0.55	0.83	0.18
20:4	-	1.26	0.12
21:0	3.67	2.39	1.13
20:5n-3	15.27	9.27	5.61
22:0	-	0.37	0.30
22:1	-	0.92	1.49
22:2	11.12	-	-
24:0	5.11	3.14	1.51
22:6n-3	3.29	0.80	9.39
Saturated	32.69	37.23	22.65
Monounsaturated	18.11	13.74	13.86
PUFA	49.20	43.32	63.49
TOTAL	100	100	100

C-12: *C. vulgaris*, C-87: *Nannochloris* sp., EC-1: *C. vulgaris*.

2. *Chlorella*의 대량 배양을 위한 최적 경제 배지 개발

2-1. 배지 종류에 따른 *Chlorella*의 성장

농업용 비료를 대량 배양용 배지로 개발하기 위하여 f/2 배지와 비교 한 결과(Table 10), f/2 배지에서 배양 7일만에 세포 밀도 169×10^4 cells/ml, 성장률이 0.3247로 가장 높았다. Schreiber 배지(0.2669)보다는 농업용 비료에서 성장률(0.2825)이 더 높게 나타났다. Complestal 배지만을 사용한 경우는 성장이 가장 낮았으며(0.2213), 농업용 비료(50%)+complestal (50%)의 배지의 성장률은 0.2789로 농업용 비료나 complestal 배지만을 사용한 것과 유의적으로 차이는 없는 것으로 나타났다. 농업용 비료 배지에서 7일째 세포 밀도가 141×10^4

Table 10. Growth of *Chlorella ellipsoidea* with different media at 25°C, 15‰ and 5,000 lux

(unit: $\times 10^4$ cells/ml)					
Culture days	1	2	3	4	5
0	35	36	36	36	35
1	66	47	43	53	41
2	80	67	50	69	61
3	84	69	66	76	71
4	101	81	72	85	82
5	130	84	86	94	92
6	147	100	91	124	110
7	169	131	105	141	137
S.G.R.	0.3247 ^a	0.2669 ^b	0.2213 ^c	0.2825 ^b	0.2789 ^b

1: f/2, 2: Schreiber media, 3: Complestal, 4: Fertilizer (compound, 0.1176 mg/ℓ; urea, 0.1637 mg/ℓ), 5: Fertilizer 50% + complestal 50%.

cell/ml로 가장 높게 나타나 대조구인 f/2 배지 실험구를 제외하면 경제적으로 사용할 수 있는 배지는 농업용 비료인 것으로 판단된다.

2-2. 농업용 비료의 농도에 따른 *Chlorella*의 성장

위의 실험 결과를 토대로 하여 적합한 비료의 함량을 파악하기 위하여 f/2배지와 농업용 비료를 혼합 첨가하여 5일간 성장 변화를 본 결과(Table 11), 대조구인 f/2 배지에서 일간 성장률이 0.3838로 가장 높게 나타났으며, f/2 배지의 함량이 높을수록 좋은 성장을 보였다. 또 농업용 비료를 Schreiber 배지의 N과 P를 기준으로 1.0배(복합비료 0.1176 g/ℓ, 요소비료 0.1617 g/ℓ)를 첨가한 농업용 비료만을 공급하였을 때는 성장률이 0.2890으로 1.5배나 2.0배에 비하여 비교적 높은 성장률을 나타내었다.

이상과 같이 대량 배양의 목적으로 사용될 수 있는 농업용 비료는 Schreiber 배지 농도의 1.0배가 적합한 것으로 나타났으나, 보다 적합한 비료의 농도를 확인하기 위하여 농업용 비료의 농도에 따른 *Chlorella*의 성장을 재 실험한 결과는 Table 12과 같다. 대조구인 f/2 배지에서 성장률이 0.3815로 가장 높게 나타났고, 비료 1.25배가 비료 첨가 실험구에서 높은 성장률(0.3407)을 나타내었으며, 다른 실험구에서는 성장률이 0.2704~0.2981로서 낮은 성장률을 보였으며, 이들 실험구 사이에는 유의적인 차이는 보이지 않았다. 비료 1.5배는 88×10^4 cells/ml로 가장 낮은 세포 밀도를 나타내었고, 질산염 1.5배 농도, 인산염 1.0배 농도(복합비료 0.1176 g/ℓ, urea fertilizer 0.2724 g/ℓ)를 첨가한 경우 90×10^4 cells/ml의 세포 밀도로 비교적 낮은 성장을 나타내었다.

농업용 비료에 액체 비료인 complesal을 첨가하여 그 성장을 측정한 결과 (Table 13), 비료 배지 1.25배가 0.3208로 f/2 배지 다음으로 높은 성장률을 나타내었다. 다음으로는 비료 1.25배지(75%)+complesal (25%)를 첨가한 실험구

Table 11. Growth of *Chlorella ellipsoidea* with f/2 and fertilizer media

(unit: $\times 10^4$ cells/ml)							
Culture days	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	75	72	68	65	57	54
3	87	85	79	79	74	65	59
4	110	101	95	94	83	81	64
5	134	122	114	109	96	89	72
S.G.R.	0.3838 ^a	0.3621 ^b	0.3405 ^c	0.3302 ^c	0.2890 ^d	0.2701 ^d	0.2087 ^e

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 (compound fertilizer 0.1176 g/ℓ , urea fertilizer 0.1637 g/ℓ), 6: Fertilizer 1.5 times, 7: Fertilizer 2.0 times.

Table 12. Growth of *Chlorella ellipsoidea* with different concentrations of fertilizer media

(unit: $\times 10^4$ cells/ml)					
Culture days	1	2	3	4	5
0	35	35	35	34	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.	0.3815 ^a	0.2981 ^c	0.2704 ^c	0.2844 ^c	0.3407 ^b

1: f/2, 2: Fertilizer 1.0 times (compound fertilizer 0.1176 g/ℓ , urea fertilizer 0.1637 g/ℓ), 3: Fertilizer 1.5 times, 4: Fertilizer (compound fertilizer 0.1176 g/ℓ , urea fertilizer 0.2724 g/ℓ : N 1.5 times, P 1.0 times), 5: Fertilizer 1.25 times.

Table 13. Growth of *Chlorella ellipsoidea* with fertilizer and complex media

(unit: $\times 10^4$ cells/ml)

Culture days	1	2	3	4	5	6
0	34	32	34	31	32	33
1	64	54	42	48	47	40
2	76	64	56	64	56	54
3	86	86	70	73	67	67
4	108	105	82	82	84	75
5	143	126	105	116	105	90
6	166	148	122	128	126	110
7	187	152	133	142	136	120
S.G.R.	0.3509 ^a	0.3208 ^b	0.2807 ^c	0.3140 ^{bc}	0.2964 ^c	0.2631 ^d

1: f/2, 2: Fertilizer 1.25 times, 3: Fertilizer 1.0 times (75%)+complex (25%), 4: Fertilizer 1.25 times (75%)+complex (25%), 5: Fertilizer 1.25 times (50%) + complex (50%), 6: Fertilizer 1.25 times (25%)+complex (75%).

가 0.3140의 성장률로 높게 나타나, complex의 첨가 비율과는 관계없이 비료 배지 1.25배의 첨가 비율이 높을수록 성장률이 높은 경향을 보였다. 그러나, 비료 1.25배 배지를 25% 첨가하였을 때(0.2631) 비료 1.0배를 75% 첨가한 실험구(0.2807)보다 낮은 성장을 나타내었다.

2-3. Vitamin 첨가에 따른 *Chlorella*의 성장

비료 배지에 f/2 배지에서 사용되는 비타민을 단독 또는 혼합하여 첨가하여 7일간 배양한 결과는 Fig. 9와 같다. 대조구인 f/2 배지에서는 배양 7일만에 127×10^4 cells/ml로 성장하였고, vitamin을 첨가한 실험구는 $90 \sim 104 \times 10^4$

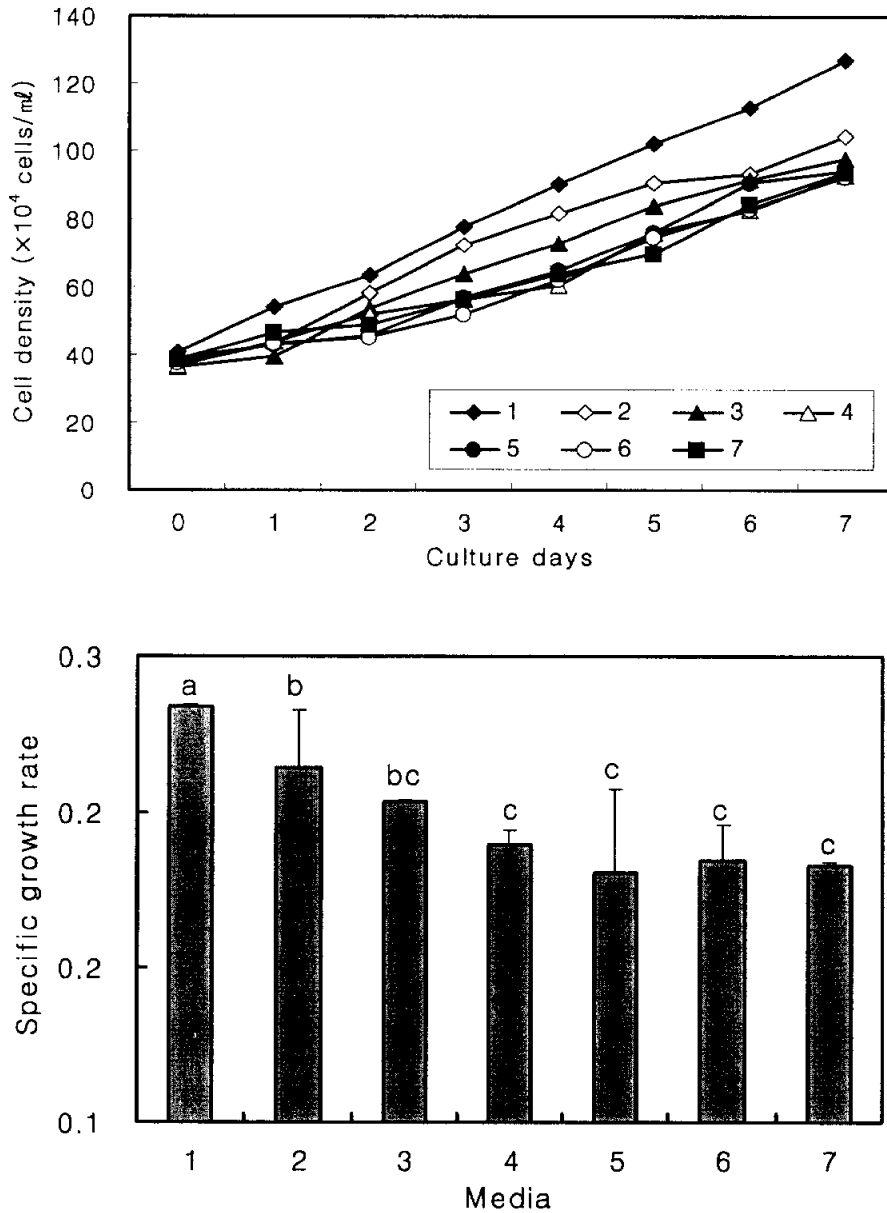


Fig. 9. Cell density (up) and specific growth rate (bottom) of *Chlorella* at different concentrations of fertilizer media added with and vitamin (1: f/2, 2: fertilizer 1.0 time (NaNO_3 100 mg/l, Na_2HPO_4 20 mg/l), 3: fertilizer 1.5 times (NaNO_3 150 mg/l, Na_2HPO_4 20 mg/l), 4: fertilizer 1.5 times (NaNO_3 150 mg/l, Na_2HPO_4 10 mg/l), 5: 2+mixed vitamin (biotin+ B_{12} +thiaminHCl, 6: 2+ B_{12} , 7: 2+thiaminHCl).

cells/ml로 오히려 낮은 세포밀도를 보였다. 성장률은 f/2 배지에서 0.2337로 가장 높았으며, 다음으로 비료 1.0배 배지의 성장률이 0.2142로, 비료 1.5배 (NaNO₃ 150 mg/ℓ, Na₂HPO₄ 20 mg/ℓ) 배지의 0.2035 보다 높았다. 비타민을 비료 1.0배 배지에 단독 또는 혼합 공급한 경우는 성장률이 0.1805~0.1830으로 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이는 *Chlorella* 등의 녹조류에서는 비타민이 성장에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 보여진다.

2-4. 단일 미량 원소의 첨가 효과

비료 배지(1.25배)에 f/2 배지에서 이용되는 코발트(Co), 구리(Cu), 아연(Zn), 몰리브데늄(Mo)의 미량 원소를 f/2배지에서의 농도 1.0배를 기준으로 0.5~2.0배의 농도로 각각 첨가하여 7일간 배양한 결과(Table 14, Fig. 10), 각 미량 원소의 첨가 함량이 높을 수록 높은 성장을 나타내었다. 대조구인 비료 배지(1.25배)와 코발트 0.5 배(0.055 mg/ℓ)를 첨가한 실험구에서 배양 7일째 각각 세포 밀도가 149×10^4 cells/ml와 148×10^4 cells/ml, 성장률이 각각 0.2930과 0.2912로 가장 낮았다. 전체 실험구에서 아연과 구리를 첨가한 실험구의 성장률이 구리 0.3042~0.3559, 아연 0.3096~0.3598로 코발트나 몰리브데늄을 비료 배지에 첨가하여 배양한 경우(0.2903~0.3231)보다 비교적 높은 성장률을 나타내었다. 전체 실험구 중에서 아연 2.0 배(0.088 mg/ℓ)와 구리 2.0 배(0.0392 mg/ℓ)를 첨가하였을 경우 성장률이 각각 0.3598과 0.3559로서 높게 나타났다.

위의 f/2 배지에 이용되는 4종의 미량 원소를 비료 배지에 단독으로 0.5~2.0 배로 첨가한 실험에서 가장 성장률이 높았던 구리 2.0 배와 아연 2.0 배 및 철과 망간을 각각 0.5~2.0 배(철: 5~20 mg/ℓ, 망간: 0.11~0.44 mg/ℓ)의 농도로 첨가하여 다시 8일간 배양한 결과는 Table 15, Fig. 11과 같다. 위의

Table 14. Cell density of *Chlorella ellipsoidea* cultured with fertilizer media added with different concentrations of trace element

(unit : $\times 10^4$ cells/ml)										
Media	Trace element	Concentration (mg/ℓ)	Culture days							
			0	1	2	3	4	5	6	7
f/2			33	62	78	89	115	152	176	205
Fertilizer			35	39	44	50	63	96	127	149
Fertilizer	CoCl ₂	0.055	36	37	42	48	58	80	112	148
		0.110	34	39	45	50	66	83	113	152
		0.165	34	41	50	66	78	99	125	155
		0.220	34	47	65	68	89	108	144	164
		0.0098	35	43	50	54	72	106	129	154
Fertilizer	CuSO ₄	0.0196	35	41	62	67	80	103	139	165
		0.0294	34	53	69	79	105	129	157	171
		0.0392	34	59	72	81	105	138	167	191
		0.022	34	41	46	55	68	100	121	157
Fertilizer	ZnSO ₄	0.044	34	51	65	79	95	127	145	177
		0.066	35	59	74	84	109	135	161	187
		0.088	34	62	81	90	108	145	168	194
		0.006	35	40	43	46	62	79	100	141
Fertilizer	Na ₂ MoO ₄	0.012	33	41	46	52	72	84	118	152
		0.018	35	43	56	62	78	103	139	165
		0.024	34	45	64	70	88	108	145	169

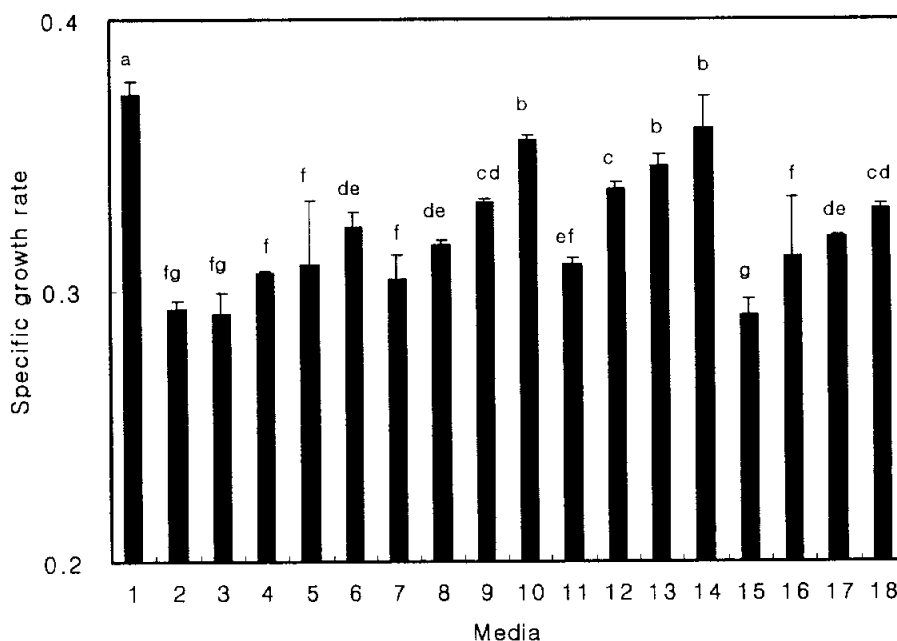


Fig. 10. Specific growth rate of *Chlorella ellipsoidea* cultured with fertilizer media added with different concentrations of trace element (1: f/2, 2: fertilizer 1.25 times (compound 0.1470 g/ℓ, urea 0.2050 g/ℓ), 3: 2+CoCl₂ (0.055 mg/ℓ), 4: 2+CoCl₂ (0.110 mg/ℓ), 5: 2+CoCl₂ (0.165 mg/ℓ), 6: 2+CoCl₂ (0.220 mg/ℓ), 7: 2+CuSO₄ · 5H₂O (0.0098 mg/ℓ), 8: 2+CuSO₄ · 5H₂O (0.0196 mg/ℓ), 9: 2+CuSO₄ · 5H₂O (0.0294 mg/ℓ), 10: 2+CuSO₄ · 5H₂O (0.0392 mg/ℓ), 11: 2+ZnSO₄ · 7H₂O (0.022 mg/ℓ), 12: 2+ZnSO₄ · 7H₂O (0.044 mg/ℓ), 13: 2+ZnSO₄ · 7H₂O (0.066 mg/ℓ), 14: 2+ZnSO₄ · 7H₂O (0.088 mg/ℓ), 15: 2+Na₂MoO₄ · 2H₂O (0.006 mg/ℓ), 16: 2+Na₂MoO₄ · 2H₂O (0.012 mg/ℓ), 17: 2+Na₂MoO₄ · 2H₂O (0.018 mg/ℓ), 18: 2+Na₂MoO₄ · 2H₂O (0.024 mg/ℓ)).

Table 15. Cell density of *Chlorella ellipsoidea* cultured with fertilizer media added with different concentrations of trace element
(unit : $\times 10^4$ cells/ml)

Media	Trace element	Concentration (mg/l)	Culture days								
			0	1	2	3	4	5	6	7	8
f/2			100	211	920	1,575	2,115	2,458	2,902	3,200	3,625
Fertilizer			100	117	159	355	933	1,475	1,991	2,337	2,738
		5.0	100	115	156	341	929	1,500	2,083	2,513	2,838
		10.0	100	118	165	342	928	1,508	1,995	2,541	2,854
Fertilizer	FeCl ₃	15.0	100	120	172	381	931	1,741	2,050	2,520	3,033
		20.0	100	122	193	402	1,013	1,804	2,088	2,808	3,129
		0.11	100	116	164	360	913	1,496	1,925	2,321	2,788
		0.22	100	117	178	355	920	1,504	1,895	2,329	2,825
Fertilizer	MnCl ₂	0.33	100	119	181	355	948	1,650	2,192	2,588	3,083
		0.44	100	120	173	393	966	1,688	2,221	2,708	3,113
Fertilizer	CuSO ₄	0.0392	100	121	195	418	1,217	1,783	2,296	2,817	3,258
Fertilizer	CuSO ₄	0.088	100	122	214	431	1,184	1,821	2,421	2,776	3,167

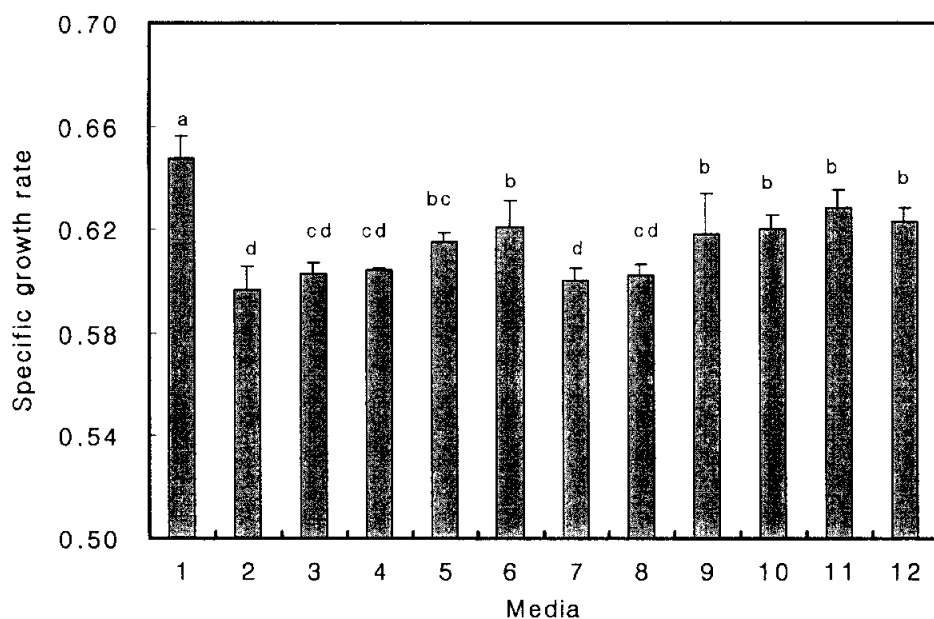


Fig. 11. Specific growth rate of *Chlorella ellipsoidea* cultured with fertilizer media added with different concentrations of trace element (1: f/2, 2: fertilizer 1.25 times (compound 0.208 g/ℓ, urea 0.172 g/ℓ), 3: 2+FeCl₃ (5 mg/ℓ), 4: 2+FeCl₃ (10 mg/ℓ), 5: 2+FeCl₃ (15 mg/ℓ), 6: 2+FeCl₃ (20 mg/ℓ), 7: 2+MnCl₂ (0.11 mg/ℓ), 8: 2+MnCl₂ (0.22 mg/ℓ), 9: 2+MnCl₂ (0.33 mg/ℓ), 10: 2+MnCl₂ (0.44 mg/ℓ), 11: 2+CuSO₄ · 5H₂O (0.0392 mg/ℓ), 12: 2+ZnSO₄ · 7H₂O (0.088 mg/ℓ)).

실험에서와 마찬가지로 비료 1.25배에서만 배양하였을 경우 배양 8일만에 세포 밀도 $2,737 \times 10^4$ cells/ml, 성장률이 0.5969로 가장 낮았으나, 구리, 아연, 철 및 망간 각 2.0배(0.0392 mg/l, 0.088 mg/l, 20 mg/l, 0.44 mg/l)를 첨가하였을 경우 성장률은 각각 0.6283, 0.6231, 0.6210과 0.6200으로 f/2 배지 다음으로 높은 성장률을 나타내었다. 망간과 철 1.5배에서는 각각 세포 밀도 $3,083 \times 10^4$ cells/ml와 $3,033 \times 10^4$ cells/ml, 성장률이 0.6183과 0.6154로 높게 나타났으며, 철과 망간의 경우도 첨가 함량이 0.5배에서 2.0배로 높아질수록 성장률이 더 높은 경향을 나타내었다.

위와 같은 결과에서 비료 배지에서 첨가 효과가 높은 것으로 판단된 구리 성분의 정확한 공급 농도를 파악하기 위하여 f/2 배지의 구리 함량의 2~5배 (0.0392~0.098 mg/l)로 비료 1.25배지에 첨가하여 8일간 배양한 결과(Fig. 12), 대조구인 f/2 배지에서 세포 밀도가 배양 8일째 $3,567 \times 10^4$ cells/ml로 가장 높았으며, 구리 3배를 첨가하였을 경우는 $2,717 \times 10^4$ cells/ml로 비료배지보다 가장 높은 세포 밀도를 보였다. 구리 2배와 3배 농도로 첨가한 실험구에서의 성장률은 비료 배지보다 유의적으로 비교적 높게 나타난 반면, 4배와 5배 공급구에서는 오히려 농도가 높을수록 성장률이 낮아지는 경향을 나타내었다.

2-5. 혼합 미량 원소의 첨가 효과

앞서 f/2 배지에 이용되는 여러 가지 미량 원소를 단독으로 첨가하여 배양하였을 경우, 구리를 첨가하였을 때 성장률이 가장 높게 나타났으며, 이들 미량 원소(철, 망간, 아연, 구리, 코발트)를 f/2배지 기준으로 혼합하여 비료 배지 1.25배에 첨가하여 7일간 배양한 결과는 Fig. 13과 같다. 먼저 비료 배지 1.25배에 철, 망간, 아연, 구리 및 코발트를 모두 혼합하여 배양하였을 경우, 7

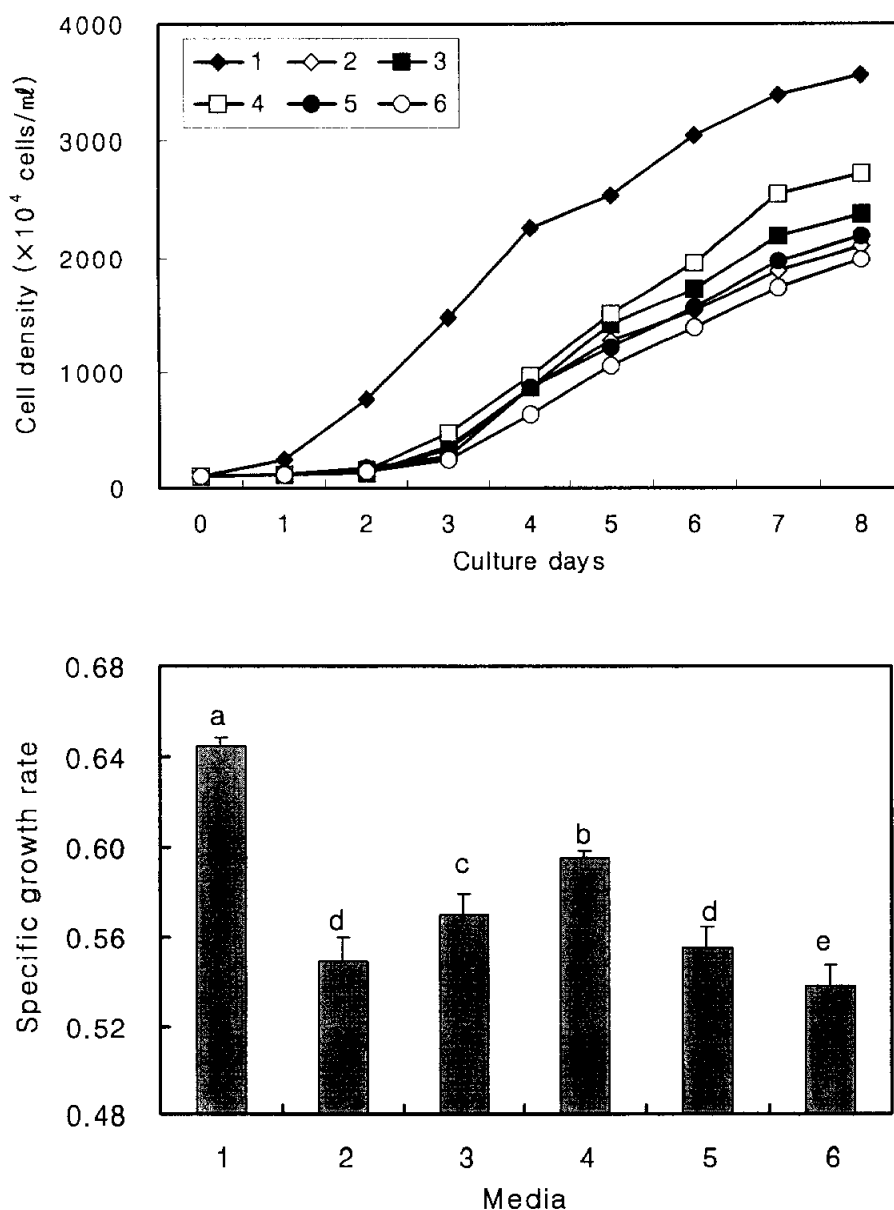


Fig. 12. Cell density (up) and specific growth rate (bottom) of *Chlorella ellipsoidea* cultured with fertilizer media added with different concentrations of copper (1: f/2 media, 2: fertilizer 1.25 times (compound 0.208 g/l, urea 0.172 g/l), 3: 2+Cu (0.0392 mg/l), 4: 2+Cu (0.0588 mg/l), 5: 2+Cu (0.0784 mg/l), 6: 2+Cu (0.098 mg/l)).

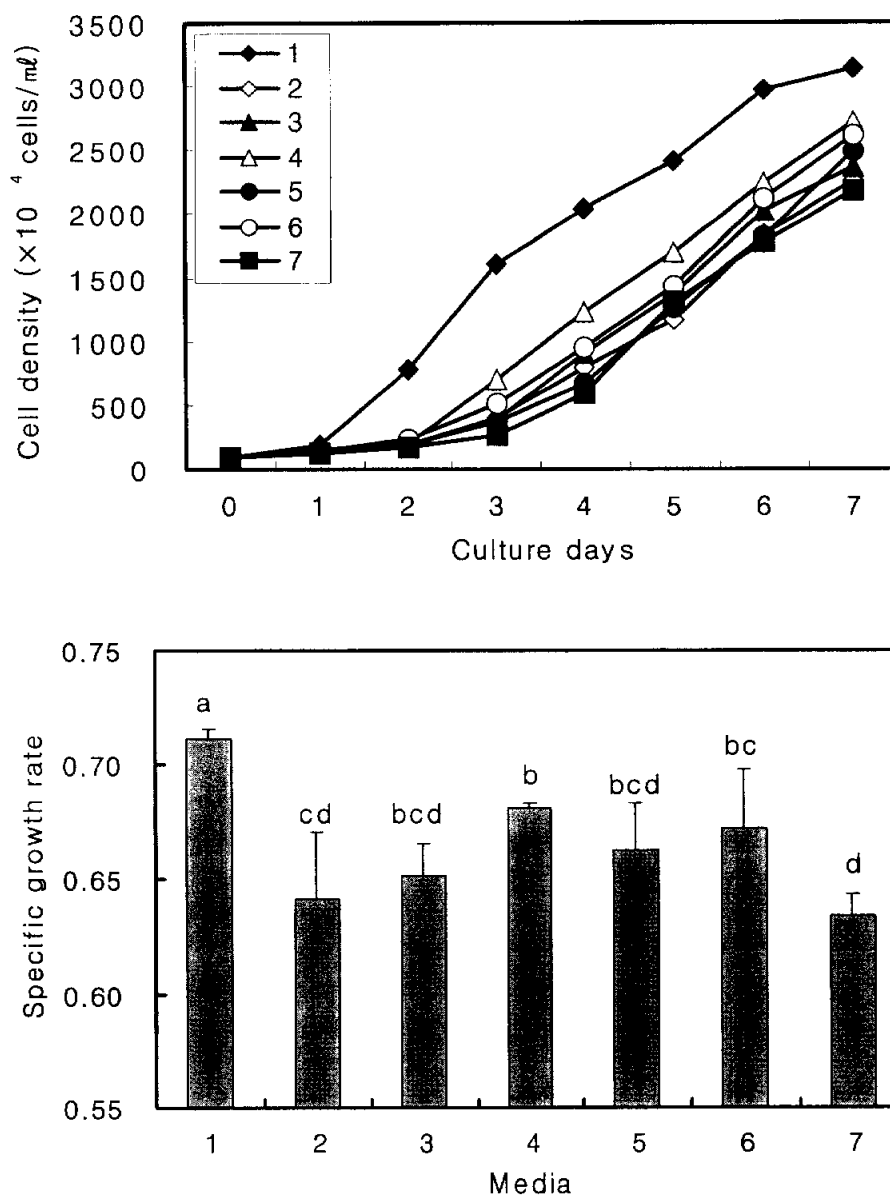


Fig. 13. Cell density (up) and specific growth rate (bottom) of *Chlorella ellipsoidea* cultured with fertilizer media added with mixed trace elements (1: f/2, 2: fertilizer 1.25 times (compound 0.208 g/ℓ, urea 0.172 g/ℓ), 3: 2+FeCl₃ (10 mg/ℓ), 4: 3+MnCl₂ (0.22 mg/ℓ), 5: 4+ZnSO₄ · 7H₂O (0.044 mg/ℓ), 6: 5+CuSO₄ · 5H₂O (0.0196 mg/ℓ), 7: 6+CoCl₂ (0.11 mg/ℓ)).

일만에 세포밀도 $2,170 \times 10^4$ cells/ml, 성장률은 0.6343으로 가장 낮았으며, 다음으로 비료 1.25배 배지만을 사용했을 때, 세포밀도는 $2,250 \times 10^4$ cells/ml, 성장률은 0.6417로 낮게 나타났다. 비료 배지에 철+망간+아연+구리를 혼합하여 첨가한 경우, 세포밀도 $2,608 \times 10^4$ cells/ml, 성장률은 0.6722로 비교적 높게 나타났다으며, 비료 배지에 철과 망간의 2가지 미량 원소를 첨가하여 배양한 실험구에서 세포밀도 $2,721 \times 10^4$ cells/ml, 성장률은 0.6809로서 가장 높게 나타났다.

위의 결과들에서 성장이 우수했던, 3종의 미량 성분 철, 망간과 구리를 각각 혼합하여 7일간 배양한 결과(Fig. 14), 비료 1.25배 배지에 망간과 구리를 혼합하여 첨가한 실험구에서 세포밀도 $1,879 \times 10^4$ cells/ml, 성장률은 0.6046으로 가장 낮았으며, 나머지 실험구에서는 성장률이 0.6496~0.6678로 유사한 경향을 나타내었으나, 비료 배지에 철과 망간을 혼합하여 첨가한 실험구가 와 세포 밀도가 $2,554 \times 10^4$ cells/ml, 성장률 0.6678로 가장 높았다.

이상의 결과에서 f/2 배지에 사용되는 미량 원소를 비료 배지에 2가지 이상 혼합하여 첨가하였을 경우, 구리 3배를 단독으로 첨가하여 *Chlorella*를 배양하였을 때의 성장률과 유의적인 차이가 없는 것으로 나타나, 대량 배양시 비료 배지에 구리 3배만을 첨가하는 것이 더 경제적인 것으로 보여진다.

2-6. Oyster powder의 첨가 효과

천연 굴껍질로 만들어 각종 미량 원소 등이 풍부한 oyster powder를 비료 배지에 첨가하여 *Chlorella*의 성장을 조사한 결과(Table 16), f/2 배지와 f/2 배지에 oyster powder 추출액을 첨가하였을 때, 성장률이 각각 0.5862와 0.5828로 가장 높았으며, 이 두 배지간의 유의적 차이는 없었다. 비료 1.25배 배지에 oyster powder 추출액만을 첨가한 것과, oyster powder 추출액과 미량

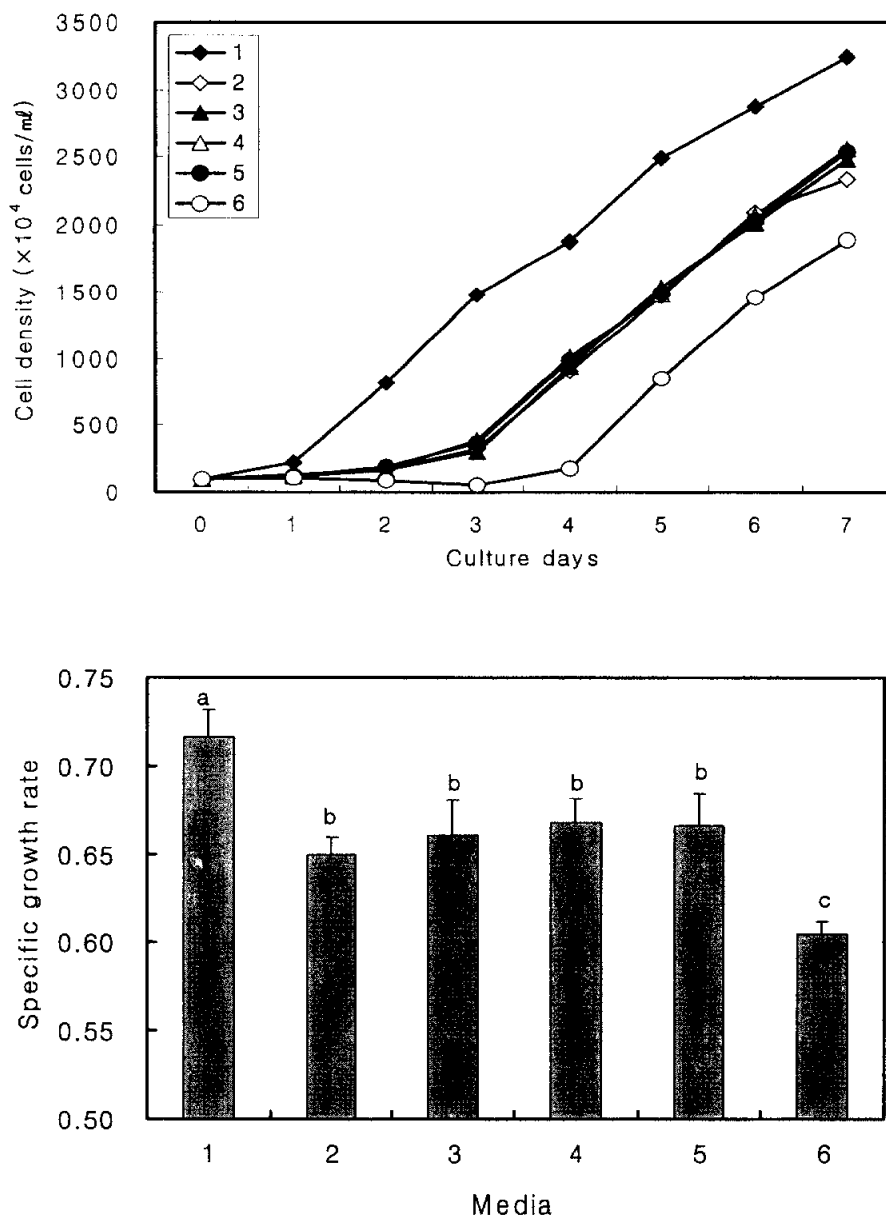


Fig. 14. Cell density (up) and specific growth rate (bottom) of *Chlorella ellipsoidea* added 3 trace element to fertilizer media (1: f/2, 2: fertilizer 1.25 times (compound 0.208 g/ℓ, urea 0.172 g/ℓ), 3: 2+FeCl₃ (10 mg/ℓ)+MnCl₂ (0.22 mg/ℓ)+CuSO₄·5H₂O (0.0196 mg/ℓ), 4: 2+FeCl₃+MnCl₂, 5: 2+FeCl₃+CuSO₄·5H₂O, 6: 2+MnCl₂+CuSO₄·5H₂O).

Table 16. Growth of *Chlorella ellipsoidea* cultured with fertilizer media added with oyster powder extract

	(unit : $\times 10^4$ cells/ml)				
	1	2	3	4	5
0	100	100	100	100	100
1	214	215	113	126	111
2	798	883	171	205	135
3	1,208	1,342	337	455	181
4	1,579	1,675	896	725	346
5	2,100	2,133	1,317	995	746
6	2,583	2,683	1,779	1,400	1,088
7	2,896	2,975	2,021	1,596	1,388
8	3,417	3,350	2,413	1,758	1,654
9	3,875	3,792	2,496	1,988	1,917
S.G.R.	0.5862 ^a	0.5828 ^a	0.5157 ^b	0.4792 ^c	0.4734 ^c

1: f/2 , 2: 1+oyster powder extract, 3: fertilizer 1.25 times (compound 0.208 g/ℓ , urea 0.172 g/ℓ), 4: 3+oyster powder extract, 5: 3+FeCl₃+MnCl₂+oyster powder extract

원소 중에서 첨가 효과가 좋았던 철과 망간를 혼합 첨가한 실험구는 성장률이 0.4792와 0.4734로서 oyster powder 추출액을 첨가하지 않은 비료 1.25배 배지의 0.5157보다 오히려 낮게 나타나, *Chlorella*의 배양에서는 효과가 없는 것으로 나타났다.

2-7. 배양기간 동안 f/2 와 농업용 비료배지의 수질 변화

*Chlorella*의 대량 배양시 주로 이용하는 농업용 비료 배지는 f/2 배지에

Table 17. Growth of *Chlorella ellipsoidea* cultured
with f/2 and fertilizer media for the
analysis of water quality
(unit : $\times 10^4$ cells/ml)

Culture days	f/2	Fertilizer
0	100	100
1	206	110
2	683	160
3	1,181	344
4	1,950	644
5	2,281	844
6	2,538	1,094
7	3,131	1,206
8	3,425	1,575
9	3,781	1,700
10	4,494	1,956
11	4,856	2,075
12	5,038	2,144
13	5,188	2,350
14	5,306	2,714
15	5,319	2,869
16	5,331	2,894
S.G.R.	0.3585	0.3034

비하여 Table 17에서 나타난 바와 같이 접종 후 3일 쯤부터 성장의 큰 차이를 나타내고 있으며, 16일간 배양했을 경우 세포 밀도가 f/2 배지에서는 $5,331 \times 10^4$ cells/ml 로 비료 배지(1.25배)의 $2,893 \times 10^4$ cells/ml와는 큰 차이를 나타내고 있다.

이 실험에서 배양 기간 동안 f/2 배지와 농업용 비료 배지의 수질의 변화를 알아 본 결과는 Table 18과 같다. 배양 시작시의 인산염 함량은 농업용 비료 배지에서 12.8717 mg/l 로서 f/2 배지의 1.5210 mg/l 로 약 9배 정도를 나타냈으나, 인산염($\text{PO}_4\text{-P}$) 성분은 배양 4일째 모두 급격하게 감소하는 경향을 나타내었다. 그리고, f/2 배지에서 아질산염($\text{NO}_2\text{-N}$)은 매우 낮은 함량을 나타내었고, 암모니아($\text{NH}_4\text{-N}$)는 거의 검출되지 않았으나, 비료 배지에서는 암모니아의 함량이 접종하기 전 배지에서 10.0039 mg/l 로 f/2 배지의 0.0646 mg/l 의 약 153배의 높은 함량을 나타내었다. 또 비료 배지에서 16일째 암모니아 농도는 19.0003 mg/l 로 접종시보다 약 2배 증가하였다. 반면, 실험 시작시 질산염은 비료 배지에서 3.2 mg/l 로서 f/2 배지 69.33 mg/l 의 약 5%의 함량을 나타냈다.

2-8. 농업용 비료 배지의 희석과 NaNO_3 첨가에 따른 *Chlorella*의 성장

이러한 결과에서 f/2 배지와 농업용 비료 배지의 초기 성장의 차이는 비료 배지의 높은 암모니아의 함량과 낮은 질산염 함량에서 기인하는 것으로 판단되어, 먼저 총 인 함량을 기준으로 비료 1.25 배 배지를 희석하여 다시 12일간 배양한 결과는 Table 19과 같다. f/2 배지에서는 성장률이 0.3472로서 가장 높은 성장률을 보였으며, 비료 1.25 배/9+ NaNO_3 (150 mg/l) 배지에서는 0.2981로서 가장 낮은 성장률을 나타내었다. 비료 1.25 배+ NaNO_3 (150 mg/l) 와 비료 1.25 배/5+ NaNO_3 (150 mg/l)는 성장률이 각각 0.3266과 0.3294로서

Table 18. Water quality of f/2 and fertilizer media during culture periods
(unit : mg/ℓ)

Media	Culture days	NO ₃ -N	NO ₂ -N	NH ₄ -N	PO ₄ -P
f/2	0	69.3333	—	0.0646	1.5210
	2	73.2533	0.0143	—	1.4831
	4	50.3840	—	0.0327	0.5537
	5	44.6667	0.0005	0.0010	0.1944
	8	39.3067	0.0002	—	0.1181
	10	35.3760	0.0005	—	0.1267
	12	33.9467	0.0004	—	0.1493
	14	35.7333	0.0021	—	0.5946
	16	32.5173	0.0028	—	0.1665
Fertilizer	0	3.2000	0.0008	10.0039	12.8717
	2	4.5024	0.0021	11.8894	3.8313
	4	4.3595	0.0015	11.4096	1.7951
	5	4.2880	0.0016	13.9798	1.9231
	8	3.4661	0.0050	11.5238	1.9994
	10	3.2160	0.0055	12.6490	1.7606
	12	3.6091	0.0060	13.2773	1.9015
	14	3.2517	0.0076	18.4520	1.5681
	16	3.2517	0.0084	19.0003	1.5659

— : non detected.

Table 19. Growth of *Chlorella ellipsoidea* cultured with diluted fertilizer media (compound 0.208 g/ℓ, urea 0.172 g/ℓ) added with NaNO₃ (150 mg/ℓ) at 25°C, 15‰ and 5,000 lux

(unit : ×10⁴ cells/ml)

	f/2	Fertilizer +NaNO ₃	Fertilizer/5 +NaNO ₃	Fertilizer/9 +NaNO ₃
0	300	300	300	300
1	589	353	538	520
2	928	550	850	793
3	1,558	1,017	1,341	1,142
4	2,313	1,558	1,950	1,558
5	2,683	1,979	2,308	1,879
6	3,171	2,483	2,575	2,117
7	3,446	2,904	3,067	2,338
8	4,013	3,304	3,479	2,625
9	4,338	3,583	3,858	2,850
10	4,705	3,621	4,150	3,021
11	4,929	3,996	4,248	3,163
12	5,388	4,538	4,646	3,579
S.G.R.	0.3472 ^a	0.3266 ^b	0.3294 ^{bc}	0.2981 ^c

유사한 성장을 보였으나, 비료 1.25배/5+NaNO₃ (150 mg/ℓ) 에서 세포 밀도가 $4,646 \times 10^4$ cells/ml로 더 높게 나타났다.

농업용 비료 배지의 보다 정확한 희석 비율을 알아 보기 위하여 농업용 비료 1.25배를 2.5배, 5.0배와 7.5배로 다시 희석하여 미량 원소 구리 3.0배 (0.0588 mg/ℓ)를 첨가하여 다시 배양한 결과(Fig. 15), 성장률이 0.3985~0.4551로 비료 1.25 배만을 첨가한 실험구가 가장 낮은 성장률을 보였다. 2.5 배, 5 배 및 7.5 배로 희석한 농업용 비료 배지에 구리를 첨가하였을 경우, 첨가하지 않았을 때 보다 모두 더 높은 성장률을 보였다. 비료 1.25 배/5+NaNO₃ (150 mg/ℓ)+CuSO₄ (0.0588 mg/ℓ) 실험구에서 최고 밀도 $3,600 \times 10^4$ cells/ml 로 f/2 배지의 $3,742 \times 10^4$ cells/ml의 약 96%에 해당하는 높은 세포밀도를 나타내었으며, 두 실험구 사이의 성장률은 유의성의 차이는 없었다.

2-9. 비료 배지로 배양시 중간시비에 따른 *Chlorella*의 성장

농업용 비료 배지의 중간 시비 효과를 알아보기 위하여 위의 실험 결과에서 f/2 배지와 유사한 성장 결과를 보인 비료 1.25 배/5+NaNO₃ (150 mg/ℓ) +CuSO₄ (0.0588 mg/ℓ) 실험구에, 동일한 배지를 25~100%로 첨가하여 8일 동안 배양한 *Chlorella*를 계속하여 13일을 다시 배양한 결과(Fig. 16), 배지의 시비 양이 높을수록 성장률이 낮아지는 경향을 나타내었다. 100%와 75%로 중간 시비를 하였을 때, 성장률이 각각 0.0478과 0.0915로 배지를 다시 첨가하지 않은 경우(0.0970)보다 오히려 낮은 성장률을 나타내어, 높은 농도로 중간 시비를 하는 것은 *Chlorella*의 성장을 저해 할 수 있는 것으로 판단된다. 반면, f/2 배지는 9일째, 총 배양 기간 17일째 최고 밀도 $12,316 \times 10^4$ cells/ml를 나타내었으나, 그 이후부터 세포수가 감소하였다. 그러나, 비료 배지 25%와 50%로 중간 시비를 하였을 경우, 시비 후 13일 째 최고 밀도가 각각 $13,300 \times 10^4$

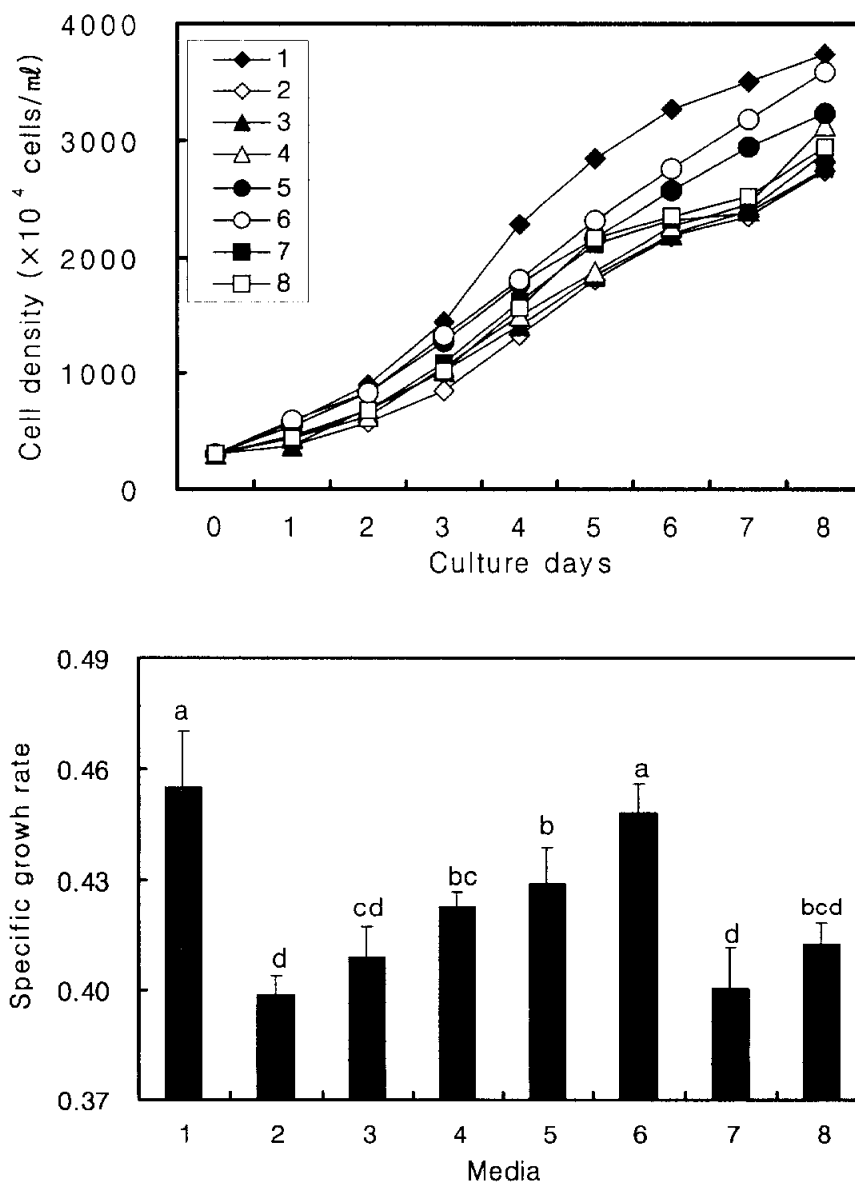


Fig. 15. Cell density (up) and specific growth rate (bottom) of *Chlorella ellipsoidea* cultured in diluted fertilizer media added with NaNO_3 (150 mg/ ℓ) and CuSO_4 (0.0588 mg/ ℓ) (1: f/2, 2: fertilizer 1.25 times (compound 0.208 g/ ℓ , urea 0.172 g/ ℓ), 3: fertilizer 1.25 times/2.5+ NaNO_3 , 4: 3+ CuSO_4 3.0 times, 5: fertilizer 1.25 times/5+ NaNO_3 , 6: 5+ CuSO_4 3.0 times, 7: fertilizer 1.25 times/7.5+ NaNO_3 , 8: 7+ CuSO_4 3.0 times).

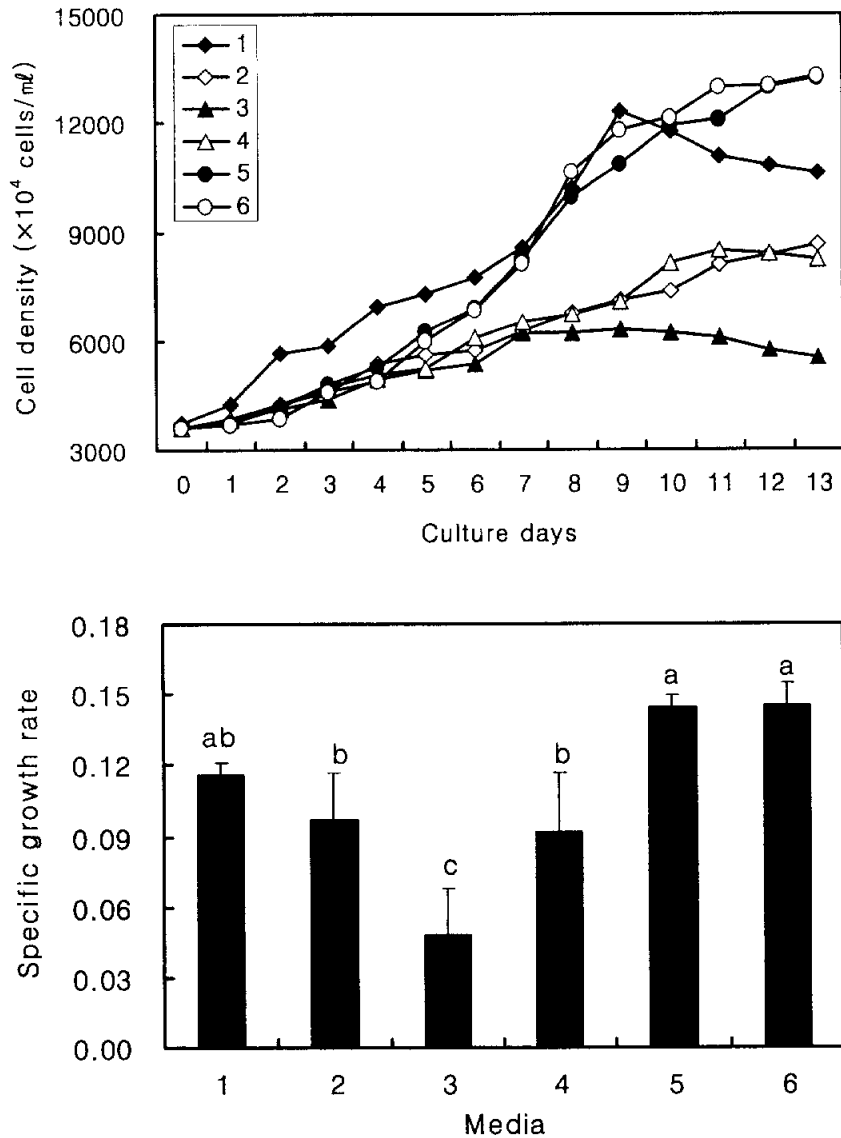


Fig. 16. Cell density (up) and specific growth rate (bottom) of *Chlorella ellipsoidea* cultured with additional supplement of fertilizer media in 4.5 ml cell chamber (1: f/2 media, 2: fertilizer 1.25 times/5 (compound 0.0417 g/l, urea 0.0344 g/l)/5+CuSO₄ 3.0 times (0.0588 mg/l)+NaNO₃ (150 mg/l), 3: 2+additional supplement (100%), 4: 2+additional supplement (75%), 5: 2+additional supplement (50%), 6: 2+additional supplement (25%).

cells/ml와 $13,233 \times 10^4$ cells/ml로 높게 나타났으며, 9일까지 배양한 f/2배지에 서의 *Chlorella*의 세포 밀도($12,316 \times 10^4$ cells/ml)와 비교하여 더 높은 성장 밀도를 보였고, 성장률도 NaNO_3 와 CuSO_4 로 비료 배지에 중간 시비를 하지 않은 실험구에 비해 유의적으로 높았다.

2-10. NaNO_3 첨가 농도에 따른 *Chlorella*의 성장

회석된 농업용 비료 배지에 NaNO_3 를 150~300 mg/l의 농도를 첨가한 결과(Fig. 17), 배양 후 10일 째, 성장률이 0.3525~0.3976으로, 질산염을 300 mg/l을 첨가한 실험구에서 유의적으로 가장 낮은 성장률을 나타내었다. 배양 후 7일째까지는 질산염 150과 200 mg/l 첨가 실험구에서 세포 밀도가 각각 $3,137 \times 10^4$ cells/ml와 $3,195 \times 10^4$ cells/ml로 유의적으로 높은 성장률을 나타내었으나, 10일째에는 200과 250 mg/l를 첨가하였을 때, 성장률이 각각 0.3825와 0.3807로서 더 높게 나타났고, f/2 배지의 성장률(0.5006)과는 큰 차이는 없었다.

2-11. 공업용 시약과 시약용 시약 첨가에 따른 *Chlorella*의 성장

앞에서 실험한 비료(비료 1.25배/5 + NaNO_3 200 mg/l + CuSO_4 0.0588 mg/l) 배지를 공업용과 특급 시약용 NaNO_3 와 CuSO_4 로 제조하여 *Chlorella ellipsoidea* (C-20)을 7일간 배양한 결과(Fig. 18), f/2 배지에서는 배양 8일째의 세포밀도 $3,738 \times 10^4$ cells/ml, 성장률은 0.4549, 시약용 비료배지와 공업용 비료 배지의 8일째 세포밀도 $3,313 \times 10^4$ cells/ml와 $3,408 \times 10^4$ cells/ml, 성장률은 0.4331과 0.4383으로 f/2배지와 비교하여 약간 높았으나, 유의적인 차이는 보이지 않았다($p < 0.05$).

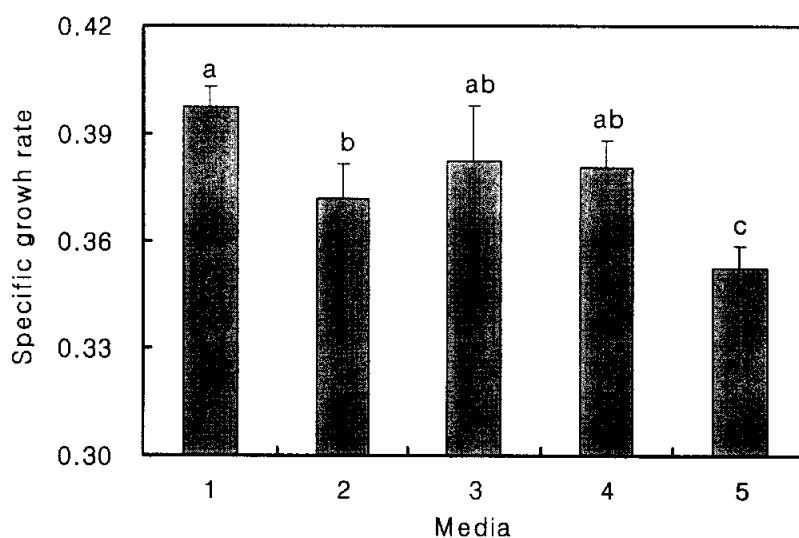
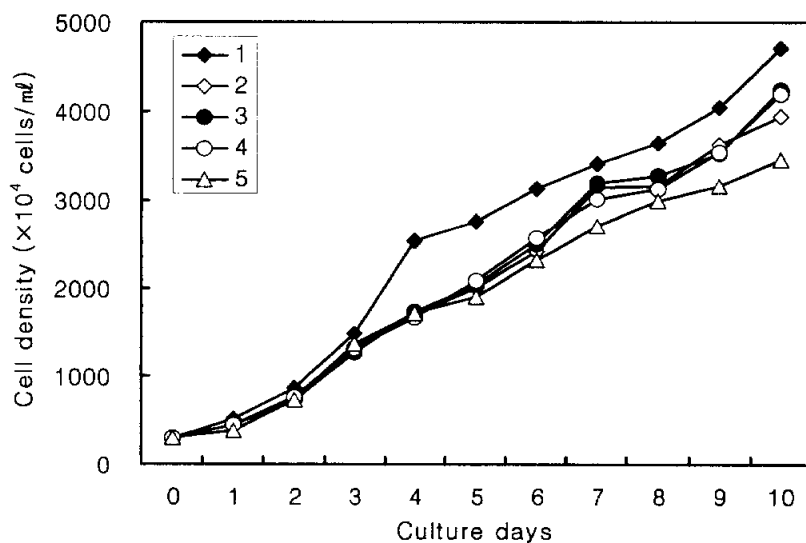


Fig. 17. Growth of *Chlorella ellipsoidea* cultured with different concentration of NaNO_3 in fertilizer media (compound 0.208 g/l, urea 0.172 g/l) added with CuSO_4 (0.0588 mg/l) (1: f/2 media, 2: fertilizer 1.25 times/5+ CuSO_4 3.0 times+ NaNO_3 150 mg/l, 3: fertilizer 1.25 times/5+ CuSO_4 3.0 times+ NaNO_3 200 mg/l, 4: fertilizer 1.25 times/5+ CuSO_4 3.0 times+ NaNO_3 250 mg/l, 5: fertilizer 1.25 times/5+ CuSO_4 3.0 times+ NaNO_3 300 mg/l).

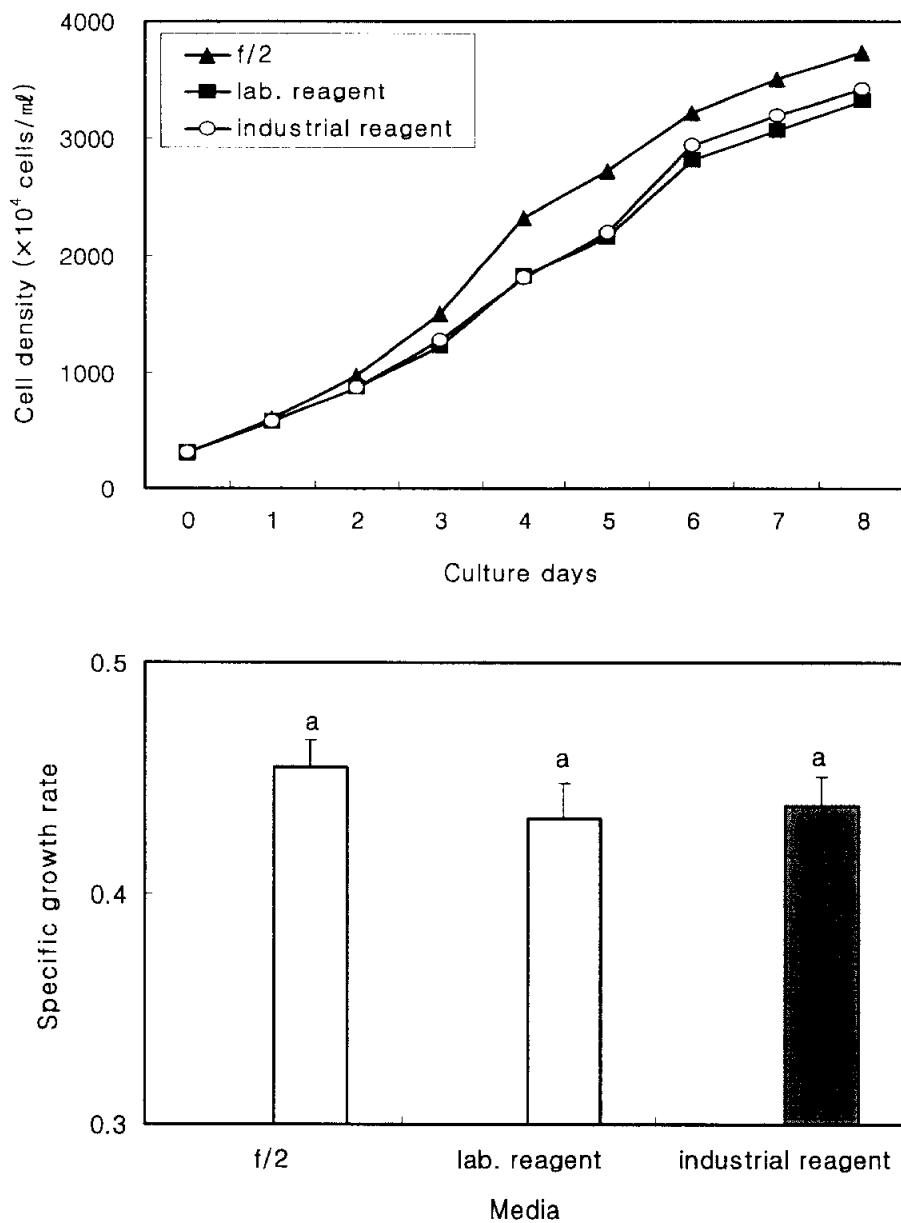


Fig. 18. Cell density (up) and specific growth rate (bottom) of *Chlorella ellipsoidea* cultured with laboratory and industrial reagents (NaNO_3 and CuSO_4) in fertilizer media.

3. 3종류 *Chlorella*와 *Nannochloris*의 대량 배양을 위한 공업용 시약 배지의 효과

3-1. 염분과 온도에 따른 3종류의 *Chlorella*와 *Nannochloris*의 성장

공업용 시약 비료 배지(복합 비료 0.0417 g/ℓ, 요소 비료 0.172 g/ℓ, NaNO₃ 200 mg/ℓ, CuSO₄ 0.0588 mg/ℓ)로 3종 *Chlorella* (C-12, EC-1)와 1종 *Nannochloris* (C-87)을 15‰와 30‰에서 배양하였다.

저수온인 10℃에서의 C-12와 EC-1의 성장을 보면, EC-1은 15‰에서 12일째 $2,333 \times 10^4$ cells/ml로 최고 세포 밀도를 나타내었으나, 그 이후 점차 감소하는 경향을 나타내었다. C-12는 모두 배양 초기에는 EC-1보다 완만한 성장 형태를 나타내지만, 14일째는 15‰와 30‰에서 $2,163 \times 10^4$ cells/ml와 $2,191 \times 10^4$ cells/ml로 EC-1과 비슷한 수준이었다. 15‰와 30‰에서의 2종(C-12, EC-1)의 성장률(0.3401-0.3462)은 유의적 차이를 보이지 않았다(Fig. 19).

20℃에서는 C-87과 C-12 모두 15‰에서 각각 세포 밀도가 $6,216 \times 10^4$ cells/ml와 $3,850 \times 10^4$ cells/ml로 30‰의 $5,267 \times 10^4$ cells/ml와 $3,446 \times 10^4$ cells/ml에 비하여 더 높았으나, C-12는 15‰와 30‰에서 큰 차이는 보이지 않았다. 성장률은 C-87이 15‰와 30‰에서 각각 0.4931과 0.4719로 C-12의 0.4267과 0.4107에 비하여 모두 유의적으로 높았다(Fig. 20).

여름철 고온기인 30℃에서 C-12와 C-87을 배양한 결과(Fig. 21), C-87은 염분 15‰와 30‰에서 세포 밀도가 각각 $16,333 \times 10^4$ cells/ml와 $8,800 \times 10^4$ cells/ml로서 C-12에 비하여 월등히 성장이 높았으며, 15‰에서 성장률 0.6352로 30‰의 0.5460에 비하여 더 높은 성장률을 보였다. 한편, C-12는 30‰에서 세포 밀도가 $4,016 \times 10^4$ cells/ml, 성장률 0.4328로서 15‰의 $2,316 \times 10^4$ cells/ml, 성장률 0.3534에 비하여 더 높았으며, 20℃의 성장에 비하여 특히, 15‰에

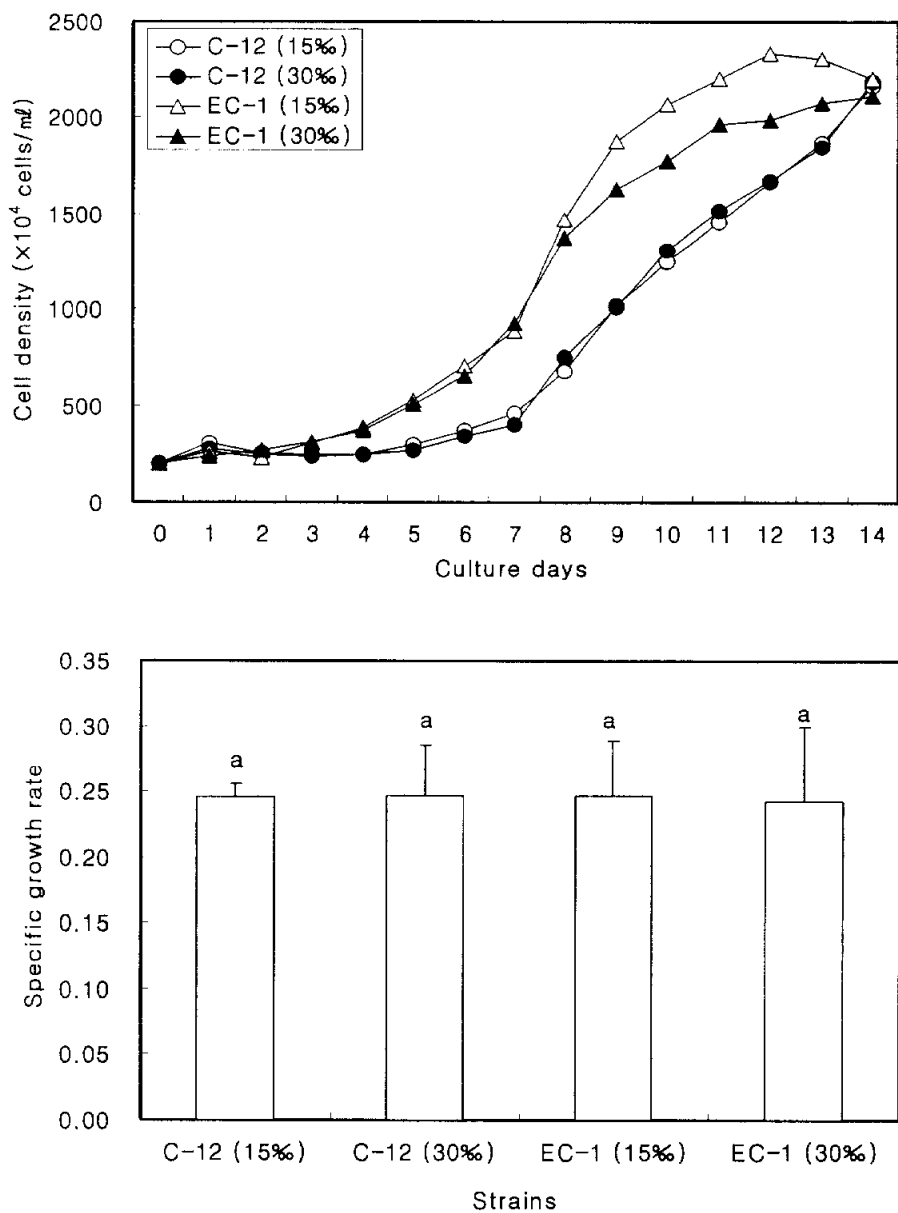


Fig. 19. Cell density (up) and specific growth rate (bottom) of two strains of *Chlorella* (C-12, EC-1) at 10°C with 5,000 lux.

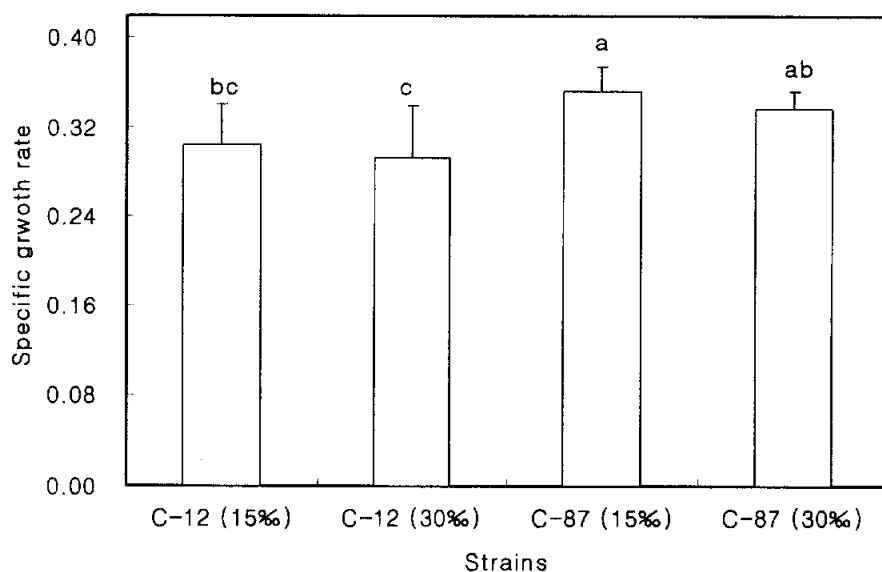
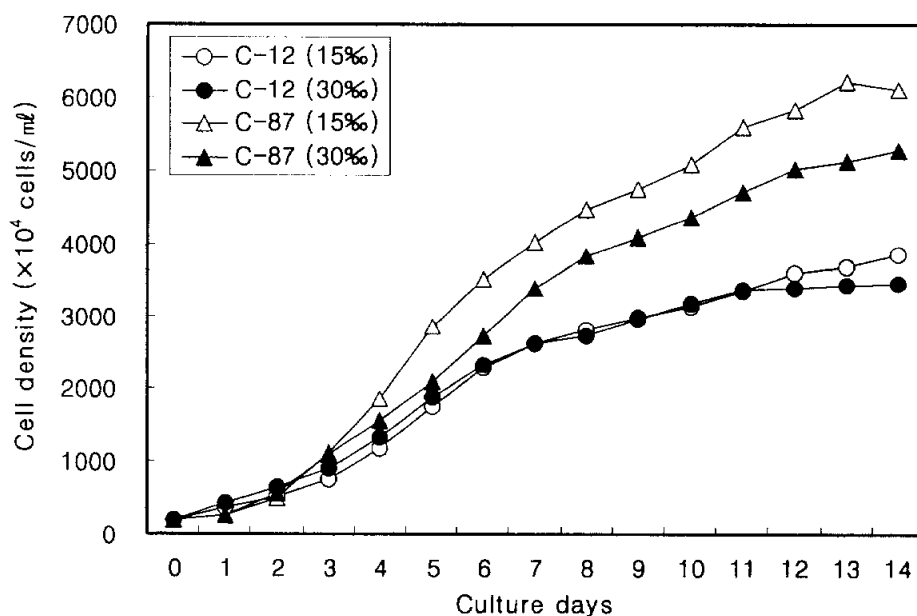


Fig. 20. Cell density (up) and specific growth rate (bottom) of *Chlorella* (C-12) and *Nannochloris* (C-87) at 20°C with 5,000 lux.

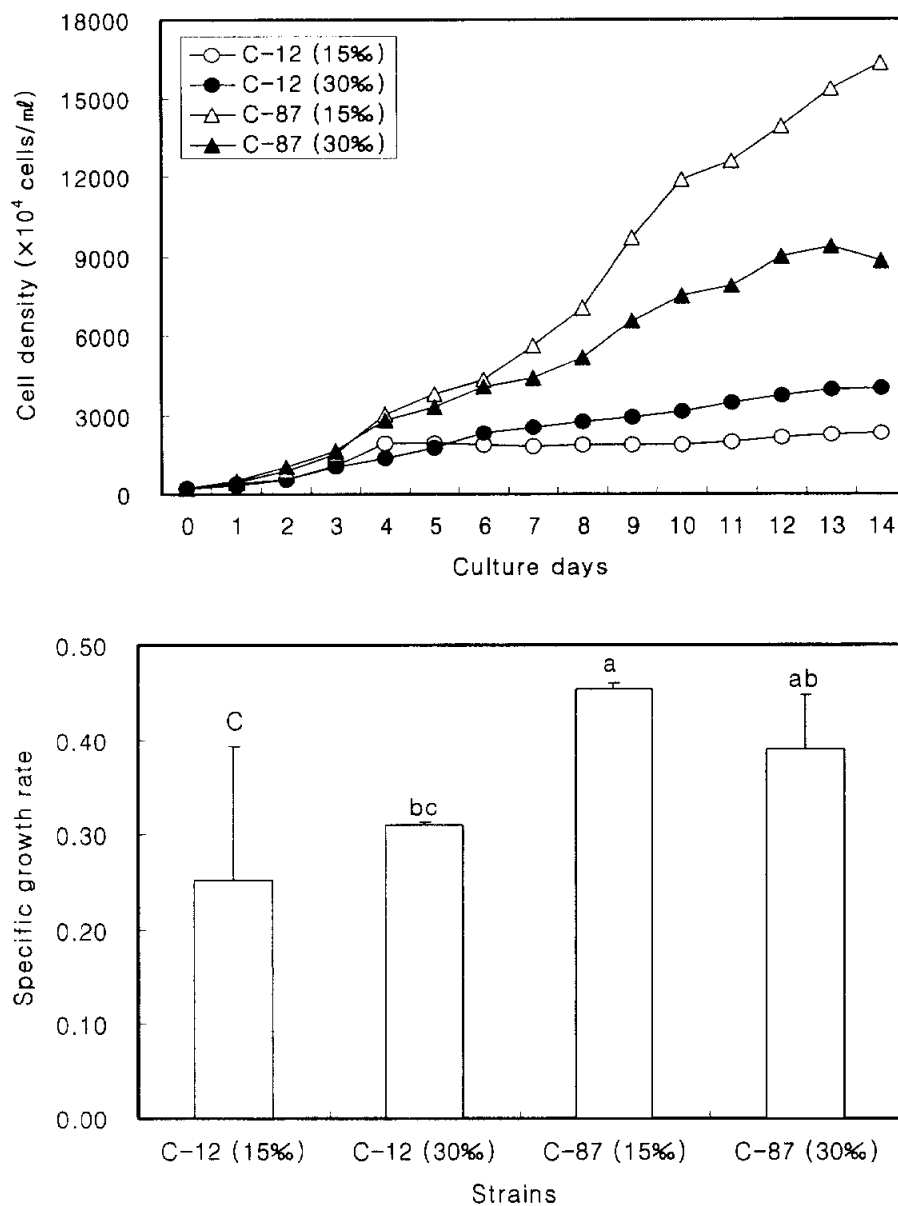


Fig. 21. Cell density (up) and specific growth rate (bottom) of *Chlorella* (C-12) and *Nannochloris* (C-87) at 30°C with 5,000 lux.

서는 낮은 성장률을 나타내었다.

C-12 *Chlorella*를 f/2 배지, 10℃에서 배양하였을 때, 매우 낮은 성장률 (0.2524)을 나타내었으나, 공업용 시약 비료 배지, 10℃에서는 EC-1과 거의 유사한 성장률을 나타내었다. 이러한 공업용 시약 비료 배지와 f/2 배지에서의 C-12의 성장을 비교하기 위하여, 다시 10℃에서 f/2배지와 공업용 시약 비료 배지로 C-12와 EC-1을 배양한 결과는 Fig. 22와 같다. 공업용 시약 비료배지에서 C-12는 배양 14일째 세포 밀도 $3,596 \times 10^4$ cells/ml로 EC-1의 $4,475 \times 10^4$ cells/ml에 비하여 비교적 낮은 세포 밀도를 나타내었다. f/2 배지에서는 C-12는 세포 밀도 587×10^4 cells/ml, 성장률 0.1110으로 EC-1의 세포 밀도 $5,237 \times 10^4$ cells/ml, 성장률 0.3365보다 매우 낮은 성장률을 나타내어, 위의 실험에서의 결과와 유사한 성장률을 나타내었다.

3-2. 15‰과 30‰에서 3종류 *Chlorella*와 *Nannochloris*의 영양 성분 비교

3종류의 *Chlorella*와 *Nannochloris*를 공업용 시약 비료 배지(복합 비료 0.0417 g/l, 요소 비료 0.0344 g/l, NaNO_3 200 mg/l, CuSO_4 0.0588 mg/l)로 배양하여 일반 성분을 분석한 결과(Table 20), EC-1에서는 10℃에서 배양하였을 경우 30‰에서 조단백과 조지방 성분이 각각 52.4%와 7.8%로 15‰의 50.7%와 6.6%에 비하여 다소 높았다. C-12에서는 최적 배양 온도인 20℃에서 배양하였을 때, 30‰의 조단백(29.7%)과 조지방(10.2%) 함량에 비하여 15‰에서 36.3%와 17.2%로 매우 높은 함량을 나타내었다. 또한, 30℃에서 배양한 C-87의 경우는 조단백에서는 15‰에서 52.7%로 30‰의 45.2%에 비하여 비교적 높았으나, 조지방은 30‰에서 6.1%로 15‰의 5.4% 보다 더 높게 나타났다.

염분에 따른 지방산 성분(Table 21)에서 n-3 HUFA의 함량은 15‰에서

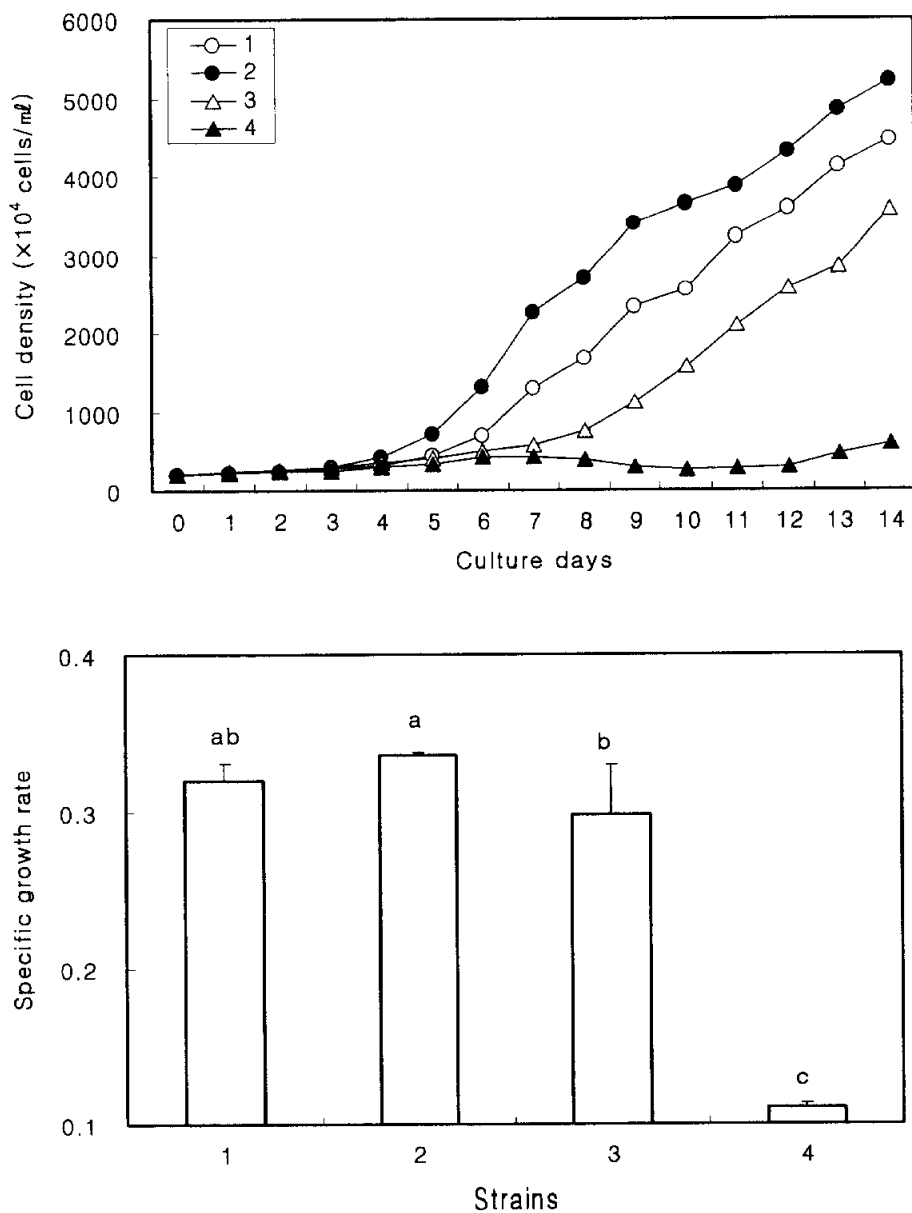


Fig. 22. Cell density (up) and specific growth rate (bottom) of two strains of *Chlorella* (C-12, EC-1) with different media (f/2, fertilizer) at 10°C and 5,000 lux (1: EC-1, industrial fertilizer media, 2: EC-1, f/2, 3: C-12, industrial fertilizer media, 4: C-12, f/2).

Table 20. Proximate chemical composition of three species of *Chlorella* and *Nannochloris* at 15‰ and 30‰

(unit : % in dry matter)

KMCC NO.	Species	Culture temp. (°C)	15‰		30‰	
			Protein	Lipid	Protein	Lipid
EC-1	<i>Chlorella vulgaris</i>	10	50.7	6.6	52.4	7.8
C-12	<i>Chlorella vulgaris</i>	20	36.3	17.2	29.7	10.2
C-87	<i>Nannochloris</i> sp.	30	52.7	5.4	45.2	6.1

EC-1, C-12와 C-87에서 각각 32.36%, 35.29%와 26.63%로서 3 종류 모두에서 30‰에 비하여 비교적 높게 나타났다. EPA (20:5n-3)는 C-12와 C-87에서는 15‰에서 각각 25.08%와 1.80%로 30‰에서보다 높았으나, EC-1에서는 30‰에서 2.2%로서 15‰의 1.7%에 비하여 높은 함량을 나타내었다. 특히, C-12는 15‰과 30‰에서 EPA의 함량이 25.08%와 20.62%로서 다른 2종의 1.4~2.2%에 비하여 매우 높게 나타났다. 반면, DHA (22:6n-3)는 C-87의 15‰과 30‰에서 각각 1.2%와 0.7%로 높았으며, C-12와 EC-1에서는 0.3~0.6%로 염분에 따른 큰 차이는 보이지 않았다.

총 아미노산 성분(Table 22)은 C-87에서 15‰과 30‰에서 각각 72.39%와 70.27%로 다른 2종류에 비하여 비교적 높게 나타났으며, C-12와 C-87에서는 30‰보다 15‰에서 다소 높았고, EC-1에서는 30‰에서 67.95%로 15‰의 55.92%에 비하여 매우 높게 나타났다. 비필수 아미노산은 glutamine과 aspartate 함량이 비교적 높게 나타났고, aspartate는 염분에 따른 큰 차이는

Table 21. Fatty acid composition of three species of *Chlorella* and
Nannochloris at 15‰ and 30‰

Fatty acid	(% fatty acid)					
	EC-1		C-12		C-87	
	15‰	30‰	15‰	30‰	15‰	30‰
C4:0	0.17	0.49	0.26	0.17	0.04	0.07
C14:0	0.36	0.38	1.59	1.34	0.08	0.51
C14:1	0.39	0.47	0.46	0.50	1.00	0.88
C15:0	-	-	0.16	0.15	0.03	0.15
C16:0	9.85	10.42	9.13	10.82	4.24	7.98
C16:1	1.65	1.89	10.32	10.60	2.29	2.52
C17:0	0.17	0.14	0.26	0.13	1.09	0.06
C17:1	5.58	5.89	0.43	0.18	2.59	3.41
C18:0	0.66	0.85	0.85	0.22	0.51	0.73
C18:1n9	3.37	2.43	4.08	6.22	2.10	2.08
C18:2n6	8.76	7.75	3.83	3.92	5.93	10.84
C18:3n6	0.52	-	2.06	3.23	-	-
C18:3n3	25.83	25.87	4.89	5.40	19.05	20.78
C20:0	2.64	4.65	6.89	3.06	11.64	-
C20:1	17.59	18.77	9.71	16.55	21.37	19.86
C20:2	6.76	6.03	4.07	4.91	2.66	7.61
C20:3n6	1.55	4.03	2.85	2.92	6.92	4.14
C21:0	-	-	1.24	-	-	4.82
C20:3n3	4.21	3.37	4.96	5.75	4.57	2.96
C20:4n6	1.23	-	0.57	-	0.37	0.37
C20:5n3	1.70	2.20	25.08	20.62	1.80	1.42
C22:1n9	1.43	1.04	1.43	0.97	2.26	1.68
C22:2	0.19	-	0.20	-	0.22	0.19
C23:0	0.85	0.36	0.86	0.24	1.26	1.00
C24:0	2.39	1.38	2.15	0.67	3.73	3.01
C24:1	1.52	1.12	1.30	0.94	3.03	2.20
C22:6n3	0.62	0.47	0.37	0.50	1.22	0.73
saturated	17.10	17.81	21.31	16.57	22.11	12.77
monounsaturated	27.27	28.54	22.71	29.29	30.73	29.09
HUFA	51.37	49.72	48.88	47.26	42.74	49.05
n3 HUFA	32.36	31.91	35.29	32.27	26.63	25.89
n6 HUFA	12.06	11.78	9.32	10.08	13.23	15.36
n3/n6	2.80	2.91	3.89	3.22	2.90	1.70

EC-1: *Chlorella vulgaris*, C-12: *C. vulgaris*, C-87: *Nannochloris* sp.

Table 22. Amino acid composition of three species of *Chlorella* and *Nannochloris* at 15‰ and 30‰

Amino acid	(% in sample)					
	EC-1		C-12		C-87	
	15‰	30‰	15‰	30‰	15‰	30‰
Asp.	5.34	5.43	6.36	5.47	7.93	6.83
Phr.	2.86	2.76	3.72	3.23	3.89	3.38
Ser.	2.75	2.79	3.41	2.97	3.68	3.18
Glu.	9.31	12.26	8.73	9.38	10.37	9.98
Gly.	2.84	2.87	4.14	3.50	4.32	3.70
Ala.	4.60	5.29	6.07	4.62	6.38	6.58
Cys.	0.00	0.49	0.00	0.00	0.00	7.33
Val.	2.93	2.86	4.01	3.41	4.03	0.00
Met.	0.12	0.81	0.54	0.16	0.16	1.00
Ile.	1.84	1.97	2.57	2.13	2.65	2.27
Leu.	4.20	4.33	6.29	5.18	6.60	5.74
Tyr.	1.36	1.64	2.26	1.47	2.27	2.18
Phe.	2.48	2.51	3.28	2.69	4.17	3.65
Lys.	3.67	3.73	5.10	4.19	4.84	4.02
His.	1.31	1.11	1.48	1.34	1.75	1.36
Arg.	6.36	9.19	4.67	4.01	5.58	4.06
Pro.	3.09	6.95	3.21	7.22	2.68	4.15
NH3	0.86	0.96	1.15	1.01	1.09	0.86
Total	55.92	67.95	66.99	61.98	72.39	70.27

EC-1: *Chlorella vulgaris*, C-12: *C. vulgaris*, C-87: *Nannochloris* sp.

보이지 않았다. EC-1의 경우 glutamine은 30%이 15%에 비하여 비교적 높은 함량을 나타내고 있다. 필수 아미노산의 경우 염분에 따른 각 성분의 함량은 큰 차이를 보이지 않았지만, cysteine의 경우는 EC-1와 C-87에서 각각 0.49%와 7.33%로 30%에서만 나타났다.

3.3. 넙치 자어에 대한 먹이 효율

10℃에서 배양한 EC-1와 C-12 *Chlorella*의 먹이 효율에 대한 넙치 자어의 성장과 생존율은 Table 23과 같다. C-12 *Chlorella*를 먹이 공급하여 배양한 L-type rotifer를 공급하였을 경우 실험 종료시 넙치 자어의 전장은 3.77 ± 0.3668 mm, EC-1로 배양한 rotifer를 공급한 자어의 3.64 ± 0.3068 mm보다 약간 높게 나타났으나, 유의적으로 차이는 없었다($p < 0.05$). 생존율에서도 C-12로 배양한 rotifer를 공급한 자어에서 32.37%로 EC-1의 29.12%보다 높게 나타났으나, 유의적인 차이는 보이지 않았다.

Table 23. Comparison of growth of larval flounder, *Paralichthys olivaceus*, fed on rotifer cultured with each strain of *Chlorella*

<i>Chlorella</i> strains	Total length (mm)			Survival (%)	Daily growth gain (mm)
	0 days	4 days	6days		
EC-1	3.01 ± 0.1309	3.35 ± 0.1327	3.64 ± 0.3068^a	29.12 ^a	0.11 ^a
C-12		3.43 ± 0.2615	3.77 ± 0.3668^a	32.37 ^a	0.13 ^a

고 찰

1. Rotifer 대량 배양을 위한 계절별 최적 미세조류 개발

Rotifer, *Brachionus plicatilis*는 그 크기와 배양의 용이함 때문에 해산 어류의 초기 유생의 먹이 생물로서 널리 이용되고 있다(Liao, 1975; Watanabe et al., 1983; Juario et al., 1984).

먹이 생물로서 미세조류는 rotifer의 성장에 큰 영향을 미치는데(Hirayama et al., 1979), 해수산 *Chlorella* 외에 *Tetraselmis* sp., *Nannochloris oculata*, *Chlamydomonas* sp. 및 *Dunaliella* sp. 등을 대상으로 한 여러 연구가 보고된 바 있다(Scott and Baynes, 1978; Hirayama et al., 1979; Witt et al., 1981; en-Amotz and Fishler, 1982; Okauchi and Fukusho, 1984).

현재 rotifer 배양을 위해 이용되는 미세조류 중에서는 배양이 가장 용이하고, 고밀도 배양이 가능할 뿐 아니라 염분이나 수온 등의 환경 변화에 대한 적응이 빠른 *Chlorella* sp.와 *Nannochloris oculata*가 가장 많이 이용되고 있다(Watanabe et al., 1978, 1983; Lubenz and Fisrlen, 1980; ames et al., 1986, 1987; James and Abu-Rezeq, 1988).

본 연구에서는 국내외의 여러 지역에서 채집, 분리되어 한국해양미세조류은행에서 보존하고 있는 130여종의 *Chlorella*와 *Nannochloris* 중 채집해역, 크기, 배양 상태를 고려하여, 해수산 *Chlorella* 5종, 해수산 *Nannochloris* 5종, 기수산과 담수산 *Chlorella* 각각 3종, 총 16종을 선택하여 rotifer의 대량 배양을 위한 계절별 최적 미세조류를 파악하기 위하여 염분과 수온에 따른 성장을 조

사하였다. 이 결과에서 영양 성분이 비교적 높은 해수산 *Chlorella* 5종 중에서는 성장률이 높았던 C-12와 C-20를, 해수산 *Nannochloris*에서는 C-31, C-87 및 C-189를, 기수산 *Chlorella*에서는 EC-1, 모두 6종을 다시 선택하였다. 담수산 *Chlorella*는 0%에서 비교적 성장률이 높은 편이었지만, 기수산이나 해수산 *Chlorella* 종류에 비하여 유의적으로 낮은 성장률을 나타내었다. 또한 담수산 *Chlorella*의 경우 15%에서는 *Chlorella* 세포가 배양 과정 중 세포끼리 뭉치는 경향을 나타내었고, 일반적으로 종묘 생산시 rotifer 대량 배양시 적정 염분은 15% 정도이므로, 0%에서만 성장이 가능한 담수산 *Chlorella*는 본 실험에서 부적합한 것으로 판단되어 제외하였다.

일반적으로 해수산 미세조류는 광염성으로 염분 내성이 있다(McLachlan, 1961). 본 연구에서 배양한 해수산 *Chlorella*나 *Nannochloris*의 겨우는 15%과 30%의 다른 염분 조건하에서 세포 밀도 증가 속도가 유의적으로 차이가 있었고, 성장률은 비교적 높은 편이었다. 기수산의 경우에도 0%에서 배양시 15%과 30%에 비하여 비교적 낮은 성장률을 보였으나, 성장이 저하되거나, 세포 밀도가 감소하는 경우는 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 볼때 해수산이나 기수산 *Chlorella*는 염분의 변화에는 잘 적응하는 것을 알 수 있으며, 담수산의 경우에는 배양시 염분 변화에 비교적 약한 것으로 판단된다.

해산 어류 종묘 생산시 초기 동물성 먹이 생물인 rotifer 대량 배양의 가장 큰 문제점은 겨울철이나 여름철에 먹이 생물인 *Chlorella*의 옥외 대량 배양이 어렵다는 것이다. 겨울철 저온기에는 세포의 성장이 매우 저조하고, 여름철 고온기에는 갑작스러운 세포의 폐사가 일어나기 때문이다. 따라서 본 연구에서는 고온기와 저온기에 잘 성장하는 strain을 개발하고자 하였다. 본 실험에서 선택된 6종의 *Chlorella*를 32℃, 30℃ 및 10℃에서 각각 배양한 결과, 고온기에 해당하는 32℃와 30℃에서는, C-87 *Nannochloris* sp. (특량만)과

C-189 *Nannochloris* sp. (부안)의 성장률이 가장 높게 나타났다. 특히, C-87은 32℃에서 10일째 $6,475 \times 10^4$ cells/ml로서 매우 높은 세포 밀도를 보였다.

한편, C-20 *C. ellipsoidea* (Japan)는 실험 시작 후 32℃에서 5일까지는 세포수가 증가하였으나, 그 이후 부터는 세포수가 감소하였고, 30℃에서 7일째 부터 세포수가 감소하였다. 32℃와 30℃에서 성장률이 각각 0.1521과 0.3483로 매우 낮은 성장률을 나타냄으로써 여름철 고온기에는 대량 배양에 부적합한 것을 알 수 있었다. 반면, C-12 *C. vulgaris* (낙동)은 32℃에서 C-20과 마찬가지로 낮은 성장률을 보였지만, 30℃에서는 C-20에 비하여 매우 높은 성장률을 나타내어, C-20에 비해 비교적 고온기에 잘 적응하는 것으로 나타났다.

이에 반해 저온인 10℃에서는 기수산 EC-1 *C. vulgaris* (화진포)가 다른 종에 비하여 성장률이 0.5052로서 높게 나타나, 수온이 낮아지는 겨울철의 대량 배양에 매우 적합한 종으로 판단된다.

Hirata et al. (1981)은 해수산 *Chlorella saccharophila*는 염분 0~60‰, 온도 14~32℃의 조건에서 배양하였을 경우 염분 15~35‰ 이외에는 성장률이 낮았으며, 17~23℃에서 성장률이 높은 것으로 보고하였다. 또, 해수산 *Chlorella*로 알려졌었던 *Nannochloropsis* sp.는 20℃에서 가장 최적의 성장률을 나타내었다고 보고하였다(James et al., 1989). 이와 같이 종에 따라서 적정 성장 온도가 다를수 있으나, 본 연구에 이용된 해수산 *Chlorella* C-12와 C-20의 온도에 따른 성장 형태와 일반적으로 유사한 결과를 나타내었다. 이상의 결과에서 본 연구에서 32℃와 30℃에서 성장률이 가장 높았던 C-87 *Nannochloris* sp. (득량만)은 여름철 고온기에 rotifer의 먹이 생물로 대량 배양하기에 적합한 먹이 생물로 판단된다.

또한, EC-1의 성장률은 32℃와 30℃에서 각각 0.4849와 0.4329로, 해수산 C-20의 0.1521과 0.3483에 비해서는 비교적 높은 성장률을 보임으로써, 고온과

저온에서도 비교적 안정적인 성장을 나타내는 것으로 보여진다.

Chlorella 속 중에서 *C. stigmatophora*, *C. pyrenoidosa*, *C. vulgaris*, *C. zofingiensis* 등 여러 종을 rotifer 배양에 이용한 보고가 있다(Lubzens and Fisrlén, 1980; Pourriot, 1980; King and Snell, 1980; Rico-Martinez and Dodson, 1992). 특히, 담수산 *Chlorella*인 *C. vulgaris*는 해수산 rotifer 배양 외에 *Lepadella patella*의 배양이나(Nandini and Sarma, 2001), 담수산 rotifer, *B. calyciflorus* (Rico-Martinez and Dodson, 1992)의 배양시 먹이 생물로 이용되기도 하였다. 이와 같이 *Chlorella* 종류는 배양이 비교적 쉽기 때문에 rotifer 먹이 생물로 가장 많이 이용되지만, *Chlorella* 종류간의 성장이나 먹이 효율 등에 대해서는 구체적인 비교가 충분하지 않다. 본 연구에서는 국내 여러 지역에서 채집된 여러 종류의 *Chlorella*와 *Nannochloris* 종류의 환경 변화에 따른 성장을 분석함으로써 이들 종간의 특성을 비교할 수 있었다.

미세조류의 화학성분은 이를 섭취한 생물의 성장과 생존율에 영향을 준다. Thompson et al. (1990)은 미세조류의 지방산 함량은 조도에 따라 달라진다고 보고하였고, Harrison et al. (1990)은 영양염과 조도의 제한에 따라 미세조류의 화학적 영양 성분의 조성이 변화한다고 보고하였다. 미세조류의 지방산 함량 중 HUFA, 특히 EPA와 DHA는 조개류 유생 (Langdon and Walcock, 1981; Chu and Webb, 1984; Enright et al., 1986)과 많은 다른 양식 생물(Brown et al., 1989)의 높은 생존율과 관련이 있다.

본 연구에서 6종의 *Chlorella*와 *Nannochloris*의 영양성분을 조사한 결과 지방산 성분 중 16:0과 16:1의 함량이 가장 높았는데, *Nannochloropsis oculata*의 주요 지방산이 16:0과 16:1 였다는 Hodgson et al. (1991)과 Volkman et al. (1993)의 보고와 유사한 결과를 보였다.

Whyte and Nagata (1990)는 *C. saccharophila*의 주요 지방산은 16:0,

16:1n7과 18:1n9이라 보고하였는데, 본 연구에서도 해수산 *Chlorella* C-12가 같은 결과를 보여 동일한 屬에 속하는 종에서는 유사한 결과가 나타나는 것으로 사료된다. 그러나, 기수산인 EC-1에서는 주요 지방산외에 17:0과 20:0의 함량이 높게 나타나 해수산 *Chlorella*와는 다른 결과를 보였다.

6종 *Chlorella*와 *Nannochloris*의 지방산 중 DHA는 C-12와 C-87에 각각 0.29%와 0.02%였으며, EPA의 경우 해수산 *Nannochloris* 중에서 C-189가 6.28%로 높았으나, 다른 2 종은 0.3~3.74%였다. Volkman et al. (1993)은 20℃에 배양한 *Nannochloropsis* 종류에서 DHA가 전혀 검출되지 않았다고 보고하였고, EPA는 16.1~28.2%로 본 연구의 결과보다는 매우 높은 함량을 나타내었다. James et al. (1989)은 *Nannochloropsis*와 *Chlorella*를 15~35℃의 온도에서 배양하였을 때, *Nannochloropsis*는 15℃와 25℃에서 0.2%와 0.4%의 EPA를 보고하였다. 이는 25℃에서 배양한 본 연구의 *Nannochloris*와는 차이가 있었으나, 20℃와 25℃에서 배양한 *Chlorella*의 EPA가 각각 0.15%와 0.30%로 나타났던 본 연구의 결과와 유사하였다.

또한, 6종의 미세조류를 먹이로 공급하여 배양한 rotifer의 주요 지방산이 16:0, 16:1n7과 18:1n9로서 해수산 *Chlorella*의 지방산 함량과 유사한 결과를 보였다. EPA 함량이 가장 높았던 C-12를 먹이로 공급한 실험구에서도 rotifer의 생존율이 높았으며, EPA 함량도 높게 나타났으며, rotifer의 영양 성분은 먹이로 공급된 미세조류에 영향을 받고 있었다(Scott and Middleton, 1979; Ben-Amotz et al., 1987; Frolov et al., 1991).

2. *Chlorella*의 대량 배양을 위한 최적 경제 배지 개발

해산어 양식에 있어서 유생의 먹이생물인 rotifer 대량 배양을 위한 미세

조류의 대량 배양에 이용되는 농업용 비료는 실내 배양에서의 f/2 배지에 비하여 생산 단가가 낮다는 장점이 있으나, f/2 배지에서 배양했을 때보다 세포의 성장률이 낮은 단점이 있다. 본 연구에서는 해수산 *Chlorella*의 배양시 사용가능한 상업 비료를 조사하기 위하여, 액체 비료 complexal과 농업용 비료(요소+복합비료)를 대상으로 조사하였다. 실험 결과 농업용 비료는 액체 비료에 비해 높은 세포 밀도를 보였고, 대량 배양용 농업용 비료의 적정 농도는 Schreiber 배지의 N과 P 농도의 1.25배로 나타났다. 따라서 농업용 비료 배지를 개발하면 f/2 배지에 비해 생산 단가를 낮출 수 있고, 대량 배양 또한 가능한 것으로 나타났다.

미세조류의 대량 배양시 농업용 비료를 많이 사용하고 있으나, 이 농업용 비료는 주요 성분이 질소와 인으로 구성되어 있으며 (Ukeles, 1980; Gonzalez-Rodriguez and Maestrini, 1984), 농업 비료 배지에는 미세조류의 성장에 필수적인 미량 원소나 비타민 등이 함유되어 있지 않다(Stein, 1973). 본 연구에 사용된 농업용 비료의 경우, 요소 비료는 질소함량 46%, 복합 비료는 질소 22%, 인 12%, 카리(칼륨) 12%, 구용성 고토(마그네슘) 3%로 구성되어 있어, *Chlorella* 등의 미세조류의 성장에 필요한 미량 원소는 거의 함유되어 있지 않아, f/2 배지에 비하여 낮은 성장을 나타내었다.

또한, f/2배지에서는 접종 후 2-3일째부터 세포 밀도가 기하급수적으로 증가하지만, 농업용 비료 배지에서는 접종 후 5일 이상이 경과해야 세포 밀도가 기하 급수적으로 증가하여, f/2 배지에 비해 초기 성장의 지연이 문제점으로 나타났다.

본 연구에서는 먼저, 농업용 비료에 f/2 배지에 사용되는 6종류 미량원소(코발트(Co), 구리(Cu), 아연(Zn), 몰리브데늄(Mo), 철(Fe), 망간(Mn))을 농도를 달리하여 단독으로 첨가한 후 *Chlorella*를 배양한 결과, 구리 성분은 f/2 배

지 첨가량의 3배($0.0588 \text{ mg}/\ell$)를 첨가하였을 때, f/2 배지에서의 성장에 약 80%에 달하는 성장 향상 효과를 보였다. 또한 이들 미량 원소를 2가지 이상 혼합하여 비료 배지에 공급하였을 때, 농업용 비료 배지를 단독으로 사용한 경우보다 비교적 높은 성장률을 나타내었다. 위의 결과에서 철+망간(0.6810), 철+망간+아연(0.6621)과 철+망간+아연+구리(0.6744)로 혼합하여 비료 배지에 첨가하여 *Chlorella*를 배양하였을 경우, 구리 3배를 단독으로 공급하였을 때의 성장률(0.6665)과는 유의적인 차이가 없었다. 반면, 철, 망간, 아연, 구리와 코발트를 모두 첨가한 실험구는 미량 원소를 첨가하지 않은 비료 배지보다 오히려 더 낮은 성장률을 나타내어, 대량 배양에서는 미량 원소를 혼합하여 첨가하는 것보다 구리 3배만을 비료 배지에 단독으로 첨가하는 것이 경제적인 것으로 보여진다.

구리의 경우 다른 미량 원소인, 카드뮴(Cd; Jayaraj et al., 1992; Guanzon et al., 1994), 크롬(Cr; Wong and Chang, 1991), 니켈(Ni; Wong and Chang, 1991; Jayaraj et al., 1992)보다 미세조류에 독성을 미치는 것으로 보고되고 있다. Franklin et al. (2000)은 pH가 6.5에서 5.7로 감소할 때 구리의 반치사 농도(72-h EC_{50})가 $1.5 \mu\ell/\ell$ 에서 $35 \mu\ell/\ell$ 로 증가하여 열대성 담수산 *Chlorella* sp.의 성장을 저해한다고 보고하고 있다.

본 연구에서 구리의 적정 첨가 농도를 알아보기 위하여 예비 실험을 한 결과에서 f/2 배지에 첨가하는 구리 농도의 2~80배의 농도로 첨가하여 배양한 결과, 5배($0.098 \text{ mg}/\ell$) 이상에서는 농도가 높을수록 성장률이 감소하는 결과를 보였다. Starodub et al. (1987)은 구리의 EC_{50} (접종 후 4시간 이내에 50%이상 성장이 감소하는 농도) 농도가 $100 \mu\text{g}/\ell$ 였다고 보고하였다. 본 연구에서는 f/2 배지 기준의 구리 농도는 $19.6 \mu\text{g}/\ell$ 이며, 가장 성장률 높았던 구리 3.0 배는 $58.8 \mu\text{g}/\ell$ 로 EC_{50} 농도 이하였으며, 성장률이 감소하기 시작하는

구라 5 배는 $98 \mu\text{g}/\ell$ 로서 Starodub et al. (1987)의 EC_{50} 농도와 유사하였다.

Gonzalez-Rodriguez and Maestrini (1984)의 보고에서 12가지 비료로서 16종의 미세 조류를 Conway 배지를 대조구로 하여 배양한 결과, *Nannochloris oculata*, *Isochrysis galbana*, *Chlamydomonas palla*, *Chaetoceros* sp.에서는 본 연구의 결과와 마찬가지로 비료 배지에서 매우 낮은 성장률을 나타내었다. 그러나, *Phaeodactylum tricornutum*, *Skeletonema costatum*, *Tetraselmis striata*, *Thalassiosira pseudonana*에서는 비료의 종류에 따라 약간의 차이는 있지만, 오히려 대조구인 Conway 배지에서의 성장과 유사하거나, 성장률이 더 높았다.

*Chlorella*의 대량 배양용 배지로서 농업용 비료에 여러 가지 미량원소 등을 첨가하여 사용하였을 때, 농업용 비료(1.25배)만을 단독 사용하였을 때보다는 성장이 향상되었으나, 여전히 f/2 배지의 약 80%의 성장률을 나타내었다. 따라서, 농업용 비료에서 f/2 배지와 비교하여 질소(N)의 주성분인 암모니아 농도의 차이에 따른 성장 저해 요인이 있을 것으로 판단되어 f/2 배지와 농업용 비료로서 16일간 배양하여 배지내의 수질을 분석하였다. 그 결과 농업용 비료에서 초기 암모니아($\text{NH}_4\text{-N}$) 함량은 $10.0 \text{ mg}/\ell$ 로서 f/2 배지의 $0.065 \text{ mg}/\ell$ 의 약 153배나 되었으며, 인산($\text{PO}_4\text{-P}$)의 경우도 f/2 배지의 약 9배 함량을 나타내었다.

미세조류 중 어떤 종류는 높은 암모니아 농도($1 \text{ mg} \cdot \text{atom N}/\ell$ 암모니아)에 매우 민감하며, 성장이 저해된다고 보고된 바 있다(Kaplan et al., 1986). 암모니아 농도가 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{atom N}/\ell$ 보다 높으면 높은 조도와 pH 의 배양 환경에서 배양되는 10여종 부착 규조류의 성장을 저해한다고 보고하고 있다(Admiraal, 1977). 특히, 높은 조도, pH 및 암모니아 농도와의 상관관계에 대해서 주목해야 하며, 높은 pH와 암모니아 농도는 복합적으로 미세조류에 독성

을 끼친다고 보고되었다(Kalpan et al., 1986).

본 연구에서 농업용 비료 배지의 수질은 f/2 배지에 비하여 높은 암모니아와 인산염 농도(약 150 배)가 *Chlorella*의 질산염 흡수를 저해하여, 초기 성장률이 낮은 것으로 판단된다. 따라서, f/2 배지의 인산염 함량을 기준으로 농업용 비료 1.25 배를 9배 희석하여 기초 실험을 하였을 때, 9배 희석한 실험구는 접종 후 2일째부터 세포 밀도가 감소하기 시작하였다. 한편, 농업용 비료 배지의 질산염의 농도는 f/2 배지에 비하여 5% 정도로 매우 낮았으며, 비료 배지를 9배 희석하였을 경우 질산염이 함량이 더욱 낮아져 영양 성분이 *Chlorella*의 성장을 저해하는 것으로 판단되었다.

미세조류의 배양시 배지내의 암모니아가 질산염의 흡수를 저해하는 것으로 보고되고 있다(Caperon and Meyer, 1972; Epply and Renger, 1974; Bienfang, 1975; Conway, 1977; Terry, 1982). 따라서, 본 연구에서는 농업용 비료의 높은 암모니아 농도를 낮추기 위하여 비료 배지 1.25 배를 5 배, 9 배로 희석하고 NaNO_3 를 f/2 배지에 사용하는 함량($150 \text{ mg}/\ell$)으로 첨가하여 배양하였을 때, *Chlorella*의 성장이 f/2 배지의 약 86%로 높은 성장을 보였다. *Chlorella* 배양시 농업용 비료만을 사용할 경우 f/2 배지에 비하여 초기 성장률이 매우 낮았다. 그러나, 희석한 비료 배지에 NaNO_3 를 첨가하였을 경우, 5 배와 9배 희석한 배지 모두에서 접종 2일째 세포 밀도가 f/2 배지($589 \times 10^4 \text{ cells}/\text{ml}$)에 비하여 각각 $537 \times 10^4 \text{ cells}/\text{ml}$ 와 $520 \times 10^4 \text{ cells}/\text{ml}$ 로 높은 세포 밀도를 나타냄으로써, 비료 배지내의 높은 암모니아와 낮은 질산염 농도가 성장을 저해 한 요인으로 판단된다.

광합성을 하는 대부분의 미세조류는 질소 공급원으로서 질산염 또는 암모니아를 이용하며, 여러 종류의 미세조류(*Anabaena variabilis*, *Nostoc muscorum*, *Chlorella ellipsoidea*, *C. pyrenoidosa*, *Chaetoceros simplex*,

Cyclotella cryptica, *Skeletonema* sp.)는 질소 공급원으로서 질산염 또는 암모니아에서 유사한 성장률을 나타낸다고 보고된 바 있다(Leftley, 1980). 그러나, Paasche (1971)는 *Dunaliella tertiolecta*는 질산염 보다 암모니아 환경에서 10~30% 정도 더 빨리 성장한다고 보고하였다. 또한 Antia et al. (1975)는 실험실 미세조류를 배양할 경우 질산염을 함유한 배지에서 더 성장률이 높다고 보고하였다. 이와 같이 미세조류의 종과 저자에 따라 질소원으로서의 질산염과 암모니아의 효과는 다른 것으로 보고되고 있다.

본 연구에서는 농업용 비료 배지의 암모니아 농도를 낮추고 질소 공급원으로서 질산염(NaNO_3)을 첨가하여 *Chlorella*를 배양하였을 때, 높은 성장률을 나타내었다. 또한, 희석한 농업용 비료 배지+ NaNO_3 에 미량 원소 중 첨가 효과가 가장 좋았던 구리 3.0 배(0.0588 mg/ ℓ)를 첨가하여 *Chlorella*를 배양하였을 때, 비료 1.25 배/5(복합 비료 0.0417 g/ ℓ , 요소 비료 0.0344 g/ ℓ)+ NaNO_3 (200 mg/ ℓ)+ CuSO_4 3.0 배(0.0588 mg/ ℓ) 배지의 실험구는 f/2 배지의 성장의 약 96%를 나타내었다.

한편, 배지의 중간 시비 효과를 알아보기 위하여 배양 후 8 일째 비료 1.25 배/5+ NaNO_3 (200 mg/ ℓ)+ CuSO_4 3.0 배(0.0588 mg/ ℓ) 배지를 25~100%의 중간 시비를 한 결과, 중간시비를 하지 않은 f/2 배지에서는 총 배양 기간 19일째부터 세포 밀도가 감소하였으나, 25%와 50%를 중간시비한 경우는 세포 밀도가 계속 증가하였다. 또한, 질소 공급원으로서의 질산염을 150~300 mg/ ℓ 로 첨가하였을 때, 200과 250 mg/ ℓ 에서 가장 높은 성장률을 나타내었다.

이와 같은 결과를 종합해 볼때, *Chlorella*의 대량 배양시 사용하는 농업용 비료 배지는 ℓ 당 복합 0.0417 g, 요소 0.0344 g, 질산염(NaNO_3 200 mg)과 미량 원소로 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.0588 mg)을 첨가하는 것이 가장 효과적이며, 또한 장기간 배양시 접종 후 7~8일째 위와 동일한 비료 배지 초기 농도의 25%를

시비하여 주는 것이 안정적으로 배양밀도를 높일 수 있는 방법일 것으로 판단된다.

그러나, *Chlorella*의 비료 배지 실험 동안 질산염과 구리 성분을 실내 배양에서 사용하는 특급 시약을 사용하였으며, 이 배지를 대량 배양에 적용하였을 경우, *Chlorella*의 대량 배양시 생산 단가가 높아지게 된다. 따라서, 질산염과 구리 성분을 단가가 낮은 공업용 시약으로 사용하여 비료 배지를 만들어 특급 시약용 비료 배지와 성장을 비교한 결과, f/2배지, 시약용 비료 배지와 공업용 비료 배지는 성장에서 유의적인 차이는 보이지 않았다. 접종 후 8일째의 공업용 비료 배지에서 $3,408 \times 10^4$ cells/ml로 시약용 배지의 $3,312 \times 10^4$ cells/ml에 비하여 더 높게 나타났다. *Chlorella*의 대량 배양시 위와 같은 농도의 공업용 시약 비료 배지를 사용할 경우, f/2 배지나 일반 비료 배지에 비하여 생산단가가 낮고 고밀도 배양이 가능하여, 관리 인력 등의 생산비용을 절감할 수 있을 것으로 판단된다.

3. 3종류 *Chlorella*와 *Nannochloris*의 대량 배양을 위한 공업용 시약 배지의 효과

공업용 비료 배지(복합 비료 0.0417 g/l, 요소 비료 0.0344 g/l, 공업용 질산염 200 mg/l, 공업용 황산구리 0.0588 mg/l)로 C-20 *Chlorella ellipsoidea*를 배양하였을 때, f/2 배지와 비교하여 성장에서 유의적으로 차이가 없는 것으로 나타났다.

공업용 비료 배지로 rotifer 겨울철 대량 배양에 적합한 *Chlorella* (C-12, EC-1)과 여름철 대량 배양에 적합한 *Nannochloris* (C-87)를 15‰과 30‰로 배양하였을 때, 10℃에서 C-12와 EC-1은 염분에 따른 유의적 차이는 보이지

않았다. 20℃에서는 C-12와 C-87에서 모두 15%이 30%에 비하여 성장이 더 좋은 것으로 나타났으나, 30℃에서 C-12는 30%에서, C-87은 15%에서 성장률이 더 높게 나타났다.

C-12 *C. vulgaris*는 f/2 배지, 10℃에서 배양하였을 때 EC-1에 비하여 매우 낮은 성장률을 나타내었으나, 공업용 시약 비료 배지 10℃에서 배양하였을 경우 EC-1과 거의 유사한 성장 형태를 나타내었다. 이러한 C-12 *Chlorella*의 배지에 따른 성장을 비교하기 위하여, 다시 10℃에서 C-12와 EC-1을 f/2배지와 공업용 시약 비료 배지로 비교 배양하였을 때, f/2 배지에서는 성장이 낮고, 공업용 시약 비료 배지에는 높은 성장률을 나타냈다. 따라서 겨울철 저온기에 C-12를 공업용 시약 비료 배지로 배양하면 효율적인 *Chlorella*의 배양이 가능할 것으로 판단된다.

Fabregas et al. (1984)는 *Tetraselmis suecica*는 0~35%의 염분과 2~64 mM NaNO₃ 농도 조건하에서 배양하였을 경우 염분의 변화보다 NaNO₃의 농도에 더 큰 영향을 받는 것으로 보고하였다. 또한 염분과 영양염의 농도는 성장 속도보다는 biomass 생산에 더 큰 영향을 미치며, 총 단백질 함량은 각 염분에 따라 질산염의 농도가 높을수록 감소하는 것으로 나타났다.

본 연구에서는 15%와 30%에서 2 종류 *Chlorella*와 *Nannochloris*를 배양하여 영양 성분을 분석한 결과, EC-1은 30%에서 C-12의 경우는 15%에서 조단백질과 조지방 함량이 더 높았으며, C-87에서는 조단백질이 15%에서, 조지방은 30%에서 함량이 더 높게 나타났다. C-12와 C-87의 2종 모두 성장률이 높았던 15%에서 조단백질 함량이 30%에 비해 높았는데, 이는 미세조류의 배양시 배지의 염분 농도가 미세조류의 단백질 함량에 영향을 주는 것으로 보여진다.

n-3 HUFA 계열 지방산은 양식에서 필요한 미세조류를 선택하는데 중요

한 요건이다(Watanabe et al., 1983; James et al., 1987; Rezeq and James, 1987). 그러나, 미세조류의 성장률과 영양성분의 변화, 특히, 지방함량과 불포화지방산은 배양 환경에 관여한 여러 가지 조건과 관련이 있다고 보고되고 있다 (Iwamoto and Sugimoto, 1955; De Pauw et al., 1984).

염분과 온도는 n-3 HUFA 함량에 영향을 주는 것으로 보고되고 있다 (Olson and Ingram, 1975; Teshima et al., 1983). James et al. (1989)에 의하면 0~35℃의 온도에서 각각 배양하였을 때, *Chlorella*는 온도가 증가하는 것에 반해 n-3 HUFA 함량은 감소하나, *Nannochloropsis*는 25℃까지는 증가하였으나, 적정 성장 온도(15~20℃)에서는 총 n-3 HUFA 함량은 유의적인 차이가 없었다. 또, *Chlorella*의 EPA는 염분에 영향을 받지 않는 것으로 나타났으며, 0~35℃ 온도 중에서 25℃에서만 검출되었다.

Renaud and Parry (1994)는 *Isochrysis* sp.와 *Nitzschia* sp.는 염분 10~35‰에서 성장률의 유의적 차이는 없었으나, *Nannochloropsis oculata*는 35‰에서 낮은 성장률을 나타내었다. *Isochrysis* sp.와 *N. oculata*는 총지방 함량이 염분 35‰까지 증가하는 것에 비례하여 증가하였다. 단백질 함량은 염분의 변화에 큰 영향이 없는 것으로 보고하였다. 또한, *Isochrysis* sp., *N. oculata*와 *Nitzschia* sp. 3종은 염분에 따라 총지방 함량은 변화한다고 보고하였다.

그러나, 본 연구에서는 염분에 따른 지방산 성분에서 n-3 HUFA 성분이 3 종류 모두에서 15‰에서 높게 나타났으며, EPA함량도 15‰에서 높았으며 특히, C-12에서 다른 2 종(C-87, EC-1)에 비하여 월등하게 높은 수치를 나타내었고, DHA성분은 C-87의 15‰에서 가장 높은 함량을 나타내었다.

총 아미노산 함량에서 C-12와 C-87은 15‰에서 더 높았으나, EC-1은 30‰에서 더 높은 함량을 나타내었으며, 이는 성장률의 변화와 같은 경향을 나타내었다.

공업용 비료 배지로 10℃에서 배양하였을 경우 성장률이 높았던 C-12와 EC-1로 rotifer를 배양하여 넙치 자어에 먹이로 공급한 결과, 성장에서는 유의적 차이는 없었으며, 생존율에서는 EC-1보다 단백질 함량, n-3 HUPA 과 총 아미노산 함량이 높았던 C-12에서 비교적 높게 나타났다. 그러나 본 연구에서는 사육 기간이 7일로 짧아 어류 자어의 먹이 효율에 대한 실험은 장기간에 걸쳐 구체적인 실험이 필요하다.

이러한 모든 연구 결과를 종합할 때, rotifer의 먹이 생물인 *Chlorella* 또는 *Nannochloris*의 계절별 옥외 대량 배양은 여름철 고온기에 C-87 *Nannochloris* sp. (득량만)이 적합한 것으로 보여지며, 겨울철인 저온기에는 C-12 *C. vulgaris* (낙동)이 적합하며, 배지로는 배양액 1톤당 복합 비료 41.7 g+요소 비료 34.4 g+공업용 NaNO_3 200 g+공업용 CuSO_4 0.0588 g의 공업용 시약 비료배지가 적합한 것으로 나타났다. 이와 같이 계절에 따라 적합한 종을 선택하고 공업용시약 비료배지를 사용할 경우, 먹이생물에 따른 종묘 생산 단가를 낮출 수 있을 것으로 판단된다.

국 문 요 약

해산 어류, 갑각류 및 조개류의 종묘 생산시 초기 먹이 생물로서 이용되는 rotifer 먹이 생물인, *Chlorella*와 *Nannochloris*의 계절별 대량 배양에 적합한 종류를 조사하고, 경제적이고 안정적인 대량 배양을 위한 농업용 비료 배지를 개발하고자 하였다.

한국해양미세조류은행에서 보유하고 있는 130여종의 *Chlorella*와 *Nannochloris* 채집해역과 크기 등을 고려하여 11종 *Chlorella*와 5종 *Nannochloris*를 선정하였다. 5종의 해수산 *Chlorella* 중에서는, 15‰에서 C-23 *C. vulgaris* (감천), C-12 *C. vulgaris* (낙동)과 C-20 *C. ellipsoidea* (일본)이, 30‰에서는 C-23과 C-12 이 가장 좋은 성장을 나타내었다. 해수산 *Nannochloris* 5종에서는 15‰과 30‰에서 C-31 *N. oculata* (UTEX), C-87 *Nannochloris* sp. (득량만)과 C-189 *Nannochloris* sp. (부안)이, 기수산 *Chlorella*는 EC-001 *C. vulgaris* (화진포)가 15‰과 30‰에서 가장 높은 성장률을 나타내었다.

이와 같이 성장률이 양호한 3종 *Chlorella* (C-12, C-20, EC-1)과 3종 *Nannochloris* (C-31, C-87, C-189)를 대상으로 영양성분을 조사한 결과, 조단백질은 C-31과 C-12에서 각각 42.9%, 42.4%, 조지방은 C-12, C-31 및 EC-001에서 각각 2.6%, 2.6% 및 2.4%로 높았다. DHA (22:6n-3) 성분은 C-12와 C-87에서만 각각 0.29%와 0.02%의 함량을 나타내었다.

32℃에서 C-87 *Nannochloris* sp. (득량만)과 C-189 *Nannochloris* sp. (부안)이, 30℃에서는 C-31 *N. oculata* (UTEX) 와 C-87 *N. sp.* (득량만)이 가장 높은 성장을 나타내으며, 10℃에서는 EC-001 *C. vulgaris* (화진포)가 다른 *Chlorella*와 *Nannochloris* 종류에 비하여 유의적으로 높은 성장률을 나타내었

나.

이들 6종의 *Chlorella*와 *Nannochloris* 종류 중에서 L type rotifer 의 먹이로 공급하였을 경우 C-12 *C. vulgaris* (낙동)에서 301개체/ml로 가장 높은 성장을 나타내었다. 지방산 성분에서는 C-12를 먹이로 공급한 rotifer에서 EPA가 총 지방산 함량 중 15.27%로 가장 높았으며, DHA는 EC-1을 먹이로 공급한 rotifer에서 9.39%로 가장 높았다.

*Chlorella*를 Schreiber배지, Complesal 배지 및 농업용 비료 배지를 비교 배양하였을 때, 농업용 비료 배지에서 가장 높은 성장률을 나타내었고, 이때, 비료 배지의 첨가 농도는 Schreiber 배지의 N과 P 성분의 1.25배였다(복합비료 0.147 g/ℓ, 요소비료 0.205 g/ℓ). 그러나, 이 농업용 비료 배지는 f/2 배지에 비하여 세포의 성장률이 비교적 낮고, 농업용 비료 배지에는 미세조류의 성장에 필요한 미량 원소가 거의 함유되어 있지 않은 단점이 있다. 따라서, f/2 배지에 첨가되는 6종 미량원소(코발트(Co), 구리(Cu), 아연(Zn), 몰리브덴(Mo), 철(Fe) 및 망간(Mn))을 각각 단독으로 농도별로 농업용 비료 배지에 첨가하여 배양한 결과, *Chlorella*의 성장이 구리(Cu)와 아연(Zn)에서 높았다. 혼합 첨가 하였을 때는 *Chlorella*는 철+망간에서 유의적으로 높은 성장을 나타내었다. 가장 높은 성장률을 나타낸 구리(Cu)의 대량 배양시 필요한 첨가 농도를 파악한 결과, f/2 배지에서의 CuSO_4 농도의 3.0배를 첨가하였을 때 가장 효과적이었다.

*Chlorella*의 배양 기간 동안 f/2 배지와 농업용 비료 배지의 수질 변화를 측정한 결과, 총인의 함량은 농업용 비료 배지에서 14.3491 mg/ℓ, f/2 배지에서 1.5013 mg/ℓ 였으며, 비료 배지의 암모니아의 함량은 10.0039 mg/ℓ로 f/2 배지 0.0646 mg/ℓ의 약 153배의 높은 함량을 나타내었다. 이에 비해 질산염은 비료 배지에서 3.2 mg/ℓ로서 f/2 배지(69.33 mg/ℓ)의 약 5%에 불과했다. 따라

서, 높은 암모니아 농도를 낮추기 위해서 비료 배지의 농도를 1/5로 희석(복합 비료 0.0417 g/ℓ, 요소비료 0.0344 g/ℓ)하여 질소 공급원으로 질산염을 200mg/ℓ 첨가하여, *Chlorella*를 배양하였을 때, 가장 높은 성장률을 나타내었다. 또한 희석된 배지에 미량 원소 황산 구리 3.0배(0.0588 mg/ℓ)을 첨가하였을 때, 성장은 더욱 증가하여 즉, f/2 배지의 약 96%의 높은 성장을 나타내었다.

또, 배양 8일째 이와 같은 최적의 비료 배지를 1/5로 희석하여 다시 시비하였을 때, 세포 밀도가 계속 증가하였다. 한편 이와 같은 배지에서 사용한 공업용과 특급 시약용 질산염과 황산구리는 *Chlorella*의 성장에서 유의적인 차이가 없었으며, 대조구인 f/2 배지인 성장과도 유의적인 차이를 보이지 않았다.

위의 실험에서 파악된 최적의 공업용 시약 비료(복합비료 0.0417 g/ℓ, 요소비료 0.0344 g/ℓ, 질산염을 200mg, 황산구리 0.0588 mg/ℓ)배지로 계절별 대량 배양에 적합하다고 판단된 3종류 *Chlorella*와 *Nannochloris*를 15%과 30%에서 배양하였을 때, 10℃에서는 C-12와 EC-1의 2종 모두 염분에 따른 성장의 유의적인 차이는 보이지 않았다. 30℃에서는 C-87은 15%에서, C-12는 30%에서 더 높은 성장률을 나타내었으나, 20℃에서는 C-87은 15%에서 성장률이 더 높았으나, C-12는 염분에 따른 성장의 큰 차이는 보이지 않았다.

*Chlorella*를 공업용 시약 비료 배지에서 15%과 30%에서 배양하여 영양 성분을 분석한 결과, 조단백과 조지방 함량이 EC-1은 30%에서, C-12는 15%에서 더 높았으나, C-87은 조단백은 30%에서, 조지방은 15%에서 높은 함량을 나타내었다. 지방산에서 n-3 HUFA 함량은 3종 모두 15%에서 높았으며, 총 지방산 성분 중에서 EPA 함량은 C-12의 15%에서 25%로 가장 높은 함량을 나타내었다. DHA는 C-87의 15%에서 1.22%로 가장 높은 함량을 보였다. 총 아미노산 성분은 3 종류 *Chlorella*와 *Nannochloris* 중에서 C-87이 15%과

30‰에서 모두 가장 높았으며, C-12와 C-87은 15‰에서, EC-1은 30‰에서 더 높게 나타났다. 10℃에서 배양한 C-12와 EC-1로 rotifer를 배양하여 넙치 자어의 먹이로 공급하였을 때, 실험 종료시 성장과 생존율은 유의적인 차이는 보이지 않았다.

이상의 결과를 종합적으로 볼 때 여름철 고온기에는 C-87 *Nannochloris* sp., 그 외 계절에는 C-12 *Chlorella vulgaris*를 대상으로 15‰ 해수 1톤당 복합비료 41.7 g, 요소비료 34.4 g, 공업용 질산염과 황산구리를 각각 200 g과 0.0588 g을 첨가하여 배양하는 것이 효과적일 것으로 판단되었다.

감사의 글

논문이 완성되기까지 우여곡절도 많았지만, 오늘 이 논문이 나오기까지 다시 시작할 수 있게 기회를 주시고, 부족한 저를 오랜 기간 동안 변함없는 사랑과 관심으로 지켜봐 주시고, 가르쳐 주신 지도교수 허성범 교수님께 무한한 감사를 드립니다.

바쁘신 중에도 논문 수정에 힘써주신 손철현 교수님, 조재윤 교수님, 박흥기 교수님 그리고, 남윤권 교수님께 진심으로 감사드립니다.

그리고 학부와 대학원 과정 동안 많은 가르침을 주시고 격려를 아끼지 않으신 김인배 교수님, 유성규 교수님, 장영진 교수님, 배승철 교수님, 김동수 교수님, 김창훈 교수님과 김종명 교수님께도 깊은 감사를 드립니다.

본 논문이 완성되기까지 많은 관심을 가져주시고 도와주신 조기채 선배님, 한형균 선배님, 이창규 선배님, 이상민 선배님, 임영수 선배님, 박정은 선배님, 허영백 선배님, 손형우 선배님, 석사 과정 시절부터 항상 많은 도움을 주었고 걱정해주신 김형섭 선배님과 동기 조성환님, 김철원님께도 감사의 뜻을 전합니다.

또, 처음 만난 후부터 10년이 넘는 세월 동안 한결같이 챙겨주고 걱정해주시고 도와주신 김미정 선배님께 진심으로 감사 드리며, 늦게 다시 시작하는 선배를 위해 기꺼이 곁에서 도와준 후배 민병희, 박세진, 윤지현, 김해영과 여러모로 부족한 선배를 위하여 항상 관심과 도움을 아끼지 않은 김유희, 전민지 후배님, 항상 걱정하고 관심을 가져준 천해양식실험실 여러 후배님, 한국해양미세조류은행의 이계안 박사님과 심혜원 연구원님, 수산생물학과 후배님께도 감사의 말을 전하며, 제주도에서 실험에 필요한 넙치 수정란을 항상 기꺼

이 공급해주신 이상기 선배님과 후배 이일영에게도 감사 드립니다.

끝으로, 이 논문이 있기까지 많이 부족하고 걱정만 끼치던 자식을 위하여 오랜 시간 동안 이해와 사랑으로서 보살펴 주시고 기다려 주신 어머니와 못난 동생을 묵묵하게 지켜봐 주며, 이해해주신 오빠, 올케 언니, 항상 바쁜 누나 걱정을 하며 신경을 써준 동생 진만에게 진심으로 감사를 드립니다. 그리고, 항상 고모가 언제 졸업하는지 궁금해하던 우리 귀여운 조카, 정화, 혜지와 다시 시작하여 논문이 완성되기까지 곁에서 아버지와의 같은 사랑과 관심을 가져 주신 외삼촌께도 감사드립니다. 마지막으로, 늦었지만 논문이 완성되기를 너무나도 바라셨지만, 지금은 이 기쁨을 함께 하실 수 없는 아버지의 영전에 이 영광을 바칩니다.

참 고 문 헌

- Admiraal, W. 1977. Tolerance of estuarine benthic diatoms to high concentrations of ammonia, nitrite ion, nitrate ion and orthophosphate. Mar. Biol., 43: 307-315.
- Anitia, N.J., B.R. Berland, D.J. Bonin and S.Y. Maestrini. 1975. Comparative evolution of certain organism and inorganic sources of nitrogen for phototrophic growth of marine microalgae. J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 55: 519-539.
- AOAC. 1995. Official methods of analysis of the association of official analysis chemicals. 14th edition. Arlington. AV, 1141pp.
- Becker, E.W. 1981. Algae mass cultivation - Production and utilization. Process Biochemistry, 8/9: 10-14.
- Ben-Amotz, A. and R. Fishler. 1982. Induction of sexual reproduction and resting egg production in *Brachionus plicatilis* by a diet of saltgrown *Nannochloris oculata*. Mar. Biol., 67: 289-294.
- Ben-Amotz, A., R. Fishler and A. Schneller. 1987. Chemical composition of dietary species of marine unicellular algae and rotifers with emphasis on fatty acids. Mar. Biol., 95: 31-36.
- Bienfang, P.K. 1975. Steady-state analysis of nitrate-ammonium assimilation by phytoplankton. Limnol. Oceanogr., 20: 402-411.
- Bogdan, K.G., J.J. Gilbert and P.L. Starkweather. 1980. In situ clearance rates of planktonic rotifers. Hydrobiologia, 73: 73-77.
- Brown, M. 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 145: 79-99.
- Brown, M.R., S.W. Jeffrey and C.D. Garland. 1989. Nutritional aspects of

- microalgae used in mariculture: a literature review. C.S.I.R.O Marine Laboratories Report 205. C.S.I.R.O., Australia, 44pp.
- Carperon, J. and J. Meyer. 1972. Nitrate-limited growth of phyto- plankton. II. Uptake kinetics and their role in nutrient limited growth of phytoplankton. Deep-Sea Res., 19: 619-632.
- Chu, F.E. and K.L. Webb. 1984. Polyunsaturated fatty acids and neutral lipids in developing larvae of the oyster *Crassostrea virginica*. Lipids, 19: 815-820.
- Conway, H.L. 1977. Interaction of inorganic nitrogen in the uptake and assimilation by marine phytoplankton. Mar. Biol., 39: 221-232.
- Coulter, T.P. 1989. Food : the chemistry of its components. Royal Society of Chemistry Editions , Letchworth, Herts (England), 325 pp.
- De Pauw, N., J. Morales and G. Persoone. 1984. Mass culture of microalgae in aquaculture systems : progress and constraints. Hydrobiologia, 116/117: 121-134.
- De Pauw, N., J. Verboven and C. Claus. 1983. Large-scale microalgae production for nursery rearing of marine bivalves. Aquacult. Eng., 2: 27-47.
- Duncan, D.B. 1955. Multiple-range and multiple F test. Biometrics, 11: 1-42.
- Enright, C.T., G.F. Newkirk, J.S. Craigiel and J.D. Castell. 1986. Evaluation of phytoplankton as diets for juvenile *Ostrea edulis* L. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 96:1-13.
- Epply, R.W. and E.H. Renger. 1974. N assimilation of an oceanic diatom in N limited continuous culture. J. Phycol., 10: 15-23.
- Fabregas, J., L. Toribio, J. Abalde, B. Cabezas and C. Herrero. 1987. Approach to biomass production of the marine microalga *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch) using common garden fertilizer and soil extract

- as cheap nutrient supply in batch culture. *Aquacult. Eng.*, 6: 141-150.
- Fabregas, J., C. Herrero, B. Cabezas and J. Abalde. 1985a. Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch) with high nutrient concentrations. *Aquaculture*, 49: 231-244.
- Fabregas, J., C. Herrero, J. Abalde and B. Cabezas. 1985b. Growth, chlorophyll-a and protein of the marine microalgae *Isochrysis galbana* in batch culture with different salinities and high nutrient concentrations. *Aquaculture*, 50: 1-11.
- Fabregas, J., J. Abalde, C. Herrero, B. Cabezas and M. Veiga. 1984. Growth of marine microalga *Tetraselmis suecica* in batch culture with different salinities and nutrient concentration. *Aquaculture*, 42: 207-215.
- Fernandez-Reiriz, M.J., A. Perez-Camacho, M.J. Ferreiro, J. Banco, M. Planas, M.J. Compos and U. Labrata. 1983. Biochemical production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrate, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture*, 83: 17-37.
- Fontaine, C.T. and D.B. Revera. 1980. The mass culture of the rotifer, *Brachionus plicatilis*, for use as food stuff in aquaculture. *Proc. World Maricul. Soc.*, 11: 211-218.
- Franklin, N.M., J.L. Stauber, J.M. Scott and P.L. Richard. 2000. pH-dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Aquatic Toxicology*, 48: 275-289.
- Frolov, A.V., S.L. Pankov, K.N. Geradze, S.A. Pankova and L.V. Spektorova. 1991. Influence of the biochemical composition of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*, 97: 181-202.

- Fukusho, K., M. Okauchi, H. Tanaka, S.I. Wanyuni, P. Kraisingdecha and T. Watanabe. 1985. Food value of a rotifer, *Brachionus plicatilis* cultured with *Tetraselmis tetrathele* for larvae of a flounder *Paralichthys olivaceus*. Bull. Natl. Res. Aquacult., 7: 29-36.
- Gilberto, S. and A. Mazzola. 1981. Mass culture of *Brachionus plicatilis* with an integrated system of *Tetraselmis suecica* and *Saccharomyes cerevisiae*. J. World Maricult. Soc., 12: 61-62.
- González-Rodríguez, E. and S.Y. Maestrini. 1984. The use of some agricultural fertilizers for the mass production of marine algae. Aquaculture, 36: 245-256.
- Guanzon, N.G., H. Nakahara and T. Toshida. 1994. Inhibitory effects of heavy metals on growth and photosynthesis of three freshwater microalgae. Fish. Sci., 60: 379-384.
- Guillard, R.R.L. 1973. Division rates. In, Handbook of Phycological Methods. Culture Method and Growth Measurement (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). Can. J. Microbiol., 8: 229-239.
- Harrison, P.J., P.A. Thompson and G.S. Calderwood. 1990. Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. J. Applied Phycol., 2:45-56.
- Harting, P., J.U. Grobbelaar, C.J. Soeder and J. Groeneweg. 1988. On the mass culture of microalgae : A real density as an important factor for achieving maximal productivity. Biomass, 15: 211-221.
- Herrero, C., A. Cid, J. Fabregas and J. Abalde. 1991. Yields in biomass and chemical constituents of four commercially important marine microalgae

- with different culture media. *Aquacult. Eng.*, 10: 99-110.
- Hirata, H. 1977. Zooplankton cultivation and prawn seed production in an artificial ecosystem. *Helgolander Wiss. Mess.*, 30: 230-242.
- Hirata, H. 1980. Culture methods of the marine rotifer, *Brachionus plicatilis*. *Min. Rev. Data File Fish Res.*, 1: 27-46.
- Hirata, H., I. Andarias and S. Tamasaki. 1981. Effect of salinity and temperature on the growth marine phytoplankton *Chlorella saccharophila*. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.*, 30: 257-262.
- Hirayama, K. and H. Funamoto. 1983. Supplement effect of several nutrient on nutritive deficiency of baker's yeast for population growth of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Nippon suisan Gakkaishi*, 49: 505-510.
- Hirayama, K. and K. Watanabe. 1973. Fundamental studies on physiology of rotifer for its mass culture. IV. Nutritional effect of yeast on population growth of rotifer. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 39: 1123-1127.
- Hirayama, K., K. Tagaki and H. Kimura. 1979. Nutritional effect of eight species of marine phytoplankton on population growth of *Brachionus plicatilis*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 45: 11-16.
- Hodgson, P.A., R.J. Henderson, J.R. Sargent and J.W. Leftley. 1991. Pattern of variation in the lipid class and fatty acid composition of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) during batch culture I. The growth cycle. *J. Appl. Phycol.*, 3: 169-181.
- Iwamoto, H. and H. Sugimoto. 1955. Fat synthesis in unicellular algae: Part II. Chemical composition of nitrogen deficient *Chlorella* cells. *Bull. Agric. Chem. Soc. Japn.*, 19: 247-252.
- James, C.M. and T.S. Abu-Rezeq. 1988. Effect of different cell densities of *Chlorella capsulata* and a marine *Chlorella* sp. for feeding the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*, 69: 43-56.

- James, C.M. S. Al-Hinty and A.E. Salman. 1989. Growth and ω 3 fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes. *Aquaculture*, 77: 337-351.
- James, C.M., A.M. Al-Khars, S. Al-Hinty and M.B. Abbas. 1986. Manual on live food production for aquaculture, 2nd edition. Kuwait Ins. Sci. Res., Kuwait, 63pp.
- James, C.M., P. Dias and A.E. Salman. 1987. The use of marine yeast (*Candida* sp.) and bakers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in combination with *Chlorella* sp. for mass culture of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, 147: 263-268.
- Jayaraj, Y.M., B. Aparanji and P.M. Nimbarigi. 1992. Amelioration of heavy metal toxicity on primary productivity of aquatic ecosystems by calcium, magnesium and iron. *Environ. Ecol.*, 10: 667-674.
- Juario, J.V., M.N. Duray, V.M. Duray, J.F. Nacario and J.M.E. Almendras. 1994. Induced breeding and larval rearing experiments with milkfish *Chanos chanos* (Forskål) in the Philippines. *Aquaculture*, 36: 61-70.
- Kadowaki, S., T. Makazono, S. Ioku, T. Kasedo and H. Hirata. 1980. Seed production of the scallop *Chlamys nobilis* (REEVE) - II. Mixture diet of marine yeast and *Chlorella* sp. for the veliger larvae. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.*, 29: 209-215.
- Kalpan, D., A.E. Richmond, Z. Dubinsky and S. Aaronson. 1986. Algal nutrition. In: A. Richmond (Ed.). *Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press, Boca Raton, FL, 147-197pp.
- King, C.E. and T.W. Snell. 1980. Density-dependent sexual reproduction population of the rotifer *Asplanchna girodi*. *Hydrobiologia*, 73: 149-152.
- Kitajima, C., S. Fujita, F. Ohwa, Y. Yone and T. Watanabe. 1979. Improvements of dietary value for red sea bream larvae of rotifer,

- Brachionus plicatilis* cultured with bakers yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 45: 469-472.
- Knauer, J. and P.C. Southgate. 1999. A Review of the nutritional requirements of bivalves and the development of alternative and artificial diets for bivalve aquaculture. Rev. Fish. Sci., 7: 241-280.
- Laing, I. and M.M. Helm. 1981. Factors affecting the semi-continuous production of *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch in 200 ℓ vessels. Aquaculture, 22: 137-148.
- Langdon, C.J. and M.J. Waldock. 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas*. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 61: 431-448.
- Lee, M.J., J.H. Shim and C.K. Kim. 1967. Studies on the plankton of the neighboring seas of Korea. Part 1: On the marine conditions and phytoplankton of the Yellow Sea in summer. Report Inst. Mar. Biol., 1: 1-14.
- Leftley, J.W. 1980. Studies on urea metabolism in some unicellular algae. Ph.D. thesis, University of Wales, Wales.
- Liao, I.C. 1975. Experiments on induces breeding of the grey mullet in Taiwan from 1963 to 1973. Aquaculture, 6: 31-58.
- Loosanoff, V.L. and J.B. Engle. 1942. Use of complete fertilizer in cultivation of microorganism. Science, 95 (2471): 487-488.
- Lubzens, E. and R. Fisrlen, 1980. Introduction of sexual reproduction and resting egg production in *Brachionus plicatilis* reared in seawater. Hydrobiologia, 73: 55-58.
- Maruyama, I., T. Nakamura, T. Matsubayashi, Y. Ando and T. Maeda. 1986. Identification of the algae known as 'marine Chlorella' as a

- member of the Eustigmatophyceae. Jap. J. Phycol., 34: 319-325.
- McLachlan, J. 1961. The effect of salinity on growth and chlorophyll content in representative classes of unicellular marine algae. Can. J. Microbiol., 7: 399-406.
- Metcalfe, L.D., A.A. Schmitz and J.R. Pelka. 1966. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. Anal. Chem., 38: 514-515.
- Nakanishi, M. and M. Monshi. 1965. Effect of variation in salinity on photosynthesis of phytoplankton growing in estuaries. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., (Sec. III), 9: 19-42.
- Nandini, S. and S.S.S. Sarma. 2001. Population growth of *Lepadella patella* (O.F. Müller, 1976) at different algal (*Chlorella vulgaris*) densities and in association with *Philodina roseola* Ehrenberg, 1832. Hydrobiologia, 446/447: 63-69.
- Ogata, E. and T. Matsui. 1965. Photosynthesis in several marine plants of Japan as affected by salinity, drying and pH, with attention to their growth habitat. Bot. Mar., 8: 199-217.
- Okauchi, M. and K. Fukusho. 1984. Environmental conditions and medium required for mass culture of a minute alga, *Tetraselmis tetrathele*. Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture, 5: 1-11.
- Okauchi, M. and K. Fukusho. 1984. Food value of a minute alga, *Tetraselmis tetrathele*, for the rotifer *Brachionus plicatilis* culture. Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture, 5: 13-18.
- Oliveira, M.A.S., M.P. Monteiro, P.G. Robbsa and S.G. Leite. 1999. Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. Aquacult. Int., 7: 261-275.

- Olson, G.J. and J. Ingram. 1975. Effects of temperature and nutritional changes on the fatty acids of *Agmenellum quadruplicatum*. J. Bacteriol., 124: 373-379.
- Paasche, E. 1971. Effect of ammonia and nitrate on growth, photosynthesis and ribulosediphosphate carboxylase content of *Dunaliella tertiolecta*. Physiol. Plant., 25: 294-299.
- Parrish, C.C. 1987. Separation of aquatic lipid classes by Chromarod thin-layer chromatography with measurement of latroscan flame ionization detection. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 44 (4): 722-731.
- Pourriot, R. 1980. Workshop on culture techniques of rotifers. Hydrobiologia, 73: 33-35.
- Renaud, S.M., and D.L. Parry. 1994. Microalgae for use in tropical aquaculture II: Effect of salinity on growth, gross chemical composition and fatty acid composition of three species of marine microalgae. J. Appl. Phycol., 6: 347-356.
- Rceq, T.A. and C.M. James. 1987. Production and nutritional quality of the rotifer *Brachionus plicatilis* in relation to different cell densities of marine *Chlorella* sp. Hydrobiologia, 147: 257-261.
- Rico-Martinez, R. and S.I. Dodson. 1992. Culture of the rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas. Aquaculture, 105: 191-199.
- Sakahang, E. and O. Holm-Hansen. 1977. Chemical composition of *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve and *Pavlova lutheri* (Droop) Green as a function of nitrate, phosphate and iron-limited growth. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 29: 1-34.
- Schreiber, E. 1927. Die Reinkultur von marinem phytoplankton und deren bedeutung für die erforschung der produktionsfähigkeit des meerwassers. Wiss. Meeresuntersuch. N.F., 16: 1-34.

- Scott, A.P. and C. Middleton. 1979. Unicellular algae as a food for turbo (*Scophthalmus maximus* L.) larvae - the important of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids. *Aquaculture*, 18: 227-240.
- Scott, A.P. and S.M. Baynes. 1978. Effect of algal diet and temperature on the biochemical composition of the rotifer, *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture*, 14: 247-260.
- Simon, C.M. 1978. The culture of the diatom *Chaetoceros gracilis* and its use as a food for penaeid protozoal laevae. *Aquaculture*, 14: 105-113.
- Soeder, C.M. 1980. Massive cultivation of microalgae: results and prospects. *Hydrobiologia*, 72: 197-209.
- Sorokin, C. and R.W. Krauss. 1958. The effect of light intensity on the growth rate of green algae. *Plant Physiol.*, 33: 109-113.
- Starodub, M.E., P.T.S. Wong, C.I. Mayfield and Y.K. Chau. 1987. Influence of complexation and pH on individual and combined heavy metal toxicity to a freshwater green alga. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 44, 1173-1180.
- Stein, J.R. 1973. *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurement*. Cambridge University Press, Cambridge, 431 pp.
- Strickland, J.D.H. and T.R. Parsons. 1972. A Practical Handbook of Seawater Analysis. *Bull. Fish. Res. Bd. Can.*, 167: 49-80.
- Terry, K.L. 1982. Nitrate uptake and assimilation in *Thalassiosira weissflogii* and *Phaeodactylum tricornutum*: interaction with photosynthesis and with the uptake of other ions. *Mar. Biol.*, 69: 21-30.
- Teshima, S., S. Yamasaki, A. Kanazawa and H. Hirata. 1983. Effect of water temperature and salinity on eicosapentaenoic acid level of

- marine *Chlorella*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 49: 805.
- Thompson, P.A. 1999. The response of growth and biochemical composition to variations in daylength, temperature and irradiance in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). J. Phycol., 35: 1215-223.
- Thompson, P.A., P.J. Harrison and J.N.C. Whyte. 1990. Influence of irradiance on the fatty acid composition of phytoplankton. J. Phycol., 26: 278-288.
- Ukeles, R. 1980. American experience in the mass culture of microalgae for feeding larvae of the American oyster, *Crassostrea virginica*. In: Algae Biomass: Production and Use, G. Shelef and C.J., Soeder (eds.), Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 287-306.
- Utting, S.D. 1985. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. Aquacult. Eng., 4: 175-190.
- Valenzuela-Espinoza, E., R. Millán-Núñez and F. Nuñez-Cebrero. 1999. Biomass production and uptake by *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. Aquacult. Eng., 20: 135-147.
- Volkman, J.K., M.R. Brown, G.A. Dunstan and S.W. Jeffrey. 1993. The biochemical composition of marine microalgae from the class Eustigmatophyceae. J. Phycol., 29: 69-78.
- Watanabe, T. and R.G. Ackman. 1974. Lipids and fatty acid of the American (*Crassostrea virginica*) and European flat (*Ostrea edulis*) oyster from a common habitat, and after one feeding with *Dicrateria inornata* or *Isochrysis galbana*. J. Fish. Res. Bd. Can., 31: 403-409.

- Watanabe, T., C. Kitajima and S. Fujita. 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture*, 34: 115-143.
- Watanabe, T., T. Arakawa, C. Kitajima and S. Fujita. 1978. Nutritional evaluation of proteins of living feeds used in seed production of fish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 44: 985-988.
- Webb, K.L. and F.L. Chu. 1982. Phytoplankton as a food source for bivalve. In: G. Pruder, C.J. Langdin and D.E. Conkilin (Editors), *Proceeding of the Second International Conference of Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition*. Louisiana State University, Baton Rouge, LA, 272-291pp.
- Whyte, J.N.C. and W.D. Nagata. 1990. Carbohydrate and fatty acid composition of rotifer, *Brachionus plicatilis* fed monospecific diets of yeast or phytoplankton. *Aquaculture*, 89: 263-272.
- Wikfors, G. 1986. Altering growth and gross chemical composition of two microalgal molluscan food species by varying nitrate and phosphate. *Aquaculture*, 78: 33-347.
- Wilson, J.H. 1978. The food value of *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin to the larvae of *Ostrea edulis* L. and *Crassostrea gigas* Thunberg. *Aquaculture*, 13: 313-323.
- Witt, U., P.H. Koske, D. Kuhlmann, J. Lenz and W. Nellen. 1981. Production of *Nannochloris* sp. (Chlorophyceae) in large scale outdoor tanks and its use as a food organism in marine aquaculture. *Aquaculture*, 23: 171-181.
- Wong, P.K. and L. Chang. 1991. Effects of copper, chromium and nickel on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Chlorella pyrenoidosa*. *Envrion. Pollut.*, 72: 127-139.

- Yasuda, K. and N. Taga. 1980. Culture of *Brachionus plicatilis* using bacteria as food. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 46: 933-940.
- 米田傳貴. 1983. 栽培漁業と新養成技術. 濃縮クロレラの生産・保存法と利用. 水産の研究, 2(5):52-58.
- 福所邦彦. 1984. ワムシ培養餌料としてのテトラセルミス. 養殖, 21(6): 104-109.
- 山口勝己. 1992. 微細藻類の利用. 水産学シリーズ. 恒星社厚生閣. 132pp.
- 유성규. 1962. 1961년 9월 충청남도 연안(어청도, 천수만, 군산지역)에 있어서 Microplankton의 양 및 조성에 대한 연구. 中央水試. 干潟地基本調査報告 第二報, 57-72.
- 정영호, 심재형, 이민재. 1965. 한강의 Microflora에 관한 연구. 第一報: 漢江下流의 植物性 Plankton과 海水의 影響. 植物學會誌, 8(4): 7-29.