



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)

수 산 학 석 사 학 위 논 문

타가영양성 *Chlorella* 종의 탐색
및 최적 배양 조건



부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 물 학 과

김 대 근

수 산 학 석 사 학 위 논 문

타가영양성 *Chlorella* 종의 탐색
및 최적 배양 조건

지도교수 허 성 범

이 논문을 수산학석사 학위논문으로 제출함.



2012년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 물 학 과

김 대 근

김대근의 수산학석사 학위논문을 인준함

2011년 12월 일



주 심 이학박사 김 중 명 (인)

위 원 영양학박사 배 승 철 (인)

위 원 이학박사 허 성 범 (인)

목 차

Abstract	ii
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	3
1. 타가영양성 <i>Chlorella</i> 의 선별	3
1. 1. Cell chamber 배양	3
1. 2. 250 mL플라스크 배양	5
2. 최적배양 환경 요인	6
3. 타가영양 배양 및 자가영양 배양의 성장 비교	8
4. 통계처리	8
III. 결과	9
1. 타가영양성 <i>Chlorella</i> 의 선별	9
1. 1. Cell chamber 배양	9
1. 2. 250 mL플라스크 배양	9
2. 최적배양 환경 요인	12
2. 1. 탄소원으로 사용된 유기물 및 유기물 농도	12
2. 2. 배양 온도	16
2. 3. 질소와 인 비율	16
3. 타가영양 배양 및 자가영양 배양 비교	19
3. 1. 세포 성장률	19
3. 2. 세포 크기	19
3. 3. 건조 중량	23
IV. 논의	26
V. 결론	31
VI. 감사의 글	32
VII. 참고 문헌	33

The screening and optimum culture condition
of heterotrophic *Chlorella* species

Dae Geun Kim

Department of Fisheries Biology, The Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

Many phototrophic *Chlorella* species are useful for high value products such as CGF (Chlorella Growth Factor) and carotenoids. However, the growth of phototrophic *Chlorella* is often slow due to light limitation. Some phototrophic *Chlorella* can also grow heterotrophically with organic substrate in dark condition. Heterotrophic culture is easy to control and achieve to the fast growth and high yield of valuable products in mass culture. However, heterotrophic *Chlorella* species are limited.

In this study, thirty-three *Chlorella* species were tested on the growth in heterotrophic condition and three species from freshwater were found as heterotrophic *Chlorella* growing well with glucose in dark condition. The cell size and dry weight of these species in heterotrophic condition were larger and heavier than those in phototrophic condition. The maximum culture biomass of these heterotrophic species attained to 133 mg/L/day.

I. 서 론

미세조류는 광합성을 통해 수계의 생태계를 유지시켜주는 일차 생산자이다. 그들은 광합성을 통해서 매우 가치가 높은 phycobiliprotein, astaxanthin 그리고 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) 같은 물질들을 생성하기도 한다. 또한 영양학적으로도 *Spirulina*나 *Chlorella* 같은 종들은 기존에 에너지원으로 섭취하던 식품을 대체할 만큼 고단백질의 조성을 가진다(Chen, 1996; Chung *et al.*, 1999).

그중 *Chlorella*는 가장 많이 알려진 미세조류로 분류학상 Chlorophyceae강, Chlorococum목, *Chlorella*속으로, 종(species)으로는 *C. vulgaris*와 *C. ellipsoidea*가 널리 알려져 있으며, 2~10 μm 의 구형으로 현미경으로 관찰 가능한 크기이다(Lee, 2007). 이러한 *Chlorella*는 단백질,식이섬유,비타민,미네랄 등이 대량 함유된 영양 식품으로 인정받고 있으며, 다른 식품원료와는 달리 증식 속도가 매우 빠르므로 미래 식품으로 기대되어 많은 연구가 이루어지고 있다(Kim, 2004). 특히 *Chlorella*에 포함된 CGF(Chlorella Growth Factor) 성분은 성장발육, 질병회복 등에 효과가 큰 것으로 보고되었으며, 그 외에도 성인병 치료와 항암제로서의 연구 및 항산화, 미백등의 실험을 통하여 고부가의 제품을 창출할 수 있다(Hasegawa *et al.*, 1994; Justo *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2008).

이뿐만이 아니라 다양한 지질 조성을 가지고 있는 *Chlorella*는 최근 바이오에너지 중 하나인 바이오디젤의 원료로 주목을 받고 있다(Miao and Wu, 2004a,b; Xiong *et al.*, 2008).

일반적으로 *Chlorella*와 같은 거의 대부분의 미세조류는 빛과 수중에 녹아든 이산화탄소를 이용하여 광합성을 하며, 산소와 유기물을 생성하는 자가영양(autotrophic) 방식으로 성장한다. 하지만 그 중 몇 종류는 빛이 약한 환경에서 추가적인 탄소원을 받아들여 대사에 이용하는 복합영양(mixotrophic) 방식으로 성장하기도 하며 심지어 특별한 몇 종은 빛이 전혀 없는 환경에서 유기물만을 탄소원으로 이용하는 타가영양(heterotrophic) 방식으로 성장하기도 한다(Chen, 1996; Lee, 2001).

자가영양 방식으로 미세조류를 배양할 경우에는 빛과 이산화탄소를 이용하기에 생산비가 저렴하고 대기 중의 이산화탄소의 감소라는 긍정적인

기능도 가지지만 고밀도 배양 시 세포 밀도의 증가 및 세포의 대사에 의해 생성된 대사물질들에 의한 광 저해 현상이 나타나 고밀도 배양이 어렵고 넓은 배양지가 필요하다는 단점이 있다(Wen and Chen, 2003).

타가영양 방식으로 미세조류를 배양할 경우에는 광 저해 현상이 없어 고밀도 배양이 가능하며 배양환경의 조작성이 세밀하게 가능하지만 탄소원으로 사용할 유기물을 첨가하는데 드는 추가적인 비용이 소모된다. 특히 발효조라는 배양용기의 특성상 배양할 미세조류를 선별하는데 있어서, 어둠속에서 빛없이 성장하고 분열하는 능력이나, 발효조 내의 환경에서 견디기 위한 세포의 견고성 등 많은 조건이 요구된다(Barclay et al., 1994; Chen, 1996; Wen and Chen, 2003).

미세조류의 산업은 아직 초기단계이며 특히 타가영양배양에 대해서 연구되어진 미세조류 또한 매우 적다(Olaizola, 2003). 결국 이러한 연구가 효과적으로 진행되기 위해서는 타가영양 배양이 가능한 미세조류의 선별 및 그들의 최적배양 환경의 연구가 선행 되어져야 한다.

따라서 본 연구에서는 한국의 연안 및 호소 등에서 채집한 *Chlorella* 종들을 대상으로 타가영양의 조건을 부여하여 타가영양 배양이 가능한 종을 선별하였다. 그 후 타가영양 배양 상태에서 성장이 우수하게 나타난 3종에 대해서 타가영양 배양 시 가장 성장이 좋은 최적 배양 환경조건을 조사하고, 최종적으로 선택된 종에 대해서 자가영양 배양시와 타가영양 배양시의 세포의 성장률, 세포크기의 변화 및 최종 수확시의 생체량을 건조 중량으로 측정하여 비교해 보았다.

II. 재료 및 방법

1. 타가영양성 *Chlorella*의 선별

1. 1. Cell chamber 배양

실험에 사용한 *Chlorella*는 한국해양미세조류은행(KMMCC)에 보관중인 종을 크기, 채집지역, 18s rRNA결과 등을 참고로 하여 서로 차이를 보이는 종 가운데 해수산 *Chlorella* 13종, 기수산 *Chlorella* 6종, 담수산 *Chlorella* 14종으로 총 33종을 선정하였다(Table. 1).

*Chlorella*는 $60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 빛을 24시간 연속조명 하는 자가영양 실험구와 1% glucose를 첨가하여 $60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 빛을 12:12 L:D cycle을 주며 조명하는 복합영양 실험구, 1% glucose를 첨가하여 빛이 없이 배양하는 타가영양 실험구, glucose를 첨가하지 않은 암 배양 대조구의 4실험구로 구분하여 배양하였다.

배지는 f/2 배지(Guillard and Ryther, 1962)의 조성을 기준으로 담수산은 0 psu, 기수산은 16 psu, 해수산은 32 psu 로 염분을 구분하였다. 배지는 고압증기멸균법(121℃, 15분)으로 멸균하였으며 glucose는 증류수에 녹여 50% 용액으로 만들어 고압증기멸균 후 클린벤치 상에서 첨가하여 갈변현상을 방지하였다.

배양은 12 hole cell chamber의 한 hole에 배지 3 mL와 log phase로 배양중인 *Chlorella* 1 mL를 접종하였다. 배양중 배지 내 수분의 손실을 막기 위해 실링처리한 후 23℃에서 정지 배양하였다. 모든 실험구는 3반복으로 실험하였다.

세포밀도 측정을 위한 시료는 클린벤치 상에서 멸균된 1 mL 스포이드를 사용하여 한 방울 분주 하였으며, 성장 측정은 접종당일 세포밀도를 측정 후 5일 간격으로 최대 15일간 혈구계산판(haemocytometer)으로 측정하여, 실험도중 타가영양 실험구의 세포 밀도가 급격히 감소한 경우 실험을 종료하였다.

Table 1. *Chlorella* species tested in the study

Species	Origin	Size(μm)	Habitat
c1-1	Namhae	5.1 $\pm$ 1.2	Marine
c1-2	South sea	3.7 $\pm$ 1.5	Marine
c1-3	Gampo	4.0 $\pm$ 1.0	Marine
c1-4	Asan bay	4.7 $\pm$ 0.8	Marine
c1-5	Haeundae	11.2 $\pm$ 2.2	Marine
c1-6	East sea	6.4 $\pm$ 2.1	Marine
c1-7	Nakdong	3.0 $\pm$ 1.1	Marine
c1-8	South sea	3.6 $\pm$ 1.4	Marine
c1-9	Buan	4.9 $\pm$ 1.7	Marine
c1-10	Jindong	5.9 $\pm$ 1.7	Marine
c2-1	Jinhae bay	3.8 $\pm$ 1.5	Freshwater
c2-2	Busan	2.8 $\pm$ 0.9	Freshwater
c2-3	Hwajinpo	3.0 $\pm$ 1.3	Estuary
c2-4	Busan	3.0 $\pm$ 0.8	Estuary
c2-5	UTEX26	3.2 $\pm$ 1.4	Freshwater
c2-6	Hwajinpo	7.6 $\pm$ 2.7	Marine
c3-1	Nakdong rv.	3.5 $\pm$ 1.5	Estuary
c3-2	Nakdong rv.	2.4 $\pm$ 0.7	Estuary
c3-3	Nakdong rv.	6.8 $\pm$ 2.1	Marine
c3-4	Busan	3.8 $\pm$ 0.9	Estuary
c3-5	Jinhae bay	8.3 $\pm$ 1.6	Marine
c4-1	Sunwo co.	3.8 $\pm$ 1.6	Freshwater
c4-2	Busan	4.3 $\pm$ 1.3	Freshwater
c4-3	Nakdong rv.	11.2 $\pm$ 2.0	Freshwater
c4-4	Jinhae bay	3.7 $\pm$ 1.2	Freshwater
c4-5	UTEX 259	3.3 $\pm$ 1.2	Freshwater
c4-6	Upo	3.5 $\pm$ 1.0	Freshwater
c4-7	Nakdong rv.	4.6 $\pm$ 1.2	Freshwater
c4-8	Myungsun co.	3.6 $\pm$ 1.1	Freshwater
c5-1	UTEX 247	4.3 $\pm$ 1.5	Freshwater
c5-2	UTEX 20	3.7 $\pm$ 1.4	Freshwater
c5-3	Busan	6.2 $\pm$ 0.5	Freshwater
c5-4	Hwajinpo	4.5 $\pm$ 1.6	Estuary

1. 2. 250 mL플라스크 배양

Cell chamber 배양시 타가영양 배양 및 복합영양 배양 조건에서 성장을 보인 종들을 선별하여 250 mL플라스크에 100 mL f/2 배지를 분주하여 cell chamber 배양시과 같은 조건으로 4 실험구로 나누어 배양을 하였다. 모든 실험구는 세포농도 10^6 cells/mL의 밀도로 접종하여 3반복으로 실험하였다.

250 mL플라스크 배양 결과 타가영양 배양 실험구의 세포 밀도가 glucose를 첨가 하지 않은 암 배양 대조구의 세포 밀도 보다 높게 나온 경우 타가영양 성장 가능 종으로 선택 하였다. 12:12 L:D cycle로 배양한 복합영양 실험구의 세포 밀도가 자가영양 배양 실험의 세포 밀도 값보다 높게 나온 경우 복합영양 성장 가능 종으로 선택 하였다. 최대 세포 밀도 일을 기준으로 일간성장률(Specific growth rate, SGR)을 계산하였다.(Guillard, 1973; $SGR/day = 3.322 \times \log(N_2/N_1)/(t_2-t_1)$, N_2 : t_2 시의 세포 수, N_1 : t_1 시의 세포 수)



2. 최적 배양 환경 요인 분석

2. 1. 탄소원으로 사용된 유기물 및 유기물 농도

탄소원으로 glucose, glycerol, acetate를 대상으로 하였다. 250 mL 플라스크에 분주된 100 mL JM배지(Thompson *et al.*, 1988; Table. 2)에 탄소원을 1%와 2%의 농도로 첨가하였고 탄소원을 아무것도 넣지 않은 배지를 대조구로 두었다. 탄소원별 및 탄소원의 농도별 *Chlorella*의 성장률을 비교하여 타가영양 배양시 최적 탄소원을 선별하였다.

Glucose는 추가적으로 3%, 4%, 5%를 첨가한 배지를 이용해 재 실험을 하여 glucose농도별 미세조류의 성장률을 확인하였으며 모든 실험은 28℃의 어둠상태에서 정지 배양하였다.

2. 2. 온도

최적 배양 온도를 확인하는 실험은 250 mL 플라스크에 100 mL JM배지를 분주 한뒤 1% glucose를 첨가하여 24℃, 26℃, 28℃, 30℃에서 배양하였으며, 30℃에서 성장을 보인 중에 한해 32℃에서 위와 같은 방법으로 배양하여 성장률을 비교하였다.

2. 3. 질소와 인 비율

최적 질소와 인의 농도 비율을 확인하기 위해 26℃의 온도에서 1%의 glucose를 첨가하여, JM배지에 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 와 NaNO_3 의 형태로 첨가되는 질소 양인 0.0166 g/L와 KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 의 형태로 첨가되는 인 양인 0.0107 g/L를 질소 대 인 비율이 1:1인 대조구(control)로 두고 각각 질소와 인을 2배 3배로 첨가하여 질소와 인을 각기 2:1, 2:2, 2:3, 3:1, 3:2, 3:3 배로 첨가해 배지내 질소와 인의 함량에 따른 성장률을 조사하였다. 위의 실험 모두 미세조류를 10^6 cells/mL의 밀도로 초기 접종하여 3반복으로 실험하였다.

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

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

3. 타가영양 배양 및 자가영양 배양 결과 비교

질소를 2배수로 첨가한 JM배지에 1% glucose를 첨가하여 어둠속에서 26℃로 타가영양 배양 시킨 실험구와 같은 조건에서 질소를 1배로 첨가한 대조구 JM배지에서 배양한 실험구, 연속적인 $60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 빛을 조사하여 26℃, 질소를 2배수로 첨가한 JM배지에서 배양한 자가영양 실험구와 같은 조건에서 질소를 1배로 첨가한 대조구 JM배지에서 배양한 실험구로 구분하여 배양하였다. 각기 10^6 cells/mL 의 밀도로 초기 접종하여 3반복으로 7일간 배양하였다.

매일 앞서서와 동일한 방법으로 세포 개체수를 측정하였다. 세포 크기는 매일 무작위로 50개체씩 장축과 단축의 크기를 측정(Moticam pro 205A, Motic)하여 평균 세포의 크기를 구하였다. 배양 마지막 날에는 $1.2 \mu\text{m}$ glass microfiber filter (GF/C, Whatman)를 60℃에서 2시간동안 건조한 뒤 중량을 측정한 후 배양액 25 mL를 여과하여, 다시 2시간 건조 후 중량을 측정하는 방식으로 건조중량을 측정하였다.

4. 통계처리

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

III. 결 과

1. 타가영양성 *Chlorella*의 선별

1. 1. Cell chamber 배양

실험에 사용한 해수산 *Chlorella* 13종, 기수산 *Chlorella* 6종, 담수산 *Chlorella* 14종 중 타가영양성을 나타낸 종은 담수산 *Chlorella* 속 13종, 기수산 *Chlorella* 속 4종으로 총 17종이 나타났으며 담수산 *Chlorella*에서 타가영양성을 나타내는 종이 가장 많았다. 해수산 *Chlorella*에서는 타가영양성을 나타내는 종이 나타나지 않았으며 3종의 복합영양적 성향을 가진 종만 확인되었다(Table 3).

1. 2. 250 mL플라스크 배양의 성장률

타가영양성 *Chlorella* 선별 실험 결과 나타난 타가영양 종 17종과 복합영양으로 나타난 해수산 *Chlorella* 3종을 선택하여 250 mL 플라스크에 배양하였다. 배양 후 SGR값을 구하여 유의성검정을 통해 성장률을 순서대로 나타내본 결과 C4-8번과 C4-1번이 타가영양 배양시 1.19와 1.17로 유의하게 가장 높은 SGR값을 보였다($P < 0.05$). 그 뒤를 이어 C4-3, C4-4번 등이 높은 값을 나타내었다. 복합영양 배양에서는 C4-3이 1.18로 가장 높은 SGR값을 보였다($P < 0.05$). 타가영양배양의 성장률이 우수한 종이 자가영양배양 및 복합영양배양에서도 높은 성장률을 나타내는 것으로 나타났다(Table 4).

Table 3. Culture results of *Chlorella* species cultivated in cell chamber

Habitat	Species	Autotrophic	Mixotrophic	Heterotrophic
Marine	c1-1	O		
	c1-2	O		
	c1-3	O		
	c1-4	O		
	c1-5	O	O	
	c1-6	O	O	
	c1-7	O		
	c1-8	O		
	c1-9	O		
	c1-10	O	O	
	c2-6	O		
	c3-3	O		
	c3-5	O		
Estuary	c2-3	O		O
	c2-4	O	O	O
	c3-1	O		
	c3-2	O		
	c3-4	O		O
	c5-4	O	O	O
Freshwater	c2-1	O		O
	c2-2	O	O	O
	c2-5	O		O
	c4-1	O		O
	c4-2	O		O
	c4-3	O		O
	c4-4	O		O
	c4-5	O		O
	c4-6	O		
	c4-7	O		O
	c4-8	O		O
	c5-1	O	O	O
	c5-2	O	O	O
	c5-3	O	O	O

Open circle(o) means real growth

Table 4. Specific growth rate of *Chlorella* species cultured under different three trophic conditions in 250 mL flask at 23 °C

<i>Chlorella</i> species	Trophic conditions			Order of growth
	Autotrophic	Mixotrophic	Heterotrophic	
C1-5	0.6823±0.0172 ^{de}	0.7044±0.0130 ^f	0.0000±0.0000 ⁿ	M=A>H
C1-6	0.6652±0.0212 ^e	0.6422±0.0099 ^h	0.0000±0.0000 ⁿ	M=A>H
C1-10	0.7017±0.0219 ^d	0.6793±0.0206 ^g	0.0000±0.0000 ⁿ	M=A>H
C2-1	0.3010±0.0136 ^l	0.8668±0.0033 ^e	0.5861±0.0454 ^f	M>H>A
C2-2	0.5946±0.0204 ^h	0.9333±0.0111 ^d	0.4657±0.0017 ^h	M>A>H
C2-3	0.3374±0.0064 ^k	0.2887±0.0080 ^k	0.3036±0.0108 ⁱ	A>H=M
C2-4	0.5281±0.0059 ⁱ	0.6069±0.0089 ⁱ	0.2523±0.0075 ^j	M>A>H
C2-5	0.6111±0.0188 ^{gh}	0.9464±0.0080 ^d	0.5124±0.0249 ^g	M>A>H
C3-4	0.4861±0.0172 ^j	0.5983±0.0027 ^{ij}	0.5211±0.0148 ^g	M>H>A
C4-1	0.5810±0.0219 ^h	1.1804±0.0040 ^a	1.1732±0.0063 ^a	H=M>A
C4-2	0.7914±0.0206 ^{ab}	1.1735±0.0136 ^a	0.6529±0.0234 ^e	M>A>H
C4-3	0.7543±0.0259 ^c	1.1794±0.0070 ^a	0.9957±0.0172 ^b	M>H>A
C4-4	0.8078±0.1794 ^a	1.0379±0.0050 ^c	0.9493±0.0027 ^c	M>H>A
C4-5	0.6290±0.0138 ^{fg}	1.0946±0.0068 ^b	0.9419±0.0022 ^c	M>H>A
C4-7	0.7648±0.0192 ^{bc}	1.1588±0.0149 ^a	0.8847±0.0471 ^d	M>H>A
C4-8	0.6515±0.0375 ^{ef}	1.0333±0.0074 ^c	1.1908±0.0147 ^a	H>M>A
C5-1	0.2946±0.0202 ^l	0.5837±0.0186 ^j	0.6306±0.0110 ^e	H>M>A
C5-2	0.2506±0.0046 ^m	0.2471±0.0144 ^l	0.2004±0.0538 ^k	H=M=A
C5-3	0.2848±0.0065 ^l	0.0522±0.0359 ^m	0.0678±0.0346 ^m	A>H=M
C5-4	0.5076±0.0097 ^{ij}	0.2617±0.0101 ^l	0.1595±0.0052 ^l	A>M>H

Values in the same colon means not sharing a common superscript are significantly difference (P<0.05)

2. 최적 배양 환경 요인

2. 1. 탄소원으로 사용된 유기물 및 유기물 농도

대조구로 탄소원을 아무것도 넣지 않고 배양한 실험구와 glycerol과 acetate를 첨가하여 배양한 실험구에서는 1%와 2%의 농도 실험구 모두 성장이 나타나지 않았으며, glucose를 첨가하여 배양한 모든 실험구에서는 성장이 나타났다(Fig. 1). Glucose를 1%첨가한 실험구와 2%를 첨가한 실험구는 배양 후 4일까지 빠르게 세포 밀도의 증가를 보인 후 감소하였으며 3%, 4%, 5%의 glucose를 첨가한 실험구는 배양 초기에는 저조한 성장을 보이다 4일을 전후로 빠르게 세포밀도가 증가하는 경향을 보였다.(Fig. 2)

가장 높은 세포밀도에 도달한 날을 기준으로 SGR값을 산출하여 유의성 검정을 한 결과 C4-8은 glucose농도 1%와 2%가 가장 높은 SGR값을 보이며 3%, 4%, 5%와 유의한 차이를 보였다($P<0.05$). C4-4의 경우 glucose농도 1%, 2%, 5%가 가장 높은 SGR값을 보이며 3%, 4%와 유의한 차이를 보였다. C4-3의 경우 glucose농도 2%가 가장 높은 SGR값을 보였으며 1%가 두 번째로 높은 SGR값을 보였다(Table 5). 따라서 glucose의 적정 농도는 초기에 1% 또는 2%를 첨가하여 배양하는 것이 좋으며, 지속적인 성장을 위해 성장이 저하되는 4-5일 후 1-2%의 glucose를 재 첨가해주는 것이 필요할 것으로 보여 진다.

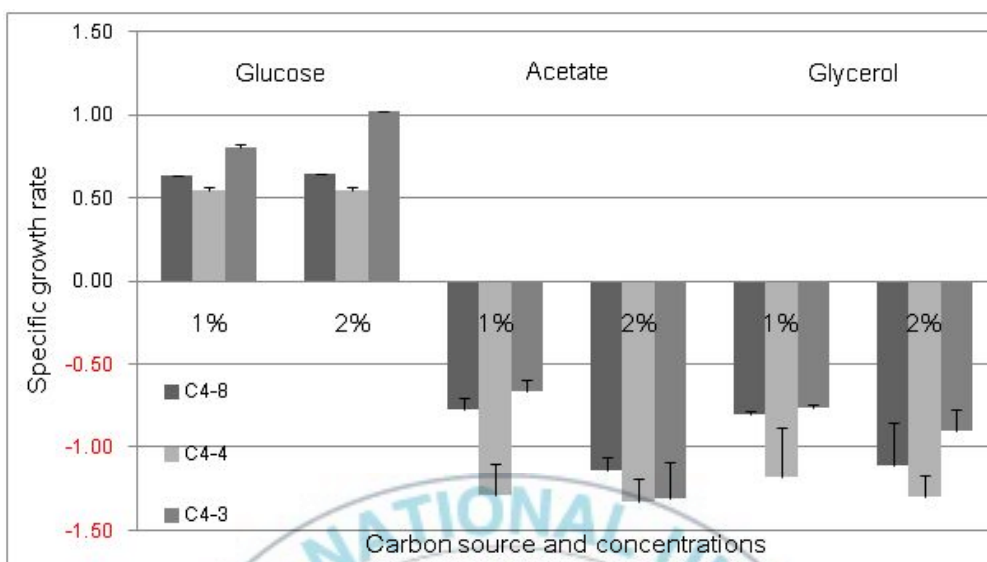


Fig. 1. Specific growth rate of three species of heterotrophic *Chlorella* with different of carbon source and concentrations at 28°C with JM media.

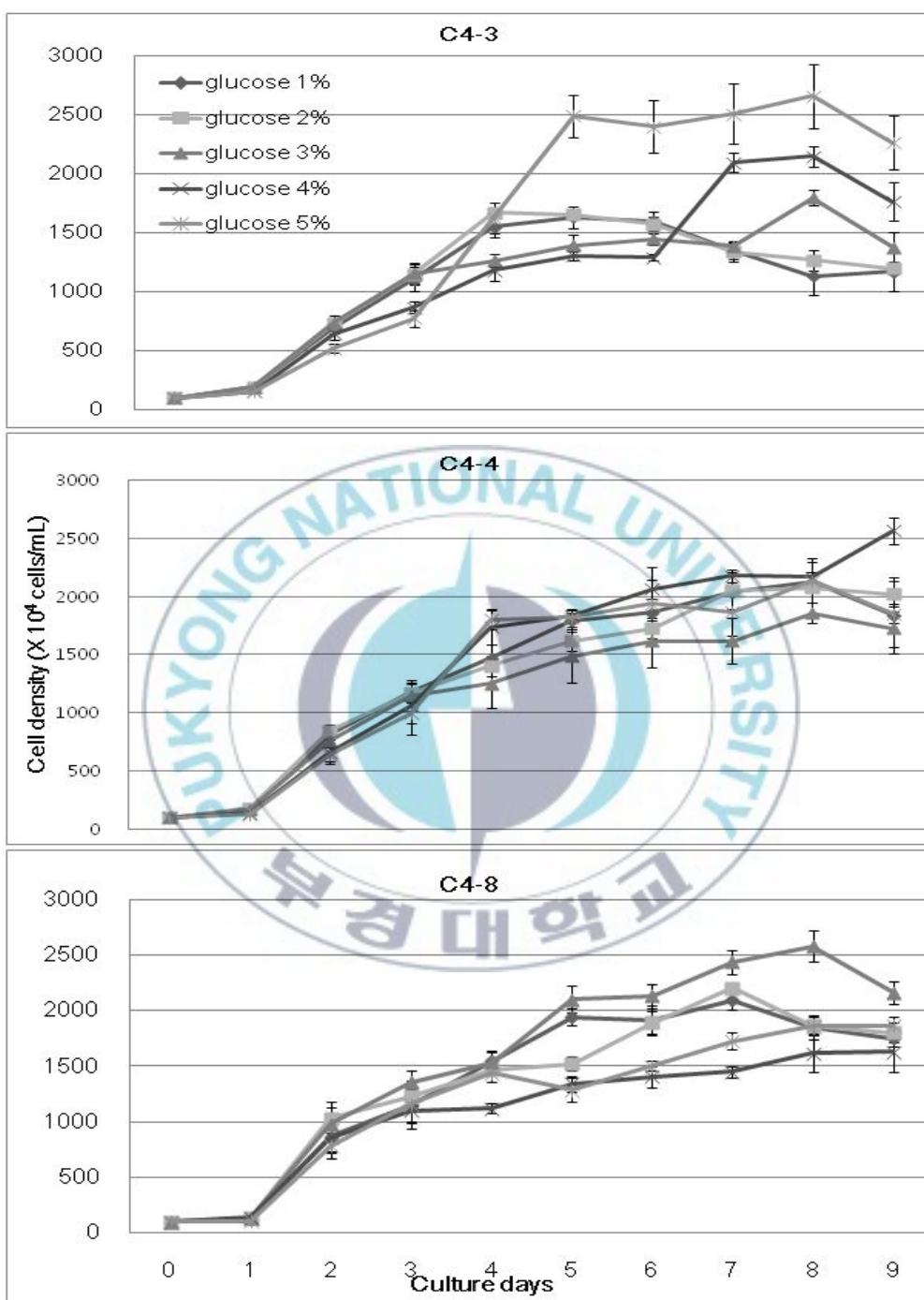


Fig. 2. Growth of three species of heterotrophic *Chlorella* with different concentrations of glucose.

Table 5. Specific growth rate(SGR) of three species of heterotrophic *Chlorella* with different concentrations of glucose

Species	Glucose concentrations	SGR	Peak day in growth
C4-3	1%	0.8059±0.0126 ^b	5
	2%	1.0161±0.0059 ^a	4
	3%	0.5211±0.0028 ^e	8
	4%	0.5533±0.0078 ^d	8
	5%	0.5910±0.0188 ^c	8
C4-4	1%	0.5508±0.0122 ^a	8
	2%	0.5469±0.0119 ^{ab}	8
	3%	0.5270±0.0060 ^{bc}	8
	4%	0.5216±0.0027 ^c	9
	5%	0.5516±0.0170 ^a	8
C4-8	1%	0.6269±0.0045 ^a	7
	2%	0.6374±0.0018 ^a	7
	3%	0.5861±0.0095 ^b	8
	4%	0.4464±0.0189 ^d	9
	5%	0.4678±0.0026 ^c	9

Different letter in specific growth rate of each species means significantly difference (P<0.05)

2. 2. 배양온도

C4-4, C4-8 의 경우 26℃에서 가장 높은 성장을 보였으며, 접종 후 2일 정도의 준비기를 가진 뒤 급격히 성장하는 모습을 보였다. C4-3의 경우 28℃에서의 성장이 초반에는 높다가 4일을 기점으로 저조해지는 모습을 보인 반면 26℃와 24℃는 8일까지 지속적으로 성장하는 모습을 보였다 (Fig. 3).

C4-3과 C4-8의 경우 30℃에서는 최대 밀도가 500×10^4 cells/mL을 넘지 못하는 매우 저조한 성장을 보여 두 종은 30℃이상의 온도에서는 성장하지 못하는 것으로 판단되었다. 반면 C4-4의 경우 30℃에서도 28℃와 비슷한 완만한 성장을 보였으며 추가적으로 진행된 32℃에서 배양한 실험에서도 3-4일까지는 완만한 성장곡선을 나타내었다.

2. 3. 질소와 인 비율

C4-3번과 C4-4번종의 경우 기존 JM배지내의 질소원인 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, NaNO_3 를 각각 기존배지의 2배로 접종한 N:P 2:1의 배지에서 가장 높은 성장을 보였으며 C4-8번의 경우 질소원과 더불어 인산원인 KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 의 농도 역시 2배로 접종한 N:P 2:2의 배지에서 가장 높은 성장을 보였다.

세종 모두 질소와 인을 3배수 넣은 N:P 3:3 배지와 질소 3배수, 인을 2배수 넣은 N:P 3:2배지에서는 가장 낮은 성장을 보였다. 그 외 대부분의 실험구에서 뚜렷하게 높은 성장은 나타나지 않았다 (Fig. 4).

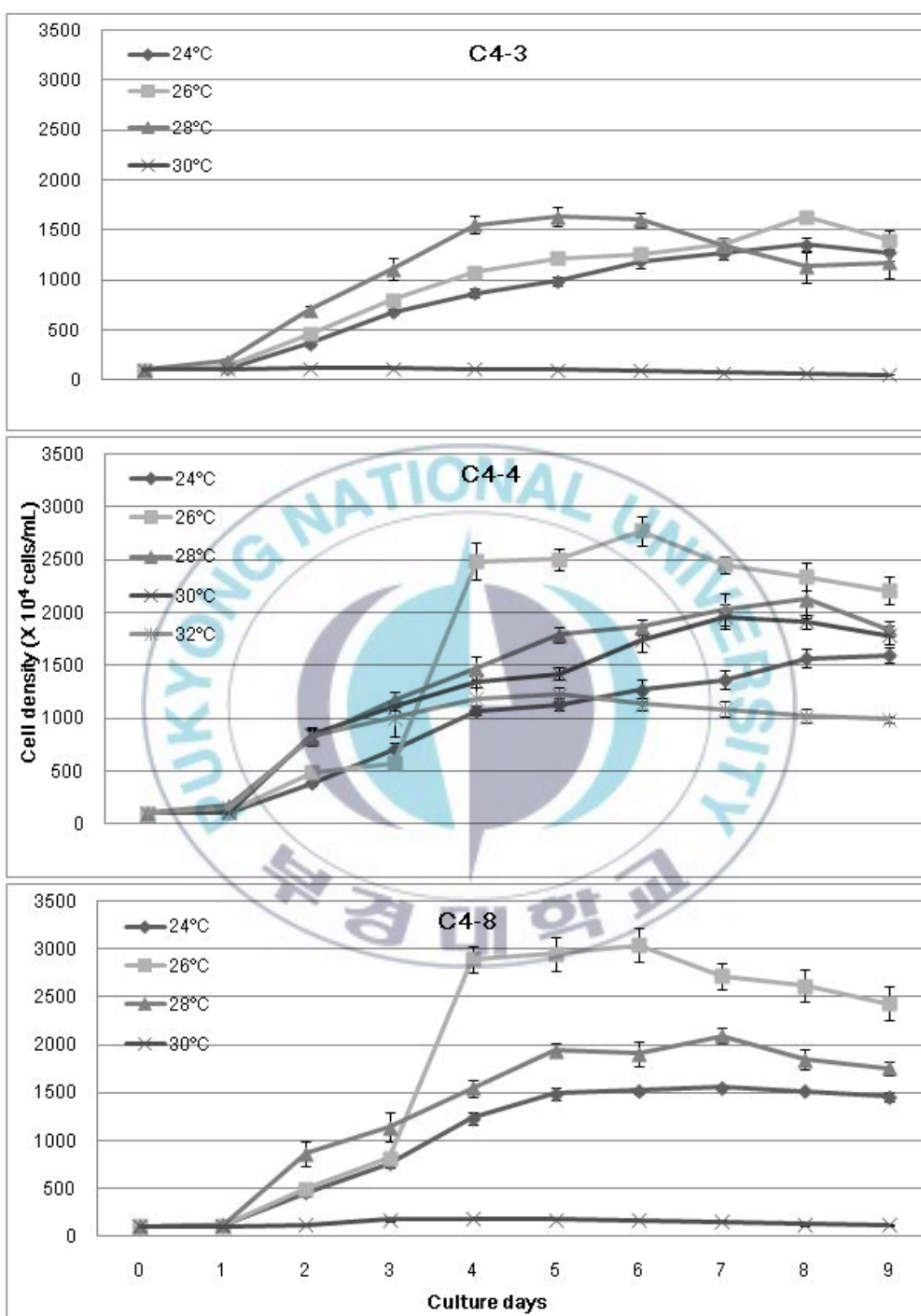


Fig. 3. Growth of three species of heterotrophic *Chlorella* with different temperatures in JM media added 1% glucose.

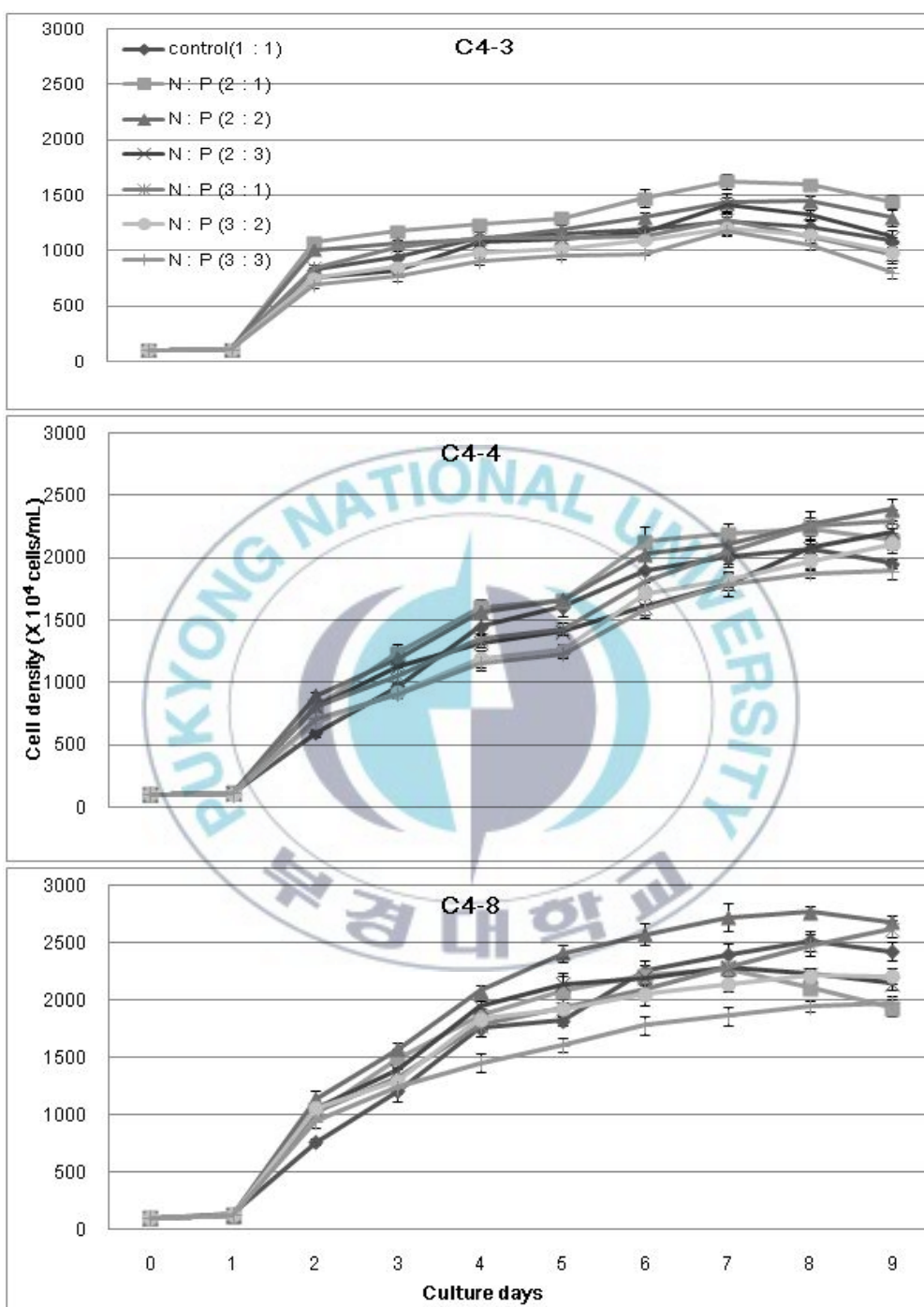


Fig. 4. Growth of three species of heterotrophic *Chlorella* with different concentrations of nitrogen-phosphorous ratio at 26°C in JM media.

3. 타가영양 배양 및 자가영양 배양의 성장 비교

3. 1. 세포 성장률

질소와 인의 비율을 C4-3은 2:2, C4-4와 C4-8은 2:1의 비율로 농도를 높여서 배양한 실험값과, 기존의 JM배지를 이용하여 배양한 실험구의 배양 후 5일째의 SGR값을 구해본 결과 타가영양 배양시 에서는 질소의 값을 더 높게한 실험구가 기존의 JM배지를 이용한 실험구보다 높은 SGR값을 나타냈으며, 자가영양 배양시 에서는 2배수의 질소가 포함된 배지에서 배양한 실험구가 더 낮은 SGR값을 보였다(Fig. 6).

세종 모두 자가영양 배양 시와 타가영양 배양시의 성장은 접종 후 첫날에는 비슷한 값을 보였으나, 접종 후 2일째부터는 지속적으로 타가영양 배양 실험구가 자가영양 배양 실험구에 비해 2배 이상 높은 세포밀도를 보였다(Fig. 5). SGR값 역시 타가영양 배양 실험구가 자가영양 배양 실험구에 비해서 유의하게 높은 SGR값을 나타내었다(Fig. 6).

3. 2. 세포크기

세포의 크기는 각 세포마다 분열 및 성장의 시기가 달라 같은 실험구 내에서도 0.5 μm 정도의 차이를 보여 오차범위가 크게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 세포 크기의 평균을 내어서 비교한 결과 세 종 모두 타가영양 배양시의 세포의 크기가 자가영양 배양시의 세포의 크기보다 많게는 1 μm 까지 크게 나타나는 경향을 확인할 수 있었다 (Fig. 7).

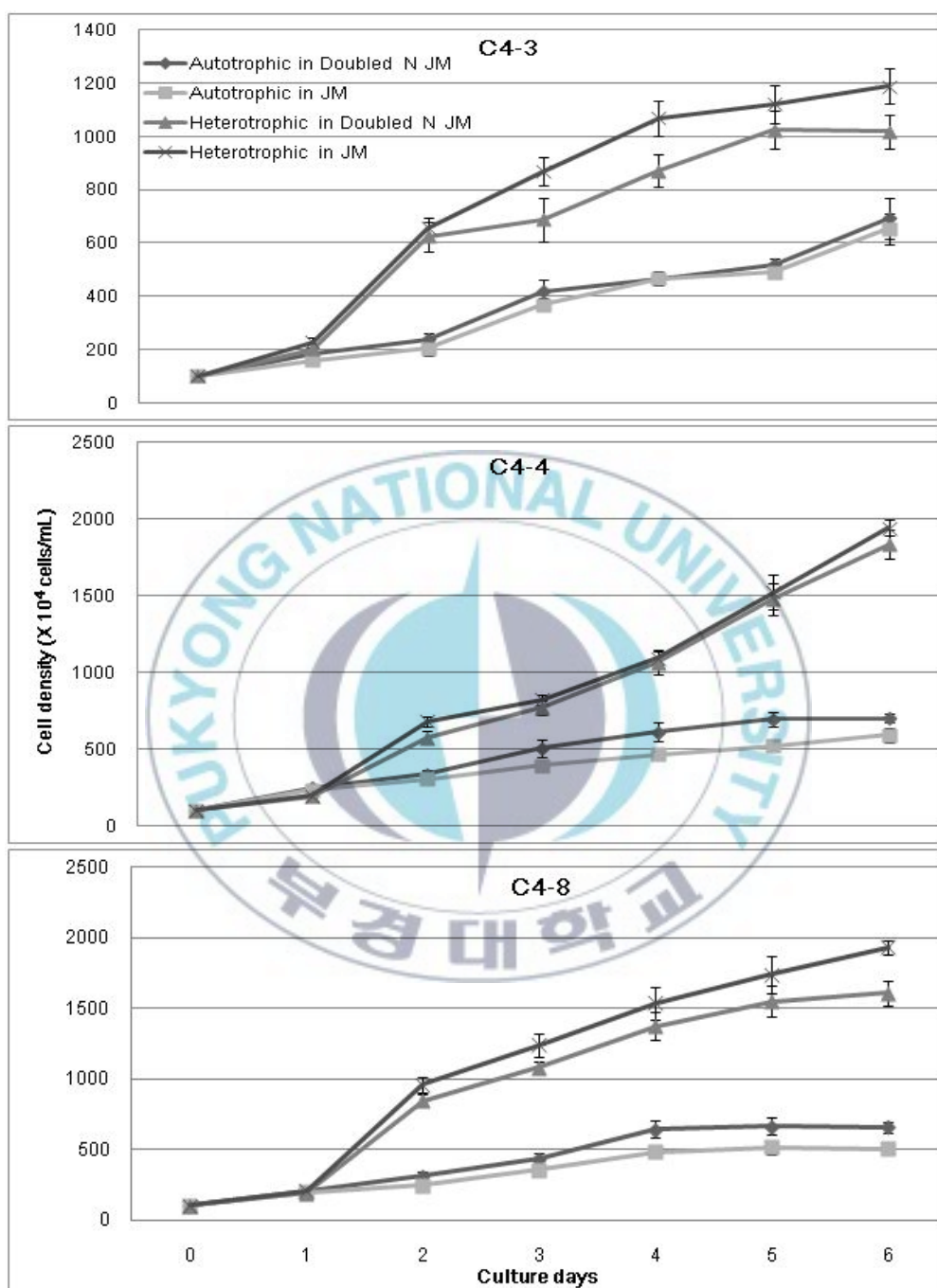


Fig. 5. Comparison of growth of *Chlorella* species cultured in autotrophic and heterotrophic condition at 26°C with different concentrations of nitrogen and phosphorus of JM media.

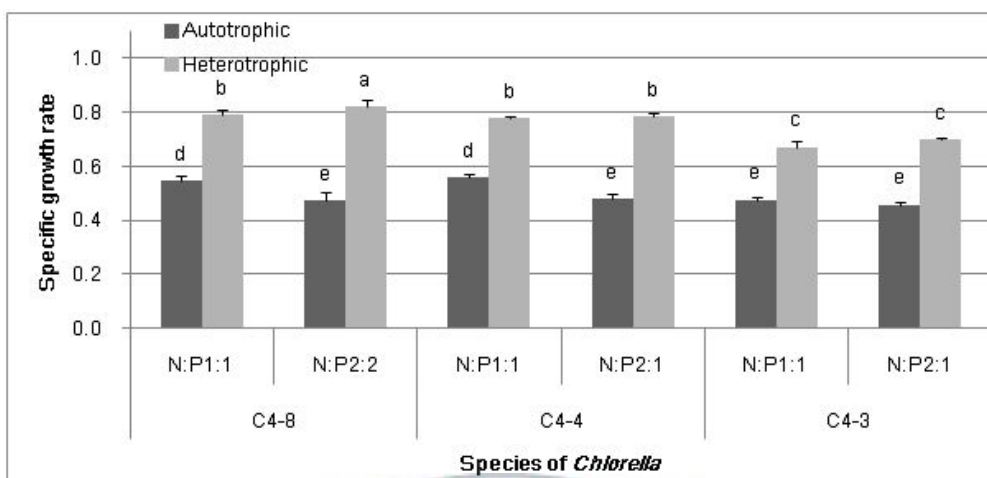


Fig. 6. Specific growth rate of *Chlorella* cultured under autotrophic and heterotrophic condition at 26°C with different concentrations of nitrogen and phosphorus of JM media.



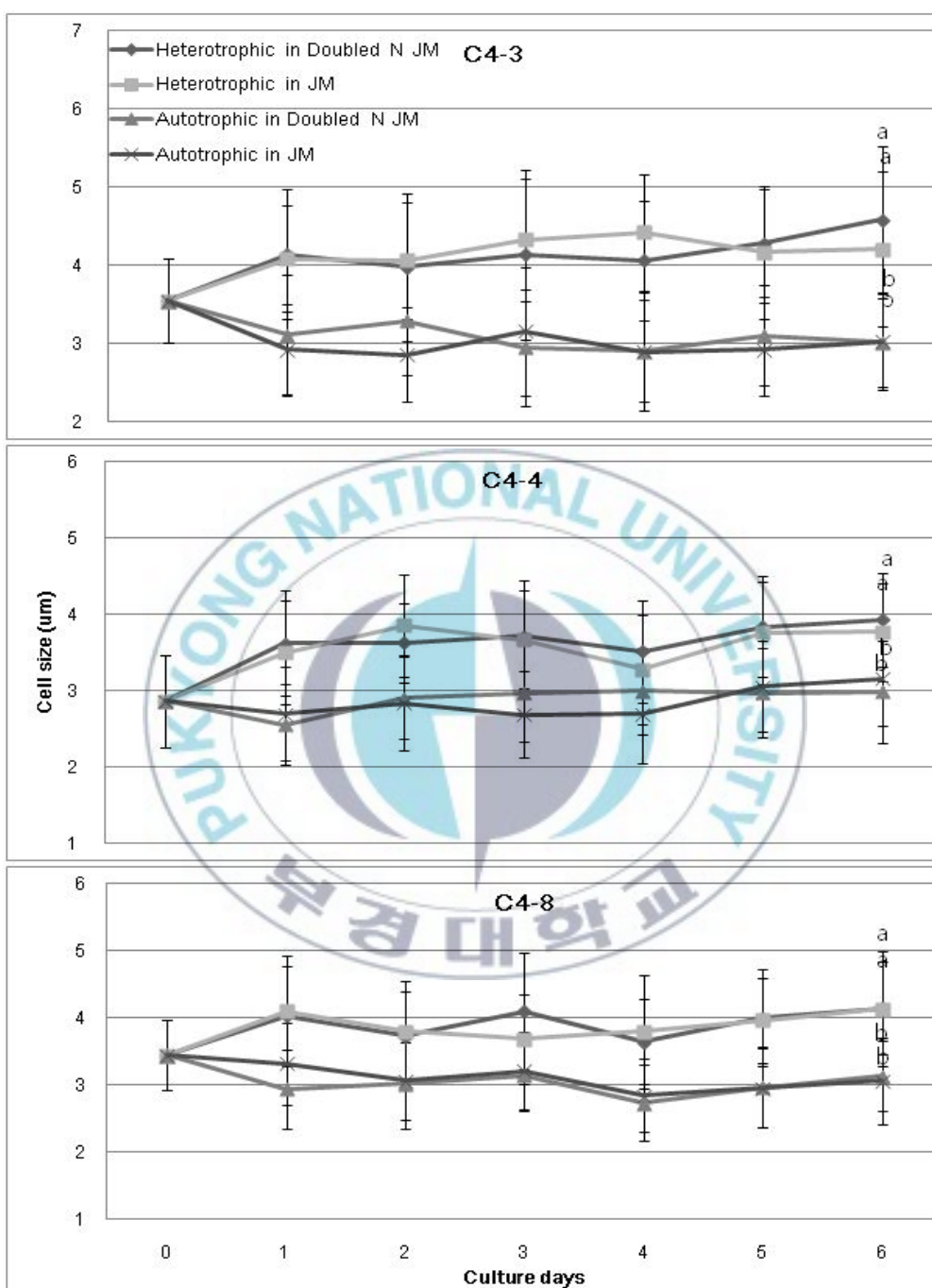


Fig. 7. Variations of cell size of *Chlorella* species cultured in autotrophic and heterotrophic condition at 26°C with different concentrations of nitrate and phosphorus of JM media.

3. 3. 건조중량

세 종의 한 세포당 건조중량의 값은 모두 타가영양 배양 상태의 실험구가 자가영양 배양 실험구에 비해 유의하게 2-3배 더 높은 값을($P<0.05$) 보였다(Fig. 8). C4-8번 종의 경우는 타가영양배양상태의 실험구에서 질소를 2배수로 넣지 않은 대조구가 0.0316 ng으로 가장 높았으며, 반면에 C4-4번 종과 C4-3번 종의 경우는 질소를 2배수로 넣은 배지에서 유의하게 높은 값을 나타내었다. 세포의 건조중량은 C4-3이 0.0680 ng으로 유의하게 가장 높은 값을 나타내었다($P<0.05$).

세종의 6일간의 배양 후 25 mL를 수확한 건조중량 값은 질소를 2배수로 넣어준 C4-3번 종이 유의하게 가장 높은($P<0.05$) 0.02 g을 수확하였으며(0.8 g/L) 그 다음으로 질소를 2배수 넣어준 C4-4종이 0.017 g (0.68 g/L), 대조구로 JM배지를 사용한 C4-3종이 0.015 g (0.6 g/L)순서로 나타났다(Fig. 9).



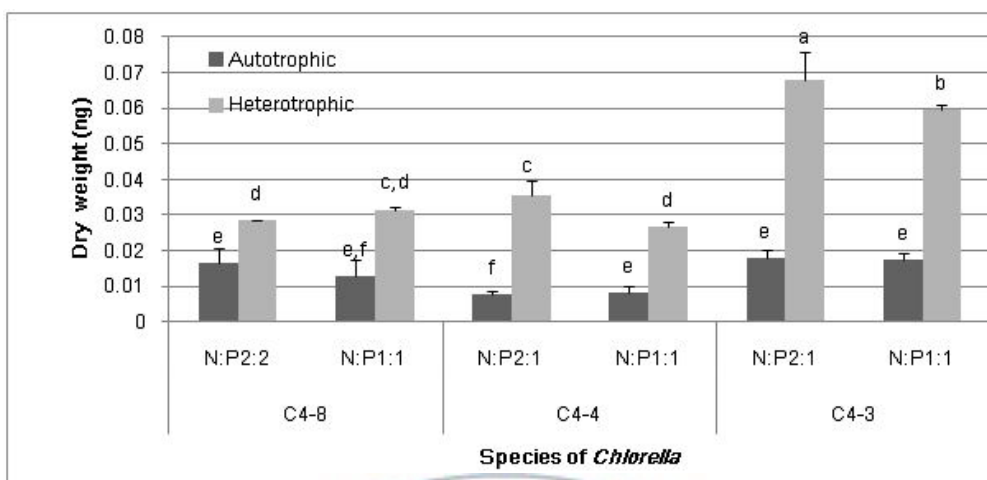
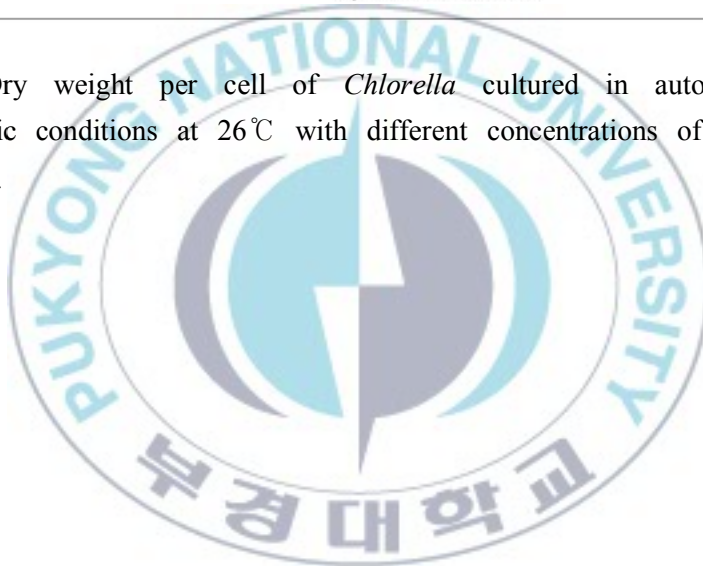


Fig. 8. Dry weight per cell of *Chlorella* cultured in autotrophic and heterotrophic conditions at 26°C with different concentrations of nitrate and phosphorus.



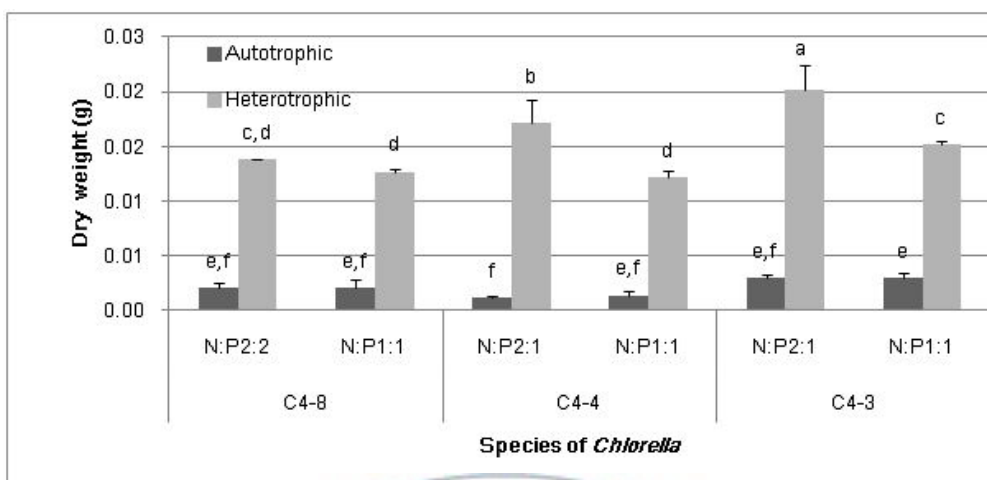
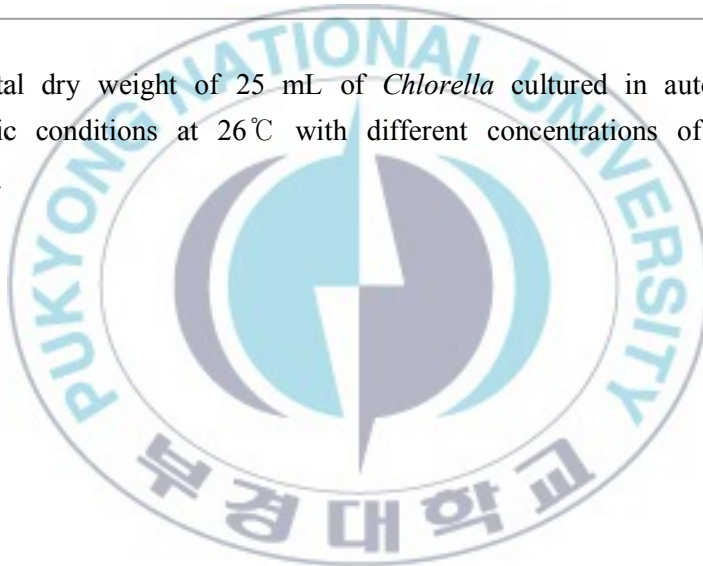


Fig. 9. Total dry weight of 25 mL of *Chlorella* cultured in autotrophic and heterotrophic conditions at 26°C with different concentrations of nitrate and phosphorus.



IV. 논 의

미세조류를 산업적으로 활용하는데 있어서 우선적으로 해결되어야 할 문제는 미세조류를 대량 배양하는 것이다. 대부분의 미세조류는 빛과 수중에 녹아든 이산화탄소를 이용해서 자가영양 방식으로 성장하지만 이러한 방식으로 대량배양을 할 경우 다른 세포에 의해 광 투과성이 저해되는 현상 때문에 목표로 하는 만큼의 세포밀도를 얻기가 힘들다. 따라서 이를 보완할만한 배양방법이 필요로 하며 그 대안중 하나가 타가영양 방식으로 배양하는 것이다. 타가영양 방식으로 미세조류를 배양할 경우 광투과성의 저해에 따른 세포배양의 제약이 없어지며, 미세조류를 배양 공정의 체계적인 조절과 고밀도 배양이 가능하며 수확시 비용이 낮다(Barclay *et al.*, 1994; Wen and Chen, 2003). 하지만 이러한 장점에도 불구하고 타가영양 배양시에는 발효조의 암상태에서 배양하기 때문에, 이러한 환경에서 견딜 수 있는 미세조류의 확보가 가장 먼저 이루어져야 한다. 또한 추가적인 탄소원의 비용을 상쇄할 수 있을 만큼 고밀도 배양이 가능하고, 부가가치가 높아 산업적으로 경쟁력이 있어야 한다.

따라서 타가영양 배양으로 이미 많이 연구되었고, astaxanthin와 lutein 같은 carotenoids와 핵산 복합체인 CGF (Chlorella growth factor)같은 고부가의 산물을 생산하는 *Chlorella*는 타가영양적 미세조류를 탐색하는데 있어서 우선적으로 연구할만한 가치를 가진다(Chen, 1996; Lee, 1997; Wen and Chen, 2003).

본 연구에서 사용된 33 종의 *Chlorella*는 호소, 하구, 연안과 같은 다양한 지역에서 채집된 종들이다. 이들을 타가영양적 상태에서 배양 실험한 결과 담수지역에서 채집된 종과 기수지역에서 채집된 종은 C3-1, C3-2, C4-6번 3 종만 빼고 나머지 17 종이 모두 타가영양 배양 상태에서도 성장하는 것이 확인되었다. 반면에 해수에서 채집된 13 종의 *Chlorella*는 모두 성장하지 않았다. 이는 일반적으로 1 mgC/L이하인 빈영양상태의 해양의 환경보다는 유기물이 지속적으로 유입되는 담수지역인 호소나 기수지역에서 타가영양적인 상태에서 성장할 수 있는 능력을 가진 종들을 더 많이 발견할 수 있음을 보여준다. 또한 종마다 차이는 있으나 실험에 사용된 대부분의 종들이 채집된 후 길게는 10년 이상 자가영양 배양 상태로

보존을 해왔음에도 불구하고 타가영양 배양조건으로 배양이 가능한 종과 성장하지 못하는 종이 나타나는 것으로 보아 유기물을 이용하는 능력은 종마다 특이적인 것으로 보여진다(Gladue and Maxey, 1994; Chen, 1996; Lee, 2001).

250 mL플라스크에 배양한 결과에서는 C2-1, C3-4, C4-1, C4-3, C4-4, C4-5, C4-7, C4-8, C5-1번의 9개의 종들이 자가영양 배양에 비해 타가영양 배양에서 더 높은 성장을 보였으며, 성장을 보인 위 종들 중 C4-8, C5-1번 종을 제외하고는 모두 타가영양 배양보다 복합영양 배양에서 가장 성장이 좋음을 나타내었다. 이를 통해 타가영양 배양상태로 지속적으로 배양하는 것보다, 광주기를 주어서 배양하여 자가영양 배양상태와 타가영양 배양상태를 복합적으로 만들어주는 것이 더 좋은 성장을 유도할 수 있을 것으로 생각된다(Lee, 2001). 또한 C4 그룹에 속한 종들이 타가영양 배양시의 성장이 가장 우수한 결과를 나타내어, 타가영양 배양이 적합한 *Chlorella* 종임을 확인할 수 있었다.

C4그룹 중 실험 결과값을 토대로 성장이 우수한 C4-3, C4-4, C4-8번의 3 종의 *Chlorella*를 선택하여 최적 배양 환경실험을 진행하였다. C4-3종은 낙동강에서 채집된 담수종으로 채집시 사이즈가 $11.2 \pm 2.0 \mu\text{m}$ 으로 매우 크게 나타난 종이나 자가영양 배양상태로 보관되어있던 종의 사이즈를 직접 측정한 값은 $3.4 \pm 0.5 \mu\text{m}$ 의 값을 나타내었다. 세포가 거대화되는 현상은 타가영양 배양시 나타나는 현상으로 보고되고 있으며, 따라서 C4-3종은 채집시 타가영양적인 환경에서 채집 되어졌을 것으로 사료된다(Griffiths, 1965). C4-4종은 진해만에서 채집된 담수종으로 채집시 사이즈는 $3.7 \pm 1.2 \mu\text{m}$ 이나 실험시 측정한 값은 $2.9 \pm 0.6 \mu\text{m}$ 이었다. C4-8종은 명선해양에서 구입한 농축 *Chlorella* 담수종으로 구입시 측정한 세포값은 $3.6 \pm 1.1 \mu\text{m}$ 이고 실험시 실측한 값은 $3.4 \pm 0.5 \mu\text{m}$ 로 비교적 비슷한 크기였다.

일반적으로 미세조류를 타가영양 배양시 사용되는 탄소원으로는 glucose와 같은 당당류와 glycerol과 acetate 같은 대사관련 물질들을 많이 사용한다(Lee, 2001; de Swaaf *et al.*, 2003a,b; Ip and chen, 2005).

본 실험에서 glycerol과 acetate를 각각 1%, 2%를 첨가하여 배양한 실험구에서는 3 종 모두 에서 성장이 나타나지 않았으며, glucose를 이용한 실험구에서만 성장이 나타나 실험에 사용된 3 종은 모두 glucose만 탄소

원으로 사용할 수 있음이 나타났다. 이는 기존의 연구결과와 비교해 보았을 때 타가영양 배양이 가능한 종이라도 첨가된 탄소원의 종류에 따라 성장을 및 대사활동에 차이를 보이는 점과 일치하며, 타가영양 배양이 가능한 종들 중에서도 각기 선호하는 유기물이 다름을 확인할 수 있었다(Yokochi *et al.*, 1998; de Swaaf *et al.*, 2003a).

glucose를 1%, 2%, 3%, 4%, 5% 첨가한 실험구에서는 3 종이 비슷한 경향을 보였다. 1-2%의 glucose를 첨가한 실험구가 초반에 더 빠른 세포의 증가를 보이며 상대적으로 4-5%는 저조한 모습을 보였는데, 이는 4% 이상의 glucose 농도에서는 배양 초기 세포의 성장이 저해를 받는 것으로 보여 진다(Xiong *et al.*, 2008). 성장률 그래프를 통해 1-2% glucose를 첨가한 실험구에서의 성장이 3-4일을 전후로 느려지는 반면 4-5%의 glucose를 첨가한 실험구의 성장은 지속적으로 증가하였다. 이는 최대밀도에 도달한 배양일이 1-2%의 실험구에 비해 4-5%의 실험구가 더 높다는 것을 통해서도 확인할 수가 있었다. 5%의 glucose 농도에서 *Chlorella*를 배양시 긴 준비기를 가지며 대수증식기로 진입하는 시간은 길지만 대신 glucose 농도가 높아 1-2%의 glucose 농도의 실험구에 비해 상대적으로 오랜 기간 성장을 보이는 것을 확인한 기존의 보고와도 일치한다(Shi *et al.*, 1999).

또한 1%의 glucose를 첨가한 실험구가 3-4일경부터 저조한 성장을 보이는 것으로 보아 접종 후 3-4일 후에는 1% glucose를 첨가한 실험구에 탄소원 으로 사용된 glucose의 배지 내 농도가 낮아져서 *Chlorella*의 성장에 저해를 받은 것으로 생각된다. 또한 특징적으로 C4-8의 경우 glucose 농도 3%에서 초기부터 빠른 성장을 보이며 지속적으로 세포밀도가 높게 나타나, 이 종의 경우 glucose 농도 3%까지는 효율적인 성장이 가능한 것으로 판단된다. 이러한 결과들을 생각해볼 때 배양을 위해 탄소원 으로 사용된 glucose의 최적 농도는 종별로 조금씩은 차이가 있으나 초기 접종시 3%이하의 농도를 이용해 배양을 시작한 뒤 3-4일을 간격으로 1%의 glucose를 추가로 투여하여 지속적인 성장을 유도하는 것이 가장 좋을 것으로 판단된다.

온도의 경우 C4-3번 종은 6일까지는 28℃에서 가장 빠른 성장을 보였으며, 그 이하의 온도인 26℃, 24℃에서는 28℃에 비해 천천히 증가하는 모습을 보여 이 종의 최적 배양온도는 26-28℃ 부근으로 판단된다. C4-4

번 종과 C4-8번 종은 모두 26℃에서 가장 빠른 성장을 보였으며, 3일정도 성장이 서서히 증가하는 준비기를 가진 후에 하루 동안 폭발적으로 증가하는 대수 증식기를 보였다. 26℃에 비해 그 이상의 온도에서는 성장률이 더 낮아지는 것으로 보아 이 종의 최적 배양온도는 26℃ 부근으로 판단된다. 이 3 종의 최적 배양 온도에 대한 실험의 결과는 일반적으로 보고되어지고 있는 타가영양 배양시의 최적 온도인 26-28℃와 비슷한 결과이다(Wu and Shi, 2007; Shi *et al.* 2002; Xiong *et al.*, 2008). 3 종중 C4-3, C4-8번은 30℃에서는 성장률이 극도로 낮아져 30℃이상의 온도에서는 성장할 수 없는 것으로 판단된다. C4-4번 종의 경우에는 30℃에서도 비교적 완만한 성장을 보이며, 심지어 32℃에서도 접종 후 3-4일 까지는 28℃에 비해 그다지 성장률이 낮지 않은 성장을 보여주어 실험에 사용한 3 종 중 가장 고온 에서 성장이 가능한 종으로 생각되어진다.

배지 내 질소와 인의 농도와 함께, 질소와 인의 비율 역시 미세조류의 초기 성장, 지질 및 지방산의 합성에 영향을 미치는 요인으로 보고되어 있다(Liu and Lee, 2000; Choi *et al.*, 2002; Tripathi *et al.*, 2002; Wen and Chen, 2003). 실험 시 일반적으로 담수산 미세조류에 사용되는 JM배지의 질소와 인 함량을 기준으로 2, 3배씩 질소와 인을 더 첨가하여 실험한 결과, 성장률에는 많은 차이를 보이지는 않는 것으로 나타났다. 이는 성장 시 탄소원으로 사용된 glucose의 초기 접종량을 1%로 동일하게 첨가하였기 때문에, 빠른 성장을 하는데 있어서 필요한 탄소원의 부족이 영향을 준 것으로 판단되어진다. 따라서 추후 실험 시 탄소원인 glucose 농도의 변화를 주어 실험한다면 다른 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다(Ip and Chen, 2005a).

질소와 인의 배지 내 농도가 3배로 높게 첨가되자, 3 종 모두에서 기준이 되는 JM배지에 비해 성장이 다소 저해되는 성향을 확인할 수 있었다. 질소만 2배로 첨가한 경우에는 *Chlorella*의 성장에 긍정적인 영향을 주는 것으로 나타났다. 따라서 배지내의 고농도의 질소와 인의 농도는 세포의 성장에 부정적인 영향을 주는 것으로 사료된다.

상기의 타가영양 배양 결과를 이용해서 타가영양 배양과 자가영양 배양에서의 성장을 비교한 결과 성장률은 타가영양 배양이 자가영양 배양에 비해 더 높게 나오는 것을 확인할 수 있었다. 세포의 크기를 비교하는 실험에서도 타가영양 배양시의 세포의 크기가 자가영양 배양시보다 더 커지

는 것을 확인할 수 있었는데, 이는 기존에 보고되었던 타가영양 배양 시 세포가 커진다는 결과와 일치하였다(Griffiths, 1965). 실험에 사용된 3 종의 *Chlorella*의 세포의 크기는 세포의 분열이나 성장에 따라서 같은 배양 구내에서도 큰 차이를 보여 오차범위가 높게 나타났다. 하지만 실험 시 측정된 50개체수의 평균을 구한 값은 타가영양 배양의 세포가 확실히 크게 나타나는 경향을 보여, 적어도 일주일간의 배양결과에서는 타가영양 배양시 세포의 크기가 자가영양 배양시의 세포의 크기보다 크게 성장한다는 것을 확인할 수 있었다.

타가영양 배양시 세포 밀도는 C4-4번 종과 C4-8번 종이 배양 6일째 세포의 밀도가 약 2000×10^4 cells/mL의 값을 보인 반면 C4-3번 종은 약 1200×10^4 cells/mL로 다소 낮은 세포 밀도를 보였다. 총 세포의 수확 시 건조중량의 값은 C4-3번 종이 가장 높은 값인 0.02 g/25 mL로 나타났다. 또한 이 값을 통해 *Chlorella* 한 세포 당 건조 중량 값을 환산해 보면 C4-3번 종의 한 세포 당 건조 중량 값이 0.068 ng으로 C4-4의 0.035 ng이나 C4-8의 0.031 ng의 값보다 많게는 두 배 이상 차이를 보였다. 이는 C4-3번 종의 세포의 크기가 다른 두 종에 비해 평균 1 μm 이상 크게 나타난 것과 일치한다. 따라서 C4-3번 종이 성장률은 다른 두 종에 비해 다소 낮지만 세포의 크기가 커서 동일한 배양기간 내에 더 많은 수확량을 얻을 수 있었던 것으로 판단된다.

V. 결 론

*Chlorella*에서 발견되는 타가영양 상태에서 살아가는 능력은 후천적으로 습득 하는 것이 라기 보다는 선천적으로 나타나는 종의 특색으로 보여진다. 따라서 타가영양 배양이 가능한 종으로 보고된 종들과 유전적으로 가까운 종들을 중심으로 연구를 진행한다면 더욱 많은 타가영양 배양 가능 종을 찾을 수 있을 것이다. 또한 *Chlorella*중에서 타가영양 배양에 적합한 종은, 연안이나 대양과 같은 해수에서 채집된 종 보다는 호소나 하천, 기수역 같은 담수 지역에서 채집된 종이 타가영양 종이 많은 것으로 사료된다. 따라서 실험에서 타가영양으로 밝혀진 종들과 유전적으로 가까운 담수 종을 위주로 분석할 필요가 있다. C4-4종의 경우 30℃이상의 고온에서도 성장이 가능한 고온 종으로 나타나, 여름철 대량 배양 시 효과적으로 사용 가능할 것으로 판단된다. 타가영양 배양 시 세포의 크기가 많게는 2 μm 까지 커지는 현상을 통해서 수확에 응용할 수 있을 것으로 보여지며, 실험 중 중 C4-3종이 배양 시 가장 큰 세포의 크기를 보였다. 타가영양 배양 시 26℃의 배양온도에서 1%의 glucose와 질소농도를 2배로 첨가한 배지에서 자가영양 배양에 비해 약 2배 이상의 높은 수확량이 가능하였다. 추후 초기 배지 내 질소와 탄소원의 농도변화를 통한 실험과, 지속적으로 배지 내 탄소원의 농도를 유지시켜 배양하는 실험을 진행한다면 더욱 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

VI. 감사의 글

가장 먼저 지금의 행복하고 즐거운 길을 걸어가도록 언제나 곁에서 인도하여 주시는 하나님께 감사를 드립니다.

부족한 저를 사랑과 인내로 가르치시고 아무것도 모르는 저에게 이렇게 재미있고 즐거운 학문의 길을 지도하여 주신 허성범 교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 가르쳐주신 많은 학문적 지식들, 인생에 대한 성찰들을 언제나 기억하면서 살아가겠습니다!

또한 실험실에서 실험하는데 있어서 많은 도움을 준 진희 누나, 주연이 누나, 기숙이 누나, 혜정이 누나, 민진이, 하나뿐인 동기 성진이, 현수에게 감사하다는 말을 전하고 싶습니다.

부족한 논문을 보시고 아낌없이 지도해주신 김종명 교수님과 배승철 교수님께 감사를 드리고 수산생물학에 대해 많은 것들을 가르쳐 주신 조재운 교수님, 김동수 교수님, 장영진 교수님, 김창훈 교수님, 남윤권 교수님, 공승표 교수님께 감사를 드립니다.

힘들 때 마다 함께 모여 즐거움을 나누던 친구들 현우, 병욱, 찬희, 진희, 태경, 지훈이 에게도 고맙단 말을 전하며, 또한 열심히 꿈을 향해 달려가자고 했던 은진이 에게도 고맙고 힘내란 말을 전합니다.

언제나 바른길을 나아가도록 도움을 주신 정관 명성 교회 김을만 목사님과 사모님, 그리고 여러 권사님, 집사님들, 그리고 우리 사랑스러운 청년회 모두 감사하고 사랑한단 말을 전합니다.

그리고 언제나 옆에서 힘을 주던 올 이쁜 성자에게 언제나 고맙고 사랑한단 말을 전합니다.

아낌없는 사랑으로 지금까지 저를 키워주시고 많은 실수와 잘못에도 불구하고 언제나 든든한 내 편이 되어 주신 부모님께 언제나 감사하고 사랑한다는 말과 함께 이 논문을 바칩니다.

VII. 참 고 문 헌

- Barclay WR, Meager KM and Abril JR. 1994. Heterotrophic production of long-chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms. *J Appl Phycol* 6, 123-129.
- Chen F. 1996. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends Biotechnol* 14, 421-426.
- Choi YE, Yun YS and Park JM. 2002. Evaluation of factors promoting astaxanthin production by a unicellular green alga, *Haematococcus pluvialis*, with fractional factorial design. *Biotechnol Prog* 18, 1170 - 1175.
- Chung WJ, Wang MS, Choi SI, Kim JK and Jeong BC. 1999. High cell density cultures of micro-algal *Dunaliella bardawil*. *Korean J Biotechnol Bioeng* 14, 160-166.
- Duncan DB. 1955. Multiple-range and multiple F test. *Biometrics* 11, 1-42.
- de Swaaf ME, Pronk JT and Sijtsma L. 2003a. Fed-batch cultivation of the docosahexaenoic-acid-producing marine alga *Cryptothecodinium cohnii* on ethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* 61, 40 - 43.
- de Swaaf ME, Sijtsma L and Pronk JT. 2003b. High-cell-density fed-batch cultivation of the docosahexaenoic acid producing marine alga *Cryptothecodinium cohnii*. *Biotechnol Bioeng* 81, 666 - 672.
- Guillard RL and Ryther JH. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can J Microbiol* 8, 229-239
- Guillard RL. 1973. Growth measurement. In: *Handbook of Phycological Methods*. J.R. Stein, ed. Cambridge University press, London, 302-306.
- Griffiths DJ. 1965. The accumulation of carbohydrate in *Chlorella vulgaris* under heterotrophic conditions. *Ann Bot N S* 29, 347-357.
- Gladue RM and Maxey JE. 1994. Microalgal feeds for aquaculture. *Journal of Applied Phycology* 6, 131 - 141.
- Hasegawa T, Okuda M and Nomoto K. 1994. Augmentation of the resistance against *Listeria monocytogenes* by oral administration of a hot water extract of *Chlorella vulgaris* in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 16, 191-202.
- Ip PF and Chen F. 2005. Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark. *Proc Biochem* 40, 733 - 738.

- Justo GZ, Silva MR and Queiroz ML. 2001. Effects of the green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal ehrlich ascites tumor transplantation in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 23, 119-132.
- Kim JS. 2004. Preparation of chlorella drinks and its quality characteristics. *Korean J Food & Nutr* 17, 382-387.
- Kim HJ, Kim IH and Lee JH. 2008. Biological activities of ethanol extract from the seawater algae, *Chlorella ellipsoidea* C020. *Korean J Biotechnol Bioeng* 23, 125-130.
- Lee MC. 2007. The effects of chlorella supplements for human. *International Journal of Coaching Science* 9, 31-40.
- Lee YK. 1997. Commercial production of microalgae in the Asia-Pacific rim. *J Appl Phycol* 9, 403-411.
- Lee YK. 2001. Microalgal mass culture system and methods: their limitation and potential. *J Appl Phycol* 13, 307-315.
- Liu BH and Lee YK. 2000. Secondary carotenoids formation by the green alga *Chlorococcum* sp.. *J Appl Phycol* 12, 301 - 307.
- Miao XL and Wu QY. 2004a. High yield of bio-oil production from fast paralysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *J Biotechnol* 110, 85-93.
- Miao XL, Wu QY. 2004b. Fast paralysis of microalgae to produce renewable fuels. *J Anal Appl Pyrolysis* 71, 855-863.
- Olaizola M. 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomol Eng* 20, 459-466.
- Shi XM, Liu HJ, Zhang XW and Chen F. 1999. Production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* at various glucose concentrations in heterotrophic cultures. *Process Biochemistry* 34, 341-437.
- Shi XM, Jiang Y. and Chen F. 2002. High-yield production of lutein by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic fed-batch culture. *Biotechnol Proc* 18, 723-727.
- Thompson JC, Rhodes and I Pettman. 1988. Natural Environmental Research Council Culture Collection of Algae and Protozoa-Catalogue of Strains Freshwater Biology Association (U.K.), 22.
- Tripathi U, Sarada R and Ravishankar GA. 2002. Effect of culture conditions on growth of green alga *Haematococcus pluvialis* and astaxanthin production. *Acta Physiol Plant* 24, 323-329.
- Wen ZY and Chen F. 2003. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnol Adv* 21, 273-294.
- Wu ZY and Shi XM. 2007. Optimization for high-density cultivation of heterotrophic *Chlorella* based on a hybrid neural network model. *Lett*

Appl Microbiol 44, 13-18.

Xiong W, Li XF, and Wu QY. 2008. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. Applied Microbiology and Biotechnology 78, 29 - 36.

Yokochi T, Honda D, Higashihara T and Nakahara T. 1998. Optimization of docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium limacinum* SR21. Appl Microbila Biotechnol 49, 72-76.

