

먹이종류에 따른 Rotifer, *Brachionus rotundiformis*의 고밀도 배양

박흥기 · 김성구* · 박기영 · 박영제**

강릉대학교 해양생명공학부, *부경대학교 생물공학과, **국립수산진흥원 강릉수산종묘배양장

High Density Cultivation of Rotifer, *Brachionus rotundiformis* in the Different Diets

Huem Gi PARK, Sung Koo KIM*, Kie Young PARK and Young Je PARK**

Faculty of Marine Bioscience & Technology, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea

*Department of Biotechnology and Bioengineering, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

**Kangnung Hatchery, National Fisheries Research and Development Institute, Kangnung 213-800, Korea

The experiment was carried out in a 10 l vessel in order to evaluate the growth and nutritional quality of rotifer, *Brachionus rotundiformis* fed by different diets (Freshwater *Chlorella*, Marine *Chlorella* and ω -yeast) for the high density cultivation. The maximum densities for the rotifer fed on the marine *Chlorella*, freshwater *Chlorella* and ω -yeast were 10,900~12,400, 9,190~10,600 and 2,390~2,750 inds./ml, respectively. Therefore, the maximum densities for the rotifer fed on the marine *Chlorella* and freshwater *Chlorella* were higher than that for rotifer fed on the ω -yeast. The essential n-3 highly unsaturated fatty acid in rotifer fed on the marine *Chlorella* was 8.71% which was slightly lower than that in rotifer fed on the ω -yeast, 9.14%, while it was higher than that in the rotifer fed on freshwater *Chlorella*, 4.45%. This result indicated that marine *Chlorella* could be appropriate diet for the high density cultivation of rotifer.

Key words: *Brachionus rotundiformis*, high density cultivation, *Chlorella*

서 론

최근, 우리나라에서는 많은 해산 어류종묘 배양장과 국·도립배양장이 있으며 이곳에서는 중요어종의 종묘생산 및 방류가 이루어지고 있다. 그러나 이들 어종의 종묘생산과 방류효과를 높이기 위해서는 건강한 종묘와 방류개체수 증대가 절실히 요구되고 있으며 이를 위해서는 자어의 초기 먹이생물인 rotifer의 질적 및 양적인 중요성은 증대되고 있는 실정이다.

현재 많은 종묘배양장에서 하루에 필요한 rotifer의 최대량은 50~100억개체로 기존의 rotifer배양가능한 개체밀도가 수백개체/ml이므로 그 양을 확보하기위해서 수백톤의 배양수조가 필요하며 이것은 높은 관리비와 시설비로 종묘생산원가를 높게 하는 원인이 될 수 있다. 따라서 이러한 rotifer 배양방법의 단점을 보완하고 많은 양의 rotifer를 확보하기위해 최근 吉村 等 (1998)과 吉村 (1995a, b)은 rotifer배양시 산소가스공급, 현탁부유물질제거장치, 자동먹이공급장치 및 pH제어 등을 통하여 1ton수조에서 안정적인 고밀도 (10,000개체/ml)배양 시스템을 개발하였다.

그러나 이들은 고밀도 배양시 담수산 농축 *Chlorella*를 먹이로 공급하였는데, 이 경우 배양된 rotifer의 고도불포화지방산 부족으로 고밀도 배양후 영양강화제를 이용하여 2차 영양강화한 후 자어의 먹이로 공급해야하는 단점이 있다고 보고하였다 (中尾·萩原, 1995; 吉松·林, 1997a, b). 따라서 rotifer 고밀도 배양중에 높은 성장률을 유지하면서 고도불포화지방산의 함량을 높일수 있는 먹이개발은 고밀도 배양 system의 공정을 간편하게 할수 있는 매우 중요한 과제이다.

본 연구는 rotifer배양에 많이 사용되고 있는 여러 농축 먹이를 이용하여 고밀도 배양시 rotifer의 성장과 지방산 조성을 조사하였다.

재료 및 방법

먹이에 따른 rotifer 고밀도 배양

Rotifer는 울진종묘배양장에서 배양되고 있는 *Brachionus rotundiformis* (이전엔 S-type으로 호칭)를 실험에 이용하였다. 실험수조는 20 l원형수조 (배양용량 10 l)를 이용하였고 공기공급은 소형 공기 공급장치를 이용하여 각 수조에 0.2 VVM (통기량/배양수량/분)를 공급하였다. 수온은 각 수조에 1 KW 히터를 이용하여 24℃로 조절하였다. 배양수의 염분은 15‰이였으며, 점종밀도는 1,000개체/ml내외로 하였다. 수조내의 부유물질을 제거하기 위해 플랑크톤 네트 (mesh size 1.5 mm, 20×30 cm) 1장을 설치하였고 하루에 두 번 세척하여 다시 배양수조에 넣어 주었다. Rotifer계수는 입체현미경하에서 rotifer 개체밀도가 200개체/ml전후로 되도록 희석한 후 3회 계수하였고 계수는 매일 두 번 (9:00, 21:00) 실시하였다. 또한 배양수의 용존산소와 pH를 측정하기 위해 산소측정기 (YSI, Model 57)와 pH측정기 (DSM, Model DP-215)를 이용하였다.

실험에 이용된 먹이는 해수 농축 *Chlorella*, 담수 농축 *Chlorella* (*Chlorella*, Ind. Co. Ltd., Japan), 유지효모 (이화유지 주식회사)을 이용하였다. 해수 *Chlorella*는 한국미세조류은행에서 배양되고

본 연구는 부경대학교 해양산업개발연구센터를 통한 한국과학재단 우수연구센터 98년도 지원금 (97K3-1506-01-01-3)에 의한 것이다.

있는 *Chlorella ellipsoidea* (KMCC-C-20)를 50톤 수조에서 배양 한후 고속연속원심분리기를 이용하여 농축시켜 실험에 이용하였다. 먹이량은 rotifer 1,000개체당 건조중량 0.232 mg (담수 *Chlorella* 8,000천만 cells)를 기준으로 정량펌프 (Eyela, Model MP-N)를 이용해서 자동공급하였다. 또한 사육수조내의 거품을 제거해 주기 위해서 소포제 (한국다우코닝, LS303)을 0.0632 g/rotifer 1,000개체 /ml를 먹이에 첨가하였다. 실험은 2회 반복하였다.

고밀도 배양시 먹이 종류에 따른 rotifer 지방산 분석

먹이종류에 따른 rotifer 고밀도 배양시 지방산 분석은 rotifer 밀도가 감소할 때 rotifer를 수확한 후, 담수로 깨끗이 세척한 후 -75 °C에 보관하였다. 이렇게 냉동된 시료를 진공동결건조시켜 Bligh and Dyer (1959)의 방법에 따라 지질을 추출하여 Metcalfe and Schmitz (1949)의 방법에 따라 methylation 하여 gas chromatography (Shimadzu GC-17A)로 rotifer의 지방산 조성을 분석하였다.

결 과

고밀도 rotifer 배양에 있어서 먹이종류에 따른 rotifer의 성장 및 배양수의 pH와 용존산소의 변화는 Fig. 1에 나타내었다. 실험 I과 II에서 rotifer 최고밀도는 해수 *Chlorella*와 담수 *Chlorella* 공급구에서 배양 84시간째 각각 10,900~12,400개체/ml, 9,190~10,600개체/ml로 나타났고 유지효모를 공급한 구에서는 배양 60시간째 최고밀도는 2,390~2,750개체/ml로 해수 *Chlorella*와 담수 *Chlorella* 공급구보다 매우 낮게 나타났다.

실험 I과 II에서 pH의 변화를 보면 담수 *Chlorella* 공급구의 경우 pH는 배양시간이 경과할수록 증가하였으며 배양종료시에는

8.30과 8.33의 범위였다. 그러나 해수 *Chlorella*와 유지효모 공급구의 pH는 7.40~7.96의 범위로 rotifer 성장에 따른 뚜렷한 차이는 보이지 않았다.

배양시간에 따른 용존산소의 변화를 살펴보면 해수 *Chlorella*와 담수 *Chlorella* 공급구의 용존산소는 초기 접종시 7.3~7.6 ppm에서 rotifer 최고밀도시 1.3~2.5 ppm으로 rotifer 밀도가 증가할수록 용존산소는 감소하는 경향을 보였다. 그러나 유지효모 공급구는 실험기간 동안에 6~7 ppm으로 큰 변화는 보이지 않았다.

고밀도 배양시 먹이 종류에 따른 rotifer 지방산 조성은 Table 1과 같다. EPA는 해수 *Chlorella*공급구가 7.27%로 가장 높게 나타났고 유지효모 공급구가 4.87%였으며 담수 *Chlorella*가 2.75%로 낮게 나타났다. DHA는 유지효모 공급구가 3.20%로 높게 나타났지만 해수 *Chlorella*와 담수 *Chlorella*는 각각 1.10%, 1.28%로 비교적 낮게 나타났다.

n-3HUFA의 함량은 유지효모 공급구에서 9.42%로 가장 높게 나타났고 다음으로 해수 *Chlorella*가 8.71%로 나타났다. 담수 *Chlorella*는 4.45%로 다른 먹이보다 비교적 낮게 나타났다.

논 의

吉村 等 (1994, 1995)은 rotifer의 배양규모의 대형화로 인한 경제적인 문제점과 rotifer의 양적인 확보를 해결하기 위해 담수 농축 *Chlorella*를 이용하여 rotifer 고밀도 배양을 시도하였다. 이들은 rotifer를 고밀도로 배양하기 위해서는 고밀도 배양시 rotifer의 성장저해요인을 규명하였는데 첫째로 rotifer 개체밀도가 증가할수록 용존산소 부족 (吉村 等, 1994)에 의한 폐사와 둘째로 pH 및 현탁물질 증가에 따른 이온화되지 않은 암모니아 농도 축적에 의한

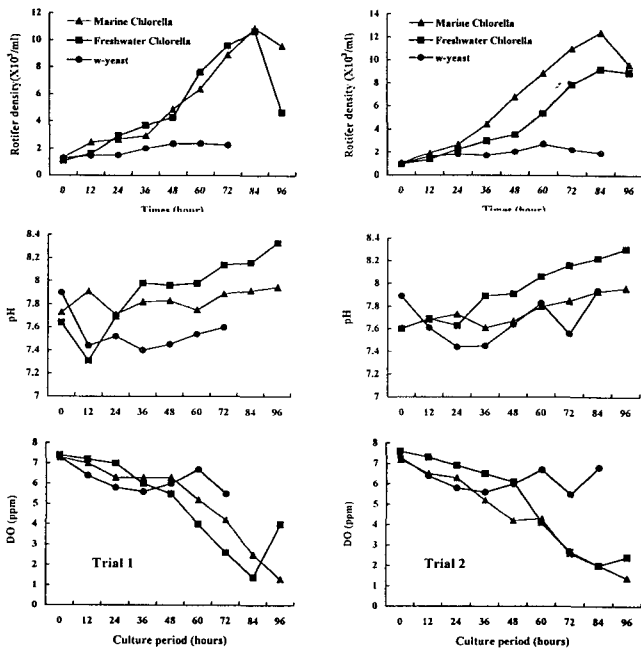


Fig. 1. Results of high density culture of the rotifer fed by the different diets.

Table 1. Fatty acids composition (% area) of the rotifer fed by the different diets in the high density culture

Fatty acid	Diets		
	Freshwater <i>Chlorella</i>	Marine <i>Chlorella</i>	w-yeast
14:0	1.25	1.57	0.79
15:0	0.89	0.42	0.19
16:0	14.35	13.79	13.76
16:1n-7	1.72	4.06	1.79
18:0	4.81	5.39	3.65
18:1n-9	3.29	2.37	3.05
18:1n-7	1.36	5.30	1.80
18:2n-6	35.64	18.07	29.41
18:3n-3	2.67	4.03	12.72
20:1n-9	0.85	2.74	1.09
20:2n-6	2.55	1.63	2.17
20:3n-6	1.68	2.31	1.08
20:4n-6	1.97	2.38	0.62
20:4n-3	0.42	0.34	1.30
20:5n-3	2.75	7.27	4.87
22:6n-3	1.28	1.10	3.20
Others	22.52	27.23	18.51
n-3 HUFA ¹	4.45	8.71	9.37

¹HUFA, Highly unsaturated fatty acid (≥20).

성장 저해라고 보고하였다(吉村 等, 1995). 최근 吉村 等(1997, 1998)과 吉村(1998)은 rotifer의 이러한 성장저해요인을 제거해 주기위해서 산소가공급, pH 제어장치, 현탁부유물질제거장치 및 자동먹이공급장치 등을 설치하여 rotifer를 안정적으로 10,000개체/ml 이상 유지하는 고밀도 rotifer 배양에 관한 연구를 수행하였다.

中尾·萩原(1995)는 고밀도 배양시 rotifer의 성장저해요인인 용존산소와 이온화되지 않은 암모니아는 수온이 낮을수록 영향을 적게 받기 때문에 수온 25°C에서 공기공급(0.2~0.5 VVM)하였을 때 rotifer 밀도를 7,000~9,000개체/ml까지 유지할 수 있으며 이온화되지 않은 암모니아의 농도를 제어하기 위해서 pH를 7.8로 조절하였을 때 20,000개체/ml까지 가능할 수 있다고 보고하였다.

본 실험의 먹이종류에 따른 rotifer 최고밀도는 담수 *Chlorella*와 해수 *Chlorella* 공급구에서 각각 10,900~12,400개체/ml, 9,190~10,600개체/ml로 비슷한 경향을 보였다. 이러한 결과는 中尾·萩原(1995)의 연구와 비슷한 경향을 보였다.

그러나 본 실험에 있어서 rotifer의 최고밀도가 더이상 증가하지 않은 원인으로 첫째로 中尾·萩原(1995)와 吉村 等(1995)은 담수 *Chlorella*를 먹이로 공급할 때 배양시간이 지날수록 pH값이 상승하여 8부근에서는 이온화되지 않은 암모니아 증가로 독성을 유발하는 농도에 달하기 때문에 rotifer의 고밀도 배양을 수행하는데 저해요인이 된다고 보고하였다. 따라서 이들은 낮은 pH에서는 이온화되지 않은 암모니아의 농도가 낮아지기 때문에 pH를 인위적으로 낮추기 위해 pH제어장치를 설치(산소가공급)하여야 최고 10,000~34,000개체/ml을 유지한다고 보고하였다. 따라서 본 실험에서 담수 *Chlorella*를 공급한 경우 실험종료시 pH값은 8.3으로 높게 나타나 이온화되지 않은 암모니아의 축적에 의한 것으로 판단된다. 그러나 해수 *Chlorella*를 공급한 경우 pH는 7.9로 낮게 나타나 이온화되지 않은 암모니아의 영향은 적은 것으로 사료된다.

둘째로 中尾·萩原(1995)는 고밀도 rotifer 배양시 4 ppm이상의 용존산소가 rotifer의 성장에 영향을 미치지 않는 것으로 보고하였는데 본 실험에서 해수 *Chlorella*와 담수 *Chlorella*의 공급구의 경우 rotifer 최고밀도시 2 ppm이하로 낮게 나타나 용존산소 부족에 의한 개체수 감소로 판단된다. 이러한 결과로 볼 때 본 실험에서 수온 24°C, 통기량 0.2 VVM, rotifer 밀도가 약 5,000개체/ml일 때 산소가공급을 충분히 공급해야만 안정적인 rotifer 성장을 기대될 것으로 판단된다.

한편 유지효모 공급구의 rotifer 최고밀도는 2,390~2,750개체/ml로 낮은 경향을 보였는데 이러한 원인으로 吉村(1998)은 고밀도 배양시 기름성분이 rotifer를 서로 흡착시켜 rotifer 성장에 악영향을 미친다고 보고하였는데 본 실험에서도 유지효모의 기름성분이 rotifer의 성장에 영향을 미친 것으로 판단된다. 따라서 유지효모는 rotifer 고밀도 배양시 먹이로서 부적당한 것으로 판단된다.

中尾·萩原(1995)와 吉松·林(1998a, b)은 담수 *Chlorella*를 먹이로 공급하였을 때 rotifer의 n-3 HUFA 함량은 1%이하로 매우 낮은 경향을 보였다. 따라서 吉松·林(1998a, b)과 吉村(1998)은 담수 *Chlorella*를 rotifer 고밀도 배양에 이용할 때 n-3 HUFA 함량이 낮기 때문에 반드시 2차영양강화를 하여야 한다고 보고

하였다. 본 실험에서도 담수 *Chlorella*를 공급한 rotifer의 n-3 HUFA의 함량은 4.45%로 비교적 낮게 나타났다. 그러나 해수 *Chlorella*와 유지효모 공급구는 담수 *Chlorella*보다는 비교적 높은 n-3 HUFA 함량을 보여 영양가로서 우수한 먹이라고 판단된다.

따라서 본 연구를 종합해 볼 때 해산 *Chlorella*는 rotifer 개체 밀도 10,000개체/ml까지는 담수 *Chlorella*와 비슷한 개체증가를 보였고 10,000개체/ml 이상 배양할 때 이온화 되지 않은 암모니아의 독성이 발현될 수 있는 pH 8.0 이상(吉村 等, 1995)은 되지 않아 pH 제어장치가 필요 없는 것으로 판단되며 담수 *Chlorella*보다 n-3 HUFA 함량이 높기 때문에 해수 *Chlorella*를 이용하여 고밀도로 rotifer를 배양하는 것이 효율적인 것으로 판단된다. 그러나 해수 *Chlorella*가 담수 *Chlorella*보다 비교적 n-3 HUFA의 함량에서 높게 나타나지만 어류자어의 먹이로 공급하기전 해수 *Chlorella*로 2차 영양강화된 n-3 HUFA의 함량 최고 31.5%(박 등, 1999)보다 낮은 경향을 보였다. 이러한 원인은 본 실험에서 rotifer의 n-3 HUFA의 함량을 분석하기위해서 rotifer를 수확한 시점이 배양수 질악화와 산소부족으로 인한 rotifer의 활력 저하(Snell et al., 1987)로 rotifer가 감소한 시기였기때문에 충분한 먹이섭취가 이루어지지 않아 n-3 HUFA의 함량이 낮은 것으로 판단된다. 따라서 고밀도 배양에 있어서 성장기간별 rotifer의 n-3 HUFA의 함량 조사가 필요하다고 판단된다. 또한 현재 해산 *Chlorella*의 생산량은 충분히 공급되고 있지 않기 때문에 만약 담수 *Chlorella*를 이용할 때에는 n-3HUFA의 함량을 증가시킬 수 있는 영양강화제의 개발도 필요할 것으로 판단된다.

요 약

고밀도 배양에 있어서 먹이종류(해수 *Chlorella*, 담수 *Chlorella*, 유지효모)에 따른 Rotifer, *Brachionus rotundiformis* 성장과 영양가를 조사하기 위해서 10ℓ 배양수조에서 실험을 실시하였다.

해수 *Chlorella*, 담수 *Chlorella*와 유지효모를 공급한 rotifer의 최고밀도는 각각 10,900~12,400개체/ml, 9,190~10,600개체/ml, 2,390~2,750개체/ml였다. 따라서 해수 *Chlorella*, 담수 *Chlorella*를 공급한 rotifer의 최고밀도는 유지효모를 공급한 rotifer보다 높게 나타났다. 또한 해수 *Chlorella*를 공급한 rotifer의 고도불포화지방산 함량은 8.71%로 나타났다. 이것은 유지효모를 공급한 rotifer(9.14%)와 비슷한 경향을 보였지만, 담수 *Chlorella*를 공급한 rotifer(4.45%)보다는 높게 나타났다.

따라서 본 연구의 결과를 종합해 보면 고밀도 rotifer 배양에 있어서 양질의 rotifer를 생산하기위해서 해수 *Chlorella*가 적절한 먹이인 것을 판단된다.

사 사

본 연구는 부경대학교 해양산업개발연구센터를 통한 한국과학재단 우수연구센터 98년도 지원금(97K3-1506-01-01-3)에 의한 것이다.

참 고 문 헌

- Bligh, E. G. and W. J. Dyer. 1955. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911~917.
- Metcalfe, L. D. and A. A. Schmitz. 1949. The rapid preparation of fatty acids esters for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.*, 177, 751pp.
- Snell, T. W., Childress M. J. and E. M. Boyer. 1987. Assessing the status of rotifer mass cultures. *J. World Aquaculture Soc.*, 18 (4), 270~277.
- 吉村研治. 1998. ワムシ培養の最新技術と今後の展望について. *日本養殖誌*, 35 (10), 42~47.
- 吉村研治. 1995a. シオミズツボワムシの高密度培養システム(上). *日本養殖誌*, 32 (6), 114~118.
- 吉村研治. 1995b. シオミズツボワムシの高密度培養システム(下). *日本養殖誌*, 32 (7), 116~118.
- 吉村研治・臼杵考志・吉松隆夫・田中賢二・石崎文彬・上村英樹. 1998. ワムシ高密度間引き培養におけるアンモニアと懸濁物およびワムシ現存量の變化. *水産増殖*, 46 (2), 183~192
- 吉村研治・臼杵考志・吉松隆夫・田中賢二・石崎文彬. 1997. 海産小型ツボワムシの高密度培養における懸濁物の定量とその除去. *日水誌*, 63 (6), 912~919.
- 吉村研治・岩田剛・田中賢二・北島力・石崎文彬. 1995. 非解離アンモニア抑制のためのpH制御によるシオミズツボワムシの高密度培養. *日水誌*, 61 (4), 602~607.
- 吉村研治・北島力・宮本義次・岸本源次. 1994. 濃縮淡水クロレラ給餌によるシオミズツボワムシの高密度培養増殖阻害要因について. *日水誌*, 60 (2), 207~213.
- 中尾 崇・萩原篤志. 1995. 空気通気によるワムシの高密度培養と短時間栄養強化. *水産の研究*, 14 (9), 64~70.
- 吉松隆夫. 林雅弘. 1997a. 高密度培養ワムシの栄養強化技術(上). *日本養殖誌*, 34 (6), 76~78.
- 吉松隆夫. 林雅弘. 1997b. 高密度培養ワムシの栄養強化技術(下). *日本養殖誌*, 34 (7), 119~121.
- 박흥기·이상민·허성범. 1999. 넙치 및 돌돔자어 사육에 있어서 *Brachionus plicatilis*과 *B. rotundiformis* 내구란에서 갓 부화한 rotifer의 먹이효율. *한국양식학회지*, 12 (1), 31~38.

1999년 3월 2일 접수

1999년 4월 28일 수리