



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0155682  
(43) 공개일자 2021년12월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A01K 61/50 (2017.01) A23K 10/16 (2017.01)  
A23K 50/80 (2016.01)  
(52) CPC특허분류  
A01K 61/50 (2017.01)  
A23K 10/16 (2016.05)  
(21) 출원번호 10-2020-0073219  
(22) 출원일자 2020년06월16일  
심사청구일자 2020년06월16일

(71) 출원인  
경상국립대학교산학협력단  
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)  
(72) 발명자  
강석중  
경상남도 토영시 용남면 대곡길 12, 103동 1503호  
정우철  
경상남도 창원시 마산합포구 월영남12길 12, 104  
동 1904호  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
김남식

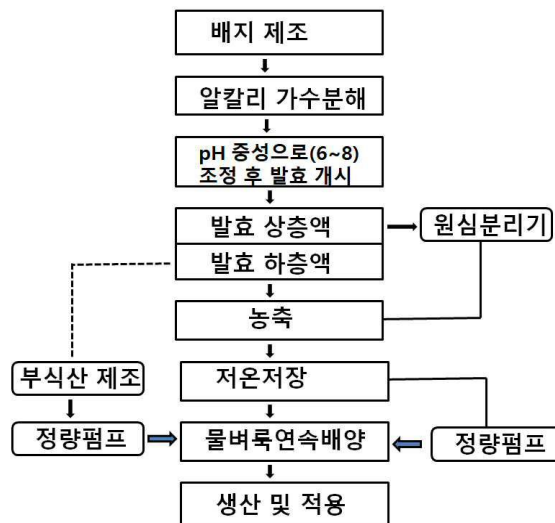
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 은편모조류를 이용한 물벼룩 대량배양 방법

(57) 요약

본 발명은 무광 하에서 유기물 배지의 타가영양 배양을 적용하여 오메가-3 고도불포화 지방산을 다량 함유하는 농축 은편모조류를 효과적으로 생산함에 따라 물벼룩을 고밀도로 배양할 수 있는 은편모조류를 이용한 물벼룩 대량배양 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**A23K 50/80** (2016.05)

(72) 발명자

**최병대**

경상남도 통영시 미수해안로 54-21, 106동 1203호

**김봉**

경상남도 통영시 통영해안로 2, 309호 (경상대학교  
해양과학대학 해양생물교육연구센터)

**아니수자만 엠디**

경상남도 통영시 통영해안로 2, 309호 (경상대학교  
해양과학대학 해양생물교육연구센터)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                              |
|-------------|------------------------------|
| 과제고유번호      | 11-1192000-000068-01         |
| 과제번호        | 11-1192000-000068-01         |
| 부처명         | 해양수산부                        |
| 과제관리(전문)기관명 | 해양수산부 해양수산과학기술진흥원(KIMST)     |
| 연구사업명       | 수산실용화기술개발                    |
| 연구과제명       | 해수물벼룩의 고밀도 연속대량배양 및 그 산업적 적용 |
| 기 여 율       | 1/1                          |
| 과제수행기관명     | 경상대학교 산학협력단                  |
| 연구기간        | 2010.07.01 ~ 2013.06.30      |

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

은편모조류가 포함된 배양수에 유기성 배지를 혼합 후 수산화나트륨(NaOH)을 첨가하여 알칼리 가수분해액을 제조하는 단계;

상기 알칼리 가수분해액에 유기산 및 자연수를 첨가하여 중화시키는 중화단계;

상기 중화된 알칼리 가수분해액을 무광 하에서 발효시키는 발효단계;

상기 발효단계를 거친 발효액을 원심분리하여 상층액으로부터 농축 은편모조류액을 수득하는 단계;

상기 발효액의 하층액에 휴무스(humus)를 첨가하여 부식산(humic acid)을 제조하는 단계; 및

상기 농축 은편모조류액 및 부식산을 물벼룩에게 급여하는 단계를 포함하는, 은편모조류의 타가영양 배양을 이용한 지각류의 대량배양 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 은편모조류는 Chroomonas 속, Cryptomonas 속, Rhodomonas 속, Chilomonas 속 및 Cyanomonas 속을 포함하는 군으로부터 선택되는, 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 중화단계는 pH 5 내지 7로 조절하는 것인, 방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 자연수는 담수, 기수 또는 해수인, 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 발효단계는 pH 6 내지 8로 조절하고 25~30℃의 온도에서 12~15일간 수행되는, 방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 유기성 배지는 가축분, 농가부산물, 가공식품 부산물, 하수처리장 슬러지, 음식폐기물 음폐수, 육상양식장 고형오물 및 유기질 비료로 구성되는 군으로부터 선택되는, 방법.

#### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 유기성 배지의 투입량은 배양수의 0.1~5 중량%인, 방법.

#### 청구항 8

제1항에 있어서,

상기 휴무스는 0.1~5 중량%를 첨가하는, 방법.

#### 청구항 9

제8항에 있어서,

상기 휴무스는 부엽토, 피트모스 또는 초탄인, 방법.

#### 청구항 10

제1항에 있어서,

상기 지각류는 참물벼룩(*Daphnia sp.*), 모이나 물벼룩(*Moina sp.*) 기수산 물벼룩(*Diaphanosoma sp.*) 또는 염호 물벼룩(*Moina mongolica*)인, 방법.

#### 청구항 11

제1항에 있어서,

상기 유기산은 초산, 구연산, 말산, 벤조산, 빙초산, 레몬산, 술폰산, 주석산 또는 글리콜산인, 방법.

#### 청구항 12

제1항에 있어서,

상기 농축 은편모조류액은 2,000~200,000 cell/mL로 급여하는, 방법.

#### 청구항 13

은편모조류가 포함된 배양수에 유기성 배지를 혼합 후 수산화나트륨(NaOH)을 첨가하여 알칼리 가수분해액을 제조하는 단계;

상기 알칼리 가수분해액에 유기산 및 자연수를 첨가하여 중화시키는 중화단계;

상기 중화된 알칼리 가수분해액을 무광 하에서 발효시키는 발효단계;

상기 발효단계를 거친 발효액을 원심분리하여 상층액으로부터 농축 은편모조류액을 수득하는 단계; 및

상기 발효액의 하층액에 휴무스(humus)를 첨가하여 부식산(humic acid)을 제조하는 단계를 포함하는, 지각류 배양용 사료 조성물 제조방법.

#### 청구항 14

제13항에 있어서,

상기 유기산은 초산, 구연산, 말산, 벤조산, 빙초산, 레몬산, 술폰산, 주석산 또는 글리콜산인, 제조방법.

#### 청구항 15

제13항의 제조방법으로 제조되는, 지각류 배양용 사료 조성물.

#### 청구항 16

제15항에 있어서,

상기 지각류는 참물벼룩(*Daphnia sp.*), 모이나 물벼룩(*Moina sp.*), 기수산 물벼룩(*Diaphanosoma sp.*) 또는 염호물벼룩(*Moina mongolica*)인, 조성물.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001]

본 발명은 물벼룩 대량배양 방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 은편모조류를 이용한 물벼룩 대량배양 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 일반적으로 어류와 갑각류(새우, 게)는 산란과 부화 후 자·치어의 입 크기에 맞는 살아있는 먹이생물을 반드시 필요로 한다. 전 세계적으로 수산양식 종자생산 현장에서 윤충(로티퍼) 단계 이후 가장 많이 사용되고 있는 먹이생물은 알테미아(*Artemia nauplius*)인데 전량 외국에서 수입하고 있기 때문에 고가이고 수급상의 문제가 항상 제기되고 있다. 또한 먹이생물로서 필수영양소인 오메가-3 고도불포화 지방산(n-3HUFA, 특히 EPA, DHA)이 부족하여 영양강화를 해야 하는 결점이 있음에도 불구하고 아직까지는 이를 대체할 만한 먹이생물이 없기 때문에 알테미아를 그대로 사용하고 있다. 특히 최근에는 지구 기후변화 등으로 인하여 생산량이 불규칙함에 따라 각국에서는 알테미아 자연채취를 일부 제한하거나 수출을 규제하는 움직임이 있기 때문에 공급의 불안정과 가격폭등 가능성을 항상 내포하고 있다. 따라서 알테미아를 대체할 수 있는 먹이생물의 개발이 시급한 실정이며 이를 대체할 수 있는 지각류(枝角類)인 물벼룩과 요각류(copepoda)가 제안되고 있지만 요각류는 단위생식(치녀생식)을 하지 않고 자웅이체인 생리생태적인 특성으로 인하여 고밀도 배양의 벽을 넘지 못하고 있어 이의 대안으로 단위생식을 하는 물벼룩(water flea)이 각광을 받고 있다. 물벼룩은 여과섭식 생물로 주먹이인 식물성 플랑크톤은 물론 효모, 섬모충과 박테리아까지 매우 광범위하게 먹이를 이용하는 종이다(Urabe *et al.*, *Hydrobiologia* 25: 121-128, 1991; Fileto *et al.*, *Aquat Ecol* 38: 503-514, 2004; Kumar *et al.*, *International Review of Hydrobiology* 93: 284-296, 2008). 물벼룩은 자연 상태 혹은 인공배양 상태와 같은 사육환경과 공급되는 먹이의 구성에 따라 성장률 및 번식률에 영향을 받는다(Fileto *et al.*, *Aquat Ecol* 38: 503-514, 2004). 이러한 물벼룩을 경제성 있는 먹이생물로 대량생산하기 위해서는 고함유의 오메가-3 고도불포화지방산을 함유하면서 동시에 실용적인 먹이조성, 안정적인 배양방법 및 경제성 있는 시스템과 운영방법을 개발해야한다. 또한 이들의 대량배양은 수산종자의 산업적 생산을 위한 필수적 요건이다. 이와 관련하여 한국공개특허 제2014-0100858호는 수산양식용 식물 먹이생물인 은편모류 텔레아우락스 엠펜옥제이아(KCTC 1231BP) 및 이를 이용한 윤충류 및 이때패류의 배양방법에 대해 개시하고 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0003] 그러나 상기 선행기술의 경우, 저밀도 광에너지 및 무기물배지를 이용한 자가영양배양으로 물벼룩의 대량배양에는 적합하지 않다.

[0004] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 무광 하에서 유기물 배지의 타가영양 배양을 적용하여 오메가-3 고도불포화 지방산을 다량 함유하는 농축 은편모조류를 효과적으로 생산함에 따라 물벼룩을 고밀도로 배양할 수 있는 은편모조류를 이용한 물벼룩 대량배양 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

### 과제의 해결 수단

[0005] 본 발명의 일 관점에 따르면, 은편모조류가 포함된 배양수에 유기성 배지를 혼합 후 수산화나트륨(NaOH)을 첨가하여 알칼리 가수분해액을 제조하는 단계; 상기 알칼리 가수분해액에 유기산 및 자연수를 첨가하여 중화시키는 중화단계; 상기 중화된 알칼리 가수분해액을 무광 하에서 발효시키는 발효단계; 상기 발효단계를 거친 발효액을 원심분리하여 상층액으로부터 농축 은편모조류액을 수득하는 단계; 상기 발효액의 하층액에 휴무스(humus)를 첨가하여 부식산(humic acid)을 제조하는 단계; 및 상기 농축 은편모조류액 및 부식산을 물벼룩에게 급여하는 단계를 포함하는, 은편모조류의 타가영양 배양을 이용한 지각류의 대량배양 방법이 제공된다.

[0006] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 은편모조류가 포함된 배양수에 유기성 배지를 혼합 후 수산화나트륨(NaOH)을 첨가하여 알칼리 가수분해액을 제조하는 단계; 상기 알칼리 가수분해액에 유기산 및 자연수를 첨가하여 중화시키는 중화단계; 상기 중화된 알칼리 가수분해액을 무광 하에서 발효시키는 발효단계; 상기 발효단계를 거친 발효액을 원심분리하여 상층액으로부터 농축 은편모조류액을 수득하는 단계; 및 상기 발효액의 하층액에 휴무스(humus)를 첨가하여 부식산(humic acid)을 제조하는 단계를 포함하는, 지각류 배양용 사료 조성물 제조방법이 제공된다.

[0007] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 제조방법으로 제조되는 지각류 배양용 사료 조성물이 제공된다.

### 발명의 효과

[0008] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 은편모조류를 이용한 물벼룩 대량배양 방법은 실용배지를 사용하여 경제성이 뛰어나고 고밀도의 은편모조류를 효과적으로 생산하는 것이 가능하므로 물벼룩을 포함하는 수산양식을 위

한 먹이생물의 연속 대량배양에 활용할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

### 도면의 간단한 설명

[0009]

도 1은 본 발명의 은편모조류를 이용한 물벼룩 대량배양 방법의 전 공정을 개략적으로 나타내는 개요도이다.

도 2는 은편모조류 원종분리 및 물벼룩 검정 테스트 장치를 나타내는 사진이다.

도 3은 은편모조류 원종과 *Chroomonas sp.*의 성장을 비교분석한 그래프이다.

도 4는 은편모조류 원종과 *Cryptomonas ovata*의 성장을 비교분석한 그래프이다.

도 5는 은편모조류 원종과 *Chilomonas paramecium*의 성장을 비교분석한 그래프이다.

도 6은 휴무스를 이용한 부식산의 추출 시스템을 나타내는 사진이다.

A: 추출부, B: 안정화를 위한 조정부, C: 에어스트리핑(air stripping)부, D: 저장조.

도 7은 20톤 규모의 물벼룩 대량 배양시스템의 모습을 나타내는 사진이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따라 생산된 물벼룩을 수거 후 저온 저장을 위한 제품의 모습을 나타내는 사진이다.

도 9는 본 발명의 물벼룩 대량 배양시스템의 종류 중 종자배양탱크와 연결된 현장적용시스템의 개념도이다.

P: 펌프, PP:정량펌프.

도 10은 실내에서 물벼룩배양 탱크와 종자 생산시스템을 연계해서 수산종자를 생산하는 장치의 모습을 나타내는 사진이다.

A: 물벼룩배양 탱크, B: 수산종자 탱크(향어 치어).

도 11은 본 발명의 농축 은편모조류로서 배양한 물벼룩과 시판용 알테미아를 각각 감성돔 치어에게 급여했을 때의 성장도를 비교분석한 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010]

#### 용어의 정의:

[0011]

본 문서에서 사용되는 "은편모조류(cryptophytes)"는 담수 및 해수에 서식하는 단세포성 원생생물로 크기가 작고(5~50  $\mu\text{m}$ ), 환경 충격에 쉽게 붕괴되며, 주로 냉수 및 다소 깊은 곳에서 서식하는 특징을 가져 '숨어있는(crypto) 편모생물'로 명명된 생물군을 말한다. 대부분 광합성 생물로 불포화지방산을 생산하는 등 양질의 먹이생물로 수산양식, 오메가-3 생산 등 산업적으로 중요한 생물군이다.

[0012]

본 문서에서 사용되는 "물벼룩(Cladocera)"은 절지동물문, 요각아강(copepod), 지각목, 물벼룩과의 갑각류이다. 물벼룩의 몸길이는 0.5~2.5 mm로 어류와 갑각류(새우, 게) 치어의 생물먹이로 적당하다. 이에 따라, 물벼룩을 양식용 어종의 사료로 이용하기 위해 인공 배양도 이루어지고는 있으나, 대량 생산이 아닌 소규모 배양에 불과하다.

[0013]

본 문서에서 사용되는 "타가영양(heterotroph)"은 세균, 균류, 기생식물 등은 무기물로 부터 영양이 되는 유기물을 만들 수 없으므로 직접 또는 간접으로 녹색식물이 만든 동화양분(유기물)을 취해야 하는데 이것을 타가영양 또는 종속영양이라고 한다.

[0014]

본 문서에서 사용되는 "지각류"는 절지동물문(節肢動物門) 갑각류강(甲殼類綱), 양갑목(兩甲目), 물벼룩과의 갑각류에 속하는 동물 무리로 담수, 기수 및 해수에 모두 서식하며 물에 떠서 플랑크톤 생활을 하는 부유성 종류를 의미한다. 전 세계에 분포하며 해염을 잘 지지 못하며 흐르는 물이 아닌 저수지나 호수에 산다. 작은 것은 0.2 mm, 큰 것은 4 mm가 넘으며 심장과 소화기관, 생식기관 등이 달려 있는 다세포 생물이다. 먹이사슬의 맨 밑바닥인 조류(식물 플랑크톤)를 먹이로 삼고, 어린 물고기를 비롯한 작은 동물들의 먹이가 된다.

[0015]

#### 발명의 상세한 설명:

[0016]

본 발명의 일 관점에 따르면, 은편모조류가 포함된 배양수에 유기성 배지를 혼합 후 수산화나트륨(NaOH)을 첨가

하여 알칼리 가수분해액을 제조하는 단계; 상기 알칼리 가수분해액에 유기산 및 자연수를 첨가하여 중화시키는 중화단계; 상기 중화된 알칼리 가수분해액을 무광 하에서 발효시키는 발효단계; 상기 발효단계를 거친 발효액을 원심분리하여 상층액으로부터 농축 은편모조류액을 수득하는 단계; 상기 발효액의 하층액에 휴무스(humus)를 첨가하여 부식산(humic acid)을 제조하는 단계; 및 상기 농축 은편모조류액 및 부식산을 물벼룩에게 급여하는 단계를 포함하는, 은편모조류의 타가영양 배양을 이용한 지각류의 대량배양 방법이 제공된다.

- [0017] 상기 대량방법에 있어서, 상기 은편모조류는 Chroomonas 속, Cryptomonas 속, Rhodomonas 속, Chilomonas 속 및 Cyanomonas 속을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있고 상기 중화단계는 pH 5 내지 7로 조절하는 것일 수 있으며 상기 자연수는 담수, 기수 또는 해수일 수 있다.
- [0018] 상기 대량방법에 있어서, 상기 발효단계는 pH 6 내지 8로 조절하고 25~30℃의 온도에서 12~15일간 수행될 수 있고 상기 유기성 배지는 가축분, 농가부산물, 가공식품 부산물, 하수처리장 슬러지, 음식폐기물 음폐수, 육상양식장 고형오물 및 유기질 비료로 구성되는 군으로부터 선택될 수 있으며 상기 유기성 배지의 투입량은 배양수의 0.1~5 중량%일 수 있다.
- [0019] 상기 대량방법에 있어서, 상기 휴무스는 0.1~5 중량%를 첨가할 수 있고 상기 휴무스는 부엽토, 피트모스 또는 초탄일 수 있으며 상기 지각류는 참물벼룩(*Daphnia* sp.), 모이나 물벼룩(*Moina* sp.) 기수산 물벼룩(*Diaphanosoma* sp.) 또는 염호물벼룩(*Moina mongolica*)일 수 있다.
- [0020] 상기 대량방법에 있어서, 상기 유기산은 초산, 구연산, 말산, 벤조산, 빙초산, 레몬산, 술폰산, 주석산 또는 글리콜산일 수 있고 상기 농축 은편모조류액은 2,000~200,000 cell/mL로 급여할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 은편모조류가 포함된 배양수에 유기성 배지를 혼합 후 수산화나트륨(NaOH)을 첨가하여 알칼리 가수분해액을 제조하는 단계; 상기 알칼리 가수분해액에 유기산 및 자연수를 첨가하여 중화시키는 중화단계; 상기 중화된 알칼리 가수분해액을 무광 하에서 발효시키는 발효단계; 상기 발효단계를 거친 발효액을 원심분리하여 상층액으로부터 농축 은편모조류액을 수득하는 단계; 및 상기 발효액의 하층액에 휴무스(humus)를 첨가하여 부식산(humic acid)을 제조하는 단계를 포함하는, 지각류 배양용 사료 조성물 제조방법이 제공된다.
- [0022] 상기 제조방법에 있어서, 상기 유기산은 초산, 구연산, 말산, 벤조산, 빙초산, 레몬산, 술폰산, 주석산 또는 글리콜산일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 제조방법으로 제조되는 지각류 배양용 사료 조성물이 제공된다.
- [0024] 상기 사료 조성물에 있어서, 상기 지각류는 참물벼룩(*Daphnia* sp.), 모이나 물벼룩(*Moina* sp.), 기수산 물벼룩(*Diaphanosoma* sp.) 또는 염호물벼룩(*Moina mongolica*)일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 대량배양된 물벼룩은 어류 또는 갑각류의 자치어의 사육을 위한 사료로 사용될 수 있고 상기 어류는 조피볼락, 참돔, 돌돔, 강당돔, 감성돔, 붉돔, 돛돔, 뽕에돔, 볼락, 황점볼락, 붉바리, 능성어, 다금바리, 대왕바리, 흰점 독사시치, 노래미, 쥐노래미, 양태, 삼세기, 쭈기미, 쏨뱅이, 붉은 쏨뱅이, 참복, 검복, 까치복, 황복, 자주복, 밀복, 쥐치, 말쥐치, 방어, 봉장어, 농어, 점농어, 조기, 참조기, 부세, 전어, 송어, 가송어, 민어, 큰민어, 홍민어, 터봇, 광어(넙치), 도다리, 강도다리, 층거리 가지미, 범가지미, 돌가자미, 참서대, 고등어, 방어, 참다랑어, 가다랑어, 명태, 대구, 쭈기미, 연어, 대서양연어, 무지개송어, 스틸헤드송어, 잉어, 이스라엘잉어, 붕어, 민물장어, 메기, 물메기, 쏘가리, 황쏘가리, 동자개, 미꾸라지, 은어, 틸라피아, 관상어일 수 있고, 연체동물 두족류는 오징어, 문어, 낙지, 주꾸미, 갑각류는 새우, 대하, 보리새우, 흰다리새우, 징거미새우, 큰징거미새우, 게는 참게, 동남참게, 꽃게 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0026] 현재, 물고기 양식용 먹이로는 알테미아(*artemia*)가 사용되고 있는데, 전량 수입에 의존하고 있기 때문에 경제성이 떨어지는 문제가 있다. 따라서 양식용 어종의 먹이로 알테미아를 대체할 수 있도록 물벼룩의 대량 생산이 가능하게 된다면, 양식 산업에 있어서 수입 대체 효과는 물론이고, 양식 어종 먹이의 원가 절감에 따른 생산성 향상도 기대할 수 있다. 이로 인해 물벼룩을 인공적으로 배양하려는 여러 가지 방안이 고안되어 왔지만 아직까지 소량 배양에 불과하고 종래 배양법은 수산종자의 생산을 목적으로 하는 것이 아니라, 수질환경 독성평가를 위한 실험생물로서 실험실 규모에서 안정적인 배양을 목적으로 하고 있다. 또한 산업적 측면에서 물벼룩의 대량 생산을 위해서는 극복해야 할 기존의 인공배양 기술의 문제점들이 존재한다.
- [0027] 첫째, 종래의 노지배양을 답습한 저밀도 노지인공배양방식이다. 이는 넓은 공간의 노지에 배양수온을 25~28℃로 맞추고 식물성플랑크톤, 효모 등을 급여하는 저밀도로 물벼룩을 배양하는 방법이다. 상기 방법은 환경조절이

거의 불가능하기 때문에 대량번식(bloom)을 지속적으로 유지시키지 못해 일회성으로 끝나고 단위면적당 생산 밀도가 낮기 때문에 대량생산을 위해서는 대단위 수면적을 필요로 한다. 또한 개방적 환경이기 때문에 오염생물을 차단하기 어려우며, 넓은 수조 공간 전체의 배양수를 성장 최적수온으로 맞추기 위해서는 과도한 난방비가 필요로 하므로 경제성이 떨어진다. 두 번째, 종래의 인공배양 기술인 고밀도 회분배양(batch culture) 방법으로 저밀도에 의한 각종 배양상의 문제점과 경제성 문제를 해결하기 위해서 진일보한 고밀도배양이 제안되었으나(일본 등록특허 제3394028호, 2003.01.31.; 한국등록실용신안 제232078호, 2001.05.15.) 초기접종을 하여 먹이를 집중적으로 공급하면서 약 3일간 배양하는데, 배양수의 자체오염으로 인하여 물벼룩을 채집하여 수확하고 그 채집량의 일부를 다시 종자(seed)로 사용하는 방법이라 배양수에 발생하는 착생생물(epibiont, 특히 종벌레)과 원생동물에 의한 감염 및 높은 불확실성으로 실용성과 경제성이 역시 떨어진다.

[0028] 세 번째, 지금까지 고밀도 회분배양에서 효모 공급 시에는 순식간에 수질의 악변을 일으키고 농축클로렐라(담수, 해수)와 같은 시판용 식물성 플랑크톤을 단독으로 사용할 경우에 배양조 내에 다량의 찌꺼기 발생, 물벼룩의 포란율과 생존율의 급격한 저하 및 생존기간이 짧아지는 치명적인 문제점을 갖고 있어서 수확고가 낮아 실용화되지 못하였다.

[0029] 이에 본 발명자들은 효율적인 물벼룩의 대량 생산을 위해 많은 연구결과 원종을 접종하지 않고 광이 없는 무광하에서 발효조건인 유기물질의 농도와 온도조건을 맞추어 주는 타가영양 배양법으로 순수 은편모조류가 대량 발생하는 공정을 확립하였고, 상층수를 농축하여 고농축 은편모조류를 경제성 있게 수득할 수 있는 배양방법을 개발하였다. 따라서 담수 및 해수에 서식하는 단세포성 원생생물인 은편모조류를 이용하여 어류 및 갑각류의 먹이생물인 물벼룩의 대량생산이 가능하므로 산업적으로 활용가능하다.

[0030] 아울러 한국공개특허 제2002-0061066호에는 유동 공법을 이용한 물벼룩의 고밀도 배양방법이 개시되어 있고, 한국등록특허 제0020354호는 가축분뇨에 유용 미생물 혼합물을 첨가한 후 발효하여 제조된 가축분뇨 발효물을 유효성분으로 하는 물벼룩 배양용 사료 조성물이 개시되어 있으나, 본 발명의 오메가-3 고도불포화 지방산을 다량 함유하는 농축 은편모조류를 이용하여 물벼룩을 대량배양하는 방법과는 상이하다.

[0031] 본 발명은 수산양식 종자산업의 절실한 요구에 의해서 수십 년간에 걸친 시행착오에 의한 연구개발에 의해서 도출된 것으로서 하기와 같은 과제를 해결하기 위함이다: 첫째, 영양학적 측면으로 유용 해수 및 갑각류의 종자 생산을 위해서는 필수지방산인 오메가-3 고도불포화지방산을 다량 함유하는 먹이생물로서의 물벼룩을 배양해야 한다는 점이다. 기존의 초기 먹이생물인 윤충(로티퍼)용으로 개발되어 시판되는 담수농축클로렐라, 효모는 오메가-3 고도불포화 지방산이 결핍된 치명적인 약점을 갖고 있고 둘째, 생산성으로 상기의 저밀도 노지배양방식과 고밀도 회분배양방식은 고가의 먹이인 농축클로렐라(담수, 해수) 급여에도 불구하고 낮은 포란율, 생존율 저하로 생산성이 낮은 문제점을 갖고 있으며 셋째, 먹이 적합성으로 시판용 농축클로렐라는 단세포 식물성플랑크톤 녹조속(屬)의 특징인 두꺼운 세포벽을 갖고 있기 때문에, 이것이 완전히 소화되지 않은 채로 배출되어 세포벽의 축적에 의한 유기물 찌꺼기 발생 및 먹이의 부패에 따른 수질악화의 문제 및 시판용 효모는 자체 특성으로 인하여 수질악변이 쉽게 일어난다. 넷째, 계절성으로 먹이생물을 안정적으로 공급하고 산업화가 이루어지기 위해서는 계절에 관계없이 연중 생산할 수 있는 대량배양 기술이 필요하고 다섯째, 물벼룩 배양 기초기술의 불완전성으로 청수에서 자주 일어나는 폐사원인의 불명확성을 해결하고자 함이다(Samel *et al.*, 1999, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 43: 103-110).

[0032] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

# [0033] 실시예 1: 은편모조류의 원종 배양

[0034] 본 발명자들은 발효배양 탱크에서 배양된 은편모조류의 효능을 확인하기 위해서 독일 SAG(The Culture Collection of Algae at Goettingen University, Germany; 이하 SAG로 표기)으로부터 *Chroomonas* sp.(원종번호, 980-1), *Cryptomonas ovata*(원종번호, 979-3)와 *Chilomonas paramecium*(원종번호, 977-2a) 세 종류의 은편모조류를 분양받아 사용하였다. 배양 배지는 SAG의 권장 방법에 따라 M1B12 배지(표 1, 표 2)를 제조하였고, ErbsS 배지는 완두콩 추출물을 제조하여 사용하였다. 상기 세 종류 은편모조류 원종의 배양은 50 ml 테스트 튜브를 사용하였고, 배양 조건은 온도 25℃, 5,000-6,000 lx 광원으로 24시간 조사하여 수행하였다. 분양받은 원종과 형태적으로 닮은 은편모조류의 종주를 분리하기 위해서 본 발명의 실시예 6에 기재된 타가영양 배양 탱크에서 배양수를 채수하였고 실험실에서 미세관 피펫을 이용하여 광학입체현미경하에서 은편모조류의 모양과 운동성을 보고 1세포씩 분리하여 4종류를 수득하였다(표 3). 상기 수득한 4종의 배양은 상기와 동일한

MiEB12 배지 및 ErbsS 배지를 사용하여 24-칸 배양판에 넣고, 상기와 동일한 온도와 광 조건에서 계대배양을 수행하여 50 ml 테스트튜브로 scale-up한 후에 실험에 사용하였다(도 2). 상기 MiEB12 배지의 조성을 하기 표 1에, 미량원소 용액의 조성을 하기 표 2, 은편모조류의 분류를 하기 표 3에 요약하였다.

**표 1**

MiEB12 배지의 조성

| 구성성분                                             | 보관액(g/100 ml) | 최종농도(ml) |
|--------------------------------------------------|---------------|----------|
| KNO <sub>3</sub>                                 | 1             | 10       |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0.2           | 5        |
| MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O            | 0.1           | 10       |
| CaSO <sub>4</sub>                                | 포화용액          | 10       |
| 토양추출액                                            | 3.1           | 20       |
| 피트모스 추출액                                         |               | 10       |
| 미량원소 용액*                                         |               | 5        |
| 중류수                                              |               | 930      |

**표 2**

미량원소 용액의 조성

| 구성성분                                                  | 보관액(g/100 ml) | 최종농도(ml) |
|-------------------------------------------------------|---------------|----------|
| ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                 | 0.1           | 1        |
| MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O                 | 0.1           | 2        |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                        | 0.2           | 5        |
| Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O | 0.02          | 5        |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O  | 0.02          | 5        |
| CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O                 | 0.0005        | 1        |
| FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O                 |               | 0.7g     |
| EDTA (Titriplex III, Merck)                           |               | 0.8g     |
| Vitamin B12 (5 x 10 <sup>-6</sup> g/l)                |               | -        |
| 중류수                                                   |               | 981      |

**표 3**

은편모조류 종주의 분류 특성

| 약자 | 형태    | 운동성  | 특징       |
|----|-------|------|----------|
| LF | large | fast | 대형이고 빠르다 |
| LS | large | slow | 대형이고 느리다 |
| SF | small | fast | 소형이고 빠르다 |
| SS | small | slow | 소형이고 느리다 |

## 실시예 2: 1차 배양 실험

본 발명자들은 발효배양탱크에서 자체 분류한 은편모조류의 범용 효능성을 알아보기 위해서 원종과 비교 실험을 수행하였다. 구체적으로 실험에 사용한 대조군은 *Chroomonas* sp.(원종번호, 980-1), 실험군은 상기 표 3의 LF, LS, SF, SS를 대상으로 MiEB12 배지를 사용하여 배양하였고 배양 조건은 온도 25℃, 5,000-6,000 lx 광원으로 24시간 조사하였다. 그 후 배양 용기는 200 ml 비이커를 사용하였고, 초기접종 농도는 5x10<sup>3</sup> cells/ml가 되도록 주입해서 매일 샘플링하여 12일간 배양 실험을 수행하였다.

그 결과, 대조군과 실험군 간의 성장 차이는 거의 없었으며 대조군과 비교하여 LF군이 약간 빠른 성장을 나타낸

반면에 SS균은 다소 저조한 성장을 나타내었다(도 3).

#### [0041] 실시예 3: 2차 배양 실험

[0042] 본 발명자들은 상기 제1차 배양 실험과 동일한 목적으로 비교 실험을 수행하였다. 실험에 사용한 대조균은 *Cryptomonas ovata*(원종번호, 979-3), 실험균은 LF, LS, SF, SS를 이용하여 MiEB12 배지에서 배양하였고, 배양 조건은 상기 1차 조건과 동일하게 설정하였다.

[0043] 그 결과, 상기 1차 배양실험과 동일하게 실험구간의 성장차이는 거의 없었다(도 4). 상기 1차 배양 실험과 동일한 경향으로 대조균이 약간 빠른 성장을 나타내었고, 최대 정점에서의 존속 기간은 모든 균에서 2~3일로 나타났다.

#### [0044] 실시예 4: 3차 배양 실험

[0045] 본 발명자들은 상기 1차 및 2차 배양 실험과 동일한 목적으로 비교 실험을 수행하였다. 실험에 사용한 대조균은 *Chilomonas paramecium*(원종번호, 977-2a), 실험균은 LF, LS, SF, SS를 대상으로 ErbsS 배지를 약간 변형하여 사용하였고, 배양 조건은 무광상태 외는 1차 조건과 동일하게 설정하였다.

[0046] 그 결과, 상기 1차 및 2차 배양 실험과는 달리 실험구간의 성장차이가 현저하게 나타났다(도 5). LF 및 SF와 비교하여 대조균, LS 및 SS의 성장이 높게 나타났다. LS와 SS의 공통점은 타가영양 배지에서 빠른 성장을 나타냈으나 최대 정점에서의 존속 기간은 2일로 동등하게 나타났다.

#### [0047] 실시예 5: 오메가-3 지방산의 분석

[0048] 본 발명자들은 은편모조류의 오메가-3 지방산 함량을 분석하였다. 구체적으로 은편모조류, 물벼룩 및 해수 자치어의 총 지질 추출은 종래 기술을 참고하여 수행하였다(Bligh and Dyer, *Can.J.Biochem.Physiol.* 37:911-917. 1995).

[0049] 구체적으로, 시료를 비커에 취한 뒤 세포분쇄기(homogenizer AM-12, Nihonseiki Kaisha Co. Ltd., Tokyo, Japan)에 15,000 rpm으로 5분간 분쇄한 후, 클로로포름(chloroform)과 메탄올(methanol)을 2:1로 혼합한 추출 용매를 시료의 2배로 첨가하여 하루 동안 방치하였다. 그 후 클로로포름 층만을 분리하기 위하여 등근 플라스크 위에 깔때기를 놓고, 그 위에 황산나트륨( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )을 첨가하여 서서히 클로로포름 층만 흘러내리게 하였다. 이어서 분리된 클로로포름 층은 진공회전농축기(Rotavapor R-114, BUCHI)를 사용하여 40℃ 이하에서 용매를 완전히 증발시킨 후, 추출된 총 지질의 무게를 측정하였고 모든 작업은 질소 기류 하에서 수행하였다. 그 후, 시료 일정량과 내부표준물질(C23 : 0 methyl ester) 1 mL(1 mg)을 cap tube에 취하고, 0.5 N NaOH-methanol 용액 1.5 mL를 첨가하여 질소를 충전한 다음, 100℃에서 8분간 가열하여 검화하였으며 방냉 후 12%  $\text{BF}_3$ -methanol 2 mL를 가한 후 튜브의 뚜껑을 닫고, 100℃에서 11분간 가열하여 메틸(methyl)화 하였다. 약 30℃로 냉각한 후 iso-octane 1 mL를 첨가하였고 30초간 와류 믹서(vortex mixer)로 혼합하였으며 즉시 3 mL의 포화 식염수를 첨가 후 흔들어 방치하여 iso-octane층이 분리되도록 하였다. 상기 Iso-octane층을 시료 병(4 mL)에 옮긴 후, 다시 iso-octane 1 mL를 첨가한 다음 흔들어 재추출하여 시료 병에 모으고 이를 지방산 메틸 에스테르(methyl ester) 시료로 하였다. 지방산 분석에 사용하는 GLC는 Omega-wax-320 fused-silica capillary column(30 m  $\times$  0.32 mm  $\times$  0.25 mm, i.d. Supelco Co., Bellefonte, PA, USA)를 장착한 Clarus 600(Perkin Elmer Co. Ltd., USA)를 이용하였고 분석 시 컬럼(column)은 185℃에서 8분간 유지하였으며 3℃/min씩 230℃까지 상승시킨 후 10분간 유지하였다. 이 때 주입기 250℃, 검출기 270℃ 및 운반 기체(carrier gas)는  $\text{He}$ (1.0 kg/cm<sup>2</sup>)을 사용하였다. 또한 지방산의 분석은 동일조건에서 분석한 표준품의 ECL과 비교하여 동정하였고, 지방산 표준품은 GC-MS로 동정된 멘헤이트유(menhaden oil)를 사용하여 시판용 먹이생물과 본 발명의 먹이생물의 주요 지방산 함량을 분석하였다.

[0050] 그 결과, 시판용 먹이생물인 효모와 담수농축 클로렐라는 오메가-3 고도불포화 지방산이 전체지방산의 10 중량% 이하인데 반하여, 본 발명의 실험 주종인 LF(*Cryptomonas sp.*)와 LS(*Chilomonas sp.*)는 각각 42.4 및 45.5 중량%로 나타났다(표 4). 따라서 상기 결과는 본 발명의 생물먹이의 지방산의 함량은 30 중량%를 초과하는 지질영양학적으로 우수한 생물먹이임을 시사하는 것이다. 상기 주요 지방산의 분석 결과를 하기 표 4에 요약하였다.

### 표 4

[0051]

시판용 먹이생물과 본 발명 주종 은편모조류의 지방산 조성

| 지방산      | 시판용 먹이 |           | 본 발명의 주종 먹이생물                   |                                |
|----------|--------|-----------|---------------------------------|--------------------------------|
|          | 효모     | 담수농축 클로렐라 | LF<br>( <i>Cryptomonas</i> sp.) | LS<br>( <i>Chilomonas</i> sp.) |
| 16:0     | 12.4   | 16.8      | 26.7                            | 12.0                           |
| 16:1n7   | 14.7   | 2.9       | 0.5                             | 1.7                            |
| 18:0     | 8.7    | 4.4       | 0.8                             | 0.7                            |
| 18:1n-9  | 7.9    | 2.5       | 7.6                             | 1.2                            |
| 18:1n-7  | 8.3    | 1.2       | 0.1                             | 0.2                            |
| 18:2n-6  | 15.0   | 37.7      | 0.7                             | 28.2                           |
| 18:3n-3  | 6.1    | 9.7       | 16.7                            | 5.2                            |
| 18:4n-3  | -      | 0.1       | 15.1                            | 17.8                           |
| 20:1n-9  | -      | 0.1       | -                               | -                              |
| 20:4n-6  | -      | tr        | -                               | 1.2                            |
| 20:3n-3  | -      | tr        | -                               | -                              |
| 20:4n-3  | -      | -         | 0.4                             | 14.2                           |
| 20:5n-3  | -      | -         | 6.2                             | 5.4                            |
| 22:5n-3  | -      | -         | -                               | 0.8                            |
| 22:6n-3  | -      | -         | 4.0                             | 2.1                            |
| n-3 PUFA | 6.1    | 9.8       | 42.4                            | 45.5                           |

[0052]

#### 실시예 6: 타가영양 배양

[0053]

본 발명자들은 본 발명의 은편모조류를 대상으로 타가영양(heterotroph) 배양을 수행하였다. 구체적으로, 4톤 발효탱크(2m x 2m x 1m)를 이용하여 배양수 3톤에 시판용 유기질 비료와 대학 구내식당 멸균 음폐수를 절반씩 혼합한 유기성 배지 5~6 kg을 첨가한 후에 0.2N 수산화나트륨(caustic soda)을 투입하여 pH 9 이상으로 올리면서 25~30℃의 상온에서 24시간 동안 교반하였다. 다음 날 초산(acetic acid)을 첨가하여 pH 6으로 중화시킨 후에 자연수 1톤을 첨가하여 최종 유기성 배지 함량이 0.15 중량%되도록 조정하여 알칼리 가수분해액을 제조하였다. 25~30℃의 상온, 무광하에서 12~15일간 타가영양 배양을 수행하였다.

[0054]

이어서, 발효 최고점에서 은편모조류가 고밀도화된 상층만을 채수하여 원심분리하였고 세포가 크고, 무각(無殼)인 점을 고려하여 플로우베스킷 타입(flow basket) 원심분리기로 1,200rpm 이하 조건으로 배양액과 분리시켜 수득을 4,000~8,000 mg/L의 농축액을 제조하였다. 그 후, 상기 농축 은편모조류는 1개월 동안 저온(7℃)의 냉장고에 보관 하면서 필요 시 물벼룩 배양에 사용하였다. 상기 발효과정을 거치는 동안, 초기에는 많은 착생생물이 나타났으나, 12~15일 사이에 은편모조류의 군집이 관찰되었고 최고점에서 원심분리를 시작하여 농축 은편모조류액을 제조하였다(도 1).

[0055]

#### 실시예 7: 부식산의 추출 및 독성 실험

[0056]

##### 7-1: 부식산 추출

[0057]

본 발명자들은 휴무스(humus)로부터 부식산(humic acid)을 추출하였다. 구체적으로, 부식산 추출을 위해 장치의 구성이 추출부, 조정부, 에어stripping부(air stripping) 및 저장조로 나누어져 1톤 아크릴원통을 사용하였다(도 6). 추출물에 물 1톤을 투입 후 피트모스(peatmoss) 1 kg을 첨가하여 세망(mesh 52)에 넣고 부유성 물질과 불용성 물질을 제거하였다. 추출부의 하부에는 폭기(aeration)로 물을 교반시키고, 추출부의 상부에서 순환수를 계속적으로 낙차시켜서 강한 수류교반에 의해서 휴무스로부터 부식산을 효과적으로 용출시켰다. 또한 조정부는 순환펌프와 바이패스를 통해서 에어stripping부에 들어가는 수량을 조절하면서 스키머 효과로 용존유기물을 효과적으로 제거하도록 하였고 에어스트립부에서 추출수의 정체 시간은 3분이 되도록 하였다. 추출조건은 온도 25℃, pH 8.0, 용존산소는 포화상태에서 5일간 추출하여 부식산 원액을 제조하였다.

[0058]

##### 7-2: 독성 실험

[0059]

본 발명자들은 상기 7-1에서 제조한 수용성 부식산 원액을 물벼룩에게 바로 사용했을 경우에 폐사가 일어나는 일이 빈번하였기에 때문에 이를 방지하고자 독성실험을 수행하였다. 구체적으로 배양용기는 40ml 유리 샘플병을 사용해서 배양액 30 ml을 채운 다음 샘플병 렉에 거치했다. 그 후 1개의 실험군은 10개의 샘플병을 사용하여 10반복이 되도록 디자인했다. 시료를 일정액 채운 다음, 물벼룩을 1개의 샘플병에 1마리씩 넣었다. 죽을 때까지의

수명을 1세대의 수명으로 하였고, 그 기간 동안에 물벼룩 새끼(자충)을 산출하는 횟수를 출산횟수, 한 마리가 1회에 출산하는 자충의 수를 산자수(産仔數)라 하였다.

[0060] 그 결과, 부식산 원액 제조 후 10일 경과 후부터 물벼룩의 생존이 담보되었기 때문에 숙성시키는 안정화 과정이 필요하였다(표 5). 이러한 이유는 수질환경모니터링을 위한 환경독성 시험생물로 사용하는 물벼룩은 이들 독성 물질에 매우 민감할 뿐만 아니라 추출 용액 속에는 미지의 물질이 함유되어 있으며, 휴무스의 상태, 종류, 배합비 및 추출 시간에 따라서 상태가 매우 다르기 때문에 물벼룩 배양을 위한 순기능을 기대할 수 없다. 따라서 본 실험에서는 안정화 기간은 15일 이상으로 하였다. 상기 분석한 독성 실험 결과를 하기 표 5에 요약하였다.

표 5

[0061] 부식산의 처리 경과 시간에 따른 물벼룩의 생존율(%)

| 경과시간      | 0일 | 2일째 | 4일째 | 6일째 | 8일째 | 10일째 | 12일째 |
|-----------|----|-----|-----|-----|-----|------|------|
| 피트모스      | 0  | 0   | 50  | 100 | 100 | 100  | 100  |
| 부엽토(시판)   | 0  | 0   | 40  | 60  | 90  | 100  | 100  |
| 발효계분      | 0  | 0   | 30  | 60  | 80  | 100  | 100  |
| 발효배양액(하층) | 0  | 0   | 90  | 100 | 100 | 100  | 100  |

### [0062] 7-3: 부식산의 효능 검증

[0063] 본 발명자들은 상기 7-1에서 제조한 부식산에 대한 효능을 검증하였다. 본 발명의 물벼룩 고밀도 배양 시 청수 상태에서 클로렐라와 같은 식물성 플랑크톤을 먹이로 사용했을 때 찌꺼기에 의한 배양수의 자가오염과 착생생물의 번식 및 성장, 포란수의 저하뿐만 아니라, 폐사가 빈번히 발생했다. 그러나 때때로 휴무스를 투입하면 생존이 길어지는 경우가 경험적으로 자주 일어났기 때문에 물벼룩 생존에 대한 부식산의 효능을 검증하였다. 구체적으로 실험방법은 상기 부식산의 독성실험과 같은 방법으로 수행하였고, 물벼룩의 먹이는 시판용 담수 농축클로렐라를 사용하였다. 또한 실험에 사용한 물벼룩은 미리 예비실험을 수행하여 실험 먹이에 순치한 다음 한 마리의 어미 물벼룩에서 산출한 동일배의 자충을 실험 물벼룩으로 선정하였다. 상기 실험 어미 물벼룩은 24시간마다 새로운 먹이를 담은 샘플병에 옮긴 후, 생존 기간, 1회 산란수, 산란 간격일, 총산자수를 측정하였다.

[0064] 그 결과, 부식산을 종래 식물성 플랑크톤과 함께 사용할 경우, 물벼룩의 산란율, 성장률 및 수명연장이 현저히 증가하는 것으로 나타났다(표 6). 부식산의 첨가 효과는 투명한 청수에서 식물성 플랑크톤을 단독으로 사용하였을 때와 비교하여 물벼룩 생존기간 3.5배, 1회 산란수 2배, 총산란 회수 4배, 총산자수는 8.1배로 현저한 차이를 나타내어 부식산의 첨가 효능이 검증되었다. 상기 결과를 근거로 물벼룩 고밀도 연속배양에 부식산을 첨가하였다. 상기 부식산 첨가에 따른 물벼룩의 생존성 분석 결과를 하기 표 6에 요약하였다.

표 6

[0065] 물벼룩의 생존 효과

| 평가항목       | 미첨가구<br>(ch 단독) | 첨가구<br>(ch+부식산) | 증가(배) |
|------------|-----------------|-----------------|-------|
| 생존기간(일)    | 5.1             | 18.1            | 3.5   |
| 총 산자수(마리)  | 19.8            | 160.4           | 8.1   |
| 1회 산란수(마리) | 6.0             | 12.2            | 2.0   |

### [0066] 실시예 8: 물벼룩의 대량배양

#### [0067] 8-1: 20톤 물벼룩 생산 전용시스템

[0068] 본 발명자들은 본 발명의 배양시스템을 이용하여 물벼룩의 대량배양을 수행하였다. 구체적으로 20톤의 직사각형 조립식 캔버스수조(7m x 5m x 1m)에 가열장치, 산소공급장치, 수질측정장치, 먹이공급장치, 수확장치 등을 설치하였다(도 7). 배양조건은 수온 25℃, 조도는 1,000 lx, 광주기는 14L : 10D의 단일 조건을 맞추어 주었고, 초기밀도는 0.01 ± 0.001 ind./mL로 조절하였다. DO측정은 YSI-5000 (YSI, Co., Ltd., USA)를 사용하여 측정하였고, 산소조절은 블로와 및 airstone을 사용하여 적정량 유지시켰다(표 7). 또한 pH는 pH20N(ISTEK, Co., Ltd., Korea)를 사용하여 측정하였고 수온 유지는 1 kW 히터(Ami, Co., Ltd., Korea)를 여러 개 사용하였으며, 온도조절기(801-H, Ami, Co., Ltd., Korea)를 사용하여 조절해 주었다. 아울러, 물벼룩의 수거를 위해 50 mm

PVC pipe를 수조 상층에 설치하였고, 밸브를 달아 배수 시 물의 양을 조절하였다. 또한 먹이는 농축 은편모조류를 정량펌프(FRJ800PFX5, Wilo, Co.,Ltd., Korea)로 공급하였고 신선도를 유지하기 소형 냉장고를 사용하여 7℃로 유지하였다.

[0069] 그 결과, 20톤의 배양탱크에서 초기접종 밀도 0.01 마리/㎖에서 15일 후에 40.1 마리/㎖의 밀도에 도달하여 5,000배의 증가를 나타내었고 순환율 0.5회전/일에서 일일생산량 1.34 kg/㎥/day을 기록하였다(표 8). 상기 생산된 물벼룩은 채집통에서 수거 후 1 kg 단위로 냉동 보관하여 다음 실험에 사용하였다(도 8). 상기 물벼룩의 배양조건을 하기 표 7에, 물벼룩 대량 연속배양 결과를 하기 표 8에 요약하였다.

표 7

[0070] 물벼룩의 배양조건

| 항목               | 상세 조건                                         |
|------------------|-----------------------------------------------|
| 배양탱크             | 유효수량: 20 ton<br>크기: 7m x 5m x 1m(높이)          |
| 배양수              | 지하수                                           |
| 수온               | 25 ± 1℃                                       |
| 먹이밀도             | 2,000~200,000 cell/mL                         |
| 정량펌프             | Volumetric pump<br>(FRJ800PFX5, Wilo co.,Ltd) |
| 조도               | 1,000 <                                       |
| 광주기              | 24L : 0D                                      |
| 초기접종 농도(ind./ml) | 0.01 ± 0.002                                  |
| 부식산의 희석비율        | 90~98:10~2의 중량 비율                             |

표 8

[0071] 물벼룩 연속 대량배양 결과

| 초기접종밀도<br>(마리/㎖) | 채집시밀도<br>(마리/㎖) | 일일생산량<br>(kg/ ㎥/day) | 밀도증가<br>(배) |
|------------------|-----------------|----------------------|-------------|
| 0.01             | 40.1            | 1.34                 | 5,000       |

## [0072] 8-2: 실내 종자배양 탱크

[0073] 본 발명자들은 물벼룩 대량배양 시스템 중에서 종자배양탱크와 연결된 현장적용시스템을 검증하기 위하여 실내에서 실증실험을 시도하였다(도 9). 구체적으로 1톤 물벼룩 배양조(3m x 0.5m x 1m), 1톤 종자배양탱크(3m x 1m x 0.4m), 먹이정량공급장치, 가열장치, 수질측정장치 등으로 구성하였다. 또한 물벼룩 배양조에 공급되는 먹이공급은 정량펌프를 이용하여 냉장의 농축 은편모조류를 일정량 공급하였다. 물벼룩 배양조에 공급되는 부식산의 희석비율은 10%였다. 상기 배양된 물벼룩은 정해진 보충수의 순환율에 의해서 낙차로 종자 배양조에 공급되도록 하였다(도 10). 아울러 본 실험에 사용한 향어 수정란은 전남 전주시 성덕동 성덕양어장에서 구입한 것을 사용하였다(표 9).

[0074] 그 결과, 1톤 종자 배양탱크에서 전장 6 mm 크기 부화자어 5,000 마리가 25일 후에 전장 3 cm(체중 1g)의 치어 3,000마리로 성장하여 60%의 생존율을 나타내었다(표 10). 상기 결과는 양어지지 없이도 실내에서 계절에 상관없이 연중 계획적으로 담수어 종자 생산이 가능함을 시사한다. 상기 종자 배양탱크의 배양조건을 하기 표 9에, 물벼룩 생산 결과를 하기 표 10에 요약하였다.

표 9

[0075] 종자 배양탱크의 배양조건

| 항목   | 상세 조건            |
|------|------------------|
| 어종   | 향어 자치어           |
| 구입장소 | 전남 전주시 성덕동 성덕양어장 |

|             |                                               |
|-------------|-----------------------------------------------|
| 물벼룩 배양탱크    | 유효수량: 1 ton<br>크기: 3m x 0.5m x 1m(높이)         |
| 향어종자 배양탱크   | 유효수량: 1 ton<br>크기: 3m x 1m x 0.4m(높이)         |
| 수온          | 25 ± 1℃                                       |
| 먹이밀도        | 2,000~200,000 cell/mL                         |
| 정량펌프        | Volumetric pump<br>(FRJ800PFX5, Wilo co.,Ltd) |
| 조도(먹이배양탱크)  | 1,000 <                                       |
| 광주기         | 24L : 0D                                      |
| 종자배양탱크의 순환율 | 1회전/day                                       |
| 부식산의 희석비율   | 90~98:10~2의 중량 비율                             |

## 표 10

## 물벼룩 생산 결과

| 접종 시 크기<br>(부화자어, 마리) | 방양 시 크기<br>(전장cm, 체중g) | 향어 자치어<br>(마리) | 생존율<br>(%) |
|-----------------------|------------------------|----------------|------------|
| 5,000                 | 3 cm(1 g)              | 3,000          | 60         |

## 실시예 9: 알테미아와 비교실험

본 발명자들은 본 발명에 일 실시예에 따라 생산된 물벼룩의 효과를 해수어에 검증하였다. 구체적으로 실험에 사용된 감성돔은 경상남도 고성군 산삼면 소재 수화수산 종묘배양장에서 직접 난을 운반 후 부화하여 운송 급이를 끝낸 체중 0.2 g의 치어 상태에서 알테미아와 물벼룩의 비교 실험을 수행하였다. 처음에는 난에서 부화한 치어를 운반하였으나, 운반 후에 실험실에 도착하자마자 전부 폐사하여 수정난을 운반하는 방법으로 변경하였다. 그 후, 실험 디자인은 물벼룩군과 알테미아군으로 디자인하였고, 각 실험군당 100마리씩, 3반복으로 수행하였다. 또한 사육장치는 60 cm × 30 cm × 30 cm의 사각수조에 수량은 30 L이고 순환여과식 장치로 계속적인 여과해수의 첨가에 의해 배설물이 즉시 사육조 밖으로 배출될 수 있도록 하였다. 이 때의 주수량은 1 L/min, Air flow는 4.5 L/min로 조절하였고 전 사육기간을 통한 수온은 25 ± 1 °C로 유지하였으며 각각의 먹이는 항상 mL 당 1개체 이상을 유지시켜 주었다. 실험은 6주간 진행하였고 측정은 전 개체를 대상으로 2주 간격으로 측정하였다.

또한 먹이의 공급은 농축 은편모조류를 사용하여 연속배양에서 생산한 물벼룩(*Moina macrocopa*) 및 영양강화한 알테미아(Great Salt Lake, Utah, USA)를 급이하였다. 또한, 알테미아의 부화는 염분 34 psu, 수온 28℃, 조도 2000 lx의 조건에서 1 g/L의 수용량을 맞추어준 다음 충분한 교반이 될 수 있게 공기를 공급해 주고 24시간 동안 부화시켰다. 이 때 20 L 곡물용기를 사용하였고, 24시간이 지난 후 부화한 알테미아를 수거 후 영양강화제인 DC SUPER SELCO(INVE, Co., Ltd., Thailand, 200 mL/can)를 사용하여 영양강화를 24시간 동안 수행 후 감성돔 치어에게 공급하여 성장을 관찰하였다.

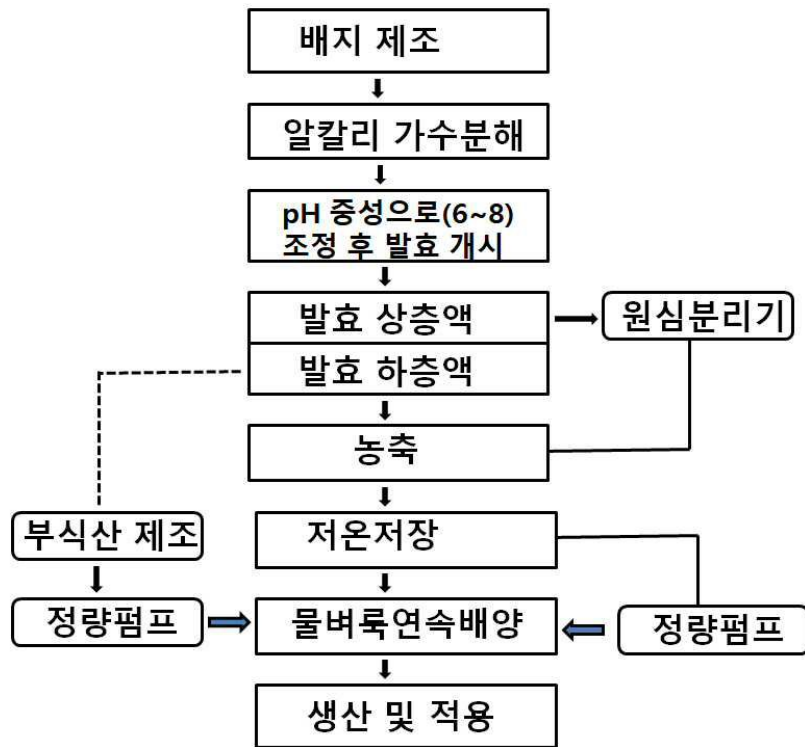
그 결과, 알테미아군은 6주 후 0.2 g에서 1.12 g으로 성장한 반면 물벼룩군은 0.2 g에서 1.61로 성장배수에서 알테미아군의 5.6배에 비교하여 물벼룩군은 8배로 매우 높은 성장을 나타내었다(도 11). 상기 결과는 본 발명의 농축 은편모조류로 배양한 물벼룩을 감성돔 치어의 먹이로 종래 알테미아를 대체할 수 있음을 시사하는 것이다.

결론적으로 본 발명의 농축 은편모조류를 이용한 물벼룩 대량배양 방법은 기존의 물벼룩 먹이의 필수지방산 영양결핍 문제를 해결하고 종래 먹이로 고밀도 배양 시 발생하는 배양수의 자가오염 및 작생생물 오염 문제를 해결할 수 있다. 또한, 종래 물벼룩의 생식율과 성장률이 낮아지는 문제점을 해결함에 따라 물벼룩 수명을 획기적으로 연장시키는 효과가 있고 청수에서 자주 일어나는 물벼룩 폐사원인을 해결하여 계획적인 물벼룩 생산을 할 수 있는 효과가 있다. 아울러 계절과 장소에 상관없이 연중으로 물벼룩을 연속 대량생산하는 것이 가능하여 경제성이 증가함에 따라 수산양식 종자산업에 적극 활용가능하다.

본 발명은 상술한 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면

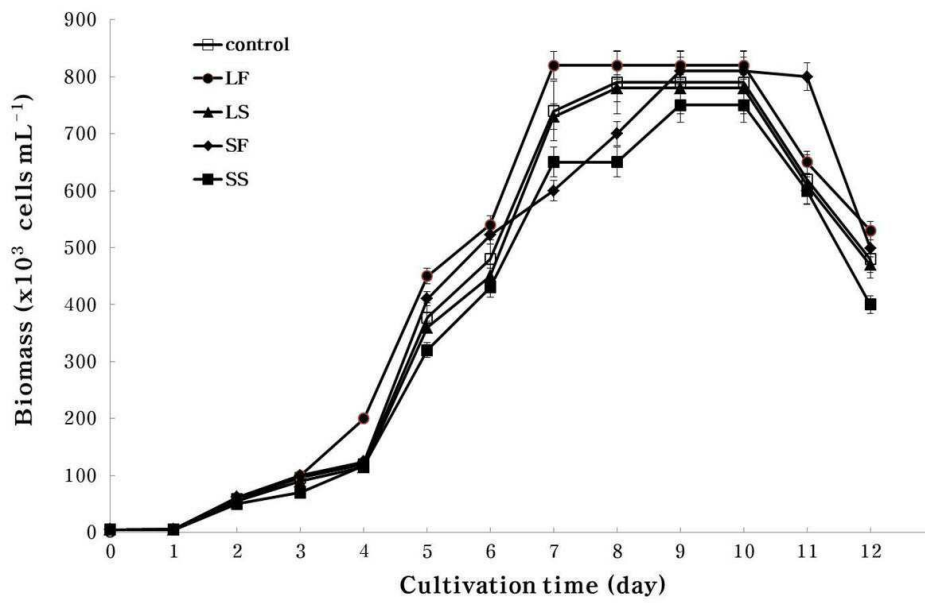
도면1



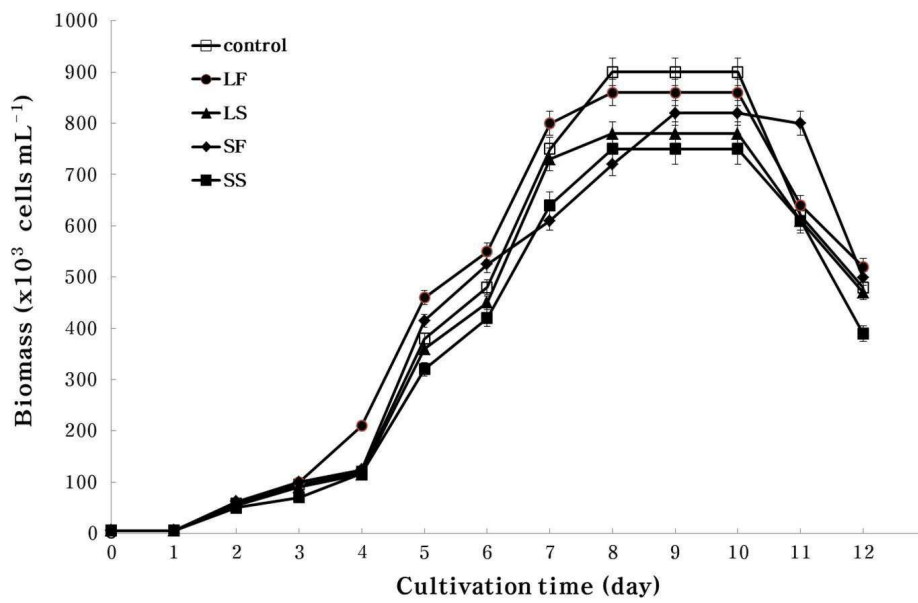
도면2



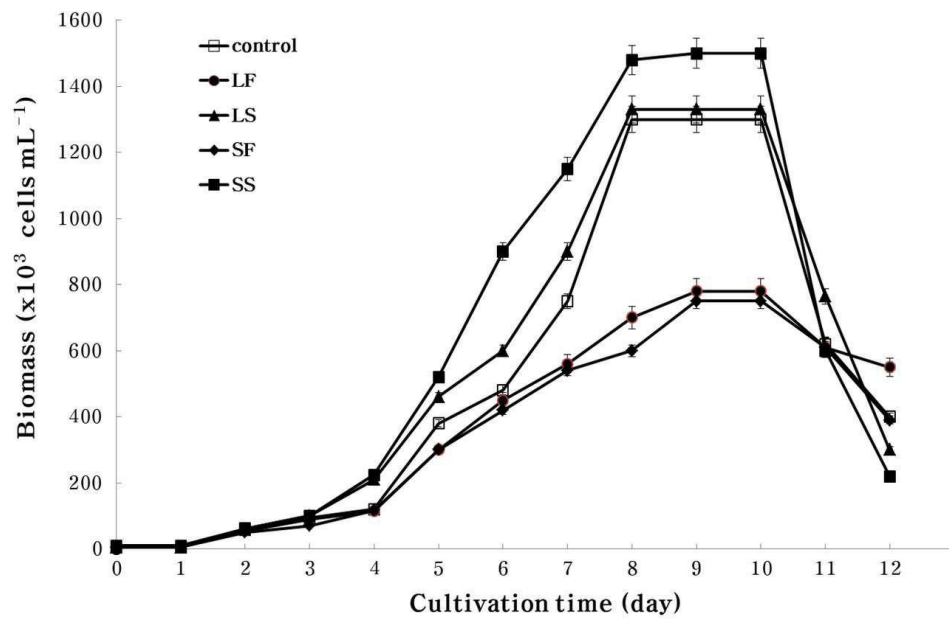
도면3



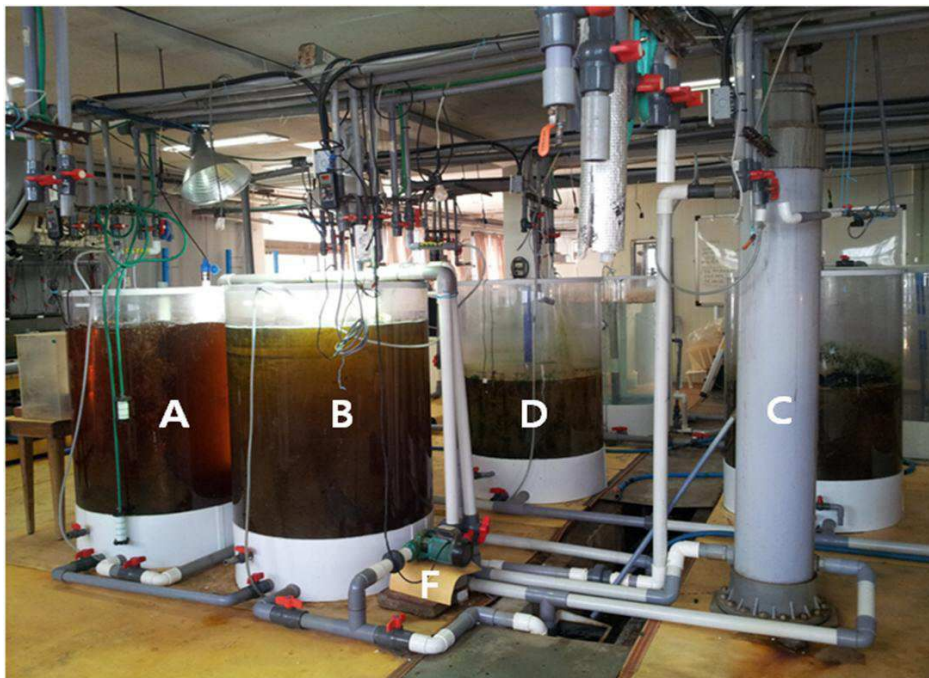
도면4



도면5



도면6



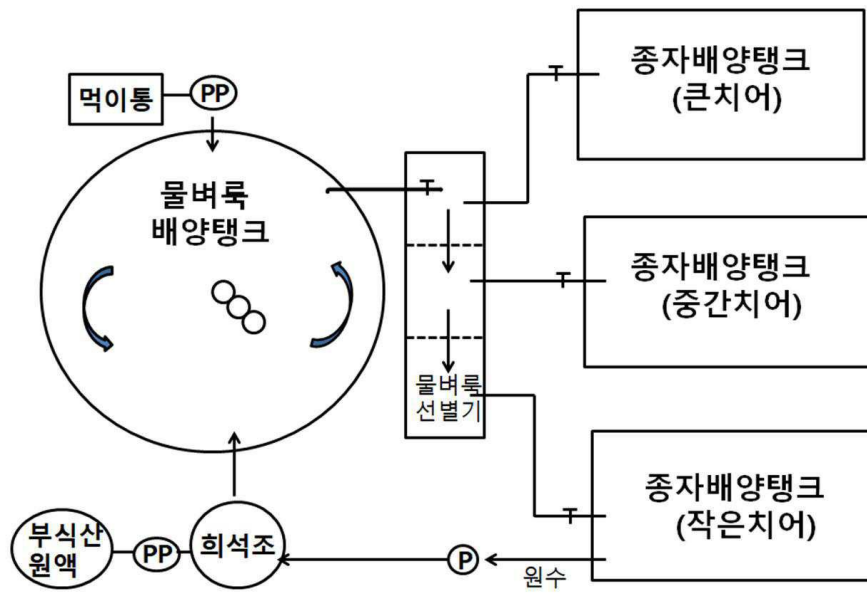
도면7



도면8



도면9



도면10



도면11

