

## 컴퓨터 시뮬레이션을 통한 치어 사육용 다단계 배양시스템의 개발 가능성 탐색

곽중기 · 조만기\*

동서대학교 산업기술연구센터

Received October 21, 2003 / Accepted February 2, 2004

**Possibility to Develop the Multistage Culture System for Larvae Cultivation by Computer Simulation.**  
Jung-Ki Kwak and Man-Gi Cho\*. *Engineering Research Center, Dongseo University, Busan 617-716, Korea*  
– The possibility for developing multistage culture system to cultivate larvae by computer simulation with basic experiments was investigated. This culture system was composed of 3 stages. At the 1st stage, *Chlorella* sp. were cultivated and at 2nd stage *Chlorella* sp. were supplied to rotifer (*Brachionus plicatilis*), and rotifer were supplied to larvae at the 3rd stage. In this study, *Chlorella* sp. were cultivated by batch culture to search for the possibility of continuous feeding to rotifer at 2nd stage. The maximum specific growth rate ( $\mu_{max}$ ) of *Chlorella* sp. at the logarithmic phase was 0.56 [1/day]. Rotifer was cultivated by fed-batch culture at the feeding rate of *Chlorella* sp.,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  and  $10^6$  [cells/rotifer · h] to search for the relation between the feeding rate of *Chlorella* sp. and the growth rate of rotifer. As the results, the minimum feeding rate of *Chlorella* sp. was  $2.8 \times 10^4$  [cells/rotifer · day] in the multistage culture system, then the change of rotifer concentration at 2nd stage was simulated by computer. The required amount of rotifer for the growth of larvae was also increased as the growth of larvae. On the 9th day of the culture, the rotifer uptake rate of larvae was 250 [cells/rotifer · day]. Based on these basic experiments and results, It was suggested that the possibility of multistage culture system to cultivate larvae with continuous feeding of *Chlorella* sp. and rotifer.

**Key words** – Multistage culture system, *Chlorella* sp, *Brachionus plicatilis*

어류의 종묘생산은 rotifer, artemia, algae 등 대부분 먹이 생물에 의존하고 있으며, 특히 rotifer는 어류 및 갑각류의 초기 종묘 생산시 가장 널리 이용되는 동물성 먹이 생물이다. Rotifer의 배양을 위한 사료로서 담수산 농축 *Chlorella*, 유지 효모 및 빵 효모 등이 사용되는데, 이 중에서 식물성 플랑크톤인 *Chlorella* sp.를 기질로 하는 rotifer의 대량 연속 배양에 관한 연구가 이미 상당히 이루어진 상태이며, 치어를 사육하기 위한 먹이로서 rotifer의 공급량과 치어의 성장에 관한 연구도 많이 진행되어 왔다[1-4]. 치어를 사육할 때 치어의 체장이 길어짐에 따라 필요로 하는 rotifer의 개체수도 상대적으로 증가하므로 치어의 성장에 따라 rotifer의 공급 속도도 증가시켜야 하며, 치어의 성장에 따라 필요한 영양섭취가 충분히 되도록 먹이에 상당한 주의가 필요하다. 그리고 치어의 배양시 생성되는 이산화되지 않은 암모니아, 배설물 등으로 인한 배양수의 오염 문제로 인해 신선한 배양액을 계속 공급해야 하고, 배설물 등을 제거해야 하는 어려움이 있다. 한편, 제거된 배설물은 일부 농작물의 퇴비로 이용되기도 하지만 퇴비로 이용하기 위해서는 부차적인 공정이 뒤따라야 한다.

현재까지 보고된 연구들은 두 개체의 먹이 관계만을 이용하여 연속배양을 시도한 것들이고, *Chlorella*, rotifer, 치어의 먹이 상관관계를 통합적으로 이용하여 연속적인 공정으로 시

도한 예는 아직까지 보고되어 있지 않다. *Chlorella* → rotifer → 치어로 이어지는 이러한 다단계의 공정이 연속적으로 진행되면서 치어가 배출하는 배설물이 포함된 배양수를 다시 1단계의 *Chlorella*의 배양수로 다시 공급을 하여 사이클을 이루도록 한다면, *Chlorella*의 광합성에 의해 다음 단계의 rotifer와 치어의 성장에 필요한 산소의 공급이 자동적으로 이루어지게 되고, 치어에 의해 생산된 이산화탄소는 다시 1단계인 *Chlorella*에 보내져 광합성에 사용될 것이다. 또한 *Chlorella*는 수질 자정능력이 있으므로 치어의 배양시 생산되는 암모니아와 배설물의 자연정화도 기대할 수 있다 [5]. 따라서 이러한 공정시스템이 개발된다면 에너지의 절약뿐만 아니라 배출수로 인한 수질환경의 오염도 막을 수 있으리라 사료된다. 따라서 본 연구에서는 기초실험을 통한 결과 및 생물학적 kinetics를 토대로 하여 이러한 다단계 배양 시스템에서의 효율적인 기질 공급관계를 계산하여 컴퓨터 시뮬레이션을 통한 타당성을 조사해 보았다.

### 재료 및 방법

#### 실험 재료

*Chlorella* sp.와 rotifer (*Brachionus plicatilis*)는 국립 남해 종묘 배양장에서 분양 받아 실험실에서 3개월간 배양한 것을 이용하였으며, 치어는 경상남도 통영시에 위치한 성지실업에서 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 수정란을 분양 받아 부화 후 실험에 사용하였다.

\*Corresponding author

\*Tel : 051-320-1796, Fax : 051-313-2129

\*E-mail : mgcho@dongseo.ac.kr

**배양조**

*Chlorella* sp. 배양조는 투명 acryl plate를 이용하여 30 cm × 30 cm × 30 cm인 배양조를 자체 제작하여 사용하였으며, rotifer 배양조는 2L용량의 삼각 플라스크를 사용하였다. 또한 넙치 유생용 배양조 또한 투명 acryl plate를 이용하여 10 cm × 10 cm × 25 cm인 배양조를 자체 제작하여 사용하였으며, 배양액의 온도조절은 항온수조를 이용하였다.

**배양배지**

Rotifer와 넙치 유생의 배양에 사용된 해수는 부산시 광안리 해변에서 채취한 것을 이용하였으며, 사용하기 전 2 µm mesh-filter로 여과 멸균하여 이용하였다. 그리고 *Chlorella* sp.의 배양을 위한 배지는 현재 종묘 배양장에서 사용하고 있는 것으로 Table 1에 나타내었다.

**배양조건**

*Chlorella* sp.의 경우 항온수조를 이용하여 배양액의 온도를 25℃로 유지하였으며, 할로겐 램프를 이용하여 8,000~12,000 lx의 조도를 공급하면서 batch culture로 배양하였다. 그리고 배양액의 원활한 순환과 광합성의 산물인 산소의 축적을 방지하기 위하여 여과된 일반 공기를 공급하였으며, 초기집중농도는 3 × 10<sup>6</sup> [cells/mL]으로 하였다.

Rotifer의 경우 온도 25℃로 유지하였으며, 3,000~5,000 lx의 조도에서 배양하였는데 이는 예비실험결과 rotifer도 빛을 공급할 경우 성장률이 높았기 때문이다. 이때 원활한 배양액의 순환 및 호흡을 위한 산소의 공급을 위하여 일반 공기를 여과시켜 공급하였다. 한편 rotifer의 초기 집중농도는 5 [rotifers/mL]였으며, rotifer에 공급되는 먹이는 *Chlorella* sp.를 사용하였다.

넙치 유생의 경우에도 항온수조를 이용하여 해수의 온도를 19±0.5℃로 유지하였고, 명(明期)·암기(暗期)는 각각 11시간 및 13시간으로 조절하였으며, 이때 명기의 조도는 1,000 lx로 고정시켰다. 배양조내 넙치 유생의 배양밀도는 15 [larvae/L]로 유지하였으며, 넙치 유생의 먹이로 rotifer를 공급하였다.

***Chlorella* sp.와 rotifer의 농도 및 넙치유생의 길이 측정**

*Chlorella* sp.의 농도 측정은 매일 일정한 시간에 배양액 표면에서 10 cm 깊이에서 3회 채취하였으며, 현미경 (Olympus

Co. Ltd., CHS)에서 Hemocytometer (Supereor Co. Ltd.)를 이용하여 계수한 후 평균값을 취하였다. Rotifer의 농도 측정도 매일 일정한 시간에 배양액 표면에서 10 cm 깊이에서 3회 채취하여 현미경에서 Plankton Counting Chamber를 이용하여 계수한 후 평균값을 취하였다. 넙치 유생의 경우 일반 종묘 배양장에서는 배양액을 계속적으로 공급하고 배출시키지만, 본 실험에서는 하루에 한번 새로운 해수로 배양액의 4/5를 교체하면서 rotifer 소모량을 구하였다. 그리고, 새로운 해수가 공급될 때 rotifer의 농도는 항상 8~12 [cells/mL]가 되도록 유지하였다.

넙치 유생의 길이 측정은 매일 일정한 시간에 무작위로 5 개체를 3회 채취하여 현미경에서 접안 마이크로미터(Olympus Co. Ltd)를 이용하여 길이를 측정 후 평균값을 취하였다.

**결과 및 고찰**

***Chlorella* sp.의 배양 및 성장 kinetics**

*Chlorella* sp.의 초기 농도를 3 × 10<sup>6</sup> [cells/mL]으로 하여 온도 25℃, 8,000~12,000 lx에서 9일간 배양한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 여기에서 연속배양에 필요한 *Chlorella* sp.의 비증식속도를 계산한 결과 0.56 [1/day]이었다. 따라서, 1단계 배양조 즉, *Chlorella* sp.용 배양조의 시간에 따른 *Chlorella* sp.의 개체수 변화를 예측하기 위해 물질 수지식을 이용하여 다음과 같은 미분방정식을 유도하였다.

$$\frac{dX}{dt} = (\mu_c - D)X \tag{1}$$

즉, 물질 수지식 (1)에서 X는 *Chlorella* sp.의 단위 부피당 세포수, µc는 *Chlorella* sp.의 비증식 속도, D는 연속 배양시 적용될 희석률로써 여기서 *Chlorella* sp.의 초기 세포수 X<sub>0</sub>를 6 × 10<sup>5</sup> [cells/mL]로 조절하고 µc는 0.56 [1/day], D는 0.4 [1/day]로 고정하였을 때 배양 시간에 따른 X의 변화 즉, *Chlorella* sp.의 농도를 배양 시간에 따라 예측하여 Fig. 2로

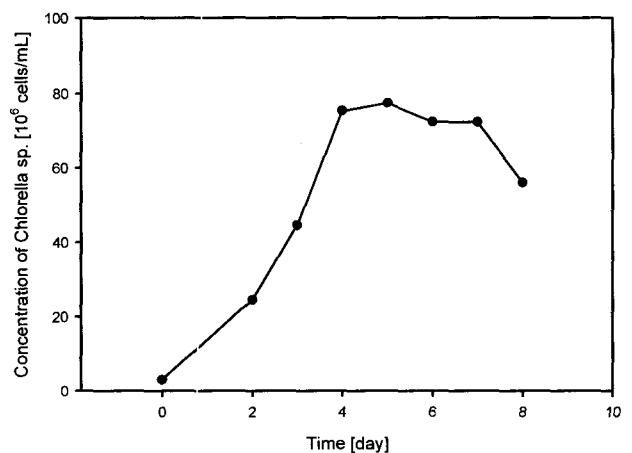


Fig. 1. Growth curve of *Chlorella* sp. in the batch culture. *Chlorella* sp. was cultivated under 25℃ and 10,000 lx

Table 1. Composition of the medium for *Chlorella* sp.

	Component	Composition [%]
Complex medium	Nitrogen	21
	Phosphorus	17
	Potassium	17
Urea medium	Urea	46

· 0.1176 g of complex medium and 0.1637 g of urea medium are mixed in 1 L sea water

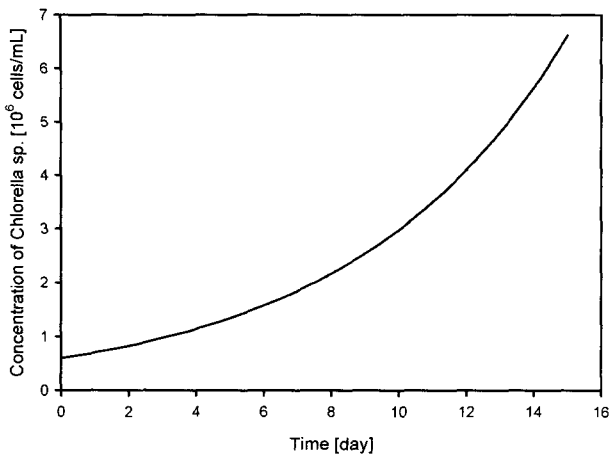


Fig. 2. Theoretical change of cell concentration of *Chlorella* sp. at 1st stage in the multistage culture system. Cell concentration of *Chlorella* sp. was determined from the batch culture by computer simulation.

나타내었다. 연속 배양시 적용될 희석률을 0.4 [1/day]로 설정한 것은 초기 *Chlorella* sp.의 공급량( $6 \times 10^5$  1/mL  $\times$  0.4 =  $2.4 \times 10^5$  1/mL :  $X_0 \times D$ )에 대한 rotifer의 비증식속도가 0.43 [1/day]이므로 wash-out을 방지하기 위하여 안전하게 0.4 [1/day]로 설정하였다. 이 시뮬레이션 결과로부터 1단계 배양 조에서의 *Chlorella* sp.의 농도는 배양 초기  $6 \times 10^5$  [cells/mL]에서 배양 15일째에는  $6 \times 10^6$  [cells/mL]까지 증가함을 알 수 있었다. 이와 더불어 2단계로 공급되는 *Chlorella* sp.의 양이 증가하게 될 것이고, 자연적으로 2단계의 rotifer 개체수 또한 안정적으로 증가할 것임을 예측 할 수 있었다.

**Rotifer의 배양 및 성장 kinetics**

Rotifer에 공급되는 *Chlorella* sp.의 적절한 공급량을 구하기 위하여, rotifer 한 개체당 한 시간에  $10^3, 10^4, 10^5, 10^6$ 의 비율로 먹이를 공급하는 fed-batch 상태에서 배양하였으며, 이 때 *Chlorella* sp.의 공급량이 rotifer의 비증식속도 ( $\mu$ )에 미치는 영향을 Fig. 3에 나타내었다. Rotifer의 비증식속도 ( $\mu$ )는 공급되는 *Chlorella* sp. 농도가 커질수록 증가하였으며,  $10^5$  [cells/day  $\cdot$  rotifer]에서 포화되어 더 이상 증가하지 않았다. 즉, rotifer는 *Chlorella* sp. 농도에 대해 다음의 monod kinetic에 따라 성장함을 알 수 있었다.

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_s + S} \tag{2}$$

여기서 S는 rotifer의 기질로써 공급되는 *Chlorella* sp.의 농도 [cells/mL]이며,  $K_s$ 는 최대 비증식속도의 절반( $\mu_{max}/2$ )에 해당하는 성장속도에서의 기질의 농도 [cells/mL]가 된다.

Fig. 3에서 rotifer의 최대 비증식속도( $\mu_{max}$ )는 0.46 [1/day]이었으며, 최소의 *Chlorella* sp. 공급량은  $2.8 \times 10^4$  [cells/day  $\cdot$  rotifer]이었고,  $K_s$ 는 컴퓨터를 이용하여 계산하였으며, 이 실험에서 3,781 [cells/mL]이었다. 식 (2)과 1단계에서의 *Chlo-*

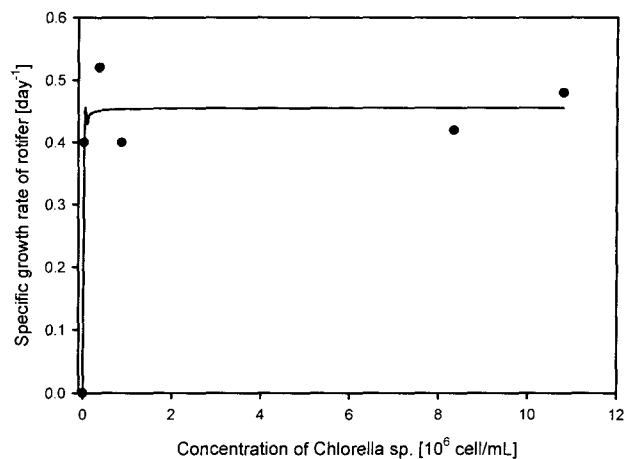


Fig. 3. Change of the specific growth rate of rotifer with various concentration of *Chlorella* sp.

*rella* sp. 개체수 변화로부터 2단계에서의 시간에 따른 rotifer의 비증식속도( $\mu$ ) 변화를 예측할 수 있었다. 그리고 여기서 구해진 비증식속도의 변화를 이용하여 rotifer의 성장속도 변화에 따른 개체수의 변화 또한 2단계에서의 rotifer에 대한 물질 수지식을 다음과 같이 예측할 수 있다.

$$\frac{dY}{dt} = (\mu_r - D)Y \tag{3}$$

여기서, Y는 rotifer의 농도 [cells/mL],  $\mu_r$ 은 rotifer의 성장속도, D는 희석률로써 Fig. 4는 시간에 따른 2단계에서의 rotifer 개체수 변화율을 시뮬레이션한 것이다. 배양초기 rotifer의 농도는 8.3 [cells/mL]에서 배양 15일째 27.6 [cells/mL]까지 증가함을 알 수 있었다. 즉 시간이 지남에 따라 2단계에서 3단계로 공급되는 rotifer의 개체수가 증가하게 되는데, 이는 넘치 유생이 성장함에 따라 먹이를 많이 요구하는 현상에 비

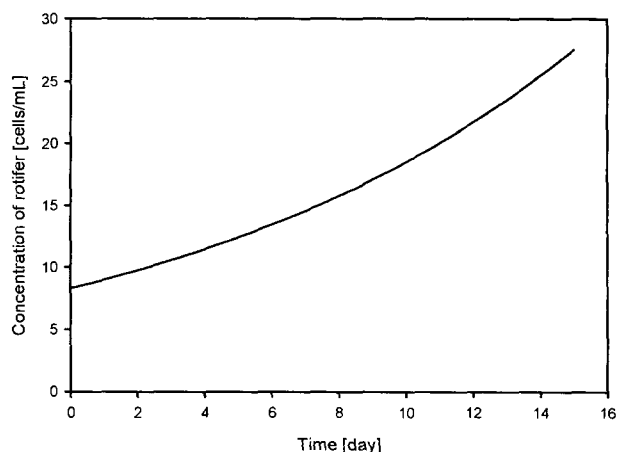


Fig. 4. Theoretical change of cell concentration of rotifer at 2nd stage in the multistage culture system. The cell concentration of rotifer was determined from the theoretical change of *Chlorella* sp. at 1st stage and specific growth rate of rotifer.

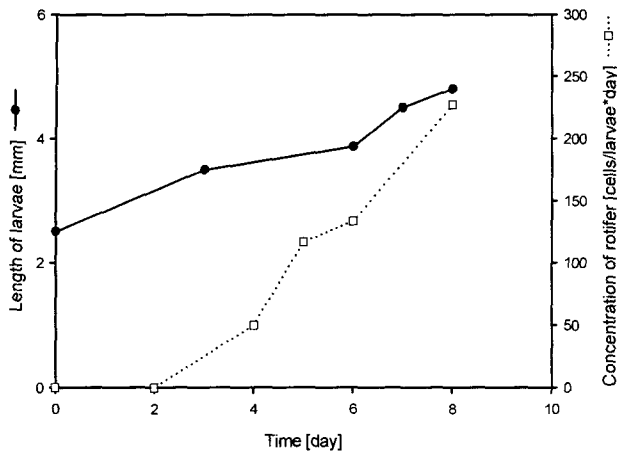


Fig. 5. Changes of the ingestion rate and length of larvae. Concentration of rotifer ingested by larvae was checked as the increasing of the length of larvae in a day.

추어볼 때 바람직한 방향이라 할 수 있을 것이다.

**넙치유생의 성장에 따른 rotifer 섭취량 및 체장변화**

부화 직후 넙치유생의 체장은 2.5~2.8 mm로 넙치유생은 부화 직후 몸체에 있는 배낭에서 영양분을 흡수한다. 약 2일 후 배낭의 영양분이 완전히 흡수된 후 초기 먹이로 rotifer를 8~12 [cells/mL]로 공급하였다 [2]. Fig. 5는 시간이 지남에 따라 하루에 섭취한 rotifer의 개체수 변화와 넙치 유생의 체장 변화를 나타낸 것이다. 배양 9일째 치어 한 개체가 섭취한 rotifer의 양은 약 250 [cells/day]까지 증가하였으며, rotifer의 농도는 17.7 [cells/mL]이었다. 따라서 배양조의 부피가 2.4L이므로 배양조 내의 총 rotifer 개체수는 42,480 [cells]이 된다. 희석률이 0.4이므로 하루에 3단계로 공급되는 rotifer의 개체수는 16,992 [cells]이다. 넙치 유생 한 개체가 하루에 250 [cells]을 섭취하므로 3단계 배양조에서 배양할 수 있는 넙치 유생의 개체수는 약 68개체가 된다. 실제 종묘 배양장에서 리터당 30개체의 넙치 유생을 사육하는 현실과 비교하여 볼 때 본 연구의 목적인 다단계 배양 시스템에서 비교적 넙치 유생들이 잘 성장할 수 있을 것으로 판단되었다.

**요 약**

기초 실험과 컴퓨터 시뮬레이션을 통하여 치어를 사육하기 위한 다단계 배양시스템의 개발에 대한 가능성을 조사하였다. 이 다단계 배양 시스템은 3단계로 구성되어 있으며, 1단

계에서 배양되는 *Chlorella* sp.는 rotifer (*Brachionus plicatilis*)가 배양되는 2단계로 공급이 되고 rotifer는 다시 3단계의 치어의 먹이로 공급된다. 그리고 치어의 배양액은 1단계로 다시 보내져 전체 3단계에서 사이클을 이루며 순환을 하게 된다. 본 연구에서는 *Chlorella* sp.를 연속적으로 2단계로 공급하기 위한 가능성을 탐색하기 위해 *Chlorella* sp.를 희분식으로 배양하였는데, 대수증식기에서 비성장 속도는 0.56 [1/day]이었다. Rotifer는 fed-batch 방식으로 배양하였는데, 이때 *Chlorella* sp.의 공급속도와 rotifer의 성장속도와의 관계를 찾기 위해 *Chlorella* sp.의 공급속도를  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  [cells/h · rotifer]로 각각 조절하여 실험하였다. 다단계 배양 시스템에서 *Chlorella* sp.의 최소공급속도는  $2.8 \times 10^4$  [cells/day · rotifer]였으며, 2단계에서 rotifer의 농도변화를 컴퓨터로 시뮬레이션한 결과, 최대 비증식 속도는 0.46 [1/day]이었다. 치어의 체장이 길어짐에 따라 치어의 성장을 위해 필요한 rotifer의 개체수도 증가하였으며, 배양 9일째 치어의 rotifer 섭취 속도는 250 [cells/day · larvae]이었다. 이러한 기본적인 실험과 결과에 기초하여 *Chlorella* sp.와 rotifer의 연속배양이 이루어지면서 치어를 배양하기 위한 다단계 배양시스템의 개발 가능성을 제시할 수 있었다.

**감사의 글**

이 논문은 산업자원부의 출연금 등으로 수행한 지역전략 산업 석박사 연구인력 양성사업의 연구결과이며, 이에 감사드립니다.

**참 고 문 헌**

1. Fukuhara, O. 1986. Morphological and functional development of japanese flounder in early life stage. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **52**, 81-91.
2. Hirayama, K. and M. Ogawa. 1972. Fundamental Studies on Physiology of rotifer for its mass culture-I. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **38(11)**, 1207-1214.
3. James, C. and S. Tawfiq. 1988. Effect of different cell densities of *Chlorella capsulata* and marine *Chlorella* sp. for feeding the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture* **69**, 43-56.
4. Kusano, T. and K. Hirayama. 1972. Fundamental Studies on Physiology of rotifer for its mass culture-II. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **38(12)**, 1357~1363.
5. Pyeon, J. S. 1991. Microalgae Culture Using Fish-extracted Carbon Dioxide and Ammonia. KAIST, Master thesis.