

## **수산특정연구개발사업(과제명)**

### **해조류 종보존을 위한 동결보존기술 개발**

Development of cryopreservation technique for  
pedigree-preservation of algae

**2006. 1**

전라남도해양바이오산업연구원(주관연구기관)

여수대학교 양식생물학전공(협동연구기관 I)

여수대학교 냉동공학전공(협동연구기관 II)

해 양 수 산 부

## 제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “해조류 종 보존을 위한 동결보존기술 개발에 관한 연구” 과제의  
최종 보고서로 제출합니다.

2006년 1월 일

주관연구기관명 : 전라남도해양바이오산업연구원

총괄연구책임자 : 조 영 현

연 구 원 : 강 성 필, 이 경 우, 서 대 철, 김 종 기, 김 충 남, 홍 용 식, 김 영 복

협동연구기관명 : 여수대학교 양식생물학전공

세부과제책임자 : 신 중 암

연 구 원 : 김 도 훈, 이 은, 배 용 현, 윤 영 성, 김 진 환, 강 정 민, 김 용 용,  
최 성 제, 전 영 호, 왕 세 호, 유 병 동, 서 태 호

협동연구기관명 : 여수대학교 냉동공학전공

세부과제책임자 : 김 민 용

연 구 원 : 이 세 영

# 요 약 문

## I. 제 목

해조류 종보존을 위한 동결보존기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

근래에는 다양한 식품 소재로서 뿐만 아니라, 選擇的抗癌·抗腫瘍性과 抗成人病물질 등의 機能性, 藥效性生理活性物質, 免役活性物質, 神經細胞活性化物質, 細胞選別, 組織化學, 免役學的檢査 등에 이용되는 biosensor 素材物質, 超傳導ceramic纖維 등 hightechnology 소재 물질, 작물의 내병성과 유용미생물의 활력증강 등 비료와 가축·어·패류사료의 소재 물질, 미용과 건강 등을 위한 화장품, 구취제, 海洋系香氣와 海藻療法(algotherapy) 소재 물질 등의 유용 물질이 해조류에 함유되어 있는 것이 알려졌고, 또한, 해양수질의 淨化 즉 해양수질환경수복(bioremediation) 소재 물질로서 그 인식과 이용이 세계적으로 확산되고 있으며, 해조관계의 특허 등 知的財産權의 확보도 늘어나고 있다. 바다 목장의 초석이 되는 것 역시 해조류이며, 청색혁명을 이루는 반석이 되는 것 역시 해조류이다.

이와 같이 해조류는 재생 가능한 해양식량자원, 해양생화학자원, 해양연료자원 등 재생 가능 천연자원으로서의 가치가 매우 높을 뿐만 아니라, 이산화탄소만을 방출하는 어패류와는 달리 광합성과 호흡과정 중에서 이산화탄소와 산소를 흡수·방출하므로 지구의 탄소순환에도 일조하고 있다.

다른 산업과 달리 재생 가능성·지속적 이용 가능성 자원을 이용하므로, 대상 자원생물의 활용도를 높이기 위하여 고생산성·고품질성·고부가가치성 품종을 육성하고, 省資源 高創出 持續可能型産業(low input - high output sustainable industry)으로 발전시켜야 할 것이다.

따라서, 본 연구는 아직까지 연구되지 않은 국내에 서식하는 홍조, 갈조, 녹조류의 16종에 대하여 Program freezer를 이용한 2단계 동결법을 이용하여 적정 동해방어제의 조건을 연구하였으며, 해동 후 생존율에 영향을 미치는 요인을 연구하였다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

### 1. 종보존을 위한 동결 및 해동 조건의 최적화

가. 유용 홍조, 갈조, 녹조류의 지역별 재배품종 종묘 확보

나. 예비 동결과 해동실험, 생존율 조사

### 2. 원종묘와 동결 보존종묘의 비교생물학적 실험

- 가. 원 또는 계대배양 종묘와 동결보존종묘의 실내배양 비교실험
- 나. 원 또는 계대배양 종묘와 동결보존종묘의 비교생리, 분자생물학적 시험

### 3. 해조류의 종보존을 위한 동결 및 해동 공정에서의 열특성 연구

- 가. 동결속도에 따른 동결점 및 동결잠열 측정
- 나. 동결 Kinetics 해석
- 다. 해조류 및 빙결정의 3차원 분포 측정
- 라. 해동상태에서의 해조류의 열특성

## IV. 연구개발 결과

### 1. 종보존을 위한 동결 및 해동 조건의 최적화

토속종 또는 재배되고 있는 국내 산업종 가운데 홍조류(김과래목)에서 참김(*Porphyra tenera*), 방사무늬김(*P. yezoensis*), 잇바디돌김(*P. dentata*), 모무늬돌김(*P. seriata*), 긴잎돌김(*P. pseudolinearis*), *P. haitanensis*. 갈조류(다시마목)에서 미역(*Undaria pinnatifida*), 다시마(*Laminaria japonica*), (모자반목)에서 모자반(*Sargassum fulvellum*), 툃(*Hizikia fusiforme*). 녹조류(갈파래목)에서 가시파래(*Enteromorpha prolifera*), 청각(*Codium fragile*)의 엽체 및 종묘를 이용한 적정 동결, 해동실험 및 생존율을 조사하여, 각 종별 동해방어제, 농도 등 적정 동결조건 및 해동조건에 대하여 결과를 얻어 내었다.

### 2. 원종묘와 동결 보존종묘의 비교생물학적 실험

대상 해조에 대하여 동결 전·후의 종묘에 대하여 비교배양 함으로서 t-검정을 통한 형태적 비교분석과 생리·유전학·분자생물학적 검증을 하였다.

또한, 동결 전·후의 시료에 대하여 투과전자현미경(TEM)을 이용하여 세포내 미세구조를 관찰하였다.

그 결과, 동결전후의 시료에 대하여 차이가 없었음을 알 수 있었다.

### 3. 해조류의 종보존을 위한 동결 및 해동 공정에서의 열특성 연구

동결속도에 따른 동결잠열의 측정은 *P. seriata*를 대상으로 빙결정의 성상을 저온 현미경 및 3차원 연상처리시스템에 의하여 측정하였으며, DSC에 의하여 동결속도에 따른 동결점 및 동결잠열을 측정함으로써 연구결과 얻었고, 동결 Kinetics 해석하였다.

빙결정의 3차원 분포의 경우 3차원 빙결정 측정장치 및 저온현미경을 이용하여 포자의 동결에 따른 빙결분포 및 해동과정에서의 빙결정의 용해에 관한 현상을 측정하였다.

해동상태에서의 열특성 측정의 경우 *P. seriata*, *U. pinnatifida*, *S. fulvellum*의 해동 0.1~2.0°C/min에서의 해동 DSC곡선으로부터 해동개시온도, 해동최대온도, 해동종결온도, 해동잠열을 측정하였다.

또한, 해동 DSC곡선을 Partial Kinetics Program을 이용하여 10등분함으로써 각각의

단위 구간에서의 Heat Flux, 활성화에너지, 엔탈피, 엔트로피, 자유에너지를 측정함으로써 최적의 해동속도를 결정하였다.

## V. 연구개발결과의 활용계획

- 전국 해조류 생산량의 90%를 점유하는 도로서 연구원 내 종묘은행을 설치하여 연중 가동시키고, 사라져가는 해조 종의 보존과 지역특성에 맞는 품종들을 동결 보존하여 종묘의 안정적 공급 기술체계 확립한다.
- 연안 생태계 보존용 등 기능에 따른 종묘의 보존과 공급 체계 확립으로 갯녹음, 연안 수질오염대책 방안 등 활용이 가능하다.
- 해조류 다양성 생물학과 보전생물학 발전에 일조할 것이다.
- 경제해조의 분자분류학적, 생리·생태학적, 생화학·분자생물학적, 유전학적 특성파악으로 적지 품종의 재배 유도화에 활용될 수 있다.
- 해조동결보존에 대한 지적재산권 취득, 특허출원, 산업체 기술이전, 상품화, 현장애로 해결, 정책자료, 어업인 교육 등에 활용이 가능하다.

# SUMMARY

## I. Title of research

Development of cryopreservation technique for pedigree-preservation of algae

## II. The object and need of research

Recently, not only various materials for food but also the functions of anticancer and antitumor, antiinflammatory, antiviral and antimicrobial etc., medical effectiveness for bioactive substances, immune active material, nerve cell active material, biosensor material including cell selection, histochemistry, examination of immunity, etc., high technology material including super conductor ceramic fabrics, material for live stock, fish, shellfish, and fertilizers including disease resistant, increase of activity for useful microorganism, cosmetics for beauty culture and health, foul breath resistant material, marine fragrance and algotherapy, which have been known recently. The recognition for seawater clarifier and CO<sub>2</sub> reduction i.e. bioremediation material also has been spread worldwide. Acquisition related to the intellectual rights of algae-related affairs has been increased rapidly as well. The base of marine ranching shall be algae and also the base to the blue revolution shall be seaweeds as well.

The algae are valuable for the recyclable natural resource including renewable marine crop resources, marine biochemical resources, marine fuel resources, and for helping in the carbon circulation in the earth since in the processes of photosynthesis and respiration they absorb carbon and evolve oxygen different from fish and shellfish.

Different from the other industries, taking advantage of recyclable and continuously available resource, it shall be necessary for developing the product of high production, high quality, and high value addition, and the low input-high output sustainable industry in order to increase the availability of the seaweeds. Therefore, it is natural that the researches shall be focused on the static preservation and supply of good seeds and seedlings. Especially, since the plant industries including seaweeds are of fundamentally life-supporting industry, which are different from the animal industries such as fish and shellfish, it has a good prospect in the seaweed cultivation if various parts of efforts will be focused on the improvement of the seaweed industry.

This study is the first in Korea in the field to develop a cryopreservation method and to compare traits between pre- and post-cryopreservations of some red, brown and green algae.

### **III. Scope and contents of research and development**

#### **1. Optimization of cooling and thawing conditions**

- 1) Collection and maintenance of local varieties of useful red, brown and green algae.
- 2) Experiment of prefreezing and thawing, and viability estimation.

#### **2. Comparative experiments between pre- and post-cryopreservations**

- 1) Culture experiment.
- 2) Biological examination.

#### **3. Study on thermal property in the process of cooling and thawing of algae**

- 1) Measurement of freezing point and freezing latent heat.
- 2) Analysis of freezing kinetics
- 3) Measurement of three dimensional distribution of ice crystallization and algae.
- 4) Study on thermal property in thawed algae.

### **IV. Results**

#### **1. Optimization of cooling and thawing conditions**

Using *Porphyra tenera*, *P. yezoensis*, *P. dentata*, *P. seriata*, *P. Pseudolinearis*, *P.haitanensis*, *Undaria pinnatifida*, *Laminaria japonica*, *Sargassum fulvelum*, *Hizikia fusiforme*, *Enteromorpha prolifera* and *codium fragile*, the results of a kind of optimal cryoprotectants, its concentration, cooling and thawing conditions were obtained.

#### **2. Comparative experiments between pre- and post-cryopreservations**

By culture of pre- and post-cryopreservation plants, morphological, physiological and molecular biological and ultrastructural examinations were performed. There was little difference between the two from the results.

#### **3. Study on thermal property in the process of cooling and thawing of algae**

The two-step cooling method have been mostly used for the preservation of algae, and cryoprotectants are used as freezing medium. However, in order to get the higher survival rate of algae, effect of ice crystal must be reduced in process of first-step freezing. As size and distribution of ice crystal may be depended on cooling rate and recrystallization of ice crystal decreases the survival rate, optimal conditions in

first-step freezing of cryopreservation are must be established. In this study, optimal cooling rate and final freezing temperature of *Porphyra seriata*, *Undaria pinnatifida*, *Sargassum fulvellum* were investigated. The mixed suspension of 10 % DMSO and 0.5 M sorbitol in 50 % seawater used as cryoprotectant. Exothermic temperature, freezing time, latent heat of freezing, temperature range of freezing process were measured by differential scanning calorimetry. These results suggest that optimal cooling rate and final freezing temperature were *Porphyra seriata* (1.25°C/min, -34.3 °C), *Undaria pinnatifida* (1.0°C/min, -35.6°C). *Sargassum fulvellum* (1.0°C/min, -33.2°C), respectively.

## V. Application plan of results

- Algae production of Jeollanamdo was about 90% of national production, so the stable cryopreservation and supply system of algae is established by founding the seed bank.
- The cryopreservation and supply system by the seed bank can lead to a preventive of water pollution due to the function of algae for conservation and restoration of coastal ecosystems.
- The system is useful for development of diversity, conservation and restoration biology.
- Clarifying the characteristics relating to ecological, physiological, biochemical, genetical and molecular characters of economic algae is useful to effective breeding and cultivation.
- The system is useful for acquisition of intellectual property right, transference of this technology to industrial circles, commercialization, policy planning and education for fishermen, etc.



# CONTENTS

SUMMARY -----	5
CONTENTS -----	8
<b>Chapter 1. Overview -----</b>	<b>10</b>
Section 1. Aim of research and development -----	10
Section 2. Needs for the study -----	14
Section 3. Objective and research contents -----	16
<b>Chapter 2. R&amp;D status -----</b>	<b>17</b>
<b>Chapter 3. Optimization of cooling and thawing conditions for algae cryo preservation -----</b>	<b>18</b>
Section 1. Introduction -----	18
Section 2. Red algal <i>Porphyra</i> -----	20
Section 3. Brown kelps -----	44
Section 4. Green algae -----	56
<b>Chapter 4. Comparative experiments between pre- and post- cryopreservations -----</b>	<b>68</b>
Section 1. Culture experiment -----	68
Section 2. Biological examination -----	92
<b>Chapter 5. Study on thermal property in the process of cooling and thawing of algae -----</b>	<b>115</b>
Section 1. Introduction -----	115
Section 2. Measurement of character of ice crystallization -----	115
<b>Chapter 6. Purpose achievement and expected contributions -----</b>	<b>145</b>
Section 1. Purpose achievement -----	145
Section 2. Expected contributions -----	146
<b>Chapter 7. Application plan of results -----</b>	<b>148</b>
<b>Chapter 8. References -----</b>	<b>154</b>

# 목 차

제출문	1
요약문	2
SUMMARY	5
CONTENTS	8
목 차	9
제 1 장 연구개발과제의 개요	10
제 1 절 연구개발목적	10
제 2 절 연구개발의 필요성	14
제 3 절 연구개발의 목표 및 내용	16
제 2 장 국내외 기술개발현황	17
제 3 장 종 보존을 위한 동결 및 해동조건의 최적화	18
제 1 절 서    론	18
제 2 절 홍조 김속 조류의 종 보존을 위한 동결 및 해동조건의 최적화	20
제 3 절 갈조 다시마목, 모자반목 배우체의 종 보존을 위한 동결 및 해동 조건의 최적화	44
제 4 절 녹조 가시파래와 청각의 종 보존을 위한 동결 및 해동조건의 최적화	56
제 4 장 원종묘와 동결보존종묘의 비교 생물학적 실험	68
제 1 절 동결전후 종묘의 비교재배실험	68
제 2 절 동결보존 종묘와 원 종묘의 생리·분자생물·미세구조적 비교검증	92
제 5 장 해조류의 종 보존을 위한 동결 및 해동공정에서의 열 특성 연구	115
제 1 절 서    론	115
제 2 절 해조류의 동결공정에서의 동결속도에 따른 빙결정의 성장 측정	115
제 6 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	145
제 1 절 목표달성도	145
제 2 절 기대효과	146
제 7 장 연구개발결과의 활용계획	148
제 8 장 참고문헌	154

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발 목적

해조류는 우리나라에서 예로부터 식용으로 애용되어 왔으며, 의학용, 공업용 원료 및 사료로도 많이 사용되고 있다. 그리고 최근에는 해조류가 가지고 있는 특수한 화학물질과 풍부한 영양으로 전 세계에서 미래의 식량자원이나 의약품으로도 관심이 고조되고 있다. 이러한 높은 관심도에 맞추어 재배기술에 많은 연구가 되어 지고, 생산량 또한 급격하게 증가하고 있는 상태이다.

종보존에 있어서 김속(*Porphyra*) 조류의 경우, 굴 껍질(폐각) 등의 기질 속을 파고 들어가 생육하는 이른바 폐각사상체를 직접 「종 보존」에 이용하며, 기타 수많은 계통이 김 재배업자나 시험연구기관에서 생리생화학적 연구재료용으로 대부분의 경우 유리사상체로 보존 배양되어지고, 또한 연구용으로서 최근 몇 개의 변이 종이 단독 분리, 보존되어지고 있다(Kuwano 1996). 이러한 종들은 현재까지 대부분 계대배양을 통해 널리 보존되어지고 있다.

다시마목(Laminariales) 조류 역시, 전세계 온대, 한대 지역에서 가장 흔한 해조류중의 하나로서, 야생종은 수확하여 식용, 동물의 사료, 비료, 피코콜로이드의 원료로 사용되어지고 있다. 그 중 미역과 다시마는 한국, 일본, 중국, 러시아에서 상업적으로 재배되면서(Lobban and Harrison, 1994), 많은 배우체들이 연구실에서 분리, 보관되고 있다.

이러한 김속(*Porphyra*)조류와 다시마목(Laminariales) 조류의 경우, 보존 종의 수는 한결 같이 증가하는 경향이 있다. 다수의 종을 기존 방법인 유리사상체나 배우체로 하여 계속적으로 보존 배양하는 것은 복잡하면서도 이미 한계와 있다할 수 있고, 연구실에 보관되는 종묘의 양이 증가할수록 저장 기술은 많은 관심의 대상이 된다.

이러한 조류배양기술은 최근 조류학의 발달에 기여하였으며, 많은 조류 배양이 전 세계 연구실에 보관되어져 오고 있다. 하지만 조류 배양에는 많은 인력을 필요로 하였으며, 이로 인해 배양체의 유지를 포기하게 만든 주원인이 되었다. 이 결과 액화 질소(LN)를 이용한 동결보존은 가장 확실한 장기저장법이며, 적은 인력과 공간으로 장기간 안전하게 유지, 보존할 수 있는 방법을 찾게 되었다.

현재 고등식물과 미세 조류를 포함한 많은 생명체에서 액화질소 동결보존이 성공적으로 이루어지고 있다(Bajaj & Reinert 1977; Leeson *et al.* 1984; Rall & Fahy 1985; Mazur *et al.* 1992).

조류의 동결보존에 관한 보고 역시 Table 1과 같이 최근 증가하는 추세이다. 그러나 아직 해조류의 동결보존에 관한 자료는 미흡한 실정이다(van der Meer & Simpson 1984; Renard *et al.* 1992; Kuwano *et al.* 1993, 1994, 1996; Sakanishi & Saga 1994).

Rednard *et al.*(1992)는 *U. pinnatifida*의 동결보존에 관해 연구하였으며, 생존 추정치를 고려하지 않은 상태에서 액화질소를 이용한 동결보존에서의 생존 결과를 발표하였다. Sakanishi and Saga(1994)는 *L. diabolica* 배우체의 생존 추정치와 더불어 생존에 대한 연구결과를 발표했다. 또한, 대항 배우체를 이용한 Laminariales 동결보존 연구에서 실용적이고 유의할 만한 결과가 발표되었다(Kono *et al.* 1998). 그리고 Kuwano *et al.*(1992, 1993)와 Jo *et al.*(2003)는 김속(*Porphyra*) 조류에 대한 동해방어제의 조건을 나타냈으며, 2단계 동결보존법을 이용한 적정 동결조건에 대한 연구결과를 보고한 바 있다.

위와 같이, 최근 들어 동결보존에 대한 연구가 다시 시도되어지고 있으나, 아직까지 동결보존법에 관한 일반적인 방법이 정립되지 못했으며, 현재까지의 연구결과로 알 수 있듯이 해조류 종에 따른 동해방어제의 종류와 효능이 다르다는 것을 알 수 있었다. 동결보존의 성공은 동해보호제의 적절한 선택에 달려있다(Taylor and Fletcher, 1999; Kuwano and Saga, 2000; Kuwano *et al.* 2004)라고 생각되어진다. 더욱이 동결전후의 시료에 대한 형태적, 유전적 검증은 이루어 지지 않은 상태로서 이에 대한 검증 역시 필요하다고 생각되어 진다.

따라서, 본 연구는 아직까지 연구되지 않은 국내에 서식하는 유용 홍조, 갈조, 녹조류에 대하여 Program freezer를 이용한 2단계 동결법을 이용하여 적정 동해방어제의 조건을 연구하였으며, 해동 후 생산율에 영향을 미치는 요인을 연구하였다. 또한, 동결전과 동결후의 종묘에 대하여는 비교재배 실험을 통한 성장도를 측정하고 이에 대한 형태적 검정, 일반성분분석, 구성·유리아미노산분석 및 전자현미경을 통한 세포내 미세구조 등에 대한 차이점에 대하여 비교검정과 해조류 동결과정에서의 열역학적 특성의 측정을 통해 동결과정에서 동결상태의 빙결정 성장과 해조류 생존을 관계를 규명하여 유용 해조류(김과래 목, 다시마 목, 갈파래 목)의 동결보존기술을 개발하여 유전자원 보존에 활용하는데 있다.

Table 1. Cryopreservation methods of marine algae in liquid nitrogen

Species	Cryoprotective solution	cooling	Viability	References
<b>CHLOROPHYTA</b>				
<b>Ulvophyceae</b>				
<i>Ulva lactuca</i>	50% S.W. + 1.5 M DMSO	-40°C(2°C/min) → LN (rapid)	36-100%	Van der Meer <i>et al.</i> (1984)
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	100% S.W. + 10% DMSO + 5% proline	-40°C(<1°C/min) → LN (rapid)	71%	Kono <i>et al.</i> (1997)
<b>HETEROKONTOPHYTA</b>				
<b>Phaeophyceae</b>				
<i>Eisenia bicyclis</i> ; gametophyte	100% S.W. + 10% ethylene glycol + 10% proline	-40°C(<1°C/min) → LN (rapid)	27-31%	Kono <i>et al.</i> (1998)
<i>Laminaria diabolica</i> ; gametophyte	100% S.W. + 10% DMSO + 0.5 M sorbitol	-40°C(<1°C/min) → LN (rapid)	53%	Sakanishi and Saga (1994)
<i>Laminaria japoica</i> ; gametophyte	100% S.W. + 10% ethylene glycol + 10% proline	-40°C(<1°C/min) → LN (rapid)	64%	Kuwano <i>et al.</i> (2004)
<i>Laminaria longissima</i> ; gametophyte	100% S.W. + 10% ethylene glycol + 10% proline	-40°C(<1°C/min) → LN (rapid)	67%	Kuwano <i>et al.</i> (2004)
<i>Kjellmaniella crassifolia</i> ; gametophyte	100% S.W. + 10% ethylene glycol + 10% proline	-40°C(<1°C/min) → LN (rapid)	73%	Kuwano <i>et al.</i> (2004)
<i>Ecklonia stolonifera</i>	100% S.W. + 10% ethylene glycol + 10% proline	-40°C(5°C/min) → LN (rapid)	73%	Kuwano <i>et al.</i> (2004)
<i>Ecklonia kurome</i>	100% S.W. + 5% ethylene glycol + 10% proline	-40°C(5°C/min) → LN (rapid)	56%	Kuwano <i>et al.</i> (2004)
<i>Undaria pinnatifida</i> ; gametophyte	100% S.W. + 5-30% glycerol	-40°C(5°C/min) → LN (rapid)	survived	Renard <i>et al.</i> (1992)
	100% S.W. + 10% glycerol + 10% proline	-40°C(<1°C/min) → LN (rapid)	73%	Kuwano <i>et al.</i> (2004)

(contd.)

Table 1.(continue)

Species	Cryoprotective solution	cooling	Viability	References
<b>RHODOPHYTA</b>				
<b>Rhodophyceae</b>				
<i>Porphyra</i> : sporophyte (5 species)	50% S.W. + 10% DMSO + 0.5 M sorbitol	-40°C(<1°C/min) → LN (rapid)	44-78%	Kuwano and Saga (1994)
<i>Porphyra yezonsis</i> : gametophyte	100% S.W.	-10°C(slow) → LN (170°C/min)	100%	Sakai and Sugawara (1978)
sporophyte	50% S.W. + 10% DMSO + 0.5 M sorbitol	-40°C(<1°C/min) → LN (rapid)	61%	Jo <i>et al.</i> (2003)
<i>Porphyra tenera</i> sporophyte	50% S.W. + 10% DMSO + 0.5 M sorbitol	-40°C(<1°C/min) → LN (rapid)	55%	Jo <i>et al.</i> (2003)
<i>Porphyra seriata</i> sporophyte	50% S.W. + 10% DMSO + 0.5 M sorbitol	-40°C(<1°C/min) → LN (rapid)	64%	Jo <i>et al.</i> (2003)
<i>Porphyra dentata</i> sporophyte	50% S.W. + 10% DMSO + 0.5 M sorbitol	-40°C(<1°C/min) → LN (rapid)	71%	Jo <i>et al.</i> (2003)
<i>P o r p h y r a</i> <i>psendolinearis</i> sporophyte	50% S.W. + 10% DMSO + 0.5 M sorbitol	-40°C(<1°C/min) → LN (rapid)	58%	Jo <i>et al.</i> (2003)
<i>P o r p h y r a</i> ; gametophyte (2 species)	100% S.W. + 10% DMSO + 5% dextran	-40°C(<1°C/min) → LN (rapid)	>96%	Kuwano and Saga (1996)
<i>Gracilaria</i> (2 speces)	50% S.W. + 1.5 M DMSO	-40°C(2°C/min) → LN (rapid)	36-100%	Van der Meer and Simpson(1984)
<i>Palmaria palmata</i>	50% S.W. + 1.5 M DMSO	-40°C(2°C/min) → LN (rapid)	100%	Van der Meer and Simpson(1984)
<i>D e v a l e r a e a</i> <i>ramentacea</i>	50% S.W. + 1.5 M DMSO	-40°C(2°C/min) → LN (rapid)	100%	Van der Meer and Simpson(1984)
<i>Chondrus crispus</i>	50% S.W. + 1.5 M DMSO	-40°C(2°C/min) → LN (rapid)	70-86%	Van der Meer and Simpson(1984)

## 제 2 절 연구개발의 필요성

인류가 해조류를 이용하기 시작한 것은 매우 오래 전으로, 선사시대의 유적에서 미역, 대황, 모자반 등이 발견되고 있다. 어떻게 이용되었는지는 확실하지 않으나 해조류는 식용으로서, 또는 어·패류 등과 함께 염분 보급원으로서 매우 유용했었을 것으로 생각된다.

근래에는 다양한 식품 소재로서 뿐만 아니라, 選擇的抗癌·抗腫瘍性과 抗成人病물질 등의 機能性, 藥效性生理活性物質, 免役活性物質, 神經細胞活性化物質, 細胞選別, 組織化學, 免役學的檢查 등에 이용되는 biosensor 素材物質, 超傳導ceramic纖維 등 hightechnology 소재 물질, 작물의 내병성과 유용미생물의 활력증강 등 비료와 가축·어·패류사료의 소재 물질, 미용과 건강 등을 위한 화장품, 구취제, 海洋系香氣와 海藻療法(algotherapy) 소재 물질 등의 유용 물질이 해조류에 함유되어 있는 것이 알려졌고, 해양수질의 淨化 즉 해양수질환경수복(bioremediation) 소재 물질로서 그 인식과 이용이 세계적으로 확산되고 있으며, 해조관계의 특허 등 知的財産權의 확보도 늘어나고 있다. 바다 목장의 초석이 되는 것 역시 해조류이며, 청색혁명을 이루는 반석이 되는 것 역시 해조류이다.

이와 같이 해조류는 재생 가능한 해양식량자원, 해양생화학자원, 해양연료자원 등 재생 가능 천연자원으로서의 가치가 매우 높을 뿐만 아니라, 이산화탄소만을 방출하는 어패류와는 달리 광합성과 호흡과정 중에서 이산화탄소와 산소를 흡수·방출하므로 지구의 탄소순환에도 일조하고 있다.

다른 산업과 달리 재생 가능성·지속적 이용 가능성 자원을 이용하므로, 대상 자원생물의 활용도를 높이기 위하여 고생산성·고품질성·고부가가치성 품종을 육성하고, 省資源 高創出 持續可能型産業(low input - high output sustainable industry)으로 발전시켜야 할 것이다. 따라서, 해조생산산업의 큰 축을 이루는 해조의 안정적 우량종묘의 보존과 공급에 대한 연구에 박차를 가하여야 함은 물론이다. 특히 해조류 등 식물산업은 어패류 등의 동물산업과 달리 根本的 生命扶養産業(fundamentally life-supporting industry)이므로 다방면의 해조산업 육성에 힘을 기울인다면 해조류 재배업의 전망은 밝다.

### 1. 경제·산업적 측면

기르는 어업에서의 종묘는 양성기술과 함께 대상어업의 성패를 좌우하나, 양성기술이 확립되어 있으면 종묘의 중요성은 더욱 커진다. 국내의 해조재배어업 중 주요 품종인 김, 미역, 다시마의 종묘는 상당수 외국에서 도입한 것으로, 유전적 침식과 더불어 여러 가지 과학적 검증이 되어 있지 않다. 또한 각종 해안공사, 매립, 오염 등 생태계 변화로 인한 고유종과 야생종의 절멸위기로 유전자원의 소멸, 품종의 획일화와 유전적 취약성 등 종과 종 내의 다양성 감소가 일어나고 있다.

BT산업의 핵심중의 하나는 종묘산업이고, 종묘전쟁의 원인이다. 따라서 무분별한 외래

품종의 도입을 방지하고, 다양한 유전자원을 수집·보존하여 base collection과 active collection을 구축하고, 자원의 특성 정보 data base와 passport data를 data base화하여 종묘은행을 운영하며, 우량품종의 안정적 장기보존, 적지적종의 안정적 공급, 연안 생태계 보존용과 기능성 종묘보존 등으로 해조재배업을 포함한 해조산업 경영의 안정화, 소득증대, 수출확대, 고부가가치성 등 기능성 종묘의 유전·육종학 연구 유도로서 해조의 고도 이용화 촉진, 지적재산권(종묘, 동결보존방법 등)취득으로 국제적 기술 우위를 점유하여 경제·산업적 이익에 크게 기여할 수 있다.

## 2. 기술적 측면

현재 국내에서 해조류의 보존은 액체배지에 의한 계대배양법을 사용하고 있다. 계대배양법은 손쉽게 많은 해조류를 배양할 수 있다는 이점은 있으나, 많은 시·공간이 필요한 점, 오염의 가능성, 장기간 배양시 포자형성 능력의 저하와 유전적 변이 등 원래 성질의 변화 가능성 등의 단점이 있다. 동결보존법은 장기간 보존 가능, 적은 시·공간으로 유지 가능, 유전적 안정성 등의 이점이 있으나 현재는 많은 해조에서의 기술개발이 이루어져 있지 않다.

해조류의 동결보존법 개발은 육상식물의 배양세포의 동결보존법을 모델로 해서 시작한 예가 많으며, 대부분 육상식물에서의 방법에 준거하고 있다. 현재 해조류의 동결보존은 동결매액으로서 대부분 50~100% 천연 해수를 사용하며, 동해방어제로서 DMSO, 글리세롤, 에틸렌글리콜 등이 이용되며, 여기에 프롤린, 만니톨, 텍스트란, 솔비톨, 폴리비닐피로리돈 등을 첨가하기도 한다. 냉각 방법은 동결 대상해조에 따라서 다소 다르나, 2단계 동결법을 채용하고 있다. 해동 방법은 주로 급속 해동법을 채용하고 있다. 그러나, 동결보존에 적합한 세대, 조직, 세포의 종류, 그들의 생리적 상태나 전처리방법, 동결속도의 정확한 제어, 생존율의 정확한 측정법 등 아직도 불명확한 점이 많다.

따라서 국내에서는 전무한 해조류의 종보존을 위한 동결보존기술개발을, 외국에서 연구된 방법들을 검토하여 더 많은 경제 해조류의 동결보존과 더 향상된 방법을 확립하려고 한다. 동결보존종의 안정적 공급과 본 연구에서 축적된 기술은 우량품종과 지적재산권 확보 등 종묘전쟁에서 질과 양의 기술 수준의 우위를 차지할 수 있다.



## 제 3 절 연구개발의 목표 및 내용

### 1. 최종목표

해조류 동결과정에서의 열역학적 특성의 측정(보존 경제성의 증대)을 통해 동결과정에서 동결상태의 빙결정 성장과 해조류 생존율 관계를 규명하여 유용 해조류(김파래 목, 다시마 목, 갈파래 목)의 동결보존기술을 개발하여 유전자원 보존을 위한 중요은행 설치에 활용하는데 있다.

### 2. 연차별 연구개발목표와 내용

구 분	목 표	내용 및 범위
1차년도 (2002년 ~2003년)	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 대상 해조의 종묘확보</li> <li>· 예비동결과 해동실험</li> <li>· 동결속도에 따른 빙결정의 성장 측정</li> <li>· 해조류 동결 및 해동 과정에서의 열역학적 특성의 측정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 김파래 목, 다시마 목, 갈파래 목의 지역별 재배품종 종묘 확보</li> <li>· 대상 해조류의 유전적 검증</li> <li>· 예비 동결과 해동실험, 생존율 조사</li> <li>· 동결속도에 따른 동결점 및 동결잠열 측정</li> <li>· 동결 Kinetics 해석</li> </ul>
2차년도 (2003년 ~2004년)	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 적정 동결과 해동조건 및 생존율검정</li> <li>· 대상해조의 유전검증</li> <li>· 해조류의 동결상태에서의 해조류 3차원 구조측정</li> <li>· 해조류의 해동상태에서의 열특성 측정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 적정 동결과 해동조건 확립,</li> <li>· 생존율 검정</li> <li>· 유전적 검증</li> <li>· 해조류 및 빙결정의 3차원 분포 측정</li> <li>· 해동상태에서의 해조류의 열특성</li> </ul>
3차년도 (2004년 ~2005년)	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 원 또는 계대배양 종묘와 동결 보존종묘의 재배학적, 생리학적, 분자생물학적 비교실험</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 원 또는 계대배양 종묘와 동결보존종묘의 실내배양 비교실험</li> <li>· 원 또는 계대배양 종묘와 동결보존종묘의 비교재배 실험</li> <li>· 원 또는 계대배양 종묘와 동결보존종묘의 비교생리학적, 분자생물학적 시험</li> </ul>

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

김속 조류의 사상체 동결보존에 관하여 최근에 연구가 행하여지고 있다. 土屋(1989, 1992)은 방사무늬 김의 사상체를  $-85^{\circ}\text{C}$ 에 보존하는 것을 시험하였으며, 해수에 10.7% DMSO, 8.6% 글루코오스 및 10.7% 폴리에틸렌글리콜을 첨가한 동결 매개액이 최고 동해 방어효과가 있다는 것, 생산율 저하를 방지하기 위해서는 동해방어제의 첨가를 천천히 행할 필요가 있고, 냉각속도  $0.6^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 에서 동결한 쪽이  $2.4^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 에서 동결한 경우보다 생산율이 높았으며, 생산율은 동결보존 중에 서서히 저하하지만 490일 후에도 13%의 세포가 생존한다는 것 등을 보고하고 있다. 藤吉 등(1993a, b)은 방사무늬 김의 사상체를 2단계 동결법(일단 예비 동결하여 그 후 액체질소온도까지 급속 동결하는 방법)에 의해 액체질소온도에서 동결 보존에 대하여 시험한 결과 33% 해수에 1.5M DMSO와 0.5~0.75M 솔비톨을 첨가한 동결 매개액체가 가장 동해방어효과가 높았으며, 생산율 저하를 방지하기 위한 동해방어제의 첨가는  $0^{\circ}\text{C}$ 에서 천천히 행할 필요가 있고, 예비동결은  $0.5\sim 1.0^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 의 속도에서  $-40\sim -50^{\circ}\text{C}$ 까지 진행시키는 것이 적절하였다는 등을 보고하고 있다.

액체질소를 이용한 동결보존방법은 많은 연구보고에서 2단계 동결법이 이용되고 있다. 이것은 세포를 일단  $-30\sim -40^{\circ}\text{C}$ 까지 천천히 냉각시켜 세포를 동결탈수하고, 그 후 액체질소온도까지 급랭시켜 세포 내부의 물을 결빙시키는 방법이 있다. 이 방법은 고등식물의 배양세포나 미세조류의 동결보존에도 사용되고 있다(Morris 1978, Chen *et al.*, 1984b).

냉동보존법의 개발에는, 각각의 요인이 어느 정도 생존율에 영향을 미치는가를 밝혀 명확하게 할 필요가 있다. 앞서 말한 것처럼 김속 사상체에 있어서 지금까지 연구된 유효한 동해방어제의 종류와 그 농도, 동해방어제의 첨가속도, 예비동결온도 및 냉각속도 등이 보고되어지고 있다. 그러나 해수농도, 植氷온도, 해빙속도 등이 중요하는데도 검토되고 있지 않을 뿐만 아니라, 예비동결온도와 냉각온도의 관계, 동해방어제의 농도와 예비동결온도의 관계 등 상호 관계에 있어서는 정확하게 밝혀져 있지 않다.

## 제 3 장 종 보존을 위한 동결 및 해동 조건의 최적화

### 제 1 절 서 론

조류배양기술은 최근 조류학의 발달에 기여하였으며, 많은 조류 배양이 전 세계 연구실에 보관되어 있다. 하지만 조류 배양에는 많은 인력을 필요로 하였으며, 이로 인해 배양체의 유지를 포기하게 만든 주원인이 되었다. 이 결과 액화질소(LN)를 이용한 동결보존법은 가장 확실한 장기저장법으로 적은 인력과 공간으로 장기간 안전하게 유지, 보존할 수 있는 방법을 찾게 되었다. 고등식물과 미세 조류를 포함한 많은 생명체에서 액화질소 동결보존이 성공적으로 이루어지고 있다(Bajaj & Reinert 1977; Leeson *et al.* 1984; Rall & Fahy 1985 : Mazur *et al.*). 그러나 아직 해조류의 동결보존에 관한 자료는 미흡한 실정이다(van der Meer & Simpson 1984 : Renard *et al.* 1992 : Kuwano *et al.* 1993, 1994, 1996 : Sakanishi & Saga 1994).

김속(*Porphyra*)은 홍조식물문(Rhodophyta)의 원시홍조강(Bangiophyceae), 보라털목(Bangiales), 보라털과(Bangiaceae)에 속하고, 세계에는 약 45종(Kraft 1981)이 알려져 있다. 주로 재배되고 있는 종은 한국과 일본에서는 참김(*P. tenera*) 및 방사무늬 김(*P. yezoensis*) 등이 주종을 이루고 있으며, 한국에서는 특히 모무늬 돌김(*P. seriata*)이 많이 재배되고 있으며, 중국에서는 여기에 추가하여 *P. haitanensis* 가 있다.

김 재배업에 있어서는 수많은 계통이 김 재배업자나 시험연구기관에서 사상체로서 보존배양 되어지고, 또한 연구용으로서 최근 몇 개의 변이 종이 단독 분리, 보존되어지고 있다(三浦·高木 1994). 보존 종의 수는 한결같이 증가하는 경향이 있다. 이러한 다수의 종을 기존 방법인 유리사상체로 하여 계속적으로 보존 배양하는 것은 복잡하면서도 이미 한계에 도달하였다고 할 수 있다.

Laminariales은 전세계 온대, 한대 지역에서 가장 흔한 해조류종의 하나이다. 포자체는 무성한 수중림을 형성하여 다양한 어류와 무척추동물의 좋은 서식처를 제공한다. 성게, 소라, 전복, 그 외 상업적으로 유용한 생물들이 서식하고 있다. 야생종은 수확하여 식용, 동물의 사료, 비료, 피코콜로이드의 원료로 사용된다. *Undaria*와 *Laminaria*는 한국, 일본, 중국, 러시아에서 상업적으로 재배되면서(Lobban and Harrison, 1994), 많은 배우체들이 연구실에서 분리, 보관되고 있다.

연구실에 보관되는 Laminariales 배우체의 량이 증가할수록 배우체 저장 기술은 많은 관심의 대상이 된다.

*Enteromorpha*(Ulvales, chlorophyta)에는 상업적으로 재배하는 몇 가지 종이 속해있다. 이들의 생활사는 이중 생활환으로 엽상 배우체와 포자체로 구성되어 있으며 이 두 가지를 모양으로는 구분하기는 힘들다. 배양시 *Enteromorpha*의 암수 생식체는 단성생식을

통해 엽상 배우체로 증식한다. 따라서 암수 배우체를 서로 분리하여 배양하는 경우 미융합 생식체로 영구보존이 가능하다.

조류의 동결보존에 관한 보고 역시 Table 1과 같이 최근 증가하는 추세이다. 그러나 아직 해조류의 동결보존에 관한 자료는 미흡한 실정이다(van der Meer & Simpson 1984; Renard *et al.* 1992; Kuwano *et al.* 1993, 1994, 1996; Sakanishi & Saga 1994). Rednard *et al.*(1992)는 *U. pinnatifida*의 동결보존에 관해 연구하였으며, 생존 추정치를 고려하지 않은 상태에서 액화질소를 이용한 동결보존에서의 생존 결과를 발표하였다. Sakanishi and Saga(1994)는 *L. diabolica* 배우체의 생존 추정치와 더불어 생존에 대한 연구결과를 발표했다. 또한, 대황 배우체를 이용한 Laminariales 동결보존 연구에서 실용적이고 유의할 만한 결과가 발표되었다(Kono *et al.* 1998). 그리고 Kuwano *et al.*(1992, 1993)와 Jo *et al.*(2003)는 김속(*Porphyra*) 조류에 대한 동해방어제의 조건을 나타냈으며, 2단계 동결보존법을 이용한 적정 동결조건에 대한 연구결과를 보고한 바 있다.

위와 같이, 최근 들어 동결보존에 대한 연구가 다시 시도되어지고 있으나, 아직까지 동결보존법에 관한 일반적인 방법이 정립되지 않았으며, 현재까지의 연구결과로 알 수 있듯이 해조류 종에 따른 동해방어제의 종류와 효능이 다르다는 것을 알 수 있었다. 동결보존의 성공은 동해보호제의 적절한 선택에 달려있다(Taylor and Fletcher, 1999; Kuwano and Saga, 2000; Kuwano *et al.* 2004)라고 생각되어진다. 더욱이 동결전후의 시료에 대한 형태적, 유전적 검증은 이루어 지지 않은 상태로서 이에 대한 검증 역시 필요하다고 생각되어 진다.

따라서, 본 연구는 아직까지 연구되지 않은 국내에 서식하는 유용 홍조, 갈조, 녹조류에 대하여 Program freezer를 이용한 2단계 동결법을 이용하여 적정 동해방어제의 조건을 연구하였으며, 해동 후 생산율에 영향을 미치는 요인을 연구하였다.

## 제 2 절 홍조 김속 조류의 종 보존을 위한 동결 및 해동조건의 최적화

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 재료

본 연구에서는, 전라남도해양바이오산업연구원내 종 보존연구실에서 계대 배양하고 있는 홍조류(김파래목)에서 참김(*P. tenera*), 방사무늬김(*P. yezoensis*), 잇바디돌김(*P. dentata*), 모무늬돌김(*P. seriata*), 긴잎돌김(*P. pseudolinearis*), *P. haitanensis*의 유리사상체를 이용하였다. 처리조건의 검토는 주로 모무늬돌김(*P. seriata*)을 이용하였다. 모든 유리사상체 계대 배양에는 20℃, 14시간 명기( $60\mu\text{ Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ ; 백색형광등) · 10시간 암기의 광주기하에서 PES배지(Probasoli 1968)를 사용하여 배양하고, 사용 전에 가정용 믹서로 세단하였다.

#### 나. 동해 방어제

본 연구에서는 지금까지 각종 생물의 동결보존에 있어서 동해방어제로 사용되고 있는 DMSO, Glycerol( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ ), Ethylene glycol( $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ), Glycerol, Proline, Betaine · HCl, Skimmed milk, Sucrose, Glucose( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ), Sorbitol( $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$ ), 및 Mannitol( $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$ )에 대하여 동해방어제로서의 효과를 검토하였다.

#### 다. 프리저에 의한 동결 및 해동

해수(32.0~33.5%)를 0~100%의 범위에서 여러 가지 농도로 희석하여 Sucrose, Glucose, Sorbitol, 혹은 Mannitol 을 0~0.1M 첨가한 것을 기본액으로 하였다(0.01M HEPES를 첨가해서 pH 8.0으로 조정). 이 기본액 0.75 ml에 약 1 mg(생중량)의 사상체를 섞어, 용량 2 ml의 동결보존용 vial에 넣어, ice bath에 넣고 빙냉시켰다. 기본액에 최종농도의 2배량의 동해방어제 농도가 되도록 제조하여 미리 빙냉시켜 놓은 동결 매개액 0.75 ml를 15분에 걸쳐 서서히 사상체 현탁액에 첨가한 후 45분간 안정시킨다.

사상체 현탁액 1.5 ml를 넣은 동결 보존용 바이알을 알루미늄 제재의 바이알홀더에 끼워 넣어, -40℃ 또는 -80℃ Programmed Freezer(samwon)에서 동결시킨다. 동결 중인 사상체 현탁액의 온도변화는, 기록계(KA100 Kowics)에 의해 측정한다. 냉각속도는 5℃/분 이하였다. Deep-Freezer에서 동결 보존한 후 40℃ water-bath에 넣고 강하게 흔들어서 사상체 현탁액을 급하게 해동시켜, 얼음이 완전히 녹기 바로 전에 바이알을 ice-bath로 옮겼다. 해동 후 사상체 현탁액을 용량 14 ml의 원뿔형 침전관으로 옮겨, 냉장보관한 해수로 30분 이상에 걸쳐 7배로 희석하고 300×g로 5분간 원심분리 한 후 윗물을 제거하고, 다시 한번 해수와 섞어, 동해방어제를 제거했다.

#### 라. 2단계 동결 및 해동

기본조작은 아래와 같이 했다. 50% 해수(16.0~16.8%)에 0.5M Sorbitol을 첨가한 것을 기본액으로 하였다(0.01M HEPES를 첨가하여 pH 8.0으로 조절). 이 기본액 0.75 ml에 약 1 mg(생중량)의 사상체를 현탁시켜, 용액 2 ml의 동결보존용 바이알에 넣고 아이스바스를 이용 냉각시켜, 기본액에 최종농도의 2배량의 DMSO를 함유하게 제조한 동결매개액을 미리 냉각시켜 두었다가, 이 동결매개액 0.75 ml를 15분에 걸쳐 서서히 사상체 현탁액에 첨가한 후 45분간 안정시킨다. 사상체 현탁액을 넣은 동결 보존용 바이알을 Programmed Freezer(Samwon)를 사용하여 일단 1 °C/분으로 -40 °C까지 예비동결하고, 그 후 액체질소에 담갔다. 액체질소탱크 속에서 하루 동안 보존한 후 40 °C의 항온수조 속에서 바이알을 세게 흔들면서 사상체 현탁액을 급속히 해동하여 얼음이 완전히 녹기 바로 전에 바이알을 ice-bath로 옮겼다. 해동 후 사상체 현탁액을 용량 14 ml의 원뿔형 침전관으로 옮겨 냉장보관한 해수로 30분 이상에 걸쳐 7배로 희석하고 300×g로 5분간 원심분리 한 후 윗물을 제거하고, 다시 한번 해수와 섞어 동해방어제를 제거했다.

#### 마. 생존률 측정

세포의 생사판정은 뉴트럴레드 염색으로 판정하였다(Saga *et al.*, 1989). 사상체 현탁액에 뉴트럴레드 해수용액(0.1%)을 같은 량 넣어, 20분간 염색했다. 염색 후, 다시 해수로 희석하여 염색제를 제거하였다. 각각의 바이알에 대하여 300개 이상의 사상체 세포의 생사를 광학현미경으로 판정하였다. 생존율은 동결보존하기 전의 사상체 샘플에 대한 상대치로 표시하였다. 모든 경우에 있어 동일 처리한 3샘플에 대해 계수하여 평균치를 구했다.

#### 바. 증식 및 성숙 상태의 확인

액체질소 속에 동결 보존한 사상체를 20 °C, 14시간 명기( $60 \mu \text{Em}^2\text{s}^{-1}$ ; 백색형광등)·10시간 암기의 광주기하에서 PES배지를 이용하여 배양하고, 증식한 사상체를 가정용 믹서로 세단하여, 각포자낭을 형성하지 않은 사상체 조각만을 하나씩 분리하여, 20 °C(*P. haitanensis* 25 °C), 10시간 명기( $60 \mu \text{Em}^2\text{s}^{-1}$ ; 백색형광등)·14시간 암기 하에서 통기 배양했다. 각포자낭을 형성한 사상체를 15 °C(*P. haitanensis* 25 °C), 10시간 명기( $60 \mu \text{Em}^2\text{s}^{-1}$ ; 백색형광등)하고 14시간 암기 하에서 통기 배양하여 각포자를 방출시켰다.

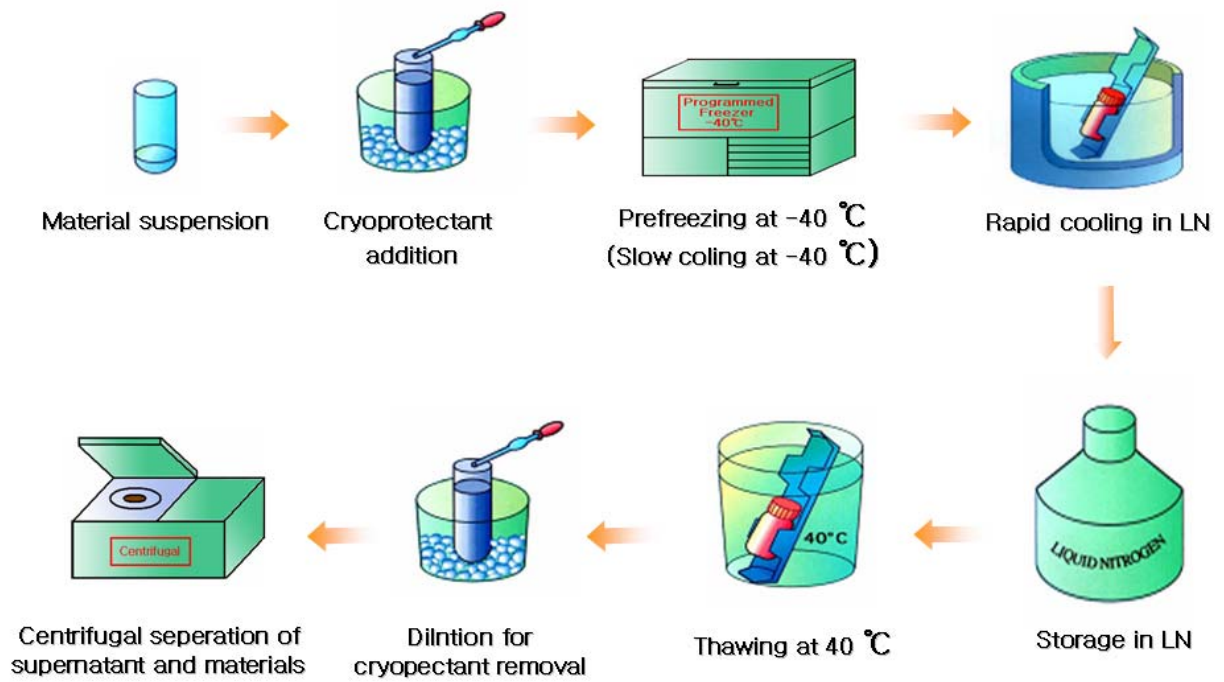


Fig. 1. Schematic diagram of two-step cooling method and thawing method.

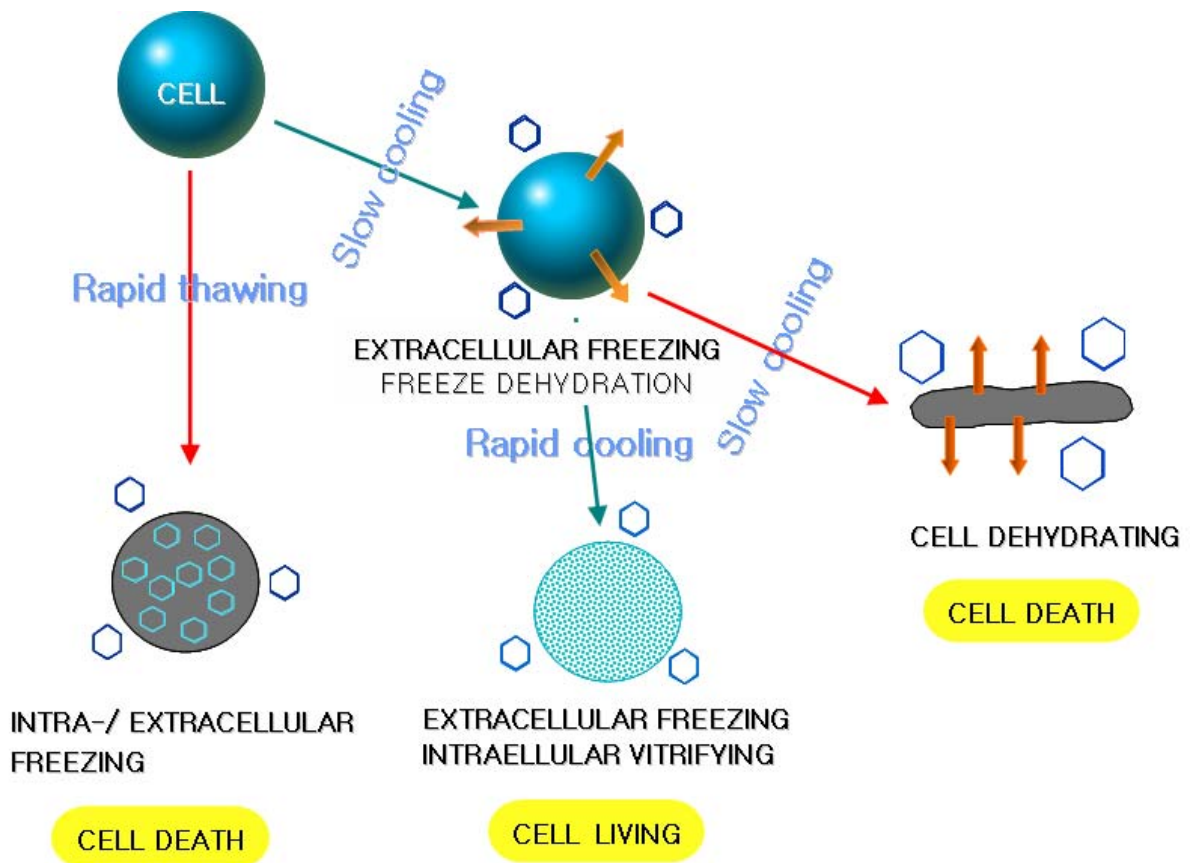


Fig. 2. Schematic diagram of cell fate by cooling methods. Snowflakes, ice crystals.



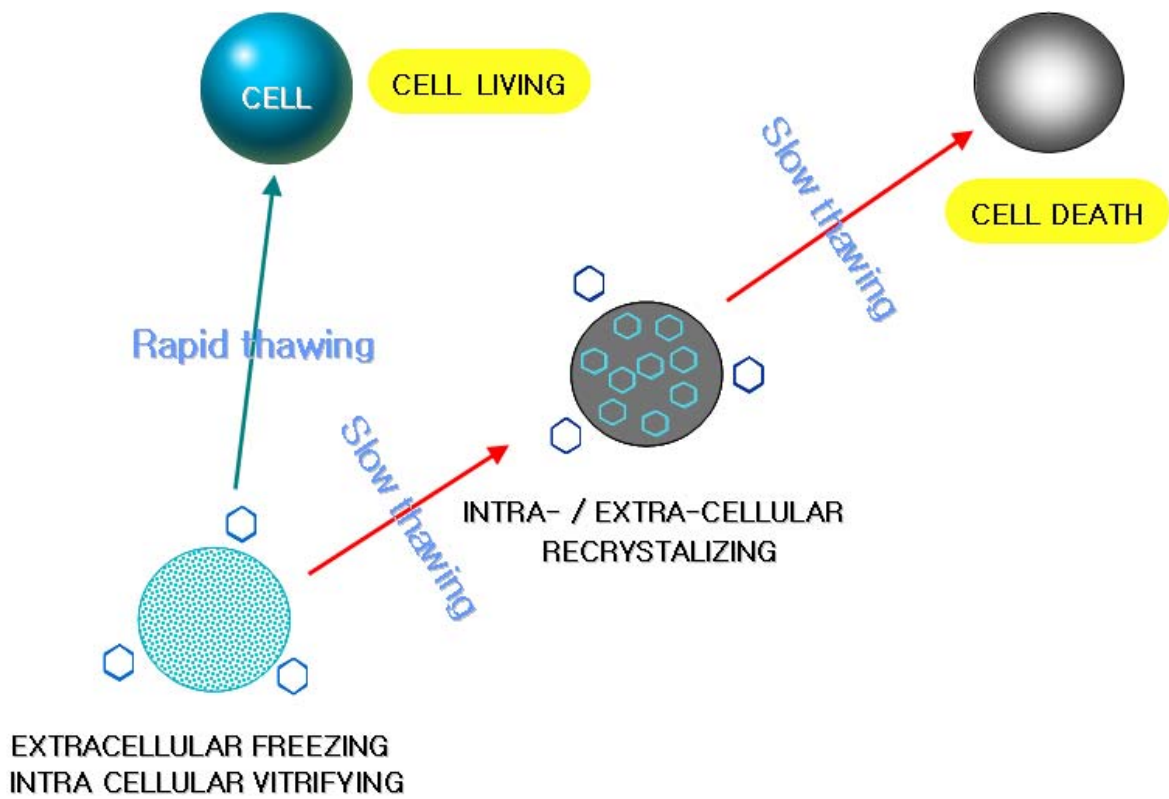


Fig. 3. Schematic diagram of cell fate by thawing methods. Snowflakes, ice crystals.

## 2. 결 과

### 가. 동해방어제의 검토

2단계 동결법에 의해 액체질소온도에서 동결보존을 한 경우, 세포를 적당한 동해방어제로 처리함으로써,  $-30\sim-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 동결을 견뎌 내야 할 필요가 있다. 국내 산업종으로 널리 사용되고 있는 모무늬돌김(*P. seriata*)의 사상체를 이용한, 동해방어제의 효과를  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 하루 동안 동결시킴으로써 검토하였다.

먼저, 고등식물과 미세조류의 동결보존에 가장 널리 사용되고 있는 DMSO를 이용하여 그 동해방어 효과를 검토했다.

Fig. 4는 100% 해수 또는 50% 해수에 0, 5, 10, 15%의 농도로 DMSO를 넣은 경우의 생존율을 나타냈다. DMSO를 첨가하지 않고 동결시킨 것은 생존율이 10% 이하였다.

50% 해수에 DMSO를 5% 첨가, 생존율은 65.4%가 되었지만, DMSO농도를 15%까지 높여도 생존율은 거의 변화하지 않았다. 한편, 100%해수에 DMSO를 넣은 경우에는 생존율은 DMSO를 넣지 않고 동결한 경우보다 오히려 낮아져, DMSO의 동해방어효과는 해수농도에 영향을 받는 것임이 명확해졌다(100% 해수에 30% DMSO를 넣으면 침전이 생기기 때문에, 100% 해수에 15% DMSO를 넣은 경우의 실험은 하지 않았다). 그래서 여러 종류의 농도로 희석시킨 해수에 5% DMSO를 넣어, 해수 농도의 영향에 대하여 검토했다. 그 결과, DMSO를 넣지 않은 경우에는 생존율은 모두 10%이하였지만, DMSO를 넣은 경우에는 생존율은 크게 변화하여, 해수농도의 상승에 따라 생존율은 높아지며, 해수농도 50%에서의 생존율은 최대가 되고, 그 이상으로 해수농도가 높아지면 생존율은 다시 낮아졌다(Fig. 5).

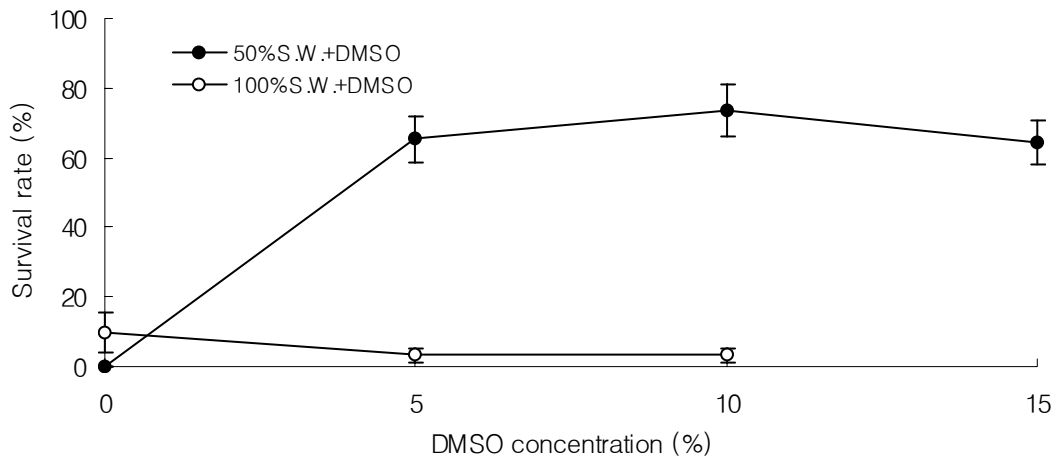


Fig. 4. Effect of the concentration of DMSO on survival rate of the conchocelis of *Porphyra seriata*. Conchocelis cells were frozen at  $-40^{\circ}\text{C}$  for one day. As the addition of 30% DMSO to 100% seawater brought about precipitation, the effect of 15% DMSO in 100% seawater was not examined. Values are means  $\pm$ SD (n=3).

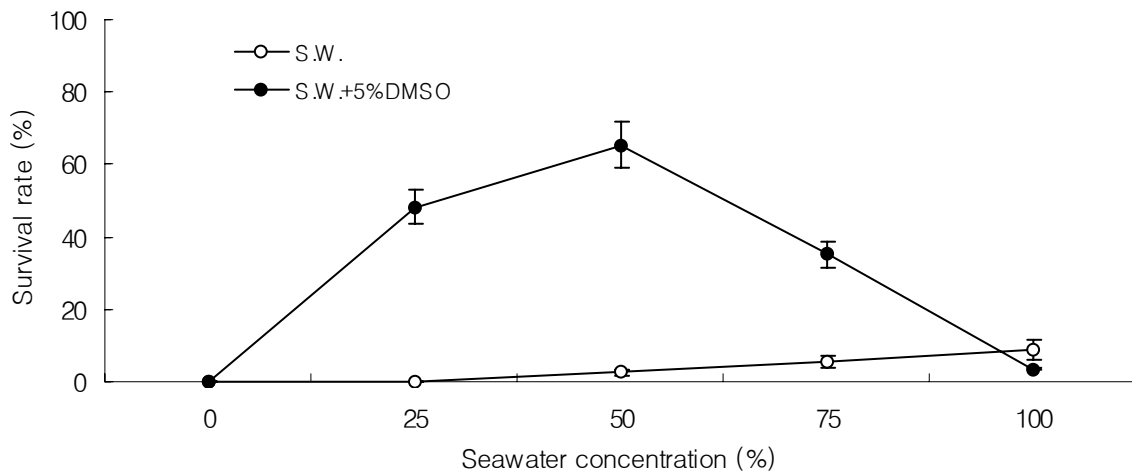


Fig. 5. Effect of the concentration of seawater on survival rate of the conchocelis of *Porphyra seriata*. Conchocelis cells were frozen at  $-40^{\circ}\text{C}$  for one day in various concentrations of seawater. Values are means  $\pm$ SD (n=3).

DMSO이외에 김 속 사상체에 유효한 동해방어제가 있는지를 조사하기 위해 동결보존에 자주 사용되고 있는 Glycerol, Ethylene glycol, Proline, Betaine · HCl, Skim milk, Sucrose, Glucose, Sorbitol 및 Mannitol에 대하여 동해방어제 효과를 똑같이 -40 °C에서 하루 동안 동결시켜 검토하였다. 당과 당 알코올에 대해서는, 독성이 낮다고 생각되므로 첨가농도를 비교적 높게 하였고, 또 동결매개액의 침투압이 같아지도록 각각 1.0M을 50%해수에 첨가했다. 그 이외의 것에 대해서는, 독성에 의해 동해 방어 효과가 감춰지지 않도록 하기 위해 첨가농도를 비교적 낮게 하여, 각각 5%를 50%해수에 첨가했다. Table 2에 나타난 것처럼, DMSO이외에도 Sucrose와 Proline에서 동해방어효과가 나타났지만, 검토한 동해방어제 중에서는 DMSO의 효과를 상회한다거나 DMSO와 동등한 효과를 갖는 것은 없었다.

Table 2. Survival rates(mean±SD) of the conchocelis of *Porphyra seriata* in various cryoprotectant

Cryoprotectant	Survival rates (%)
Control (50% seawater)	2.1 ± 2.1
5% DMSO	65.4 ± 4.8
5% Ethylene glycol	3.2 ± 3.1
5% Glycerol	6.8 ± 4.2
5% Proline	18.3 ± 4.6
5% Betaine · HCl	9.7 ± 2.4
5% Skimmed milk	1.8 ± 1.3
1M Glucose	4.6 ± 3.2
1M Sucrose	43.1 ± 4.9
1M Sorbitol	3.5 ± 2.6
1M Mannitol	1.6 ± 1.4

\* Conchocelis were frozen at -40°C for one day in each cryoprotectant dissolved in 50% seawater.

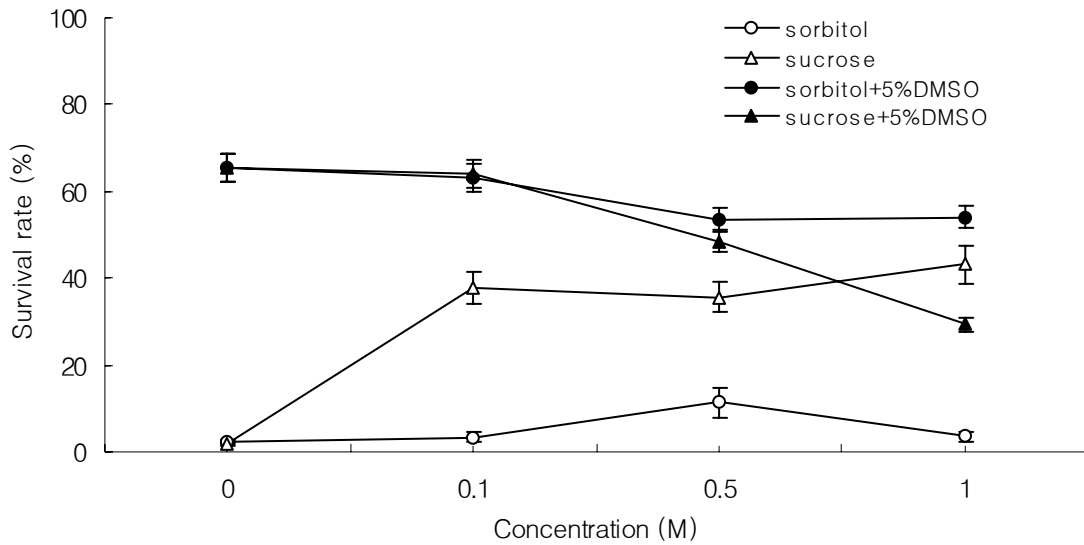


Fig. 6. Effect of the sorbitol and sucrose concentrations on survival rates of the conchocelis of *Porphyra seriata* frozen at  $-40^{\circ}\text{C}$  for one day. Cryoprotectants were added in 50% seawater. Values are means $\pm$ SD (n=3).

DMSO와 DMSO 다음으로 동해방어효과가 높았던 Sucrose를 혼합함으로써 동해방어 효과를 높일 수 있는지의 여부를 명확히 하기 위해, 5% DMSO와 0.1~1.0M Sucrose를 혼합하여,  $-30^{\circ}\text{C}$ 에서 하루 동안 동결시킨 경우의 생존율을 5% DMSO 단독의 경우와 비교해 보았다. 또, Sucrose 혼합에 의한 효과가 동결매개액의 침투압 상승에 의한 것인지의 여부를 명확히 하기 위해, 단독으로는 효과를 볼 수 없었던 Sorbitol을 같은 0.1~1.0M의 농도로 DMSO와 혼합하여 비교 검토했다. 그 결과를 (Fig. 6)에 나타냈다. Sucrose는 단독으로 사용하면 0.1~1.0M의 범위에서 생존율 40% 정도의 동해방어 효과를 볼 수 있지만, 5% DMSO와 혼합하면 0~0.1M의 범위에서 생존율 65.4%정도가 되었으나, Sucrose농도가 상승하자마자 생존율이 저하하는 것을 볼 수 있었다. Sorbitol은 단독으로 사용하면 어떤 농도에서도 동해방어효과는 볼 수 없었지만, 5% DMSO와 혼합하면 생존율은 53~65%가 되었지만 5% DMSO 단독의 경우에 비해 생존율의 상승은 나타나지 않았다.

50% 해수에 5% DMSO를 넣은 동결매개액을 사용하여,  $-40^{\circ}\text{C}$ 에서 보존한 경우 생존율의 경과시간 변화를 조사함과 함께, DMSO와 Sucrose 또는 Sorbitol을 혼합함으로써 생존율이 경과시간 변화의 차이가 발생하는지의 여부를 비교 검토하였는데, 그 결과는 Table 3과 같다.

Table 3. Survival rates(mean±SD) of the conchocelis of *Porphyra seriata* stored at -40 °C for different periods of time. Cryoprotectants were added in 50% sea water

Cryoprotectant	Survival rates (%)						
	1 hours	1 day	7 day	10 day	20 day	40 day	60 day
5% DMSO	-	65.4±4.8	0.5±0.5	0.1±0.1	-	-	-
5% DMSO +0.5M sorbitol	75.2±1.8	53.6±3.6	14.2±4.2	9.3±3.8	3.2±0.4	1.5±0.7	0.4±0.4
5% DMSO +0.1M sucrose	-	48.6±6.9	0.4±0.4	0.1±0.1	-	-	-

\* - : not examined.

이러한 세 가지 경우와 같은 동결매개액을 사용하여 사상체 세포를 -80 °C에서 보존한 경우의 결과를 (Table 4) 에 나타냈다. 모든 동결매개액에서 생존율은 매우 낮고, 3일 이내에 1%이하가 되었다.

Table 4. Survival rates(mean±SD) of the conchocelis of *Porphyra seriata* frozen at -80°C for different periods of time

Cryoprotectant	Survival rates (%)			
	4hours	1day	3day	7day
5% DMSO	-	0.2±0.2	-	0.2±0.2
5% DMSO+0.5M sorbitol	1.8±0.7	1.5±0.4	0.4±0.3	0
5% DMSO+0.1M sucrose	-	0	-	0

\* - : not examined

\* Cryoprotectants were added in 50% seawater.

이상의 결과로, 모무늬돌김 사상체는 50% 해수에 5% DMSO와 0.5M Sorbitol을 넣은 동결매개액을 사용하면 -40°C까지 냉각시켜도 비교적 단기간이면 높은 비율로 생존한다는 것이 명확해졌다.

#### 나. 2단계 동결에서 예비동결조건의 검토

50%해수에 DMSO와 Sorbitol을 넣은 동결매개액을 사용하면, 방사무늬 김 사상체의 세포를 단기간이면  $-40^{\circ}\text{C}$ 까지 냉각시켜도 높은 비율로 생존 시킬 수 있다는 것이 명확해졌으므로, 2단계 동결법을 도입하기 위해 모무늬돌김을 사용하여 예비동결 조건을 검토하였다.

50%해수에 2.5~15% DMSO 와 0.5M Sorbitol을 혼합한 동결매개액을 사용하여 사상체 현탁액을 먼저  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 속도로  $-20\sim-80^{\circ}\text{C}$ 의 범위에서 여러 가지 온도로 예비동결하여, 예비 동결 직후 바로 해동시킨 경우의 생존율을 구하자마자, 예비 동결 후 액체질소온도까지 급랭시켜 하루 동안 보존한 경우의 생존율을 구했다. 그 결과를 (Fig. 7)에 나타냈다. 예비동결 직후 바로 해동하면(Fig. 7. A) 사상체 세포의 생존율은, DMSO 농도에 관계없이 예비동결온도의 저하와 함께 낮아졌지만, DMSO가 높아지면 예비동결온도의 저하에 따른 생존율 저하는 적어졌다. 단, DMSO 15%의 경우에 생존율은 전체적으로 낮았고, 특히 예비동결온도가  $-40^{\circ}\text{C}$ 이상의 범위에서의 생존율은 가장 낮았다. 이에 비해 예비동결 후 그것을 액체질소온도까지 냉각시킨 경우에는 (Fig. 7. B), 어떤 DMSO 농도에서도,  $-20\sim-30^{\circ}\text{C}$ 까지 예비동결 한 사상체 세포는 예비동결 단계에서는 대부분이 생존했음에도 생존율은 20% 이하였지만,  $-40^{\circ}\text{C}$ 까지 예비동결온도를 낮춘 것에서는 생존율이 가장 높고, 또 예비동결온도를 낮추자 생존율은 점점 낮아졌다. 예비동결온도  $-40^{\circ}\text{C}$ 일 때의 사상체세포의 생존율은, DMSO 농도의 10%인 경우가 최고(63.8%)이며, DMSO 농도가 이보다 더 높거나 낮아도 생존율은 이보다 더 낮았다.

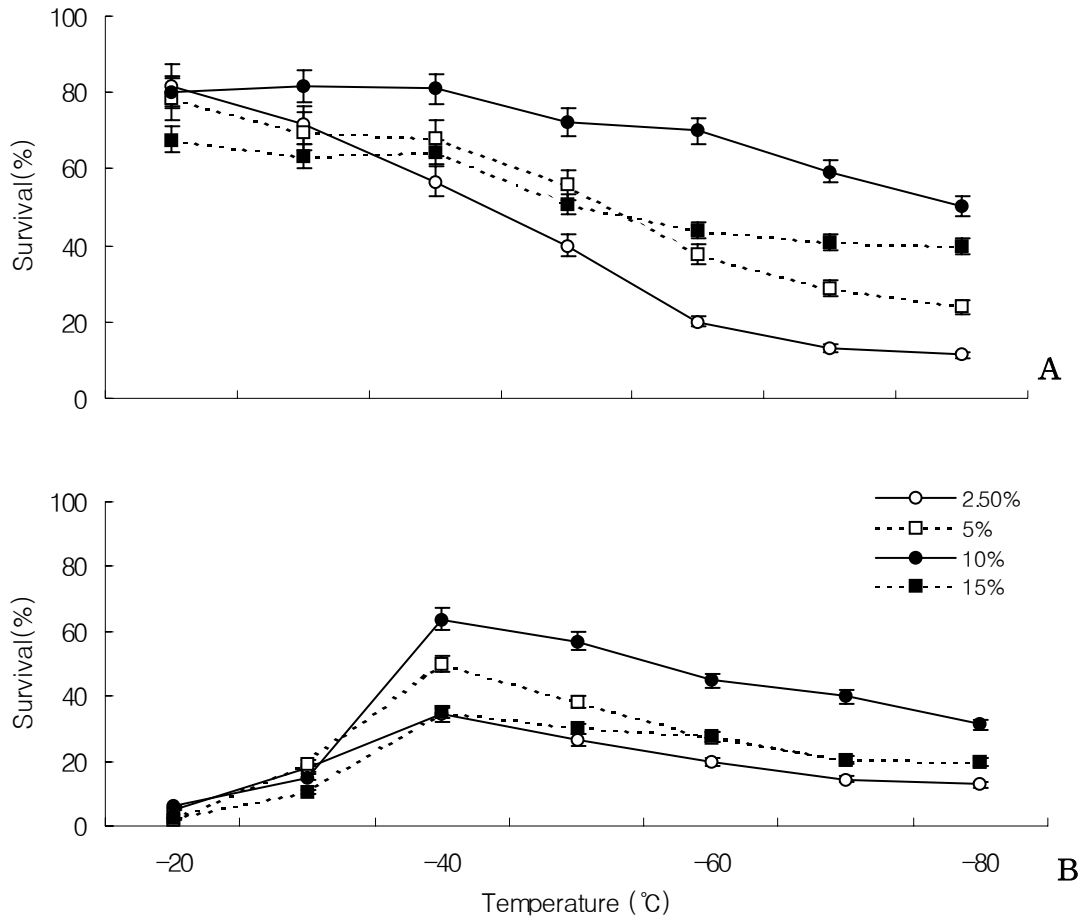


Fig. 7. Survival rates of the conchocelis of *Porphyra seriata* cooled to various temperatures at 1°C/min. Conchocelis cells were suspended in cryoprotective solutions composed of 2.5~15% DMSO and 0.5M sorbitol in 50% seawater. A, thawed immediately after prefreezing; B, stored for 1 day in LN before thawing. Values are means±SD (n=3).



2단계 동결 후 생존율이 가장 높았던 예비동결온도  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 인 경우의 DMSO 농도와 생존율의 관계를 (Fig. 8)에 나타냈다. 이 그림에는 (Fig. 7)에 나타낸 데이터 이외에 DMSO를 0% 및 20%로 했을 때의 결과도 함께 나타내고 있다. DMSO없이 사상체세포를 동결시킨 경우에는 사상체세포의 생존율은 현저히 낮아졌다. DMSO의 동해방어효과는 2.5%부터 나타났으며, 최적 농도는 10%였다. DMSO농도가 10%를 넘으면 저해효과가 나타나기 시작해, DMSO 농도를 20%까지 높이면 사상체세포의 생존율은 DMSO없이 동결시킨 경우와 비슷한 수준까지 낮아졌다.

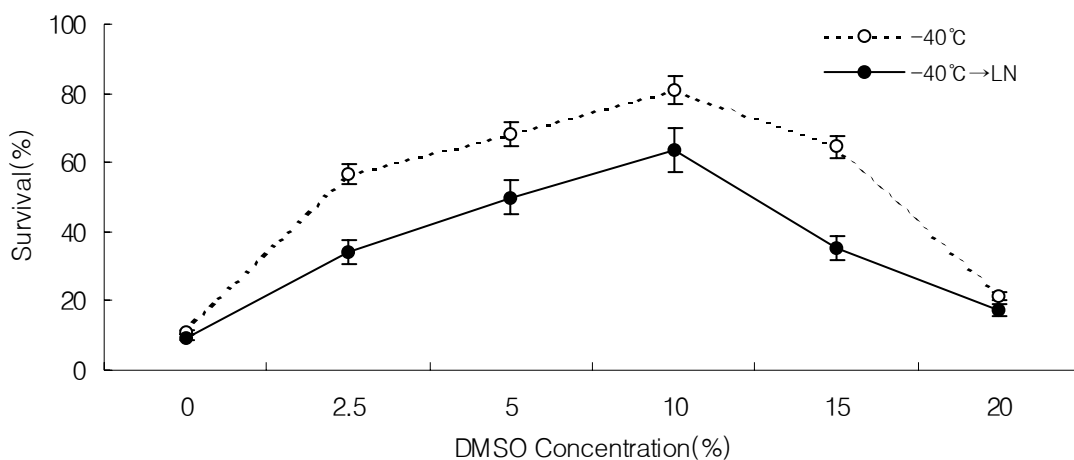


Fig. 8. Effect of DMSO concentrations on survival of the conchocelis of *Porphyra seriata*. Conchocelis cells were suspended in cryoprotective solutions composed of 0~20% DMSO and 0.5M sorbitol in 50% seawater, cooled to  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  at  $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  and thawed before or after the immersion in LN for a day. Values are means  $\pm$  SD.

50 %해수에 10 % DMSO와 0.5 M Sorbitol을 혼합한 동결매개액을 사용하여, 예비동결 있어서 냉각속도의 영향에 대해 검토하였다. 사상체 현탁액을  $0.5\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 의 속도로  $-20\sim -80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 까지 예비 동결하여, 예비동결 직후 바로 해동한 경우의 생존율과 예비 동결 후 액체질소 온도까지 급랭시켜 1일간 보존한 경우의 사상체 세포의 생존율을 (Fig. 9)에 나타냈다. 예비동결 직후 바로 해동한 경우에는, 생존율은 냉각속도와 상관없이 예비동결 온도의 저하와 함께 거의 비슷하게 저하되었다(Fig. 9. A). 한편, 예비동결 후에 액체질소 온도까지 냉각하여 하루 동안 보존한 경우에는, 생존율은 예비동결온도  $-20\sim -30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서는 매우 낮고, 예비동결온도  $-40\sim -50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서는 높아지고,  $-50\sim -60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 이하가 되면 낮아져,  $0.5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  와  $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  에서 냉각했을 때는 최적 예비 동결 온도는  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 였는데,  $2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  과  $4\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  에서 냉각했을 때는 최적 예비동결온도는  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 이었다(Fig. 9. B).

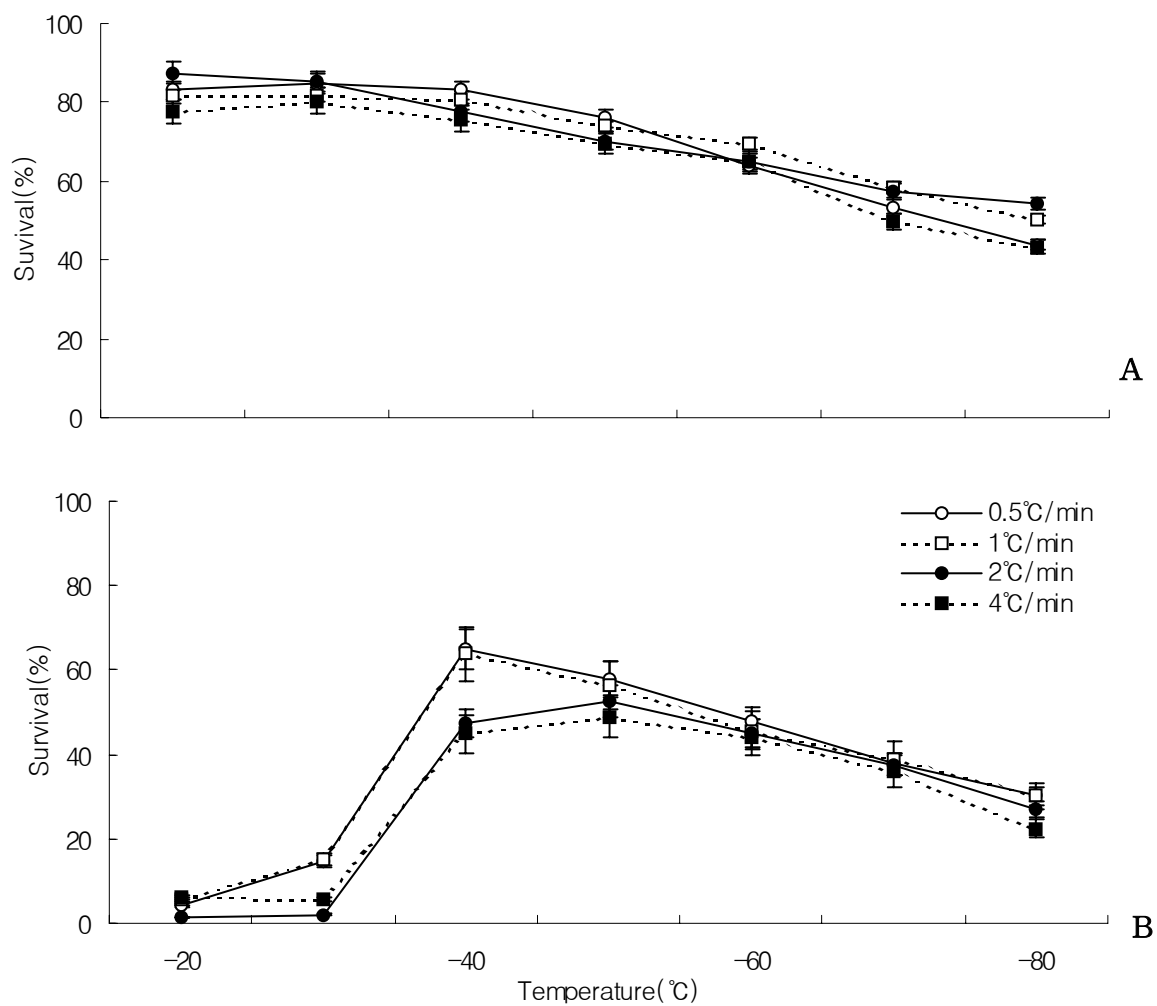


Fig. 9. Effect of cooling rates on survival of the conchocelis of *Porphyra seriata*. Conchocelis cells were cooled to  $-20\sim-80^{\circ}\text{C}$  at  $0.1\sim 4^{\circ}\text{C}/\text{min}$  and thawed before (A) or after (B) the immersion in LN for a day. Values are means  $\pm$  SD ( $n=3$ ).

액체질소온도로 하루 동안 보존했을 때 가장 높은 생존율을 얻을 수 있었던 예비동결 온도  $-40^{\circ}\text{C}$ 의 경우에 대해서 냉각온도와 사상체세포의 생존율 관계를 (Fig. 10)에 나타냈다. 이 그림에는 (Fig. 9)에 나타낸 데이터 외에 냉각속도  $0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  일때의 결과도 함께 나타내고 있다.  $0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 속도로 아주 천천히 냉각시켜도,  $0.5\sim 1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 에서 냉각한 경우에 비해 생존율에 유의한 차이는 나타나지 않았다. 냉각속도가  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 을 넘으면 액체질소온도까지 냉각되어 1일간 보존한 후의 생존율은 약간 저하되었지만, 검토했던  $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 까지의 냉각속도 범위에서는 두드러진 저하는 나타나지 않았다. 이러한 결과에서, 예비동결범위에 있어서 적절한 냉각속도는  $0.1\sim 1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 이라고 판단되었다.

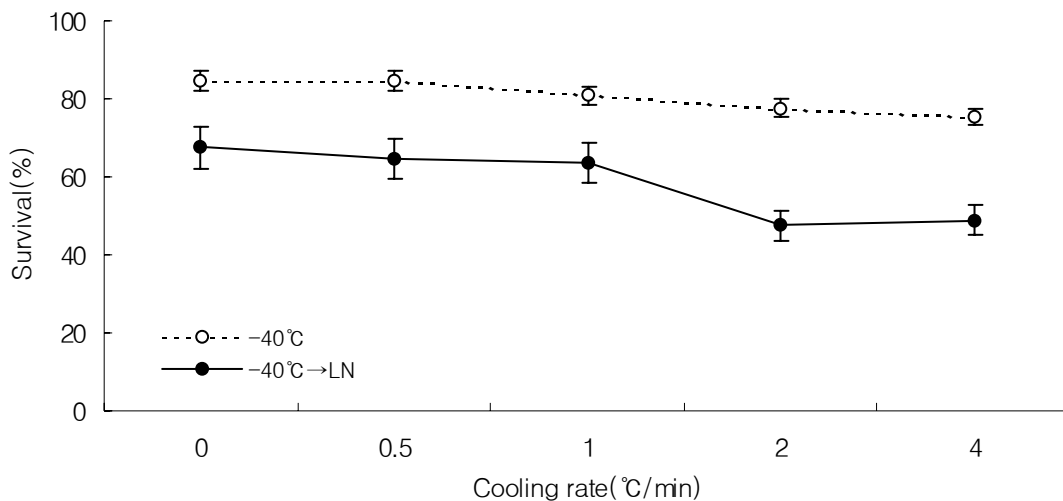


Fig. 10. Effect of cooling rates on survival of the Conchocelis of *Porphyra seriata*. Conchocelis cells were cooled to  $-40^{\circ}\text{C}$  at  $0.1 \sim 4^{\circ}\text{C}/\text{min}$  and thawed before or after the immersion in LN for a day. Values are means  $\pm$  SD ( $n=3$ ).

예비동결에 있어서  $-40^{\circ}\text{C}$ 까지 일단 냉각하고, 이 온도에서 0~60분간 유지하여 동결탈수를 보충함으로써 사상체세포의 생존율을 더욱더 높일 수 있는지의 여부를 냉각속도 0.5~ $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 경우에 대해서 검토하였다. 그 결과를 (Fig. 11)에 나타냈다. 모든 냉각속도에서  $-40^{\circ}\text{C}$ 에 있어서 유지시간은 생존율에 영향을 미치지 않는다는 것이 명확해졌다.

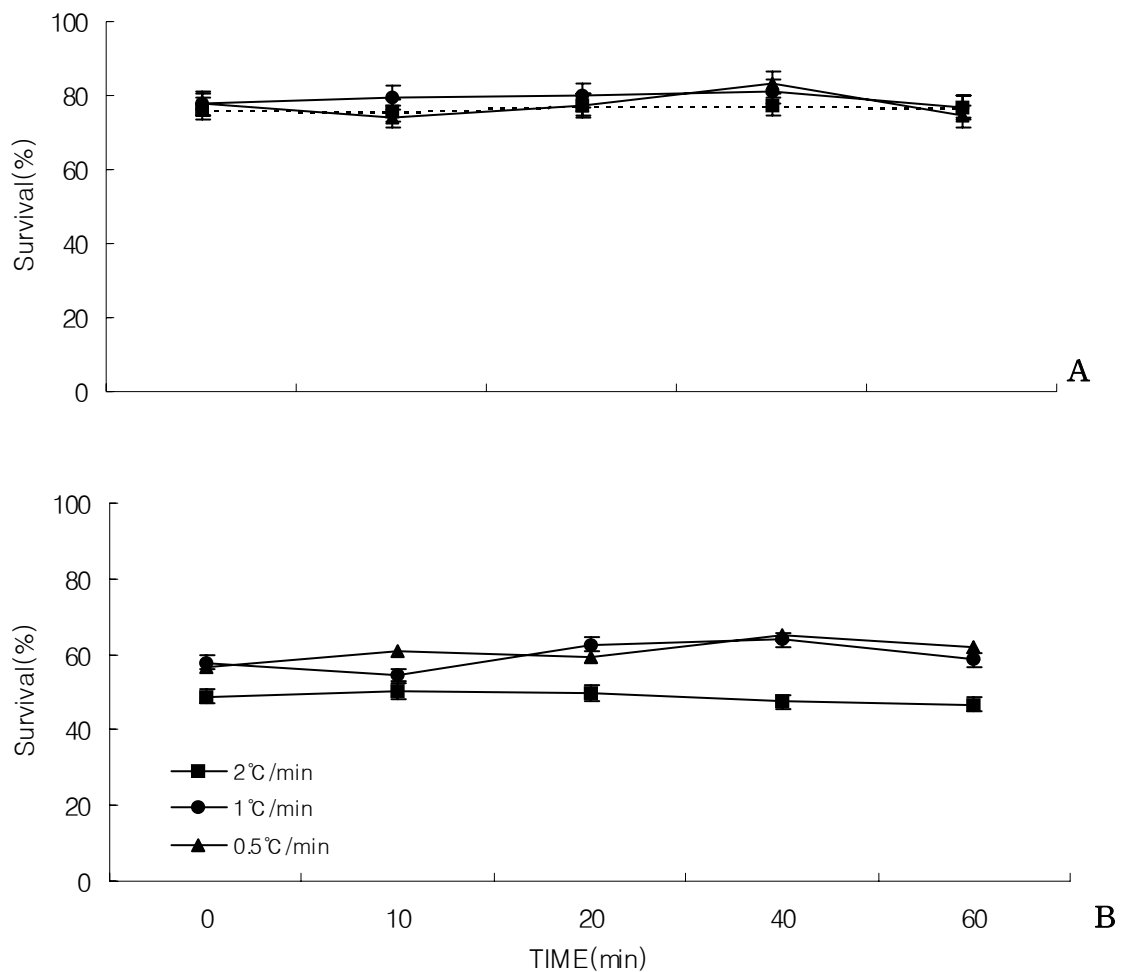


Fig. 11. Effect of retention for various periods of time at  $-40^{\circ}\text{C}$  on survival of the conchocelis of *Porphyra seriata*. Conchocelis cells were cooled to  $-40^{\circ}\text{C}$  at 0.5~ $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  and retained for various periods of time. A, thawed immediately after prefreezing; B, stored for 1 day in LN before thawing. Values are means $\pm$ SD (n=3).

#### 다. 해동속도의 검토

액체질소온도에서 동결 보존한 사상체를 해동하여 사용할 때 해동속도가 사상체의 생존율에 미치는 영향을 모무늬돌김을 이용하여 검토하였다. 동결한 사상체 현탁액이 들어 있는 바이알을, 40°C의 항온수조 속에서 세게 흔들면서 해동했을 때, 0°C 항온수조 속에서 해동했을 때, 20°C 또는 4°C 공기 중에 바이알을 방치하여 해동했을 때에 대해 비교하였다.

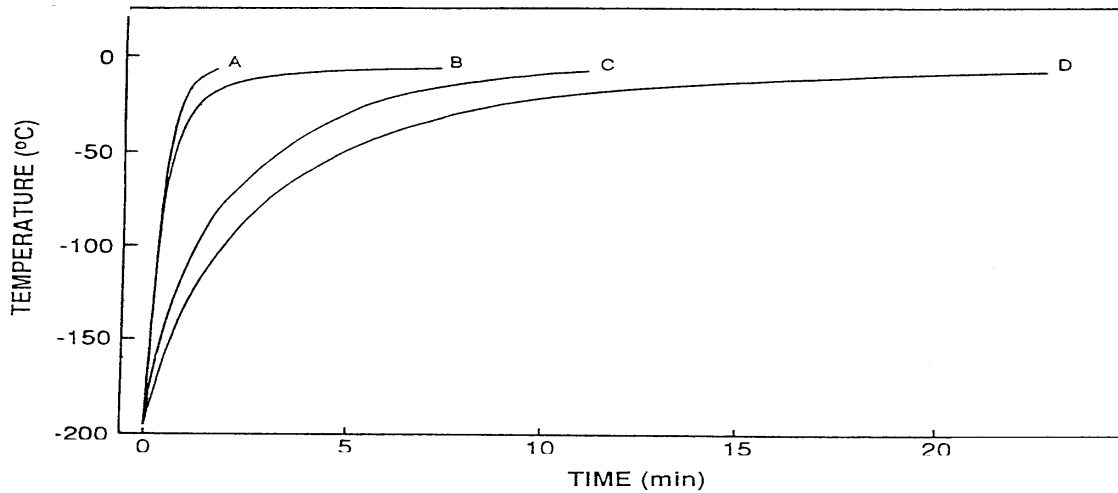


Fig. 12. Temperature changes of conchocelis suspensions of *Porphyra seriata* during thawing. The frozen conchocelis suspensions were thawed by agitating vials in a water bath at 40°C (A), by keeping vials in a water bath at 0°C (B), or by keeping vials in air at 20 (C) or 4°C (D).

사상체 현탁액의 해동에 따른 온도변화를 (Fig. 12)에 나타냈다. 해동속도는, 40°C의 항온수조 속에서 해동한 경우가 가장 빠르고, 다음으로 0°C 수조에서 해동한 경우, 20°C의 공기 중에서 해동한 경우, 4°C의 공기 중에서 해동한 경우 순 이었다.

위 각각의 경우에 사상체 세포의 생존율을, 예비동결 후 바로 해동한 경우와 또 액체질소 온도까지 급랭시켜 하루 동안 보존한 후 해동한 경우에 대하여 Table 5에 나타냈다. 예비 동결 후 바로 해동한 경우에 생존율은 75.6~80.9%로, 해동속도는 생존율에 거의 영향을 주지 않았다. 이에 비해 액체질소온도까지 급랭시켜 하루 동안 보존한 경우에는, 해동속도가 가장 빠른 40°C의 수조에서 해동한 경우의 생존율이 가장 높고(63.8%), 해동속도가 낮아짐에 따라 생존율은 점점 낮아지고, 해동속도가 가장 느린 4°C의 공기 속에서 해동한 것에서의 생존율은 7.9%로 가장 낮았다.

Table 5. Comparison of the survival (mean  $\pm$  S.D.) of conchocelis cells of *Porphyra seriata* when conchocelis suspensions were thawed at different warming rates. The frozen conchocelis suspensions were thawed by agitation vials in a water bath at 40°C, by keeping vials in a water bath at 0°C, or by keeping vials in air at 20 or 4°C

Thawing	Survival (%)	
	(-40°C)	(-40°C $\rightarrow$ LN)
40°C (in water)	80.9 $\pm$ 4.6	63.8 $\pm$ 3.8
0°C (in water)	78.6 $\pm$ 5.4	45.5 $\pm$ 4.2
20°C (in air)	77.4 $\pm$ 2.8	25.1 $\pm$ 4.5
4°C (in air)	75.6 $\pm$ 5.9	7.9 $\pm$ 3.8

이 결과로 보면, 액체질소온도에서 동결 보존한 모무늬돌김의 사상체 현탁액에 있어서는, 40°C 항온수조 속에서 바이알을 세게 흔들며 급속히 해동하는 것이 가장 좋은 방법이라고 판단된다.

#### 라. DMSO 첨가조건의 검토

모무늬돌김을 사용하여 DMSO 첨가조건에 대하여 검토했다. 50% 해수에 10% DMSO를 함유한 동결 매개액에 사상체세포를 직접 현탁시킨 경우와, 기본액에 최종 농도의 2배인 20% DMSO를 함유한 액을 준비하여, 이것을 15분 또는 30분에 걸쳐 사상체 현탁액에 서서히 첨가하여 최종적으로 DMSO농도를 10%이하로 한 경우에 대하여, 사상체 현탁액을 -40°C까지 예비동결한 후 바로 해동했을 때와, 또 액체질소온도까지 급랭하여 하루 동안 보존한 후 해동했을 때의 사상체세포의 생존율을 비교했다. 그 결과를 Table 6에 나타냈다. 50% 해수에 10% DMSO를 포함한 동결 매개액에 사상체 세포를 직접 현탁시킨 경우에는, 예비 동결 직후 바로 해동했을 때나, 액체질소온도까지 급랭하여 하루 동안 보존했을 때도 사상체 세포의 생존율은 낮았으며(40.1~48.3%), 이에 비해 15분에 걸쳐 DMSO를 서서히 첨가했을 경우에 확실히 높은 생존율(62.9~79.2%)을 얻을 수 있었다. 그러나 30분에 걸쳐 DMSO를 더 서서히 첨가하더라도 생존율의 유의한 향상은 발견되지 않았다(63.8~80.9%).

Table 6. Comparison of the survival (mean  $\pm$  SD, n=3) of conchocelis cells of *Porphyra seriata* when DMSO was added at different time. An equal volume of the basal solution having 20% DMSO was added gradually over a period of 15 or 30 min

DMSO addition <sup>a</sup> (min)	Survival(%)	
	-40°C	-40°C→LN
0 <sup>b</sup>	48.3 $\pm$ 4.6	40.1 $\pm$ 4.3
15	79.2 $\pm$ 4.1	62.9 $\pm$ 5.9
30	80.9 $\pm$ 2.8	63.8 $\pm$ 3.8

<sup>a</sup> Time required to attain a final concentration of 10%

<sup>b</sup> Conchocelis cells were centrifuged and suspended immediately in the cryoprotective solution having 10% DMSO.

사상체 현탁액에 DMSO를 첨가한 후, DMSO가 사상체 세포 내에 침투하도록 평행시간을 더 잡아, 사상체 세포의 생존율이 높아지는지의 여부를 검토했다. 그 결과를 (Fig. 13)에 나타냈다. DMSO를 15분에 걸쳐 사상체 현탁액에 넣은 후 평행 시간을 5~225분 잡고, -40°C까지 예비 동결한 후 바로 해동한 경우와 액체질소온도까지 급랭시켜 하루 동안 보존한 후 해동한 경우에도, 평행시간이 길어짐에 따라 생존율은 처음에는 약간 높아지지만 평행시간 225분까지 유의한 차이는 발견되지 않았다.

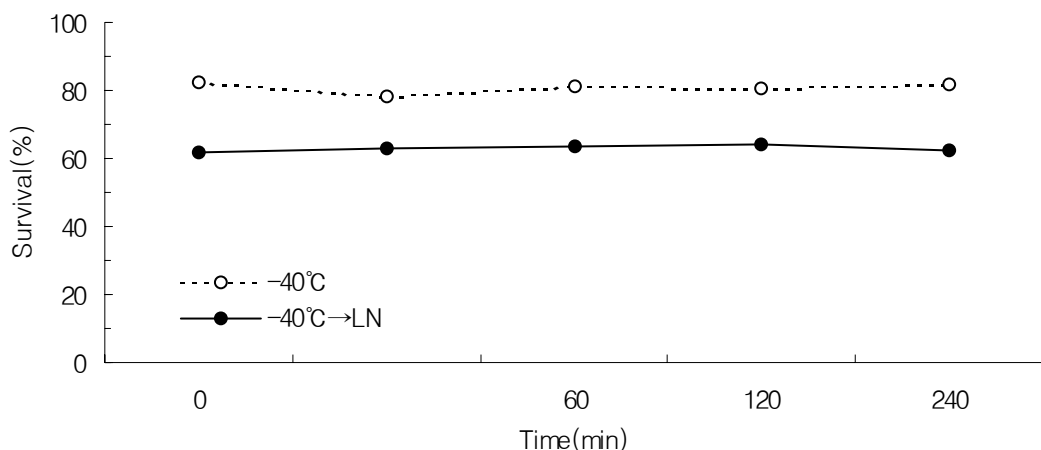


Fig. 13. Effect of equilibration for various periods of time after DMSO addition on survival of the conchocelis of *Porphyra seriata*. Values are means  $\pm$  SD (n=3).

이러한 결과로 보면, DMSO의 첨가는, 사상체를 포함한 기본액(50% 해수에 0.5M Sorbitol과 0.01M HEPES를 넣어 pH 8.0으로 조정)에 대해 20% DMSO를 함유하도록 조정된 동결매개액을 15분에 걸쳐 서서히 같은 양을 넣는 방법으로 하는 것이 좋을 것으로 판단되고, DMSO 첨가후의 평행시간은 사상체 세포의 생존율에는 영향을 미치지 않는다는 것이 명확해졌다.

#### 마. 해동 후 동해방어제 제거법의 검토

해동한 사상체 현탁액 1.5ml를 용량 14ml의 원심 관으로 옮겨, 미리 빙냉시켜 놓은 해수를 서서히 넣어 7배로 희석하여, 원심분리 후 윗물을 버리고 다시 한번 해수를 넣어 희석함으로써 동해방어제를 제거했다. 이 같은 희석이 생존율에 어느 정도 영향을 미치는지를 명확히 하기 위해, 해수를 넣어 7배로 희석할 때의 희석 속도에 변화를 주었을 때의 사상체 세포의 생존율을 비교했다. 그 결과를 Table 7에 표시했다. 해동 후의 사상체 현탁액에 해수를 급속히 첨가하여 원심 분리한 사상체의 생존율은 약간 낮은 편(55.5%)이었지만, 0.5~3.5시간 걸쳐 해수를 서서히 넣어 희석한 경우에도 사상체 세포의 생존율은 두드러지게 높아지지는 (58.1~60.2%)않았고, 희석시간 0.5~3.5시간의 범위에서는 사상체 세포의 생존율에는 유의한 차는 나타나지 않았다.

따라서 해동후의 동해방어제 제거할 때 사상체 세포의 상해를 가능한 한 적게 하기 위해서는, 사상체 현탁액에 해수를 30분 이상 걸쳐 서서히 넣어 희석할 필요가 있다고 생각되어진다.

Table 7. Comparison of the survival (mean  $\pm$  SD n=3) of conchocelis cells of *Porphyra seriata* for different dilution rates of the cryoprotective solution. After thawing, conchocelis suspensions with cryoprotectants were diluted 7-fold with ice-chilled seawater over various periods of time

Dilution time (h) <sup>a</sup>	Survival(%)
Rapid dilution	55.5 $\pm$ 5.4
0.5	63.8 $\pm$ 3.8
1.5	58.1 $\pm$ 6.2
3.5	60.2 $\pm$ 7.8

<sup>a</sup> Time required to dilute 7-fold with seawater

<sup>b</sup> Conchocelis suspension with cryoprotectants was diluted 7-fold with a single addition of seawater.



**바. 김속 6종의 사상체 동결보존**

위와 같이 실험한 결과에 의하여, 김속조류 사상체에 대하여 50% 해수에 DMSO농도 10%와 0.5M sorbitol을 첨가한 동해방어제로 처리하여 프로그램 Freezer(냉각속도 1℃/min)에서 -40℃까지 예비동결한 후 액체질소온도까지 급속동결하여 1일간 보존한 후 해동한 경우의 참김 외 5종의 사상체 세포의 생존율은 Table 8에 나타났으며, *P. tenera*와 *P. pseudolinearis* 의 생존율이 다른 종에 비하여 약간 낮았으며, 그 외의 종은 유의한 차이를 보이지 않았다.

Table 8. Comparison of the survival (mean ± SD, n=3) of conchocelis cells of *Porphyras* prefrozen to -40℃ in a cryoprotective solution of 10% DMSO and 0.5M sorbitol in 50% seawater by a program freezer prior to immersion in LN

Species	Survival(%)
<i>P. tenera</i>	54.6 ± 5.3
<i>P. yezoensis</i>	61.0 ± 2.5
<i>P. dentata</i>	70.9 ± 3.3
<i>P. seriata</i>	63.8 ± 3.8
<i>P. pseudolinearis</i>	58.4 ± 7.2
<i>P. haitanensis</i>	65.4 ± 2.7

**사. 액체질소온도에서의 장기보존**

액체질소온도에서 동결보존 한 경우의 장기 보존 가능성에 대하여 검토하기 위해, 2단계 동결법에 의해 액체질소온도까지 급랭한 후 300일까지의 여러 기간으로 동결보존 한 방사무늬 김의 사상체 세포의 생산률을 조사했다. 그 결과를 Fig. 14에 나타냈다. 액체질소온도에서 1시간~300일간 동결 보존한 후 해동한 사상체세포의 생산률에는 거의 변화가 없고, 평균 65.3%였다. 따라서 이 방법에 의하면 적어도 300일 내지 1년 정도의 장기보존이 가능하다.

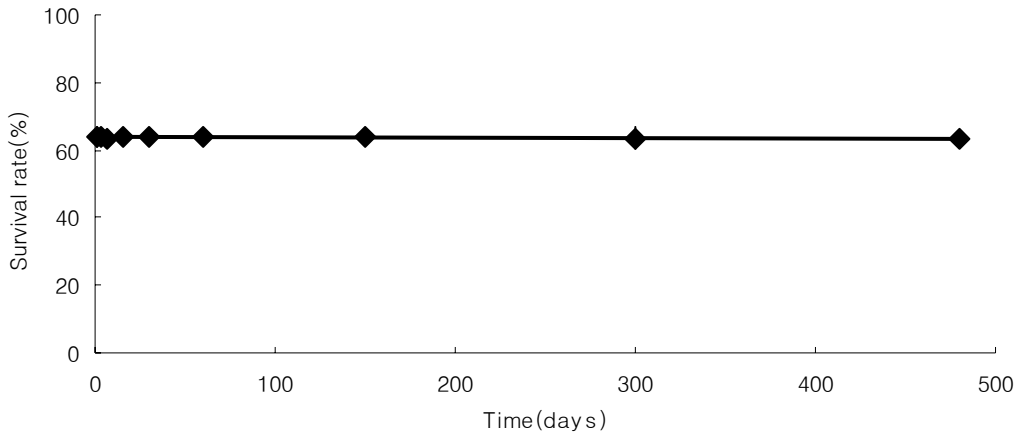


Fig. 14. Survival of the conchocelis of *Porphyra seriata* stored in LN for various periods of time (1h-300 days). Values are means  $\pm$ SD (n=3).

#### 아. 동결보존사상체세포의 증식 및 성숙능력 확인

가정용 믹서로 세단한 김 사상체를 50 % 해수에 10% DMSO와 0.5M Sorbitol을 함유한 동결매개액에 현탁시켜,  $-40^{\circ}\text{C}$ 까지 예비동결하고, 그 후 바로 액체질소온도까지 급랭하여 1일간 보존한 후, 사상체 현탁액을 함유한 바이알을  $40^{\circ}\text{C}$ 의 항온수조에 넣고 세계 흔들어 해동하여, 미리 빙냉시켜 놓은 해수로 희석하여 동해방어제를 제거하고 사상체세포를 PES배지에 옮겨 배양하여, 사상체세포의 증식 및 성숙능력을 조사했다. 모든 주 또는 종에서, 해동후의 사상체 세포는 다시 증식을 시작하였고, 50일 후에는 육안으로 인식이 가능한 크기의 콜로니가 되었다. 이러한 콜로니를 세단하여, 각포자낭을 형성하고 있지 않은 사상체 조각만을 단독 분리하여 배양한 결과, 사상체는 새롭게 각포자낭을 형성하였다. 각포자낭에서 방출된 각포자는 발아하여 엽상체가 되는 것을 확인 할 수 있었다.

#### 자. 사상체콜로니의 동결보존

앞에서 말한 모든 실험에서는 공시 사상체 시료를 가능한 한 균일하게 하여 실험결과 오차를 적게 하기 위해 가정용 믹서로 세단 한 사상체를 사용하였는데, 실용적인 사상체의 동결보존의 경우에는 세단으로 인한 사상체세포의 파손은 오히려 피하는 것이 좋다. 그래서 사상체를 세단하지 않고 콜로니 그대로 동결 보존하는 것을 시도해 보았다. *P. seriata* 콜로니를 생중량 3 mg (직경 약 5 mm) 또는 30 mg(직경 약 10 mm)의 크기로 나누어, 50% 해수에 10% DMSO와 0.5M Sorbitol을 함유한 동결매개액 1.5 ml를 넣은 동결보존용 바이알 1개에 각각 한 콜로니를 넣어, 간이 예비동결장치에서  $-40^{\circ}\text{C}$ 까지 예비 동결한 후, 액체질소에 넣어 급속 동결하여 하루 동안 동결보존하고, 그 후  $40^{\circ}\text{C}$  항온수조 속에서 세계 흔들면서 해동한 것과, 가정용 믹서로 세단 한 사상체의 현탁액에서와 마찬가지로 동결, 해동한 것에 대해, 해동 후의 사상체세포의 성장률을 비교했다. 그 결과는 Table 9과 같다.

Table 9. Comparison of the survival (mean  $\pm$  SD, n=3) of conchocelis cells of *Porphyra seriata* when conchocelis colonies of different sizes were cryopreserved in LN. Conchocelis cells were prefrozen to  $-40^{\circ}\text{C}$  in a cryoprotective solution of 10% DMSO and 0.5M sorbitol in 50% seawater by a simple prefreezing system prior to immersion in LN

Colony size (mg)	Survival(%)
Short fragment <sup>a</sup>	64.5 $\pm$ 3.6
3	62.3 $\pm$ 4.4
30	68.6 $\pm$ 0.4

<sup>a</sup> Conchocelis colonies were chopped into short fragments with a Waring blender and 1 mg (fresh wt.) of the fragments were added to a cryogenic vial.

생장률은 사상체를 세단 한 경우의 64.5%에 대해 콜로니 그대로 동결 보존한 경우에는 62.3% 및 68.6%였다. 또 1.5 ml의 동결매개액을 함유한 바이알 하나에 3, 10, 100 mg(생중량)의 사상체 콜로니를 넣어 동결보존 한 경우에는 Table 10, 해동 후 사상체 세포의 성장률은 62~64%이며, 바이알 하나 당 사상체 콜로니의 양이 100 mg까지의 범위에서는 해동후의 사상체 세포의 성장률에 두드러진 차이는 발견되지 않았다. 앞서서처럼 액체 질소 온도에서 동결 보존하여 해동한 후 사상체 세포는 Figure 15와 같다. 뉴트럴 레드처럼 염색되어 있지 않는 일부 세포는 죽어 있지만, 많은 세포가 붉게 염색되어 살아 있다는 것을 알 수 있었다.

Table 10. Comparison of the survival (mean  $\pm$  SD, n=3) of conchocelis cells of *Porphyra seriata* when different amounts of conchocelis colonies were preserved in cryogenic vial. Conchocelis cells were prefrozen to  $-40^{\circ}\text{C}$  in a cryoprotective solution of 10% DMSO and 0.5M sorbitol in 50% seawater by a simple prefreezing system prior to immersion in LN

Amount (mg)	Survival(%)
3	62.3 $\pm$ 4.4
10	63.7 $\pm$ 3.3
100	62.2 $\pm$ 4.1

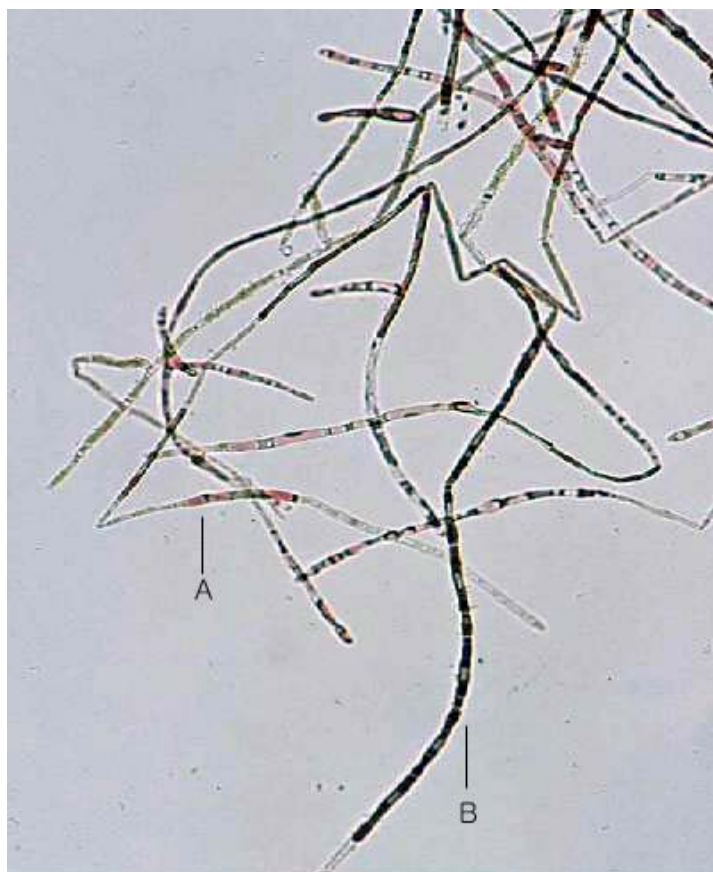


Fig. 15. Conchocelis of *Porphyra seriata*. A, Live conchocelis treated with neutral red ; B, Dead conchocelis cells treated with neutral red.

### 제 3 절 갈조 다시마목, 모자반목 배우체의 종 보존을 위한 동결 및 해동조건의 최적화

#### 1. 재료 및 방법

##### 가. 재료

본 연구에서 사용한 다시마목 배우체들은 *L. japonica* Areschoug(female MBLJ-1, male MBLJ-2), *L. longissima* Miyabe(female MBLL-1, male MBLL-2), *K. crassifolia* Miyabe(female MBEC-1, male MBEC-2), *E. kurome* Okanura (female MBEK-1, male MBEK-2) *E. stolonifera* Okanura(female MBES-1, male MBEK-2), *U. pinnatifida*(Harvey) Suringer( female MBUP-1, male MBUP-2)로 일본 나가사키대학의 종보존 연구실에서 보관 중이던 것을 이용하였다.

모자반목의 모자반(*S. fulvellum*)과 툃트(*H. fusiforme*)은 전라남도 진도군 임회면 상만리 해안에서 채취한 모조에서 방출시킨 유배를 이용하였다. 이들 균주는 ESI 배지에서 22℃ (*E. kurome*, *U. pinnatifida*)나 17℃(나머지 균주)에서 배양한 후 백색 형광램프로 14L:10D간 15  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  처리하였다.

##### 나. 동해 방어제

본 연구에서 사용한 동해 방어제는 DMSO, Glycerol( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ ), Ethylene glycol( $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ), Dextran, Proline, Sucrose, Glucose( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ) 및 Sorbitol( $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$ )에 대하여 동해방어제로서의 효과를 검토하였다.

동해 방어제를 만드는 과정은 해수(32%)에 최종농도의 목포치(5~15%)의 2배가 되게 혼합하고, 이렇게 만들어진 용액과 동량의 배우체 현탁액을 혼합하면 실험에 사용할 동해 방어제가 완성된다.

##### 다. Program Freezer를 이용한 2단계 동결 및 해동

기본조작은 아래와 같다. 용량 2 ml의 동결보존용 바이알에 해수(32%)를 0.75 ml 넣고, 여기에 약 1 mg(생중량)의 시료를 넣는다. 그리고 이것을 아이스 바스(ice bath)에 넣어 빙냉 시킨다. 기본액에 최종농도의 2배량의 동해방어제가 포함되도록 제조한 동해 방어제를 미리 빙냉시켜 놓고, 0.75 ml를 15분에 걸쳐 서서히 첨가한 후 45분간 안정시킨다.

동해 방어제가 첨가되어 1.5 ml의 동결 보존용 바이알을 알루미늄 바이알홀더에 끼워 넣어, 2단계 동결을 위해 배우체 현탁액을 포함한 동결 보존용 바이알을 프로그램 Freezer(Programmed Freezer, Samwon)를 사용하여 일단 1 °C/분으로 -40 °C까지 예비동결하고, 처리 직후 바로 액체질소에 보존하였다.

하루 동안 동결 보존한 후 40 °C워터바스 속에 넣고 강하게 흔들어서 배우체 현탁액을 급하게 해동시켜, 얼음이 완전히 녹기 직전에 바이알을 아이스 바스로 옮겼다. 해동 후

배우체 현탁액을 14 ml용량의 원뿔형 침전관에 옮기고, 이것에 빙냉한 해수 10 ml를 30 분 이상에 걸쳐 서서히 첨가하여 300×g에서 5분간 원심분리 한 후 상등 액을 버리고 다시 한번 더 기본액 10 ml를 가하여 잘 흔들어 동해방어제를 제거한다.

#### 라. 생존율 측정

세포의 생사판정은 erythrosin 염색으로 판정하였다. 0.05% (w/v) erythrosin-seawater 용액을 넣어 20분간 염색 처리한 후 염색액은 해수를 이용해 제거하였다. 각각의 바이알에 대하여 300개 이상의 세포를 광학 현미경상에서 생사여부를 판정하였고, 생존율은 동결보존하기 전의 샘플에 대한 상대치로 표시하였다. 모든 경우에 있어 동일 처리한 3샘플에 대해 계수하여 평균치를 구했다.

Kono *et al.*(1998)은 Laminariales 종인 *E. bicyclis* 생존성이 용해 후 배양에서 감소한다는 보고에 따라, 생존성은 용해 즉시 배양과 함께 일주일 후 배양에서도 평가하였다. 더욱이 용해 8일 후 배양에서의 생존성의 변화는 가장 낮은 수치를 보이므로 실제 생존성을 평가하기 위해 생존율을 조사하였다.

## 2. 결 과

### 가. 다시마목 Laminariales(Phaeophyta) 배우체의 동결·해동

본 연구에서 사용된 모든 배우체의 생존율은 Kono *et al.*(1998)의 연구와 마찬가지로 해동 후 배양에서 감소하였다(Table 11). 동결과 해동 과정에서의 사세포는 해동 직후 분석에서 일부 나타나지 않을 수 있으므로 전체 피해정도를 평가하기 위해서는 이중분석이 필요하였다.

DMSO와 glycerol은 여러 종류의 세포에서 사용 가능한 동해방어제이고 ethylene glycol은 Laminariales *E. bicyclis*에서 좋은 동해방어제로서의 역할을 하는 것으로 보고되었다(Kono *et al.*, 1998). 본 연구에서는 동해방어제를 단독으로 사용하는 경우 *L. japonica*, *L. longissima*, *K. crassifolia*, *E. kurome*, *E. stolonifera*에서 가장 효능을 나타낸 동해방어제는 ethylene glycol이었다(Table 11). ethylene glycol의 최적 농도는 종마다 차이가 있었다. 위에서 언급한 종 가운데 *E. kurome*을 제외한 나머지의 경우 10%에서 최적의 효과를 발휘한다. 그러나 *E. kurome*에서 5% 이상의 ethylene glycol은 오히려 유해한 효과를 나타내었다. 또한 10% proline과 ethylene glycol의 혼합액은 해동 후 배양에서 생존을 증가시키는 반면 proline과 glycerol 또는 DMSO의 혼합액에서는 효과가 적었다.

하지만 *U. pinnatifida*의 경우 glycerol이 ethylene glycol보다 우수한 효과를 나타내었다(Table 12). glycerol의 최적 농도는 10%이며 10% proline과 glycerol의 혼합액은 배양 시 배우체의 생존을 증가시켰다. 10% ethylene glycol과 10% proline의 혼합액은 다른 종에서와 마찬가지로 *U. pinnatifida*에서도 유리한 효과를 보였다. 그러나 생존의 경우 10% proline과 glycerol의 혼합액에서 동결보존한 세포보다 더 높게 나타나지는 않는다.

Table 11. Effects of various cryoprotectants on survival (mean±SD) of female gametophytic cells of 5 species of Laminariales. The cells were immersed in LN after the first slow cooling to -40°C. Survival rates were estimated immediately after thawing and after post-thawing incubation for a week

Cryoprotectant	survival(%)				
	<i>L.japonica</i>	<i>L.longissima</i>	<i>K.crassifolia</i>	<i>E.stolonifera</i>	<i>E.kurome</i>
Control (seawater)	0.0 ± 0.0 <sup>a</sup> -	0.0 ± 0.0 -	0.0 ± 0.0 -	0.2 ± 0.2 (0.0 ± 0.0)	0.0 ± 0.0 -
5% (v/v) ethylene glycol	23.4 ± 1.9 (24.0 ± 1.5) <sup>b</sup>	48.1 ± 0.4 (45.1 ± 3.9)	44.1 ± 1.2 (45.1 ± 3.1)	42.7 ± 1.8 (41.7 ± 2.4)	23.0 ± 1.3 (7.5 ± 1.9)
10% (v/v) ethylene glycol	49.6 ± 3.7 (45.0 ± 3.4)	59.9 ± 1.4 (55.4 ± 2.1)	65.8 ± 0.7 (60.9 ± 2.2)	54.5 ± 2.2 (39.3 ± 3.5)	20.1 ± 1.3 (7.0 ± 2.1)
15% (v/v) ethylene glycol	31.2 ± 1.2 (34.7 ± 0.7)	58.4 ± 1.6 (55.7 ± 1.7)	48.2 ± 1.5 (51.8 ± 1.7)	50.0 ± 4.1 (31.5 ± 1.5)	6.5 ± 1.4 (1.0 ± 0.7)
10% (v/v) glycerol	9.0 ± 3.1 (4.7 ± 4.0)	20.8 ± 2.0 (15.1 ± 4.7)	48.0 ± 3.9 (27.3 ± 5.6)	48.4 ± 2.9 (32.0 ± 2.1)	11.5 ± 0.7 (1.3 ± 0.8)
10% (v/v) DMSO	45.3 ± 1.3 (25.0 ± 4.4)	39.9 ± 2.3 (36.8 ± 2.8)	60.5 ± 3.7 (50.2 ± 2.9)	57.1 ± 1.4 (28.1 ± 1.6)	5.5 ± 0.4 (0.0 ± 0.0)
5% (v/v) ethylene glycol + 10% (w/v) proline	- -	- -	- -	- -	56.2 ± 1.2 (42.2 ± 3.4)
10% (v/v) ethylene glycol + 10% (w/v) proline	63.9 ± 3.1 (53.7 ± 2.3)	67.4 ± 2.6 (59.8 ± 1.4)	73.1 ± 3.5 (65.1 ± 2.0)	73.3 ± 1.9 (59.7 ± 3.3)	52.7 ± 2.4 (35.9 ± 3.0)
+ 10% (w/v) sorbitol	58.0 ± 2.6 (42.2 ± 1.7)	60.2 ± 1.9 (56.5 ± 2.5)	66.8 ± 2.8 (66.7 ± 3.9)	68.8 ± 0.8 (56.9 ± 1.5)	40.9 ± 0.8 (27.2 ± 2.7)
+ 10% (w/v) sucrose	50.1 ± 2.6 (40.0 ± 4.0)	57.1 ± 2.2 (53.0 ± 2.2)	65.8 ± 0.9 (64.9 ± 2.4)	63.8 ± 2.5 (48.5 ± 0.6)	38.3 ± 1.6 (24.1 ± 2.1)
+ 5% (w/v) dextran	35.7 ± 3.3 (26.2 ± 1.9)	52.8 ± 2.8 (48.9 ± 1.6)	5.8 ± 2.9 (8.2 ± 3.3)	56.8 ± 4.3 (43.8 ± 3.3)	19.3 ± 2.3 (16.4 ± 2.0)
10% (v/v) glycerol + 10% (w/v) proline	8.1 ± 1.0 (8.4 ± 1.9)	20.1 ± 4.0 (15.8 ± 2.0)	32.2 ± 3.5 (26.0 ± 4.4)	43.1 ± 1.5 (20.0 ± 0.9)	16.1 ± 3.3 (0.7 ± 0.5)
10% (v/v) DMSO + 10% (w/v) proline	39.2 ± 1.8 (12.4 ± 3.5)	37.0 ± 5.2 (23.7 ± 3.9)	69.6 ± 3.5 (48.7 ± 2.3)	54.7 ± 1.8 (28.1 ± 2.1)	3.1 ± 1.5 (0.2 ± 0.3)

<sup>a</sup>Survival rate immediately after thawing

<sup>b</sup>Survival rate after post-thawing incubation for a week.



Table 12. Effects of various cryoprotectants on survival (mean±SD) of female gametophytic cells of *Undaria pinnatifida*. The cells were immersed in LN after the first slow cooling to -40°C. Survival rates were estimated immediately after thawing and after post-thawing incubation for a week

Cryoprotectant	survival (%)	
	After thawing <sup>a</sup>	After post-thawing incubation <sup>b</sup>
Control (seawater)	0.0 ± 0.0	-
5% (v/v) glycerol	51.3 ± 3.6	36.2 ± 3.1
10% (v/v) glycerol	64.1 ± 2.7	44.7 ± 2.8
15% (v/v) glycerol	57.3 ± 0.7	32.0 ± 2.9
10% (v/v) ethylene glycol	51.6 ± 4.2	4.4 ± 1.9
10% (v/v) DMSO	12.9 ± 0.9	0.5 ± 0.3
10% (v/v) glycerol + 10% (w/v) proline	73.1 ± 0.9	60.3 ± 0.5
10% (v/v) glycerol + 10% (w/v) sorbitol	69.0 ± 2.3	58.5 ± 3.2
10% (v/v) glycerol + 10% (w/v) sucrose	65.0 ± 1.5	54.0 ± 1.2
10% (v/v) glycerol + 5% (w/v) dextran	61.4 ± 0.5	58.3 ± 1.3
10% (v/v) ethylene glycol + 10% (w/v) proline	66.0 ± 2.4	51.8 ± 3.3
10% (v/v) DMSO + 10% (w/v) proline	31.1 ± 2.3	0.3 ± 0.2

<sup>a</sup>Survival rate immediately after thawing

<sup>b</sup>Survival rate after post-thawing incubation for a week.

실제 생존율은 해동 0~8일 이후의 배양에서의 생존성 검사로 평가할 수 있다. 해동 후 배양에서 생존율은 4~6일간 지속적으로 감소하였다(Fig. 16). 종과 성별에 고려한 경우 최소 수준은 36.2%에서 67.2%였다. 해동 후 배양기간이 4~6일이 지나면 세포분열이 진행되기 시작하므로 생존성이 증가하는 것을 본 연구 결과 알 수 있었다.

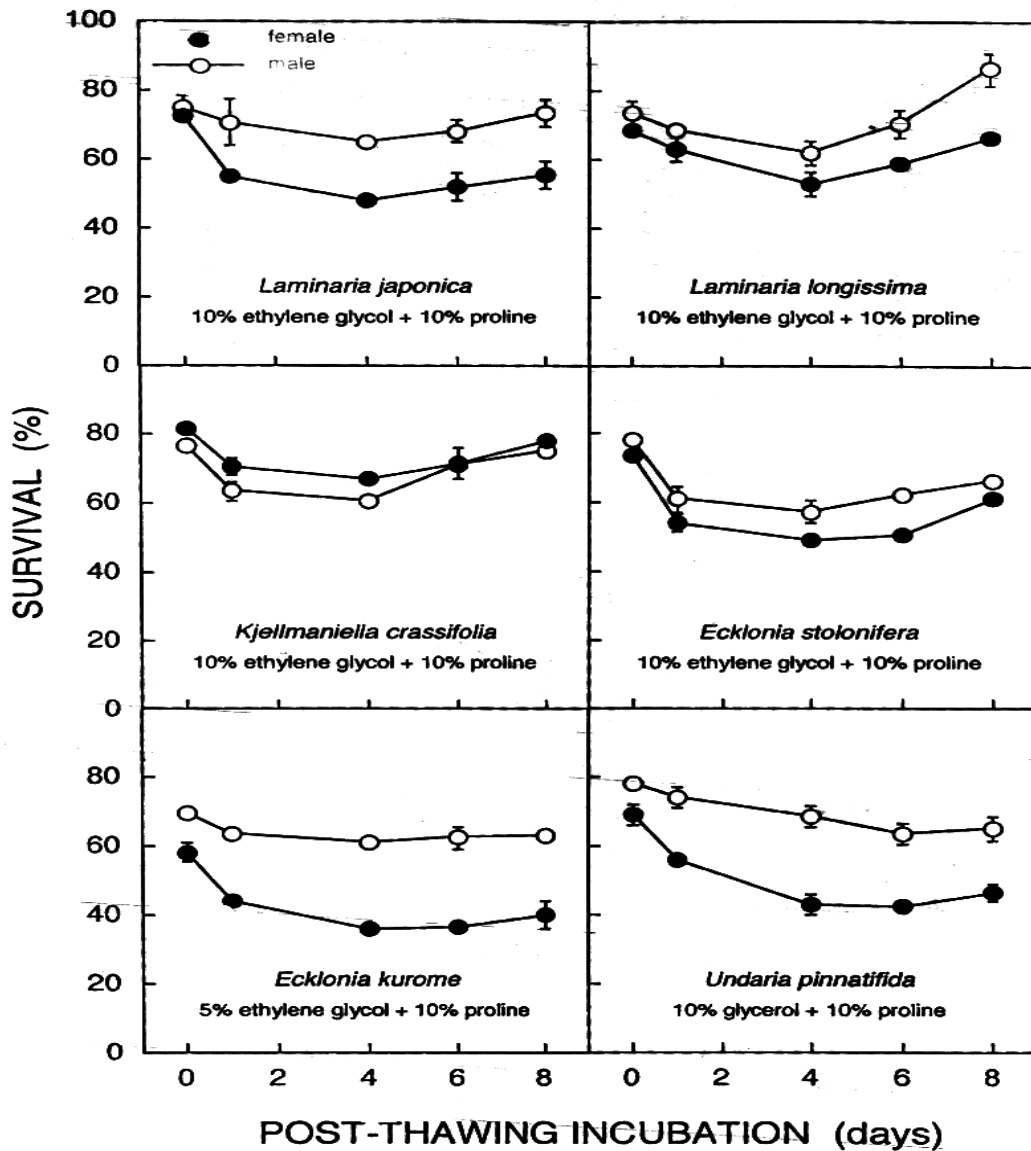


Fig. 16. Changes in the survival of gametophytic cells of 6 species of Laminariales during post-thawing incubation. Gametophytic cells suspended in the appropriate cryoprotective solution were immersed in LN after the first slow cooling to  $-40^{\circ}\text{C}$ . Values are means  $\pm$  SD.

나. 모자반(*Sargassum fulvellum*)의 동결·해동

본 연구에서 사용한 동해방어제 가운데 한가지 방어제를 사용했을 경우 DMSO, 다음으로 dextran에서 가장 좋은 효과를 나타냈다(Table 13). DMSO의 동해 방어효과는 농도에 의해 좌우되었는데 15%에서 15.6%로 동해 방어효과가 가장 높은 것으로 보여진다(Table 14). 해수에 40%의 DMSO를 혼합하여 만든 용액에서는 동해 보호 효과가 급격히 감소하여 DMSO의 최종 농도가 20%인 경우에서의 실험 결과를 얻을 수는 없었다. DMSO와 다른 동해 방어제의 혼합하여 사용한 구간에서의 세포 생존율은 10% DMSO와 5% proline 를 혼합한 구간에서 21.3%로 다소 높게 나타났다. 또한, 5%의 dextran을 혼합 구간에서는 15.7%의 생존율로 다소 낮게 나타났으며, sucrose와 glycerol에서 생존율이 다소 높게 나타났음을 알 수 있었다(Table 15).

*S. fulvellum*의 유배를 -20℃와 -60℃에서 1차 냉각 시킨 후 액화질소동결보존 단계를 거치지 않고 용해시킨 경우, 다른 종들과 마찬가지로 세포의 생존율은 1차 냉각 온도가 낮아질수록 감소하는 경향을 보였다(Fig. 17). -40℃ 이하에서 1차 냉각시킨 경우 세포 손상이 감소하였으며 연구 결과 -40℃에서 1차 냉각 시킨 후 액화질소 동결보존시 세포의 생존율이 20.6%로 가장 높은 것으로 나타났다.

Table 13. Survival rate(mean±SD) of young fronds of the *Sargassum fulvellum* in various cryoprotectants after thawing. Young fronds were frozen by the first slow cooling and subsequent rapid cooling steps in each cryoprotectant dissolved in 100% seawater, and stored for 24h in LN before thawing

Cryoprotectant	Survival rate(%)
Control(seawater)	0.3 ± 0
5% DMSO	12.8 ± 1.3
5% dextran	11.4 ± 0.9
5% proline	6.3 ± 0.7
5% glycerol	7.5 ± 0.3
5% ethylene glycol	5.9 ± 2.6
5% sorbitol	7.1 ± 0.6
5% glucose	4.3 ± 0.2
5% sucrose	4.2 ± 0.4

Table 14. Effect of concentration of DMSO on the survival rate(mean  $\pm$ SD) of young fronds *Sargasumm fulvellum*. Young fronds were frozen by the two-step cooling method and thawed after immersion in LN for 24h

Cryoprotectant	Survival rate(%)
Control(seawater)	0.3 $\pm$ 0
5% DMSO	12.8 $\pm$ 1.3
10% DMSO	13.7 $\pm$ 1.5
15% DMSO	15.6 $\pm$ 1.4

Table 15. Survival rate(mean $\pm$ SD) of young fronds of the *Sargasumm fulvellum* in mixed cryoprotectants. Young fronds were frozen by the two-step cooling method and thawed after immersion in LN for 24h

Cryoprotectant	Survival(%)
10% DMSO + 5% proline	21.3 $\pm$ 2.5
10% DMSO + 5% dextran	15.7 $\pm$ 1.8
10% DMSO + 5% glycerol	18.9 $\pm$ 1.2
10% DMSO + 5% ethylene glycol	14.3 $\pm$ 1.2
10% DMSO + 5% sorbitol	12.8 $\pm$ 0.9
10% DMSO + 5% glucose	19.7 $\pm$ 1.2
10% DMSO + 5% sucrose	20.7 $\pm$ 1.1
15% DMSO + 5% proline	11.5 $\pm$ 1.3
15% DMSO + 5% dextran	8.7 $\pm$ 0.6
15% DMSO + 5% glycerol	6.9 $\pm$ 1.0
15% DMSO + 5% ethylene glycol	8.2 $\pm$ 0.7
15% DMSO + 5% sorbitol	8.7 $\pm$ 0.8
15% DMSO + 5% glucose	9.6 $\pm$ 0.9
15% DMSO + 5% sucrose	10.2 $\pm$ 1.2

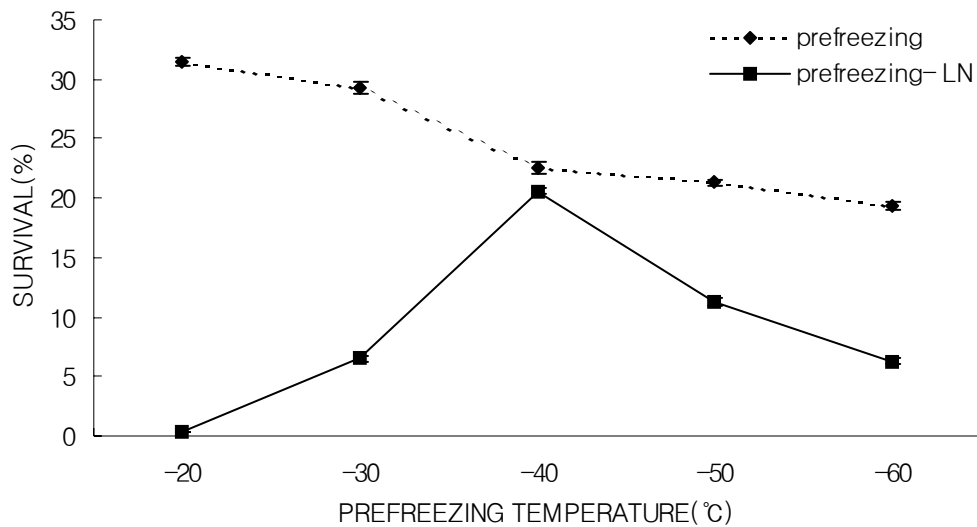


Fig. 17. Survival of *Sargassum fulvellum* pre frozen in a program-mable freezer. The thalli were suspended in a cryoprotective solution composed of 10% DMSO and 5% proline in seawater. Prefrozen suspensions were thawed without (dotted line) or after (solid line) immersion in LN. Values are means  $\pm$ SD.

#### 다. 툃(*Hizikia fusiforme*)의 동결·해동

본 연구에서 사용한 동해방어제 가운데 한가지 방어제를 사용했을 경우 DMSO에서 가장 좋은 효과를 나타내었다(Table 16). DMSO의 동해 방어효과는 농도에 의해 좌우되었는데 10%에서 22.3%와 15%에서 20.4%로 동해 방어효과가 가장 높은 것으로 나타났다(Table 17). 해수에 40%의 DMSO를 혼합하여 만든 용액에서는 동해 보호 효과가 급격히 감소하여 DMSO의 최종 농도가 20%인 경우에서의 실험 결과를 얻을 수는 없었다. DMSO와 다른 동해 방어제의 혼합액을 사용한 동결보존에서 세포의 생존율은 10% DMSO와 5% proline 를 혼합한 구간에서 23.7%로 다소 높게 나타났다(Table 18).

*H. fusiforme*의 유배를  $-20^{\circ}\text{C}$ 와  $-60^{\circ}\text{C}$ 에서 1차 냉각 시킨 후 액화질소동결보존 단계를 거치지 않고 용해시킨 경우, *C. fragile*와 같이 세포의 생존율은 1차 냉각 온도가 낮아질수록 감소하는 경향을 보였다(Fig. 18).  $-40^{\circ}\text{C}$  이하에서 1차 냉각시킨 경우 세포손상이 감소하였으며 연구 결과  $-40^{\circ}\text{C}$ 에서 1차 냉각 시킨 후 액화질소 동결보존시 세포의 생존율이 21.3%로 가장 높은 것으로 나타났다.

Table 16. Survival rate(mean±SD) of young fronds of the *Hizikia fusiforme* in various cryoprotectants after thawing. Young fronds were frozen by the first slow cooling and subsequent rapid cooling steps in each cryoprotectant dissolved in 100% seawater, and stored for 24h in LN before thawing

Cryoprotectant	Survival rate(%)
Control(seawater)	0.3 ± 0
5% DMSO	17.2 ± 1.2
5% dextran	5.7 ± 0.7
5% proline	6.5 ± 1.3
5% glycerol	4.3 ± 0.9
5% ethylene glycol	5.7 ± 2.1
5% sorbitol	6.2 ± 2.0
5% glucose	6.0 ± 1.6
5% sucrose	6.4 ± 1.8

Table 17. Effect of concentration of DMSO on the survival rate(mean ±SD) of young fronds *Hizikia fusiforme*. Young fronds were frozen by the two-step cooling method and thawed after immersion in LN for 24h

Cryoprotectant	Survival rate(%)
Control(seawater)	0.3 ± 0.0
5% DMSO	17.2 ± 1.2
10% DMSO	22.3 ± 3.5
15% DMSO	20.4 ± 2.3

Table 18. Survival rate(mean±SD) of young fronds of the *Hizikia fusiforme* in mixed cryoprotectants. Young fronds were frozen by the two-step cooling method and thawed after immersion in LN for 24h

Cryoprotectant	Survival(%)
10% DMSO + 5% proline	23.7± 3.8
10% DMSO + 5% dextran	13.9± 2.4
10% DMSO + 5% glycerol	17.2± 2.9
10% DMSO + 5% ethylene glycol	9.3± 3.4
10% DMSO + 5% sorbitol	15.4± 4.2
10% DMSO + 5% glucose	17.3± 2.6
10% DMSO + 5% sucrose	19.6± 3.8
15% DMSO + 5% proline	18.1 ± 2.1
15% DMSO + 5% dextran	10.3 ± 1.6
15% DMSO + 5% glycerol	11.3 ± 1.2
15% DMSO + 5% ethylene glycol	9.9 ± 0.6
15% DMSO + 5% sorbitol	12.5 ± 0.8
15% DMSO + 5% glucose	11.1 ± 0.5
15% DMSO + 5% sucrose	17.6 ± 0.6

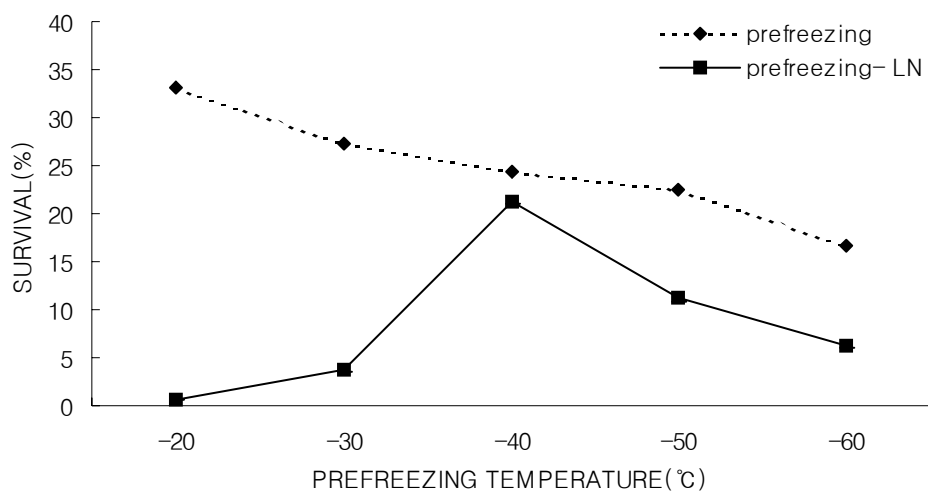


Fig. 18. Survival of *Hizikia fusiforme* prefrozen in a program-mable freezer. The thalli were suspended in a cryoprotective solution composed of 10% DMSO and 5% proline in seawater. Prefrozen suspensions were thawed without (dotted line) or after (solid line) immersion in LN. Values are means  $\pm$ SD.



## 제 4 절 녹조 가시파래와 청각의 종 보존을 위한 동결 및 해동조건의 최적화

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 재료

본 연구에서는 전남 진도군 임회면 인근해역(Fig. 19)에서 채집한 가시파래(*E. prolifera*)와 청각(*C. fragile*)의 조체를 이용하였다. 채집한 시료는 ice-box에 넣어 즉시 실험실로 운반하여 수온 15°C, 한랭 백색 형광램프를 이용하여  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  로 광주기 10L:14D의 단일조건하에서 통기배양 하였다. 본 동결보존 연구에서는 청각의 수사와 가시파래의 유엽을 이용하였다.

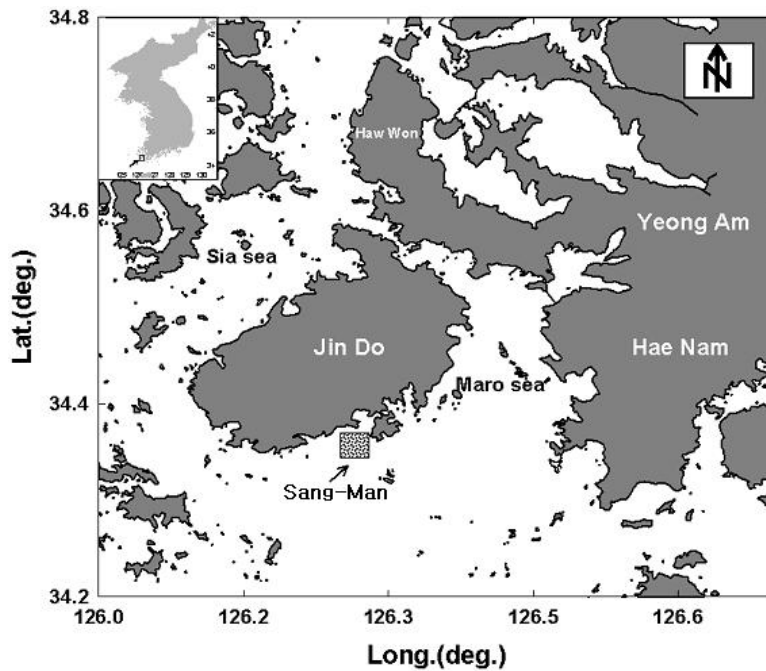


Fig. 19. The collecting site of plants used in this study.

#### 나. 동해방어제

본 연구에서는 지금까지 각종 생물의 동결보존에 있어서 동해방어제로 사용되고 있는 DMSO, Dextran, Proline, Glycerol(C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>), Sorbitol(C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>), Glucose(C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), Sucrose 및 Ethylene glycol(HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)를 이용하여 단일 동해방어제에 대한 효과와 DMSO와 다른 동해방어제의 혼합액에 대한 효과를 조사하였으며, 그에 대한 생존율을 측정하였다.

#### 다. 동결과 해동

동해 방어제를 이용한 기본액 만드는 과정은 해수(32%)에 최종농도의 목표치(5~15%)의 2배가 되게 혼합하여 제조한다. 현탁액은 2 ml의 vial 당 10~100 mg의 시료가 들어갈 정도의 적정량을 미리 준비하여 둔다.

그리고 이것을 저온항온수조(0~4℃)에 넣어 빙냉 시킨다. 기본액에 최종농도의 2배량의 동해방어제가 포함되도록 제조한 동해방어제를 미리 빙냉시켜 놓고, 0.75 ml를 15분에 걸쳐 서서히 첨가한 후 45분간 안정시킨다.

동해 방어제가 첨가되어 1.5 ml의 동결 보존용 vial을 알루미늄 바이알홀더에 끼워 넣어, -40℃ Program Freezer(Programmed Freezer, Samwon)속에서 예비 동결시킨다. 동결 중인 엽상체 현탁액의 온도변화는, 기록계(KA100 Kowics)에 의해 측정한다. 냉각속도는 1 ℃/분으로 하였다. 2단계 동결을 위해 엽상체 현탁액을 포함한 동결 보존용 바이알을 Program Freezer에서 꺼낸 즉시 액체질소에 담갔다.

24시간 동안 동결 보존하고 그 후 액체질소에서 꺼내어 40℃ 항온수조 속에 넣고 강하게 흔들어서 시료현탁액을 빠르게 해동시켜, 얼음이 완전히 녹기 직전에 바이알을 저온항온수조로 옮긴다. 해동 후 엽상체 현탁액을 14 ml용량의 원뿔형 침전관에 옮기고, 이것에 빙냉한 해수 10 ml를 30분 이상에 걸쳐 서서히 첨가하여 300×g에서 5분간 원심분리한 후 상등 액을 버리고 다시 한번 더 기본액 10 ml를 가하여 잘 흔들어 동해방어제를 제거한다.

#### 라. 생존율 측정

가시파래의 유엽과 청각의 수사의 생산률 조사는 erythrosine 염색 후 평가하였다 (Saga *et al.* 1989). 시료는 erythrosine-seawater 용액에 20분간 염색한 후 남은 염색제는 해수를 이용하여 세척하였다. 생산률은 동결 전의 생존율과 비교하여 상대적으로 표현하였다. 동결보존한 청각의 수사와 가시파래의 유엽 일부를 PES 배지에 접종 한 후 전에 기술한 방법으로 배양하였다. 각 실험에서 각 처리단계를 검사하기 위해 30개의 동종배양이 사용되었다.

## 2. 결 과

### 가. 가시파래의 동결 및 해동

본 연구에서는 Fig. 20과 같이 erythrosion 염색을 통한 엽체의 사세포를 조사하여 생존율을 나타내었다. 단일 동해방어제를 사용했을 경우 DMSO에서 가장 좋은 효과를 나타내었다(Table 19). DMSO의 동해 방어효과는 농도에 의해 좌우되었는데 DMSO 10% 농도에서는  $54.4 \pm 4.8\%$ , 15% 농도에서는  $54.9 \pm 3.2\%$ 로 DMSO의 농도가 증가하는 경우 동해 방어효과도 상승하는 것으로 보였다(Table 20). 해수에 40%의 DMSO를 혼합하여 만든 용액에서는 동해 방어 효과가 급격히 감소하여 DMSO의 최종 농도가 20%인 경우에서의 실험 결과를 얻을 수는 없었다. DMSO와 다른 동해 방어제와 혼합해서 사용한 동결보존에서는 세포의 생존율이 10% DMSO와 5% proline으로 혼합한 구간에서  $68.3 \pm 3.6\%$ 로 가장 높게 나타났으며, 15%의 DMSO 혼합액에서는 10% DMSO의 혼합액에서 보다 현저한 차이를 나타내었다(Table 21). 세포의 생존성에서는 미미한 변화를 보이거나 증가하는 경우는 전혀 없었다.

가시파래의 유엽을  $-20^{\circ}\text{C}$ 와  $-60^{\circ}\text{C}$ 에서 1차 냉각 시킨 후 액화질소동결보존 단계를 거치지 않고 융해시킨 경우 세포의 생존율은 1차 냉각 온도가 낮아질수록 감소하는 경향을 보였다(Fig. 21).  $-20^{\circ}\text{C}$ 와  $-30^{\circ}\text{C}$  사이에서 1차 냉각시킨 후 액화질소 동결보존 하는 경우 세포의 손상을 초래하여 생존율이 10% 미만으로 나타났다.  $-40^{\circ}\text{C}$  이하에서 1차 냉각시킨 경우 세포손상이 감소하였으며, 연구 결과  $-40^{\circ}\text{C}$ 에서 1차 냉각 시킨 후 액화질소 동결보존시 세포의 생존율이 가장 높은 것으로 나타났다.

1주일간 액화 질소 동결 보존한 가시파래의 유엽를 융해시키자 성장을 시작하여 엽상체로의 증식이 가능하였다.

본 연구에서 나타난 결과와 같이 동결보존시 1차냉각 후 액화질소에 보존시 동해 피해를 최소화하기 위해서는  $-40^{\circ}\text{C}$  까지 1차 냉각 시킨 후 액화질소로 즉시 이송하여 보존하는 것이 바람직한 것으로 생각되어진다.

또한 가시파래의 경우 적합한 동해방어제로서는 DMSO와 proline를 이용하여 각각 10%와 5%로 혼합하여 사용시 종보존에 유리할 것으로 생각되어진다.

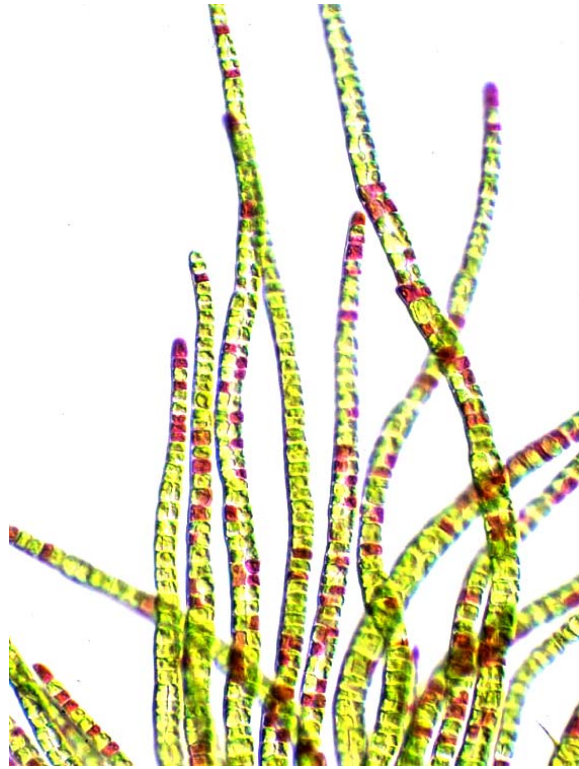


Fig. 20. Fronds of *Enteromorpha prolifera* stained by erythrosine. Red cells are dead.

Table 19. Survival rate(mean±SD) of young fronds of the *Enteromorpha prolifera* in various cryoprotectants after thawing. Young fronds were frozen by the first slow cooling and subsequent rapid cooling steps in each cryoprotectant dissolved in 100% seawater, and stored for 24h in LN before thawing

Cryoprotectant	Survival rate(%)
Control(100%seawater)	0.7 ± 0.0
5% DMSO	22.8 ± 2.1
5% dextran	18.4 ± 2.6
5% proline	14.7 ± 1.8
5% glycerol	12.1 ± 3.0
5% ethylene glycol	10.4 ± 3.8
5% sorbitol	17.4 ± 2.4
5% glucose	8.8 ± 4.4
5% sucrose	11.8 ± 3.7

Table 20. Effect of concentration of DMSO on the survival rate(mean ±SD) of young fronds *Enteromorpha prolifera*. Young fronds were frozen by the two-step cooling method and thawed after immersion in LN for 24h

Cryoprotectant	Survival rate(%)
Control(100%seawater)	0.7 ± 0.0
5% DMSO	22.8 ± 2.1
10% DMSO	54.4 ± 4.8
15% DMSO	54.9 ± 3.2
20% DMSO	-
40% DMSO	-

Table 21. Survival rate(mean±SD) of young fronds of the *Enteromorpha prolifera* in mixed cryoprotectants. Young fronds were frozen by the two-step cooling method and thawed after immersion in LN for 24h

Cryoprotectant	Survival(%)
10% DMSO + 5% proline	68.3 ± 3.6
10% DMSO + 5% dextran	52.6 ± 4.7
10% DMSO + 5% glycerol	62.4 ± 5.8
10% DMSO + 5% ethylene glycol	45.4 ± 3.4
10% DMSO + 5% sorbitol	43.3 ± 3.0
10% DMSO + 5% glucose	42.4 ± 2.7
10% DMSO + 5% sucrose	61.4 ± 4.2
15% DMSO + 5% proline	58.2 ± 5.2
15% DMSO + 5% dextran	49.6 ± 3.3
15% DMSO + 5% glycerol	55.3 ± 4.3
15% DMSO + 5% ethylene glycol	52.7 ± 3.5
15% DMSO + 5% sorbitol	43.0 ± 3.4
15% DMSO + 5% glucose	41.3 ± 2.7
15% DMSO + 5% sucrose	49.5 ± 4.2

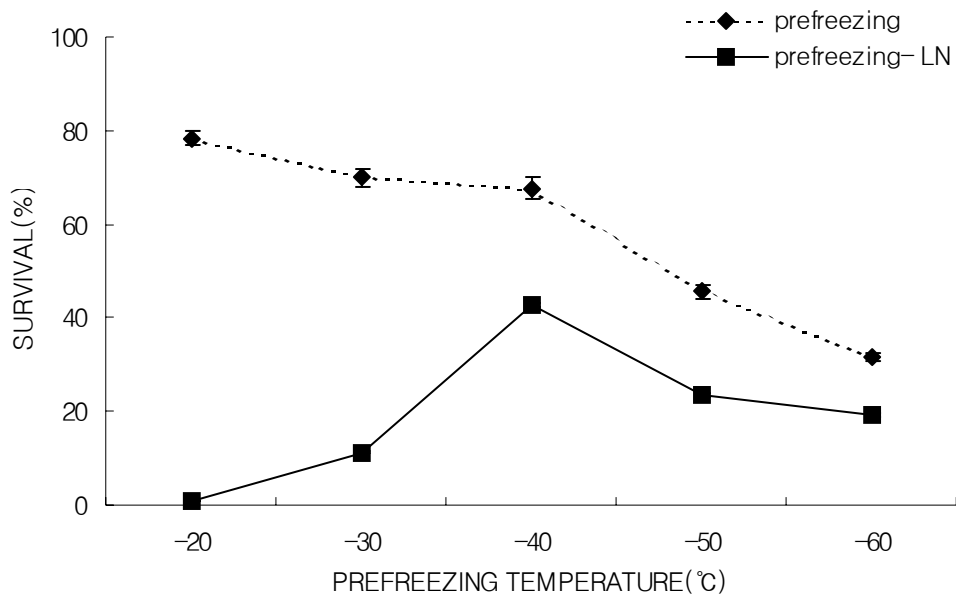


Fig. 21. Survival of *Enteromorpha prolifera* prefrozen in a program-mable freezer. The thalli were suspended in a cryoprotective solution composed of 10% DMSO and 5% proline in seawater. Prefrozen suspensions were thawed without (dotted line) or after (solid line) immersion in LN. Values are means  $\pm$ SD.

## 나. 청각의 동결 및 해동

본 연구에서는 Fig. 22과 같이 erythrosion 염색을 통한 엽체의 사세포를 조사하여 생존율을 나타내었다. 단일 동해방어제를 사용했을 경우 DMSO에서 가장 좋은 효과를 나타냈다(Table 22). DMSO의 동해 방어효과는 농도에 의해 좌우되었는데 DMSO 10% 농도에서  $24.7 \pm 3.1\%$ 를 나타내어 15% 보다 동해 방어효과가 높은 것으로 나타났다(Table 23).

해수에 40%의 DMSO를 혼합하여 만든 용액에서는 동해 보호 효과가 급격히 감소하여 DMSO의 최종 농도가 20%인 경우에서의 실험 결과를 얻을 수는 없었다. DMSO와 다른 동해 방어제의 혼합액을 사용한 동결보존에서는 세포의 생존율이 10% DMSO와 5% sucrose 를 혼합한 구간에서 43.6%로 현저한 차이를 나타냈으며, proline을 혼합한 구간에서도 39.7%로 다른 동해방어제에 비하여 높게 나타났다(Table 24).

청각의 수사를  $-20^{\circ}\text{C}$ 와  $-60^{\circ}\text{C}$ 에서 1차 냉각 시킨 후 액화질소동결보존 단계를 거치지 않고 융해시킨 경우 세포의 생존율은 1차 냉각 온도가 낮아질수록 감소하는 경향을 보였다(Fig. 23).  $-20^{\circ}\text{C}$ 와  $-30^{\circ}\text{C}$  사이에서 1차 냉각시킨 후 액화질소 동결보존 하는 경우 세포의 심각한 손상을 초래하였다.  $-40^{\circ}\text{C}$  이하에서 1차 냉각시킨 경우 세포손상이 감소하였으며 연구 결과  $-40^{\circ}\text{C}$ 에서 1차 냉각 시킨 후 액화질소 동결보존시 세포의 생존율이 가장 높은 것으로 나타났다.

1주일간 액화 질소 동결 보존한 청각의 배우체를 융해시키자 성장을 시작하여 단위생식으로 엽상체의 증식이 가능하였다.

본 연구에서 나타난 결과와 같이 동결보존시 1차 냉각 후 액화질소에 보존시 동해 피해를 최소화하기 위해서는  $-40^{\circ}\text{C}$  까지 1차 냉각 시킨 후 액화질소로 즉시 이송하여 보존하는 것이 바람직한 것으로 생각되어진다.

또한 청각의 경우 적합한 동해방어제로서는 DMSO와 sucrose를 이용하여 각각 10%와 5%로 혼합하여 사용시 종보존에 유리할 것으로 보여 진다.



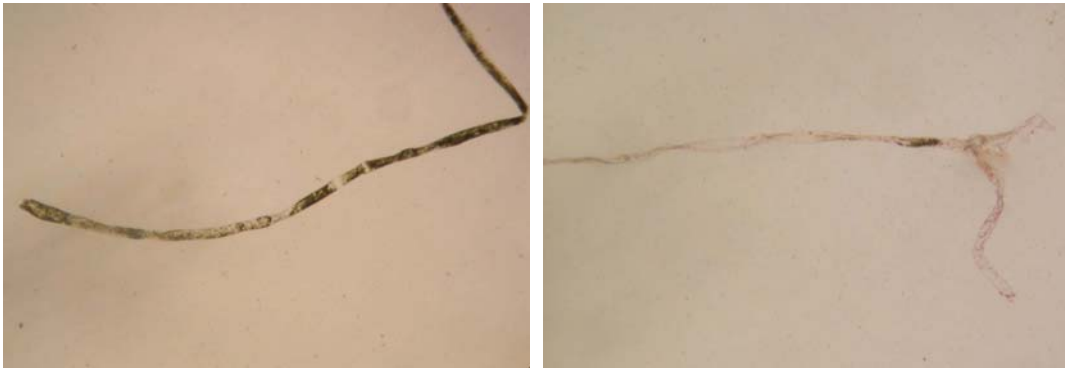


Fig. 22. Medullary threads of *Codium fragile* stained by erythrosine. Red cells are dead(left).

Table 22. Survival rate(mean±SD) of medullary threads of *Codium fragile* in various cryoprotectants after thawing. The threads were frozen by the first slow cooling and subsequent rapid cooling steps in each cryoprotectant dissolved in 100% seawater, and stored for 24h in LN before thawing

Cryoprotectant	Survival rate(%)
Control(100%seawater)	0.3 ± 0.0
5% DMSO	17.5 ± 1.8
5% dextran	6.1 ± 1.9
5% proline	9.3 ± 2.2
5% glycerol	5.4 ± 0.7
5% ethylene glycol	6.9 ± 2.0
5% sorbitol	7.5 ± 1.2
5% glucose	7.1 ± 0.8
5% sucrose	8.8 ± 2.0

Table 23. Effect of concentration of DMSO on the survival rate(mean ±SD) of medullary threads of *Codium fragile*. The threads were frozen by the two-step cooling method and thawed after immersion in LN for 24h

Cryoprotectant	Survival rate(%)
Control(100%seawater)	0.3 ± 0.0
5% DMSO	17.5 ± 1.8
10% DMSO	24.7 ± 3.1
15% DMSO	21.6 ± 2.7
20% DMSO	-
40% DMSO	-

Table 24. Survival rate(mean±SD) of medullary threads of the *Codium fragile* in various cryoprotectants. The threads were frozen by the two-step cooling method and thawed after immersion in LN for 24h

Cryoprotectant	Survival(%)
10% DMSO + 5% proline	39.7 ± 4.3
10% DMSO + 5% dextran	21.7 ± 1.3
10% DMSO + 5% glycerol	31.9 ± 2.9
10% DMSO + 5% ethylene glycol	23.2 ± 3.5
10% DMSO + 5% sorbitol	33.8 ± 2.0
10% DMSO + 5% glucose	27.6 ± 2.7
10% DMSO + 5% sucrose	42.6 ± 3.6
15% DMSO + 5% proline	11.7 ± 0.9
15% DMSO + 5% dextran	10.3 ± 0.8
15% DMSO + 5% glycerol	9.2 ± 1.2
15% DMSO + 5% ethylene glycol	7.7 ± 1.0
15% DMSO + 5% sorbitol	9.3 ± 0.6
15% DMSO + 5% glucose	7.8 ± 0.6
15% DMSO + 5% sucrose	12.6 ± 0.7

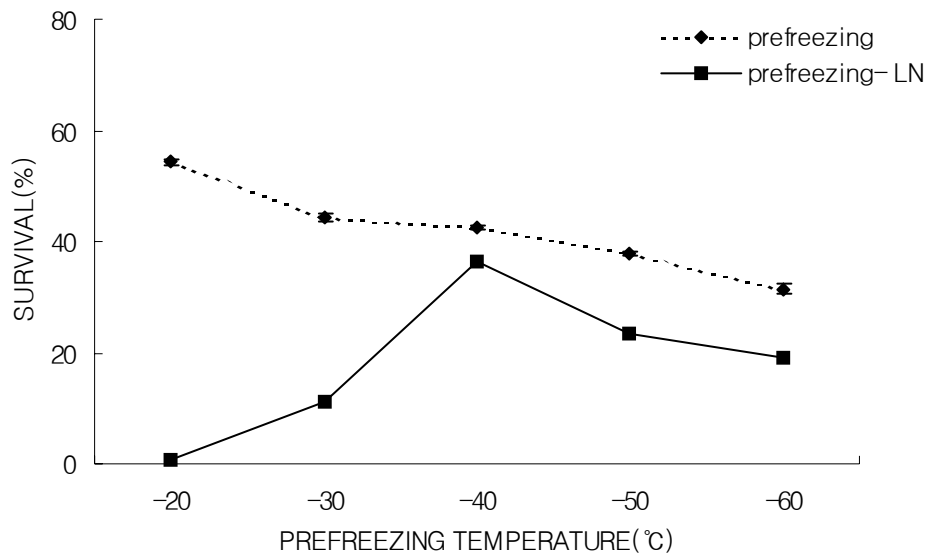


Fig. 23. Survival of *Codium fragile* prefrozen in a program-mable freezer. The thalli were suspended in a cryoprotective solution composed of 10% DMSO and 5% proline in seawater. Prefrozen suspensions were thawed without (dotted line) or after (solid line) immersion in LN. Values are means  $\pm$ SD.

## 제 4 장 원종묘와 동결보존종묘의 비교 생물학적 실험

### 제 1 절 동결전·후 종묘의 비교재배실험

#### 1. 재료 및 방법

##### 가. 어장환경 생태조사

비교재배실험의 경우 전남 진도군 임회면 상만리 인근 양식어장에서 '04년 10월부터 '05년 6월까지 김, 미역, 다시마의 양식적기에 맞추어 비교재배실험을 실시하였다(Fig. 24).

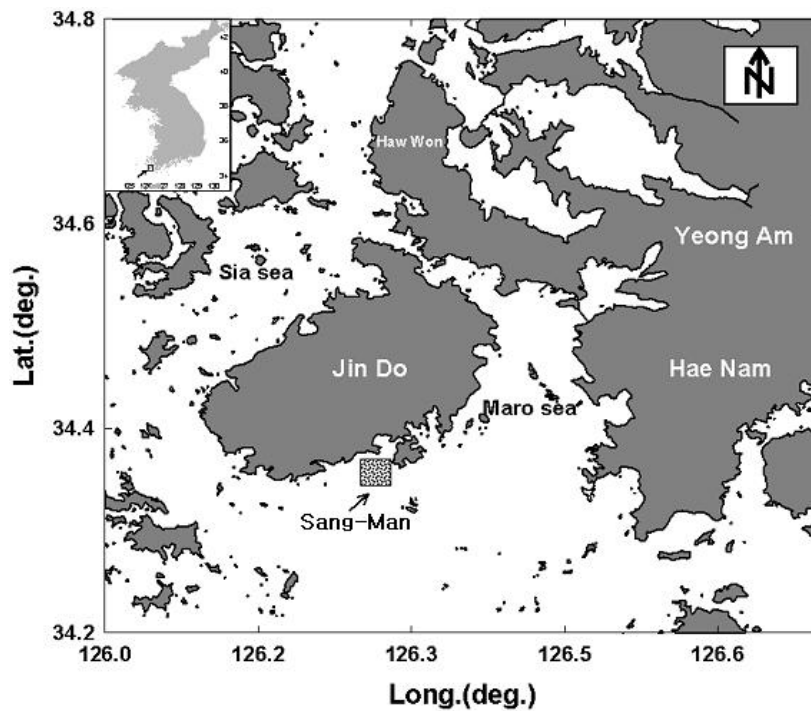


Fig. 24. The collecting site of materials used in this study.

어장환경조사는 양성시기 동안 매월 1회 실시하였으며, 조사항목으로는 수온(°C), 용존 산소(mL/l), 염분(ppt)을 다목적수질측정기(YSI-85)를 이용하여 어장지에서 조사하였다 (Fig. 25).

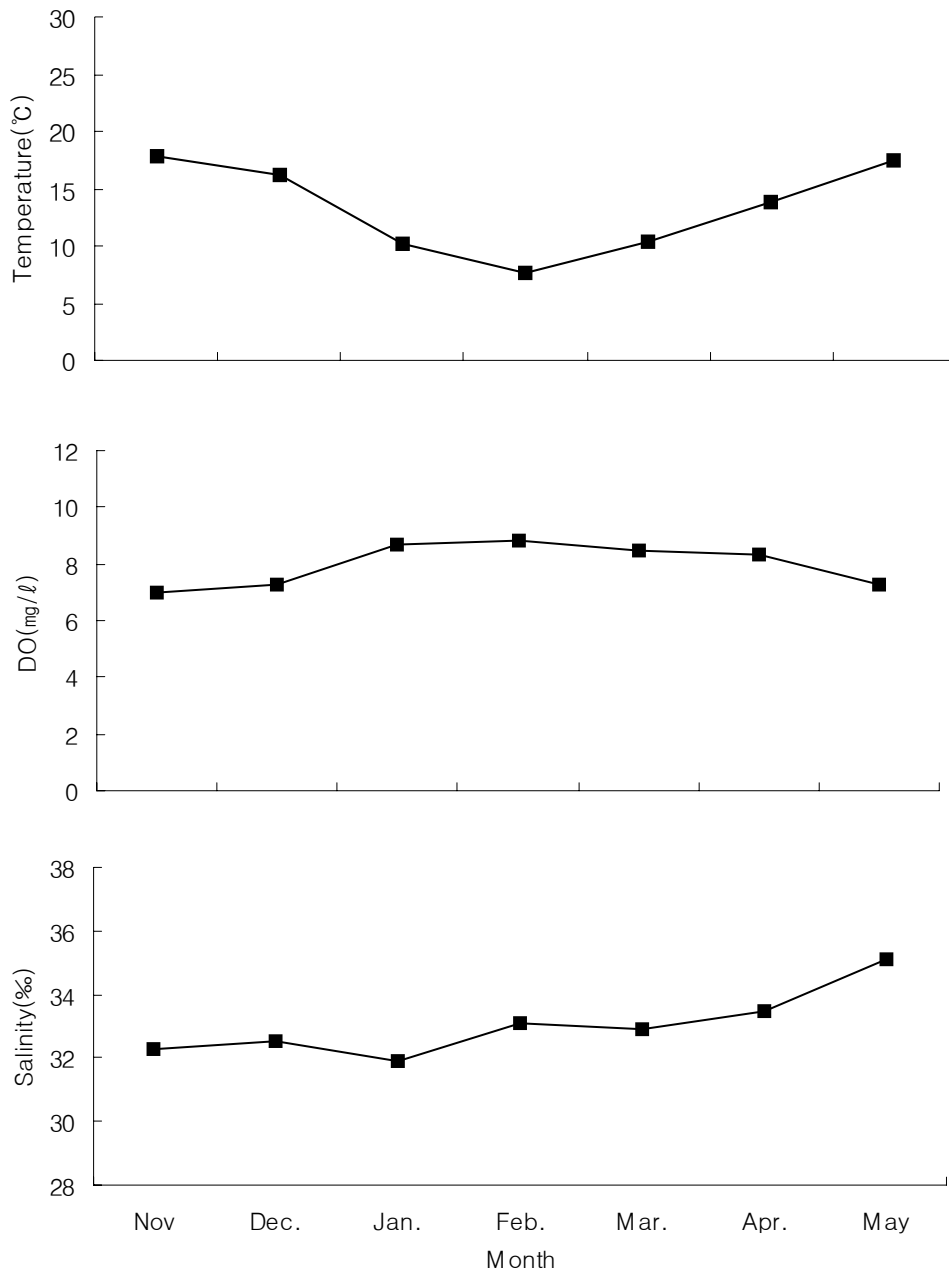


Fig. 25. Measurements of seawater temperature(°C), dissolved oxygen(mg/ℓ), salinity(‰) by aquafarm and cultivation months.

## 나. 양성시험

### (1) 김파래목

본 연구원에서 배양중이던 원종묘와 동결종묘의 유리사상체를 '04년 5월에 패각에 이식하여 '04년 9월까지 5개월간 성숙관리 하였다. 각포낭이 형성된 10월 초 양식시험어장으로 이송하여 양성발에 채묘를 실시하였다.

이때, 채묘 방식은 수면에 전개한 김발밑에 비닐시이트를 깔아서 방출된 각포자가 일산 않도록 하여, 파동의 충격으로 각포자의 분산을 균등하게 하는 부류식 채묘를 실시하였다.

재배방법으로는 발포스티로폴 또는 합성수지제의 부자를 결착해서 부력을 준 인공간출식 육묘용 부상대에 종망을 전개해, 그 말목에 종망을 수평으로 결착하여 인위적으로 임의의 시각에 일정한 시간동안 종망을 공기중에 노출(간출)시켜 산처리제를 사용하지 않고 잡조류를 구제하는 부류식 시설법으로 재배하였다.

이때, 재배시설의 경우 10m 이심의 내해에 부력을 준 닻으로 고정된 틀에 종망을 수평으로 전개해서 결착 고정시키고, 일일 노출시간은 평균 4~6시간을 실시하였다.

각 시료는 원종묘와 동결종묘 2품종으로 구분하였으며, 측정형질로는 엽장(Blade length), 엽폭(Blade width)의 2형질을 5개월간 측정하였고, 이 결과를 토대로 원종묘와 동결종묘의 성장에 따른 유의차를 분석하였다.

### (2) 다시마목

포자의 방출시기에 맞추어 성숙한 포자엽을 채취하여, 여과해수를 이용하여 부착성 돌말류와 그 밖의 불순물을 깨끗이 세척 운반한다. 이렇게 세척한 포자엽에서 유주자를 방출시켜 실험실내에 7일간 정치배양 시키고, 일주일후 현미경적 크기의 배우체를 항온항습실로 옮겨 통기배양하여 증식시켰다. 원종묘 배우체는 수온 18℃ 조도 1,200Lux 조건에서 채묘시기 전까지 배양 후 성숙시켰고, 동결종묘의 경우 해동 후 원종묘와 같은 조건으로 채묘시기 전까지 성숙배양 하였다.

채묘는 500 ℓ 수조에서 인위적으로 성숙시킨 수배우체에서 정자를 방출시켜 암배우체와 수정시켰고, 수정은 현미경을 통하여 확인후 채묘틀을 담구어 씨줄에 부착되도록 하였다.

채묘 후의 용이한 관리를 위해 본원의 육상수조에서 냉각수를 이용하여 채묘의 적정 수온을 유지시키면서 아포체로 받아시켰다.

육상수조에서 아포체에서 받아한 유엽은 약 1개월 안에 육안으로 식별이 가능하였고 유엽체의 크기가 1~3cm정도 성장하였을 때 시험어장으로 이송하였다.

시험어장은 전라남도 진도군 임회면 상만리 인근 양식장에서 실시하였으며, 시설방법은 연승수하식방법(Fig. 26)을 선택하여 미역과 다시마 각각 원종묘 1대(100m), 동결종묘 1대(100m)의 크기로 시설, 구간별 각 5줄씩 20줄을 시설, 관찰하였다. 시설재료는 Ø16mm

폴리에틸렌 로프를 사용하였고, 설치방법은 씨줄을 5~10cm로 절단하여 친승 로프에 30cm 간격으로 끼워넣기식 시설법을 이용하였으며, 종묘의 개체수는 20개를 넘지 않게 조절하여 밀식되지 않도록 시설 하였다.

각 시료는 미역은 11월, 다시마는 2월부터 채취하여 원종묘와 동결종묘 2품종으로 구분하여 측정하였으며, 측정형질로는 미역은 엽장(Blade length), 엽폭(Blade width), 줄기길이(Upper stipe length)의 3형질을, 다시마는 엽장(Blade length), 엽폭(Blade width) 2형질을 5개월간 측정하였고, 이 결과를 토대로 원종묘와 동결종묘의 성장에 따른 유의차를 분석하였다.

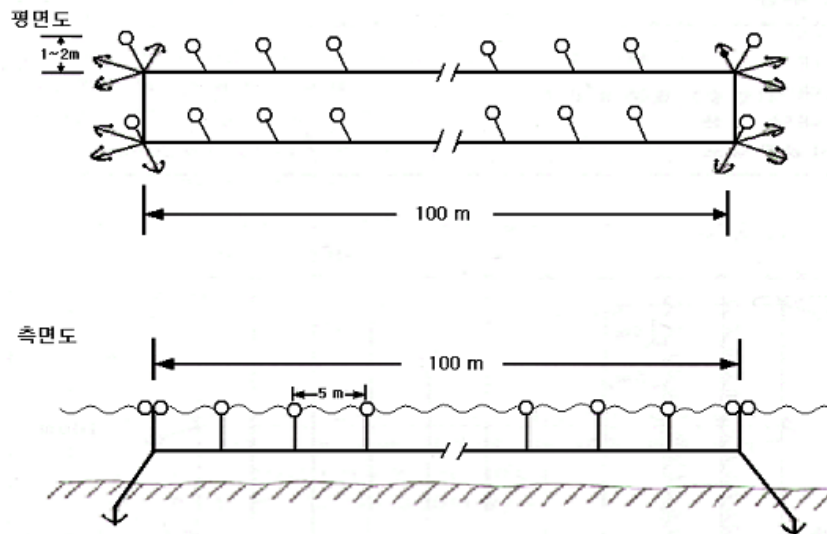


Fig. 26. A planar view and end view of cultivation facilities for Laminariales.

### (3) 갈파래목

동결처리 전후의 종묘를 이용하여 각 시료별로 배양장내 실내수조(500ℓ)를 Figure 27, 28과 같이 시설하여 재배실험 하였다.

가시파래는 엽체를 해동후 Incubator에서 일별 2~3℃로 증감하여 최종온도인 자연수온에 5일내에 도달하도록 하여 설치된 수조로 이식하여 재배하였다. 이때 수온은 15~18℃ 였으며, 광주기는 12L:12D으로 맞추어 자연조건과 동일하게 맞추어 실시하였다.

또한, 주수는 자연해수를 여과하여 흘러넘으로써 유수식(1일 2회)방법을 이용하였으며, 엽체의 성장에 적합한 조건으로 유지 관리하였다.

동결종묘의 경우 동해방어제 제거 후 동결전 종묘와 같은 조건하에서 재배실험을 실시하였다.

각 시료는 11월부터 3월까지 월별 30개체에 대하여 무작위채취하여 동결전과 동결후 2구간으로 구분하여 측정하였으며, 측정형질로는 엽장(blade length), 엽폭(blade width)의 2형질을 5개월간 측정하였고, 이 결과를 토대로 성장에 따른 유의차를 분석하였다.



청각의 경우, 포낭과 수사를 이용하여 가시파래와 같이 자연수온과 일치하도록 5일간 Incubator에서 배양후 실내수조로 이식 재배였으며, 3월~7월까지 5개월간 실시하였다.

#### (4) 형태적 비교검정

측정형질로는 엽장(blade length)과 가짓수(branch number)의 2형질에 대하여 조사하여 유의차를 분석하였다.

각 종별 형태적 비교분석은 T-검정을 통한 원종묘와 동결종묘 두 집단간의 측정항목별 평균, 표준오차, Levene의 등분산검정을 통한 유의확률을 구하여 두 집단간 분산의 동일 여부를 확인하고, 등분산이 가정되는 경우 평균의 동일성에 대한 T값과 양집단의 평균에 대한 유의확률을 구하였다. 이때 신뢰구간은 95% 기준하였다.

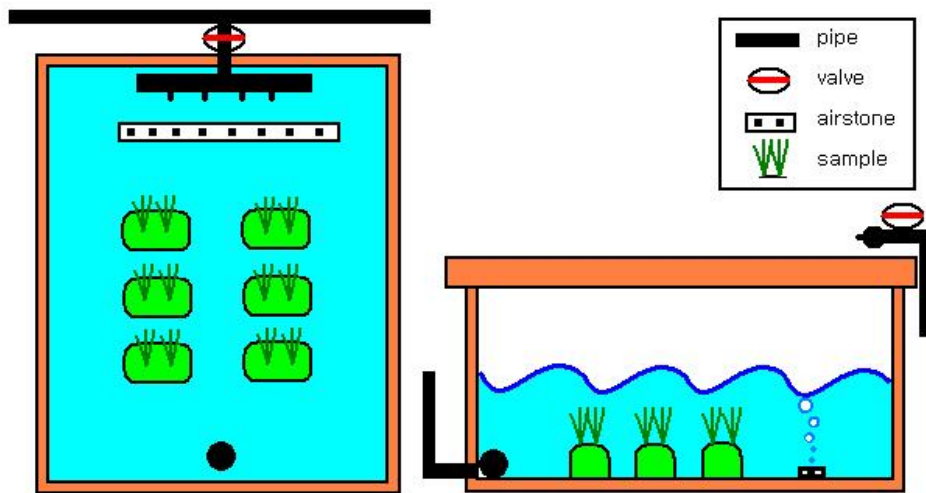


Fig. 27. A plane(right) and side(left) view of indoor culture tank.



Fig. 28. A photograph of indoor culture tanks.

## 2. 결 과

### ○ 원종묘와 동결종묘의 업체재배시 형태적 비교검정

각 종별 형태적 비교분석은 T-검정을 통한 원종묘와 동결종묘 두 집단간의 측정항목별 평균, 표준오차, Levene의 등분산검정을 통한 유의확률을 구하여 두 집단간 분산의 동일여부를 확인하고, 등분산이 가정되는 경우 평균의 동일성에 대한 T-값과 양집단의 평균에 대한 유의확률을 구하였다. 이때 신뢰구간은 95% 기준하였다.

Table 25의 결과에서와 같이 *P. tenera*의 경우, 등분산검정은 원종묘와 동결종묘 두 집단의 분산이 동일한가를 검정하기 위한 결과로서, 11월 엽폭에 대한 결과값을 제외한 나머지의 결과 같이 유의확률값이 유의수준 0.05보다 크므로 두 집단의 분산이 동일하다는 가정을 기각할 수 없다는 것을 알 수 있다. 따라서 분산이 동일하다는 가설을 받아들이며, 이에 대한 조사항목별 T값을 구하였다. 또한, 평균의 동일성에 대한 유의확률이 유의수준 0.05보다 크므로 두 집단간의 평균값이 차이가 없다는 가설을 기각할 수 없다. 따라서 본 실험결과 *P. tenera* 원종묘와 동결종묘의 재배시 형태적 유의차는 없는 것으로 생각되어진다.

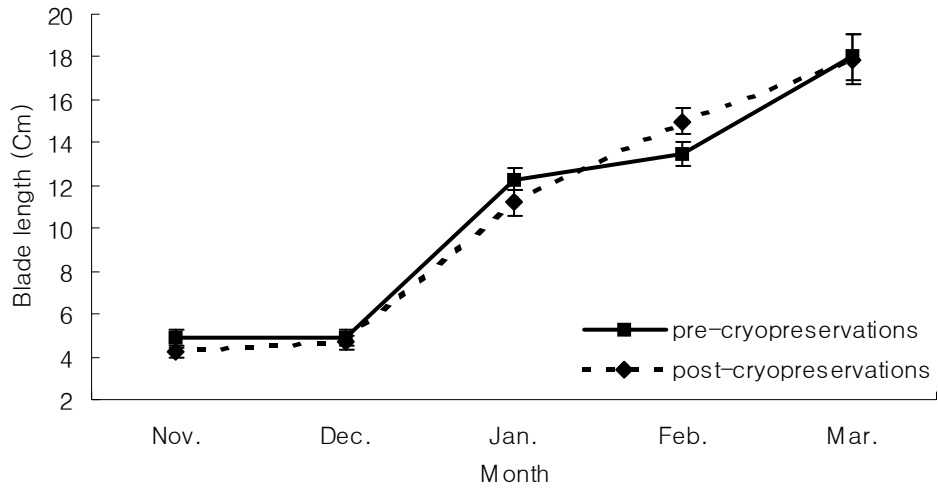


Fig. 29. Comparison of blade length of the two groups of *Porphyra tenera*.

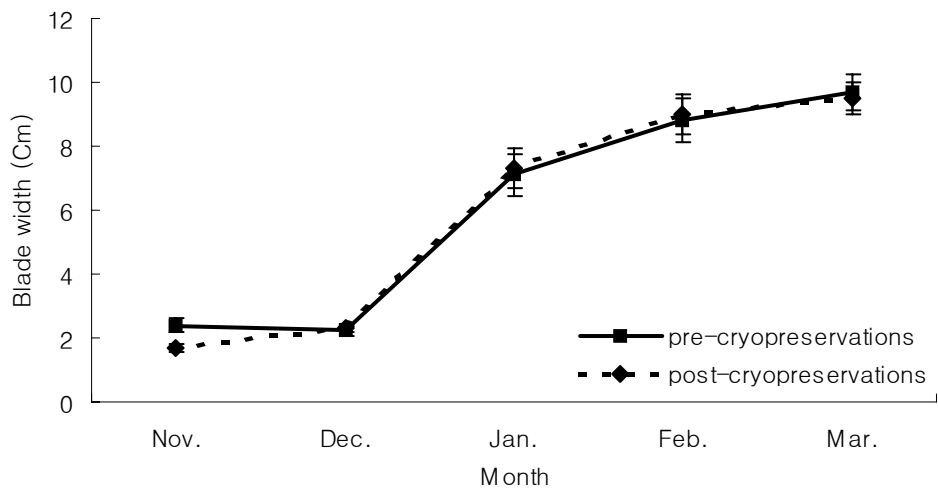


Fig. 30. Comparison of blade width of the two groups of *Porphyra tenera*.

Table 25. Mean and standard deviation(SD) of pre- and post- cryopreservations of *Porphyra tenera*

Species	Month	Trait	Mean	SD	Levene's test	T-test		
					P	t	P	
<i>P. tenera</i>	Nov.	Blade length	pre-	4.88	1.88	0.14	1.70	0.09
			post-	4.17	1.30			0.10
		Blade width	pre-	2.44	1.07	0.01	3.28	0.002
			post-	1.68	0.69			
	Dec.	Blade length	pre-	4.92	2.14	0.06	0.40	0.70
			post-	4.72	1.78			0.70
		Blade width	pre-	2.23	0.86	0.96	-0.509	0.61
			post-	2.33	0.75			
	Jan.	Blade length	pre-	12.33	3.02	0.47	1.4	0.17
			post-	11.17	3.42			
		Blade width	pre-	7.13	3.63	0.85	-0.18	0.85
			post-	7.30	3.33			
	Feb.	Blade length	pre-	13.53	3.09	0.79	-1.92	0.05
			post-	15.10	3.20			
		Blade width	pre-	8.83	3.69	0.81	-0.18	0.85
			post-	9.00	3.45			
	Mar.	Blade length	pre-	18.00	6.01	0.53	0.04	0.96
			post-	17.93	6.38			
		Blade width	pre-	9.73	3.00	0.85	0.28	0.77
			post-	9.51	2.87			

Table 26의 결과, *L. japonica*의 경우, 등분산검정은 원종묘와 동결종묘 두 집단의 분산이 동일한가를 검정하기 위한 결과로서, 5월 전장에 대한 결과값을 제외한 나머지의 결과값이 유의확률값이 유의수준 0.05보다 크므로 두 집단의 분산이 동일하다는 가정을 기각할 수 없다는 것을 알 수 있다. 따라서 분산이 동일하다는 가설을 받아들이며, 이에 대한 조사항목별 T값을 구하였다. 또한, 평균의 동일성에 대한 유의확률이 유의수준 0.05보다 크므로 두 집단간의 평균값이 차이가 없다는 가설을 기각할 수 없다. 따라서 본 실험결과 *L. japonica* 원종묘와 동결종묘의 재배시 형태적 유의차는 없는 것으로 생각되어진다.

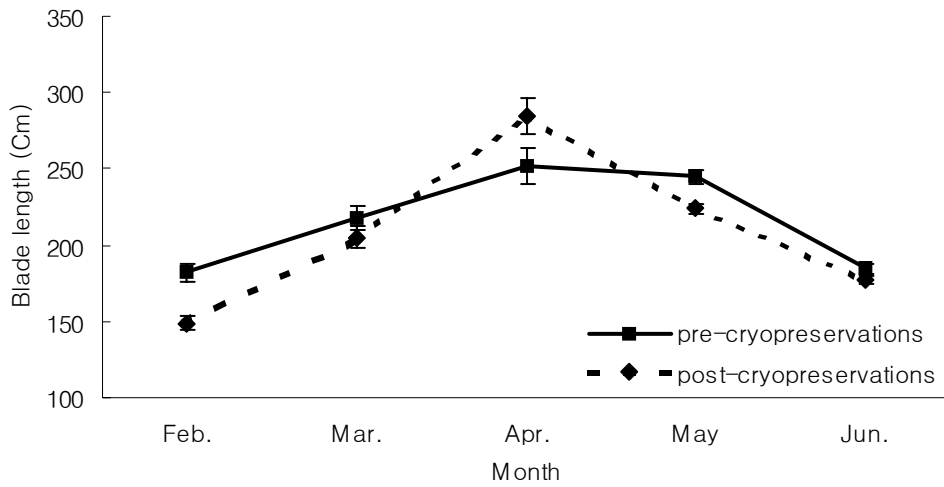


Fig. 31. Comparison of blade length of the two groups of *Laminaria japonica*.

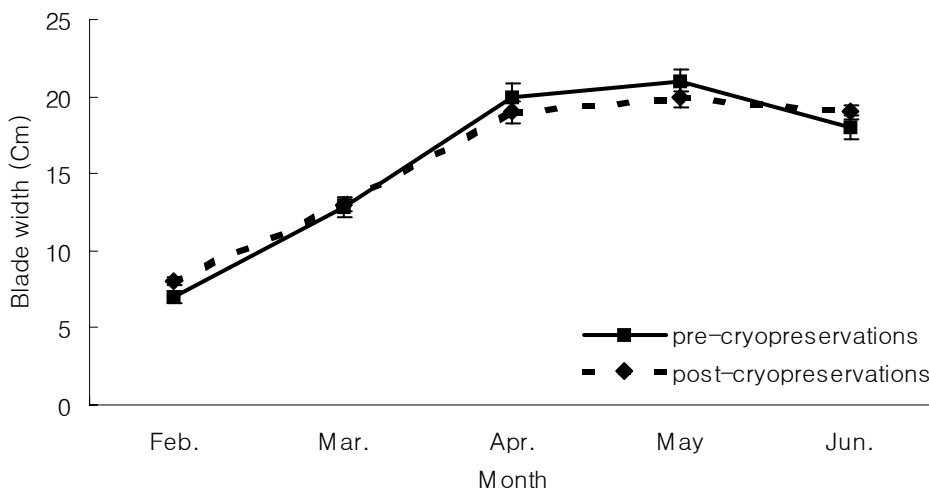


Fig. 32. Comparison of blade width of the two groups of *Laminaria japonica*.

Table 26. Mean and standard deviation(SD) of pre- and post- cryopreservations of *Laminaria japonica*

Species	Month	Trait	Mean	SD	Levene's test	T-test		
					P	t	P	
<i>L. japonica</i>	Feb.	Blade length	pre-	142.50	31.57	0.39	0.88	0.38
			post-	149.26	27.50			
		Blade width	pre-	7.3	1.93	0.11	-1.77	0.082
			post-	8.1	1.54			
	Mar.	Blade length	pre-	217.50	42.05	0.87	1.18	0.24
			post-	205.00	39.80			
		Blade width	pre-	12.76	2.86	0.22	0.398	0.69
			post-	12.50	2.30			
	Apr.	Blade length	pre-	252.06	66.83	0.70	-1.85	0.06
			post-	283.60	65.06			
		Blade width	pre-	19.85	4.98	0.23	0.89	0.38
			post-	18.80	4.11			
	May	Blade length	pre-	227.95	21.05	0.09	0.77	0.45
			post-	223.50	14.89			
		Blade width	pre-	20.70	3.13	0.48	0.95	0.35
			post-	19.75	3.18			
	Jun.	Blade length	pre-	176.1	14.72	0.26	-0.108	0.92
			post-	176.55	11.49			
Blade width		pre-	18.25	3.26	0.16	-0.70	0.49	
		post-	18.85	2.96				

Table 27의 결과에서와 같이 *U. pinnatifida*의 경우, 등분산검정은 원종묘와 동결종묘 두 집단이 분산이 동일한가를 검정하기 위한 결과로서, 11월 전장에 대한 결과값을 제외한 나머지의 결과 같이 유의확률값이 유의수준 0.05보다 크므로 두 집단의 분산이 동일하다는 가정을 기각할 수 없다는 것을 알 수 있다. 따라서 분산이 동일하다는 가설을 받아들이며, 이에 대한 조사항목별 T값을 구하였다. 또한, 평균의 동일성에 대한 유의확률이 유의수준 0.05보다 크므로 두 집단간의 평균값이 차이가 없다는 가설을 기각할 수 없다. 따라서 본 실험결과 *U. pinnatifida* 원종묘와 동결종묘의 재배시 형태적 유의차는 없는 것으로 생각되어진다.



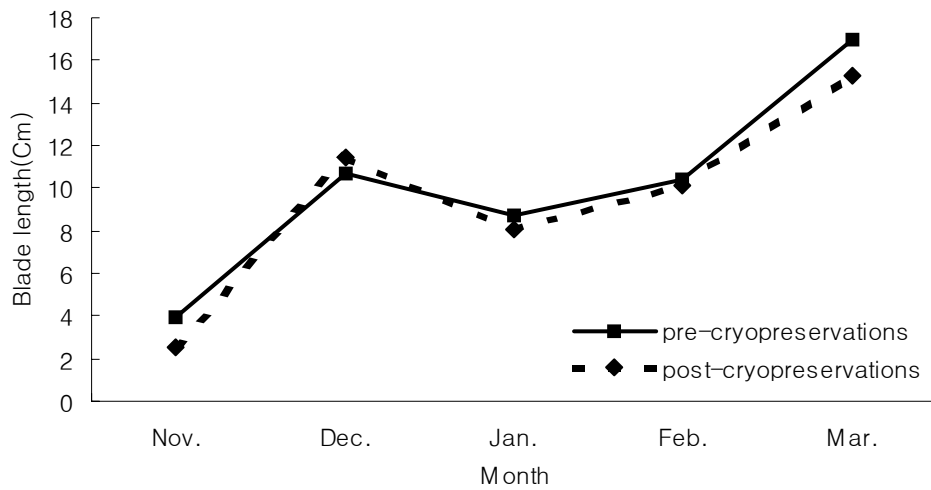


Fig. 33. Comparison of blade length of the two groups of *Uudaria pinnatifida*.

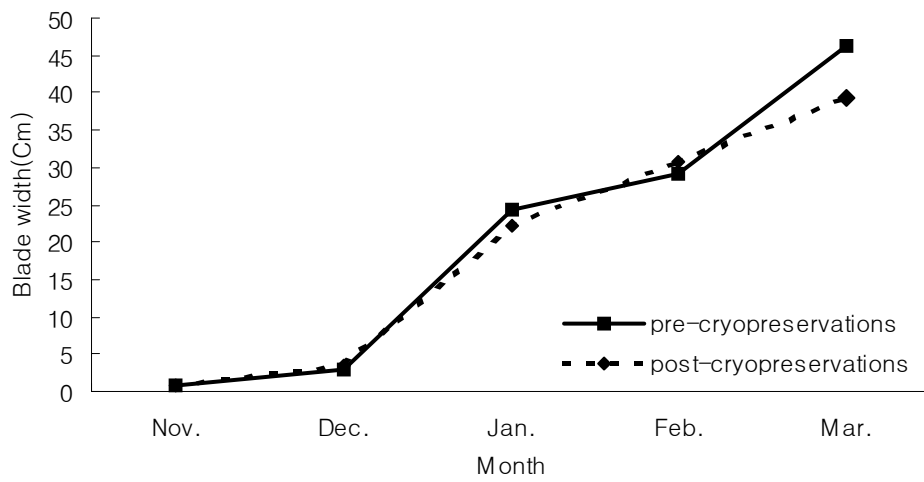


Fig. 34. Comparison of blade width of the two groups of *Uudaria pinnatifida*.

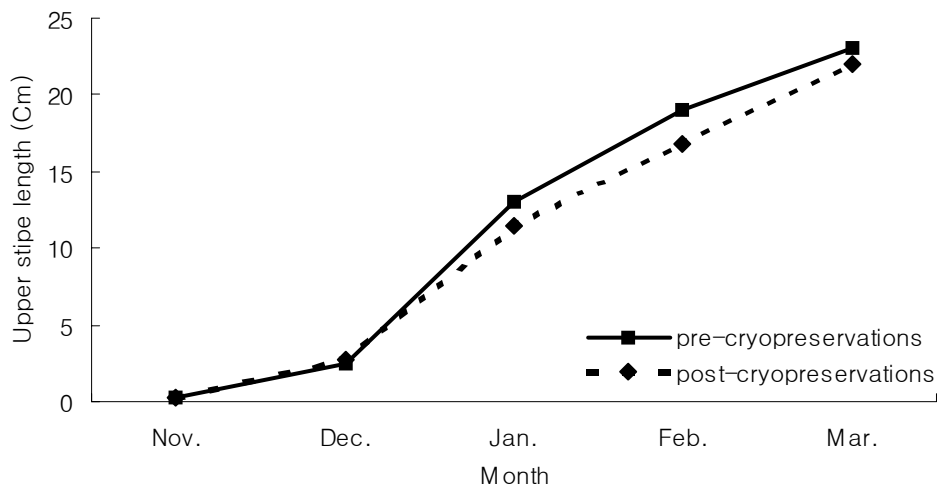


Fig. 35. Comparison of upper stipe length of the two groups of *Uudaria pinnatifida*.

Table 27. Mean and standard deviation(SD) of pre- and post- cryopreservations of *Uudaria pinnatifida*

Species	Month	Trait	Mean	SD	Levene's test	T-test		
					P	t	P	
<i>U. pinnatifida</i>	Nov.	Blade length	pre- 39.00 post- 25.65	16.07 7.98	0.008	3.33	0.002	
		Blade width	pre- 9.00 post- 7.80	4.05 3.09				0.38
		Upper stipe length	pre- 2.20 post- 2.00	1.11 0.79	0.17	0.66	0.52	
		Blade length	pre- 106.65 post- 114.10	20.81 30.32				0.11
		Blade width	pre- 30.38 post- 34.80	14.50 13.87	0.89	-0.99	0.33	
		Upper stipe length	pre- 24.65 post- 27.50	5.31 4.73				0.68
	Dec.	Blade length	pre- 87.20 post- 80.50	14.19 15.37	0.57	1.43	0.16	
		Blade width	pre- 24.25 post- 22.30	6.95 6.65				0.73
		Upper stipe length	pre- 13.05 post- 11.50	3.17 3.12	0.72	1.56	0.13	
		Blade length	pre- 104.15 post- 100.95	21.33 24.56				0.54
		Blade width	pre- 29.15 post- 30.70	11.36 15.25	0.69	-0.36	0.72	
		Upper stipe length	pre- 18.95 post- 16.75	6.27 6.05				0.88
	Jan.	Blade length	pre- 169.90 post- 152.50	35.45 24.78	0.05	1.81	0.08	
		Blade width	pre- 46.20 post- 39.20	12.59 12.09				0.87
		Upper stipe length	pre- 23.00 post- 22.00	6.96 5.48	0.18	0.51	0.62	
		Feb.	Blade length	pre- 104.15 post- 100.95				21.33 24.56
			Blade width	pre- 29.15 post- 30.70	11.36 15.25	0.69	-0.36	0.72
			Upper stipe length	pre- 18.95 post- 16.75	6.27 6.05			
	Mar.		Blade length	pre- 169.90 post- 152.50	35.45 24.78	0.05	1.81	0.08
			Blade width	pre- 46.20 post- 39.20	12.59 12.09			
Upper stipe length			pre- 23.00 post- 22.00	6.96 5.48	0.18	0.51	0.62	

Table 28의 결과에서와 같이 *S. fulvellum*의 경우, 등분산검정은 원종묘와 동결종묘 두 집단의 분산이 동일한가를 검정하기 위한 결과로서, 모든 측정항목에서 유의확률값이 유의수준 0.05보다 크므로 두 집단의 분산이 동일하다는 가정을 기각할 수 없다는 것을 알 수 있다. 따라서 분산이 동일하다는 가설을 받아들이며, 이에 대한 조사항목별 T값을 구하였다. 또한, 평균의 동일성에 대한 유의확률이 유의수준 0.05보다 크므로 두 집단간의 평균값이 차이가 없다는 가설을 기각할 수 없다. 따라서 본 실험결과 *S. fulvellum* 원종묘와 동결종묘의 재배시 형태적 유의차는 없는 것으로 생각되어진다.

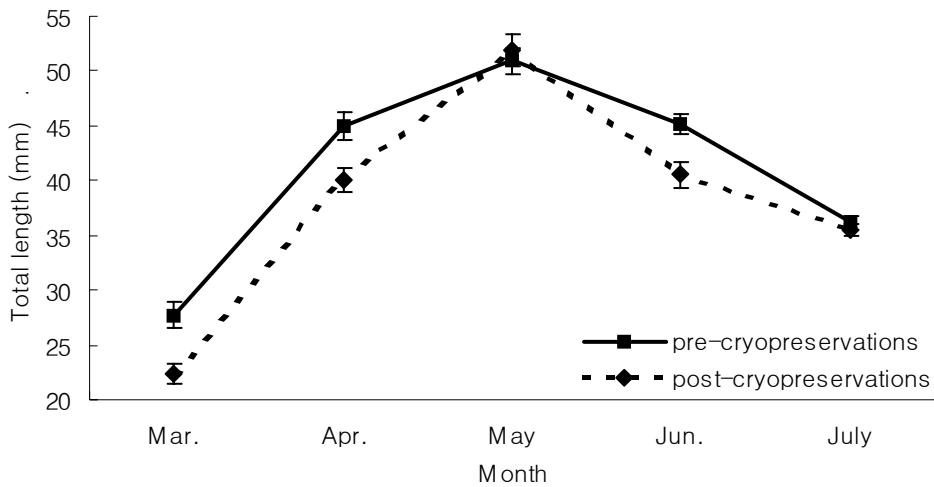


Fig. 36. Comparison of total length of the two groups of *Sagarssum fulvellum*.

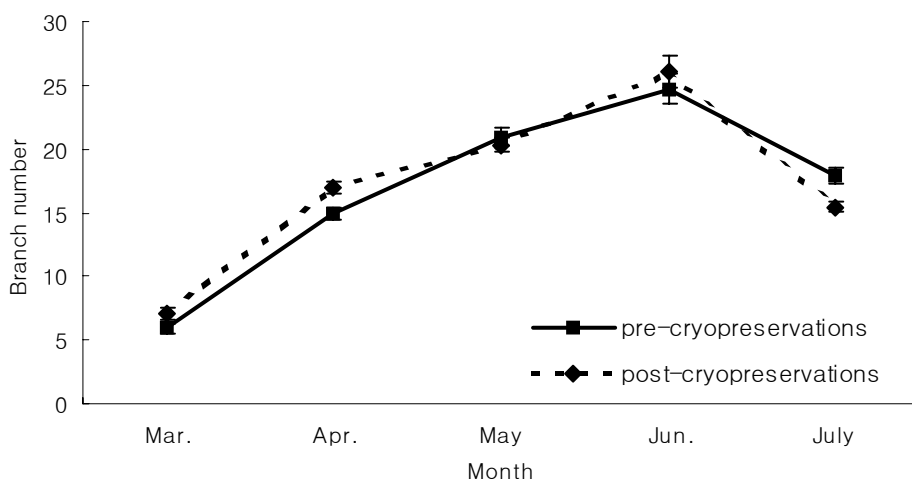


Fig. 37. Comparison of branch number of the two groups of *Sagarssum fulvellum*.

Table 28. Mean and standard deviation(SD) of pre- and post- cryopreservations of *Sagarssum fulvellum*

Species	Month	Trait	Mean	SD	Levene's test		T-test	
					P	t	P	
<i>S. fulvellum</i>	Mar.	Blade	pre-	24.37	5.67	0.58	1.46	0.15
		length	post-	22.40	4.75			
		branch	pre-	5.90	2.26	0.74	-1.87	0.07
		number	post-	7.03	2.43			
	Apr.	Blade	pre-	42.53	7.51	0.71	1.39	0.17
		length	post-	40.07	6.15			
		branch	pre-	15.70	2.87	0.79	-1.70	0.09
		number	post-	16.93	2.74			
	May	Blade	pre-	50.93	6.49	0.44	-0.53	0.60
		length	post-	51.90	7.55			
		branch	pre-	20.97	3.60	0.12	0.73	0.47
		number	post-	20.33	3.08			
	Jun.	Blade	pre-	42.60	5.93	0.56	1.26	0.21
		length	post-	40.57	6.54			
		branch	pre-	24.67	6.47	0.82	-0.84	0.40
		number	post-	26.10	6.73			
July	Blade	pre-	36.17	3.32	0.63	0.77	0.44	
	length	post-	35.53	3.01				
	branch	pre-	16.50	2.60	0.85	1.59	0.12	
	number	post-	15.47	2.45				

Table 29의 결과에서와 같이 *H. fusiforme*의 경우, 등분산검정은 원종묘와 동결종묘 두 집단이 분산이 동일한가를 검정하기 위한 결과로서, 4월 가지수에 대한 결과값과 5월 전장에 대한 결과값을 제외한 나머지의 결과 같이 유의확률값이 유의수준 0.05보다 크므로 두 집단의 분산이 동일하다는 가정을 기각할 수 없다는 것을 알 수 있다. 따라서 분산이 동일하다는 가설을 받아들이며, 이에 대한 조사항목별 T값을 구하였다. 또한, 평균의 동일성에 대한 유의확률이 유의수준 0.05보다 크므로 두 집단간의 평균값이 차이가 없다는 가설을 기각할 수 없다. 따라서 본 실험결과 *H. fusiforme* 원종묘와 동결종묘의 재배시 형태적 유의차는 없는 것으로 생각되어진다.

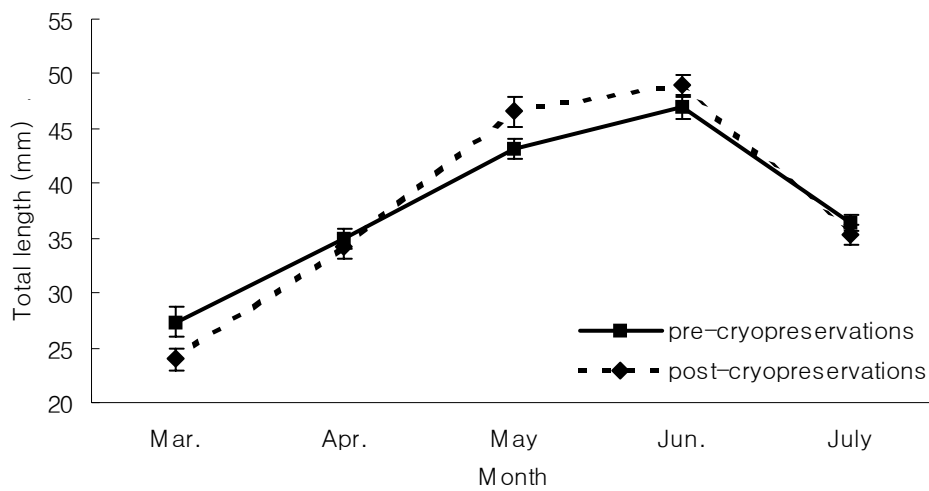


Fig. 38. Comparison of total length of the two groups of *Hizikia fusiforme*.

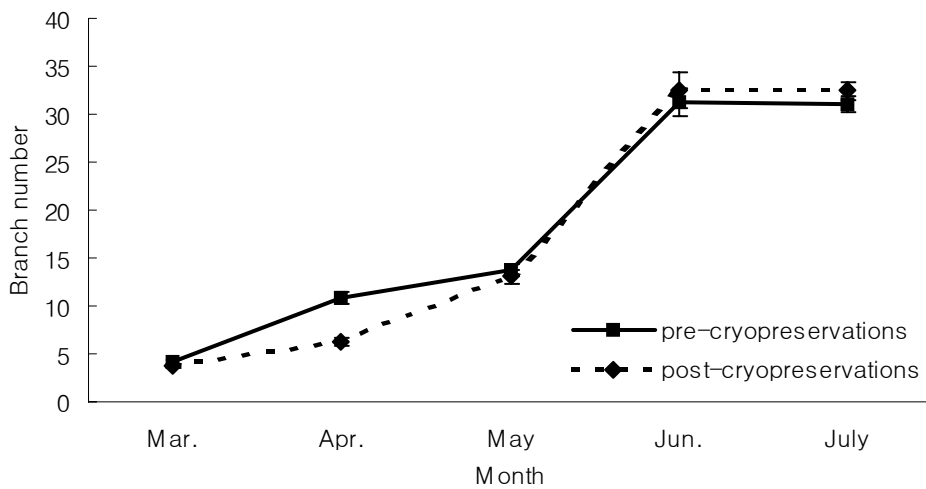


Fig. 39. Comparison of branch number of the two groups of *Hizikia fusiforme*.

Table 29. Mean and standard deviation(SD) of pre- and post- cryopreservations of *Hizikia fusiforme*

Species	Month	Trait	Mean	SD	Levene's test	T-test		
					P	t	P	
<i>H. fusiforme</i>	Mar.	Blade	pre-	27.37	7.87	0.07	1.98	0.05
		length	post-	23.93	5.30			
		branch	pre-	4.17	1.56	0.29	1.07	0.29
		number	post-	3.77	1.33			
	Apr.	Blade	pre-	35.00	5.03	0.11	0.50	0.62
		length	post-	34.27	6.20			
		branch	pre-	10.80	3.71	0.03	5.56	0.000
		number	post-	6.30	2.56			
	May	Blade	pre-	44.17	4.84	0.03	-2.07	0.04
		length	post-	46.57	7.60			
		branch	pre-	13.83	3.50	0.33	0.75	0.46
		number	post-	13.10	4.05			
	Jun.	Blade	pre-	46.90	5.63	0.86	-1.53	0.13
		length	post-	48.97	4.82			
		branch	pre-	31.30	8.12	0.05	-0.49	0.62
		number	post-	32.50	10.55			
	July	Blade	pre-	36.40	4.10	0.36	0.93	0.36
		length	post-	35.33	4.79			
		branch	pre-	31.07	4.56	0.87	-1.09	0.28
		number	post-	32.40	4.92			

가시파래의 경우 동결전·후의 비교배양실험 결과 Fig. 40, 41에서와 같이 월별 엽장(blade length)과 엽폭(blade width)의 성장이 거의 동일하게 나타났으며, 이 결과 유의차( $P > 0.05$ )가 없는 것으로 검정되었다. 월별 성장도 역시 두 종 모두 2월중 엽장과 엽폭이 가장 높게 나타났다.

또한, 엽체의 모양 역시 동결전·후의 형태적인 차이점을 찾아 볼 수 없었다.

각 종별 형태적 비교분석은 T-검정을 통한 동결전·후의 두 집단간의 측정항목별 평균, 표준오차, Levene의 등분산검정을 통한 유의확률을 구하여 두 집단간 분산의 동일 여부를 확인하고, 등분산이 가정되는 경우 평균의 동일성에 대한 T-값과 양집단의 평균에 대한 유의확률을 구하였다. 이때 신뢰구간은 95% 기준하였다.

Table 30의 결과에서와 같이 가시파래의 경우, 등분산검정은 동결전·후 두 집단의 분산이 동일한가를 검정하기 위한 결과로서, 모든 측정항목에서 유의확률값이 유의수준 0.05보다 크므로 두 집단의 분산이 동일하다는 가정을 기각할 수 없다는 것을 알 수 있다. 따라서 분산이 동일하다는 가설을 받아들이며, 이에 대한 조사항목별 T값을 구하였다. 또한, 평균의 동일성에 대한 유의확률이 유의수준 0.05보다 크므로 두 집단간의 평균값이 차이가 없다는 가설을 기각할 수 없다. 따라서 본 실험결과 가시파래의 동결전·후 재배시 형태적 유의차는 없는 것으로 생각되어진다.

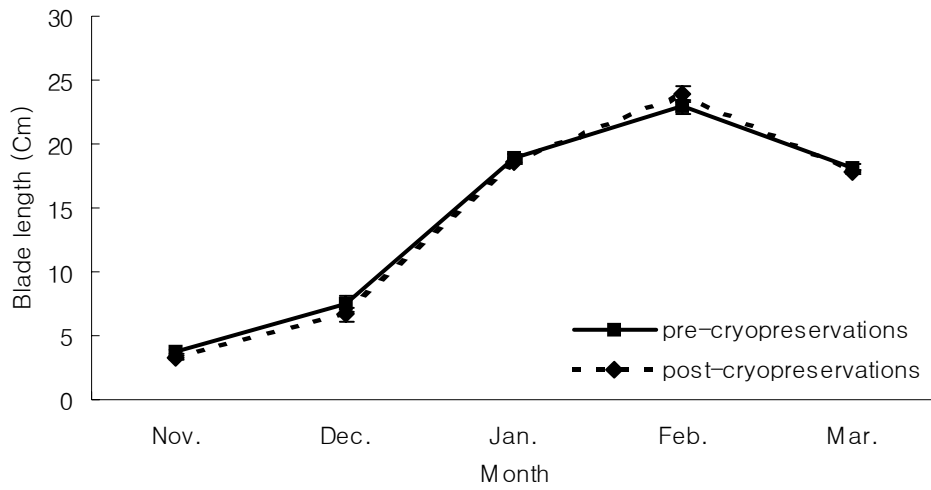


Fig. 40. Comparison of blade length of the two groups of *Enteromorpha prolifera*.

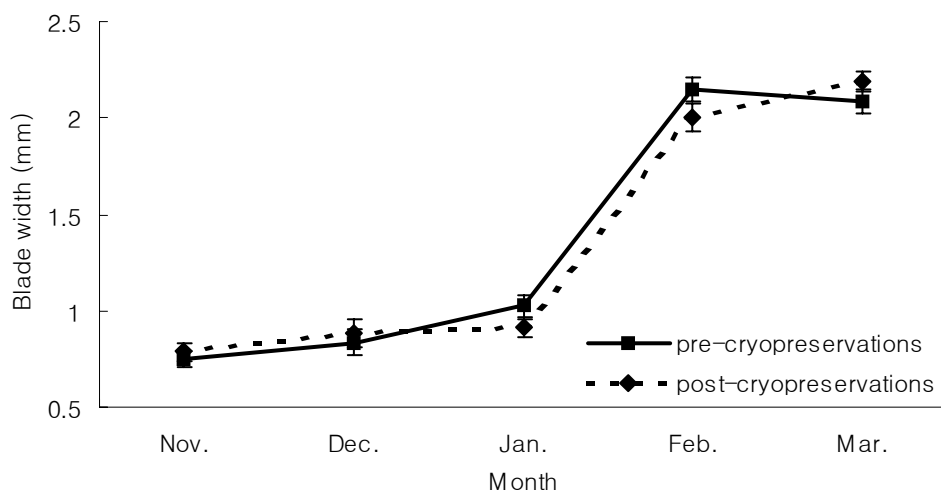


Fig. 41. Comparison of blade width of the two groups of *Enteromorpha prolifera*.



Table 30. Mean and standard deviation(SD) of pre- and post- cryopreservations of *Enteromorpha prolifera*

Species	Month	Trait	Mean	SD	Levene's test	T-test		
					P	t	P	
<i>E. prolifera</i>	Nov.	Blade length (cm)	pre-	3.74	0.84	0.44	2.07	0.43
			post-	3.26	0.96			
		Blade width (mm)	pre-	0.75	0.24	0.83	-0.57	0.57
			post-	0.79	0.25			
	Dec.	Blade length	pre-	7.49	3.24	0.46	1.01	0.32
			post-	6.66	3.11			
		Blade width	pre-	0.84	0.36	0.64	-0.49	0.63
			post-	0.88	0.38			
	Jan.	Blade length	pre-	18.98	1.25	0.91	1.08	0.29
			post-	18.62	1.30			
		Blade width	pre-	1.03	0.32	0.12	1.61	0.11
			post-	0.91	0.24			
	Feb.	Blade length	pre-	22.92	3.06	0.15	-1.19	0.24
			post-	23.93	3.53			
		Blade width	pre-	2.14	0.34	0.44	1.42	0.16
			post-	2.01	0.40			
Mar.	Blade length	pre-	18.19	1.26	0.20	1.37	0.18	
		post-	17.80	0.89				
	Blade width	pre-	2.09	0.34	0.14	-1.30	0.20	
		post-	2.19	0.27				

청각의 경우 동결전·후의 비교배양실험 결과 Fig. 42, 43에서와 같이 월별 엽장(blade length)과 가짓수(branch number)의 성장이 거의 동일하게 나타났으며, 이 결과 유의차 ( $P > 0.05$ )가 없는 것으로 검정되었다. 월별 성장도 역시 두종 모두 6월중 엽장과 가짓수가 가장 높게 나타났다.

또한, 엽체의 모양 역시 동결전·후 형태적인 차이점을 찾아 볼 수 없었다.

Table 31의 결과에서와 같이 청각의 경우, 등분산검정은 동결전·후의 두 집단의 분산이 동일한가를 검정하기 위한 결과로서, 모든 측정항목에서 유의확률값이 유의수준 0.05보다 크므로 두 집단의 분산이 동일하다는 가정을 기각할 수 없다는 것을 알 수 있다. 따라서 분산이 동일하다는 가설을 받아들이며, 이에 대한 조사항목별 T값을 구하였다. 또한, 평균의 동일성에 대한 유의확률이 유의수준 0.05보다 크므로 두 집단간의 평균값이 차이가 없다는 가설을 기각할 수 없다. 따라서 본 실험결과 청각의 동결전·후 재배시 형태적 유의차는 없는 것으로 생각되어진다.

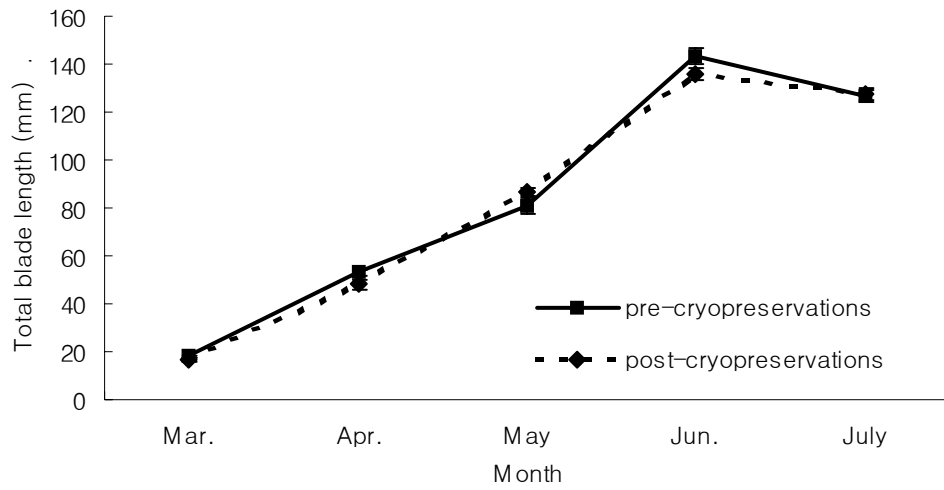


Fig. 42. Comparison of total blade length of the two groups of *Codium fragile*.

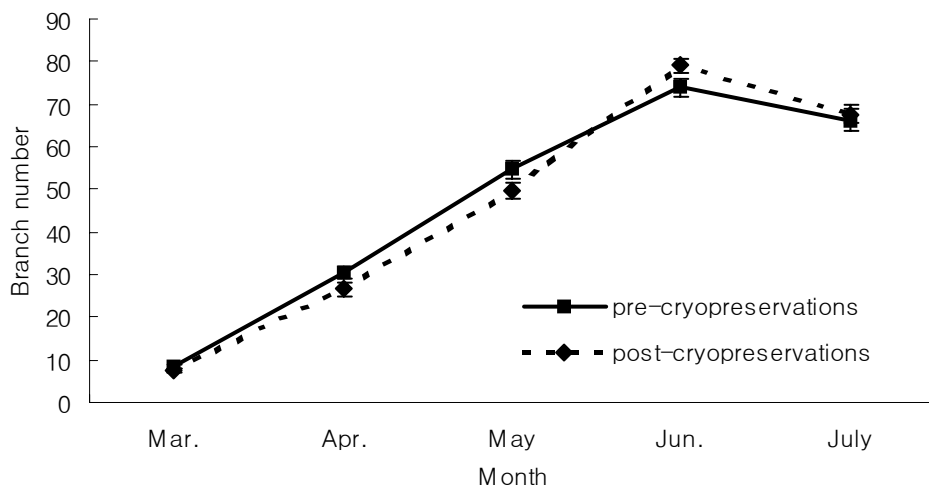


Fig. 43. Comparison of branch number of the two groups of *Codium fragile*.

Table 31. Mean and standard deviation(SD) of pre- and post- cryopreservations of *Codium fragile*

Species	Month	Trait	Mean	SD	Levene's test		T-test	
					P	t	P	
<i>C. fragile</i>	Mar.	Blade length (mm)	pre-	18.13	2.54	0.92	2.13	0.04
			post-	16.70	2.67			
		branch number	pre-	8.23	2.52	0.21	1.23	0.22
			post-	7.53	1.81			
	Apr.	Blade length	pre-	53.17	6.61	0.06	2.47	0.02
			post-	47.97	9.40			
		branch number	pre-	30.40	8.28	0.77	1.80	0.08
			post-	26.57	8.19			
	May	Blade length	pre-	80.97	17.13	0.36	-1.60	0.11
			post-	86.63	8.99			
		branch number	pre-	54.70	10.81	0.57	1.93	0.06
			post-	49.50	10.07			
	Jun.	Blade length	pre-	143.37	16.65	0.56	2.02	0.05
			post-	135.70	12.46			
branch number		pre-	73.93	11.04	0.18	-2.03	0.05	
		post-	79.20	8.97				
July	Blade length	pre-	126.87	16.94	0.08	-0.12	0.91	
		post-	127.30	11.77				
	branch number	pre-	66.30	14.64	0.63	-0.41	0.68	
		post-	67.73	12.26				

## 제 2 절 동결보존 종묘와 원 종묘의 유전적 비교검증

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 유전적검증

RAPD 분석 : 각각의 해조류 샘플은 채취하여 , ice box에 넣어 실험실로 운반한 다음 이물질 제거를 위하여 여과해수에 5회, 미생물 살균을 위해 70%알콜에 2회, DNA추출시 저해 요인인 염제거를 위해 증류수로 3회 세척한 후  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관한다.

시료의 조직을 액체질소가 든 막자사발에서 분쇄한 후 microtube에 샘플 50~100 mg 을 정량하여 넣고  $2 \times$  CTAB buffer를  $500\mu\text{l}$ 첨가하여  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 30분 반응한 후 2-mercaptoethanol를  $10\mu\text{l}$ 첨가  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 다시 30분간 반응시킨다. tube를 꺼내어 상온이 되도록 식힌 후 Phenol/Chloroform(25:1)을 1 Volum첨가하여 15,000 rpm으로 상온에서 5분간 원심분리 하고 다시 Chloroform/Isoamyl alcohol(24:1)을 Volum첨가하여 15,000rpm으로 상온에서 5분간 원심분리하여 당분과 단백질을 제거한 후 상등액에 10M ammonium acetate  $10\mu\text{l}$ 와  $-20^{\circ}\text{C}$ , 100% EtOH를 2 Volum첨가하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 방치한 후 15,000 rpm으로  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 원심분리하여 DNA를 침전시킨 후  $-20^{\circ}\text{C}$ , 70% EtOH로 세정한 후 15,000rpm으로  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 원심분리하여 다시 DNA를 침전하여  $25\mu\text{l}$  3차멸균증류수 또는 TE buffer에 녹여서  $4^{\circ}\text{C}$ 에 보관한다(Fig. 44).

20가지로 된 10-mer arbitrary primer, Kits A, B, C (Operon Technologies Inc., California)중에서 60가지의 primer을 이용하여 PCR반응을 한다.

$20\mu\text{l}$ 의 PCR반응액은 Premix-Top(Bioneer)을 사용하여  $1\mu\text{l}$ 의 template DNA( $3\text{ng}/\mu\text{l}$ ),  $1\mu\text{l}$ 의 primer( $5\text{pM}/\mu\text{l}$ )와 3차멸균증류수  $18\mu\text{l}$ 첨가하여 구성하며 GeneAmp PCR System 9700(Perkin-Elmer Applied Biosystems)를 사용하여  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 1회 denature 한 후,  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 30초간 denature,  $34^{\circ}\text{C}$ 에서 30초간 annealing,  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 30초간 extension을 35회 실시하고 나서, 최종  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 extension한다.

PCR 증폭산물은 1% agarose gel에서 100V, 30분간 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 UV transilluminator 위에서 육안으로 확인 후 667 film Kodak Polaroid 카메라로 촬영한다(Fig. 45).

**Thalli 100 mg**  
↓ rinse TE buffer (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0)  
**2 × CTAB buffer**  
↓ 500  $\mu$ l, 60°C, 30 min.  
**2-mercaptoethanol**  
↓ 10  $\mu$ l, 60°C, 30 min.  
**Phenol/Chloroform (25:1)**  
↓ 15,000 rpm, 4°C, 3min. centrifuge  
**Chloroform/Isoamyl alcohol (24:1)**  
↓ 15,000 rpm, 4°C, 3min. centrifuge  
**0.1 volume 3M Sodium acetate**  
**2 volume 100% EtOH adding**  
↓ -20°C, 30 min. incubation  
**DNA precipitation**  
↓ 15,000 rpm, 4°C, 15min. centrifuge  
**Washing (500 $\mu$ l 70% EtOH adding)**  
↓ 15,000 rpm, 4°C, 5min. centrifuge  
**Air dry**  
↓  
**DNA pellet extraction**  
(solution:TE buffer)

Fig. 44. The process of DNA extraction from algae.

## PCR

↓ 20  $\mu$ l Premix-Top(Bioneer)  
+ 1  $\mu$ l template DNA(3 ng/ $\mu$ l),  
1  $\mu$ l primer(5 pM/ $\mu$ l), DDW 18  $\mu$ l

## Denaturation

↓ 94°C, 5 minute, one time

## Denaturation

↓ 94°C, 30 seconds

## Annealing

↓ 34°C, 30 seconds 35cycles

## Extension

↓ 72°C, 30 seconds

## Extension

↓ 72°C, 5 minute, one time

## Electrophoresis

↓ 1% agarose gel

## Loading

↓ sample, 6×loading buffer  
(0.25% bromophenol blue, 0.25% xylen cyanol  
FF, 30% glycerol in water)

## Ethidium bromide staining

↓ 0.5  $\mu$ l/100ml

## Band confirmation

Fig. 45. The process of RAPD-PCR of algae.

## 나. 초미세 구조관찰

전자현미경 : 신선한 엽체를 1변 약 3~4mm크기의 입방체 4~5 엽편을 잘라서 칭량병 또는 10ml정도의 샘플병에 넣어 2.5% 글루타르알데하이드용액(용매인산완충액(2.76%인산1나트륨수용액과 2.84%인산2나트륨수용액을 1:4로한 혼합액, pH 약 7.2)에 1/4몰이 되도록 자당을 첨가한 것)을 넣어 4~5℃의 냉장고에서 2~3시간 고정한다. 고정할 때 쓴 것과 같은 인산완충액으로 시료를 5회 세정한다. 처음에는 자당을 1/4몰이 되도록 첨가한 완충액을 쓰고 두 번째는 1/8몰, 세 번째는 1/16몰, 네 번째와 다섯 번째는 자당이 함유되어있지 않은 완충액으로 세정한다. 세정시간은 각각 10분간이고 4~5℃에서 한다. 세정을 끝낸 시료를 1~2% 오스뮴산수용액(고정할 때 쓴 것과 같은 완충액을 용매로 해서 만듦)에서 암조건으로 1시간고정하며, 4~5℃에서 행한다. 50, 75, 90, 95% 에탄올에 각각 15분간 시료를 넣어 탈수한 후 100%에탄올에서 30분간 프로필렌옥사이드로 1시간 탈수하며, 4~5℃에서 행한다. 프로필렌옥사이드 1:에폭시수지1의 혼합액에 하룻밤 시료를 넣고, 다시 에폭시수지로 하룻 동안(이사이에 적어도 한번은 수지를 갈아줌)넣어 시료에 수지를 잘 침투시킨다. 수용성수지를 사용할 경우 탈수조작은 생략한다. 캡셀 또는 실리콘제의 포매판에 시료를 수지와 함께 넣어 처음 12시간은 37℃, 12시간은 50℃, 그 후 24시간은 60℃로 가열하여 중합시킨다. 캡셀 또는 포매판에 묻어진 시료는 미리 여분의 수지 부분을 제거한다. 1~3 $\mu$ m두께로 유리칼 또는 다이아몬드칼로 초박절편을 만든다. 슬라이딩마이크로톰 사용시는 시료를 절편작제 직전까지 60℃로 유지시킨다. 에탄올로 적신 가아제로 잘 닦은 슬라이드글래스에 절편을 증류수의 방울위에 띄어놓는다. 슬라이드글래스를 60~80℃의 열판위에서 수분을 증발시켜 절편을 슬라이드글래스위에 붙인다. 이때에 절편이 오그라들지 않게 주의한다. 절편을 첨부한 슬라이드글래스를 열판위에 놓은채 염색액을 적하한다. 2~3분 후에 절편위로 물을 흘려 세정한다. 시료가 없는 수지부분에 착색이 보이면 과도염색이며, 염색부족시에는 재염색한다. 시간을 들여도 염색이 잘 안될 경우는 염색전에 1~2% 과산화수소로 시료를 처리한다. 절편에 메스마크가 있을 경우에 에폭시수지를 봉입제로 사용하여 커버글라스로 덮어 관찰한다. 염색에 1~2% 톨루이딘 청염색액을 사용하여 영구 프레파라트로 한다.

## 다. 아미노산 분석

유리 · 구성아미노산 분석 : 참김 (*P. tenera*), 다시마 (*L. japonica*), 미역 (*U. pinnatifida*), 모자반 (*S. fulvellum*), 툫 (*H. fusiformis*), 가시파래 (*E. prolifera*), 청각 (*C. fragile*)의 원종묘와 동결종묘에 대해서 유리 · 구성아미노산분석을 실시하였다.



## 2. 결 과

### 가. 유전적 검증

홍조류(김과래목)에서 참김(*P. tenera*), 방사무늬김(*P. yezoensis*), 잇바디돌김(*P. dentata*), 모무늬돌김(*P. seriata*)에 대해서 동결보존 전과 후에 RAPD변이 분석을 한 결과 Fig. 46과 47에서 보는 바와 같이 동결보존 전과 후에 차이는 없었다.

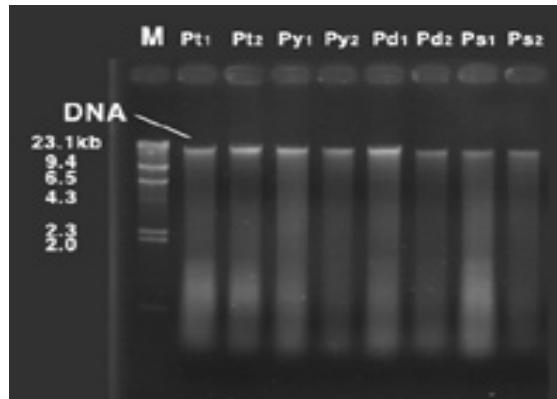


Fig. 46. Genome DNA of 4 species of *Porphyra*.

M :  $\lambda$ DNA/HindIII, Pt1 : pre-cryopreservation of *P. tenera*, Pt2 : post-cryopreservation of *P. tenera*, Py1 : pre-cryopreservation of *P. yezoensis*, Py2 : post-cryopreservation of *P. yezoensis*, Pd1 : pre-cryopreservation of *P. dentata*, Pd2 : post-cryopreservation of *P. dentata*, Ps1 : pre-cryopreservation of *P. seriata*, Ps2 : post-cryopreservation of *P. seriata*.

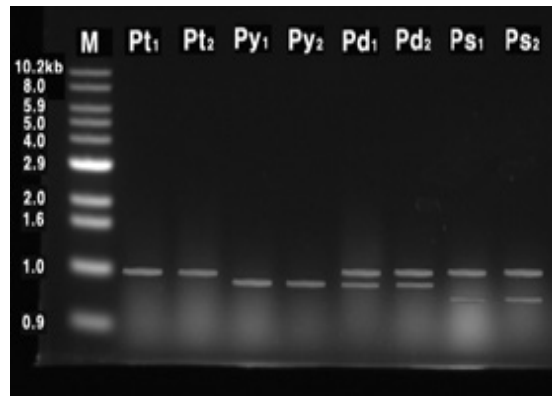


Fig. 47. RAPD-PCR patterns of 4 species of *Porphyra*.

M :  $\lambda$ DNA/HindIII, Pt1 : pre-cryopreservation of *P. tenera*, Pt2 : post-cryopreservation of *P. tenera*, Py1 : pre-cryopreservation of *P. yezoensis*, Py2 : post-cryopreservation of *P. yezoensis*, Pd1 : pre-cryopreservation of *P. dentata*, Pd2 : post-cryopreservation of *P. dentata*, Ps1 : pre-cryopreservation of *P. seriata*, Ps2 : post-cryopreservation of *P. seriata*.

### 나. 세포의 초미세 구조관찰

홍조류(김과래목)에서 참김(*P. tenera*), 방사무늬김(*P. yezoensis*), 모무늬돌김(*P. seriata*)에

대해서 동결보존 전과 후의 조체를 투과전자현미경(TAM)을 이용하여 세포내 미세구조를 관찰하였으며(Fig. 48~Fig. 50), 갈조류(다시마목)에서 다시마(*L. japonica*), 미역(*U. pinnatifida*) 과 녹조류(갈파래목)에서 가시파래(*E. prolifera*), 청각(*M. nitidum*)에 대해서 세포내 미세구조를 관찰하였다(Fig. 51~Fig. 56).

본 연구결과 동결전후 조체의 투과전자현미경 사진에서와 같이 엽록체, 핵, 미토콘드리아, 피레노이드, 전분 등과 같은 세포소기관이 관찰되었다. 동결전후 조체의 미세구조에 차이는 없는 것으로 보인다.

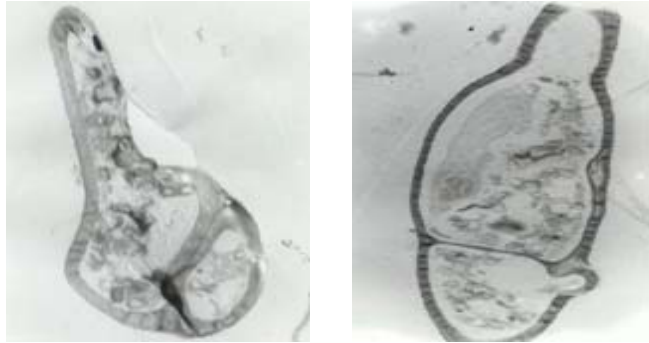


Fig.48. Ultrastructure of pre-(left) and post-(right) cryopreservations of *Porphyra tenera*.

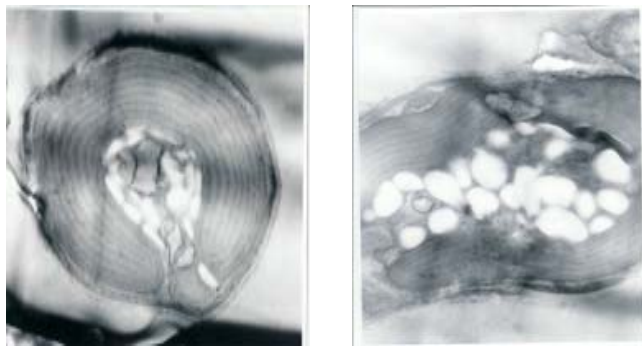


Fig.49. Ultrastructure of pre-(left) and post-(right) cryopreservations of *Porphyra yezoensis*.

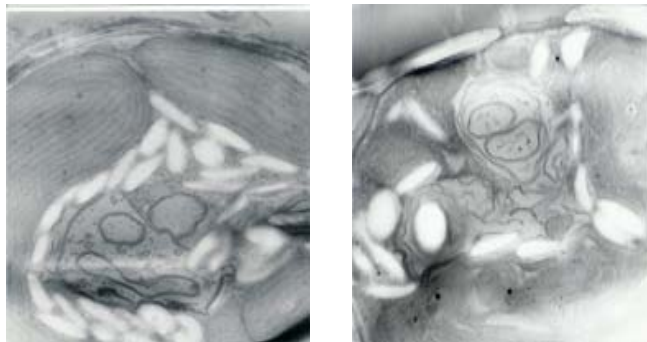


Fig.50. Ultrastructure of pre-(left) and post-(right) cryopreservations of *Porphyra seriata*.

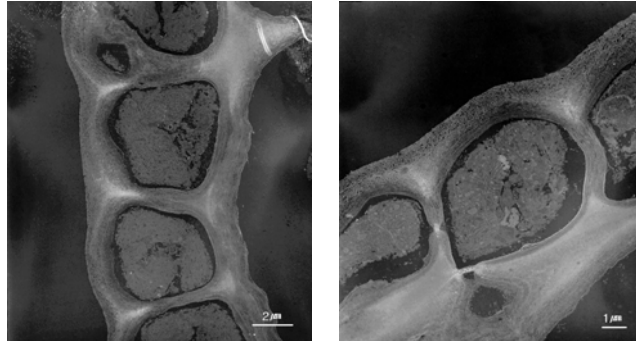


Fig. 51. Ultrastructure of pre-(left) and post-(right) cryopreservations of *Laminaria japonica*.

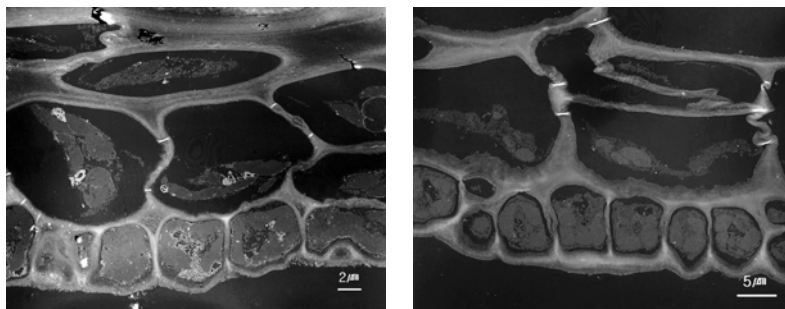


Fig. 52. Ultrastructure of pre-(left) and post-(right) cryopreservations of *Undaria pinnatifida*.

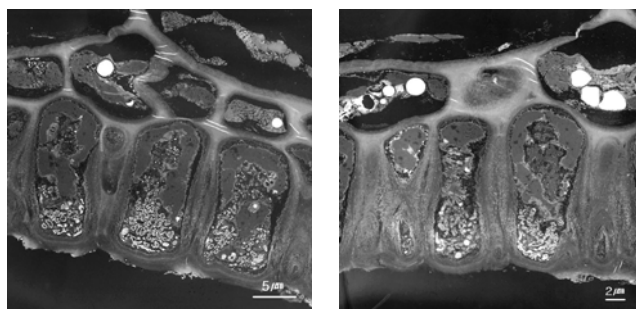


Fig. 53. Ultrastructure of pre-(left) and post-(right) cryopreservations of *Sargassum fulvellum*.

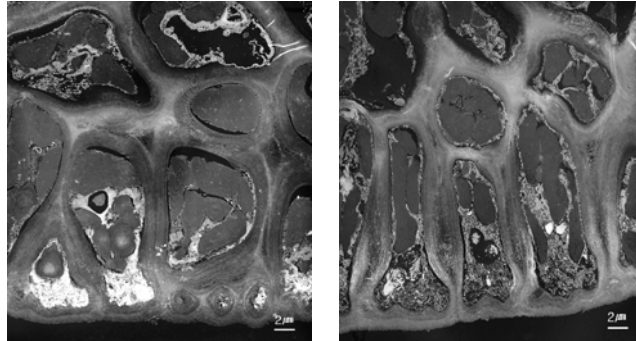


Fig. 54. Ultrastructure of pre-(left) and post-(right) cryopreservations of *Hizikia fusiforme*.

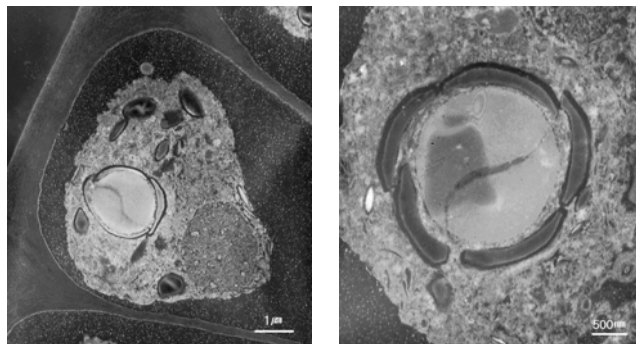


Fig. 55. Ultrastructure of pre-(left) and post-(right) cryopreservations of *Enteromorpha prolifera*.

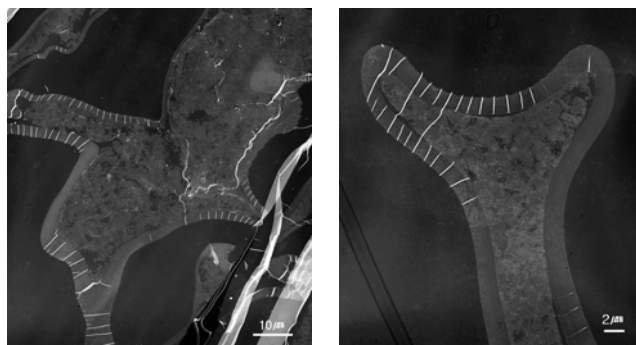


Fig. 56. Ultrastructure of pre-(left) and post-(right) cryopreservations of *Codium fragile*.

#### 다. 일반성분 및 유리·구성아미노산의 조성

본 실험에서 사용한 참김의 동결전·후의 일반성분은 Fig. 57과 같다. 참김은 Moisture 함량이 동결전에서는 74.4%, 동결후에는 73.7%로 나타났고, Protein, Ash, Lipid의 순으로 나타났다.

동결전·후의 유리아미노산의 조성은 Figure 58와 같이 나타났다. 시료 100g 중에 분포하는 각 유리아미노산의 조성을 살펴보면 동결전과 후 모두에서 Taurine, Alanine, Glutamic acid, Ammonia 순으로 두 조건 모두 다른 성분들 보다 높게 나타났음을 알 수 있다. 또한, 결과에서 보는 바와 같이 Taurine에서 201.6 mg/100g과 190.7 mg/100g, Alanine에서 200.4 mg/100g과 193.6 mg/100g으로 10.9 mg/100g과 6.8 mg/100g 차이로 약간의 차이를 보였으나, 유의차가 나타나진 않았다.

구성아미노산조성은 Taurine, Glycine, Valine, Alanine 순으로 동결전후 시료에서 모두 같이 다소 높게 나타났다(Fig. 59). Taurine과 Glycine에서 각각 2146.6 mg/100g과 2159.7 mg/100g, 1795.5 mg/100g과 1778.6 mg/100g으로 13.1 mg/100g과 16.9 mg/100g 로 나타났으며, 대부분의 성분에서 유의차가 나타나지 않았다.

따라서, 본 결과에서와 같이 동결전과 동결후의 재배중에 대하여 일반성분분석과 유리·구성아미노산의 조성에 있어 큰 차이점이 없는 것으로 생각되어진다.

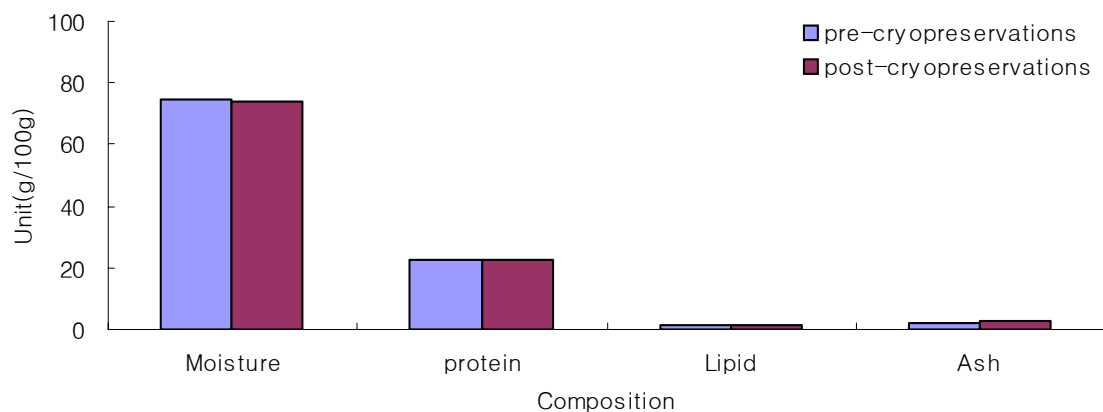


Fig. 57. Contents of Proximate components of *Porphyra tenera*.

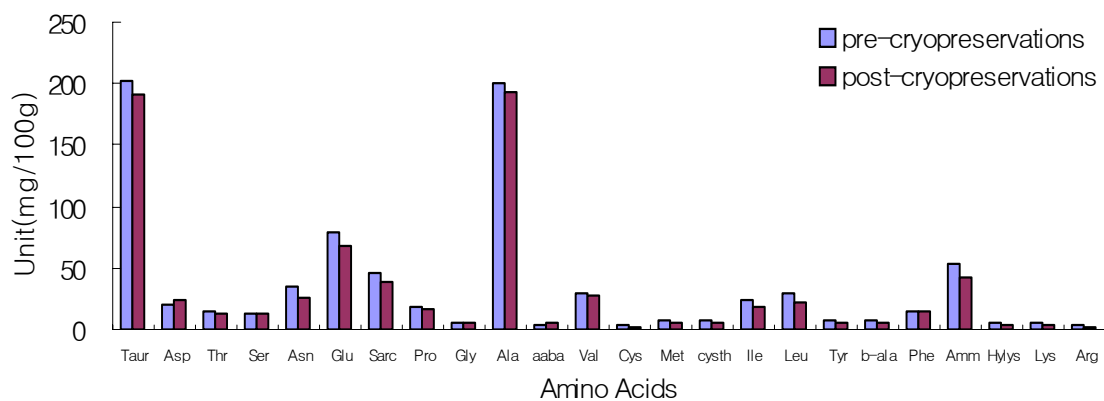


Fig. 58. Contents of free amino acids of *Porphyra tenera*.

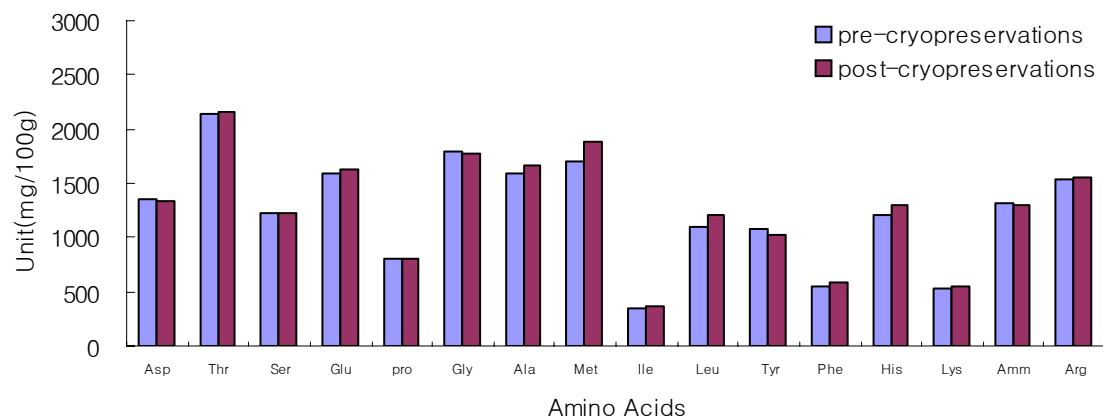


Fig. 59. Contents of total amino acids of *Porphyra tenera*.

본 실험에서 사용한 다시마의 동결전·후의 일반성분은 Fig. 60과 같다. 다시마는 Moisture 함량이 동결전에서는 73.6%, 동결후에는 73.3%로 거의 같게 나타났고, Protein, Ash, Lipid의 두구간 모두 같은 순으로 나타났다.

동결전·후의 유리아미노산의 조성은 Figure 61와 같이 나타났다. 시료 100g 중에 분포하는 각 유리아미노산의 조성을 살펴보면 동결전과 후 모두에서 Alanine, Taurine, Glutamic acid, Ammonia 순으로 두 조건 모두 다른 성분들 보다 높게 나타났음을 알 수 있다. 또한, 결과에서 보는 바와 같이 Alanine에서 193.6 mg/100g과 193.5 mg/100g, Taurine에서 190.6 mg/100g과 190.4 mg/100g으로 0.1 mg/100g과 0.2 mg/100g으로 거의 같은 양의 조성을 보였다.

구성아미노산조성은 Glutamic acid, Alanine, Lysine순으로 동결전후 시료에서 모두 같이 다소 높게 나타났다(Fig. 62). Glutamic acid과 Alanine에서 각각 2326.4 mg/100g과 2510.5 mg/100g, 2569.7 mg/100g과 2333.7 mg/100g으로 184.1 mg/100g과 236mg/100g의 약간의 유의차를 보였다.

따라서, 본 결과에서와 같이 동결전과 동결후의 재배중에 대하여 일반성분분석과 유리아미노산의 조성에서는 유의차를 보이지 않았으나, 구성아미노산의 조성량에 있어서 약간의 유의차가 나타났음을 알 수 있다. 그러나, 구성아미노산의 경우 성분에 있어서는 동결전후 모두 같은 것으로 나타났다.



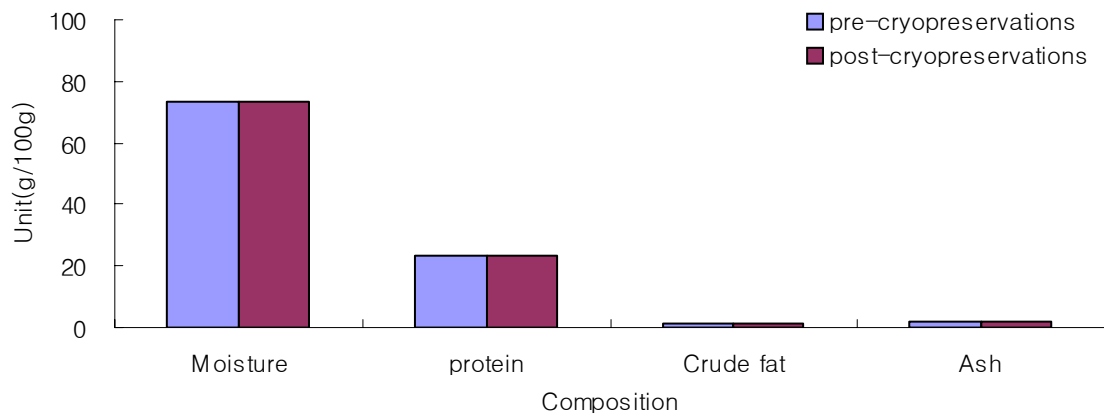


Fig. 60. Contents of Proximate components of *Laminaria japonica*.

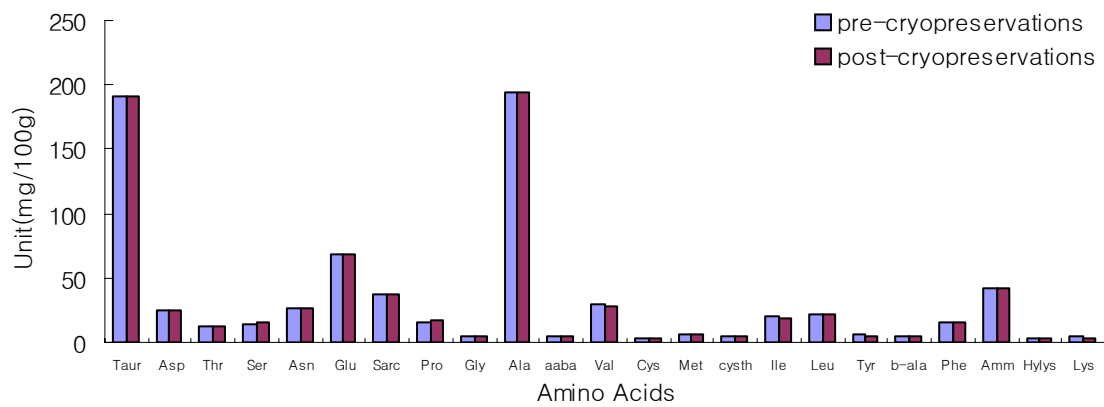


Fig. 61. Contents of free amino acids of *Laminaria japonica*.

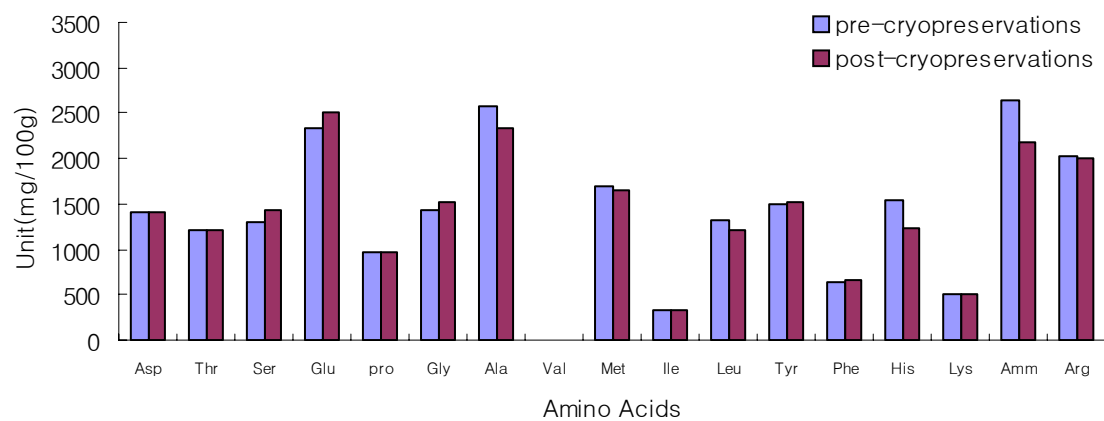


Fig. 62. Contents of total amino acids of *Laminaria japonica*.

본 실험에서 사용한 미역의 동결전·후의 일반성분은 Fig. 63과 같다. 미역은 Moisture 함량이 동결전에서는 73.9%, 동결후에는 74.0%로 거의 같게 나타났고, Protein, Ash, Lipid의 두구간 모두 같은 순으로 나타났다.

동결전·후의 유리아미노산의 조성은 Figure 64와 같이 나타났다. 시료 100g 중에 분포하는 각 유리아미노산의 조성을 살펴보면 동결전과 후 모두에서 Alanine, Taurine, Glutamic acid, Ammonia 순으로 두 조건 모두 다른 성분들 보다 높게 나타났음을 알 수 있다. 또한, 결과에서 보는 바와 같이 Alanine에서 204.7 mg/100g과 186.3 mg/100g, Taurine에서 200.9 mg/100g과 194.3 mg/100g으로 18.4 mg/100g과 6.6 mg/100g의 차이를 나타냈으며, Alanine에서 약간의 유의차를 보였으나, 대부분의 성분들에서는 유의차가 나타나진 않았다.

구성아미노산조성은 Ammonia, Alanine, Arginine, Lycine 순으로 동결전후 시료에서 모두 같이 다소 높게 나타났다(Fig. 65). Ammonia와 Alanine에서 각각 1644.3 mg/100g과 1687.1 mg/100g, 1383.2 mg/100g과 1442.7 mg/100g으로 42.8 mg/100g과 59.5 mg/100g의 차이를 보여 유의차는 나타나지 않았다.

따라서, 본 결과에서와 같이 동결전과 동결후의 재배종에 대하여 유리아미노산의 Alanine에서 약간의 차이를 보였을 뿐, 대부분의 일반성분분석과 유리·구성아미노산의 조성에 있어 큰 차이점이 없는 것으로 나타났다.

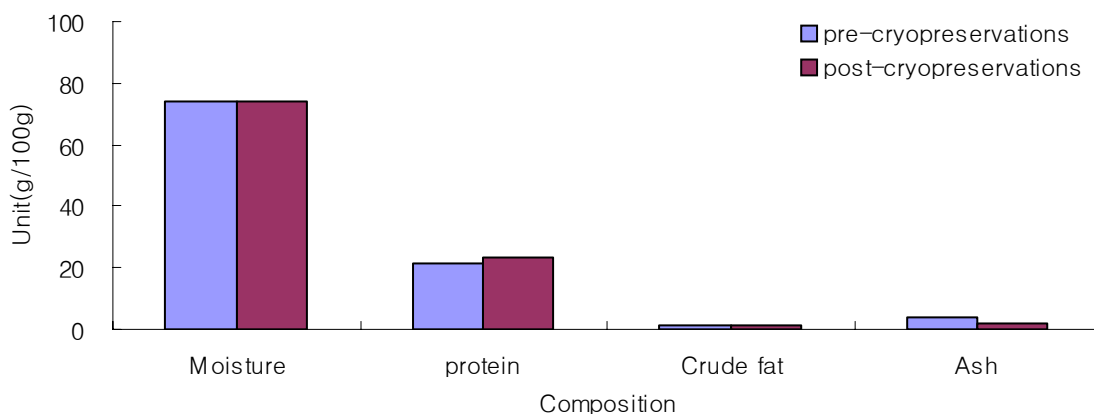


Fig. 63. Contents of Proximate components of *Undaria pinnatifida*.

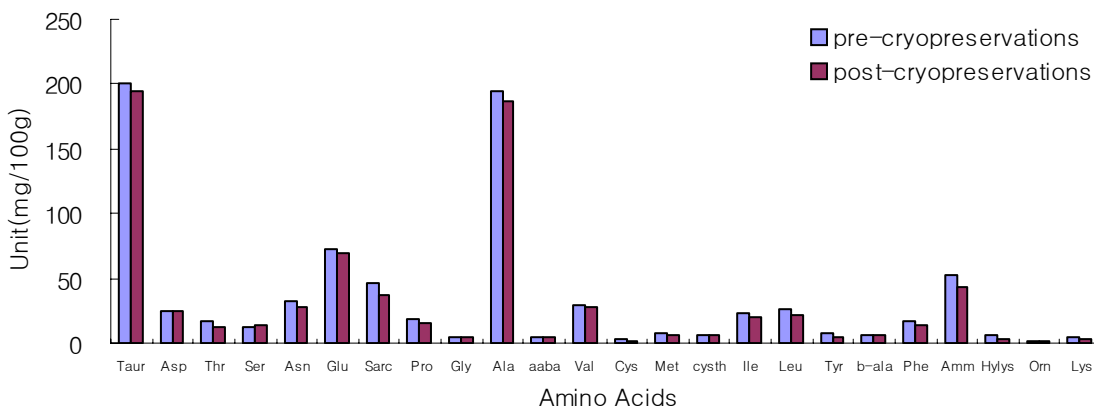


Fig. 64. Contents of free amino acids of *Undaria pinnatifida*.

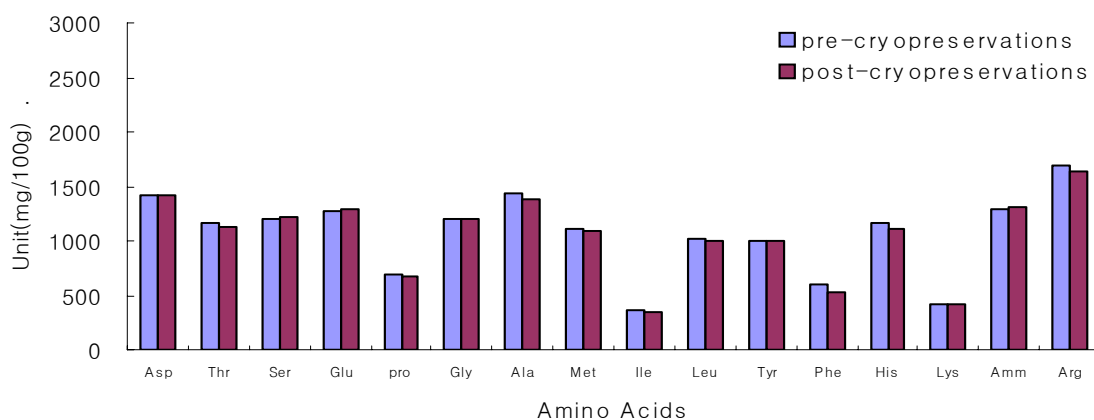


Fig. 65. Contents of total amino acids of *Undaria pinnatifida*.

본 실험에서 사용한 모자반의 동결전·후의 일반성분은 Fig. 66과 같다. 모자반은 Moisture 함량이 동결전에서는 74.8%, 동결후에는 74.4%로 거의 같게 나타났고, Protein, Ash, Lipid의 두구간 모두 같은 순으로 나타났다.

동결전·후의 유리아미노산의 조성은 Figure 67와 같이 나타났다. 시료 100g 중에 분포하는 각 유리아미노산의 조성을 살펴보면 동결전과 후 모두에서 Alanine, Taurine, Glutamic acid, Ammonia 순으로 두 조건 모두 다른 성분들 보다 높게 나타났음을 알 수 있다. 또한, 결과에서 보는 바와 같이 Alanine에서 260.2 mg/100g과 260.2 mg/100g, Taurine에서 200.8 mg/100g과 201.5 mg/100g으로 유리아미노산의 조성에 있어 거의 유의차를 찾아 볼 수 없었다.

구성아미노산조성은 Alanine, Glutamic acid, Lysine 순으로 동결전후 시료에서 모두 같이 다소 높게 나타났다(Fig. 68). Alanine, Glutamic acid에서 각각 2085.6 mg/100g과 2212.8 mg/100g, 2083.8 mg/100g과 2054.2 mg/100g으로 127.2 mg/100g과 29.6 mg/100g 로 나타났으며, Alanine를 제외한 대부분의 성분에서는 유의차가 나타나지 않았다.

따라서, 본 결과에서와 같이 동결전과 동결후의 재배중에 대하여 일반성분분석과 유리·구성아미노산의 조성에 있어 큰 차이점이 없는 것으로 생각되어진다.

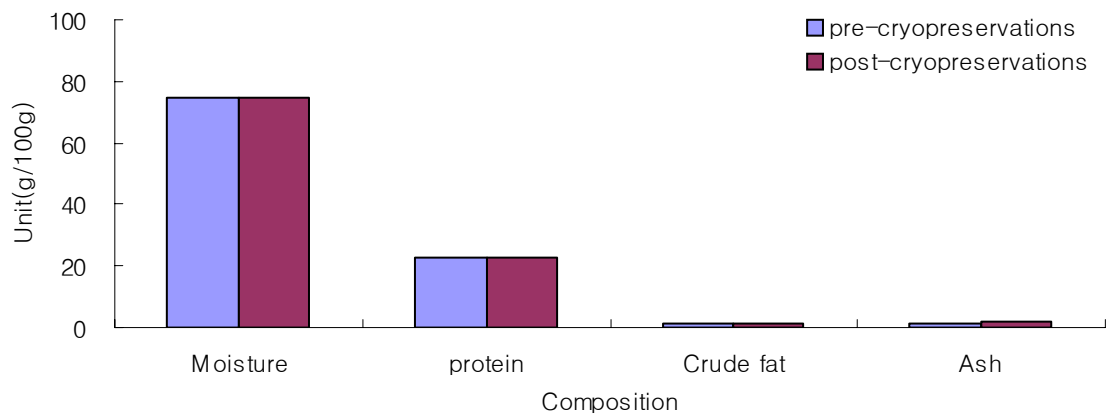


Fig. 66. Contents of Proximate components of *Sargassum fulvellum*.

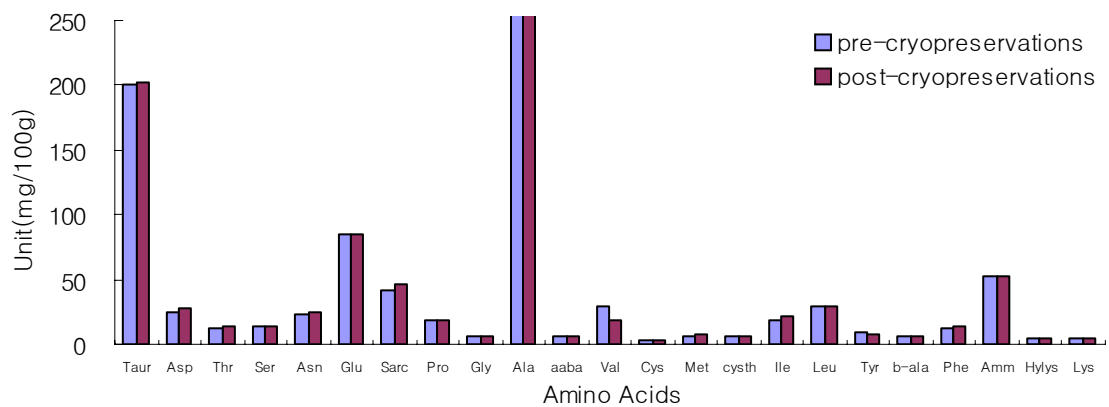


Fig. 67. Contents of free amino acids of *Sargassum fulvellum*.

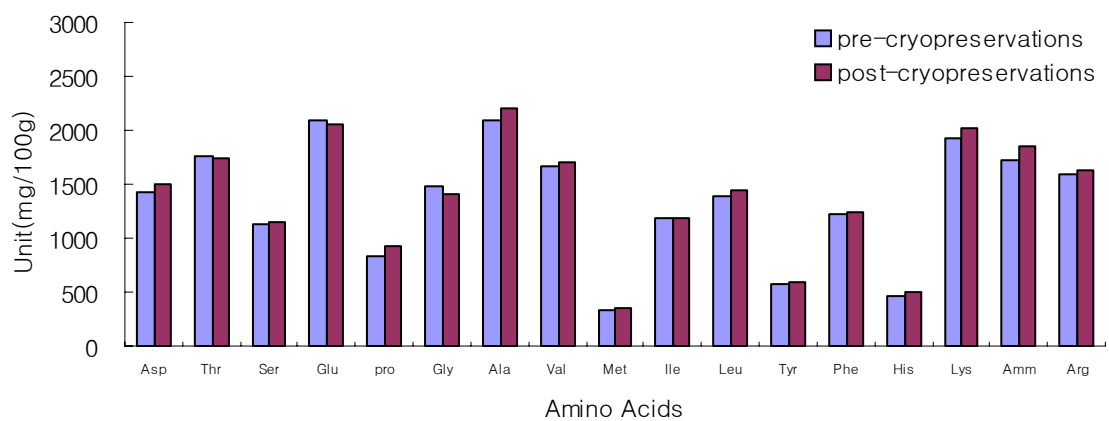


Fig. 68. Contents of total amino acids of *Sargassum fulvellum*.

본 실험에서 사용한 톳의 동결전·후의 일반성분은 Fig. 69과 같다. 톳은 Moisture 함량이 동결전에서는 81.1%, 동결후에는 79.8%로 거의 같게 나타났고, Protein, Ash, Lipid의 두 구간 모두 같은 순으로 나타났다.

동결전·후의 유리아미노산의 조성은 Figure 70와 같이 나타났다. 시료 100g 중에 분포하는 각 유리아미노산의 조성을 살펴보면 동결전과 후 모두에서 Taurine, Alanine, Glutamic acid, Ammonia 순으로 두 조건 모두 다른 성분들 보다 높게 나타났음을 알 수 있다. 또한, 결과에서 보는 바와 같이 Taurine에서 257.0 mg/100g과 263.6 mg/100g, Alanine에서 261.0 mg/100g과 259.9 mg/100g으로 6.6 mg/100g과 1.1 mg/100g 차이로 약간의 차이를 보였으나, 유의차가 나타나진 않았다.

구성아미노산조성은 Arginine, Valine, Aspartic acid, Glycine 순으로 동결전후 시료에서 모두 같이 다소 높게 나타났다(Fig. 71). Arginine과 Valine에서 각각 980.6 mg/100g과 892.2 mg/100g, 809.8 mg/100g과 713.1 mg/100g으로 88.4 mg/100g과 96.7 mg/100g 로 약간의 차이가 나타났다.

따라서, 본 결과에서와 같이 동결전과 동결후의 재배중에 대하여 일반성분분석과 유리아미노산의 조성에는 큰 차이점은 없었으나, 구성아미노산의 조성에 있어 약간의 차이 조성량의 차이가 나타났음을 알 수 있다.

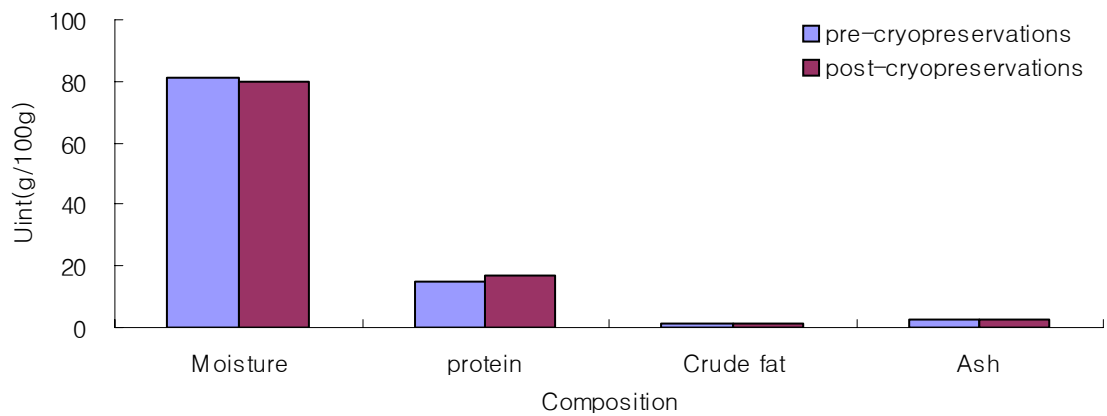


Fig. 69. Contents of Proximate components of *Hizikia fusiforme*.

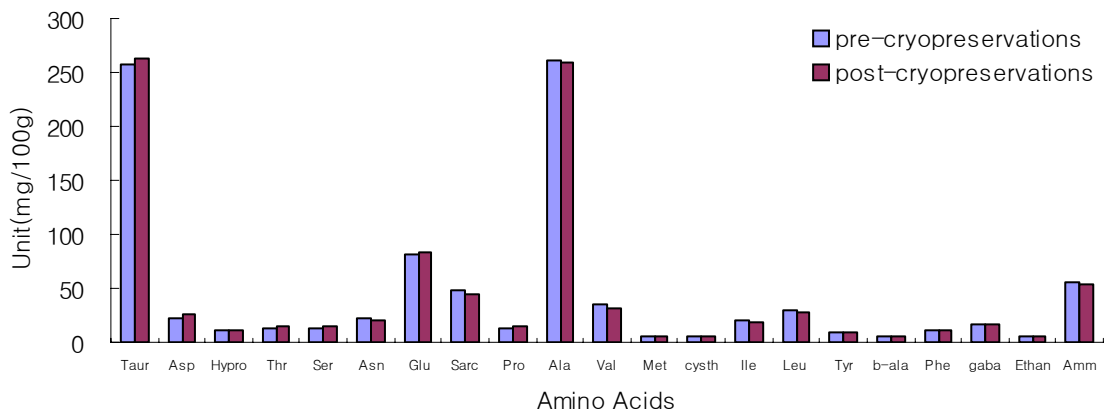


Fig. 70. Contents of free amino acids of *Hizikia fusiforme*.

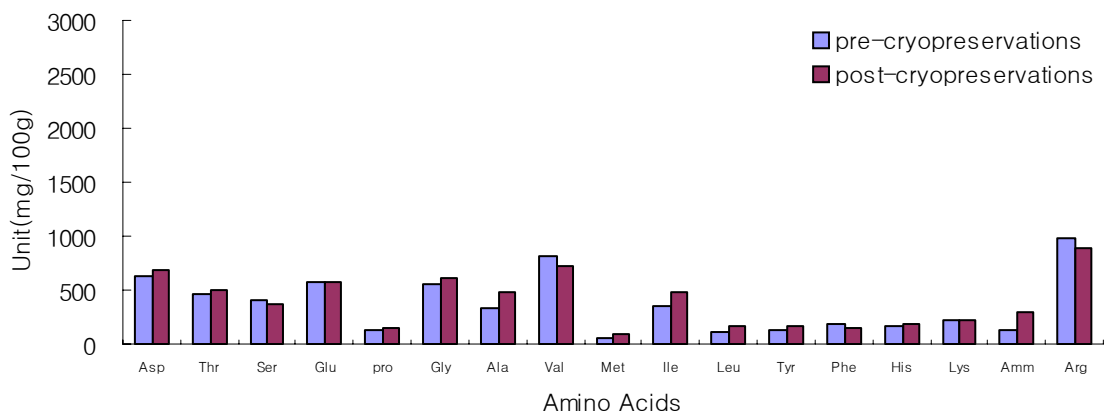


Fig. 71. Contents of total amino acids of *Hizikia fusiforme*.

본 실험에서 사용한 가시파래의 동결전·후의 일반성분은 Fig. 72과 같다. 가시파래는 Moisture 함량이 동결전에서는 73.5%, 동결후에는 73.8%로 나타났고, Protein, Lipid, Ash의 함량이 각각 23.9, 1.1, 1.3% 순으로 나타났다.

동결전·후의 유리아미노산조성은 Figure 73와 같이 나타났다. 시료 100 g 중에 분포하는 각 유리아미노산의 조성을 살펴보면 동결전과 후 모두에서 Taurine, Alanine, Glutamic acid, Ammonia 순으로 두 조건 모두 다른 성분들 보다 높게 나타났음을 알 수 있다. 또한, 결과에서 보는 바와 같이 Taurine에서 262.3 mg/100g과 273.8 mg/100g, Alanine에서 262.8 mg/100g과 244.4 mg/100g으로 11.5 mg/100g과 10.6 mg/100g 차이로 약간의 차이를 보였으나, 다른 성분들에서는 유의차가 나타나진 않았다.

구성아미노산조성은 Glutamic acid, Alanine, Lysine, Ammonia 순으로 동결전후 시료에서 모두 같이 다소 높게 나타났다(Fig. 74). Glutamic acid, Lysine에서 각각 2567.8 mg/100g과 2651.2 mg/100g, 2167.4 mg/100g과 2288.0 mg/100g으로 83.4 mg/100g과 120.6 mg/100g으로 약간의 차이를 보였으며, 대부분의 성분에서는 유의차가 나타나지 않았다.

따라서, 본 결과에서와 같이 동결전과 동결후의 재배중에 대하여 일반성분분석과 유리·구성아미노산의 조성에 있어 큰 차이점이 없는 것으로 생각되어진다.



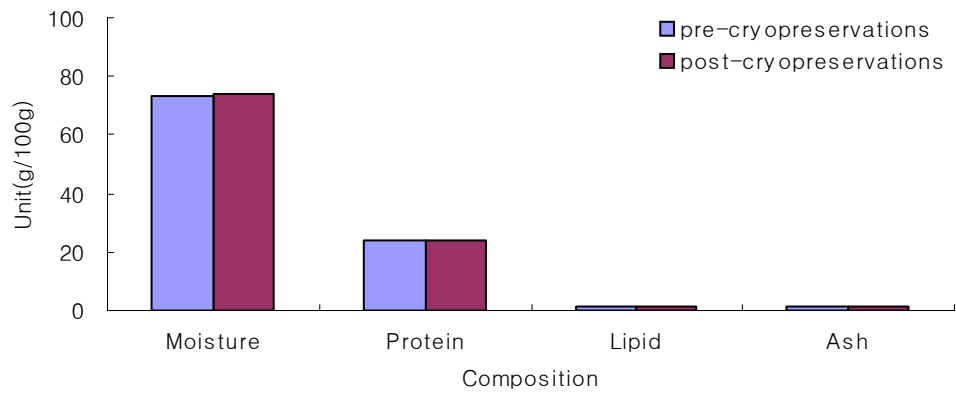


Fig. 72. Contents of Proximate components of *Enteromopha prolifera*.

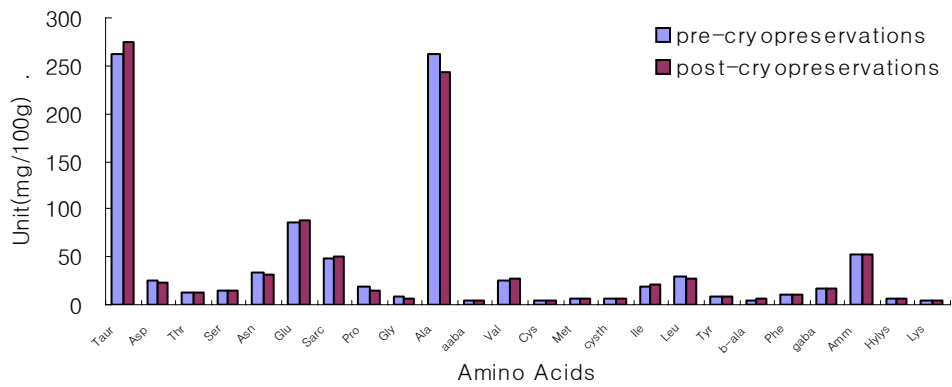


Fig. 73. Contents of free amino acids of *Enteromopha prolifera*.

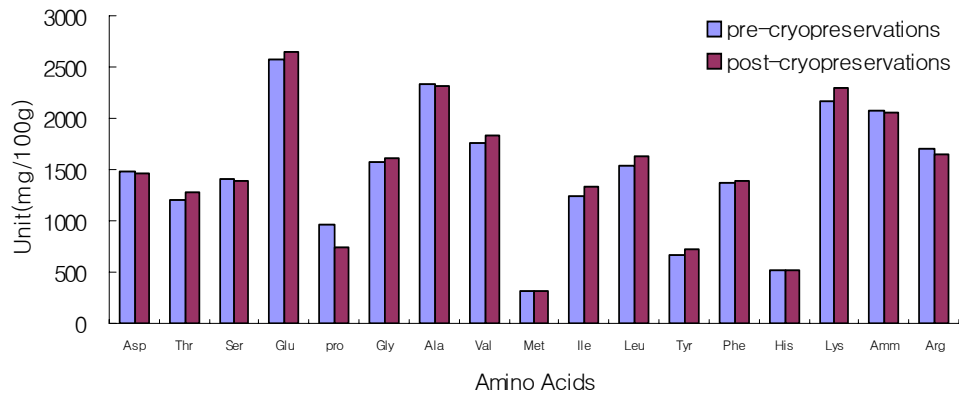


Fig. 74. Contents of total amino acids of *Enteromopha prolifera*.

본 실험에서 사용한 청각의 동결전·후의 일반성분은 Fig. 75과 같다. 청각은 Moisture 함량이 동결전에서는 79.5%, 동결후에는 79.2%로 나타났고, Protein, Lipid, Ash의 함량이 각각 15.5, 1.4, 3.6% 순으로 나타났다.

동결전·후의 유리아미노산조성은 Figure 76과 같이 나타났다. 시료 100 g중에 분포하는 각 유리아미노산의 조성을 살펴보면 동결전과 후 모두에서 Taurine, Alanine, Glutamic acid 순으로 두 조건 모두 다른 성분들 보다 높게 나타났음을 알 수 있다. 또한, 결과에서 보는 바와 같이 Taurine에서 129.2 mg/100g과 133.9 mg/100g, Alanine에서 92.4 mg/100g과 91.6 mg/100g으로 61.2 mg/100g과 65.4 mg/100g 차이로 약간의 차이를 보였으나, 다른 성분들에서는 유의차가 나타나진 않았다.

구성아미노산조성은 Arginine, Valine, Glycine, Glutamic acid, Aspartic acid 순으로 동결전후 시료에서 모두 같이 다소 높게 나타났다(Fig. 77). Glycine, Glutamic acid, Aspartic acid에서 각각 532.4 mg/100g과 566.8 mg/100g, 531.6 mg/100g과 569.8 mg/100g, 524.0 mg/100g과 569.1 mg/100g으로 34.4 mg/100g, 38.2 mg/100g, 45.1 mg/100g으로 약간의 차이를 보였으며, 대부분의 성분에서는 유의차가 나타나지 않았다.

따라서, 본 결과에서와 같이 동결전과 동결후의 재배중에 대하여 일반성분분석과 유리·구성아미노산의 조성에 있어 큰 차이점이 없는 것으로 생각되어진다.

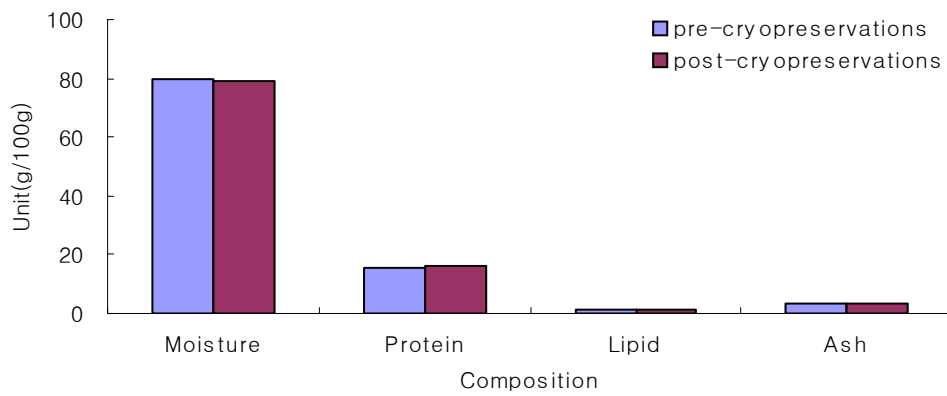


Fig. 75. Contents of Proximate components of *Codium fragile*.

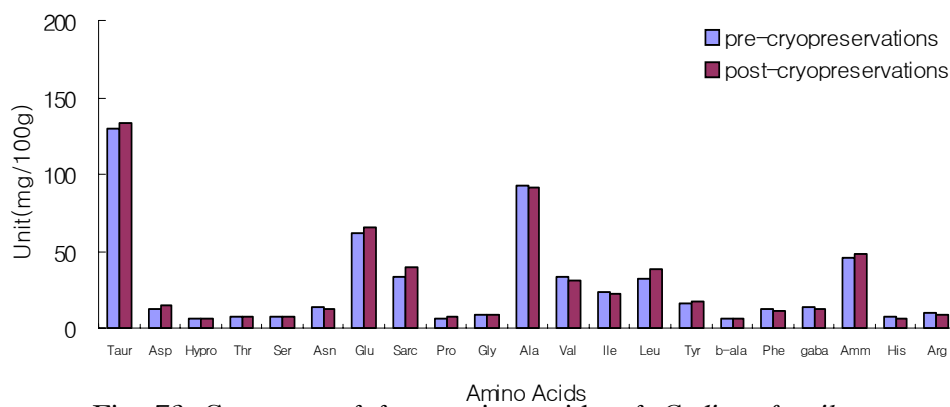


Fig. 76. Contents of free amino acids of *Codium fragile*.

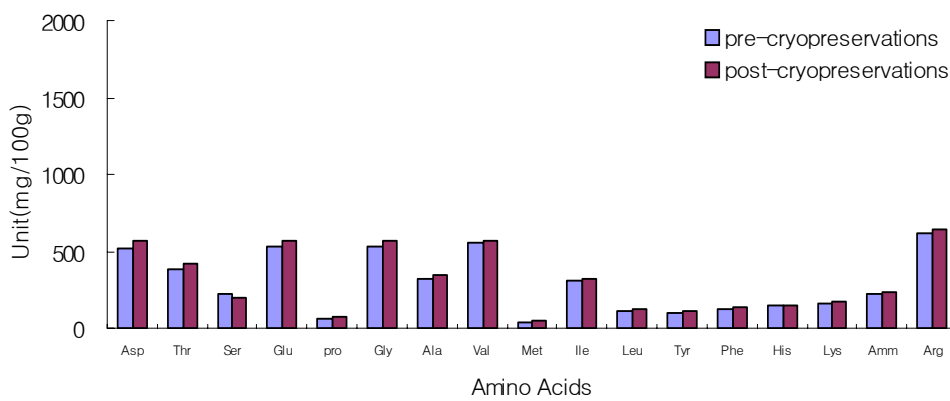


Fig. 77. Contents of total amino acids of *Codium fragile*.

# 제 5 장 해조류의 종 보존을 위한 동결 및 해동공정에서의 열 특성 연구

## 제 1 절 서 론

해양 환경의 악화로 인한 해조류 종묘의 소멸 위기에 대처하고 종묘수입에 의한 외화 손실을 방지하기 위해서 우량 품종의 장기 보존을 통한 해조 산업 안정화의 중요성이 인식되고 있다. 현재의 국내외의 해조류 종묘 보존에 관한 연구는 동결보존액으로서 해수 또는 동결방어제의 첨가에 의한 2단계 액체질소 동결법이 이용되고 있으나, 해조류의 품종별 동결공정에서의 열역학적 특성이 명확히 규명되어 있지 않다. 그러므로, 본 연구에서는 대표적인 해조류인 *P. seriata*(사상체), *U. pinnatifida*(배우체), *S.fulvellum*(유배)의 1 단계 동결에서의 동결특성을 규명함으로써 빙결정 생성을 제어하고, 생존율을 높일 수 있는 최적동결조건을 확립하고자 한다.

## 제 2 절 해조류의 동결공정에서의 동결속도에 따른 빙결정의 성상 측정

### 1. 재료 및 방법

최근에는 생물재료의 내부 구조 관찰, 병리학에 있어서 조직 조사에 마이크로톰에 의한 얇은 세포조직을 제작하여, 그 세포조직을 현미경으로 관찰하고 이들의 입체표본의 제작은 얇은 세포조직으로부터 영상정보 등에 근거하여 3차원영상을 구축해 왔다. 생체분야에서 최근 컴퓨터나 영상처리기술이 진보함에 따라 2차원정보를 계측함에 의해 3차원적인 정보의 요구에 의하여, SEM 등으로, 3차원구조를 관찰하고 있지만, 각 재료의 특별한 성질 때문에 그 파악에 한계가 있으며, 이러한 방법은 얇은 세포조직의 제작상의 정확성, 막대한 양의 얇은 세포조직의 제작의 어려움이 있다.

그러므로 본 연구개발에서는 대상으로 하는 시료를 연속적으로 잘라서, 노출된 2차원단면을 CCD카메라로 촬영하여, 그 정보에 근거하여 3차원영상을 구축하는 「Micro-Slice 영상처리시스템」에 의해 해조류내에 생성되는 빙결정을 3차원적으로 관찰·계측하고 그 조직을 형광염색하고 빙결정 조직과 일반 조직을 식별하고, Micro-Slice 영상처리시스템에 의해 해조류에 포함되는 빙결정을 3차원적으로 관찰하는 방법을 이용함으로써 생존율을 극대화 할 수 있는 최적의 동결조건을 확립한다.

### 가. Micro-Slice 영상처리시스템

Micro-Slice 영상처리시스템의 흐름도 Fig. 78에 나타내었다. 본 시스템은 파라핀 및 Multi-Slicing해서, 그 단면을 노출시킨 Micro-Slice부를 포함한 ① 단면영상작성장치, 노출된 2차원 단면영상을 CCD칼라카메라로 촬영하는 ② 단면화상촬영장치, 촬영된 원 화상을 레이저디스크에 기록하는 ③ 화상기록장치, 기록된 원 화상의 정보에 기초해서 3차원 화상을 재구축하고, 실제로는 절단되어 있지 않은 임의의 시료의 단면영상을 재구성해서 표시하는 등, 영상정보처리를 행하는 워크스테이션으로서의 기능을 가진 ④ 3차원 영상구축장치, 마이크로컴퓨터에 의해 의에 기술한 장치 ①의 Slice와 ③의 기록 타이밍을 맞추기 위해 신호를 발생하는 ⑤ 신호발생기 및 ②로 촬영중의 영상과 ③에 기록된 원 화상, 또, ④에서 얻어진 재구축영상을 관찰자에게 표시하기 위한 ⑥모니터로 구성되어 있다.

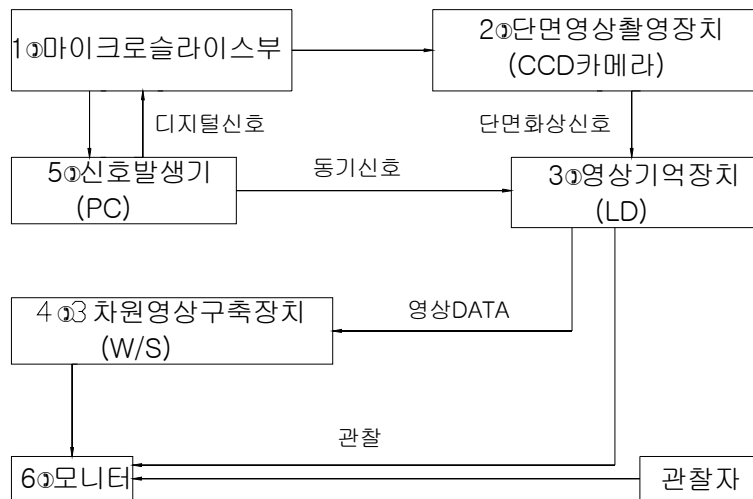


Fig. 78. Flow chart of micro-slice image processing system.

### 나. 측정법

공시 시료를 원통형으로 잘라내서, 염색한 후, 파라핀제의 샘플 홀더에 충전한다. 시료 동결중의 열유속을 측정하기 위해 시료 바닥 부분에 동막대를 삽입하고, 또 샘플홀더의 외주부를 발포스티로폼으로 단열한다. 또, 샘플폴더 하부로부터 5 mm간격으로 열전대를 삽입해서, 동결프로세스에 있어서의 온도분포의 시간에 따른 변화를 측정한다.

시료는 액체질소가스를 냉매로 하는 프로그램 freezer수조의 위쪽 면에 설치한 냉각동판의 위에 샘플폴더 바닥 면에 접촉시켜서 동결한다. 냉각동판의 표면온도는 실온에서 -150℃의 범위에서 일정 값으로 제어가 가능하다. 해조류 안에 생성된 빙결정의 크기는

동결곡선의 최대빙결정생성대(0~-5℃)통과시간에 영향을 받으므로, 이 비교를 위해 시료의 동결은 빙결정이 커지는 완만동결(-15℃)과 작아지는 급속동결(-120℃)을 각각 2시간 행한다. 동결된 시료는 형광현미경을 이용해서, 절삭회전수60rpm, 절삭두께 5 $\mu$ m로 연속적으로 Slice한다.

#### ◦ 해조류의 동결과정에서의 속도별 열역학적 특성 측정 및 최적 조건의 확립

DSC는 데이터를 처리하는 Disk station main unit와 측정결과를 출력하는 X-Y plotter, 냉각시스템인 Auto cooling unit, Keyboard, CPU로 구성되어 있다. DSC의 보정을 위한 standard sample은 Indium(156.6℃)과 Tin(232.0℃) 및 mercury(-38.87℃)를 사용하여 melting point를 측정하여 편차를 구한다.

DSC 측정을 위한 container는 sealer hermetic container(Al)를 사용하며, sample container를 밀봉하기 위해서 sample sealer를 사용한다. 냉각제로는 액체질소를 사용하고, 측정값은 동일 시료를 각각 3번씩 측정하여 평균치를 구한다. 그림 2에 전형적인 DSC의 곡선을 나타내었으며 3종류의 특성변화 곡선이 나타난다. 냉각시간에 따른 시료의 동결과정중에 방출 열량의 관계는 ①곡선(Heat flux-time thermogram)으로, 온도변화는 ②곡선(Temperature-time thermogram)으로 구해지며, 방출열량의 시간에 대한 미분곡선은 ③곡선(Differential thermogram of heat flux and time)으로 나타난다. 발열량 (동결잠열, $\Delta H_f$ )은 heat flux-time thermogram의 면적에 의해 구해지며, Temperature-time thermogram에서  $T_s$ 는 과냉각온도,  $T_f$ 는 동결점을 나타내며, Heat flux-time thermogram에서  $T_0$ 는 onset point,  $T_m$ 은 최대발열반응온도,  $T_c$ 는 발열반응종료온도를 나타낸다. 재료의 농도별 동결점, 동결잠열, 동결완료온도를 활용하여 해조류의 생존율을 높이기 위한 재료의 최적 동결조건을 결정하여 해조류의 동결 보존 공정에 활용한다.

### (1) 빙결정의 3차원 분포 측정

(가) 동결속도에 따른 빙결정의 성장 측정

#### ① 해수 수용액 사상체

빙결정의 3차원 구조 측정 결과는 Fig. 79와 같다. 3차원 구조는 각각의 시료에 대하여 약 300여 화면으로 구성되어 있으나, 영상프로그램에 의하여 작동가능하며, 본 보고서에서는 중간 위치 부분의 촬영 사진을 수록하였다. 빙결정은 투명하므로 식별을 위하여 적색으로 염색하여 구조를 측정한 결과 동결 및 해동과정에서 열이 방출되는 방향과 동일한 방향으로 빙결정의 경계부분인 무늬결이 형성되며, 각 경계부분의 좁은 사이에 사상체가 존재하기 때문에 물리적인 영향으로 생존율이 저하하는 것으로 판단된다.

해수 수용액을 포함한 사상체의 동결 특성을 측정하기 위하여 일반적인 동결고 속에서의 냉각속도를 기준으로 상온에서 0℃까지는 동결속도 2℃/min로, 0℃에서 -10℃까지는

0.1°C/min, -10°C에서 -40°C까지는 2°C/min 의 동결속도로 시료의 온도를 강하시키면서 사상체의 동결현상을 관찰하였다. Fig. 80에서 보는 바와 같이 -18.8°C에서 사상체가 동결되기 시작하며, -20°C를 경과하면서 얼음의 결정이 안정화되면서 -30°C이하의 온도에서 계의 상태가 변함이 없는 것으로 관찰됨에 따라 해수에서의 동결 보존은 -30°C이하의 온도에서 완료된다고 판단된다.

사멸율을 줄일 수 있는 방법은 현재 동결에 이용되는 3차원 동결방식을 1차원 동결방식으로 전환함으로써 구조적으로 복잡한 빙결정의 3차원 구조를 1차원 구조로 바꾸는 것이 사멸율을 줄일 수 있는 방법이라 생각된다.

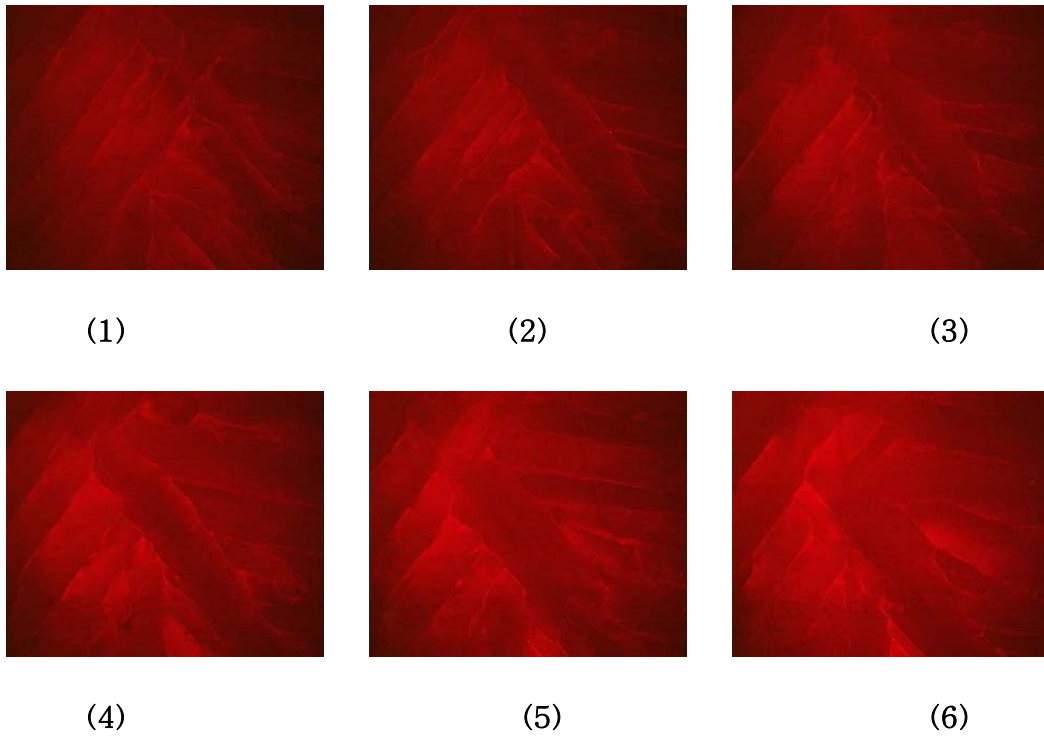


Fig. 79. Ice structure of *Porphyra seriata* in cryoprotectant from upper(1) to bottom(6).

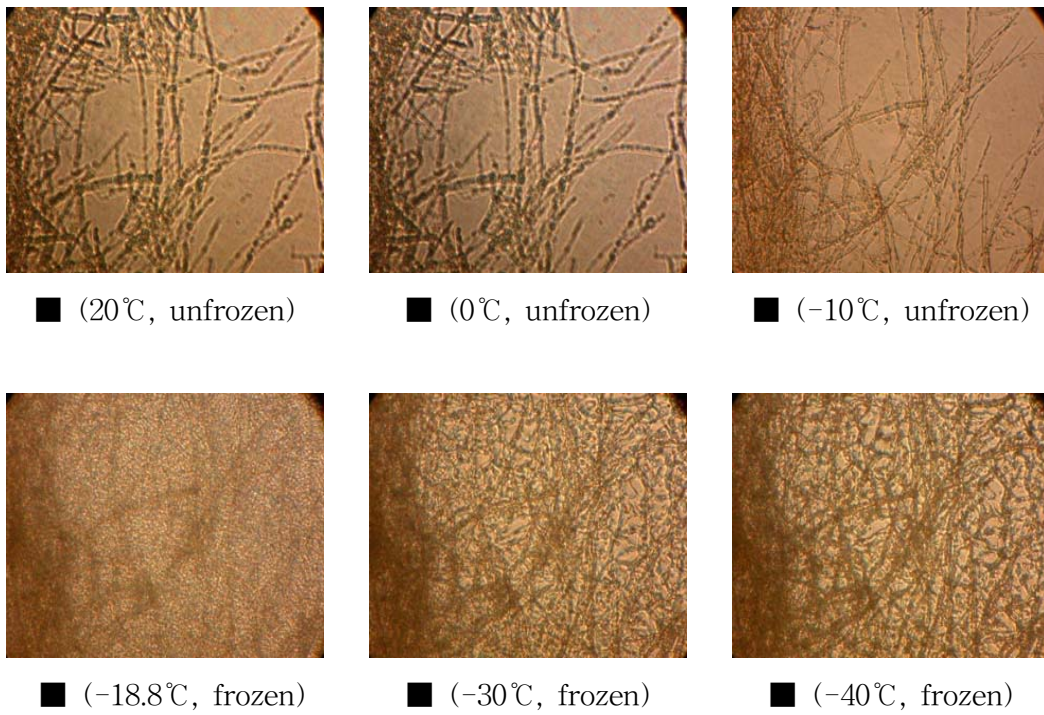


Fig. 80. Freezing process of *Porphyra seriata* in sea water at freezing rate 2°C/min.



## ② 동결보존액 처리 사상체의 동결

사상체의 보존방법으로 동결 보존액을 이용한 사상체의 1차 동결시의 빙결정의 생성 및 형상에 대한 특성을 측정하였다. 동결보존액 처리는 2ml 바이알에 해수 0.75ml를 넣은 후 사상체 1mg을 넣고, 기본액(2배) 0.75ml를 15분에 걸쳐 시료가 세포내의 수분과 치환될 수 있도록 하였다.

기본액은 50%해수 + 10% DMSO + 0.5M sorbitol로 조제하였으며, 제조한 시료를 cold stage 위에 놓고 동결속도 1°C/min 및 0.5°C/min로 동결시키면서 동결되는 과정을 측정하였다. 측정 결과를 Fig. 81 및 Fig. 82에 나타내었다. 상온에서 온도가 내려가면 4°C부근에서 사상체의 둘레에 흰색의 경계선이 보이기 시작하고, -9°C를 전후하여 동결보존액 부분과 사상체의 경계부분에 결정의 계면이 점점 커지면서 뚜렷해지며, -11°C 전후에서 동결보존액이 존재하는 부분에 가는 선들이 형성되면서 -20°C를 지나면서 동결보존액 부분의 가는 선이 굵은 선으로 형성된다.

-26°C에서 서서히 어두워지기 시작하면서 -28°C를 전후하여 완전히 어두워지면서 흰선이 보이기 시작한다. -31°C 전후에서 작은 빙결정이 보이기 시작하며, -35°C이하가 되면 전체의 계가 색이 일정하게 되면서 안정된 상태가 유지되므로 사상체와 보존액의 구별이 되지 않는 상태가 되는 것으로 관찰되었다.

해수를 포함한 사상체의 동결과정과 동해방어제를 이용하는 경우의 저온현미경 관찰상의 차이점은 해수를 포함한 사상체를 동결하는 경우에는 빙결정이 생성됨을 의미하는 화면상의 어두워지는 정도가 급격하게 진행되므로써 사상체에 미치는 영향이 크다고 생각되나, 동해방어제를 넣은 경우 서서히 동결되기 시작함을 나타내는 계의 밝기가 서서히 떨어지기 시작하는 현상으로 보아 빙결정의 형성에 대한 사상체의 안정성을 확보할 수 있는 것으로 확인되었다.

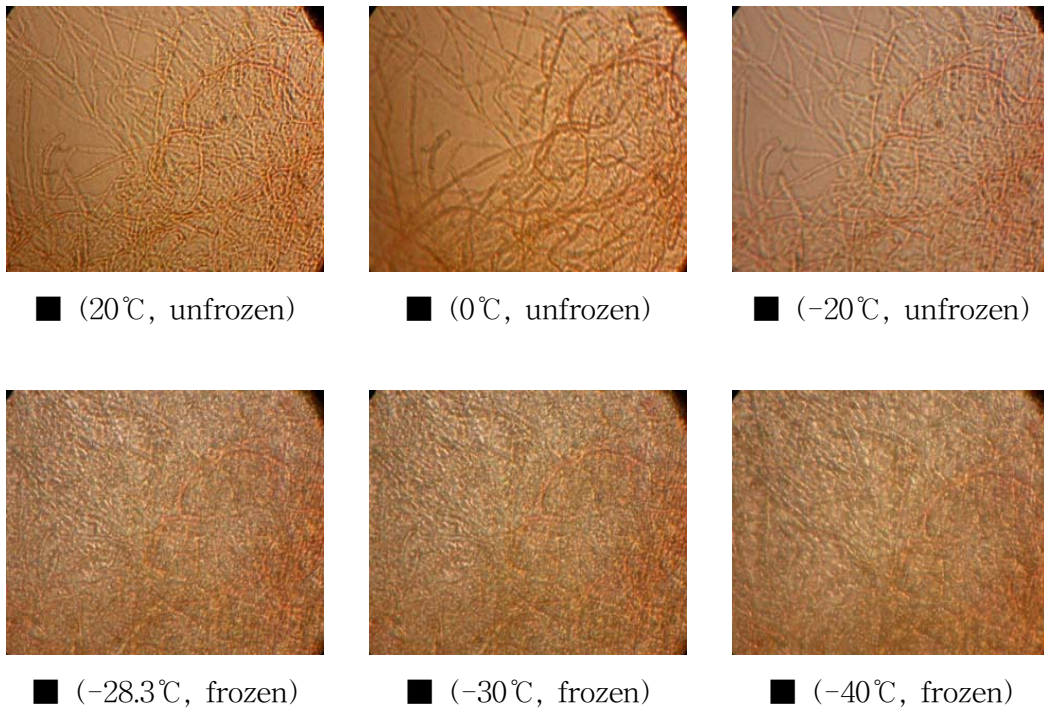


Fig. 81. Freezing process of *Porphyra seriata* in cryoprotectant at freezing rate  $-1.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

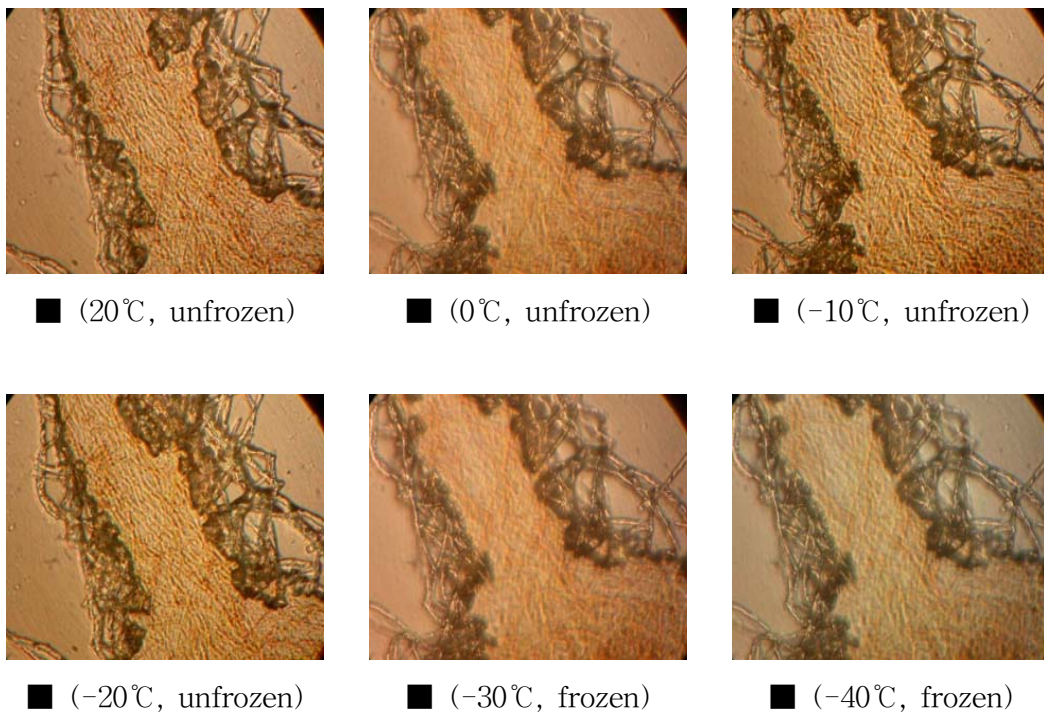


Fig. 82. Freezing process of *Porphyra seriata* in cryoprotectant at freezing rate  $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

또한, 동결속도 1°C/min인 경우 -28.3°C에서 -0.5°C/min인 경우 -26.5°C에서 동결되었으며, 동결속도에 관계없이 -30°C를 지나면서 계의 색이 동일해 지는 현상으로 보아 빙결정이 안정화되면서, -35°C이하에서는 계의 전체의 색의 변화를 보이지 않았다. 이것은 사상체의 1차동결에서 -35°C이하의 온도가 되면 빙결정이 안정화됨으로써 2차 처리공정인 액체질소처리를 하더라도 사상체의 생존율을 높일 수 있는 최적의 보존 온도임을 나타낸다.

## (2) 동결 열특성 측정

### (가) 물, 해수, 동결보존액의 동결 특성 비교

사상체의 동결점 및 동결잠열을 측정하기 위하여 냉각속도 0.1-2.0°C/min에서의 DSC에 의한 발열반응곡선을 측정하였다. 비교를 위하여 물의 동결점 및 동결잠열을 측정하였으며, 물, 해수 및 동결보존액 처리한 시료의 동결특성을 비교한 결과는 Table 32, Table 33과 같다

해수 및 동결보존액을 이용하는 각각의 경우에 대하여 동결점과 동결잠열을 각각 Table 32 및 Table 33에 나타내었다. 동결이 시작되는 온도는 해수사상체 -8.29°C, 동결보존액 사상체 -19.64°C였으며, 동결잠열은 해수사상체 -288.2 J/g, 동결보존액 사상체 -164.90 J/g으로 동결보존액 사상체가 해수사상체의 57.2%에 불과하였다. 측정 결과로부터 동결잠열은 물이 가장 크며, 다음으로 해수, 동결보존액의 순이었으며, 이것은 해조류의 종보존을 위한 보존액으로서 물과 해수보다 동결보존액을 사용하는 것이 동결과정 중에 빙결정의 형성에 따른 상변화에 관여하는 열량을 감소시켜 사상체에 대한 영향이 적음을 의미한다.

Table 32. DSC endothermic Characteristics of *Porphyra seriata* in sea water

Material	Kinds	Cooling Rate (°C/min)				Average
		0.1	0.5	1.0	2.0	
Sea water + <i>P. seriata</i>	Freezing temperature(°C)	-6.67	-8.40	-8.88	-9.22	-8.29
	Freezing cease temperature(°C)	-17.27	-19.88	-20.66	-24.69	%,
	Latent heat of freezing (J/g)	-279.6	-288.7	-291.2	-293.4	-288.2
Water	Freezing temperature(°C)	-7.30	-7.89	-8.80	-9.22	-8.83
	Freezing cease temperature(°C)	-15.53	-17.50	-18.64	-24.34	-19.00
	Latent heat of freezing (J/g)	-332.1	-345.2	-311.8	-347.3	-337.3

Table 33. DSC endothermic Characteristics of *Porphyra seriata* in cryoprotectant

Material	Kinds	Cooling Rate (°C/min)				Average
		0.1	0.5	1.0	2.0	
Cryoprotectant + <i>P. seriata</i>	Freezing temperature(°C)	-17.57	-18.40	-20.76	-21.82	%,
	Freezing cease temperature(°C)	-26.15	-26.40	-26.36	-34.63	%,
	Latent heat of freezing (J/g)	-165.0	-170.3	-156.7	-167.6	-164.90
Water	Freezing temperature(°C)	-7.30	-7.89	-8.80	-9.22	-8.83
	Freezing cease temperature(°C)	-15.53	-17.50	-18.64	-24.34	-19.00
	Latent heat of freezing (J/g)	-332.1	-345.2	-311.8	-347.3	-337.3

(나) 동해방어제를 사용한 해조류 사상체의 동결 특성

*P. seriata*, *U. pinnatifida*, *S. fulvellum* 동결에 의한 발열반응 실험을 동결속도 (냉각속도, Cooling rate, Freezing rate) 0.1~2.0°C/min 범위에서 행하여 동결온도(On set point), 동결 최대진행온도(Maximum point, heat flux가 최대인 온도), 동결종료온도(Cease point)를 측정 하였다. 측정 결과는 Fig. 83~Fig. 85과 같다.

① 동결 온도, 최대 동결 진행 온도

*P. seriata*, *U. pinnatifida*, *S. fulvellum* 모두 동결속도가 증가함에 따라 큰 변화를 보이지 않으며, 동결 온도, 동결 최대진행온도는 동일한 동결속도에서 *S. fulvellum*, *P. seriata*, *U. pinnatifida* 의 순으로 높은 온도를 나타내었다.

② 동결 종료 온도

Fig. 83~Fig. 85에서 보는 바와 같이 *P. seriata*, *U. pinnatifida*, *S. fulvellum* 모두 동결속도가 증가할수록 동결 종료온도는 낮아졌으며, 동결 종료 온도의 범위는 *P. seriata* -20.5°C~-30.5°C, *U. pinnatifida* -18.1°C~-27.8°C, *S. fulvellum* -17.0°C~-27.1°C 였다

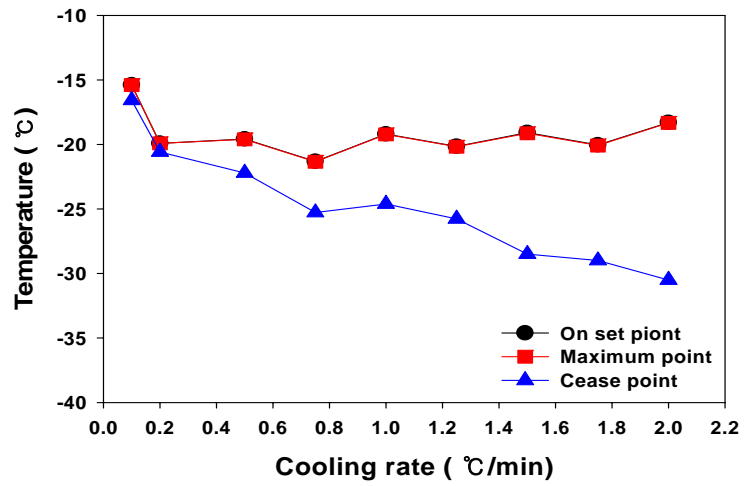


Fig. 83. Exothermic temperature of *Porphyra seriata*.

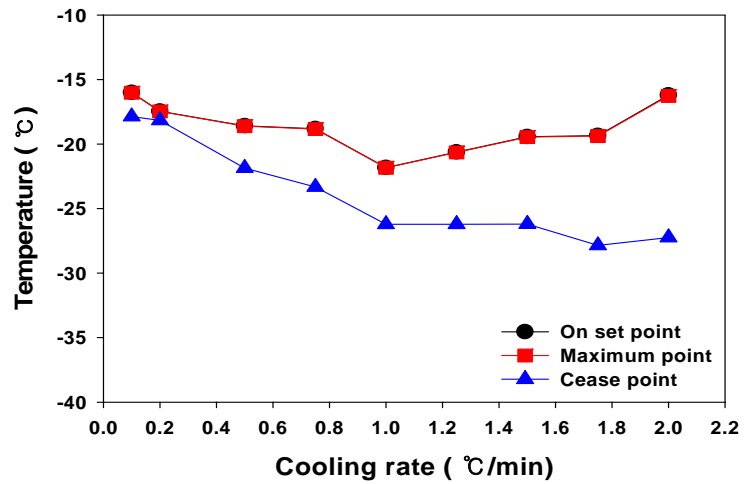


Fig. 84. Exothermic temperature of *Undaria pinnatifida*.

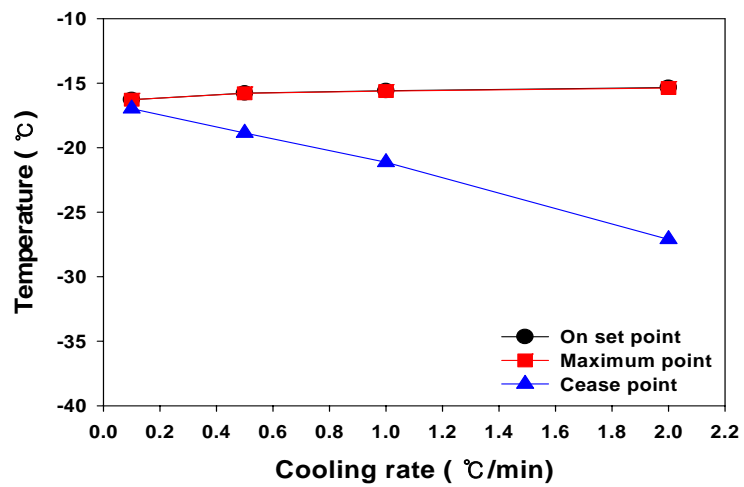


Fig. 85. Exothermic temperature of *Sargassum fulvellum*.

### ③ 동결에 의한 빙결정 생성온도 범위

Fig. 86~Fig. 88에서 보는 바와 같이 빙결정 생성온도의 범위(Temperature difference)는 동결 속도가 클수록 넓은 온도 범위에 걸쳐 분포하며, 상대적으로 편차의 상승이 적은 냉각속도는 *P. seriata* 0.1~1.25°C/min, *U. pinnatifida* 0.75~1.0°C/min였으며, *S. fulvellum* 은 상승률이 거의 일정하였다.

### ④ 동결 시간

*P. seriata*은 냉각 속도 0.1~1.25°C/min에서 냉각속도가 클수록 동결시간(Freezing time)이 짧아지며, 1.25°C/min에서 최단시간을 나타내었다. 1.5°C/min이상에서는 다시 상승하는 경향을 보였다. *U. pinnatifida*의 동결 진행시간은 냉각 속도 0.1~1.0°C/min에서는 김과 동일하게 냉각속도가 클수록 짧아져 1.01~1.5°C/min이상에서는 다시 증가하였다.

*S. fulvellum*은 냉각속도 1.0°C/min에서 최단시간을 나타내었다. 위의 결과로부터 해조류의 종보존을 위한 동결보존 공정에서 생존율을 높이기 위해서는 동결 진행시간이 짧을수록 효과가 크므로 최적 냉각속도를 1.0~1.5°C/min로 하는 것이 타당하다고 생각된다 (Fig. 86~ Fig. 88).

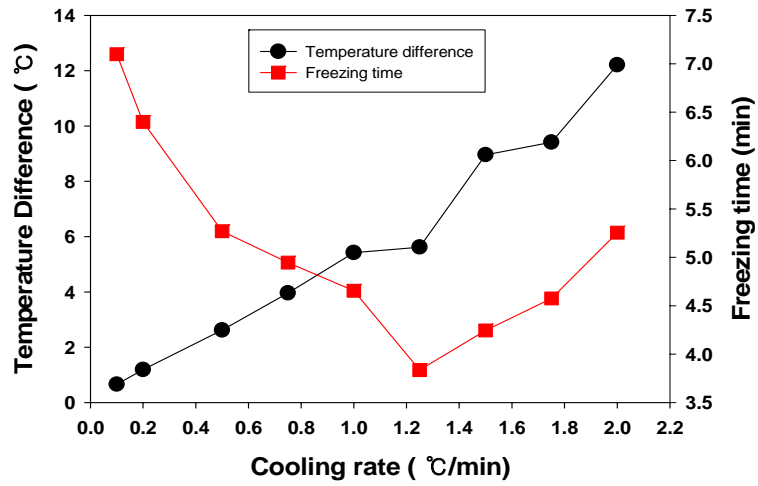


Fig. 86. Freezing time and exothermic temperature of *Porphyra seriata*.

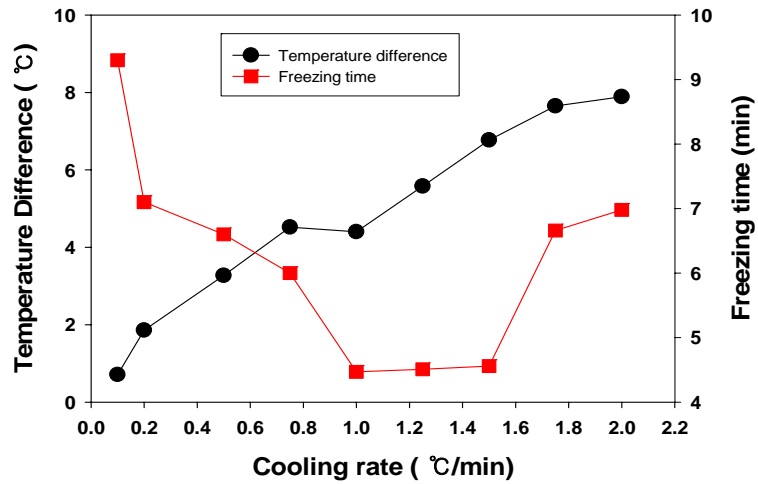


Fig. 87. Freezing time and exothermic temperature of *Undaria pinnatifida*.

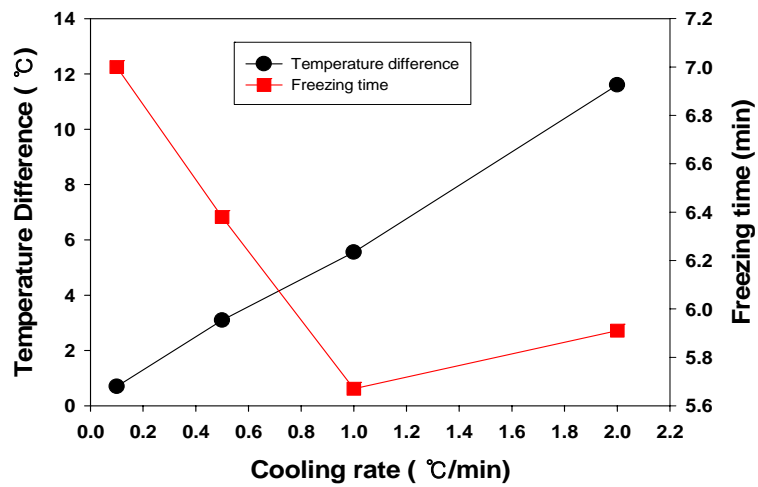


Fig. 88. Freezing time and exothermic temperature of *Sargassum fulvellum*.



⑤ 동결잠열

동결 잠열(Latent heat of freezing)은 조성성분 및 조성 비율이 변화 되지 않는 일반적으로 냉각속도의 관계없이 일정한 값을 가지며, 냉각속도 0.1~2.0°C/min의 범위에서 측정된 동결잠열을 평균하였다. Fig. 89에서 보는 바와 같이 *P. seriata*, *U. pinnatifida*, *S. fulvellum*의 동결잠열은 각각 153.58 J/g, 146.67 J/g, 123.08 J/g의 값을 나타내었으며 미역이 가장 큰 값을 나타내었다.

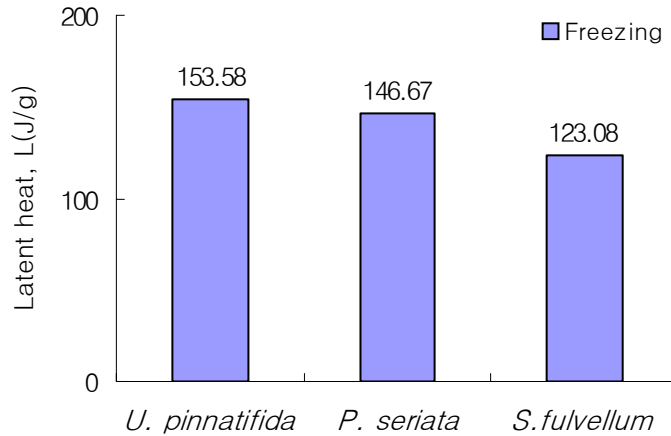


Fig. 89. Latent heat of freezing.

(3) 동결 Kinetics 해석

(가) 동결 속도 상수

*P. seriata*, *U. pinnatifida*, *S. fulvellum*의 동결과정에서의 열역학적 물성을 구하기 위하여 발열반응곡선의 동결온도와 동결종료온도의 구간을 등간격으로 10등분하여 등분한 각 온도 구간에서의 누적 잠열(A)과 Heat flux(dH/dt), 냉각속도( $V_f$ )와의 다음의 관계식으로부터 동결속도상수( $k_f$ )를 구하였다.

$$k_f = \frac{V_f(dH/dt)}{A} \text{----- (1)}$$

동결반응속도상수는 동결점에서 동결이 완료되는 동결종료온도사이의 각 온도에서의 동결진행속도를 파악할 수 있는 지표로서 해조류의 1차 동결과정에서의 동결이 가장 빠르게 진행되는 온도 범위를 결정할 수 있다. 해조류의 동결과정에서는 동결 시작 초기에 동결반응속도상수의 값이 크게 나타나므로 초기에 사멸율이 높은 것으로 판단된다(Table 34~Table 36).

Table 34. Kinetic constant of *Porphyra seriata* in process of freezing

Material	Cooling rate ( °C/sec )								
	0.1	0.2	0.5	0.75	1.0	1.25	1.5	1.75	2.0
	3.155	43.236	16.697	21.944	37.978	427.456	782.274	1071.537	1088.236
	1.466	19.539	67.949	98.996	106.995	183.967	338.323	426.030	470.666
	0.810	10.699	37.090	56.107	95.141	109.398	178.467	236.770	268.307
	0.505	7.063	22.737	33.878	59.593	66.744	107.136	144.988	156.070
<i>P. seriata</i>	0.295	4.728	14.135	21.335	35.265	40.860	64.303	86.866	90.925
	0.225	3.120	9.514	12.882	22.532	26.793	39.536	55.401	56.219
	0.151	1.796	5.277	7.573	12.752	16.055	22.911	33.640	32.557
	0.094	0.923	2.920	4.059	7.444	9.344	12.497	16.462	17.701
	0.041	0.404	1.083	2.012	3.686	3.084	4.935	8.154	6.991

Table 35. Kinetic constant of *Undaria pinnatifida* in process of freezing

Material	Cooling rate ( °C/sec )								
	0.1	0.2	0.5	0.75	1.0	1.25	1.5	1.75	2.0
	10.030	39.351	111.657	265.948	416.038	542.106	1072.774	1091.048	1320.396
	3.835	16.935	47.459	113.757	173.962	237.640	446.239	455.856	550.495
	2.191	8.179	26.298	63.781	99.608	127.462	226.788	250.813	300.086
	1.430	5.155	16.443	37.892	61.756	74.767	139.444	144.618	178.982
<i>U. pinnatifida</i>	0.971	3.226	10.712	23.430	39.563	44.459	87.570	88.278	118.479
	0.533	1.448	6.199	13.548	25.851	25.479	55.854	54.280	72.154
	0.323	0.968	3.625	8.164	14.232	15.158	36.125	31.396	45.939
	0.136	0.526	1.927	3.993	8.791	7.427	18.731	17.073	25.575
	0.044	0.311	0.634	1.579	3.726	3.667	6.908	6.766	9.468

Table 36. Kinetic constant of *Sargassum fulvellum* seaweed in process of freezing

Material	Cooling rate ( °C/sec )			
	0.1	0.5	1.0	2.0
	14.103	298.925	798.062	2013.775
	6.348	126.033	344.908	849.952
	3.652	70.950	192.707	501.364
	2.303	44.886	119.555	311.169
<i>S. fulvellum</i>	1.574	28.791	78.362	200.808
	1.278	18.634	51.134	126.637
	0.544	11.071	30.454	80.772
	0.312	5.707	17.684	45.027
	0.154	2.800	7.714	22.266

(나) 활성화 에너지

활성화에너지(Ea)는 동결점에서 동결이 완료되는 동결 종료온도사이의 각 온도에서의 동결이 진행되기 위해서 필요로 하는 최소의 열량을 파악할 수 있는 지표로써 동결반응 속도의 대수로그 값 (ln k<sub>f</sub>)을 y축의 값으로 하고 절대온도의 역수(1/T)를 x축으로 하여 구한 1차식으로부터 기울기를 측정함으로써 (2)식에 의하여 계산한다. 냉각속도와 상관성을 가지고 있으며, *P. seriata* 3971649 J/g · mole~247601.2 J/g · mole, *U. pinnatifida* 4644011 J/g · mole~264935 J/g · mole, *S. fulvellum* 4096360 J/g · mole~235159.5 J/g · mole의 값을 나타내었다. 또한 동결속도가 클수록 동결을 위한 활성화에너지의 값이 작아지는 경향을 보였다(Table 37~Table 39).

Table 37. Activation energy of *Porphyra seriata* in process of freezing

(  $\times 10^{-5}$  )

Material	Cooling rate ( °C/min )								
	0.1	0.2	0.5	0.75	1.0	1.25	1.5	1.75	2.0
<i>P. seriata</i>	3971649	2480805	1155391	728868.1	531261.5	515795.2	322871.8	326269.3	247601.2

Table 38. Activation energy of *Uudaria pinnatifida* in process of freezing

(  $\times 10^{-5}$  )

Material	Cooling rate ( °C/min )								
	0.1	0.2	0.5	0.75	1.0	1.25	1.5	1.75	2.0
<i>U. pinnatifida</i>	4644011	1725497	955152.3	695067.4	636825.4	555098.3	439838.3	264935	368604.8

Table 39. Activation energy of *Sargassum fulvellum* in process of freezin

(  $\times 10^{-5}$  )

Material	Cooling rate ( °C/min )			
	0.1	0.5	1.0	2.0
<i>S. fulvellum</i>	4096360	956867.9	518707.6	235159.5

(다) 동결 열물성 측정

동결과정 중의 열물성을 측정함으로서 동결진행 중에 계(System)의 내부에서 일어나는 열적변화를 추정할 수 있으므로 해조류의 동결보존을 위한 1차 동결단계에서의 사상체에 대한 영향을 최소화할 수 있는 조건의 설정이 가능하다.

동결열물성에는 엔트로피(S), 엔탈피(H), 자유에너지(F)가 있으며, 모두 계의 안정성과 관계가 있다. 결정 방법은 앞에서 구한 활성화에너지를 기본으로 다음의 (3)식 및 (4)식에 의하여 구한다. *P. seriata*, *U. pinnatifida*, *S. fulvellum*의 각각의 물성치의 값을 동결속도와의 관계로 표시한 결과는 Fig. 90~Fig. 95와 같다. Fig. 90 및 Fig. 91의 엔트로피 및 엔탈피의 변화에서 보는 바와 같이 냉각속도에 따라서 차이는 보이고 있으나, 냉각속도 1.0°C/min이하에서는 큰 편차를 보이고 있으나, 1.0°C/min이상에서는 작은 값으로 거의 일정하게 안정화되는 경향을 보이고 있다. 그러므로 동결보존을 위한 최적의 냉각속도는 1.0°C/min라 판단된다.

자유에너지는 *P. seriata*, *U. pinnatifida*, *S. fulvellum* 모두 동일한 냉각속도에서는 거의 일정한 값을 나타내었으므로 냉각속도에 관계없이 동결진행온도와 자유에너지의 관계를 살펴보기 위하여 y축에 자유에너지 x축에 동결진행온도를 plotting하여 Fig. 92~Fig. 94의 결과를 얻었다. 동결대상물에 따라서 차이를 보이는 물성치이나, 동결이 진행되는 각 온도(X축 값)와 자유에너지는 Fig. 92~Fig. 94에서 보는 바와 같이 선형의 관계를 나타내고 있다. 이것은 동결이 시작되어 종료될 때까지 계가 안정된 상태로 동결이 진행됨을 의미하며, *P. seriata*, *U. pinnatifida*, *S. fulvellum*의 종류별로 비교하기 위하여 통합하여 나타낸 Fig. 95에서도 거의 동일한 위치에 존재하는 것으로 판단하여 해조류 3종류 모두가 동결보존액 속에서 안정된 상태로 동결이 진행된다고 판단된다.

$$\Delta F = R \cdot T \ln - \frac{b \cdot T}{K \cdot h} \text{-----} (3)$$

$$\Delta H = E_a - R \cdot T = T \Delta S + \Delta F \text{-----} (4)$$

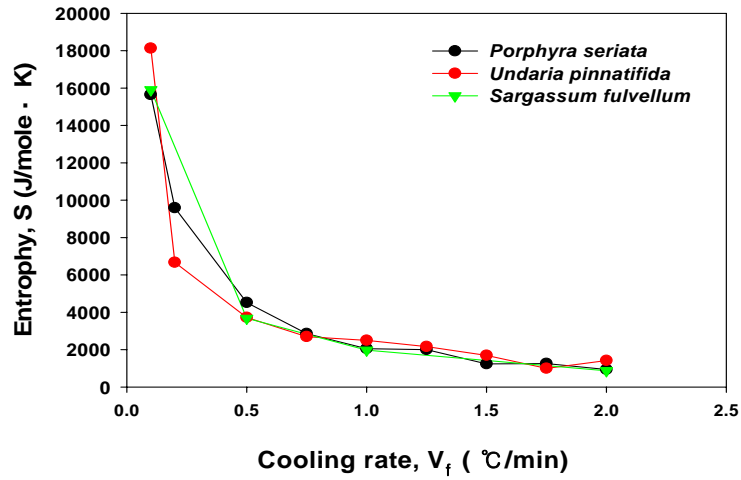


Fig. 90. Relations of entropy and cooling rate in freezing process.

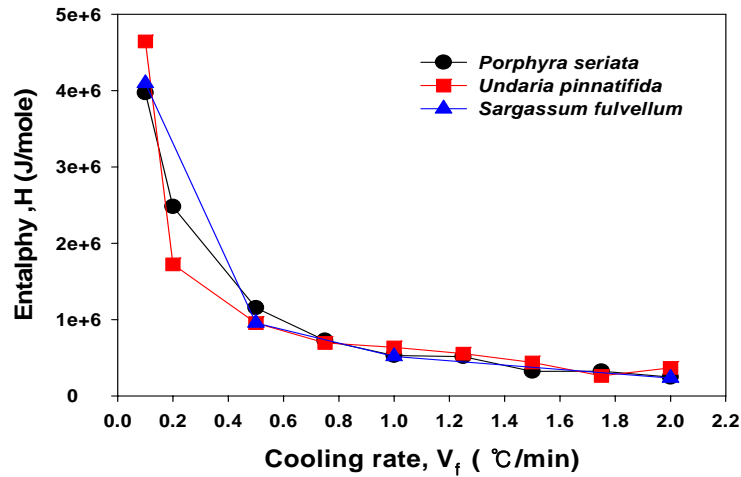


Fig. 91. Relations of enthalpy and cooling rate in process of freezing.

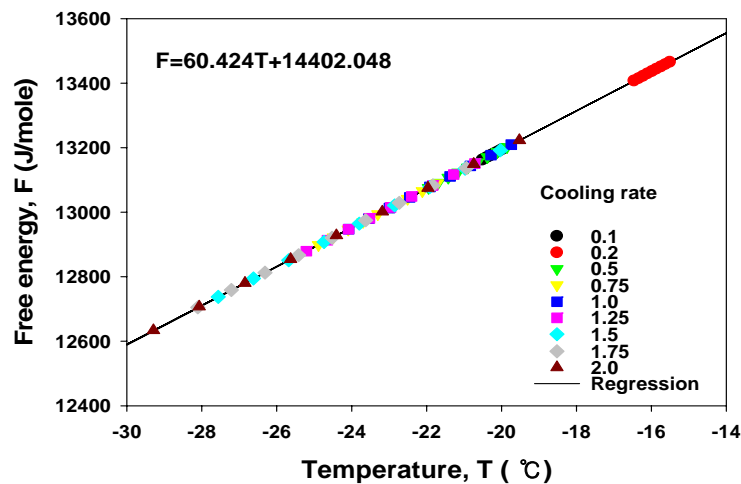


Fig. 92. Relations of free energy and temperature of *Porphyra seriata*.

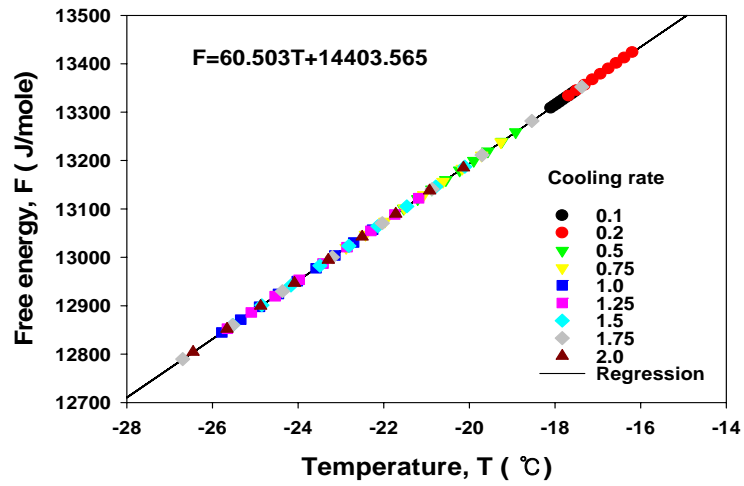


Fig. 93. Relations of free energy and temperature of *Undaria pinnatifida*.

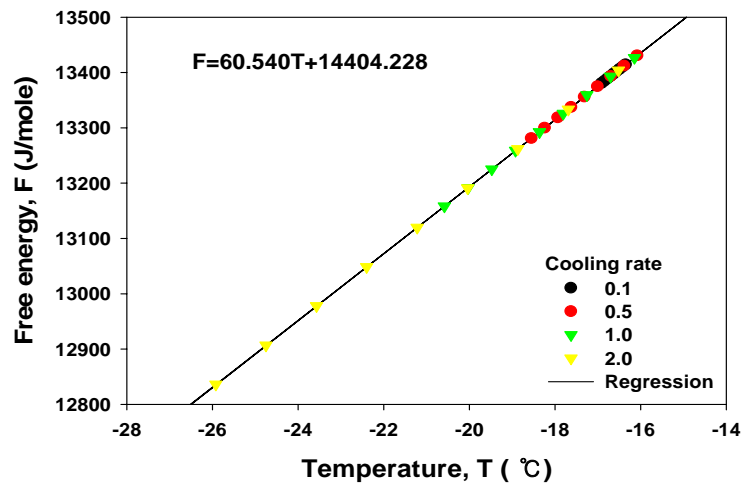


Fig. 94. Relations of free energy and temperature of *Sargassum fulvellum*.

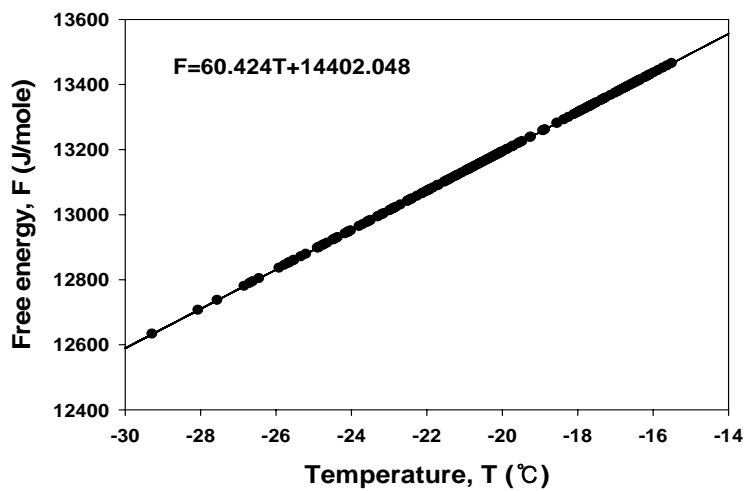


Fig. 95. Relations of free energy and temperature *Porphyra seriata*, *Undaria pinnatifida*, and *Sargassum fulvellum*.

#### (4) 해동에서의 빙결정의 분포 측정

동결이 완료된 후  $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 해동속도로 해동한 빙결정의 거동은 Fig. 96과 같다.

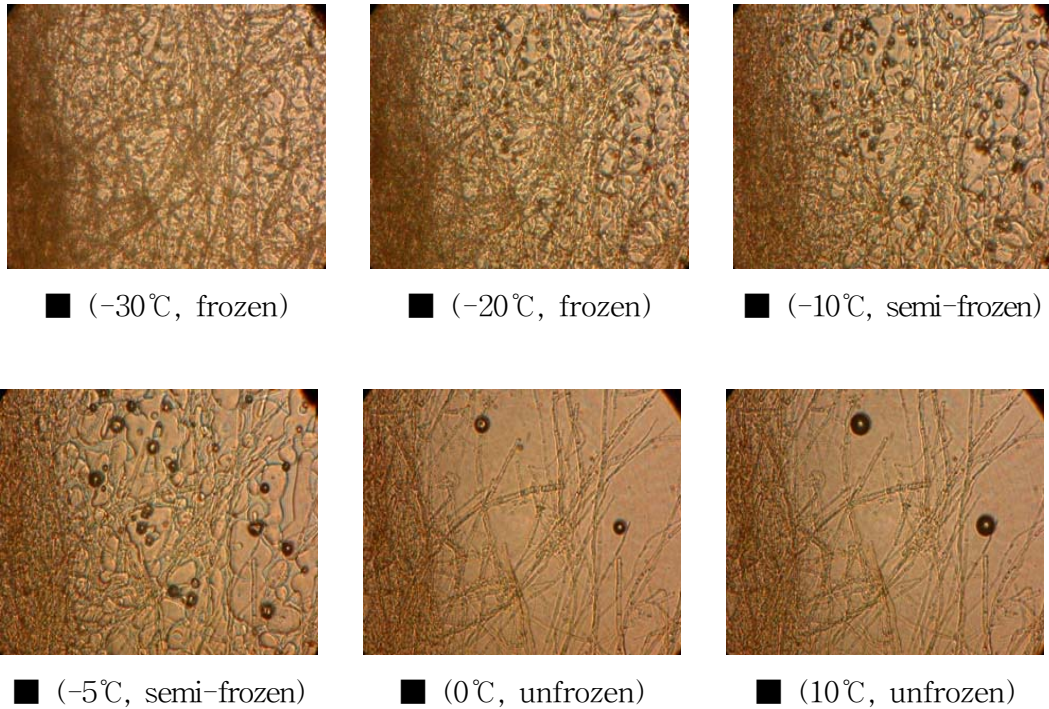


Fig. 96. Thawing process of *Porphyra seriata* in sea water at thawing rate  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

#### (5) 해동 열 특성 측정

*P. seriata*, *U. pinnatifida*, *S. fulvellum*의 흡열반응 실험을 행한 결과 해동시작온도, 최대 해동 진행 온도(heat flux가 최대인 온도), 해동완료 온도를 측정하였다. 측정결과는 Fig. 97~Fig. 99과 같다.

##### (가) 해동 개시 온도 및 최대 진행 속도

해동은 해동속도가 클수록 낮은 온도에서 시작되며, *P. seriata*은  $0.1\sim 1.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 범위에서는 차이를 보이지 않으며,  $-19.8\sim -22.4^{\circ}\text{C}$ 에서 해동이 시작되나,  $1.75\sim 2.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 범위에서는  $-27.2^{\circ}\text{C}$ 에서 해동이 시작되었다. *U. pinnatifida*은  $0.1\sim 0.75^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 범위에서는  $-18.6\sim -20.4^{\circ}\text{C}$ 에서 해동이 시작되나, 해동속도  $1.0\sim 2.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 범위에서는  $-25.1\sim -27.1^{\circ}\text{C}$ 에서 해동이 시작되었다. *P. seriata*, *U. pinnatifida*은  $-5.0^{\circ}\text{C}$ , *S. fulvellum*은  $-7.0^{\circ}\text{C}$ 부근에서 최대의 값을 나타내었으므로, 해동을 위한 흡열반응이 가장 높은 온도로 판단된다.

##### (나) 해동 종료 온도

*P. seriata* 은  $1.25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 까지는  $-2.49\sim -0.50^{\circ}\text{C}$ ,  $1.5\sim 2.0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 에서는  $2\sim 3^{\circ}\text{C}$ 에서 해동이 종료되었다.



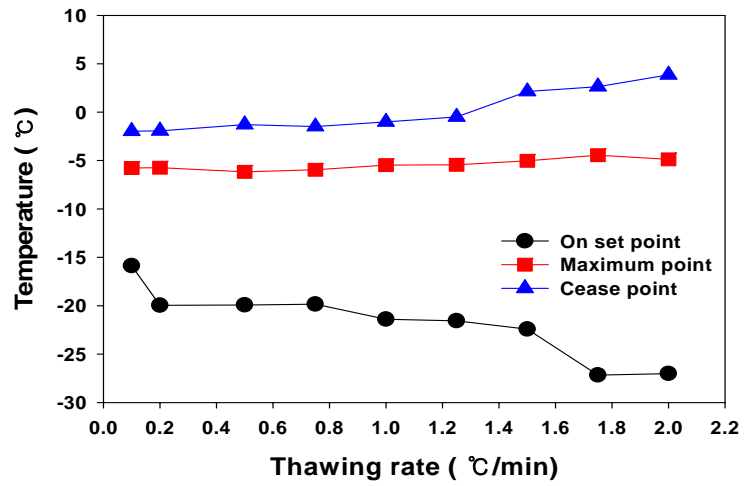


Fig. 97. Endothermic temperature of *Porphyra seriata*.

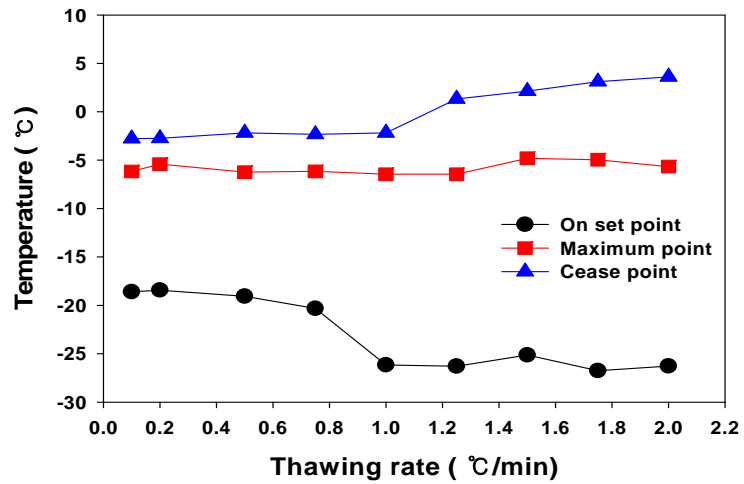


Fig. 98. Endothermic temperature of *Uudaria pinnatifida*.

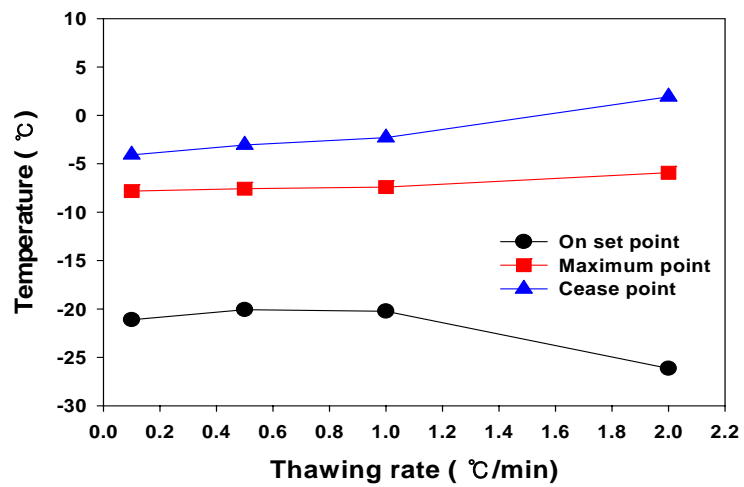


Fig. 99. Endothermic temperature of *Sargassum fulvellum*.

(다) 해동 진행 온도

Fig. 100~Fig. 102에서 보는 바와 같이 해동의 시작온도와 종료온도와의 편차인 해동 진행온도는 동결진행온도와 동일한 경향으로 해동속도가 클수록 넓은 온도범위에 걸쳐 해동이 진행되었다. 상대적으로 해동진행온도의 범위가 좁은(편차가 적은) 해동속도는 *P. seriata* 0.2~0.75°C/min, *U. pinnatifida* 0.2~0.75°C/min, *S. fulvellum* 0.1~1.0°C/min 범위였다.

(라) 해동시간

해동시간은 *P. seriata*, *U. pinnatifida*, *S. fulvellum* 모두 해동속도 0.5°C/min에서 최대치를 나타내었으며, 해동속도가 증가할수록 해동시간은 단축되었다(Fig. 100~Fig. 102).

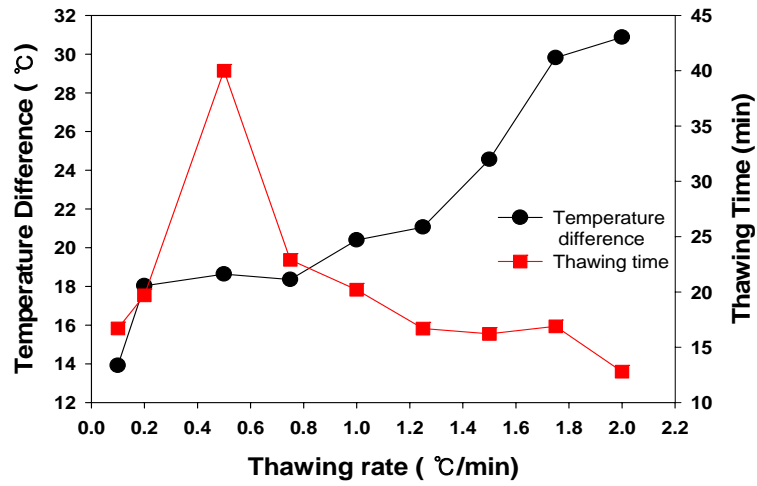


Fig. 100. Thawing time and endothermic temperature of *Porphyra seriata*.

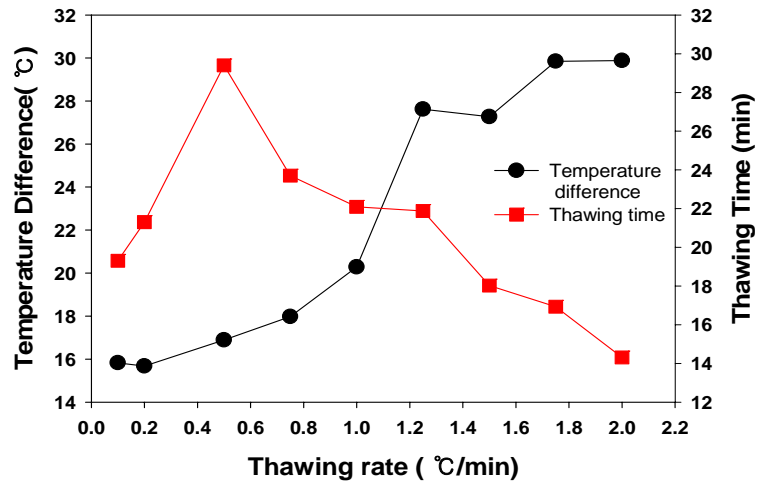


Fig. 101. Thawing time and endothermic temperature of *Undaria pinnatifida*.

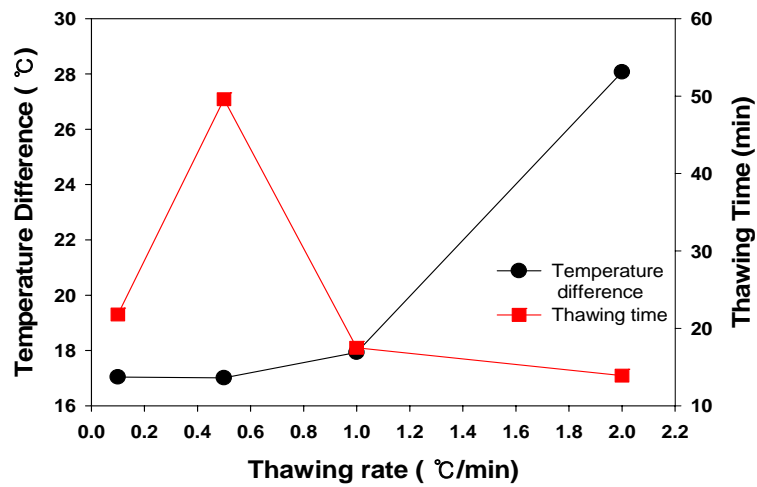


Fig. 102. Thawing time and endothermic temperature of *Sargassum fulvellum*.

(마) 해동잠열

해동잠열은 Fig. 103에서 보는 바와 같이 *U. pinnatifida* 128.37 J/g, *P. seriata* 118.53 J/g, *S. fulvellum* 94.42 J/g의 값을 나타내었으며, 동결잠열의 경향과 동일하게 *U. pinnatifida*이 가장 큰 값을, *P. seriata*, *S. fulvellum*의 순으로 큰 값을 나타내었다 (Fig. 103).

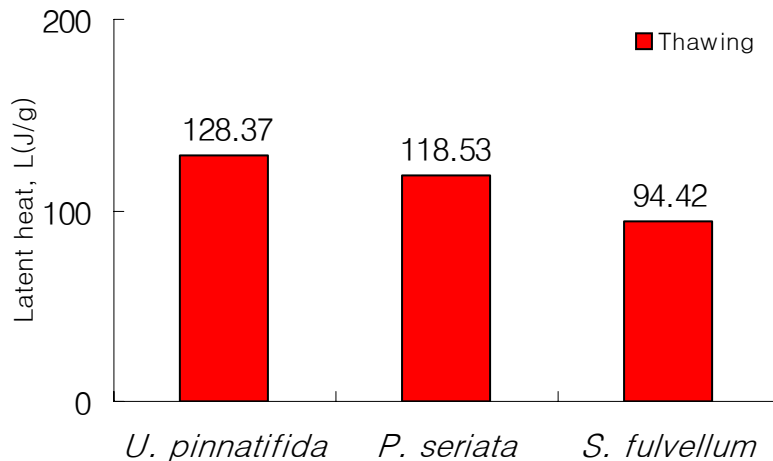


Fig. 103. Latent heat of thawing.

(6) 해동 Kinetics 해석

(가) 해동 속도 상수

사상체의 해동과정에서의 해동개시온도에서 해동종료온도 사이의 흡열반응에서의 반응에 따른 반응속도상수를 동결과정에서와 동일하게 (1)식에 의하여 구하였다. 흡열반응곡선의 해동온도와 해동종료온도의 구간을 등간격으로 10등분하여 등분한 각 온도 구간에서의 누적 해동잠열(A)과 Heat flux(dH/dt), 해동속도( $V_f$ )와의 관계식으로부터 해동속도상수( $k_f$ )를 구하였다.

해조류의 해동과정에서의 해동이 가장 빠르게 진행되는 온도범위를 결정할 수 있으며, *P. seriata*, *U. pinnatifida*, *S. fulvellum*의 해동과정에서도 동결과정과 동일하게 해동 초기에 해동반응속도상수 값이 높게 나타나고 있으며, 해동 초기에 사멸율이 높은 것으로 판단된다(Table 40~Table 42).

Table 40. Kinetic constant of *Porphyra seriata* in process of thawing $( \times 10^{-5} )$ 

Material	Cooling rate ( °C/sec )								
	0.1	0.2	0.5	0.75	1.0	1.25	1.5	1.75	2.0
<i>P. seriata</i>	57.766	59.657	193.224	307.989	661.947	529.368	1319.597	3328.831	7071.627
	38.506	47.716	60.386	184.793	353.038	340.308	659.728	1109.612	1296.389
	26.568	38.174	45.090	144.370	282.430	256.145	555.560	693.507	975.319
	18.995	27.677	34.102	115.496	207.139	237.303	456.466	624.156	718.324
	15.001	24.721	28.489	96.959	187.678	195.866	398.950	536.312	650.784
	12.552	17.851	27.229	87.497	170.925	186.080	366.721	474.107	578.526
	10.930	19.223	27.078	79.652	156.776	173.792	342.431	447.424	334.594
	7.436	12.049	22.530	71.847	122.006	84.808	155.557	287.278	90.995
	0.619	1.297	29.232	10.847	14.342	8.698	27.988	44.622	10.740

Table 41. Kinetic constant of *Undaria pinnatifida* in process of thawing $( \times 10^{-5} )$ 

Material	Cooling rate ( °C/sec )								
	0.1	0.2	0.5	0.75	1.0	1.25	1.5	1.75	2.0
<i>U. pinnatifida</i>	28.261	45.606	175.927	740.015	543.006	1664.046	2210.224	3574.362	1377.369
	16.957	36.481	81.179	224.260	203.666	693.426	573.021	1042.521	918.163
	10.766	38.507	54.467	157.875	157.194	453.831	420.995	774.444	584.308
	8.695	32.832	47.115	120.929	146.775	361.768	342.670	595.726	479.977
	7.022	27.360	41.295	95.490	120.186	283.794	314.343	527.858	413.198
	5.861	25.677	37.331	86.015	103.441	260.639	296.981	494.232	391.683
	5.578	23.904	35.028	78.730	97.687	345.193	283.628	463.335	365.762
	4.226	15.846	29.536	60.286	90.150	225.813	169.674	144.419	99.498
	0.813	2.820	7.123	11.608	22.839	57.581	29.005	23.231	13.156

Table 42. Kinetic constant of *Sargassum fulvellum* seaweed in process of thawing

( × 10<sup>-5</sup> )

Material	Cooling rate ( °C/sec )			
	0.1	0.5	1.0	2.0
	596.675	851.203	3489.471	20022.224
	136.738	709.335	2093.683	7508.342
	78.728	378.312	1284.125	4692.713
	62.153	246.400	866.351	3488.724
<i>S.fulvellum</i>	52.035	224.623	710.818	2919.911
	43.813	182.400	599.321	2626.681
	39.500	178.057	549.162	2442.472
	20.164	165.958	119.639	1384.938
	1.894	135.030	12.727	255.385

(나) 활성화 에너지

활성화에너지(Ea)는 해동시작온도에서 해동종료온도 사이의 각 온도에서의 해동이 진행되기 위해서 필요로 하는 최소의 열량으로서 해동속도상수의 대수로그값 (lnk<sub>t</sub>)을 y축의 값으로 하고 해동이 진행되는 각 온도의 절대온도를 역수(1/T)로 하여 x축으로 하고 그래프화한 1차식으로부터 기울기를 측정함으로써 (2)식에 의하여 계산한 결과는 Table 43~Table 45와 같다. 해동과정에서의 활성화에너지는 *P. seriata* -175062 J/g · mole ~ -70639.9 J/g · mole, *U. pinnatifida* -120729 J/g · mole ~ -62624 J/g · mole, *S. fulvellum* -174502 J/g · mole ~ -80786 J/g · mole 의 값을 나타내었다. 또한 동결과정에서는 활성화에너지에 비하여 1/5~1/10의 비율로 작은 값을 가지므로 동결보다는 해동의 진행시에 *P. seriata*, *U. pinnatifida*, *S. fulvellum*에 대한 영향이 매우 작았다.

Table 43. Activation energy of *Porphyra seriata* in process of thawing

Material	Cooling rate ( °C/min )								
	0.1	0.2	0.5	0.75	1.0	1.25	1.5	1.75	2.0
<i>P.seriata</i>	-175062.4	-147119.19	-29807.582	-96563.901	-117099.94	-96897.355	-81057.81	-70699.899	-134720.56

Table 44. Activation energy of *Undaria pinnatifida* in process of thawing

Material	Cooling rate ( °C/min )								
	0.1	0.2	0.5	0.75	1.0	1.25	1.5	1.75	2.0
<i>U. pinnatifida</i>	-120729.17	-71297.667	-108771.69	-117687.2	-67431.061	-62624.429	-759777.067	-85874.086	-85554.273

Table 45. Activation energy of *Sargassum fulvellum* in process of thawing

Material	Cooling rate ( °C/min )			
	0.1	0.5	1.0	2.0
<i>S.fulvellum</i>	-167932.87	-49246.628	-174502.57	-80786.69

(다) 해동 열물성 측정

해동과정 중의 엔트로피(S), 엔탈피(H), 자유에너지(F)의 변화는 해동진행 중에 계(System)의 내부에서 일어나는 열적변화를 추정할 수 있으므로 해조류의 해동을 위한 조건의 설정이 가능하다. 해동과정에서의 활성화에너지를 (3)식에 대입하고 (4)식에 의하여 구한 한 결과는 Fig. 104~Fig. 106와 같다. 엔트로피 및 엔탈피의 변화에서 보는 바와 같이 해동속도에 따라서 차이는 보이고 있으나, 최소의 엔탈피 및 엔트로피의 값을 가지는 해동속도는 0.1°C/min를 제외하고는 *P. seriata*, *S. fulvellum*은 동일하게 1.0°C/min가 적절하나, *U. pinnatifida*은 0.75°C/min가 적정한 것으로 나타났다. 자유에너지는 해동속도는 0.1°C/min를 제외하고는 *P. seriata*, *S. fulvellum*은 동일하게 0.5°C/min가 적절하나, *U. pinnatifida*은 1.0°C/min가 적정한 것으로 나타났다. 이러한 차이는 조직상의 구조 및 조성성분의 차이에 기인하는 것으로 판단된다. 이상의 결과로부터 해동속도는 급속해동을 제외하고는 0.5°C/min~1.0°C/min로 하는 것이 타당하다고 생각된다.



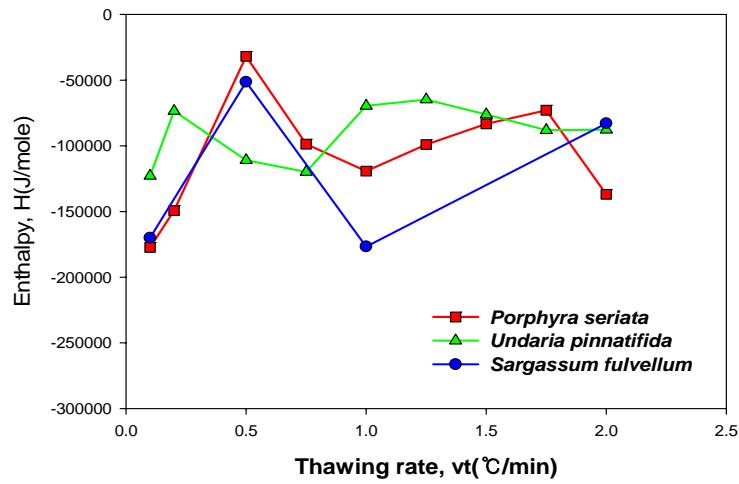


Fig. 104. Relations of enthalpy and thawing rate.

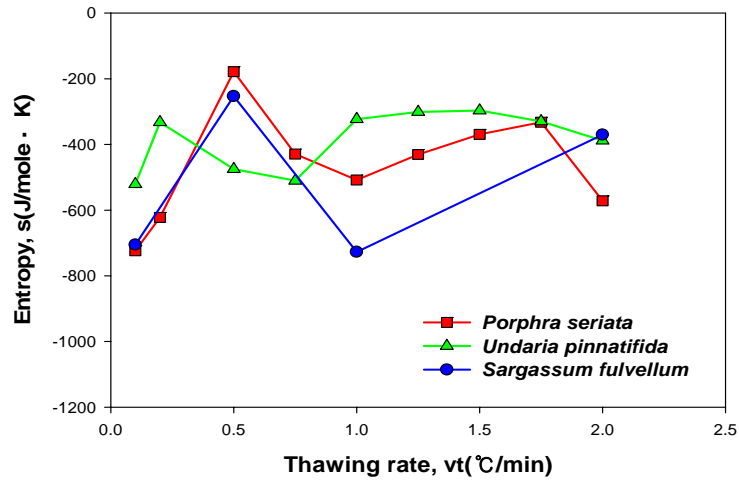


Fig. 105. Relations of entropy and thawing rate.

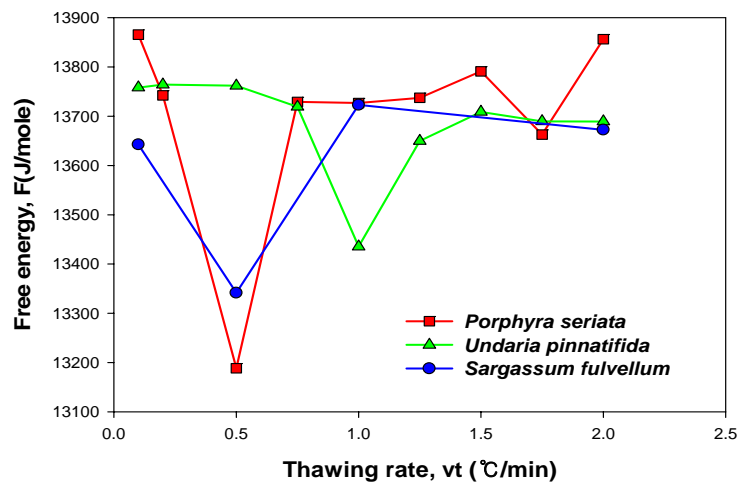


Fig. 106. Relations of free energy and thawing rate.

## 제 6 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 목표달성도

#### 1. 종보존을 위한 동결 및 해동 조건의 최적화

홍조류(김과래목)에서 참김(*Porphyra tenera*), 방사무늬김(*P. yezoensis*), 잇바디돌김(*P. dentata*), 모무늬돌김(*P. seriata*), 긴잎돌김(*P. pseudolinearis*), *P. haitanensis*. 갈조류(다시마목)에서 다시마(*Laminaria japonica*), 미역(*Undaria pinnatifida*) (모자반목)에서 모자반(*Sargassum fulvellum*), 툫(*Hizikia fusiforme*). 녹조류(갈파래목)에서 가시파래(*Enteromorpha prolifera*), 청각(*Codium fragile*)을 이용한 적정 동결, 해동실험 및 생존율을 조사하여, 각 종별 동해방어제, 농도 등 적정 동결조건 및 해동조건에 대하여 결과를 얻었으며(대한민국 특허 0539726), 이상의 결과는 당초 목표를 충분히 달성하였다.

#### 2. 원종묘와 동결 보존종묘의 비교생물학적 실험

대상 해조에 대하여 동결 전·후의 종묘에 대하여 비교배양 함으로서 t-검정을 통한 형태적 분석과 생리·유전학·분자생물학적 검증을 하였다.

또한, 동결 전·후의 시료에 대하여 투과전자현미경(TEM)을 이용하여 세포내 미세구조를 관찰하였다. 그 결과, 동결전후의 시료에 대하여 차이가 없었음을 알 수 있었다.

#### 3. 해조류의 종보존을 위한 동결 및 해동 공정에서의 열특성 연구

동결속도에 따른 동결잠열의 측정은 *P. seriata*를 대상으로 빙결정의 성상을 저온 현미경 및 3차원 연상처리시스템에 의하여 측정하였으며, DSC에 의하여 동결속도에 따른 동결점 및 동결잠열을 측정함으로써 연구결과를 얻었고, 동결 Kinetics 해석하였다.

빙결정의 3차원 분포의 경우 3차원 빙결정 측정장치 및 저온현미경을 이용하여 포자의 동결에 따른 빙결분포 및 해동과정에서의 빙결정의 용해에 관한 현상을 측정하였다.

해동상태에서의 열특성 측정의 경우 *P. seriata*, *U. pinnatifida*, *S. fulvellum*의 해동 0.1~2.0°C/min에서의 해동 DSC곡선으로부터 해동개시온도, 해동최대온도, 해동종결온도, 해동잠열을 측정하였다.

또한, 해동 DSC곡선을 Partial Kinetics Program을 이용하여 10등분함으로써 각각의 단위 구간에서의 Heat Flux, 활성화에너지, 엔탈피, 엔트로피, 자유에너지를 측정함으로써 최적의 해동속도를 결정하였다. 이상의 결과는 당초 목표를 충분히 달성한 결과이다.

## 제 2 절 기대효과

### 1. 기술적 측면

현재 국내에서 해조류의 보존은 액체배지에 의한 계대배양법을 사용하고 있다. 계대 배양법은 손쉽게 많은 해조류를 배양할 수 있다는 이점은 있으나, 많은 시·공간이 필요한 점, 오염의 가능성, 장기간 배양시 포자형성 능력의 저하와 유전적 변이 등 원래 성질의 변화 가능성 등의 단점이 있다. 동결보존법은 장기간 보존 가능, 적은 시·공간으로 유지 가능, 유전적 안정성 등의 이점이 있으나 현재는 많은 해조에서의 기술개발이 이루어져 있지 않다.

해조류의 동결보존법 개발은 육상식물의 배양세포의 동결보존법을 모델로 해서 시작한 예가 많으며, 대부분 육상식물에서의 방법에 준거하고 있다. 현재 해조류의 동결보존은 동결매액으로서 대부분 50~100% 천연 해수를 사용하며, 동해방어제로서 DMSO, 글리세롤, 에틸렌글리콜 등이 이용되며, 여기에 프롤린, 만니톨, 텍스트란, 솔비톨, 폴리비닐피로니돈 등을 첨가하기도 한다. 냉각 방법은 동결대상해조에 따라서 다소 다르나, 2단계 동결법을 채용하고 있다. 해동 방법은 주로 급속 해동법을 채용하고 있다. 그러나, 동결보존에 적합한 세대, 조직, 세포의 종류, 그들의 생리적 상태나 전처리방법, 동결속도의 정확한 제어, 생존율의 정확한 측정법 등 아직도 불명확한 점이 많다.

따라서 국내에서는 전무한 해조류의 종보존을 위한 동결보존기술개발을, 외국에서 연구된 방법들을 검토하여 더 많은 경제 해조류의 동결보존과 더 향상된 방법을 확립하려고 한다. 동결보존종의 안정적 공급과 본 연구에서 축적된 기술은 우량품종과 지적재산권 확보 등 종묘전쟁에서 질과 양의 기술 수준의 우위를 차지할 수 있다.

### 2. 경제·산업적 측면

기르는 어업에서의 종묘는 양성기술과 함께 대상어업의 성패를 좌우하나, 양성기술이 확립되어 있으면 종묘의 중요성은 더욱 커진다. 국내의 해조재배어업 중 주요 품종인 김, 미역, 다시마의 종묘는 상당수 외국에서 도입한 것으로, 유전적 침식과 더불어 여러 가지 과학적 검증이 되어 있지 않다. 또한 각종 해안공사, 매립, 오염 등 생태계 변화로 인한 고유종과 야생종의 절멸위기로 유전자원의 소멸, 품종의 획일화와 유전적 취약성 등 종과 종내의 다양성 감소가 일어나고 있다.

BT산업의 핵심중의 하나는 종묘산업이고, 종묘전쟁의 원인이다. 따라서 무분별한 외래품종의 도입을 방지하고, 다양한 유전자원을 수집·보존하여 base collection과 active collection을 구축하고, 자원의 특성 정보 data base와 passport data를 data base화하여 종묘은행을 운영하며, 우량품종의 안정적 장기보존, 적지적종의 안정적공급, 연안 생태

계 보존용과 기능성 종묘보존 등으로 해조재배업을 포함한 해조산업 경영의 안정화, 소득증대, 수출확대, 고부가가치성 등 기능성 종묘의 유전·육종학 연구 유도로 해조의 고도이용화 촉진, 지적재산권(종묘, 동결보존방법 등)취득으로 국제적 기술 우위를 점유하여 경제·산업적 이익에 크게 기여할 수 있다.

### 3. 사회·문화적 측면

우량종묘의 안정적 공급으로 생물식민주의를 방지하고, 해조 재배어업의 활성화와 경영내용의 상향 안정화는 고령화와 후계자 문제의 해결에 고기능성 등 브랜드상품은 海藻食文化의 정착과 국민의 건강·기호 등 소비자의 욕구 해결에 직결되며, 국제 종묘전쟁에서의 우위와 지적소유권 점유, 세계 시장 석권, 수출 증대, 해조 식문화의 수출 등 사회·문화적 또는 문화 경제적 측면에서도 국가 위상의 제고를 꾀할 수 있다.

## 제 7 장 연구개발결과의 활용계획

### 1. 기술적 측면

- 개발된 핵심기술 및 성과물을 수산기술관리소에 이전함으로써 계대배양의 문제점을 해결하여 안정적인 대 어민지도에 기여.
- 종묘은행 설치 운영을 통해 종묘의 안정적 공급 기술체계 확립.
- 대형해조의 동결보존기술 선진국인 일본의 장기불황으로 민자소멸과 더불어 연구자양성이 곤란하나, 우리나라는 수산기술개발과제로 집중연구가 가능하여 기술적 우위 점유와 연구자 양성 가능.
- 우량품종, 고유종 및 절멸위기종의 안정적 장기보존가능.
- 연안 생태계 보존용 등 기능에 따른 종묘의 보존과 공급 체계 확립으로 갯녹음, 연안 수질오염대책 방안 가능.
- 연안 수산자원 증강을 위한 조장 조성 기술개발 유도 가능.
- 해조류 다양성 생물학과 보전생물학 발전에 일조.

### 2. 경제 · 산업적 측면

- 동결 보존종묘를 수산기술관리소 및 각 연구기관과 공유하고 나아가 이 품종들을 보급함으로써 우량품종의 안정적 공급이 이루어져 계획적인 어민 소득 창출.
- 우량 종묘의 안정적 공급으로 해조산업종묘의 상향 안정화, 소득증대, 수출확대 등으로 어가경제발전, 후계자 문제 해결 및 어촌 상향 안정화 가능.
- 정부의 세계 일류 상품 육성 계획에 일조.
- 고기능성 · 고부가가치성 품종개발 유도로 해조의 고도 이용화 가능.
- 해조 식문화 정착 · 발전에 일조.
- 지적 재산권 취득과 국제적 기술 우위 점유로 경제 · 산업적 이익에 기여.
- 해조종묘 산업 기반 확립 가능.

※ 다양성생물학, 보전생물학의 발전에 따른 종과 유전자보급을 위한 종묘은행 또는 유전자은행의 필요성 부각에 따라 이 연구결과는 기반기술로 자리 잡음.

[별지 제11호 서식]

## 수산특정연구개발사업 연구성과활용결과 보고서

① 연구과제명	해조류 종보존을 위한 동결 보존기술 개발					
② 주관연구기관	전라남도 해양바이오산업연구원		③ 총괄연구책임자	조영현 (인) (전화 : 061-275-1025) (H·P: 019-619-0201)		
④ 참여기업			⑤ 총연구기간	2002년 10월~2005년 10월 (3년 0월)		
⑥ 연구개발비 (천원)	계	300,000	⑦ 총참여연구원 (명)	총인원	22	
	정부출연금	300,000		내부인원	12	
	기업부담금			외부인원	10	
	기타					
⑧ 주요 연구개발 목표 및 연구내용(간략히 작성) - 연구목표 및 내용 해조류 동결과정에서 열역학적 특성의 측정(보존 경제성의 증대)을 통해 동결과정에서 동결상태의 빙결정 성장과 해조류 생존율 관계를 규명하여 유용해조류(김과래목, 다시마목, 갈파래목)의 동결보존 기술을 개발하여 유전자원 보존을 위한 종묘은행 설치에 활용한다.  - 연구결과 및 결과별 활용가능영역(산업체활용, 교육·지도활용, 정책활용 등) 유용해조류(김과래목, 다시마목, 갈파래목)의 지역별 재배품종의 종묘확보로 계대배양 및 대량배양을 통한 시료확보와 동해방어제를 이용한 예비동결 및 해동실험으로 적정 동해방어제의 검토, 예비동결조건 검토, 해동속도 검토, DMSO 첨가조건 검토와 해동 후 동해방어제 제거법 검토 등을 통한 생존율을 조사하였고, 대상 해조의 비교생물학적 검증으로 생리, 분자생물학적 검증을 실시하였다. 동결속도에 따른 빙결정 성장 측정, 동결속도에 따른 동결점 및 동결잠열 측정과 동결 Kinetics를 해석함.						
연 구 성 과 의 활 용	⑨ 연구성과활용 총괄 (해당되는 모든 란 기재)					
	산업화 (기술실시계약 체결건수)	산업화 추진실적 (보류, 중단 등)	교육·지도활용	정책활용	타연구에 활용 및 2단계연구에 활용	기타 활용 (내용 : )
	건	건	21건	건	건	1건
	산업재산권	학술지 게재	학술대회 발표	언론·저널보도	전시회참가	인력양성 (학사/석사/박사 등)
	1건 (국내 : 1건) (국외 : 건)	2건 (국내 : 1건) (국외 : 1건)	4건 (국내 : 2건) (국제 : 2건)	6건 (국내 : 6건) (국외 : 건)	건 (국내 : 건) (국제 : 건)	2건
	연수지원	인력교류	국제회의 신설/개최	기타 홍보 (내용 : )		
건	건	건	건			

연구성과 활용의 활용	⑩ 연구성과 활용에 따른 예상 기대효과		기술적 측면으로는 개발된 핵심기술 및 성과물을 수산기술관리소에 이전함으로써 계대배양의 문제점을 해결하여 안정적인 대 어민지도 기여와, 종묘은행 설치 운영을 통해 종묘의 안정적 공급 기술체계를 확립할 것이며, 연안 수산자원 증강을 위한 조장 조성 기술개발 유도가 가능할 것이다. 또한, 해조류 다양성 생물학과 보전생물학 발전에 일조할 것으로 보여진다. 경제·산업적 측면으로는 동결 보존종묘를 수산기술관리소 및 각 연구기관과 공유하고, 나아가 이 품종들을 보급함으로써 우량품종의 안정적 공급이 이루어져 계획적인 어민 소득 창출에 기여할 것이다. 우량 종묘의 안정적 공급으로 해조산업종묘의 상향 안정화, 소득증대, 수출확대 등으로 어가 경제발전, 후계자 문제 해결 및 어촌 상향 안정화가 가능할 것으로 기대되어진다. 그리고 고기능성·고부가가치성 품종 개발 유도로 해조의 고도 이용화 가능, 지적 재산권 취득과 국제적 기술우위 점유로 경제·산업적 이익에 기여 등 해조종묘 산업 기반 확립 가능할 것이다.				
	⑪ 연구성과 활용시 애로사항 및 건의사항		해당없음				
	⑫ 산업화 활용(기술실시계약 체결)내역 또는 산업화 추진실적						
	성	업체명 (대표자 및 연락책임자)	전 번	화 호	업체현황 (설립시기, 자본금, 직원수 등)	산업화시기 (예정)	기업활용유형 (신제품명 및 특성, 공정개선등)
	과						
	의	※ 기술료징수내역					
	활	1년차( 년)		2년차( 년)		3년차( 년)	
	용	4년차( 년)		5년차( 년)		6년차( 년)	
		7년차( 년)		8년차( 년)		현재징수총액	
	⑬ 실적(1년동안)						
	수입대체효과 (백만원/년)	수출증대효과 (백만원/년)	매출증대효과 (백만원/년)	생산성향상효과 (백만원/년)	고용창출효과 (인력양성인원수)	기타	
⑭ 향후 기대효과							
	수입대체효과 (백만원/년)	수출증대효과 (백만원/년)	매출증대효과 (백만원/년)	생산성향상효과 (백만원/년)	고용창출효과 (인력양성인원수)	기타	

⑮ 교육 및 지도활동 내역							
교육명칭	교재명	일시	장소	참석 대상	인원	주요내용	기대효과
해조류재배학 및 실험	O.H.P교재	20030917	수해양관 820호	학부생	24	해조류동결보존의 중요성, 방법	종묘의 동결보존 중요성 환기
해조류종묘생산	O.H.P교재	20030915	수해양관 820호	대학원생	17	해조류동결보존의 중요성, 방법	종묘의 동결보존 중요성 환기
조류배양증식공학	O.H.P교재	20030916	수해양관 820호	산업대학원생	27	해조류동결보존의 중요성, 방법	종묘의 동결보존 중요성 환기
조류재배학 특론	O.H.P교재	20030929	수해양관 820호	대학원생	6	해조류동결보존의 중요성, 방법	종묘의 동결보존 중요성 환기
해조류종묘생산	프린트물의 기타	20040916	여수대학교 강의실	학부생	22	동결보존	동결보존의 중요성 이해
육종학	프린트물의 기타	20041006	여수대학교 강의실	학부생	31	동결보존	동결보존의 중요성 이해
유전학	육종학범론	20041012	여수대학교 강의실	학부생	24	동결보존	동결보존의 중요성 이해
육종학특론	유전학의 이해	20041009	여수대학교 강의실	대학원생	35	동결보존	동결보존의 중요성 이해
어업인 교육	프린트물의 기타	20030512	전라남도 수산시험 연구소	어업인	18	해조양식및종보존방법	해조류동결보존의 중요성
해양수산행정과정	O.H.P교재	20040302	전남도 공무원교육원	공무원	24	해조류 양식	해조류동결보존의 중요성
어업인교육	O.H.P교재	20040503	전라남도 수산시험 연구소	어업인	10	해조양식 및 종보존방법	해조류동결보존의 중요성
조류학특론	O.H.P교재	20040301	수해양관 820호	대학원생	36	해조류동결보존의 중요성, 방법	종묘의 동결보존 중요성 환기
유전학특론	O.H.P교재	20040301	수해양관 820호	산업대학원	2	종묘의 동결보존 중요성 환기	종묘의 동결보존 중요성 환기
유전체학 및 실험	O.H.P교재	20040901	수해양관 820호	학부생	42	해조류동결보존의 중요성, 방법	종묘의 동결보존 중요성 환기
해양수산실무과정	O.H.P교재	20050314	전남도 공무원교육원	공무원	24	해조류양식	해조류동결보존의 중요성
어업인 교육	O.H.P교재	20050607	전라남도 수산시험 연구소	어업인	26	해조양식 및 종보존방법	해조류동결보존의 중요성
형질 및 집단 유전학	O.H.P교재	20050307	수해양관 820호	대학원생	15	해조류동결보존의 중요성, 방법	종묘의 동결보존 중요성 환기
유전학특론	O.H.P교재	20050308	수해양관 820호	산업대학원생	3	해조류동결보존 중요성 환기	종묘의 동결보존 중요성 환기
유전학	O.H.P교재	20050309	수해양관 820호	학부생	23	해조류동결보존의 중요성, 방법	종묘의 동결보존 중요성 환기
식물생리학 및 실험	O.H.P교재	20050310	수해양관 820호	학부생	33	해조류동결보존의 중요성, 방법	종묘의 동결보존 중요성 환기
분자생물학	O.H.P교재	20050310	수해양관 820호	학부생	19	해조류동결보존의 중요성, 방법	종묘의 동결보존 중요성 환기
⑯ 정책활동 내역(수산시책 반영 및 정책건의)							
시책명		주관부처		일시		시책추진실적 및 계획	기대효과
⑰ 타 연구개발사업에의 활용							
연구사업명		연구제목		연구자		연구기간	본 연구와의 관계



연 구 성 과 의 활 용	⑱ 산업재산권(발명특허, 실용신안, 의장 등)											
	구 분 (발명특허, 실용신안 등)		명칭(기술명)		출원국가	출원			등록			
						출원인	출원일	출원번호		등록인	등록일	등록번호
	국 내	발명특허	동결보존에 의한 해조류의 종 보존방법		대한민국	전라남도	20030814	10-2003- 0056619		전라남도	20051222	0539726
	국 외											
	⑲ 국내외 전문학술지 게재											
	연구자		연구제목			학술지명	통권, 호		년, 월		발행기관(국명)	
	국 내	조영현외 8명	Cryopreservation of Sporothalli of the Genus Porphyra(Bangiales, Rhodophyta) from Korea			Algae	18(4),321-331		20031201		한국조류학회	
	국 외	Kazuyoshi Kuwano 외 4명	Cryoperservation of Gametophytic Cells of Laminariales(Phaeophyta) in Liquid Nitrogen			J. Phycol	40,606-610		20040310		미국조류학회	
	⑳ 국내 및 국제학술회의 발표											
	발표자		발표제목			학술대회명	인쇄물 명칭, 통권, 호		년, 월, 일		장소, 국명	
	국 내	조영현 외 4명	홍조류 김 사상체의 동결보존			한국양식학회	p68		20031024		강릉대학교 Korea	
	국 내	김민용 외 6명	Freezing characteristics of Porphyra seriata Undaria pinnatifida and Sargassum ulvellum for the cryopreversation of algae			한국생물공학회	(XV),304-308		20041013		충북대학교 Korea	
	국 외	조영현 외 2명	Cryopreservation of Sporothalli of the Genus Porphyra(Bangiales, Rhodophyta) from Korae			The eighth international symposium on the cfficient application and preservation of marine biological resources	p54-61		20031003		후쿠이현립대학 Japan	
	국 외	강성필 외 8명	Cryopreservation methods and trait comparison between pre- and post-cryoperservation of two green algae			Proceeding of the international symposium on the efficient application and preservation of marine biological resources	p212-213		20051102		여수대학교 Korea	
	㉑ 홍보실적(신문, 방송, 저널 등)											
	홍보유형 및 매체		제 목			내 용			일시		홍보면 (채널)	
	지방일간지		전남 해양바이오 산업 메카로 육성			해조류 종묘은행 설치운영			20050831		호남일보	
	지방일간지		전남도, 해조류 연구 시급			해조류 종묘은행 설치운영			20050901		광주매일	
	지방일간지		해양바이오산업 메카			해조류 종묘은행 설치운영			20050901		남도일보	
	지방일간지		양식해조류 신품종 개발 박차			해조류 종묘은행 설치운영			20050901		광남일보	
지방일간지		전남도 해조류 신품종			해조류 종묘은행 설치운영			20050901		전남매일		
지방일간지		해조류 신품종 개발 통해 전남 해양바이오 메카로			해조류 종묘은행 설치운영			20050901		무등일보		

연 구 성 과 의 활 용	㉒ 전시회 등 참여(전시회, 박람회, 제품설명회 등)						
	행사주최	행사명칭	참가주체	전시품목	일시	장소	
	㉓ 인력양성(학사, 석사, 박사 등 인력양성)						
	일자	종류 (학사, 석사, 박사)	이름	성별(남/녀)	졸업지역(학위받은 지역)		
	20030226	박사	조영현	남	여수대학교		
	20060217	박사	강성필	남	여수대학교		
	㉔ 연수지원(단순 학회참석 등 제외, 장기는 2개월 이상)						
	구분	이름	분야	장·단기	국내·외	기간	지역
	㉕ 인력교류						
	교류구분	장·단기구분		대상자이름	기간		
	㉖ 국제회의 신설/개최 ※ 국제회의(외국인 5인 이상 포함, 총 20인 이상 참석)의 신설 또는 개최에 대하여 회의명, 분야, 규모, 장소, 지원금액을 구체적으로 작성. 단, 외국인 초청 세미나는 제외						
	회의명	분야	참가국	인원	개최장소	지원금액	
㉗ 기타 활용 및 홍보실적							

※ 첨부 : 작성내용 증빙자료 사본(기제출 자료는 제외)

## 제 8 장 참고문헌

- Abe Institute, Fuji Economy Inc. 1986. Survey on pharmacological effect of algae. Abe Institute Fuji Economy Inc. 207 pp
- Arasaki S. and Arasaki T. 1983. Vegetables from the sea. Japan Publications, Inc. 196 pp.
- Akatsuka I. ed. 1990. Introduction to applied phycology. SPB Academic Publishing bv. 683 pp.
- Bajaj Y. P. S. and Reinert J. 1977. Cryobiology of plant cell cultures and establishment of gene-banks. In: Reinert J. and Bajaj Y. P. S. ed. Applied and fundametal aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Springer-Verlag. pp. 757-777.
- Baust J. M. 2002. Molecular mechanisms of cellular demise associated with cruopreservation failure. Cell Preserv. Techno. 1: 17-31.
- Ben-Amotz A. and Gilboa A. 1980a. Cryopreservation of marine unicellular algae. I. A survey of algae with regard to size, culture age, photosynthetic activity and chlorophyll-to-cell ratio. Ecol. Prog. Ser. 2: 157-161.
- Ben-Amotz A. and Gilboa A. 1980b. Cryopreservation of marine unicellular algae. II. Induction of freezing tolerance. Ecol. Prog. Ser. 2: 221-224.
- Benson E. E. 1990. Free radical damage in stored plant germ plasm. International Board of Plant Genetic Resources, Rome. 55 pp.
- Bousfield I. J. 1984. Maintenance of industrial and marine bacteria and bacteriophages, In: Kirsop B. E. and Snell J. J. S. ed. Maintenance of microorganisms. Academic Press, New York, pp. 63-68.
- Chapman V. J. and Chapman D. J. 1980. Seaweeds and their uses. 3rd ed. Chapman and Hall. 334 pp.
- Chen T. H. H., Kartha K. K., Constabel F. and Gustav L. V. 1984a. Freezing characteristics of cultured *Catharanthus roseus* (L). G. Don cells treated with

- dimethylsulfoxide and sorbitol in relation to cryopreservation. *Plant Physiol.* 75: 720-725.
- Chen T. H. H., Kartha K. K., Leung N. R., Kurz W. G. W., Chatson K. B. and Constabel F. 1984b. Cryopreservation of alkaloid producing cell cultures of periwinkle (*Catharanthus roseus*). *Plant Physiol.* 75: 726-731.
- Chirapart A. 2002. Application of marine animal effluents for cultivation of *Gracilaria* and *Caulerpa* in Thailand. Abstracts of 2002 JSP and APPF Joint Conference. Tsukuba, Japan. 47 p.
- Chung I. K., Kang Y. H. and Lee J. A. 2002. Application of *Porphyra* cultivation in fish farm effluent treatment. Abstracts of 2002 JSP and APPF Joint Conference. Tsukuba, Japan. 47 p.
- Cunniff P. 1995. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 16th Edition, Association of Official Analytical Chemists. Virginia. U.S.A.
- Day T. G. and Brand J. J. 2005. Cryopreservation methods for maintaining microalgal cultures. In: Andersen R. A. ed. Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press. pp. 165-187.
- Day J. G. and Fenwick C. 1993. Cryopreservation of members of the genus *Tetraselmis* used in aquaculture. *Aquaculture* 118: 151-160.
- Day J. G. and McLellan M. R. ed. 1995. Cryopreservation and freeze-drying protocols. *Methods in Molecular Biology* 38. Humana Press. Totowa. New Jersey. 254 pp.
- Fahy G. M., MacFarlane D. R., Angell C. A. and Merymann. H. T. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21: 407-426.
- 藤吉榮次・山崎誠・塊頭鈞 1993a. ナラワスサビノリ糸状體の超低温保存. *水産増殖* 41: 85-87.
- 藤吉榮次・山崎誠・塊頭鈞 1993b. ナラワスサビノリ糸状體の超低温保存における豫備凍結条件の検討. *水産増殖* 41: 547-551.
- Franks F. 1985. Biophysics and biochemistry at low temperatures. Cambridge University Press. Cambridge. 250 pp.

- Fujiyoshi E. 1997. Cryopreservation on *Porphyra*. Nat. Hist. Res. Special Issue No. 3: 83-87
- Fujiyoshi E., Yamasaki M. and Kito H. 1993. Cryopreservation of conchocelis of *Porphyra yezoensis* form. *narawaensis*. Suisanzoshoku 41: 85-87 (in Japanese with English abstract).
- Fujiyoshi E., Yamasaki M. Umezawa S. and Kito H. 1993. Prefreezing conditions for cryopreservation of conchocelis of *Porphyra yezoensis* form. *narawaensis* Suisanzoshoku 41: 547-551.(in Japanese with English abstract).
- Guiry M. D. and Blunden G. 1991. Seaweed resources in Europe : Uses and potential. John Wiley and Sons. 432 pp.
- Hikichi K., E. Terauchi M. Okauchi and N. Saga. 1996. Methods for cryopreservation of some species of the food microalgae (NRIA culture collection). Cryobiol. Cryotechnol. 42: 85-92 (in Japanese with English abstract).
- Jo Y.-H., Kang S.-P., Seo T.-H., Choi S.-J., Ko K.-H., Kuwano K., Saga N., Kim M.-Y. and Shin J.-A. 2003. Cryopreservation of sporothalli of the genus *Porphyra*(Bangiales, Rhodophyta) from Korea. Algae 18:321-331.
- Kamei Y. 1999. Biological activity of marine algal ingredients. Fragrance J. 4:22-28(in Japanese with English abstract).
- Kawai M. 1995. Algae supporting our health. In: Kamada H. and Hori H. ed. Animal and Plant Resources in the 21st Century Nihonkeizaihyoronsha. pp. 41-76(in Japanese).
- Kirsop. B. E. and Snell. J. J. S. (Eds). 1984. Maintenance of Microorganisms. Academic Press. London.
- Kirsop B. and Doyle A. 1991. Maintenance of microorganisms and cultured cells. Academic Press. London. 308 pp.
- Kono S., Kuwano K. and Saga N. 1998. Cryopreservation of *Eisenia bicyclis*(Laminariales, Phaeophyta) in liquid nitrogen. J. Mar. Biotech. 6: 220-223.
- Kono S., Kuwano K., Ninomiya M., Onishi J. and Saga N. 1997. Cryopresrvtion of *Enteromorpha intestinalis* (Ulvaes, Chlorophyta) in liquid nitrogen.

Phycologia 36: 76-78.

- 桑野和可. 1994. アマノリ属藻類(紅藻ウシケノリ目)の 絲状體の 凍結保存の 實用化に 關する 研究. 東京水産大學 大學院 博士學位 論文.
- Kuwano K. and Saga N. 2000. Cryopreservation of marine algae: Applications in biotechnology. In: Figerman M. and Nagabhushanam R. ed. Recent advances in marine biotechnology. Volume 4: Aquaculture. Part A, Seaweeds and invertebrates. Science Publishers Inc, New Hampshire pp. 23-40.
- Kuwano K., Aruga Y. and Saga N. 1992. Preliminary study cryopreservation of the conchocelis of *Porphyra yezoensis*. Fish. Sci. 58: 1793-1798.
- Kuwano K., Aruga Y. and Saga N. 1993. Cryopreservation of the conchocelis of the marine alga *Porphyra yezoensis* Ueda (Rhodophyta) in liquid nitrogen. Plant Sci. 94: 215-225.
- Kuwano K., Aruga Y. and Saga N. 1994. Cryopreservation of the conchocelis of *Porphyra*(Rhodophyta) by applying a simple prefreezing system. J. Phycol. 30: 566-570.
- Kuwano K., Aruga Y. and Saga N. 1996. Cryopreservation of the clonal gametophytic thalli of *Porphyra* (Rhodophyta). Plant Sci. 116: 117-124.
- Kuwano K., Kono S., Jo Y.-H., Shin J.-A. and Saga N. 2004. Cryopreservation of the gametophytic cells of Laminariales (Phaeophyta) in liquid nitrogen. J. Phycol. 40: 606-610.
- Kraemer G-P., Yarish C. and Carmana R. 2002. Comparison of the bioremediation of *Porphyra* spp. Abstracts of 2002 JSP and APPF Joint Conference. Tsukuba, Japan. 47 p.
- Leeson E. A., Cann J. P. and Morris G. J. 1984. Maintenance of algae and protozoa. In: Kirsop B. and Snell J. J. S. ed. Maintenance of Microorganisms. Academic Press, London. p. 131-160.
- Lembi C. A. and Waaland J. R. ed. 1988. Algae and human affairs. Cambridge Univ. 590 pp.
- Li P. H. and Sakai A. ed. 1978. Plant cold hardiness and freezing stress. Academic

- Press, New York. p. 345-359.
- Lobban C. S. and Harrison P. J. 1994. Seaweed Ecology and Physiology. Cambridge University Press New York.
- Mazur P. 1969. Freezing injury in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 20: 419-448.
- Mazur P. 1977. The role of intracellular freezing in the death of cell cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 14: 251-272.
- Mazur P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications *Am. J. Physiol.* 247: C125-C142.
- Mazur P., Cole K. W., Hall J. W., Schreuders P. D. and Mahowald A. P. 1992. Cryobiological preservation of *Drosophila* embryos. *Science* (Washington, D.C.) 258: 1932-1935.
- 右田清治 1966. アマノリ葉体の生体凍結保存-II. 長崎大學水産學部研究報告 21: 131-138.
- 右田清治 1967. 凍結アサクサノリ糸状体の生存と殻胞子放出. 長崎大學水産學部研究報告 22: 33-43.
- McLachlan J. 1973. Growth media-marine. In: Stein J. R. ed. *Handbook of phycological methods : Culture methods and growth measurements*. Cambridge Univ. Press. pp. 25-51.
- McLellan M. R. 1989. Cryopreservation of diatoms. *Diatom Res.* 4: 301-318.
- Migita S. 1964. Freeze-preservation of porphyra thalli in viable state-I *Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ.* 17: 44-54 (in Japanese with English abstract).
- Migita S. 1966. Freeze-preservation of *Porphyra* thalli in viable state-II. Effect of cooling velocity and water content of thalli on the frost resistance. *Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ.* 21: 131-138 (in Japanese with English abstract).
- Migita S. 1967. Viability and spore-liberation of conchocelis-phase, *Porphyra tenera*, freeze-preserved in sea water *Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ.* 22, 33-43 (in Japanese with English abstract).
- Miura A. ed. 1992. *Cultivation of edible algae in Japan*. Koseisha Koseikaku.

- 150 pp.(in Japanese).
- Morris G. J. 1976. The cryopreservation of *Chlorella*. 1. Interactions of rate of cooling, protective additive and warming rate. *Arch. Microbiol.* 107: 57-62.
- Morris G. J. 1978. Cryopreservation of 250 strains of Chlorococcales by the method of two-step cooling. *Br. Phycol. J.* 13: 15-24.
- Morris G. J. 1981. Cryopreservation: An Introduction to cryopreservation in culture collections. Institute of Terrestrial Ecology, Cambridge. 27 pp.
- Morvan P. Y., Ars H., Vallee R. and Kurata Y. 1999. The world of algae and its evolution as regards cosmetics. *Fragrance J.* 4: 69-75(in Japanese with English abstract).
- Nakane T. 1999. Development of marine materials for cosmetic in recent year. *Fragrance J.* 4: 58-68(in Japanese with English abstract).
- Nakao Y. and Fusetani N. 1999. Useful marine natural products. *Fragrance J.* 4: 17-21(in Japanese with English abstract).
- Nei, T. 1969. Freezing and drying of microorganisms.
- 根井外喜男. 1971. 低温生物学概説, 東京大学出版会.
- 根井外喜男. 1972. 凍結・乾燥と細胞障害, 東京大学出版会.
- 根井外喜男. 1972. 凍結・乾燥と保護物質. 東京大学出版会.
- 根井外喜男. 1977. 微生物の保存法, 東京大学出版会.
- 能登谷正浩. 1987. 有用海藻のバイオテクノロジー。恒星社厚生閣.
- Nisizawa K. 2002. Seaweeds Kaiso. Japan Seaweed Association. 106 pp.
- Osborne J. A. and Lee D. 1975. Studies on the conditions required for optimum recovery of *Tetrahymena pyriformis* strain S (phenoset A) after freezing to and thawing from -196°C. *J. Protozool.* 22: 233-237.
- Ott R. L. and Longnecker M. 2001. An introduction to statistical methods and data analysis. 5th ed. Duxbury, Thomson Learning, Wadsworth Group, CA. 1152 pp.



- Provasoli L. 1966. Media and prospects for the cultivation of marine algae. In: Watanabe A. and Hattori A. ed. Cultures and Collections of Algae, Proc. U.S. - Japan Conf., Hakone, September Japan. Soc. Plant Physiol., Tokyo. pp. 63-75.
- Rall W. F. and Fahy G. M. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at  $-196^{\circ}\text{C}$  by vitrification. Nature (London) 313:573-5.28.
- Reinert. J. and Bajaj. Y. P. S. (Eds). 1997. Applied and Fundametal Aspects of Plant Cell. Tissue. and Organ Culture. Springer-Verlag. Berlin.
- 嵯峨直恒. 1989. 海洋生物のジーンバンク。 海洋出版社.
- 嵯峨直恒. 桑野和可. 2000. 海洋生物資源の系統保存, 特に 海洋植物を 主とした 現状と展望について。 低温生物工學會誌. 46(1), 38-42.
- 嵯峨直恒. 松永是. 1991. ラボマニュアル・マリンバイオテクノロジー。 裳華房
- Renard P., Arbault S., Kaas R. and Perez R. 1992. A method for the cryopreservation of the gametophytes of the food algae *Undaria pinnatifida*(Laminariales). Comptes. Red. Acad. Sci. Series III-Life Sciences 315: 445-451.
- Saga N., Sakanishi Y. and Ogishima T. 1989. Method for quick evaluation of cell viabillity in marine macroalgae. Jpn. J. Phycol. 37: 129-136.
- Saga N. and Kuwano K. 2000. Pedigree-preservation of marine organism resources, featuring marine plants. Cryobiology and Cryotechnology, 46(1), 38-42.
- 酒井昭 1990. 植物細胞の液體窒素温度における生存の機序と保存法の問題點. 月刊海洋 22: 113-120.
- 酒井 昭. 1992. 凍結保存 : 動物・植物・微生物, 朝倉書店.
- Sakai A. 1993. Cryogenic strategies for survival of plant cultured cells and meristems cooled to  $-196^{\circ}\text{C}$ . Reprint from JICA GRP REF No. 6. 26 pp. JICA, Tokyo.
- Sakai A. and Otsuka K. 1967. Survival of plant tissue at super-low temperature V. An electron microscope study of ice in cortical cells cooled rapidly. Plant Physiol. 42: 1680-1694.
- Sakai A. and Sugawara Y. 1978 Survival of plant germlasm in liquid nitrogen. In: Li P. H. and Sakai A. ed. Plant cold hardness and freezing stress. Academic

- Press, New York. 345-359.
- Sakai A., Kobayashi S. and Oiyama I. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports* 9: 30-33.
- Sakanishi Y. and Saga N. 1994. Survival of female gametophytic cells of *Laminaria diabolica* Miyabe (Phaeophyta) in liquid nitrogen. *Fish. Sci.* 60: 623-624.
- Saks N. M. 1978. The preservation of salt marsh algae by controlled liquid nitrogen freezing. *Cryobiology* 15: 563-568.
- Sato M. 1999. Functions of alginate and the application for cosmetics use. *Fragrance J.* 4: 76-84 (in Japanese with English abstract).
- Shin J.-A. 1999. Cultivation of *Porphyra* and *Undaria* in Korea : challenge and prospective. '99 International Symposium of the Korean Society of Phycology : Environmentally Friendly Seaweed Mariculture in the 21st Century, Jeju National University, Korea. 7-8, and the lecture.
- Sokal R. R. and Rohlf F. J. 1995. *Biometry*. 3rd ed. W.H. Freeman and Company, NY. 887 pp.
- Steponkus P. L. ed. 1992 *Advances in low-temperature biology*. Vol.1. Jai Press. London.
- Steponkus P. L. 1984. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 543-584.
- Sugawara Y. and Sakai A. 1974. Survival of suspension cultured sycamore cells, cooled to the temperature of liquid nitrogen. *Plant Physiol.* 54: 722-724.
- 照本勳 1965. スサゼノリの凍結と乾燥. *低温科学 生物編* 23: 11-20.
- 土屋仁 1989. ノリのフリーリビング糸状体の凍結保存について. *千葉水試研報* 47: 35-36.
- 土屋仁 1992. ノリのフリーリビング糸状体の凍結保存について-II 凍害防禦剤と凍結方法について. *千葉水試研報* 50: 37-43.
- Taniguchi K. 1991. Marine afforestation of *Eisenia bicyclis* (Laminariales, Phaeophyta.) *NOAA Tech Rpt NMFS* 102: 47-57.

- Taylor R. and Fletcher R. L. 1999. Cryopreservation of eukaryotic algae—a review of methodologies. *J. Appl. Phycol.* 10: 481–501.
- Terumoto I. 1965. Freezing and drying in a red marine algae, *Porphyra yezoensis* Ueda. *Low Temp. Sci. Ser. B* 23: 11–20 (in Japanese with English abstract).
- Tsuchiya H. 1989. Cryopreservation of free-living conchocelis of *Porphyra yezoensis*—III. *Bull. Chiba Pref. Fish. Exp. Sta.* 52: 27–30(in Japanese).
- Tsuchiya H. 1992. Cryopreservation of free-living conchocelis of *Porphyra yezoensis*—II. Cryoprotectants and freezing method. *Bull. Chiba Pref. Fish. Exp. Sta.* 50: 37–43(in Japanese).
- Tsuchiya H. 1994. Cryopreservation of free-living conchocelis of *Porphyra yezoensis*. *Bull. Chiba Pref. Fish. Exp. Sta.* 47: 35–36(in Japanese).
- Ulrich J. M., Finkle B. J., Moore P. H. and Ginoza H. 1979. Effect of a mixture of cryoprotectants in attaining liquid nitrogen survival of callus cultures of a tropical plant. *Cryobiology* 16: 550–556.
- Van der Meer J. P. and Simpson F. J. 1984. Cryopreservation of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta) and other macrophytic marine algae. *Phycologia* 23: 195–202.
- Watanabe M. M. and Sawaguchi M. 1995. Cryopreservation of a water-bloom forming cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa* f. *aeruginosa*. *Phycol. Res.* 43: 111–116.
- Watanabe, M. M., Shimizu A. and Satake K. N. 1992. NIES-microbial culture collection at the National Institute for Environmental Studies: Cryopreservation and database of culture strains of microalgae. In : Watanabe M. M. ed. *Proceedings of the Symposium on Culture Collection of Algae*. National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Japan. pp. 33–41.
- Welch B. 1938. The significance of the difference between two means when the population variances are unequal. *Biometrika* 29: 350–362.
- West J. A. 2005. Long-term macroalgal culture maintenance. In: Andersen R. A. ed. *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press. pp. 157–163.
- Yarish C. 1999. Developing a sustainable *Porphyra*/salmon integrated aquaculture for

bioremediation and production of food and biochemicals. '99 International symposium of the Korean Society of Phycology : Environmentally Friendly Seaweed Mariculture in the 21st century. Jeju National University Korea. 9-17, and the lecture.

Yarish C., Rawson Jr. M. V., Chopin T., Wang D. R., Chon C., Carmona R., Chen C., Wang L., Ji R. and Sullivan J. 2002. Ecosystem modeling : A tool to understand the interactions between extractive and fed aquaculture. Abstracts of 2002. JSP and APPF Joint Conference, Tsukuba, Japan. 47 p.

**Appendix**

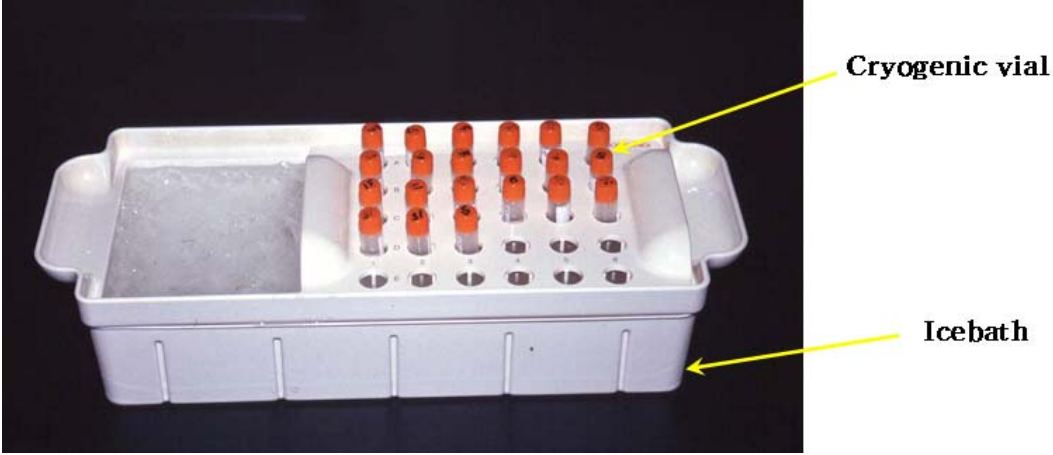


Photo 1. Aliquot of 1.5 ml material suspension into 2.0 ml cryogenic vials.

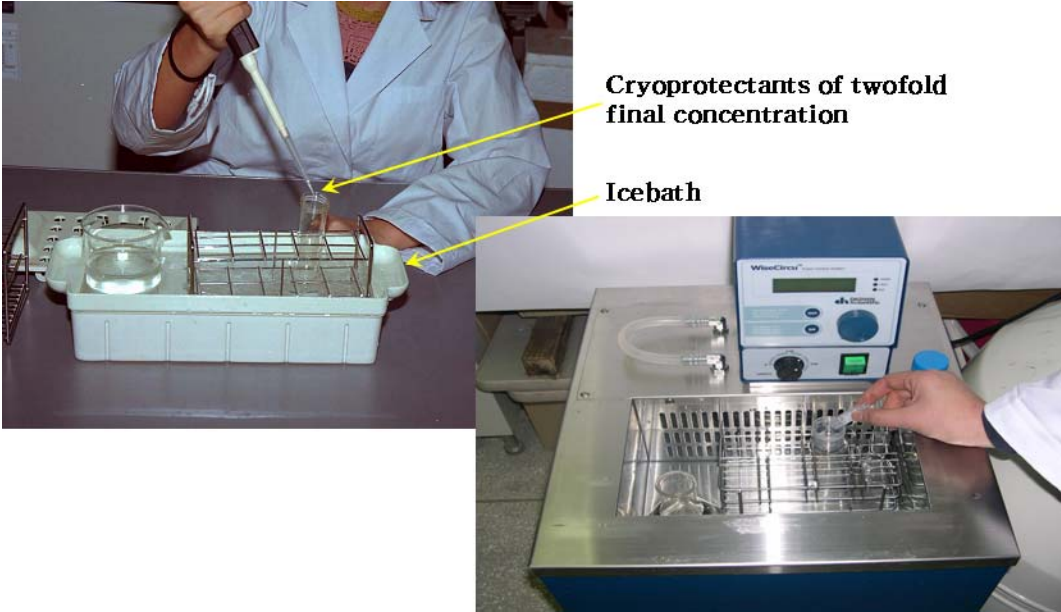


Photo 2. Gradual addition of twofold cryoprotectants of equal volume of material suspension.

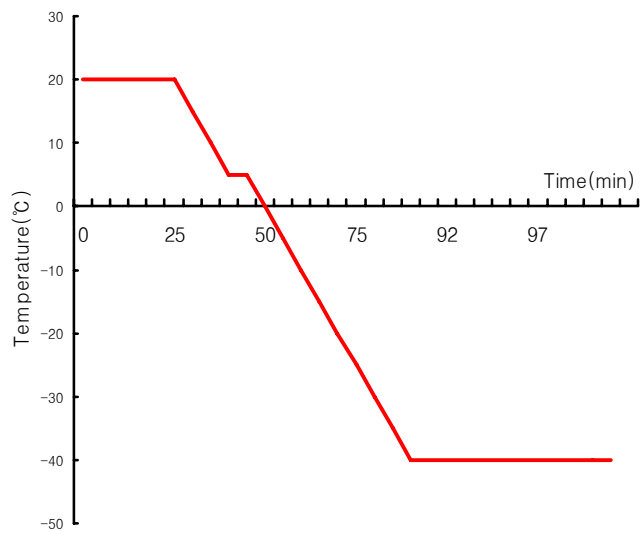


Photo 3. A programmable freezer for prefreezing. Slow cooling to  $-40^{\circ}\text{C}$  at a speed of  $1^{\circ}\text{C} / \text{min}$ .



Photo 4. Rapid cooling in LN. Immersing rapidly a holder with vials into LN.



Photo 5. Small(left) and large(right) storage tanks for cryopreservation.



Photo 6. Thawing in a water bath at 40°C(left) and put into an ice bath(right).

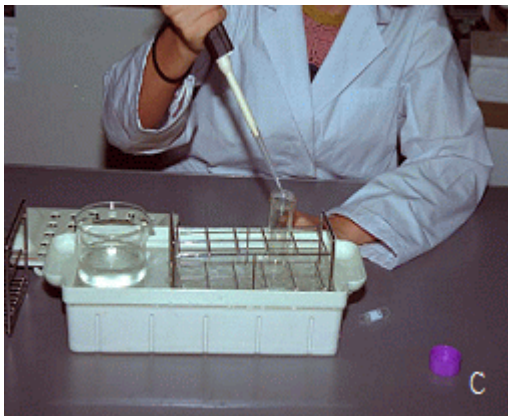


Photo 7. Cryoprotectants removal. The suspension was transferred into a tube(A and B) and it was gradually diluted by ice-chilled seawater(C). and the centrifugal separation was performed for supernatant removal(D).



## 주 의

1. 이 보고서는 해양수산부에서 시행한 수산특정연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 해양수산부에서 시행한 수산특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.