J Plant Biotechnol (2018) 45:400-408
DOI:https://doi.org/10.5010/JPB.2018.45.4.400

ISSN 1229-2818 (Print)
ISSN 2384-1397 (Online)

Research Article

해양 규조류 *Nitzschia* sp.의 초저온동결보존을 위한 보존제의 영향 분석

이인혜 · 전지영 · 김경미 · 강명석

Screening of cryoprotectants (CPAs) for cryopreservation in the *Nitzschia* sp. of marine microalgae

In Hye Lee · Ji Young Jeon · Kyeung Mi Kim · Myung suk Kang

Received: 21 September 2018 / Revised: 29 November 2018 / Accepted: 3 December 2018
ⓒ Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Biodiversity has continued to degrade in the 21st century due to global warming occasioned by destruction of the environment around the world.. The Nagoya protocol places Korea in a unique position to effectively develop and protect its domestic genetic resources. Microalgae under study in this research contains large amount of antioxidant substances such as beta carotene and astaxanthin, that can be used as biological resource owing to the large amounts of biomass that can be secured through photosynthesis. However, it is difficult to preserve it since cryopreservation method used for long-term preservation is yet to be developed. A basic study for long term cryopreservation was carried out on *Nizschia frustulum* and *Nitzschia amabilis* which belong to marine diatoms. As cryoprotectants (CPAs), glycerol, DMSO, and methanol which penetrate into cells were prepared at 5%, 10%, and 15% concentrations each, in case of methanol, it was tested at concentrations of 5%, 10% and 12% by its nature. Two kinds of microalgae, *N. frustulum* and *N. amabilis*, were diluted with 10^2, 10^3 and 10^4 cells ml $^{-1}$, respectively. The highest survival rate was shown at12% concentration of methanol, and the figures were 6.94 ± 0.31% in *N. frustulum* and 8.85 ± 0.16% in *N. amabilis*. As a result of 3 weeks cultivation of thawed microalgae after freezing, the result is shows that *N. frustulum* increased about 10 times faster and *N. amabilis* increased about 12 times the original concentration.

Keywords microalgae, diatom, cryoprotectants (CPAs)

I. H. Lee · J. Y. Jeon · K. M. Kim · M. S. Kang (✉)
국립생물자원관 유용자원활용과 생물소재연구팀
e-mail: rosemaker@korea.kr

서 언

생물자원을 안정적으로 보존하는 것은 자국의 생물주권 확립 및 생물 종 활용가치 제고를 위해 매우 중요하다. 생물자원의 냉동보존은 생명공학적 기술을 가미하여 각 분류군별 보존방법을 개별적으로 적용, 보존한 다음 일정기간이 지난 후 살아있는 활성 배양체로 복원이 가능하도록 하는 것이다(Brand et al. 2004). 그렇기 때문에 각 고유의 생물형태 및 특성을 이해하는 것이 보존방법 확립을 위한 첫걸음이다. 현재 장기보존 되고 있는 생물자원은 동물의 혈액 및 세포, 생식소, 식물의 종자 등 상업화로 인한 소비가 높거나 또는 보존방법이 비교적 까다롭지 않아서 쉽게 보존기술이 확립된 소재들이다(Hirano et al. 2005; Wusteman et al. 2008; Zhang et al. 2009; Kaczmarczyk et al. 2011). 미생물자원관리에 있어서 원핵생물과 균류자원은 종 특성에 관계없이 glycerol을 이용하여 보존되며 다시 활성배양체로 복원되기 비교적 용이하다(Kirsop et al. 1991; Smith et al. 1994). 하지만 미세조류자원 관리에 있어서는 냉동보존방법이 확립되어 있지 않기 때문에 액체배지를 이용한 계대배양으로 자원을 유지하고 있으며, 이에 따른 오염 및 유전적 변이가 발생하기도 한다(Burnett et al. 2001).

미세조류는 2011년 일본 대지진으로 유출된 방사성물질인 Cs, Sr, I 및 금속등을 흡착하여 오염을 정화시킨 사례가 있으며(Shanab et al. 2012; Fukuda et al. 2014), beta-Carotene, Astaxanthin 등 항산화물질을 함유하고 있어 최근 새로운 유용 생물자원으로 각광받고 있다(Priyadarshani and Rath 2012). 또한, 광합성을 통해 용이하게 생물량을 증가시킬 수 점이 생물자원으로서의 부가가치를 높이고 있다(Day et al. 2000; Rhodes et al. 2006).

미세조류의 동결보존방법은 일반적으로 저온냉장고(-80°C)와 액체질소 liquid nitrogen (-196°C)를 이용한 동결방법을

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

말하며, 액체질소에 장기보존하는 연구가 다양하게 시도되고 있다. 미세조류를 액제질소에 동결시킬 때 세포는 건조 및 삼투압 작용으로 인해 세포 내에 얼음 결정이 형성되어 세포 생존 능력이 상실되기 때문에 이를 조절하기 위한 적절한 동결보존제(Cryoprotectants: CPAs)의 선택은 매우 중요하다(Nowshari and Brem 2001). 따라서 glycerol, DMSO (Dimethyl sulfoxide), methanol 및 sucrose등과 같은 다당류와 최근 들어 개발되고 있는 동결방지단백질(antifreeze protein)과 같은 다양한 보존제를 이용한 동결보존방법이 연구되고 있다(Tzovenis et al. 2004; Bui et al. 2013; Koh et al. 2015).

미세조류를 냉동보존하기 위해서는 미세조류와 동결보존제 혼합액을 냉각시킬 때 나타나는 cell 손상 메커니즘을 이해할 필요가 있다. 이것은 두 가지 측면으로 요약 할 수 있는데, 첫 번째는 저온 보존할 때 나타나는 세포 손상으로 냉각할 때 세포내의 수분이 세포 밖으로 빠져 나와 결정을 형성하고, 세포 내에서는 용질의 농도가 상승하여 삼투압이 발생하면서 세포와 세포막에 물리적인 손상을 유발한다는 것이며(Li et al. 2010), 두 번째는 저온 보존했던 cell 을 해동 및 회복시킬 때 발생하는 세포 손상으로써 결빙될 때 유발된 세포 손상(necrosis)과정이 세포 사멸과정(programmed cell death)을 유도한다는 것이다(Durand et al. 2011). 이러한 cell 손상을 방지하기 위해서는 동결보존제를 이용한 유리화과정(vitrification)이 필요하다. 유리화라는 것은 동결보존제와 미세조류를 혼합하여 부동액 상태로 만들어 동결온도를 낮추고 점성을 높여서 결정대신 점성용액의 무형결정, 즉 유리질이 되도록 하는 것이다(polge et al. 1949; Fahy et al. 1984; Rall and fahy 1985). 시료가 냉각되는 과정에서 최대한 고압을 사용하여 동결속도를 빠르게 하는 것은 얼음결정 형성을 줄이고 균일한 유리질 얼음이 형성되는데 도움을 준다(Katkov et al. 2006; Bui et al. 2013). 이와 같은 세포의 유리화를 통한 저온동결법은 동물 세포의 동결 보존에서도 사용된다(Meikle et al. 2018).

미세조류 동결보존에 있어서 미국의 텍사스대학 조류자원은행(UTEX)이 2018년 8월 기준으로 약 488 strains의 미세조류를 냉동 보존하고 있으며(Table 1), 이러한 냉동보존에 의한 자원관리는 적은 비용으로 방대한 생물자원을 효율적으로 관리할수 있도록 하고 있다(Brand and Diller 2004). 본 연구에서는 UTEX에서 동결보존에 성공한 strains 중 국립생물자원관에 보유하고 있는 *Nitzschia frustulum* (NIBRDIC000499724)와 *Nitzschia amabilis* (NIBRDIC000499742) 두 종을 대상으로 동결보존방법에 대한 연구를 수행하였다.

Table 1 List of micro algae resources to be frozen in UTEX

Class	Saltwater strains	Freshwater strains
Bacillariophyceae	13	2
Chlorophyceae	11	337
Chrysophyceae	0	4
Cryptophyceae	2	0
Cyanophyceae	11	59
Euglenophyceae	1	5
Eustigmatophyceae	0	2
Florideophyceae	1	0
Green Alga	0	4
Prymnesiophyceae	1	0
Xanthophyceae	0	26
Unknown	0	9
Total	40	448

재료 및 방법

미세조류 종 선정

미세조류 장기보존을 위해 사용된 *Nitzschia frustulum*과 *Nitzschia amabilis* 두 종은 2016년 국립생물자원관 자생생물 조사 발굴 연구사업(조류분야)로 발굴 되었다. 채집지는 충청남도 태안군 소원면 파도리 해수욕장에서 채집되었으며. 배양조건은 F/2 배지에서 33 μmol m^{-2} s^{-1}, 20°C이다. 현재는 액체 배양방법으로 3개월마다 정기적으로 계대배양하여 유지하고 있다.

미세조류 배양체 준비

미세조류 장기보존을 위해 10^4 cells ml^{-1} 농도로 성장한 *Nitzschia frustulum* 과 *Nitzschia amabilis* 두 종을 F/2 배지에 각각 1% (v/v)씩 분주하여 33 μmol m^{-2} s^{-1}, 20°C에서 4주간 배양하였다. 조류 배양에 사용한 F/2 배지는 VISION사의 SUCTION MASTER 감압여과기와 Merck Millipore사의 0.2 ㎛ GTTP Membrane Filters를 이용하여 불순물을 여과한 해수를 121°C에서 15분간 고압멸균한 후 배지를 24°C의 적정온도로 식힌 상태에서 Guillard's (F/2) Marine Water Enrichment Solution (50x, liquid, plant cell culture tested) (Sigma aldrich, USA)을 20 ml L^{-1} 첨가하여 제조하였다. 냉동보존을 위한 cell 농도를 맞추기 위해, 4주간 10^4 cells ml^{-1}로 배양된 미세조류는 F/2 배지를 이용하여 농도를 각각 10^4 cells ml^{-1}, 10^3 cells ml^{-1}, 10^2 cells ml^{-1}로 희석하여 준비하였다.

원심분리기를 이용한 미세조류 cell 농축

4주간 10^4 cells ml^{-1}로 배양된 미세조류는 50 ml tube에 담

아서 원심분리기를 이용하여 4°C에서 5분간 4000 g로 원심분리하여 상층을 버리는 과정을 통해 점차적으로 10^5 cells ml^{-1} 농도까지 농축한다.

농도별 동결보존제 제작방법 확립

미세조류 장기보존을 위한 동결보존제는 glycerol, DMSO (Dimethyl sulfoxide), methanol을 선정하였으며 각각 10%, 20%, 30%로 멸균해수로 희석하여 제조하였다. Glycerol은 F/2 배지 에 각각 10%, 20%, 30% 농도로 첨가한 후 121°C 에서 15분간 고압멸균 하였다. DMSO와 methanol은 멸균한 해수로 농도에 맞춰 희석한 후 클린벤치에서 DMSO는 Pall Life Sciences사의 0.2 μm DMSO Safty Syringe filter를 이용하여 여과하였고, methanol은 Sartorius stedim biotech의 0.2 μm Syringe filter로 여과하여 제조하였다. Methanol의 경우 해수에 25% 이상일 때 침전물이 생겨서 완전히 용해 가능한 농도인 24%로 희석하여 제조하였다.

동결보존 방법

동결보존을 위해 배양체별로 각각 희석하여 준비한 10^4 cells ml^{-1}, 10^3 cells ml^{-1}, 10^2 cells ml^{-1} 농도의 미세조류와 동결보존제는 2 ml cryo tube에 1 ml씩(미세조류 배양체 1 ml: 동결보존제 1 ml) 혼합하여 total volume 2 ml이 되도록 제조하였다. 냉동된 cryo tube 에서 각각의 보존제 최종농도는 5%, 10%, 15%가 되도록 하였으며, Methanol의 경우 5%, 10%, 12%를 최종 농도로 사용하였다. 미세조류와 동결보존제를 혼합한 cryo tube는 isopropyl alcohol을 채운 cryo 1°C freezing container (Nalgene, USA)에 넣어 -80°C에서 1시간 30분 동안 냉동한 후, cryo box에 옮겨 단기보존은 24시간, 장기보존은 4주간 액체질소에 보관하였다.

동결 보존 후 해동 및 재배양 방법

액체질소에 보관하던 cryo box를 37°C 항온수조에 옮겨 녹을 때까지 미세조류-동결보존제 혼합액을 완전히 해동하였다. 해동된 F/2 배지 150 ml를 넣은 250 ml 삼각플라스크로 옮긴 후 파라필름으로 밀봉하여 약한 빛에서 12 h 배양한 후, 33 μmol m^{-2} s^{-1}, 20°C 배양기로 옮겨서 3주간 배양하였다.

동결 보존 후 세포 계수

재배양된 미세조류는 Sedgwick-Rfter chamber (Matsunami, Japan) 플랑크톤 계수기에 1 ml을 떨어뜨리고 glass slide를 위에 덮은 뒤 역상현미경을 이용하여 동결보존 전, 동결보존 후, 재배양 후에 온전한 형태의 세포만 계수하였다.

통계분석

동결보존제 농도별 미세조류 *Nitzschia* sp.의 생존률 결과는 SPSS (ver.17.0) One-way ANOVA를 이용하여 통계분석하였으며 tukey-test를 이용해 사후분석하였다.

결과 및 고찰

Two step 유리화 및 해동과정

미세조류 동결보존법에 있어서 미국의 텍사스 주립대학의 미세조류은행(UTEX) 이 앞선 연구를 진행하고 있다. 미세조류는 분포하는 환경에 따라서 담수조류(fresh water)와 해양조류(salt water)로 나뉘며, 과거 연구가 많이 진행된 담수조류 냉동보존법 연구가 해양조류 보다 앞서고 있다. 특히 UTEX 에서는 2018년 7월을 기준으로 2,572 strains의 조류를 활성배양체 상태로 보존하고 있으며, 이중 488주의 냉동보존법을 확립하였는데 담수조류가 90%이상으로 대부분이고 해양조류는 10% 미만을 차지하고 있다(Table 1).

동결보존법 연구에서 유리화과정은 냉각할 때 세포 내 얼음 결정 형성을 최소화하여 세포 재생률을 높이는 중요한 역할을 한다. 본 논문에서 사용한 *Nitzschia* sp. 는 해양 미세조류로 two step 유리화 과정을 통해 동결되었다(Fig. 1). 이 과정에서 중요한 것은 step 1으로 동결 보존제에 혼합된 미세조류의 손상을 최소화 하기 위해 −35 ~ -75°C 사이를 일정한 속도(0.2 ~ 1도/분)로 온도를 낮출 수 있는 freezing container에 넣은 채로 −80°C 저온냉동고에서 냉각시키는데(Fig. 2), 이때 세포 외부의 동결보존제 (cryoprotectants, CPAs)를 먼저 균질한 형태로 동결시킨다(Crutchfield et al. 1999). 액체질소에서 -196°C까지 낮추는 Two step 유리화 과정은 해양 미세조류 냉동보존에 있어서 많이 사용

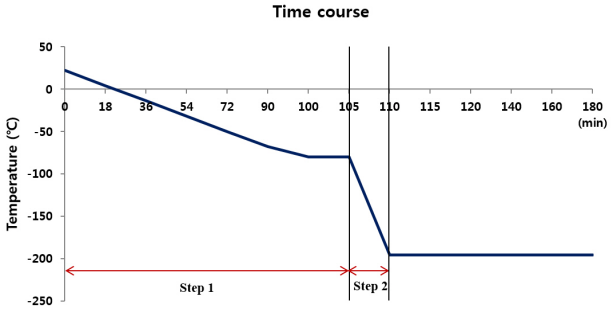

Fig. 1 Two-step freezing procedure used in the experiment for marine micro-algae cryopreservation. Step1; Cryobials were placed in a prechilled freezing container (NALGENE "Mr. Frosty") for 1.5h in a -80°C deep freezer. Mr.Frosty provides the critical -1°C/minute cooling rate required for cell cryopreservation. Step2; They were quickly transferred into a LN_2 (liquid nitrogen) storage container of -196°C

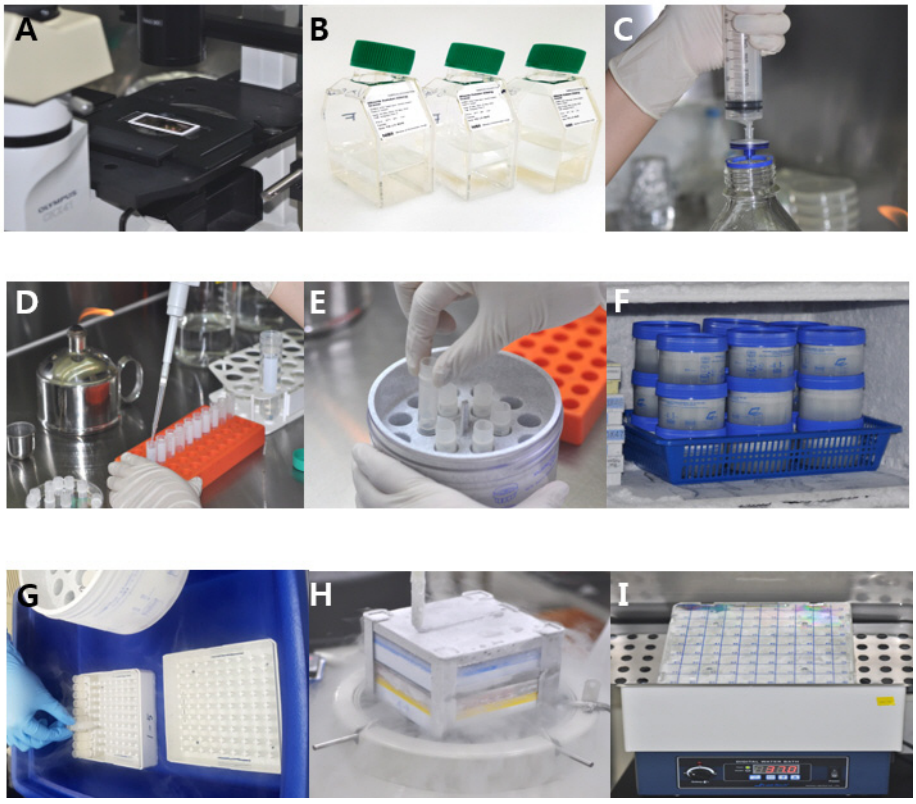

Fig. 2 Frozen process for long-term preservation of microalgae. (A); 1 μl of the culture solution is dropped on the plankton counter and the number of cells measured using a light microscope. (B); Dilute the cells based on the concentration set for cryopreservation. (C); Prepare cryoprotectants(CPAs) using a filter or autoclave according to the nature of the CPAs. (D); Add and mix 1 ml of each prepared cell and CPAs into a cryo vial to make a final volume of 2 ml. (E and F); The vial in the Mr. frosty (pre-cooled to 4 degrees) freeze to -80 degrees in a deep freezer for 1.5 hours. (G); Immediately freeze vials in cryobox pre-soaked in liquid nitrogen. (H); Carefully insert the cryobox into the designated location on the LN_2 container. Replenish liquid nitrogen while periodically checking for lack of liquid nitrogen. (I); When thawing, take out the cryo box from LN_2 and thaw it in a 37°C water bath

되는 방법으로 선행 연구에서도 같은 냉각과정을 이용하였으며, 종에 따라 차이가 있으나 상당히 높은 재생률을 나타냈다(Day and Brand 2005; Rhodes et al. 2006). 해동과정은 37°C 항온 수조에서 급속 해동 방법을 선택하였다. 해양 미세조류의 해동 후 재생률(viability)는 천천히 실온에서 해동하는 것과 빠르게 해동하는 것에 따라서 차이가 나는데 37~40°C 사이의 항온수조에서 빠르게 해동하는 것이 더 높은 재생률을 나타내기 때문에 급속 해동 방법을 선택하였다(Ben-Amotz and Gilboa 1980; Day and Fenwick 1993; Cañavate and Lubian 1995; Cañavate and Lubian 1997).

동결 보존 후 미세조류 형태 변화

미세조류 동결 전·후의 형태를 비교하기 위해 광학현미경 400배율에서 관찰한 결과 동결 전에는 규산질의 단단한 세포벽 내부에 구성 물질이 잘 갖춰진 생존 세포의 형태가 관찰되었으나 동결 후에는 세포가 사멸하였으며 내부를 차지하고 있던 구성 요소들이 방출되어 세포벽만 남은 형태가 관찰되었다(Fig. 5). 동결보존제의 종류 및 농도에 따라서는 생존 세포와 사멸 세포의 세포 농도 외에 형태적으로는 차이가 나타나지 않았다. 이것은 *Nitzschia* sp. 의 동결보존 연구 사례와 일치하는데, 규소(silica)로 구성된 세포벽이 동결보존시 발생하는 삼투압에 의해 파괴되어 세포 내 물질이 외부로 방출되고 세포벽만 남는 것으로 추정된다(Buhmann et al. 2013). 본 연구에서도 동결 보존 후와 trypan blue를 이용한 염색 결과 세포벽 잔해만 남아 있는 것이 관찰되어 이러한 사실을 입증하였다(Fig. 5와 Fig. 6). 이러한 문제점을 보완하기 위해선 특수한 동결보존제의 선별과 유리화과정을 통한 세포 내 점성의 유리질 얼음형성과정을 개선해야 할 필요성이 있다(Polge et al. 1949).

동결보존제 종류 및 농도에 따른 생존율

보존제의 선택은 동결보존에 있어서 매우 중요한 요소이다. Glycerol, DMSO, Methanol는 식물, 동물, 미생물의 유기체를 장기간 동결 보존할 때 사용하는 가장 일반적인 동결보존제들이다. 동결보존제의 종류 및 농도에 따른 미세조

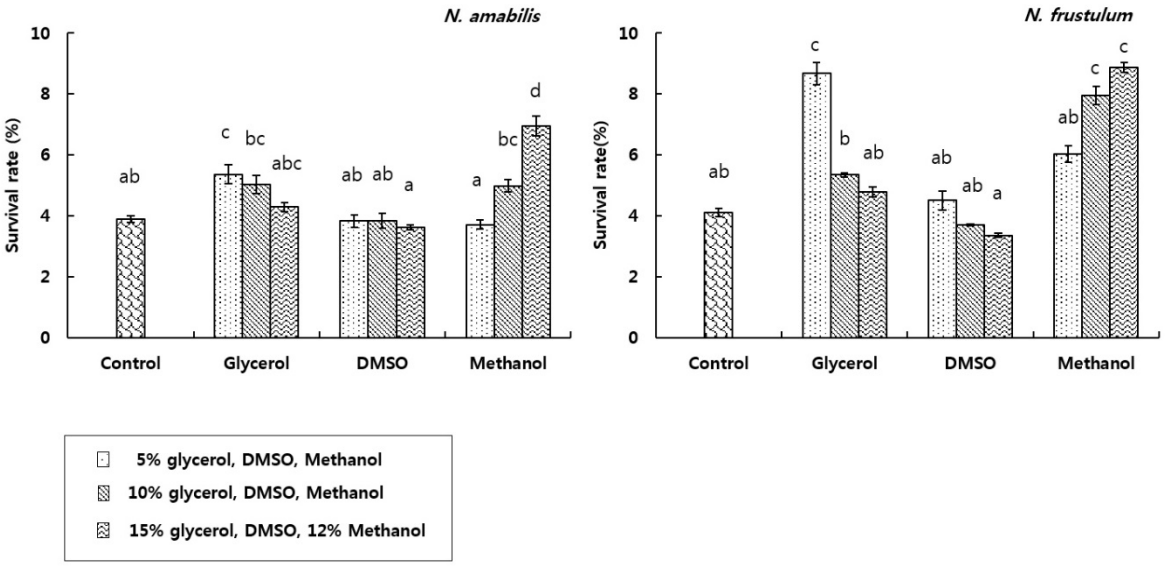

Fig. 3 Effect of various cryoprotectants (CPAs) at different concentrations on the viability of *Nitzschia amabilis* and *Nitzschia frustulum* after cryopreservation. Control cells were cryopreserved using F/2 medium instead of CPAs. The concentrations of microalgae cells used for cryopreservation was 10^4 cells ml^{-1}. Glycerol and DMSO were used as CPAs to give a final concentrations of 5%, 10%, and 15%, respectively. For methanol, the final concentration of the preservation mixture was set at 12% due to the difficulty of dissolving in F / 2 medium. In the bar graph, 5% dashed line, 10% oblique line and 15% (Methanol was 12%) staircase indicate preservative concentration. ($p<0.05$, One-way ANOVA, tukey-HSD)

류의 생존율은 *N. frustulum*과 *N. amabilis* 모두 methanol 의 함량이 높을수록 생존율이 높게 나타났고 12%에서 각각 6.94 ± 0.31%, 8.85 ± 0.16%로 가장 높은 성장률을 나타내었다. 세가지 동결보존제 중 DMSO의 경우 농도가 높을수록 생존율이 감소하였으며 두 종 모두 DMSO 15%에서 각각 3.61 ± 0.08%, 3.35 ± 0.06%로 전체 실험군 중 가장 낮게 생존하였다. Glycerol의 경우 5, 10, 15% 모두 동결보존제를 첨가하지 않은 대조구 보다는 높게 나타났지만 메탄올 12%에서의 생존율보다는 비교적 낮은 결과를 나타냈으며, glycerol함량이 낮을수록 생존율이 높아지는 양상을 보였다. One-way ANOVA를 이용한 통계분석 결과 두 종 모두 생존율이 가장 높게 나타난 메탄올 12%가 동결보존제를 첨가하지 않은 control과 유의적인 차이를 보였으며 생존율이 가장 낮게 나타난 DMSO 5, 10, 15%의 결과와도 차이를 나타냈다(Fig. 3). 본 결과는 미세조류 동결보존에 있어서 세포 내 침투가 가능한 methanol과 같은 보존제가 효율이 높다는 사례와 일치한다(Andersen 2005; Day and Brand 2005). 또한 동결보존제로서 DMSO와 methanol이 cell membrane 지질에 영향을 미치는 것으로 알려져 있는데, DMSO는 냉각될 때 membrane을 보호하지 못하지만 methanol 은 membrane의 지질 리모델링을 유도한다고 보고되어 있다(Yang and Li 2016). 이와 더불어 세포를 침투하는 보존제의 독성에 대해선 다양하게 조사되었다(Tzovenis et al. 2004). 본 연구 결과에서는 DMSO를 보존제로 사용하였을 때 보존효율이 glycerol, Methanol 과 비교했을 때 상당히 낮아지는 것을 확인하였다. 이것은 세포와 보존제가 혼합되어 세포 내에서 물질 평형을 이루는 시간이 2~3분 이상 지연될수록 보존제의 세포 독성이 강하게 나타나며 세포파괴를 촉진시키는데 DMSO는 대체로 이러한 현상이 높다고 보고된 사례와 일치하였다(Redekar and Wagh 2000; Tanniou et al. 2012). 반면, glycerol 는 보존효과는 있으나 박테리아의 번식이 발생하기 때문에 개선해야할 문제가 있다(Taylor and Fletcher 1998).

해동 후 재생률

동결보존제와 혼합된 미세조류 세포를 two step 유리화과정을 통해 냉각시킨 후 액체질소에서 48 h 보관하였다가 해동하였다. 미세조류 냉동보존 연구에 있어서 결과에 대한 평가를 할 수 있는 기준은 냉동직후 살아 있는 세포 계수와 더불어 재배양 여부이다. 동결보존 직후의 세포 계수 결과 DMSO보다는 methanol과 glycerol에서 살아있는 세포가 많았다. 또한 glycerol 보다는 methanol에서 살아있는 세포 수가 많았으며 농도가 높아질수록 효율이 높았다. 메탄올의 경우 동결보존제 제작과정에서 15% methanol은 2배 stock인 30% methanol 을 제작하게 되는데 F/2 배지에 용해되지 않고 뿌옇게 되는 현상이 있었다. 따라서 본 연구에서는 F/2배지에 녹을 수 있는 methanol의 최고 농도 24%를 사용하였고, 미세조류 세포와 혼합 후 최종 농도 12% methanol을 맞추기 위해 24% 메탄올을 제작하였다. 동결보존제로 12% methanol을 사용하였을 때 세포 독성 및 재배양 여부를 확인하기 위하여 냉동보존 된 *N. frustulum*

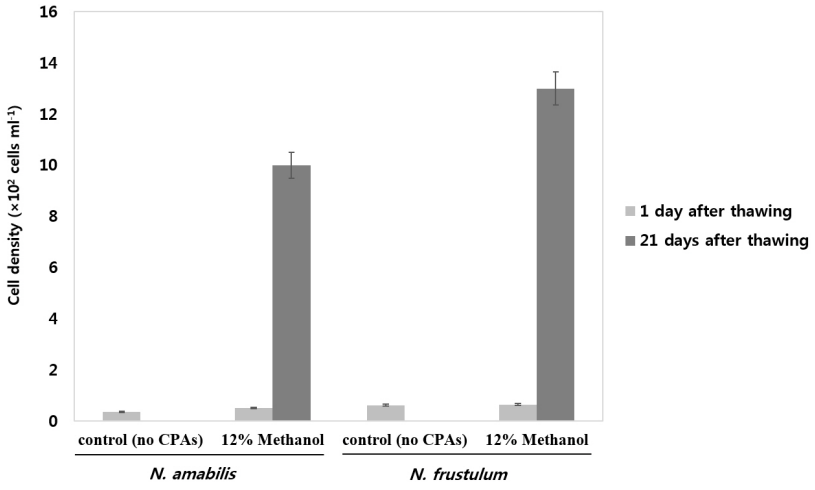

Fig. 4 Effect of cryoprotective agents on post-thaw viability (PTV). Cultures of *Nitzschia amabilis* (left) and *Nitzschia frustulum* (right) were cryopreserved with 12% Methanol, then thawed and tested for viability after 3weeks re-culture

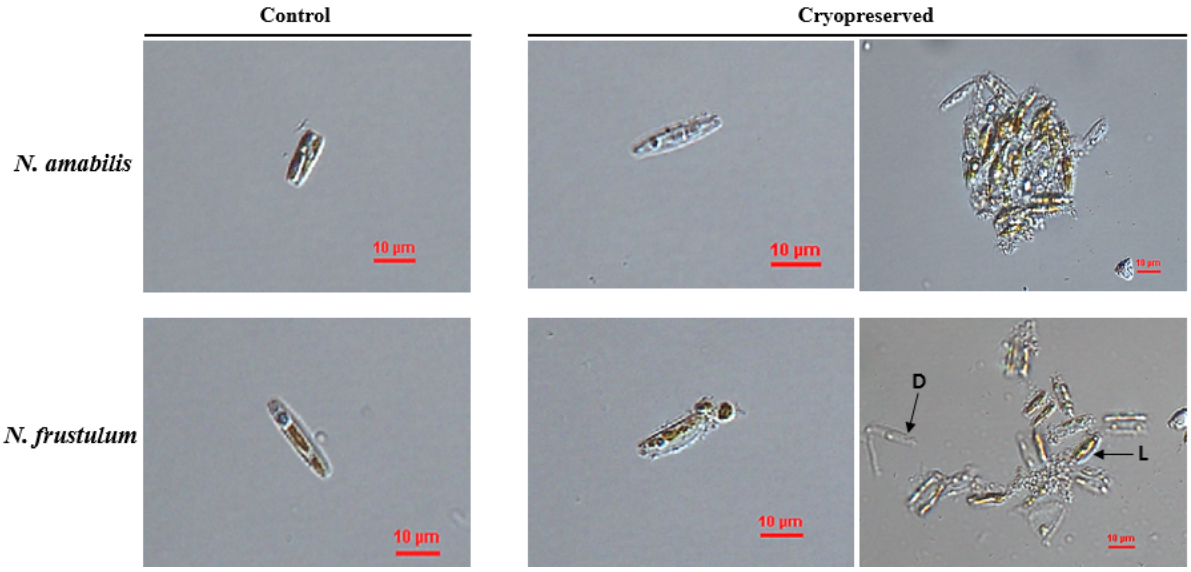

Fig. 5 Cell morphology of microalgae after cryopreservation using 12% methanol. *Nitzschia amabilis* and *Nitzschia frustulum* were mixed with CPAs and stored in LN_2 for 48 hours. Immediately after thawing, the cell shape was observed using a light microscope (D – Dead cells and degraded cellular constituents; L– living cells)

과 *N. amabilis* 또한 각각 F/2 배지를 보존제 대신 넣은 세포를 대조군으로 취하여 실험을 진행하였다. 동결 보존 후 원심분리하여 상층을 제거하는 방법으로도 수행하였으나 유실되는 양이 많아 재배양에 실패하였다(data 미제시). 따라서 원심분리에 의한 손실률을 최소화하기 위해 보존액과 미세조류가 혼합된 total volume인 2ml을 그대로 사용하였고, 보존제의 독성을 최소화하기 위해 150 ml의 F/2 배지에 넣음으로써 보존제의 영향을 약화시켰다. 그 결과 *N. frustulum*은 3주 후 약 10배 이상 재배양이 되었고, *N. amabilis*는 약12배 정도 재배양에 성공하였다(Fig. 4). 실제 냉동하지 않은 세포의 배양주기와 비교했을 때는 배양속도가 느린 경향이 있으나 동결보존 후 재배양이 되었다는 점은 매우 중요한 성과이다. 냉동보존법은 동결 및 해동 과정에서 일어나는 삼투압 스트레스, cold shock 및 세포 내, 외 얼음 형성에 의한 잠재적 손상을 감소시키는 것이 중요하다(Day et al. 2000; Blanco et al. 2008). 그러나 이렇게 세포 표면이 다당류로 둘러싸인 규조류의 경우 동결보존제의 침투 효율에 문제가 발생할 수 있으며, 동결보존제에 세포가 노출되는 시간이 길수록 해동 후 재생률(viability)이 낮아진다(Fleck 1998). 동결 직후의 생 세포 수가 약 8~10% 정도 밖에 되지 않아 위험요소가 높은 점은 본 미세조류 동결보존법 연구에서 개선되어야 할 사항이다. 또한 동결 후 살아있는 미세조류도 세포 주변에 다당류 점액질이 분비되거나, 세포내 탄수화물, 지방, 단백질

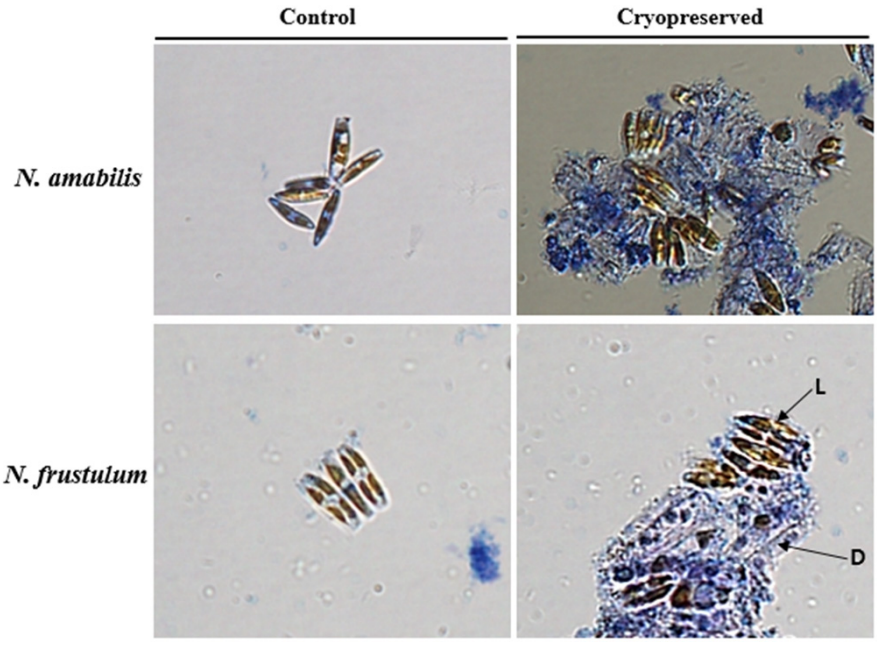

Fig. 6 Analysis of cell morphology after cryopreservation using trypan blue staining. *Nitzschia amabilis* and *Nitzschia frustulum* were mixed with 12% methanol and stored in LN2 for 48 hours. Immediately after thawing, it was directly stained with trypan blue (D – Dead cells and degraded cellular constituents; L– living cells)

의 함량이 변화하는 등의 현상이 발생하기 때문에(Kumari et al. 2016), 차후 동결 전·후 나타나는 대사과정에 대한 분석을 추가하여 동결보존 후 세포 생존률을 높일수 있는 방안을 모색중이다.

이 연구에서는 유용한 생물학적 자원인 미세조류 *Nitzschia* sp.에 대한 적절한 동결보존제를 탐색하였다. 국립생물자원관(NIBR) 국가배양센터에서는 미세조류 자원관리의 효율성을 높이기 위해 종 특성에 관계없는 균일한 동결보존제 및 보존방법 개발을 최종 목적으로 하고 있으며, 차후 연구에서는 유리화 과정을 조절하여 세포 손상을 최소화하고 분자생물학적인 접근법을 활용하여 동결 직후의 살아있는 세포 수를 높일 수 있는 방향으로 연구를 확대할 계획이다.

적 요

21세기 들어 전 세계는 환경파괴에 따른 지구 온난화로 인하여 생물 다양성이 지속적으로 감소하였다. 생물다양성의 감소는 생태계의 자정 및 복원능력 등을 악화 시켜 환경오염이 더욱 심화 되었고 나아가 생물의 생존을 위협하고 있다. 우리나라는 현재 나고야 의정서로 인해 국내 유전자원을 효율적으로 발굴 보호해야 하는 중요한 시점에 있다. 본 연구에서 사용하는 미세조류는 유용 생물자원으로 활용도가 높으나 동결보존하는 방법이 개발되어 있지 않아 장기보존에 어려움이 있다. 대부분의 원핵생물이나 균류 등의 미생물은 종에 관계없이 glycerol 을 이용하여 저온동결보존이 가능하나 미세조류는 동결보존제의 종류와 농도, 유리화 과정 및 해동방법 등에 따라 세포 재생률에 차이가 있기 때문에 구체적인 연구가 필요하다. 미세조류 중 규조류는 전 세계적으로 발견되며 규산질로 구성된 cell wall 은 이미 산업적으로 많이 이용되고 있다. 본 연구에서는 해양 규조류 *Nizschia frustulum*과 *Nitzschia amabilis*를 이용하여 장기 동결보존을 위한 기초연구를 수행하였다.

동결보존제로는 세포막 침투성 보존제인 glycerol, DMSO, methanol을 각각 5, 10, 15% 농도로 제조하여 실험하였고 메탄올의 경우 시약 특성상 5, 10, 12% 농도로 실험하였으며 미세조류는 *N. frustulum*과 *N. amabilis* 두 종을 각각 10^2, 10^3, 10^4 cells ml^{-1}로 희석하여 사용하였다. 실험에 사용한 미세조류 두 종 모두 메탄올 12%에서 가장 높은 생존율을 보였으며 *N. frustulum*은 6.94 ± 0.31%, *N. amabilis*는 8.85 ± 0.16%로 나타났다. 동결 후 해동한 미세조류를 3주간 재배양한 결과에서는 *N. frustulum*이 재배양 초기 농도보다 약10배 증가하였고 *N. amabilis*는 약12배 증가한 결과를 나타내었다. 본 연구에서는 유용생물자원인 미세조류 *Nizschia* sp.에 한하여 적합한 동결보존제를 탐색하였으며 이 자료를 바탕으로 더 많은 동결보존제에 대한 효과와 다양한 미세조류 종에 적합한 동결보존 기법 연구가 필요한 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 환경부의 야생생물 유전자원 활용지원기반 구축(1800-1844-308) 연구사업의 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

References

Andersen RA (2005) Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press New York 578p

Ben-Amotz A, Gilboa A (1980) Cryopreservation of marine unicellular algae. I. A survey of algae with regard to size, culture age, photosynthetic activity and chlorophyll-to-cell ratio. Mar. Ecol. Prog. Ser 2:157-161

Blanco JM, Long JA, Gee G, Donoghue AM, Wildt DE (2008) Osmotic tolerance of avian spermatozoa: influence of time, temperature, cryoprotectant and membrane ion pump function on sperm viability. Cryobiology 56:8-14

Brand JJ, Diller KR (2004) Application and theory of algal cryopreservation. Nova Hedwigia 79:175-189

Buhmann MT, Day JG, Kroth PG (2013) Post-cryopreservation viability of the benthic freshwater diatom Planothidium frequentissimum depends on light levels. Cryobiology 67: 23-29

Bui TV, Ross IL, Jakob G, Hankamer B (2013) Impact of procedural steps and cryopreservation agents in the cryopreservation of chlorophyte microalgae. PloS one 8:e78668

Burnett KG (2001) Recent advances in marine biotechnology. Copeia 4:1165-1167

Cañavate J, Lubian L (1995) Relationship between cooling rates, cryoprotectant concentrations and salinities in the cryopreservation of marine microalgae. Marine Biology 124:325-334

Cañavate JP, Lubian LM (1997) Effects of slow and rapid warming on the cryopreservation of marine microalgae. Cryobiology 35: 143-149

Crutchfield A, Diller K, Brand J (1999) Cryopreservation of Chlamydomonas reinhardtii (Chlorophyta). European Journal of Phycology 34:43-52

Day J, Brand J (2005) Cryopreservation methods for maintaining microalgal cultures. Algal culturing techniques: 165-187

Day JG, Fenwick C (1993) Cryopreservation of members of the genus Tetraselmis used in aquaculture. Aquaculture 118: 151-160

Day JG, Fleck RA, Benson EE (2000) Cryopreservation-recalcitrance in microalgae: novel approaches to identify and avoid cryo-injury. Journal of Applied Phycology 12:369-377

Durand PM, Rashidi A, Michod RE (2011) How an organism dies affects the fitness of its neighbors. The American Naturalist 177: 224-232

Fahy GM, MacFarlane D, Angell C, Meryman H (1984) Vitrification as an approach to cryopreservation. Cryobiology 21:407-426

Fleck R (1998) The assessment of cell damage and recovery in cryopreserved freshwater protists. Ph.D. thesis. University of Abertay, Dundee. Scotland, U.K.

Fukuda S-y, Iwamoto K, Atsumi M, Yokoyama A, Nakayama T, Ishida K-i, Inouye I, Shiraiwa Y (2014) Global searches for microalgae and aquatic plants that can eliminate radioactive cesium, iodine and strontium from the radio-polluted aquatic environment: a bioremediation strategy. Journal of plant research 127:79-89

Hirano T, Godo T, Mii M, Ishikawa K (2005) Cryopreservation of immature seeds of Bletilla striata by vitrification. Plant Cell Reports 23:534-539

Kaczmarczyk A, Turner SR, Bunn E, Mancera RL, Dixon KW (2011) Cryopreservation of threatened native Australian species—what have we learned and where to from here? In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 47:17-25

Katkov II, Isachenko V, Isachenko E, Kim MS, Lulat AGI, Mackay AM, Levine F (2006) Low-and high-temperature vitrification as a new approach to biostabilization of reproductive and progenitor cells. International Journal of Refrigeration 29:346-357

Kirsop BE, Doyle AC (1991) Maintenance of microorganisms and cultured cells. Academic Press Ltd.,London p 308

Koh HY, Lee JH, Han SJ, Park H, Lee SG (2015) Effect of the antifreeze protein from the arctic yeast Leucosporidium sp. AY30 on cryopreservation of the marine diatom Phaeodactylum tricornutum. Applied biochemistry and biotechnology 175: 677-686

Li Y, Wang F, Wang H (2010) Cell death along single microfluidic channel after freeze-thaw treatments. Biomicrofluidics 4:014111

Meikle MN, Schlapp G, Menchaca A, Crispo M (2018) Minimum volume spatula MVD vitrification method improves embryo survival compared to traditional slow freezing, both for in vivo and in vitro produced mice embryos. Cryobiology

Namrata K, Mukesh KG, Raghubansh KS (2016) Open encapsulation-vitrification for cryopreservation of algae. Cryobiology 73(2): 232-239

Nowshari M, Brem G (2001) Effect of freezing rate and exposure time to cryoprotectant on the development of mouse pronuclear stage embryos. Human Reproduction 16:2368-2373

Polge C, Smith AU, Parkes AS (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature 164: 666

Priyadarshani I, Rath B (2012) Commercial and industrial applications of micro algae-A review. J algal biomass utln 3:89-100

Rall WF, Fahy GM (1985) Ice-free cryopreservation of mouse embryos at − 196 C by vitrification. Nature 313:573

Redekar P, Wagh A (2000) Cryopreservation studies on the marine diatom Navicula subinflata Grun

Rhodes L, Smith J, Tervit R, Roberts R, Adamson J, Adams S, Decker M (2006) Cryopreservation of economically valuable marine micro-algae in the classes Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Cyanophyceae, Dinophyceae, Haptophyceae, Prasinophyceae, and Rhodophyceae. Cryobiology 52:152-156

Rhodes L, Smith J, Tervit R, Roberts R, Adamson J, Adams S, Decker M (2006) Cryopreservation of economically valuable marine micro-algae in the classes Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Cyanophyceae, Dinophyceae, Haptophyceae, Prasinophyceae, and Rhodophyceae. Cryobiology 52:152-156

Shanab S, Essa A, Shalaby E (2012) Bioremoval capacity of three heavy metals by some microalgae species (Egyptian Isolates). Plant signaling & behavior 7:392-399

Smith D, Onions AH (1994) The preservation and maintenance of living fungi. CAB international

Tanniou A, Turpin V, Lebeau T (2012) Comparison of cryopreservation methods for the long term storage of the marine diatom Haslea ostrearia (simonsen). Cryobiology 65:45-50

Taylor R, Fletcher RL (1998) Cryopreservation of eukaryotic algae−a review of methodologies. Journal of Applied Phycology 10: 481-501

Tzovenis I, Triantaphyllidis G, Naihong X, Chatzinikolaou E, Papadopoulou K, Xouri G, Tafas T (2004) Cryopreservation of marine microalgae and potential toxicity of cryoprotectants to the primary steps of the aquacultural food chain. Aquaculture 230:457-473

Wusteman MC, Simmonds J, Vaughan D, Pegg DE (2008) Vitrification of rabbit tissues with propylene glycol and trehalose. Cryobiology 56:62-71

Yang D, Li W (2016) Methanol-promoted lipid remodelling during cooling sustains cryopreservation survival of Chlamydomonas reinhardtii. PloS one 11:e0146255

Zhang E, Zhang L, Wang B, Yan B, Wang Q (2009) Cryopreservation of marine diatom algae by encapsulation-vitrification. Cryoletters 30:224-231