

진주조개, *Pinctada fucata martensii* 담륜자의 냉동보존을 위한 동해방지제의 선택

장영진 · 최윤희 · 장윤정
부경대학교 수산과학대학 양식학과

Selection of Cryoprotectants for Cryopreservation of Pearl Oyster, *Pinctada fucata martensii* Trochophore

Young Jin Chang, Youn Hee Choi and Yun Jeong Chang

Department of Aquaculture, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

요 약 : 우리나라에서 진주양식의 대상패류인 진주조개 (*Pinctada fucata martensii*) 담륜자를 냉동보존하기 위하여 4가지 동해방지제를 사용하여 냉동실험을 실시하고, 적합한 동해방지제를 찾고자 하였다. 동해방지제인 dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol, glycerol과 1,2-propanediol을 희석액인 0.2 M sucrose에 각각 0.01, 0.1, 1.0과 2.0 M이 되도록 혼합한 다음, 10분간 평형상태를 유지한 후 냉동하였다. 냉동후 해동시킨 담륜자는 모든 동해방지제에서 농도가 증가할수록 생존율이 높아졌으나, 일부 세포내 함유물이 세포 외로 유출되어 손상을 입은 개체도 보였다. 진주조개의 담륜자 냉동보존에 적합한 동해방지제는 1.0~2.0 M의 DMSO와 ethylene glycol로서 해동후 생존율이 82.8~97.4%로 가장 높았다.

ABSTRACT : To find out the desirable cryoprotectant for cryopreservation of bivalve trochophores, four types of cryoprotectant were tested with trochophores of the pearl oyster (*Pinctada fucata martensii*) generally used in the pearl production in Korea. Each cryoprotectant (dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, glycerol and 1,2-propanediol) was mixed with 0.2 M sucrose to make final concentrations of 0.01, 0.1, 1.0 and 2.0 M. The trochophores were immersed in each preparation, waiting for 10 minutes to reach equilibration and cryopreserved in the liquid nitrogen (-196°C). Survival rate of trochophores thawed after cryopreservation increased as the media concentration increase. However, a few number of the trochophores seemed to be damaged with the efflux of cell inclusions. Our study results indicate that desirable cryoprotectants for cryopreservation of pearl oyster trochophores are 1.0~2.0 M dimethyl sulfoxide and ethylene glycol : 82.8~97.4% of the trochophores cryopreserved with these media survived after thawing.

Key words : Bivalve, Pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*, Trochophore, Cryoprotectant, Cryopreservation.

서 론

일반적으로 동물 배(embryo)의 냉동보존시 냉동에 의한 손상을 막기 위해 동해방지제를 사용하는데, 동해방지제는 세포가 냉동되는 과정에서 생겨나는 세포내 전해질의 농축이나 삼투질농도의 증가와 세포내외의 빙결정 형성 등 배의 생존에 불리한 상태를 완화하거나 조절하는 작용을 갖는다(한국수정란이식학회, 1995). 동해방지제는 세포막의 통과 여부에 따라 투과형과 비투과형으로 나뉘어지는데, 투과형으로는 methanol, ethanol, ethylene glycol, acetamide, propylene glycol, dimethyl sulfoxide (DMSO), glycerin 등이 있으며, 비투과형으로는 sucrose, polyethylene glycol, dextran

등이 있다(酒井, 1987). 동해방지제의 투과속도는 분자량에 따라 달라지는데, 분자량이 적은 methanol (MW 32.04)이 가장 빨리 침투하고 분자량이 큰 sucrose (MW 342.3)는 침투하지 못한다(Renard, 1991). 또한 동해방지제의 농도가 증가하고 평형시간이 길어지면 배는 점점 더 영향을 받는데, methanol이 ethylene glycol, 1,2-propanediol, DMSO, glycerol, sucrose 등 보다 배 발달에 손상을 덜 입히는 것으로 알려져 있다(Renard, 1991). 그리고 세포막을 투과하는 동해방지제를 복합적으로 사용하였을 때에는 냉동하는 동안 배에 대한 보호효과가 높아진다(Takahashi & Kanagawa, 1985).

이와 같이 동해방지제는 냉동보존 과정에서 그 효과를 좌우하는 중요한 요인중의 하나이지만, 조개류 배에 이용하여 그 효과를 검증한 예는 드물다. Toledo et al. (1989)은 진주담치, *Mytilus edulis*의 배를 냉동할 때 DMSO를 사용하여

본 연구는 교육부 지방대특성화사업연구비 지원에 의해 이루어진 것이며, 이에 깊은 감사를 드립니다.

동해방지제의 효과를 조사하였으며, Renard (1991)는 참굴, *Crassostrea gigas*의 배에 methanol과 sucrose를, Gwo (1995)는 propylene glycol을, Chao et al. (1997)은 DMSO를 사용하여 냉동보존시 동해방지제가 배에 미치는 영향을 연구하였다. 이와 같이 조개류의 적정 동해방지제는 종에 따라 다를 뿐만 아니라 동일종이라 하더라도 연구자에 따라 서로 다른 결과를 보이고 있어, 새로운 종의 배에 대한 적정 동해방지제를 결정하기가 어렵다.

조개류 발생배의 냉동보존 기술이 개발된다면, 냉동한 유생을 사용하여 연중 종묘생산과 선발육종이 가능해지고 우량종의 유전자를 보존할 수 있다. 그리고 앞으로 환경오염에 따라 절멸위기에 있는 종의 gene pool을 구축할 수 있을 것이며, 재래종의 유전자 보존도 가능해질 것이다. 또한 보존된 알과 발생배는 입 크기가 작은 양식어류의 종묘생산시 생 먹이로도 사용될 수 있다.

따라서 본 연구에서는 진주양식에 사용되는 진주조개 (*Pinctada fucata martensii*)의 답륜자 유생을 냉동보존하기 위한 적합한 동해방지제를 찾고자, 세포막을 투과하는 DMSO, ethylene glycol, glycerol과 1,2-propanediol을 동해방지제로 하고 비투과성인 sucrose를 희석액으로 사용하여 진주조개 답륜자의 냉동보존 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

채란용 어미 조개는 경상남도 통영해역의 진주조개 양식장에서 채집하였다. 채집한 어미의 껍질에 붙어있는 이물질을 제거한 후 계측하였고, 이때 크기는 각장 63.7 ± 4.4 mm, 각고 73.5 ± 4.5 mm, 전중 45.2 ± 7.6 g이었다. 진주조개의 알과 정자를 채취하기 위하여 어미를 우:♂=5:1의 비율로 하여 50 l 들이의 플라스틱 수조에 수용한 다음, 1시간 방치하여 안정되었을 때 산란유발 자극을 주었다. 산란유발 자극으로는 간출과 수온자극의 2가지 방법을 병용하였는데, 먼저 어미를 실내에서 2시간 동안 음지에 노출시킨 다음, 23℃에서 1시간에 걸쳐 29℃까지 상승시켜 6℃의 수온자극을 주었다. 채란·채정에 이은 인공수정과 세란에는 25 μm 필터로 1차 여과한 다음, 차아염소산나트륨 150 ppm으로 소독한 해수를 사용하였다.

동해방지제에 따른 진주조개 유생의 냉동보존 효과를 파악하기 위해, 발생배의 50%가 답륜자에 이르렀을 때를 기준으로 하여 이후 16시간째에 달한 유생을 냉동보존 실험에 사용하였다. 냉동보존에 사용된 희석액으로는 인공해수(NaCl 2.7g, KCl 0.07g, NaHCO₃ 0.05g, CaCl₂ 0.12g, MgCl₂ 0.46g,

Table 1. Concentration and osmolalities of cryoprotectants used for the cryopreservation of the pearl oyster trochophore

Cryoprotectant	Concentration (M)	Osmolality (mOsm/kg)
DMSO	0.01	1226.7±11.0
	0.1	1434.3± 9.1
	1.0	> 3000
	2.0	> 3000
Ethylene glycol	0.01	1211.6±10.4
	0.1	1322.0±10.6
	1.0	2397.7± 6.7
	2.0	> 3000
Glycerol	0.01	1210.3± 6.7
	0.1	1309.7± 2.5
	1.0	2358.0±17.0
	2.0	> 3000
1,2-propanediol	0.01	1212.3± 8.7
	0.1	1343.3± 7.5
	1.0	2525.7±71.2
	2.0	> 3000

증류수 100ml)에 녹여 만든 0.2 M sucrose, 동해방지제로는 DMSO, ethylene glycol, glycerol과 1,2-propanediol을 사용하였다. 이들 4종류의 동해방지제를 희석액에 첨가하여 최종 농도가 각각 0.01, 0.1, 1.0과 2.0 M이 되도록 한 다음 냉동보존 실험을 실시하였다. 각 용액의 삼투질농도는 삼투압 측정기(The Advanced™ Osmometer)를 사용하여 측정하였으며 (Table 1), 답륜자를 각 용액에 넣은 다음 평형시간을 10분씩으로 하였다. 이후 답륜자를 0.5 ml straw (Japan, FHK)에 넣어 봉입한 다음, 0℃로 설정되어 있는 프로그램냉동기 (Samwon Freezing Engineering Co., Korea)로 옮겼다. 이어 냉동률 -1℃/분으로 -12℃가 될 때까지 냉동한 다음, 10분 동안 seeding을 한 후 냉동률 -1.5℃/분으로 -35℃까지 냉동하였다. 이후 신속히 -196℃의 액체질소통(USA, MVE)으로 옮겨 저장한 다음, 실험목적에 따라 냉동된 각 straw를 꺼내 25℃의 온수에 급속 해동하여 냉동하였던 답륜자의 생존율을 조사하였다.

모든 자료는 Computer Program Statistix 3.1 (Analytical Software, St. Paul, Min. USA)로 분산분석을 실시하여 최소 유의차 검정으로 평균간의 유의차 유무를 판정하였다.

결 과

1. DMSO

분자량 78.13인 DMSO는 투과형 동해방지제이며, 0.01~

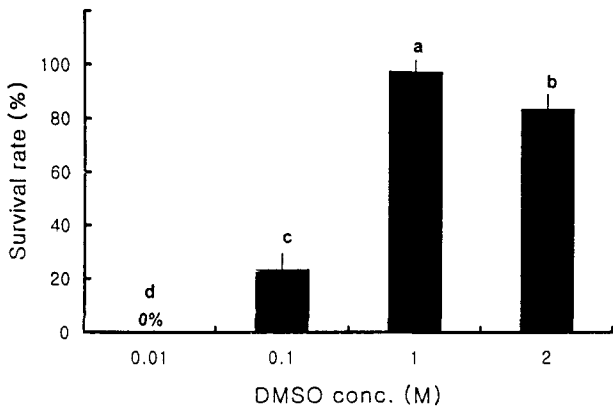


Fig. 1. Survival rates of thawed pearl oyster trochophores after freezing with four concentrations of DMSO. Different alphabetic letters on the bars are significantly different ($P < 0.05$).

2.0 M 농도를 사용하여 담륜자를 냉동한 결과, 농도에 따라 생존율에 유의한 차이가 나타났다. 농도가 가장 낮은 0.01 M에서는 담륜자가 모두 폐사하였으나, 농도가 높아질수록 생존율이 유의하게 높아져 0.1~2.0 M에서 23.2~97.4%를 나타내었다($P < 0.05$)(Fig. 1). 한편 담륜자의 외형도 농도에 따라 약간의 차이가 있었는데, 농도가 낮을수록 세포막이 파괴되어 부피가 축소되거나 일부 팽창하였으며, 소수의 담륜자에서는 세포 함유물이 세포외로 유출되었다. 이러한 현상은 고농도에서 저농도로 갈수록 심하게 나타났다.

2. Ethylene glycol

분자량 42.67인 ethylene glycol도 DMSO와 같이 투과형 동해방지제이다. 농도에 따른 담륜자의 생존율을 조사한 결과, DMSO에 비해 0.01 M 뿐만 아니라 0.1 M에서도 담륜자가 생존하지 않았다. 그러나 1.0~2.0 M에서는 82.8~90.1%가 생존하여 저농도에 비해 높은 생존율을 보였다($P < 0.05$)(Fig. 2). 해동된 담륜자의 외형은 DMSO와 같이 농도가 낮을수록 손상이 심하게 나타났으며 세포내 물질이 과립상으로 유출되었다.

3. Glycerol

Glycerol은 본 연구에서 사용된 동해방지제중 가장 분자량이 높다(92.09). 이 동해방지제를 이용하여 담륜자를 냉동보존한 결과, 다른 동해방지제에 비해 생존율이 가장 낮았으며, 1.0~2.0 M에서도 11.0%의 생존율을 나타내었다(Fig. 3). Glycerol에서도 다른 동해방지제와 같이 해동된 담륜자의 외형이 손상을 입었다.

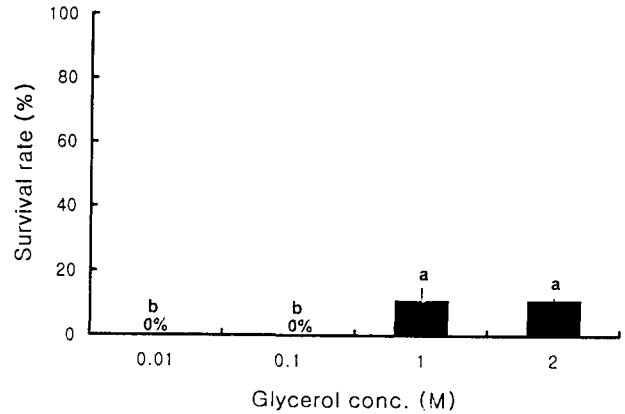


Fig. 2. Survival rates of thawed pearl oyster trochophores after freezing with four concentrations of ethylene glycol. Different alphabetic letters on the bars are significantly different ($P < 0.05$).

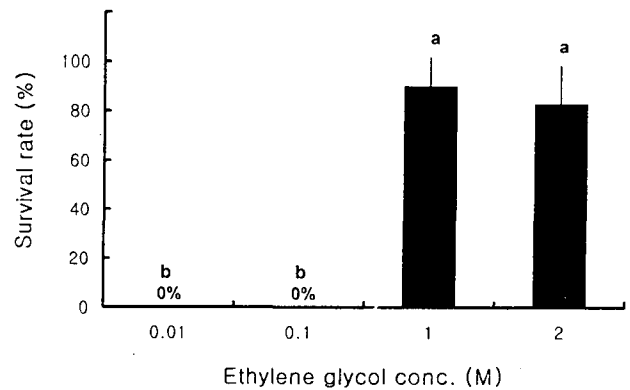


Fig. 3. Survival rates of thawed pearl oyster trochophores after freezing with four concentrations of glycerol. Different alphabetic letters on the bars are significantly different ($P < 0.05$).

4. 1,2-propanediol

76.10의 분자량을 가진 1,2-propanediol의 경우 DMSO와 같이 농도가 가장 낮은 0.01 M에서는 담륜자가 생존하지 않았으나, 농도가 증가할수록 생존율이 높아졌다. 그러나 2.0 M에서도 생존율이 $33.0 \pm 2.9\%$ 로 DMSO와 ethylene glycol에 비해 낮은 값을 보였다(Fig. 4). 담륜자의 외형도 다른 동해방지제와 같이 농도가 낮을수록 세포막의 손상이 심하게 나타났다.

4종류의 동해방지제를 사용하여 담륜자를 냉동보존하였을 때, 일부 손상을 입은 개체들이 나타났으나 생존한 담륜자는 섬모를 가지고 회전운동을 하여 비보존 담륜자와 같이 활발

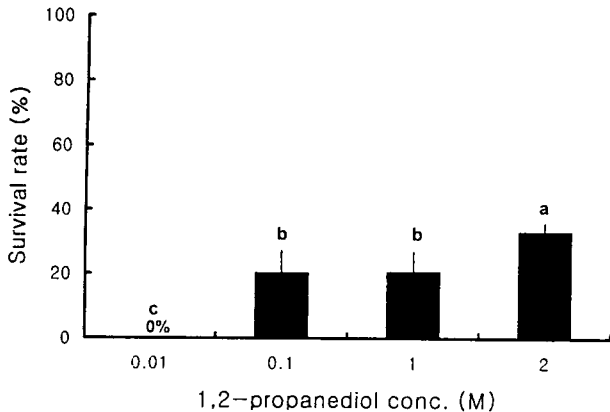


Fig. 4. Survival rates of thawed pearl oyster trochophores after freezing with four concentrations of 1,2-propanediol. Different alphabetic letters on the bars are significantly different ($P < 0.05$).

한 움직임 보였다.

고찰

동해방지제는 물에 용해되기 쉽고, 물의 수소결합을 끊어 물 구조를 바꾸는 등 냉동 및 해동하는 동안 물의 상태를 변화시킨다 (Renard & Cochard, 1989). 또한 동해방지제는 냉동보존시 세포를 보호하는 역할을 하는데 분자량이나 세포에 대한 투과성 정도에 따라 그 효과가 다르게 나타난다 (Renard & Cochard, 1989). 투과성 동해방지제 중 가장 분자량이 적은 methanol은 빠른 속도로 투과하며, 분자량이 큰 glycerol은 느리게 투과한다. 이는 삼투압 차이에서 오는 것으로 삼투압으로 인한 손상이 클수록 투과속도는 느릴 수밖에 없다 (Chao et al., 1997).

본 연구에서 4종류의 동해방지제를 사용하여 담륜자를 냉동보존하였을 때, 분자량이 92.09로 가장 큰 glycerol에서는 11.0%의 생존율을 보였으며, 분자량이 42.67로 가장 작은 ethylene glycol에서는 90.1%를 보였다. 그러나 1,2-propanediol과 DMSO는 분자량이 각각 76.10과 78.13으로 서로 비슷하지만 해동후 담륜자의 생존율에는 유의한 차이가 나타났다. 즉 1,2-propanediol에서는 33.0%가 생존하였으나, DMSO에서는 97.4%가 생존하여 본 연구에서 사용한 동해방지제중 가장 높은 생존율을 나타냈다. 이러한 결과로 미루어볼 때, 분자량이 적은 동해방지제가 평형시간 동안 배에 투과하는 정도가 클 수는 있으나 냉동을 거친 배에서는 동해방지제의 투과성 여부만으로는 동해방지제의 효과를 판단할 수 없을 것으로 생각된다. Renard & Cochard (1989)와 최와

장 (1999)은 실온에서 조개류의 배를 DMSO, ethylene glycol, glycerol과 1,2-propanediol에 침지한 결과, 모든 용액에서 농도가 증가할수록 독성이 증가하여 배의 생존율이 낮아지는 것으로 보고하였다. 그러나 같은 동해방지제로 냉동하였을 때는 본 연구결과와 같이 오히려 농도가 높은 동해방지제를 사용하였을 때, 해동후 발생배의 생존율이 높아졌다. 이것은 실온에서 평형시간 동안 동해방지제로 인해 받은 손상은 삼투압으로 인한 것이지만, 냉동과정을 거치는 동안 빙점이 강하여 세포에 악영향을 미치는 온도역을 빠르게 지나가기 때문에 고농도의 동해방지제를 사용하는 것이 해동후 생존율을 높게 한 것으로 판단된다 (한국수정란이식학회, 1995). 따라서 동해방지제는 물분자와 강력히 결합하여 빙결정 (icecrystal)에 의해 손상되는 세포수의 비율을 줄이고, 용질의 농축을 최소한으로 줄이는 능력을 가지고 있어야 할 것이다.

한편, 최와 장 (1999)에 의하면 조개류의 배가 동해방지제에 sucrose를 첨가하여 침지하였을 때 배의 생존율이 유의하게 높아지는 것을 보여주었다. 이는 sucrose가 비투과성 동해방지제이면서 세포막을 안정시키는 역할을 하기 때문이다. 정자에서도 세포막 투과성이 낮은 물질인 당류, 즉 포도당, 과당, 자당, 유당, 라피노스 등을 희석액으로 사용하면 삼투압이 조정되면서 냉동보존 효과도 얻을 수 있는 것으로 나타났다 (한국수정란이식학회, 1995).

조개류 배에 여러가지 동해방지제를 사용하여 냉동보존한 결과는 연구자 마다 다르다. Gwo (1995)는 참굴의 배를 냉동보존하였을 때 DMSO나 ethylene glycol에 비해 propylene glycerol에서 생존율이 높았으며, Toledo et al. (1989)은 진주담치의 배에 DMSO를 사용하였을 때 생존율이 높았다. 한편 어류인 medaka (Arii et al., 1987), 무지개송어와 은연어 (Stoss & Donaldson, 1983) 알의 냉동보존에서는 DMSO가 효과적이었으며, 포유류인 소 (Dochi et al., 1998), 양 (Martinez & Matkovic, 1998), 쥐 (Cseh et al., 1997)와 말 (Hochi et al., 1996)의 배에서는 ethylene glycol이 효과적인 것으로 나타나, 조개류 뿐만 아니라 어류와 포유류에서도 동해방지제의 효과는 종류에 따라 다른 것으로 생각된다.

이러한 중 특이적인 경향을 나타내는 동해방지제는 냉동되는 동안 빙결정을 제어할 수 있는 충분히 농축된 것으로 탈수에 내성을 가지는 것이 보존효과를 높일 수 있을 것으로 판단된다 (Chao et al., 1997).

인용문헌

- Arii N, Namai K, Gomi F (1987) Cryoprotection of medaka embryos during development. *Zool Sci* 4:813-818.
- Chao NH, Lin TT, Chen YJ, Hsu HW, Liao IC (1997) Cryopreservation of late embryos and early larvae in the oyster and hard clam. *Aquaculture* 155:31-44.
- Cseh S, Corselli J, Nehlsin-Cannarella SL, Bailey LL, Szalay AA (1997) The effect of quick-freezing in ethylene glycol on morphological survival and *in vitro* development of mouse embryos frozen at different preimplantation stages. *Theriogenology* 48:43-50.
- Dochi O, Yamamoto Y, Saga H, Yoshida N, Kano M, Maeda J, Miyata K, Yamauchi A, Tominaga K, Oda Y, Nakashima T, Inohae S (1998) Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program. *Theriogenology* 49:1051-1058.
- Gwo JC (1995) Cryopreservation of oyster (*Crassostrea gigas*) embryos. *Theriogenology* 43:1163-1174.
- Hochi S, Maruyama K, Oguri N (1996) Direct transfer of equine blastocysts frozen-thawed in the presence of ethylene glycol and sucrose. *Theriogenology* 46:1217-1224.
- Martinez AG, Matkovic M (1998) Cryopreservation of ovine embryos: slow freezing and vitrification. *Theriogenology* 49:1039-1049.
- Renard P (1991) Cooling and freezing tolerances in embryos of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: methanol and sucrose effects. *Aquaculture* 92:43-57.
- Renard P, Cochard JC (1989) Effect of various cryoprotectants on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg, manila clam, *Ruditapes philippinarum* Reeve and king scallop, *Pecten maximus* (L) embryo: Influence of the biochemical and osmotic effects. *Cryo-letters* 10:169-180.
- Stoss J, Donaldson EM (1983) Studies on cryopreservation of eggs from rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 31:51-65.
- Takahashi Y, Kanagawa H (1985) Quick freezing of mouse embryos by direct plunge into liquid nitrogen vapour: effect of sugars. *Jpn J Vet Res* 33:141-144.
- Toledo JD, Kurokura H, Kasahara S (1989) Preliminary studies on the cryopreservation of the blue mussel embryos. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55:1661 p.
- 한국수정란이식학회 (1995) 소수정란 이식. 정문각. 서울. pp. 13-132.
- 酒井昭 (1987) 凍結保存. 朝倉書店. 東京. pp. 15-22.
- 최윤희, 장영진 (1999) 4종류의 동해방지제에 침지한 진주조개, *Pinctada fucata martensii*와 참굴, *Crassostrea gigas* 담륜자의 생존율. 한국수산학회지. 인쇄중.