



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2016년 2월
석사학위 논문

갈조류 미역 배우체 세대의
동결보존에 관한 연구

조선대학교 대학원

생명과학과

이진교

갈조류 미역 배우체 세대의
동결보존에 관한 연구

Studies on the cryopreservation of vegetative gametophyte
of *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae, Ochrophyta)

2016년 2월 일

조선대학교 대학원

생명과학과

이진교

갈조류 미역 배우체 세대의 동결보존에 관한 연구

지도교수 조 태 오

이 논문을 생명과학석사학위 신청 논문으로 제출함

2015년 10월

조선대학교 대학원

생명과학과

이 진 교

이진교의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 박 현 용 (인)

위 원 조선대학교 교수 송 상 기 (인)

위 원 조선대학교 교수 조 태 오 (인)

2015년 11월

조선대학교 대학원

목 차

Abstract.....	I
List of Tables.....	III
List of Figures.....	IV
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	
1. 재료	
1) 채집	5
2) 포자받기	7
3) 암·수 배우체 분리	7
2. 동결	
1) 동해보호제	8
2) 동결 과정	9
3. 해동	
1) 해동 과정	10
4. 해동 후 배양	
1) 배양 광원	11
2) 배양기	17
3) 생산률 측정	20
4) 색소함량 측정	21

Ⅲ. 결과

1. 동해보호제(CPAs) 선별

- 1) 세포침투형 동해보호제 선별 23
- 2) 세포보호형 동해보호제 선별 24

2. 최적 회복의 과장 및 광량 연구

- 1) 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}/\text{s}^{-1}$ 에서 과장별 생산률 29
- 2) 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}/\text{s}^{-1}$ 에서 과장별 생산률 30
- 3) 60 $\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}/\text{s}^{-1}$ 에서 과장별 생산률 31

3. LED 과장별 미역 배우체 광형태형성 변화..... 38

4. LED 과장별 미역 배우체 색소함량 변화..... 40

IV. 고찰 45

【참고문헌】 48

ABSTRACT

Studies on the cryopreservation vegetative gametophyte of *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae, Ochrophyta)

Lee Jin Gyo

Advisor : Prof. Cho Tae Oh, Ph.D.

Department of Natural College

Graduate School of Chosun University

The marine brown alga, *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar, is edible and an important commercial seaweed in Asian countries. In accordance with global warming and climate changes, the development of methods for genetic preservation and the new cultivar is important. Cryopreservation is an important technology that allows the viable storage of cells of tissues over long periods of time at extremely low temperatures (-196°C) for their use as biological and genetic resources. Successful cryopreservation is often judged by the survival of algal cells and their re-growth as viable cultures or complete plant regeneration. Previous studies in cryopreservation of *U. pinnatifida* have been focused mainly on damages induced by the freeze-thaw regime than recovery rates of post-cryopreservation. In this study, we evaluated the effects of variable Light-Emitting Diode (LED) sources on the viability of the gametophyte of *U. pinnatifida* after cryopreservation. Gametophyte of *U. pinnatifida* was cultured at 20°C under blue LED (460 nm), red LED (660 nm), green LED (530 nm), and white LED (mixed wavelength) lamps with light intensity of 20, 40, 60 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. After post-cryopreservation, the cell viability of gametophyte was examined every two days during 3 weeks. Cell viability was increased to $95.42 \pm 0.9\%$ under blue LED light with light intensity of 40 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. We also estimated pigment contents with in the gametophyte of *U. pinnatifida* depending on different light quality during

3 weeks. In my result, the pigment contents within gametophyte under blue light were much higher than under other lights. The present result showed that the optimized recovery light is blue (460 nm) with $40 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ after the freeze-thaw.

List of Tables

Table 1. Production of cultivated seaweeds in Korea.....	4
Table 2. Provasoli's enriched natural seawater medium (PES Medium).....	19
Table 3. Effects of systemic cryoprotectants on survival of gametophyte of <i>Undaria pinnatifida</i>	26
Table 4. Effects of systemic and non-systemic cryoprotectants on survival of gametophyte of <i>Undaria pinnatifida</i>	28
Table 5. Changes in the survival of gametophyte of <i>U. pinnatifida</i> during post-thawing incubation. Cultured at different light wavelength and 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}/\text{s}^{-1}$	35
Table 6. Changes in the survival of gametophyte of <i>U. pinnatifida</i> during post-thawing incubation. Cultured at different light wavelength and 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}/\text{s}^{-1}$	36
Table 7. Changes in the survival of gametophyte of <i>U. pinnatifida</i> during post-thawing incubation. Cultured at different light wavelength and 60 $\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}/\text{s}^{-1}$	37
Table 8. Effect of different LED wavelength on pigment of contents in gametophyte of <i>U. pinnatifida</i> ($P < 0.05$).....	44

List of Figures

Figure 1. Collected <i>Undaria pinnatifida</i> (Harvey) Suringar.	5
Figure 2. Map showing the collection site in Chuja island.	6
Figure 3. Spectral distribution of white LED light source (Mixed length).·	12
Figure 4. Spectral distribution of blue LED light source (460 nm).·	13
Figure 5. Spectral distribution of red LED light source (660 nm).·	14
Figure 6. Spectral distribution of mixed (B+R) LED light source (460, 660 nm).	15
Figure 7. Spectral distribution of green LED light source (530 nm).	16
Figure 8. Mimetic diagram of LED incubator.	17
Figure 9. LED (Light Emitting Diode) incubators.	18
Figure 10. Gametophyte of <i>Undaria pinnatifida</i> stained by 0.05% (w/v) Erythrosine-seawater. Red cells are dead.	20
Figure 11. Effects of systemic cryoprotectants on survival of gametophyte of <i>Undaria pinnatifida</i> .·	25
Figure 12. Effects of systemic and non-systemic cryoprotectants on survival of gametophyte of <i>Undaria pinnatifida</i>	27
Figure 13. Changes in the survival of gametophyte of <i>U. pinnatifida</i> during post-thawing incubation. Cultured at different light wavelength and $20 \mu\text{mol}/\text{m}^{-2}/\text{s}^{-1}$.·	32
Figure 14. Changes in the survival of gametophyte of <i>U. pinnatifida</i> during post-thawing incubation. Cultured at different light wavelength and $40 \mu\text{mol}/\text{m}^{-2}/\text{s}^{-1}$.·	33
Figure 15. Changes in the survival of gametophyte of <i>U. pinnatifida</i> during post-thawing incubation. Cultured at different light wavelength and $60 \mu\text{mol}/\text{m}^{-2}/\text{s}^{-1}$.·	34
Figure 16. Changes in the photomorphogenesis of gametophyte. cultured at different light wavelength and $40 \mu\text{mol}/\text{m}^{-2}/\text{s}^{-1}$.·	39
Figure 17. Effect of different LED wavelength on chlorophyll a ratio in gametophyte of <i>U. pinnatifida</i> ($P < 0.05$).·	41

Figure 18. Effect of different LED wavelength on chlorophyll c ratio in gametophyte of *U. pinnatifida* ($P < 0.05$). 42

Figure 19. Effect of different LED wavelength on carotenoids ratio in gametophyte of *U. pinnatifida* ($P < 0.05$). 43

I. 서론

식물 종자에 대한 지적 재산을 보호하는 국제협약인 ‘국제식물 신제품보호연맹(UPOV)’은 해조류를 비롯한 모든 종자를 2012년부터 UPOV의 보호대상으로 지정했다. 우리나라에서는 2012년 1월 7일부터 해조류를 포함한 모든 작물에 품종보호제도를 시행하고 있으며 세계 각국에서 등록된 식물 신제품을 수입하는 모든 종자에 로열티를 지불해야 사용이 가능하다(특허청 2012). 따라서 해조류도 예외 없이 품종사용료를 지불해야 한다. 국내 해조양식의 대부분은 일본 품종에 의존하는 실정이기 때문에 국내의 토종 종자를 확보하고 체계적인 유전자원 관리와 선발 및 교잡육종을 통한 새로운 신제품 개발이 시급하다(해조류바이오연구센터 2009).

해조류는 물 속에 살아있는 상태로 종자를 보관해야 하기 때문에 해조류 생리에 관한 전반적인 지식과 체계적인 관리를 통해 보존이 가능한 실정이다. 해조류에 대한 품종사용료 문제와 유전자원 확보는 중국, 일본 등 인접 다른 국가에서도 많은 관심을 가지고 있다. 지구 온난화에 따라 기존 근해에 자생하던 한대성 해조류가 온대성과 아열대성의 해조류들에 의해 서식지가 바뀌게 되고 점차적으로 사라지고 있어 우수 유전자원의 조기 확보와 여러 종자의 교배를 통한 고수온에 견딜 수 있는 신제품 개발 연구가 필요하다.

해조류인 미역은 예로부터 우리나라, 일본, 중국 등지에서 식용으로 이용되어 오고 있다. 우리나라에서는 연간 약 32만 톤이 생산되고 있으며 미역은 국내에서 생산되는 해조류 생산량 1/3의 비중을 차지하여 경제적으로도 중요한 해조류 중 하나이다(해양수산부 통계자료 2014)(Table 1). 미역을 포함한 상업적인 해조류들은 현재까지 대부분 연구실에서 계대배양을 통해 유지나 보존이 되어 지고 있다. 하지만 보존 종의 수가 늘어남에 따라 배양에 많은 인력과 시간, 공간이 필요하게 되고 계대배양은 장기적으로 보았을 때 오염의 위험, 유전적 변이 등의 문제를 안고 있다(Day et al. 1995). 이에 대한 대안으로 적은 인력과 공간으로 장기간 안전하게 유지, 보존 할 수 있는 액체질소(-196℃)를 이용한 초저온 동결보존법이 적용되고 있다(Rhodes et al. 2006).

해조류 동결보존은 육상식물 배양세포의 동결보존법을 모델로 하여 해조류 동결 보존을 시작하였다(Van der Meer and Simpson 1984, Renard et al. 1992, Kuwano et al. 1993, 1994, 1996).

현재 해조류 동결방법으로 2단계 동결방법이 사용되고 있다. 2단계 동결법은 세포를 1차적으로 -40°C 까지 천천히 냉각시켜 세포를 동결탈수하고, -196°C 의 액체질소탱크에서 급랭시켜 세포를 결빙시키는 방법으로써, 배양세포나 미세조류의 동결보존에도 사용되고 있다(Morris 1978, Chen et al. 1984).

동결시 동결손상(Freezing stress)으로부터 세포를 보호하기 위해 쓰이는 물질을 동해보호제(Cryoprotectants, CPAs)라고 한다. 동해보호제는 동결 전 세포에 첨가하여 냉동시키고, 해동 후 다시 제거 되었을 때 세포의 생존성을 높이는 역할을 한다(Karlsson and Toner 1996). 세포를 동결하게 될 때 세포의 일차적인 동결손상은 세포 주변에 존재하는 물이 먼저 냉각되면서 세포 내부의 수분이 세포 밖으로 나오게 되어 탈수현상으로 인해 세포 내 용질농도 증가로 인한 삼투압에 의해 이루어진다(Lovelock 1954). 이러한 세포의 동결 및 탈수 과정에서 발생하는 삼투압 스트레스는 세포막의 초미세 구조의 변화와 세포막의 이중 구조체 및 세포기관의 파괴 등 심각한 세포손상을 가져온다. 세포의 이차적인 동결손상은 세포 내 얼음결정으로 일어나는데 세포 내 얼음 결정 형성은 물리적인 세포막 파괴와 기포의 생성으로 인해 세포 기관의 동결손상을 유발한다(Mazur 2004). 동해보호제는 이러한 냉동과정에서 발생하는 세포의 동결손상을 예방하기 위해 첨가 해주는 주요한 물질이다. 동해보호제는 두 종류로 구분되며 세포침투형 동해보호제와 세포보호형 동해보호제가 있다(Cañavate and Lubian 1994). 세포침투형 동해보호제는 세포막을 침투할 수 있는 저분자 물질로 세포막을 통과해 세포내 수분을 치환하여 동결 시 얼음 결정이 형성되는 것을 억제하는 역할을 하고 세포보호형 동해보호제는 세포 밖의 얼음 결정 형성을 억제하는 작용을 한다(Fuller 2004). Kono et al. (1998)과 Kuwano et al. (2004)의 연구에 따르면 갈조류 다시마목 배우체 동결보존실험을 위한 보호제의 조합으로 Ethylene glycol과 Proline이 효과적이며 미역 배우체 동해보호제로는 Glycerol과 Proline의 조합에서 생존성이 높게 나타난다고 하였다.

지금까지의 해조류 동결보존에 관한 연구는 각 종마다 동해보호제의 종류에 따라 생존성이 다르게 나타나며 동결보존의 성공은 동해보호제의 적절한 선택과 농도에 달려있다고 보고되었다(Taylor and Fletcher 1999, Kuwano and Saga 2000, Kuwano et al. 2004). 아직까지 해조류의 각 종별 동결보존법은 정확히 확립이 되지 않고 있으며 동결보존 전 후에 특성과 생리에 관한 다양한 연구도 미미한 실정이다. 또한, 기존의 연구는 대부분 동결보호제의 탐색과 동결 조건에 초점이 맞춰져 있고 해동 후 동결에 의한 물리적인 세포손상

의 회복에 관한 연구가 많이 이루어지지 않았다. 따라서 동결과정 뿐만 아니라 해동 후 동결손상된 해조류의 생리적 회복과정에 대한 연구가 요구되고 있다.

해조류의 성장에는 물리적, 지질적, 화학적 요인에 의해 달라지는데 수 많은 환경의 요인 중에서도 일반적으로 해조류의 성장에 가장 큰 영향을 주는 것은 수온과 광이라고 알려져 있다(Druehl et al. 1987, Vásquez and Vega 2001). 특히 빛은 해조류에게 광합성을 위한 원동력이 되며, 빛의 파장과, 조성은 세포의 색소, 화학적 조성, 이온수송 및 성장속도에 관여하여 해조류의 생리적인 기작을 조절하는 중요한 요인이라고 보고되었다(Wallen and Green 1971, Vesk and Jeffrey 1977, Rivkin 1989, Schmid and Dring 1993).

반도체 광원인 LED (Light Emitting Diode)는 광생물학 연구에 다양하게 사용 될 수 있는 광원이다(Bula et al. 1991). LED는 광원으로서 부피가 작고, 수명이 길며, 단일 파장을 방출하므로 특정파장을 선별적으로 사용할 수 있고, 광 강도 조절이 용이하며 열 방출이 낮은 장점이 있다(Okamoto et al. 1997, Schuerger et al. 1997). LED를 조명장치로 사용할 경우 백열등과 형광등의 수명이 각각 1000 시간, 8000 시간 정도인 반면 LED장치는 약 50,000 시간 이상으로 매우 길어 대체 조명으로 각광 받고 있다.

현재 발광다이오드를 광원으로 이용한 연구는 식물재배와 미세조류 배양 및 성장에 많이 이용되고 있으나(Barta et al. 1992, Lee and Palsson 1994, Oh et al. 2007), 해조류 배양에 LED가 사용된 연구사례는 적으며 광 파장 반응에 대한 명확한 기작이 밝혀져 있지 않은 상태이다(Kwon and Choi 2013).

따라서, 본 연구는 갈조류 미역 배우체의 동결 보존을 위한 동해보호제를 탐색하고, 동결 보존 후 미역 배우체의 생리적 회복과정에서 LED 파장과 광량이 미역 배우체의 회복추이에 미치는 영향에 대해 살펴보았다. 또한 회복 배양기간 동안 각각의 파장에 따른 광형태형성 반응과 색소 함량 변화에 대해서도 조사하였다.

Table 1. Production of cultivated seaweeds in Korea.

(단위 : M/T)

Year	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
계	792,953	921,024	858,659	901,672	992,283	1,022,326	1,131,305
미역	309,907	381,076	309,155	393,616	394,003	349,924	327,375
김	210,956	224,242	211,444	235,534	316,428	349,827	405,525
다시마류	250,049	285,221	306,183	241,322	246,701	308,601	373,264
돛	20,909	17,701	19,533	21,133	23,351	13,024	13,311
파래	684	8,003	5,903	4,531	6,085	6,002	5,034
청각	158	1,186	1,796	1,394	1,005	855	2,045
기타	1100	3,595	4,645	4,142	4,710	4,093	4,751

* 출처 : 해양수산부 통계자료 2014

II. 재료 및 방법

2.1. 재료

1) 채집

본 연구에 사용된 미역(*Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar)의 성숙된 포자체는 2013년 6월 24일 제주시 추자면 추자도 예초리(33°57' 13" N, 126°19' 52" E)에서 조간대와 스쿠버다이빙을 통해 채집되었다(Figure 1). 채집된 개체는 곧바로 아이스박스에 넣어 실험실로 운반하여 포자엽 부분만을 절단하여 포자받기를 실시하였다.



Figure 1. Collected *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar.

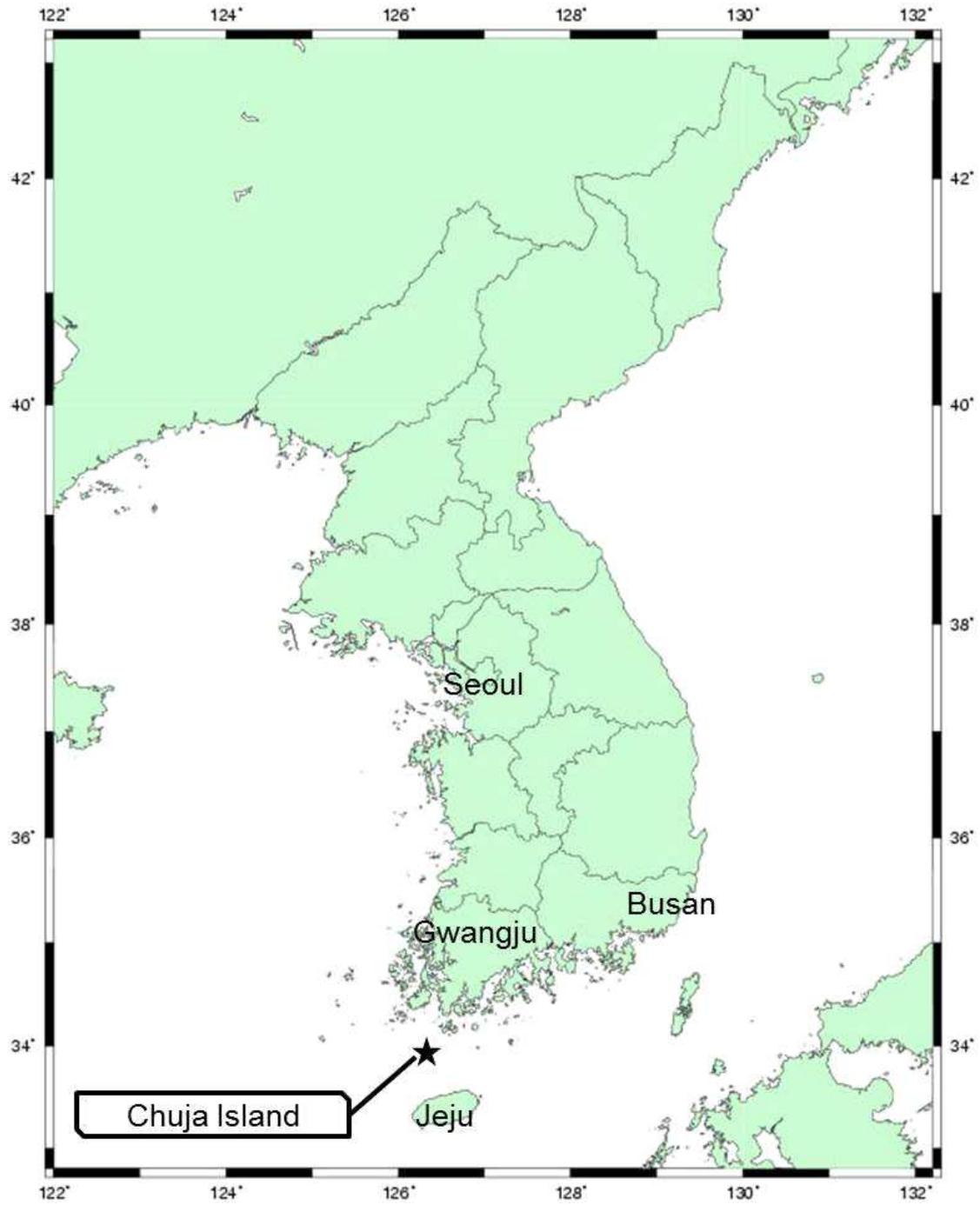


Figure 2. Map showing the collection site in Chuja island.

2) 포자받기

포자엽의 깨끗하고 성숙한 부위를 2 cm × 2 cm 크기로 멸균된 칼을 이용해 절단한 후 2 L 멸균해수가 담긴 3개의 비이커에 옮겨가며 붓과 핀셋을 이용해 부착생물과 이물질을 제거하였다. 이후 150 mm Petri dish에 KIMTECH 와이퍼를 2-3장 깔고 위에 세척된 포자엽을 올려 그늘진 실내에서 4시간 음건 시켰다. Culture dish에 포자의 부착을 위해 Cover glass를 깔고 멸균해수 100 ml를 채운 후 음건된 포자엽을 넣고 온도 18°C, 광주기 12D:12L, 광량 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ 의 배양기에 두고 24시간 동안 유주자의 방출을 유도 하였다.

3) 암·수 배우체 분리

미역 배우체 세대의 암·수 배우체 분리를 위해 최초 방출된 유주자액의 0.1 ml를 취하여 Cover glass가 놓인 6 Multi well-plate에 넣고 차례로 옮겨 가면서 유주자액을 희석하여 밀도를 조절하였다. 해부현미경 아래서 암 배우체와 수 배우체를 구분하여 Petri dish에 담고 PES배지가 첨가된 해수에서 배양 하였다.

2.2. 동결

1) 동해보호제

본 연구에서는 세포침투형 동해보호제와 세포보호형 동해보호제의 조합을 통해 미역 배우체 최적의 동해보호제를 파악하고자 하였다. 세포침투형 동해보호제로 Glycerol, Ethylene glycol, Propylene glycol, Methanol, DMSO (Dimethyl sulfoxide)의 5가지를 이용하였다. 또한 미역배우체의 생존성을 높이기 위해 결합적으로 사용가능한 세포보호형 동해보호제로는 Proline, Sucrose, Sorbitol의 3가지를 사용하여 동해보호제의 조합을 만들었다. 실험에 사용된 동해보호제의 농도는 멸균된 여과 해수를 이용하여 조절하였다. 각각의 샘플들을 동결보존한 후 해동하여 온도 20℃, 광주기 12D:12L, 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}/\text{s}^{-1}$ 광량에서 8일간 배양하며 생산률을 측정 하였다.

2) 동결 과정

1.8 ml Nunc Cryotube Vials (Thermo Scientific Inc., Denmark)에 멸균된 해수 기본액 0.75 ml를 넣은 후 약 1 mg(FW⁻¹)의 배우체를 바이알에 넣었다. 미리 빙냉 시켜 놓은 동해보호제 0.75 ml를 삼투압에 의한 급진적인 변화를 방지 기위해 15분에 걸쳐 3회 천천히 배우체 현탁액에 첨가하였다. 배우체 현탁액이 담긴 바이알을 Isopropyl alcohol이 담긴 Freezing Container에 넣고 -50℃의 Deep Freezer에서 4시간 완만 동결 한 후 알루미늄의 바이알 케이스 홀더에 넣고 곧바로 -196℃의 액체질소 탱크에 넣어 일주일간 보관하였다(Kuwano et al. 2004).

1.8 ml Cryotube Vials

1 mg(FW⁻¹) Gametophyte of *U. pinnatifida*
 + 0.75 ml Autoclaved sea-water
 + 0.75 ml CPAs (20% Glycerol + 20% Proline, 0.01 M HEPES)



Freezing Container



-50℃ Deep Freezer (4h)



-196℃ Liquid Nitrogen (a week)

2.3. 해동

1) 해동 과정

일주일간 동결보존된 미역 배우체를 -196°C 의 액체질소탱크에서 꺼낸 후, 곧바로 40°C 의 항온수조에 넣고 3분간 강하게 흔들여 해동시켰다(Kuwano et al. 2004). 해동된 미역배우체는 멸균된 해수 100 ml를 담은 Culture dish에 옮겨 담았다. 동해보호제를 제거하기 위해 Culture dish에 담긴 해수를 10분 간격으로 환수하고 10회 이상 반복하여 점진적으로 동해보호제를 제거하였다.

-196°C Liquid Nitrogen (a week)



40°C Water bath (3 min)



Autoclaved sea-water (10 min)
10 times



Culture dish (PES Medium)

2.4. 해동 후 배양

1) 배양 광원

배양 광원은 식물 재배용 LED (DYNEBIO Inc., DYLED44V, 40W)를 광원으로 사용하였다. 실험에 사용된 광질은 총 5개를 사용하였으며 사용된 광원의 피크는 Blue LED 460 nm, Red LED 660 nm, Mix LED (Blue 460 nm + Red 660 nm), Green LED 530 nm 이며 대조구로 White LED (Mixed length)를 사용하였다. 광질별 스펙트럼 파장 측정은 USB2000+ UV-VIS (Ocean Optics, Inc., USA)를 통해 각각의 피크와 스펙트럼을 측정하였다 (Figures 3-7).

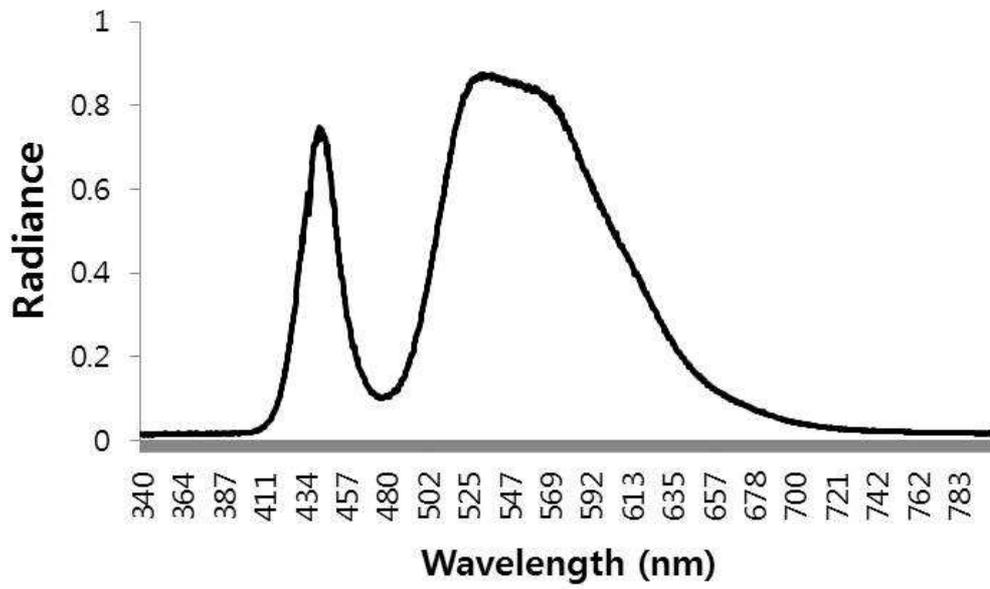


Figure 3. Spectral distribution of white LED light source (Mixed length).

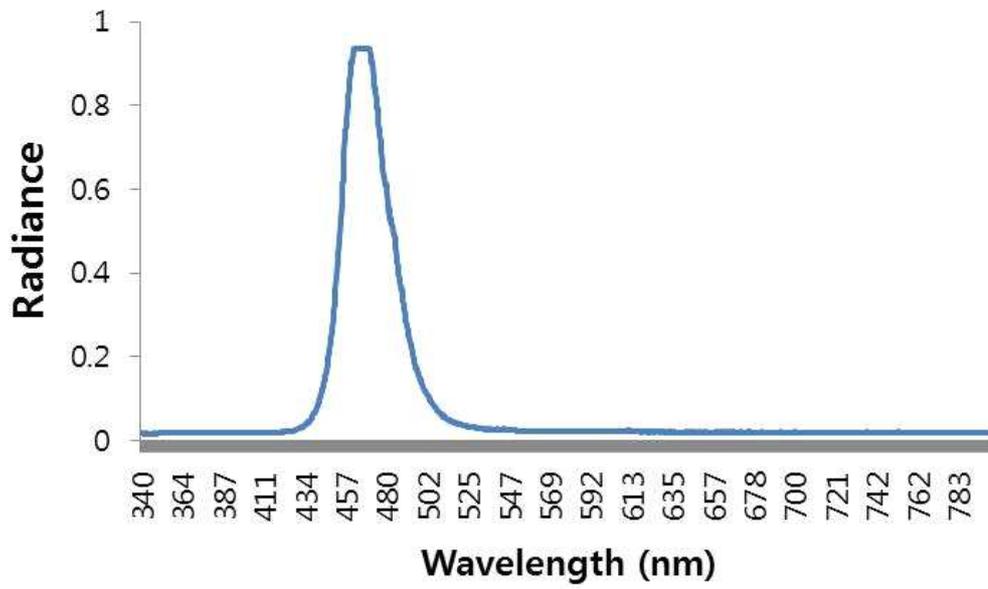


Figure 4. Spectral distribution of blue LED light source (460 nm).

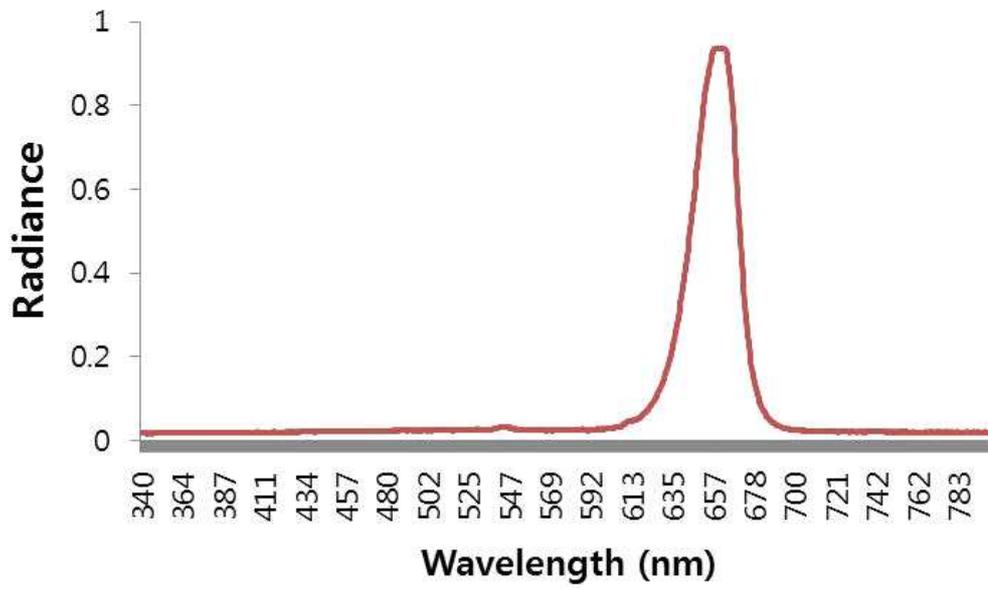


Figure 5. Spectral distribution of red LED light source (660 nm).

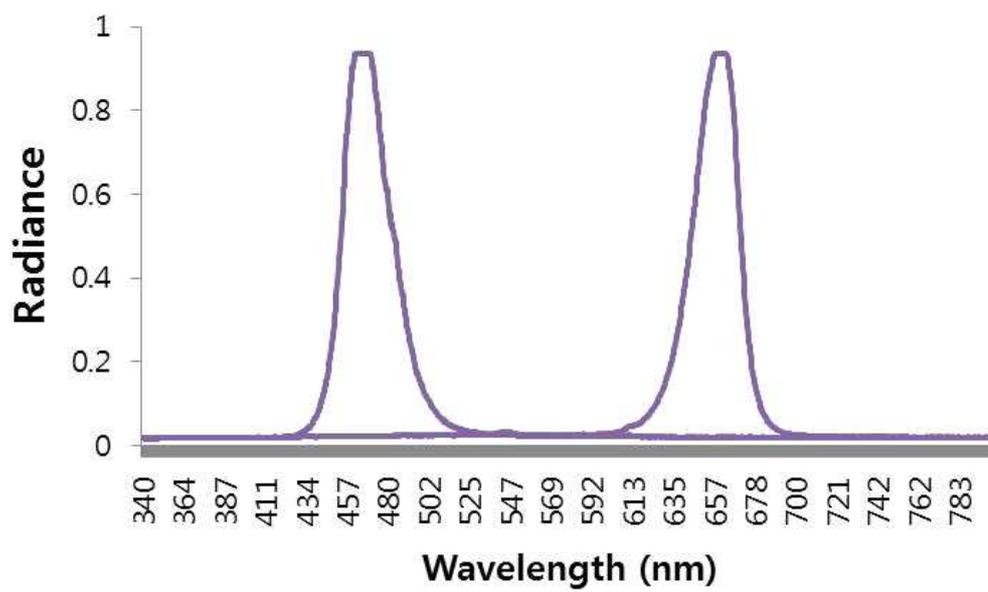


Figure 6. Spectral distribution of mixed(B+R) LED light source (460, 660 nm).

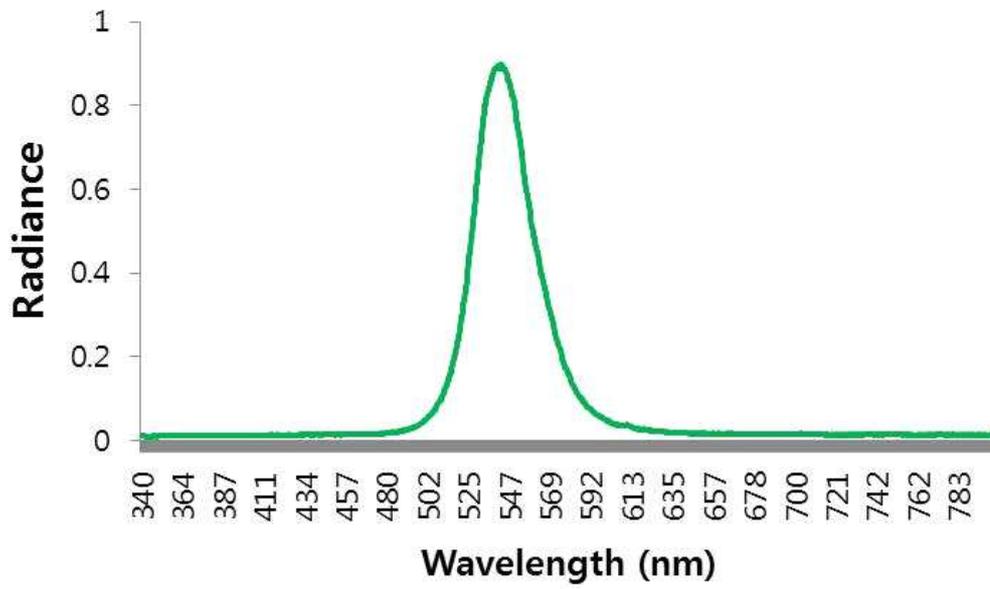


Figure 7. Spectral distribution of green LED light source (530 nm).

2) 배양기

LED 광원은 약 30 cm 높이에 설치하였으며, 조광은 광주기 조절기를 이용하여 명 조건 12시간, 암 조건 12시간이 되게 하였다. 배양은 흑색 아크릴로 자체 제작된 배양기 케이스를 이용하였다(Figures 8, 9). 온도 조건은 미역 배우체의 성장상을 이용하여 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 조절하였다. 배양기내 실시간 온도를 모니터링하기 위해 미니 전자온도계를 설치하였다. 배지 조건은 멸균된 해수에 PES 배지를 첨가하여 사용하였으며(Provasoli 1968), 배양 기간 3주 동안 2일 간격으로 환수 하였다(Table 2). 광량 조건은 20, 40, 60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ 로 3가지 광량을 사용하였으며 광량의 조절은 LED에 연결된 광량조절기를 사용하였다. 광량 세기는 광량측정기(LI-250, Li-cor, Lincoln, NE, USA)를 사용하여 측정하였다.

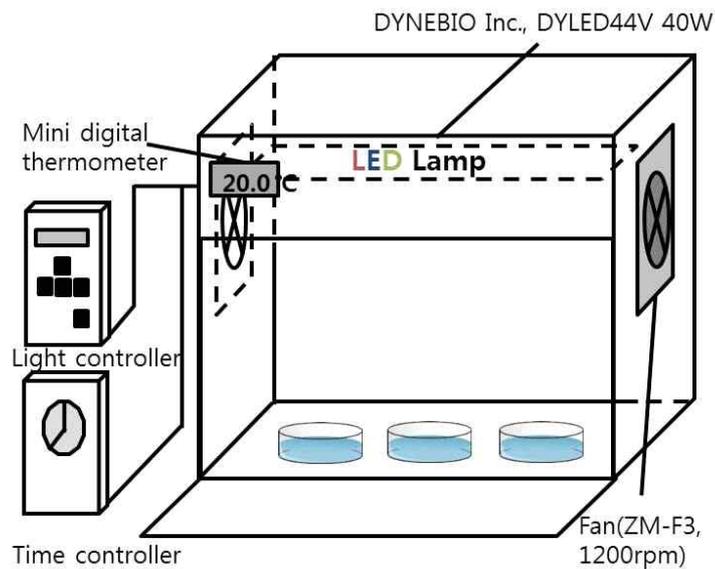


Figure 8. Mimetic diagram of LED incubator.



Figure 9. LED (Light Emitting Diode) incubators.

Table 2. Provasoli's enriched natural seawater medium (PES Medium).

Stock solution		Total amount of each component	Amount of stock solution to add
1. Sodium β -glycerophosphate		10 g / 200 ml	10 ml
2. NaNO ₃		17.5 g / 500 ml	100 ml
3. Vitamin B12		0.01 g / 1000 ml	10 ml
4. Thiamine		0.25 g / 500 ml	10 ml
5. Biotin		0.0025 g / 500 ml	10 ml
6. Part - I	FeSO ₄	0.702 g	250 ml
	Na ₂ -EDTA	0.66 g	
		/ 1000 ml	
7. Part - II	H ₃ BO ₃	1.12 g	250 ml
	FeCl	0.048 g	
	MnSO ₄ ·5H ₂ O	0.12 g	
	ZnSO ₄	0.022 g	
	CoSO ₄	0.0048 g	
	Na ₂ -EDTA	1 g	
		/ 1000 ml	
Total volume of stock solution			640 ml
add D.W			610 ml
Total PES volume			1250 ml

20 ml(PES medium)/ 1 L(Autoclaved seawater)

3) 생산률 측정

생산률 측정은 0.05% (w/v) Erythrosine-seawater 용액에 세포를 침지하여 20분간 염색 처리 후 염색액을 해수로 씻어낸 뒤 이루어졌다(Figure 10). 세포의 생사판정은 각각의 Vial에서 3개의 샘플을 채취한 후 각 샘플의 개체들로부터 300개 이상의 세포들을 광학현미경을 이용하여 염색의 유무를 통해 생사여부를 판정하였다(Saga et al. 1989). 3주의 회복기간 동안 2일 간격으로 각각의 처리구에 대한 생산률을 측정하면서 광질에 따라 변화하는 배우체의 형태에 대해서도 살펴보았다.

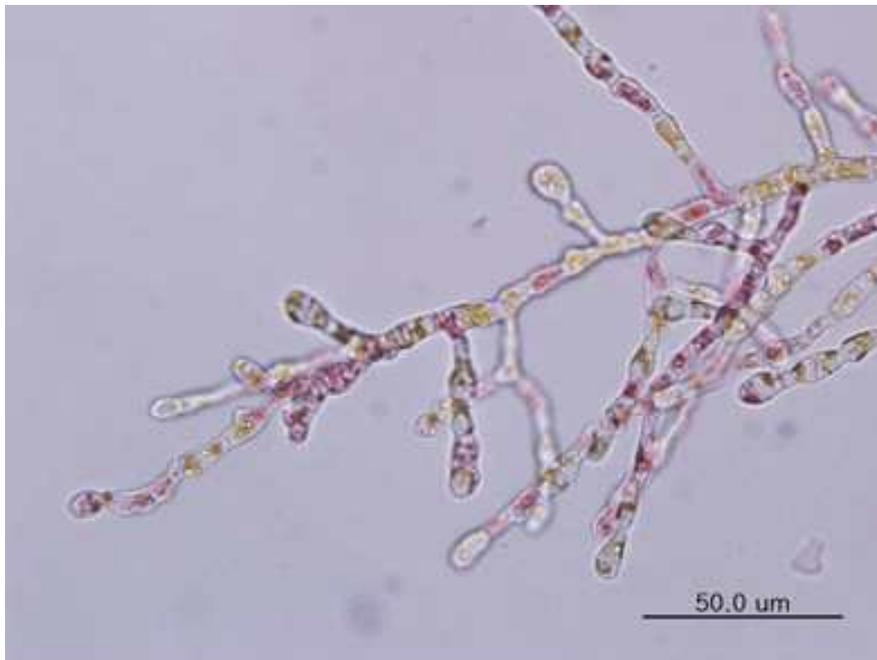


Figure 10. Gametophyte of *Undaria pinnatifida* stained by 0.05% (w/v) Erythrosine-seawater. Red cells are dead.

4) 색소함량 측정

(1) Chlorophyll a & Chlorophyll c

Chlorophyll a와 Chlorophyll c의 함량을 측정하기 위해, 3주간 다른 광질에 의해 회복된 배우체의 생체량을 각각 측정한 후 1.8 ml microcentrifuge tube에 넣었다. 이후 90%의 Acetone을 1 ml 첨가하여 완전히 분쇄 시키고 Vortex를 이용해 용액과 배우체의 분쇄된 Pellet들을 잘 섞어주었다. 다시 90%의 Acetone을 0.5 ml를 추가로 첨가 후 10,000 rpm으로 5분간 원심 분리하였다. 원심 분리된 Sample의 상층액을 추출하여 3.5 ml Standard glass cuvette (JM science Co., Korea)에 담아 UV/VIS Spectrophotometer (Optizen 2120UV, Mecasys Co., Ltd, Korea)로 630, 664 nm 흡광도를 측정하였고 아래와 같은 공식을 사용하여 계산하였다(Jeffrey and Humphrey 1975).

$$Chl\ a = (11.47 A_{664} - 0.4 A_{630}) \times \text{추출된 용액의 양} / \text{엽체의 생체량}$$

$$Chl\ c = (24.36 A_{630} - 0.4 A_{664}) \times \text{추출된 용액의 양} / \text{엽체의 생체량}$$

(2) Carotenoids

Carotenoids 함량을 측정하기 위해, 3주간 회복된 배우체의 생체량을 각각 측정한 후 1.8 ml microcentrifuge tube에 methanol을 1.5 ml 첨가하여 24시간 동안 5°C 이하의 냉암소에 보관하였다. 이후 추출액은 3.5 ml standard glass cuvette (JM science Co., Korea)에 담아 UV/VIS Spectrophotometer (Optizen 2120UV, Mecasys Co., Ltd, Korea)로 470, 653, 666 nm 흡광도를 측정하였고 아래와 같은 공식을 사용하여 계산하였다(Lichtenthaler and Wellburn 1983).

$$\text{Carotenoids} = (1000 A_{470} - 2.86 \text{ Chl } a - 129.2 \text{ Chl } b) \times \text{추출된 용액의 양} \\ / (245 \times \text{엽체의 생체량})$$

Ⅲ. 결과

3.1. 동해보호제(CPAs) 선별

1) 세포침투형 동해보호제 선별

각 세포침투형 동해보호제로 동결한 후 해동과정을 거쳐 해동 직 후 초기 생산률을 측정 하였을 때, 10% Glycerol에서 동결한 샘플은 51.82%의 생산률로 가장 높게 나타났으며, 10% Ethylene glycol에서는 44.98%, 10% Propylene glycol에서는 30.49%, 10% DMSO는 17.14%, 10% Methanol은 11.08%로 나타났다. 대조구로 사용된 멸균된 100% Seawater에서는 미역 배우체 모두 사멸된 것으로 나타났다. 동해보호제를 사용한 모든 샘플에서 해동 2-4일 후 8-22%정도의 감소된 생산률을 나타냈다. 해동 후 8일째에 측정하였을 때 10% Glycerol은 49.89%의 생산률을 나타냈으며, 10% Ethylene glycol에서는 29.00%, 10% Propylene glycol에서는 15.89%, 10% DMSO는 9.99%, 10% Methanol은 12.24%로 나타났다(Figure 11). 실험 결과에서 미역배우체에 사용된 세포침투형 동해보호제 중 Glycerol이 $51.82 \pm 0.87\%$ 의 생산률로 가장 최적화된 것으로 확인되었다(Table 3).

2) 세포보호형 동해보호제 선별

각 세포보호형 동해보호제로 동결한 후 해동과정을 거쳐 해동 직 후 초기 생산률을 측정 하였을 때, 10% Glycerol과 10% Proline의 조합에서 55.97%의 생산률을 나타냈으며, 10% Glycerol과 10% Sucrose의 조합은 54.72%, 10% Glycerol과 10% Sorbitol의 조합에서는 53.98%로 약간의 차이를 나타내었다. 해동 2일 후 모든 샘플에서 약 10%정도의 감소된 생산률을 나타냈으며 4일 이후부터는 점차 회복되었다. 8일째가 되었을 때 측정한 결과, 10% Glycerol과 10% Proline의 조합에서 57.91%의 가장 높은 생산률을 나타냈으며, 10%와 Glycerol과 10% Sucrose의 조합은 54.31%, 10% Glycerol과 10% Sorbitol의 조합에서는 53.91%의 생산률을 나타내었다(Figure 12). 미역 배우체에 세포침투형 보호제인 10% Glycerol을 단일로 사용하였을 때보다 세포침투형과 세포보호형 동해보호제를 조합하여 사용하였을 때 약 5%정도 생산률이 높게 나타났다(Table 4). 미역 배우체 동해보호제에 가장 적합한 세포침투형과 보호형의 조합은 Glycerol과 Proline으로 나타났다.

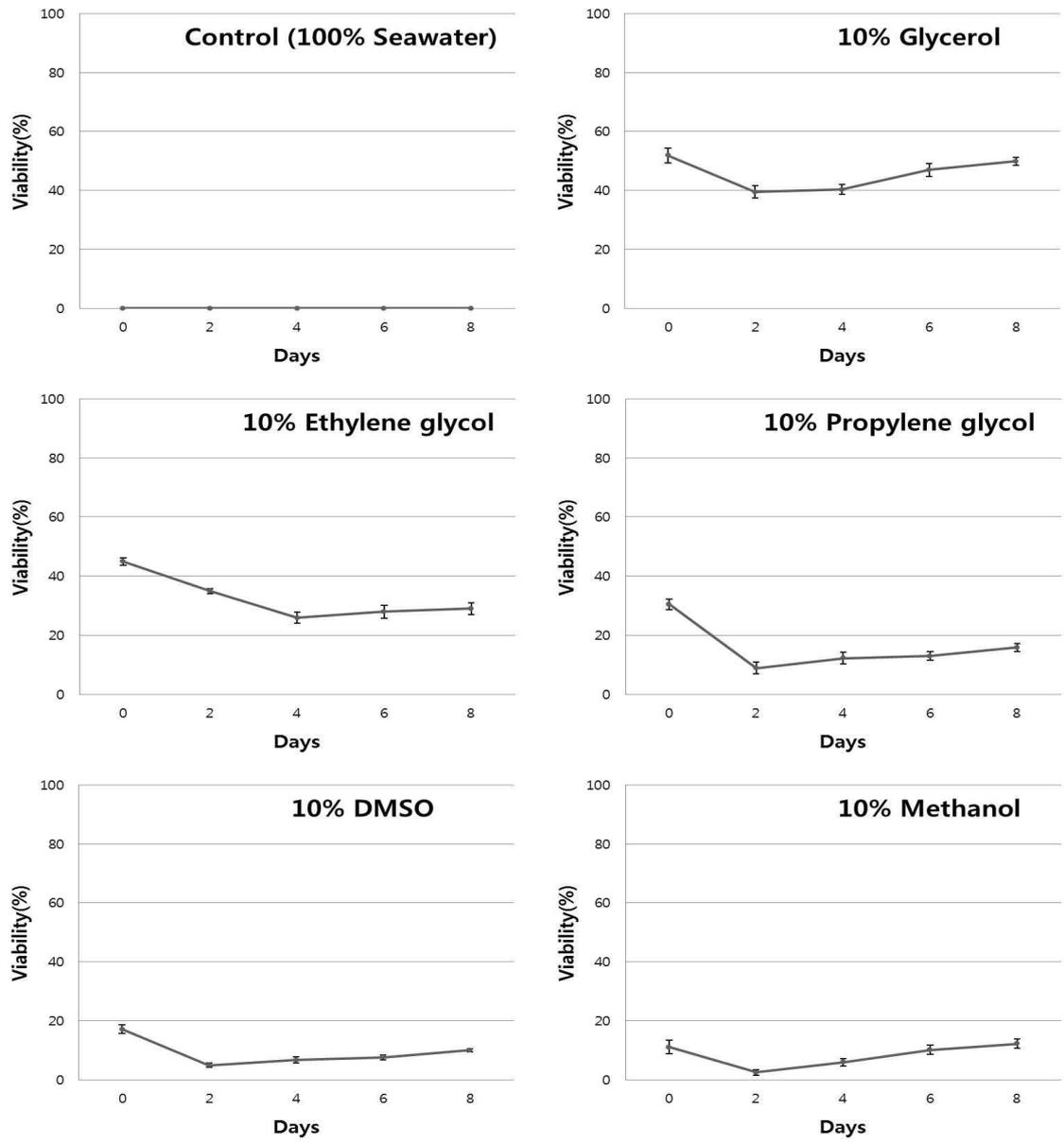


Figure 11. Effects of systemic cryoprotectants on survival of gametophyte of *Undaria pinnatifida*.

Table 3. Effects of systemic cryoprotectants on survival of gametophyte of *Undaria pinnatifida*.

CPAs	Days				
	0	2	4	6	8
Control (100% Seawater)	0.0 ± 0.0				
10% (v/v) Glycerol	51.82 ± 0.87	39.45 ± 0.14	40.29 ± 1.05	46.98 ± 0.39	49.89 ± 0.55
10% (v/v) Ethylene glycol	44.98 ± 1.21	34.94 ± 0.89	25.89 ± 1.87	28.00 ± 2.19	29.00 ± 2.03
10% (v/v) Propylene glycol	30.49 ± 1.77	8.89 ± 1.90	12.22 ± 1.94	12.89 ± 1.44	15.89 ± 1.35
10% (v/v) DMSO	17.14 ± 1.40	4.89 ± 0.78	6.67 ± 1.02	7.56 ± 0.78	9.99 ± 0.52
10% (v/v) Methanol	11.08 ± 2.23	2.44 ± 0.95	5.89 ± 1.31	10.11 ± 1.57	12.24 ± 1.60

(means ± SD, n = 3)

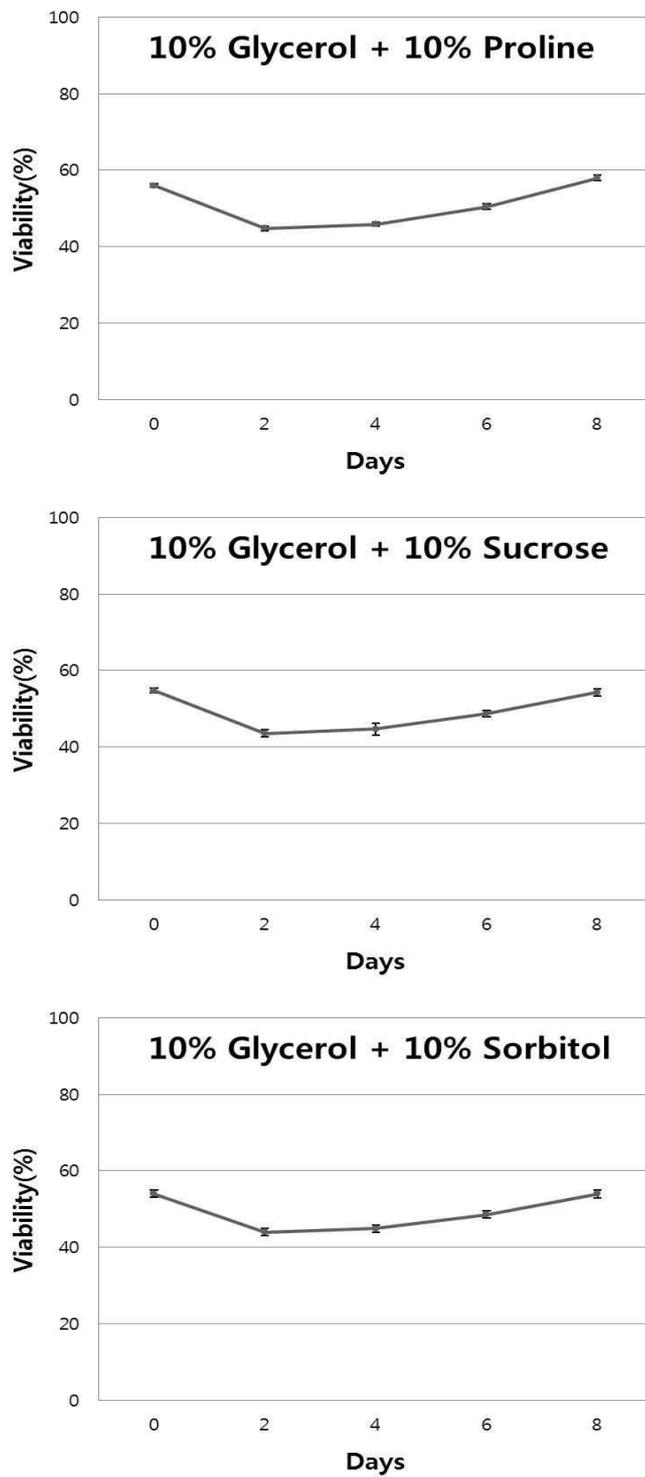


Figure 12. Effects of systemic and non-systemic cryoprotectants on survival of gametophyte of *Undaria pinnatifida*.

Table 4. Effects of systemic and non-systemic cryoprotectants on survival of gametophyte of *Undaria pinnatifida*.

CPAs	Days				
	0	2	4	6	8
10% (v/v) Glycerol + 10% (w/v) Proline	55.97 ± 0.43	44.75 ± 0.56	45.84 ± 0.53	50.43 ± 0.72	57.91 ± 0.75
10% (v/v) Glycerol + 10% (w/v) Sucrose	54.72 ± 0.55	43.47 ± 0.94	44.63 ± 1.57	48.68 ± 0.74	54.31 ± 0.95
10% (v/v) Glycerol + 10% (w/v) Sorbitol	53.98 ± 0.79	43.97 ± 0.56	44.82 ± 1.14	48.56 ± 0.99	53.91 ± 0.70

(means ± SD, n = 3)

3.2. 최적 회복의 광량 및 광질 연구

1) 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ 에서 파장별 생산률

미역배우체의 동결보존 후 빛 파장과 광량의 영향을 알아보기 위하여 일주일간 동결된 미역배우체 샘플을 해동 시킨 후 3주간 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ 의 광량에서 LED 파장별(Blue, Red, White, Green, Mix (Blue+Red)) 회복추이를 관찰한 결과, 최초 해동 후 생산률을 측정하였을때 57.07%로 나타났다(Figure 13). 2일째에는 최초 생산률 보다 13-15%감소되어 혼합광에서는 44.09%, 적색광 42.99%, 백색광 42.40%, 청색광 42.37%, 녹색광은 42.08%순으로 나타났다. 해동 후 배양에서 2-4일째에 생산률이 가장 낮게 나타났으며, 4일 이후 배양기간부터는 세포 분열이 진행되기 시작하므로 생산률이 점차적으로 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 8일째 배양 측정결과, 생산률은 청색광에서 55.46%, 혼합광 52.43%, 백색광 50.66%, 녹색광 50.33%, 적색광 47.95%순으로 나타났다. 14일째 배양 측정에서는 청색광 67.25%, 혼합광 62.96%, 녹색광 60.35%, 백색광 58.24%, 적색광 57.39%의 생산률을 나타냈으며 가장 높은 생산률을 보이는 청색광과 가장 회복이 낮은 적색광에서 10%차이를 나타내었다. 22일째에 생산률을 측정한 결과, 청색광에서는 84.81%로 가장 높은 생산률을 나타냈으며 그 다음으로 혼합광 80.35%, 녹색광 75.06%, 백색광 71.37%, 적색광 71.32%로 나타났다(Table 5).

2) $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ 에서 파장별 생산률

$40 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ 광량에서의 파장별 생산률을 측정하기 위하여 일주일간 동결된 미역배우체 샘플을 해동 시킨 후 3주간 LED 파장별(Blue, Red, White, Green, Mix (Blue+Red)) 회복추이를 관찰한 결과, 최초 해동 후 생산률을 측정하였을 때 63.60%로 나타났다(Figure 14). 2일째에는 최초 생산률 보다 16-19%감소되어 청색광 47.55%, 백색광 45.87%, 혼합광 44.80%, 녹색광 44.64%, 적색광 44.55%순으로 나타났다. 배우체의 회복은 4일째부터 점차적으로 회복되는 추세를 보였으며, 8일째 배양에서 측정결과, 생산률은 청색광에서 63.61%, 백색광 55.01%, 혼합광 54.41% 녹색광 54.68%, 적색광 51.49%순으로 나타났다. 약 일주일이 지났을 때 청색광에서는 최초 생산률과 동일하게 회복이 됨을 측정결과를 통해 확인 할 수 있었고, 대조구인 백색광과 비교하였을 때는 생산률이 8%정도 높게 나타났으며 가장 생산률이 낮은 적색광과 비교하였을 때는 12%정도 높은 생산률을 나타내었다. 10일과 12일 사이에는 청색광과 혼합광에서 생산률이 각각 11%, 10%이상 회복되었으며 백색광 7%, 녹색광과 적색광에서는 3%차이의 회복을 나타내었다. 14일째 배양 측정에서는 청색광 85.91%, 혼합광 76.74%, 녹색광 74.79%, 백색광 74.20%, 적색광 66.83%의 생산률을 나타냈으며 가장 높은 생산률을 보이는 청색광과 가장 생산률이 낮은 적색광에서 약 20%정도의 차이를 나타내었다. 16일째까지는 청색광에서 가장 빠른 회복을 보였는데 이후 90%이상의 생산률부터는 급격히 회복력이 감소하였다. 22일째에 생산률을 측정한 결과, 청색광에서는 95.42%로 가장 높은 생산률을 나타냈으며 그 다음으로 백색광 90.12%, 혼합광 89.57%, 녹색광 88.13%, 적색광 86.93%로 나타났다(Table 6).

3) $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ 에서 파장별 생산률

$60 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ 광량에서의 파장별 생산률을 측정하기 위하여 일주일간 동결된 미역배우체 샘플을 해동 시킨 후 3주간 LED 파장별(Blue, Red, White, Green, Mix (Blue+Red)) 회복추이를 관찰한 결과, 최초 해동 후 생산률을 측정하였을때 60.48%로 나타났다(Figure 15). 2일째에는 최초 생산률보다 13-17%감소되어 혼합광 47.25%, 백색광 46.67%, 청색광 46.28%, 녹색광 44.20%, 적색광 43.13%순으로 나타났다. 배우체의 회복은 4일째부터 점차적으로 회복되는 추세를 보였으며, 8일째 배양에서 측정결과, 생산률은 청색광에서 54.59%, 혼합광 52.43%, 녹색광 52.25% 백색광 51.88%, 적색광 50.13%순으로 나타났다. 12일까지는 생산률은 청색광에서 65.45%로 혼합광의 62.79%보다 약 2-3% 높게 나타났으나, 14일째 배양 측정에서는 혼합광 73.81%, 청색광 71.35%, 백색광 66.60%, 녹색광 63.37%, 적색광 62.59%의 생산률을 나타냈으며 가장 높은 생산률을 보이는 혼합광과 가장 생산률이 낮은 적색광에서 약 11%정도의 차이를 나타내었다. 22일째에 생산률을 측정한 결과, 혼합광에서 88.73%, 청색광 87.31%로 1%정도의 미미한 차이를 보였으며 그 다음으로 백색광 83.91%, 녹색광 82.48%, 적색광 81.31%로 나타났다(Table 7).

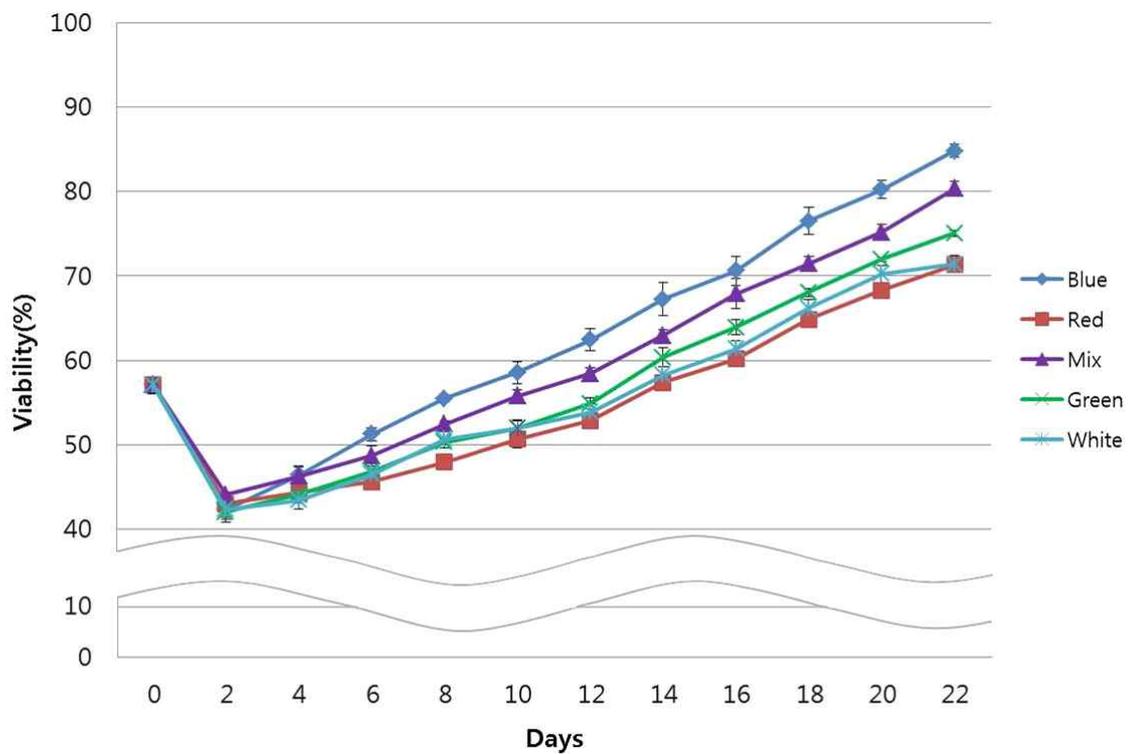


Figure 13. Changes in the survival of gametophyte of *U. pinnatifida* during post-thawing incubation. Cultured at different light wavelength and $20 \mu\text{mol}/\text{m}^{-2}/\text{s}^{-1}$.

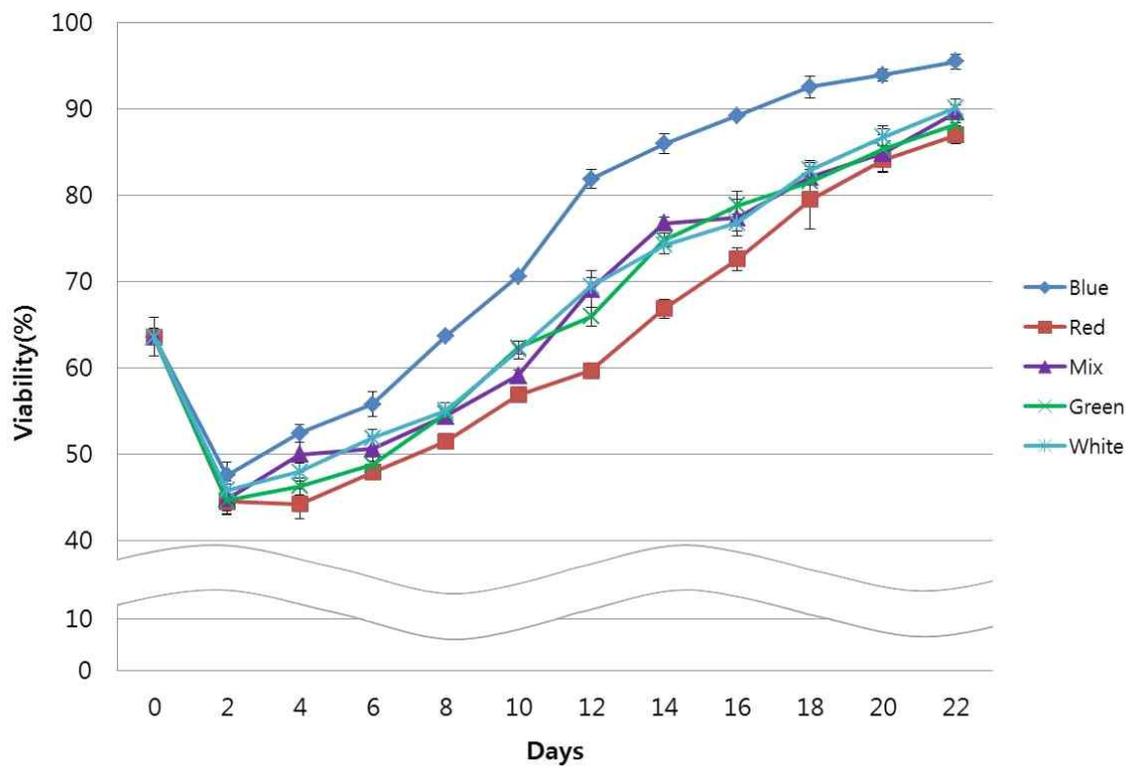


Figure 14. Changes in the survival of gametophyte of *U. pinnatifida* during post-thawing incubation. Cultured at different light wavelength and $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$.

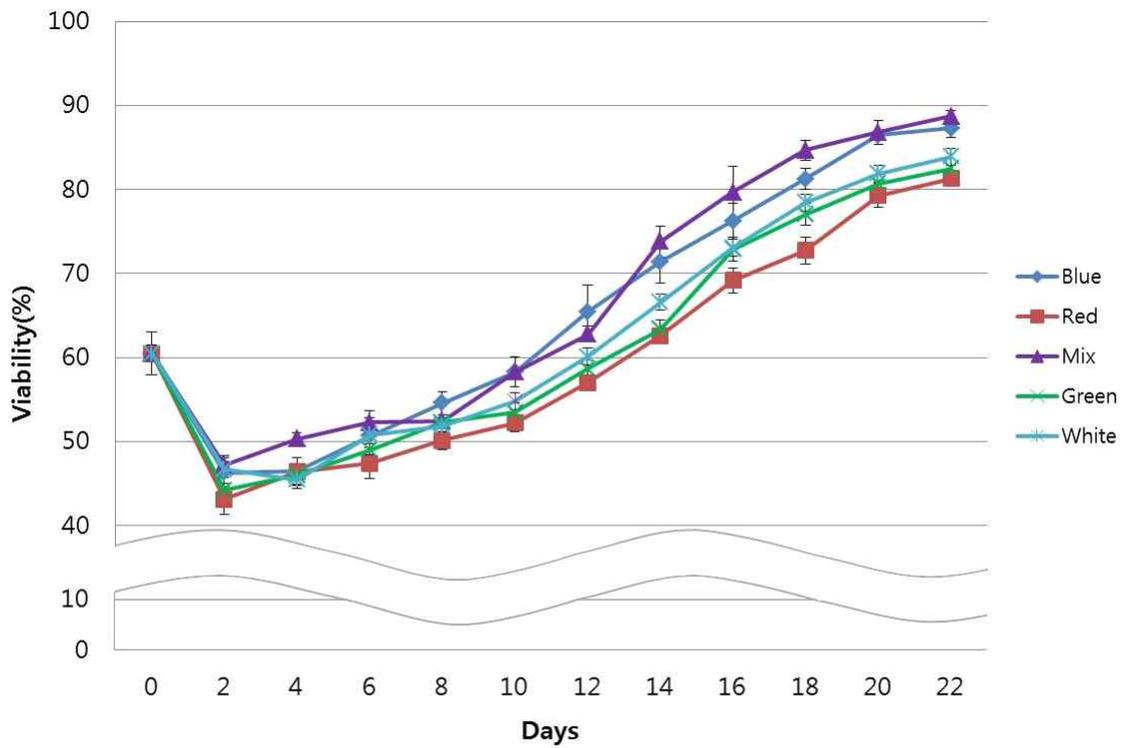


Figure 15. Changes in the survival of gametophyte of *U. pinnatifida* during post-thawing incubation. Cultured at different light wavelength and $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$.

Table 5. Changes in the survival of gametophyte of *U. pinnatifida* during post-thawing incubation. Cultured at different light wavelength and $20 \mu\text{mol/m}^{-2}/\text{s}^{-1}$.

Light Sources	Days											
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
White LED (%)	57.07 ± 1.00	42.40 ± 1.35	43.42 ± 0.50	46.54 ± 0.11	50.66 ± 0.17	51.97 ± 0.61	53.87 ± 0.83	58.24 ± 1.48	61.35 ± 0.69	66.15 ± 0.35	70.26 ± 0.68	71.37 ± 1.00
Blue LED (%)	57.07 ± 1.00	42.37 ± 1.19	46.38 ± 1.05	51.24 ± 0.82	55.46 ± 0.37	58.55 ± 1.30	62.45 ± 1.33	67.25 ± 1.99	70.60 ± 1.73	76.49 ± 1.62	80.25 ± 1.09	84.81 ± 0.77
Red LED (%)	57.07 ± 1.00	42.99 ± 0.76	44.30 ± 0.98	45.63 ± 0.73	47.95 ± 0.70	50.64 ± 1.04	52.87 ± 0.83	57.39 ± 0.80	60.18 ± 0.39	64.83 ± 0.86	68.29 ± 0.46	71.32 ± 0.78
Mix(R+B) LED (%)	57.07 ± 1.00	44.09 ± 0.35	46.29 ± 1.23	48.69 ± 1.24	52.43 ± 0.39	55.80 ± 0.69	58.43 ± 0.72	62.96 ± 0.66	67.89 ± 1.77	71.45 ± 0.79	75.17 ± 0.90	80.35 ± 0.86
Green LED (%)	57.07 ± 1.00	42.08 ± 1.20	44.08 ± 0.96	46.87 ± 0.58	50.33 ± 0.38	51.99 ± 0.85	54.91 ± 0.62	60.35 ± 1.16	63.90 ± 0.87	68.03 ± 0.49	71.95 ± 0.24	75.06 ± 0.38

(means ± SD, n = 3)

Table 6. Changes in the survival of gametophyte of *U. pinnatifida* during post-thawing incubation. Cultured at different light wavelength and $40 \mu\text{mol/m}^{-2}/\text{s}^{-1}$.

Light Sources	Days											
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
White LED (%)	63.60 ± 2.24	45.87 ± 1.71	47.94 ± 0.76	51.86 ± 0.97	55.01 ± 1.22	62.04 ± 0.37	69.45 ± 0.31	74.20 ± 0.85	76.79 ± 2.82	82.95 ± 1.31	86.71 ± 3.03	90.12 ± 0.44
Blue LED (%)	63.60 ± 2.24	47.55 ± 1.50	52.46 ± 1.03	55.79 ± 1.44	63.61 ± 0.45	70.59 ± 0.24	81.86 ± 1.07	85.91 ± 1.16	89.16 ± 0.23	92.50 ± 1.28	93.91 ± 0.70	95.42 ± 0.88
Red LED (%)	63.60 ± 2.24	44.55 ± 1.49	44.26 ± 1.72	47.89 ± 0.79	51.49 ± 0.47	56.88 ± 0.48	59.66 ± 0.55	66.83 ± 1.08	72.57 ± 1.27	79.49 ± 3.43	84.09 ± 0.61	86.93 ± 1.03
Mix(R+B) LED (%)	63.60 ± 2.24	44.80 ± 1.79	49.99 ± 2.09	50.62 ± 1.43	54.41 ± 0.54	59.08 ± 0.63	69.10 ± 2.13	76.74 ± 0.68	77.38 ± 2.15	82.08 ± 1.63	84.84 ± 2.17	89.57 ± 0.87
Green LED (%)	63.60 ± 2.24	44.64 ± 1.21	46.31 ± 0.99	48.75 ± 0.94	54.68 ± 0.40	62.34 ± 0.70	65.91 ± 1.10	74.79 ± 0.79	78.78 ± 1.64	81.54 ± 1.76	85.31 ± 2.68	88.13 ± 0.26

(means ± SD, n = 3)

Table 7. Changes in the survival of gametophyte of *U. pinnatifida* during post-thawing incubation. Cultured at different light wavelength and $60 \mu\text{mol}/\text{m}^{-2}/\text{s}^{-1}$.

Light Sources	Days											
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
White LED (%)	60.48 ± 2.56	46.67 ± 0.53	45.45 ± 1.31	50.77 ± 0.71	51.88 ± 0.73	54.84 ± 0.67	60.10 ± 2.36	66.60 ± 0.80	73.03 ± 1.87	78.43 ± 0.85	81.89 ± 0.09	83.91 ± 0.26
Blue LED (%)	60.48 ± 2.56	46.28 ± 2.06	46.45 ± 1.62	50.67 ± 2.19	54.59 ± 1.36	58.29 ± 0.47	65.45 ± 3.19	71.35 ± 2.49	76.25 ± 2.16	81.25 ± 1.26	86.47 ± 0.58	87.31 ± 1.15
Red LED (%)	60.48 ± 2.56	43.13 ± 1.82	46.41 ± 0.31	47.44 ± 1.81	50.13 ± 1.03	52.22 ± 1.00	57.03 ± 0.55	62.59 ± 0.91	69.18 ± 1.45	72.74 ± 1.63	79.25 ± 1.41	81.31 ± 0.59
Mix(R+B) LED (%)	60.48 ± 2.56	47.25 ± 0.82	50.34 ± 0.78	52.29 ± 1.40	52.43 ± 0.15	58.29 ± 1.76	62.79 ± 0.94	73.81 ± 1.86	79.71 ± 1.45	84.69 ± 1.19	86.82 ± 1.44	88.73 ± 0.66
Green LED (%)	60.48 ± 2.56	44.20 ± 0.41	45.99 ± 1.21	49.02 ± 1.50	52.25 ± 0.50	53.43 ± 1.14	58.67 ± 1.05	63.37 ± 1.06	72.87 ± 1.41	77.02 ± 1.31	80.69 ± 0.39	82.48 ± 0.41

(means ± SD, n = 3)

3.3. LED 파장별 미역 배우체 광형태형성 변화

해동 후 배양을 통해 3주간 온도 20℃, 광주기는 명주기 12시간과 암주기 12시간, 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ 광량에서 각 LED 파장을 조사한 후 미역 배우체의 광형태형성의 변화에 대해 살펴 보았다. 해동 후 각 파장에서 3-4일째 까지 형태의 변화 없이 각 파장에 따라 각기 다른 생산물을 나타내었다. 8일째가 되었을 때 청색광, 혼합광에서 세포의 형태가 신장 되지 않고 세포의 분열과 함께 타원형의 모양으로 점차 변화되는 것을 관찰 할 수 있었다. 2주 후 관찰 결과 청색광, 혼합광과 같이 백색광에서도 세포의 형태가 점차적으로 타원형으로 분열되며 형성되는 것을 확인 할 수 있었고 적색광, 녹색광에서는 세포의 형태가 분열 없이 길게 신장되는 것을 관찰 하였다. 해동 후 22일째 관찰 결과, 육안으로 외부를 관찰하였을 때 청색광, 혼합광, 백색광에서 배우체의 색상이 진한 갈색을 나타내었으며 적색, 녹색광에서는 연한 갈색을 띄었다. 세포의 형태는 청색광, 혼합광, 백색광에서 원형모양의 세포로 분열과 함께 조밀한 형태로 회복되었으며 적색광과 녹색광에서는 세포가 계속 신장되어 자라는 형태로 나타났다. 특히, 적색광에서는 최초 해동 후 배우체 세포 가로 길이를 측정하였을 때 $14.29 \pm 2.4 \mu\text{m}$ 로 나타났는데 3주 후 측정하였을 때는 가로길이가 $29.28 \pm 1.7 \mu\text{m}$ 로 측정되어 해동 직 후의 미역 배우체 보다 2-3 배 정도 길게 신장된 것으로 관찰 되었다(Figure 16).

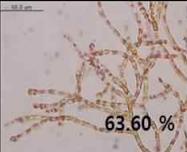
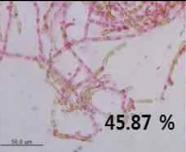
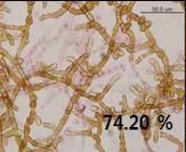
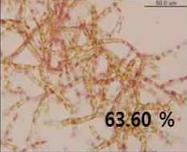
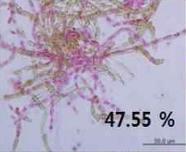
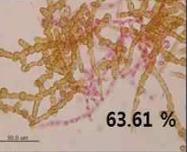
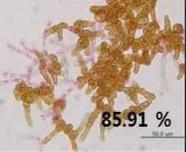
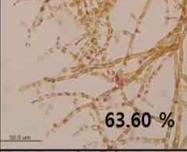
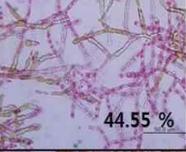
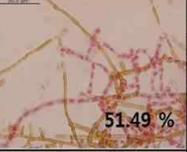
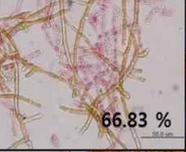
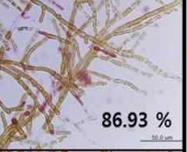
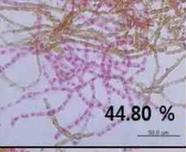
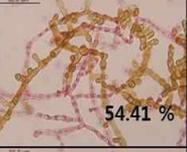
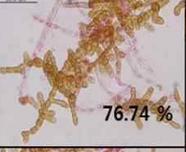
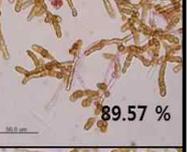
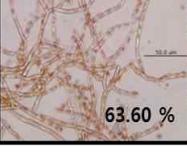
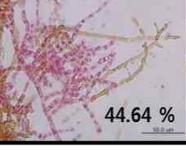
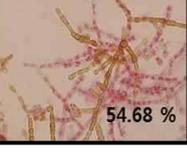
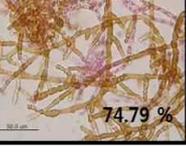
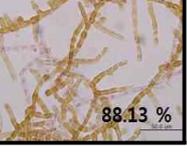
	After thawing	After 2 days	After 8 days	After 14 days	After 22 days
White	 63.60 %	 45.87 %	 55.01 %	 74.20 %	 90.12 %
Blue	 63.60 %	 47.55 %	 63.61 %	 85.91 %	 95.42 %
Red	 63.60 %	 44.55 %	 51.49 %	 66.83 %	 86.93 %
Mix (B+R)	 63.60 %	 44.80 %	 54.41 %	 76.74 %	 89.57 %
Green	 63.60 %	 44.64 %	 54.68 %	 74.79 %	 88.13 %

Figure 16. Changes in the photomorphogenesis of gametophyte. cultured at different light wavelength and $40 \mu\text{mol}/\text{m}^{-2}/\text{s}^{-1}$.

3.4. LED 파장별 미역 배우체 색소함량 변화

미역 배우체 해동 후 $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ 광량에서 3주간 파장이 상이한 5가지의 광질을 조사하여 각각의 색소함량의 변화에 대해서 살펴보았다(Table 8). 색소함량 측정결과, 청색광에서의 Chlorophyll a의 함량은 생중량 1 g당 2.075 mg로 나타났으며, 백색광 1.768 mg, 혼합광 1.724 mg, 녹색광 1.346 mg, 적색광 1.256 mg 순으로 나타났다(Figure 17). Chlorophyll c의 함량 측정 결과에서도 청색광에서 생중량 1 g당 1.167 mg으로 가장 높았으며 이어서 백색광 1.050 mg, 혼합광 1.002 mg, 녹색광 0.667 mg, 적색광 0.592 mg으로 나타났다(Figure 18). Carotenoids 함량 측정결과에서도 청색광이 0.965 mg으로 가장 높게 나타났으며, 그 다음으로 녹색광 0.862 mg, 혼합광 0.802 mg, 백색광 0.762 mg, 적색광 0.759 mg 으로 나타났다(Figure 19).

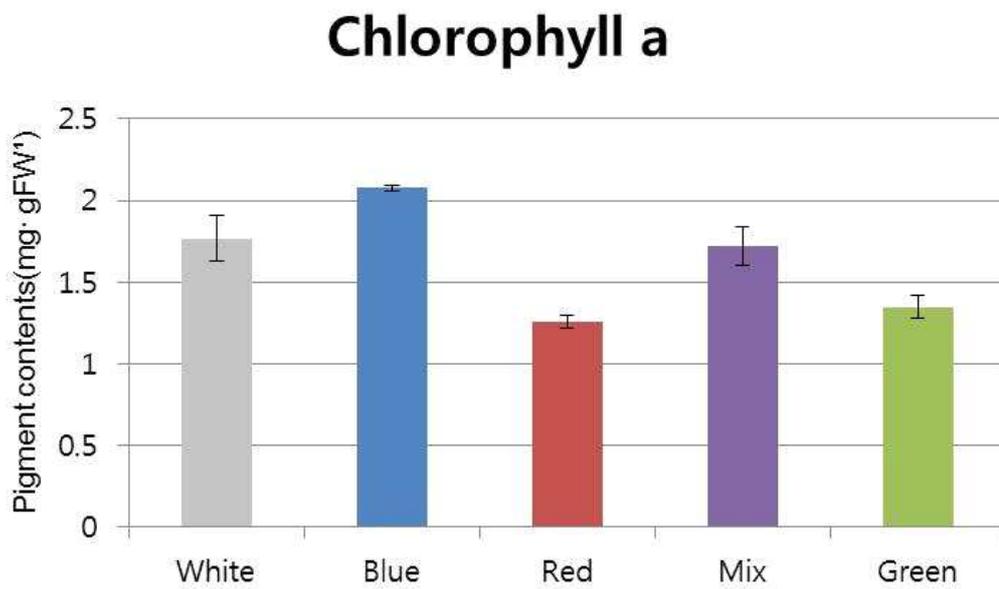


Figure 17. Effect of different LED wavelength on chlorophyll a ratio in gametophyte of *U. pinnatifida* ($P < 0.05$).

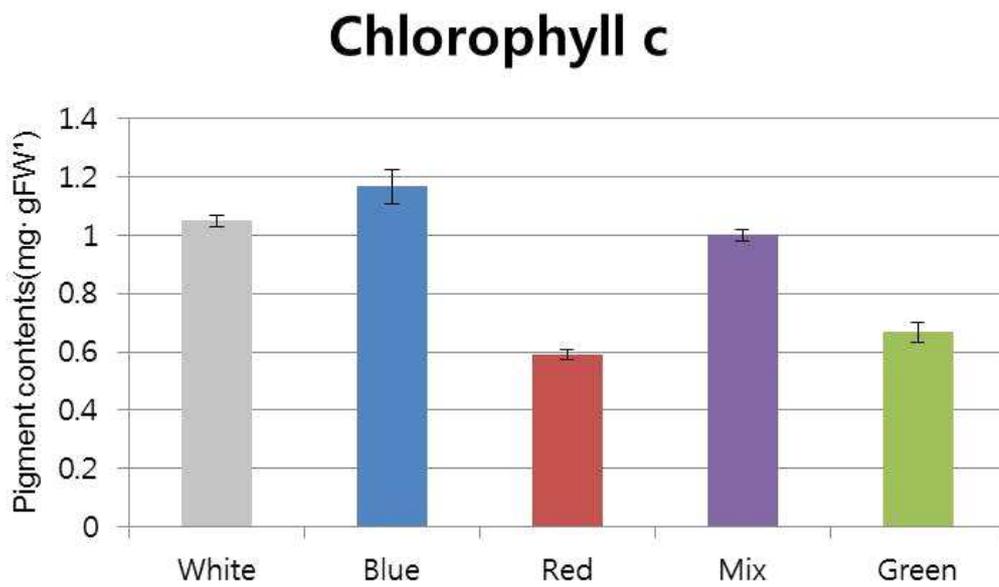


Figure 18. Effect of different LED wavelength on chlorophyll c ratio in gametophyte of *U. pinnatifida* ($P < 0.05$).

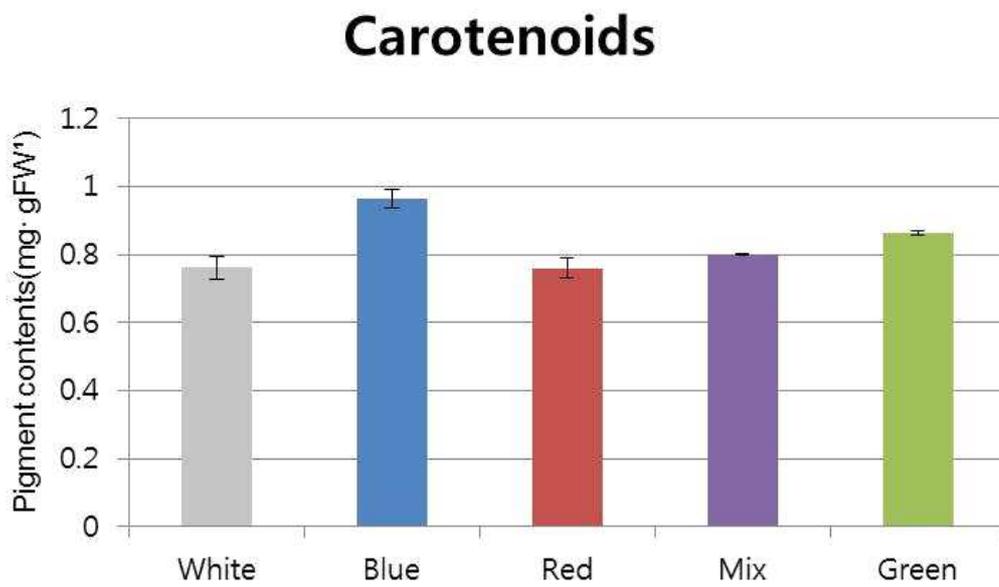


Figure 19. Effect of different LED wavelength on carotenoids ratio in gametophyte of *U. pinnatifida* ($P < 0.05$).

Table 8. Effect of different LED wavelength on pigment of contents in gametophyte of *U. pinnatifida* ($P < 0.05$).

Light Sources	Chlorophyll a (mg · gFW ¹)	Chlorophyll c (mg · gFW ¹)	Carotenoids (mg · gFW ¹)
White LED	1.768 ± 0.139	1.050 ± 0.019	0.762 ± 0.034
Blue LED	2.075 ± 0.015	1.167 ± 0.058	0.965 ± 0.027
Red LED	1.256 ± 0.040	0.592 ± 0.018	0.759 ± 0.029
Mix(R+B) LED	1.724 ± 0.118	1.002 ± 0.020	0.802 ± 0.002
Green LED	1.346 ± 0.071	0.667 ± 0.033	0.862 ± 0.006

(means ± SD, n = 3)

IV. 고찰

동결보존기술은 세포의 기능적인 변화가 일어나지 않는 상태로 저온에서 장기간 보관할 수 있는 유용한 기술이다(Saks 1978). 하지만 해조류의 동결보존 기술은 지금까지 확립되지 않았으며 해조류 각 종마다 해동 후 생산물이 동해보호제의 종류와 농도, 동결 및 해동 조건에 따라 많은 차이를 보이고, 회복과정에 따라서도 생산물이 달리 나타났다.

본 연구에서는 갈조류인 미역의 배우체 세대를 이용하여 동결보존에 관한 실험들을 진행하였다. 미역 배우체의 동결을 하기 위해 세포침투형 동해보호제와 세포보호형 동해보호제를 선별 결과, 세포침투형 보호제로는 Glycerol과 세포보호형 동해보호제로는 Proline의 조합이 가장 최적화된 것으로 나타났다. Glycerol을 단일 동해보호제로 사용하였을 때보다 세포보호형 동해보호제인 Proline과 Sucrose, Sorbitol을 조합하여 사용하였을 때 약 5%이상 생산물이 높은 것으로 나타났는데, 이는 동결 과정에서 세포침투형 동해보호제가 세포내의 얼음 결정 형성을 억제함과 동시에 세포보호형 동해보호제가 세포막 외부의 얼음 결정 형성을 억제하고 삼투압을 조절하는 역할을 한 것으로 판단된다. Kuwano et al. (2004)의 미역 배우체 동해보호제 실험의 결과에서도 Glycerol과 Proline의 조합이 가장 최적화된 것으로 보고된 바 있다.

미역 배우체의 동결 및 해동 직 후 Erythrosine염색액을 이용해 염색의 유무에 따라 생산물 측정을 하였다. Kono et al. (1998)은 Laminariales 종의 생존성이 용해 후 배양에서 감소한다고 보고하였는데 본 실험에 사용된 미역 배우체에서도 해동 2-4일째에 가장 낮은 생산물을 보이다가 회복배양 일주일째에 최초 해동 후의 생산물과 비슷한 생산물을 나타내었다. 이러한 생존성의 변화에 따라 본 실험에서는 해동 직 후 나타난 생산물과 더불어 실제 생존성을 평가하기 위해 3주의 배양기간 동안 회복된 세포와 분열된 세포를 함께 측정하여 생산물로 평가하였다.

미역 배우체의 해동 후 회복 조건으로 빛의 파장과 광량을 달리 주었을 때 생산물의 차이를 나타내었는데 이는 광합성을 하는 해조류 특성으로 각 종마다 유효하게 작용하는 빛의 파장과 세기에 따라 회복의 추이가 달리 나타난 것으로 해석된다. 해산식물인 해조류는 바다라는 특수한 환경에 서식하고 있다. 해수에 투과되는 광선은 수심이 증가됨에 따라 광조사량 뿐만 아니라 광질도 다양하게 변화되는데, 연안수에서 적색 파장이 대부분 수 m내에서 완전

히 흡수 또는 반사 되는데 비하여, 청색과 녹색 파장은 비교적 깊은 수심 까지 도달하게 되어 단파장 광선 영역대를 형성한다(Jerlov 1966). 따라서 색소 조성의 변이와 바다의 빛 변이 사이에는 어떠한 관련이 있음을 시사한다. 해양생태계 내에서 일차 생산자인 해조류는 태양광을 에너지원으로 이용하고 이산화탄소를 흡수하여 광합성을 한다. 또한 해조류의 성장에는 물리적, 지질적, 화학적 요인에 의해 달라지는데 수 많은 환경의 요인 중에서도 일반적으로 해조류의 성장에 가장 큰 영향을 주는 것은 수온과 광이라고 알려져 있다 (Druehl et al. 1987, Vásquez and Vega 2001). 특히 빛은 해조류에게 광합성을 위한 원동력이 되며, 빛의 파장과, 조성은 세포의 색소, 화학적 조성, 이온 수송 및 성장속도에 관여하여 해조류의 생리적인 기작을 조절하는 중요한 요인이라고 보고되었다(Wallen and Green 1971, Veski and Jeffrey 1977, Rivkin 1989, Schmid and Dring 1993). 본 연구에서도 여러 가지 단 파장의 광질을 이용하여 동결 보존 후 생체 회복력에 관하여 다루었다. 결과적으로 갈조류인 미역 배우체 세대는 $40 \mu\text{mol}/\text{m}^{-2}/\text{s}^{-1}$ 광량과 단파장의 광질인 청색광(460 nm)에서 다른 단파장의 광질에 비해 가장 빠른 회복력을 나타내었다. 이러한 청색광의 효과는 해조류 광 생리반응과 관련된 연구에서 성장뿐만 아니라 성숙에도 관여 하는 것으로 보고되었는데, 청색광을 다시마목 Laminariales의 사상체에 조사하였을 때 배우체 식물에서 정자와 난자 생성을 촉발시키고 적색광에서는 성숙을 저해한다고 하였다(Lüning and Neushul 1978). 또한 지중해 연안에 생육하는 갈조류 *Cystoseira barbata*를 대상으로 한 연구에서도 청색광과 적색광을 조사하였을 때 성장률과 색소함량이 청색광에서 적색광보다 높게 나타난다고 하였다(Baghdadli et al. 1994).

3주의 배양기간 동안 생산물 측정과 함께 각 파장에 따라 달리 나타는 미역 배우체의 광형태형성(photomorphogenesis)에 대해서도 살펴보았다. 청색광과 혼합광 그리고 백색광에서 회복된 배우체는 원형의 조밀한 형태로 분열하며 회복되었으며 외형적으로는 갈색의 진한 색택을 띄었다. 녹색광과 적색광에서는 배우체가 세로로 길게 신장되며 회복되는 형태와 외형적으로 황색의 연한 색택을 나타냈다. 이는 해조류에서 청색광이 단백질 합성, 호흡, 효소 활성이 증가시키고 적색광이 탄수화물을 축적시킨다는 연구 결과에서처럼 (Dring 1988), 미역 배우체 또한 광질의 변화에 따라 반응한 것으로 판단된다. 또한 갈조류 고리매속(*Scytosiphon*) 포자체 세대의 광형태형성 실험 결과에서도 적색광을 조사하였을 때 포자체는 길게 신장되고 불규칙하게 가지를 치는 사상체를 형성 하였으나 청색광에서 자란 세포들은 분열을 통해 2차원적 생

장이 일어난다고 보고하였다(Dring and Lüning 1975).

본 연구에서는 3주간 각기 다른 과장으로 조사된 미역 배우체의 색소 함량을 측정하기 위해 UV/VIS Spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정한 후 이를 환산하여 색소 함량 값을 구하였다. 측정 결과, 청색광에서 3주간 배양한 미역 배우체가 다른 광질에서 배양한 미역 배우체 샘플에 비해 Chlorophyll a, Chlorophyll c, Carotenoids 함량이 유의적으로 높게 나타났다 ($P < 0.05$). Dring (1991)은 식물체내 엽록소의 농도의 증가는 광합성의 증가에 비례적인 연관성이 있다고 보고하였는데 본 연구에서도 미역 배우체내의 엽록소와 보조색소의 증가와 함께 광합성의 비례적인 증가로 조사된 미역 배우체 세대의 생체 회복에 영향을 주었을 것으로 판단된다. Oh and Koh (1996)의 미역 엽상체 실험에서도 성장과 광합성 사이에 높은 상관관계가 있다고 보고된 바 있다.

이러한 실험결과들을 통해 미역 배우체 뿐만 아니라 다른 해조류들 역시 동결 보존 후 각 종의 특성에 맞는 광질을 선별하여 회복을 유도한다면 기존의 배양 환경에 비해 더욱 빠른 회복력을 나타낼 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 추가적으로 각 종에 대한 광질 탐색이 더 필요할 것으로 보인다.

【참고문헌】

- 특허청. 2012. 「최근 UPOV회의 동향 및 주요국 식물품종 보호체계 연구」보고서.
- 해조류바이오연구센터. 2009. 「미역 선발육종 연구」 국립수산물과학원 사업보고서. pp. 15-17.
- 해양수산부. 2014. 「2014 해양수산 주요통계」해조류 어업생산량. pp. 75.
- Baghdadli, D., Tremblin, G. & Ducher, D. 1994. The effect of light quality on growth, photosynthesis and development in cultivated thalli of *Cystoseria barbata* C. Ag. f. *aurantia* (Kütz.) Giaccone (Phaeophyceae, Fucales). *Botanica Marina* 37: 43-50.
- Barta, D. J., Tibbitts, T. W., Bula, R. J. & Morrow, R. C. 1992. Evaluation of light emitting diode characteristics for a space based plant irradiation source. *Advances in Space Research* 12: 141-149.
- Bula, R. J., Morrow, R. C., Tibbitts, T. W., Barta, D. J., Ignatius, R. W. & Martin, T. S. 1991. Light-emitting diodes as a radiation source for plants. *HortScience* 26: 203-205.
- Cañavate, J. P. & Lubian, L. M. 1994. Tolerance of six marine microalgae to the cryoprotectants dimethyl sulfoxide and methanol. *Journal of Phycology* 30: 559-565.
- Chen, T. H. H., Kartha, K. K., Leung, N. R., Kurz, W. G. W., Chatson, K. B. & Constabel, F. 1984. Cryopreservation of alkaloid producing cell cultures of periwinkle (*Catharanthus roseus*). *Plant Physiology* 75: 726-731.

- Day, J. G., DeVille, M. M. 1995. Cryopresevation of algae. *In* Day, J. G., McLellan, M. R. [Eds.] *Cryopreservation and Freeze drying Protocols, Methods in Molecular Biology - Volume 38*. Human Press, Totowa, NJ, USA, pp. 81-89.
- Dring, M. J. 1988. Photocontrol of development in algae. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39: 157-174.
- Dring, M. J. 1991. *The biology of marine plants*. Cambridge University Press.
- Dring, M. J. & Lüning, K. 1975. Induction of two-dimensional growth and hair formation by blue light in the brown alga *Scytosiphon lomentaria*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 75: 107-117
- Druehl, L. D., Cabot, E. L. & Lloyd, K. E. 1987. Seasonal growth of *Laminaria groenlandica* as a function of plant age. *Canadian Journal of Botany* 65: 1599-1604.
- Fuller, B. J. 2004. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo letters* 25: 375-388.
- Jeffrey, S. W. & Humphrey, G. F. 1975. New spectrophotometric Equations for determining chlorophylls a, b, c₁ and c₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemical Physiological Pflanzen* 167: 191-194.
- Jerlov, N. G. 1966. Aspects of light measurements in the sea. *In* Bainbridge, R., Evans, G. C. & Rackham, O. [Eds.] *Light as an ecological factor*. Blackwell, Oxford, pp. 91-98.

- Karlsson, J. O. M. & Toner, M. 1996. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials* 17: 234-256.
- Kono, S., Kuwano, K. & Saga, N. 1998. Cryopreservation of *Eisenia bicyclis* (Laminariales, Phaeophyta) in liquid nitrogen. *Journal of Marine Biotechnology* 6: 220-223.
- Kuwano, K. & Saga, N. 2000. Cryopreservation of marine algae: Applications in biotechnology. In Fingerman, M. & Nagabhushanam, R. [Eds.] *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. & Saga, N. 1993. Cryopreservation of the conchocelis of the marine alga *Porphyra yezoensis* Ueda (Rhodophyta) in liquid nitrogen. *Plant Science* 94: 215-225.
- Kuwano, K., Aruga, Y. & Saga, N. 1994. Cryopreservation of the conchocelis of *Porphyra* (Rhodophyta) by applying simple prefreezing system. *Journal of Phycology* 30: 566-570.
- Kuwano, K., Aruga, Y. & Saga, N. 1996. Cryopreservation of the clonal gametophytic thalli of *Porphyra* (Rhodophyta). *Plant Science* 116: 117-124.
- Kuwano, K., Kono, S., Jo, Y.-H., Shin, J.-A. & Saga, N. 2004. Cryopreservation of the gametophytic cell of Laminariales (Phaeophyta) in liquid nitrogen. *Journal of Phycology* 40: 606-610.
- Kwon, C. J. & Choi, C. G. 2013. Growth of *Ulva pertusa* Kjellman (Chlorophyta, Ulvophyceae) by a Light-Emitting Diode (LED) light source. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 46: 571-574.

- Lee, C. G. & Palsson, B. O. 1994. High-density algal photobioreactors using light-emitting diodes. *Biotechnology and Bioengineering* 44: 1161-1167.
- Lichtenthaler, H. K. & Wellburn, A. R. 1983. Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extract in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11: 591-592.
- Lovelock, J. E. 1954. The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing. *Biochemical Journal* 56: 265-270.
- Lüning, K. & Neushul, M. 1978. Light and temperature demands for growth and reproduction of laminarian gametophytes in southern and central California. *Marine Biology* 45: 297-309
- Mazur, P. 2004. Principles of cryobiology. In Fuller, B. J., Lane, N. J. & Benson, E. E. [Eds.] *Life in the Frozen State*. CRC Press, Boca Raton, pp. 3-65.
- Morris, G. J. 1978. Cryopreservation of 250 strains of Chlorococcales by the method of two-step cooling. *British Phycological Journal* 13: 15-24
- Oh, S. H. & Koh, C. H. 1996. Growth and photosynthesis of *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta) on a cultivation ground in Korea. *Botanica Marina* 39: 389-393.
- Okamoto, K., Yanagi, T. & Kondo, S. 1997. Growth and morphogenesis of lettuce seedlings under different combinations of red and blue light. *Acta Horticulturae* 435: 149-157.
- Provasoli, L. 1968. Media and prospects for the cultivation of marine algae. In Watanabe, A., and Hattori, A. [Eds.] *Culture and collections of algae*. Japanese Society of Plant Physiology pp. 63-75.

- Renard, P., Arbault, S., Kaas, R. & Perez, R. 1992. A method for the cryopreservation of the gametophytes of the food algae *Undaria pinnatifida* (Laminariales). *Comptes Rendus Academie Series III-Life Sciences* 315: 445-451.
- Rivkin R. B. 1989. Influence of irradiance and spectral quality on the carbon metabolism of phytoplankton. I. Photosynthesis, chemical composition and growth. *Marine Ecology Progress Series* 55: 291-304.
- Rhodes, L., Smith, J., Tervit, R., Roberts, R., Adamson, J., Adams, S. & Decaer, M. 2006. Cryopreservation of economically valuable marine micro-algae in the classes Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Cyanophyceae, Dinophyceae, Haptophyceae, Prasinophyceae, and Rhodophyceae. *Cryobiology* 52: 152-156.
- Saga, N., Sakanishi, Y. & Ogishima, T. 1989. Method for quick evaluation of cell viability in marine macroalgae. *Japanese Journal of Phycology* 54: 722-724.
- Saks, N. 1978. The preservation of salt marsh algae by controlled liquid nitrogen freezing. *Cryobiology* 15: 563-568.
- Schmid, R. & Dring, M. J. 1993. Rapid, blue-light-induced acidifications at the surface of *Ectocarpus* and other marine macroalgae. *Plant Physiology* 101: 907-913.
- Schuerger, A. C., Brown, C. S. & Stryjewski, E. C. 1997. Anatomical features of pepper plants (*Capsium annuum* L.) grown under red light-emitting diodes supplemented with blue or far-red light. *Annals of Botany* 79: 273-282.
- Taylor, R. & Fletcher, R. L. 1999. Cryopreservation of eukaryotic algae—a review of methodologies. *Journal of Applied Phycology* 10: 481-501.

- Van der Meer, J. P. & Simpson, F. J. 1984. Cryopreservation of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta) and other macrophytic marine algae. *Phycologia* 23: 195-202.
- Vásquez, J. A. & Vega, J. M. A. 2001. *Chondracanthus chamissoi* (Rhodophyta, Gigartinales) in northern Chile: ecological aspects for management of wild populations. *Journal of Applied Phycology* 13: 267-277.
- Vesk, M. & Jeffrey, S. W. 1977. Effect of blue-green light on photosynthetic pigments and chloroplast structure in unicellular marine algae from six classes. *Journal of Phycology* 13: 280-288.
- Wellen, D. G. & Geen, G. H. 1971. Light quality in relation to growth, photosynthetic rates and carbon metabolism in two species of marine plankton algae. *Marine Biology* 10: 34-43.