

감성돔, *Acanthopagrus schlegeli* 배의 생존과 부화에 미치는 동해방지제의 영향

임한규* · 장영진¹ · 조필규¹

국립수산과학원 울진수산종묘시험장, ¹부경대학교 양식학과

Effects of Cryoprotectants on Survival and Hatching of Black Seabream, *Acanthopagrus schlegeli* Embryos

Han Kyu Lim*, Young Jin Chang¹ and Pil Gue Jo¹

Uljin Marine Hatchery, National Fisheries Research and Development Institute, Uljin 767-860, Korea
¹Department of Aquaculture, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

In order to develop a method for the cryopreservation of fish embryos, the determination of optimal concentrations of dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol and glycerol as individual cryoprotectants was performed by using the early embryos of black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*. Optimal concentrations of cryoprotectants were assessed in terms of effects on mortality, median lethal concentration and hatching rate of embryos. The mortality of black seabream embryos immersed in cryoprotectants was related to the concentrations of cryoprotectants and immersion times. The toxicity to embryos was lower in order of DMSO, < ethylene glycol, < glycerol. The results from the mortality, median lethal concentration and hatching rate evaluations suggest that DMSO was the most effective cryoprotectant for black seabream embryos followed by ethylene glycol, and suitable concentrations of DMSO and ethylene glycol were 2.0~2.25M and 1.0~1.78M, respectively, with 20 minutes of immersion time.

Keywords: Black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*, Cryoprotectant, Mortality, Hatching rate, LC50

서 론

장기간 동안 어류의 수정란이나 발생중인 배를 보존할 수 있는 냉동보존 기술은 인공종묘 생산시 여러 가지 장점을 제공할 뿐만 아니라, 희귀종이나 재래종의 종 보존 방법을 간소화시킬 수 있으며, 우량종의 gene pool을 조성할 수 있게 한다. 이와 같이 어류 수정란이나 배의 냉동보존기술이 의학이나 축산업에서 처럼 많은 장점을 가지고 있고, 세계적으로도 많은 나라에서 기술개발에 주력하고 있음에도 불구하고, 국내에서는 아직 이 분야에 관한 기초 연구가 미비한 실정이다.

현재 포유류에서는 초기배의 냉동보존 방법이 확립되어 많은 장점을 제공해주고 있으나(Wittingham et al., 1972; 한국수정란 이식학회, 1995), 어류의 수정란이나 발생중인 배는 포유류의 것 보다 크고 난막이 두껍기 때문에 동해방지제의 침투나 열의 전달을 어렵게 하므로 아직 효과적인 냉동보존 방법이 개발되어 있지 않다(Suzuki et al., 1995; Chang, 1997). 냉동보존을 성

공적으로 수행하기 위해서는 우선적으로 냉동에 의한 피해를 최소화시키기 위하여 냉동 대상에 적합한 동해방지제를 선택하여 사용해야 한다. 선택된 동해방지제는 친수성이어야 하고 원형 질막에 대한 투과성이 높아야 하며, 독성은 낮아야 한다(Leung and Jamieson, 1991). 이러한 조건을 만족시키는 동해방지제로 dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol, glycerol 및 methanol 등이 주로 사용되었으나, 냉동보존하려는 대상에 따라 각기 다른 효과를 나타내었기 때문에 모든 어류의 수정란이나 배 보존에 공통적으로 사용될 수 있는 동해방지제는 아직 밝혀지지 않았다. 특히 어류에서 초기 배의 냉동보존 효과를 높이기 위해서는 세포내 동해방지제의 농도가 높은 것이 좋지만, 동해방지제는 세포내 독성을 나타내는 문제점이 있기 때문에 성공적인 냉동보존의 첫 단계로서 동해방지제의 종류와 함께 적정 농도를 결정하는 일이 우선되어야 한다.

최근 Chao and Liao (2001)에 의하여 어류와 패류 배의 냉동보존에 관한 종합적인 검토가 있었으나 아직 어류의 발생중인 배를 냉동보존할 수 있는 실용적인 방법은 개발되지 않았다. 어류의 배를 냉동보존하기 위한 기초실험으로는 zebra fish,

*Corresponding author: limhk@nfrdi.re.kr

*Brachydanio rerio*의 발생중인 배에서 DMSO와 glycerol의 침투와 난황제거에 관한 보고(Harvey et al., 1983; Hagedorn et al., 1997; Liu et al., 1999), 무지개송어, *Salmo gairdneri*, 잉어, *Cyprinus carpio*, pejerrey, *Odonthestes bonariensis* 및 송사리, *Oryzias latipes*에서 동해방지제의 침투와 독성에 관한 연구(Arii et al., 1992; Suzuki et al., 1995) 등으로 연구 범위가 일부 어종에 한정되어 있을 뿐만 아니라 냉동보존 기술의 개발보다는 동해방지제의 독성이나 침투 등 아직 기초적 연구에 머물러 있는 수준이다.

본 연구에서는 발생중인 어류 배에 적합한 냉동보존 방법을 개발하기 위한 연구의 일환으로 DMSO, ethylen glycol 및 glycerol의 농도와 침지 시간이 발생중인 감성돔, *Acanthopagrus schlegeli* 배에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

동해방지제로 DMSO, glycerol 및 ethylen glycol을 사용하였으며, 침지 농도는 세가지 동해방지제 모두 1, 2, 3, 4 M로 설정하였다. 발생중인 배에 동해방지제가 침투할 수 있는 평형시간은 각 농도별로 5, 10, 20, 40 및 80분으로 설정하였으며, 침지 후 배들은 여과 해수로 3회 씻은 다음 부화 할 때까지 500 ml 비이커에 수용하였다. 동해방지제의 농도별, 평형시간별 배의 생존율은 침지 처리 후 12시간 후에 조사하였고, 모든 실험은 실온($18.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$)에서 이루어졌다. 부화율은 침지 처리한 배에 대하여 부화한 개체를 계수하여 구하였고, 발생중인 배의 사망률은 비이커 바닥에 가라앉거나 배의 색이 탁하게 변한 배를 죽은 배로 간주하여 그 수를 계산하였다. 모든 실험은 3반복으로 실시하였으며 실험에 이용된 배의 발달 단계는 포배기(blastula stage)였다.

반수치사농도(median lethal concentration, LC50)는 독성물질 농도의 log값에 대한 치사빈도의 probit 값의 접점을 구하여 분석하였다(Litchfield and Wilcoxon, 1949).

모든 측정값들은 평균±표준오차로 표시하였다. 측정값들에 대한 유의성 검정을 위하여 필요한 경우 측정값들을 각도수 변형법(angular transformation)으로 변형한 후 SPSS (SPSS Inc., 1997) 컴퓨터 프로그램을 이용하여 Analysis of variance (ANOVA) 와 Tukey's test를 유의수준 95%에서 실시하였다.

결 과

DMSO, ethylen glycol 및 glycerol을 동해방지제로 사용했을 때 배의 사망률은 Fig. 1과 같다. DMSO의 경우, 1 M에서는 80분 동안 침지하여도 12시간 후의 사망률이 $4.5 \pm 0.5\%$ 로 매우 낮았다. 2 M에서 40분간 침지한 후의 사망률은 $12.8 \pm 6.6\%$ 로 비교적 낮았으나, 80분간 침지한 후에는 $84.1 \pm 4.5\%$ 로 급격히 증가하였다. 3 M에서는 침지시간 20분부터 사망률이 증가하기

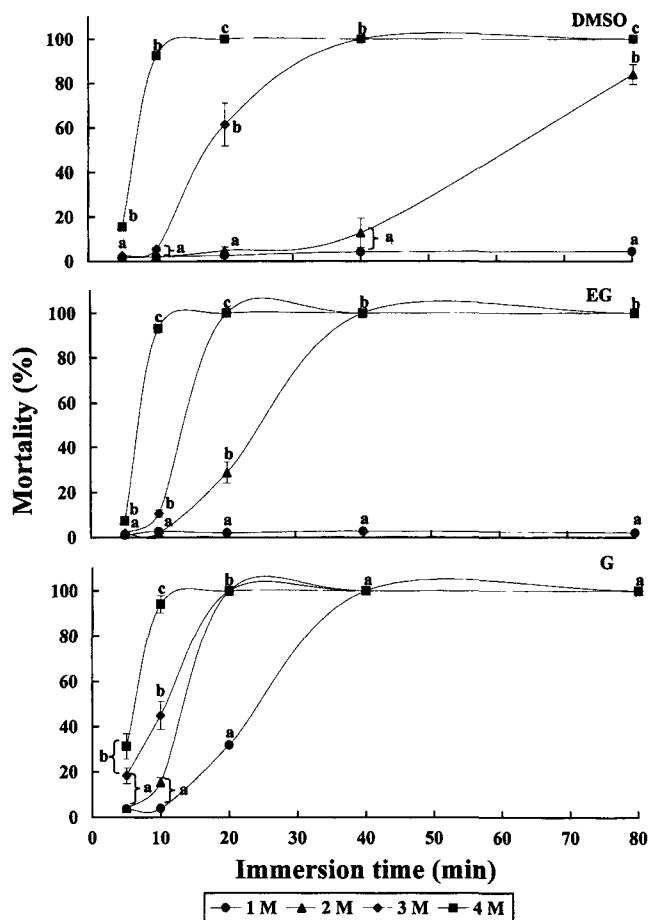


Fig. 1. Changes of mortality in black seabream, *Acanthopagrus schlegeli* embryo during the various immersion time. Different superscripts indicate significant differences between concentrations of cryoprotectants at that time ($P < 0.05$). DMSO; dimethyl sulphoxide, EG; ethylene glycol, G; glycerol.

시작하여 40분부터는 100% 사망하였고, 4 M에서는 침지와 함께 사망률이 급격히 증가하여 침지시간 10분만에 $92.4 \pm 1.3\%$ 까지 높아졌다. 침지시간 40분까지는 1 M과 2 M 사이에서 유의적인 차이가 없었으나 80분부터 2 M의 사망률이 1 M보다 유의적으로 증가하였다. Ethylen glycol에 처리한 경우, 80분간 1 M에 침지했을 때 12시간 경과 후의 사망률이 $2.1 \pm 0.4\%$ 로 대조구의 $2.3 \pm 0.5\%$ 와 유의적인 차이가 없었으나, 농도가 높아지면서 생존율이 점차 감소하였다. 2 M에서는 침지시간 20분만에 사망률이 $28.8 \pm 4.7\%$ 로 증가하여 1 M보다 유의적으로 높아졌으며, 침지시간 40분부터는 모두 사망하였다. 3 M과 4 M에서는 침지시간 20분부터 전량 사망하였다. Glycerol은 실험에 사용된 동해방지제중 가장 높은 독성을 나타냈다. 1 M에서도 20분간 침지한 경우 12시간 후의 사망률이 $31.9 \pm 1.6\%$ 로 높아졌으며 침지시간 40분부터 glycerol로 처리된 모든 배가 사망하였다.

동해방지제의 농도와 침지시간에 따른 배의 부화율은 Fig. 2와 같다. 1 M DMSO의 경우 5~80분의 침지시간에서 부화율이

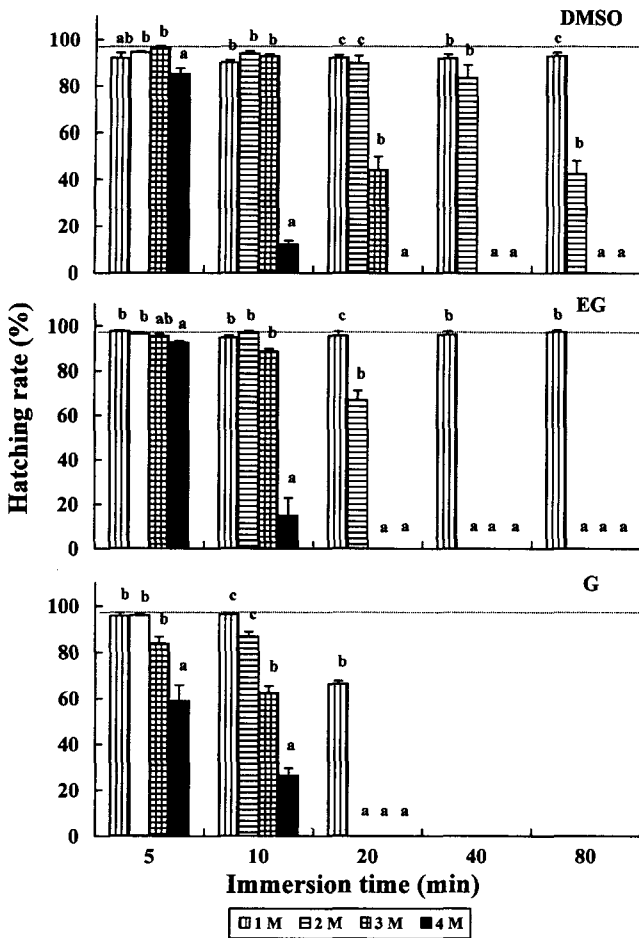


Fig. 2. Changes of hatching rate in black seabream, *Acanthopagrus schlegelii* embryo during the various immersion time. Horizontal lines indicate the average hatching rate of control. Other details as for Fig. 1.

90.2±2.2~93.1±1.4%였으며, 2 M의 경우에도 침지시간 40분까지는 83.8±5.5%로 비교적 높았으나, 80분에서는 42.6±5.6%로 급격히 감소하였다. 3 M에서는 침지시간 10분 이후부터 부화율이 급격히 감소하였고, 4 M에서는 5분 이후부터 빠르게 감소하였다. 침지시간 10분까지는 1~3 M 사이에서 유의적인 차이가 없었으나 침지시간 20분부터 3 M의 부화율이 1 M이나 2 M과 비교하여 유의적으로 낮아졌다. Ethylen glycol의 경우 1 M에서는 DMSO에서와 같이 침지시간이 길어져도 부화율에는 영향을 미치지 않았으나, 2 M에서는 침지시간 10분부터 부화율이 감소하여 20분에 67.0±4.2%로 감소하였으며, 40분에는 전혀 부화되지 않았다. 3 M에서는 침지시간 10분에 88.5±1.1%의 부화율을 보였던 것이 20분에서는 0%로 급격히 감소하였고, 4 M에서는 침지시간 10분만에 15.1±7.7%까지 감소하였다. 침지시간 10분까지는 1~3 M 사이에서 유의적인 차이가 없었으나 20분부터 2 M과 3 M의 부화율이 유의적으로 낮아졌다. Glycerol의 농도와 침지시간에 따른 배의 부화율은 실험에 이용된 3가지 동해방지제중 가장 낮았다. 가장 낮은 농도인 1 M

에서도 침지시간 10분 이후부터 부화율이 급격히 떨어져 20분에서는 66.2±1.4%로 감소하였고 40분에는 전혀 부화되지 않았다.

고 찰

세포의 냉동보존시 냉동에 의한 손상을 막기 위해 첨가하는 물질을 동해방지제라고 하는데, 이들 동해방지제는 공정점 (eutectic point)이 낮기 때문에 냉동시 얼음 결정의 양을 감소시켜 염의 농축을 막고 세포내에 빠르게 침투하여 탈수를 억제하고 원형질의 콜로이드 상태가 변화하는 것을 방지함으로써 냉동에 의한 세포의 피해를 최소화시킨다(한국수정란이식학회 1995; Leung and Jamieson 1991). 지금까지 DMSO, ethylene glycol, glycerol 및 methanol 등이 어류의 정자나 발생중인 배를 위한 동해방지제로 사용되어 왔다. 이들은 분자량 100 이하로 중성이고 친수성이 강하며 전해질이나 유기산의 용매가 될 수 있으며 세포막을 자유롭게 통과하여 염류 완충작용을 가져야 하고 세포에 대한 독성이 적어야 한다. 그러나 모든 동해방지제는 미약하지만 세포에 대한 독성을 가지고 있어 사용 농도나 처리 시간에 따라 배의 생존에 큰 영향을 미치고 있다. 본 연구에서도 DMSO, ethylene glycol 및 glycerol은 발생중인 감성돔 배에 대하여 분명한 독성을 나타내었으며, 동해방지제의 종류나 농도 및 침지 시간에 따라 감성돔 배의 생존율이나 부화율이 크게 달라져 Suzuki et al.(1995)의 연구에서처럼 동해방지제가 종 특이성이 있음을 보였다. 본 연구에서 좋은 결과를 보인 침지시간은 20분이었으며, 이 침지시간에서 DMSO와 ethylene glycol의 반수치사농도는 각각 2.25 M과 1.78 M였다 (Fig. 3). 앞으로 감성돔 배의 냉동보존을 위한 DMSO와 ethylene glycol의 농도를 침지시간 20분 이내에서 반수치사농도 이하로 설정한다면 동해방지제에 의한 피해를 최소화시킬 수 있을 것으로 생각된다. 배의 사망률과 최종 부화율을 근거로 판단할 때 2 M DMSO가 발생중인 감성돔 배를 위한 동해방지제로 가장 효과적이었고 ethylene glycol도 침지시간을 짧게했을 때는 효과적이었다. 따라서 감성돔 배의 냉동보존을 위한 동해방지제

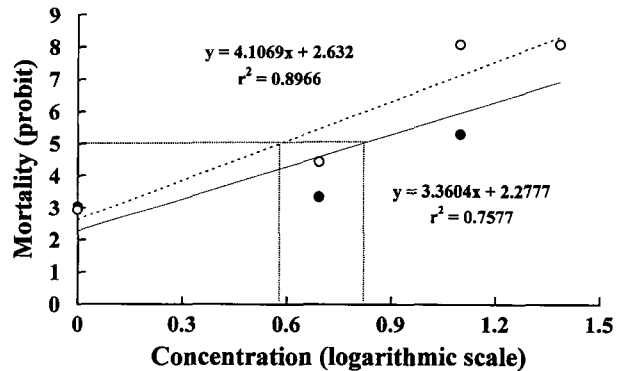


Fig. 3. Estimation of median lethal concentration (LC50) in various dimethyl sulphoxide (DMSO, ●) and ethylene glycol (EG, ○) concentrations at 20 min immersion.

로는 DMSO가 가장 적합하며, 침지시간을 20분 이하로 할 경우 처리 농도는 2.0~2.25 M 사이가 적합할 것이다.

이미 정자의 냉동보존을 위한 이전의 연구들에서 DMSO는 동해방지제로서 가장 많이 사용되었고 그 효과도 충분히 입증되었다(Lim, 1998). 발생중인 어류의 배를 대상으로 한 연구에서는 Haga (1982)가 무지개송어에서 1.4~2.1 M의 DMSO 농도가 효과적이었다고 보고하였으며, Suzuki et al. (1995)도 2 M DMSO를 사용하였을 때 무지개송어와 송사리, pejerrey에서 좋은 결과를 얻었다. 그러나 DMSO, propylene glycol 및 methanol을 사용한 zebrafish의 연구 결과 methanol이 난막을 가장 잘 침투하였으며(Hagedorn et al., 1997), finger fish, *Monodactylus sebae*의 배를 이용한 실험에서도 methanol을 trehalose나 glucose와 함께 사용하였을 때 독성을 감소시킬 수 있었으며 효과도 좋았다(Chao et al., 1996). 이처럼 동해방지제의 효과는 종에 따라 큰 차이를 보이기 때문에 본 연구와 같이 냉동보존에 앞서 적합한 동해방지제와 그 처리 농도를 결정하는 예비 실험이 필수적이다.

이미 언급하였듯이 냉동에 대한 세포의 피해를 최소화시키기 위해서는 동해방지제의 농도가 높은게 좋지만 동시에 동해방지제는 독성을 가진다는 모순을 가지고 있다. 더욱이 최근에 시도되고 있는 유리화(vitrification)에 의한 급속 냉동 방법은 냉동에 따른 피해를 최소화시킬 수 있어 어류의 배에서도 시도되고 있으나 동해방지제의 농도를 높여야 한다는 문제점이 있다. 따라서 배의 생존은 최대화시키는 동시에 냉동의 피해를 최소화시키는 동해방지제의 적정 처리농도와 처리 시간을 찾는 것은 어류 배의 급속 냉동보존 방법을 개발하기 위한 첫 번째 단계이다. 본 연구에서 DMSO와 ethylene glycol의 경우 3M에서 10분간 침지하여도 배의 생존에는 큰 영향을 미치지 않았기 때문에 감성돔 배를 위한 급속 냉동 방법을 찾는 데 중요한 기준이 될 것이다. 그러나 감성돔 배에 대한 DMSO나 ethylene glycol의 침투 속도가 아직 밝혀져 있지 않기 때문에 동해방지제의 농도를 낮추고 오랫동안 처리하는 방법이 효과적인지 아니면 고농도에서 단시간 처리하는게 더 좋은지는 앞으로의 연구에서 밝혀야 할 과제이다.

어류 배 내부에 침투한 동해방지제의 농도를 측정하는 방법으로는 동위원소로 표지하여 측정하는 방법(Harvey et al., 1983)과 HPLC를 이용하는 방법(Suzuki et al., 1995)이 있으나, 이번 연구에서는 발생중인 배의 내부에 침투한 동해방지제의 농도를 측정하지 못했다. 그러나 잉어, 무지개송어, 송사리 및 pejerrey의 발생중인 배를 이용한 Suzuki et al. (1995)의 연구 결과를 바탕으로 검토해 볼 때 감성돔 배의 사망은 배 내부로 침투한 동해방지제의 증가 때문이며, 감성돔 배의 사망 패턴은 동해방지제의 종류별로 내성의 차이를 보였지만 농도나 침지 시간의 어떤 임계범위를 넘어서면 급격히 증가하는 특성을 보였다(Fig. 1). 동해방지제의 농도나 침지 시간 외에도 Chao et al. (1996)은 finger fish의 배에 대한 연구에서 수정 후 시간이 더 지날수록

동해방지제인 methanol에 대한 내성이 더 크다고 하여 배의 발달도 동해방지제의 효과에 영향을 미침을 보고하였다. Suzuki et al. (1995)도 어류 배의 화학물질에 대한 내성은 발달 단계에 의존한다고 하였고, Haga (1982)는 무지개송어의 발안난이 발안하기 이전보다 내성이 높다고 하였다. 본 연구에서는 포배기의 배반 실험에 사용하였기 때문에 배의 발달 단계에 따른 동해방지제의 효과를 밝힐 수 없었으나, 이전의 실험들에서 더 발달한 배일수록 동해방지제에 대한 내성이 증가하는 경향을 보였기 때문에 만일 본 실험에서도 배체가 형성된 배나 심장이 박동하고 있는 배를 대상으로 실험을 실시하였다면 더욱 좋은 결과가 얻어졌을 것이다.

요 약

어류 배의 냉동보존 방법을 개발하기 위한 연구의 일환으로 감성돔, *Acanthopagrus schlegelii*의 초기 배를 대상으로 동해방지제인 DMSO, ethylene glycol 및 glycerol의 최적 농도와 처리시간을 파악하기 위한 연구가 수행되었다. 동해방지제의 적정 농도를 평가하기 위하여 배의 사망률, 부화율 및 반수치사 농도를 조사하였다. 동해방지제로 처리된 감성돔 배의 사망률은 침지농도나 시간과 밀접히 연관되었으며, 감성돔 배에 대한 독성은 DMSO, ethylene glycol, glycerol의 순서로 낮았다. 배의 사망률, 부화율 및 반수치사농도에 대한 결과로부터 감성돔 배를 냉동보존하기 위한 가장 적합한 동해방지제는 DMSO였으며, 다음이 ethylene glycol이었다. 20분의 처리시간에서 효과적인 DMSO의 침지 농도는 2.0~2.25 M이었으며, ethylene glycol의 경우 1.0~1.78 M이었다.

참고문헌

Arii, K, T. Suzuki, R. Takai, and T. T. Kozima, 1992. Tolerance of fish eggs to dimethylsulphoxide as the cryoprotectant. J. Tokyo Univ. Fish., **79**: 121-126 (in Japanese).
 Chang, Y. J., 1997. Present and future studies on the cryopreservation of fish gametes. Suisanzoshoku, **45**: 557-564.
 Chao, N. H. and I. Chiu Liao, 2001. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. Aquaculture, **197**: 161-189.
 Chao, N. H., H. W. Hsu, H. W. Chang and Y. J. Chen, 1996. Finger fish (*Monodactylus sebae*) as model fish in embryo cryopreservation. COA Fish. Ser. (Council of Agriculture, Taipei), **56**: 159-171.
 Haga, Y., 1982. On the subzero temperature preservation of fertilized eggs of rainbow trout. Bull. Japan Soc. Sci Fish., **48**: 1569-1572.
 Hagedorn, M., E. Hsu, F. W. Kleinhans and D. E. Wildt, 1997. New approaches for studying the permeability of fish embryos: Toward successful cryopreservation. Cryobiology, **34**: 335-347.
 Harvey, B. R. N. Kelley and M. J. Ashwood-Smith, 1983. Permeability of intact and dechroionated zebra fish embryos to

- glycerol and dimethyl sulfoxide. *Cryobiology*, **20**: 432-439.
- Leung, L. K. P. and B. G. M. Jamieson, 1991. Live preservation of fish gametes. (in) *Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa*, (ed.), B. G. M. Jamieson, Cambridge University Press, New York, pp. 245-269.
- Lim, H. K., 1998. Physiological properties of sperm and gamete preservation in black seabream, *Acanthopagrus schlegeli*. Ph. D. thesis, Pukyong National University, Pusan, Korea, 130 pp. (in Korean).
- Litchfield, J. T. and F. Wilcoxon, 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharm. Ther.*, **96**: 99-113.
- Liu, X. H., T. Tiantian and D. M. Rawson, 1999. The effect of partial removal of yolk on the chilling sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Cryobiology*, **39**: 236-242.
- Suzuki, T., H. Komada, R. Takai, K. Arai and T. Kozima, 1995. Relation between toxicity of cryoprotectant DMSO and its concentration in several fish embryos. *Fish. Sci.*, **61**: 193-197.
- Wittingham, D. G., S. P. Leibo and P. Mazur, 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C. *Science*, **178**: 411-414.
- 한국수정란이식학회, 1995. 소 수정란 이식. 정문각, 서울, 290 pp.

원고접수 : 2003년 7월 31일

수정본 수리 : 2003년 9월 22일

책임편집위원 : 권혁추