

Recent Research Trends of Cryopreservation Technology Based on Microalgae Chlorophyta

Jun-Ho Yim^{1,2†}, Yong Bae Seo^{3†}, Seon Min Kim^{1,2} and Young Jae Jeon^{1,2*}

¹Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

²School of Marine and Fisheries Life Science, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

³Basic Science Research Institute, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

Received September 6, 2021 / Revised October 22, 2021 / Accepted October 25, 2021

Since microalgae research started on late 18 century, they have been recognized as one of the most important bioresources used in bioindustry. Owing to the large efforts paid to industrial application of this microorganisms, their importance on food/feed and bioactive compounds has been further extending into the environmental research areas including alternative energy resources, mitigation of the carbon emission, and waste-water treatment. However, despite the importance on their industrial application, the fundamental research field related to the long-term preservation of microalgae culture has not received much attention. However, a less labor intensive and cost-efficient preservation technology enabling biologically active and stable microalgae-culture provides a key success factor in the biotechnological application. Therefore, this study investigated various cutting-edge microalgae cryopreservation technologies currently developed so far, mainly targeting Chlorophyta, which occupies the largest taxon in the classification system of microalgae. In addition, for the development of successful cryopreservation technique, the key factors such as temperature control effect and preservative effect during cryopreservation of microalgae culture were investigated. In addition, the problems with current preservation technology that is being used in Korean domestic biological resource banks and the international microalgal resource banks are described. According to our investigation, currently no standard method for long-term preservation of microalgae is available due to their various morphological and physiological characteristics. To overcome such issues, much more efforts on fundamental research area on the identification of specific biomarker used for microalgae taxonomical classification and further systemic approaches based on strain-specific cryopreservation methods needed.

Key words : Algae, chlorophyta, cryopreservation, cryoprotectants, microalgae

서 론

조류(Algae)는 육상 식물을 제외한 모든 광합성 생물을 통칭하는 생물 군으로 분류학적 용어가 아닌 광의적인 일반 용어이다. 현재까지 보고된 조류는 약 3만~ 100만 종 이상으로 추정되며, 서식하는 환경에 따라 담수조류(fresh water algae)와 해조류(marine algae)로 구분하며, 생태학적으로 대형조류(Macroalgae)와 미세조류(Microalgae)로 구분할 수 있다[19].

미세조류는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 원핵생물(prokaryote)에 속하는 남세균(Cyanobacteria)과 진핵생물(Eukaryote)에 해당하는 녹조류(Green algae), 규조류(Diatoms), 와편모조

류(Dinophyta) 등으로 구분할 수 있다[1]. 일반적인 형태학적 특징은 대부분 단세포(Unicell) 형태로 성장하며, 작은 구형(cocoid)의 조류가 보편적이다. 크기는 수 μm 서 수백 μm 까지 다양하며, 분류학적 범주에서 다양한 속(Genus)에 약 20만~80만 종(Species)이 다채로운 자연환경에 서식하는 것으로 추정되며, 현재까지 약 5만여 종의 미세조류가 연구를 통해 보고되었다[42]. 앞서 언급한 미세조류 중 녹조류(Chlorophyta)의 경우 약 300,000 종 이상 분포하는 것으로 알려져 있으며, 현재까지 500 속 15,000 종이 보고되어 조류 중 가장 큰 문(Division)에 속하는 미세조류 중 하나이다[27]. 녹조류는 주요 광합성 색소, 탄수화물 저장 형태, 엽록체의 구조, 세포외벽, 편모 유무, 미세소관의 배열 등을 근거로 하여 담녹조강(Prasinophyceae), 녹조강(Chlorophyceae), 갈파래강(Ulvophyceae), 윤조강(Charophyceae)으로 분류하고 있다[23]. 하지만 이러한 분류체계는 지구생물권에 존재하는 모든 생명체의 유전학적 근연관계에 의존하는 분류체계 방법의 변경으로 미세조류의 분류체계는 여전히 많은 논란을 일으키고 있는 분야이다[33]. 녹조류는 담수 조류가 90% 이상을 차지하며 나머지 10%는 해수, 기수 및 토양(토양 표면 포함) 등에 분포한다. 대부분 자유 생

† Authors contributed equally.

*Corresponding author

Tel : +82-51-629-5612, Fax : +82-51-629-5619

E-mail : youngjaejeon@pknu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

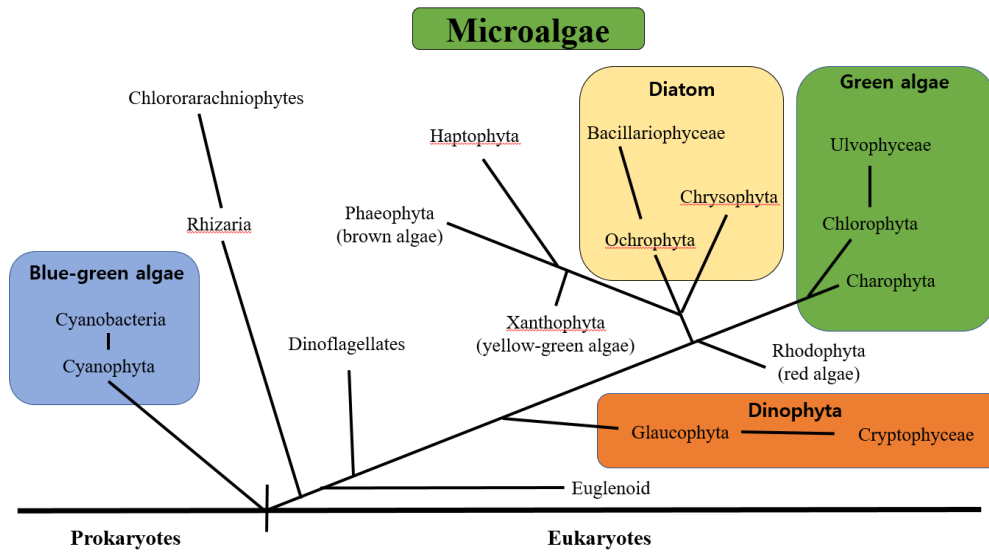


Fig. 1. Schematic diagram of the microalgal phylogenetic tree [1].

활형이지만 일부는 기생을 하거나 공생하는 것으로 보고되었다[16, 33, 45].

이러한 미세조류는 육상 식물보다 성장이 빠르고 배양면적당 생산성이 높고, 광 조건이 확보된 자연 환경에서 배양이 가능하다는 장점과 이들이 생산하는 다양한 1, 2차 대사산물(단백질, 지질, 당질, 색소 등의 생리활성 물질)을 고농도로 대량생산할 수 있다는 점에서 중요한 바이오 산업 소재로서 가능성을 충분히 인정받고 있다[6]. 실제로 Fig. 2에서 보는 바와 같이, 미세조류는 기초연구에서부터 바이오 에너지[22], 식품 및 의약품 원료[8], 건강보조 식품[10, 18], 양식 사료[30], 폐수 처리[25], 대기 오염 정화(CO₂ 고정화)[51] 등 다양한 분야에서 활용되고 있다. 특히, 미세조류를 활용한 대체 에너지 개발 연구는 전 세계적으로 가장 관심을 많이 받고 있는 연구분야로 미국, 유럽 등의 주요국을 중심으로 대규모 미세조류의 배양을 통한 바이오디젤의 연료인 지질 생산 등과 같은 대체 수송 연료 상업용 생산공정 개발 가능성을 2000년 초부터 인

지하고 미세조류를 활용한 바이오 연료 연구개발을 위한 투자를 강화하고 있다[35]. 우리나라의 경우 산업통상자원부와 해양수산부에서 2009년부터 10년간 490억원의 예산을 투입하여 바이오디젤 생산 기술 개발을 추진했던 분야이다[37].

상업적 대량생산과 산업 소재로서 가능성을 인정받고 있는 미세조류에 대한 연구는 1890년 Beijerinck에 의해 *Chlorella vulgaris*를 대상으로한 단일 배양(Unialgal culture) 연구를 통해 시작되었으며, 그 이후 1919년 Warburg가 엽록소 실험을 위해 미세조류 단일 배양법을 최초로 개발하였다[36]. 미세조류의 대량 배양(Mass culture) 연구는 1948년에 미국(Stanford), 독일(Essen), 일본(Tokyo)을 중심으로 연구가 진행되었으며, 1960년대 초 일본에서 *Chlorella*를 상업적 대량생산하는 것을 시초로 하여 미국, 이스라엘, 호주, 인도 등의 국가에서 미세조류를 산업화하는 데 성공하였다[41]. 여기에는 수많은 연구자들이 미세조류 순수 분리 기술 개발, 최적 단일 배양법 개발 및 대량생산 공정 확립에 관한 다양한 연구 수행과 미세조류의 배양을 통한 생산 가능한 다양한 기능성 물질 및 소재의 발굴을 통해 산업적 생물자원으로서의 가능성을 검토한 결과이다.

미세조류에 관한 기초 연구는 앞서 설명한 바와 같이 배양과 생리활성물질의 대량생산 연구에 초점이 맞춰져 있다. 하지만 이처럼 중요한 바이오 산업에 활용되는 소중한 자원 및 소재임에도 불구하고 미세조류에 대한 안정적인 장기 보존 연구는 미미한 실정이다. 현재 주요 생물자원의 장기 보존을 위한 방법은 경제적 효율성이 높은 동결보존(Cryopreservation)을 통한 보존법이 가장 신뢰성이 높은 방법으로 알려져 있으나[48], 이 방법은 기초연구 및 산업적으로 기술 수요가 높은 생물자원을 대상으로한 동물의 혈액, 정자와 난자를 포함하는 동물세포, 식물 종자[39]와 비교적 동결보존이 쉬운

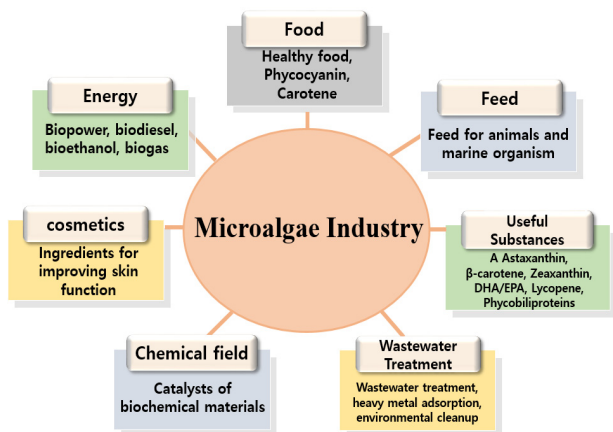


Fig. 2. Industrial field of microalgae [5, 8, 10, 22, 30].

미생물 자원인 원핵생물, 진균류 등을 위한 범용적인 장기 보존 기술로 활용되고 있다[2]. 미세조류의 경우 1980년대까지만 해도 국내외의 대부분의 기관과 연구자들이 Pringsheim에 의해 확립된 분리, 배양 유지의 기술에 근거하여 정기적인 계대 배양법[13]에 전적으로 의존하는 미세조류 배양체 보존 및 유지를 위해 제한적으로 사용되어 왔다. 하지만 이러한 계대 배양법에 근거한 보존 기술은 노동집약적이며, 오염 및 유전적 변이가 빈번히 발생하는 문제를 초래하고 있다[40]. 이에 따라서 최근 들어 미세조류의 동결보존을 통한 장기 보존에 대한 중요성이 부각되어 일부 생물자원 보존 기관 및 연구자들이 미세조류 동결보존 시 삼투압 조절 작용, 세포 손상 기전, 보존제를 이용한 동결보존방법에 관한 다양한 연구가 진행되어 일부 미세조류의 경우 동결보존을 통한 안정적 장기 보존이 가능해졌다[2, 39, 48]. 하지만 다수의 미세조류가 동결보존을 통한 장기보존 시 활성형의 배양체를 얻을 수 없는 문제와 보존제의 독성에 의한 세포 손상 등의 문제가 발생할 수 있으며, 이를 극복하기 위한 개별 미세조류의 동결보존법에 대한 연구가 절실히 필요한 실정이다.

생물자원의 장기 보존은 국가적으로 생물주권을 확립하는 것과 산업적 활용을 위해 필수적으로 필요한 매우 중요한 요소이다. 또한, 미세조류는 앞서 언급한 다양한 산업적 활용도를 가지는 생물자원으로써 중요성이 점차 부각되고 있는 이유로 본 총설에서는 차세대 생물자원으로써 중요성이 강조되고 있는 미세조류의 장기 보존을 위한 동결보존법에 대한 연구 현황을 정리함으로써, 향후 신종 발굴과 산업적 중요 미세조류의 안정적인 장기 보존을 위한 동결보존법의 문제점을 극복하기 위해 현재 수행되고 있는 연구 경향에 대해 논하고자 한다.

본 론

미세조류의 대표적 장기 보존법

미세조류의 대표적인 장기 보존법은 계대배양법(Subculture), 동결건조법(Lyophilization), 동결보존법(Cryopreservation) 등이 알려져 있다. 계대배양법은 1949년 Pringsheim에 의해 개발되어 현재 가장 널리 사용되고 있는 미세조류 보존법이다[13, 14, 21]. 그러나 계대배양법은 주기적 증식 상태 관찰 및 지속적인 계대작업이 필요하므로 인력과 시간의 소모가 극심하다. 또한 장기간 지속적으로 반복되는 계대배양으로 인해 유전적 변이 등이 일어나거나 생리적 특성을 소실할 가능성이 높아 장기보존법으로는 부적절하다. 동결 건조법은 ice crystal, 세포내 삼투압 변화 등에 의한 세포 손상을 최소한으로 조절된 조건 하에서 시료(동물 혈액, 조직, 세포 및 미생물)를 장기 보존하는 방법이다. Watanabe, Holm-Hansen, Takanono 등은 남세균(*Tolypothrix tenuis*, *Calothrix brevissima*, *Spirulina platensis*, *Nostoc*, *Schizothrix*)과 녹조류(*Chlorella ellipsoidea*)를

대상으로 장기 보존을 위한 동결건조법을 연구하였다. 이들의 결과를 요약하면 남세균인 *Tolypothrix tenuis*, *Calothrix*, *Nostoc*, *Schizothrix*는 동결건조 시 2년 이상의 보존에도 활성형 배양체를 얻을 수 있었지만, 녹조류인 *Chlorella ellipsoidea*는 동결건조 처리 후에 모두 사멸됨을 보고하였다[46, 49]. 이처럼 동결건조법은 남조류의 일부 종에서는 장기 보존을 위한 방법으로 선택 가능하지만, 녹조류의 장기 보존에는 적합하지 않은 방법이라 사료된다. 동결보존법은 -60°C 이하의 Deep freezer나 -130°C 이하의 액체질소내에서 보존하는 방법으로 미세조류와 달리 세포벽을 보유하고 있지 않은 세포인 동물의 정자와 사람의 혈액 보존 등에 적용하여 성공함에 따라 비교적 견고한 세포벽을 보유한 미세조류의 장기 보존법으로도 적용할 수 있는 가장 적합한 방법으로 다수의 생물자원 보존 기관 및 연구자들이 활용하고 있는 방법이다[43]. 미세조류의 일반적 동결보존 방법은 Fig. 3에서 보는 바와 같이 4단계로 구성된다. 첫번째 단계는 동결 시 세포 내외부의 변화로부터 세포를 보호하는 작용을 하는 동결보존제의 선택과 알맞은 농도로 보존 시료에 첨가하는 단계이다[23]. 두번째 단계는 동결 온도의 제어이다. 급속 동결과 단계별 동결로 나눌 수 있으며, 동결 속도 제어, 동결 이전에 저온에 적응시키는 등의 중간 단계의 부가적인 전처리가 포함된다. 세번째 단계는 동결 이후에 보존 시료를 해동하는 것으로, 이 과정은 동결 후에 미세조류의 재생율에 크게 영향을 미치는 단계인 것으로 알려져 있다[28]. 네번째 단계는 동결보존의 평가이다. 가장 많이 다루어 지는 것이 생존율과 재생율(회복률)이며, 이 단계 이후 최종적으로 생물 자원적 측면의 중요성에 따라서 동결보존 후 보존된 자원의 생리적 및 형태적 특성을 평가하는 마지막 단계로 이루어진다. 하지만 미세조류는 형태적, 생리적, 유전적으로 매우 다양한 복잡한 생물시스템을 가지고 있는 이러한 이유로 인해 동결보존 시 개별 미세조류의 대사 생리적 특성 및 동결 과정에서 발생하는 세포의 물리적 생화학적 손상을 최소화하기 위해 사용되는 보존제의 영향을 중심으로 파악해야 한다 [34, 44]. 이에 따라서 본론에서는 미세조류의 동결 보존 시 고려해야 할 대상인 1) 동결보존 시 온도 제어에 따른 영향, 2) 보존제의 영향, 3) 미세조류 자원 보존 기관의 현황에 대해서 서술하고자 한다.

동결 보존제(Cryoprotectants, CPAs)의 영향

동결 보존제(Cryoprotectants; Cryoprotective Agents, CPAs)은 냉동 시 물의 어는점을 낮추어 배지 및 세포 내부에서 얼음 결정 형성을 억제하여 세포의 물리적 동결 손상(cryo-injury)로부터 세포를 보호하기 위해 배양액에 첨가하는 물질이다. 이러한 동결 보존제는 세포막의 투과성에 따라 세포 침투형(Penetrating)과 비침투형(Non-penetrating) CPA으로 나눌 수 있다[9]. Ethylene glycol (EG), Propylene glycol, Dimethyl sulfoxide (DMSO), Glycerol, Methanol은 대표적인 세포 침투

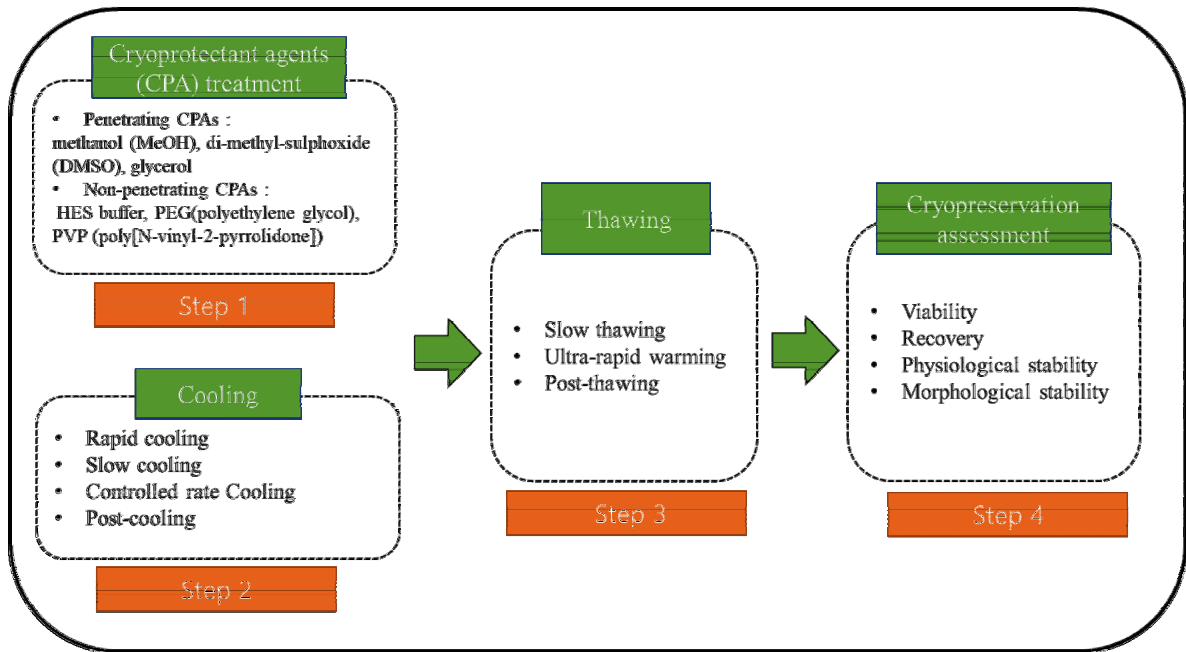


Fig. 3. Schematic diagram of cryopreservation procedures for microalgae.

형 CPA이며, 침투형 CPA는 대부분 고분자 물자로 Sucrose, Trehalose, Polyethylene glycol (PEG) 등이 있다[29]. 동결보존을 위해 주로 사용하는 CPA는 침투형인 Glycerol, DMSO, Methanol을 이용하고 있다. 하지만 Glycerol의 경우 원핵생물 및 진균류의 동결보존에는 우수한 성능을 보이지만 진핵생물의 동결보존에는 효과가 미미한 것으로 알려져 있다. DMSO 및 Methanol의 경우 진핵생물의 동결보존 시 주로 사용되는 CPA이지만 세포 독성 문제로 인하여 적정 농도에 대한 독성 효과를 확인하는 선행 실험이 필요하다[5, 17].

미세조류 동결 보존을 위한 CPA는 Table 1에서 보는 바와 같이, 침투형 CPA인 5% DMSO와 10% Methanol이 최적의

CPA 농도로 범용적으로 사용되고 있는 것으로 보인다. Brand와 Kenneth [11]의 *Chlamydomonas*를 이용한 CPA 연구 결과에서는 5% Methanol, 8% DMSO를 사용 시 최적의 재배양율을 보인다는 결과를 도출하였으며, Tessaroli 등[47]에 의해 수행된 결과에서도 *Kirchneriella aparta*와 일부 종을 제외한 *Ankistrodesmus*, *Monoraphidium*, *Kirchneriella* 등의 종들이 5% Methanol, 8% DMSO를 사용 시 60% 이상의 rABS (Live/death 염색시약인 erthrosine-b를 이용하여 동결 보존 전의 생존율과 후의 생존율의 비)를 가진다고 보고하였다. 특히 단일 세포로 자라는 *Monoraphidium*의 경우도 5% DMSO를 이용한 동결 보존 후 rABS가 60%가 넘는 높은 재배양율을 보여줄 뿐만 아니라 *Ankistrodesmus*와 같이 군집 형태로 자라는 미세조류도 단일 세포 미세조류처럼 rABS가 80% 이상을 가지는 것으로 보고하였다.

앞서 설명한 것처럼 DMSO와 Methanol의 경우 우수한 CPA이지만 세포독성을 가지는 물질이다. 이러한 이유로 최근 들어 미세조류의 안정적 동결 보존을 위해 세포 독성이 없으며, DMSO와 Methanol을 대체할 수 있는 소재를 찾는 연구가 수행되고 있다. Prevaiz 등이 2021년 발표한 논문에서는 파키스탄 바투라 빙하에서 분리한 *Pseudomonas* sp. BGI-2가 생합성하는 exopolysaccharide (EPS)를 이용하여 CPA로 활용할 수 있는 가능성 여부를 분석하였다[3]. 이 논문의 결과에 의하면 *Chlorella vulgaris* UTEX 2714, *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, *Scenedesmus obliquus* HTB1, *Synechococcus* sp. CBW1003, *Synechococcus* sp. CB0101를 대상으로 약 20% EPS를 사용하였을 시 *Chlorella vulgaris* UTEX 2714를 제외한 모든 균주에서 5% DMSO 사용보다 우수한 재배양율을 보이는 것으로 보고

Table 1. The comparison of cell viability effects using various penetrative cryoprotectants

Microalgae	Type of CPA	Viability	Ref.
<i>Monoraphidium arcuatum</i>	5% DMSO	95%	[26]
<i>M. griffithii</i>	5% DMSO	100%	
<i>M. contortum</i>	5% DMSO	100%	
<i>M. pseudobraunii</i>	5% DMSO	61%	
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	5% DMSO	47%	
<i>Kirchneriella irregularis</i>	5% DMSO	84%	
<i>Chlorella cf. braunii</i>	5% DMSO	95%	
<i>Pyranimonas</i> sp.	10% DMSO	+ ^a	[38]
	10% MeOH	+ ^a	

^a: After cryopreservation, when cultured in the same method and period as before cryopreservation, the same absorbance as before cryopreservation was shown.

하였다. 국내에서도 Park 등[38]이 10% DMSO 단독 사용과 alginate microcapsules과 같은 해조류 유래 EPS를 고체 지지체로 이용하여 사상체 남세균인 *Trichormus variabilis*의 재배양을 비교한 연구 결과를 보고하였다. 이들의 결과에서는 4일간 동결 보존 후 35일 동안 배양한 실험에서 10% DMSO 단독 사용한 동결 보존법이 재배양율이 높았으나, alginate microcapsules를 활용한 동결 보존법도 새로운 동결 보존법으로써 가치를 인정을 받을 수 있는 소재라 사료된다.

동결보존 시 온도 제어에 따른 영향

급속 동결(Rapid cooling, One-step)

급속동결은 시료를 직접적으로 액화질소(-196℃)에 넣어 보관하는 방법이다. 이러한 급속동결은 빠른 동결을 통해 세포 내에서 얼음이 결정화 되는 것을 억제하여 세포에 가해지는 물리적 손상을 최소화할 수 있고, 다른 부가적인 단계가 필요하지 않아 비교적 간편하게 조작할 수 있는 장점이 있다. 또한, 급속 동결 방법은 독성이 있는 동결보존제(Cryoprotectants, CPAs)를 고농도로 처리할 필요가 없기 때문에 장기보존에 필요한 세포의 생존에 유리하다[15]. Table 2에 나타낸 바와 같이 현재까지 미세조류에서 급속 동결 후 세포 재배양율에 대해 보고된 사례로는 1-step급속 동결에서 *Anabaena* sp.는 최대 63±3.66%, *Oocystis* sp.는 73±2.65%의 세포 생존율이 나타나는 것으로 보고되었으며[20], 2-step 급속 동결에서 *Chlorella marina*는 82%, *Chlorella ovalis*는 86.1%, *Chlorella salina*는 72.2%, *Chlorella spaerckii*는 87.1%, *Nannochloris oculata*는 63.1%의 생존율이 나타나는 것으로 보고되었다[31].

제어 동결 (Slow cooling, Two-step)

제어 동결법은 동결 보존법에 있어서, 세포 내부의 얼음 형성의 생성 비율을 조절하는데 특성이 있는 핵심적인 제어 방

법이다. 제어 동결은 0.5~5℃/min의 속도로 -40~-80℃까지 1차적으로 동결시킨 후, -196℃에서 보관하는 방법이다[12]. 제어 동결법은 동결 속도를 제어함으로써 세포내부의 수분이 세포 밖으로 충분히 유출되는 탈수 작용을 도와주며, 세포 내 탈수 작용에 의해 세포 내부의 얼음 결정의 크기가 커지는 것을 억제하여 세포소기관의 손상을 막아줌으로써 세포의 생존율을 높이게 된다[24, 26]. 이러한 방법은 세포의 동결을 막는 동결보존제를 필요로 하며, 현재 다양한 세포의 동결 보존법으로 사용되고 있으며, 미세조류의 동결 보존법으로도 활용되고 있다. Table 2에 나타낸 바와 같이, Tessarolli 등[47]에 의해 보고된 결과는 *Monoraphidium arcuatum*에서 95%, *Monoraphidium griffithii*에서 100%, *Monoraphidium contortum*에서 100%, *Kirchmeriella irregularis*에서 84%로 급속 동결과 비교 시 제어 동결에서의 재배양율이 증가하는 것으로 보고하였다. 그러나 일부 미세조류의 경우 급속 동결법 및 제어 동결법으로 보존하였을 때 낮은 재배양율을 나타내는 경우도 확인되었다. 이러한 이유로 미세 조류를 동결 보존하기 위해 제어 동결법을 응용하는 방법으로 동결 과정의 중간 단계에서 동결 온도에 적응시키기 위한 정치 시간을 주거나, 중간 단계에서 다른 2회의 온도 설정을 통해 비결정형 얼음 형성(vitrification)에 필요한 동결 온도에 안정성을 부여하는 방법이 제시되고 있다[47]. 이러한 방법은 동결 보존하고자 하는 미세조류의 종류를 고려하여 정치하는 중간 단계 온도나 정치 시간을 임의로 설정할 수 있다. 예를 들어, UTEX에서는 3단계의 동결로 중간 단계의 온도를 -40℃, -80℃로 각각 설정하여 보존 시료를 순차시킨 후, 최종적으로 액화 질소에 넣어 -196℃에서 보관하는 방법을 사용하고 있다[12]. 이 방법은 제어 동결법과 비교하여 세포의 안정성을 높이기 위해 주로 동물과 식물 등 고등 생물의 세포나 조직의 동결에 사용되던 방법을

Table 2 The list of freezing techniques and methodologies used in the cryopreservation of microalgae

	Microalgae	Freezing procedure	Viability (%)	Ref.
1-Step	<i>Nannochloris</i> sp.	Direct freezing in liquid nitrogen stored at -196℃	52	[12]
	<i>Anabaens</i> sp.		73	
	<i>Oocystis</i> sp.		63	[24]
2-Step	<i>Chlorella marina</i>	1. Rapid cooling -30℃ (Held at -30℃ for 15 min) 2. Rapid cooling -196℃ (LN) (Storage at -196℃)	82	[12]
	<i>C. obalis</i>		86.1	
	<i>C spaerckii</i>		72.2	
	<i>C salina</i>		87.1	
	<i>Nannochloris atomus</i>		54.2	
	<i>N oculate</i>		63.1	
2-Step	<i>Monoraphidium arcuatum</i>	1. Slow cooling -40℃ (-1℃/min. Held at -40℃ for 15 min) 2. Rapid cooling -196℃ (LN) (Storage at -196℃)	95	[34]
	<i>M. griffithii</i>		100	
	<i>M. contortum</i>		100	
	<i>M. pseudobraunii</i>		61	
	<i>Kirchmeriella irregularis</i>		84	
	<i>Chlorolobion braunii</i>		100	

미세조류에서도 적용한 사례이다.

미세조류 보존 기관별 현황

산업적으로 활용 가치가 높은 생물자원의 체계적 관리를 위해 각 나라마다 생물자원 소재 은행을 구축하여 운영 중에 있다. 이들 생물자원 소재 은행(동물, 식물, 미생물 및 유전자 은행 등)으로부터 연구자들은 분양 및 관련 정보를 제공받아 연구에 활용하고 있다. 미세조류 자원 소재 은행의 경우 장기 보존에 대한 효율적인 보존법이 마련되지 않아 자원 관리에 한계점을 보이고 있으나, 주요 선진국(미국, 스코틀랜드, 캐나다, 일본)에서는 이미 미세조류의 장기 보존을 위한 미세조류 자원 소재 은행을 운영 중에 있다. 물론 우리나라도 다수의 연구 기관에서 미세조류 자원 소재 은행을 구축하여 운영하고 있으나 주요 선진국에 비해 체계적인 관리는 미진한 실정이다.

주요 선진국의 미세조류 자원 소재 은행에 대한 현황은 1980년대 초 설립된 미국 메인주(State of Maine)의 국립 해양 식물 플랑크톤 배양 센터(NCMA, National Center for Marine Algae and Microbiota)에서는 현재까지 2,500주 이상의 미세조류를 배양 및 보존하여, 전 세계 연구자들에게 활성 배양체를 분양하고 있다. 텍사스대학 조류 자원 소재 은행(The University of Texas, UTEX)은 3,000주의 미세조류를 배양하여 전 세계 연구자들에게 분양하고 있다. 스코틀랜드의 CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa), 캐나다의 CPCC (Canadian Phycological Culture Centre) 등도 같은 역할을 하고 있다. 하지만 이들 기관의 경우에서도 미세조류의 장기 보관은 계대배양법이 주된 방법이다[7, 50]. 실제로 UTEX에서 장기 보존 중인 3,000주 중에서 해양미세조류 40주와 담수미세조류 448주를 포함하는 전체 488주만이 동결보존법에 의해 장기 보관 중인 것으로 조사되었다(Table 3) [32].

국내 미세조류 자원 소재 은행에 대한 현황을 살펴보면 다

Table 3. The list of microalgae resources currently preserved using a cryopreservation method 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
Floriidophyceae	1	0
Prymnesiophyceae	1	0
Xanthophyceae	0	26
Green Alga	0	4
Unknown	0	9
Total	40	448

음과 같다. 미세조류 관련 생물자원 소재 은행은 한국 해양 미세조류 은행(Korea Marine Microalgae Culture Center; KMCC), 국립생물자원관의 국가 미생물 배양체 은행(KCMC), 담수생물자원 은행(Freshwater Bioresources Culture Collection; FBCC), 생물자원센터(KCTC) 등을 중심으로 국내 미세조류 생물자원의 효율적 관리와 산업적 활용에 필요한 인프라를 구축하여 배양체 분양 및 보존에 대한 서비스를 제공하고 있다. 이들 기관에서 보유한 미세조류 장기 보존 목록은 Table 4에 요약 정리하였다.

국내 미세조류 자원 소재 은행도 국외의 경우처럼 장기 보존의 주된 방법은 계대배양법에 의존하고 있다. 하지만 최근에 국립생물자원관과 낙동강생물자원관에서 각각 해양 규조류 *Nitzschia* sp., 사상체 미세조류 *Trichormus variabilis*의 동결보존법을 개발하여 관련 학계에 발표하였다[32, 38]. 이처럼

Table 4. The list of current microalgae resources index preserved in Korean biological resource banks at 2020

	Classification	Number of cultures
	Diatoms	957
	Green algae	831
	Rodophyta	661
	Bacillariophyta	2223
	Cryptophyta	15
	Haptophyta	7
	Dinophyta	452
	Pyrrophyta	2
Freshwater Biological Resources Bank	Bacillariophyceae	5
	Green algae	63
	Diatoms	4
	Cyanobacteria	6
	Bacillariophyta	1
	Cryptophyta	17
	Ochrophyta	15
	Green algae	55
	Dinophyta	40
	Bacillariophyta	8
	Ochrophyta	8
	Haptophyta	4
	Cryptophyta	3
Korea Marine Microalgae Culture Center	Diatoms	666
	Green algae	333
	Cryptophyta	5
	Cyanobacteria	48
	Haptophyta	10
	Dinophyta	64
	Ochrophyta	20
	Rhodophyta	2
	Euglenoids	5

국내에서도 다양한 미세조류의 장기 보존을 위한 동결보존법 개발 연구가 활발히 진행되고 있다.

결 론

미세조류의 현재까지 연구 경향을 살펴보면 순수 분리 및 배양법은 많은 발전을 이루었다. 하지만 미세조류의 장기보존법은 1949년 Pringsheim가 확립한 계대배양법이 현재까지도 다수의 자원 소재 은행 및 연구자들이 진행하고 있는 방법이다. 이 방법은 잦은 계대배양에 따른 시간, 인력 소모가 많은 노동집약적 방법이며, 유전적, 생리적 특성을 소실하는 단점이 있어 이를 보완하기 위한 방법으로 -60°C 이하나 -130°C 이하의 액체 질소 내에서 보존하는 방법인 동결보존법이 대안으로 제시되고 있다. 하지만 동결보존법은 동결 및 해동 과정에서 세포가 받는 삼투압 스트레스, cold shock, 세포 내외 얼음 결정 형성에 의한 잠재적 손상을 감소시켜야 하며, 보존제의 세포 독성 문제를 극복해야 한다.

이와 같은 문제를 해결하기 위해서 다수의 연구자들이 동결 보존 시 온도 제어와 보존제 영향에 대한 연구를 진행하였으며, Table 1, 2에서 보는 바와 같이 미세조류 종 별 재배양율이 차이를 보이는 것으로 분석되었다. 급속 동결(Rapid cooling; One step)에 의해 장기 보존될 수 있는 미세조류는 *Nanochloris* sp., *Anabaens* sp., *Oocystis* sp. 등이 효율이 높았으며, 제 동결(Slow cooling, Two Step)의 경우는 *Monoraphidium* sp., *Kirchneriella* sp., *Chlorobion* sp., *Chlorella* sp. 등이 효율이 높은 것으로 분석되었다. 하지만 같은 속에 포함되는 미세조류도 종에 따라서 동결 방법에 차이에 따른 효과가 다른 것으로 파악되었다. CPA의 경우, 현재 미세조류에서 침투형 CPA인 DMSO, methanol 등의 사용을 선호하고 있다. *Chlamydomonas*, *Kirchneriella*, *Monoraphidium* 등의 경우 5% DMSO 사용시 재배양율이 높고, *Pyramimonas* 등은 10% DMSO, 10% Methanol에서 재배양율이 높은 것으로 보고하고 있다. 하지만 많은 종의 미세조류가 이에 해당하는 것은 아니었으며, 특히 20% 이상의 DMSO를 사용 시 세포 독성 문제를 일으킨다는 연구 결과도 제시되고 있다. 이러한 이유로 세포 독성을 일으키지 않으며 효율이 좋은 소재를 찾는 연구가 진행되고 있다. 특히 병해 세균인 *Pseudomonas* sp. BGI-2가 생합성하는 EPS가 5% DMSO 사용보다 우수한 재배양율을 보인다는 보고는 향후 새로운 동결 보존제 개발에 있어 극지방의 생물 및 미생물 유래 소재를 활용한 동결보존방법 개발도 큰 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

미세조류의 장기 보존을 위한 표준 동결보존법을 제안하기 위해서는 많은 문제점을 극복해야 한다. 앞서 소개된 연구 결과에서 미세조류의 경우 같은 속에 있는 종들도 동결 보존을 위한 최적화 방법이 다르며, 같은 종일지라도 서식 환경에 따라 동결 보존법이 다르게 적용되는 경우가 많았다. 이러한 이

유로 미세조류의 표준 동결보존법을 위해 미세조류의 분류 체계에 대한 연구가 더욱 심도 깊게 이루어져야 할 것이다. 이를 토대로 개별 미세조류의 동결 보존을 위해 동결 및 해동 시 세포 손상을 최소화 수 있는 적정 온도 제어법, 최초 생존 세포 수의 적정량, 보존제 농도 및 노출 시간에 대한 연구가 필수적으로 분석되어야 할 것이다. 이와 더불어 동결 및 해동 후 살아 있는 미세조류의 세포내 탄수화물, 단백질, 지방 함량이 변화하는 등의 현상이 발생하기 때문에 동결 전 후 나타나는 대사 과정에 대한 분석을 분자생물학 및 생화학적 분석법을 활용하여 동결 보존 후 세포 재배양율을 높일 수 있는 방안을 모색하여야 할 것이다.

한편, 국내외 미세조류 자원의 체계적 관리를 위한 자원 은행 현황은 국외의 경우 주요 선진국(미국, 캐나다 등)에서는 1980년대에 이미 미세조류의 산업적 응용 가능성을 인식하고 체계적 관리를 위한 시스템을 구축하여 전 세계 연구자들에게 미세조류 배양체 분양 및 관련 정보를 제공하고 있다. 장기 보존을 위한 방법은 이들 국가도 현재는 계대배양이 주된 장기 보존법으로 활용되고 있으나, 점차적으로 동결보존법이 계대배양법을 대체할 것으로 예상된다. 국내의 경우도 국립생물자원관, 낙동강생물자원관, 해양생물자원관 등의 생물자원 소재 은행에서 활발히 국내 서식 및 선행 연구된 미세조류 주류 수집, 장기 보존을 하고 있다. 최근에 국립생물자원관과 낙동강생물자원관에서 동결보존을 위한 새로운 방법을 개발하여 학계에 발표하는 등의 실적을 내고 있으나, 미국 등의 국가와 비교 시 국내의 미세조류 동결 보존에 관한 연구는 미미한 실정이다. 이러한 문제를 극복하기 위해서는 국가 차원에서 차세대 생물자원인 미세조류의 장기 보존을 위한 연구에 대해 지원을 확대할 필요가 있다.

감사의 글

본 결과물은 환경부의 재원으로 한국환경산업기술원의 다부처 국가생명연구지원 선진화 사업 지원을 받아 연구되었습니다(과제번호 2021003420001).

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Ahn, C. Y., Lee, J. Y. and Oh, H. M. 2013. Control of microalgal growth and competition by N: P ratio manipulation. *Kor. J. Environ. Biol.* **31**, 61-68.
- Ali, P., Fuchich D., Shah, A. A., Hasan, F. and Chen, F. 2021. Cryopreservation of cyanobacteria and eukaryotic micro-

- algae using exopolysaccharide extracted from a glacier bacterium. *Microorganisms* **9**, 395.
3. Ali, P., Shah, A. A., Hasan, F., Hertkorn, N., Gonsior, M. and Sajjad, W., et al. 2020. A glacier bacterium produces high yield of cryoprotective exopolysaccharide. *Front. Microbiol.* **10**, 3096.
 4. Ben-Amotz, A. and Gilboa, A. 1980. Cryopreservation of marine unicellular algae. 11. Induction of freezing tolerance. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2**, 221-224.
 5. Best, B. P. 2015. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. *Rejuvenation Res.* **18**, 422-436.
 6. Borowitzka, M. A. 1990. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *J. Biotechnol.* **70**, 313-321.
 7. Brand, J. J. and Diller, K. R. 2004. Application and theory of algal cryopreservation. *Nova Hedwigia* 175-189.
 8. Caporgno, M. P. and Mathys, A. 2018. Trends in microalgae incorporation into innovative food products with potential health benefits. *Front. Nutr.* **5**, 58.
 9. Chian, R. C. and Quinn, P. 2010. *Fertility cryopreservation*: Cambridge University Press
 10. Ciferri, O. and Tiboni, O. 1985. The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. *Annu. Rev. Microbiol.* **39**, 503-526.
 11. Crutchfield, A., Diller, K. and Brand, J. 1999. Cryopreservation of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta). *Eur. J. Phycol.* **34**, 43-52.
 12. Day, J. and Brand, J. 2005. Cryopreservation Methods for Maintaining Cultures, pp. 165-187. In: *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press, New York.
 13. Ernest, G. and Pringsheim, O. 1949. The growth requirements of *Porphyridium cruentum*: with remarks on the ecology of brackish water algae. *Ecology* 57-64.
 14. Ferris, M. J. and Hirsch, C. 1991. Method for isolation and purification of cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1448-1452.
 15. Fuller, B. J. 2004. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo Letters* **25**, 375-388.
 16. Gärtner, G. 1992. Taxonomy of symbiotic eukaryotic algae. *Algae and Symbioses* 325-338.
 17. Gaget, V., Chiu, Y. T., Lau, M. and Humpage, A. R. 2017. From an environmental sample to a long-lasting culture: the steps to better isolate and preserve cyanobacterial strains. *J. Appl. Phycol.* **29**, 309-321.
 18. Gao, K. 1992. Chinese studies on the edible blue-green alga. *J. Appl. Phycol.* **10**, 37-49.
 19. Guiry, M. D. 2012. How many species of algae are there? *J. Phycol.* **48**, 1057-1063.
 20. Gwo, J. C., Chiu, J. Y., Chou, C. C. and Cheng, H. Y. 2005. Cryopreservation of a marine microalga, *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae). *Cryobiology* **50**, 338-343.
 21. Harris, D. O. 1972. Life history and growth inhibition studies in *Platydorina caudata* (Volvocaceae). *Bull. Soc. Bot. France* **119**, 161-174.
 22. Hossain, N., Zaini, J. and Mahlia, T. M. I. 2019. Life cycle assessment, energy balance and sensitivity analysis of bio-ethanol production from microalgae in a tropical country. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **115**, 109371.
 23. Hubalek, Z. 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology* **46**, 205-229.
 24. Hubel, A., Cravalho, E., Nunner, B. and Körber, C. 1992. Survival of directionally solidified B-lymphoblasts under various crystal growth conditions. *Cryobiology* **29**, 183-198.
 25. Hwang, I. S., Park, Y. M., Lee, Y. E., Kim, D. W., Park, J. S. and Oh, E. J., et al. 2020. Removal of water pollutants and its application to swine wastewater treatment through the establishment of best optimal growth conditions of *Ankistrodesmus vibriarius*. *Kor. J. Environ. Biol.* **38**, 82-92.
 26. Ishiguro, H. and Rubinsky, B. 1994. Mechanical interactions between ice crystals and red blood cells during directional solidification. *Cryobiology* **31**, 483-500.
 27. John, B. D. M. 1994. Alternation of generations in algae: its complexity, maintenance and evolution. *Biol. Rev.* **69**, 275-291.
 28. Joseph, I., Panigrahi, A. and Chandra, P. K. 2000. Tolerance of three marine microalgae to cryoprotectant dimethyl sulphoxide, methanol and glycerol. *Int. J. Mol. Sci.* **29**, 243-247
 29. Karlsson, J. O. and Toner, M. 1996. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials* **17**, 243-256.
 30. Kim, K. H., Lee, J. H., Park, C. H. and Oh, T. K. 2020. Incubation of *Scenedesmus quadricauda* based on food waste compost. *Kor. J. Agric. Sci.* **47**, 1039-1048.
 31. Kumari, N., Gupta, M. K. and Singh, R. K. 2016. Open encapsulation-vitrification for cryopreservation of algae. *Cryobiology* **73**, 232-239.
 32. Lee, I. H., Jeon, J. Y. and Kim, K. M. 2018. Screening of cryoprotectants (CPAs) for cryopreservation in the *Nitzschia* sp. of marine microalgae. *J. Plant Biotechnol.* **45**, 400-408.
 33. Lortou, U. and Gkelis, S. 2019. Polyphasic taxonomy of green algae strains isolated from Mediterranean freshwaters. *J. Biol. Res. (Thessalon)* **26**, 1-12.
 34. Meryman, H. 1971. Cryoprotective agents. *Cryobiology* **8**, 173-183.
 35. Muhammad, G., Alam, M. A., Mofijur, M., Jahirul, M., Lv, Y. and Xiong, W., et al. 2021. Modern developmental aspects in the field of economical harvesting and biodiesel production from microalgae biomass. *Renew. Sust. Energ. Rev.* **135**, 110209.
 36. Nickelsen, K. 2007. Otto Warburg's first approach to photosynthesis. *Photosynth. Res.* **92**, 109-120.
 37. Noh, K. R., Kil, S. C. and Oh, M. S. 2013. Scientometric Analysis for Biodiesel. *Econ. Environ. Geol.* **46**, 593-602.
 38. Park, M., Kim, Z. H., Nam, S. W., Lee, S. D., Yun, S. M. and Kwon, D. R., et al. 2020. Characterization of filamentous cyanobacteria encapsulated in alginate microcapsules. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **48**, 205-214.
 39. Pegg, D. 2002. The history and principles of cryopreservation. *Semin. Reprod. Med.* **20**, 5-13.
 40. Preisig, H. R. and Andersen, R. A. 2005. Historical review of algal culturing techniques.79-82. In: *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press, UK.

41. Richmond, A. E. and Soeder, C. J. 1986. Microalgaculture. *Crit. Rev. Biotechnol.* **4**, 369-438.
42. Romanenko, E., Kosakovskaya, I. and Romanenko, P. 2015. Phytohormones of microalgae: biological role and involvement in the regulation of physiological processes. Pt I. auxins, abscisic acid, ethylene. *Int. J. Algae* **17**, 275-289.
43. Ryther, J. H. 1956. Photosynthesis in the ocean as a function of light intensity 1. *Limnol. Oceanogr.* **1**, 61-70.
44. Simone, E. and Brown, E. 1991. ATCC preservation methods: freezing and freeze drying American Type Culture Collection. 2nd ed. Rockville, Maryland
45. Takano, M., Sado, J. I., Ogawa, T. and Terui, G. 1973. Freezing and freeze-drying of *Spirulina platensis*. *Cryobiology* **10**, 440- 444.
46. Tessarolli, L. P., Day, J. G. and Vieira, A. A. H. 2017. Establishment of a cryopreserved biobank for the Culture Collection of Freshwater Microalgae (CCMA-UFSCar). *Biota Neotrop.* **17**.
47. Vajta, G. and Kuwayama, M. 2006. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* **65**, 236-244.
48. Watanabe, A. 1959. Some devices for preserving blue-green algae in viable state. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **5**, 153-157.
49. Wolkers, W. F. and Oldenhof, H. 2021. Principles underlying cryopreservation and freeze-drying of cells and tissues. In: Wolkers, W. F., Oldenhof, H. (eds) *Cryopreservation and Freeze- Drying Protocols*. Methods in Molecular Biology. Springer Science, New York.
50. Yun, Y. S., Park, J. M. and Yang, J. W. 1996. Enhancement of CO₂ tolerance of *Chlorella vulgaris* by gradual increase of CO₂ concentration. *Biotechnol. Tech.* **10**, 713-716.

초록 : 미세조류 동결보존 기술 개발의 최근 연구 동향

임준호^{1*} · 서용배^{2*} · 김선민¹ · 전용재^{1*}

(¹부경대학교 자연과학대학 미생물학과, ²부경대학교 기초과학연구원)

미세조류 연구는 18세기 후반부터 시작된 이후 생물산업에서 가장 중요한 생물자원으로 인식되어 왔다. 특히 미세조류의 산업 활용에 초점을 맞춘 식품/사료 및 생리 활성 화합물에 대한 초기 주요 연구 분야는 현재 대체 에너지 자원, 탄소 배출 저감 및 폐수 처리를 포함한 환경 연구 분야로 더욱 확대되고 있다. 하지만 그 산업적 활용의 중요성에도 불구하고 미세조류 배양의 장기 보존과 관련된 기초 연구 분야는 많은 주목을 받지 못하고 있다. 그러나 생물학적으로 활성을 띠는 안정적인 미세조류 배양체 보존은 이러한 미세조류의 산업적 활용을 더욱 부각시킬 수 있는 핵심적인 성공요소이다. 따라서 본 총설은 조류(algae)의 분류체계에서 가장 큰 분류군을 차지하는 녹조류(Chlorophyceae)를 포함하여 현재까지 개발된 다양한 최첨단 미세조류 냉동보존기술을 조사하였다. 또한, 국내 생물자원은행 및 국제 미세조류 자원은행에 기탁된 생물학적으로 활성을 띠는 미세조류 배양체를 보존·유지하기 수행하고 있는 보존 기술과 함께 동결보존 시 온도조절 효과, 보존제 효과 등 미세조류의 성공적인 동결보존 기술과 관련된 주요 요인들을 조사하였다. 본 연구를 통해 확인된 결과를 살펴보면, 미세조류의 형태 및 생리학적 다양성으로 인해 현재로서는 범용적으로 사용할 수 있는 표준 미세조류 장기 보존 방법이 없다는 것을 확인하였다. 따라서, 이러한 문제를 극복하기 위해서는 미세조류의 분류학적 체계를 명확하기 위한 종 특이적 바이오마커의 개발과 종 특이적 동결보존 방법에 기반한 체계적인 접근을 위한 기초 연구 분야에 대해 훨씬 더 많은 노력이 필요함을 확인하였다.