

남태평양 흑진주생산 최적화를 위한 항체개발 연구보고서

2011. 4. 30.

주관연구기관 / 한국해양연구원
위탁연구기관 / 제주대학교

국 토 해 양 부
한 국 해 양 연구 원

R&D/BSPM
55800-2292-3

남태평양 흑진주생산 최적화를 위한 항체개발 연구보고서

Land Transport and Maritime
R&D Report

2011

국 토 해 양 부
한 국 해 양 연구 원

주 의

1. 이 보고서는 국토해양부에서 시행한 국제공동연구사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 국토해양부에서 시행한 국제공동연구사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

남태평양 흑진주생산 최적화를 위한 항체개발 연구보고서

2011. 4. 30.

주관연구기관 / 한국해양연구원
위탁연구기관 / 제주대학교

국 토 해 양 부
한 국 해 양 연구 원

제 출 문

국토해양부장관 귀하

이 보고서를 “국제공동연구”과제(세부과제 “남태평양 흑진주생산 최적화를 위한 항체개발 연구”)의 최종보고서로 제출합니다.

2011. 04. 30

주관연구기관명 : 한국해양연구원

주관연구책임자 : 강 도 형

참 여 연 구 원 : 박 홍 식

노 충 환

허 수 진

허 식

김 경 진

권 석 재

주 세 종

아부아판

오 철 홍

김 한 준

이 대 원

정 윤 환

예 보 람

위탁연구기관명 : 제주대학교

위탁연구책임자 : 최 광 식

참 여 연 구 원 : 양 현 성

김 봉 규

홍 현 기

정 희 도

보고서 요약서

과제고유번호	PM55800	해 당 단 계 연 구 기 간	1단계 (3년)	단 계 구 분	(1)/(1)
연구사업명	중 사업명	국제공동연구사업			
	세부사업명	남태평양 흑진주생산 최적화를 위한 항체개발 기술			
연구과제명	대 과제명				
	세부과제명				
연구책임자	강도형	해당단계 참 여 연구원수	총 : 18명 내부 : 13명 외부 : 5명	해당단계 연 구 비	정부 : 285,170천원 기업 : 천원 계 : 285,170천원
		총연구기간 참 여 연구원수	총 : 18명 내부 : 13명 외부 : 5명	총연구비	정부 : 285,170천원 기업 : 천원 계 : 285,170천원
연구기관명 및 소 속 부 서 명	한국해양연구원 해양생물자원연구부		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 : 프랑스		상대국연구기관명 : IFREMER		
위탁연구	연구기관명 : 제주대학교		연구책임자 : 최 광 식		
요약				보고서면수	195
<p>Federated State of Micronesia의 Chuuk State에 서식하는 흑진주조개 모패 및 유생의 건강 및 관리, 배우자인 알, 정자에 특이적인 다클론항체를 개발하여 번식량을 측정하고, 모패의 기생충 감염 여부를 파악하여 모패로 사용될 흑진주조개의 건강도를 파악하고자 본 연구를 수행하였다. 연구 수행 결과, 흑진주조개 난·정자 단백질 특이적인 항체를 성공적으로 개발 하여 암컷과 수컷 흑진주조개의 번식량 측정 및 포란수를 정량적으로 측정 할 수 있었으며, 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체의 개발에 관한 국제특허를 출원·등록할 수 있었다. 마지막으로 조직병리학적, 분자생물학적 진단법을 이용하여 흑진주조개의 건강도 및 기생충 등 질병 감염 유무를 판단하여 Chuuk State의 양식 환경을 간접적으로 평가 할 수 있었다. 이 연구를 통하여 측정된 흑진주조개의 번식량은 차후 흑진주조개의 번식생리학적인 기초 자료로 사용될 것으로 기대되며, 기생충 등 질병 감염 유무에 관한 연구 결과는 모패의 효율적인 관리를 위한 기초 자료로 사용될 것으로 기대 된다.</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	남태평양, 흑진주조개, 항체개발, 국제기술전수			
	영 어	South Pacific, Black-lip pearl oyster, Development of antibody, International technology transfer			

요 약 문

제1장 연구개발과제의 개요

흑진주조개, *Pinctada margaritifera* (Linnaeus, 1758)는 인도-태평양 산호초 지역에 널리 서식하며 그 중 프랑스령 폴리네시아 산호초 지역에 많이 서식한다 (Pouvreau et al. 2000, Southgate and Lucas 2008). 흑진주조개는 진주조개과 (Family)의 다른 종 (species)들보다 크기가 더 커서 상대적으로 더 큰 진주를 생산할 수 있는 장점이 있다 (Pouvreau et al. 2000). 흑진주조개 (*P. margaritifera*) 양식을 근간으로 한 흑진주 생산은 현재 프랑스령 폴리네시아의 주된 경제적 역할을 하고 있으며, 연 평균 생산량은 6 MT (US \$ 175,000,000)이다 (Pouvreau et al. 2000). 흑진주 생산량의 증가는 흑진주조개 모패의 수요를 급격히 증가시켰으며, 이는 흑진주조개 자원량의 감소를 야기 시켰다 (Kang et al. 2005).

성공적인 흑진주조개 자원관리를 위해서는 우량종묘의 생산을 위한 모패의 번식생리학적 연구가 반드시 선행되어야 하며, 이는 모패의 연중 생식주기 파악 및 산란시기 예측과 같은 정성적인 연구와 모패로부터 생산되는 알과 정자의 정량적 측정, 즉 포란수 (reproductive effort 또는 fecundity) 측정 등의 연구를 말한다. 대부분의 이매패류는 알을 포함하는 생식소 (ovary or testis)가 물리적으로 분리되지 않고 외투막 및 소화맹낭에 포함되어 있으며, 이매패류의 포란수는 수백만 또는 수천만 개에 이르는 등 이를 측정하는 방법상의 어려움 때문에 포란수 측정에 관한 연구는 정성적인 연구에 비하여 그 연구가 매우 저조한 실정이다 (Park and Choi 2004).

Chuuk Lagoon 내 흑진주조개의 현존량은 0.3개체/100 m²이며, 이는 진주 생산량이 가장 높은 폴리네시아에 비해 약 30% 정도에 해당한다. 이 지역에서 진주 생산이 가능한 모패의 잠재 현존량은 367,000개체로 추정되고 있어 매우 낮은 자연생산력임을 알 수 있다. 따라서 성공적인 흑진주조개 자원관리를 위해서는 우량종묘의 생산을 위한 모패의 번식생리학적 연구가 반드시 선행되어야 한다. 이는 모패의 연중 생식주기 파악 및 산란시기 예측과 같은 정성적인 연구와 모패로부터 생산되는 알과 정자의 정량적 측정, 즉 포란수(reproductive effort 또는 fecundity) 측정 등의 연구 등을 통칭한다.

포란수 측정에 관한 연구는 이를 측정하는 방법상의 문제로 정성적인 연구에 비하여 그 연구가 매우 저조한 실정이다. 이는 다른 동물과 달리 대부분의 이매패류는 알을 포함하는 생식소(ovary)가 물리적으로 분리되지 않고 외투막 및 소화맹낭에 포함되어 있는 문제와 이매패류의 포란수가 수백만 또는 수천만 개에 이르는데 그 문제점이 있다.

유용이매패류의 포란수 또는 번식량 측정은 양식종의 생활사 및 자원관리 측면에서 필수 불가결한 생물학적 정보로 간주된다. 그러나 이에 관한 연구는 세계적으로 거의 이루어지지 못하고 있는 실정이다. 이는 번식량을 측정하는 기술에 관한 문제로, 연구대상 종의 알 단백질에 대한 특정 항체를 개발, 항체면역효소측정법 (ELISA)를 이용하면 이러한 문제를 해결할 수 있다. 이는 이미 본 연구진에 의한 선행연구에서 세계적으로 입증된 바 있다.

대다수 온대지역의 이매패류는 수온, 먹이 및 서식장소와 같은 환경인자의 영향에 따라 번식주기의 변화를 보인다. 일반적인 이매패류의 연중 번식 주기는 에너지저장, 배우자형성, 산란 그리고 비활성 등의 4단계로 요약되는 계절적 변화를 보인다. 수온이 생식소발달을 촉진 혹은 퇴행시키는 역할을 한다면, 해수 중의 가용 먹이는 산란에 참가하는 성체의 산란량 및 유생의 발달과정에 깊은 영향을 미친다. 그러나 열대지역에 분포하는 이매패류의 번식에 관한 연구는 온대지역의 이매패류에 비하여 매우 빈약하며, 이에 따라 열대 이매패류의 번식전략이나 생리에 관한 정보는 절대적으로 부족한 실정이다.

이러한 경향에 비춰봤을 때, 현재 Chuuk Lagoon에 있어 흑진주조개의 양식 방법은 자연산 흑진주조개로부터 방출된 부유치패를 채묘하는 자연채묘 방식을 주로 사용하고 있으나, 양식 산업을 위한 충분한 양의 치패를 확보함에 있어 어려움을 겪고 있다 (Arnaud-Haond et al. 2003). 따라서 흑진주조개 치패의 안정적 공급을 위하여 인공종묘생산을 통한 치패 생산 필요성이 높게 인식되고 있으나, 생활사 및 번식생리 등에 관한 기초연구 부족으로 흑진주조개의 인공종묘생산은 현재 이 지역에서 아직까지 성공적으로 이루어지지 않고 있다. 따라서 북반구에 위치한 Federated State of Micronesia의 Chuuk State에 서식하는 흑진주조개 개체군의 연중 생식소발달과 산란시기의 규명은 개체군동태 및 자원의 효율적 관리에 있어 매우 중요한 자료이다. 그러나 이러한 중요성에도 불구하고 흑진주조개의 서식지역별 번식생물학적 특성에 관한 연구는 전무한 실정이다. 그러므로 이 연구는 Chuuk State에서 모패로 양성된 *P. margaritifera*의 알, 정자에 특이적인 다클론항체를 개발하여 번식량을 측정하고, 모패의 기생충 감염 여부를 파악하여 모패로 사용될 흑진주조개의 건강도를 파악하는데 있다.

또한 최근의 진단 및 치료용 신약 개발 분야에서 나타난 가장 두드러진 현재의 변화는 기존의 저 분자량 약품(Small molecule drug) 위주의 개발 체제에서 생물학적 약품(Biological drug)으로의 급격한 성장과 다양한 진단 및 치료방법이 본격적으로 개발되며 검증되고 있다는 점이다. 진단 및 치료용 항체는 개발 단계에 자체적인 전문기술이 요구되어 높은 기술 장벽이 있을 뿐만 아니라 항체 용도로 특허로 보호받을 수 있는 소재이나, 현재 국내에서는 항체 관련 연구는 일부 바이오 회사와 학교, 연구소 등에서 연구용 항체를 개발하고 있으나 이를 제품화해 판매하고 있는 업체는 극소수에 불과하다. 그러므로 흑진주조개 항체의 개발에 따른 관련 국제 활동 및 논문 등 정량적인 성과에 따라

연구를 주도할 수 있는 중요한 요소이기도 하다. 이는 흑진주 생산을 위한 모패의 안정적인 공급을 유도할 것이며 남태평양 도서 국가의 흑진주양식 산업에 있어 가장 시급한 일을 해결하는 과정이라고도 볼 수 있다. 현재까지 개발된 국내의 연구기술을 바탕으로 기술개발을 통해 국제특허를 확보하고, 주요 생물자원을 위한 원천기술로서 국제적 연구의 선도적인 기회를 확보한다면 흑진주 생산 최적화를 위한 국제 기술 전수 프로그램 선도에 이바지 할 것으로 본다.

제2장 국내외 기술개발 현황

한국해양연구원에서는 마이크로네시아 축주의 한-남태평양해양연구센타를 운영하며, 흑진주 조개의 생태학적 연구, 자원생물학적 연구 및 세포생물학적 연구를 수행 중이다. 관련 연구로서 남태평양에 서식하는 흑진주조개 개체군 특성(Park et al., 2007), 흑진주조개 유생의 착생 및 성장 특성, 환경조건에 따른 흑진주조개의 번식 및 에너지 대사 연구 및 흑진주조개의 패각성장 특성 및 연중 생식소 발달 과정을 연구 중에 있다.

이번 연구와 관련된 연구로는 흑진주조개의 하계 산란 특성에 대한 연구는 보고된 바 있으나(Kang et al., 2005), 흑진주조개의 포란수나 정량적 번식량 측정에 관한 연구는 전 세계적으로 아직 이루어 지지 않았다. 해산이매패류의 번식량 측정은 생식 주거나 자원 관리하는데 있어 중요한 기초 자료가 되는데, 최근 들어 난 특이 단백질에 대한 다클론항체를 개발하여 이를 효소면역측정법 (ELISA)을 이용하여 참굴, 개조개 및 바지락 등과 같은 이매패류의 포란수를 측정하는 바 있다(Choi et al., 1993, 1994; Kang et al., 2003; Park et al. 2003,2004).

포란수 측정에 관한 연구는 이를 측정하는 방법상의 문제로 정성적인 연구에 비하여 그 연구가 매우 저조한 실정임. 이는 다른 동물과 달리 대부분의 이매패류는 알을 포함하는 생식소(ovary)가 물리적으로 분리되지 않고 외투막 및 소화맹낭에 포함되어 있는 문제와 이매패류의 포란수가 수백만 또는 수천만 개에 이르는데 그 문제점이 있다. 패류의 포란수 또는 번식량 측정은 양식종의 생활사 및 자원관리 측면에서 필수 불가결한 생물학적 정보로 간주된다. 그러나 이에 관한 연구는 세계적으로 거의 이루어 지지 못하고 있는 실정이다. 이는 번식량을 측정하는 기술에 관한 문제로, 연구대상 종의 알 단백질에 대한 특정 항체를 개발, 항체면역효소측정법 (ELISA)를 이용하면 이러한 문제를 해결할 수 있다. 이는 이미 본 연구진에 의한 선행연구에서 세계적으로 입증된 바 있다.

북반구에 위치한 마이크로네시아의 Chuuk Lagoon에 서식하는 흑진주조개 개체군의 연중 생식소발달과 산란시기의 규명은 개체군동태 및 자원의 효율적 관리에 있어 매우

중요한 자료이다. 그러나 이러한 중요성에도 불구하고 흑진주조개의 서식지역별 번식생물학적 특성에 관한 연구는 전무한 실정이다. 그러므로 이 연구는 Chuuk lagoon에서 모패로 양성된 *P. margaritifera*의 알에 포함된 특정 난황단백질의 특성을 파악하고, 다클론항체를 개발하여 흑진주조개 번식량을 정량화 하는데 중요한 정보를 제공하는데 있다.

난황단백질 (Vitellin)과 전구물질 (Vitellogenin)의 특징에 관한 연구로는 현재까지 우리나라에서는 해산어류나 누에, 곤충, 파충류 등을 통해 Vitellin이나 Vitellogenin의 정제 및 합성에 대한 호르몬의 영향, 면역학적 특성에 관한 연구가 보고되고 있다. 그러나 해산이매패류의 경우 국외에서는 난황단백질 (Vitellin)에 관한 연구가 수행되었지만 매우 국한되어 있고, 난황형성과정의 직접적인 근거가 불분명하며 Vitellogenin의 특징에 대한 연구는 저조한 실정이며 현재까지 우리나라에서는 이에 관한 연구가 어느 이매패류에서도 전혀 이뤄지지 않은 실정이었다.

흑진주조개의 번식량에 대한 연구는 프랑스 폴리네시아 해역에 서식하는 흑진주조개의 산란 전.후의 무게의 차이를 이용해 번식량을 측정하는 연구 (Pouvreau et al. 2000a)와 페르시아 해역에 서식하는 흑진주조개의 화학 자극을 통해 산란되는 알의 수를 세는 방법 (Ehteshami et al. 2011)의 연구가 보고 되었다. 한편 흑진주조개의 배우자 형성과 번식주기에 관한 연구로는 홍해에 서식하는 흑진주조개의 연간 번식 주기 (Crossland 1957), 프랑스 폴리네시아 해역에 서식하는 흑진주조개의 정자 형성의 초미세구조 (Thielley et al. 1993a)와 연간 번식 주기 (Pouvreau et al. 2000b), 호주 해역에 서식하는 흑진주조개의 연간 번식주기 (Acosta-Salmon and Southgate (2005)에 관한 연구가 있었다.

우리나라의 경우, 흑진주조개에 대한 번식주기 및 정량적인 번식량 측정에 관한 연구는 보고된 바 없다. 그러나 최근 들어 난 특이 단백질에 대한 다클론항체를 개발하여 이를 효소면역측정법 (ELISA)에 의하여 이매패류의 산란량을 측정하는 기법이 보고되고 있으며, 이러한 방법은 신속하고 객관적인 번식량 자료를 제공하는 것으로 알려지고 있다 (대서양굴, 참굴, 개조개 및 바지락, Choi et al. 1993, 1994; Kang et al. 2003; Park et al. 2003, 2004).

제3장 연구개발 수행 내용 및 결과

3-1. 흑진주조개 모패 관리

3-1-1. 흑진주조개 모패의 기초관리 방안

일반적으로 이매패류의 생식소 발달은 수온과 먹이의 영향에 크게 영향을 받는다. 온대지방의 경우, 수온은 gametogenesis를 시작하게 하는 cue인 반면, 먹이는 생식소의 발달을 촉진·성숙시키는 인자로서 유생의 생존에도 그 영향이 있다. 그러나 열대지역의 경우, 수온이 흑진주조개의 성숙을 결정한다는 보고도 있다(Saucedo et al. 2001). 온대지방 이매패류 서식지에 비해 열대지역 환초 환경의 경우, 수온은 안정적인데 반해 먹이조건은 좋지 않다. 이런 지역에 서식하는 흑진주조개, *P. margaritifera*의 서식밀도는 그리 높지 않은데 그 이유로 먹이원의 부족을 꼽기도 한다. 이 흑진주조개를 이용한 흑진주 산업은 세계적으로 고부가가치 수산양식 산업으로 각광을 받고 있으나, 근래에 들어서는 양식장 오염, 어장의 노후화, 질병 및 유생 확보 등의 여러 가지 문제로 인해 양식에 어려움이 있다고 보고되고 있다.

이매패류 유생의 초기성장과 생존율은 모패가 만들어 준 알의 질에 따라 그 수준이 좌우된다고 보고되고 있다. 2002년 한-남태평양연구센터에서 실시한 흑진주조개 종묘생산 결과(unpublished data)에 따르면 수정란에서 자패 착생까지의 생존율은 0.7% 정도였었다. 이 종묘생산은 자연에서 채집된 암·수 개체들을 이용하여 실시했던 연구로서, 이런 낮은 수준의 생존율을 보인 것은 환초 지역에서 채집된 암컷 개체의 포란수와 알의 질을 무시할 수가 없다. 이는 해수로부터 충분한 영양원을 받지 못했다는 간접적인 증거가 되며, 그 결과 생식소의 충분한 성숙을 이루지 못한 것으로 해석할 수 있다.

산란이 이뤄진 모패들은 먹이급이가 이뤄지고 한 달 정도가 지나면 생식소의 재 성숙 현상을 관찰 할 수 있었으나, 먹이가 없을 경우에는 자연 산란뿐만 아니라 인공적인 산란유도의 경우에도 알들을 관찰할 수 없었다. 이 결과는 좋은 품질의 흑진주를 생산하기 위해서는 흑진주조개 모패의 먹이원을 잘 관리해야 하는 중요한 결과라 볼 수 있다.

3-1-2. 산란기 배우자(알과 정자)의 생화학적 특성

흑진주조개 알 하나의 무게는 14.31 ng이었다. 대부분의 이매패류들의 알 하나의 무게와 유사하였으며, 그 중 우리나라에 서식하고 양식하는 종인 참굴(*Crassostrea gigas*)과 유사하였다. 조직학적 분석결과에서도 유사한 크기를 보이기도 했다.

다른 이매패류들과 비교한 생화화적인 조성을 보았을 때, 단백질의 함량은 유사한 반면 지방함량은 다른 종들보다 높은 경향을 나타냈으며, 반대로 탄수화물 함량은 낮은

수준을 보였다. 지방함량이 높다는 것은 상대적으로 높은 면역성을 갖고 있다는 것을 나타내며, 탄수화물함량이 낮은 것은 상대적으로 낮은 에너지를 가진 자패(juvenile)로 유도되어 일정한 시기(D-shaped or umbo stage)에 대량폐사는 일어날 수 있지만 생존한 자패와 치패(spat)의 경우에는 높은 생존율을 가질 수 있다는 것을 나타낸다. 이는 먹이조건이 상대적으로 낮은 열대지역의 특수한 적응 기작이라고 볼 수 있다.

산란 직전의 성숙기 알의 지방산 함량은 지방산의 종류에 따라 16:0(palmitic acid)를 포함한 SAFAs가 시료에서 총 지방산의 44.92%로 가장 우점하였으며, 22:6(n-3)(Docosapentaenoic acid; DHA)을 포함한 PUFAs가 총 지방산의 31.23%로 그 다음 우점하였다. 단일불포화지방산이 19.53%로 가장 낮게 나타났으며, 이 중 18:1(n-9)(Oleic acid)는 정자보다는 알에 더 많이 함유되어 있었다. 포화지방산 중 Palmitic acid는 식물 기원의 지방산으로서 부유성 식물플랑크톤 및 저서성 규조류 등을 섭취한 증거로서 볼 수 있다.

정자의 지방산 함량은 22:6(n-3)(Docosapentaenoic acid; DHA)을 포함한 PUFAs가 총 지방산의 55.22%로 가장 우점하였다. 그 다음으로 16:0(palmitic acid)를 포함한 SAFAs가 시료에서 총 지방산의 26.84%로 우점하였으며, 단일불포화지방산이 10.57%로 가장 낮게 나타났으며, 20:1(n-11)은 알보다 정자에 더 많이 함유되어 있었다. 정자의 지방산 함량 중 특이한 것은 DHA 농도가 높다는 것인데, 이는 이매패류 번식에 가장 중요한 지방산이기도 하다. 일반적으로 sterol과 PUFAs는 이매패류 성체의 번식 및 유생의 생존에 중요한 요소로 작용한다. 이 연구결과는 흑진주조개 유생의 대량폐사 시기에 자패 또는 치패의 지방산 조성을 추적하는데 기본 자료로 사용하였다.

3-2. 흑진주조개 배우체의 특이 단백질에 대한 다클론항체 연구

3-2-1. 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체 개발 및 암컷 흑진주조개 번식량 측정

흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체의 개발을 위해 2008년 4월 마이크로네시아 측수에 위치한 한남대평양해양연구센터에서 양성되고 있는 30개체의 암컷 흑진주조개를 채집하였다. 성숙한 암컷의 생식소 부위에 칼집을 낸 후 압박하여 알을 추출하고 100 um와 40um 체로 불순물을 제거한 후 여러 번 세척하여 순수한 알만을 분리하였다. 순수 분리된 알을 동결 건조하여 분말화 하고, 항원으로 토끼에 주사하였다. 난단백질 항원은 총 4차례 토끼에 주사 하였으며, 면역화가 끝난 후 항 혈청을 분리하였다. 분리된 항혈청의 특이성과 민감도 측정 결과 혈청 내 미약한 비 특이적인 반응이 남아 있는 것을 확인하였고, 이를 제거하기 위해 면역흡착제를 준비하여 혈청 내 비특이적인 항체를 제거하였다. 비 특이적인 교차반응 제거 후 얻은 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체는 흑진주조개 난 단백질에만 특이적으로 반응하였고, 개발된 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체가 인지하는 난 단백질의 크기는 약 524, 283, 154, 96, 74, 69, 41, 36, 34 그리고

22 kDa이었다.

이 연구에서 개발된 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체를 이용해 흑진주조개의 번식량을 측정하기 위해 2009년 12월 마이크로네시아 축주에서 36개체의 암컷 흑진주조개를 채집하였으며, 지역 간 비교 분석을 위해 2010년 5월 프랑스령 폴리네시아 타히티에서 9개체의 암컷 흑진주조개를 채집하여 번식량 측정에 사용하였다. 순수분리된 흑진주조개 알 분말과 체조직 분말을 혼합하여, 알 분말의 무게가 3, 7, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 mg이 되게 100 mg 씩 준비하여 표준 물질로 사용하였다. 이 연구에서 개발된 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체를 일차 항체 (6.3 ug/ml)로 사용하였고, 표준물질로부터 계산되는 시료의 생식소지수 (GSI, %)와 포란수 (Fecundity)를 계산하였다. 그 결과, 축주에서 채집된 성숙기 (Ripe stage)의 암컷 흑진주조개는 건중량의 평균 18.4%의 알을 포함하는 것으로 나타났으며, 타히티에서 채집된 성숙기 (Ripe stage)의 암컷 흑진주조개는 건중량의 평균 12.5%의 알을 포함하는 것으로 나타났다.

3-2-2. 흑진주조개 난 특이적인 단백질 특성 조사

흑진주조개 난 단백질의 분자적 특성과 다른 이매패류 종의 난 단백질이 갖는 분자적 특성을 조사하기 위해 흑진주조개 알 분말과 본 연구팀에서 보유하고 있는 참굴, 강굴, 가시굴, 담치 그리고 바지락 알 분말을 5% native PAGE와 10% SDS-PAGE 후 Coomassie blue로 염색하여 비교하였다. 또한 개발된 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체가 다른 이매패류 종의 난 단백질을 인지 할 수 있는지 알아보기 위해 western blotting과 ELISA를 실시하였다. 마지막으로 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체가 인지하는 흑진주조개 난 단백질의 특성을 알아보기 위하여 N-terminal 아미노산 서열을 분석하였다. 그 결과, native PAGE 상에서 담치를 제외한 5 종의 난 단백질은 약 420 kDa에서 한 개의 major band를 갖고 있었으며, SDS-PAGE 상에서도 약 47 과 39 kDa 크기의 major band가 모든 종의 난 단백질에 공통적으로 관찰 되었다. 따라서 이 연구에서 개발된 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체가 이러한 공통 항원을 인지하는지 혹은 다른 공통 항원의 존재 유무를 확인하기 위해 western blotting을 수행하였고, 그 결과 공통항원은 존재하지 않았으며, 개발된 항체는 종 특이적으로 흑진주조개 난 단백질과만 반응하는 것을 알 수 있었다. 마지막으로 흑진주조개 난 단백질의 특성을 알아보기 위해 실시된 N-terminal 아미노산 서열 분석 결과, 개발된 항체가 인지한 10개의 난 단백질 중 약 41 과 22 kDa의 단백질 단편의 경우에만 N-terminal 아미노산 서열 분석이 가능하였다.

3-2-3. 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체 개발 및 수컷 흑진주조개 번식량 측정

흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체의 개발을 위해 2008년 12월 마이크로네시아 축주에 위치한 한남태평양해양연구센터에서 양성되고 있는 10개체의 수컷 흑진주조개를 채집하였다. 성숙한 수컷의 생식소 부위에 칼집을 낸 후 압박하여 정자를 추출하고 100 um와 40um 체로 불순물을 제거한 후 여러 번 세척하여 순수한 정자만을 분리하였다. 순수 분리된 정자는 동결건조하여 분말화 하고, 정자 분말을 PBS에 섞어주어 항원으로 토끼에 주사하였다. 정자 단백질 항원은 총 5차례 토끼에 면역화 하였으며, 면역화가 끝난 후 항혈청을 분리하였다. 분리된 항혈청의 특이성과 민감도 측정 결과 혈청 내 미약한 비특이적인 반응이 남아 있는 것을 확인하였고, 이를 제거하기 위해 면역흡착제를 준비하여 혈청 내 비특이적인 항체를 제거하였다. 비특이적인 교차반응 제거 후 얻은 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체는 흑진주조개 정자 단백질에 특이적으로 반응하였고, 개발된 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체가 인지하는 정자 단백질의 크기는 약 27.5 kDa이었다.

이 연구에서 개발된 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체를 이용해 흑진주조개의 번식량을 측정하기 위해 2009년 12월 마이크로네시아 축주에서 100개체의 수컷 흑진주조개를 채집하였으며, 지역간 비교 분석을 위해 2010년 5월 프랑스령 폴리네시아 타히티에서 11개체의 수컷 흑진주조개를 채집하여 번식량 측정에 사용하였다. 순수 분리정제된 흑진주 정자 분말과 흑진주조개 체 조직 분말을 섞어 정자 분말의 무게가 5, 10, 20, 40, 60, 80 mg이 되게 100 mg 씩 준비하여 표준 물질로 사용하였다. 축과 타히티에서 채집된 흑진주조개를 100 mg 씩 재어 균질화 한 후 항원으로 사용하였다. 이 연구에서 개발된 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체를 일차 항체 (6.0 ug/ml)로 사용하였고, 표준 물질로부터 계산되는 시료의 생식소지수 (GSI, %)를 계산하였다. 그 결과, 축주에서 채집된 성숙기 (Ripe stage)의 수컷 흑진주조개는 건중량의 평균 8.5%의 정자를 포함하는 것으로 나타났으며, 타히티에서 채집된 성숙기 (Ripe stage)의 암컷 흑진주조개는 건중량의 평균 7.5%의 정자를 포함하는 것으로 나타났다.

3-2-4. 흑진주조개 건강도 조사를 위한 기생충 등 질병 감염 유무 연구

2009년 12월과 2010년 5월에 각각 축주와 타히티에서 채집된 흑진주조개의 건강도 평가를 위해 조직학적인 관찰을 통하여 소화맹낭 위축도와 기생충 감염 여부를 관찰하였고, 분자생물학적인 방법을 통하여 이패매류의 병원성 원생 기생생물인 Perkinsus 의 감염 여부를 진단하였다. 연구 결과, 소화맹낭 위축도의 경우 타히티의 흑진주조개가 축주에 서식하는 흑진주조개보다 더 위축되어 Chuuk 주의 먹이 조건이 더 풍부하다는 것을 간접적으로 알 수 있었다. 기생충 감염의 경우 두 지역에서 모두 Trematode의 감염을

이 다른 기생충의 감염율에 비해 높은 경향을 나타내었으며, 조직병리학적인 관찰과 분자생물학적인 Perkinsus 진단 결과 Perkinsus의 감염 여부는 없었다. 비록 Trematode의 감염율이 다른 기생충에 비해 높은 감염율을 나타내었지만 이러한 기생충이 흑진주조개에 미치는 영향에 대한 연구는 좀 더 세밀한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

3-3. 흑진주조개 유생의 관리

3-3-1. 부유유생 배양 및 성장

미수정란은 물방울형이나 수정을 마치면 점차 둥글어 진다. 인공산란유발로 얻어진 흑진주조개 수정란은 원형으로 직경은 50~51 μm 로 다른 이매패류와 유사하다. 수온 29°C, 염분 33‰에서 수정란은 부등할을 한다. 산란시간 기준으로 1시간 만에 2세포기에 도달하며, 이후 세포분열 시간은 평균 30분 내외로 1시간 20분 만에 4세포기, 1시간 50분 만에 8세포기, 2시간 20분 만에 16세포기, 3시간 만에 32세포기에 도달하여, 이때부터 개체별 발생시간에 차이가 나기 시작한다. 4시간 30분 만에 상실기에, 6시간 만에는 대부분의 수정란이 낭배기에, 9시간 후에는 담륜자(trochopore)유생으로 부화하여 유영생활에 들어간다. 이때의 크기는 약 $65.11 \pm 2.67 \mu\text{m}$ 로서 수정에서 초기 담륜자유생이 되기까지 걸린 시간은 같은 종의 난 발생 연구와 유사하였으나, 초기 D형 유생의 크기가 5 μm 정도 작은 경우가 있다. 대부분의 경우 담륜자 유생기에서 초기 D형 유생기 사이에 제 1차 대량폐사가 일어나며, 20% 이상 유생이 사멸했다. 수정 후 1.5일이 지나면 D형 유생의 입 주위에 섬모가 발달하여 먹이를 섭취하기 시작한다. 이후 유생의 성장은 10 $\mu\text{m}/\text{일}$ 내외로 빨라지며, 제 7일째 각정기에 도달하며, 180 μm 로 성장한다. 이 때, 급격하고 치명적인 제2차 대량폐사가 일어나며, 많은 유생이 사멸했다. 이 시기가 바로 흑진주조개 종묘 생산에 있어 가장 조심해야 할 시기인 것으로 여겨진다. 이러한 대량 폐사는 모든 산란군에서 같이 관찰되었으며, 유생밀도와 먹이생물 공급량과는 독립적으로 발생하는 것으로 생각된다. 제 2차 대량 폐사시기를 견디고 살아남는 유생은 15일째 발안기와 포복기에 들어가기 시작한다. 15일째는 대부분의 유생에서 한 쌍의 뚜렷한 붉은색 안점을 관찰할 수 있다. 발안기 및 포복기 유생은 2~3일 내에 부착기 유생으로 발달하여 저층에 머물다가 떠오르기를 수회 반복한다. 바로 이 시기가 채묘시기로 부착기 유생이 적당한 기질을 찾으면 다시는 떠오르지 않고 죽사를 내어 기질에 부착하고 저서생활로 들어가며 점차 흑진주조개 모양으로 변한다. 이를 부착치패라 하며 흑진주조개의 특징인 크게 귀가 발달하지 않은 상태이다. 부착치패는 성장이 빨라 부착 후 10일 지나면 각장 1 mm 정도로 성장하고 귀가 발달하여 흑진주조개의 모양을 갖춘다.

3-3-2. 발달단계 별 유생의 성장

부화 후 10일경 초기 각정기 유생이 관찰되었고, 각장 $136.39 \pm 11.98 \mu\text{m}$ 와 각고 $129.75 \pm 12.09 \mu\text{m}$ 의 평균 크기를 보였다. 부화 후 12일경에는 대부분의 유생이 각정기 단계에 진입하였고, 유생의 패각에서 안점을 관찰할 수 있었으며, 이때 평균 유생의 크기는 각장 $148.99 \pm 24.18 \mu\text{m}$, 각고 $135.20 \pm 22.65 \mu\text{m}$ 이었으며 2차 감모가 일어났다. 부화 후 15일 경에는 유생들이 포복행동이 관찰되었다. 이때 미리 준비해둔 플라스틱검정비닐 재질의 채묘기를 투입하였다. 유생의 평균 크기는 각장 각고가 각각 $189.28 \pm 21.86 \mu\text{m}$ 과 $173.60 \pm 19.13 \mu\text{m}$ 이었다(그림 3-4-5). 부착기를 투입한 후 부터는 환수가 불가능하여 약 19일경 유수식으로 전환하여 부분환수를 실시하였으나 수조 내 부유하는 유생들이 관찰되어 24:00~07:30 동안에는 지수식으로 하여 잔류 부유유생의 부착을 유도를 하였다. 부화 후 약 23일경 부착치패가 확인되어 유수식으로 전환하여 사육하였고 환수를 약 50% 정도부터 시작하여 점차 환수량을 늘려갔다. 유생의 크기 측정은 환수 하는 시기인 2일 간격으로 하다가 부착시기가 다가옴에 따라 채묘기 투입 후부터는 유생의 안정적인 부착을 유도하기 위하여 환수를 줄이고 지수식으로 사육을 하였고, 부착이 완료될 시점인 부화 후 약 23일경 환수를 실시하였고 이 시기에 크기를 측정하였으며 평균 크기는 각장 $250.63 \pm 50.58 \mu\text{m}$ 각고 $224.47 \pm 29.86 \mu\text{m}$ 이었다. 부착후 유수식으로 사육을 하였으나, 수조 바닥에 먹이 찌꺼기 또는 치패의 배설물들이 쌓여 바닥 청소 및 치패에 피해를 예방하기 위하여 부화 후 33일경 미리 준비해둔 수조에 채묘기를 옮겨주었으며 크기를 측정하였다. 이때 부착치패의 평균 크기는 각장 $328.85 \pm 42.67 \mu\text{m}$, 각고 $249.55 \pm 29.79 \mu\text{m}$ 이었다.

각 성장 지역별로 치패들의 각장 성장은 육상수조 지역이 평균각장 $11.64 \pm 2.69 \text{ mm}$ 에서 $13.92 \pm 3.06 \text{ mm}$ 범위로 가장 적게 성장하였고, 최대 성장 지역인 모패 양성 수하연 지역에서는 평균 $15.03 \pm 4.36 \text{ mm}$ 에서 $35.02 \pm 9.25 \text{ mm}$ 의 범위로 약 2배가량 성장하였고, 치패들의 성장 차이도 4 지역에 비해 상대적으로 편차가 크게 나타났다.

각 지역별 치패의 평균 육질성장 또한 육상수조에서 가장 낮고, 수하연 지역에서 가장 높았다. 육상수조에서는 $0.12 \pm 0.08 \text{ g}$ 에서 $0.24 \pm 0.15 \text{ g}$ 으로 가장 낮은 성장률을 보였고, 수하연 지역에서는 평균 중량 $0.32 \pm 0.33 \text{ g}$ 에서 $6.80 \pm 5.25 \text{ g}$ 의 범위를 보여 평균적인 육질 성장이 최대값을 보였다. 각 치패별로 성장의 차이가 확연하게 나타났다

3-4. 흑진주조개 다클론항체의 기술가치 평가

평가대상기술가치평가는 한국해양연구원이 소유하고 있는 지적재산권(특허 등록번호: 제10-0947742호) “흑진주 조개 알 추출물의 항원단백질 및 이에 특이적인 항체를 이용하여 흑진주 조개의 번식량을 예측하는 방법” 특허기술을 대상으로 한다. 평가의 목적은 본 평가대상기술을 사업에 적용한 경우 그 기술사업의 가치를 추정한 후, 사업가치에서 기술이 차지하는 기여도를 측정하여 기술의 공정가치를 합리적인 방법에 따라 산정하는

것이며, 산정금액은 현물출자를 하는데 있어서, 이해 및 합리적인 판단을 할 수 있도록 도움을 제공하는 데 있다. 공정가치란 자발적인 수요자와 공급자 모두가 해당 기술에 대한 모든 사실을 이해하고 쌍방이 거래에 대한 강요가 없는 상황에서 거래될 수 있는 금액을 의미한다. 평가일은 2010년 03월 31일을 기준으로 하였다.

평가기관인 남앤드남국제특허사무소는 평가를 위해 현재 및 미래의 경제, 산업시장, 기술동향 및 권리동향 등을 조사 및 분석하였으며, 또한 한국해양연구원의 기술성평가자료, 사업성평가자료, 과거의 재무자료, 연구개발 및 설비투자현황·계획 등을 분석하여 개별기술가치평가에 관한 일반적인 평가방법, 평가절차 및 분석방법에 따라 평가업무를 수행하였다. 평가방법은 소득접근법을 적용하였다. 본 평가는 평가기간 중 최선의 이용 가능한 객관적인 자료를 분석하고 합리적인 가정과 통계적인 방법을 적용하여 수행되었으나, 그 결과치는 미래의 경기변동, 경영환경 등 외부요인, 평가기준일 및 평가상의 가정이 상이할 경우 다르게 나타날 수 있다.

위의 평가방법과 평가절차에 따라 기술가치를 평가하였으며, 평가대상기술에 따른 기술 수명을 적용하여 평가하였다. 현금흐름 기반의 이익접근법과 로얄티공제법을 활용하여 각 기술에 대한 평가를 수행하였다. 평가대상기술들에 대해 적정한 기술가치로는 이익접근법으로 45.4억원, 로얄티공제법으로 8.6억 원으로 추정되었다.

평가대상특허는 물건발명(항원 및 항체)과 방법발명(흑진주 조개 번식량 예측방법)으로서 권리범위가 명확하나 다소 좁게 확보되어 있는 것으로 판단되고, 국내외 선행기술 조사 결과, 평가대상특허와 유사한 선행기술은 없는 것으로 조사되었으므로, 무효화 가능성이 매우 낮아 권리 안정성이 높은 것으로 판단된다. 또한, 항원-항체 반응을 통해 흑진주 조개 번식량을 정량적으로 측정하는 방법을 최초로 개발하여 권리의 경쟁성이 우수한 것으로 판단된다. 흑진주 조개의 우량종묘를 생산하기 위해서는 포란수 측정 기술이 중요하므로, 평가대상특허는 흑진주 양식 산업에 직접적이고 혁신적인 기술로서 기여할 것으로 기대된다.

평가대상기술은 흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질, 이에 특이적인 항체 및 상기 항체를 이용하여 흑진주 조개의 번식량을 예측하는 방법에 관한 것으로, 평가대상기술을 이용함으로써 손쉽고 정확하게 흑진주조개의 번식량을 정량화할 수 있으며, 이를 통해 흑진주 조개의 생활사 연구의 중요한 정보제공 및 흑진주 생산량의 효율적 관리가 가능할 것으로 판단된다.

평가대상기술은 흑진주 양식 기술로서, 평가대상기술이 적용될 수 있는 시장은 i) 흑진주 보석 시장 및 ii) 흑진주의 “모발 노화방지” 용도와 관련된 ‘기능성 샴푸 시장’을 고려할 수 있다.

국내 흑진주 시장의 연평균 성장률(CAGR) 약 10% 및 상기 시장규모에서의 추정 점유율 10%를 토대로 평가대상기술의 추정 기술수명인 14년 동안 평가대상기술 보유 기업

이 달성가능한 매출액을 추정한 결과, 2011년 1.4억원, 2012년 1.6억원, 2013년 1.7억원, 2014년 1.9억원, 2015년 2.1억원, 2016년 2.3억원, 2017년 2.8억원, 2019년 3.0억원, 2020년 3.3억원, 2021년 3.7억원, 2022년 4.0억원, 2023년 4.4억원, 2024년 4.9억원의 매출을 달성할 수 있을 것으로 추정되었다.

또한, 국내 기능성 샴푸 시장의 연평균 성장률(CAGR) 약 10% 및 유사기업의 매출자료를 토대로 평가대상기술의 추정 기술수명인 11년 동안 평가대상기술 보유 기업이 달성가능한 매출액을 추정한 결과, 2011년 300.0억원, 2012년 330.0억원, 2013년 363.0억원, 2014년 399.3억원, 2015년 439.2억원, 2016년 483.2억원, 2017년 531.5억원, 2018년 584.6억원, 2019년 643.1억원, 2020년 707.4억원, 2021년 778.1억원의 매출을 달성할 수 있을 것으로 추정되었다.

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

4-1. 흑진주 생산 최적화를 위한 다클론항체 개발의 시장 기여도

국내 흑진주 시장 규모는 국내 진주 시장 규모의 약 15% 정도에 해당되므로, 상기와 같이 예측할 수 있다. 진주에 대한 수요와 공급이 유사한 추이를 보인다고 가정하에, 상기 10년간의 통계자료를 근거로 국내 진주 시장의 연평균 성장률(CAGR)을 살펴보면 약 -4.6%로 계속 감소하고 있다. 그러나, 평가대상기술인 흑진주 생산 기술을 통하여 흑진주를 저렴한 가격으로 국내시장에 공급할 수 있어 막대한 수입대체효과가 예상되며, 후술하는 기능성 샴푸 시장에서도 흑진주가 모발 노화 방지 용도로서 소비자들에 각광받고 있는 점을 고려할 때 향후 국내 흑진주 시장은 적어도 기능성 샴푸 시장의 성장률인 10% 이상으로 성장할 것으로 예측할 수 있다.

흑진주는 모발노화방지 효과가 있어 기능성(프리미엄) 샴푸에도 이용되고 있다. 따라서 연도별 프리미엄 샴푸시장 규모를 살펴보면 2002년 1,000억원, 2003년 1,297억원, 2004년에 1,800억 원이었다. 기능성 미용시장의 업계에 따르면, 두피케어 시장은 20%대의 고성장률을 보이는 반면, 기능성(프리미엄) 샴푸 시장은 10%의 성장률을 보인다고 보고하였다. 따라서 상기 업계 보고에 따라 국내 기능성 샴푸 시장은 적어도 연평균 성장률(CAGR) 약 10%로 지속적으로 증가할 것으로 예측할 수 있다.

우리가 개발한 기술은 흑진주 양식 기술로서, 평가대상기술이 적용될 수 있는 시장은 i) 흑진주 보석 시장 및 ii) 흑진주의 “모발 노화방지” 용도와 관련된 ‘기능성 샴푸 시장’을 고려할 수 있다.

국내 흑진주 시장의 연평균 성장률(CAGR) 약 10% 및 상기 시장규모에서의 추정 점유율 10%를 토대로 평가대상기술의 추정 기술수명인 14년 동안 평가대상기술 보유 기업이 달성가능한 매출액을 추정한 결과, 2011년 1.4억원, 2012년 1.6억원, 2013년 1.7억원, 2014년 1.9억원, 2015년 2.1억원, 2016년 2.3억원, 2017년 2.8억원, 2019년 3.0억원, 2020년 3.3억원, 2021년 3.7억원, 2022년 4.0억원, 2023년 4.4억원, 2024년 4.9억원의 매출을 달성할 수 있을 것으로 추정되었다. 또한, 국내 기능성 삼푸 시장의 연평균 성장률(CAGR) 약 10% 및 유사기업의 매출자료를 토대로 평가대상기술의 추정 기술수명인 11년 동안 평가대상기술 보유 기업이 달성가능한 매출액을 추정한 결과, 2011년 300.0억원, 2012년 330.0억원, 2013년 363.0억원, 2014년 399.3억원, 2015년 439.2억원, 2016년 483.2억원, 2017년 531.5억원, 2018년 584.6억원, 2019년 643.1억원, 2020년 707.4억원, 2021년 778.1억원의 매출을 달성할 수 있을 것으로 추정되었다.

4-2. 연구 측면에서의 흑진주조개 번식량 정량을 위한 다클론항체 개발

이 연구에서 제주대학교 연구팀은 1차년도 연구 목표를 흑진주조개의 알 순수 분리 및 알의 생화학적 조성 분석, 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체 개발, 개발된 항체에 대한 특허 출원을 목표로 연구를 수행하였고, 특허 출원 과정에서 이전 연구자들과 알 분리 차이점 및 독창성을 중점적으로 기술 하여 세계 최초로 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체 개발에 관한 특허를 출원 할 수 있었다.

2차 년도에는 개발된 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체를 이용한 흑진주조개 암컷의 번식량을 측정하고, 흑진주조개 난 단백질의 특성 조사, 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체 개발을 목표로 연구를 수행하였으며, 1차 년도에 개발된 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체를 이용하여 성공적으로 마이크로네시아 축주에 서식하고 있는 흑진주조개의 번식량을 측정하여 세계 최초로 흑진주조개의 포란수를 정량적으로 측정할 수 있었다. 또한 흑진주조개 난 단백질의 특성을 전기영동 및 western blotting, N-terminal 아미노산 서열 분석을 통해 조사함으로써 개발된 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체가 종 특이적으로 흑진주조개에만 반응 한다는 것을 알 수 있었다.

3차 년도에는 2차 년도에 이어 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체 개발, 흑진주조개 수컷 번식량 측정, 기생충 감염 등 질병 유무 진단을 목표로 연구를 수행하였다. 그 결과, 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체가 성공적으로 개발이 되었으며, 이는 이때 패류에서 대서양굴 정자 특이적인 항체 개발 (Choi et al. 1993) 이후 세계에서 두 번째로 개발이 이루어 졌으며, 진주조개과에 속한 종에서는 세계 최초로 정자 단백질에 특이적인 항체의 개발이 이루어져 의미가 있다고 평가된다. 연구 수행 기간 동안 개발된 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체를 이용하여 흑진주조개 수컷 번식량을 측정하여 흑진주조개의 암. 수컷 번식량을 정량적으로 측정 할 수 있었다. 또한 이번 연구에서 조직병

리학적, 분자생물학적인 기생충 등 질병 감염 유무 진단 결과는 Chuuk State 해역의 간접적인 환경 지표로 간주되며, 추후 흑진주조개 모패 양성에 고려해야할 기초 자료로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

제5장 연구개발결과의 활용계획

이 연구에서 흑진주조개의 연간 번식주기 연구는 이루어지지 않았다. 따라서 개발된 흑진주조개 난. 정자 단백질 특이적인 항체를 이용한 연간 번식량 측정이 필요할 것으로 사료된다. 열대지역에 서식하는 흑진주조개는 일반적으로 연중 산란하는 이매패류로 알려져 있으며, 여러 번 산란하는 만큼 양질의 배우체 (알/정자)를 방출하는 시기가 언제인지 조사가 이루어져야 할 것이다. 이는 양질의 배우체에 의해 수정된 치패가 보다 건강한 모패가 될 수 있기 때문이다. 따라서 이 연구 수행 기간 동안 실시되었던 생화학적 조성분 분석법과 함께 개발된 항체를 이용해 모패의 연간 번식 주기를 파악한다면, 양질의 배우체를 산란하는 시기를 파악할 수 있을 것으로 사료된다.

또한 개발된 흑진주조개 난. 정자 단백질 특이적인 항체는 번식량 측정뿐만 아니라 배우자형성과정에 대한 연구에 관련하여 western blotting, ELISA 등 항원-항체 반응을 이용하는 면역학적 기술에도 활용할 수 있을 것으로 기대된다. 이는 난황단백질 (vitellin)이나 그 전구 물질 (vitellogenin)과 같은 난황형성과정에 대한 연구에 사용될 수 있을 것으로 사료된다. 마지막으로 기생충 등 질병 감염 유무 조사 데이터는 효과적인 흑진주조개 모패 관리에 중요한 자료로 사용될 것이라 기대된다.

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

연구 수행 기간 동안 본 연구팀은 French polynesia Tahiti에 위치한 IFREMER에 방문하여 흑진주조개 모패 및 치패 관리 시설을 견학 하였다. Tahiti IFREMER 연구소에서는 보다 효율적인 치패 관리를 위해서 자동화 프로그램을 사용하고 있었고, 이러한 컴퓨터 프로그램은 치패 사육에 필요한 용존산소, pH, 먹이 공급량 등 모든 요건을 한 대의 컴퓨터에 의해서 조절하여 실시간으로 모니터링 할 수 있는 기술을 이용하고 있었다. 또한 양질의 흑진주 생산을 위해 생산되는 흑진주의 모양, 색깔 등을 단계별 등급을 나누었으며, 최고 등급의 흑진주를 생산한 모패의 유전학적 정보를 찾아내고, 선발 육종 해 봄으로써 흑진주의 질을 높이기 위한 노력을 하고 있었다.

SUMMARY

Chapter 1. Introduction

A study of marine biotechnology industries on the development of black pearl from blacklip pearl oyster (BLO, *Pinctada margaritifera*) by Korea Ocean Research & Development Institute (KORDI) is investing at Chuuk State in Federate State of Micronesia (FSM) and is in an early developing phase. There is only a rearing farm trained by KORDI and Korea South Pacific Ocean Research Center (KSORC) cooperated with the government of Chuuk state. The KORDI established the KSORC at Chuuk State (N7°27', E151°53'), Federated State of Micronesia in 2000, in recognition of the role that ocean research and breeding technology play an important role in aquaculture development through collaborative relationship formed KORDI and Chuuk State. The KSORC focuses much of ocean research on coastal systems in tropical environment. Approximately 15 faculty, staffs, and students are engaged in marine science activities at the center. The KSORC faculty includes numerous researchers such as biological, chemical, and physical oceanography; genetics; aquaculture; aquatic management; and GIS-based computational modeling.

The KSORC research proceeds on two broad fronts. The first is the aquaculture study and hatchery-based breeding of the black-lip pearl oyster to produce black pearl. The second is the assessment of potential marine resources in tropical area. The current focus of KSORC's research is evaluation of the commercial and ecological importance of the larval *P. margaritifera*. Use of land-based hatchery is widespread in larval breeding and could play an important role in aquaculture. KSORC will upgrade its instrumentation to become the leading research center for the useful tropical marine resources, with plans of expanding its program into one of the most significant efforts in the world.

Pearl oysters are an important marine resource within the Indo-Pacific oceans. They are widely cultured for the production of black pearls, their flesh is eaten, and their shell, known as mother-of-pearl (MOP) is used in the ornament and shelled-button industry. The pearl oyster, like other shellfish and many other marine

animals (e.g., abalone; Tegner et al., 1996), has a long history of exploitation throughout the world. Records from the pearl industries in India and Venezuela document the discovery, harvest, and eventual over-exploitation of these populations (Romero et al., 1999). Pearl oysters have been prone to exploitation due to the considerable value of the pearls and the nacre, or "mother of pearl", of the shell, and because of the animal's sessile nature and tendency to occur in sufficient densities at shallow depths for relatively easy collection.

Farming the black-lip pearl oyster to produce pearls has been a viable industry in the tropical Pacific region since 1976. Today the industry in French Polynesia alone is worth approximately US\$140 million per year. Farming black-lip pearl oysters for pearls in the U.S. Affiliated Pacific Islands have substantial potential, and although oyster populations remain low in many areas of the region, farms currently exist in the Republic of the Marshall Islands and the Federated States of Micronesia (Haws and Ellis, 2000). Pearl farming can be done on many economic levels using various approaches ranging from family or community arrangements to commercial-scale enterprises. The high population densities, high temperature variation and high suspended matter of relatively poor quality in the nearshore shallow lagoon environment may explain the observed life history pattern observed in the oyster populations (Kimani and Mabuti, 2002). During the last three decades, there has been a rapid expansion of black pearl industries and the demand of mother-of-pearl also increased sharply. Consequently, over-exploitation of the oyster has prevailed and resulted shortage of the mother-of-pearl for pearling (Sims, 1992). Intensive studies have paid to secure black-lip pearl oysters in French Polynesia. Intes et al. (1986) estimated the density through underwater research and the echo-sounding data. There were studies such as on the oyster population and growth (Sims 1992; Pouvreau et al., 2000; Pouvreau and Prasil, 2001), larval and juvenile rearing (Southgate and beer, 1997), feeding adaptation (Loret, et al., 2000; Yukihiro et al., 1999), distribution and stocks (Zanini and Salvat, 2000). However, little scientific attentions have paid on the black-lip pearl oyster in Chuuk Lagoon except KORDI (1999). The first step to produce the black pearl is enough to secure stocks of the mother-of-oyster. *P. margaritifera* grows to a much larger size than the other species in the same genus and is able to produce larger pearls (Pouvreau et al.

2000). Currently, black pearl aquaculture plays a major economic role in French Polynesia; the annual production is six metric tons of pearls (\$US 175 million). The increase of pearl production resulted in resource depletion (Kang et al., 2005).

Oyster's reproductive effort and timing are important parameters to investigate for stock management and aquaculture. However, the investment of each individual for reproduction is not easily appreciable since the male and female gonads cannot be easily separated from the body. Currently the reproductive effort of *P. margaritifera* is estimated by the difference in weight of the individual just prior to and after spawning (Pouvreau et al., 2000), or by counting the number of gametes released after inducing animals to spawn using various chemicals or thermal shocks (Ehteshami et al., 2011). The effort of reproduction can also be estimated histologically by the determination of the surface occupied by the gonad in the visceral mass. However, the techniques described above may often underestimate the reproductive output. Therefore, the quantitative aspects of reproduction have rarely been studied.

In this study, we developed a polyclonal antibody against the BLP oyster's egg and sperm. We used this immunological probe to measure the reproductive effort of the BLP oyster in Chuuk State, Federated State of Micronesia.

Chapter 2. Previous studies

To date, the only reproductive effort studies on *P. margaritifera* were done by Pouvreau et al. (2000) who estimated the difference in weight of the individual just prior to and after spawning and Ehteshami et al. (2011) who counted the number of gametes released after inducing animals to spawn using various chemicals or thermal shocks. The reproductive cycle of *P. margaritifera* has been studied in the Red Sea (Crossland, 1957), in Australia (Acosta-Salmón and Southgate, 2005) and spermatogenesis has been studied in French Polynesia (Thielley et al., 1993).

In Korea, no study has been measured BLP oyster reproductive effort.

Recently several studies have reported quantitative measurement of reproductive effort of marine bivalves including *Crassostrea virginica* (Choi et al. 1993), *Saxidomus purpuratus* (Park et al., 2003) and Manila clam (Park and Choi 2004) using immunological technique, indicating that immunoassay is a method of choice to measure quantity of egg or sperm mass in marine bivalves.

Chapter 3. Project contents and results

3-1. Fundamental management of black-lip pearl oyster

3-1-1. Reproductive condition of *P. margaritifera* in two food regimes

Reproductive condition and spawning of black-lip pearl oyster, *P. margaritifera* was studied in two regimes of food; food-added (AF) and no food-added (NAF) using cultured oysters. Prior to conduct the experiment, 20 oysters of initial sample were collected to observe the gonadal condition. Two different regimes were assessed in the tanks supplied with 10 μ m filtered seawater for two months. In AF treatment, oysters were fed daily with algal paste of 200 cells μ l⁻¹. Gonad samples were taken from the oysters every month and processed for histological analysis. Condition index (CI) and gonadal maturity were estimated to assess reproductive status, and muscular dry weight (MDW) were calculated to assess an energy storage of oyster in each sampling date. Most of initial oysters were in fully matured. Water temperature and salinity fluctuated from 28.2 to 31.2°C and from 33.8 to 34.5 ppt, respectively; two parameters were not influenced in oyster reproduction during the study. The CI of oysters in both regimes were constant until a month, but the CI significantly decreased to the lowest level in NAF in two months later ($p < 0.05$). Oyster MDW in AF was not changed in each sampling date while the MDW decreased significantly at two months later in the NAF. Oysters in the AF were spawned in a month later while the ripe gametes of oysters were still remained in the NAF. The AF showed more suitable condition to ready for spawning than the NAF. Interestingly, oysters were not spawned artificially at one month later in the NAF because oysters were maintained their energy level in food lack condition. Our data suggested that the food

supply is very important factor to accelerate the spawning activity of *P. margaritifera* in brooding season.

3-1-2. Biochemical component of egg and sperm

In this study, the BLP oyster eggs were purified from sexually mature female oysters. A egg weight were recorded 14.31 ng and the egg was composed of 45.5 % protein, 5.8 % carbohydrate, 21.5 % lipid and 11.5 % ash. The content of lipid and protein in an egg was higher than carbohydrate, indicating that the egg ready to fertilize in water column with high buoyancy and immune activities. Lipid plays different biological roles in bivalves, physiological demands (immunity and buoyancy, etc.), and energy storage. We analysed lipid content, class and fatty acid composition in the eggs and sperm of the BLO from the nursery of KSORC. Lipid contents for egg and sperm were recorded 74.19% and 17.65% of dry weight, respectively. The fatty acid of eggs was dominant in saturates fatty acid (44.92%) whether the fatty acid of sperm was dominant in polyunsaturates (55.22%).

3-2. Development of immunological probe to assess reproductive effort of BLP oyster

3-2-1. Egg specific antibody development and reproductive effort measurement

In this study, an egg-specific polyclonal antibody was developed to quantify the reproductive effort of the BLP oyster. The BLP oyster eggs were purified from sexually mature female oysters. The eggs were composed of 45.5 % protein, 5.8 % carbohydrate, 21.5 % lipid and 11.5 % ash. BLP egg was injected to a New Zealand white rabbit over 8 week period to produce antibody. Cross-reacting antibodies in the anti-serum that weakly bound to the non-gonadal protein was removed using immunoabsorbent. The oyster egg protein-specific IgG was isolated and purified by precipitation methods. Western blotting assay showed that the purified IgG specifically bounded to the egg protein. Molecular mass of the polypeptide fraction of the oyster egg proteins was determined to be 270, 140, 100, 45, 40, and 23 kDa. Immunofluorescence staining also showed a high sensitivity specific to the egg protein. In ELISA, the antibody detected 0.14 to 18 ug/ml of egg proteins in the

oyster protein mixture. Quantity of egg estimated using ELISA was finally expressed as gonad-somatic index (GSI). ELISA indicated that *P. margaritifera* in December 2009 produced 7.3 to 26.4 % of their body weight as eggs during the ripe stage or 51,092,625 to 191,350,812 with a mean of 93,926,077 eggs per individual oyster.

3-2-2. BLP oyster's egg characterization

To characterize BLP oyster's egg protein, egg proteins of 6 bivalves including *P. margaritifera* were compared by 5 % native and 10 % SDS-PAGE. Egg proteins of 6 marine bivalves were also compared in Western blotting and ELISA using anti-BLP oyster egg specific IgG. The results showed that one major single band around 420 kDa under native PAGE was observed as a common protein in all bivalves, and 2 major bands (around 47 and 39 kDa) observed under SDS-PAGE.

3-2-3. Sperm specific antibody development and reproductive effort measurement

Polyclonal antibody specific to the sperm protein of BLP oyster was developed in this study to localize and quantify the protein. To obtain mature sperm, ripe male BLP oysters ranging from 120 to 140 mm in shell length (the longest axis of the shell) were collected from Chuuk State in December 2008. The testis containing ripe sperm were first excised and placed on a petri-dish and squeezed to extract the sperm. The crude sperm fluid was sieved through 40 and 100 μm meshes to remove the debris. To develop antibody, the purified sperm was homogenized using an ultrasonifier and the protein level adjusted 1 mg/ml to be served as antigens. After 12 weeks period of immunization, specificity of the rabbit anti-BLP oyster sperm protein serum developed was tested using ELISA and Western blotting. Western blot assay showed that the rabbit antiserum developed in this study cross-reacts with the somatic tissue including mantle and gills. Consequently, the cross-reaction IgG in the antiserum was removed using an immunoadsorbent prepared by polymerizing the somatic tissue proteins. The oyster sperm protein specific IgG was isolated and purified by precipitation methods. Western blotting result showed that the purified IgG specifically binds to sperm protein. Molecular mass of the polypeptide fraction of the oyster sperm proteins was determined to be 27.5 kDa. In ELISA, the rabbit anti-BLP oyster sperm IgG detected 0.3-10 μg of BLP oyster sperm protein,

indicating that the antibody is highly sensitive to detect minute quantity of the sperm protein. Quantity of sperm estimated using ELISA was finally performed as gonad-somatic index (GSI). ELISA indicated that *P. margaritifera* in December 2009 produced 8.5 % of their body weight as sperms on ripe stage.

3-2-4. Parasite infection diagnosis

General health condition of BLP oysters collected from Chuuk State in 2009 and Tahiti in 2010 were examined in this study using histology. The digestive tube atrophy and presence of pathogens were examined using a light microscope. Infection with the protozoan parasite, *Perkinsus olseni* was also examined using PCR.

The results showed that Tahiti BLP oyster had the highest score of DTA. The parasite which had the highest frequency in both locations was the trematode. *Perkinsus* infection could not be detected by histological and molecular method. Although trematod infection was observed from BLP oysters from Tahiti and Chuuk state, the impact of this parasite was not clearly understood and need to be studied further.

3-3. Management of pearl oyster spat

The successful development of nursery-based culture techniques for *P. margaritifera* juveniles has reported due to the increasing need to produce more pearl oysters. So far, no studies have been conducted on larval rearing, settlement and early growth of the pearl oyster in Micronesia. The purpose of this study is to assess the larval rearing and settlement of *P. margaritifera* juveniles and spat using nursery-based culture system. In addition, early spat growth of the pearl oyster in the same area also reports in this study.

The maximum number of eggs were spawned per individual was 24×10^6 eggs with a mean of 12×10^6 eggs. Mean egg diameter was about $50.1 \pm 2.1 \mu\text{m}$ (\pm s.d., $n=60$) during the spawning. Oyster larvae reached for settlement after 18 days rearing in temperature of 28-30°C with live algal feed. The survival rate of larvae was about 67% after three days of hatching. Survival from fertilization to settlement stage was low which was around 0.7 %. After one month of settlement, spats had a mean shell

length of 3.2 ± 0.2 mm and a mean total weight of 2.2 ± 0.9 mg. In the lagoon, the water temperature ranged from 28.1 in February to 29.6 centi-degree in June. After rearing for 5 months in different culture areas, spats in on-going ground culture area had highest growth with a mean total weight of 104 ± 35.2 mg. The seed and spat of *P. margaritifera* were successfully cultured in the hatchery and long-line culture ground. However, poor larval survival seems to be the limiting factors to support a pearl aquaculture industry in FSM. In the current and future studies, firstly we assess to develop the efficient live feed and the program of health management in the hatchery and on-going long-line haging system for increasing survival of seed and spat. Secondly, we also assess to develop the technique for mass production of black pearl in Chuuk state, FSM as the high economical contribution in Chuuk state.

3-4. Economics of patented technology to make polyclonal antibody

Technical value on the patented technology for development of antibody of specific protein of *P. margaritifera*, was evaluated using a KORDI patent "A method on quantitative assessment on the reproductive effort of black-lip pearl oyster using egg extract-specific antibody (patent No. 10-0947742)" at a base period of 31st March 2010 by Nam & Nam World Patent & Law Firm. Analysts in Nam & Nam World Patent & Law Firm assessed in the fields of current/future economy, industrial market, technical trend and claim trend, and then they analysed its potential in the whole market. Analysis method was applied using income approach. Optimal technical value was assessed by "Relief from Royalty" and "Relief from Benefit". The value was assessed 3.8 million USD according to the Relief from benefit while the value was assessed 717,000 USD according to the Relief from Royalty.

The technology was significant in this field since there were no similar patents in the world in previous reports, and was state-of-art in the field of nursery-based pearl production industry using good quality of mother of blacklip pearl oyster.

Chapter 4. Goal fulfillment and contributions to related field

The objective of the study was to purify the BLP oyster eggs, to analyze biochemical composition of the BLP oyster eggs and to develop BLP oyster-egg specific antibody and it was successfully fulfilled. At the first year, we submitted a patent for technique to measure the BLP oyster using the polyclonal rabbit anti-egg protein specific IgG.

In the second year, we successfully measured the reproductive effort of the female BLP oysters from Chuuk State using the BLP oyster egg specific IgG developed in the first year. We confirmed that the BLP oyster IgG was specific to the egg protein using Western blotting and ELISA. Finally, we characterized the BLP oyster egg protein properties using electrophoresis, Western blotting and N-terminal amino acid sequence.

In the third year, BLP oyster sperm protein-specific IgG was successfully developed and applied to measure reproductive effort of male BLP oysters. General health condition of BLP oysters supplied from Tahiti and Chuuk State was also examined using histology and molecular technique.

Chapter 5. Application and further work

Understanding annual gametogenesis of BLP oysters in Chuuk State is crucial in BLP oyster larvae in hatchery condition. It is believed that the immunological technique developed in this study helps to identify spawning season of the BLP oysters as well as the quantity of eggs or sperm produced by the oysters.

목 차

제1장 연구개발과제의 개요	1
제1절 연구개발 사업 발굴의 개요	3
1. 사업발굴의 개요	3
2. 연구개발을 위한 기술의 일반 현황	3
제2절 연구개발 사업 발굴의 추진 경위	4
1. 국제공동연구 사업의 추진 주체	4
2. 국제공동연구 사업의 추진경위	5
제3절 연구개발의 필요성	6
1. 과학기술적 측면	6
2. 경제·산업적 측면	7
3. 사회·문화적 측면	8
제2장 국내외 기술개발 현황	9
제1절 국내 기술개발 현황	11
1. 기술개발 현황	11
2. 국내 이매패류 항체 및 번식량 기술개발 현황	12
가. ELISA를 이용한 번식량의 정량적 측정	12
나. Perkinsus의 조직병리학적 영향 구명	13
다. 바지락포자충 진단을 위한 PCR 및 Anti-Perkinsus IgG 개발	13
라. 강굴의 번식량 측정에 관한 연구	13
제2절 국외 기술개발 현황	14
제3장 연구개발 수행 내용 및 결과	15
제1절 흑진주조개 모패 관리	17
1. 흑진주조개의 건강성 조사	17
가. 서론	17
나. 재료 및 방법	17

다. 결과 및 고찰	20
2. 흑진주조개 모패가 생산한 알과 정자의 생화학적 특성 조사	26
가. 서론	26
나. 재료 및 방법	26
다. 결과 및 고찰	30
제2절 흑진주조개 배우체의 항체개발 및 번식량 측정	33
1. 알과 정자의 항체개발	33
가. 서론	33
나. 재료 및 방법	34
다. 결과 및 고찰	41
2. 개발된 항체를 이용한 흑진주조개의 번식량 측정	45
가. 서론	45
나. 재료 및 방법	46
다. 결과 및 고찰	51
3. 마이크로네시아와 폴리네시아 흑진주조개의 번식량 비교	65
가. Chuuk State와 Tahiti에서 채집된 흑진주조개 암컷의 번식량 비교	65
나. 흑진주조개 수컷의 성성숙 단계	66
다. 항체면역효소법(ELISA)을 이용한 번식량(reproductive effort) 측정	67
제3절 흑진주조개 모패의 원생생물 질병 현황	68
1. 두 지역(Chuuk과 Tahiti)의 흑진주조개 질병 감염 유무 진단	68
가. 조직학적 관찰을 통한 기생충 감염 유무 관찰	68
나. 소화맹낭 위축도(Digestive Tube Atrophy) 관찰	68
다. PCR을 이용한 DERM disease, Perkinsus olseni 감염 진단	69
라. 질병 검출 결과	70
마. PCR을 이용한 Perkinsus 진단	72
제4절 흑진주조개 유생 관리	74
1. 흑진주조개 유생의 건강성 조사 및 치패 생산	74
가. 서론	74
나. 재료 및 방법	76
다. 결과 및 고찰	82

제5절	혁신주조개 항체개발의 기술가치	97
1.	기술가치 분석 결과 요약	97
가.	평가개요	97
나.	평가방법 및 절차	97
다.	평가금액	97
라.	기술가치 평가의 전제 및 제한조건	98
마.	활용정보	99
바.	평가방법 및 절차	99
2.	가치평가 의견 요약	100
가.	권리성	100
나.	기술성	100
나.	시장성	100
3.	기술 및 권리 분석	101
가.	기술성 분석	101
나.	기술동향	101
다.	권리성 분석	103
라.	기술성 분석	106
마.	기술성 분석 종합의견	118
제4장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	119
제1절	혁신주조개 항체개발 연구의 학문적 의의	121
제2절	혁신주조개 항체개발에 따른 관련 산업 시장분석	122
1.	시장성 분석	122
가.	산업동향	122
나.	시장동향	123
다.	기업동향	127
라.	수요 예측	129
2.	종합적인 관련 분야와의 경제적 기여도 분석	133
제5장	연구개발결과의 활용계획	135
제6장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	139
제1절	폴리네시아 프랑스해양연구소(IFREMER)	141
제2절	하와이 태평양연안자원센터(PACRC)	144
제7장	참고문헌	149

그림 목 차

그림 1-1-1. 흑진주 생산의 연간 생산량 및 중요성	3
그림 1-2-1. 한·남태평양해양연구센터의 기능	4
그림 1-2-2. 국제공동연구 사업의 추진경위	5
그림 3-1-1. 남태평양 마이크로네시아 연방국 축주에 위치한 흑진주조개의 채집 장소 및 실험지역	18
그림 3-1-2. 실험을 위해 사용된 개체들과 수조 및 여과기의 모습	19
그림 3-1-3. 실험에 사용된 feeding (A)과 non-feeding (B) 실험구 내 개체들의 모습	19
그림 3-1-4. 흑진주조개, <i>P. margaritifera</i> 의 외부 및 내부 형태와 개각 후 육질과 패각으로 분리한 모습	20
그림 3-1-5. 실험기간 동안의 수온과 염분의 변화(28.2-31.2°C, 33.8-34.5 ppt)	21
그림 3-1-6. 흑진주조개 난소의 생식소 발달 구분. (A) 발달기, (B) 성숙기, (C) 산란/부분산란기, (D) 소모기. Scale bar: 100 μ m.	23
그림 3-1-7. 실험 전 후의 흑진주조개 난소의 생식소 상태	24
그림 3-1-8. 실험 전 후의 흑진주조개의 건강도의 변화	24
그림 3-1-9. 실험 전 후의 흑진주조개 근육무게를 통한 에너지 저장도 변화	25
그림 3-1-10. 난소에서 정제된 알과 조직상의 난소 사진 및 흑진주조개의 해부도	30
그림 3-2-1. 혈구응집 반응의 순서도	37
그림 3-2-2. 항원-항체 혈구응집반응의 모습	41
그림 3-2-3. 난 단백질의 분자량적 특성과 난 단백질 이외에 기타 조직과의 교차반응 유무를 알아보기 위해 실시한 western blotting의 교차반응 제거 전, 후 분자량 모습 (A) 교차반응 제거 전, (B) 교차반응 제거 후, 1차 항체: 6.4 μ g/ml (A, antiserum), 3.1 μ g/ml (B, anti-BLP oyster egg protein specific IgG), 2차 항체: 0.3 μ g/ml. Lane 1: Molecular weight marker, Lane 2: 흑진주조개 알 추출물, Lane 3: 흑진주조개 육질 추출물, Lane 4: 흑진주조개 소화맹낭 추출물, Lane 5: 흑진주조개 정소 추출물	42
그림 3-2-4. 교차반응 제거 전, 후(A, B)의 ELISA 분석 결과	43
그림 3-2-5. 흑진주조개의 조직 슬라이드 상에서 개발된 항체가 난 단백질에 특이적으로 반응하는지 알아보기 위한 면역형광염색 실시 결과. (A) negative control, (B) positive control. Scale bar: 100 μ m	43

- 그림 3-2-6. 흑진주조개 정자에 대한 항체의 Western blotting 결과. (A) 교차반응 제거 전, (B) 교차반응 제거 후, 1차 항체: 42 $\mu\text{g/ml}$ (A, antiserum), 4.5 $\mu\text{g/ml}$ (B, anti-BLP oyster sperm protein specific IgG), 2차 항체: 1 $\mu\text{g/ml}$. (A) Lane 1: 흑진주조개 정자 추출물, Lane 2: molecular weight marker, Lane 3: 흑진주조개 소화맹낭 추출물, Lane 4: 흑진주조개 외투막 추출물, Lane 5: 흑진주조개 족 추출물, Lane 6: 흑진주조개 아가미 추출물, Lane 7: 흑진주조개 패각근 추출물. (B) Lane 1: molecular weight marker, Lane 2: 흑진주조개 정자 추출물, Lane 3: 흑진주조개 알 추출물, Lane 4: 흑진주조개 소화맹낭 추출물, Lane 5: 흑진주조개 외투막 추출물, Lane 6: 흑진주조개 족 추출물, Lane 7: 흑진주조개 아가미 추출물 44
- 그림 3-2-7. ELISA를 이용한 흑진주조개 정자 단백질의 특이적인 항체 민감도 측정. (A) 교차반응 제거 전, (B) 교차반응 제거 후, 1차 항체: 12.8 $\mu\text{g/ml}$ (A, antiserum), 6 $\mu\text{g/ml}$ (B, anti-BLP oyster egg protein specific IgG), 2차 항체: 1 $\mu\text{g/ml}$ 45
- 그림 3-2-8. 흑진주조개 난소의 발달 단계. (A) 발달기, (B) 성숙기, (C) 산란/부분산란기, (D) 소모기. Scale bar: 100 μm 48
- 그림 3-2-9. 6종의 해산 이매패류 난 단백질을 native-PAGE를 수행하여 구성 단백질의 크기를 확인한 결과. Lane 1: marker, Lane 2: 흑진주조개 알 추출물, Lane 3: 참굴 알 추출물, Lane 4: 강굴 알 추출물, Lane 5: 가시굴 알 추출물, Lane 6: 담치 알 추출물, Lane 7: 바지락 알 추출물 52
- 그림 3-2-10. 6종의 해산 이매패류 난 단백질을 non-reducing과 reducing조건하에서 수행하여 구성 단백질의 크기를 확인한 결과. (A), non-reducing 조건, (B), reducing 조건. Lane 1: marker, Lane 2: 흑진주조개 알 추출물, Lane 3: 참굴 알 추출물, Lane 4: 강굴 알 추출물, Lane 5: 가시굴 알 추출물, Lane 6: 담치 알 추출물, Lane 7: 바지락 알 추출물 53
- 그림 3-2-11. 6종의 해산 이매패류 난 단백질을 reducing 조건에서 실시한 western blotting 결과. Lane 1: marker, Lane 2: 흑진주조개 알 추출물, Lane 3: 참굴 알 추출물, Lane 4: 강굴 알 추출물, Lane 5: 가시굴 알 추출물, Lane 6: 담치 알 추출물, Lane 7: 바지락 알 추출물 53
- 그림 3-2-12. Indirect-ELISA의 결과를 통한 개발된 항체와 흑진주조개 알 단백질과의 반응 54
- 그림 3-2-13. 번식량 측정을 위해 채집한 흑진주조개의 개체들의 크기 분포 58
- 그림 3-2-14. 번식량 측정용 흑진주조개 암컷 개체들의 크기 분포 58
- 그림 3-2-15. 번식량 측정을 위해 사용된 흑진주조개 암컷의 생식소 발달 59

그림 3-2-16. 생식소 성숙지수를 이용해 측정한 흑진주조개의 번식량	59
그림 3-2-17. 흑진주조개의 조직 항원 단백질을 이용한 분리된 항혈청의 특이성을 확인한 western blotting 결과. (A) 교차반응 제거 전, (B) 교차반응 제거 후, 1차 항체: 42 µg/ml (A, antiserum), 4.5 µg/ml (B, anti-BLP oyster sperm protein specific IgG), 2차 항체: 1 µg/ml. (A) Lane 1: 흑진주조개 정자 추출물, Lane 2: molecular weight marker, Lane 3: 흑진주조개 소화맹낭 추출물, Lane 4: 흑진주조개 외투막 추출물, Lane 5: 흑진주조개 족 추출물, Lane 6: 흑진주조개 아가미 추출물, Lane 7: 흑진주조개 패각근 추출물. (B) Lane 1: molecular weight marker, Lane 2: 흑진주조개 정자 추출물, Lane 3: 흑진주조개 알 추출물, Lane 4: 흑진주조개 소화맹낭 추출물, Lane 5: 흑진주조개 외투막 추출물, Lane 6: 흑진주조개 족 추출물, Lane 7: 흑진주조개 아가미 추출물	62
그림 3-2-18. Indirect ELISA를 이용한 정자항체 민감도 측정 결과. (A) 교차반응 제거 전, (B) 교차반응 제거 후. 1차 항체: 12.8 µg/ml (A, antiserum), 6 µg/ml (B, anti-BLP oyster egg protein specific IgG), 2차 항체: 1 µg/ml	63
그림 3-2-19. 마이크로네시아와 폴리네시아산 흑진주조개의 성성숙 지수의 비교	66
그림 3-2-20. 마이크로네시아와 폴리네시아산 흑진주조개 수컷의 성성숙 지수의 비교 ..	66
그림 3-2-21. 마이크로네시아와 폴리네시아에 서식하는 흑진주조개 암컷의 발달단계에 따른 번식량 비교	67
그림 3-3-1. 흑진주조개의 소화맹낭 위축도의 현미경 상 단계(Kang et al. 2010)	69
그림 3-3-2. 현미경 상 조직슬라이드 관찰을 통한 기생충들의 사진. A~B: Cestode, C~D: Copepode, E: Gregarine (*), F: Trematode. Scale bar: 100 µm	71
그림 3-3-3. 현미경 상 조직슬라이드 관찰을 통한 미 분류된 기생충들의 사진. Scale bar: 100 µm	72
그림 3-3-4. PCR 기법을 이용한 분자생물학적 <i>Perkinsus</i> 감염 여부 진단. Lane 1: 100 bp DNA ladder (bioneer), Lane 2: negative control (water), Lane 3: positive control (<i>P. olseni</i> 에 감염된 바지락), Lane 4~7: 흑진주조개 아가미(Chuuk) State, Lane 8~10: 흑진주조개 소화기관(Chuuk), Lane 11~14: 흑진주조개 아가미(Tahiti), Lane 15~17: 흑진주조개 소화기관(Tahiti)	73
그림 3-4-1. 실내 먹이생물 배양 모습	78
그림 3-4-2. 산란유도에 사용된 흑진주조개 모패의 크기분포	79
그림 3-4-3. 산란유도를 위한 모패 간출자극 및 자외선살균해수 유수	83

그림 3-4-4. 치패생산을 위한 시설 및 각 과정별 그림	84
그림 3-4-5. 수정난의 세포분열과 초기유생발달 모습	88
그림 3-4-6. 사육 일수에 따른 유생의 성장 및 크기	90
그림 3-4-7. 사각평면형 채묘기	91
그림 3-4-8. 사각박스형 채묘기	92
그림 3-4-9. 채묘기에 부착한 치패의 모습	92
그림 3-4-10. 네 지역에서 서로 다르게 성장한 치패들의 모습	93
그림 3-4-11. 네 지역에서 5개월간 양성한 치패들의 크기 변화	94
그림 3-4-12. 네 지역에서 5개월간 양성한 치패들의 중량 변화	94
그림 3-4-13. 발달단계별 치패들의 지방산(포화, 단일 및 다불포화지방산) 변화	95
그림 3-5-1. 평가 방법 및 절차	99
그림 3-5-2. 한국내 연도별 출원동향	108
그림 3-5-3 한국내 주요 출원인 건수	109
그림 3-5-4 한국내 출원건의 기술분류(IPC)	109
그림 3-5-5 해외출원 누적건수	110
그림 3-5-6 해외국가의 연도별 출원동향	110
그림 4-2-1 산업연관체계	122
그림 4-2-2 국내 샴푸 시장 규모	126
그림 4-2-3 국내 프리미엄 샴푸 시장점유율	126
그림 4-2-4 국내 두피 시장 현황	131

표 목 차

표 1-3-1. 세계 항체 시장의 성장세 (단위: 달러)	8
표 3-1-1. 서로 다른 환경에서의 플랑크톤 변화	21
표 3-1-2. 실험에 사용된 흑진주조개 모패의 생물학적 지수. AF: 급이군, NAF: 미급이군, N: 실험 개체수, SH: 각장, SL: 각고, TW: 총중량	22
표 3-1-3. 알 계수 및 무게 측정 결과	30
표 3-1-4. 알 하나의 무게 및 알이 가지는 단백질, 지방, 탄수화물 함량의 비교	31
표 3-1-5. 성숙한 흑진주조개 알 및 정자에 포함된 지방산 함량	32
표 3-2-1. 항원-항체 반응을 위한 면역학적 실험과정	36
표 3-2-2. 이 연구에서 사용한 실험생물 이용, 항체 형성과정	39
표 3-2-3. 흑진주조개 알의 생화학적인 특성	41
표 3-2-4. 흑진주조개 개체들의 배우자형성과정 및 발달단계의 정성적인 관찰 기준	47
표 3-2-5. 흑진주조개 알 단백질 구성요소 분자량 및 다른 이매패류와의 비교	56
표 3-2-6. 흑진주조개 알 특이적인 단백질 내 아미노산 비교	57
표 3-2-7. 서로 다른 이매패류의 크기, 건중량 및 번식량 비교. SL: 각고, TDWT: 건조육중량, EW: 알 무게	61
표 3-3-1. 흑진주조개의 소화맹낭 위축도 관찰 단계(Kang et al. 2010)	68
표 3-3-2. 흑진주조개 <i>Perkinsus</i> 감염 여부 파악을 위한 유전자 프라이머 제작	70
표 3-3-3. 마이크로네시아와 폴리네시아 흑진주조개의 소화맹낭 지수 및 기생충 감염 빈도	70
표 3-4-1. 수정난의 발생단계별 시간, 크기 및 개체수	87
표 3-4-2. 유생 사육일에 따른 수조 내 환경변화	89
표 3-4-3. 유생 사육일수에 따른 먹이생물의 종류와 급이량	90
표 3-4-4. 발달단계별 치패들의 지방산 변화	96
표 3-5-1 평가대상특허	101
표 3-5-2 분석 기간	107
표 3-5-3 검색 키워드	107

표 3-5-4 해외국가별 주요 출원인	111
표 3-5-5 기술분류(IPC) 분석	112
표 3-5-6 평가대상기술 관련 중요특허 목록	112
표 3-5-7 대상기술 관련 중요특허 분석	114
표 4-2-1 2005년 1/4분기 진주 수입 상대국 현황	125
표 4-2-2 국내 샴푸 시장 규모	126
표 4-2-3 국내 프리미엄 샴푸 시장점유율	126
표 4-2-4 2007년 기준 진주 수입 상위 30위 도소매업체	129
표 4-2-5 국내 진주 수입 연도별 통계	130
표 4-2-6 평가대상기술 보유 기업의 매출액 추정	132
표 4-2-7 평가대상기술 보유 기업의 매출액 추정	133

List of Figures

Figure 1-1-1.	3
Figure 1-2-1. Function of Korea South Pacific Ocean Research Center	4
Figure 1-2-2. Promoting details of an international collaboration study	5
Figure 3-1-1. Study site at Chuuk State in Federated States of Micronesia	18
Figure 3-1-2. Rearing tanks and filter system for growing black pearl oyster	19
Figure 3-1-3. Black pearl oysters (BLP) in feeding (A) and non-feeding (B) experiments	19
Figure 3-1-4. External and internal morphology of black pearl oyster, <i>P. margaritifera</i>	20
Figure 3-1-5. Water temperature and salinity fluctuated from 28.2 to 31.2°C and from 33.8 to 34.5 ppt, respectively	21
Figure 3-1-6. Photomicrographs of <i>P. margaritifera</i> ovary. (A) Development stage, (B) Ripe stage, (C) Spawning/partly spawned stage, (D) Spent stage	23
Figure 3-1-7. Ovarian status of the oyster before and after experiments	24
Figure 3-1-8. Variation of condition index before and after experiments	24
Figure 3-1-9. Variation of muscular condition index as an energy storage index before and after experiments	25
Figure 3-1-10. Purified eggs, microscopic image of ripe ovary and morphology of <i>P.</i> <i>margaritifera</i>	30
Figure 3-2-1. Steps involved in haemagglutination test	37
Figure 3-2-2. Hemmagglutination assay result	41
Figure 3-2-3. Confirmation of antiserum and antibody specificity using western blotting. Each types of proteins (2 µg) were separated by 10 % SDS-PAGE, and transferred PVDF membrane.(A) Before removed cross-reaction, (B) After removed cross-reaction, Primary antibody: 6.4 µg/ml (A, antiserum), 3.1 µg/ml (B, anti-BLP oyster egg protein specific IgG), Secondary antibody: 0.3 µg/ml. Lane 1: Molecular weight marker, Lane 2: BLP oyster eggs extract, Lane 3: BLP oyster somatic tissue extract, Lane 4: BLP oyster digestive gland extract, Lane 5: BLP oyster male gonad extract	42
Figure 3-2-4. Titration curve of the antigen-antibody reaction in ELISA	43

- Figure 3-2-5. Localization of *P. margaritifera* egg protein using anti-BLP oyster egg protein specific IgG applied on matured female using immunofluorescence assay. (A) negative control, (B) positive control. Scale bar: 100 μm 43
- Figure 3-2-6. Western blotting result of Rabbit anti-*P. margaritifera* sperm protein IgG and the antigen. (A) Before removed cross-reaction, (B) After removed cross-reaction, Primary antibody: 42 $\mu\text{g/ml}$ (A, antiserum), 4.5 $\mu\text{g/ml}$ (B, anti-BLP oyster sperm protein specific IgG), Secondary antibody: 1 $\mu\text{g/ml}$. (A) Lane 1: BLP oyster sperm extract, Lane 2: molecular weight marker, Lane 3: BLP oyster digestive gland extract, Lane 4: BLP oyster mantle extract, Lane 5: BLP oyster foot extract, Lane 6: BLP oyster gill extract, Lane 7: BLP oyster adductor muscle extract. (B) Lane 1: molecular weight marker, Lane 2: BLP oyster sperm extract, Lane 3: BLP oyster egg extract, Lane 4: BLP oyster digestive gland extract, Lane 5: BLP oyster mantle extract, Lane 6: BLP oyster foot extract, Lane 7: BLP oyster gill extract 44
- Figure 3-2-7. ESLIA test showing rabbit anti-*P. margaritifera* sperm protein IgG and various proteins including the BLP sperm protein. (A) Before removed cross-reaction, (B) After removed cross-reaction, Primary antibody: 12.8 $\mu\text{g/ml}$ (A, antiserum), 6 $\mu\text{g/ml}$ (B, anti-BLP oyster egg protein specific IgG), Secondary antibody: 1 $\mu\text{g/ml}$ 45
- Figure 3-2-8. Photomicrographs of *P. margaritifera* ovary. (A) Development stage, (B) Ripe stage, (C) Spawning/partly spawned stage, (D) Spent stage 48
- Figure 3-2-9. Comparison of molecular sizes of different marine bivalve eggs. Lane 1: molecular weight marker, Lane 2: *P. margaritifera* egg extract, Lane 3: *Crassostrea gigas* egg extract, Lane 4: *C. ariakensis* egg extract, Lane 5: *Saccostrea kegaki* egg extract, Lane 6: *Mytilus edulis galloprovincialis* egg extract, Lane 7: *Ruditapes philippinarum* egg extract 52
- Figure 3-2-10. Comparison of molecular sizes of different marine bivalve eggs. (A), non-reducing natural condition, (B), reducing condition. Lane 1: molecular weight marker, Lane 2: *P. margaritifera* egg extract, Lane 3: *C. gigas* egg extract, Lane 4: *C. ariakensis* egg extract, Lane 5: *S. kegaki* egg extract, Lane 6: *M. edulis* egg extract, Lane 7: *R. philippinarum* egg extract 53
- Figure 3-2-11. Western blotting results showing the antigen-antibody reaction. Each types of marine bivalve egg proteins (2 μg) were separated by 10 % SDS-PAGE, and transferred on PVDF membrane. Primary antibody: 3.1 $\mu\text{g/ml}$, Secondary

antibody: 0.3 µg/ml. (A) non-reducing condition, (B) reducing condition. Lane 1: molecular weight marker, Lane 2: *P. margaritifera* egg extract, Lane 3: *C. gigas* egg extract, Lane 4: *C. ariakensis* egg extract, Lane 5: *S. kegaki* egg extract, Lane 6: *M. edulis* egg extract, Lane 7: *R. philippinarum* egg extract 53

Figure 3-2-12. ELISA titration curve used in the quantification of the BLP oyster egg protein. Each types of marine bivalve egg proteins were 2 fold diluted from 20 µg/ml and coated to 96-well plate. and then blocked by 1 % BSA in PBS-T. Primary antibody: 3.5 µg/ml, Secondary antibody: 1 µg/ml 54

Figure 3-2-13. Size frequency distribution of BLP oysters used in the analysis 58

Figure 3-2-14. Size frequency distribution of female BLP oysters used in the analysis 58

Figure 3-2-15. Gonad somatic index (%) of female BLP oysters in various reproductive 59

Figure 3-2-16. Fecundity of female BLP oysters estimated from GSI 59

Figure 3-2-17. Western blotting result of Rabbit anti-*P. margaritifera* sperm protein IgG and the antigen. (A) Before removed cross-reaction, (B) After removed cross-reaction, Primary antibody: 42 µg/ml (A, antiserum), 4.5 µg/ml (B, anti-BLP oyster sperm protein specific IgG), Secondary antibody: 1 µg/ml. (A) Lane 1: BLP oyster sperm extract, Lane 2: molecular weight marker, Lane 3: BLP oyster digestive gland extract, Lane 4: BLP oyster mantle extract, Lane 5: BLP oyster foot extract, Lane 6: BLP oyster gill extract, Lane 7: BLP oyster adductor muscle extract. (B) Lane 1: molecular weight marker, Lane 2: BLP oyster sperm extract, Lane 3: BLP oyster egg extract, Lane 4: BLP oyster digestive gland extract, Lane 5: BLP oyster mantle extract, Lane 6: BLP oyster foot extract, Lane 7: BLP oyster gill extract 62

Figure 3-2-18. ESLIA test showing rabbit anti-*P. margaritifera* sperm protein IgG and various proteins including the BLP sperm protein. (A) Before removed cross-reaction, (B) After removed cross-reaction, Primary antibody: 12.8 µg/ml (A, antiserum), 6 µg/ml (B, anti-BLP oyster egg protein specific IgG), Secondary antibody: 1 µg/ml 63

Figure 3-2-19. Gonad somatic index (%) of female BLP oysters collected from Chuuk and Tahiti 66

Figure 3-2-20. Percentage of each reproductive stages of male BLP oysters from Chuuk State and Tahiti 66

Figure 3-2-21. Gonad-Somatic Index (GSI) of female BLP oysters in various reproductive stages 67

Figure 3-3-1. Photomicrographs of the digestive tubule atrophy (DTA) of <i>P. margaritifera</i> (Kang et al. 2010). (A) Score 1 of DTA, (B) Score 2 of DTA, (C) Score 3 of DTA, (D) Score 4 of DTA. Scale bar: 100 μm	69
Figure 3-3-2. Histological sections of BLP oysters infected by numerous parasites (H&E). A~B: Cestode, C~D: Copepode, E: Gregarine (*), F: Trematode. Scale bar: 100 μm	71
Figure 3-3-3. Histological sections of BLP oyster exhibiting unidentified parasites (A~F *). Scale bar: 100 μm	72
Figure 3-3-4. PCR diagnosis of Perkinsus of BLP oyster. Lane 1: 100 bp DNA ladder (bioneer), Lane 2: negative control (water), Lane 3: positive control (<i>P. olseni</i> infected Manila clam), Lane 4~7: gill of BLP oyster which collected from Chuuk State, Lane 8~10: visceral mass of BLP oyster which collected from Chuuk State, Lane 11~14: gill of BLP oyster which collected from Tahiti, Lane 15~17: visceral mass of BLP oyster which collected from Tahiti	73
Figure 3-4-1. Phytoplankton culture in clean room	78
Figure 3-4-2. Size distribution of mother of pearl oyster	79
Figure 3-4-3. Spawning induction of mother pearl oyster using air exposure and ultra violet treated seawater	83
Figure 3-4-4. Procedure on spat production of black pearl oyster in FSM.	84
Figure 3-4-5. Cell division of fertilized eggs and early development of the juvenile	88
Figure 3-4-6. Daily growth and size of the juvenile and spat	90
Figure 3-4-7. Rectangular plane type of seed collector is located in rearing tank	91
Figure 3-4-8. Rectangular box type of seed collector is located in rearing tank	92
Figure 3-4-9. Spats on the collectors	92
Figure 3-4-10. Different size of the spats collected from different sites	93
Figure 3-4-11. Size increment of the spats for 5 months collected from different sites	94
Figure 3-4-12. Weight increment of the spats for 5 months collected from different sites	94
Figure 3-4-13. Fatty acid (i.e. saturated, mono- and polyunsaturated fatty acid) composition from fertilized egg to the spats	95
Figure 3-5-1. Method of evaluation and process	99
Figure 3-5-2. Annual application trend in Korea	108

Figure 3-5-3. Number of important applicants in Korea	109
Figure 3-5-4. IPC of domestic application	109
Figure 3-5-5. Cumulative number of international application	110
Figure 3-5-6. Annual application trend in foreign countries	110
Figure 4-2-1. A system related industries	122
Figure 4-2-2. Industrial scale of shampoo industry	126
Figure 4-2-3. Domestic possession rate of premium shampoo industry	126
Figure 4-2-4. Industrial status of domestic head skin care	131

List of Tables

Table 1-3-1. World economics of antibody market	8
Table 3-1-1. Plankton cell densities of the water column in two regimes	21
Table 3-1-2. Biometric data of broodstock used for this study. AF: artificial feed, NAF: non-artificial feed, N: number of specimen, SH: shell height, SL: shell length, TW: total weight	22
Table 3-1-3. Results of egg counting and weighting	30
Table 3-1-4. Comparison of a egg weight and biochemical composition (protein, lipid and carbohydrate) in different bivalve species	31
Table 3-1-5. Fatty acid composition of black-lip pearl oyster egg and sperm. ND : not detected, Others1 : 20:0, 22:0, Others2 : 16:1(n-5), 18:1(n-5), 20:1(n-9), 22:1(n-11), 22:1(n-9), Others3 : 16:2(n-4), 18:2, 20:2(n-6), 20:3, Branched & Odd chain : 15:0i, 15:0a, 15:0?, 16:0br, 17:0i, 17:0a, 17:1, 17:0?, 18:0br, 21:0?	32
Table 3-2-1. Immunization procedure	36
Table 3-2-2. Rabbit immunization protocol used in this study	39
Table 3-2-3. Biochemical composition of <i>P. margaritifera</i> eggs	41
Table 3-2-4. Gametogenesis of <i>P. margaritifera</i> used in this study. Each gametogenic stage as referred from Kang et al. (2005) and Saucedo and Southgate (2008)	47
Table 3-2-5. Determination of molecular weight of egg protein fraction in marine bivalves by SDS-PAGE or western blotting in previous studies	56
Table 3-2-6. N-terminal amino-acid sequencing result of BLP oyster egg protein	57
Table 3-2-7. Fecundity of female BLP oyster and other marine bivalves. SL: shell length, TDWT: tissue dry weight, EW: egg weight	61
Table 3-3-1. Semi-quantitative scale for digestive tubule atrophy	68
Table 3-3-2. List of oligonucleotide sequences and thermal cycle parameters used in this study	70
Table 3-3-3. Digestive tubule atrophy and prevalence (%) of parasites in BLP oysters from two sites	70
Table 3-4-1. Developmental stages, size and number of individuals of the spat	87

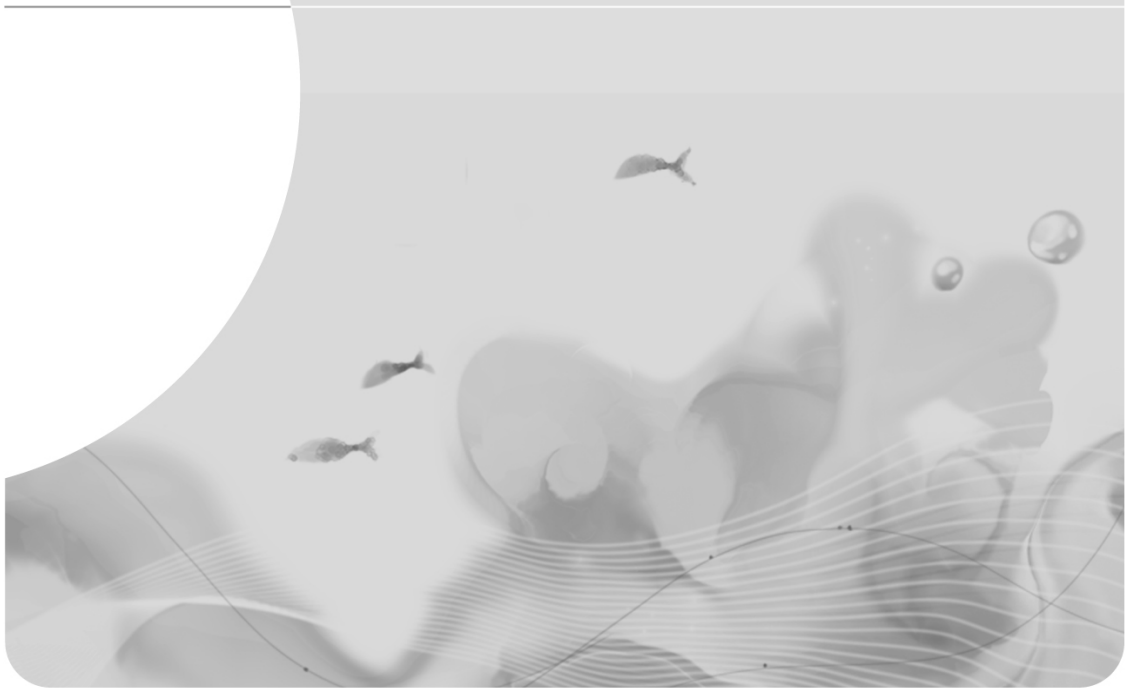
Table 3-4-2. Environmental changes in rearing tanks by elapse time	89
Table 3-4-3. Feeds and feeding amount in rearing tanks by elapse time	90
Table 3-4-4. Fatty acid composition on developmental stages of black-lip pearl oyster. FE: fertilized egg, H: hatching stage, MU: mid-umbone stage, LU: late-umbone stage, PV: pediveliger stage, SP: spat.	96
Table 3-5-1. Evaluated target patents	101
Table 3-5-2. Analysis duration	107
Table 3-5-3. Keywords search	107
Table 3-5-4. Important applicants in foreign countries	111
Table 3-5-5. IPC analysis	112
Table 3-5-6. List of evaluated target technologies-related important patents	112
Table 3-5-7. Analysis of evaluated target technologies-related important patents	114
Table 4-2-1. Pearl-exported countries in spring 2005	125
Table 4-2-2. Industrial scale of shampoo industry	126
Table 4-2-3. Domestic possession rate of premium shampoo industry	126
Table 4-2-4. Pearl-imported 30 companies in 2007	129
Table 4-2-5. Annual statistics of domestic pearl import	130
Table 4-2-6. Putative income of evaluated-technology holding company	132
Table 4-2-7. Putative income of evaluated-technology holding company	133

제 1 장

Korea Ocean Research & Development Institute



연구개발과제의 개요



제1장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발 사업 발굴의 개요

1. 사업발굴의 개요

해양생물 산업 중에 가장 높은 부가가치를 형성하는 분야는 흑진주생산으로서 타히티에서만 약 10억불 시장규모를 나타내고 있다(그림 1-1-1). 그러나 최근에 들어 흑진주를 생산하는 모패인 흑진주조개(*Pinctada margaritifera*)가 타히티를 중심으로 대량폐사 현상이 연차적으로 발생하여 흑진주 생산량이 급격히 감소하는 추세이다. 특히 흑진주는 각 모패 개체에 하나씩만 생성되는 특징을 가지고 있어 그 위험성 또한 크다.



그림 1-1-1. 흑진주 생산의 연간 생산량 및 중요성

2. 연구개발을 위한 기술의 일반 현황

패류에서 배우체를 이용한 항체 개발은 번식량을 파악하기 위한 정량적인 수단으로서 주요 생물자원관리 측면에서 필수불가결한 정보이며, 대량생산량 표준화를 위해 번식량 측정 및 관리 기술이 중요하다. 이는 모패의 연중 생식주기 파악 및 산란시기 예측과 같은 정성적인 연구와 모패로부터 생산되는 알과 정자의 정량적 측정, 즉 포란수(reproductive effort 또는 fecundity) 측정 등의 연구 등을 말한다.

2009년까지 흑진주조개의 항체연구를 통한 번식량 연구는 전무한 상태였다. 포란수 측정을 이용한 번식량 연구는 이를 측정하는 방법상의 문제로 정성적인 연구에 비하여 그 연구가 매우 저조한 실정이다. 이는 다른 동물과 달리 대부분의 이매패류는 알을 포함하는 생식소(ovary)가 물리적으로 분리되지 않고 외투막 및 소화맹낭에 포함되어 있는 문제와 이매패류의 포란수가 수백만 또는 수천만 개에 이르는데 그 문제점이 있다. 유용 이매패류의 포란수 또는 번식량 측정은 양식종의 생활사 및 자원관리 측면에서 필수 불가결한 생물학적 정보로 간주된다. 그러나 이에 관한 연구는 세계적으로 거의 이루어 지지 못하고 있는 실정이다. 이는 번식량을 측정하는 기술에 관한 문제로, 연구대상 종의 알 단백질에 대한 특정 항체를 개발, 항체면역효소측정법 (ELISA)를 이용하면 이러한 문제를 해결할 수 있다. 이는 이미 본 연구진에 의한 선행연구에서 세계적으로 입증된 바 있다. 그러므로 성공적인 흑진주조개 자원관리를 위해서는 우량종묘의 생산을 위한 모패의 번식생리학적 연구가 반드시 선행되어야 한다.

제2절 연구개발 사업 발굴의 추진경위

1. 국제공동연구 사업의 추진 주체

우리나라는 신 국제 해양질서에 따른 해양 분할시대에 대응키 위한 해양활동의 세계화 거점 확보, 21세기 국가 성장 동력 확보를 위한 주요광물자원 및 식량자원의 공급원 확보, 연근해 수산자원 감소 및 해양관할권 협소화에 따른 신 국토개념 정립과 경제활동 영역 확보, 신의약품 등 고부가가치 물질자원 소재인 열대해양생물유전자 자원 확보 필요 등의 목적을 전제로 열대지역 진출을 도모해왔다(그림 1-2-1).

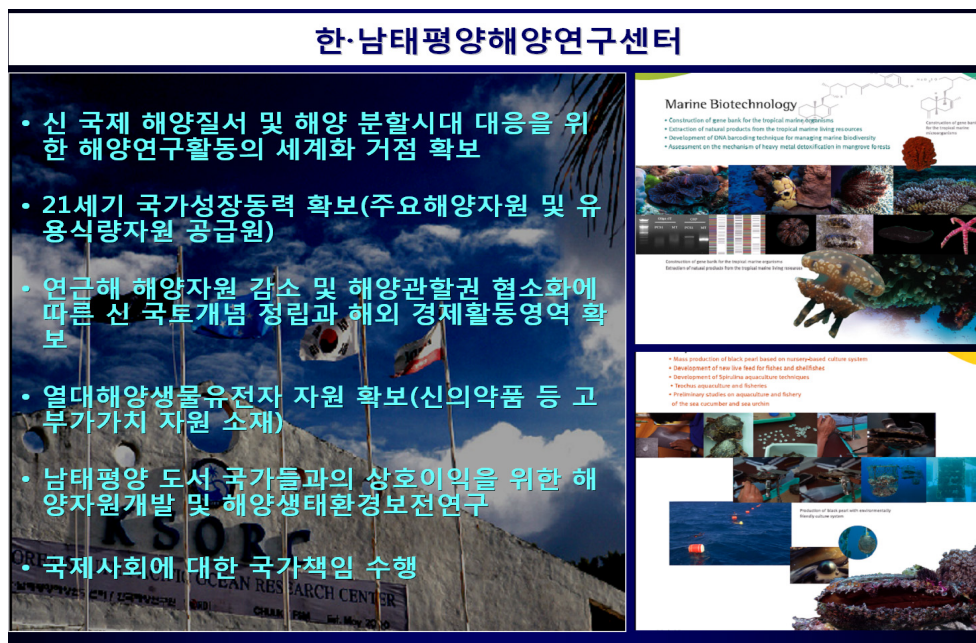


그림 1-2-1. 한·남태평양해양연구센터의 기능

특히 산호 등 종다양성이 높은 남태평양 도서 국가에 진출하고자 하는 프로젝트는 2005년에 결실을 맺어 마이크로네시아의 축주에 연구센터를 설립하였다. 그 명칭은 한·남태평양해양연구센터(Korea·South Pacific Ocean Research Center, KSORC)로서 남태평양 해양개발에 대한 전진기지 역할을 하며 우리나라의 해양과학기술력을 바탕으로 현지 정부 및 관계기관과의 협조관계를 구축하고, 남태평양 도서국가의 국민경제 활성화와 우리나라의 해양자원 공급원 확보를 도모하고자 하는 취지로 설립되었다. KSORC 설립취지에 맞는 연구개발 사업 중 흑진주 생산에 대한 장기적인 학문적 기여를 위해서는 축주에 서식하는 흑진주조개의 관리적 측면이 중요하다고 판단되었고, 그 중 흑진주조개의 건강 및 생산성과 직결되는 번식량의 정량화를 연구하는 것이 중요한 이슈가 되었다.

2. 국제공동연구 사업의 추진경위

우리 연구진은 2003년부터 2007년까지 국내에 서식하는 유용 이매패류의 알을 대상으로 항체를 개발하여 번식량의 정량화에 선도적인 역할을 해오고 있었다. 그러던 중 2008년 2월에는 프랑스 폴리네시아 타히티의 IFREMER에서 흑진주조개 항체개발의 기술적인 협력을 요청해 온 바, 국제공동연구의 시발점이 되었다 볼 수 있다.

2003-2007	<ul style="list-style-type: none"> • 한국산 유용이매패류의 항체개발 연구 수행 참굴, 개조개, 바지락, 기생충 등
2008.02.29	<ul style="list-style-type: none"> • 폴리네시아 군도 타히티의 프랑스 IFREMER 과학자의 항체개발 제안(우리측 기술 이전 및 공동연구 희망)
2008.04.18	<ul style="list-style-type: none"> • 2008년도 KIMST 국제공동연구사업 공모과제 제안서 제출
2008.05.23	<ul style="list-style-type: none"> • 2008 WAS Conference <ol style="list-style-type: none"> 1. Reproductive condition of the tropical black-lip pearl oyster, <i>Pinctada margaritifera</i> in two food conditions 2. IFREMER 측(Dr. Tristan Renault and Dr. Gilles Le Moullac)과 Hawaii 측(Dr. Maria Haws) 관계자 미팅

그림 1-2-2. 국제공동연구 사업의 추진경위

이 연구는 국내의 연구진이 이미 확립한 국제적인 연구기술을 바탕으로 기술적인 변형과 중 특이적인 항체개발을 통해 국제특허를 확보한 후, 주요 생물자원관리를 위한 원천기술로서 국제적 연구의 선도적인 기회를 확보할 수 있는 기회를 마련코자 하였다. 특히 프랑스 폴리네시아 IFREMER의 요청에 의해 이 국제공동연구가 이뤄진 만큼 이매패

류 항체 연구 분야에 보유한 세계적 기술 수준을 바탕으로 원천 기술을 확립하여 국제 기술전수 연구 프로그램으로 활용할 수 있는 프로그램이 확립된다면 흑진주 생산 국가간 상호 협력 체계가 구축될 것으로 판단되어 이 연구사업이 시행되었다(그림 1-2-2).

제3절 연구개발의 필요성

1. 과학기술적 측면

Chuuk Lagoon 내 흑진주조개의 현존량은 0.3개체/100 m²이며, 이는 진주 생산량이 가장 높은 폴리네시아에 비해 약 30% 정도에 해당한다. 이 지역에서 진주 생산이 가능한 모패의 잠재 현존량은 367,000개체로 추정되고 있어 매우 낮은 자연생산력임을 알 수 있다. 따라서 성공적인 흑진주조개 자원관리를 위해서는 우량종묘의 생산을 위한 모패의 번식생리학적 연구가 반드시 선행되어야 한다. 이는 모패의 연중 생식주기 파악 및 산란 시기 예측과 같은 정성적인 연구와 모패로부터 생산되는 알과 정자의 정량적 측정, 즉 포란수(reproductive effort 또는 fecundity) 측정 등의 연구 등을 통칭한다.

포란수 측정에 관한 연구는 이를 측정하는 방법상의 문제로 정성적인 연구에 비하여 그 연구가 매우 저조한 실정이다. 이는 다른 동물과 달리 대부분의 이매패류는 알을 포함하는 생식소(ovary)가 물리적으로 분리되지 않고 외투막 및 소화맹낭에 포함되어 있는 문제와 이매패류의 포란수가 수백만 또는 수천만 개에 이르는데 그 문제점이 있다. 유용 이매패류의 포란수 또는 번식량 측정은 양식종의 생활사 및 자원관리 측면에서 필수 불가결한 생물학적 정보로 간주된다. 그러나 이에 관한 연구는 세계적으로 거의 이루어지지 못하고 있는 실정이다. 이는 번식량을 측정하는 기술에 관한 문제로, 연구대상 종의 알 단백질에 대한 특정 항체를 개발, 항체면역효소측정법 (ELISA)를 이용하면 이러한 문제를 해결할 수 있다. 이는 이미 본 연구진에 의한 선행연구에서 세계적으로 입증된 바 있다.

대다수 온대지역의 이매패류는 수온, 먹이 및 서식장소와 같은 환경인자의 영향에 따라 번식주기의 변화를 보인다. 일반적인 이매패류의 연중 번식 주기는 에너지저장, 배우자형성, 산란 그리고 비활성 등의 4단계로 요약되는 계절적 변화를 보인다. 수온이 생식소발달을 촉진 혹은 퇴행시키는 역할을 한다면, 해수 중의 가용 먹이는 산란에 참가하는 성체의 산란량 및 유생의 발달과정에 깊은 영향을 미친다. 그러나 열대지역에 분포하는 이매패류의 번식에 관한 연구는 온대지역의 이매패류에 비하여 매우 빈약하며, 이에 따라 열대 이매패류의 번식전략이나 생리에 관한 정보는 절대적으로 부족한 실정이다.

이러한 경향에 비취봤을 때, 현재 Chuuk Lagoon에 있어 흑진주조개의 양식 방법은

자연산 흑진주조개로부터 방출된 부유치패를 채묘하는 자연채묘 방식을 주로 사용하고 있으나, 양식 산업을 위한 충분한 양의 치패를 확보함에 있어 어려움을 겪고 있다 (Arnaud-Haond et al. 2003). 따라서 흑진주조개 치패의 안정적 공급을 위하여 인공종묘생산을 통한 치패 생산 필요성이 높게 인식되고 있으나, 생활사 및 번식생리 등에 관한 기초연구 부족으로 흑진주조개의 인공종묘생산은 현재 이 지역에서 아직까지 성공적으로 이루어지지 않고 있다.

또한 최근의 진단 및 치료용 신약 개발 분야에서 나타난 가장 두드러진 현재의 변화는 기존의 저 분자량 약품(Small molecule drug) 위주의 개발 체제에서 생물학적 약품(Biological drug)으로의 급격한 성장과 다양한 진단 및 치료방법이 본격적으로 개발되며 검증되고 있다는 점이다. 진단 및 치료용 항체는 개발 단계에 자체적인 전문기술이 요구되어 높은 기술 장벽이 있을 뿐만 아니라 항체 용도로 특허로 보호받을 수 있는 소재이나, 현재 국내에서는 항체 관련 연구는 일부 바이오 회사와 학교, 연구소 등에서 연구용 항체를 개발하고 있으나 이를 제품화해 판매하고 있는 업체는 극소수에 불과하다. 그러므로 흑진주조개 항체의 개발에 따른 관련 국제 활동 및 논문 등 정량적인 성과에 따라 연구를 주도할 수 있는 중요한 요소이기도 하다. 이는 흑진주 생산을 위한 모패의 안정적 공급을 유도할 것이며 남태평양 도서 국가의 흑진주양식 산업에 있어 가장 시급한 일을 해결하는 과정이라고도 볼 수 있다. 현재까지 개발된 국내의 연구기술을 바탕으로 기술개발을 통해 국제특허를 확보하고, 주요 생물자원관리를 위한 원천기술로서 국제적 연구의 선도적인 기회를 확보한다면 흑진주 생산 최적화를 위한 국제 기술 전수 프로그램 선도에 이바지 할 것으로 본다.

2. 경제 · 산업적 측면

일반적인 항체 시장은 향후 연간 약 29% 이상 높은 성장률을 보일 것으로 예상된다고 보고되고 있다. 전체 연구용 항체 시장은 2003년 약 43억 달러 규모에서 2010년에는 약 185억 달러 이상 성장한다고 보고되었다(표 1-3-1). 현재 단백질과 관련해 상용화 단계에 있는 시장은 크게 상품화된 단백질 시장과 단백질 항체 시장으로 나뉘는데, 현재 상용화된 단백질 연구 관련 시장의 80~90%를 차지하는 것은 바로 단백질 항체이기도 하다. 현재까지 단백질 연구로 상용화된 항체 시장의 대부분을 단백질 항체 시장이 차지하고 있으므로 흑진주 생산의 최적화를 위한 항체 단백질 연구는 대단히 중요한 핵심 연구이다.

표 1-3-1. 세계 향체 시장의 성장세

(단위: 달러)

국가명	2003년	2005년	2007년	2009년*	2010년*
미국	33억	53억	83억	124억	149억
유럽	6.6억	9.7억	15억	22억	27억
일본	1.5억	2.0억	2.8억	3.8억	4.4억
캐나다	1.1억	1.4억	1.8억	2.3억	2.5억
아태지역	6,300만	8,300만	1.1억	1.5억	1.8억
기타	2,700만	3,500만	4,500만	5,400만	5,900만
합계	43억	67억	104억	154억	185억

* 예상치

자료: 연세대 프로테오믹스 연구소 및 GIA Estimates

해양생물 산업 중에 가장 높은 부가가치를 형성하는 분야로서 타히티에서만 역 10억 불 시장규모를 나타내고 있으나, 흑진주 생산이 타히티를 중심으로 대량폐사현상이 연차적으로 발생, 생산량이 급격히 감소하는 추세이다. 한편 유용 이매패류의 배우자를 이용한 향체개발은 주요 생물자원관리 측면에서 필수불가결한 정보이며, 대량생산량 표준화를 위한 번식량 측정 및 관리 기술이 중요하지만 현재까지 흑진주조개의 향체연구는 전무한 상태이다. 그러므로 국내의 연구기술을 바탕으로 기술개발을 통해 국제특허를 확보한 후, 주요 생물자원관리를 위한 원천기술로서 국제적 연구의 선도적인 기회를 확보할 수 있을 것으로 본다. 또한 패류 향체 연구 분야에 보유한 세계적 기술 수준을 바탕으로 원천 기술 확립 후, 국제 기술 전수 연구 프로그램으로 전환하여 상호 협력 관계도 구축 가능하리라 생각한다

3. 사회·문화적 측면

흑진주조개 양식을 근간으로 한 흑진주 생산은 남태평양 도서 국가에서 가장 중요한 산업 중 하나이다. 흑진주조개는 캘리포니아 연안과 지중해, 홍해, 인도 태평양 지역 등 전 세계적으로 폭넓게 분포하며, 주로 남태평양 주변 환초에 풍부하게 분포하므로 열대 지역의 대표 생물 중 하나이기도 하다. 특히 폴리네시아의 흑진주 산업은 최근 30년간 빠른 속도로 발전해 왔으며, 연 평균 6 M/T의 흑진주조개를 생산하고 있다(Fassler 1995).

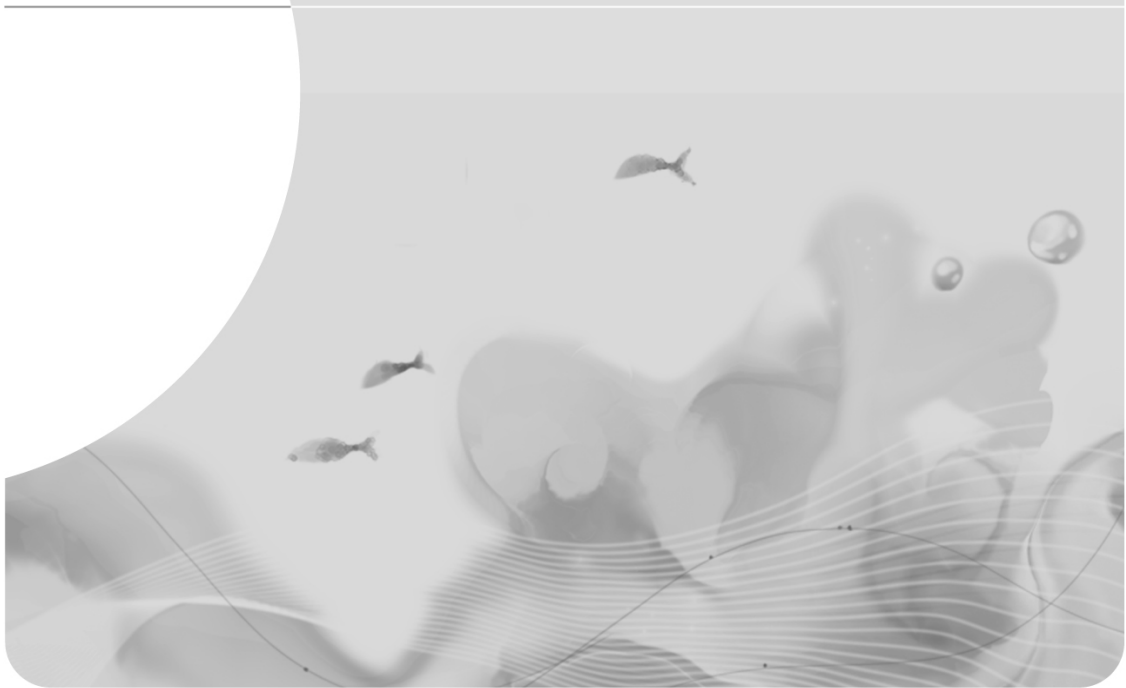
Chuuk Lagoon에서는 현재 흑진주조개 양식이 활발히 이루어지고 있으며, 생산된 조개는 주로 식용이나 기념품 재료로 활용되고 있으나, 흑진주 생산량의 증가는 흑진주조개 모패의 수요를 급격히 증가시켰으며, 이는 흑진주조개 자원량의 감소를 야기시켜 자연산 흑진주조개의 채취를 금지하고 있는 실정이다. 이러한 자연산 흑진주조개 모패 자원을 보존하고 지속가능한 이용을 위하여 번식량의 정량적 산정을 위한 향체개발 연구는 대단히 중요하다.

제 2 장

Korea Ocean Research & Development Institute



국내외 기술개발 현황



제2장 국내외 기술개발 현황

제1절 국내 기술개발 현황

1. 기술개발 현황

한국해양연구원에서는 마이크로네시아 축주의 한-남태평양해양연구센타를 운영하며, 흑진주 조개의 생태학적 연구, 자원생물학적 연구 및 세포생물학적 연구를 수행 중이다. 관련 연구로서 남태평양에 서식하는 흑진주조개 개체군 특성(Park et al., 2007), 흑진주조개 유생의 착생 및 성장 특성, 환경조건에 따른 흑진주조개의 번식 및 에너지 대사 연구 및 흑진주조개의 패각성장 특성 및 연중 생식소 발달 과정을 연구 중에 있다.

이번 연구와 관련된 연구로는 흑진주조개의 하계 산란 특성에 대한 연구는 보고된 바 있으나(Kang et al., 2005), 흑진주조개의 포란수나 정량적 번식량 측정에 관한 연구는 전 세계적으로 아직 이루어 지지 않았다. 해산이매패류의 번식량 측정은 생식 주기나 자원 관리하는데 있어 중요한 기초 자료가 되는데, 최근 들어 난 특이 단백질에 대한 다클론항체를 개발하여 이를 효소면역측정법 (ELISA)을 이용하여 참굴, 개조개 및 바지락 등과 같은 이매패류의 포란수를 측정하는 바 있다(Choi et al., 1993, 1994; Kang et al., 2003; Park et al. 2003,2004).

포란수 측정에 관한 연구는 이를 측정하는 방법상의 문제로 정성적인 연구에 비하여 그 연구가 매우 저조한 실정임. 이는 다른 동물과 달리 대부분의 이매패류는 알을 포함하는 생식소(ovary)가 물리적으로 분리되지 않고 외투막 및 소화맹낭에 포함되어 있는 문제와 이매패류의 포란수가 수백만 또는 수천만 개에 이르는데 그 문제점이 있다. 패류의 포란수 또는 번식량 측정은 양식종의 생활사 및 자원관리 측면에서 필수 불가결한 생물학적 정보로 간주된다. 그러나 이에 관한 연구는 세계적으로 거의 이루어 지지 못하고 있는 실정이다. 이는 번식량을 측정하는 기술에 관한 문제로, 연구대상 종의 알 단백질에 대한 특정 항체를 개발, 항체면역효소측정법 (ELISA)를 이용하면 이러한 문제를 해결할 수 있다. 이는 이미 본 연구진에 의한 선행연구에서 세계적으로 입증된 바 있다.

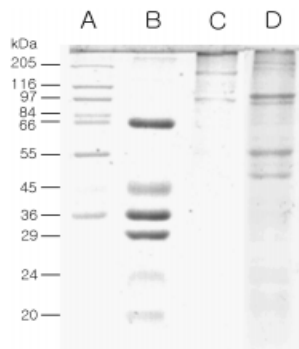
북반구에 위치한 마이크로네시아의 Chuuk Lagoon에 서식하는 흑진주조개 개체군의 연중 생식소발달과 산란시기의 규명은 개체군동태 및 자원의 효율적 관리에 있어 매우 중요한 자료이다. 그러나 이러한 중요성에도 불구하고 흑진주조개의 서식지역별 번식생물학적 특성에 관한 연구는 전무한 실정이다. 그러므로 이 연구는 Chuuk lagoon에서 모패로 양성된 *P. margaritifera*의 알에 포함된 특정 난황단백질의 특성을 파악하고, 다클론항체를 개발하여 흑진주조개 번식량을 정량화 하는데 중요한 정보를 제공하는데 있다.

난황단백질 (Vitellin)과 전구물질 (Vitellogenin)의 특징에 관한 연구로는 현재까지 우리나라에서는 해산어류나 누에, 곤충, 파충류 등을 통해 Vitellin이나 Vitellogenin의 정제 및 합성에 대한 호르몬의 영향, 면역학적 특성에 관한 연구가 보고되고 있다. 그러나 해산이매패류의 경우 국외에서는 난황단백질 (Vitellin)에 관한 연구가 수행되었지만 매우 국한되어 있고, 난황형성과정의 직접적인 근거가 불분명하며 Vitellogenin의 특징에 대한 연구는 저조한 실정이며 현재까지 우리나라에서는 이에 관한 연구가 어느 이매패류에서도 전혀 이뤄지지 않은 실정이었다.

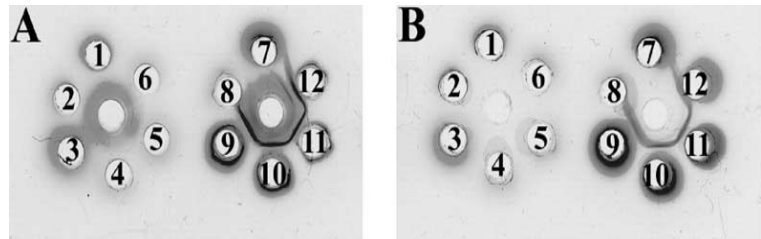
2. 국내 이매패류의 항체 및 번식량 기술개발 현황

가. ELISA를 이용한 번식량의 정량적 측정

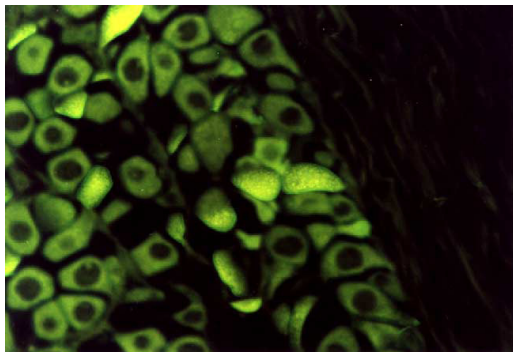
참굴의 알 (egg) 특이항체를 개발하였고 효소면역측정법 (ELISA)을 통하여 참굴의 산란시기에 번식량을 정량적으로 측정 (Kang 등, 2003) 하였으며, 개조개 (Park 등, 2003)와 바지락 (Park and Choi, 2004)의 항체를 개발하여 같은 방법으로 연구를 수행하였다.



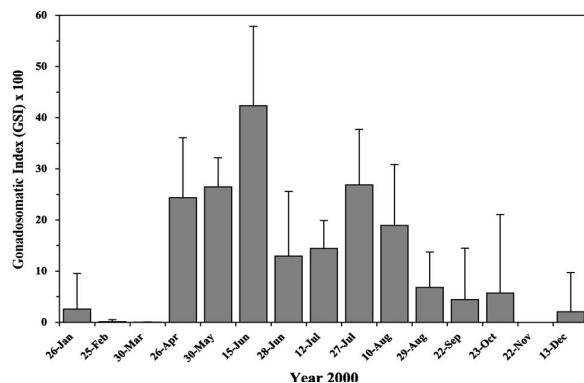
SDS-PAGE를 이용한 단백질의 분자량 측정



Double-Immunodiffusion을 이용한 난단백질의 다클론항체 특정성 측정 방법



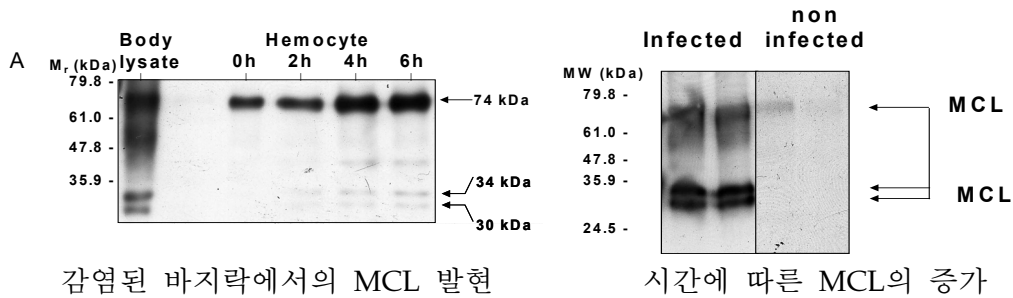
난 특이 단백질에 대한 다클론항체의 면역화학적 염색 반응 결과



ELISA를 이용한 연중 번식량 측정 방법

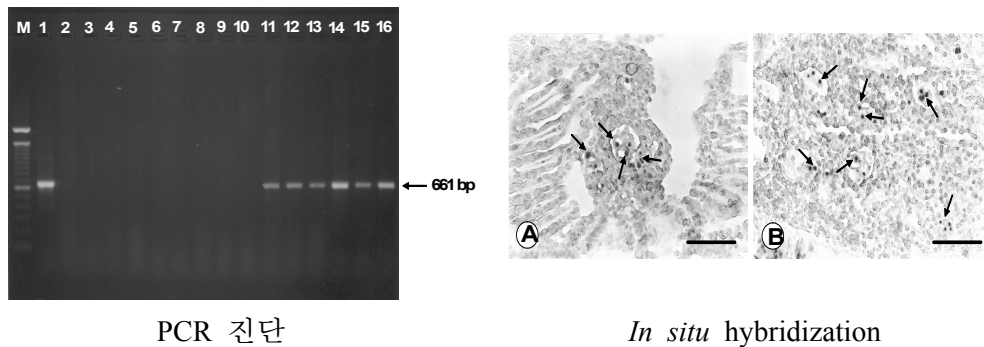
나. Perkinsus의 조직병리학적 영향 구명

병리조직학적 검사를 통한 바지락포자충의 병리적 특성 보고 (Park and Choi, 2001).



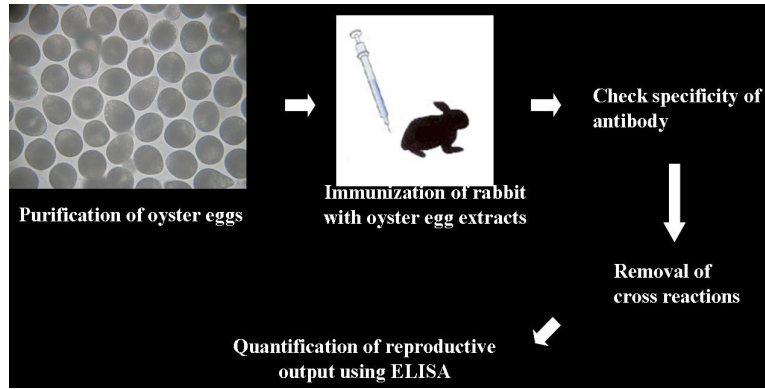
다. 바지락포자충 진단을 위한 PCR 및 Anti-Perkinsus IgG 개발

바지락포자충의 진단은 주로 Ray's FTM을 이용한 방법이 가장 보편적이다. 그러나 정량적 진단을 위하여 Choi's 2 M NaOH lysis 방법 (Choi et al., 1989)이 최근 주목을 받고 있다. 한편, 다양한 진단방법의 개발을 위하여 항체를 이용한 진단기술 개발 및 PCR, insitu hybridization을 이용한 분자생물학적 진단 기술을 이미 개발하였다 (Park et al., 2002).

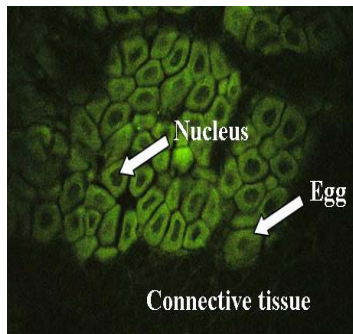
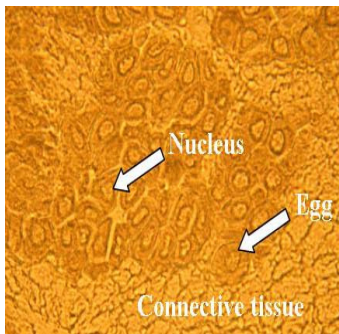


라. 강굴의 번식량 측정에 관한 연구

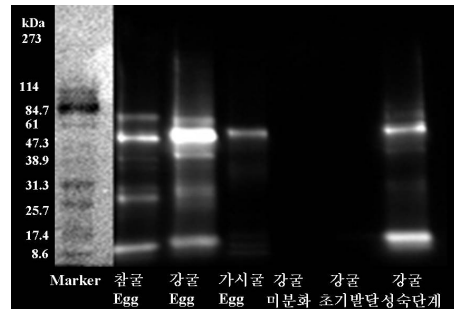
이 연구는 현재 강굴의 시험 양식이 시행되고 있는 섬진강 하구의 강굴을 대상으로 실시하였다. - 강굴 알 및 정충에 대한 다클론 항체개발: Choi et al. (1992), Kang et al. (2003)의 항체개발 protocol 이용, New Zealand산 흰 토끼를 이용하여 항체 생산하는 과정을 설명한다.



강굴 egg & sperm 항체개발을 위한 실험 모식도



형광 면역염색 결과 확인된 강굴의 난황단백질



강굴항체를 이용한 Western blotting

제2절 국외 기술개발 현황

흑진주조개는 높은 산업적 가치로 인하여 이 종에 관한 개체군 연구(Service de la Peche 1970), 환경에 따른 서식밀도(Intes et al. 1986), 먹이 선택성(Yukihira et al. 1999), 유생 성장(Alagarwami et al. 1989; Southgate and Beer 1997) 및 자원량(Zanini and Salvat 2000; Sims 1992) 등의 연구가 수행된 바 있다. 온대지역의 이매패류와 달리 열대지역에 분포하는 흑진주조개는 연중 산란의 양상을 보이나 주 산란기는 수온이 높은 여름과 초가을로 보고되고 있다(Pouvreau et al. 2000). 특히 폴리네시아 군도의 흑진주 자원관리를 위한 프랑스 연구진의 자원량 및 인공 자원관리를 위한 보고가 많다. 근래에는 호주, 뉴질랜드 및 인도에서도 흑진주 생산을 위한 직접적인 자원관리 및 유전, 건강유지 기법 등의 연구가 진행되고 있다.

그러나 전 세계적으로도 난 단백질에 관한 연구가 보고된 바 없을 뿐만 아니라 번식량 측정에 관한 연구는 보고된 바 없다.

제 3 장

Korea Ocean Research & Development Institute



연구개발 수행 내용 및 결과



제3장 연구개발 수행 내용 및 결과

제1절 흑진주조개 모패 관리

1. 흑진주조개의 건강성 조사

가. 서론

일반적으로 이매패류의 생식소 발달은 수온과 먹이의 영향에 크게 영향을 받는다. 온대지방의 경우, 수온은 gametogenesis를 시작하게 하는 cue인 반면, 먹이는 생식소의 발달을 촉진·성숙시키는 인자로서 유생의 생존에도 그 영향이 있다. 그러나 열대지역의 경우, 수온이 흑진주조개의 성숙을 결정한다는 보고도 있다(Saucedo et al. 2001). 온대지방 이매패류 서식지에 비해 열대지역 환초 환경의 경우, 수온은 안정적이지만 먹이조건은 좋지 않다. 이런 지역에 서식하는 흑진주조개, *P. margaritifera*의 서식밀도는 그리 높지 않는데 그 이유로 먹이원의 부족을 꼽기도 한다. 이 흑진주조개를 이용한 흑진주 산업은 세계적으로 고부가가치 수산양식 산업으로 각광을 받고 있으나, 근래에 들어서는 양식장 오염, 어장의 노후화, 질병 및 유생 확보 등의 여러 가지 문제로 인해 양식에 어려움이 있다고 보고되고 있다.

이매패류 유생의 초기성장률과 생존율은 모패가 만들어 준 알의 질에 따라 그 수준이 좌우된다고 보고되고 있다. 2002년 한-남태평양연구센터에서 실시한 흑진주조개 종묘생산 결과(unpublished data)에 따르면 수정란에서 자패 착생까지의 생존율은 0.7% 정도였었다. 이 종묘생산은 자연에서 채집된 암·수 개체들을 이용하여 실시했던 연구로서, 이런 낮은 수준의 생존율을 보인 것은 환초 지역에서 채집된 암컷 개체의 포란수와 알의 질을 무시할 수가 없다. 이는 해수로부터 충분한 영양원을 받지 못했다는 간접적인 증거가 되며, 그 결과 생식소의 충분한 성숙을 이루지 못한 것으로 해석할 수 있다.

그러므로 이 연구의 목적은 먹이가 흑진주조개의 생식소 성숙과 유생의 생존에 어떤 영향을 미치는지에 대한 연구로서, 흑진주 양식산업을 위한 모패와 유생 사육에 효율적인 자료를 제공하는데 있다.

나. 재료 및 방법

(1) Sampling

이 연구에 사용된 흑진주조개, *P. margaritifera* 모패는 마이크로네시아 연방 축주의 연승수하식 양식장에서 2007년 4월 25일에 채집하였다(그림 3-1-1). 실험에 사용된 모패

는 nursery에서 유생을 키운 후, 2002년 5월에 착생한 치패가 성장한 것으로서 그 크기는 50-120 mm 였다. 흑진주조개가 채집된 시점의 생식소와 건강상태를 파악하기 위해 83개 체 중 23개체를 사용하였다.

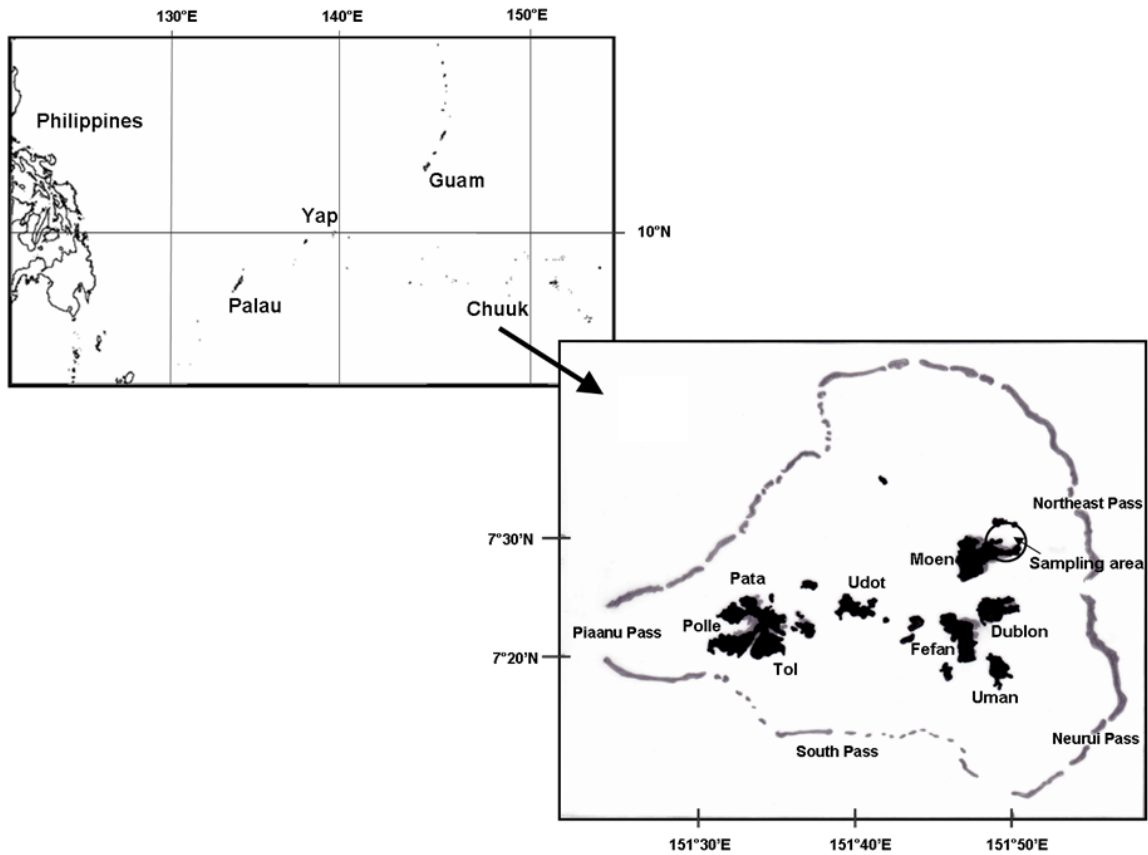


그림 3-1-1. 남태평양 마이크로네시아 연방국 측주에 위치한 흑진주조개의 채집 장소 및 실험 지역

(2) 모패 관리

채집된 모패는 패각위의 debris를 모두 제거한 후, 100L 용량의 유수식 실험수조 두개에 각각 60개체씩 분리 수용하였다(그림 3-1-2). 두 수조 모두 동일한 필터(10 μ m-filter)를 사용하였고 환수율(66.7 ml/sec) 또한 같게 조정하였고, 수온은 Saucedo et al. (2001)이 제안했던 진주조개 성숙 온도인 28-29°C를 유지하였다. 수온과 염분은 YSI 85 (Yellow Spring, Ohio, USA)를 이용하여 매일 측정하였다. 모패에 급이할 먹이는 현장 사정상 live feed를 사용하지 못하고, algal paste (a mixed diet of *Isochrysis*, *Pavlova*, *Thalassiosira weissflogii* and *Tetraselmis*, shellfish diet 1800TM)를 Uriarte et al. (2004)의 방법에 따라 하루에 200 cells/?l · day (100 ml per day in each tank)를 한쪽 수조에만 급이하여 feeding과 non-feeding으로 다르게 분리 실험하였다(그림 3-1-3).

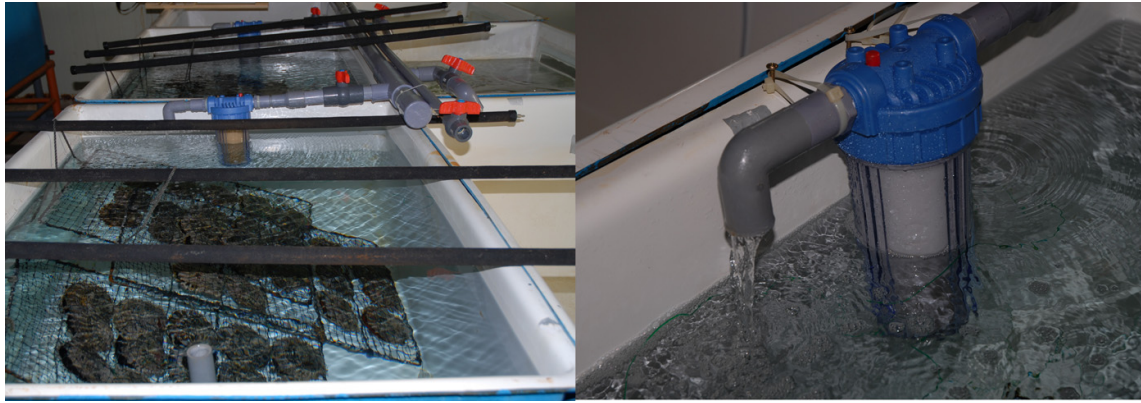


그림 3-1-2. 실험을 위해 사용된 개체들과 수조 및 여과기의 모습

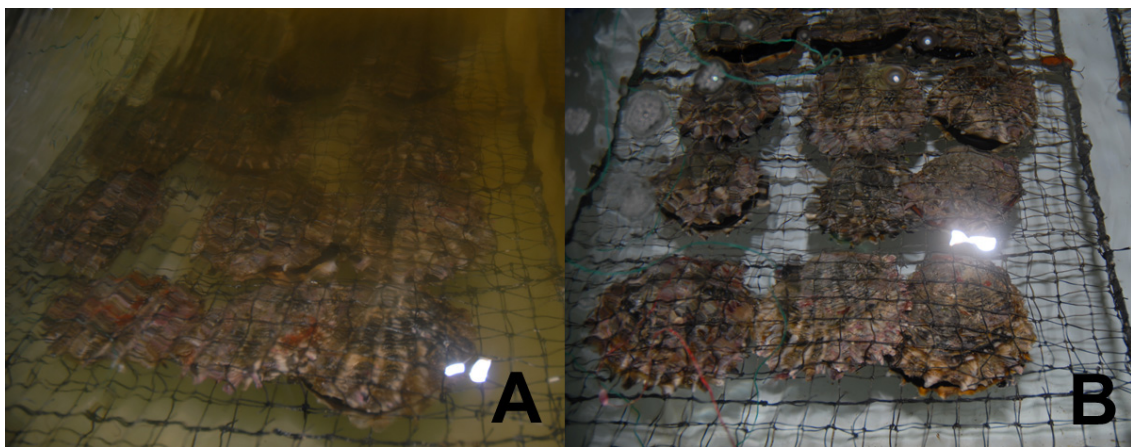


그림 3-1-3. 실험에 사용된 feeding (A)과 non-feeding (B) 실험구 내 개체들의 모습

(3) Biometric measurement and condition index

채집된 모패들의 실험 전후 생식소의 발달 상태와 패각근의 생화학적 분석을 위해 순치 하루 후인 2007년 4월 26일에 20개체, 한 달 후인 5월 25일과 2달 후인 6월 24일에 각각 10개체씩을 두 실험 수조에서 꺼내 실험하였다. 흑진주조개의 크기는 각정부길이 (Hinge length, HL)와 각장(Shell Height)을 vernier caliper를 이용하여 0.01 mm까지 측정하여 기록하였다. 패각을 포함한 전체무게(total weight, TW)를 측정하고 개각 후, 패각중량(shell wet weight, SW), 습중량(tissue wet weight, TWW), 근육무게(muscular weight, MW)를 0.01 g까지 측정하고 기록하였다(그림 3-1-4). 이 기록을 사용하여 건강도(condition index, CI)는 SW와 TWW의 비(ratio)로 나타냈으며, 에너지저장도(muscular condition index, MCI) (Saucedo et al. 2001)는 변형된 식인 TDW와 MDW의 비로 나타냈다. 조직학적 관찰을 위해서 육질의 수직 횡단면을 폭 2 cm 정도로 절개하였고, 이 부분을 Davidson's fixative에 48시간 고정한 후 수돗물로 수세하여 70% ethanol로 치환하여 보관하였다.



그림 3-1-4. 흑진주조개, *P. margaritifera*의 외부 및 내부 형태와 개각 후 육질과 패각으로 분리한 모습.

(4) 모패 생식소의 조직학적 관찰

70%-ethanol에 고정되어 있던 육질의 수직 횡단면을 ethanol series를 통해 탈수과정, xylene 용액에서 투명과정을 거치고 100%-paraffin으로 봉입하여 5 μ m 두께로 조직파라핀 절편법을 실시하였다. 이 후 절편조직은 염색은 Harris hematoxylin과 eosin Y 용액을 이용하여 비교염색 하였고, 디지털카메라가 장착되어 있는 광학현미경을 이용하여 흑진주조개 생식소 조직의 발달상태를 그림으로 저장하여 분석에 이용하였다. 흑진주조개 생식소의 발달단계는 Kang et al. (2003, 2004)의 criteria를 따라 정량적으로 구분하였다[(1) early active, (2) late active, (3) ripe, (4) spawning, (5) spent and (6) absorbing]. 생식소 부분의 임의의 조직 5군데에서 관찰된 각 부분을 사진촬영 하여 각 발달단계에 따른 난모세포의 크기를 image processing software를 사용하여 정량하였다. 6개의 발달단계에 맞는 난의 평균크기(\pm 표준편차)의 범위를 이용하여 실험 전후 두 실험구 개체들이 갖는 생식소 내 변화를 산정하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) 수온 및 염분 변화

실험 기간 중의 수온과 염분은 각각 28.2~31.2°C와 33.8~34.5 ppt의 범위를 보였다. 실

험을 수행한 실험실이 비록 실내에 위치하고 있으나, 냉방기를 갖추고 있지 못해 대기 온도 및 수온의 변화를 조절할 수는 없었다. 마이크로네시아의 일반적인 수온을 나타내고 있으며, 염분은 안정적인 모드를 보였다(그림 3-1-5).

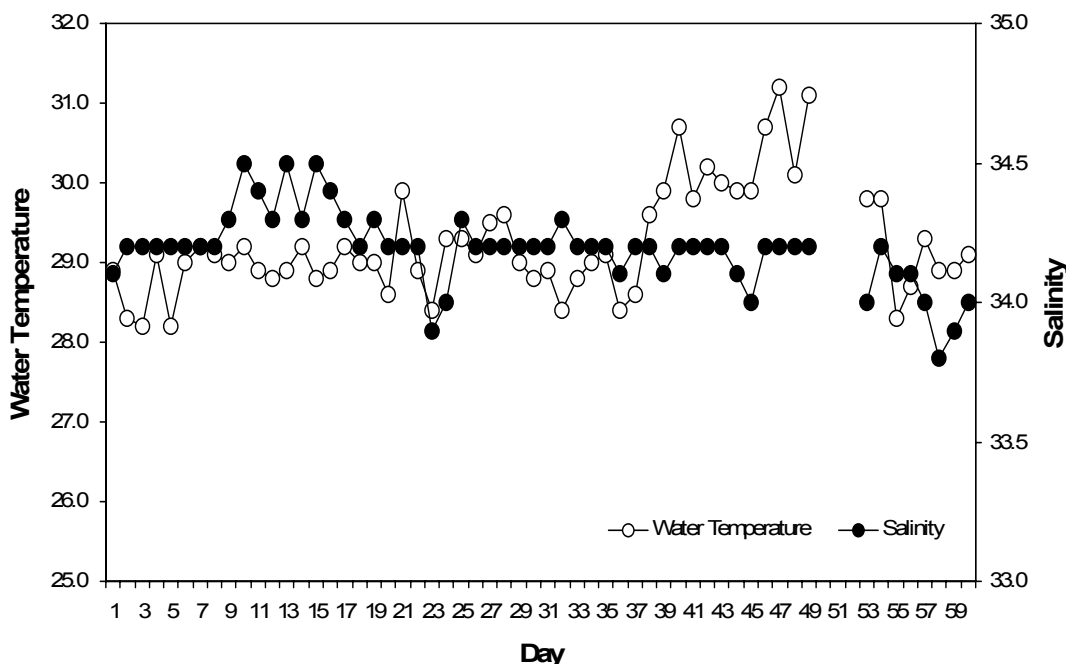


그림 3-1-5. 실험기간 동안의 수온과 염분의 변화 (28.2-31.2°C, 33.8-34.5 ppt).

(2) 여과 전후 해수 내 식물플랑크톤 비교

실험을 위해 10 μm의 필터로 여과한 해수에는 *Synechocystis* sp. and *Gloeobacter* sp. 단 두 종만이 관찰되었으며, 여과하지 않은 실험구의 해수에는 *Achnanthes longipes*, *Caloneis bacillum*, *Navicula* sp., *Nitzschia socialis*, *Anabaena* sp., *Gloeobacter* sp., *Merismopedia* sp., *Microcystis* sp., *Oscillatoria* sp., and *Synechocystis* sp. 등의 종들이 혼재하고 있었다(표 3-1-1). 온대지역의 일반적인 해수에 비해 열대지역 자연해수 내 식물플랑크톤의 양이 현저하게 낮은 것을 관찰할 수 있었으며, 이로 인한 흑진주조개의 번식 및 자연 성장과 치패의 성장에도 영향을 끼칠만한 수준의 양으로 생각된다. 그러므로 먹이조건이 흑진주조개 모패의 성장 및 번식에 대한 연구의 필요성을 재확인하는 계기가 됐다.

표 3-1-1. 서로 다른 환경에서의 플랑크톤 변화.

Treatments	Total vol. (ml)	Cells/ml	Cells/L in the original Vol.
Filtered	1,000	903	45,133
Non-filtered	1,000	1,597	79,850

(3) 실험에 사용된 흑진주조개 모패의 생물학적 지수

실험에 사용된 흑진주조개의 크기는 각장(Shell Height, SH), 각고(Shell Length, SL)을 전체 무게 등이 유사하여 실험적인 유의차는 없었다. 초기의 무게는 190 g 정도였으나 (표 3-1-2), 실험을 개시한 후 한 달째 되는 시기에는 두 실험구 모두 무게가 늘었으나, 두 달 후에는 두 실험구 모두의 흑진주조개 모패의 무게는 비슷한 크기임에도 불구하고 줄었다. 이는 체내의 생리적인 현상에 의해 체중이 감소한 원인이 가장 큰 원인으로 생각된다.

표 3-1-2. 실험에 사용된 흑진주조개 모패의 생물학적 지수. AF: 급이군, NAF: 미급이군, N: 실험 개체수, SH: 각장, SL: 각고, TW: 총중량

	N	SH (mm)	SL (mm)	TW (g)
Initial	20	115.4±9.9	108.0±9.0	190.5±45.7
One month	AF	117.7±6.1	107.9±6.7	204.9±30.9
	NAF	116.3±6.1	107.6±6.8	207.4±28.8
Two months	AF	112.4±6.9	105.0±6.8	192.6±31.5
	NAF	113.9±10.5	106.5±11.3	192.8±43.1

(4) 실험 기간 중 흑진주조개 생식소의 변화

실험에 사용된 흑진주조개의 생식소 발달은 그림 3-1-6과 같이 각 단계별로 특징을 가진 그림으로 표현 가능하다. Fig. 는 흑진주조개 난소의 계절에 따른 연중 생식소의 변화를 나타낸 그림이다. 그림 3-1-6-A는 발달기의 난모세포로 여포내에 성장하는 난모형 성세포 및 난원세포들이 공중하는 것을 관찰할 수 있다. 그림 3-1-6-B는 성숙기의 세포 모양으로서 여포에는 성숙한 난자로 가득 채워지고 여포 내 난자의 축적으로 여포 내부가 발달 및 확장되었다. 완숙한 알 (mature oocytes)을 포함하고 있다. 성숙기 난의 크기는 평균직경이 40~50 μm 정도로 여포를 가득 채웠고, 난 내에 핵이 관찰된다. 그림 3-1-6-C는 산란기에 일부 난자의 방출이 일어나 여포 내의 빈 공간 (lumen, LM)이 형성되고 방출되지 않은 알들이 잔존하였다. 방란 후의 성숙난이 존재하며, 방란에 의한 빈공간이 관찰된다. 산란 후 개체의 생식소로서 성숙난과 초기 성장하는 early vitellogenic oocyte (EV), vitellogenic oocyte (VO), 비어있는 여포 공간 등이 관찰된다. 그림 3-1-6-D는 소모기의 상태를 나타낸다. 여포에는 잔존 난 (relict ova, RO)이 일부 관찰되지만 일부 영양세포를 제외하고는 소엽이 거의 비어있는 상태이다. 또한 여포(follicle, F)가 현저하게 수축되어 있고, 식세포작용이 이루어지고 있는 상태이다.

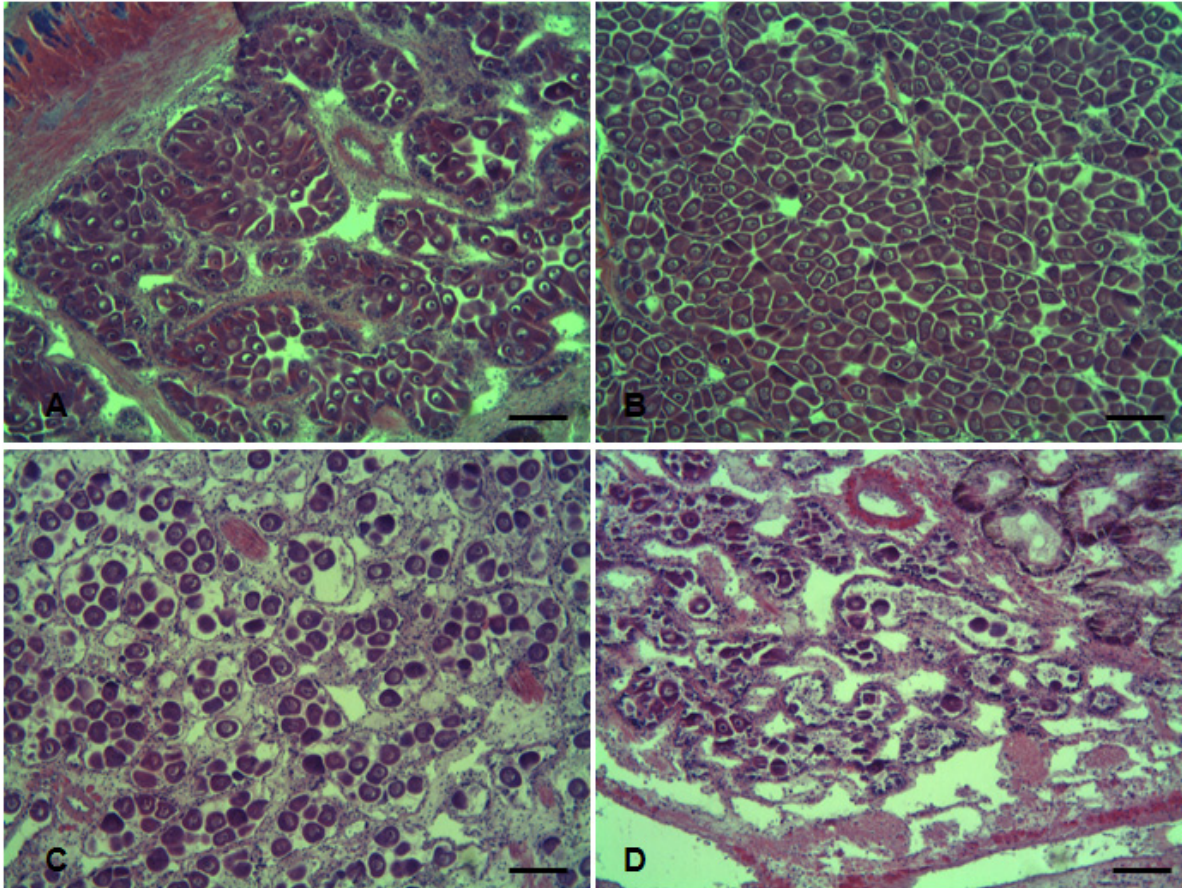


그림 3-1-6. 흑진주조개 난소의 생식소 발달 구분. (A) 발달기, (B) 성숙기, (C) 산란/부분산란기, (D) 소모기. Scale bar: 100 μ m.

실험초기에는 발달기, 성숙기 및 부분산란하는 개체들의 비율이 각각 12.5%, 62.5%, 25%였다. 마이크로네시아 흑진주조개 특성상 4월부터 산란을 시작하는 특성을 고려했을 때, 이상적인 결과이다. 먹이를 급이하고(AF) 급이하지 않는 실험구(NAF)의 실험기간에 따라 생식소의 변화를 볼 수 있었는데 AF에서는 먹이를 충분히 공급한 한 달 후, 대부분의 개체들이 산란 또는 소모기의 특성을 가진 반면 먹이를 급이하지 않은 NAF에서는 성숙상태로 남아 있었다(71.4%)(그림 3-1-7).

먹이를 지속적으로 공급한 AF에서는 두 달 후, 재성숙(21.4%)하는 경향을 보였고, 나머지는 한달 전과 유사한 생식소 상태를 나타내었다. 먹이를 공급하지 않은 NAF에서는 성숙한 알들의 비율이 급격히 낮아졌으며(36.4%) 이 시기의 알들은 흡수되거나 퇴화하는 상태가 우세(63.5%) 하였다.

이는 먹이를 지속적으로 섭취한 흑진주조개들은 산란과 성숙을 주기적으로 할 수 있는 에너지가 충분한 것으로 판단되어지며, 정상적인 번식활동이 가능할 것으로 생각된다. 그러나 먹이조건이 극히 낮은 NAF 실험구에서는 에너지원이 부족하여 성숙한 상태로 한 달간 유지하다가 두 달째 들어서서는 성숙한 알들을 체내로 다시 흡수하는 흡수기의 개체들을 많이 관찰한 바, 이는 정상적인 번식활동이 제한된다는 사실을 반증한다고 볼 수 있다.

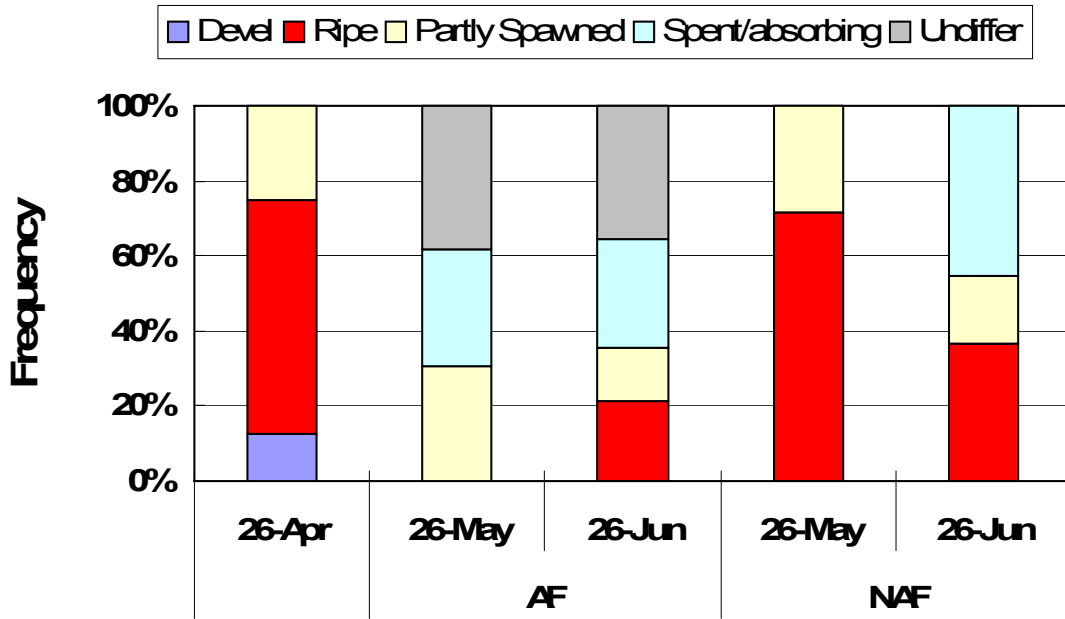


그림 3-1-7. 실험 전 후의 흑진주조개 난소의 생식소 상태.

그림 3-1-8은 실험기간 동안의 건강도(condition index)를 나타낸 그림으로서 초기의 개체들의 건강도는 한 달 경과한 AF와 NAF의 건강도지수와 유사하지만, AF 실험구의 산란이 이뤄진 개체들에 의해 낮은 값을 보이긴 했지만 NAF의 개체들과 비교했을 때 보다는 상대적으로 높았다($P < 0.05$). 먹이급이를 하지 않은 실험구의 개체들에서는 두 달이 경과한 시기에 가장 낮은 값을 보였고, 이때의 건강상태는 초기 개체들과 비교했을 때 현저하게 낮아진 값을 나타냈다.

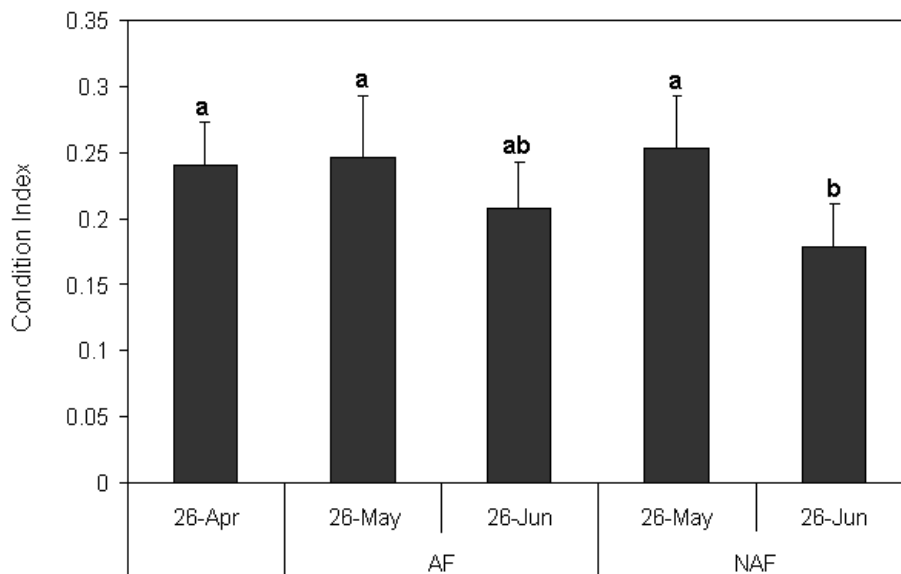


그림 3-1-8. 실험 전 후의 흑진주조개의 건강도의 변화

그림 3-1-9는 실험기간 동안의 에너지저장도(muscular condition index)를 나타낸 그림으로서 초기의 개체들의 건강도지수는 한 달 경과한 AF와 NAF의 에너지저장도와 유사하지만, AF 실험구의 산란이 이뤄진 개체들에 의해 낮은 값을 보이긴 했지만 NAF의 개체들과 비교했을 때 보다는 상대적으로 높았다($P < 0.05$). 먹이급이를 하지 않은 실험구의 개체들에서는 두 달이 경과한 시기에 가장 낮은 값을 보였고, 이때의 에너지 저장상태는 초기 개체들과 비교했을 때 현저하게 낮아진 값을 나타냈다.

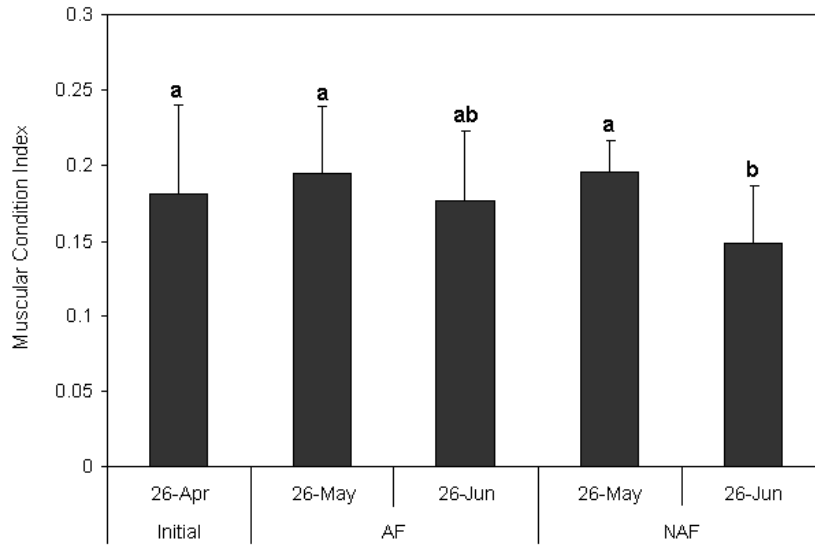


그림 3-1-9. 실험 전 후의 흑진주조개 근육무게를 통한 에너지 저장도 변화

여러 연구자들의 보고에 따르면 일반적으로 이매패류의 생식소 발달은 수온과 먹이의 영향에 크게 영향을 받는다. 온대지방의 경우, 수온은 gametogenesis를 시작하게 하는 cue인 반면, 먹이는 생식소의 발달을 촉진·성숙시키는 인자로서 유생의 생존에도 그 영향이 있다. 그러나 열대지역의 경우, 수온이 흑진주조개의 성숙을 결정한다는 보고도 있다. 온대지방 이매패류 서식지에 비해 열대지역 환초 환경의 경우, 수온은 안정적인데 반해 먹이조건은 좋지 않다. 이런 지역에 서식하는 흑진주조개, *P. margaritifera*의 서식밀도는 그리 높지 않은데 그 이유로 먹이원의 부족을 꼽기도 한다. 이 흑진주조개를 이용한 흑진주 산업은 세계적으로 고부가가치 수산양식 산업으로 각광을 받고 있으나, 근래에 들어서는 양식장 오염, 어장의 노후화, 질병 및 유생 확보 등의 여러 가지 문제로 인해 양식에 어려움이 있다고 보고되고 있다.

그러므로 먹이공급 실험구의 개체들은 건강도와 에너지저장도 모두 먹이를 공급하지 않은 실험구 보다 현저하게 높았으며, 이는 산란에 의한 건강상태 저하도 먹이공급으로 모패를 안정화 할 수 있다는 결론이며, 먹이가 없는 시기에서는 산란이 이뤄지기 어렵다는 사실을 뒷받침하는 결과이기도 하다. 대부분의 이매패류들은 근육에 탄수화물을 저장

하여 먹이가 없는 시기에 에너지로 재사용하는 사실을 고려했을 때 마이크로네시아에 서식하는 흑진주조개는 두 달 간의 먹이 섭취 공백이 최소의 에너지 저장 기간이라고 볼 수 있다. 그러므로 이 연구는 먹이조건이 풍부한 다른 지역보다 열대 지역의 흑진주조개 번식활동이 시기적으로 제한되었다는 다른 보고들과 비교했을 때 먹이는 번식과 성장의 가장 중요한 제한요인임을 해석할 수 있는 좋은 예로 들 수 있을 것이다.

2. 흑진주조개 모패가 생산한 알과 정자의 생화학적 특성 조사

가. 서론

이대패류 유생의 초기성장과 생존율은 모패가 만들어 준 알의 질에 따라 그 수준이 좌우된다고 보고되고 있다. 2002년 한-남태평양연구센터에서 실시한 흑진주조개 종묘생산 결과에 따르면 수정란에서 자패 착생까지의 생존율은 0.7% 정도였다. 이 종묘생산은 자연에서 채집된 암·수 개체들을 이용하여 실시했던 연구로서, 이런 낮은 수준의 생존율을 보인 것은 환초 지역에서 채집된 암컷 개체의 포란수와 알의 질을 무시할 수가 없다. 이는 해수로부터 충분한 먹이 공급을 받지 못했다는 간접적인 증거가 되며, 그 결과 생식소의 충분한 성숙을 이루지 못한 것으로 해석할 수 있다. 그러므로 흑진주조개 모패로부터 생산된 알과 정자의 생화학적 특성 조사는 세대 유지를 위한 중요한 기초자료이기도 하다.

나. 재료 및 방법

(1) Sampling

이 연구에 사용된 흑진주조개, *P. margaritifera* 모패는 마이크로네시아 연방 축주의 연승수하식 양식장에서 흑진주조개 성숙기인 2009년 7월에 채집하였다. 실험에 사용된 모패는 각 크기별로 암수 10마리씩 채집하였고, 크기 범위는 135.6~155.2 mm였다.

(2) 알의 정제

흑진주조개의 패각을 제거한 후, 생식소 조직의 일부를 취해서 광학현미경으로 암·수를 구분하였다. 성숙한 암컷의 난소 부위를 절개하여 Petri dish에 올려놓고 면도 칼날을 이용하여 난소 위를 바둑판무늬로 잘게 칼집을 내고 부드러운 붓으로 압박하여 알을 추출하였다. 분리된 알은 0.02 mM ammonium hydroxide의 멸균된 0.45 μ m-여과해수 일정량과 혼합하고, 망목의 크기가 100 μ m인 체로 거대불순물을 걸러주었다. 알과 여과해수 혼합액은 다시 망목의 크기가 40 μ m인 체로 알 이외의 미세 불순물을 제거한 후, 저속으로 원심분리(1000 R.P.M., 10 min.)하여 상등액 내의 잔여 불순물을 제거하였다(Choi et al., 1993). 이 후 정제된 흑진주조개 알은 -75°C에서 냉동시키고 동결건조기를 이용하여 냉동동결건조 하였다.

(3) 알 하나의 무게 산정

순수 정제된 흑진주조개 알은 일정량의 여과해수와 혼합시키고, subsample을 취하여 혈구계수기로 4회 반복 계수한 후, 전체 알의 수를 추정하였다. 계수된 흑진주조개 알은 -75°C에서 냉동시키고 Lyophilizer를 이용하여 동결건조(냉동건조, Lyophilization) 하였다. 알의 총건조중량을 측정하고, 총건조중량을 전체 알의 수로 나누어 흑진주조개 알 하나의 건조중량을 추정하였다.

$$\text{Egg dry weight} = \text{Total dry weight of eggs} / \text{Total number of eggs}$$

(4) 단백질 정량 (BCA protein assay reagent 사용)

동결건조된 흑진주조개 알 시료를 막자사발에서 1차 분쇄한 후, 분쇄된 시료 40 mg 과 Phosphate-Buffered Saline (PBS: 0.15 M NaCl, 0.003M KCl, 0.01 M NaH₂PO₄, 0.01 M KH₂PO₄, pH 7.4) 용액 10 ml를 15 ml 원심관에서 혼합하고, 초음파 파쇄기로 1분간 균질화시킴. 균질화된 시료-PBS 혼합액을 원심분리 (7000 R.P.M., 4°C, 30 min.)하여 상등액을 취한 후, 1 mg/ml 0.5 mg/ml로 각각 희석하여 2회 반복 실험하였다. 희석된 시료 0.1 ml를 각각 표지된 (label) 시험관에 옮기고, 시약 (BCA kit) 2.0 ml와 혼합한 뒤, 항온수조에서 37°C, 30분간 반응시켰다. 희석된 시료 및 표준단백질 0.1 ml와 시약 (BCA kit) 2.0 ml를 37°C에서 30분 반응시키고, 분광광도계 (562 nm)로 흡광도를 측정했다. 표준 단백질로 Bovine Serum Albumin (BSA ; 2.0 mg/ml)을 사용하였다. BSA를 100~1000 mg/ml로 희석하여, 시료와 동일한 방법으로, 시약과 반응시키고 각각의 흡광도를 측정한 후, standard curve를 구했다(Fig. ???). Standard curve를 이용하여 시료에 포함된 수용성 단백질의 함량을 추정하고, 시료의 전체 무게에 대한 퍼센트 값으로 환산하였다.

(5) 탄수화물 정량 [페놀-황산 정량법 (Dubois et al, 1956) 사용]

동결건조된 흑진주조개 알 시료를 일정량의 PBS와 혼합하고 (4 mg/ml) 초음파 파쇄기로 균질화시킴. 균질화된 시료-PBS 혼합액을 원심분리(7000 R.P.M., 4°C, 30 min.)하여 상등액을 취하고, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml로 각각 희석하여 2회 반복 실험했다. 희석된 시료 1 ml에 10% 페놀 1 ml를 반응시키고 다시, 황산 5 ml와 상온에서 10분간 반응시킨 후, 분광광도계 (485 nm)로 흡광도를 측정하였다. 표준 탄수화물로 10% soluble agar를 사용했다. Soluble agar를 50~500 mg/ml로 희석하여, 시료와 동일한 방법으로, 10% 페놀과 황산에 반응시키고 각각의 흡광도를 측정한 후, standard curve를 구하였다(Fig. ???). Standard curve를 이용하여 시료의 탄수화물 함량을 추정하고, 시료의 전체 무게에 대한 퍼센트 값으로 환산하였다.

(6) 총지질 정량 [크로로폼-메탄올 정량법 (Bligh and Dyer, 1959) 사용]

동결건조된 흑진주조개 알 시료 200 mg을 15 ml의 지질 추출 용매 (Bligh and Dyer, 1959)와 혼합한 뒤, 초음파 파쇄기로 균질화시켰다. 유기용매와 혼합된 시료에 크로로폼 4 ml를 넣고 반응시킨 후, 증류수 4 ml를 넣고 균질화하였다. 유리섬유필터지로 여과하여 불순을 제거하고, 메탄올-증류수 층과 크로로폼-지질층으로 분리될 때까지 상온에 보관하였다. 이 중 크로로폼-지질층을 취하여 실온에서 건조시킨 뒤, 전자저울을 이용하여 흑진주조개의 지질 함량을 측정하고 시료의 전체 무게에 대한 퍼센트 값으로 환산했다.

(7) 알의 peptide 분석을 위한 전기영동

알에 포함된 peptide는 SDS-Polyacrylamide Gel 상에서 분리하였다. 전기영동 Kit의 Stand를 설치하고, 7.5% Running Gel Solution 30 ml (Monomer solution ; 7.5 ml, 4× Running Gel Buffer ; 7.5 ml, 10 % SDS ; 0.3 ml, ddH₂O ; 14.6 ml, 10 % Ammonium Persulfate ; 150 μl, TEMED ; 10 μl)를 자력교반기에서 혼합하였다. Stand의 위쪽 끝에서 약 4 cm 가량 여유를 두고 Running Gel Solution을 부은 후, Water-Saturated n-Butanol 0.6 ml를 Running Gel 위에 따르고 Gel이 완전히 중화될 수 있도록 1-2시간가량 상온에 두었다. 4% Stacking Gel Solution 10 ml (Monomer solution ; 1.33 ml, 4× Stacking Gel Buffer ; 2.5 ml, 10 % SDS ; 0.1 ml, ddH₂O ; 6.0 ml, 10 % Ammonium Persulfate ; 50 μl, TEMED ; 5 μl)를 자력교반기에서 혼합하였다. Running Gel Overlay 용액을 따라내고, Stacking Gel Solution으로 Running Gel 표면을 씻어주었고, Stacking Gel Solution을 붓고 comb를 삽입한 후, 완전히 중화될 수 있도록 1시간가량 상온에 두었다. Marker protein으로 시판되고 있는 Sigma사의 High marker를 사용하였고, 동일량의 2×Treatment buffer 혼합하여 100°C에서 90초 동안 반응시키고 시료와 함께 주입 (loading)하였다. 동결건조된 흑진주조개 알 시료를 막자사발에서 1차 분쇄한 후, 분쇄된 시료 1 g과 PBS 용액 10 ml를 원심관에서 혼합하고 초음파 파쇄기로 1분간 균질화시켰다. 균질화된 시료-PBS 혼합액을 원심분리 (7000 R.P.M., 4°C, 30 min.)하여 상등액을 취하였다. 처리된 상등액 20 μl와 동일량의 2×Treatment Buffer를 시험관에 넣고 100°C에서 90초 동안 반응시켰다. Gel이 완전히 중화된 후, comb를 제거하고 well을 Tank Buffer로 씻어주었다. Well에 Tank buffer를 채우고 실험계획에 따라 시료-2×Treatment Buffer 혼합액 20 ml를 주입하였고, 사용하지 않는 well은 1× Treatment Buffer 20 ml를 주입하였다. Chamber 조립 후, 상부 chamber와 하부 chamber에 Tank Buffer를 채우고, 40-50 volt에서 약 13시간 동안 전기영동을 실시하였다. 염색은 염색 용액 (0.025% Coomassie Brilliant Blue R 250, 40% methanol, 7% acetic acid)에서 4시간 염색을 하였고, 탈색 용액 I (40% methanol, 7% acetic acid)에서 30분, 탈색 용액 II (7% acetic acid, 5% methanol)에서 4시간 탈색시켰다. Gel은 탈색 용액 II에 1% glycerol를 첨가한 용액에 건조 전까지 보관하였다.

(8) 알과 정자의 지방산 분석

흑진주조개 배우체인 알과 정자의 지방산 분석은 protocol에 따라 순수 정제된 시료를 사용하였다. 모든 시료는 분석 전까지 -70°C 에서 보관하고, 동결건조하여 각각의 무게를 측정 후 수행하였다.

지방분석에 사용되는 모든 유리용기는 증류수로 세척하여 450°C 에서 3시간 정도 태운 후, 혼합 유기용매[Dichloromethan:Methanol($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$)=1:1)]로 2~3번 세척하였다. 준비된 시료를 유리용기에 넣고, 혼합 유기용매($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ =1:1)를 첨가한 후, 약 10분간 초음파분해(bath sonication)하여 지방을 추출하였다(Bligh and Dyer 1959). 추출된 지방을 혼합 유기용매($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ =2:1)에 다시 용해시킨 후, 지방 class와 지방산 분석에 사용하였다. 추출된 적정량(약 $0.2\sim 1.0\ \mu\text{l}$)의 지방을 chromarod (Mitsubishi Kagaku Iatron)에 떨어뜨리고, 혼합 유기용매($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ =1:1)로 농축(focusing)시킨 후, 비극성 유기용매(Hexane:Diethyl ether:Formic acid=85:15:0.2)로 지방 class를 분리하였다. 이렇게 분리된 지방 class는 Iatroscan Mark-V TLC-FID(Thin-Layer Chromatography with Flame-Ionization Detector; IATRON LABORATORIES, Inc.)로 분석되어(Ju et al. 1997), 지방 class standard (Phospholipid: 1,2-Dipalmitoyl-rac-glycero-3-phosphocholine hydrate; Cholesterol: cholesterol; Free Fatty Acid: n-Nonadecanoate; Triacylglycerol: Glyceryl trioleate; Sigma-Aldrich Co.)와 비교하여 시료의 지방 함량과 class를 정성, 정량화하였다. 총 지방 함량은 각 지방 class 함량의 합으로 산출되었다.

지방산 분석을 위하여 추출된 지방의 적정량(약 $50\ \mu\text{l}$)에 $0.5\ \text{N}\ \text{KOH}/\text{MeOH}$ 를 넣고 70°C 에서 30분간 가열한 후, 혼합 유기용매(Hexane:Diethyl ether=9:1)로 알코올과 스테롤을 분리, 추출하였다. 추출하고 남은 용액에 염산을 넣어 KOH 를 침전시킨 후, 혼합 유기용매(Hexane:Diethyl ether=9:1)로 지방산을 추출하였다. 추출된 지방산에 BF_3/MeOH 를 첨가하고, 70°C 에서 30분 동안 가열하여 지방산메틸에스테르(Fatty Acid Methyl Ester)로 유도한 후, 추출 전에 첨가된 internal standard인 n-Nonadecanoic acid(동경화성공업주식회사)와 비교하여 gas chromatographyflame ionization detector(GC-FID; Agilent 7890A)로 정량 분석하였다. 지방산의 분리, 분석에는 GC-FID에 ZB-5MS column(길이 $60\ \text{m}$, 내경 $0.32\ \text{mm}$, 코팅된 내부 필름 두께 $0.25\ \mu\text{m}$; Phenomenex)을 사용하였다. 적용된 온도 조건은 시료 주입구 250°C , column 오븐은 50°C 에서 120°C 까지 $10^{\circ}\text{C}/\text{분}$, 120°C 에서 300°C 까지 $4^{\circ}\text{C}/\text{분}$ 으로 설정되었고, 이동상 가스는 헬륨($30\ \text{ml}/\text{분}$)을 사용하였다. 각 지방산의 구조(탄소수, 포화도, 이중결합 위치)는 GC-mass spectrometry detector(GC-MSD; Agilent 7890A GC-Agilent 5975C MSD)를 이용하여 $70\ \text{eV}$ 에서 원자 질량 $50\sim 700\ \text{amu}$ 범위에서 수행되었으며, 나머지 적용 조건(column, 온도, 이동상 가스)은 정량 분석시의 GC-FID와 동일하게 설정하였다. 지방산 성분 중 불포화지방산의 탄소 이중결합(double bond) 위치는 상업용 지방산 standard (Fatty acid methyl ester; FAME, unsaturated kit; Sigma-Aldrich Co.) 또

는 FAME을 fatty acid picolinyl ester로 전환하여 GC-MSD로 확인하였다(Destaillats and Angers 2002).

이 연구에서 지방산 명명은 총 탄소 개수와 이중결합 개수를 표기한 후, 메틸기 (-CH₃)의 탄소를 1번으로 하여 탄소가 이중결합(double bond)되어 있는 첫 번째 탄소 위치를 n 뒤에 숫자로 표기하였다(Table 2).

다. 결과 및 고찰

(1) 알의 무게

그림 1은 플랑크톤 계수용 슬라이드 상에서 촬영한 흑진주조개, *P. margaritifera*의 난소에서 추출·정제한 알의 모습이다. 이를 계수하고 알 하나의 무게를 측정된 결과, 흑진주조개가 포란한 알 하나의 무게는 14.31 ng이었다(그림 3-1-10, 표 3-1-3).

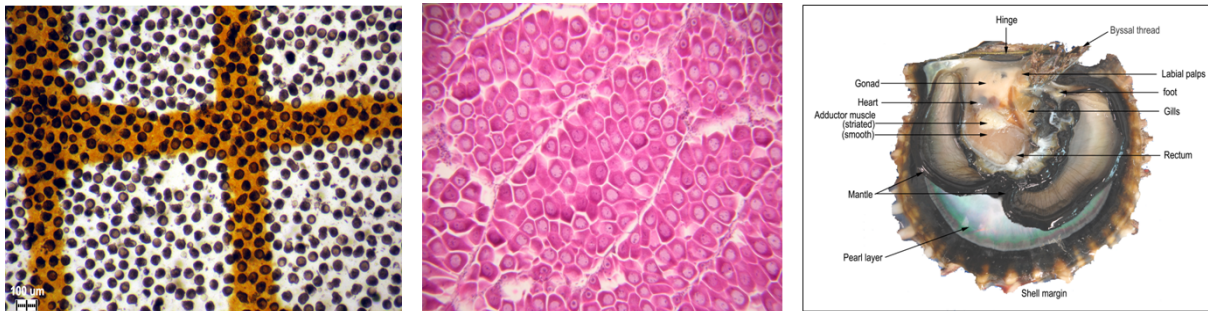


그림 3-1-10. 난소에서 정제된 알과 조직상의 난소 사진 및 흑진주조개의 해부도

대부분의 이매패류들의 알 하나의 무게와 유사하였으며, 그 중 우리나라에 서식하고 양식하는 종인 참굴(*Crassostrea gigas*)과 유사하였다. 조직학적 분석결과에서도 유사한 크기를 보이기도 했다(표 3-1-3).

표 3-1-3. 알 계수 및 무게 측정 결과

Dilution	Mean number of eggs
×32	2,205
×16	4,858
×8	7,033
×4	15,570
×2	36,040
1	72,080
Original 11 ml	1,585,760
Total weight	6.983
Tube weight	6.756
Egg dry weight	0.227
egg weight	14.31 ng

(2) 알의 생화학적 조성

표에서 보는 바와 같이 다른 이매패류들과 비교한 생화학적 조성을 보았을 때, 단백질의 함량은 유사한 반면 지방함량은 다른 종들보다 높은 경향을 나타냈으며, 반대로 탄수화물 함량은 낮은 수준을 보였다. 지방함량이 높다는 것은 상대적으로 높은 면역성을 갖고 있다는 것을 나타내며, 탄수화물함량이 낮은 것은 상대적으로 낮은 에너지를 가진 자패(juvenile)로 유도되어 일정한 시기(D-shaped or umbo stage)에 대량폐사는 일어날 수 있지만 생존한 자패와 치패(spat)의 경우에는 높은 생존율을 가질 수 있다는 것을 나타낸다. 이는 먹이조건이 상대적으로 낮은 열대지역의 특수한 적응 기작이라고 볼 수 있다.

표 3-1-4. 알 하나의 무게 및 알이 가지는 단백질, 지방, 탄수화물 함량의 비교

Species	Egg dry-weight in ng	Percentage of Protein (%)	Percentage of Lipid (%)	Percentage of CHO (%)	References
<i>Crassostrea virginica</i>	12	50	21	9	Lee & Hefferenan (1991)
<i>Mercenaria mercenaria</i>	51	40	14	8	Lee & Hefferenan (1991)
<i>C. gigas</i> (Portugal strain)	-	44-74	16-38	7-12	Massapina et al. (1999)
<i>C. gigas</i> (Korea)	13	41	3.3(25.5)	11.7	Kang et al. (2003)
<i>Ruditapes philippinarum</i>	22	41	-	-	Park & Choi (2008)
<i>Saxidomus purpuratus</i>	95	37	11.4	10.83	Park & Choi (2003)
<i>Pinctada margaritifera</i>	14.3	45.5	21.5	5.8	Present study

(3) 알의 지방산 조성

지방산을 포화도에 따라 그룹화하면, 포화지방산(Saturated fatty acids; SAFA), 단일불포화지방산(Monounsaturated fatty acids; MUFAs), 다불포화지방산(Polyunsaturated fatty acids; PUFAs)으로 나눌 수 있다. 산란 직전의 성숙기 알의 지방산 함량은 지방산의 종류에 따라 16:0(palmitic acid)를 포함한 SAFAs가 시료에서 총 지방산의 44.92%로 가장 우점하였으며, 22:6(n-3)(Docosapentaenoic acid; DHA)을 포함한 PUFAs가 총 지방산의 31.23%로 그 다음 우점하였다. 단일불포화지방산이 19.53%로 가장 낮게 나타났으며, 이 중 18:1(n-9)(Oleic acid)는 정자보다는 알에 더 많이 함유되어 있었다. 포화지방산 중 Palmitic acid는 식물 기원의 지방산으로서 부유성 식물플랑크톤 및 저서성 규조류 등을 섭취한 증거로서 볼 수 있다.

정자의 지방산 함량은 22:6(n-3)(Docosapentaenoic acid; DHA)을 포함한 PUFAs가 총 지방산의 55.22%로 가장 우점하였다. 그 다음으로 16:0(palmitic acid)를 포함한 SAFAs가 시료에서 총 지방산의 26.84%로 우점하였으며, 단일불포화지방산이 10.57%로 가장 낮게 나

타났으며, 이 중 calanoid 요각류에 의해 주로 합성되는 것으로 알려져 있는(Lee et al. 1971) 20:1(n-11)은 알보다 정자에 더 많이 함유되어 있었다. 정자의 지방산 함량 중 특이한 것은 DHA 농도가 높다는 것인데, 이는 이매패류 번식에 가장 중요한 지방산이기도 하다. 일반적으로 sterol과 PUFAs는 이매패류 성체의 번식 및 유생의 생존에 중요한 요소로 작용한다. 이 연구결과는 흑진주조개 유생의 대량폐사 시기에 자패 또는 치패의 지방산 조성을 추적하는데 기본 자료로 사용하였다.

표 3-1-5. 성숙한 흑진주조개 알 및 정자에 포함된 지방산 함량.

Fatty acids	Pearl oyster egg	Pearl oyster sperm
<i>n-Saturates</i>		
14:0	6.28	0.40
16:0	29.10	16.63
18:0	9.08	9.60
Others ¹	0.46	0.20
Total abundance(%)	44.92	26.84
<i>Monounsaturates</i>		
16:1(n-9)	0.27	ND
16:1(n-7)	3.07	0.28
16:1(n-3)	0.19	ND
18:1(n-9)	8.72	4.10
18:1(n-7)	1.98	0.88
20:1(n-11)	3.92	4.45
24:1	0.24	0.28
Others ²	1.13	0.58
Total abundance(%)	19.53	10.57
<i>Polyunsaturates</i>		
16:4(n-1)	0.03	ND
18:2(n-6)	3.53	2.75
18:3(n-6)	0.47	0.30
18:4(n-3)	2.52	0.53
20:4(n-6)	1.19	3.73
20:4(n-3)	0.98	0.18
20:5(n-3)	4.02	6.59
22:5(n-6)	1.20	3.48
22:6(n-3)	16.15	37.14
Others ³	1.14	0.52
Total abundance(%)	31.23	55.22
<i>Branched & Odd chain</i>		
Total abundance(%)	4.32	7.37
Total abundance(%)	4.32	7.37
Total concentration (ug/mg-dry wt.)	74.19	17.65

제2절 흑진주조개 배우체의 항체 개발 및 번식량 측정

1. 알과 정자의 항체 개발

가. 서론

흑진주조개, *P. margaritifera* (Linnaeus, 1758) 는 인도-태평양 산호초 지역에 널리 서식하며 그 중 프랑스령 폴리네시아 산호초 지역에 많이 서식한다 (Pouvreau et al. 2000, Southgate and Lucas 2008). 흑진주조개는 다른 종(species)들보다 크기가 커서 더 큰 진주를 생산할 수 있는 장점이 있다 (Pouvreau et al. 2000). 흑진주 조개(*P. margaritifera*) 양식을 근간으로 한 흑진주 생산은 남태평양 도서 국가에서 가장 중요한 산업 중 하나이며, 현재 흑진주 양식은 프랑스령 폴리네시아의 주된 경제적 역할을 하고 있으며, 연평균 생산량은 6 MT (US \$ 175,000,000)이다 (Pouvreau et al. 2000). 흑진주 생산량의 증가는 흑진주조개 모패의 수요를 급격히 증가시켰으며, 이는 흑진주조개 자원량의 감소를 야기 시켰다 (Kang et al. 2005).

흑진주생산을 위한 모패의 안정적 공급은 Chuuk State의 진주양식 산업에 있어 가장 시급한 일 중의 하나로 간주된다. 현재 Chuuk State의 흑진주조개의 양식방법은 자연산 흑진주조개로부터 방출된 부유치패를 채묘하는 자연채묘 방식을 주로 사용하고 있으나, 양식 산업을 위한 충분한 양의 치패를 확보함에 있어 어려움을 겪고 있다 (Arnaud-Haond et al. 2003, Kang et al. 2005). 따라서 흑진주조개 치패의 안정적 공급을 위하여 인공종묘 생산을 통한 치패 생산 필요성이 높게 인식되고 있으나, 생활사 및 번식생리 등에 관한 기초연구 부족으로 흑진주조개의 인공종묘생산은 아직까지 성공적으로 이루어지지 않고 있다 (Kang et al. 2005). 열대지역에 분포하는 이매패류의 번식에 관한 연구는 온대지역의 이매패류에 비하여 매우 빈약하기 때문에, 열대 이매패류의 번식전략이나 생리에 관한 정보는 절대적으로 부족한 실정이다.

성공적인 흑진주조개 자원관리를 위해서는 우량종묘의 생산을 위한 모패의 번식생리학적 연구가 반드시 선행되어야 하며, 이는 모패의 연중 생식주기 파악 및 산란시기 예측과 같은 정성적인 연구와 모패로부터 생산되는 알과 정자의 정량적 측정, 즉 포란수 (reproductive effort 또는 fecundity) 측정 등의 연구를 말한다. 포란수 측정에 관한 연구는 이를 측정하는 방법상의 어려움 때문에 정성적인 연구에 비하여 그 연구가 매우 저조한 실정이다. 이는 다른 동물과 달리 대부분의 이매패류는 알을 포함하는 생식소(ovary or testis)가 물리적으로 분리되지 않고 외투막 및 소화맹낭에 포함되어 있으며, 이매패류의 포란수가 수백만 또는 수천만 개에 이르기 때문이다 (Park and Choi 2004).

패류의 포란수 또는 번식량 측정은 양식종의 생활사 및 자원관리 측면에서 필수적인

생물학적 정보로 간주된다. 그러나 이에 관한 연구는 세계적으로 거의 이루어 지지 못하고 있는 실정이다. 이는 번식량을 측정하는 기술에 관한 문제로, 연구대상 종의 알 단백질에 대한 특정 항체를 개발, 항체면역효소측정법 (ELISA)를 이용하면 이러한 문제를 해결할 수 있다. 이는 Choi et al. (1993), Kang et al. (2003), Park et al. (2003; 2004; 2006) 등의 선행연구에서 세계적으로 입증된 바 있다.

북반구에 위치한 Federated State of Micronesia의 Chuuk State에 서식하는 흑진주조개 개체군의 연중 생식소발달과 산란시기의 규명은 개체군동태 및 자원의 효율적 관리에 있어 매우 중요한 자료이다. 그러나 이러한 중요성에도 불구하고 흑진주조개의 서식지역별 번식생물학적 특성에 관한 연구는 전무한 실정이다. 그러므로 이 연구는 Chuuk State에서 모패로 양성된 *P. margaritifera*의 알에 포함된 특정 난황단백질의 특성을 파악하고, 다클론항체를 개발하여 흑진주조개 번식량을 정량화 하는데 있다.

나. 재료 및 방법

(1) 흑진주조개 채집 및 Egg 분리

흑진주조개 (Black lip pearl oyster, BLP oyster)의 채집은 다음과 같이 실시 되었다. 먼저 흑진주조개 난 단백질에 특이적인 항체를 개발하기 위해, 2008년 4월 Chuuk State, Federated State of Micronesia에 위치한 한남태평양해양연구센터 (Korea-South Pacific Ocean Research Center, KSORC)에서 양성되고 있는 암컷 흑진주조개 30개체를 채집하였다 (Fig. 1). 채집된 30개체의 흑진주조개의 껍데기를 제거한 후, 주사기를 이용해 생식소 조직의 일부를 취해 광학 현미경으로 암, 수를 구분하였다. 성숙한 암컷의 난소 부위를 절개하여 페트리 디쉬 (Petri dish)에서 조직을 압박하여 알을 추출하였다. 알과 알 사이의 응집 혹은 조직 찌꺼기와와의 응집되는 현상을 방지하기 위하여 추출된 알에 0.02 mM 암모니아 용액 (ammonium hydroxide)을 포함하는 해수 (0.45 μm 여과 및 멸균처리 됨)와 혼합하고, 망목의 크기가 100 μm 와 40 μm 인 체로 알 이외의 거대 불순물과 미세 불순물을 제거하였다. 불순물들이 제거된 여과액을 저속으로 원심분리 (700 rpm, 10분)하여 상등액 내의 잔여 불순물을 현미경하에서 확인하며 완전히 제거 될 때까지 원심분리과정을 5회 반복하였다 (Park et al. 2003). 이 후 정제된 흑진주조개 알은 -75°C 에서 냉동한 후 동결건조기를 이용하여 동결 건조하였다. 동결건조를 마친 알은 막자 사발을 이용하여 분말 (egg powder)을 만들고 -20°C 에 보관하였다.

(2) 흑진주조개 Egg의 생화학 조성분 분석

(가) 총 탄수화물 함량 분석

총 탄수화물 함량 분석은 Taylor (1955)의 Phenol & Sulfuric acid 방법을 이용하였다.

동결건조 된 egg powder와 phosphate buffered saline (0.15 M NaCl, pH 7.4, PBS)를 혼합하여 초음파 파쇄기로 균질화 한 후 8,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 이후 상등액에 10% Phenol과 황산용액을 첨가하여 발색 시킨 뒤 spectrophotometer를 이용해 490nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 Dextrose anhydrous를 50-1000 ug/ml 농도로 희석하여 standard 로 이용하였고, 표준물질 농도와 흡광도와의 상관식에 따라 시료의 총 탄수화물 함량 (mg/g Tissue Dry Weight, TDW)을 구하였다.

(나) 총 단백질 함량 분석

총 단백질 함량 분석은 동결건조 된 egg powder를 0.1M NaOH 용액에 반응 시킨 뒤, 37°C에서 2시간 incubation 한 후, 8,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 취한 뒤, 이 상등액을 BCA protein assay kit (Pierce, 23227)에 따라 준비하고 562nm 파장에서 흡광도를 측정하여 분석하였다. 표준물질은 BSA (bovine serum albumin)를 50-1000 ug/ml 농도로 준비하여 표준물질 흡광도와의 상관식에 따라 시료의 총 단백질 함량 (mg/g TDW)을 표시하였다 (Park et al. 2006).

(다) 총 지방 함량 분석

총 지방 함량 분석은 동결건조 된 egg powder에 Chloroform과 Methanol의 혼합액을 넣어 시료의 총 지방을 추출해 내었다. 이후 0.9% NaCl을 첨가하여 Chloroform + Lipid층과 Methanol + Water층의 두 층으로 나누고 위쪽에 위치하는 Methanol + Water층을 버리고 지방이 포함되어 있는 Chloroform층을 취하였다. 지방을 함유한 Chloroform을 알루미늄 dish에 붓고 건조기에서 하루 동안 건조하여 Chloroform을 제거하였다. 이후 dish의 무게를 빼주어 지방의 양 (mg/g TDW)을 측정하였다 (Bligh and Dyer 1959).

(라) Ash 함량 분석

Ash 함량 분석은 다음과 같이 진행 되었다. 빈 도가니의 무게를 재고, 동결건조 된 egg powder를 도가니에 넣어준 후, muffle furnace에서 450°C로 24시간 동안 태웠다. 이후, 무게를 재고 처음 도가니의 무게를 빼주어 Ash의 함량을 결정 하였다.

(3) 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체 개발

(가) 토끼 면역과정 (Immunization procedure)

정량적인 번식량 추정에 사용할 항체 개발을 위해 순수 분리한 흑진주조개 egg powder를 PBS에 단백질 농도가 0.5 mg/ml가 되도록 준비하였다. 준비된 흑진주 조개 알 단백질 추출물 0.5 ml와 같은 양의 Freund's Complete Adjuvant (FCA)를 혼합하여 총 1 ml

의 항원을 준비하고, 토끼의 등 피하에 4-5군데에 나누어 주사를 하였다. 첫 주사 전에 토끼의 귀동맥에서 혈액을 채취하여 negative control 로 저장하였다. 첫 주사 2주 후, 동일한 항원 단백질과 Freund's Incomplete Adjuvant (FIA)를 혼합하여 주사하여 주었으며, 일주일 간격으로 총 4차례 주사를 하였다 (Table 3-2-1). Table 3-2-1은 토끼 면역 과정을 나타내는 표로 각 Test bleeding은 항체의 역가를 평가하기 위해 사용되었다.

Table 3-2-1. 항원-항체 반응을 위한 면역학적 실험과정 Immunization procedure

Time	Procedure	Dose of antigen
1 st day	Control serum	Test bleeding
1 st day	First injection	500 μ g/ml egg protein + FCA *
2 weeks	1 st booster	Test bleeding
4 weeks	2 nd booster	250 μ g/ml egg protein + FIA **
5 weeks	3 rd booster	250 μ g/ml egg protein + FIA **
7 weeks	4 th booster	250 μ g/ml egg protein + FIA **
8 weeks	1 st bleeding	Bleeding
9 weeks	2 nd bleeding	Bleeding

*FCA: Freund's complete adjuvant, **FIA: Freund's incomplete adjuvant

(나) Heammaglutination test

혈청 내 항체의 존재유무와 항체 역가를 알아보기 위해 혈구응집반응실험을 실시하였다. 실험에 사용된 혈액은 사람의 혈액에서 분리한 적혈구를 이용하였다. 혈액 (Human)을 EDTA or Heparin이 처리된 tube에 3ml 정도 채혈하였다. PBS로 3회 세척하고 원심분리하여 적혈구 (RBC, red blood cells)를 분리해 내었다. 분리해낸 적혈구는 1%가 되도록 PBS에 재 부유시킨 뒤 1% formalin을 RBC에 첨가하여 적혈구를 안정화 시켰다. 이 후 formalin이 처리된 1% RBC와 0.05 mg/ml tannic acid를 1:1로 혼합하였다. 타닌산이 코팅된 적혈구에 항원인 흑진주조개 알 단백질 추출물을 동일량 첨가한 뒤 10분간 상온에서 배양하였다. 이후, 흑진주조개 난 단백질에 특이적으로 반응하는 항체를 100배 희석한 뒤 56°C에서 30분간 열처리를 하여 complement를 비활성화 시킨다. 최종적으로 96-well plate에 항체를 이배수로 희석 (0-2048 배) 한 뒤, 준비된 적혈구를 10 μ l씩 분주하고 3시간 후 응집반응을 관찰하였다 (그림 3-2-1).

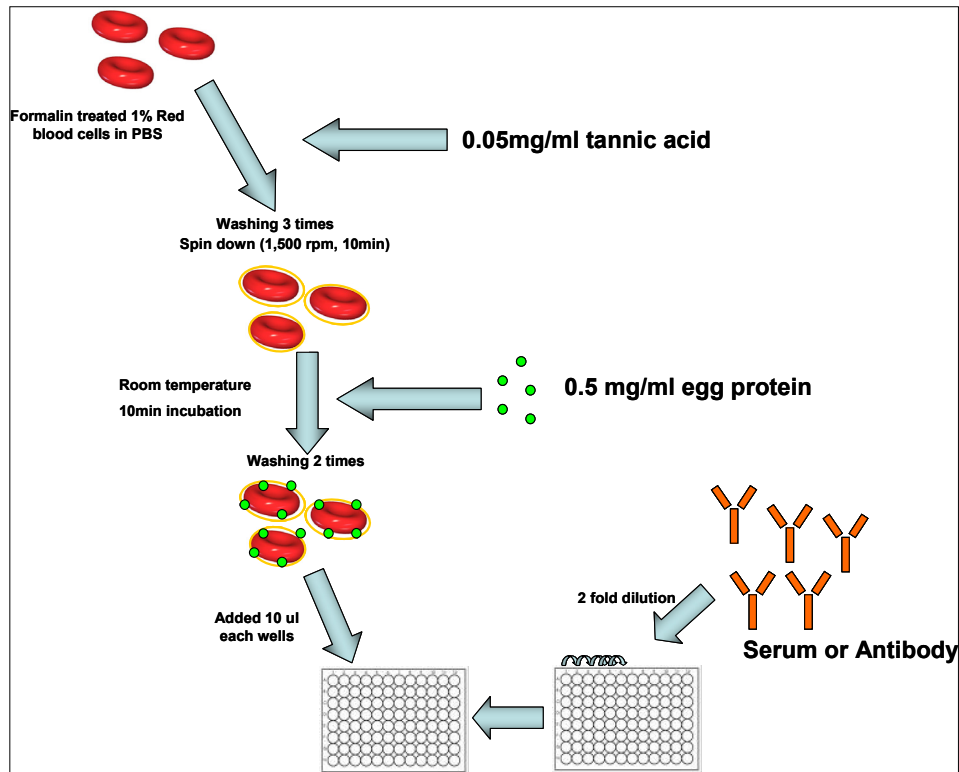


그림 3-2-1. 혈구응집 반응의 순서도 Steps involved in haemagglutination test.

(다) 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체 특이성과 민감도 측정

이 연구에서 개발된 항체의 특이성과 민감도는 각각 western blotting과 indirect-ELISA를 이용해 평가 되었다. 각각의 실험 방법은 아래에 기술하였다. 토끼로부터 얻은 혈액에서 분리한 항혈청의 흑진주조개 난 단백질에 대한 특이성과 민감도 평가 결과, 항혈청내에 흑진주조개 난 단백질 외에 기타 조직 단백질과 반응하는 항체가 있는 것을 확인하였다. 따라서 이러한 교차반응을 제거하기 위해 면역흡착제(Immunoabsorbent)를 준비하여 항혈청내 비특이적인 항체를 제거하고 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체를 얻었다.

(라) 면역흡착제 (Immunoabsorbent)를 이용한 비특이적 항원-항체 반응 제거 및 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체 분리

알 이외의 조직 세포와의 교차반응은 번식량을 측정하는데 과대평가의 요인으로 작용한다. 흑진주조개의 경우 연중산란 습성을 갖고 있어 난을 포함하지 않는 indifferent 단계의 개체를 사용할 수 없기 때문에 수컷의 개체를 사용하여 수컷 개체 추출물이 결합된 glutaraldehyde 면역 흡착제를 사용하여 교차반응을 제거 하였다. 교차반응이 제거된 혈청에서 IgG를 분리하기 혈청에 40% 포화된 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 4°C에서 6시간동안 반응시켜 IgG를 침전시켰다. 침전된 IgG는 4000rpm에서 30분간 원심 분리한 뒤, dialysis tubing을 이용

하여 하루 동안 투석, ammonia sulfate를 제거하였다.

(마) Western blotting

흑진주조개 알 단백질이 갖는 분자의 특성을 알아보기 위해 SDS-PAGE와 Western blotting을 수행하였다. 이를 위하여 흑진주조개의 알과 체 조직 (foot, gill, mantle, muscle), 소화맹낭, 수컷 생식소로부터 단백질을 추출 (2ug/ml) 한 뒤, 이를 SDS-PAGE 에 10 ul 씩 분주하였다. 전기영동을 통하여 분리된 결과는 PVDF membrane (PIERCE, 88114)에 transfer 하였다. PVDF membrane은 5% skim milk in TBS-T (tris buffered saline solution containing tween 20, blocking buffer)에 한 시간 blocking 한 뒤, 이 연구에서 개발된 흑진주조개 항체를 3.1 µg/ml 농도로 blocking buffer에 희석하여 2시간 동안 반응 시켰다. 2차 항체는 goat anti-Rabbit IgG (HRP, KOMA) 0.3 µg/ml로, PVDF membrane에 한 시간 동안 반응 시킨 뒤, peroxidase와 luminol을 1:1로 희석하여 membrane에 반응시킨 암실에서 ECL반응을 30초 간격으로 3분간 촬영하였다.

(바) 항체면역효소측정법 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

항원 단백질로 흑진주조개 알 단백질과 대조구로 수컷에서 추출된 단백질을 이용하였다. 차반응 제거 전에는 알 단백질의 농도를 18ug/ml, 수컷 개체 조직 추출물 22.5ug/ml를 2배수 희석하였었고, 교차반응 제거 후에는 알 단백질 농도를 20ug/ml, 수컷 개체 조직 추출물 20ug/ml를 2배수 희석하여 항원 단백질로 사용하였다. 희석된 항원 단백질을 Polystyrene 96-well ELISA microplate에 100ul씩 넣은 후, 4°C에서 over night 반응하였다. 이 후, 1차 항체 6.3ug/ml를 100ul씩 분주하고 1시간 반응시키고, 2차 항체로 1ug/ml Goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase-conjugated 100ul씩 분주한 뒤, 1시간 반응시켰다. p-nitrophenylphosphate (pNPP)를 발색시약으로 사용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

(사) Immunofluorence staining

조직슬라이드는 xylene을 이용하여 파라핀을 제거하였고, 알코올 탈수과정을 거쳐 PBS-T로 치환한 뒤, 5% BSA에 1시간 배양하였다. 개발된 항체는 5% BSA에 31.0 µg/ml로 희석하여 1차 항체로 2시간동안 반응시킨 뒤, negative control로 pre-immune rabbit serum (2 µg/ml) 을 이용하였다. 2차 항체는 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rabbit IgG (2.5 µg/ml)를 이용, 최종적으로 형광 현미경 하에서 관찰 하였다.

(4) 흑진주조개 정자 특이적인 항체 개발

(가) 정자 분리

흑진주조개 정자 특이적인 항체를 제작하기 위해 2008년 12월경 Federated State of

Micronesia 에 위치한 Chuuk State의 한 · 남태평양해양연구센터에서 양성하고 있는 성숙기의 흑진주조개 10개체를 채집하였다. 채집 된 흑진주조개의 패각을 제거한 후, 생식소 조직의 일부를 취해서 광학 현미경으로 암,수를 구분하였다. 성숙한 수컷의 정소 부위를 절개하여 페트리 디쉬 (Petri dish)에서 조직을 압박하여 정자를 추출하였다. 조직찌꺼기와 응집되는 현상을 방지하기 위하여 추출된 정자를 0.02 mM 암모니아 수용액 (ammonium hydroxide)을 포함한 해수 (0.45 μm여과 및 멸균처리 됨)와 혼합하고, 망목의 크기가 100 μm와40 μm인 체로 정자 이외의 거대 불순물과 미세 불순물을 제거하였다. 불순물들을 제거한 여과액을 저속으로 3회 원심분리(700 rpm, 10분)하여 여과액 내의 잔여 불순물을 제거 후 4000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 버리고 정자를 모았다. 이 후 정제된 흑진주조개 정자는 -70 °C에서 냉동 한 후 동결건조기를 이용하여 동결 건조하였다.

(나) 항체 개발 (Immunization procedure)

정량적인 번식량 측정에 사용할 항체 개발을 위해 순수 분리한 흑진주조개 정자 분말 (sperm powder)을 PBS용액에 단백질 농도가 0.5 mg/ml가 되도록 준비하였다. 준비된 흑진주조개 정자 단백질 추출물 0.5 ml와 같은 양의 Freund's complete adjuvant (FCA)를 혼합하여 총 1 ml의 항원을 준비하고, 토끼에게 주사하였다. 첫 면역전 토끼의 귀 동맥에서 혈액을 채취하여 이를 negative control 로 이용하였다. 첫 면역 2주 후, 0.25 mg/ml의 동일한 항원 단백질 0.5 ml과 Freund's incomplete adjuvant (FIA)를 동량 혼합하여 주사하였으며, 일주일 간격으로 총 5차례 주사 하였다 (표 3-2-2). 마지막 면역 주사 1주후부터 총 4차례에 걸쳐 토끼의 귀동맥에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리해 -70 °C에 보관하였다.

표 3-2-2. 이 연구에서 사용한 실험동물 이용, 항체 형성과정.

Time	Procedure	Dose of antigen		
Cont. serum	14, 22, January	Control	Bleeding	
Initial day	28, January	First injection	500 μg/ml egg protein + FCA *	
1 weeks	4, February		Test bleeding	
2 weeks	11, February	1 st booster	250 μg/ml egg protein + FIA **	
3 weeks	18, February		Test bleeding	
4 weeks	25, February	2 nd booster	Test bleeding	250 μg/ml egg protein + FIA **
6 weeks	11, March	3 rd booster	Test bleeding	250 μg/ml egg protein + FIA **
9 weeks	1, Aprill	4 th booster	Test bleeding	250 μg/ml egg protein + FIA **
12 weeks	24, Aprill	5 th booster		250 μg/ml egg protein + FIA **
14 weeks	2, May	1 st bleeding		
15 weeks	8, May	2 nd bleeding		
16 weeks	16, May	3 rd bleeding		
17 weeks	21, May	Last bleeding		

*FCA: Freund's complete adjuvant, **FIA: Freund's incomplete adjuvant

(다) 면역흡착제를 이용한 비특이적 항원-항체 반응 제거 및 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체 분리

분리된 항혈청을 이용하여 western blotting 수행한 결과, 정자 이외의 조직 세포와의 비 특이적인 반응이 미약하게 있는 것을 확인하였다 (Fig. 18A). 따라서 정자 이외의 조직 세포와 반응하는 비 특이적인 항체를 제거하기 위해 정자를 포함하지 않는 흑진주조개 암컷의 개체를 사용하여 암컷 개체 추출물로 면역 흡착제 (immunoabsorbent)를 제작하여 교차반응을 제거 하였다. 교차반응을 제거하는 과정은 흑진주조개 난 단백질 특히 항체 개발과 동일한 과정을 거쳐 수행되었다.

(라) 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체의 특이성 측정 (Western blotting)

개발한 정자 항체의 특이성을 확인하기 위하여, 항혈청과 개발된 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체를 western blotting을 이용해 확인하였다. 흑진주조개의 정자 분말 (sperm powder)과 체조직 분말 (egg, foot, gill, mantle, digestive gland)을 1xPBS에 녹여 초음파 분쇄하여 상등액을 취하고 단백질 농도가 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 가 되도록 희석하였다. Western blotting 과정은 흑진주조개 난 단백질 특이성 조사에 이용된 과정과 같은 방법으로 수행하였다.

(마) Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)를 이용한 항체 민감도 측정

2차년도 연구에서 개발된 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체의 민감도를 확인하기 위해 indirect ELISA를 실시하였다. 흑진주조개의 정자 분말 (sperm powder)과 체조직 분말 (egg, foot, gill, mantle, digestive gland)을 PBS 용액에 첨가한 뒤 초음파 분쇄하여 상등액을 취하고 단백질 농도가 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 희석하여 항원 단백질로 사용하였다. 준비된 단백질을 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 열처리하여 변성을 시켜준 후, polystyrene 96-well ELISA microplate에 2배수 희석을 2반복으로 해 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 over night 반응 시키고, TBS-T (Tris buffer saline containing 0.05% tween-20, washing buffer)로 5회 세척하였다. 5% skim milk in TBS-T (blocking buffer)를 150 μl 넣고 상온에서 1시간 동안 blocking을 하였고, 전과 동일한 방법으로 세척하였다. 1차 항체로 2차년도 연구에서 개발한 항체 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 blocking buffer에 희석하여 100 μl 씩 분주하고 상온에서 1시간 반응시키고 세척 후, 2차 항체로 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase - conjugated를 washing buffer에 희석하여 100 μl 씩 분주하고 1시간 반응시켰다. 발색기질로 p-nitrophenylphosphate (pNPP)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) 흑진주조개 Egg의 항체개발

(가) 흑진주조개 Egg의 생화학 조성분 분석

흑진주조개 Egg의 생화학 조성분 분석 결과 표 3-2-3에서 보는 바와 같이 총 단백질 함량 45.5%, 총 탄수화물 함량 5.8%, 총 지방 함량 21.5%, 무기질 함량 11.5%의 범위를 나타내었다.

표 3-2-3. 흑진주조개 알의 생화학적 특성.

	Total protein	Total carbohydrate	Total lipid	Total ash
Percentage (%)	45.5	5.8	21.5	11.5

(2) Heammagglutination test

혈청 내 항체의 존재 유무와 역가를 알아보기 위해 실시 된 항체응집반응 실험의 결과 그림 3-2-2에서 보는 바와 같았다. Control로 사용 된 항원단백질의 주사 전 채취한 혈청인 initial day와 주사 2주 후에는 항체-항원 응집반응이 없어 적혈구가 바닥에 모이는 점 형태를 띄었고, 4주 후부터는 항체-항원 응집반응이 보이면서 항체 역가가 증가하는 것을 볼 수 있었다. 8주 후에는 항체 역가가 1:1600으로 희석하였을 때까지 반응을 보이는 높은 민감도를 나타내었다 (그림 3-2-2).

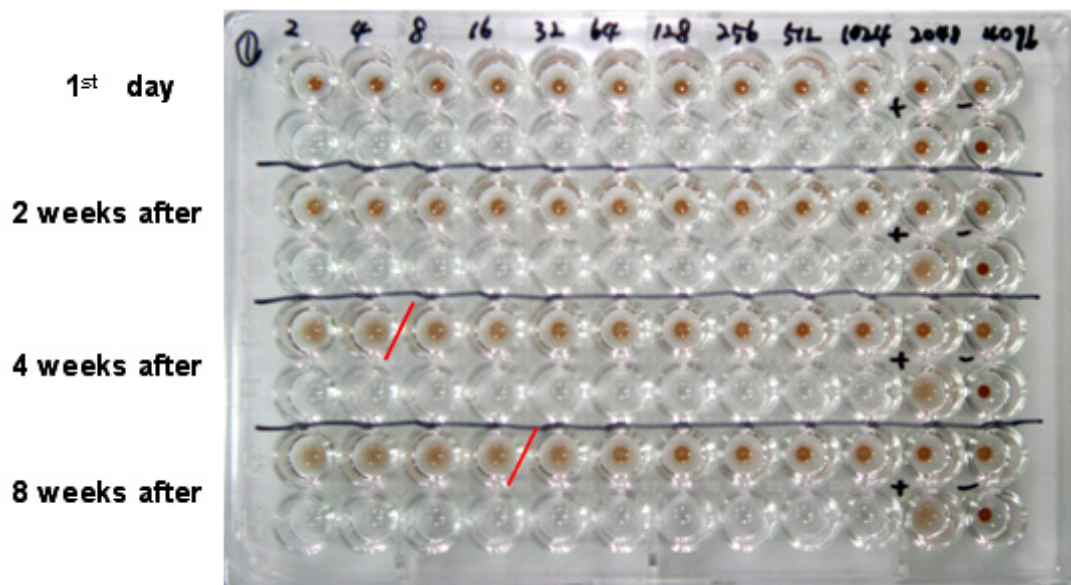


그림 3-2-2. 항원-항체 혈구응집반응의 모습

③ Western blotting

난 단백질의 분자량적 특성과 난 단백질 이외에 기타 조직과의 교차반응 유무를 알아보기 위해 실시한 Western blotting은 교차반응 제거 전, 후에 이루어 졌다 (그림 3-2-3). 난 단백질을 구성하는 펩타이드로서는 524, 283, 154, 96, 74, 69, 41, 36, 34 그리고 22 kDa정도로 추정되며, 그림 3-2-3A에서 보는 바와 같이 교차반응 제거 전에 난 단백질 이외의 기타 조직들과 교차반응을 보였지만, 교차반응 제거 과정 후, 그림 3-2-3B에서처럼 난 단백질을 제외한 기타조직들과의 교차반응이 제거되었음을 확인하였다.

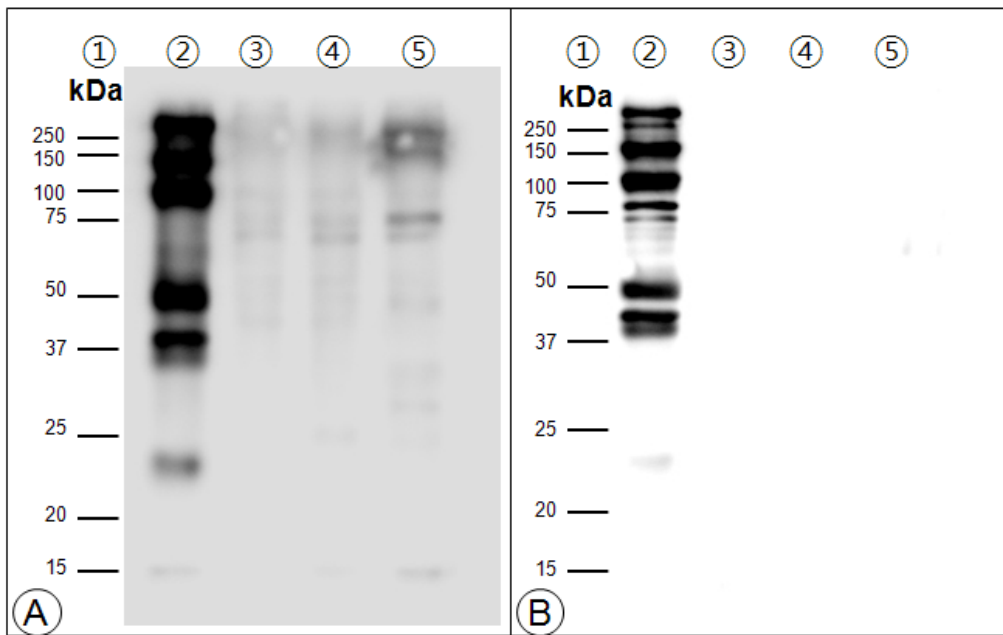


그림 3-2-3. 난 단백질의 분자량적 특성과 난 단백질 이외에 기타 조직과의 교차반응 유무를 알아보기 위해 실시한 western blotting의 교차반응 제거 전, 후 분자량 모습.

④ ELISA

흑진주조개 난 단백질에 특이적인 항체가 어느 정도의 민감도가 있는지, 알 이외의 비 특정 세포와의 교차반응이 있는지 알아보기 위해 교차반응 제거 전, 후로 ELISA 분석을 실시하였다. 최종적으로 교차반응을 제거한 항원-항체 반응은 ELISA assay 에서 0.07-20 ug/ml egg protein 이었으며, negative control에서는 항원-항체 반응이 나타나지 않았다(그림 3-2-4).

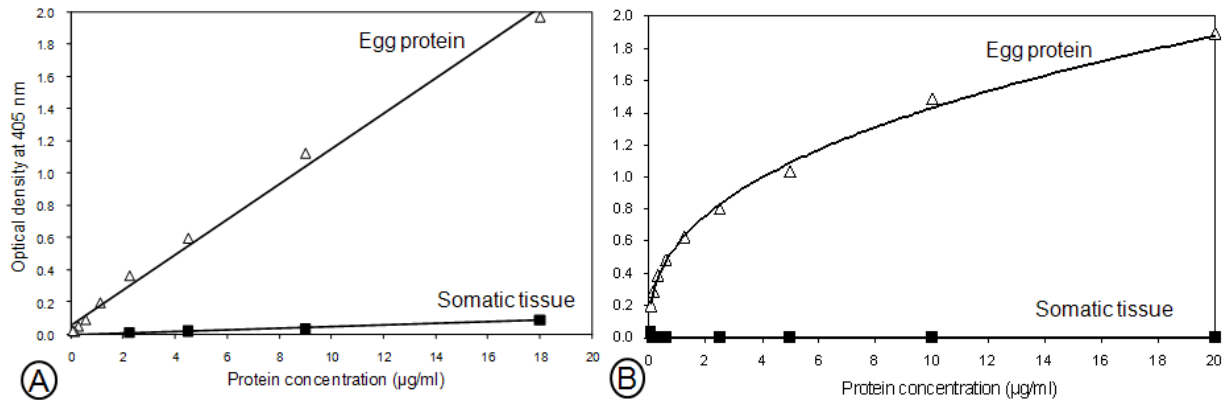


그림 3-2-4. 교차반응 제거 전, 후(A, B)의 ELISA 분석 결과. Titration curve of the antigen-antibody reaction in ELISA.

⑤ Immunofluorescence staining

흑진주조개의 조직 슬라이드 상에서 개발된 항체가 난 단백질에 특이적으로 반응하는지 알아보기 위하여 Immunofluorescence staining을 실시하여 형광현미경 하에서 관찰하였다. 관찰 결과 그림 3-2-5에서 보는 바와 같이 개발된 항체는 흑진주 조개의 알 중에서도 알의 단백질 부분에 붙는 것을 면역형광법으로 확인 할 수 있었다.

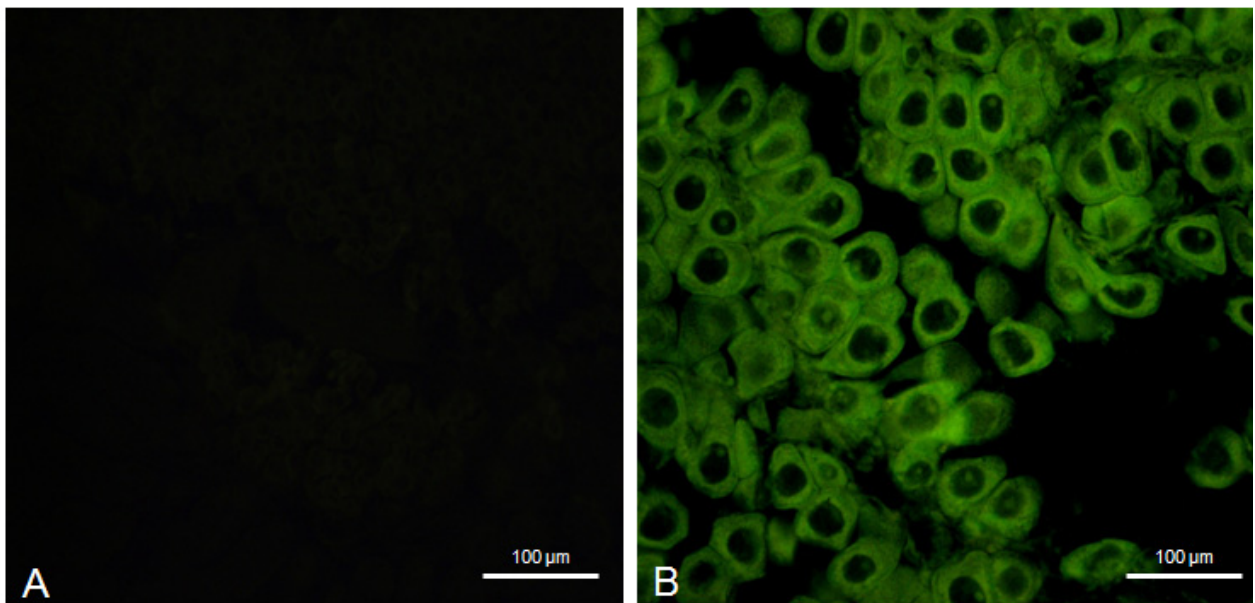


그림 3-2-5. 흑진주조개의 조직 슬라이드 상에서 개발된 항체가 난 단백질에 특이적으로 반응하는지 알아보기 위한 면역형광염색 실시 결과. Scale bar: 100 µm. Localization of *P. margaritifera* egg protein using anti-BLP oyster egg protein specific IgG applied on matured female using immunofluorescence assay. (A) negative control, (B) positive control. Scale bar: 100 µm.

나. 흑진주조개 (*P. margaritifera*) 정자에 대한 항체 개발

(1) Western blotting

흑진주조개로부터 분리한 정자 분말을 PBS에 녹여 단백질량을 측정하였을 때, PBS에 녹는 수용성 단백질의 양은 3-12 %의 범위를 나타내었다. 정자 단백질을 항원으로 토끼의 피하 조직에 첫 번째 주사 후, 5차례 boosting을 실시하고 마지막 boosting 1주 후, 2주 후, 3주 후에 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였다 (표 3-2-2). 그림 3-2-6은 분리된 항혈청의 특이성을 확인하기 위해 흑진주조개의 조직 항원 단백질을 이용하여 western blotting을 실시하였다. 항혈청은 흑진주조개 정자를 포함하여 약하게 모든 조직에서 항원-항체 반응이 나타났지만 (Fig. 18A), 흑진주조개 암컷 조직 추출물로 제작된 면역흡착제를 이용하여 교차반응을 제거하고 수집한 항체는 흑진주조개 정자 단백질에서만 항원-항체 반응이 관찰되었다 (Fig. 18B). 이때, 개발된 항체가 인지하는 정자 단백질의 분자량은 약 27.5 kDa으로 단 한 개의 단백질 단편과만 항원-항체 결합 반응을 나타냈다.

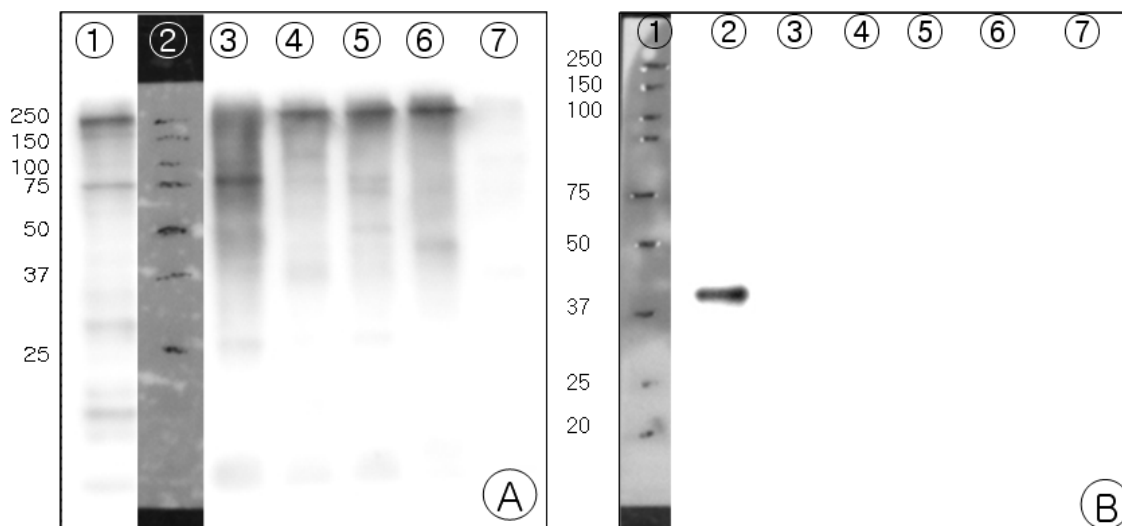


그림 3-2-6. 흑진주조개 정자에 대한 항체의 WESTERN BLOTTING 결과

(2) Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)를 이용한 항체 민감도 측정

흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체의 민감도를 확인하기 위해 ELISA를 이용해 교차반응 제거 전, 후를 비교하여 확인하였다. 교차반응 제거 전 항혈청에서는 정자 단백질을 0.0048 - 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도 범위를 측정할 수 있었다 (그림 3-2-7A). 하지만 흑진주조개 난 단백질을 제외한 기타 조직 단백질 또한 같은 범위의 농도를 측정할 수 있었다. 교차반응 제거 후, 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체는 0.31 - 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도 범위의 정자 단백질을 측정할 수 있었고, 기타 조직 단백질과의 교차반응은 2.5 - 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도 범위에서 미약하게 남아 있었지만 우려할 만한 강도는 아니었다 (그림 3-2-7B).

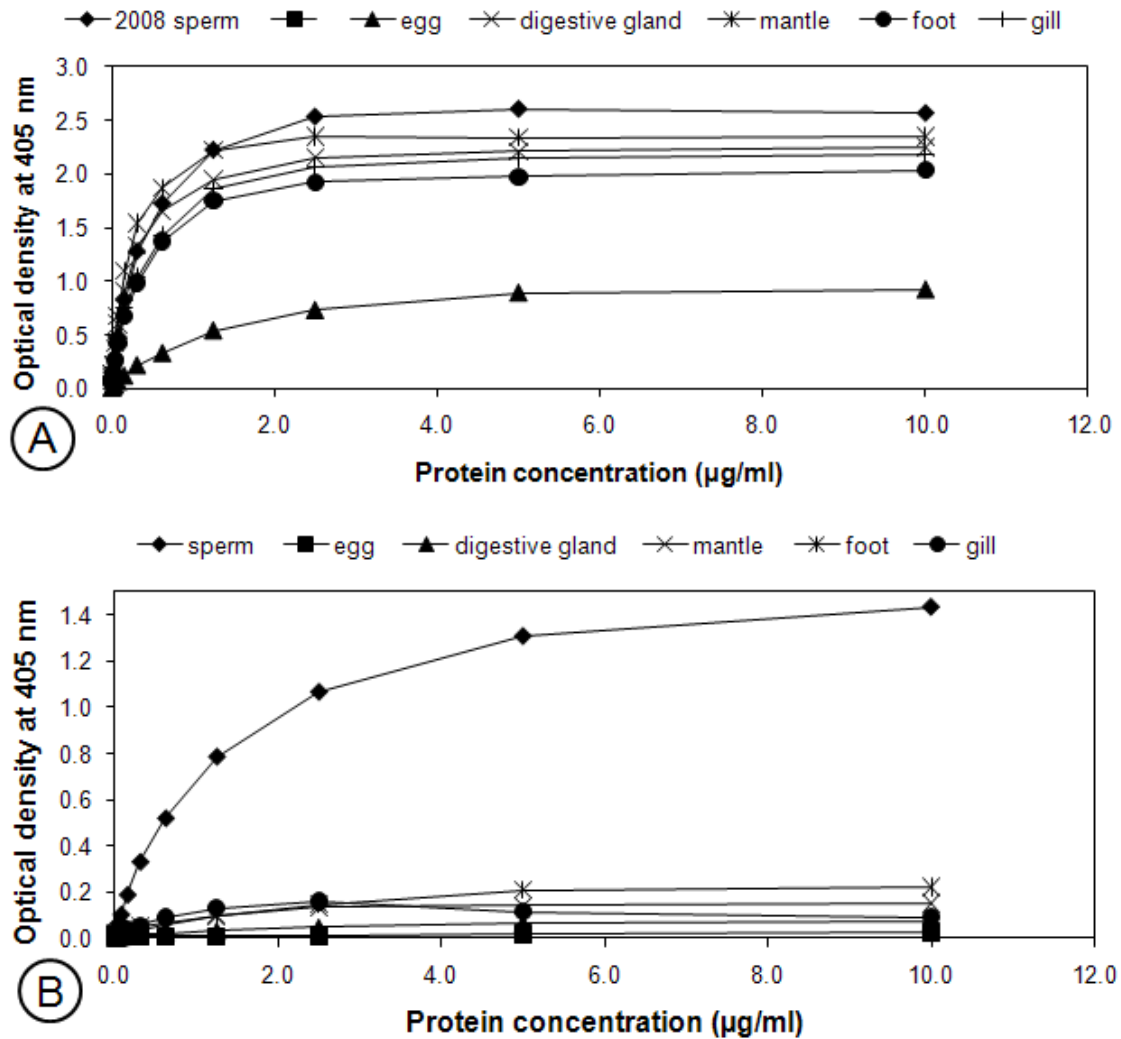


그림 3-2-7. ELISA를 이용한 흑진주조개 정자 단백질의 특이적인 항체 민감도 측정.

2. 개발된 항체를 이용한 흑진주조개의 번식량 측정

가. 서론

흑진주조개에 관한 연구는 현재까지 먹이 선택성(Yukihira et al. 1999), 유생성장 (Alagarwami et al. 1989; Southgate and beer 1997) 및 자원량(Sims 1993) 등의 연구가 수행된 바 있다. 또한 흑진주조개의 배우자형성과 번식에 관한 연구로는 호주 해역 (Acosta-Salmon and Southgate, 2005)에 서식하는 흑진주조개의 연간 번식주기에 관한 연구와 프랑스 폴리네시아 해역에 서식하는 흑진주조개의 산란 전·후 무게의 차이를 이용해 번식량을 측정한 연구 (Pouvreau et al. 2000a), 정자 형성과정의 초미세구조 (Thielley et al. 1993a)에 관한 연구가 보고된 바 있다. 하지만 항체를 이용한 생식주기나 번식량 측정에 관한 연구는 보고된 바 없다. 최근 프랑스 폴리네시아 해역의 흑진주조개 삼핵 개체의 폐사 발생이 일어나고 있으나 아직 정확한 원인이 밝혀지지 않고 있다. 하지만

번식생리학적인 문제 및 패류 질병 등의 가능성을 제기하고 있어 이 연구가 대단히 중요하다.

흑진주조개의 포란수나 정량적 번식량 측정에 관한 연구는 전 세계적으로 아직 이루어지지 않았다. 해산이매패류의 번식량 측정은 생식 주기나 양식 관리하는데 있어 중요한 기초 자료가 되는데, 최근 들어 난 특이 단백질에 대한 다클론항체를 본 연구팀에서 개발하여 이를 효소면역측정법 (ELISA)을 이용하여 이매패류의 포란수를 측정할 수 있다 (참굴, 개조개 및 바지락, Choi et al., 1993, 1994; Kang et al., 2003; Park et al. 2003,2004).

또한, 현재까지 우리나라에서는 해산어류나 누에, 곤충, 파충류 등을 통해 Vitellin이나 Vitellogenin의 정제 및 합성에 대한 호르몬의 영향, 면역학적 특성에 관한 연구가 되었다. 그러나 해산이매패류의 경우 국외에서는 난황단백질 (Vitellin)에 관한 연구가 수행되었지만 매우 국한되어있고, 난황형성과정의 직접적인 근거가 불분명하며 Vitellogenin의 특징에 대한 연구는 저조한 실정이다. 또한 현재까지 흑진주조개에 대해서는 전 세계적으로 난 단백질에 관한 연구가 보고된 바 없고, 우리나라에서는 이에 관한 연구가 어느 이매패류에서도 전혀 이뤄지고 있지 않고 있다.

패류의 포란수 또는 번식량 측정은 양식종의 생활사 및 자원관리 측면에서 필수적인 생물학적 정보로 간주된다. 그러나 이에 관한 연구는 세계적으로 거의 이루어지지 못하고 있는 실정이다. 이는 번식량을 측정하는 기술에 관한 문제로, 연구대상 종의 알 단백질에 대한 특정 항체를 개발, 항체면역효소측정법 (ELISA)를 이용하면 이러한 문제를 해결할 수 있다. 이는 Choi et al. (1993), Kang et al. (2003), Park et al. (2003; 2004; 2006) 등의 선행연구에서 세계적으로 입증된 바 있다.

북반구에 위치한 Federated State of Micronesia의 Chuuk State에 서식하는 흑진주조개 개체군의 연중 생식소발달과 산란시기의 규명은 개체군동태 및 자원의 효율적 관리에 있어 매우 중요한 자료이다. 그러나 이러한 중요성에도 불구하고 흑진주조개의 서식지역별 번식생물학적 특성에 관한 연구는 전무한 실정이다. 그러므로 이 연구는 Chuuk State에서 모패로 양성된 *P. margaritifera*의 알에 포함된 특정 난황단백질의 특성을 파악하고, 다클론항체를 개발하여 흑진주조개 번식량을 정량화 하는데 있다.

나. 재료 및 방법

(1) 번식량 측정

(가) 번식량 측정을 위한 시료 채취

2009년 12월 흑진주조개 번식량 측정을 위해 Federated State of Micronesia 에 위치한 Chuuk State의 한·남태평양해양연구센터에서 양성되고 있는 흑진주조개 137 개체를 크

기에 상관없이 채집하였다. 채집된 개체는 실험실로 옮겨와 크기를 측정된 후, 개각하여 육질부분을 취하고 습중량을 측정하였다. 흑진주조개의 암.수 판별과 조직학적인 성숙 단계를 판단하기 위하여 생식소를 포함하는 부분을 5 mm 두께로 잘라 고정액 (Davidson's solution)에 고정하고, 조직슬라이드를 제작하여 Harris' Hematoxylin & eosin Y 염색 후 현미경에서 관찰하였다. 성숙 단계 (Reproductive stage)는 Kang et al. (2005), 과 Saucedo and Southgate (2008)의 흑진주조개 성숙 단계를 참고하여 다음 표 3-2-4와 같이 나누어 관찰하였다 (그림 3-2-8). 나머지 부분은 번식량 측정을 위해 동결 건조를 하여 분말화한 후 분석에 사용할때까지 -20℃에 보관하였다.

표 3-2-4. 흑진주조개 개체들의 배우자형성과정 및 발달단계의 정성적인 관찰 기준[Kang et al. (2005) and Saucedo and Southgate (2008)].

Developmental stage	Numerical Score	Histological description
Developing	1	Previtellogenic, vitellogenic, and postvitellogenic oocytes (Pro, Vo, Po) in relative equal proportion, showing free Po filling acini, but still leaving a wide interocyte space.
Ripe	2	Ripe ovary packed with ripe oocytes and a thin layer along follicle wall (F)
Spawning/partly spawned	3	Partially spawned ovaries with loosely packed mature oocytes. Some early vitellogenic oocyte (EVO) and vitellogenic oocyte (VO) still remain.
Spent	4	Spent ovaries largely devoid of relict ova (RO).

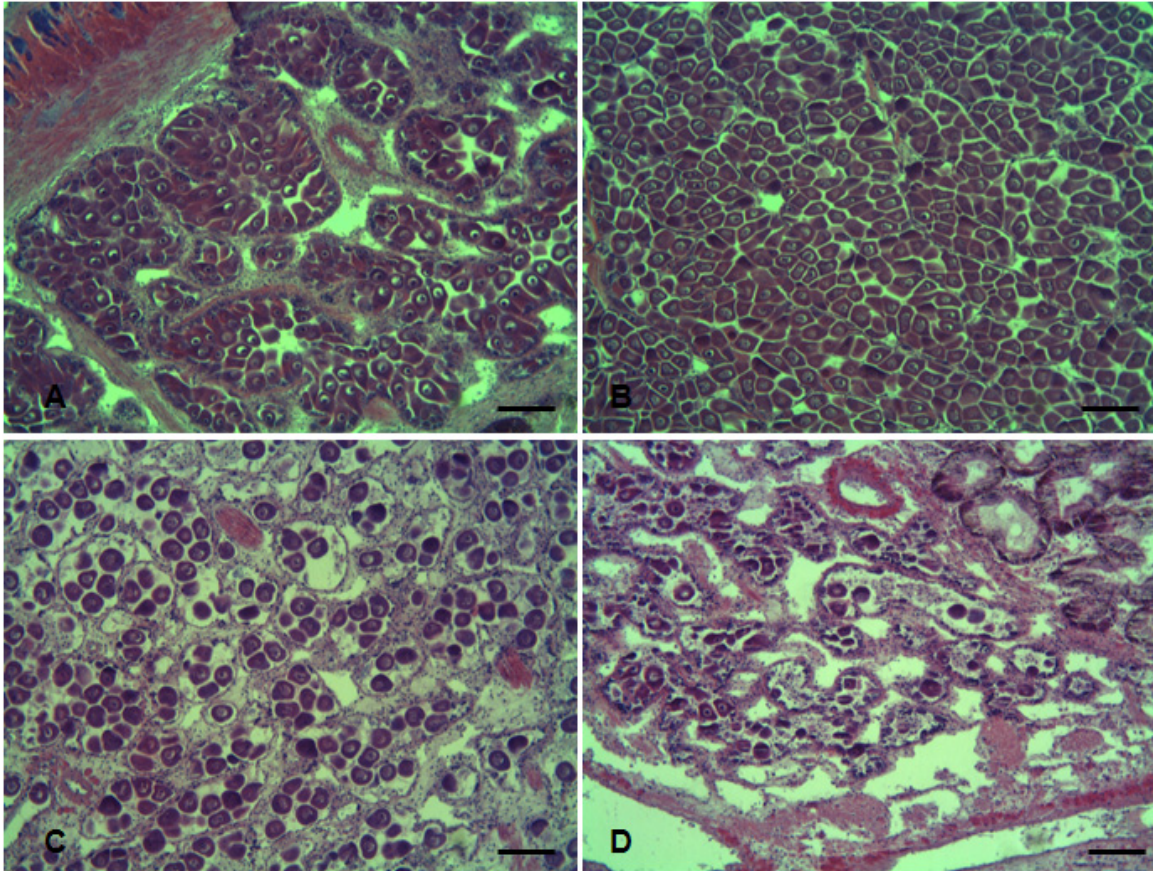


그림 3-2-8. 흑진주조개 난소의 발달 단계

(나) 항체면역효소법 (ELISA)을 이용한 암컷의 번식량 (Reproductive Effort) 측정

1차년도 연구에서 개발된 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체를 이용하여 흑진주조개의 번식량을 측정하였다. 정량적인 번식량 측정을 위해 항체면역효소법 (ELISA)를 이용하여 번식량 측정을 하였으며, 방법은 다음과 같다.

이매패류는 생식소가 물리적으로 분리되어 있지 않고 소화맹낭 혹은 결합조직등에 둘러 싸여 있는 점을 감안하여, 1차년도 연구에서 순수 분리한 알 분말과 수컷 개체 체조직 분말을 섞어 알 분말이 3, 7, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 %가 되게 100 mg씩 준비하여 표준물질을 제작하였다. 채집된 흑진주조개 중 암컷개체를 선별하여 각각 100 mg씩 취해 번식량 측정에 사용하였다. 표준물질과 암컷개체 분말을 PBS에 첨가한 뒤 초음파 파쇄기를 이용해 균질한 뒤 8,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취해 추출물을 얻었다. 이렇게 얻은 추출물을 PBS-T를 이용해 1,000배 희석하여 항원 단백질로 사용하였다. 희석된 항원 단백질을 polystyrene 96-well ELISA microplate에 100 μ l씩 분주 후, 4 $^{\circ}$ C에서 over night 반응 시키고, microplate autowasher를 이용하여 PBS-T로 세척하였다. 1% BSA in PBS-T (blocking buffer)를 150 μ l 넣고 상온에서 1시간 동안 blocking을 하였고, 전과 동일한 방법으로 세척하였다. 1차 항체로 1차년도 연구에서 개발한 항체 (6.3 μ g/ml) 100 μ l를 microplate에 분주하고 상온에서 1시간 반응시키고 세척 후, 2차 항체로

(1 $\mu\text{g/ml}$ goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase-conjugated) 를 첨가하였다. 발색기질로 p-nitrophenylphosphate (pNPP)를 발색시약으로 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로부터 계산되는 시료의 생식소지수 (GSI, %)와 건중량을 이용해 암컷개체에서 알이 차지하는 무게를 계산하였고, 이 무게를 1차년도 연구에서 계산된 알 하나의 무게 (13.41 ng)로 나누어 주어 포란수 (fecundity)를 계산하였다.

(다) 항체면역효소법 (ELISA)을 이용한 수컷의 번식량 (Reproductive effort) 측정

2차년도 연구에서 개발된 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체를 이용하여 indirect-ELISA로 번식량을 측정하였다. 이매패류는 생식소가 물리적으로 분리되어 있지 않고 소화맹낭 혹은 결합조직등에 둘러 싸여 있는 점을 감안하여, 2차년도 연구에서 순수 분리한 정자 분말과 암컷 개체 체조직 분말을 섞어 알 분말이 중량비로 5, 10, 20, 40, 60, 80 %가 되게 100 mg씩 준비하여 표준물질을 만들었다. Chuuk State와 Tahiti에서 채집된 흑진주조개 중 수컷개체를 선별하여 각각 100 mg씩 취해 번식량 측정에 사용하였다. 표준물질과 수컷개체 분말을 PBS 용액에 첨가한 뒤 초음파 파쇄기를 이용해 균질한 뒤 8,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취해 추출물을 얻었다. 이렇게 얻은 추출물을 PBS를 이용해 300배 희석하여 항원 단백질로 사용하였다. 흑진주조개 암컷 조직 추출물을 동일한 방법으로 희석하여 negative control로 사용하였다. 희석된 항원 단백질은 polystyrene 96-well ELISA microplate에 2반복으로 100 μl 씩 분주하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 over night 반응 시키고, TBS-T (Tris buffer saline containing 0.05% tween-20, washing buffer)로 5회 세척하였다. 5 % skim milk in TBS-T (blocking buffer)를 150 μl 넣고 상온에서 1시간 동안 blocking을 하였고, 전과 동일한 방법으로 세척하였다. 1차 항체로 2차년도 연구에서 개발한 항체 6 $\mu\text{g/ml}$ 를 blocking buffer에 희석하여 100 μl 씩 분주하고 상온에서 1시간 반응시키고 세척 후, 2차 항체로 1 $\mu\text{g/ml}$ goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase - conjugated를 washing buffer에 희석하여 100 μl 씩 분주하고 1시간 반응시켰다. 발색기질로 p-nitrophenylphosphate (pNPP)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 Tahiti에서 채집된 개체 중 암컷 개체의 경우 2차년도 연구수행에서와 같은 조건에서 번식량을 측정하여 비교하였다.

(라) 흑진주조개를 포함한 해산이매패류의 난 단백질 특성 비교

① 전기영동법(Electrophoresis)에 의한 비교

흑진주조개 (BLP oyster) 난 단백질의 분자적 특성과 다른 이매패류 종의 난 단백질이 갖는 분자적 특성을 5 % native electrophoresis와 10 % SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 비교하였다. 이를 위해 흑진주조개, 참굴 (*Crassostrea gigas*), 강굴 (*C. ariakensis*), 가시굴 (*Saccostrea kegaki*), 담치 (*Mytilus edulis*), 바지락 (*Ruditapes philippinarum*)의 egg powder를 각각 20 mg씩 측정 후, 각 egg

powder에 protease inhibitor인 PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)가 1 mM 포함된 1 ml 의 PBS (Phosphate buffer saline)를 첨가하여 10초간 초음파 파쇄하여 균질화 하였다. 이후 8,000 rpm, 4 °C에서 10분간 원심분리한 뒤, 상등액을 취하였다. BCA protein assay kit (Pierce, 23227)를 이용하여 단백질 정량을 하고, 각각의 난 단백질 추출물의 농도가 4 μ g/ μ l가 되도록 4x sample buffer (0.125 M Tris-HCl, 4 % SDS, 20 % v/v glycerol, 0.02 % bromophenol blue, pH 6.8)와 혼합하였다. 이때, 10 % SDS-PAGE의 경우 4x sample buffer 에 β -mecaptoethanol이 첨가 된 것과 첨가되지 않은 두 가지의 sample buffer를 난 단백질 과 혼합하여 95 °C에서 5분간 변성했다. 5 % native gel과 10 % SDS-polyacrylamaide gel 에 각종의 난 단백질을 30 μ l씩 분주하고 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 후 gel을 유리판에서 분리한 후, Coomassie brilliant blue R-250으로 염색을 하여 peptide banding pattern을 확인하였다.

② Western blotting

1차년도 연구에서 개발된 항체(Rabbit anti-BLP oyster egg protein specific IgG)가 흑진주조개 난 단백질 외 해산 이매패류에 속하는 종의 난 단백질을 인지하는지 알아보기 위해 western blotting을 하였다. 흑진주조개를 포함하는 6종의 해산 이매패류의 난 단백질 농도를 0.2 μ g/ μ l가 되도록 4x sample buffer와 혼합 하고 95 °C에서 5분간 변성 후, 10 % SDS-PAGE를 실시하였다. Sample buffer는 β -mecaptoethanol이 첨가된 조건과 첨가되지 않은 조건 모두 western blotting을 실시하였다. 전기영동으로 분리된 단백질을 PVDF membrane (PIERCE, 88114)에 20 V 에서 1시간 30분 동안 transfer 하였다. Transfer 된 membrane은 5 % skim milk in TBS-T (blocking buffer)로 1시간 동안 blocking 하였다. 1차 항체로 개발한 흑진주조개 정자 단백질에 특이적인 항체를 0.6 μ g/ml으로 blocking buffer 에 희석하여 4 °C에서 over night 반응 시켰다. TBS-T (washing buffer)로 15분씩 3차례 세척한 후 washing buffer에 2차 항체 (goat anti-Rabbit IgG HRP, KOMA)를 0.3 μ g/ml으로 희석하여 1시간 동안 반응 시켰다. washing buffer로 15분씩 3차례 세척한 후, peroxidase 와 luminol을 1:1로 섞어 membrane에 1-2분 정도 반응 시켜 enhanced chemiluminescence (ECL)반응을 30초 간격으로 3분간 촬영하였다.

③ Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)

흑진주조개를 포함하는 6종의 해산 이매패류의 난 단백질 20 μ g/ml 를 PBS-T에 희석하여 항원 단백질로 사용하였다. 대조구로는 흑진주조개 수컷 단백질 (20 μ g/ml)을 사용하였다. 6종의 해산 이매패류 난 단백질과 대조구 단백질을 polystyrene 96-well ELISA microplate에 2배수 희석을 2반복으로 해 4 °C에서 over night 반응 시키고, PBS-T 로 세척하였다. 1 % BSA in PBS-T (blocking buffer)를 150 μ l 넣고 상온에서 1시간 동안 blocking을 하였고, 전과 동일한 방법으로 세척하였다. 1차 항체로 1차년도 연구에서 개발

한 항체 3.5 $\mu\text{g/ml}$ 를 blocking buffer에 희석하여 100 μl 씩 분주하고 사온에서 1시간 반응시키고 세척 후, 2차 항체로 1 $\mu\text{g/ml}$ goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase - conjugated를 blocking buffer에 희석하여 100 μl 씩 분주하고 1시간 반응시켰다. 발색기질로 p-nitrophenylphosphate (pNPP)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

④ 흑진주조개 알 특이적인 단백질 아미노산 서열 분석

1차년도 연구에서 개발된 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체가 인지하는 peptide band의 특성 연구와 흑진주조개 알에만 존재하는 특이적인 단백질의 특성을 연구하기 위해 각 band의 아미노산 서열 분석을 하였다. 흑진주조개 알 분말 (egg powder)을 1xPBS와 혼합하여 초음파 파쇄기로 균질화 시킨 뒤, 8,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 알 추출물을 BCA protein assay kit(Pierce, 23227)를 이용하여 단백질 농도가 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 가 되도록 희석한 뒤, 4x sample buffer와 혼합 하고 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 변성 후, 10 % SDS-PAGE를 수행 하였다. 전기영동이 끝난 후 분리된 단백질을 PVDF membrane (PIERCE, 88114)에 20 V 에서 1시간 30분 동안 transfer 하였다. 단백질이 transfer된 membrane을 Coomassie blue staining solution으로 염색하고 건조시켜 아미노산 서열 분석할 band를 표지한 후 대전 기초과학지원연구소에 아미노산 서열 분석을 의뢰하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) 흑진주조개 난 단백질 특성

(가) 전기영동과 Western blotting

해산 이매패류 알을 구성하는 단백질의 중간 특성을 분석하기 위해 6종의 해산 이매패류 난 단백질을 native-PAGE를 수행하여 구성 단백질의 크기를 확인한 결과, 담치 (*M. edulis*)를 제외하고 5종의 난 단백질은 약 420 kDa에서 하나의 major band를 갖고 있었으며, 종에 따라 1-2 minor band도 관찰되었다 (그림 3-2-9). 이와 달리, non-reducing과 reducing조건하에서는 고분자에서 저분자량까지 다양한 크기의 단백질 subunit들이 확인되었다 (그림 3-2-10). 특히, reducing 조건 하의 단백질 전기영동시 분자량 47과 39 kDa의 두 개의 major band가 모든 종에 공통적으로 관찰되었다.

따라서 1 차년도 연구에서 개발한 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체를 이용하여 이매패류 내 공통 항원의 존재 유무를 확인하기 위해 western blotting으로 분석하였다. Reducing 조건에서 실시한 western blotting 결과에서 강굴 (*C. ariakensis*)의 난 단백질 중 약 70 kDa의 분자량을 갖는 단백질 분자와 아주 미약한 교차반응이 있는 것이 관찰되었지만, 개발된 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체에 대한 공통 항원이 존재하지 않았으며, 개발된 항체는 흑진주조개 난 단백질에 특이적으로 반응함이 확인되었다 (그림

3-2-11). 이러한 결과는 indirect-ELISA의 결과에서도 동일하게 개발된 항체는 0.04-10 $\mu\text{g/ml}$ 의 흑진주조개 난 단백질과 반응하였다 (그림 3-2-12)

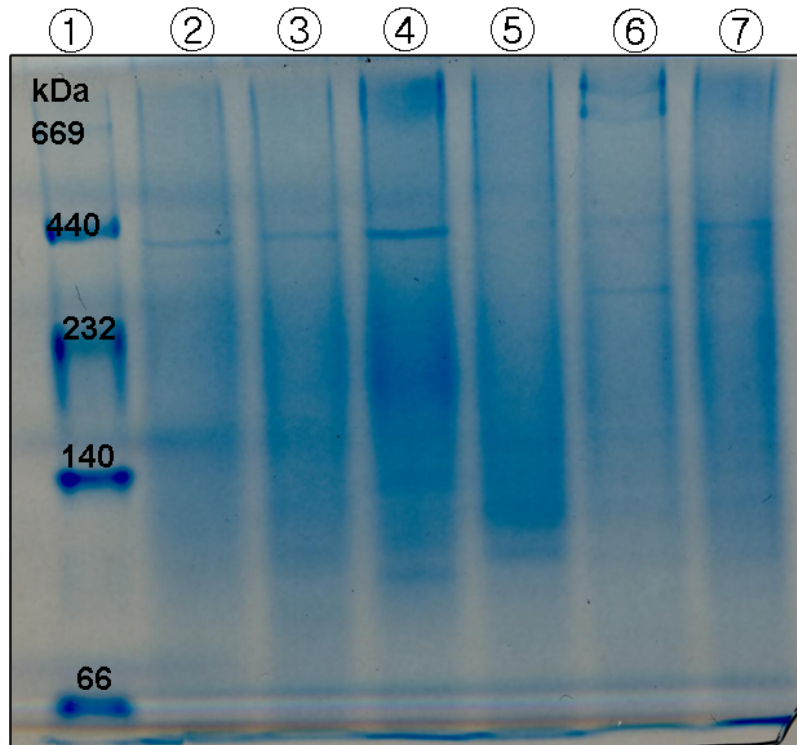


그림 3-2-9. 6종의 해산 이매패류 난 단백질을 native-PAGE를 수행하여 구성 단백질의 크기를 확인한 결과. Lane 1: marker, Lane 2: 흑진주조개 알 추출물, Lane 3: 참굴 알 추출물, Lane 4: 강굴 알 추출물, Lane 5: 가시굴 알 추출물, Lane 6: 담치 알 추출물, Lane 7: 바지락 알 추출물.

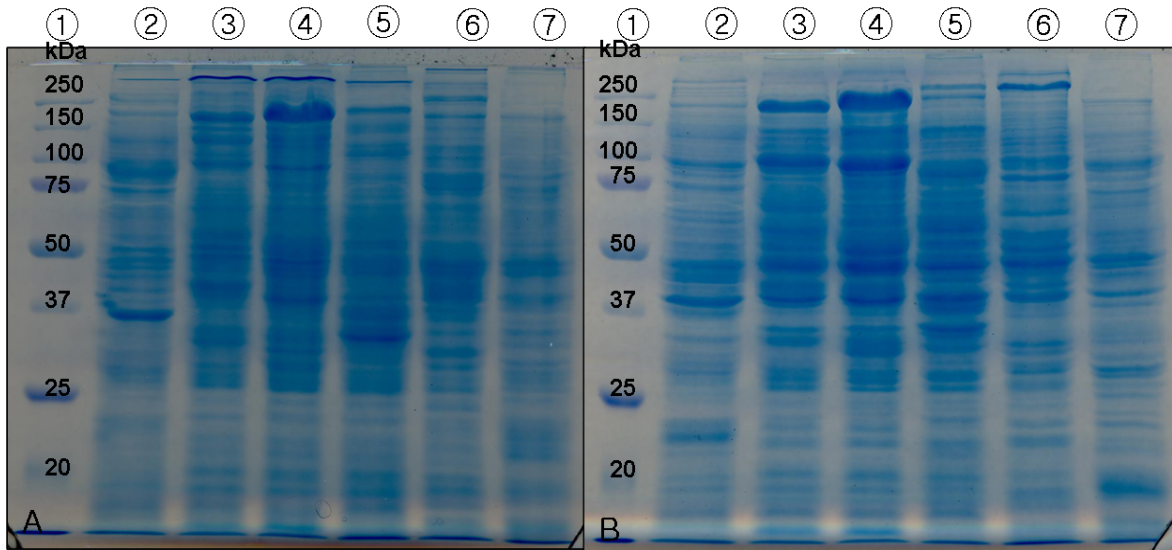


그림 3-2-10. 6종의 해산 이매패류 난 단백질을 non-reducing과 reducing조건하에서 수행하여 구성 단백질의 크기를 확인한 결과. Lane 1: marker, Lane 2: 흑진주조개 알 추출물, Lane 3: 참굴 알 추출물, Lane 4: 강굴 알 추출물, Lane 5: 가시굴 알 추출물, Lane 6: 담치 알 추출물, Lane 7: 바지락 알 추출물.

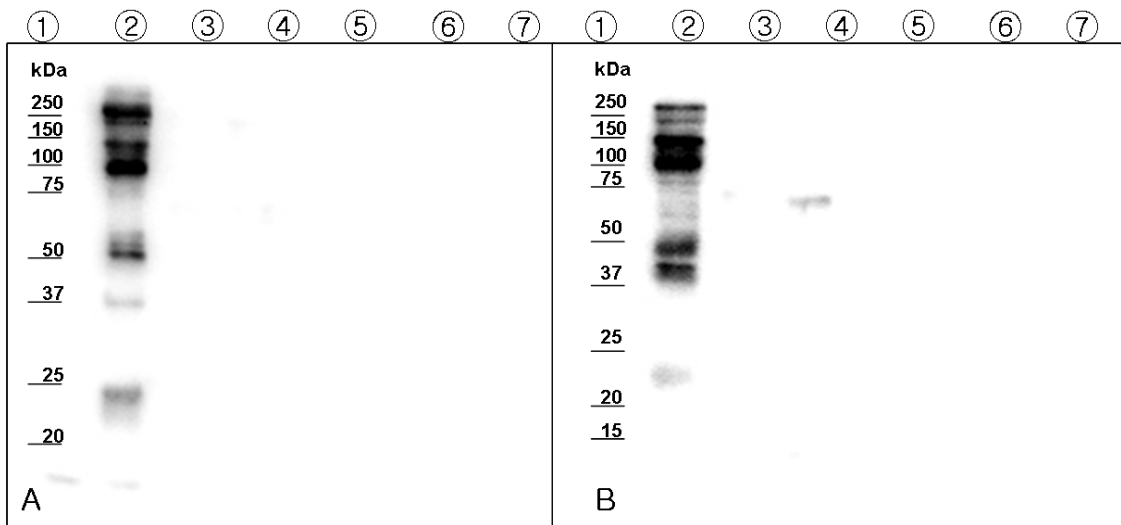


그림 3-2-11. 6종의 해산 이매패류 난 단백질을 reducing 조건에서 실시한 western blotting 결과. Lane 1: marker, Lane 2: 흑진주조개 알 추출물, Lane 3: 참굴 알 추출물, Lane 4: 강굴 알 추출물, Lane 5: 가시굴 알 추출물, Lane 6: 담치 알 추출물, Lane 7: 바지락 알 추출물.

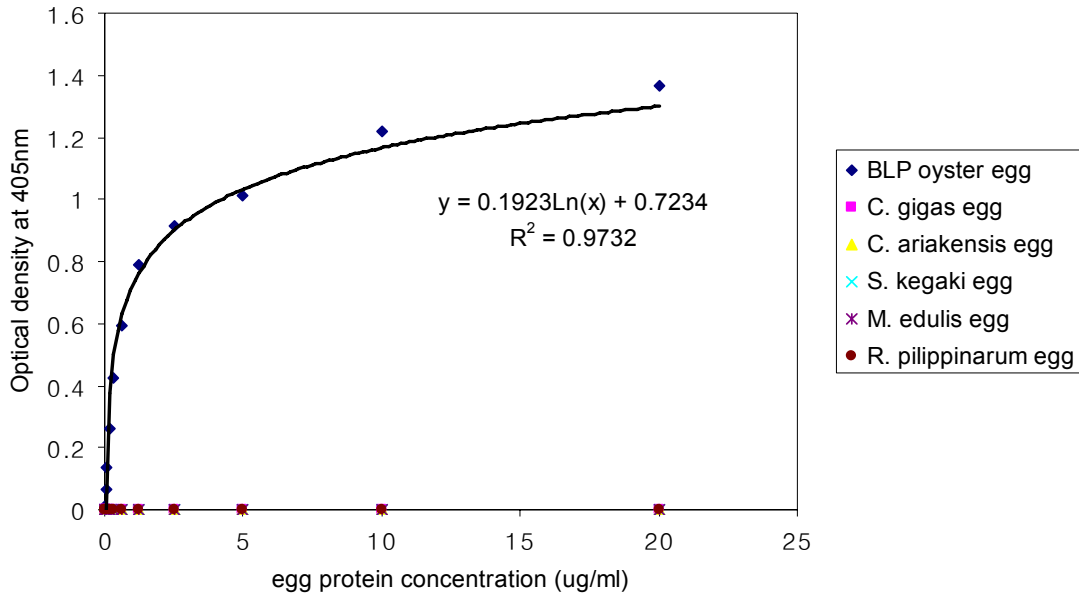


그림 3-2-12. Indirect-ELISA의 결과를 통한 개발된 항체와 흑진주조개 알 단백질과의 반응

Vitellin은 난생형 동물의 난에 축적이 되는 주요 난황 단백질로서 배아발생 단계에 주요 영양원으로 작용한다(Shafir et al. 1992, Arukwe and Goksoyr 2003, Babin 2008, Amano et al. 2008, Tiu et al. 2009). Table 5는 현재까지 보고된 해산 이매패류 난 단백질에 관한 연구 결과를 비교한 표이다. Suzuki et al (1992)은 그들의 연구에서 참굴 (*C. gigas*)의 vitellin 으로 추정되는 female specific protein의 분자량이 native-PAGE에서 500 kDa이상의 크기를 갖고 있으며, SDS-PAGE상에서는 7개의 밴드인 105, 85, 66, 64, 60, 45, 41 kDa의 분자량을 갖고 있다고 보고 하였고, Osada et al. (1992)는 가리비 (*P. yessoensis*)의 vitellin의 분자량이 native-PAGE에서 450 kDa이며 SDS-PAGE non-reducing condition에서 270, 60, 30 kDa의 분자량을 갖으며, 이들의 생화학적인 분석 결과와 함께 보았을 때, 이 peptide band들이 vitellin일 것으로 추정하였다. 그 외 Park et al. (2003), Park and Choi (2004), Kim et al. (In preparation)은 개조개 (*S. purpuratus*), 바지락 (*R. philippinarum*), 강굴 (*C. ariakensis*)의 암컷 개체에서 알을 순수하게 분리해 내었고, SDS-PAGE상에서 이들의 난 단백질의 분자량을 247, 200, 99, 91, 54, 47 kDa (개조개, *S. purpuratus*), 330, 96, 64, 50, 31 kDa (바지락, *R. philippinarum*), 150, 120, 95, 90, 82, 55 kDa (강굴, *C. ariakensis*)의 5-6 개의 band를 각각 보고하였다. 이들은 난 단백질에 특이적인 항체를 개발하여 면역형광염색, ELISA 등의 분석 결과 난 단백질에 특이적으로 반응하는 것을 확인하였고, 난 단백질의 주요 물질이 vitellin이라는 점을 착안하여 이들이 보고한 난 단백질의 밴드를 vitellin일 것으로 추정하였다. 이러한 연구들과 비교하여 보았을 때, 1차년도 연구에서 흑진주조개의 알을 순수하게 분리하였던 점과 개발된 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체가 흑진주조개 난 단백질에만 특이적으로 반응 한다는 점에

서 항체가 인지하는 10개 (524, 283, 154, 96, 74, 69, 41, 36, 34 그리고 22 kDa)의 band가 난황단백질인 vitellin일 것으로 추정되었다. 따라서 이 연구에서 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체가 인지하는 10개의 흑진주조개 난 단백질의 아미노산 서열 분석을 하였고, 그 결과 22 kDa 크기의 흑진주조개 난 단백질의 아미노산 서열을 분석 할 수 있었다. 하지만 이 아미노산 서열만으로는 22 kDa 크기의 난 단백질이 vitellin인지 판단하기는 어려우며, 분석이 되지 않은 다른 크기의 단백질은 대부분 N-말단 쪽에 methylation, glycosylation, alkylation, acetylation 등의 modification이 있기 때문으로 판단 됨으로 좀 더 분자생물학적인 연구가 필요하다.

1차년도 연구 수행에서 개발된 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체가 인지하는 흑진주조개 난 단백질 단편 중 270, 150, 100, 47, 44 kDa의 난 단백질은 다른 이매패류 (bivalve) 종 (species)의 난 단백질에서도 한 개 혹은 두 개의 난 단백질 단편의 크기와 비슷함을 알 수 있었고, 흑진주조개 난 단백질 단편 중 22 kDa 크기의 난 단백질 단편은 흑진주조개에만 존재하는 것을 알 수 있었다. 따라서 이 연구에서는 흑진주조개의 알을 구성하는 단백질의 특성을 다른 해산 이매패류(bivalve) 종 (species)의 난 단백질과 비교 분석 하기 위해 native-, denaturing-PAGE, western blotting을 실시하였으며, 그 결과 표 3-2-5에서 보듯이 흑진주조개 난 단백질은 native PAGE에서 420 kDa의 하나의 단백질 단편을 갖고 있었고, 이는 참굴 (*C. gigas*), 강굴 (*C. ariakensis*), 가시굴 (*S. kegaki*), 바지락 (*R. philippinarum*)의 난 단백질에서도 관찰이 되었다(Fig. 10). SDS-PAGE reducing condition에서도 6개의 해산 이매패류 난 단백질들은 47, 39 kDa의 위치에서 major band를 동일하게 관찰 할 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 1 차년도 연구에서 개발된 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체가 SDS-PAGE에서 관찰된 동일한 위치에 있는 단백질 단편을 흑진주조개 난 단백질과 같은 항원으로 인지하는지 알아보기 위해 western blotting을 수행하였으나 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체는 흑진주조개 난 단백질과만 항원-항체 반응을 강하게 보이고 다른 이매패류 종 (species)의 난 단백질과는 반응하지 않았다. 이는 난 단백질의 크기는 같지만 항체가 인지하는 항원결정기 (펩타이드 서열 혹은 구조)가 달라서 일 것으로 사료된다. 그러나 서로 다른 종 (species)의 크기가 같은 난 단백질이 실지로 같은 단백질 인지 다른 단백질 인지는 좀 더 자세한 연구가 필요하다.

표 3-2-5. 흑진주조개 알 단백질을 구성하는 펩타이드 분자량 및 다른 이매패류와의 비교.

Species	Molecular weight (kDa)	Author	Methodology
<i>C. gigas</i>	105, 85, 66, 64, 60, 45, 41	Suzuki et al. 1992	Western blotting
<i>C. ariakensis</i>	150, 120, 95, 90, 82, 55	Kim et al. in preparation	Western blotting
<i>C. ariakensis</i>	Non-reducing condition : 260, 240, 90, 85, 53, 48, 42, 32 Reducing condition : 70, 73, 48, 45, 35, 30	Mausumi and Choi in preparation	SDS-PAGE
<i>C. virginica</i>	76, 56, 50, 48, 18, 17	Lee and Heffernan 1991	SDS-PAGE
<i>P. yessoensis</i>	270, 60, 30	Osada et al. 1992	SDS-PAGE
<i>S. purpuratus</i>	Non-reducing condition : 163, 95 Reducing condition : 247, 200, 99, 91, 54, 47	Park et al. 2003	SDS-PAGE
<i>M. mercenaria</i>	98, 87, 68, 60, 56, 36, 19	Lee and Heffernan 1991	SDS-PAGE
<i>R. philippinarum</i>	Non-reducing condition : 475, 84, 40 Reducing condition : 330, 96, 64, 50, 31 Native PAGE : 420	Park and Choi 2004	SDS-PAGE
<i>P. margaritifera</i>	Non-reducing condition : 270, 140, 95, 50, 37, 24 Reducing condition : 270, 150, 100, 47, 44, 23	Present study	Native PAGE Western blotting

(나) 아미노산 서열분석

1차년도 연구에서 개발된 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체가 인지하는 항원 단백질은 분자량이 약 524, 283, 154, 96, 74, 69, 41, 36, 34 그리고 22 kDa 의 10 개 항원 단백질을 인지하는 것으로 1차년도 연구에서 보고 하였다. 이에 각 단백질 단편들의 N-terminal 아미노산 서열을 분석하여 본 결과 41과 22 kDa의 단백질 단편의 경우 10개의 아미노산 서열을 확인할 수 있었다. 한편, 283과 154 kDa의 단백질 단편의 경우 일부 분의 아미노산 서열을 확인할 수 있었으며, 나머지 단백질 단편의 경우 분석이 불가능했다 (표 3-2-6).

표 3-2-6. 흑진주조개 알 특이적인 단백질 내 아미노산 비교.

kDa	283	154	96	41	36	22
1	D	D	-	E, A	-	F, (D)
2	F	L, F, I		F, (V, I, L)		K, (I)
3	L	L, V, I		E, (L, K, I, P, Y, G)		P
4		V, L, E, A, F		P, A		F
5		A, E, V, L, I		V, (L, K)		R
6				A, P, (L, I)		E
7				V, (R)		E, S
8				A, (I, L)		K
9				P, (T, F)		D, X
10						R

(다) 흑진주조개 암컷의 번식량 측정

① 번식량 측정을 위한 시료 채취 결과

2009년 12월 Federated State of Micronesia 에 위치한 Chuuk State의 한·남태평양해양 연구센터에서 양성되고 있는 흑진주조개 137 개체를 크기에 상관없이 채집하였고, 채집된 흑진주조개의 각고의 범위는 40~179 mm (그림 3-2-13)였고, 채집된 137 개체 중 각고가 100~149 mm인 개체가 전체 채집 개체의 60 % 이상을 차지하는 정규분포 곡선의 형태를 띄었고, 암컷의 비율은 27 % 였다. 이러한 형태는 전체 암컷개체에서도 각고가 110~149 mm의 개체가 70 %의 비율인 정규분포의 형태를 띄고 있었던 것과 동일하였다 (그림 3-2-14). 한편, 크기 그룹별 암.수의 비율에서는 각고가 60~89 mm인 그룹에서 암컷의 비율이 0 %, 90~119 mm인 그룹에서 20 %, 120~149 mm인 그룹에서 28 %, 150~179 mm인 그룹에서 57%로 크기가 커짐에 따라 암컷의 비율이 증가하였다. 이로써 흑진주조개는 각고가 90 mm 이상의 개체에서 성분화가 일어나는 응성 선성숙형 자웅이체 (protandrous hermaphrodite)인 것을 확인 할 수 있었다.

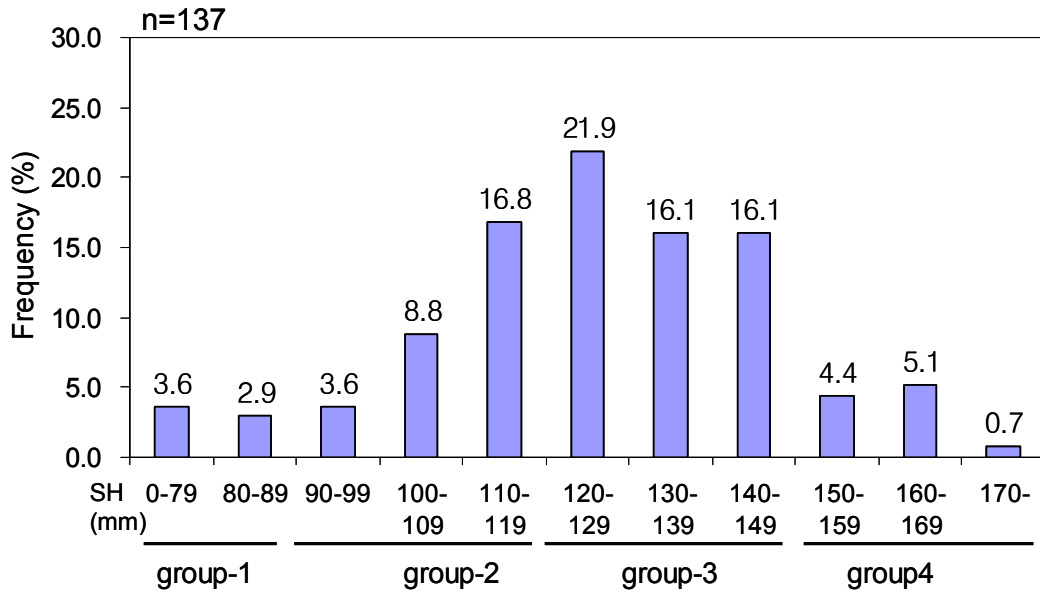


그림 3-2-13. 번식량 측정을 위해 채집한 흑진주조개의 개체들의 크기 분포

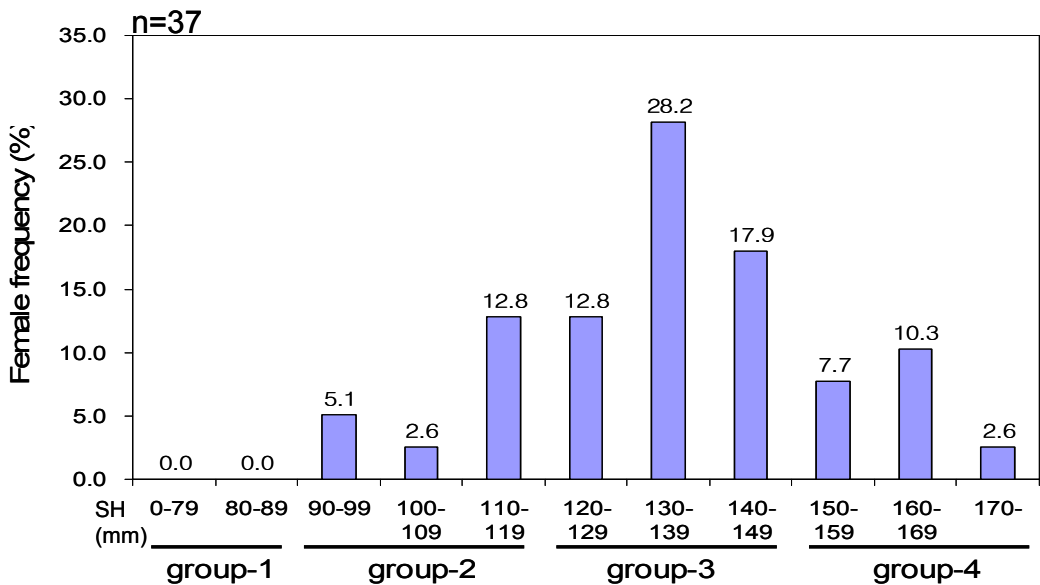


그림 3-2-14. 번식량 측정용 흑진주조개 암컷 개체들의 크기 분포

② 항체면역효소법을 이용한 암컷의 번식량 측정

흑진주조개 암컷의 번식량을 측정하기 위해 Indirect-ELISA를 수행하였다. 37 개체의 암컷 개체를 조직학적 관찰 결과와 함께 분석한 결과, 12월 채집된 흑진주조개는 다양한 성숙 단계들을 보였다. 발달기 (Developing stage)에 속한 암컷 흑진주조개의 생식소 지수 (GSI, %)는 건중량의 평균 7.7%의 알을 포함하는 것으로 나타났으며, 성숙기 (Ripe stage)에 속한 흑진주조개는 평균 18.4 %, 부분산란기 (Spawning/partly spawned stage)에 속한

흑진주조개는 평균 7.7%, 소모기 (Spent stage)에 속한 암컷 흑진주조개는 건중량의 3.6%의 알을 포함하는 것으로 확인되었다 (그림 3-2-15). 또한 성숙기 (Ripe stage)에 속하는 암컷 흑진주조개는 크기가 커짐에 따라 포란수가 증가하였다 (그림 3-2-16).

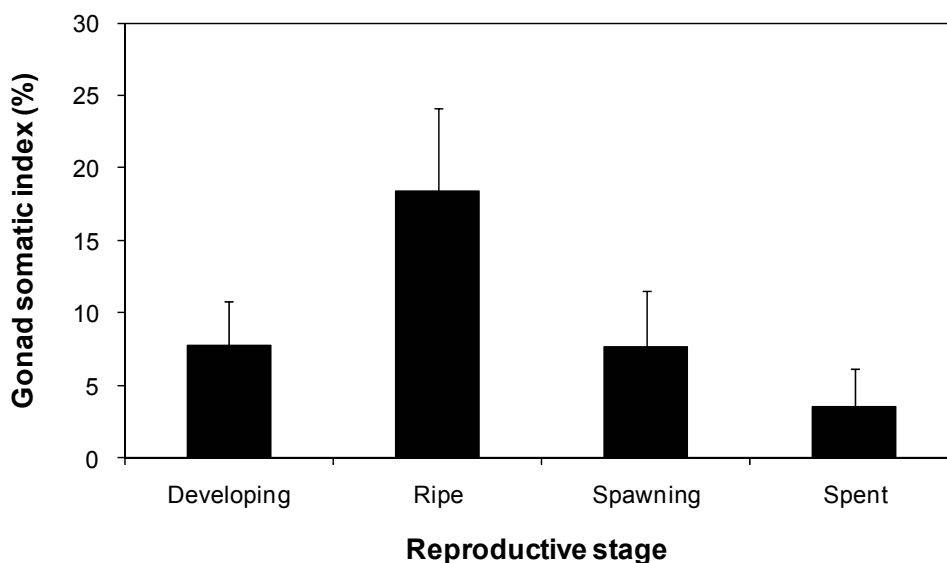


그림 3-2-15. 번식량 측정을 위해 사용된 흑진주조개 암컷의 생식소 발달

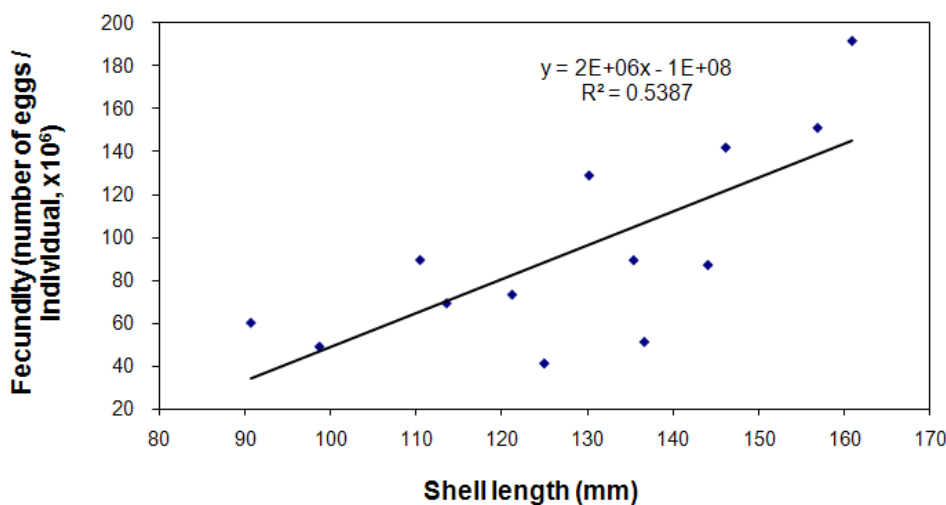


그림 3-2-16. 생식소 성숙지수를 이용해 측정한 흑진주조개의 번식량

Pouvreau et al.은 2000에 Tahiti에서 1, 2, 3년생의 흑진주조개를 채집하여 암.수의 비율과 산란 전.후의 무게 차를 이용해 번식량을 측정, 보고하였다. Pouvreau et al.은 그들의 연구 결과에서, 흑진주조개는 각고가 90 mm이하 (1년생)의 개체에서 오로지 수컷만 관찰 할 수 있었고, 각고가 90~119 mm (1~2년생)인 개체에서 암컷의 비율이 20 %, 각고가 120 mm (2~3년생)이상인 개체에서 암컷의 비율이 30 %로 관찰 됨 으로서, 흑진주조개의 각고가 80 mm이상 자라면서부터 성분화가 일어나기 시작하며, 해가 지날수록 암컷

의 비율이 증가하는 응성선성숙형 자웅이체라고 보고한 바 있다. 또한, Tranter et al. (1958, 1959)은 *Pinctada* 속에 속하는 진주조개는 먼저 수컷으로 성숙 후, 암컷의 비율이 증가하는 현상이 일반적이며, 이러한 성 성숙 현상은 그들의 먹이의 조건과 관련이 있을 것이라고 보고하였다. 이번 연구 결과 또한 선행 된 연구와 동일한 양상을 나타내었다. 흑진주조개의 번식량 측정을 위해 Chuuk State에서 채집된 137 개체의 흑진주조개는 각 고의 범위가 40~179 mm 였으며, Fig. 14와 Table 9에서 보듯이 크기 그룹별 암컷의 비율은 각고가 60-89 mm인 그룹에서 0 %, 90~119 mm인 그룹에서 20 %, 120~149 mm인 그룹에서 28 %, 150~179 mm인 그룹에서 57%로 크기가 커짐에 따라 암컷의 비율이 증가함으로써 Chuuk State에 서식하는 흑진주조개 또한 각고가 90 mm 이상의 개체에서 성분화가 일어나는 것을 확인 할 수 있었다.

이때패류에서의 정량적인 번식량 측정은 그들의 생활사와 자원 관리에 있어서 중요한 정보이다 (Park and Choi 2004). 1차년도 연구에서 개발된 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체를 이용해 흑진주조개의 번식량을 측정하였다. 12월 채집된 흑진주조개는 다양한 성성숙 단계를 타나냈으며, 발달기 (Developing stage)에 속한 암컷 흑진주조개의 생식소 지수 (GSI, %)는 건중량의 평균 7.7%의 알을 포함하는 것으로 나타났으며, 성숙기 (Ripe stage)에 속한 흑진주조개는 평균 18.4 %, 부분산란기 (Spawning/partly spawned stage)에 속한 흑진주조개는 평균 7.7%, 소모기 (Spent stage)에 속한 암컷 흑진주조개는 건중량의 3.6%의 알을 포함하는 것으로 나타났다 (Fig. 16). 또한 성숙기 (Ripe stage)에 속하는 암컷 흑진주조개는 크기가 커짐에 따라 포란수가 증가하였다 (그림 3-2-16). Pouvreau et al.은 2000년 그들의 연구에서 열대지역에 서식하는 흑진주조개가 연간 5회의 주 산란시기를 갖는 것으로 보고하였고, 산란 전,후의 무게를 측정하여 번식량을 측정 한 결과 크기가 커짐에 따라 7~38%로 성성숙지수도 증가하고, 생산하는 배우자의 수도 증가한다고 보고하였다. 이 연구에서 또한, 성숙시기의 흑진주조개의 크기가 커짐에 따라 포란수의 증가하는 경향을 볼 수 있었다. 하지만 번식량 측정을 위해 12월 한차례만 채집이 이루어 졌기 때문에 보다 정확한 번식량을 측정하기 위해서는 연간 채집을 하여 연간 번식량의 변화를 측정해봐야 할 것으로 보인다.

이번 연구에서 2009년 12월 Chuuk State에 서식하고 있는 흑진주조개는 51.1-41.7 X 106 개의 알을 포함하고 있었다. 표 3-2-7은 흑진주조개의 포란수와 다른 이때패류 종의 포란수와 비교한 표이다. 흑진주조개의 포란수는 다른 이때패류 종인 참굴 (*C. gigas*)와 대서양굴 (*C. virginica*)와 비슷한 포란수를 나타내고 있었다 (Kang et al. 2003, Choi et al. 1993). 그러나 그들의 패각의 크기와 건중량에 대한 포란수를 생각했을 때, 흑진주조개의 포란수의 비율은 낮다고 할 수 있다. 또한, 패각의 크기와 건중량이 비슷한 강굴 (*C. ariakensis*)의 포란수 (in preparation)와 비교하여 보았을 때도 흑진주조개의 포란수가 낮은 것을 알 수 있었다. 이는 흑진주조개가 연중 산란의 형태의 번식 전략을 갖고 있으며, 이러한 연중 산란시기는 그들의 먹이와 밀접한 연관이 있다는 선행 연구 (Pouvreau et al.

2000a)와 비교하였을 때, 흑진주조개의 크기에 비해 포란수가 낮은 이유는 이들의 번식 생태학적인 전략으로써 연중 산란을 위해 항상 성장 유지에 대한 에너지 저장과 번식에 대한 에너지의 저장이 동시에 이루어져야 하기 때문일 것으로 판단된다.

표 3-2-7. 서로 다른 이매패류의 크기, 건중량 및 번식량 비교.

Oyster species	Location	SL (mm)	TDWT (g)	EW (ng)	Fecundity	Study
<i>C. virginica</i>	Galveston Bay, U.S.	70-120	0.7-1.9	13	1.7-65.4X10 ⁶	Choi et al. (1993)
<i>C. gigas</i>	Goseong Bay, Korea	74-91.6	0.9-2.9	13	4-196X10 ⁶	Kang et al. (2003)
<i>C. ariakensis</i>	Seomjin River estuary, Korea	125.2-230.1	10.5-13.6	14	162-910X10 ⁶	Kim et al. (in preparation)
<i>P. margaritifera</i>	Chuuk State, FSM	90.8-172.0	3.0-11.0	13.41	51.1-141.7X10 ⁶	Present study

③ 흑진주조개 정자의 특성 및 항체 개발

흑진주조개로부터 분리한 정자 분말을 PBS에 녹여 단백질량을 측정하였을 때, PBS에 녹는 수용성 단백질의 양은 3~12%의 범위를 나타내었다. 정자 단백질을 항원으로 토끼의 피하 조직에 첫 번째 주사 후, 5차례 boosting을 실시하고 마지막 boosting 1주 후, 2주 후, 3주 후에 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였다. 분리된 항혈청의 특이성을 확인하기 위해 흑진주조개의 조직 항원 단백질을 이용하여 western blotting을 실시하였다. 항혈청은 흑진주조개 정자를 포함하여 약하게 모든 조직에서 항원-항체 반응이 나타났지만 (Fig. 18A), 흑진주조개 암컷 조직 추출물로 제작된 면역흡착제를 이용하여 교차반응을 제거하고 수집한 항체는 흑진주조개 정자 단백질에서만 항원-항체 반응이 관찰되었다 (Fig. 18B). 이때, 개발된 항체가 인지하는 정자 단백질의 분자량은 약 27.5 kDa으로 단 한 개의 단백질 단편과만 항원-항체 결합 반응을 나타냈다.

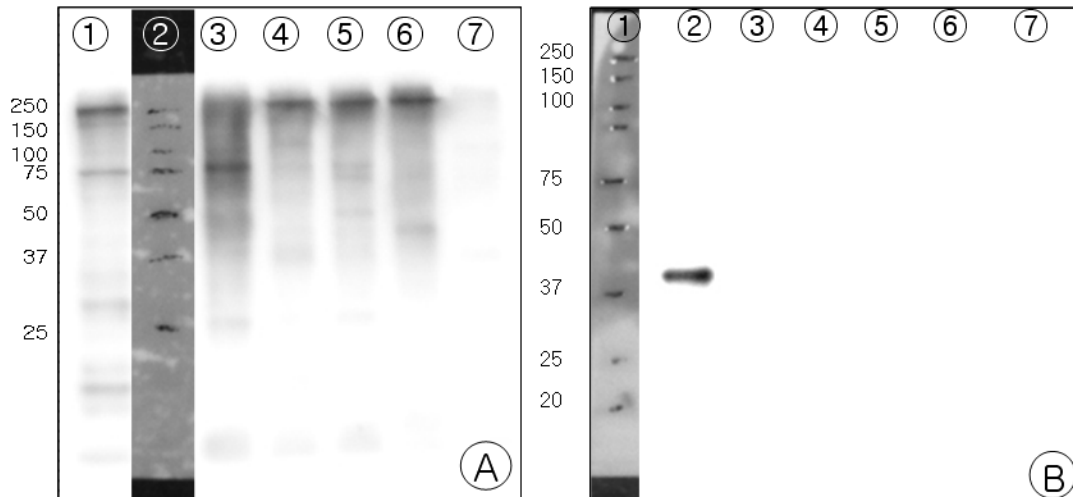


그림 3-2-17. 흑진주조개의 조직 항원 단백질을 이용한 분리된 항혈청의 특이성을 확인한 western blotting 결과. (A) 교차반응 제거 전, (B) 교차반응 제거 후, (A) Lane 1: 흑진주조개 정자 추출물, Lane 2: marker, Lane 3: 흑진주조개 소화맹낭 추출물, Lane 4: 흑진주조개 외투막 추출물, Lane 5: 흑진주조개 족 추출물, Lane 6: 흑진주조개 아가미 추출물, Lane 7: 흑진주조개 패각근 추출물. (B) Lane 1: marker, Lane 2: 흑진주조개 정자 추출물, Lane 3: 흑진주조개 알 추출물, Lane 4: 흑진주조개 소화맹낭 추출물, Lane 5: 흑진주조개 외투막 추출물, Lane 6: 흑진주조개 족 추출물, Lane 7: 흑진주조개 아가미 추출물.

④ Indirect ELISA를 이용한 정자항체 민감도 측정

2차년도 연구에서 개발 중인 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체의 민감도를 확인하기 위해 ELISA를 이용해 교차반응 제거 전, 후를 비교하여 확인하였다. 교차반응 제거 전 항혈청에서는 정자 단백질을 0.0048~10 $\mu\text{g/ml}$ 농도 범위를 측정할 수 있었다 (그림 3-2-18A). 하지만 흑진주조개 난 단백질을 제외한 기타 조직 단백질 또한 같은 범위의 농도를 측정할 수 있었다. 교차반응 제거 후, 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체는 0.31~10 $\mu\text{g/ml}$ 농도 범위의 정자 단백질을 측정할 수 있었고, 기타 조직 단백질과의 교차반응은 2.5~10 $\mu\text{g/ml}$ 농도 범위에서 미약하게 남아 있었지만 우려할 만한 강도는 아니었다 (그림 3-2-18B).

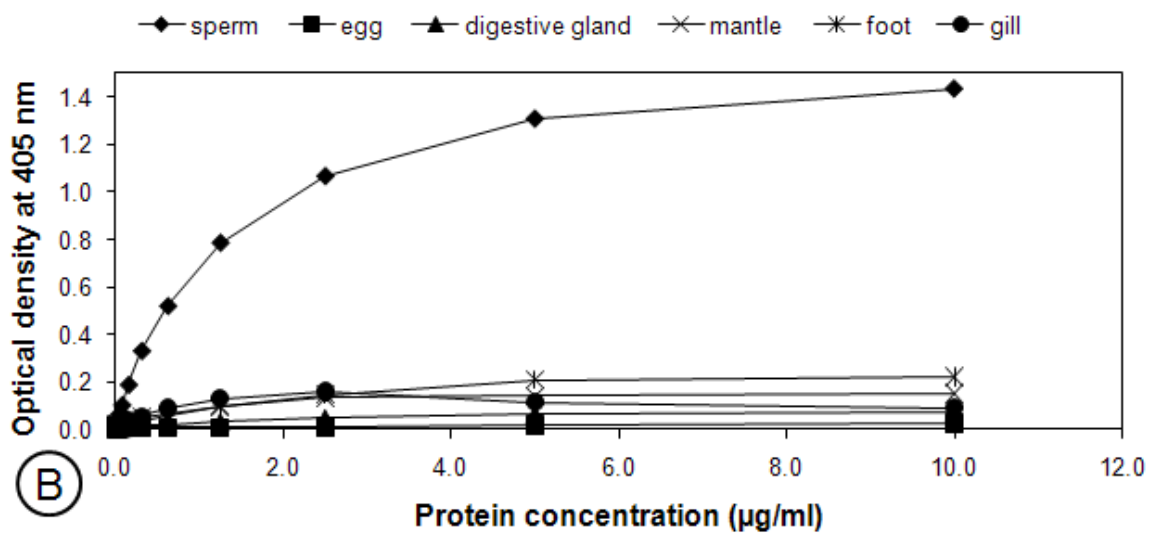
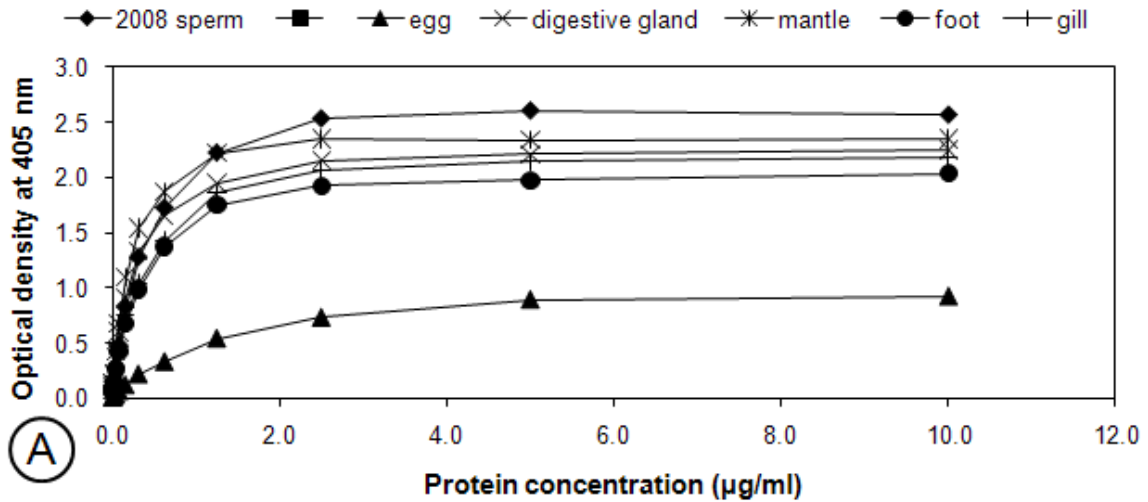


그림 3-2-18. Indirect ELISA를 이용한 정자항체 민감도 측정 결과. (A) 교차반응 제거 전, (B) 교차반응 제거 후

2차년도 연구 수행 결과, 흑진주조개의 정자를 순수하게 분리 할 수 있었다. 성숙시기의 흑진주조개 수컷 조직에 상처를 낸 후 압박하여 자연스럽게 흘러나오는 정자를 받아 체에 걸러 불순물을 제거해 순수 분리하였다. 이러한 방법은 알을 분리하는 법과 유사하였다. Choi et al. (1993)은 불순물을 제거한 정자를 percol을 이용하여 비중 차이로 정자를 순수 분리 해 내었지만, 이 연구에서는 체에 걸러 불순물을 제거한 후, 원심분리를 이용한 3회 세척으로 충분히 순수한 정자를 분리 해 낼 수 있었다. 분리된 흑진주조개의 수용성 정자 단백질은 건조 중량의 3-12 %의 범위를 나타내었으며, 이는 Choi et al. (1993)이 보고한 대서양굴 (*C. virginica*)의 수용성 정자 단백질이 13 %였다는 것과 유사하였다.

1차년도 연구에서 개발된 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체의 개발 과정과 같이 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체의 개발 또한 토끼에 주사하여 개발이 진행이 되

었다. 토끼에 주사한 정자 단백질은 총 5번의 booster를 실시해 주었다. 토끼로부터 분리된 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항혈청 역시 난 특이적인 항혈청에서처럼 정자 단백질 외에 기타 조직 단백질과의 교차반응을 western blotting 결과 (그림 3-2-17A) 확인할 수 있었으며, 이를 암컷 개체 단백질로 이루어진 면역흡착제를 이용하여 교차반응을 제거하여 성공적으로 정자 단백질 특이적인 항체를 개발 할 수 있었다 (그림 3-2-17B). 이때, 개발된 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체는 약 27.5 kDa의 단 한 개의 정자 단백질 단편만을 인지하는 것으로 나타났다 (그림 3-2-17B). 항체가 인지하는 정자 특이적인 단백질의 분자량은 현재까지 기타 이매패류 (bivalve)에서는 보고 된 바 없다. 비록 개발된 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체의 민감도 조사가 필요하지만 western blotting 결과 (그림 3-2-17B)에서 오직 정자 단백질과 항원-항체 반응을 보이는 것을 보아 향후 개발된 항체를 이용하여 흑진주조개 수컷에 대한 번식량을 측정하는데 사용할 수 있을 것으로 기대 된다.

2~3차년도 연구수행 결과 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체의 개발을 성공적으로 할 수 있었다. 개발된 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체를 이용한 ELISA 결과, 개발된 항체가 흑진주조개 정자 단백질과 강하게 반응 하는 것을 확인 할 수 있었다 (그림 3-2-18). 하지만 면역흡착제를 이용해 기타 조직과의 교차반응을 제거한 후의 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체 역시 미약하게 기타조직과의 교차반응이 존재하였지만 (그림 3-2-18B), 이것은 번식량 측정 시 기타조직 단백질을 negative control로 사용하여 미약한 교차반응에 의한 과평가를 방지 할 수 있을 것으로 사료된다.

1995년 Mikhailov et al.은 담치 (*Mytilus galloprovincialis*)의 성분화에 관여하는 단백질을 찾기 위해 수컷 특이적인 단백질 (male associated polypeptide, MAP-39)을 분리하였고, 이 단백질에 특이적인 항체를 개발하였다. 이 수컷 특이적인 단백질은 약 39 kDa의 분자량을 갖고 있었고, 개발된 anti-MAP39를 이용한 면역조직화학적 염색을 통해 MAP-39 단백질은 follicle 혹은 connective tissue matrix의 세포벽에 존재하는 단백질로 성성숙과 배우자 산란에 관여할 것이라고 생각하였다. 이는 수컷 특이적이지만 우리의 연구에서처럼 정자에 특이적이지는 않았다. 그 이유는 수컷 특이적인 단백질을 분리하는 과정에서 정자를 순수 분리하지 않고 생식소 전체를 사용하였기 때문이라 사료된다. 반면 2~3차년도 연구수행 중 개발된 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체는 정자를 순수하게 분리하여 토끼에 주사하였고, 면역조직화화적인 방법으로 확인하지는 못하였지만 western blotting과 ELISA 결과에서 개발된 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체가 약 27.5 kDa의 단백질을 인지하여 MAP-39와는 다른 단백질이며, 기타 조직과의 항원-항체 반응이 아닌 정자 단백질과의 강한 항원-항체 반응을 일으킴으로써 정자에 특이적이라는 것을 입증하였다고 할 수 있다.

현재까지 해산이매패류의 번식량을 측정하기 위해 참굴, 대서양굴, 개조개 및 바지락의 난 단백질에 특이적인 항체가 개발되어 ELISA를 통해 번식량이 측정 되었으며 (Choi

et al., 1993; Kang et al., 2003; Park et al., 2003, 2004; Uddin et al., 2008), 이들 항체의 민감도는 Table 14와 같다. 특히 Choi et al. (1993)은 대서양굴의 난 단백질과 정자 단백질 특이적인 항체를 개발하여 번식량을 측정하였고, 이때 개발된 대서양굴 정자 특이적인 항체의 민감도는 0.1~10 µg/ml 범위의 정자 단백질을 측정할 수 있었다. 이번 연구에서 개발된 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체의 민감도는 0.3~10 µg/ml 범위의 정자 단백질을 측정함으로써 대서양굴 정자 특이적인 항체보다 낮은 민감도를 갖고 있었지만, 대서양굴과 개조개의 난 단백질 특이적인 항체의 민감도 (각각 0.1~10 µg/ml, 0.23~15 µg/ml)와 비교하였을 때 비슷한 민감도를 갖고 있는 것을 알 수 있다. 따라서 2~3차년도 연구수행 기간 동안 개발된 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체의 개발을 성공적으로 이루어 졌으며, 이 연구를 통해 *Pinctada* 속에 속한 종에서 최초로 정자와 난자 단백질 특이적인 항체를 개발하였다는 것은 큰 의미를 갖는 것으로 사료된다.

3. 마이크로네시아와 폴리네시아 흑진주조개의 번식량 비교

가. Chuuk State와 Tahiti에서 채집된 흑진주조개 암컷의 번식량 비교

1차년도 연구에서 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체의 개발이 이루어졌고, 2차년도 연구에서 Chuuk State에서 채집된 암컷 흑진주조개의 번식량 측정이 이루어 졌다. 3차년도 연구 수행 중 2010년 5월 Tahiti에서 20개체의 흑진주조개 채집이 이루어졌고, 이 중 9개체가 암컷이었다. 9개체의 암컷 흑진주조개의 크기는 130~150 mm 였다. 따라서 2차년도에 측정된 Chuuk State에서 채집된 암컷 흑진주조개 개체 중 동일한 크기의 흑진주조개의 번식량 측정값을 선별하여 Tahiti 흑진주조개 번식량 측정값과 비교하였다. Tahiti에서 채집된 9개의 암컷 개체 중 6개체가 성숙기 (Ripe stage)인 것으로 나타났고, 이때 흑진주조개의 성성숙지수 (GSI, %)는 건중량의 16.0%의 알을 포함하는 것으로 나타났다 (그림 3-2-19).

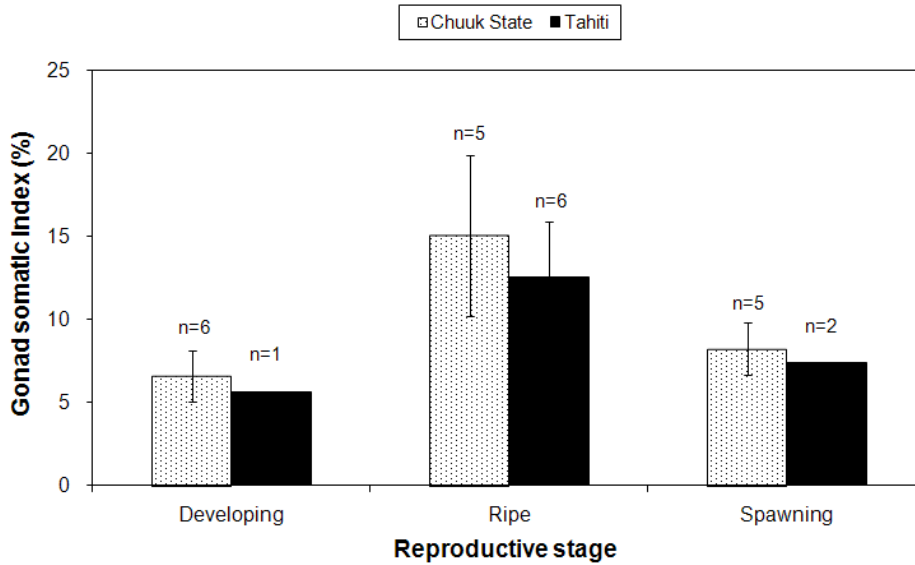


그림 3-2-19. 마이크로네시아와 폴리네시아에 서식하는 흑진주조개 암컷의 개체 및 성성숙 지수의 비교

나. 흑진주조개 수컷의 성성숙 단계

흑진주조개의 번식량 측정에 앞서 조직학적인 방법을 이용해 성성숙 단계를 관찰하였다. 2009년 12월 Chuuk State에서 채집된 100개체의 수컷 흑진주조개는 다양한 성성숙 단계를 관찰할 수 있었다. 전체 수컷의 54 %가 발달단계 (Development stage) 인 것으로 나타났으며, 이어 성숙기 (Ripe stage)가 28 %, 부분 산란기 (Spawning / partly spawn stage)가 9 %, 소모기 (Spent stage)가 9 % 관찰되었다. 반면, 2010년 5월 Tahiti에서 채집된 11개체의 수컷 흑진주조개에서는 90.9 % (10개체)가 발달단계 (Development stage)로 관찰되었으며, 성숙기 (Ripe stage)는 9.1 % (1개체)만 관찰되었다 (그림 3-2-20).

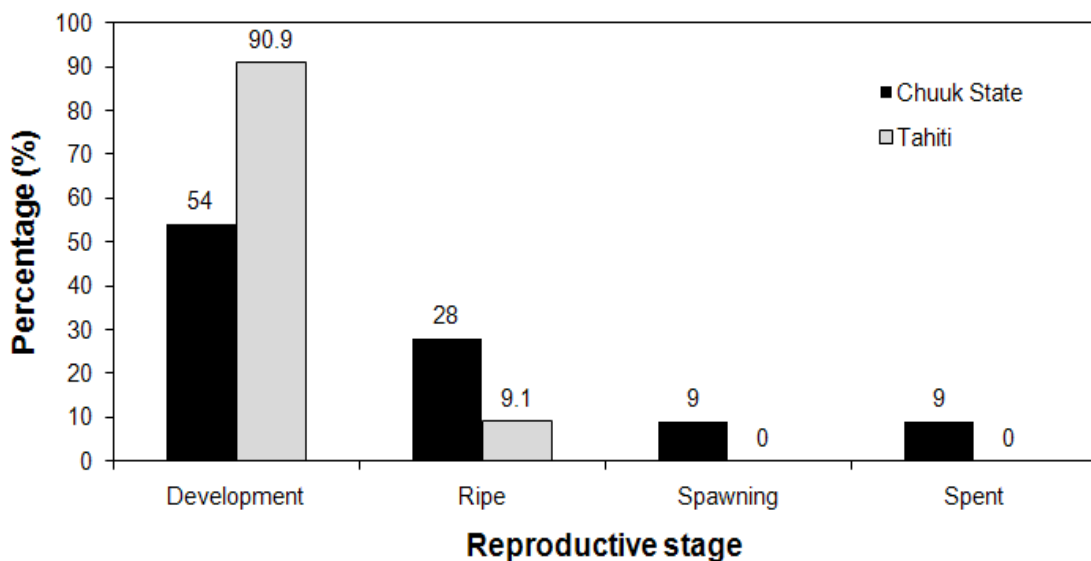


그림 3-2-20. 마이크로네시아와 폴리네시아에 서식하는 흑진주조개 수컷의 성성숙 지수의 비교

다. 항체면역효소법 (ELISA)을 이용한 번식량 (Reproductive effort) 측정

2 ~ 3차년도에 걸쳐 개발된 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체를 이용해 흑진주조개 수컷의 번식량을 측정하였다. Western blotting을 이용한 특이성 검사에서 개발된 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체는 오로지 약 27.5 kDa의 정자 단백질과만 반응하였으나 (그림 3-2-17B), ELISA를 이용한 민감도 검사에서는 미약한 교차반응이 남아 있었다 (Fig. 그림 3-2-18B). 따라서 미약하게 남아 있는 기타 조직 단백질과의 반응을 번식량 측정 시 negative control로 사용하여 번식량 측정 값의 과평가 현상을 방지하였고, 측정된 O.D 값에서 negative control 값을 뺀 후의 값을 환산하여 번식량을 측정하였다. 조직학적인 성숙 발달 단계와 함께 나타낸 결과, Chuuk State의 경우, 발달단계의 흑진주조개는 습중량의 평균 3.1 %를 정자의 무게를 포함 하는 것으로 나타났으며, 성숙기에는 평균 8.5 %, 부분산란기에는 평균 5.7 %, 소모기에는 평균 0.8 %의 정자를 포함 하는 것으로 나타났다. 특히, 성숙기에 해당하는 흑진주조개는 최대 습중량의 15.9 %의 정자를 포함 하였다. 반면, Tahiti에서 채집된 흑진주조개의 경우, 발달단계의 흑진주조개가 습중량의 평균 4.8 %의 정자 무게를 포함하고 있었고, 성숙기에 해당하는 1개체의 흑진주조개 수컷은 습중량의 평균 7.5 %를 정자를 포함하는 것으로 나타났다 (그림 3-2-21).

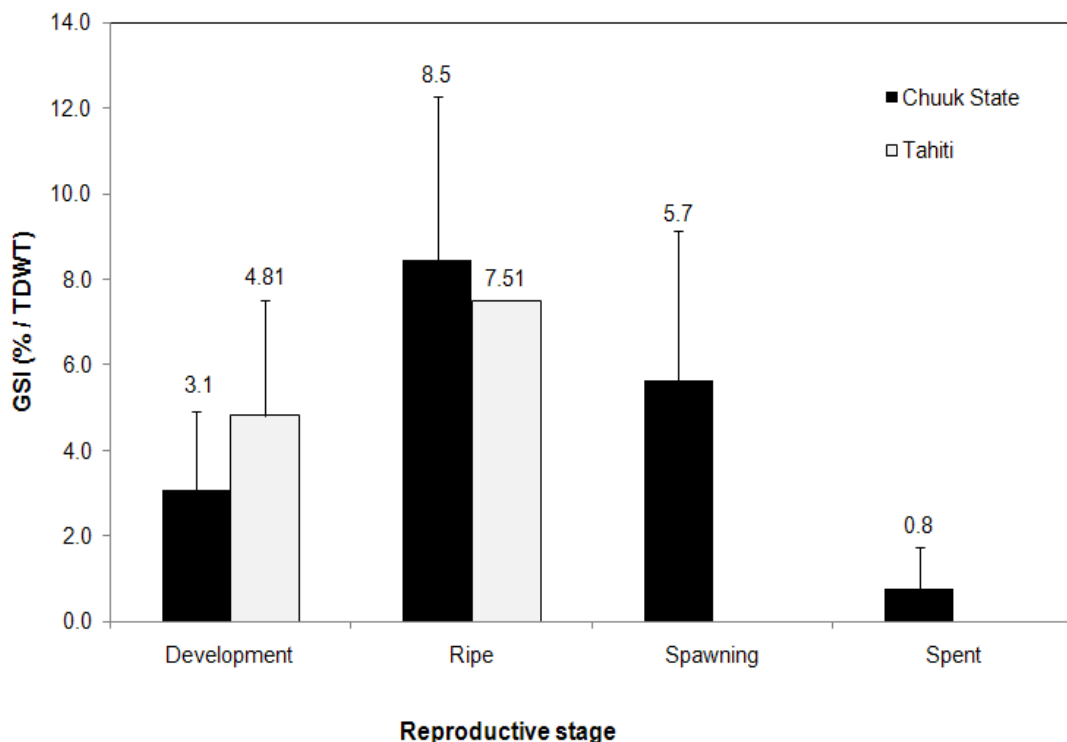


그림 3-2-21. 마이크로네시아와 폴리네시아에 서식하는 흑진주조개 암컷의 발달단계에 따른 번식량 비교

제3절 흑진주조개 모패의 원생생물 질병 현황

1. 두 지역(Chuuk과 Tahiti)의 흑진주조개 질병 감염 유무 진단

가. 조직학적 관찰을 통한 기생충 감염 유무 관찰

모패의 건강도를 파악하기 위해 조직병리학적 방법을 통해 기생충 감염 유무를 관찰하였다. 조직병리학적 관찰을 위해 2009년 12월 Chuuk State에서 채집된 흑진주조개와 2010년 5월 Tahiti에서 채집된 흑진주조개가 사용되었다. 채집 당시, 흑진주조개의 패각에 기생하는 Polydora 의 감염 유무를 확인하였다.

나. 소화맹낭 위축도 (Digestive Tube Atrophy) 관찰

처리된 개체들은 Davidson's solution에 하루 동안 고정된 5 mm 두께의 절편을 70 % 알코올로 탈수하고 파라핀 포매하였다. 포매된 조직은 마이크로톰을 이용하여 6 μ m 두께로 절단하여 Harris' Hematoxylin과 Eosin Y 로 염색하였다. 제작된 조직 시료는 광학 현미경을 이용하여 Perkinsus, Trematode, Maltelia, Cestode, Metacestode, Copepode, Gregrine 등의 기생충 감염 유무를 관찰 하였다. 또한, 소화맹낭위축도 (Digestive tube atrophy, DTA)는 각각 0-4 단계 (표 3-3-1, 그림 3-3-1)로 나누어 수치화 하였다 (Kang et al., 2010).

표 3-3-1. 흑진주조개의 소화맹낭 위축도 관찰 단계(Kang et al. 2010).

Score	Description
0	Normal wall thickness in most tubules (0% atrophy), lumen nearly occluded, few tubules even slightly atrophied
1	Average wall thickness than normal, but greater than one-half normal thickness, most tubules showing some atrophy, some tubules still normal
2	Wall thickness averaging about on-half as thick as normal
3	Wall thickness less than one-half of normal, most tubules walls significantly atrophied, some walls extremely thin (fully atrophied)
4	Wall extremely thin (100 atrophied), nearly all tubules affected

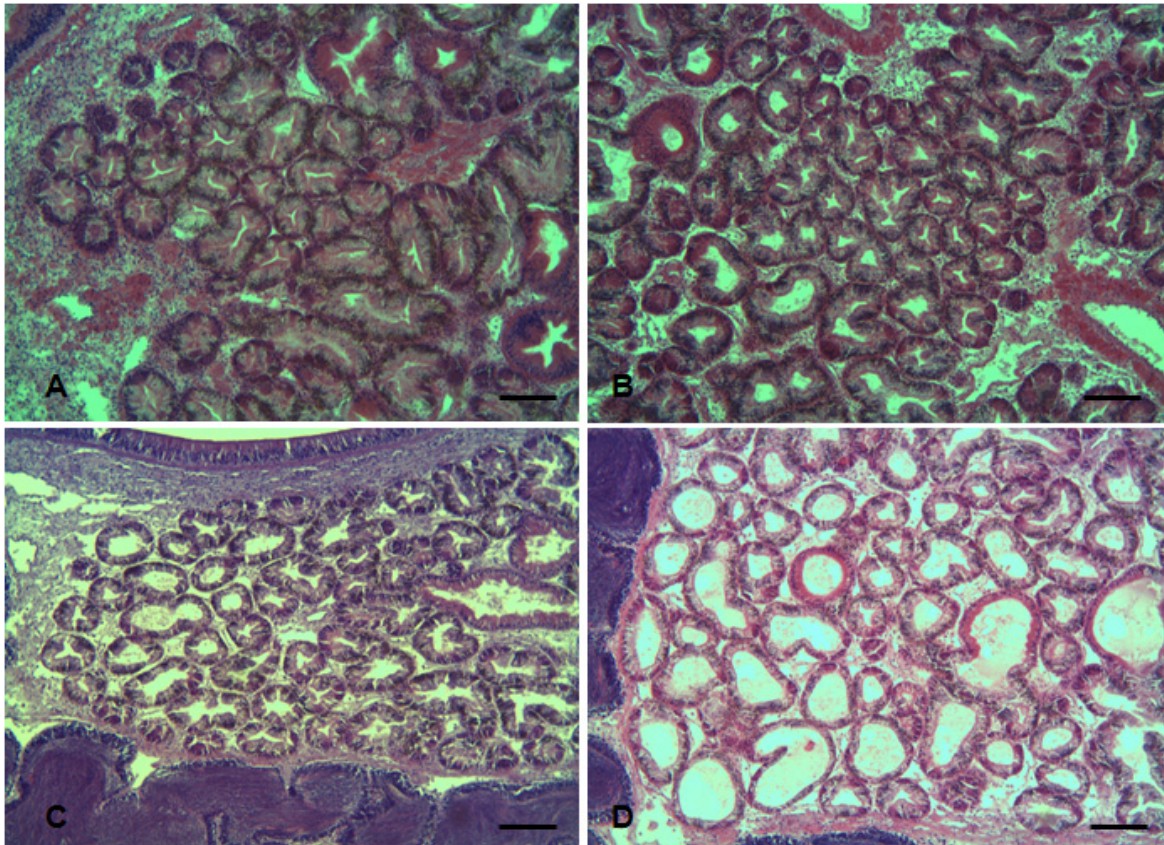


그림 3-3-1. 흑진주조개의 소화맹낭 위축도의 현미경 상 단계(Kang et al. 2010). Scale bar: 100 μ m.

다. PCR을 이용한 **DERMO disease, Perkinsus olseni** 감염 진단

2008년과 2010년 Chuuk과 Tahiti에서 채집된 흑진주조개의 아가미 (4개체)와 내장낭 (3개체)으로부터 25 mg의 조직을 잘라내어 proteinase K와 tissue lysis buffer (Qiagen, Germany)를 처리하여 total DNA를 추출하였다. 이와 함께 Perkinsus에 감염된 황도바지락과 *P. honshuensis* trophozoite를 일본 동경대학의 Professor Yoshinaga Tomoyoshi로부터 제공받아 DNA를 분리하여 positive control로 사용하였다. Perkinsus를 진단하기 위하여 기존에 밝혀진 *Perkinsus olseni*, *P. marinus*, *P. honshuensis*의 ITS(Internal transcribed spacer) 서열을 이용하여 multiple alignment를 수행하여, variation이 큰 영역을 확인하고 *P. olseni* (Pos F/ Pos R)와 *P. honshuensis* (Pho F/ Pho R)에 특이적인 primer를 제작하였다 (표 3-3-2). 400 ng의 total DNAs, 50 pmole의 forward와 reverse primer, 10X Ex Taq buffer, 2.5 mM dNTP와 0.625 Unit의 Ex Taq polymerase를 혼합하여 25 μ l의 반응액을 준비하여 Thermal cycler TP600 (Takara Co.)를 사용하여 PCR 반응을 다음과 같이 실시하였다. Early denaturation 94 $^{\circ}$ C에서 5분, denaturation 94 $^{\circ}$ C에서 30초, primer annealing 58 또는 55 $^{\circ}$ C에서 30초, extension은 72 $^{\circ}$ C에서 25초를 35회 반복하고, 최종 DNA extension은 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 실시하여 반응을 종결하였다. 증폭된 각 유전자 산물은 ethidium bromide가 첨가된 1.2% agarose gel 전기영동을 실시하여 100bp DNA ladder (bioneer)에 비교하여 그 크기를 확인하였다.

표 3-3-2. 흑진주조개 *Perkinsus* 감염 여부 파악을 위한 유전자 프라이머 제작

Primer	Sequence (5'→3')	Anneal temp (°C)
Pos F	CGAAACTAGCGGTCTTGCTTCGGC	58
Pos R	AGGCGCGGTCTCCTCTCG	
Pho F	CCACCTGCCTGGCAGGTGATT	55
Pho R	CGAATTGGCTCAATAAATTGAGYC	

라. 질병 검출 결과

2009년 12월 Chuuk State에서 채집된 136 개체의 흑진주조개와 2010년 5월 Tahiti에서 채집된 20개의 흑진주조개의 건강도 조사를 위해 조직병리학적인 관찰을 실시하였다. Chuuk State에서 채집된 흑진주조개의 경우, 소화맹낭 위축도의 경우 수컷 개체에서 평균 2.0, 암컷 개체에서 평균 1.7로 나타났다. 기생충 감염 유무 관찰 결과는 수컷 개체에서 Trematode 30.0%로 가장 높은 감염율을 보였으며, 이어 Cestode 13.0%, Polydora 9%, Gregarine 2%, Copepode 1% 순의 감염율을 보였다. 암컷 개체에서는 수컷과 동일하게 Trematode가 30.6%로 가장 높은 감염율을 보였으며, 이어 Polydora 13.9%, Copepode, Metacestode, Gregarine이 각각 2.8%의 감염율을 보였다. 반면 Tahiti에서 채집된 흑진주 조개의 경우에는, 소화맹낭 위축도가 수컷의 경우 평균 3.1, 암컷의 경우 평균 2.8로 Chuuk State에서 채집된 흑진주조개 개체보다 높은 수치를 나타냈으며, 기생충 감염 유무 관찰 결과에서는 수컷 개체에서는 Trematode 만이 18.2%의 감염율로 관찰을 할 수 있었으며, 암컷 개체의 경우 Trematode, Cestode, Metacestode, Rickettsia가 각각 1개체씩 11.1%의 감염율을 나타내었다 (표 3-3-3).

표 3-3-3. 마이크로네시아와 폴리네시아 흑진주조개의 소화맹낭 지수 및 기생충 감염 빈도

Sampling site	Sex	n	DTA	Prevalence (%)							
				Polydora	Perkinsus	Trematode	Copepode	Cestode	Metacestode	Gregarine	Rickettsia - like organism
Chuuk State	M	100	2.0	9.0	0.0	30.0	1.0	13.0	0.0	2.0	0.0
	F	36	1.7	13.9	0.0	30.6	2.8	0.0	2.8	2.8	0.0
Tahiti	M	11	3.1	0.0	0.0	18.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	F	9	2.8	0.0	0.0	11.1	0.0	11.1	11.1	0.0	11.1

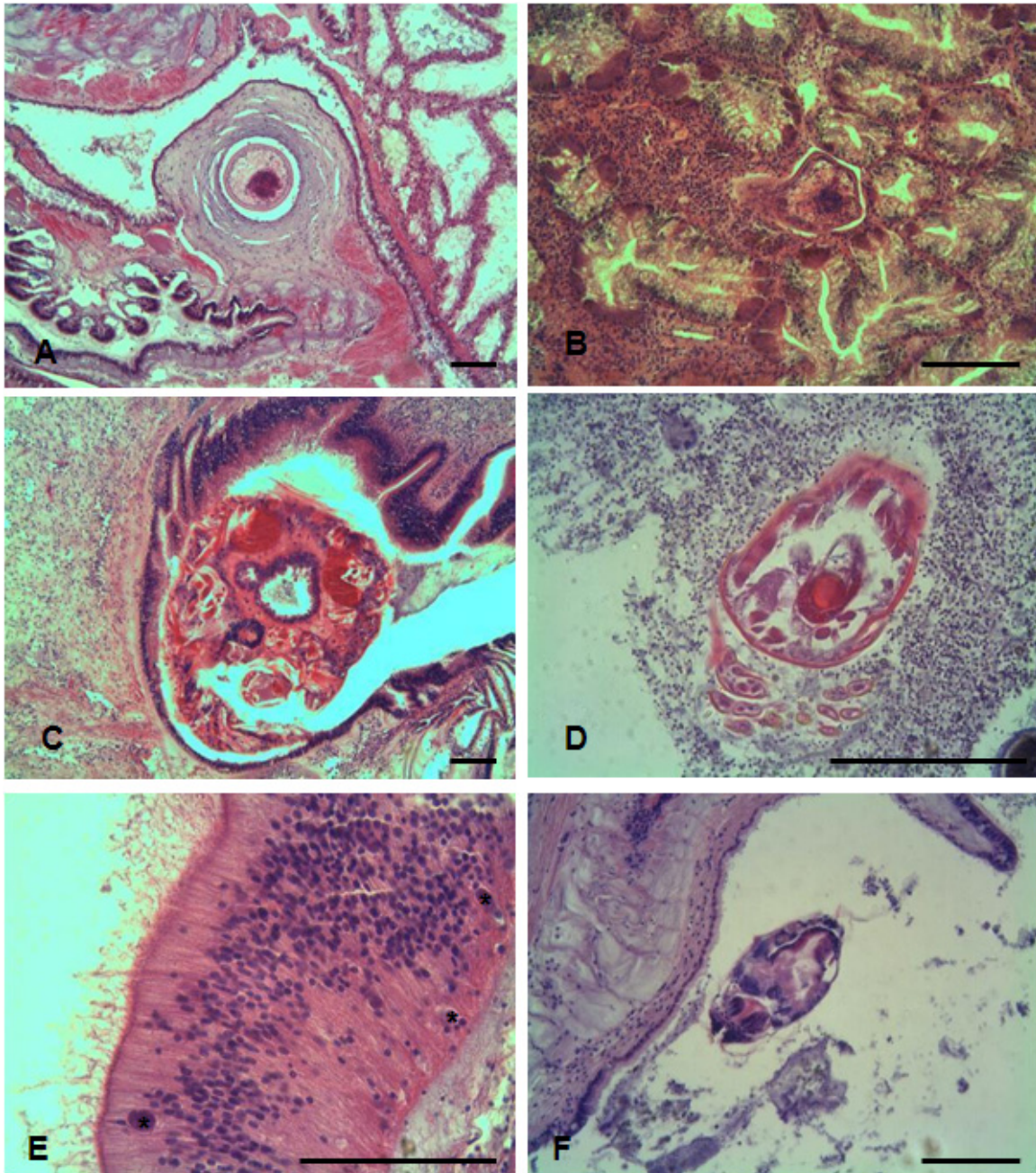


그림 3-3-2. 현미경 상 조직슬라이드 관찰을 통한 기생충들의 사진. A~B: Cestode, C~D: Copepode, E: Gregarine (*), F: Trematode. Scale bar: 100 μ m.

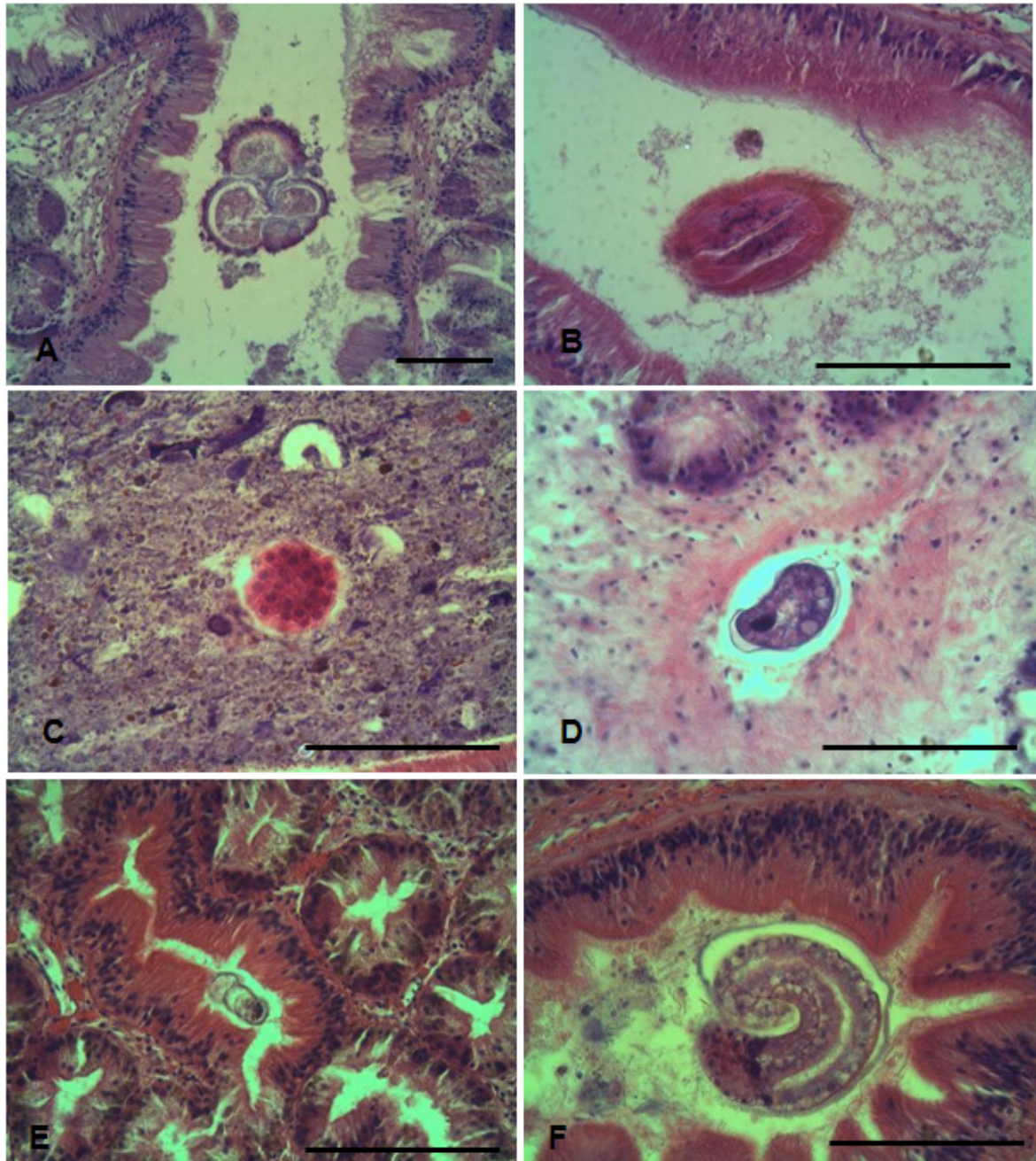


그림 3-3-3. 현미경 상 조직슬라이드 관찰을 통한 미 분류된 기생충들의 사진. Scale bar: 100 μ m.

마. PCR을 이용한 *Perkinsus* 진단

조직병리학적인 *Perkinsus* 감염 여부 진단과 더불어 분자생물학적인 진단을 수행하여 흑진주조개의 *Perkinsus* 감염 여부를 확인해 보았다. 그림 3-3-4에서 보는 바와 같이 PCR 진단 수행 결과 흑진주조개의 아가미와 내장낭에서는 *P. olseni*는 진단되지 않았다. 또한, *P. hounshuensis*도 진단되지 않았다 (data not shown). 이러한 결과는 조직병리학적인 관찰 결과에서 *Perkinsus*가 관찰되지 않는 것과 같은 결과를 나타내었다.

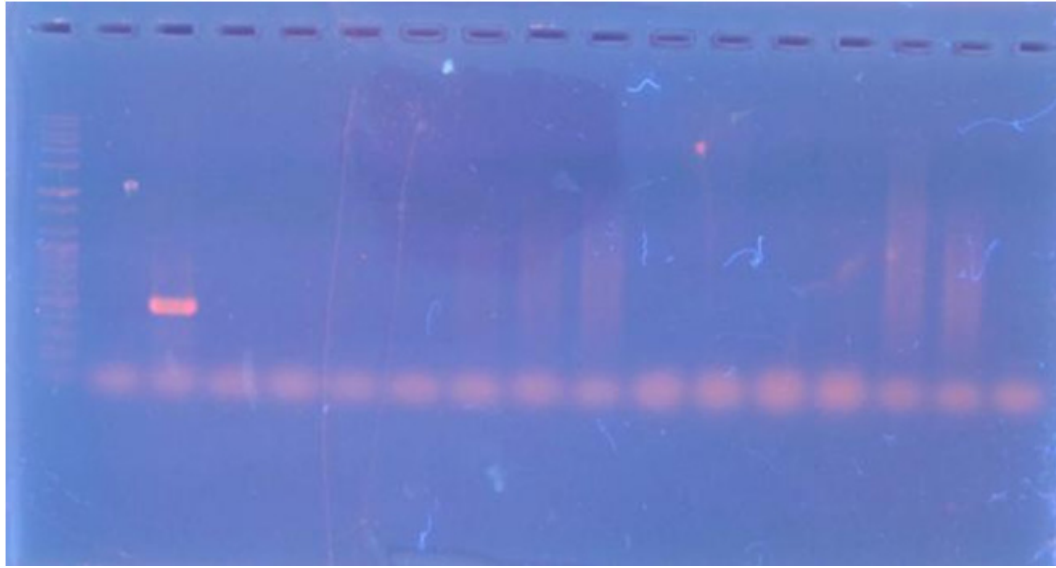


그림 3-3-4. PCR 기법을 이용한 분자생물학적 *Perkinsus* 감염 여부 진단. Lane 1: 100 bp DNA ladder (bioneer), Lane 2: negative control (water), Lane 3: positive control (*P. olsenii*에 감염된 바지락), Lane 4~7: 흑진주조개 아가미(Chuuk) State, Lane 8~10: 흑진주조개 소화기관(Chuuk), Lane 11~14: 흑진주조개 아가미(Tahiti), Lane 15~17: 흑진주조개 소화기관(Tahiti).

질 좋은 흑진주의 생산을 위해서는 건강한 모패의 관리가 필요로 하다. 모패의 건강도를 알아보기 위해서 이 연구에서는 소화맹낭 위축도와 기생충 감염 유무의 진단을 통해 흑진주조개의 건강도를 평가하였다. 흑진주조개와 관련하여서, 1985년과 1986년에 걸쳐 French polynesia에 서식하는 흑진주조개의 대량패사가 보고 된적 있다. 이때의 대량패사는 치패와 모패에서 모두 동일하게 대량패사가 있었던 것으로 조사 되었으며 (Chagot et al. 1993, Remoissenet 1995), 이와 관련하여 여러 학자들이 그 원인을 밝히기 위해 연구를 하였지만 아직 확실한 원인은 밝혀지지 않았다 (Le Moullac et al. 2003, Bernadac et al. 1980, Cabral 1989a, Chagot et al. 1993). 하지만 먹이 환경이 bacteria가 증식할 수 있는 충분한 환경이 아니기 때문에 1999년 Comps et al.이 제시한 virus에 의한 패사일 것으로 추정하고 있다. 현재까지 흑진주조개를 비롯하여 *Pinctada* 속에 속한 진주조개의 질병에 관한 연구를 미비한 실정이다 (Humphrey 2008). 몇몇 연구들에 의해서 *Pinctada* 속에 속한 진주조개에서 조직병리학적인 방법을 통한 기생충 감염 보고는 흑진주조개에서 Gregarine 감염 (Chagot et al. 1993, Comps et al. 2001), 아코야진주조개에서 *Perkinsus* sp. 감염 (Muroga 2002), Haplosporidiosis 감염 (Hine 1996, Hine and Thorne 1998), Trematode 감염 (Shiplely and Hornell 1906), Metacestode 감염 (Shiplely and Hornell 1906) 등이 보고되었지만 기생충 감염이 패사를 일으킨다는 연관성에 관한 연구 보고는 없었다. 우리의 연구에서도 *Polydora*, Trematode, Metacestode, Cestode, Gregarine, *Rickettsia*와 같은 질병을 조직병리학적인 방법으로 확인하였으나 (그림 3-3-2, 3-3-3) 이들이 흑진주조개에 미치는 영향에 대한 연구는 좀더 세밀한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

제4절 흑진주조개 유생 관리

1. 흑진주조개 유생의 건강성 조사 및 치패 생산

가. 서론

일반적으로 이매패류의 생식소 발달은 수온과 먹이의 영향에 크게 영향을 받는다. 온대지방의 경우, 수온은 gametogenesis를 시작하게 하는 cue인 반면, 먹이는 생식소의 발달을 촉진·성숙시키는 인자로서 유생의 생존에도 그 영향이 있다. 그러나 열대지역의 경우, 수온이 흑진주조개의 성숙을 결정한다는 보고도 있다(Saucedo et al. 2001). 온대지방 이매패류 서식지에 비해 열대지역 환초 환경의 경우, 수온은 안정적인데 반해 먹이조건은 좋지 않다. 이런 지역에 서식하는 흑진주조개, *P. margaritifera*의 서식밀도는 그리 높지 않은데 그 이유로 먹이원의 부족을 꼽기도 한다. 이 흑진주조개를 이용한 흑진주 산업은 세계적으로 고부가가치 수산양식 산업으로 각광을 받고 있으나, 근래에 들어서는 양식장 오염, 어장의 노후화, 질병 및 유생 확보 등의 여러 가지 문제로 인해 양식에 어려움이 있다고 보고되고 있다.

이매패류 유생의 초기성장과 생존율은 모패가 만들어 준 알의 질에 따라 그 수준이 좌우된다고 보고되고 있다. 2002년 한-남태평양연구센터에서 실시한 흑진주조개 종묘생산 결과(unpublished data)에 따르면 수정란에서 자패 착생까지의 생존율은 0.7% 정도였었다. 이 종묘생산은 자연에서 채집된 암·수 개체들을 이용하여 실시했던 연구로서, 이런 낮은 수준의 생존율을 보인 것은 환초 지역에서 채집된 암컷 개체의 포란수와 알의 질을 무시할 수가 없다. 이는 해수로부터 충분한 영양원을 받지 못했다는 간접적인 증거가 되며, 그 결과 생식소의 충분한 성숙을 이루지 못한 것으로 해석할 수 있다.

그러나 인공종묘는 천연종묘에 비해 생산단가가 높고, 먹이 생물 배양 등 고난도의 기술을 필요로 하므로 대량생산에 많은 어려움이 있다. 따라서 단위면적당 생산량을 높이고 특히, 초기 유생의 폐사를 최소화시킬 수 있는 최적 생존조건을 구명하는 것은 매우 중요한 일이다.

유생의 성장과 생존에 미치는 영향으로 알의 질을 보고(Gallager and Mann, 1986)한 바 있으나, 정자에 대한 정보는 없다. 또한 인공종묘생산과 정에서 유생의 생존을 높이는 가장 중요한 것은 먹이의 양과 질, 공급횟수 등이 중요하게 언급되고 있다. 따라서 흑진주조개 인공종묘생산과정에서 어미관리, 유생 및 치패 사육에 필요한 먹이로 이용되는 미세조류의 질적 및 양적 대량 배양은 종묘생산과정에서 가장 필수적이다. 뿐만 아니라, 건강한 유생 사육을 위한 영양조건은 매우 중요한 문제로(Garcia-Esquivel et al., 2001) 공급되는 영양조건의 변화는 직접적으로 유생의 성장과 생화학적 조성 변화에 영향을 미치

고, 전체 사육조건의 질을 결정한다(Farias et al., 1998). 따라서 인공종묘생산과정에서 유생의 생화학적 조성의 변화를 정확히 아는 것은 에너지 대사와 영양조건을 평가하는 중요한 요소(Farias et al., 1998)로 전체 종묘생산의 성공과 효율적인 먹이생물 관리의 기초적인 요소로 작용할 수 있다.

그러나 미세조류의 대량배양은 배양비용이 매우 높을 뿐만 아니라, 공간적인 면에서 유생사육시설의 3분의 1이 소요될 정도로 많은 부분을 차지하고 있다. 미세조류 대량 배양에 소비되는 경비는 노동력이 37%, 시설 및 감가상각비 30%, 배지비용 19% 그리고 에너지 비용이 14%의 순으로 노동경비가 가장 많은 부분을 차지하고 있다(Donaldson, 1991). 전체적인 미세조류의 배양비용은 실내의 경우 \$2~200/kg dry weight 이고, 실외는 \$4~20/kg dry weight (De pauw and Persoone, 1988)로 미세조류의 종류와 배양방법 및 규모에 따라 다르지만 대체적으로 상업적 인공종묘생산 과정에서 전체 인공종묘생산 비용의 15~85% 정도 차지하고 있다(Donaldson, 1991). 따라서 효율적인 미세조류의 이용은 대상생물의 건강을 유지할 뿐만 아니라, 전체적인 인공종묘생산 비용을 낮출 수 있다. 미세조류의 효과적인 이용은 공급대상 생물의 크기 또는 유생의 성장단계에 따라 적정 요구조건을 맞춤으로서 허실을 줄여 전체적인 먹이효율을 높이고, 불필요한 배양을 억제함으로써 노동력을 절감할 수 있다.

현재 세계적으로 진주 산업에서 가장 각광받고 있는 해산 진주조개 중에서 흑진주조개 *Pinctada margaritifera*는 가장 중요한 세 가지 종들 중의 하나이다. 다른 두 종들은 *P. maxima* 와 *P. fucata* 이다 (K. Alagarwami, 1989). 또한 전 세계 흑진주 생산량의 90% 이상을 차지하는 French Polynesia에서는 이 *P. margaritifera* 종에서 세계 최상품이자 최고가의 진주를 생산한다(Ward, 1985; AQUACOP, 1982). 위의 세가지 종 중에서 *P. fucata* 는 일본, 인도에서 일찍부터 양식이 되어졌고(Alagarwami et al., 1983) 대량 치패 종묘생산을 위한 실험적 부화사육이 입증되어져 왔으며(Alagarwami et al., 1987), *P. maxima*는 호주에서 인공 대량 배양이 실험적으로 성공되어졌다(Tanaka and Kumeta, 1981), 하지만 흑진주조개 *P. margaritifera*의 유생사육은 French Polynesia에서 반복적인 시험에도 불구하고 실패하였다 (Coeroli et al., 1984).

흑진주조개는 주로 북태평양의 일본 오키나와 해역에서부터 남태평양 호주, 뉴질랜드, 타히티 그리고 인도양과 아프리카 등지에서 서식한다. 과거 오랫동안 흑진주조개 양식을 위한 종묘(치패)의 확보는 주로 자연에서 채집되었다. 그러나 일부에서는 어장환경의 오염과 질 높은 모패의 안정적인 공급을 위하여 인공종묘생산의 필요성을 인식해 왔다. 그러나 실험적으로는 성공을 하였으나 안정적으로 대량 양식산업에 이용하기 위해서 아직도 기술력이 부족한 실정이다. 현재 타히티, 호주 등 흑진주조개에 많은 연구를 하고 있는 국가에서도 인공종묘생산의 산업적 이용에 관한 연구가 꾸준히 진행되고 있는 실정이다.

그러나 지금까지 흑진주조개 유생의 최적 성장을 유도할 수 있는 영양요구 및 먹이 생물의 조건에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 이에 대한 체계적인 연구는 흑진주조개 인공종묘생산의 지속적인 발전과 경쟁력 향상을 위해서 무엇보다도 중요하다고 할 수 있다. 그러므로 이 연구의 목적은 먹이가 흑진주조개의 생식소 성숙과 유생의 생존에 어떤 영향을 미치는지에 대한 연구로서, 흑진주 양식산업을 위한 모패와 유생 사육에 효율적인 자료를 제공하는데 있다.

나. 재료 및 방법

(1) Sampling

마이크로네시아 연방국(Federated States of Micronesia, FSM)은 많은 섬들로 이루어진 Yap, Chuuk, Phonpei, Kosrae의 4개 주가 있으며, 그 중 가장 인구가 많은 Chuuk 주의 Weno 섬에 우리의 해양연구센터가 위치해 있다. 축 환초(atoll)는 N7°, E149° 에 위치하고 세계에서 가장 큰 대형 환초로 길이는 약 225km이며, 직경이 약 64km 정도이다. 환초의 내해는 연중 파도가 높지 않아 안정적이며, 일부 다른 소규모 환초보다는 넓어 조류의 흐름이 원활하여 패류양식에 아주 적합하다고 할 수 있다.

종묘생산에 사용된 어미조개들은 웨노(Weno)섬 연안에서 잠수로 채집하여 센터 앞 수심 20-30m의 바다에서 연승수하연에서 귀매달기 및 포켓에 수용하여 수심 3-9m에서 1-2년 동안 양성하던 어미들을 이용하였다.

(2) 유생 발생을 위한 처리

각 실험구의 모패를 1시간동안 노출시켜 산란유도하고 난 후, 각 실험구를 구분하기 위해 서로 다른 10 L의 수조에서 수정시켰다. 산란이 끝난 개체들을 수조에서 꺼낸 후, 수정란을 60 µm 체를 이용하여 3회 세란하고 각 실험구별 수정율을 산정하였다. 각 실험구별 수정란의 발생과정(D-shaped stage, umbone stage, pediveliger, juvenile and spat stages)을 일정한 시간마다 현미경하에서 관찰하고 기록하였으며, 각 단계별 사진촬영 및 크기 측정을 하였다. 먹이는 D-shaped larvae부터 현장에서 배양한 *Isochrysis*, *Pavlova*, *Chaetoceros* and *Tetraselmis*를 1:1:1:1의 비율로 급이 하였다. 각 단계별로 서로 다른 비율의 먹이를 공급하였으며, 그 결과는 Table 1과 같다.

(3) 먹이생물배양

흑진주조개, *P. margritifera*(L.)의 종묘생산을 위하여 일반적으로 조개류의 유생 먹이로 사용되고 있는 *Isochrysis aff. galbana*, *Pavlova lutheri*, *Chaetoceros gracilis*, *C. simplex*, *C. calcitrans*, *Tetraselmis suecica*, 그리고 *Nannochloropsis oculata*를 한국미세조류은행에서

원종을 구매하였다. 운반된 원종은 50ml 코니컬 튜브에 5개로 나누어 수용하였고, 이 미세조류를 중간 배양한 후 2ℓ 플라스틱 용기에 담은 후 아이스박스를 이용하여 한국에서 현장으로 운반하였다. 이 종들 중에서 현장에서 배양이 잘 되는 *Isocrysis aff. galbana*, *Pavlova lutheri*, *Chaetoceros gracilis*, *Nannochloropsis oculata* 4종을 흑진주종묘생산에 먹이로 사용하였다 (Alagarwami et al., 1989; Southgate et al., 1998). 또한 현지 축은 미세조류를 항시 구매할 수가 없는 실정이어서 사정상 살아있는 종을 급이할 수 없을 때를 대비하여 국내에서 판매되는 Shellfish diet (Instant)를 준비하였다.

(4) 먹이생물 원종 배양

한국에서 항공으로 현장에 냉장상태로 옮겨온 원종은 200ml 삼각플라스크를 이용하여 배양하였다. 삼각플라스크는 중성세제로 세척하여 증류수로 행군 다음 태양광에 의해 깨끗이 말린 것을 사용하였고, 배양수는 5 μ m, 1 μ m 카트리지 필터 그리고 자외선 살균등을 거친 여과수를 사용하였으며 삼각플라스크에 적당량을 넣고 솜마개로 막고 그 위에 호일을 씌운 후 100℃에서 30~40분 동안 Autoclave에서 멸균하였다. 고온멸균 후 다시 자외선 살균등 하에서 3시간 이상 멸균하여 사용하였다. 접종 시 솜마개에 먹이생물이 닿지 않도록 주의하고 접종이 끝나면 플라스크 주둥이 부분을 알코올램프로 가열하여 살균 해주었다. 접종한 원종은 Shaking Incubator내에서 12:12 암기 : 명기로 배양하였고, 배양 온도는 22℃를 유지시켜주었다. Shaking Incubator가 사용이 불가능할 경우 하루 한번 이상 흔들여 주었다. 배지는 Conwy 배지를 이용하였으며, 배양수의 1리터당 1ml의 배지, 비타민은 배양수 1ℓ 당 0.1ml, 그리고 규조류(*Chaetoceros sp.*)의 경우 배지 외에 규산나트륨을 배양수 1ℓ 당 0.8ml을 첨가시켜 주었다.

각 종은 중간배양과 대량배양시 원생동물에 의한 오염에 대비해 수시로 교체해 주기 위해서 5~6일에 한번씩 재접종하여 충분한 양의 원종을 보유하였다.

(5) 중간배양 및 대량배양

각 종은 원종을 5ℓ 배양용기에 재접종하여 중간배양용으로 사용하였으며 이것을 다시 30ℓ 용기에 접종하여 대량배양용으로 사용하였다. 배양에 사용된 배양수는 5 μ m, 1 μ m 카트리지 여과 후 자외선살균등을 거치고 1kW 히터봉을 이용하여 95℃까지 가열한 후 사용하였다. 이때 접종하기 전 다시 자외선 살균등 하에서 4시간 정도 재살균 하며 배양실 온도와 같은 온도로 수온을 하강시켰다. 사용한 배지는 원종배양 시와 동일하였으며, 먹이생물의 접종 농도는 접종 하고자하는 먹이생물을 배양수의 10분의 1정도 넣는 것을 기본으로 하나 먹이생물을 더 빨리 키우고자 할 때는 접종농도를 더 높여주었다. 배양실은 온도가 20~22℃가 되도록 유지하였고 광량은 12:12 암기 : 명기로 해주었다. 배양된 미세조류는 매일 급이 전 혈구계수판을 이용하여 확인하였고, 사육일수별, 종별 그리고 상태에 따라 상황에 맞게 급이율을 달리하였다.



그림 3-4-1. 실내 먹이생물 배양 모습

(6) 산란 유도

산란유도에 사용된 어미는 채집하여 1~2년간 3~9m 수심의 연승수하연에서 양성 중인 어미를 사용하였다. 수하연에서 배양장으로 어미를 이동하여 패각에 붙어있는 부착생물을 청소용 칼과 솔을 이용하여 깨끗이 제거한 후 각장을 측정하였다. 이 어미들은 총 70 개체로 평균 각장 12.72 ± 1.19 cm 이었다. 이들을 통풍이 잘 되는 플라스틱 바구니에 담고, 바람이 잘 드는 그늘에서 간출자극을 실시하였다. 노출을 110분 동안 실시한 후 1톤 FRP수조에 어미들을 옮겨 놓고, 5 μ m, 1 μ m 카트리지 여과 후 자외선살균등을 거친 여과해수를 포기 없이 천천히 흘려주어 산란을 유도시켰다. 그러나 아무 반응이 없어서 전량 환수 후 먹이 자극을 실시하였다. 산란을 하지 않아 먹이 자극을 실시하였으며 먹이생물 공급 후 약 50분 후부터 산란이 시작되었다. 방정이 일어난 후 약 1-2분 뒤 자극을 받은 암컷들이 방란을 시작하였고, 방란이 시작되면서 난과 정자의 적절한 수정을 위한 정자의 밀도를 고려하여 살균해수를 조금씩 추가 시켜주었으며 약하게 포기를 시켜주었다. 방란 방정은 10여 분간 지속 되었다.

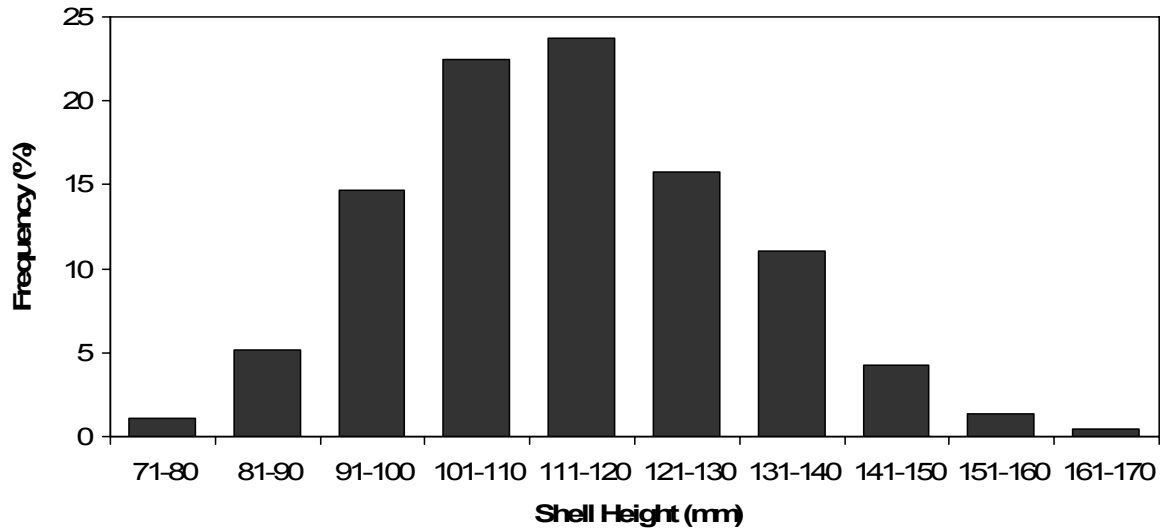


그림 3-4-2. 산란유도에 사용된 흑진주조개 모패의 크기분포

(7) 유생 관리(사육 및 성장)

각 실험구의 모패를 1시간동안 노출시켜 산란유도하고 난 후, 각 실험구를 구분하기 위해 서로 다른 10 L의 수조에서 수정시켰다. 산란이 끝난 개체들을 수조에서 꺼낸 후, 수정란을 60 µm 체를 이용하여 3회 세란하고 각 실험구별 수정율을 산정하였다. 각 실험구별 수정란의 발생과정(D-shaped stage, umbone stage, pediveliger, juvenile and spat stages)을 일정한 시간마다 현미경하에서 관찰하고 기록하였으며, 각 단계별 사진촬영 및 크기 측정을 하였다. 먹이는 D-shaped larvae부터 현장에서 배양한 *Isochrysis*, *Pavlova*, and *Nannochloropsis*를 1:1:1의 비율로 급이 하였다. 각 단계별로 서로 다른 비율의 먹이를 공급하였으며, 그 결과는 Table 1과 같다.

방란 방정이 일어난 10여분 후 망목 20 µm의 걸름망을 이용하여 세란하고 수정란을 수거하였다. 수거된 수정란은 약 1,462만 립 정도이었으며 4 m × 2 m × 1.3 m의 FRP수조내 수량 4톤의 여과 살균된 사육수에 수정란을 약 3.65 eggs/mL정도의 밀도로 수용하였고, 난에 영향을 최소화하도록 아주 약하게 포기를 시켜주었다. 수정 후 약 50분에 세포분열이 일어났고, 약 4시간 후에 상실기에 접어들기 시작했으며, 18시간 이후에 초기 D상이 발견되기 시작하였고 약 24시간 후에 대부분의 D상 유생으로 발달되었다. 이때 40µm의 걸름망을 이용하여 D상 유생을 수거하였다.

유생에게는 매일 정기적으로 먹이를 급이 하였으며, 먹이생물인 Iso., Nano., Pav.를 같은 비율로 급이 하였으며(Phaeo.-전량폐사, Chaeto-상태불량으로 급이를 하지 않았다.) 부화 일수, 유생의 크기와 밀도에 따라 공급량을 달리 하였다. 부착시기 이후에는 사육수 mL당 개체수로 먹이를 급이 하였다. 유생의 크기가 작아 유수식 방법에 어려움이 있어 지수식 사육방법을 이용하였고, 부착 유도 전까지 2일 1회 정기적으로 사육수를 전환

수를 실시하였다. 환수는 전날 10 μm , 1 μm 의 필터를 통과한 자외선 살균해수를 이용하였으며 환수시마다 유생의 크기를 측정하였다.

(8) 부착

채묘기는 진주조개 부착기질로 널리 쓰이고 있는 검정색 필름(차광막)을 이용하였으며, 필름을 40 × 40 cm 크기로 두 겹의 필름을 팽팽하게 당겨 사각으로 테두리를 피복된 철사를 둘러 3단으로 제작하였다. 또 다른 한 종류의 채묘기는 50 × 50 × 20 cm 크기의 플라스틱 상자에 부착기질을 겹쳐 놓고 뚜껑으로 덮었으며, 플라스틱 상자는 해수의 소통이 원활하게 많은 구멍이 나 있는 것을 이용하였다.

제작된 채묘기는 먼지 및 이물질을 제거하기 위하여 담수로 깨끗이 세척해 주었고 다시 해수에 3일 정도 담가 두었다. 부착시기가 다가오는 시점인 부화 후 15일경 채묘기를 투입하였다.

(9) 치패 사육 및 성장

부착된 치패들은 (1)침하식 연승수하연(모패양성장), (2) 센터앞 폰드 가두리, (3)실외 육상수조와 (4) 배양장 내부수조에서 사육하였다. (1) 연승수하연은 산호초 연안에서 100여 미터 떨어진 수심 15-25 m 지역에 설치되어있다. 이 연승수하연에 수심 3~6 m의 범위에 치패망을 설치하였다. (2) 센터앞 폰드 가두리는 산호초 연안에서 수심 0.5~1 m의 잘피지역 수로를 통과하여 사방이 둑으로 막혀진 연안해수의 유입이 적은 지역으로 파도가 잔잔하고 먹이생물들이 많은 지역이다. 이곳에 가두리를 설치하여 네트에 치패를 수용하였다. (3) 실외 육상수조는 4톤 크기의 FRP 수조에 펌프를 이용하여 웅덩이의 해수를 공급하여 유수식으로 치패를 사육하였다. 수조가 실외에 설치한 이유로 수조 상단에 천막을 설치하여 비와 직사광선을 막아주었다. (4) 배양장 내부수조는 산호초 연안의 수심 약 15m지점에서 끌어올린 해수를 이용하였고 10 μm , 5 μm 필터링을 하여 해수를 지수식으로 공급하였다. 육상의 2곳인 실외 수조와 배양장 내부수조는 매일 정기적으로 먹이를 공급하였으며, 먹이를 급이한 후 약 2시간 정도는 지수식으로 한 후 다시 해수를 유수식으로 공급하였다. 폰드와 연승수하연의 치패에는 먹이를 따로 공급하지 않았다. (1)과 (2)에서는 해적생물에 의한 유생의 피해를 줄이기 위하여 정기적으로 월 1~2회 해적생물을 제거하여 주었고, 치패망에 여러 부착생물의 부착으로 치패의 먹이섭취와 해수 흐름에 방해가 줄이기 위하여 네트 청소를 실시하였다. 또한 각각의 장소에서 치패의 성장을 조사하기 위하여 정기적으로 크기를 측정하였다.

(10) 유생의 발달단계별 지방산의 조성 및 분석

시기 및 단계별 유생발생 실험을 진행하던 중 이번 분석에 필요하고 가장 잘 채집된

2009년 9월의 흑진주조개 유생을 대상으로 지방산 조성을 발달단계별로 파악하였다. 지방산 분석은 protocol에 따라 순수 정제된 시료를 사용하였다. 모든 시료는 분석 전까지 -70°C에서 보관하고, 동결건조하여 각각의 무게를 측정 후 수행하였다. 지방분석에 사용되는 모든 유리용기는 증류수로 세척하여 450°C에서 3시간 정도 태운 후, 혼합 유기용매[Dichloromethan:Methanol(CH₂CL₂:MeOH)=1:1)]로 2~3번 세척하였다. 준비된 시료를 유리용기에 넣고, 혼합 유기용매(CH₂CL₂:MeOH=1:1)를 첨가한 후, 약 10분간 초음파분해(bath sonication)하여 지방을 추출하였다(Bligh and Dyer 1959). 추출된 지방을 혼합 유기용매(CH₂CL₂:MeOH=2:1)에 다시 용해시킨 후, 지방 class와 지방산 분석에 사용하였다. 추출된 적정량(약 0.2~1.0 μl)의 지방을 chromarod (Mitsubishi Kagaku Iatron)에 떨어뜨리고, 혼합 유기용매(CH₂CL₂:MeOH=1:1)로 농축(focusing)시킨 후, 비극성 유기용매(Hexane:Diethyl ether:Formic acid=85:15:0.2)로 지방 class를 분리하였다. 이렇게 분리된 지방 class는 Iatrosan Mark-V TLC-FID(Thin-Layer Chromatography with Flame-Ionization Detector; IATRON LABORATORIES, Inc.)로 분석되어(Ju et al. 1997), 지방 class standard (Phospholipid: 1,2-Dipalmitoyl-rac-glycero-3-phosphocholine hydrate; Cholesterol: cholesterol; Free Fatty Acid: n-Nonadecanoate; Triacylglycerol: Glyceryl trioleate; Sigma-Aldrich Co.)와 비교하여 시료의 지방 함량과 class를 정성, 정량화하였다. 총 지방 함량은 각 지방 class 함량의 합으로 산출되었다.

지방산 분석을 위하여 추출된 지방의 적정량(약 50 μl)에 0.5 N KOH/MeOH를 넣고 70°C에서 30분간 가열한 후, 혼합 유기용매(Hexane:Diethyl ether=9:1)로 알코올과 스테롤을 분리, 추출하였다. 추출하고 남은 용액에 염산을 넣어 KOH를 침전시킨 후, 혼합 유기용매(Hexane:Diethyl ether=9:1)로 지방산을 추출하였다. 추출된 지방산에 BF₃/MeOH를 첨가하고, 70°C에서 30분 동안 가열하여 지방산메틸에스테르(Fatty Acid Methyl Ester)로 유도한 후, 추출 전에 첨가된 internal standard인 n-Nonadecanoic acid(동경화성공업주식회사)와 비교하여 gas chromatographyflame ionization detector(GC-FID; Agilent 7890A)로 정량 분석하였다. 지방산의 분리, 분석에는 GC-FID에 ZB-5MS column(길이 60 m, 내경 0.32 mm, 코팅된 내부 필름 두께 0.25 μm; Phenomenex)을 사용하였다. 적용된 온도 조건은 시료 주입구 250°C, column 오븐은 50°C에서 120°C까지 10°C/분, 120에서 300°C까지 4°C/분으로 설정되었고, 이동상 가스는 헬륨(30 ml/분)을 사용하였다. 각 지방산의 구조(탄소수, 포화도, 이중결합 위치)는 GC-mass spectrometry detector(GC-MSD; Agilent 7890A GC-Agilent 5975C MSD)를 이용하여 70 eV에서 원자 질량 50-700 amu 범위에서 수행되었으며, 나머지 적용 조건(column, 온도, 이동상 가스)은 정량 분석시의 GC-FID와 동일하게 설정하였다. 지방산 성분 중 불포화지방산의 탄소 이중결합(double bond) 위치는 상업용 지방산 standard (Fatty acid methyl ester; FAME, unsaturated kit; Sigma-Aldrich Co.) 또는 FAME을 fatty acid picolinyl ester로 전환하여 GC-MSD로 확인하였다(Destaillats and Angers 2002).

이 연구에서 지방산 명명은 총 탄소 개수와 이중결합 개수를 표기한 후, 메틸기

(-CH₃)의 탄소를 1번으로 하여 탄소가 이중결합(double bond)되어 있는 첫 번째 탄소 위치를 n 뒤에 숫자로 표기하였다(Table 2).

다. 결과 및 고찰

(1) 먹이생물 배양

흑진주 종묘생산에 주로 이용되는 먹이생물은 *Isocrysis aff. galbana*, *Pavlova lutheri*, *Chaetoceros gracilis*, *C. simplex*, *C. calcitrans*, *Tetraselmis suecica*, 그리고 *Nannochloropsis oculata*를 한국미세조류은행에서 원종을 구매하여, 현장에서 배양하였으나 원종이 한국에서 실온에서 운송이 되어졌고, 열대산호초지역의 해수를 이용하여 배양했을 때는 이 7종들 중에서 *Isocrysis aff. galbana*, *Pavlova lutheri*, *Chaetoceros gracilis*, *Nannochloropsis oculata* 4종만이 배양이 양호하였다.

(2) 산란 유도

한남태평양 해양연구센터(KSORC) 앞 라군은 흑진주조개 모패관리에 양호한 장소이다. 종묘생산 시작 4~5주전에 선별된 개체를 2 m 전후의 수심에 매달아 줄 경우 효과적으로 성 성숙을 유발할 수 있었다. 그러나 동 지역은 집중호우 시 토사유입으로 탁도가 증가하거나, 동풍이 강할 경우 외역의 부유물질이 다량 유입하는 곳으로 기상에 따른 변수가 많은 곳이므로 1주 후 실내 모패 관리동으로 옮겨 인공적으로 생산한 미세조류들을 급이시키며 모패를 관리했다. 성 성숙(sexual maturation)이 상당히 진행된 모패를 선별하여 종묘생산에 임할 수도 있지만, 종묘생산 개시 1~2개월 전에 모패를 준비하여 계획에 맞추어 성성숙을 유도했다. 한번 산란 경험이 있는 개체도 2개월 정도 양성하여 종묘생산용 모패로 사용할 수 있으므로, 선별된 모패를 먹이생물이 풍부한 연안에 매달아 주거나, 실내 수조에 수용하여 배양한 먹이를 주며 주기적으로 관찰했다. 모패를 간출시키거나 해수를 약간 담은 용기에 30분 정도 놓아두면 패각을 벌린다. 이때, 집계를 패각에 넣고 고정시키고 생식소의 색과 비만도를 관찰하여 기록하고 소독한 주사바늘로 생식소를 가볍게 찢어 내용물을 묻혀 내어 모패의 암수 구분을 현미경으로 관찰하였다.

흑진주조개 어미의 건강상태가 종묘생산에서 중요한 요소로 작용하여, 자연에서 채집되고 그 후 약 1~2년간 연승수하연에서 양성되었던 어미를 육안 상 패각의 성장선이 잘 발달되고 색이 뚜렷한 것들을 선별하여 깨끗이 선별하여 산란유도를 실시하였다. 산란유도에 이용된 모패는 그림 3-4-3과 같다. 어미는 총 70마리로 평균 각장 12.72±1.19 cm이었다. 산란유도는 일반적으로 패류에서 간출자극을 실시하여 흑진주조개도 간출자극을 약 110분 실시하였으나 산란을 하지 않았다. 그래서 다시 자외선살균 여과해수를 환수한 후 먹이자극을 실시하여 산란을 유도하였다. 자극 후 약 50분부터 방정이 시작된 후 1~2분 뒤 암컷의 산란이 시작되었다. 수정이 잘 되도록 수조 내에 약간 해수를 흘려 주면서 포기하여 정자와 난의 잘 섞이도록 하였다.

수거된 수정난은 각 사이즈별 100 μm , 80 μm , 40 μm , 20 μm 거름망을 이용하여 세척한 후, 미리 준비해둔 여과살균해수의 부화수조에 수용하였다. 수거된 수정난은 약 1,462만개 정도이었다.



그림 3-4-3. 산란유도를 위한 모패 간출자극 및 자외선살균해수 유수

산란을 마치고 휴지기에 있는 개체는 실내수조에서 30일 정도 먹이를 충분히 주며 관리하면 성적으로 성숙한다. 수컷은 90% 이상에서 완숙기에 이른 정자가 관찰되며, 수컷의 경우 영양이 좋을 경우 항상 성숙된 정자를 가지고 있기 때문에, 모패를 수용할 때 표식을 하여 주고 관리하면 자주 생식소 확인을 하지 않아도 된다. 암컷은 생식소의 1/2 이상이 팽창하여 있으며 유백색이 짙은 개체를 골라 생식소를 검경하여 독립된 알들이 우점적으로 관찰되는 개체를 고른다. 암컷은 60% 정도에서 성숙된 알을 관찰할 수 있다. 패각을 살펴보면 생식소가 팽창하기 시작하여, 안쪽으로 1/3 이상 부위가 유백색을 띤다. 이때부터 간출자극에 의한 인공산란 유발이 가능하며 2개월이 되면 산란을 마치고 생식소강이 서서히 비어 가는 산란기의 개체들이 관찰되기 시작한다. 따라서 주기적으로 생식소를 검사하여 가능한 한 산란에 임박한 개체를 선별하여 모패로 사용하였다. 약 2시간 정도의 외부 노출자극에 의해 산란 임박을 조장하기 전 종묘생산 준비를 마무리 하였다.

(가) 치패 생산을 위한 산란유발 및 생산 프로토콜

흑진주조개의 산란유발 자극방법 중 가장 효과 있는 방법은 2시간 정도 햇빛으로 간

출 자극 후 이보다 8-10℃ 낮은 수온에서 저온 자극을 준 경우였다. 흑진주 조개는 응성 선속형 자웅이체로 알려져 있지만(Tranter 1958a, 1959), 서식 환경에 따라 자웅동체와 자웅이체형의 성 결정 현상을 보이며, 개체군에 따라 자성선속형도 출현하는 경우도 있다(Trander 1958b). 산란은 대부분 불완전하며 산란하지 못한 알을 재흡수 하지만, 경우에 따라서 생산된 알을 모두 산란하거나(Tranter 1958a), 생산된 알의 2/3 정도만 산란하거나(Bullivant 1962), 여러 차례에 걸쳐 조금씩 산란(Rose et. al. 1990) 하는 경우도 보고되고 있듯이 다양한 산란유형을 나타낸다.

그러나 이번 연구에서 밝힌 바와 같이 응성선속형 자웅이체로 밝혀졌고, 여러차례에 걸쳐 산란하는 것으로 추정되는 바 본 연구에서 사용한 흑진주조개 암컷의 생식소에는 난황생성전난모세포, 난원세포 및 난모세포가 혼재하는 개체가 많았으며, 자극에 반응한 암컷의 수와 수정란 수를 감안하면 대부분의 개체가 불완전 산란을 하는 것으로 판단된다. 모패는 전술한 바와 같이 관리 중이던 모패의 성 성숙도를 산란유발 1주일 전에 검사하여 암컷과 수컷의 비율을 2:1로 준비했고, 산란유발 당일 아침에 채집한 자연산 모패를 더하여 당일 산란용 모패로 사용했다. 축 현지 사정을 감안하여 재구성한 인공산란 프로토콜은 다음과 같다(그림 3-4-4).



그림 3-4-4. 치패생산을 위한 시설 및 각 과정별 그림

- ▶ 07:00~09:00 시설 준비, 배양장의 청결유지, 준비용 용기세척 및 10 μm 여과해수 준비에 의한 인공산란 유발 준비
- ▶ 09:00~11:00 패각 청소, 부착생물을 완전하게 제거하지 않을 경우 부착생물도 산란 자극에 산란하여 흑진주조개 유생과 경쟁하기 때문에 완전하게 제거해야 한다. 청소 시 성장돌기도 제거하여 산란 자극도를 높여 준다. 패각청소가 끝나면 담수펌프로 5분 정도 다시 세척하여 해면, 갯지렁이, 요각류 등의 기생생물 등을 구제한다. 간출 자극 전 인공적으로 개각 후 암수를 검경하고, 암수를 따로 보관하였다.

암컷은 약 10마리, 수컷은 5마리 정도로 2:1 비율로 준비한다.

- ▶ 10:00~13:00 간출 자극, 간출자극은 햇빛이 들고 통풍이 잘되는 곳에서 실시하며, 폐각이 건조되어 개각이 자연스럽게 이뤄질 때까지 실시한다. 간출자극 중에 자외선 조사된 살균배양수를 준비한다. 깨끗한 해수를 1 μm 카트리지를 여과기로 거른 후 자외선 멸균기로 멸균하여, 간출이 이뤄지는 기온 대비 약 8~10 $^{\circ}\text{C}$ 정도 낮은 살균배양수를 소요량의 2배로 준비하여 5톤 수조에 담아 준비했다.
- ▶ 13:00~21:00 상대 저온 자극, 상대 저온자극 5톤 수조에 살균배양수를 50 cm 수심으로 채워 모패가 완전히 잠기게 하여 수용하고 포기는 하지 않으며 조용함을 유지한다. 자극 개시 2시간 후 산란이 유발된 수조 및 개체들을 확인한다.
- ▶ 21:00~21:30 산란 및 수정, 산란수조의 환경에 의해 정상적인 경우 30분 이내에 산란한다. 수컷이 먼저 방정하고, 이어서 암컷이 방란기도 하나 둘 모두 한꺼번에 방출하기도 한다. 방출된 정자가 너무 많으면 물이 탁해지고 수정률이 저하될 뿐만 아니라 세균이 번식할 가능성도 높아지므로 방정이 시작되어 물색이 약간 흐려지면 수컷을 모두 제거한다. 여분의 수조가 있을 경우 수컷을 방정 시켜 적정량의 정자 현탁액을 암컷 수조에 넣어주어도 좋다. 암컷의 방정이 끝나면, 모패를 모두 제거하고 천천히 저어주어 수정을 도와준다. 이 작업은 최초 방사 후 30분 이내에 마친다. 산란 수조 내의 해수를 5 ml씩 5회 각기 다른 위치와 수심에서 채취하여 같은 용기에 넣고 잘 흔들어 준 후 이중 1ml씩 3회 채취하여 해부 현미경으로 검정하여 산란 수, 수정률을 확인한다. 산란수조의 수온이 상온에 도달 후 30분 이내에 산란이 시작되지 못하면, 수컷 한 마리의 정소를 절개하여 정자현탁액을 만들어 넣어준다. 다시 30분을 경과하여도 산란이 시작되지 못하면 전 과정을 다시 되풀이해야 한다. 부화수조를 준비하고 1 μm 로 여과하여 자외선멸균기를 통과시킨 상온해수를 채워 놓는다.
- ▶ 21:30~22:30 수정란 수거/세척 및 부화조 수용. 산란수조의 해수를 75 μm 네트를 통과시켜 찌꺼기와 부유물을 제거하고 20 μm 네트로 수정란을 수거하여 깨끗한 해수로 세척하여 잔존 정자를 제거하여 부화조에 수용한다. 흑진주조개 수정란은 유연성이 커 20 μm 네트를 통과하는 경우가 많이 있다. 따라서 수정란의 수거 및 세척은 부화수조에서 실시하여 20 μm 네트를 통과한 수정란은 같은 부화수조에 수용하고, 20 μm 로 거른 수정란은 수개의 부화수조에 나누어 수용한다. 수용밀도는 2~3개/ml로 한다. 부화수조를 약하게 포기해 준다.

(나) 부유유생 사육

미수정란은 물방울형이나 수정을 마치면 점차 둥글어 진다. 인공산란유발로 얻어진 흑진주조개 수정란은 원형으로 직경은 50~51 μm 로 다른 이매패류와 유사하다. 수온 29 $^{\circ}\text{C}$, 염분 33‰에서 수정란은 부등할을 한다. 산란시간 기준으로 1시간 만에 2세포기에

도달하며, 이후 세포분열 시간은 평균 30분 내외로 1시간 20분 만에 4세포기, 1시간 50분 만에 8세포기, 2시간 20분 만에 16세포기, 3시간 만에 32세포기에 도달하여, 이때부터 개체별 발생시간에 차이가 나기 시작한다. 4시간 30분 만에 상실기에, 6시간 만에는 대부분의 수정란이 낭배기에, 9시간 후에는 담륜자(trochopore)유생으로 부화하여 유영생활에 들어간다. 이때의 크기는 약 $65.11 \pm 2.67 \mu\text{m}$ 로서 수정에서 초기 담륜자유생이 되기까지 걸린 시간은 같은 종의 난 발생 연구(Southgate and Beer 1997)와 유사하였으나, 초기 D형 유생의 크기가 $5 \mu\text{m}$ 정도 작은 경우가 있다. 대부분의 경우 담륜자 유생기에서 초기 D형 유생기 사이에 제1차 대량폐사가 일어나며, 20% 이상 유생이 사멸했다.

수정 후 1.5일이 지나면 D형 유생의 입주위에 섬모가 발달하여 먹이를 섭취하기 시작한다. 이후 유생의 성장은 $10 \mu\text{m}/\text{일}$ 내외로 빨라지며, 제7일째 각정기에 도달하며, $180 \mu\text{m}$ 로 성장한다. 이 때, 급격하고 치명적인 제2차 대량폐사가 일어나며, 많은 유생이 사멸했다. 이 시기가 바로 흑진주조개 종묘생산에 있어 가장 조심해야 할 시기인 것으로 여겨진다. 이러한 대량 폐사는 모든 산란군에서 같이 관찰되었으며, 유생밀도와 먹이생물 공급량과는 독립적으로 발생하는 것으로 생각된다.

제 2차 대량 폐사시기를 견디고 살아남는 유생은 15일째 발안기와 포복기에 들어가기 시작한다. 15일째는 대부분의 유생에서 한 쌍의 뚜렷한 붉은색 안점을 관찰할 수 있다. 발안기 및 포복기 유생은 2~3일 내에 부착기 유생으로 발달하여 저층에 머물다가 떠오르기를 수회 반복한다. 바로 이 시기가 채묘시기로 부착기 유생이 적당한 기질을 찾으면 다시는 떠오르지 않고 죽사를 내어 기질에 부착하고 저서생활로 들어가며 점차 흑진주조개 모양으로 변한다. 이를 부착치패라 하며 흑진주조개의 특징인 크게 귀가 발달하지 않은 상태이다. 부착치패는 성장이 빨라 부착 후 10일 지나면 각장 1 mm 정도로 성장하고 귀가 발달하여 흑진주조개의 모양을 갖춘다.

(3) 유생의 성장

수거된 수정란은 약 1,462만개였으며 산란 24시간 후 수거된 초기D상 유생은 164만 개체로 부화율은 11.21% 정도였으며 이때 1차 감모가 일어났다. 수정란은 크기가 지름 약 $50 \mu\text{m}$ 정도였다. 유생들은 수량 4톤의 자외선 살균해수에 약 $3.65 \text{ 난}/\text{ml}$ 의 밀도로 수용되었다. 수정란이 부화 후 D상까지 발달하는 동안의 사육수 온도와 수정란의 세포분열과 초기유생발달은 표 3-4-1과 그림 3-4-5와 같다. 수정 후 10분에 극체가 출현하였고, 약 50분 뒤 대부분의 수정란은 2세포기의 발달단계를 보였다. 그리고 수정 후 약 3시간50분경 상실기에 접어들었으며 수정 후 약 18시간10분경에 초기 D상 유생들이 관찰되었으며 약 24시간 후 대부분의 난들이 D상 유생으로 발달하였다. 이때 초기 D상 유생들의 평균 크기는 각장 $82.97 \pm 2.55 \mu\text{m}$, 각고 $65.11 \pm 2.67 \mu\text{m}$ 이었다.

표 3-4-1. 수정난의 발생단계별 시간, 크기 및 개체수.

발생단계	경과시간	크기(μm) SL/SH	개체수	수온($^{\circ}\text{C}$)
수정난	10분	50	1,462만	28.9
2세포기	50분	50		
4세포기	1시간 10분	50		
8세포기	1시간 45분	50		
16세포기	2시간 20분	50		
32세포기	2시간 50분	50		
상실기	3시간 50분	55		
낭배기	4시간 30분	55		
담륜자유생	5시간 30분	55		
초기D상 유생	18시간 10분	80/60	164만 (부화율 11.21%)	
D상 유생	약 24시간	87/70		28.1
초기각정기	6-10일	136/130		27.8
각정기	12일	149/135	148만 (생존율 90.24%)	27.6
포복기	15일	189/174	60만 (생존율 36.58%)	27
부착기	19-23일	251/224	76,720 (생존율 4.67%)	28.7

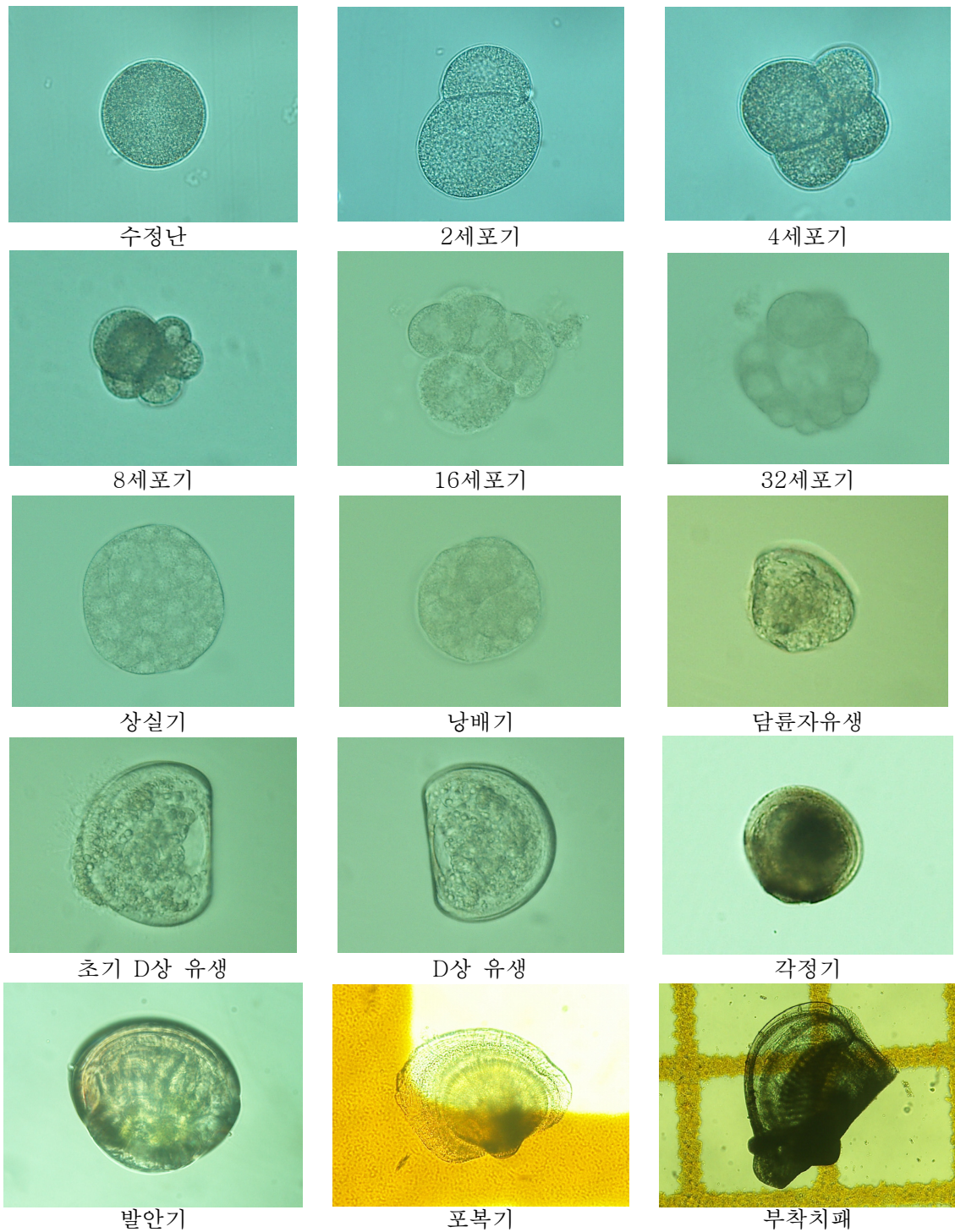


그림 3-4-5. 수정란의 세포분열과 초기유생발달 모습

부화 후 10일경 초기 각정기 유생이 관찰되었고, 각장 $136.39 \pm 11.98 \mu\text{m}$ 와 각고 $129.75 \pm 12.09 \mu\text{m}$ 의 평균 크기를 보였다. 부화 후 12일경에는 대부분의 유생이 각정기 단계에 진입하였고, 유생의 패각에서 안점을 관찰할 수 있었으며, 이때 평균 유생의 크기는 각장 $148.99 \pm 24.18 \mu\text{m}$, 각고 $135.20 \pm 22.65 \mu\text{m}$ 이었으며 2차 감모가 일어났다. 부화 후 15일 경에는 유생들이 포복행동이 관찰되었다. 이때 미리 준비해둔 플라스틱검정비닐 재질

의 채묘기를 투입하였다. 유생의 평균 크기는 각장 각고가 각각 $189.28 \pm 21.86 \mu\text{m}$ 과 $173.60 \pm 19.13 \mu\text{m}$ 이었다(그림 3-4-5). 부착기를 투입한 후 부터는 환수가 불가능하여 약 19일경 유수식으로 전환하여 부분환수를 실시하였으나 수조 내 부유하는 유생들이 관찰되어 24:00~07:30 동안에는 지수식으로 하여 잔류 부유유생의 부착을 유도를 하였다. 부화 후 약 23일경 부착치패가 확인되어 유수식으로 전환하여 사육하였고 환수를 약 50% 정도부터 시작하여 점차 환수량을 늘려갔다.

표 3-4-2. 유생 사육일에 따른 수조 내 환경변화

사육일수 (부화 후)	수 온 (°C)	용존산소 (mg/l)	염 분 (‰)	pH	비고
수정난	28.9	3.7	34.2	8.31	
부화직후	28.7	3.18	34.2	8.3	초기 D상 유생
1일	28.1	3.57	34.3	8.26	D상 유생
2일	28.4	3.81	34.3	8.3	"
3일	27.9	3.96	34.3	8.29	"
4일	27.7	3.58	34.2	8.33	"
5일	28.1	2.66	34.3	8.36	"
6일	28.9	2.11	34.2	8.26	" (초기각정기 혼재)
7일	29.7	2.96	34.1	8.58	"
8일	28.2	2.19	34.2	8.27	"
9일	27.2	2.96	34.2	8.31	"
10일	27.8	3.22	33.8	8.23	초기 각정기
11일	27.5	2.69	34	8.26	"
12일	27.6	3.23	34.2	8.06	각정기, 발안기
13일	27.7	2.96	34.3	8.28	"
14일	27.3	2.78	33.8	8.31	"
15일	27.0	2.99	33.8	8.44	포복기(채묘기투입)
16일	28.2	3.31	34.1	8.35	포복기
17일	27.4	3.04	34.2	8.33	"
18일	27.9	3.25	34.2	8.27	"
19일	27.3	2.46	34.1	8.33	부착치패
20일	27	4.35	34.2	8.3	"

유생의 크기 측정은 환수 하는 시기인 2일 간격으로 하다가 부착시기가 다가옴에 따라 채묘기 투입 후부터는 유생의 안정적인 부착을 유도하기 위하여 환수를 줄이고 지수식으로 사육을 하였고, 부착이 완료될 시점인 부화 후 약 23일경 환수를 실시하였고 이 시기에 크기를 측정하였으며 평균 크기는 각장 $250.63 \pm 50.58 \mu\text{m}$ 각고 $224.47 \pm 29.86 \mu\text{m}$ 이었다. 부착후 유수식으로 사육을 하였으나, 수조바닥에 먹이 찌꺼기 또는 치패의 배설물들이 쌓여 바닥 청소 및 치패에 피해를 예방하기 위하여 부화 후 33일경 미리 준비해둔

수조에 채묘기를 옮겨주었으며 크기를 측정하였다. 이때 부착치패의 평균 크기는 각각 $328.85 \pm 42.67 \mu\text{m}$, 각고 $249.55 \pm 29.79 \mu\text{m}$ 이었다(그림 68).

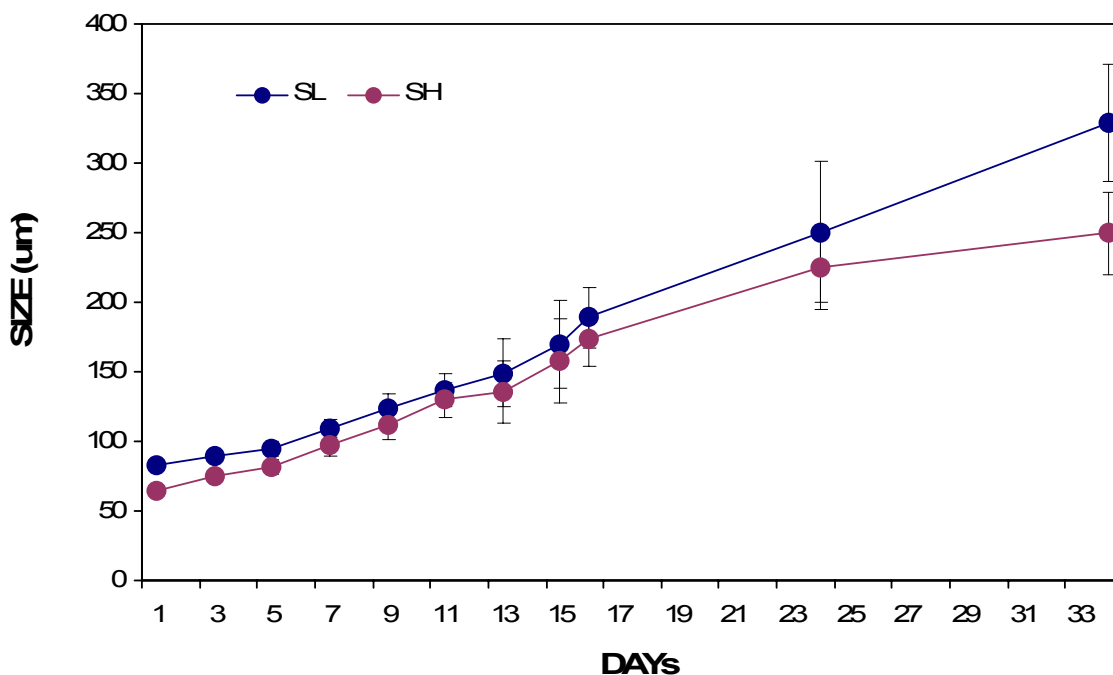


그림 3-4-6. 사육 일수에 따른 유생의 성장 및 크기

유생의 먹이 공급은 하루 2~4회로 상황에 따라 급이하였고, 현지에서 배양이 잘되는 Iso, Nan, Pav. 3종을 급이하였다(표 3-4-3).

표 3-4-3. 유생 사육일수에 따른 먹이생물의 종류와 급이량

배양일수 (D상 이후)	먹이종류	급이량 (cells/유생)	급이수 (횟수/일)
1	Iso, Nan, Pav	2380	3
2	Iso, Nan, Pav	7031	2
3	Iso, Nan, Pav	2812	3
4	Iso, Nan, Pav	2946	3
5	Iso, Nan, Pav	4017	3
6	Iso, Nan, Pav	3214	3
7	Iso, Nan, Pav	5000	3
8	Iso, Nan, Pav	5753	3
9	Iso, Nan, Pav	7142	3
10	Iso, Nan, Pav	5084	3
11	Iso, Nan, Pav	5932	3
12	Iso, Nan, Pav	4611	4
13	Iso, Nan, Pav	6081	3
14	Iso, Nan, Pav	14102	4
15	Iso, Nan, Pav	221260	채묘기투입

Iso; *Isocrysis aff. galbana*, Nan; *Nannochloropsis oculata*, Pav; *Pavlova lutheri*,

(4) 부착 (settlement of spat)

검정비닐필름을 이용한 채묘기는 2가지 종류로 제작(그림 3-4-7, 3-4-8)되어 유생의 최대 크기가 각장, 각고가 각각 약 214 μm , 201 μm 인 부화 후 15일경 포복행동이 관찰되는 시점에 투입되어졌다. 각 패묘기는 부착기 유생이 들어있는 수조 내에 수평으로 설치하여 채묘 하였다. 유생이 부착한 것을 확인 한 후 유생이 부착된 채묘기는 4 ton 탱크로 옮겨 유수식으로 사육하였으며 부착기를 제외하고 부착수조에 붙은 치패는 따로 옮기지 않고 부착 수조 내에서 유수식으로 전환하여 사육하였다.

이때 급이한 먹이의 종류와 양은 표 3-4-3 에서 보는 것과 같으며 급이 횟수는 상황에 따라 1일 2~4회로 하였다.



그림 3-4-7. 사각평면형 채묘기



그림 3-4-8. 사각박스형 채묘기



그림 3-4-9. 채묘기에 부착한 치패의 모습

(5) 치패사육

부착된 치패들은 네 가지 실험구 (센터 앞 수하연, 폰드 앞 수하연, 식당 앞 수조, 배양장 내부 수조)에서 분산 배치시키고, 서로 다른 환경에서 성장하는 것을 관찰하였다.

배양장 내부 수조에서는 먹이생물 급여량이 적은 것으로 판단되어지고, 성장이 외부 수조에 비해서 느렸다. 농축 배양된 먹이생물을 섞어서 급여하고 있으나, 그 양에 한계가 있어 먹이생물의 대량배양에 관건이 있는 것으로 판단된다. 외부 자연해수를 여과하여 실시한 식당 앞 수조에서는 야간 정기적인 단전(04시~07시)으로 인해 배터리로 물은 공급하고 있으나, 현재 배터리 상태가 좋지 않아 만충전 이후에도 약 1~2시간 정도면 펌프가 멈추는 현상이 지속적으로 발생하여 전기사정에 의한 문제를 해결해야 할 것으로 판단된다. 센터 앞 인공연못에서는 부유물이 상당히 많으나, 성장은 양호한 편이며 개체 크기 차이가 꽤 있는 것으로 관찰되어 먹이효율 및 여과효율에 의한 편차로 판단하였다. 센터 앞 모패를 가두어 놓은 지역의 수하연에서는 일부 부유물 부착이 있었으나, 그다지 심하지 않으며 쉽게 제거 가능하여 흑진주조개 치패의 성장에 영향을 미치지 않고 치패들이 성장이 좋았다.

부착치패들은 약 5개월 동안 서로 다른 4 지역에서 서로 다른 양상의 성장 패턴을 보였으며, 모패가 있는 수하연 주위의 개체들이 가장 빨리 성장 하였다. 5개월 동안 약 2배(35 mm 이상) 가까이 성장하여 눈으로 확인 가능할 정도로 성장하였다.

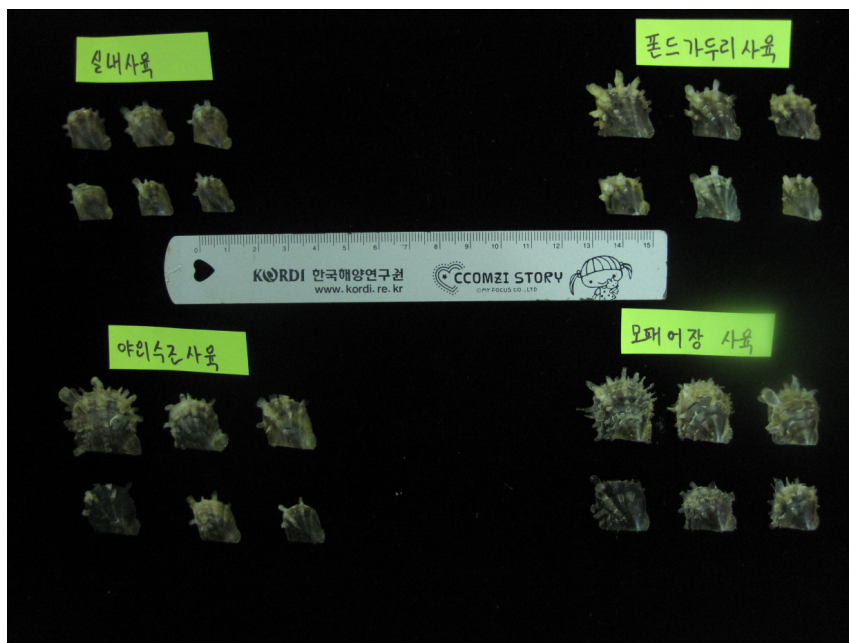


그림 3-4-10. 네 지역에서 서로 다르게 성장한 치패들의 모습

Variation of Shell Length

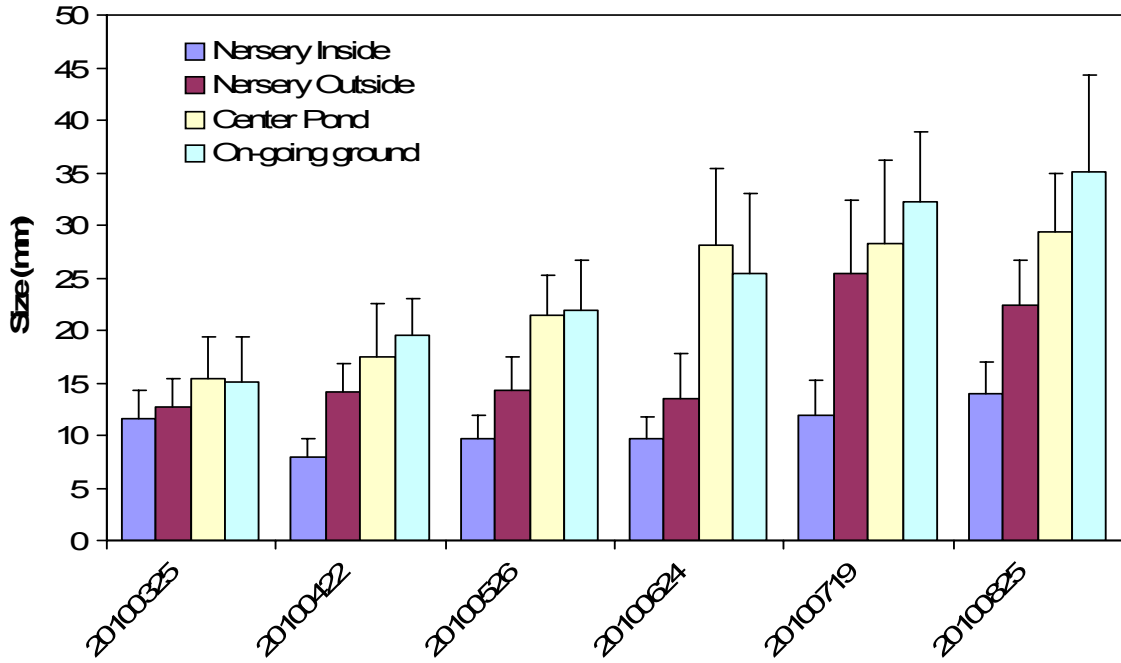


그림 3-4-11. 네 지역에서 5개월간 양성한 치패들의 크기 변화

Variation of Weight

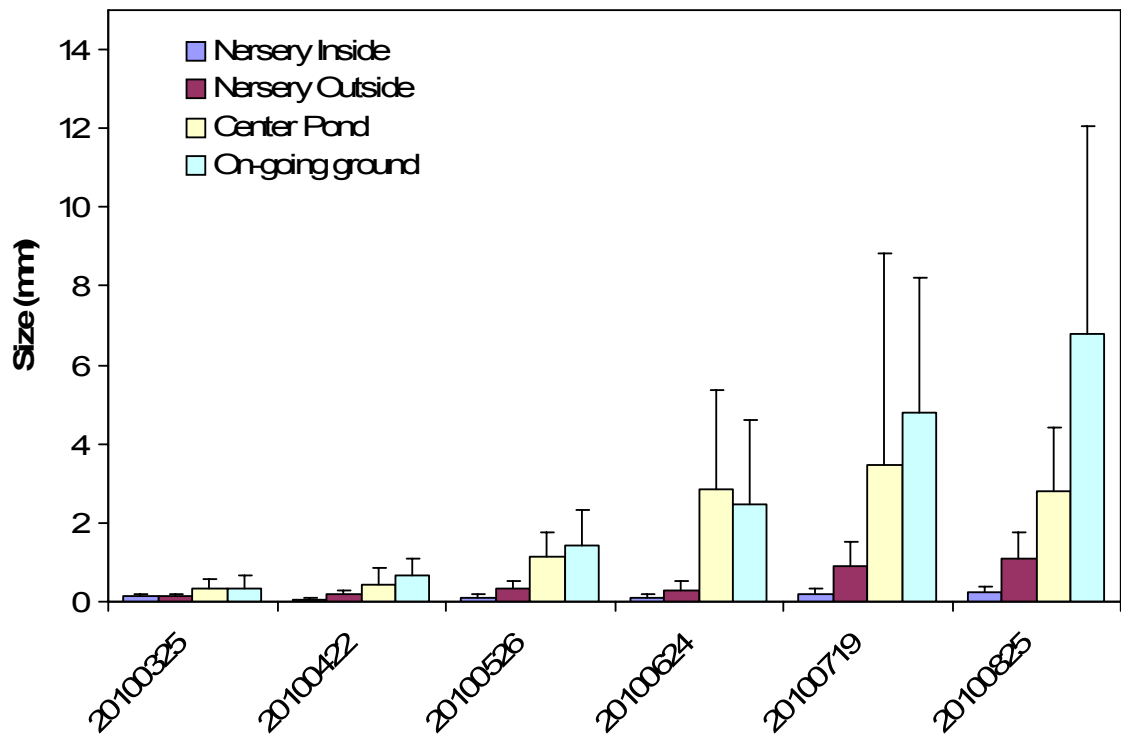


그림 3-4-12. 네 지역에서 5개월간 양성한 치패들의 중량 변화

각 성장 지역별로 치패들의 각장 성장은 육상수조 지역이 평균각장 11.64±2.69 mm에서 13.92±3.06 mm 범위로 가장 적게 성장하였고, 최대 성장 지역인 모패 양성 수하연 지역에서는 평균 15.03±4.36 mm에서 35.02±9.25 mm의 범위로 약 2배가량 성장하였고, 치패들의 성장 차이도 4 지역에 비해 상대적으로 편차가 크게 나타났다(그림 3-4-11).

각 지역별 치패의 평균 육질성장 또한 육상수조에서 가장 낮고, 수하연 지역에서 가장 높았다. 육상수조에서는 0.12±0.08 g에서 0.24±0.15 g으로 가장 낮은 성장률을 보였고, 수하연 지역에서는 평균 중량 0.32±0.33 g에서 6.80±5.25 g의 범위를 보여 평균적인 육질 성장이 최대값을 보였다. 각 치패별로 성장의 차이가 확연하게 나타났다(그림 3-4-12).

(6) 발달단계별 유생의 지방산 조성

유생의 발달단계 별 나타난 지방산을 포화도에 따라 그룹화하면, 포화지방산(Saturated fatty acids; SAFA), 단일불포화지방산(Monounsaturated fatty acids; MUFAs), 다불포화지방산(Polyunsaturated fatty acids; PUFAs)으로 나눌 수 있다. 앞서 알과 정자의 지방산 함유 특성 파악을 통해 알아본 바와 같이 산란 직전의 성숙기 알은 SAFAs(44.92%)와 PUFAs(31.23%)가 차례로 우점하였고 정자의 경우, PUFAs(55.22%)와 SAFAs(26.84%)로 차례대로 우점하였다. 반면 수정란의 경우에는 SAFAs가 58.83%로 가장 높게 나타났고, MUFAs(19.31%)와 PUFAs(8.41%)의 순서대로 나타났다. 유생이 발달하여 D-shape 단계에 있을 때는 SAFAs가 98.05%로 급격하게 증가하고, MUFAs(1.6%)와 PUFAs(0%)는 거의 소멸한 상태였다(그림 3-4-13).

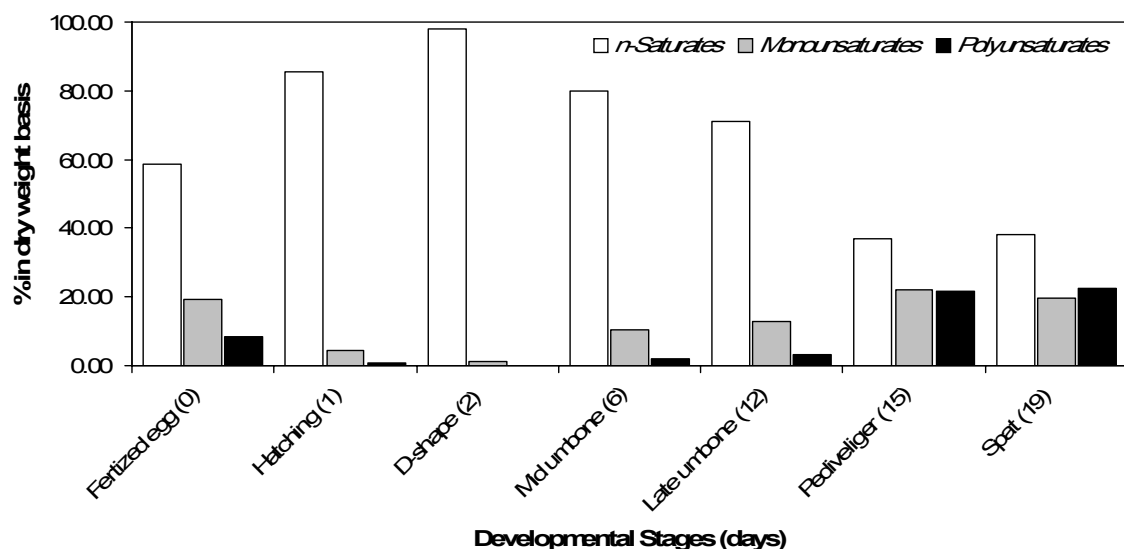


그림 3-4-13. 발달단계별 치패들의 지방산(포화, 단일 및 다불포화지방산) 변화

표 3-4-4. 발달단계별 치패들의 지방산 변화. Fatty acid composition on developmental stages of black-lip pearl oyster. FE: fertilized egg, H: hatching stage, MU: mid-umbone stage, LU: late-umbone stage, PV: pediveliger stage, SP: spat.

	FE	H	D-shape	MU	LU	PV	SP
14:0	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.97	0.00
15:0i	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.15	0.00
15:0a	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00
15:0n	0.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.11	0.00
16:1n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.32	0.00
16:1n-7	1.52	0.00	0.00	0.00	0.00	6.25	2.38
16:2	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.32	0.00
16:0	20.65	15.73	0.26	16.16	11.40	12.16	9.74
17:0i	0.63	0.77	0.00	0.84	0.24	0.34	0.35
17:0a	0.19	0.64	0.58	1.10	0.52	0.09	0.12
17:0n	3.56	3.13	0.00	1.37	2.18	2.46	1.33
18:3	0.14	0.64	0.00	0.00	0.68	0.52	0.36
18:4	0.73	1.09	0.00	0.84	3.06	4.74	2.45
18:2	2.45	1.77	0.16	1.97	3.65	3.27	4.76
18:1n-9	8.30	3.17	0.67	6.38	8.32	6.67	8.85
18:1n-7	9.48	1.07	0.39	3.96	4.34	8.77	8.38
18:2	2.09	0.71	0.16	2.07	2.27	0.71	0.31
18:1n-5	0.35	1.43	0.00	1.49	0.67	0.21	0.12
18:0	36.26	66.30	4.28	58.70	54.84	22.44	24.64
20:4	1.28	0.00	0.00	0.00	0.00	3.71	5.24
20:5n-3	1.42	0.00	0.00	0.00	0.75	19.02	20.36
20:0	0.84	0.00	0.00	0.00	0.42	0.69	1.44
21:0n	0.75	0.00	0.00	0.00	0.00	0.71	0.99
22:5	0.62	0.00	0.00	0.00	0.00	0.47	0.28
22:6n-3	4.90	0.00	0.00	0.00	0.00	1.81	1.65
22:6	1.44	0.00	0.00	0.00	2.35	0.32	0.24
22:0	0.98	3.56	93.51	5.12	4.31	0.76	2.39
24:0	0.94	0.00	0.00	0.00	0.00	1.97	3.63
n-Saturates	58.83	85.59	98.05	79.98	70.97	37.02	38.21
Monounsaturates	19.31	4.24	1.06	10.34	12.66	22.02	19.61
Polyunsaturates	8.41	0.71	0.16	2.07	3.02	21.54	22.32

이 때 1차 대량폐사가 일어난 것을 관찰할 수 있었는데 이러한 현상은 불포화지방산 감소가 유생의 생존에 영향을 미칠 수 있다는 증거로 대두된다. 그 중 EPA와 DHA의 함량 저하가 이 후 먹이활동을 하며 포복기(pediveliger)에 불포화 지방산인 MUFAs(22.02%)와 PUFAs(21.54%)가 증가하여 대량폐사의 현상은 거의 소멸한 상태로 파악됐다(표 3-4-4).

포화 지방산 중에서는 수정란에서 부착치패까지 중요한 요소로 작용하는 것은 16:0과 18:0으로 판단되며, 불포화지방산은 초기 생존에는 DHA가 eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3)보다 중요한 것으로 파악되며, 착생을 위한 변태(metamorphosis)를 위해서는 EPA가 DHA 보다 더 중요한 요소로 판단된다.

제5절 흑진주조개 항체개발의 기술가치

1. 기술가치 분석결과 요약

가. 평가 개요

평가대상기술가치평가는 한국해양연구원이 소유하고 있는 지적재산권(특허 등록번호: 제10-0947742호) “흑진주 조개 알 추출물의 항원단백질 및 이에 특이적인 항체를 이용하여 흑진주 조개의 번식량을 예측하는 방법” 특허기술을 대상으로 한다. 평가의 목적은 본 평가대상기술을 사업에 적용한 경우 그 기술사업의 가치를 추정된 후, 사업가치에서 기술이 차지하는 기여도를 측정하여 기술의 공정가치를 합리적인 방법에 따라 산정하는 것이며, 산정금액은 현물출자를 하는데 있어서, 이해 및 합리적인 판단을 할 수 있도록 도움을 제공하는 데 있다. 공정가치란 자발적인 수요자와 공급자 모두가 해당 기술에 대한 모든 사실을 이해하고 쌍방이 거래에 대한 강요가 없는 상황에서 거래될 수 있는 금액을 의미한다. 평가일은 2010년 03월 31일을 기준으로 하였다.

나. 평가방법 및 절차

평가기관인 남앤드남국제특허사무소는 평가를 위해 현재 및 미래의 경제, 산업시장, 기술동향 및 권리동향 등을 조사 및 분석하였으며, 또한 한국해양연구원의 기술성평가자료, 사업성평가자료, 과거의 재무자료, 연구개발 및 설비투자현황·계획 등을 분석하여 개별기술가치평가에 관한 일반적인 평가방법, 평가절차 및 분석방법에 따라 평가업무를 수행하였다. 평가방법은 소득접근법을 적용하였다. 본 평가는 평가기간 중 최선의 이용가능한 객관적인 자료를 분석하고 합리적인 가정과 통계적인 방법을 적용하여 수행되었으나, 그 결과치는 미래의 경기변동, 경영환경 등 외부요인, 평가기준일 및 평가상의 가정이 상이할 경우 다르게 나타날 수 있다.

다. 평가금액

위의 평가방법과 평가절차에 따라 기술가치를 평가하였으며, 평가대상기술에 따른 기

술 수명을 적용하여 평가하였다. 현금흐름 기반의 이익접근법과 로얄티공제법을 활용하여 각 기술에 대한 평가를 수행하였다. 평가대상기술들에 대해 적정한 기술가치로는 다음과 같이 추정되었다.

평가방법	기술가치평가금액
이익접근법	45.4억원
로얄티공제법	8.6억원

라. 기술가치 평가의 전제 및 제한 조건

기술가치평가는 현재시점에서 주어진 환경 하에 최대한 과학적이고 객관적인 분석이 이루어져야 한다. 따라서 현재의 시장상황에 특이한 변동이 발생하지 않으며, 분석의 실행 가능성과 명시적인 결론 제시라는 측면에서 기술의 경제적 수명기간 내에 혁신적 기술의 등장으로 당해 특허기술의 가치가 박탈되는 요인이 발생하지 않는다고 가정한다.

주요 시장조사 기관 등에서 분석된 자료의 통계수치 등에 대한 별도의 검증작업은 가능하지 않기 때문에 적절하다고 판단되는 수치를 신뢰하고 원용한다. 사업화가 추진되지 않고 있는 특허기술에 대한 가치평가에 대해 불가피하게 정보를 활용함에 있어서, 가능한 한 객관적인 수치를 적용하기 위해 단일 기업의 수익구조 등 편기를 가지고 있는 정보보다는 업종평균 등 보편적인 적용이 가능한 수치를 활용한다.

기술가치평가를 위한 미래 현금흐름 추정의 기초가 되는 예상 매출액 추정은 다소 보수적인 경우와 낙관적인 경우 등 두 가지 경우로 나누어 2가지 시나리오를 가정하여 분석한다. 각 시나리오별 발생확률에 대한 분석은 이루어지지 않고, 당해 업체의 현 판매 수준과 역량, 계획 등을 기초로 성공적 시장진입과 원활한 사업추진이 이루어지는 적정하다고 판단되는 수준의 매출액을 가정한다.

기술가치 평가의 적용방법론의 선정은 자료의 입수 가능성(Availability)에 따라 제한적이 될 수밖에 없다. 특히 당해 특허기술과 유사한 기술의 거래사례가 존재하지 않기 때문에 시장거래사례에 근거한 시장사례접근법(Market Approach)을 적용할 수 없다. 그럼에도 불구하고 국내외 가치평가 관행을 반영하고 평가결과의 객관성을 제고하기 위해 두 가지 이상의 가치평가 방법론을 적용하고자 한다. 따라서 여기에서는 먼저, 당해 기술 가치평가에서는 당해 특허기술의 사업화를 통한 시장진입에 따른 미래 수익흐름을 추정하여 현재가치를 산정하는 DCF 기반의 소득접근법(Income Approach)을 기본적으로 적용한다. 각 기술마다 가능한 다양한 평가방법을 적용한다.

마. 활용 정보

본 특허기술의 가치평가를 수행하기 위해 분석에 활용된 정보는 다음과 같이 다양한 소스에서 생산된 것들이다. 산업자원부, 통계청 등에서 발표 또는 발간 자료, 금융감독원의 기업공시자료 등, 정부 주요 부처들에서 제공하고 있는 역무자동화시스템, 점자모니터 기술, 온라인 복권 시스템 관련 자료와 분석에 필요한 자료를 활용한다. 식품의약품안전청, 보건복지부 등 관련 기관단체 등에서 공식적으로 발간하는 간행물, 발표자료 등을 활용한다.

선행기술 분석 등을 위한 특허동향분석을 위해서 KIPRIS 특허 데이터베이스를 활용하여 한국, 일본, 미국, 유럽특허를 탐색하였다. 또한 증권회사, 투자회사, 금융기관 등에서 관련업종의 동향에 대하여 조사, 분석한 자료를 참고한다.

기타 당해 기술가치평가를 위해 필요한 각종 정보의 입수를 위해 국내 협회, 단체 등 공공성 있는 기관에서 공표하는 자료를 최대한 활용한다.

바. 평가방법 및 절차

본 보고서는 한국해양연구원이 신청한 “흑진주 조개 알 추출물의 항원단백질 및 이에 특이적인 항체를 이용하여 흑진주 조개의 번식량을 예측하는 방법”에 대하여 사업성평가를 수행하였다. 사업성 평가는 권리성 분석, 기술-특허 분석을 통한 기술성 분석, 시장 현황 및 특성 분석을 통한 시장성 분석, 사업가치 및 기술가치 평가 등을 수행하였다. 특히, 본 사업성평가에서는 사업가치 및 기술가치를 평가하여 종합적인 평가가 될 수 있도록 하였다.

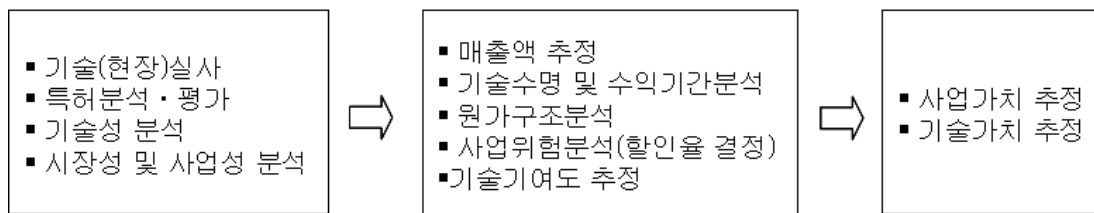


그림 3-5-1. 평가 방법 및 절차

2. 가치평가 의견 요약

가. 권리성

평가대상특허는 물건발명(항원 및 항체)과 방법발명(흑진주 조개 번식량 예측방법)으로서 권리범위가 명확하나 다소 좁게 확보되어 있는 것으로 판단되고, 국내외 선행기술 조사 결과, 평가대상특허와 유사한 선행기술은 없는 것으로 조사되었으므로, 무효화 가능성이 매우 낮아 권리 안정성이 높은 것으로 판단된다. 또한, 항원-항체 반응을 통해 흑진주 조개 번식량을 정량적으로 측정하는 방법을 최초로 개발하여 권리의 경쟁성이 우수한 것으로 판단된다. 흑진주 조개의 우량종묘를 생산하기 위해서는 포란수 측정 기술이 중요하므로, 평가대상특허는 흑진주 양식 산업에 직접적이고 혁신적인 기술로서 기여할 것으로 기대된다.

나. 기술성

평가대상기술은 흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질, 이에 특이적인 항체 및 상기 항체를 이용하여 흑진주 조개의 번식량을 예측하는 방법에 관한 것으로, 평가대상기술을 이용함으로써 손쉽고 정확하게 흑진주조개의 번식량을 정량화할 수 있으며, 이를 통해 흑진주 조개의 생활사 연구의 중요한 정보제공 및 흑진주 생산량의 효율적 관리가 가능할 것으로 판단된다.

다. 시장성

평가대상기술은 흑진주 양식 기술로서, 평가대상기술이 적용될 수 있는 시장은 i) 흑진주 보석 시장 및 ii) 흑진주의 “모발 노화방지” 용도와 관련된 ‘기능성 샴푸 시장’을 고려할 수 있다.

국내 흑진주 시장의 연평균 성장률(CAGR) 약 10% 및 상기 시장규모에서의 추정 점유율 10%를 토대로 평가대상기술의 추정 기술수명인 14년 동안 평가대상기술 보유 기업이 달성가능한 매출액을 추정한 결과, 2011년 1.4억원, 2012년 1.6억원, 2013년 1.7억원, 2014년 1.9억원, 2015년 2.1억원, 2016년 2.3억원, 2017년 2.8억원, 2019년 3.0억원, 2020년 3.3억원, 2021년 3.7억원, 2022년 4.0억원, 2023년 4.4억원, 2024년 4.9억원의 매출을 달성할 수 있을 것으로 추정되었다.

또한, 국내 기능성 샴푸 시장의 연평균 성장률(CAGR) 약 10% 및 유사기업의 매출자료를 토대로 평가대상기술의 추정 기술수명인 11년 동안 평가대상기술 보유 기업이 달성가능한 매출액을 추정한 결과, 2011년 300.0억원, 2012년 330.0억원, 2013년 363.0억원, 2014년 399.3억원, 2015년 439.2억원, 2016년 483.2억원, 2017년 531.5억원, 2018년 584.6억원, 2019년 643.1억원, 2020년 707.4억원, 2021년 778.1억원의 매출을 달성할 수 있을 것으로 추정되었다.

3. 기술 및 권리 분석

가. 기술성 분석

(1) 평가대상기술의 개요

표 3-5-1 평가대상특허

기술명	흑진주 양식 기술		
신청 기관	한국해양연구원	담당자	
등록 번호	제10-0947742호	등록일	2010년 03월 08일
출원 번호	제10-2009-0119138호	출원일	2009년 12월 03일
발명의 명칭	흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질 및 이에 특이적인 항체를 이용하여 흑진주 조개의 번식량을 예측하는 방법		
권리자	한국해양연구원	공동출원인	
발명자	강도형, 최광식, 정희도, 박홍식		
해외출원	미국출원 및 일본출원		
청구항	청구항 총11항 (독립항 : 10항, 종속항 : 1항)		
기타			

나. 기술동향

(1) 국외동향

미키모토사는 Mikimoto Hakata Pearl Culturing사가 소유한 후쿠호카현 아이노시마 소재 농장에서 아코야 진주를 생산하고 있다. 미키모토사의 자회사인 Mikimoto Hakata Pearl Culturing사는 2007년 1월에 설립되었으며 설립 목적은 2000년에 아이노시마에서 발견된 천연 진주조개를 이용, 질병에 걸리지 않는 새로운 아코야 진주조개를 양식하는 것이다. 미키모토사의 연구소인 K. Mikimoto Pearl Research Laboratory는 Fukuoka Fisheries and Marine Technology Center, 규슈 대학교, Shingu Ainosima Fisheries사의 소속 과학자들과 공동으로 아이노시마의 진주 양식 프로젝트를 진행한 결과, 높은 품질의 진주 양식에 성공하였다. 2010년의 생산 목표는 진주조개 5만 개 수확이며 앞으로 3년 후 수확량은 20만 개로 늘어날 것으로 예상하고 있다. 최근 몇 년 동안 미키모토사의 진주연구소는 아코야 진주조개의 비정상적인 사망의 원인인 ‘Heterocapsa Circularisquama 적조’ 및 Reddening Adductor 질병에 대해 연구해 왔다. 2003년에 이 연구소가 발표한 ‘Reddening Adductor로 인한 피해를 줄이는 방법’은 일본 양식 과학 협회로부터 과학기술상을 받았다.

(2) 국내동향

장흥키조개영어조합법인은 한국등록특허 제10-0595605호(등록일: 2006년 06월 23일)에

“키조개를 이용한 흑진주의 양식방법”을 개시하였다. 본 발명은 키조개를 모패로 하여 진주핵을 삽입하여 흑진주를 얻는 흑진주의 양식방법에 관한 것으로, 모패처리, 삼핵, 중간양성 및 본 양성으로 구성되는 진주의 양식 방법에 있어서, 그 모패로서 사새목 키조개과의 연체동물인 키조개를 사용하며, 본 양성 시에 각정부를 아래로 하여 저질(개펄)에 직접 삽입하여 행하는 것을 특징으로 한다.

또한, 이여준 등은 한국등록특허 제10-0328392호(등록일: 2002년02월28일)에 “홍합을 모패로 사용한 유핵진주 양식방법”을 개시하였다. 본 발명의 홍합을 모패로 사용한 유핵진주 양식방법은 먼저 홍합의 족사를 자르고 다수개의 진주핵 삽입구멍을 상하 두 개의 패각에 홍합의 패각근이 부착된 위치를 제외한 원하는 위치에 상기 진주핵의 직경보다 조금 크게 천공하여, 상기 천공된 진주핵 삽입구멍에 진주핵을 삽입한 후, 상기 전복의 패각에 접착제로 고정한다. 이어서 족사가 다시 생성되어 홍합의 상하 두 개의 패각이 맞물려 고정 될 때까지 상하 두 개의 패각의 양단부에 구멍을 내어 철사로 묶어 고정시킨다. 상기 패각의 재생을 위해서 상기 홍합이 각질, 능주질 및 진주질을 차례로 분비하여 상기 진주핵을 감싸서 흑진주를 생성하게 된다.

(3) 기술수준 분석

(가) 기술의 특성

평가대상기술은 흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질, 이에 특이적인 항체 및 상기 항체를 이용하여 흑진주 조개의 번식량을 예측하는 방법을 제공한다. 평가대상기술의 방법에 따르면 손쉽고 정확하게 흑진주조개의 번식량을 정량화할 수 있으며, 이를 통해 흑진주 조개의 생활사 연구의 중요한 정보제공 및 효율적 관리가 가능하다.

(나) 기술의 활용성

평가대상기술에 따른 흑진주 조개의 번식량 측정방법은 항원-항체의 특이적인 반응원리를 이용하여 손쉽고 정확하게 흑진주 조개의 번식량을 정량화할 수 있는 장점을 지닌다. 또한, 평가대상기술에 따른 방법은 흑진주를 생산하는 흑진주 조개의 효율적 관리 및 생활사 연구에 중요한 정보를 제공할 수 있다.

(4) 기술의 완성도

(가) 기술의 구현가능성

평가대상기술은 (i) 서열번호 1 내지 8의 항원 단백질에 특이적인 항체를 이용한 항원-항체 반응으로 흑진주 조개의 알 단백질 양을 정량하는 단계; 및 (ii) 단계 (i)에서 정량한 흑진주 조개의 알 단백질 양과 실제 양의 표준곡선을 통하여 실제 흑진주 조개의

알 단백질 양을 추정하는 단계를 포함하는, 흑진주 조개의 번식량을 예측하는 방법을 제공한다. 상기 항원-항체 반응은, 이것에 한정하는 것은 아니지만, 항체면역효소측정법(ELISA)을 사용할 수 있다. 보다 구체적으로, 평가대상기술의 흑진주 조개 번식량을 예측하는 방법은 흑진주 조개 알의 성숙에 관여하는 특이적인 알 단백질을 본 발명의 항체를 이용한 항체면역효소측정법으로 정량분석하여, 특이적인 알 단백질 총량을 간접적으로 수득할 수 있다. 간접적으로 수득한 특이적인 알 단백질 총량을 실제 양-간접적인 양 표준곡선을 통하여 실제 알 단백질 양을 추정하고, 한 개체가 가지고 있는 알 단백질 양으로부터 알의 수(포란수)를 예측할 수 있다.

(나) 경쟁기술 및 대체기술

평가대상기술의 경쟁기술 및 대체기술로서는 장흥키조개영어조합법인의 한국등록특허 제10-0595605호(등록일: 2006년 06월 23일) “키조개를 이용한 흑진주의 양식방법”을 고려할 수 있다. 그러나, UV-Vis spectrophotometer 측정결과 흑점패 흑진주에서 나타나는 pigments의 흡수 스펙트럼이 키조개 흑진주에서는 나타나지 않았다고 보고되었다¹⁾.

(5) 종합 의견

평가대상기술은 흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질, 이에 특이적인 항체 및 상기 항체를 이용하여 흑진주 조개의 번식량을 예측하는 방법에 관한 것으로, 평가대상기술을 이용함으로써 손쉽게 정확하게 흑진주조개의 번식량을 정량화할 수 있으며, 이를 통해 흑진주 조개의 생활사 연구의 중요한 정보제공 및 흑진주 생산량의 효율적 관리가 가능할 것으로 판단된다.

다. 권리성 분석

이 장에서는 평가대상기술의 권리성 분석을 수행하고, 평가대상특허의 권리의 법적 안정성 및 권리범위(청구범위) 등의 법적인 보호강도에 관한 분석을 실시하여 이에 관한 전문가적인 의견을 제시한다.

(1) 특허기술 내용

(가) 특허기술의 일반사항

인도 태평양 산호 지역에 걸쳐 서식하는 흑진주 조개(*P. margaritifera*)는 다른 종(species)들보다 크기가 무척 커서 더 큰 진주를 생산할 수 있다. 이에 따라, 흑진주 조

1) 이정임 등, Journal of the Korean Crystal Growth and Crystal Technology, “키조개를 이용하여 양식한 흑진주의 특성평가”, Vol.18, No.5 (2008) 205-210

개의 양식을 통한 흑진주의 생산은 남태평양 도서 국가에서 가장 중요한 산업 중 하나로 자리잡고 있으며, 흑진주 조개의 연평균 생산량은 6 M/T(Metric ton, 미화 175,000,000)에 달한다. 이러한 흑진주 생산량의 증가는 흑진주 조개 모패의 수요를 급격히 증가시켰으며, 흑진주 조개 자원량을 감소시켰다.

남태평양 추크 라군 (Chuuk Lagoon)의 진주양식 산업에서 흑진주 생산을 위한 모패의 안정적 공급이 가장 시급한 일 중 하나이다. 현재 추크 라군에서의 흑진주 조개의 양식방법은 자연산 흑진주 조개로부터 방출된 부유 치패를 채묘하는 자연 채묘 방식이 주로 사용되었으나, 양식 산업을 위한 충분한 양의 치패 확보에 어려움을 겪고 있는 실정이다. 이에 따라, 인공 종묘생산을 도입하여 흑진주 조개 치패를 안정적으로 공급함으로써 치패 생산의 필요성이 높게 인식되었으나, 흑진주 조개의 생활사 및 번식생리 등에 관한 기초연구 부족으로 흑진주 조개의 인공종묘생산은 아직까지 성공적으로 이루어지지 않고 있다. 또한, 열대지역에 분포하는 이매패류의 번식에 관한 연구는 온대지역의 이매패류에 비하여 매우 빈약하기 때문에, 열대 이매패류의 번식 전략이나 생리에 관한 정보가 절대적으로 부족한 실정이다.

따라서, 성공적인 흑진주 조개 자원관리를 위해서는 우량종묘의 생산을 위한 모패의 번식생리학적 연구가 반드시 선행되어야 하며, 이는 모패의 연중 생식주기 파악 및 산란 시기 예측과 같은 정성적인 연구 및 모패로부터 생산되는 알과 정자의 정량적 측정, 즉, 포란수(reproductive effort 또는 fecundity) 측정 등의 연구가 포함된다. 특히, 포란수 측정에 관한 연구는 측정 방법상의 어려움 때문에 정성적인 연구에 비하여 그 연구가 매우 저조한 실정이다. 이는 다른 동물과 달리 대부분의 이매패류는 알을 포함하는 생식소(ovary)가 물리적으로 분리되지 않고, 외투막 및 소화맹낭에 포함되어 있으며, 이매패류의 포란수가 수백만 또는 수천만 개에 이르기 때문이다. 이에 의하여, 본 발명자들은 이매패류의 일종인 흑진주 조개(*P. margaritifera*)의 알 단백질에 대하여 특이적으로 반응하는 항체를 제조하고, 흑진주 조개 번식량을 정량적으로 측정하는 방법을 개발하여 본 발명을 완성하였다.

(나) 특허의 요지 및 특징

흑진주 양식기술과 관련하여 동사가 보유하고 있는 특허는 특허출원 제10-2009-0119138호 “흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질 및 이에 특이적인 항체를 이용하여 흑진주 조개의 번식량을 예측하는 방법”(2010.03.08 등록, 이하 ‘평가대상특허’라 함)이다. 상기 특허는 등록되어 평가일 현재 유효하게 존속 중에 있다.

평가대상특허는 흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질, 이에 특이적인 항체 및 상기 항체를 이용하여 흑진주 조개의 번식량을 예측하는 방법을 제공한다. 본 특허발명의 방법에 따르면 손쉽고 정확하게 흑진주조개의 번식량을 정량화할 수 있으며, 이를 통해 흑진주 조개의 생활사 연구의 중요한 정보제공 및 효율적 관리가 가능하다.

(다) 권리 범위

특허법상 특허권의 권리범위는 특허출원서에 첨부한 명세서의 특허청구범위에 기재된 사항에 의하여 정하여지는 것이 원칙이므로 평가대상특허의 권리범위는 다음과 같다. 다만 독립항이 가장 포괄적인 권리를 가지며, 종속항은 독립항을 한정, 구체화하거나 새로운 구성요소를 독립항의 구성에 부가하는 것인바, 이하 독립항을 중심으로 권리범위를 기술하기로 한다. 평가대상특허의 특허청구범위는 아래와 같다.

【청구항 1】

서열번호 1로 표시되는 흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질.

【청구항 2】

서열번호 2로 표시되는 흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질.

【청구항 3】

서열번호 3으로 표시되는 흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질.

【청구항 4】

서열번호 4로 표시되는 흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질.

【청구항 5】

서열번호 5로 표시되는 흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질.

【청구항 6】

서열번호 6으로 표시되는 흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질.

【청구항 7】

서열번호 7로 표시되는 흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질.

【청구항 8】

서열번호 8로 표시되는 흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질.

【청구항 9】

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항원 단백질에 특이적인 항체.

【청구항 10】

(i) 제9항의 항체를 이용한 항원-항체 반응으로 흑진주 조개의 알 단백질 양을 정량하는 단계; 및

(ii) 단계 (i)에서 정량한 흑진주 조개의 알 단백질 양과 실제 양의 표준곡선을 통하여 실제 흑진주 조개의 알 단백질 양을 추정하는 단계를 포함하는, 흑진주 조개의 번식량을 예측하는 방법.

청구항 제1항 내지 제8항에 따르면, 서열번호 1 내지 8로 표시되는 흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질에 평가대상특허의 권리범위가 미친다.

또한, 청구항 제9항에 따르면, 상기 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 항원 단백질에 특이적인 항체에 평가대상특허의 권리범위가 미친다.

또한, 청구항 제10항에 따르면, (i) 제9항의 항체를 이용한 항원-항체 반응으로 흑진주 조개의 알 단백질 양을 정량하는 단계; 및 (ii) 단계 (i)에서 정량한 흑진주 조개의 알 단

백질 양과 실제 양의 표준곡선을 통하여 실제 흑진주 조개의 알 단백질 양을 추정하는 단계를 포함하는, 흑진주 조개의 번식량을 예측하는 방법에 평가대상특허의 권리범위가 미친다.

여기서 평가대상특허의 “서열번호 1 내지 8의 아미노산 서열”에 어느 하나 이상의 아미노산을 추가적으로 구성할 경우 추가된 기술 구성에 의해 현저하거나 상승적인 효과를 도출하는 특별한 사정이 없는 한, 평가대상특허의 권리범위에 속한다.²⁾

아울러 평가대상특허의 “서열번호 1 내지 8의 아미노산 서열” 중 어느 하나 이상의 아미노산을 제외시키더라도 이러한 구성의 생략이 단순한 설계변경의 정도에 지나지 아니하고, 평가대상특허와 발명의 목적, 기술적 구성, 작용효과에 있어서 유사하다면 평가대상특허의 기술의 일부를 생략한 발명이라 판단되므로 평가대상특허의 권리범위 내에 포함된다.³⁾

또한 상기 흑진주 조개의 번식량을 예측하는 방법 중 어느 하나 이상의 단계를 치환 내지 변경하더라도 평가대상특허와 과제의 해결원리가 동일하며, 그러한 치환에 의하더라도 평가대상특허와 같은 목적을 달성할 수 있고 실질적으로 동일한 작용효과를 나타내며, 그와 같이 치환하는 것을 평가대상특허가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자(당업자)가 용이하게 생각해 낼 수 있을 정도로 자명하다면, 치환 또는 변경한 발명이 평가대상특허의 출원 시에 이미 공지된 기술 내지 공지기술로부터 당업자가 용이하게 발명할 수 있었던 기술에 해당하거나 평가대상특허의 출원절차를 통하여 치환 또는 변경한 발명의 치환된 구성요소가 특허청구범위로부터 의식적으로 제외된 것에 해당하는 등의 특별한 사정이 없는 한, 치환 또는 변경한 발명의 치환된 구성요소는 특허발명의 대응되는 구성요소와 균등관계에 있는 것으로 보아 평가대상특허의 권리범위에 속한다고 보아야 한다.⁴⁾

라. 기술성 분석

(1) 특허동향분석 및 선행기술조사

(가) 조사범위 및 검색식

본 절에서는 국내외 특허 동향 및 주요 핵심특허를 분석하여 특허 선행기술의 존재 여부를 검토하였다. 특허조사는 한국특허정보원(KIPRIS)서 제공하는 자료를 이용하여 이루어졌으며, 한국특허, 일본특허, 유럽특허, 미국특허, 중국특허, PCT 국제특허를 조사하였다.

2) 이용발명이론에 입각한 권리범위 속부 판단.

3) 생략발명이론에 입각한 권리범위 속부 판단

4) 균등론에 입각한 권리범위 속부 판단

표 3-5-2 분석 기간

국가	분석 기간
한 국	1983.03.25 ~ 2010.03.23(공개) 1948.06.20 ~ 2010.03.23(등록)
일 본	1976.10.01 ~ 2009.11.26(PAJ)
미 국	1976.01.06 ~ 2010.03.16(등록) 2001.03.15 ~ 2010.03.18(공개)
유 럽	1978.12.20 ~ 2010.03.03(공개)
중 국	1985.09.10 ~ 2009.09.30(공개) 1985.09.10 ~ 2009.03.25(등록)
P C T	1978.10.19 ~ 2010.03.04(공개)

표 3-5-3 검색 키워드

키워드	관련어 및 유사어	영문
흑진주	흑진주, 흑진주 조개, 블랙 펄	black pearl, Pinctada margaritifera
양식	양식, 생산, 번식, 예측, 측정, 정량, 추출, 항원, 항체	culture, cultivate, farm, prepare, produce, make, breed, propagate, reproduce, multiply, assess, predict, measure, quantity, extract, antigen, antibody

국내특허건의 검색식은

((AB=[(흑진주+블랙펄+(black*pearl)+(Pinctada*margaritifera))*(양식+생산+번식+예측+측정+정량+추출+항원+항체+cultur+cultivat+farm+prepar+produc+mak+breed+propagat+reproduc+multipl+assess+predict+measur+quantit+extract+antigen+antibody)))+(CL=[(흑진주+블랙펄+(black*pearl)+(Pinctada*margaritifera))*(양식+생산+번식+예측+측정+정량+추출+항원+항체+cultur+cultivat+farm+prepar+produc+mak+breed+propagat+reproduc+multipl+assess+predict+measur+quantit+extract+antigen+antibody)]))으로 하였다 (AB=요약, CL=청구범위, *= AND, +=OR). 조사결과, 총 16건이 흑진주 양식 관련 특허로 집계되었다.

해외특허건의 검색식은

(CL=[((black*pearl)+(Pinctada*margaritifera))*(cultur+cultivat+farm+prepar+produc+mak+breed+propagat+reproduc+multipl+assess+predict+measur+quantit+extract+antigen+antibody)))+(AB=[((black*pearl)+(Pinctada*margaritifera))*(cultur+cultivat+farm+prepar+produc+mak+breed+propagat+reproduc+multipl+assess+predict+measur+quantit+extract+antigen+antibody)]))으로 하였다 (CL=청구범위, AB=요약, *= AND, +=OR). 조사결과, 총 144건이 흑진주 양식 관련 특허로 집계되었다.

평가대상기술은 흑진주 양식 기술과 관련이 있으므로, 상기 검색 키워드를 조합한 검색식을 사용하여 국내외 특허동향분석 및 선행기술조사를 수행하였다.

(나) 특허동향분석

(1) 한국 특허출원동향

평가대상기술이 포함된 흑진주 생산기술과 관련된 특허출원동향을 연도별 출원 건수, 주요출원인, 및 IPC 기술분류를 중심으로 분석하였다.

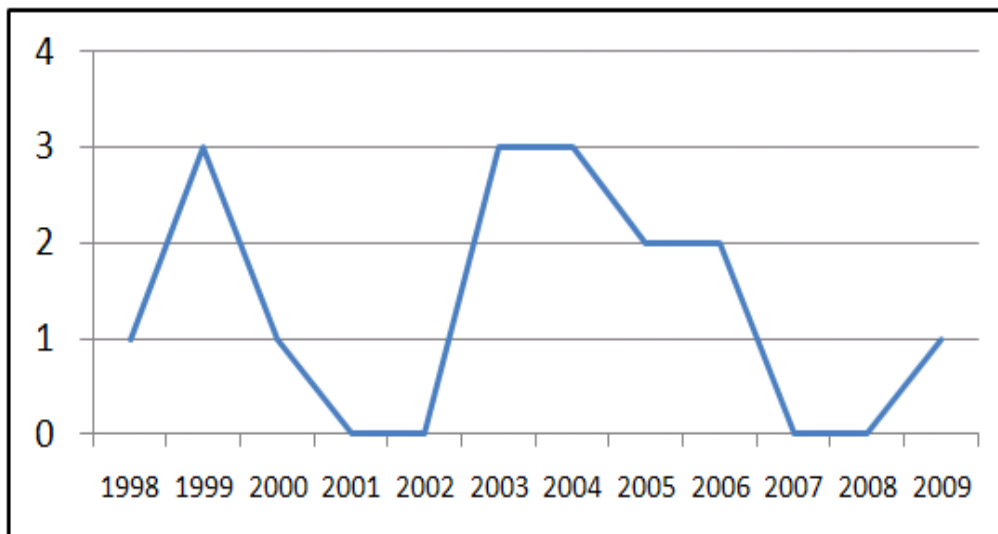


그림 3-5-2. 한국내 연도별 출원동향

상기와 같이 연도별 국내출원동향을 살펴보면, 흑진주 양식 기술은 2000년대에 들어서 출원활동이 상당히 이루어 졌으나, 최근에는 저조한 양상을 보였다.

상기 자료는 한국특허정보원(KIPRIS)의 현재 특허공개 또는 특허공고 데이터베이스에서 추출하였다. 다만, 정량분석 시 특허출원으로부터 공개되기까지의 시간 간격을 고려해 볼 때, 2009년의 출원건수는 보다 증가할 수 있다.

한편, 국내 출원 건의 주요 출원인 건수를 조사한 결과는 아래 그림 3-5-3과 같다.

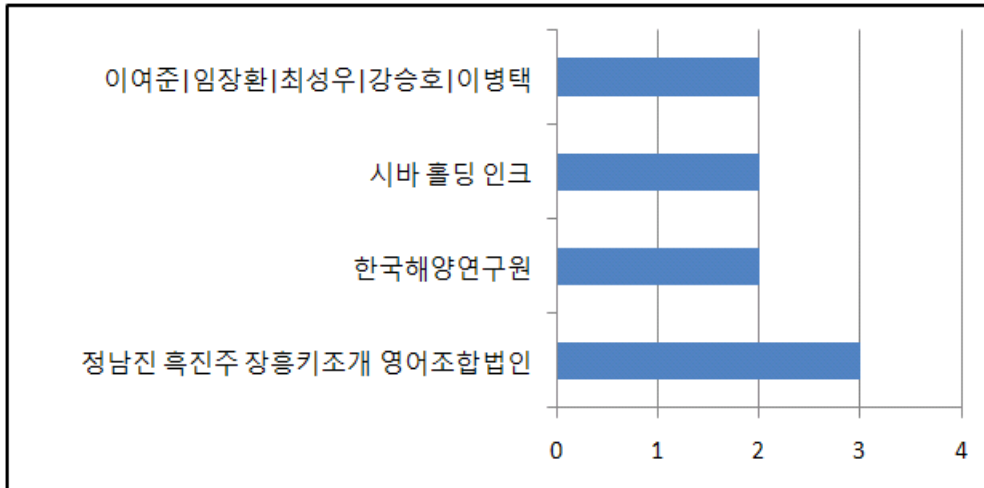


그림 3-5-3 한국내 주요 출원인 건수

조사결과, 전체적으로 볼 때 주로 국가연구기관, 기업을 중심으로 연구가 진행되어 출원된 것으로 나타났다. 특히, 정남진|흑진주|장흥키조개|영어조합법인이 주요 출원인 1위를 차지하였고, 본 평가대상기업인 한국해양연구원도 주요 출원인으로 분석되었다. 또한, 후술하는 바와 같이 PCT 출원의 주요출원인으로 선정된 시바 홀딩 인크(CIBA SPECIALTY CHEMICALS HOLDING INC.)가 국내에서도 주요 출원인으로 분석되었다. 대학의 흑진주 양식 기술 관련 출원은 활발하지 않는 것으로 나타났다.

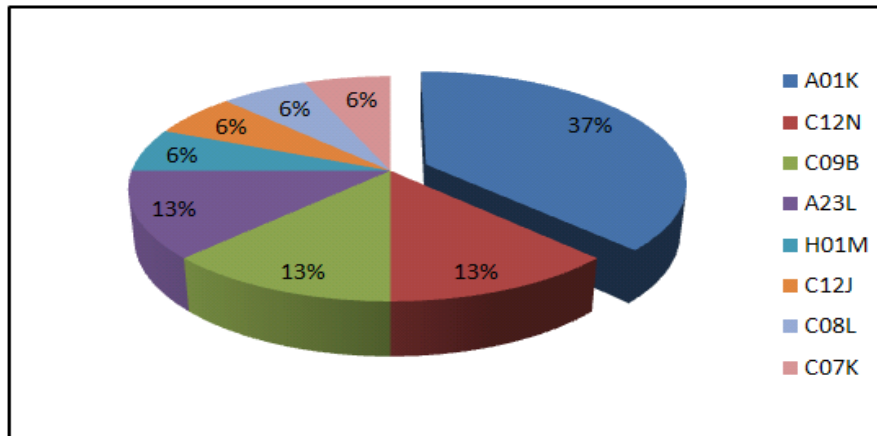


그림 3-5-4 한국내 출원건의 기술분류(IPC)

한편, 그림 3-5-4는 국내 출원된 건들의 IPC 기술분류 중 출원점유율은 A01K(축산; 조류, 어류, 곤충의 사육; 어업; 달리 분류되지 않는 동물의 사육 또는 번식; 새로운 동물)가 37%로 점유율이 가장 높았으며, C12N(미생물 또는 효소; 미생물의 보존, 유지, 증식; 그 조성물; 돌연변이 또는 유전자공학; 배지), C09B(유기 염료 또는 염료 제조에 밀접한 관련이 있는 화합물; 매염제; 레이크), A23L(A21D 또는 A23B로부터 A23J까지; 포함 되지 않는 식품, 식료품, 또는 비알콜성음료; 그 조제 또는 처리, 예. 가열 조리, 영양 개선, 물리적 처리; 식품 또는 식료품의 보존 일반)은 각각 13%로 나타났다.

(2) 해외 특허출원동향

평가대상기술과 관련된 해외 특허출원동향을 각국별 출원누적건수, 국가별 주요출원인 및 국가별 IPC 분류 순으로 분석하였다.

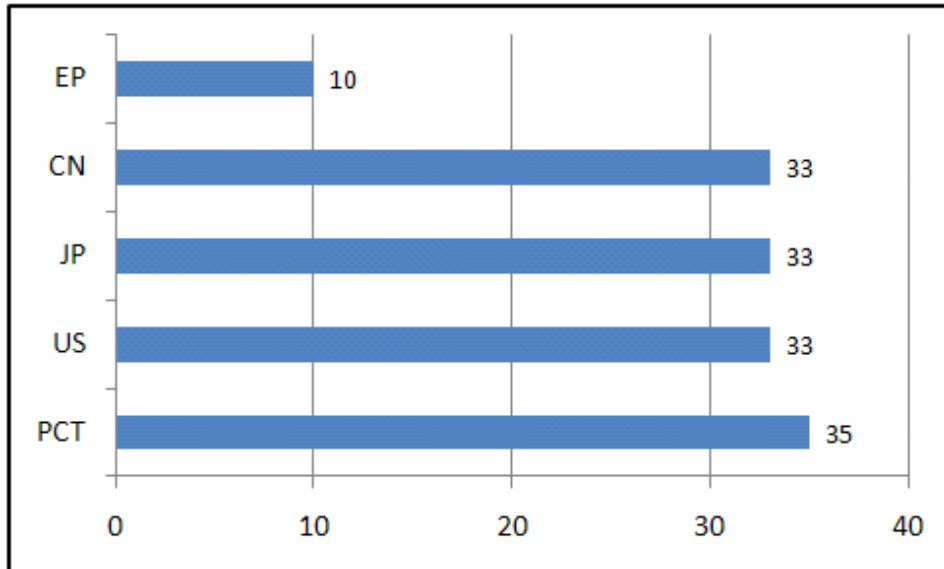


그림 3-5-5 해외출원 누적건수

해외출원 누적건수를 살펴보면, PCT 국제출원이 총 35건으로 가장 높게 나타났고, 미국, 일본, 중국이 각각 33건으로 흑진주 양식 기술 관련 총 출원건수 면에서 유사한 것으로 나타났다. 유럽은 총 10건으로 미국, 일본, 중국에 비해서 특허출원이 저조한 것으로 나타났다.

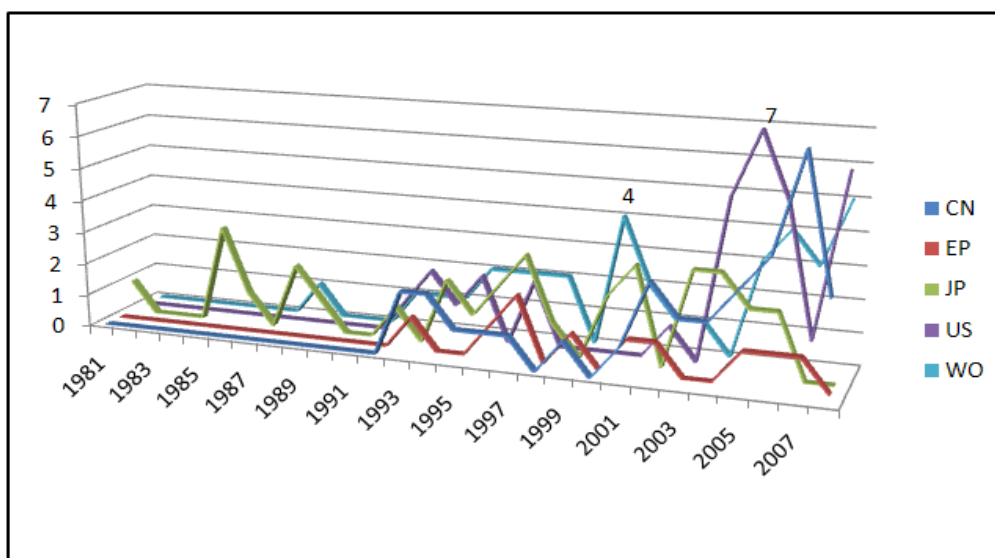


그림 3-5-6 해외국가의 연도별 출원동향

연도별 출원동향을 살펴보면, 전반적으로 PCT 국제출원이 2000년대에 들어서서 증가하는 양상을 보였고, 미국과 중국 출원이 2000년 중반에 급증하는 양상을 보였다. 일본은 1990년대 중후반부터 출원이 비교적 꾸준히 이루어지고 있는 양상을 보였다.

표 3-5-4 해외국가별 주요 출원인

국가	주요 출원인	출원 건수
미국	Xerox Corporation	3
	L'Oreal S.A.	2
	KAO CORP	2
일본	KAO CORP	2
	NOEVIR CO LTD	2
	HONDA MOTOR CO LTD	2
유럽	MERCK PATENT GmbH	2
중국	Wuhan Yunong Biological Medical Technology Co., Ltd.	2
PCT	US COSMETICS CORPORATION	2
	CIBA SPECIALTY CHEMICALS HOLDING INC.	2

해외국가별 주요 출원인을 살펴보면, 미국, 일본, 중국, 유럽 및 PCT 국제출원에 있어서 특정 출원인에 집중되지 않는 양상을 나타냈다.

주목할만한 주요출원인으로는, 미국의 경우 Xerox Corporation, L'Oreal S.A., KAO CORP으로 나타났으며, 이중 KAO CORP는 일본출원에서도 주요출원인으로 분석되었다. 또한, PCT 출원의 주요출원인인 CIBA SPECIALTY CHEMICALS HOLDING INC.는 국내 출원에서도 주요출원인으로 분석되었다.

한편, 흑진주 양식 기술 관련 해외특허의 IPC 기술분류를 살펴보면, 미국, 일본, 중국, PCT 출원의 경우 국내출원과 달리 A61K(의약품, 치과용 또는 화장용 제제) 분야의 출원건수가 가장 많았다. 또한, 미국, 일본, 유럽출원의 경우 국내출원과 마찬가지로 A01K(축산; 조류, 어류, 곤충의 사육; 어업; 달리 분류되지 않는 동물의 사육 또는 번식; 새로운 동물) 분야의 출원건수도 상당히 많은 것으로 분석되었다. 또한, 중국의 경우 흑진주 양식 기술과 다소 거리가 먼 A23L(A21D 또는 A23B로부터 A23J까지; 포함 되지 않는 식품, 식료품, 또는 비알콜성음료; 그 조제 또는 처리, 예. 가열 조리, 영양 개선, 물리적 처리; 식품 또는 식료품의 보존 일반) 분야의 출원건수도 많은 것으로 집계되었다.

표 3-5-5 기술분류(IPC) 분석

	A01K	A23L	A61K	B05D	B41M	C09C	C09D
미국	2	2	12	1	0	0	3
일본	3	2	10	2	2	2	1
유럽	2	0	1	0	0	1	0
중국	1	10	15	0	0	0	0
PCT	2	3	4	1	2	0	0

(3) 선행기술조사

(가) 선행기술 검색 결과

평가대상기술과 관련하여 선행기술을 검색한 결과, 정남진 흑진주 장홍키조개 영어조합법인의 한국등록특허 제10-0595605호 (키조개를 이용한 흑진주의 양식방법, 이하 ‘선행기술 1’이라 함); 정남진 흑진주 장홍키조개 영어조합법인의 한국공개특허 제2007-0070604호 (진주핵 고정구 및 이를 이용한 흑진주의 양식 방법, 이하 ‘선행기술 2’이라 함); 이여준, 강승호, 임장환, 최성우, 이병택의 한국등록특허 제10-0328392호 (홍합을 모패로 사용한 유핵진주 양식방법, 이하 ‘선행기술 3’이라 함); Changene, Inc.의 미국등록특허 제 7163795호 (Methods and compositions for pearl oyster cultivation, 이하 ‘선행기술 4’라 함)가 관련도가 높은 것으로 판단되었다.⁵⁾

(나) 관련 중요특허 기술 분석

표 3-5-6 평가대상기술 관련 중요특허 목록

번호	공개/등록번호 (공개/등록일자)	출원인	명칭	관련도
1	KR10-0595605 (2006.06.23)	정남진 흑진주 장홍키조개 영어조합법인	키조개를 이용한 흑진주의 양식방법	A
2	KR2007-0070604 (2007.07.04)	정남진 흑진주 장홍키조개 영어조합법인	진주핵 고정구 및 이를 이용한 흑진주의 양식 방법	A
3	KR10-0328392 (2002.02.28)	이여준, 강승호, 임장환, 최성우, 이병택	홍합을 모패로 사용한 유핵진주 양식방법	A
4	US7163795 (2007.01.16)	Changene, Inc.	Methods and compositions for pearl oyster cultivation	A

5) 관련도는 X: 신규성에 근거가 되는 문헌, Y: 진보성에 근거가 되는 문헌, A: 참고문헌으로 나타낸다.

(1) 한국등록특허 제10-0595605호 (등록일: 2006년 06월 23일)

“키조개를 이용한 흑진주의 양식방법”

본 발명은 키조개를 모패로 하여 진주핵을 삽입하여 흑진주를 얻는 흑진주의 양식 방법에 관한 것으로, 모패처리, 삽핵, 중간양성 및 본 양성으로 구성되는 진주의 양식 방법에 있어서, 그 모패로서 사새목 키조개과의 연체동물인 키조개를 사용하며, 본 양성 시에 각정부를 아래로 하여 저질(개펄)에 직접 삽입하여 행하는 것을 특징으로 하며, 흑진주의 대량 양식을 가능하게 함과 동시에 선명한 색상과 강도 높은 흑진주의 생산 가능이라는 효과를 얻을 수 있다.

(2) 한국특허공개 제2007-0070604호 (공개일: 2007년 07월 04일)

“진주핵 고정구 및 이를 이용한 흑진주의 양식 방법”

본 발명은 진주핵 고정구 및 이를 이용한 흑진주의 양식방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 원형의 지지판 중앙에 돌출편이 형성된 진주핵 고정구를 키조개에 결합고정하는 핵시술 단계를 이용함으로써 조개의 패사율을 줄여 생산성 및 작업성을 높일 수 있을 뿐만 아니라 부가가치가 높고 품질이 우수한 흑진주를 대량 생산할 수 있도록 하는 진주핵 고정구 및 이를 이용한 흑진주의 양식방법에 관한 것이다.; 이에 본 발명인 진주핵 고정구를 이용한 흑진주의 양식방법은 모패준비 단계, 핵시술 단계, 양성 단계로 이루어지며, 상기 모패준비 단계는 모패로서 키조개를 준비하는 단계로 이루어지며, 상기 핵시술 단계는 구형으로 가공된 진주핵에 삽입구멍을 천공하는 단계와, 상기 키조개의 일측 소정 위치에 관통공을 형성하는 단계와, 상기한 진주핵 고정 수나사부의 지지판과 상기 진주핵이 이격된 상태가 유지되게 상기 진주핵 고정 수나사부의 돌출편을 상기 진주핵의 삽입구멍에 삽입결합하는 단계와, 상기 진주핵 고정 수나사부를 상기 키조개의 관통공에 삽입하는 단계와, 삽입된 진주핵 고정 수나사부를 상기 진주핵 고정 암나사부에 의해 고정시키는 단계로 이루어지고, 상기 양성 단계는 키조개의 각정부를 아래로 하여 저질(개펄)에 이식하는 단계로 구성되는 것을 특징으로 한다.

(3) 한국등록특허 제10-0328392 (등록일: 2002년02월28일)

“홍합을 모패로 사용한 유핵진주 양식방법 ”

본 발명은 홍합을 모패로 사용한 유핵진주 양식방법에 관한 것이다. 더욱 구체적으로 홍합에 진주핵을 삽입하여 진주를 얻는 유핵진주 양식방법에 관한 것이다. 본 발명의 홍합을 모패로 사용한 유핵진주 양식방법은 먼저 홍합의 족사를 자르고 다수개의 진주핵 삽입구멍을 상하 두 개의 패각에 홍합의 패각근이 부착된 위치를 제외한 원하는 위치에 상기 진주핵의 직경보다 조금 크게 천공하여, 상기 천공된 진주핵 삽입구멍에 진주핵을 삽입한

후, 상기 전복의 패각에 접착제로 고정한다. 이어서 족사가 다시 생성되어 홍합의 상하 두 개의 패각이 맞물려 고정 될 때까지 상하 두 개의 패각의 양단부에 구멍을 내어 철사로 묶어 고정시킨다. 상기 패각의 재생을 위해서 상기 홍합이 각질, 능주질 및 진주질을 차례로 분비하여 상기 진주핵을 감싸서 흑진주를 생성하게 된다. 본 발명의 홍합을 모패로 사용한 유핵진주 양식방법은 기존의 전복 및 진주조개로부터 생산되는 백색의 진주보다 부가가치가 높은 흑색의 진주를 단기간에 얻을 수 있으며, 구형 또는 반구형 등의 다양한 진주핵을 이용하여 다양한 크기의 흑진주를 원하는 형태로 얻을 수 있다.

(4) 미국등록특허 제7163795호 (등록일: 2007년 01월 16일)

“Methods and compositions for pearl oyster cultivation ”

본 발명은 진주조개 양식에 유용한 방법 및 조성물을 제공한다. 흑진주 조개(*Pinctada margaritifera*)의 nacre 유전자에 관한 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드를 제공한다. 상기 폴리펩티드에 대한 항체; 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드 및/또는 항체를 포함하는 조성물이 제공된다. 본 발명은 진주 조개를 양식하는 방법을 포함하여, 상기 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드 및 항체를 이용하는 방법을 제공한다. 또한, 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드 및/또는 항체를 포함한 어레이가 제공된다.

(다) 관련특허와의 유사점 및 차이점

표 3-5-7 대상기술 관련 중요특허 분석

번호	공개/등록번호 (공개/등록일자)	유사점	차이점
1	KR10-0595605 (2006.06.23)	· 본 선행기술과 본 특허권은 흑진주 양식 기술이라는 점에서 기술 분야가 동일하다.	· 본 선행기술은 ‘키조개’를 이용하여 흑진주를 양식하는 반면, 본 특허권은 ‘흑진주 조개(<i>Pinctada margaritifera</i>)’를 이용하여 흑진주를 양식한다는 점에서 양 발명은 전혀 상이하다.
2	KR2007-0070604 (2007.07.04)	· 본 선행기술과 본 특허권은 흑진주 양식 기술이라는 점에서 기술 분야가 동일하다.	· 본 선행기술은 원형의 지지판 중앙에 돌출편이 형성된 ‘진주핵 고정구’를 ‘키조개’에 결합고정하는 핵시술 단계를 이용하여 흑진주를 양식하는 반면, 본 특허권은 상기 진주핵 고정구를 이용하지 않고 ‘흑진주 조개(<i>Pinctada margaritifera</i>)’를 이용하여 흑진주를 양식한다는 점에서 양 발명은 전혀 상이하다.
3	KR10-0328392 (2002.02.28)	· 본 선행기술과 본 특허권은 흑진주 양식 기술이라는 점에서 기술 분야가 동일하다.	· 본 선행기술은 ‘홍합’을 모패로 사용하여 흑진주를 양식하는 반면, 본 특허권은 ‘흑진주 조개(<i>Pinctada margaritifera</i>)’를 이용하여 흑진주를 양식한다는 점에서 양 발명은 전혀 상이하다.

번호	공개/등록번호 (공개/등록일자)	유사점	차이점
4	US7163795 (2007.01.16)	· 본 선행기술과 본 특허권은 흑진주의 양식에 유용한 흑진주 조개의 항원 단백질(또는 폴리펩티드) 및 그것의 항체에 관한 것이라는 점에서 기술 분야가 동일하다.	· 본 선행기술은 흑진주 조개의 nacre 유전자에 관한 폴리펩티드 및 그것의 항체에 관한 것인 반면, 본 특허권은 흑진주 조개의 알 추출물의 항원 단백질 및 그것의 항체에 관한 것으로서, 아미노산 서열이 상이하여 양 발명은 전혀 상이하다.

(라) 분석결과

본 평가대상특허는 상기에서 특허동향분석한 특허 중 평가대상특허 출원일 이전의 선행기술들과 비교 분석해 본 결과, 본 특허의 신규성 및/또는 진보성 흠결의 근거가 될 가능성이 높은 선행기술은 발견되지 않았다. 다만, 본 특허와 기술분야가 동일하고 관련성이 있는 중요특허로서 4개의 특허가 검색되었고, 상기 4개의 특허 중 3개의 특허(선행기술 1 내지 3)는 흑진주 양식 기술과 직접적으로 관련된 기술이었고, 1개의 특허(선행기술 4)는 평가대상특허와 같이 흑진주 조개의 항원 단백질 및 항체를 이용하여 검출하는 기술이었다.

그러나, 선행기술들을 구체적으로 살펴보면, 선행기술 1 내지 3은 “흑진주 조개 (*Pinctada margaritifera*)”를 이용한 흑진주 양식이 아니라, “키조개 또는 홍합”을 이용한 흑진주 양식 기술을 개시하고 있다. 또한, 평가대상특허와 가장 유사한 선행기술 4의 경우 폴리펩티드 서열(SEQ ID NO:4)을 평가대상특허의 서열번호 1 내지 8과 비교한 결과 상이한 아미노산 서열임을 확인하였다.

이와 같은 점을 종합해 볼 때, 흑진주 조개 양식 기술에 있어서 평가대상특허의 “흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질 및 이에 특이적인 항체를 이용하여 흑진주 조개의 번식량을 예측하는 방법” 기술은 선행기술에 공지되어 있지 않은 바, 선행기술과의 관련도는 적다고 판단된다.

(3) 권리 분석 및 평가 의견

(가) 권리범위의 광협

특허권의 권리범위 내지 실질적 보호범위는 특허출원서에 첨부한 명세서의 특허청구범위의 기재내용에 의해 정해지는 것이 원칙이므로 특허청구범위에 기재되지 아니한 사항은 보호를 받지 못한다.

특허청구범위를 해석함에 있어, 문언침해(all element rule), 균등론(doctrine of equivalent), 공지기술(기술수준) 참조, 출원경과 참조(금반언의 원칙: file wrapper estoppel) 등의 원칙 및 이론이 적용된다.

문언침해는 특허권의 보호범위를 부당히 확장하는 것을 방지하기 위한 것으로서, 청구항에 기재된 구성요소 하나하나의 발명자가 필수 구성요소로서 특정한 것이므로, 이들 요소 중 어느 하나를 불필요하다고 판정하는 것은 허용하지 않는 것이다. 따라서 청구항에 열거된 구성요소의 어느 것이 기능상 불필요한 것으로 인정되더라도 침해판단에서 그 요소를 결한 경우에 침해를 인정할 수 없다.⁶⁾

균등론이란 특허청구범위의 해석만으로는 특허권 침해에 해당되지 않더라도 기술적 사상이 특허발명과 동일하면, 즉 균등한 기술이면 특허권 침해로 보아 특허권자를 넓게 보호하자는 이론이다. 일반적으로 권리범위의 해석은 구성요건 완비의 법칙에 따라 하는데, 이 경우 별로 중요하지 않는 부수적인 구성 요소를 제외하고 실시하면 특허권 침해로 볼 수 없게 되어 특허권자 보호에 문제가 있다. 그러나 기술이 균등한지를 자의적으로 판단할 수는 없고, 어디까지를 균등기술로 볼 것인가 가이드라인 같은 것이 필요한데, 이에 대한 중요한 판례가 있다. 이에 따르면, 본질적인 요소가 아닐 것, 출원 전에 이미 알려진 것이 아닐 것, 작용 효과가 동일할 것, 출원경과를 참작하여 의도적으로 제외한 것이 아닐 것 등등의 판단 기준이 있다.⁷⁾

공지기술참작의 원칙은, 출원시 공지기술에 대한 개량진보의 정도를 고려하여 특허발명의 보호범위를 결정하는 것이다. 개량진보가 큰 발명의 보호범위는 넓게 해석하고, 개량진보가 작은 발명은 좁게 해석한다.

출원경과 참작의 원칙은, 출원인이 출원심사과정에서 본인이 수행한 행위와 모순되는 주장을 하는 것은 허용되지 않는다는 이론으로서, 미국, 일본 등 제외국은 물론 우리나라 판례에 의해서도 인정되는 이론이다.

이러한 청구범위 해석원칙에 따라 평가대상특허의 권리범위를 살펴보면, 독립항 제1항 내지 제8항의 항원 단백질 및 제9항의 항체는 각각 서열번호로 명확하게 한정함으로써 권리범위는 명확한 것으로 판단되나, 그 범위는 다소 좁은 것으로 판단된다. 다만, 상기 아미노산 서열 일부의 단순한 치환 또는 단순 추가를 통하여 다소 달리 실시한다 하더라도, 평가대상특허의 항원단백질 및 항체에 포함될 여지가 많은 것으로 판단된다. 또한, 서열을 일부 변형할 경우 항체 역가 면에서 상당한 차이가 발생할 가능성이 높다.

또한, 평가대상특허의 방법 청구항(제10항)에서 특정 항체(제9항)를 이용한다는 점에서 권리범위가 다소 좁다는 것은 상술한 바와 같으나, 항원-항체 반응은 항체면역효소측정법(ELISA)에 한정하지 않고, 다양한 항원-항체 반응을 포괄하고 있으므로, 권리범위가 충분히 확보된 것으로 판단된다. 따라서 방법발명으로 구성된 평가대상특허의 권리범위는 특허의 청구범위가 명확하고 그 범위가 충분히 확보되어 잠재적인 사업라인까지도 보호 가능할 것으로 판단된다.

6) Pennwalt Corp. v. Durand-Wayland, Inc., 4 USPQ2d 1737, CAFC 1987

7) 대법원 2000. 7. 28. 선고 97후2200판결

(나) 권리의 안정성

특허권의 소멸원인으로는 존속기간의 만료, 특허권의 무효, 특허권의 취소, 특허료의 불납, 상속인의 부존재, 특허권의 포기 등이 있으나, 여기서는 권리 안정성과 관련하여 대상특허의 무효 가능성을 검토한다.

특허권에 무효사유가 있는 경우, 당연히 무효로 되는 것은 아니고 이해관계인 또는 심사관의 무효심판청구에 의해 특허심판원의 심결이나 특허법원의 판결에 의해서만 무효가 될 수 있다. 특허법은 권리의 무효사유를 법 제133조에 규정하고 있으며, 무효사유는 크게 명세서 또는 특허청구범위의 기재가 불명료하거나 불충분하게 기술되어 있는 경우와, 특허청구범위의 기술내용이 특허출원 전에 공지된 선행기술과 동일하거나 선행기술로부터 용이하게 창작할 수 있는 경우의 2가지로 구분할 수 있다.

평가대상특허의 명세서 및 특허청구범위를 면밀히 검토한 결과, 기재불비와 관련된 무효사유는 발견할 수 없었다. 또한, 상기 선행기술 조사결과로부터 확인된 바와 같이, 흑진주 조개 양식 기술에 있어서 평가대상특허의 “흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질 및 이에 특이적인 항체를 이용하여 흑진주 조개의 번식량을 예측하는 방법” 기술을 개시하고 있는 선행기술은 발견되지 않았는바, 선행기술에 의한 무효화 가능성은 매우 낮다고 판단된다. 따라서, 평가대상특허는 권리 안정성이 높은 것으로 판단된다.

(다) 권리의 경쟁성

모패로부터 생산되는 흑진주 조개 알의 정량적 측정은 측정방법 상 어려움 때문에 그 연구가 매우 저조한 실정이었으나, 평가대상특허는 흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질을 동정하고, 그것에 특이적으로 반응하는 항체를 제조하여, 항원-항체 반응을 통해 흑진주 조개 번식량을 정량적으로 측정하는 방법을 최초로 개발하였다. 따라서 평가대상 기술은 흑진주 양식 기술 분야에서 기술자체가 매우 혁신적인 ‘혁신(Revolutionary) 기술’에 해당한다.

(라) 기술 및 사업 관련도

흑진주 조개의 양식 산업을 위해서는 안정적인 흑진주 조개의 치패 공급이 중요한데, 흑진주 조개의 번식 생리에 관한 기초 연구가 매우 부족하여 흑진주 조개의 인공종묘 생산이 아직까지 성공적으로 이루어지지 못하고 있는 상황이다. 흑진주 조개의 우량종묘를 생산하기 위해서는 포란수 측정 기술이 중요하므로, 평가대상특허의 “흑진주 조개 알 추출물의 항원 단백질 및 이에 특이적인 항체를 이용하여 흑진주 조개의 번식량을 예측하는 기술”은 흑진주 양식 산업에 직접적이고 혁신적인 기술로서 기여할 것으로 기대된다.

마. 기술성 분석 종합의견

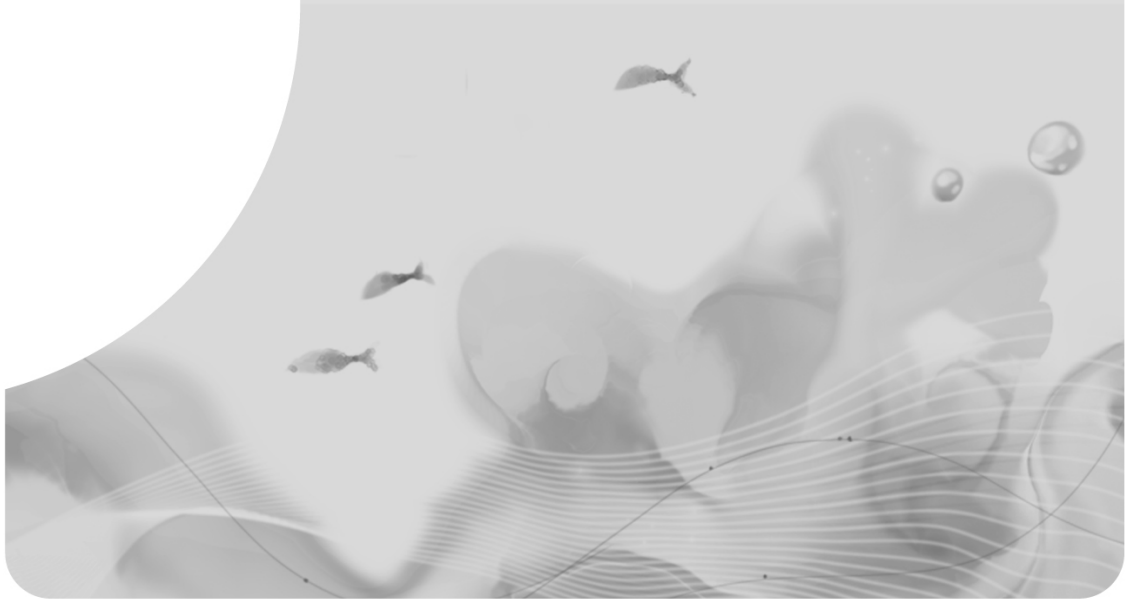
평가대상특허는 물건발명(항원 및 항체)과 방법발명(흑진주 조개 번식량 예측방법)으로서 권리범위가 명확하나 다소 좁게 확보되어 있는 것으로 판단되고, 국내외 선행기술 조사 결과, 평가대상특허와 유사한 선행기술은 없는 것으로 조사되었으므로, 무효화 가능성이 매우 낮아 권리 안정성이 높은 것으로 판단된다. 또한, 항원-항체 반응을 통해 흑진주 조개 번식량을 정량적으로 측정하는 방법을 최초로 개발하여 권리의 경쟁성이 우수한 것으로 판단된다. 흑진주 조개의 우량종묘를 생산하기 위해서는 포란수 측정 기술이 중요하므로, 평가대상특허는 흑진주 양식 산업에 직접적이고 혁신적인 기술로서 기여할 것으로 기대된다.

제 4 장

Korea Ocean Research & Development Institute



목표달성도 및 관련분야와의 기여도



제4장 목표달성도 및 관련분야와의 기여도

제1절 흑진주조개 항체개발 연구의 학문적 의의

이 연구에서 제주대학교 연구팀은 1차년도 연구 목표를 흑진주조개의 알 순수 분리 및 알의 생화학적 조성 분석, 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체 개발, 개발된 항체에 대한 특허 출원을 목표로 연구를 수행하였다. 2008년 4월 마이크로네시아 연방 축주에 서식하는 흑진주조개를 채집하여 성공적으로 순수한 알을 분리하였고, 이 과정에서 알 하나의 무게를 산출해 내었다. 또한 흑진주조개 알의 생화학적 조성분 분석이 이루어 졌으며, 순수 분리된 흑진주조개 알을 토끼에 주사하여 알 특이적인 항체를 개발 할 수 있다. 이러한 항체 개발법은 특허 출원을 시도 하였으며, 특허 출원 과정에서 이전 연구자들과 알 분리 차이점 및 독창성을 중점적으로 기술 하여 세계 최초로 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체 개발에 관한 특허를 출원 할 수 있었다.

2차 년도에는 개발된 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체를 이용한 흑진주조개 암컷의 번식량을 측정하고, 흑진주조개 난 단백질의 특성 조사, 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체 개발을 목표로 연구를 수행하였으며, 1차 년도에 개발된 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체를 이용하여 성공적으로 마이크로네시아 축주에 서식하고 있는 흑진주조개의 번식량을 측정하여 세계 최초로 흑진주조개의 포란수를 정량적으로 측정할 수 있었다. 또한 흑진주조개 난 단백질의 특성을 전기영동 및 western blotting, N-terminal 아미노산 서열 분석을 통해 조사함으로써 개발된 흑진주조개 난 단백질 특이적인 항체가 종 특이적으로 흑진주조개에만 반응 한다는 것을 알 수 있었다.

3차 년도에는 2차 년도에 이어 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체 개발, 흑진주조개 수컷 번식량 측정, 기생충 감염 등 질병 유무 진단을 목표로 연구를 수행하였다. 그 결과, 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체가 성공적으로 개발이 되었으며, 이는 이 매패류에서 대서양굴 정자 특이적인 항체 개발 (Choi et al. 1993) 이후 세계에서 두 번째로 개발이 이루어 졌으며, 진주조개과에 속한 종에서는 세계 최초로 정자 단백질에 특이적인 항체의 개발이 이루어져 의미가 있다고 평가된다. 연구 수행 기간 동안 개발된 흑진주조개 정자 단백질 특이적인 항체를 이용해 흑진주조개 수컷 번식량을 측정하여 세계 최초로 흑진주조개의 암. 수컷 번식량을 정량적으로 측정 할 수 있었다. 또한 이번 연구에서 조직병리학적, 분자생물학적인 기생충 등 질병 감염 유무 진단 결과는 Chuuk State 해역의 간접적인 환경 지표로 간주되며, 추후 흑진주조개 모패 양성에 고려해야할 기초 자료로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

제2절 흑진주조개 항체개발에 따른 관련 산업 시장분석

1. 시장성 분석

가. 산업동향

평가대상기술이 대상으로 하고 있는 산업은 흑진주 양식 산업으로서, 평가대상기술의 사업화에 있어서 전방산업은 흑진주 조개 양식 산업으로, 후방산업은 흑진주의 용도 관련 화장품 및 생활용품 산업으로 설정할 수 있다.

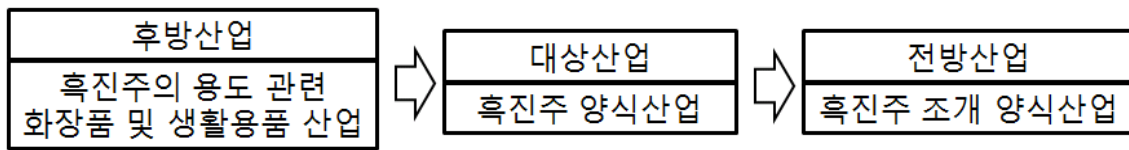


그림 4-2-1 산업연관체계

흑진주 양식 산업의 특성을 살펴보면 아래와 같다.

양식진주 중에서 가장 가격이 비싼 흑진주는 흑진주조개에서만 생산되는 것으로, 상기 흑진주의 양식이 가장 활발한 곳은 불령 폴리네시아에 속하는 타이티로 전세계 흑진주 생산량의 90% 이상을 생산하고 있으며, 상기 흑진주 조개는 캘리포니아만에서 지중해 동부에 이르기까지 널리 분포하며 서식수온의 범위는 19-32℃ 범위로 불령 폴리네시아 동부의 투아마투 환초에서 쿡제도 사이의 열대 태평양에서 많이 어획되고, 호주의 북부와 동북부, 인도네시아 아루 열도, 파푸아 뉴기니아 및 중국의 해남도 등지에 분포하는 것이다.

그러나 다른 열대성 해양동물이 주어진 범위 내에서 비교적 고르게 분포하지만, 이에 반하여 상기 흑진주조개는 특정해역의 특정 저질에 소규모로 개체군을 이루어 서식하고 있어 자원개발이 어렵다는 문제가 있고, 이에 따라 흑진주 조개의 종묘생산연구가 1970년대에 시작되었으며, 최근 부족한 흑진주조개를 확보하기 위하여 인공종묘생산 연구가 호주, 불령 폴리네시아, 쿡 제도 등에서 활발하게 진행 되고 있지만 아직 대량생산에는 이르지 못하고 실험실 수준에 머물고 있는 실정이다.

즉, 흑진주양식업은 현재까지 알려진 양식업을 포함한 모든 수산업 중 가장 부가가치가 높은 산업으로서, 최근의 흑진주 양식 산업은 자연산 흑진주조개의 자원남획으로 양식에 필요한 충분한 모패를 확보하지 못할 뿐만 아니라 구입단가 또한 상승하여 여러 어려움이 가중되고 있는 실정이다.

나. 시장동향

(1) 시장의 정의

평가대상기술은 흑진주 조개 양식 기술로서, 평가대상기술이 적용될 수 있는 시장은 i) 흑진주 보석 시장 및 ii) 흑진주 용도 관련 화장품, 생활용품 시장으로 정의할 수 있다. 다만, 흑진주의 용도는 “미용, 항염증, 면역증진, 모발염색” 등 다양한 용도가 보고되고 있으나, 본 평가에서는 국내시장에서 가장 큰 시장으로 조사된 “모발 노화방지”와 관련된 ‘기능성 샴푸 시장’을 흑진주의 보석 시장과 함께 평가대상 시장으로 정의하기로 한다.

(2) 시장동향

(가) 국외 시장

□ 흑진주 보석 시장

흑진주는 전 세계적으로 연간 약 8톤이 생산, 1조 원의 시장을 형성하고 있다. 일본 진주 기술자가 타히티에서 흑진주 생산에 성공하면서 현재, 흑진주 생산량의 95%를 타히티가 차지하고 있다.

□ 기능성 샴푸시장

일본 샴푸 시장은 오랜 기간 카오(Kao)사의 아지엔스(Asience), 유니레버사의 렉스 그리고 P&G사의 팬틴이 지배해 왔으나, 시세이도사의 츠바키가 2006년에 출시되어 시장의 큰 변화가 있었다. 일본 연간 샴푸 시장 규모는 약 2천억엔 규모에 달하였다 (2006년 기준).⁸⁾

중국은 현재 세계에서 샴푸 생산량과 판매량이 제일 많은 국가로 중국 내 시장의 샴푸 브랜드수는 3천 개를 넘으며 샴푸시장 규모가 약 200억 위안을 초과할 것으로 추계되었으며 중국 샴푸의 완제품 생산량은 연간 약 40만 톤에 달하였다 (2005년 기준). 3대 샴푸생산업체인 Olive, SLEK 및 P&G가 광둥 지역에 집중되어 있다.

(나) 국내동향

□ 흑진주 보석 시장

양식 진주의 출현으로 국내 진주시장은 물론 세계 보석시장에 큰 변화가 있었다. 진주가 본격적으로 양식되어 상품화되기까지 일본이나 유럽 등지에서는 일반 서민들이 구경하기조차도 어려웠다. 그러나 현재 진주 시장은 그야말로 변화와 발전을 거듭하면서 이전과 크게 달라졌다. 처음 2~3mm 정도의 작은 양식 진주에도 놀라움을 금치 못했던 것이 이제는 7~8mm 정도는 아예 꼬마진주 취급을 하는 정도에 이르렀다.

8) 요미우리 신문, “시세이도의 츠바키 日 샴푸시장에 돌풍”, 2006.06.09

또 10년 전만해도 아코야 진주는 진주시장의 4분의 3 정도를 차지 할 정도로 진주의 대명사로 불려왔다. 그러나 최근 10년을 전후해 세계 진주시장은 물론 국내 진주시장에서는 주로 6mm에서 9mm정도의 아코야 진주가 시장을 대부분 차지하던 것에서 중국에서 수입된 담수진주가 시장의 상당량을 차지하기 시작했다.

이처럼 담수진주의 수요가 급증한 배경에는 담수진주의 품질 향상이 가장 큰 요인으로 작용했다. 이전에는 아코야 진주와 담수진주를 한눈에 봐도 그 차이를 알 수 있었으나 이제는 진주 전문가가 봐도 차이점을 구별 할 수 없을 정도로 담수진주의 질이 발달했다. 물론 해수진주에 비해 담수진주가 지닌 모든 단점들이 전부 보완됐다는 것은 아니다.

2005년을 전후로, 아코야 진주의 수요가 감소하면서 대신 그 자리를 남양진주가 차지하게 되었다. 이전까지는 주로 일본, 호주 등지에서 소규모로 남양진주가 수입되어 판매 되었다면 최근에는 파스팔리(PASPALLEY)나 콩코드(CONCORD) 등지의 경매시장에서 남양진주가 수입되어 판매, 남양진주의 수입이 급증하게 되었다. 그러면서 동시에 가격이 크게 하락하게 돼 10mm 이상의 남양진주를 선호하는 경향이 두드러지게 되었다.

최근에는 컬러풀한 진주의 수요도 점차 늘어나고 있다. 지난 2007년 발레리나펠사에서 출시한 크라운 컬러의 초콜릿펄을 비롯해 골드 컬러의 골든펄의 수요가 좀 더 다른 것을 원하는 소비자들을 중심으로 팔려나가고 있다.

한국해양연구원은 태평양 미크로네시아에 운영 중인 남태평양해양연구센터에서 흑진주 양식에 성공했다고 최근 밝혔다. 이에 따라, 일본 중국 프랑스 등 3개국만 보유하고 있는 흑진주 양산기술을 한국도 확보하게 됐다. 흑진주는 백진주에 비해 고가품인 데다 최근 들어 수입 비중이 늘어나는 추세여서 대량생산 기술 확보는 국내 진주보석산업에 큰 영향을 줄 것으로 기대된다.

□ 기능성 샴푸시장

웰빙 트렌드의 부상과 함께 생활용품의 고급화 바람이 불고 있는 가운데 2003년 기준 전체 샴푸시장에서 기능성(프리미엄) 샴푸의 시장 점유율이 70%에 육박한 것으로 나타났다.

2000년에 약 400억원 규모였던 기능성 샴푸 시장은 샴푸 시장의 주력시장으로 급부상하고 있다. 2002년의 경우 약 1,000억원의 시장을 형성, 연간 2,200억원으로 추정되는 전체 샴푸 시장의 45% 이상을 차지했고⁹⁾, 2003년에는 전체 1,992억원의 시장 가운데 기능성 샴푸가 1,297억 규모의 시장을 형성, 전체 샴푸시장의 65.1%를 점유하였다¹⁰⁾.

9) ITOOZA(www.itooza.com), "LG 엘라스틴, "프리미엄 샴푸시장 평정한다", 2003.11.03

10) 장업신문, "샴푸시장규모 1992억원대", 2004.02.04

(3) 시장규모

(가) 해외

□ 흑진주 보석 시장

흑진주는 1973년 일본이 타히티에서 최초로 양식기술 개발에 성공한 이래 2005년 기준 전 세계적으로 약 8.5 t 이 생산돼 1.2억 달러 규모의 시장을 형성한 가운데 타히티가 전체 생산량의 93%를 점유하고 있다.¹¹⁾

참고로, 2005년 1/4분기 기준 진주의 주요 수입상대국은 일본(158만불), 중국(39만불), 홍콩(22만불)등으로 나타났다.

표 4-2-1 2005년 1/4분기 진주 수입 상대국 현황

(단위 : 만불)

수입상대국 (금액)	일본	중국	홍콩	호주	미국
	158	39	22	12	4

자료: 관세청(www.customs.go.kr) 보도자료, “보석류 수입동향”, 2005.5.11

□ 기능성 샴푸시장

중국은 현재 세계에서 샴푸 생산량과 판매량이 제일 많은 국가로 중국 내 시장의 샴푸 브랜드 수는 3천 개를 넘으며 샴푸시장 규모가 약 200억 위안을 초과할 것으로 추계되었으며 중국 샴푸의 완제품 생산량은 연간 약 40만 톤에 달하였다 (2005년 기준).

일본 연간 샴푸 시장 규모는 약 2천억엔 규모에 달하였다 (2006년 기준).

(나) 국내

□ 흑진주 보석 시장

국내에서는 남해안을 중심으로 이뤄지고 있는 양식이 모두 백진주이고, 연간 약 900만 달러 어치의 진주 수입량 가운데 15% 정도를 흑진주가 차지하고 있다.¹²⁾

흑진주는 백진주에 비해 고가품인 데다 근래 들어 수입 비중이 늘어나는 추세라 흑진주 양식 성공은 시장 판도에 적잖은 영향을 미칠 전망이다.

□ 기능성 샴푸시장

국내 샴푸 시장은 2003년까지 꾸준히 증가세를 보여 LG생활건강의 ‘엘라스틴’, P&G의 ‘펜틴’, 유니레버의 ‘도브’로 프리미엄급 샴푸시장의 3파전을 이루었다. 이러한 2002년

11) 매일경제, “세계 4번째 흑진주 양식 성공”, 2008.08.03

12) 매일경제, “해양연구, 남태평양서 흑진주 양식 성공”, 2008.07.31

말 가장 치열했던 프리미엄 샴푸 시장의 여파로 2003년 국내 샴푸시장의 규모는 3천억원 대까지 치솟았다.

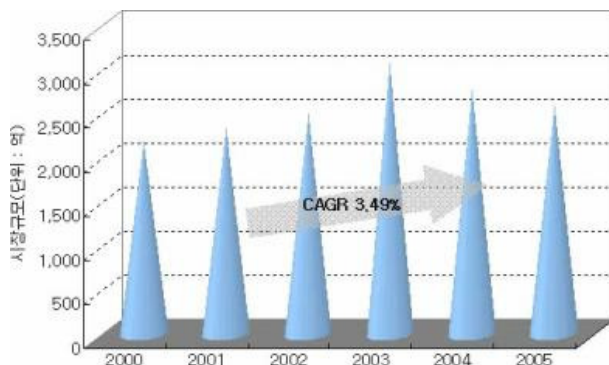


그림 4-2-2 국내 샴푸 시장 규모

자료: 업체뉴스, 알앤디비즈 재구성

표 4-2-2 국내 샴푸 시장 규모

구분	2000	2001	2002	2003	2004	2005
생산금액(억)	2,190	2,342	2,500	3,084	2,769	2,600
증감율(%)	-2.90	6.94	6.75	23.36	-10.21	-6.10

자료: 대한화장품협회, 알앤디비즈 재구성

프리미엄 샴푸는 2002년 57.7%의 시장 점유율에서 2003년 66.1%로 고속성장을 해오다가 2005년 45%로 저성장률을 보였다.

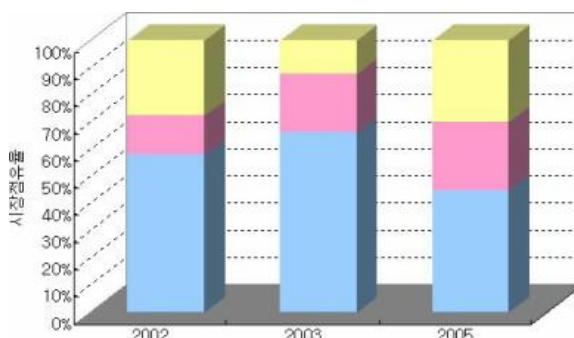


그림 4-2-3 국내 프리미엄 샴푸 시장점유율

표 4-2-3 국내 프리미엄 샴푸 시장점유율

구분	2002	2003	2005
프리미엄 샴푸	57.7%	66.1%	45%
두피케어샴푸	14.5%	21.8%	25%

자료: 업체뉴스, 알앤디비즈 재구성

또 다른 보고에 의하면, 기능성 샴푸 시장은 2000년에 약 400억원 규모로 샴푸 시장의 주력시장으로 급부상하여, 2002년의 경우 약 1,000억원의 시장을 형성, 연간 2,200억원

으로 추정되는 전체 샴푸 시장의 45% 이상을 차지했고¹³⁾, 2003년에는 전체 1,992억원의 시장 가운데 기능성 샴푸가 1,297억 규모의 시장을 형성, 전체 샴푸시장의 65.1%를 점유 하였다¹⁴⁾.

업계에 따르면 2009년 국내 샴푸 시장은 2,600억원대다(2006년 늘슨자료 기준). 이 가운데 고기능성 ‘슈퍼프리미엄’ 샴푸시장은 350억원의 규모로 전체의 14%를 차지하고 있다. 슈퍼프리미엄 샴푸시장은 2008년 104%의 성장률을 보이며 급성장하고 있다.¹⁵⁾

다. 기업동향

(1) 국외 생산업체 현황

□ 흑진주 보석 시장

흑진주는 주로 프랑스령 폴리네시아 군도의 타이티에서 양식되고, 현재 피지제도나 서사모아제도 일본남서제도, 파나마, 이란 등의 해역에서 양식되어지고 있지만 전세계 생산량의 90%를 타이티에서 공급하고 있어 붙여진 이름도 타이티 흑진주이다. 타이티 흑진주는 남양백진주의 10~20%정도의 시장을 형성하고 있다.

일본의 미키모토사는 Mikimoto Hakata Pearl Culturing사가 소유한 후쿠호카현 아이노시마 소재 농장에서 아코야 진주를 생산하고 있다. 미키모토사의 자회사인 Mikimoto Hakata Pearl Culturing사는 2007년 1월에 설립되었으며 설립 목적은 2000년에 아이노시마에서 발견된 천연 진주조개를 이용, 질병에 걸리지 않는 새로운 아코야 진주조개를 양식하는 것이다. 미키모토사의 연구소인 K. Mikimoto Pearl Research Laboratory는 Fukuoka Fisheries and Marine Technology Center, 규슈 대학교, Shingu Ainoshima Fisheries사의 소속 과학자들과 공동으로 아이노시마의 진주 양식 프로젝트를 진행한 결과, 높은 품질의 진주 양식에 성공하였다. 2010년의 생산 목표는 진주조개 5만 개 수확이며 앞으로 3년 후 수확량은 20만 개로 늘어날 것으로 예상하고 있다.

중국에서는 양식되는 진주의 종류는 해수 유핵 진주와 담수 유핵 진주, 그리고 담수 무핵 진주 3가지이다. 중국에서 해수진주가 생산되는 곳은 중국 남부의 광둥성, 광시성 및 하난도 지역의 연안지역이다. 1971년에 2.2톤이 생산되고, 1983년에 7톤, 1985년에 14톤을 거쳐 1989년에는 33톤이 생산되는 등 급속히 증가되었는데, 그 이후에 생산이 통제되어 급격한 증가는 멈추었고 2003년에는 35톤이 생산되었다. 광둥성의 리우샤(Liusha)에서 가 가운데 70%를 생산하고 광시성의 헤푸(Hepu)에서 27%를 생산한다. 담수진주의 생산은 1981년에 200톤이었고, 1983년에 300톤, 1986년에 700톤, 1998년에 1,000톤이 생산되었고,

13) ITOOZA(www.itooza.com), "LG 엘라스틴, "프리미엄 샴푸시장 평정한다", 2003.11.03

14) 장업신문, "샴푸시장규모 1992억원대", 2004.02.04

15) 아주경제(www.ajnews.co.kr), "LG생컨, 아모레, 애경 '3파전'...프리미엄 샴푸 경쟁 치열", 2009.07.02

2000년에 1,400톤, 그리고 2003년에는 1,600톤의 담수진주가 생산되었다. 이러한 담수진주는 중국의 여러 개 지역에서 생산되는 결과인데, 제장(Zhejiang)성에서 32%가 생산되고, 장수(Jiangsu)성에서 23%, 허난(Hunan)성에서 17%, 안후이(Anhui)성에서 13%, 허베이(Hubei)성에서 8%가 생산되고 장시(Jianxi) 성에서 7%가 생산되었다.¹⁶⁾

□ 기능성 샴푸시장

일본 샴푸 시장은 오랜 기간 카오(Kao)사의 아지엔스(Asience), 유니레버사의 렉스 그리고 P&G사의 팬틴이 지배해 왔으나, 시세이도사의 츠바키가 2006년에 출시되어 시장의 큰 변화가 있었다. 중국은 3대 샴푸생산업체인 Olive, SLEK 및 P&G가 광둥 지역에 집중되어 있다.

(2) 국내 생산업체 현황

□ 흑진주 보석 시장

국내에서는 1962년 일본산 진주조개를 수입하여 남해안에서 진주의 양식이 시도되었고, 1967년에는 6~7개 업체에서 본격적인 진주 양식을 시도하였으나 제반기술의 미흡으로 실패한 바, 한동안 진주 양식이 중단되었다가, 최근 진주양식 기술이 개발되어 몇몇 생산업체에서 진주양식이 활성화되고 있다.

장흥키조개영어조합법인은 흑점패(Pinctada Margaritifera)가 아닌, ‘키조개’를 모패로 하여 진주핵을 삽입하여 흑진주를 얻는 흑진주 양식기술을 개발하여 특허등록하였으며(등록특허 10-0595605), 태평양 연안에서 소량의 자연산에만 의존하고 있는 흑진주를 간단한 시설과 관리를 통하여 대량생산할 수 있는 길을 열었다. 상기 법인의 흑진주 양식방법은 주로 ‘개펄’에 직접 삽입하는 형태를 취함으로써 채롱 사용에 따른 경비의 추가 부담 및 양성 작업의 번거로움 등을 해소할 수 있는 시간적, 경제적 효과를 거둘 수 있다.

또한, 통영 진주사업단은 지역 연구기관과 어민, 지방자치단체들에 의해 2004년 결성되었으며, 산업자원부는 통영 진주양식을 지역혁신 특성화시범사업으로 선정하였다. 13개의 진주양식 농가를 합쳐 ‘통영진주영어조합’을 결성해 진주 원주 확보에 안정을 기하는 한편, 보석디자인 전문업체에 의뢰해 디자인이 가미된 다양한 진주제품 개발에 나서고 있다.

참고로, 2007년 기준 진주 수입 상위 30위 도소매업체를 살펴보면 아래 표와 같다.

16) 귀금속경제신문사(www.diamonds.co.kr), “중국에서는 어떤진주가 얼마나 양식될까?”, 2004.11.04

표 4-2-4 2007년 기준 진주 수입 상위 30위 도소매업체

	업체		업체		업체
1	(주)해양진주 도매	11	다인	21	성광진주 도매
2	제이앤제이 도매	12	바다진주	22	신믿음진주 도매
3	다음코리아 도매	13	펄랜드	23	동일상사 도매
4	(주)폴든듀 소매	14	(주)드림쥬얼리	24	로석
5	대광진주	15	해성진주상사	25	케이펄
6	월드진주 도매	16	샤론진주 도매	26	니드
7	대쉬트레이딩 도매	17	(주)삼광쥬얼리	27	일오삼 도매
8	성창비취	18	(주)미해진주	28	에이원진주 도매
9	펄스톤	19	(주)모아나	29	코베진주
10	(주)미해진주 도매	20	신진진주(주)	30	화창상사

자료: 관세청(www.customs.go.kr), 2007년 진주수입 통계 현황

□ 기능성 샴푸시장

(주)아모레퍼시픽의 모발제품 브랜드 ‘미장센’은 국내 처음으로 모발 제품에 ‘안티에이징(antiaging)’ 기능을 도입한 ‘블랙펄 헤어 안티에이징’ 라인을 2004년 6월에 출시했다. ‘미장센 블랙펄’ 라인에는 흑진주, 로열제리, 블루베리를 이용한 ‘헤어 안티에이징 복합성분’이 들어 있어 모발의 윤기, 보습력, 탄력을 높여준다. 특히 타히티산 흑진주에서 얻은 고밀도 단백질 성분은 자외선으로 인한 모발 변색 및 손상을 예방하는 데 효과적이다.¹⁷⁾

LG 생활건강은 흑진주 샴푸 ‘더블리치 블랙레시피’ 출시하였다. ‘더블리치 블랙레시피’ 샴푸에는 남태평양 폴리네시아에서만 서식하는 흑점패라는 조개에서만 나는 흑진주를 실제로 갈아 녹인 추출물이 들어있는 제품이다.¹⁸⁾ 또한, 2009년 3월 동양인의 머릿결을 위한 한방 헤어케어 제품인 “리엔 한방 헤어로스컨트롤 자하진”을 출시하였다.

애경은 모발 끊어짐, 가라짐, 푸석함으로 손상된 부위를 집중 보수해주는 기능성 샴푸인 ‘케라시스 살롱케어’와 두피 트러블, 머리빠짐, 두피 스트레스 등을 해결할 수 있도록 처방된 탈모방지샴푸 “에스파르”를 출시하였다.

라. 수요예측

(1) 시장예측

□ 흑진주 보석 시장

국내 진주수입 연도별 통계는 아래와 같다.

17) 매일경제, [새상품] 모발 노화방지 샴푸 '미장센 블랙펄', 2008.04.23

18) LG생활건강 사이트(<http://doublerich.co.kr/>)

표 4-2-5 국내 진주 수입 연도별 통계

연도	국내 진주 수입 (천 달러)	평균환율 (원)	국내 진주 시장 규모 (억 원)	국내 흑진주 시장 규모 예측 (억 원)
2000	10,496,000	1,130.61	118.7	17.8
2001	10,990,000	1,290.83	141.9	21.3
2002	14,811,000	1,251.24	185.3	27.8
2003	11,905,000	1,191.7	141.9	21.3
2004	10,526,000	1,145.31	120.6	18.1
2005	9,943,000	1,024.24	101.8	15.3
2006	9,156,000	956.11	87.5	13.1
2007	6,917,000	929.2	64.3	9.6
2008	6,740,500	1,102.59	74.3	11.1
2009	6,100,000	1276.4	77.9	11.7

자료: 관세청(www.customs.go.kr), 진주수입 통계

국내 흑진주 시장 규모는 국내 진주 시장 규모의 약 15% 정도에 해당되므로, 상기 표와 같이 예측할 수 있다. 진주에 대한 수요와 공급이 유사한 추이를 보인다고 가정하에, 상기 10년간의 통계자료를 근거로 국내 진주 시장의 연평균 성장률(CAGR)을 살펴보면 약 -4.6%로 계속 감소하고 있다. 그러나, 평가대상기술인 흑진주 생산 기술을 통하여 흑진주를 저렴한 가격으로 국내시장에 공급할 수 있어 막대한 수입대체효과가 예상되며, 후술하는 기능성 샴푸 시장에서도 흑진주가 모발 노화 방지 용도로서 소비자들에 각광받고 있는 점을 고려할 때 향후 국내 흑진주 시장은 적어도 기능성 샴푸 시장의 성장률인 10% 이상으로 성장할 것으로 예측할 수 있다.

□ 기능성 샴푸 시장

흑진주는 모발노화방지 효과가 있어 기능성(프리미엄) 샴푸에도 이용되고 있다. 따라서, 연도별 프리미엄 샴푸시장 규모를 살펴보면 2002년 1,000억원, 2003년 1,297억원, 2004년에 1,800억 원이었다(자료: www.itooza.com; 네이버 [산업/기업] 04/01/2006)

한편, 기능성(프리미엄) 샴푸 시장에 이어 두피케어 샴푸시장도 생활용품 업체들 간의 마케팅 강화로 치열하게 경쟁하고 있다. 국내 두피시장을 살펴보면 아래와 같다.

두피시장 현황 (단위:억원)

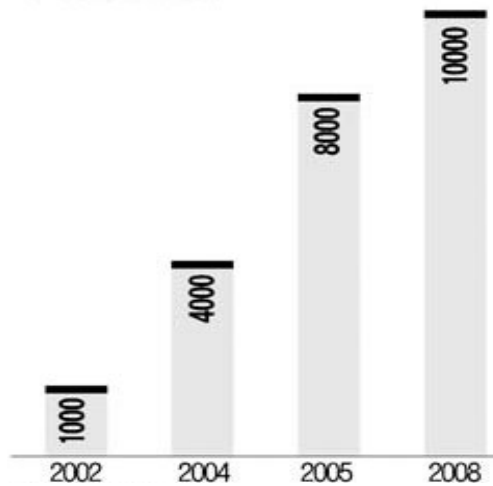


그림 4-2-4 국내 두피 시장 현황

자료: 한국두피관리협회의

업계에 따르면, 두피케어 시장은 20%대의 고성장률을 보이는 반면, 기능성(프리미엄) 샴푸 시장은 10%의 성장률을 보인다고 보고하였다¹⁹⁾. 따라서, 상기 업계 보고에 따라 국내 기능성 샴푸 시장은 적어도 연평균 성장률(CAGR) 약 10%로 지속적으로 증가할 것으로 예측할 수 있다.

(1) 흑진주

그러므로 국내 흑진주 시장은 상술한 바와 같이 적어도 기능성 샴푸 시장의 성장률인 10% 이상으로 성장할 것으로 예측되는 바, 통상적인 매출액 추정의 보수적 관점에서 연평균성장률(CAGR) 10%로 성장할 것으로 추정할 수 있다. 현재 대상기술을 보유하고 있는 주체는 ‘한국해양연구원’이나, 대상기술을 자체적으로 또는 다른 기업과 공동으로 사업화하여 생산, 판매하고 있는 상태가 아니므로, 흑진주 양식을 주업종으로 하는 유사 업종기업들의 흑진주 매출자료를 토대로 매출액을 추정할 수 있다. 그러나, 국내에서 흑진주 시장은 거의 수입에 의존하고 있기 때문에, 흑진주 양식을 주업종으로 하는 유사기업이 거의 조사되지 않을 뿐더러, 객관적인 매출자료의 확보가 어렵다.

이에 따라, 평가대상기업이 2010년부터 사업화를 시작하여 2011년부터 흑진주를 판매하기 시작한다고 가정하고, 대부분 수입에 의존하고 있는 국내 흑진주 시장에서 평가대상기술을 이용하는 경우 막대한 수입 대체 효과가 예상되므로 생산판매 초기년도에 국내 흑진주 시장의 약 10%를 점유하는 것으로 가정하여 매출액을 추정하였다.

국내 흑진주 시장의 연평균 성장률(CAGR) 10% 및 상기 시장규모에서의 추정 점유율 10%를 토대로 평가대상기술의 추정 기술수명인 14년 동안 평가대상기술 보유 기업이 달성가능한 매출액을 추정하였다.

19) 장업신문, “프리미엄 두피케어 샴푸시장 격전”, 2006.02.08

그 결과, 평가대상기술 보유기업은 아래 표와 같이 2011년 1.4억원, 2012년 1.6억원, 2013년 1.7억원, 2014년 1.9억원, 2015년 2.1억원, 2016년 2.3억원, 2017년 2.8억원, 2019년 3.0억원, 2020년 3.3억원, 2021년 3.7억원, 2022년 4.0억원, 2023년 4.4억원, 2024년 4.9억원의 매출에 기여할 수 있는 기술 수준으로 추정되었다.

표 4-2-6 평가대상기술 보유 기업의 매출액 추정

(단위: 억원)

구분	2011년	2012년	2013년	2014년	2015년	2016년	2017년
매출액	1.4	1.6	1.7	1.9	2.1	2.3	2.5
구분	2018년	2019년	2020년	2021년	2022년	2023년	2024년
매출액	2.8	3.0	3.3	3.7	4.0	4.4	4.9

(2) 흑진주를 이용한 기능성 샴푸

국내 기능성(프리미엄) 샴푸 시장의 연평균성장율(CAGR) 10% 및 하기의 유사업종기업의 평가대상기술 관련 매출자료를 토대로 평가대상기술 보유기업이 달성 가능한 매출액을 추정하였다.

현재 평가대상기술을 보유하고 있는 주체는 ‘한국해양연구원’이나, 대상기술을 자체적으로 또는 다른 기업과 공동으로 사업화하여 생산, 판매하고 있는 상태가 아니므로, 흑진주의 모발 노화방지 용도를 프리미엄 샴푸로 상품화한 유사업종기업의 매출자료를 토대로 매출액을 추정하였다.

본 평가에서는 평가대상기술의 이전을 통한 사업화가능성을 고려하고 평가대상기업과 비교 가능한 매출규모, 영업능력, 종업원 수 등을 감안하여 국내 업체 중 「아모레퍼시픽」을 평가대상기업의 유사기업으로 선정하였고, 흑진주를 이용한 ‘미장센 펠샤이닝 샴푸’의 생산판매 초기년도 매출액을 조사하여 이를 평가대상기술 보유기업의 추정 매출액으로 사용하였다.

아모레 퍼시픽은 ‘미장센 펠샤이닝 샴푸’를 2004년 6월에 출시하였고, 출시 3개월만에 약 100억원의 매출을 올렸고, 제품 출시 1년만에 300억을 매출액을 기록한 것으로 조사되었다²⁰⁾.

평가대상기업의 유사기업으로 선정된 「아모레 퍼시픽」의 ‘미장센 펠샤이닝 샴푸’에 대한 2004년 하반기와 2005년 상반기의 매출액을 초기 1차년도 300억 원 매출액으로 보고, 이를 하기 표에 정리하였다.

국내 기능성 샴푸 시장의 연평균 성장률(CAGR) 약 10% 및 상기 유사기업의 매출자

20) 코스메틱 매니아 뉴스, 2009.08.24

료를 토대로 평가대상기술의 추정 기술수명인 11년 동안 평가대상기술 보유 기업이 달성 가능한 매출액을 추정하였다.

그 결과, 평가대상기술 보유기업은 아래 표와 같이 2011년 300.0억원, 2012년 330.0억원, 2013년 363.0억원, 2014년 399.3억원, 2015년 439.2억원, 2016년 483.2억원, 2017년 531.5억원, 2018년 584.6억원, 2019년 643.1억원, 2020년 707.4억원, 2021년 778.1억원의 매출을 달성할 수 있을 것으로 추정되었다.

표 4-2-7 평가대상기술 보유 기업의 매출액 추정

(단위: 억원)

구분	2011년	2012년	2013년	2014년	2015년	2016년
매출액	300.0	330.0	363.0	399.3	439.2	483.2
구분	2017년	2018년	2019년	2020년	2021년	
매출액	531.5	584.6	643.1	707.4	778.1	

2. 종합적인 관련 분야와의 경제적 기여도 분석

우리가 개발한 기술은 흑진주 양식 기술로서, 평가대상기술이 적용될 수 있는 시장은 i) 흑진주 보석 시장 및 ii) 흑진주의 “모발 노화방지” 용도와 관련된 ‘기능성 샴푸 시장’을 고려할 수 있다.

국내 흑진주 시장의 연평균 성장률(CAGR) 약 10% 및 상기 시장규모에서의 추정 점유율 10%를 토대로 평가대상기술의 추정 기술수명인 14년 동안 평가대상기술 보유 기업이 달성가능한 매출액을 추정한 결과, 2011년 1.4억원, 2012년 1.6억원, 2013년 1.7억원, 2014년 1.9억원, 2015년 2.1억원, 2016년 2.3억원, 2017년 2.8억원, 2019년 3.0억원, 2020년 3.3억원, 2021년 3.7억원, 2022년 4.0억원, 2023년 4.4억원, 2024년 4.9억원의 매출을 달성할 수 있을 것으로 추정되었다.

또한, 국내 기능성 샴푸 시장의 연평균 성장률(CAGR) 약 10% 및 유사기업의 매출자료를 토대로 평가대상기술의 추정 기술수명인 11년 동안 평가대상기술 보유 기업이 달성 가능한 매출액을 추정한 결과, 2011년 300.0억원, 2012년 330.0억원, 2013년 363.0억원, 2014년 399.3억원, 2015년 439.2억원, 2016년 483.2억원, 2017년 531.5억원, 2018년 584.6억원, 2019년 643.1억원, 2020년 707.4억원, 2021년 778.1억원의 매출을 달성할 수 있을 것으로 추정되었다.

제 5 장

Korea Ocean Research & Development Institute



연구개발 결과 활용 계획



흑진주 양식 산업의 특성을 살펴보면 양식진주 중에서 가장 가격이 비싼 흑진주는 흑진주조개에서만 생산되는 것으로, 상기 흑진주의 양식이 가장 활발한 곳은 불령 폴리네시아에 속하는 타이티로 전세계 흑진주 생산량의 90% 이상을 생산하고 있으며, 상기 흑진주 조개는 캘리포니아만에서 지중해 동부에 이르기까지 널리 분포하며 서식수온의 범위는 19~32℃ 범위로 불령 폴리네시아 동부의 투아마투 환초에서 쿡제도 사이의 열대 태평양에서 많이 어획되고, 호주의 북부와 동북부, 인도네시아 아루 열도, 파푸아뉴기니 및 중국의 해남도 등지에 분포하는 것이다.

그러나 다른 열대성 해양동물이 주어진 범위 내에서 비교적 고르게 분포하지만, 이에 반하여 상기 흑진주조개는 특정해역의 특정 저질에 소규모로 개체군을 이루어 서식하고 있어 자원개발이 어렵다는 문제가 있고, 이에 따라 흑진주 조개의 종묘생산연구가 1970 년대에 시작되었으며, 최근 부족한 흑진주조개를 확보하기 위하여 인공종묘생산 연구가 호주, 불령 폴리네시아, 쿡 제도 등에서 활발하게 진행 되고 있지만 아직 대량생산에는 이르지 못하고 실험실 수준에 머물고 있는 실정이다.

즉, 흑진주양식업은 현재까지 알려진 양식업을 포함한 모든 수산업 중 가장 부가가치가 높은 산업으로서, 최근의 흑진주 양식 산업은 자연산 흑진주조개의 자원남획으로 양식에 필요한 충분한 모패를 확보하지 못할 뿐만 아니라 구입단가 또한 상승하여 여러 어려움이 가중되고 있는 실정이다.

이 연구에서 이뤄진 흑진주조개 모패의 건강 증진 프로그램과 대량 양식을 위한 전초 연구는 향후 남태평양에서 흑진주를 생산할 수 있는 기본적인 모델이 될 것으로 판단되며, 모패 뿐만 아니라 유생의 관리까지도 매우 중요한 기술의 한 분야라 향후 산업적인 파급효과가 클 것으로 판단된다.

열대지역에 서식하는 흑진주조개는 일반적으로 연중 산란하는 이매패류로 알려져 있으며, 여러번 산란이 일어나는 만큼 양질의 배우체를 산란하는 시기가 언제인지 조사가 이루어져야 할 것이다. 이 연구에서 흑진주조개의 연간 번식주기 분석은 이루어지지 않았으므로 개발된 흑진주조개 알과 정자 단백질 특이적인 항체를 이용한 연간 번식량 측정이 필요 할 것으로 사료되며, 이와 더불어 연중 흑진주조개 배우체의 생화학적 분석을 진행하여 정량적인 측면과 정성적인 측면이 동시에 이루어져야 할 것으로 사료된다. 이는 양질의 배우체에 의해 수정된 치패가 보다 건강한 모패가 될 수 있기 때문에 이 연구 수행 기간 동안 실시되었던 생화학적 조성분 분석법과 함께 개발된 항체를 이용해 모패의 연간 번식 주기를 파악한다면, 양질의 배우체를 산란하는 시기를 정확히 파악 할 수 있을 것으로 기대된다.

또한 개발된 흑진주조개 난. 정자 단백질 특이적인 항체는 번식량 측정뿐만 아니라 배우자형성과정, 즉, 난황단백질 (vitellin) 혹은 그 전구물질 (vitellogenin) 혹은 정자형성과정에 대한 연구에 관련하여 western blotting, ELISA, Immunofluorescence 등 항원-항체 반응을

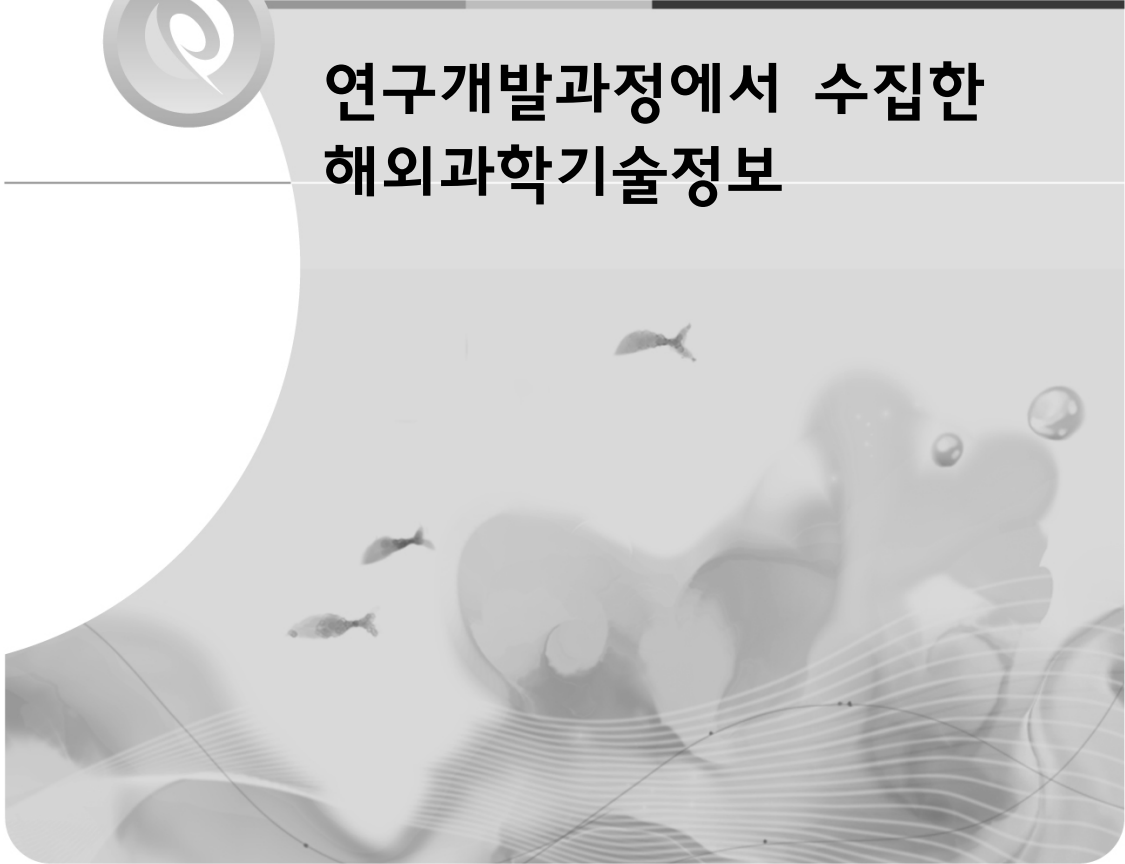
이용하는 면역학적 기술에 필수적인 요소로써 항체의 활용도 및 기여도가 중요하다고 할 수 있다. 마지막으로 기생충 등 질병 감염 유무 조사 데이터는 효과적인 흑진주조개 모패 관리에 중요한 기초 자료로 사용될 것이라 기대 된다.

제 6 장

Korea Ocean Research & Development Institute

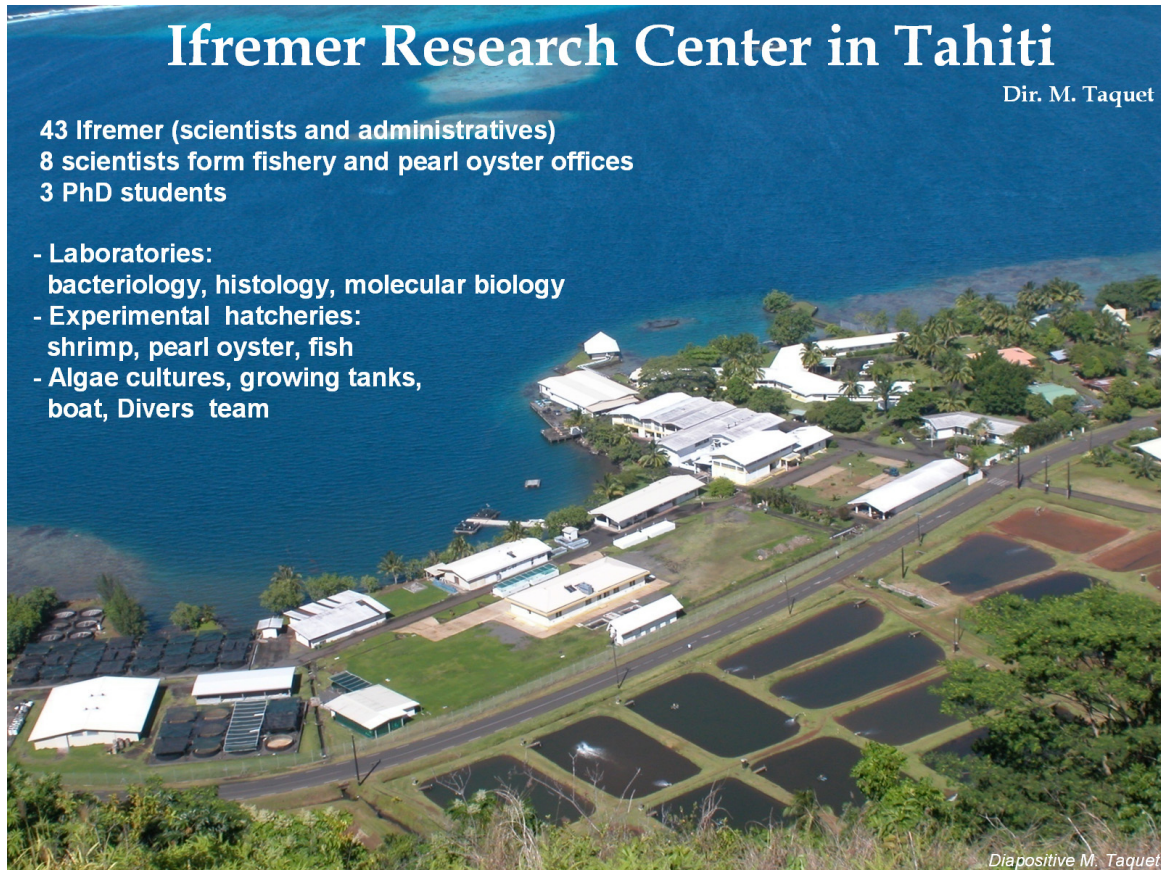


연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보



제1절 폴리네시아 프랑스해양연구소(IFREMER)

연구 수행 기간 동안 본 연구팀은 French polynesia Tahiti에 위치한 IFREMER에 방문하여 흑진주조개 모패 및 치패 관리 시설을 견학 하였다.



French polynesia Tahiti에 위치한 IFREMER는 약 30여명의 연구진과 운영진이 무척추 동물인 흑진주 및 새우와 어류의 생리 및 양식에 대한 연구를 수행하고 있다. 이곳에서는 타히티 수산국에서 연구비를 수주하여 흑진주 생산의 질과 양을 결정할 수 있을 만한 기술들을 개발하고, 개발된 기술의 현장 적용성까지 연구하고 있었다.

타히티의 흑진주 사업은 2001년부터 흑진주의 질이 나빠지는 환경이 조성되어 지진 하였으나, 폴리네시아 해양산업의 근간을 이루고 있으며, 그 규모로는 460개의 생산회사에 5,000여명이 근무하고 있으며, 2008년에 1억 유로의 수출고를 올렸다.

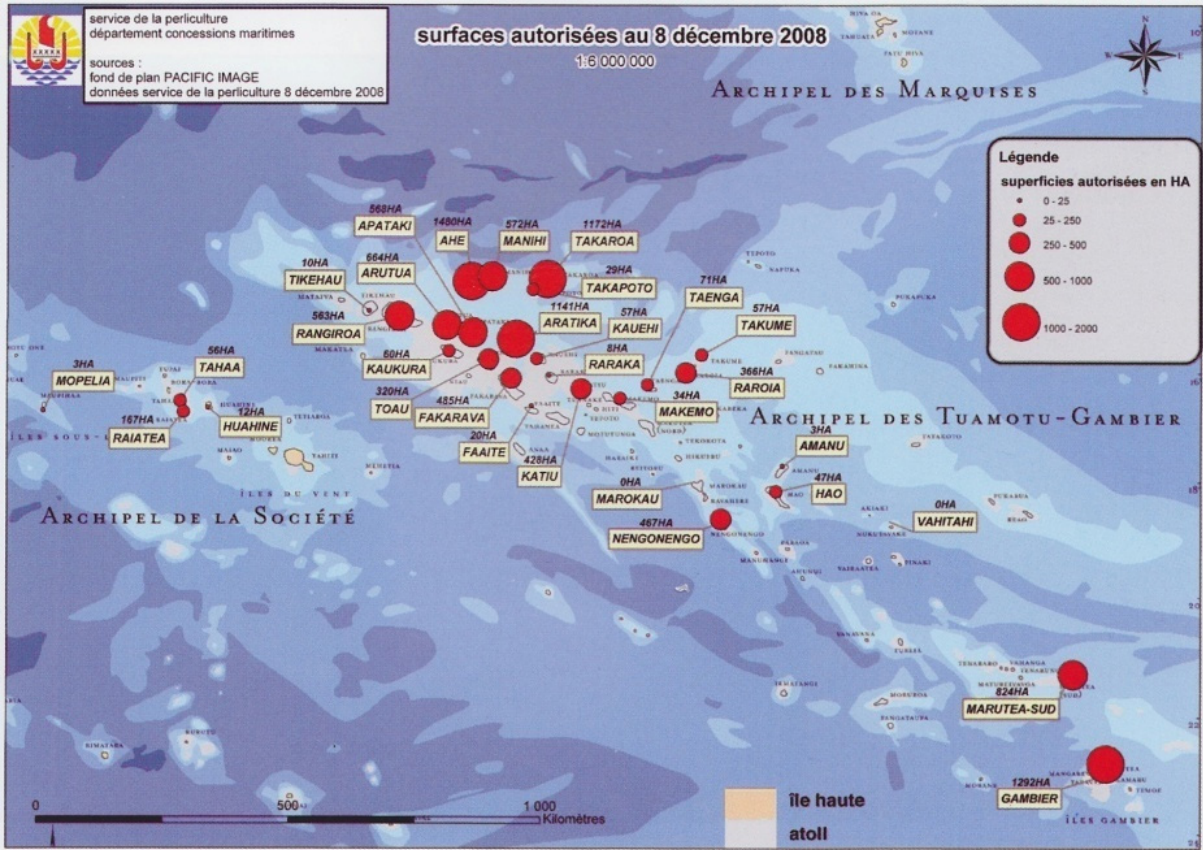
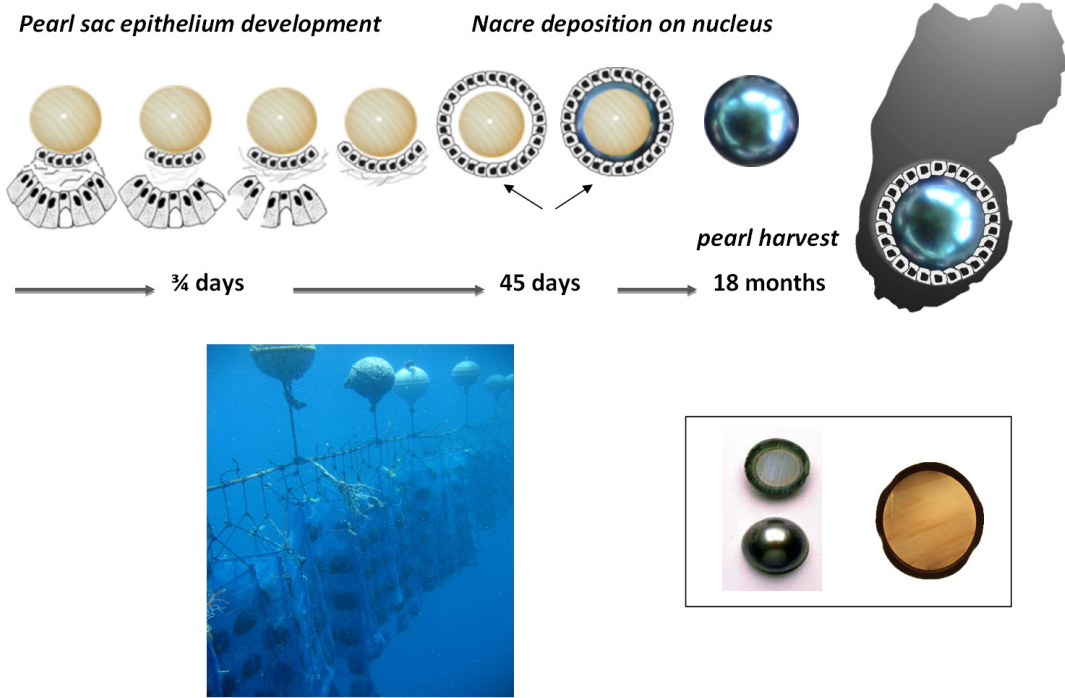


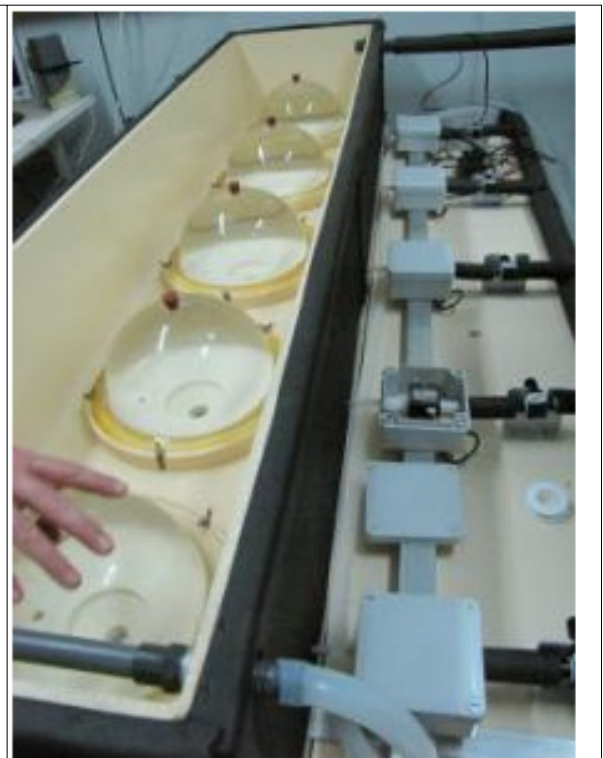
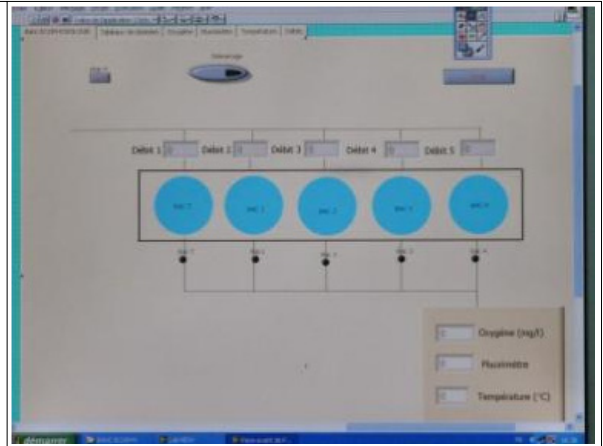
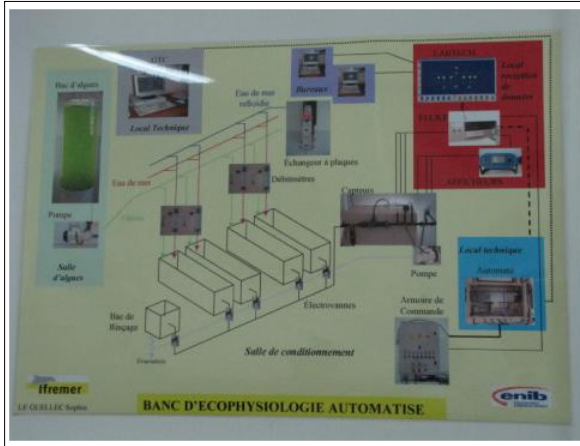
Schéma : C. Montagnani



ICES 2010, Nantes

Tahiti IFREMER 연구소에서는 보다 효율적인 치패 관리를 위해서 자동화 프로그램을 사용하고 있었고, 이러한 컴퓨터 프로그램은 치패 사육에 필요한 용존산소, pH, 먹이 공

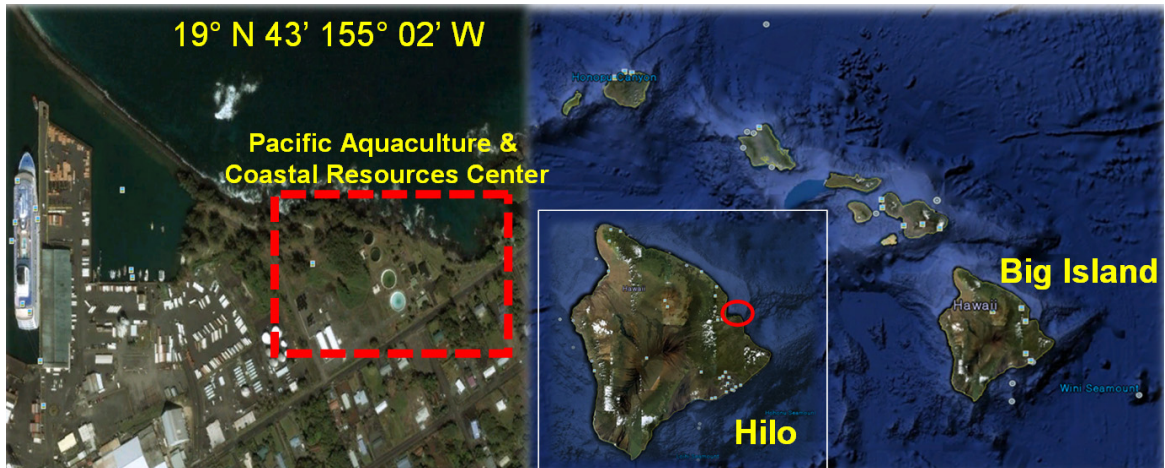
급량 등 모든 요건을 한 대의 컴퓨터에 의해서 조절하여 실시간으로 모니터링 할 수 있는 기술을 이용하고 있었다. 또한 양질의 흑진주 생산을 위해 생산되는 흑진주의 모양, 색깔 등을 단계별 등급을 나누었으며, 최고 등급의 흑진주를 생산한 모패의 유전학적 정보를 찾아내고, 선발 육종 해 봄으로써 흑진주의 질을 높이기 위한 노력을 하고 있었다.



제2절 하와이 태평양연안자원센터(PACRC)

1. 위치

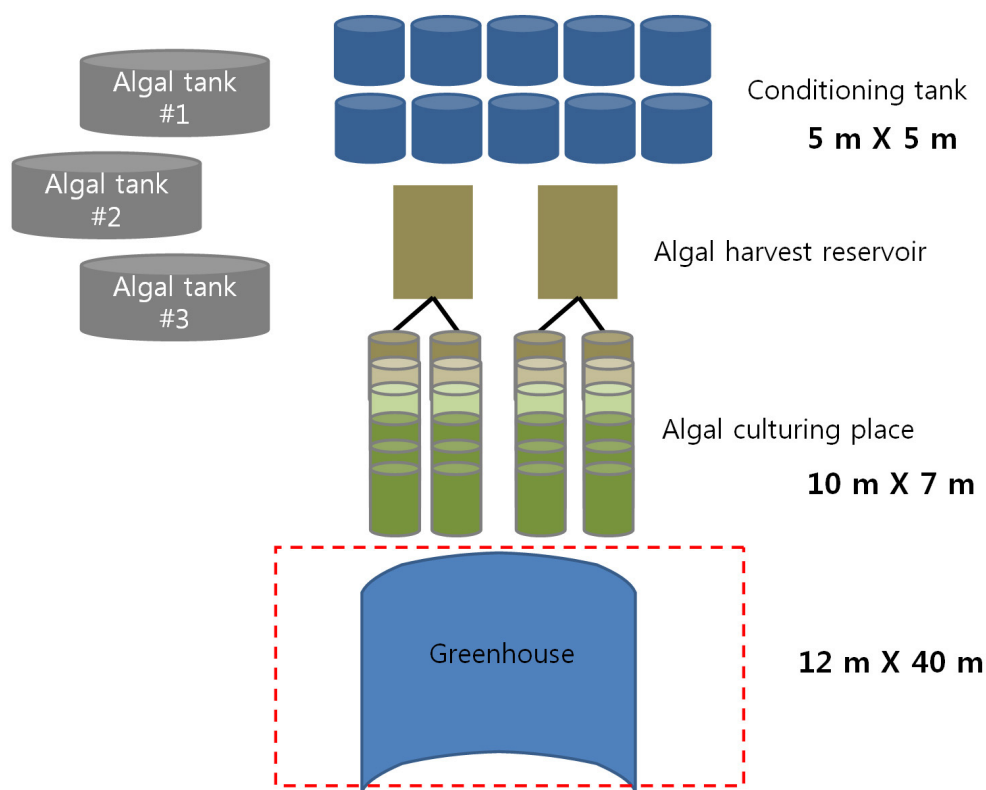
하와이 태평양연안자원센터(Pacific Aquaculture & Coastal Resources Center)는 하와이의 8개의 섬 중에 가장 큰 Big Island의 Hilo지역에 위치하고 있다.



Pacific Aquaculture & Coastal Resources Center의 면적은 다음과 같고, 그 중 이매패류 양식장의 면적은 일부이다.



연구소 항공사진에서 보이는 백색 하우스는 전체적인 이매패류 배양장의 모습을 나타내는 것으로, 이곳은 크게 3군데로 나뉘어져 있는데 치패를 양성하는 Greenhouse와 Plankton culturing area, conditioning area로 나뉘어져 있다.

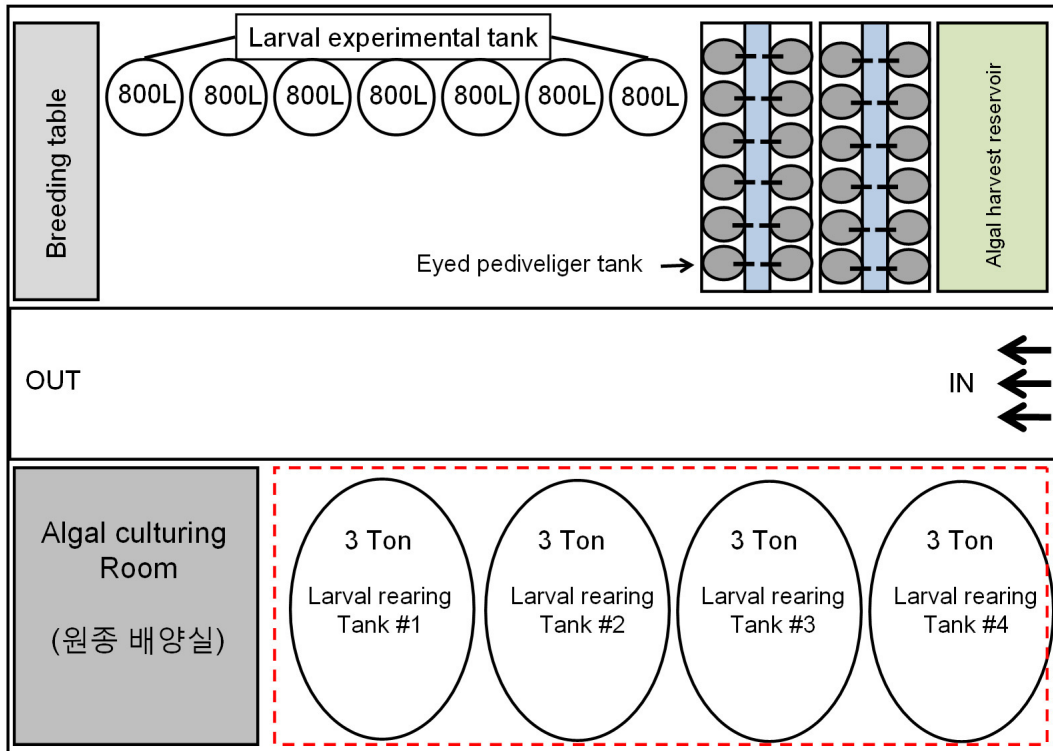


이 중 그린하우스에는 아래와 같은 구조의 배양장 구조 및 설계 부분을 나타낸다. 도면에서 보듯이 이곳에는 3 ton급 Larval rearing tank 4와 Plankton 원종배양실이 왼쪽 편에 자리하고 있으며, 오른쪽 편에는 Eyed pediveliger tank와 800L 급 실험용 Larval rearing tank가 자리하고 있다.

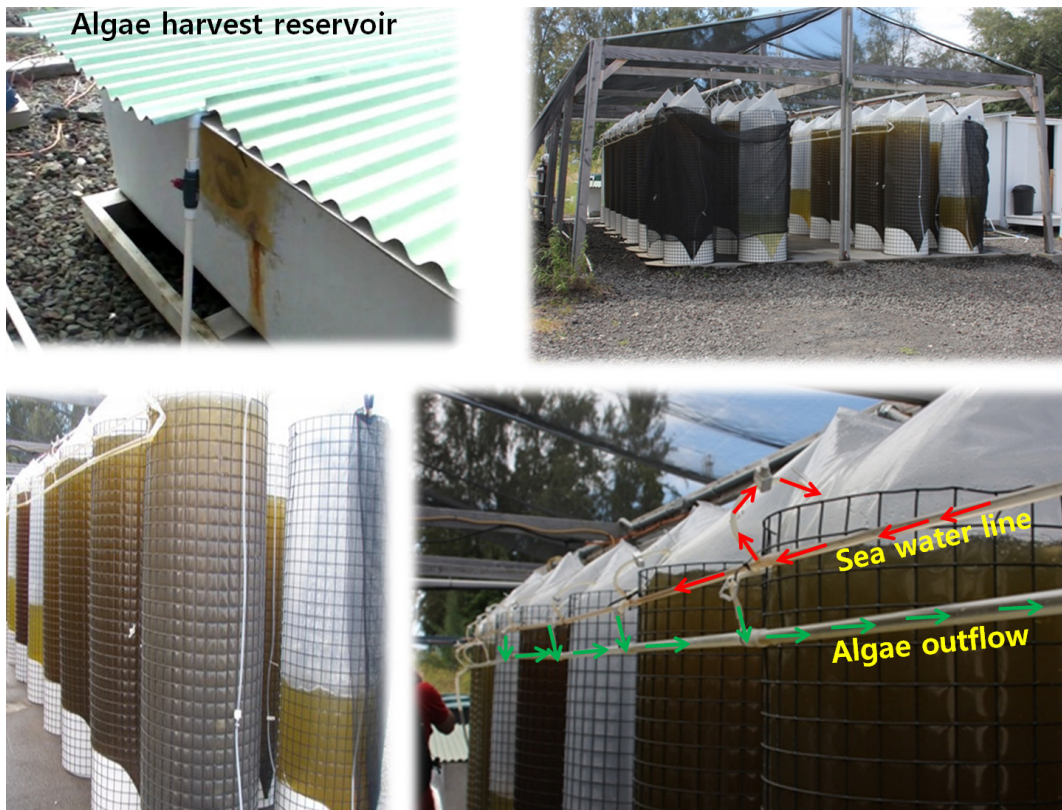
3톤급 Larval rearing tank에는 banjo filter를 사용하여 유생들이 빠져나가지 못하는 사이즈로 제작되었고, 유생들이 성장함에 따라 사이즈가 다른 banjo filter로 교체 하게 된다. 해수 공급장치와 먹이 공급 밸브가 따로 분리되어 있다.

800리터급 Larval experimental tank에는 Down welling system으로 제작되어 있고, 유량계를 설치하여 유입되는 해수의 양을 일정하게 조절하기 위하여 설치되어 있고, 수용량은 600L로 이곳에서도 Larval rearing를 실시하지만 3 ton 탱크보다 생존율이 떨어지는 경향이 있어 이곳에서는 실험용으로만 사용한다.

Eyed pediveliger tank는 Up welling system으로 제작되어 있었으며, 긴 직사각형 수조에 원형 수조가 결합되어 있는 형태를 보였다. 이곳에서는 pediveliger 단계까지 성장시키는 곳인데 이곳에서는 pediveliger단계 까지만 양성을 한다.



흑진주 유생을 성장시키기 위한 장치로서 미세조류를 성장시키는 챔버가 중요한데, 이 연구소에서는 투명 플라스틱백을 이용하여 먹이생물을 배양하고 있었다.



먹이생물은 총 4종을 양성을 하고 있었으며, *Isochrysis*, *Tetraselmis*, *Pavlova*, 외 1종을 추가적으로 배양한다. 플라tm틱 비닐팩을 이용하여 양성하고 있었으며, 일정양의 해수 및 Nutrients를 계속하여 공급하고 있었으며, 흐린 날씨가 많은 Hilo지역의 특성상 중간 곳곳에 형광등을 설치하여 흐린날에도 광합성을 할 수 있도록 유도한다. 수표면 부근에 밸브를 연결하여 약 100만~200만 cell의 plankton이 각 밸브를 통하여 Algae harvest reservoir에 모이게 되고, 이후 일정량을 Larval rearing tank 에 공급한다.

제 7 장

Korea Ocean Research & Development Institute



참 고 문 헌



참 고 문 헌

- Alagarawami, K., Dharmaraj, S., Chellam, A. and Velayudhan, T.S., 1989. Larval and Juvenile Rearing of Black-Lip Pearl Oyster *Pinctada margaritifera* (Linnaeus). *Aquaculture*, 76:43-56.
- Alagarawami, K., Dharmaraj, S., Velayudhan, T.S. and Chellam, A., 1987. Hatchery technology for pearl oyster production. *Bull. Cent. Mar. Fish. Res. Inbst., Cochin, India*, 39:62-71.
- Alagarawami, K., Dharmaraj, S., Velayudhan, T.S., Chellam, A., Victor, A.C.C. and Gandhi, A.D., 1983. Larval rearing and production of spat of pearl oyster *Pinctada fucata* (Gould). *Aquaculture*, 34:287-301.
- Allen, S.K. (2000) Research and Development on *Suminoegaki*, *Crassostrea ariakensis*, for Aquaculture in Virginia, and Other Activities with Non-natives. *J shellfish Res* 1, p. 612.
- Allen, S.K., A. Erskine, E. Walker, R. Zebal and G. Debrosse. (2003) Production of Triploid Sumioe oysters *C. ariakensis* *J shellfish Res* 22, p. 317.
- An, Y.K., Yoon, H.S. and Choi, S.D. (2006) Effects of Temperature, Salinity on the Growth of *Crassostrea ariakensis* in Seomjin River, *Korean Journal of Environmental Biology*, 24(1): 60-66.
- AQUACOP, 1982. Country Reports: French Polynesia. In: F.B. Davy and M. Graham (Editors), *Bivalve Culture in Asia and the Pacific*. IDRC, Ottawa, Ont., pp.31-33.
- Audemard, C., R. Carnegie, N. Stockes, E. Burreson and M. Bishop. (2003) Salinity effects on the susceptibility to and persistence of *Bonamia ostreae* and *Bonamia* sp in *Crassostrea ariakensis* *J shellfish Res* 24, p. 639.
- Calvo, G.W. et al. (2001) A Comparative Field Study of *Crassostrea ariakensis*(Fujita 1913) and *Crassostrea virginica* (Gmelin 1791) in Relation to Salinity in Virginia *J shellfish Res* 20, 221-229.
- Choi, K.-S., Lewis D.H., Powell E.N., Ray, S.M., (1993) Quantitative measurement of reproductive output in the American oysters, *Crassostrea virginica*, using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Aquaculture and fisheriesmanagement* 24: 375-398.
- Choi, K.-S., Park, K.-I. (1998) Quantitative evaluation of *Perkinsus* sp, a protozoan parasite

- found in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. In: Kwon HB, Joss JMP and Ishii S eds, Recent progress in molecular and comparative endocrinology, Hanrimwon Publishing Company, Seoul, pp. 489-497.
- Choi, K.-S., Park, K.-I. (2001) Histopathology and Spatial Distribution of the Protozoan Parasite, *Perkinsus* sp. Found in the Manila Clam *Ruditapes philippinarum* Distributed in Jeju, Korea. Korean J. Environ. Biol. (in press).
- Choi, K.-S. (1992) A study on the reproduction of oysters, *Crassostrea virginica* (Pelecypoda: Mollusca) in the Galveston Bay area, Texas using immunological techniques. Doctor of Philosophy Dissertation
- Choi, K.-S., Powell E.N. (1993) Development of an immunological probe for quantification of oyster gonad. In: Lauenstein GG and Cantilo AY (eds), Comprehensive descriptions of complementary measurements. Sampling and analytical methods of the national status and trends program national benthic surveillance and mussel watch projects vol II. NOAA technical memorandum NOSORCA71 p. II.85 - II.102.
- Clarke, K.R. & R.M. Warwick. 2001. Change in marine communities: An approach to analysis and interpretation 2nd edition. PRIMER-E, Plymouth. 198pp
- Cochennec, N. et al. (1998) *Bonamia*-like Parasite Found in the Suminoe Oyster *Crassostrea rivularis*. Reared in France Diseases of aquatic Organisms 34, 193-197.
- Coeroli, M., De Gaillande, D., Landret, J.P. and Coatanea, D., 1984. Recent innovations in cultivation of molluscs in French Polynesia. Aquaculture, 39: 45-67.
- Cole, T.G., Katherine, C.E. & Nora N.D. 1999. Structure of mangrove trees and forests Micronesia. Forest Ecol. and Manag. 117:95-109.
- Cordes, J.F. and K.S. Reece. (2005) Phylogenetics and species identification of *Crassostrea* oysters based on sequences and PCR-RFLP analyses of ITS- and COI markers. J shellfish Res 24, p. 647.
- De Pauw, N. and G. Persoone, 1988. Microalgae for aquaculture. (in) Borowitzka, M. A. and L. J. Borowitzka (eds.). Microalgal biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 197-221.
- Donaldson, J., 1991. Commercial production of microalgae at coast Oyster company. (in) Fulks, W. and K. L. Main (eds.) Proceedings of US-Asia Workshop on Rotifer and Microalgae Culture, Honolulu, Hawaii. The Oceanic Institute, HI, USA, pp. 229-236.

- Erskine, A.J. and S.K. Allen, Jr. (2003) Histological Examination of Gametogenesis in Genetic Triploid *Crassostrea ariakensis* in Chesapeake Bay. J shellfish Res 22, p. 328.
- Farias, A., I. Uriarte and J. C. Castilla, 1998. A biochemical study of the larval and postlarval stages of the Chilean scallop *Aropecten purpuratus*. Aquaculture, 166, 37-47.
- Friedman, K.J. & J.D. Bell. 1996. Effects of different substrata and protective mesh bagson collection of spat of the pearl oysters, *Pinctada margaritifera* (Linnaeus, 1758) and *Pinctada maculata* (Gould, 1850). J. Shellfish Res. 15: 535-541.
- Foighil, D.O., Taylor, D.J. (2000) Evolution of Parental Care and Ovulation Behavior in Oysters. Molecular Phylogenetics and Evolution 15, 301-313.
- Friedman, K. J. & J. D. Bell. 1999. Variation in abundance of blacklip oyster (*Pinctada margaritifera*) spat from inshore and off shore reefs in Solomon Island. Aquaculture 178: 273-291.
- Gallager, S. M. and R. Mann, 1986. Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Crassostrea virginica* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. Aquaculture, 56, 105-121.
- Garcia-Esquivel, Z., V. Monica Bricelj and M. A. Gonzalez-Gomez, 2001. Physiological basis for energy demands and early postlarval mortality in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 263, 77-103.
- Gervis M. H. & N. A. Sims. 1992. The biology and culture of pearl oysters (Bivalvia: ICLAM Stud. Rev. 21. 49pp. Manila, Philippines
- Grabowski, Jonathan K., Sean P. Powers, Charles H. Peterson. (2005) Growth and survivorship of non native (*Crassostrea gigas* and *Crassostrea ariakensis*) versus native eastern (*Crassostrea virginica*) oysters. J shellfish Res 24, p. 322.
- Haws H. and S. Ellis, 2000. Collectiing black-lip pearl oyster spat. Center for tropical and subtropical aquaculture publication 144: 1- 8.
- Hudson, K.L., A. Kozlowski, A.J. Erskine, S.K. Alien. (2005) Comparative field trials of triploid *Crassostrea ariakensis* with *C. virginica* at eight field sites in the Chesapeake Bay: Growth, mortality, condition, reversion and gametogenesis. J shellfish Res 24, 325-659.
- Intes, A., P. Laboute & M. Coeroli. 1986. Le stock naturel de nacre (*Pinctada* L.) dans l'atoll de Scilly (Archipel de la Societe, Polynesie Francaise). ORSTOM 31: 1-38.
- Joo, H.S. (2006) Studies on the Reproductive Cycle of Asian Oyster, *Crassostrea*

- ariakensis in Seomjin River. 50pp. M.S. Thesis, Yosu National University, Yosu [in Korean] .
- Kang, D.-H, S.-J. Kim, K.-S. Choi. (2004) Microscopic Observation of Larval *Ostrea circumpicta* (Bivalve: Ostreidae) in the Brood Chamber Collected from Jeju Korea. *J shellfish Res* 23: 411-415.
- Kang, S.-G, K.-S. Choi., Bulgakov, A.A., Kim, Y., Kim, S.-Y. (2003) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) used in quantification of reproductive output in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Korea. *J Experimental Marine Biology and Ecology* 282, 1-21.
- Kang, Y.-S., Y.-M. Kim, K.-I. Park, S. Kim, K.-S. Choi, M. Cho. (2006) Analysis of EST and lectin expressions in hemocytes of Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) (Bivalvia: Mollusca) infected with *Perkinsus olseni*. *Developmental and Comparative Immunology* 30: 1119-1131.
- Kimani e . and K.M.Mavuti, 2002. Abundance and population structure of blacklip pearl oyster *Pinctada Margaritifera*, in coastal Kenya. *Western Indian Ocean J.Mar. Sci.*, 1(2): 169-179.
- KORDI. 1999. A feasibility study on the marine resources development in the south-west Pacific region. BSPM99042-00-1204-7. Seoul, Korea. 461pp.
- Lam, K., Morton, B. (2004) The Oysters of Hongkong (Bivalve: Ostreidae and Gryphaeidae). *The Raffles bulletin of Zoology* 52, 11-28.
- Langdon, C.J., Robinson, A>M. (1996) Aquaculture potential of the Suminoe oyster (*Crassostrea ariakensis* Fugita 1913). *Aquaculture* 144, 321-338.
- Loret, P., A. Pastoureaud, C. Bacher & B. Delesalle. 2000. Phytoplankton composition and selective feeding of the pearl oyster *Pinctada margaritifera* in the Takapoto lagoon (Tuamotu Archipelago, French Polynesia): in situ study using optical microscopy and HPLC pigment analysis. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 199:55-67.
- NOAA, 1997. Rainfall data, Chuuk 1935-1990. Monthly data downloaded from National Data Center at www.ncdc.noaa.
- Park, D.W. (2004) Genetic Variation of Korean Oyster Species and Sterol Composition of Phytoplankton as Oyster Food. 103pp. Ph. D. Thesis, Pusan National University, Busan. in English] .
- Park, K.-I., A. Figueras, K.-S. Choi. (2004) Effects of The Parasitic Zooflagellate *Perkinsus*

- atlanticus on the Reproduction of the Manila Clam *Ruditapes philippinarum* in Korea. World Aquaculture 2004. p. 458.
- Park, K.-I., Figueras, A., K.-S. Choi. (2006) Application of enzyme-linked immunosorbent assay for studying of reproduction in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia): II. Impacts of *Perkinsus olseni* on clam reproduction. Aquaculture 25, 182-191.
- Park, K.-I., J.-K. Park, J. Lee, K.-S. Choi. (2005) Use of molecular markers for species identification of Korean *Perkinsus* sp. isolated from Manila clams *Ruditapes philippinarum*. Diseases of Aquatic Organisms 66: 255-263
- Park, K.-I., J.-W. Choi, (2003) Quantification of Reproductive Output of the Butter Clam, *Saxidomus purpuratus* (Sowerby, 1852) Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Ocean and Polar Research 25, 1-8.
- Park, K.-I., K.-S. Choi. (2004) Application of enzyme-linked immunosorbent assay for studying of reproduction in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Mollusca: Bivalvia): I. Quantifying eggs. Aquaculture 241: 667-687.
- Park, K.-I., Y.-M. Park, J. Lee, K.-S. Choi. (2002) Development of a PCR Assay for Detection of the Protozoan Parasite *Perkinsus*. Korean J. Environ. Biol. 20: 109-117.
- Park, S.H. (2007) Growth of Suminoe Oyster, *Crassostrea ariakensis* in Seomjin River estuary. 31pp. M.S. Thesis, Chonnam National University. [in Korean] .
- Pouvreau, S. & V. Prasil, 2001. Growth of the black-lip pearl oyster, *Pinctada*, at nine culture sites of French Polynesia: Synthesis of several samplings conducted between 1994 and 1999. Aquat. Living Resour. 14:155- 163.
- Pouvreau, S., C. Bacher & M. Heral. 2000. Ecophysiological model of growth and reproduction of the black pearl oyster, *Pinctada margaritifera*: potential applications for pearl farming in French Polynesia, Aquaculture 186:117-144.
- Romero, A., S. Chilbert, and M.G. Eisenhart 1999. Cubagua's pearl-oyster beds: the first depletion of a natural resource caused by Europeans in the American continent. Journal of Political Ecology 6 :57 - 78
- Sims, N. A. 1992. Population dynamics and stock management of the black-lip oyster, *Pinctada margaritifera* in the Cook Island, South Pacific. Aust. J. Mar. Res. 43: 1423-35.
- Southgate, P. C. & A. C. Beer. 1997. Hatchery and early nursery culture of the pearl oyster

- (*Pinctada margaritifera* L.). J. Shellfish Res. 16(2):561-567
- Southgate, P. C. and M. Ito, 1998. Evaluation of a partial flow-through culture technique for pearl oyster (*Pinctada margaritifera* L.) larvae. Aquacultural Engineering. 18:1-7.
- Sun, J., Wuse, X. (2004) Histology, ultrastructure, and morphogenesis of arickettsia-like organism causing disease in the oyster, *Crassostrea ariakensis* Gould. J Invertebrate Pathology 86, 77-86.
- Tanaka, Y. and Kumeta, M., 1981. Successful artificial breeding of silver-lip pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jameson). Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult., Japan, 2: 21-28.
- Tegner, M.J., L.V. Basch, and P.K. Dayton 1996. Near extinction of an exploited marine invertebrate. Trends in Ecology and Evolution 11, 7: 278-279.
- Thao, T.T. Ngo, Franck C.J. Berthe, K.-S. Choi. (2003) Prevalence and infection intensity of the ovarian parasite *Marteilioides chungmuensis* during an annual reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gigas*. Diseases of Aquatic Organisms. 56: 259-267.
- Thao, T.T. Ngo, S.-G. Kang, D.-H. Kang, Sorgeloos., P., K.-S. Choi. (2006) Effect of culture depth on the proximate composition and reproduction of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* from Gosung Bay, Korea. Aquaculture 253: 712-720.
- Thao, T.T. Ngo, S.-G. Kang, K.-S. Choi. (2002) Seasonal changes in reproductive condition of the Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg) from suspended culture in Gosung Bay, Korea. Korean J. Environ. Biol. 20: 268-275.
- Ward, F., 1985. The Pearl. Nat. Geogr., 168(2): 193-222.
- Yoo, S.K., Kang, K.H. (1995) Influence of Water Temperature and Salinity on Egg Development and Larvae Rearing of Oyster, *Crassostrea rivularis*, The Korean Journal of Malacology, 11(2): 165-170.
- Yoo, S.K., Lim, K.K. and Jang, Y.J. (2004) Growth and Spawning of *Crassostrea rivularis* from the Southern Sea Korea, The Korean Journal of Malacology, 20: 131-134.
- Yu, Z., Kong, X., Zhang, L., Guo, X., Xiang, J. (2003) Taxonomic status of four *Crassostrea* oysters from China as inferred from mitochondrial DNA sequences. J shellfish Res 22, 31-38.
- Yukihira, H., D.W. Klumpp and J.S.Lucas, 1999. Feeding adaptations of the pearl oysters *Pinctada margaritifera* and *P. maxima* to variations in natural particulates. Mar. Ecol. Progr. Ser. 182: 161-173.
- Zanini, J.M. & B. Salvat, 2000. Assessment of deep water stocks of pearl oysters at Atoll

(Tuamotu Archipelago, French Polynesia). Coral Reefs 19:83-87.

Zhang Q, Allen SK Jr, Reece KS (2005) Genetic variation in wild and hatchery stocks of Suminoe Oyster (*Crassostrea ariakensis*) assessed by PCR-RFLP and microsatellite markers. Marine Biotechnology 7, 588-599.

Zhou M, Allen SK Jr (2003) A review of published work on *Crassostrea ariakensis*. J Shellfish Res 22, 1-20.

이정임 등, “키조개를 이용하여 양식한 흑진주의 특성평가”, Journal of the Korean Crystal Growth and Crystal Technology, Vol.18, No.5 (2008) 205-210

강도형 등, “Chuuk Lagoon에 서식하는 흑진주 조개, *Pinctada margaritifera*의 2003년 하계 생식소 발달 및 산란특성”, Ocean and Polar research, Vol. 27(3):351-358

한국은행(<http://www.bok.or.kr/>)

통계청(<http://www.kostat.go.kr/>)

관세청(www.customs.go.kr)

캠로커스(<http://www.chemlocus.co.kr/>)

펄스톤(www.pearlstone.co.kr)

귀금속경제신문(www.diamonds.co.kr)

주 의

1. 이 보고서는 국토해양부에서 시행한 국제공동연구사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 국토해양부에서 시행한 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.