

해산 녹조류 참홀파래, *Monostroma nitidum*의 원형질체 분리와 분화

조용철·공용근·윤장택·선상미*·정규화*
국립수산진흥원, *여수대학교 생물공학과

Protoplast Isolation and Differentiation of Marine Green Alga *Monostroma nitidum*

Yong Chul CHO, Yong Gun GONG, Jang-Taek YOON, Sang-Mi SUN* and Gyu-Hwa CHUNG*

National Fisheries Research & Development Institute, Pusan 619-900, Korea

*Dept. of Biotechnology, Yosu National University, Yosu 550-250, Korea

High yields of protoplasts were obtained following enzymatic digestion of the vegetative thalli of marine green alga *Monostroma nitidum*. The enzyme mixtures containing 4% Cellulase R-10+3% Macerozyme R-10+3% Abalone acetone powder produced 4.41×10^6 protoplasts per 300 mg of fresh tissue. The highest yield of protoplasts was obtained by 270 minutes treatment of the thalli in enzyme solution. Freshly isolated protoplasts were spherical in shape and ranged between 13~33 μm in diameter. The high efficiency of differentiation were obtained by incubating freshly isolated protoplasts in 0.4 M mannitol f/2 medium for 7 days and then transferring to 0.2 M mannitol f/2 medium. Protoplasts began to form new cell walls three days after initial culture and began to germinate after 10 days, and then form a leafy thallus after further culture in f/2 medium. The addition of antibiotics in media inhibited the differentiation of protoplasts in culture.

Key words: Protoplasts, enzymatic digestion, *Monostroma nitidum*, differentiation.

서 론

육상식물의 원형질체 분리와 배양에 관한 연구는 원형질체가 세포융합이나 외래유전물질 또는 세포소기관 도입 등의 세포조작 기술에 이용이 될 뿐만 아니라 발생, 생리, 유전 등의 기초생물학적 소재로도 중요하여 오랫동안 폭넓게 이루어져 왔다 (Power and Chapman, 1985). 해조류는 관련 조작기술이 뒤늦게 시도되었고 또한 종에 따라 복잡하게 구성된 세포벽 성분을 분해할 수 있는 효소의 개발이 부진하여 원형질체의 분리가 용이하지 못하지만 개체재분화가 다수 종에서 효율적으로 유도되는 등 (Waaland et al., 1990; Reddy et al., 1992) 원형질체의 조작 및 이용에 관한 다양한 연구가 이루어지고 있다.

참홀파래 (*Monostroma nitidum*)는 단층의 세포벽을 가진 해산 녹조류로서 일본에서는 오래전부터 식용으로 양식되어 왔다 (Moromizato, 1991). 최근 본 종의 영양, 약리적 효과의 우수성이 규명되고 있어 급후의 보다 다양한 수요 기대에 따라 효율적인 양식기술의 개발이 요구된다. 지금까지 본 종의 양식에는 생육기의 성숙한 엽체를 채집하여 실내배양으로 접합자를 얻고 유주자를 방출시켜 종묘로 이용하여 왔다. 이러한 방법은 시간적, 경제적 소모가 많을 뿐만 아니라 까다로운 배양과정에 따른 종묘수급의 불안정이 우려되므로 보다 안정적인 새로운 종묘생산법을 모색할 필요가 있다 (Chen and Chiang, 1994). 그 방안의 하나로 전체형 성능을 가진 원형질체를 종묘소재로 검토해 볼 수 있으며 (佐賀縣有名水産試験場, 1989), 그 전제는 재연성 있는 원형질체 분리와 배양법의 확립이다.

*Monostroma*속 해조류에 대한 원형질체의 분리와 배양에 관한 연구결과는 지금까지 Fujita and Migita (1985), Saga and Kudo (1989), Chen and Chiang (1994) 등에 의하여 보고되었으나 보다 효율성을 높일 수 있는 방법이 필요하다. 따라서 본 연구

에서는 홀파래의 원형질체를 대량 분리하기 위한 효율적 방법과 분리한 원형질체의 분화유도 조건을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

엽체는 야외의 자연서식지에서 채집하여 즉시 실험실로 옮긴 후 12L:12D, 12°C의 항온실에 두고 48시간 이내에 원형질체 분리에 사용하였다. 4~5 cm의 크기로 절단한 엽체는 멸균해수로 3회 깨끗이 세척하여 1% Betadine 용액 (현대약품)으로 90초 동안 표면 살균하고 멸균해수로 다시 3회 세척하여 1 mm 정도로 잘게 자른 생체조직 300 mg을 7가지 효소용액 (Table 1) 5 ml와 함께 직경 5 cm의 멸균샤레에 넣어 처리하였다.

효소용액은 0.6 M mannitol, 0.5% potassium dextran sulfate를 함유한 50 mM MES buffer (pH 6.0)에 각각 Cellulase R-10, Macerozyme R-10 (이상 Yakult Honsha Co., Japan), Abalone acetone powder (AAP), Hemicellulase, Pectinase (이상 Sigma Chemical Co., USA)를 한시간 녹여 4°C에서 10,000 rpm으로 30분간 원심분리하고 그 상등액을 회수하여 Φ 0.22 μm 필터로 여과멸균함으로써 10% 효소원액을 조제한 후 단독으로 또는 조합하여 원형질체 분리에 사용하였다.

엽체와 효소액이 든 샤레는 20°C의 빛이 들어가지 않는 조건에서 50 rpm의 진탕기 위에 두고 서서히 교반시켰다. 효소처리 4시간 후에 분리된 원형질체를 Φ 30 μm 의 nylon mesh로 여과하여 500 rpm, 3분간씩 3회 원심분리하면서 배양액으로 세척, 정제하였으며, 상등액에 포함된 크기가 작은 원형질체는 700 rpm, 3분간씩 3회 원심분리하거나 35% Ficoll-400 (Sigma Chemical Co., USA) 완충액에 띄워 100 x g, 30분간 원심분리시켜 다시 회수하였다. 효소처리에 따른 시간별 원형질체의 분리량은 효소액을 처리한

30분 후 부터 30분 간격으로 480분 동안 측정하였다.

정제한 원형질체는 0~35 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 의 항생물질조합액 (Guillard's antibiotic concentrate, Sigma G5535)을 첨가한 0.2, 0.4, 0.6 M mannitol 농도의 f/2배지 (Sigma G9930) 5 cm씩을 넣은 직경 5 cm의 멸균사레에 4×10^4 cells/ml 밀도로 조정하였다. 배양액은 매주 mannitol을 함유하지 않은 f/2배지로 절반을 교환하여 주었으며 배양기간 동안 12L:12D, 12°C의 항온실에서 배양하였다.

세포의 수는 200 μm 높이의 혈구측정기를 사용하여 100배의 현미경하에서 계측하였고, 세포크기와 분화과정은 100~400배의 독립위상차현미경 (Nikon, Diaphot-TMD)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

세포벽 분해효소액으로 처리해서 210분 후에 조사한 원형질체의 분리량은 효소조합에 따라 큰 차이를 나타내었다 (Table 1). 10% 효소액 5종으로 처리한 300 mg의 엽체로부터 분리된 원형질체는 Cellulase R-10을 사용하였을 때 0.64×10^6 개로 가장 많았고, Macerozyme R-10, AAP, Hemicellulase를 처리하였을 때 각각 0.43×10^6 개, 0.38×10^6 개, 0.21×10^6 개였으며, Pectinase를 처리하였을 때는 0.05×10^6 개로 가장 적었다. 각각의 효소에 대한 세포수율의 결과를 근거로 4% Cellulase R-10+3% Macerozyme R-10+3% AAP로 조합한 효소액으로 엽체 300 mg을 210분간 처리한 결과 4.41×10^6 개에 이르는 다량의 세포를 효율적으로 분리하였다. 이는 Chen and Chiang (1994)이 *M. latissimum*의 엽체를 4% Cellulase R-10+2% Macerozyme으로 처리하여 분리할 수 있었던 엽체 1000 mg당 9×10^6 개의 세포를 얻었던 수율을 훨씬 상회하였다. 이러한 높은 수율은 해조류의 세포벽 구성분을 분해할 수 있는 다양한 효소가 함유된 AAP를 첨가함으로써 나타난 보조작용의 결과로 추정되며 AAP를 단독처리했을 때의 결과 (Table 1)와 큰 차이를 나타내었다.

김을 포함한 다양한 해조류의 엽체로부터 원형질체를 분리하기 위해서는 대부분 protease가 주요소인 papain을 전처리함으로써 보다 높은 세포수율을 얻을 수 있다 (Waaland et al., 1994; Fujita and Saito, 1990). 본 연구에서도 10% papain용액으로

30분간 전처리하였으나 전처리를 하지 않은 경우와 비교했을 때 전혀 차이가 나타나지 않아 참홀파래의 엽체외층이 그들과 다르게 구성되어 있음을 짐작할 수 있었다.

원형질체는 상기 조합의 효소액으로 처리한 30분 후 이미 2.0×10^6 개를 초과하여 (Fig. 1a) 210분 후 4.41×10^6 개 이상에 이르렀고 270분이 경과해서는 6.45×10^6 개로 최대치를 이루었다가 300분이 경과한 후 부터는 이미 분리되어 있던 원형질체가 손상됨에 따라 오히려 점차 감소되었다 (Table 2). 따라서 본 효소조합액으로 원형질체를 분리, 이용하기 위해서는 효소액의 처리 후 충분한 양의 원형질체가 분리되고, 분리된 원형질체의 손상이 적을 것으로 추정되는 180~240분 후 수거하여 이용하는 것이 적당할 것으로 사료된다.

참홀파래의 원형질체는 엽록체가 충만한 구형으로 직경 13~33 μm 이었으며, 직경 19~24 μm 인 원형질체가 57.8%로 가장 많았다 (Fig. 1b, Fig. 2). 이 결과로 미루어 볼 때 원형질체는 30 μm 의 nylon mesh를 대부분 통과할 수 있는 것으로 볼 수 있다. 그러나 30 μm 의 nylon mesh로 여과시킨 원형질체는 세포분리시 통상

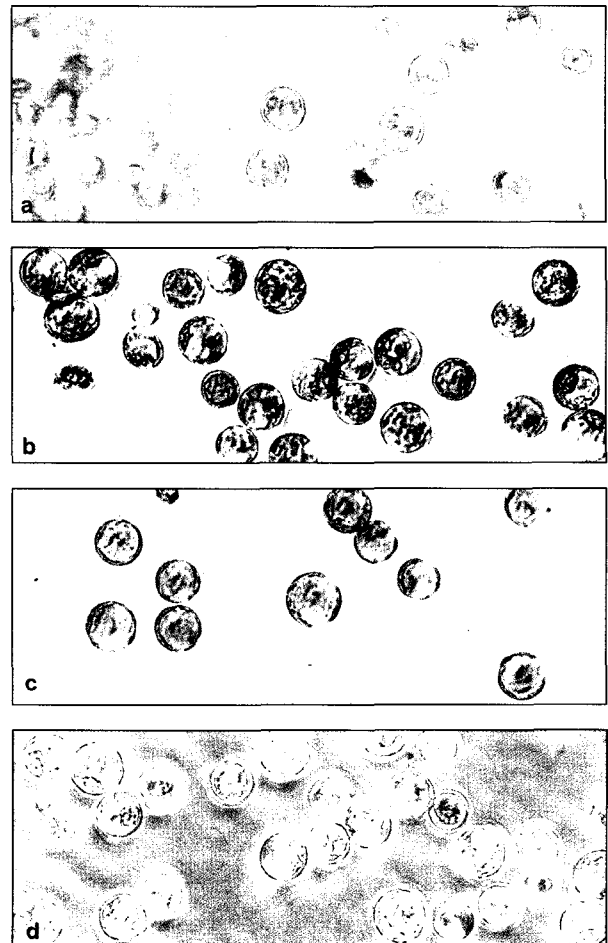


Fig. 1. Protoplasts isolated from the thalli of *Monostroma nitidum*. a, Protoplasts isolating from the thalli. b, Freshly purified protoplasts. c, 3-day-old protoplasts showing the formation of cell wall in 0.2 M mannitol f/2 liquid medium. d, 3-day-old protoplasts in 0.2 M mannitol f/2 liquid medium with 35 $\mu\text{l}/\text{ml}$ antibiotics.

Table 1. Efficiency of enzymes in releasing protoplasts from *Monostroma nitidum* thalli

Enzymes*	Protoplast number ($\times 10^6$ cells/300 mg FW)**
1) 10% Cellulase R-10	0.64
2) 10% Macerozyme R-10	0.43
3) 10% Abalone acetone powder	0.38
4) 10% Hemicellulase	0.21
5) 10% Pectinase	0.05
6) 4% Cellulase R-10+2% Macerozyme R-10	2.90
7) 4% Cellulase R-10+3% Macerozyme R-10+3% AAP	4.41

* All enzymes were dissolved in 50 mM MES buffer (pH 6.0) containing 0.6 M mannitol and 0.5% potassium dextran sulfate.

** Protoplast yield corresponds to 210 minutes incubation in enzyme mixture.

Table 2. Effects of incubation time on the yields of protoplast from *Monostroma nitidum* thalli

Incubation time (minutes)*																
30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360	390	420	450	480	
Yields**	1.07	1.42	1.58	1.75	2.22	2.77	4.41	6.22	6.45	6.29	5.40	4.96	3.96	3.11	2.21	1.43

* Enzyme solution is composed with 4% Cellulase R-10+3% Macerozyme R-10+3% Abalone acetone powder

** Yields represent $\times 10^6$ cells per 300 mg fresh weight tissue.

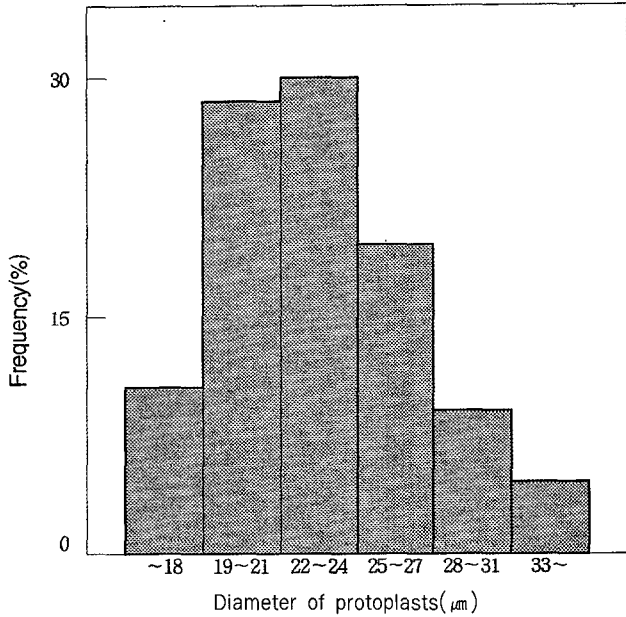


Fig. 2. Size distribution of *Monostroma nitidum* protoplasts.

적으로 수행하는 500 rpm의 3분간 원심분리로서는 원형질체 크기의 분포차에 의하여 다수의 소형 원형질체가 상등액에 남게 된다. 따라서 소형의 원형질체가 포함된 이 상등액을 700 rpm, 3분간 별도 원심분리시켜 대부분의 원형질체를 수거할 수는 있었으나 세포벽의 잔해도 함께 침전되어 이 방법으로는 깨끗한 정제 원형질체를 얻을 수 없었다. 이들 소형 원형질체는 Chen and Chiang (1994)이 분리한 것처럼 35%의 FicolI-400을 완충액으로 100 x g, 30분간 원심분리시킴으로서 밀도차에 따른 효율적인 정제를 할 수 있었다.

초기배양시의 f/2배지내 mannitol 농도에 따른 원형질체의 생존율은 삼투압농도가 낮을수록 낮아 0.2 M일 때 원형질체 파괴가 가장 많았으며 0.4 M, 0.6 M의 경우는 대부분 정상형을 유지하였다. 그러나 0.2 M mannitol이 첨가된 배양액내에서 생존한 원형질체는 대부분 세포벽의 형성과 발아가 용이하여 (Table 3) 세포생존율과는 상반된 결과로 나타났다. 한편 초기배양시의 f/2배지내 mannitol 농도를 0.4 M로 유지시킨 후 일주일 간격으로 mannitol을 함유하지 않은 배지로 교환해 준 경우에는 원형질체의 높은 생존율과 함께 발아율도 높일 수 있었다. 상기의 모든 경우에서 생존한 세포는 배양 3일후 새로운 세포벽을 형성하였는데 (Fig. 1c), 그들의 발아는 배양 일주일체를 기준으로 배지내 삼투압농도를 0.2 M 이하로 낮추어 준 경우에 한하여 배양 10일후 이루어졌다 (Fig. 3a). 또한 본 배양조건에서 배지를 교환하지 않는

Table 3. Effects of initial culture medium on the differentiation of *Monostroma nitidum* protoplasts

Medium	Relative differentiation*
f/2+0.6 M mannitol	++
f/2+0.4 M mannitol	+++
f/2+0.2 M mannitol	++++
f/2+0.6 M mannitol+35 μ l/ml antibiotics	-
f/2+0.4 M mannitol+35 μ l/ml antibiotics	-
f/2+0.2 M mannitol+35 μ l/ml antibiotics	-

* + + + +, All viable cells germinated; -, Not germinated.

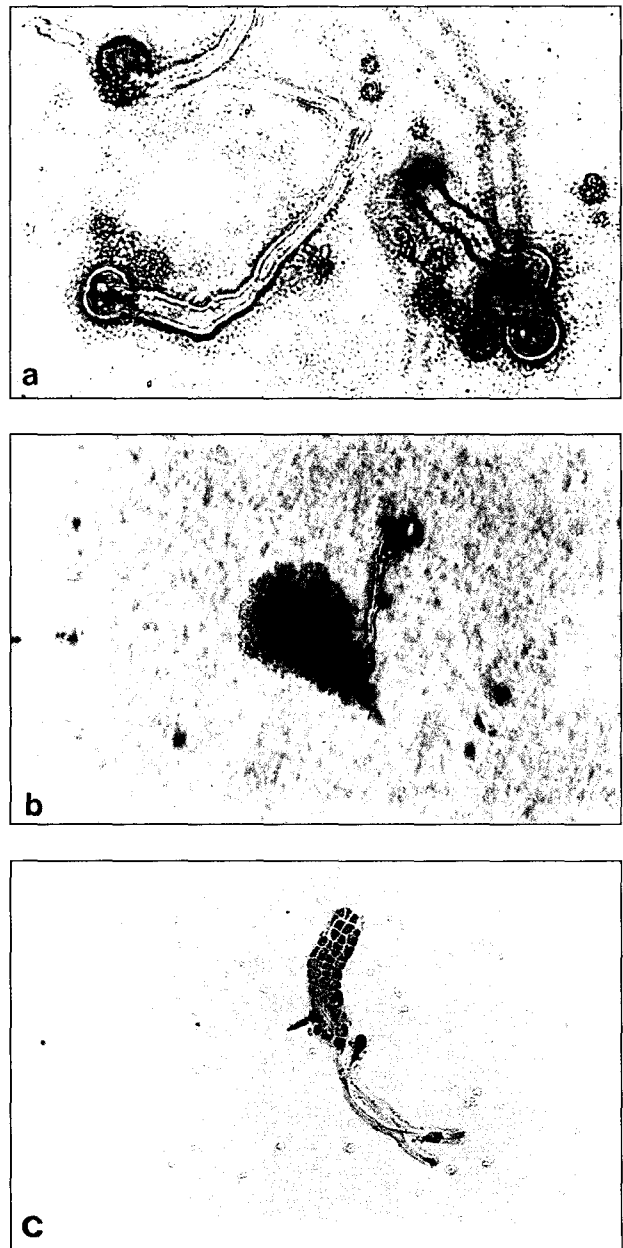


Fig. 3. Germination (a), growth (b), and regeneration (c) of *Monostroma nitidum* protoplasts cultured in f/2 liquid medium.

경우는 배양 후 10일경부터 배양기내 미생물이 서서히 증식하기 시작하였는데, 일주일 간격으로 배지를 교체함으로써 안정적인 무균상태를 유지할 수 있었다. 이같은 결과로 볼 때 참홀파래 원형질체의 배양을 위해서는 원형질체의 파괴가 이루어지지 않는 조건에서 배지내 삼투압농도를 가능한한 낮춰 줄 필요가 있는 것으로 사료된다. 초기배지를 mannitol을 함유하지 않은 배지로 절반씩 일주일 간격으로 교환해 준 배양조건에서 발아된 원형질체는 대부분 성장하여 (Fig. 3b) 6주 이후에는 엽상체로 발달하였다 (Fig. 3c). 항생물질을 첨가한 배지내의 원형질체는 항생물질을 첨가하지 않은 배지에서의 원형질체에 비해 생존율은 비슷하였으나 세포벽형성이 극히 저조하였으며 (Fig. 1d) 전혀 발아되지 않아 (Table 3) 첨가한 항생물질이 원형질체의 분화를 크게 저해함을 알 수 있었다.

요 약

해산 녹조류 참홀파래, *Monostroma nitidum*의 엽체를 효소처리하여 다량의 원형질체를 분리하였다. 최적 효소액의 조합은 4% Cellulase R-10+3% Macerozyme R-10+3% Abalone acetone powder로서 생체조직 300 mg 당 4.41×10^6 개의 원형질체가 분리되었다. 원형질체의 수율은 효소처리 270분에 최대였다. 분리 직후의 원형질체는 구형으로 직경 13~33 μm 의 크기였다. 분리된 원형질체는 0.4 M mannitol을 함유한 f/2 배지에서 배양한 후 매주 mannitol이 함유되지 않은 f/2 배지로 절반씩 교환함으로써 분화율을 높일 수 있었다. f/2배지를 사용한 적정 배양조건에서 원형질체는 배양 3일 후 새로운 세포벽을 형성하였으며 10일 후 발아하기 시작하여 엽체로 발달하였다. 항생물질의 배지내 첨가는 배양체의 분화를 저해하였다.

참 고 문 헌

Chen Y.C. and Y.M. Chiang. 1994. Isolation and regeneration of

- protoplasts of *Monostroma latissium* Wittrock (*Monostromataceae*, *Chlorophyta*). Bot. Bull. Acad. Sin. 35 : 45~51.
- Fujita, Y. and S. Migita, 1985. Isolation and culture of protoplasts from some seaweeds. Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ. No. 57. pp. 39~45.
- Fujita, Y. and M. Saito. 1990. Protoplast isolation and fusion in *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). Hydrobiologia 204/205 : 161~166.
- Moromizato, S. 1991. *Monostroma* spp. (Hitoe-gusa) In Aquaculture in tropical areas. Shokita, S., K. Kakazu, A. Tomori and T. Toma, ed. Midori Shobo Co. Ltd. Japan. (English edition prepared by M. Yamachi), pp. 36~44.
- Power, J.B. and J.V. Chapman. 1985. Isolation, culture and genetic manipulation of plant protoplasts. R.A. Dixon (ed), Plant Cell Culture. IRL Press, Oxford. pp. 37~66.
- Reddy, C.R.K., M. Iima and Y. Fujita. 1992. Induction of fast-growing and morphologically different strains through intergeneric protoplast fusions of *Ulva* and *Enteromorpha* (Ulvales, Chlorophyta). J. Appl. Phycol. 4 : 57~65.
- Reddy, C.R.K. and Y. Fujita. 1991. Regeneration of plantlets from *Enteromorpha* (Ulvales, Chlorophyta) protoplasts in axenic culture. J. Appl. Phycol. 3 : 265~275.
- Reddy, C.R.K., S. Migita, and Y. Fugita. 1989. Protoplast isolation and regeneration of three species of *Ulva* axenic culture. Botanica Marina 32 : 483~490.
- Saga, N. and T. Kudo, 1989. Isolation and culture of protoplasts from the marine green alga *Monostroma angicava*. J. Appl. Phycol. 1 : 25~30.
- Waaland, J.R., L.G. Dickson and B.A. Watson. 1994. Protoplast isolation and regeneration in the marine red alga *Porphyra nereocystis*. Planta 181 : 522~528.
- 佐賀縣有明水産試験場, 1987. ノリのプロトプラスト 単離細胞及び組織片による 優良株 クローン 種苗化 技術開發研究. 地域 バイオテクノロジー 研究開發促進開發事業報告書. pp. 1~14.

1998년 8월 13일 접수

1998년 11월 10일 수리