

## 한국산 해산 홍조류 긴잎돌김(*Porphyra pseudolinearis* Ueda)에서의 원형질체 분리

김영대\* · 최재석<sup>1</sup> · 이 주 · 손용수 · 홍용기<sup>1</sup>

국립수산과학원 동해수산연구소 증식과  
<sup>1</sup>부경대학교 생물공학과

### Isolation of protoplast from the marine red alga *Porphyra pseudolinearis* in Korea

Young-Dae Kim, Jae-Suk Choi<sup>1</sup>, Chu Lee, Yong-Su Son and Yong-Ki Hong<sup>1</sup>

Aquaculture Division, East Sea Regional Fisheries Research Institute, Gangneung 210-860, Korea  
<sup>1</sup>Department of Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

#### Abstract

Optimal conditions of protoplast isolation from the seaweed *Porphyra pseudolinearis* have been described. The *P. pseudolinearis* is one of indigenous and dominant *Porphyra* species in the East Sea region. Protoplasts have been released by enzymatic treatment of 2% agarase and 2% hemicellulase in 25mM MES buffer, pH 6.0 containing 0.5 M sorbitol. The protoplasts could be fused with neutral red-stained protoplasts of *P. okamurai* by the addition of polyethylene glycol 8000 solution.

**Key words** – protoplast, *Porphyra pseudolinearis*, cell fusion, osmotic stabilizers, enzyme solutions

#### 서 론

국내에서의 김양식은 1970년대 갯병에 강한 다수확품종인 방사무늬김(*Pophyra yezoensis*)의 도입으로 전체양식 총생산고의 15%, 해조류 총 생산고의 72%를 차지할 만큼 양적인 성장을 보여왔다[15]. 최근 일본에서 선발된 다수확 품종들이 대량으로 도입되어지고 또한 양식기술의 진보로 인하여 생산량이 급격히 증가하고 있으나, 이에 반하여 품질면에서는 열성화 현상이 일어나고 있는 실정이다. 따라

서 우리나라 고유의 맛과 향을 지니면서 지역특성에 적합한 한국 고유종의 개발과 품종개량이 절실히 요구되고 있다.

김속(*Porphyra* genus)은 홍조식물문의 홍조식물강, 김과래아강, 김과래과에 속하는 분류군으로서 전세계적으로 140여종이 알려져 있으며[22], 현재까지 국내에서 보고된 김속 식물은 16종 2품속이다[10]. 대부분의 김 엽체는 반수체이며 과포자체는 배수체로 알려져 있다[2,9,13].

원형질체분리는 해조의 생리, 생화학 및 분자유전학을 연구하는데 매우 유용한 도구로 인식되고 있으며, 특히 상업적으로 중요한 유용해조의 증식과 품종 개량에 이용되고 있다[3]. 특히, 김속의 경우, 생활사에서 종묘를 생산할 수 있는 시기가 사상체기와 각포자기에 한정되어 있는데

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel : 031-660-8563, Fax : 033-661-8514  
E-mail : ydkim@nfrda.re.kr

엽체에서 원형질체를 분리할 경우, 엽체가 반수체이므로 동일한 유전자형을 가진 종묘를 대량으로 얻을 수 있을 뿐만 아니라, 생활사에서 사상체기와 각포자기를 생략할 수 있어 종보존에도 많은 이점이 있는 것으로 알려져 있다[18, 19, 23].

이와 같은 이유에서 김속 식물의 많은 종들에서 원형질체의 분리와 배양이 이루어지고 있다[4, 16, 21]. 원형질체를 분리하기 위해서는 세포벽을 물리적 또는 생화학적으로 제거하는 것이 필수적이다. 김엽체의 세포벽구성물질은 중요한 골격성분인  $\beta$ -1,3 xylan과  $\beta$ -1,4 mannan 그리고 매트릭스성분인 porphyran으로 구성되어 있으며[3], 이들 세포벽 구성물질은 해산 조식동물의 소화효소를 이용하거나 미생물 효소를 사용하여 효과적으로 분해되는 것으로 알려져 있다[4, 6, 21].

긴잎돌김(*P. pseudolinearis*)은 동해안에만 분포하는 우점종으로 알려져 있으며[12, 17], 맛과 향이 뛰어나고, 조생종으로서 유망한 양식후보종이다. 그러나 우리나라 자생종을 대상으로 하여 양식화 및 품종개량에 유용한 기법인 원형질체 분리는 아직 시도되지 않았다. 그러므로 본 연구에서는 긴잎돌김에서 원형질체를 분리하는 최적의 조건을 확립하여, 이후의 양식화 및 품종개량을 위한 기초자료로 이용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

실험에 사용된 긴잎돌김(*Porphyra pseudolinearis* Ueda)과 오카무라돌김(*P. okamurai*)은 강원도 강릉시 주문진 암반지대에서 채집하였다. 채집한 김은 붓으로 부착생물을 제거한 후, 멸균해수로 3회 씻은 다음, 1% povidone-iodine 용액에 각각 1분간 3회 처리하였다. 부착생물이 제거된 김은 멸균해수를 주 1회 교환하여 10°C에서 배양하였으며, 해수 교환시 영양소( $120 \mu\text{M NO}_3^-$ ,  $8 \mu\text{M PO}_4^-$ )를 첨가하여 주었다. 기포발생에 의하여 물을 교반하여 주었고, 광도는 형광등을 이용하여  $80 \mu\text{mol photons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (12:12h L:D)로 처리하였다. 엽체의 크기를 약  $1\text{mm}^2$  크기로 자른 후, 효소용액을 처리하기 전까지 10°C에서 보관하였다[5].

### 원형질체의 분리

긴잎돌김의 원형질체 분리에 가장 적합한 삼투압 안정

제와 최적농도를 알아보기 위하여, 삼투압 안정제로 설탕, 솔비톨, 그리고 만니톨을 각각 0.4M, 0.5M, 그리고, 0.6M로 처리하였다. pH에 따른 원형질체 분리를 비교하기 위하여, 25mM MES완충용액, 25mM HEPS 완충용액, 그리고 25mM Tris-HCl 완충용액을 사용하여 각각 pH 6.0, pH 7.9, pH 8.0 그리고 pH 9.0조건으로 만든 후, 원형질체 분리에 사용하였다. 효소용액의 최적조성을 알아보기 위하여, 25mM MES 완충용액(pH 6.0), 0.5M 솔비톨이 용액에 각 효소를 다양한 농도와 조성으로 20°C에서 2시간 동안 진탕배양기(60rpm)로 교반하면서 처리하였다. 효소조성은 각각 1% agarase와 3% hemicellulase, 2% agarase와 2% hemicellulase, 3% agarase와 1% hemicellulase, 4% agarase, 그리고 4% hemicellulase를 처리하여 원형질체 수율을 비교하였다.

효소용액을 2시간 처리한 후, 분해되지 않은 김 세포벽을 제거하기 위하여,  $30 \mu\text{m}$  물러가아제를 통과시킨 다음,  $200 \times \text{g}$ 로 10분간 원심분리하여 상층액을 버리고 0.6M 솔비톨로 씻어주었다. 이 세척과정을 3회 반복하여 효소용액을 제거하였다. 원형질체 분리과정은 가능한 암조건에서 진행되었으며, 분리된 원형질체는 혈구계수기를 사용하여 계수하였다. 상기의 모든 실험은 3번 반복하여 평균값을 구하였다.

### 원형질체 융합시험

원형질체간의 완전한 원형질체 분리와 융합조건을 확인하기 위하여, 긴잎돌김과 오카무라돌김의 원형질체들간 세포질융합을 시도하였다. 오카무라돌김 원형질체는 0.05% neutral red로 20분간 염색한 후, 0.5M 솔비톨이 함유된 멸균해수로 씻어주었다. 그리고 염색하지 않은 긴잎돌김 원형질체와 염색된 오카무라돌김 원형질체를 혼합하여 30% polyethylene glycol 8000을 처리한 다음, 5분간 격으로 관찰하였다. 상기의 모든 관찰은 고배율 현미경(Olympus, BH-2)을 사용하였다.

## 결 과

### 삼투압 안정제 및 pH별 원형질체 분리

원형질체의 분리는 제거되는 세포벽에 상당하는 압력을 보상해 줄 수 있는 등장액에서 진행되어야 하므로 설탕, 솔

비톨, 만니톨을 삼투압안정제로 비교하여 보았다.

우선 긴잎돌김을 대상으로 하여 원형질체 분리에 적합한 삼투압안정제와 최적농도를 알아보기 위하여 각 삼투압안정제를 농도별 및 효소용액 pH별로 처리하여 원형질체가 분리된 수율을 구하였다(Fig. 1). 25mM MES 완충용액 pH 6.0에서 1% agarase와 3% hemicellulase를 처리했을 때, 0.4, 0.5, 0.6M 만니톨 용액에서의 원형질체 수율은 김 생체량 1g당 각각  $8.4 \times 10^5$ 개,  $10.2 \times 10^5$ 개,  $6.7 \times 10^5$ 개였으며, 솔비톨을 처리하였을 때의 경우는 각각  $7.6 \times 10^5$ 개,  $13.4 \times 10^5$ 개,  $6.1 \times 10^5$ 개였고, 설탕의 경우는  $5.5 \times 10^5$ 개,  $8.2 \times 10^5$ 개,  $5.9 \times 10^5$ 개였다. 삼투압안정제에 따른 원형

질체 수율을 비교해보았을 때, 만니톨, 솔비톨, 설탕 용액의 농도가 모두 0.5M일 때 가장 안정적이었다. 효소용액의 pH가 원형질체 분리에 미치는 영향을 조사한 결과가 Fig. 2에 나타나 있다. 0.5M 솔비톨 용액에 1% agarase와 3% hemicellulase를 첨가하여 김엽체에 처리해주었을 때, pH에 따른 원형질체 수율은 25mM MES 완충용액(pH 6.0), HEPES 완충용액(pH 7.0), Tris 완충용액(pH 8.0 및 9.0)에서 김생체량 1g당 각각  $13.4 \times 10^5$ 개,  $9.6 \times 10^5$ 개,  $7.5 \times 10^5$ 개, 그리고  $4.3 \times 10^5$ 개로 나타나, pH 6.0의 25mM MES 완충용액을 사용하였을 때 원형질체의 수율이 가장 높았으며, pH가 높아질수록 원형질체의 수율이 낮아졌다.

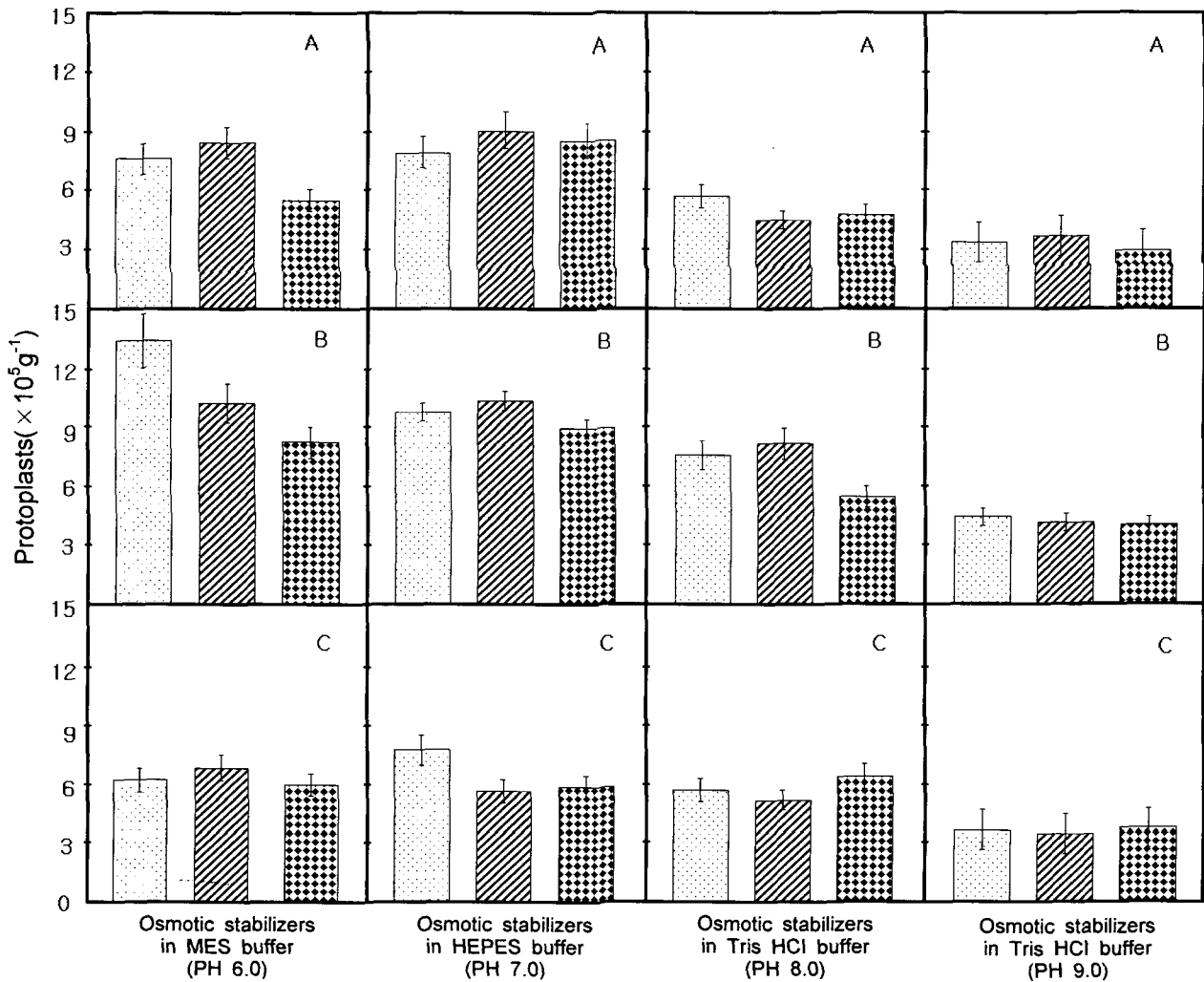


Fig. 1. Effects of osmotic stabilizers concentrations and pH on the protoplast yield from the *Porphyra pseudolinearis*. Enzyme solution was consisted of 1% agarase and 3% hemicellulase containing each of 0.4M(A), 0.5M(B), 0.6M(C) of sorbitol (□), mannitol(▨), and sucrose(▩).

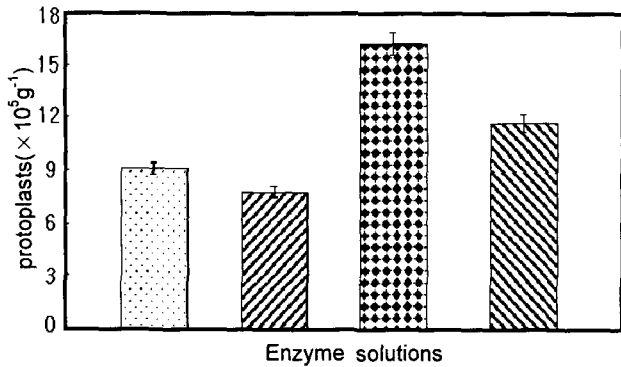


Fig. 2. Effects of various enzyme mixtures on the protoplast yield from the *P. pseudolinearis*. Osmotic stabilizer was consisted of 0.5M sorbitol in 25 mM Tris-HCl buffer(pH 6.0) containing each of 4% agarase(□), 4% hemicellulase(▨), 2% agarase and 2% hemicellulase(▩), and 3% agarase and 1% hemicellulase(▧).

효소종류별 원형질체분리

긴잎돌김으로 부터의 원형질체 분리를 위하여 0.5M 솔비톨을 25mM MES 완충용액( pH 6.0)에 넣은 후 효소종류와 농도는 agarase 4%(W/V)단독, hemicellulase 4%(W/V)단독, agarase 2%(W/V) 및 hemicellulase 2%(W/V), agarase 3%(W/V) 및 hemicellulase 1%(W/V)등으로 4가지 실험구를 설정하여 시험한 결과 각각 김 생체량 1g 당  $9.1 \times 10^5$ 개,  $7.8 \times 10^5$ 개,  $16.2 \times 10^5$ 개,  $11.7 \times 10^5$ 개로 나타나 agarase 2% 및 hemicellulase 2%의 효소 조합이 가장 좋은 원형질 분리 결과를 나타내었다(Fig. 2).

세포융합

긴잎돌김으로부터 2% agarase 2% hemicellulase 의 효소를 0.5 M 솔비톨이 함유된 25mM Tris-HCl 완충용액내에서 2시간 동안 처리하여 원형질체를 분리하였다(Fig. 3A). 그리고 오카무라돌김으로부터도 동일조건하에서 원형질체를 분리한후 0.5M 솔비톨이 함유된 0.05% neutral red로 20분 동안 염색하였으며 잔여의 neutral red를 0.5M 솔비톨 용액으로 세척하였다(Fig. 3B). 이들의 각 긴잎돌김에 원형질체들을 혼합한 후 30%의 Polyethylene glycol (Sigma Mol.Wt. : 8,000)넣은 후 5분 간격으로 관찰하였다. 15분 후에 두 종류의 원형질체가 모이는 모습이 관찰되었으며 25분 후 긴잎돌김과 오카무라돌김의 원형질체들이 접

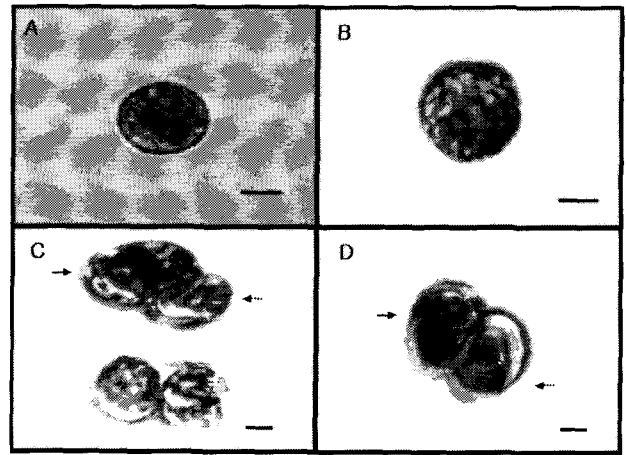


Fig. 3. Protoplasts and fusion process of *P. pseudolinearis* and *P. okamurae*. Protoplasts of *P. okamurae* have been stained with 0.05% neutral red. A, a protoplast of *P. pseudolinearis* B, a protoplast of *P. okamurae*. C, D, Aggregated protoplasts of *P. pseudolinearis*( $\rightarrow$ ) and *P. okamurae*( $\rightarrow$ ) after 25min.(Scarle bar :10 $\mu$ m).

합하는 모습이 관찰되었다(Fig. 3C, D).

고찰

효소처리에 의한 해조류의 원형질체 분리는 Millner et al [14]가 고등식물에 사용한 같은 효소를 이용하여 녹조에서 원형질체를 분리한 것이 처음으로 보고되어져 있으며, 그 후, 같은 방법으로 녹조의 많은 종에서 성공하였다. 그러나, 홍조 및 갈조에서의 원형질체 분리는 상대적으로 쉽지 않다. 이것은, 녹조의 세포벽이 고등식물의 세포벽 구성물질인 셀룰로스 및 펙틴을 주요 구성성분으로 하고 있는데 반하여, 홍조와 갈조의 세포벽은 고등식물과는 다른 다양한 복합 다당류등으로 구성되어 있으며 분류군 및 생활사에 따라서도 서로 다른 다당류가 주요 구성성분으로 되어 있어 세포벽을 완전히 분해하는데는 많은 어려움이 있기 때문이다[20]. 현재까지 성게, 전복, 군소 등의 해산 조식동물의 소화관으로부터 얻어진 효소 또는 해조를 분해하는 세균이 분비하는 효소를 이용하여 해조의 원형질체를 분리하는 연구가 진행되고 있다.

조식동물의 소화효소인 전복류의 cellulase에 대한 효능에 관한 외국의 연구로는 소수의 연구가 있다[1,4,11]. 국내에서는 Choi et al [5]의 연구에서 조제한 전복 소화효소의

아세톤분말을 효소로 사용하여 오카무라돌김에서 원형질체를 분리한 바 있다. 25mM MES 완충용액 pH 6.0, 0.5M 만니톨을 사용하였을 때, 분리된 원형질체가 김 생체량 1g 당  $8.7 \times 10^5$ 개로 나타나 본 연구의  $10.2 \times 10^5$ 개와 약간의 차이를 보였다. 이러한 차이는 전북아세톤분말에 함유된 lipase와 protease 등 원형질체 세포막을 분해하는 불순물이 함유되어 있기 때문인 것으로 사료되며, 본 실험에서는 정제된 시판효소를 사용함으로써 좀더 높은 원형질체 분리수율을 얻을 수 있었다. Butter et al [3]은 pH가 높아질수록 원형질체의 생산이 낮아진다고 하였는데, 본 연구에서도 유사한 결과를 나타내었다. 조직 연화를 일으켜 원형질체 분리를 촉진한다고 알려진 papain 전처리는 Choi et al 그리고 Waaland et al [5,21]의 연구 결과에서 효과가 거의 없는 것으로 나타나 본 실험에서는 처리하지 않았다. Fujita and Saito [8]에 따르면 긴잎돌김에서  $4.2 \times 10^5$  개가 만들어 진다고 보고하고 있어 본 연구에서와 많은 차이를 보이고 있다. 이러한 차이는 사용되어진 효소와 삼투압안정제 및 완충용액 종류를 달리하였기 때문으로 생각되어진다. Chen(1989)은 *P. linearis*에서 고농도의 cellulase 처리가 원형질을 생산하는데 효과적이라고 하였다.

Fujita and Migita는 [7]은 방사무늬김의 세포융합 연구에 PEG 4000 와 6000을 사용하였으며, 본 연구에서 사용된 PEG 8000 과 비교했을때 원형질체들이 모여드는 시간과 접합시간은 거의 같았다. 이러한 PEG의 효과는 염체의 종류와는 관계가 없는 것으로 생각된다.

## 요 약

한국 동해안 특산종인 긴잎돌김의 원형질체 분리를 위한 적절한 조건을 구명하기 위한 연구가 이루어 졌다. 홍조류 긴잎돌김은 동해안에 있어 토착종이며 우점종중 하나이다. 원형질체는 2% agarase and 2% hemicellulase 의 효소를 이용하여 25mM Mes buffer, pH 6.0의 0.5M 솔비톨에서 분리되어 졌다. 분리되어진 원형질체는 PEG 8000에서 염색한 오카무라돌김과 접합하였다.

## 감사의 글

이 논문은 해양수산부에서 시행한 수산특정연구개발사

업의 연구결과 일부입니다. 최와 홍은 2003년도 Brein Korea 21 사업에 의하여 지원되었습니다.

## 참 고 문 헌

1. Ar Gal E., Y. M. Chiang and B. Kloareg. 1993. Isolation and regeneration of protoplasts from *Porphyra dentata* and *Porphyra crispata*. *Eur. J. Phycol.* **28**, 277-283.
2. Burzycki, G. M. and J. R. Waaland. 1987. On the position of meiosis in the life history of *Porphyra torta* (Rhodophyta). *Bot. Mar.* **30**, 5-10.
3. Butler D. M., Evans L. V. & Kloareg B. 1990. Isolation of protoplasts from marine algae. pp. 647-668. In: *An Introduction to Applied phycology* (Ed. by I. Akatsuka), SPB Academic Publishing,
4. Chen L. C. M. 1989. Cell suspension culture from *Porphyra linearis* (Rhodophyta), a multicellular marine red alga. *J. Appl. Phycol.* **1**, 153-159.
5. Choi, J. S., C. G. Choi, Y. D. Kim, H. G. Kim and B. O. Jun. 1997. Preparation of cell wall degrading enzymes from marine herbivores for algal protoplast isolation. 1. Cell wall degradation and isolation of protoplasts from a marine red alga *Porphyra okamurae* Ueda by enzyme extracts of abalone (*Nordotis discus* (Reeve)). *Algae.* **12(2)**, 99-104.
6. Fujita, Y., and S. Migita, 1985. Isolation and culture of protoplast from some seaweeds. *Bull. Fac. Nagasaki Univ.* **57**, 39-45.
7. Fujita, Y. and S. Migita, 1987. Fusion of protoplasts from thalli of two different color types in *Porphyra yezoensis* Ueda and development of fusion products. *Jap. J. Phycol.* **35**, 201-208.
8. Fujita, Y. and M. Saito 1990. Protoplast isolation and fusion in *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* **204/205**, 161-166.
9. Hawkes, M. W. 1978. A field, culture and ecological study of *Porphyra gardneri*, *P. nereocystis*, and *P. thuretii* (Rhodophyta, Bangiophycidae). Ph.D. dissertation, University of British Columbia, Vancouver, Canada.
10. Hwang M. S. and I. K. Lee. 1991. Taxonomy of Genus *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) from Korea. *Algae.* **16**, 233-273.
11. Kloareg, B. and R. S. Quarrano. 1988. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological function of matrix polysaccharides. *Oceanogr. Mar.*

- Biol. Annu. Rev.* **26**, 259-315.
12. Koh N. P., C. H. Sohn, J. W. Chang and Y. K. Cheong. 1981. Study on the cultivation of *Porphyra pseudolinearis* Ueda. *Bull. Fish. Res. Dev. Agency.* **26**, 51-61.
  13. Ma, J. H., Miura, A. 1984. Observations of the nuclear division in the conchospores and their germlings in *Porphyra yezoensis* Ueda. *Jap. J. Phycol.* **32**, 373-378.
  14. Millner, P., M. Callow and L. Evans. 1979. Preparation of protoplasts from the green alga *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link. *Planta.* **147**, 174-177.
  15. Ministry of Marine Affairs and Fisheries. 1997-2000. Statistical Yearbook of Marine Affairs and Fisheries. Republic of Korea, pp. 1-1132, Cheongwoo Moonwhasa, Seoul (In Korean).
  16. Polne-Fuller, M. and A. Gibor, 1984. Development studies in *Porphyra*. I. Blade differentiation in *Porphyra perforata* as expressed by morphology, enzymatic digestion, and protoplast regeneration. *J. Phycol.* **20**, 607-618.
  17. Sohn C. H. 1998. The seaweed resources of Korea. In: Seaweed resources of the world pp. 15-33.. A. T. Critchley and M. Ohno(eds.), JICA.
  18. Tang. Y. 1982. Isolation and culture of vegetative cells and protoplasts of *Porphyra suborbiculata* Kjellm. (Chin. Engl. summary.) *J. Shandong Coll. Oceanology* **12**, 38-47.
  19. Tokuda Hiroshi 1992. Cell Engineering of Seaweeds. *Cell Science.* **8(2)**, 34-40.
  20. Toshiyoshi Araki 1997. Biotechnology of Useful Seaweed, pp. 62-72, vol. 113, Kouseisha-kouseikaku Corporation Press Inc., Tokyo.
  21. Waaland J. R., L. G. Dickson and B. A. Watson. 1990. Protoplasts isolation and regeneration in the marine red alga *Porphyra nereocystis*. *planta.* **181**, 522-528.
  22. Yoshida T., Notoya M., Kikuchi N. and Mitaya M. 1997. Catalogue of species of *Porphyra* in the world, with special reference to the type locality and bibliography. *Nat. Hist. Res.* Special Issue No. 3: 5-18.
  23. Zhao H. and X. Zhan. 1981. Isolation and cultivation of the vegetative cells of *Porphyra yezoensis* Ueda. *J. Shandong Coll. Oceanology.* **11**, 61-66.

(Received April 14, 2003; Accepted August 18, 2003)