

## 실내배양에서 방사무늬김의 황백화 회복에 대한 연구

이상용, 김영희, 김수홍, 유현일\*

국립수산과학원 해조류연구센터

## A study on the recovery of discoloration of *Pyropia yezoensis* in laboratory culture

SangYong Lee, Young Hee Kim, Soo Hong Kim and Hyun Il Yoo\*

Seaweed Research Center, National Institute of Fisheries Science, Haenam 59002, Republic of Korea

### \*Corresponding author

Hyun Il Yoo

Tel. 061-530-3906

E-mail. hiyoo@korea.kr

Received: 14 November 2019

Revised: 11 December 2019

Revision accepted: 16 December 2019

**Abstract:** To recover the discoloration of *Pyropia yezoensis*, additional  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  nutrients were supplied to the discolored blades. As a result, the efficiency of photosynthesis was increased from two days after incubation with  $\text{NO}_3^-$  and five days after incubation with  $\text{PO}_4^{3-}$ . In addition, the chromaticity analysis results showed significant changes. Furthermore, the cell vacuoles bloated due to discoloration were reduced again when they were restored from discoloration, suggesting that the control of discoloration is feasible by nutrient supply.

**Keywords:** *Pyropia yezoensis*, recovery of discoloration, recovery, laboratory culture

## 서 론

김속 (Genus *Pyropia*)은 홍조식물문의 홍조식물강, 김파래과에 속하는 분류군으로 현재까지 140여 종이 알려져 있으며, 열대에서 한대에 이르기까지 널리 분포한다 (Yoshida *et al.* 1997). 우리나라에는 10여 종이 분포하고 있으며, 주요 양식종은 참김 (*P. tenera*), 둥근돌김 (*P. suborbiculata*), 방사무늬김 (*P. yezoensis*), 모무늬돌김 (*P. seriata*), 잇바디돌김 (*P. dentata*) 등이 있다 (Kang 1970; Hwang and Lee 2001).

우리나라의 2018년 해조류의 양식 생산량은 약 171만 톤이며 김은 전체 생산량의 32% (56만 톤)를 차지하는 대표적인 양식 해조류이다. 또한 생산금액에 있어서는 전체 해조류 생산금액 8,400억원의 68.2%인 5,729억원을 차

지하는 경제적으로 매우 중요한 식용해조류이다 (MOF 2019).

우리나라에서 김은 2010년 23.5만톤에서 2018년 56.7만톤으로 생산량이 약 2.4배 증가하였다. 이와 같은 김 생산량의 지속적인 증가는 양식기술 (채취기술, 신품종개발) 및 가공기술의 발달과 마른김 생산단지 조성으로 인한 수요증가, 원료공급을 위한 양식시설의 확대가 주요한 요인이었다. 생산량 증대를 위한 밀식 및 불법 양식시설은 갯벌 발생률을 증가시켜 김의 품질로 인한 가격하락은 어업인의 소득을 감소시켰다. 뿐만 아니라 양식장의 물리·화학적 어장환경 변화에 따른 황백화 발생은 2011년부터 직·간접적으로 김 양식산업에 막대한 피해를 주고 있다 (NFRDI 2015).

황백화 현상은 김이 정상적으로 성장하지 않고 엽체의

색이 탈색되고 활력이 저하되어 김발에서 탈락되는 등 생산량 감소 및 품질 하락을 일으키는 현상이다(Amono and Noda 1987; Sakaguchi *et al.* 2003; Nishikawa and Yamaguchi 2006). 일본에서는 2000년대 초반 발생한 황백화 현상이 동계 대형 규조류의 대발생, 하천수 유입 감소 및 고염분 저영양 수괴의 이동 등에 의한 영양염 감소에 의해 발생하는 것으로 판단하였으며(Hori *et al.* 2008; Ishii *et al.* 2008; Tada and Harada 2012), 이후 발생한 황백화는 용존 무기영양염 중 질소 성분의 부족에 의한 것이라 밝혀졌다(Matsuoka *et al.* 2005; Hori *et al.* 2008; Tada *et al.* 2010). 우리나라의 경우 해수의 용존무기영양염의 결핍이 황백화를 발생시키며, 질소계열의 결핍이 주요 원인으로 보고되었다(Kang and Koh 1977).

이와 같이 김 황백화가 용존무기영양염의 결핍에 의해 발생하는 것으로 알려져 있으나, 영양성분에 따른 황백화 김 엽체의 회복에 대한 연구는 이루어지지 않았다.

따라서 본 연구는 김의 실내배양을 통해 황백화 유도된 김 엽체의 영양성분에 따른 회복 조건을 파악하여 황백화 발생을 제어할 수 있는 방법을 알아보고자 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 1. 방사무늬김 실내배양 준비

본 연구에서는 국립수산물연구원 해조류연구센터의 유전자원은행에 보존 배양중인 방사무늬김의 유리사상체(SRI-수과원104)를 제공받아 사용하였다. 제공받은 유리사상체는 300 mL의 PES배지(Provasoli 1968)가 들어있는 플라스크에 넣어, 20°C, 40  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  및 14 : 10 h L : D (Light : Dark)의 광주기로 조절된 배양기(EYELA MTI-202B, Japan)에서 배양하여 각포자낭 형성을 유도하였다. 각포자가 성숙하여 방출되면 종사줄을 넣어 각포자의 부착을 유도하였다. 부착된 각포자가 발아하여 엽체가 확인되면 종사줄을 PES배지가 들어있는 새로운 플라스크에 옮겨 엽체(약 5 cm)가 될 때까지 15°C, 40  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  및 10 : 14 h L : D 조건에서 배양하였다.

### 2. 황백화 유도 및 회복

김 엽체의 황백화 유도는 영양성분이 제거(N, P-free)된 저영양해수(Low nutrient seawater, OSIL, 1  $\mu\text{M}$  이하)를 이

용하였으며, 15°C의 40  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  광량과 10 : 14 h L : D 조건의 배양기에서 500 mL 플라스크에 김 엽체를 넣어 10일간 배양하였다(Lee *et al.* 2018).

황백화가 유도된 김 엽체의 회복 실험을 위해 용존무기질소(DIN) 성분은 질산염( $\text{NO}_3^-$ )을 사용하였으며, 용존무기인(DIP) 성분은 인산염( $\text{PO}_4^{3-}$ )을 사용하였다. 배양기간 동안 영양성분의 부족을 고려하여 질산염 농도는 300  $\mu\text{M}$ , 인산염 농도는 30  $\mu\text{M}$ 의 영양강화해수를 조제하여 사용하였다(Pereira *et al.* 2008). 조제된 영양강화해수에 황백화가 유도된 김 엽체를 넣어 황백화 유도와 동일한 배양조건에서 14일간 배양하였다. 김 엽체의 회복 정도는 2일 간격으로 김 엽체의 색택과 광합성 효율을 측정하였으며, 세포 구조를 관찰하였다.

## 3. 황백화 진단

### 1) 광합성 효율 측정

김 엽체의 광합성 효율 측정은 광합성 측정장치(Mini-PAM, Waltz, Germany)를 이용하여 최적 양자수율(Optimum quantum yield)을 측정하고 배양기간에 따라 비교하였다. 양자수율의 변화는 2개 반복구를 두어 측정하였다.

### 2) 색도 측정

김 엽체의 황백화 회복을 확인하기 위해 색차계(CR-300 Colorimeter, Konica Minolta, Japan)를 이용하여 색도를 측정하였다. 색도 측정시 엽체를 대지에 펼친 후 상부, 중부와 하부로 구분하여 각 엽체별 3회씩 측정하였으며, 시간에 따른 변화는 2일 간격으로 비교하였다. 김 엽체의 색도는 CIE system에 따라 명도지수(Lightness; L), 적색지수(Redness; a), 황색지수(Yellowness; b)로 수치화 하였다. 수치화된 각 지수는 Munsell Color Chart (ASM Standard D 1535-96, 1980)에 위치하여 표현하였다.

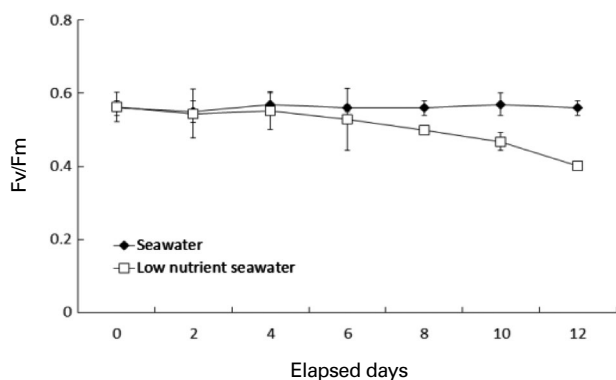
### 3) 세포구조 관찰

황백화 유도 및 회복기간 동안 김 엽체의 세포 구조는 광학현미경(BX73, Olympus, Japan)이용하여 세포구조 관찰 및 영상자료(DP73, Olympus, Japan)를 확보하였다.

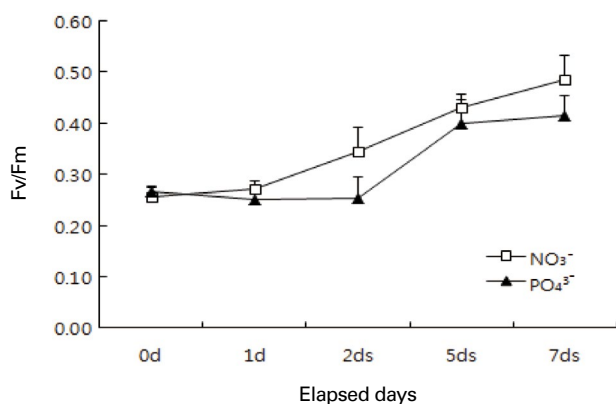
## 결과 및 고찰

황백화가 발생한 김 양식장의 김과 김발은 색이 검붉

은색에서 황색 또는 황녹색으로 퇴색되며, 세포내의 액포비대와 세포간극이 확대되는 특징을 보인다(Ueki *et al.* 2010). 김 엽체의 색택 변화는 붉은색 계통 색소(피코시아닌과 피코에스린)의 감소가 원인이며(Amano and Node 1987; Sakaguchi *et al.* 2003), 이들 색소의 감소는 무기영양

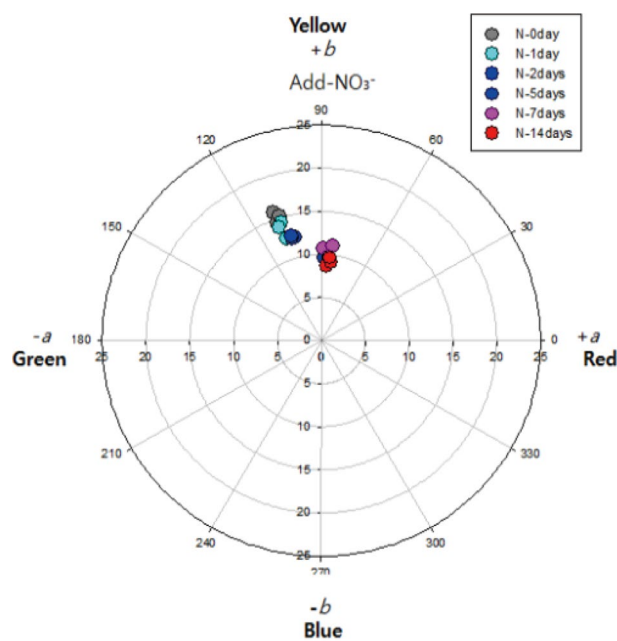


**Fig. 1.** Temporal changes in the photosynthetic yield of *Pyropia yezoensis* from 0 to 12 days cultured in nutrient-deficient medium.



**Fig. 2.** Temporal changes in the photosynthetic yield of *Pyropia yezoensis* from 0 to 7 days cultured in nitrate and phosphate-supplemented medium.

분(질소, 인, 철)의 결핍에 의해 발생한다(Ueki *et al.* 2010). 빈영양 해수에서 황백화 유도를 위해 12일간 배양한 김 엽체의 광합성 효율은 0.56 Fv/Fm에서 0.40 Fv/Fm까지 감소하였다(Fig. 1). 일반해수에서 배양한 대조구 김 엽체의 광합성 효율은 0.55~0.57 Fv/Fm 범위로 나타났다. 영양성분에 따른 황백화 김 엽체의 회복 실험에서  $\text{NO}_3^-$  (300  $\mu\text{M}$ )를 공급한 조건에서는 2일 후부터 광합성 효율이 증가하였으며,  $\text{PO}_4^{3-}$  (30  $\mu\text{M}$ )를 공급한 조건에서는 5일 후부터 광합성 효율이 증가하였다(Fig. 2). 황백화된 김 엽체의 회복 실험에서 광합성 효율은 인산염( $\text{PO}_4^{3-}$ ) 조건보다 질산염( $\text{NO}_3^-$ ) 조건에서 빠르게 회복되는 것으로 나타났다. 이러한 결과에서 무기영양분의 결핍은 김의 광합성 보조색

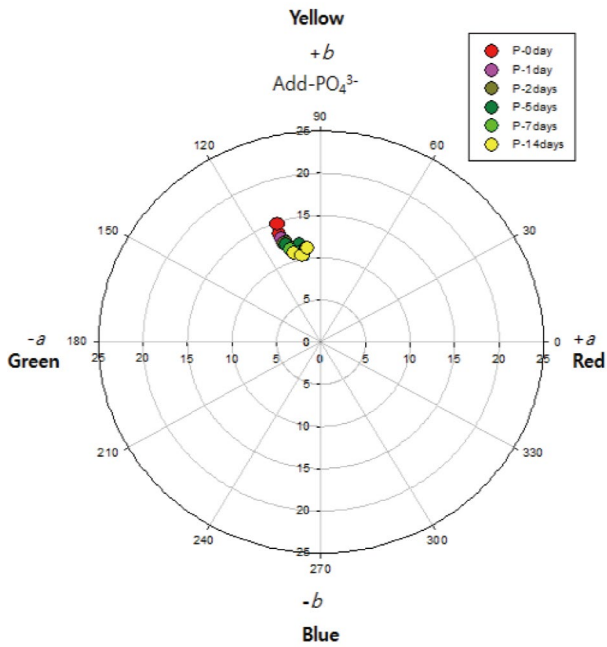


**Fig. 3.** Location of redness (a) and yellowness (b) values on the chromaticity diagram in 0 to 14-day cultures of *Pyropia yezoensis* in nitrate-added medium.

**Table 1.** Summary of mean  $\pm$  S.E. for *L*, *a*, and *b* colorimetry values of *Pyropia yezoensis* from 0 to 14 days cultured in  $\text{NO}_3^-$ -added and  $\text{PO}_4^{3-}$ -added medium.

Parameters		0 day	1 day	2 days	5 days	7 days	14 days	Timely <i>F</i> *
(Lightness)	$\text{NO}_3^-$	84.7 $\pm$ 0.3	86.2 $\pm$ 0.6	85.4 $\pm$ 0.5	80.6 $\pm$ 1.1	79.8 $\pm$ 0.7	81.2 $\pm$ 1.9	3.40*
	$\text{PO}_4^{3-}$	85.9 $\pm$ 0.5	86.7 $\pm$ 0.1	86.1 $\pm$ 0.3	85.3 $\pm$ 0.6	85.3 $\pm$ 0.7	84.4 $\pm$ 0.9	13.0*
<i>a</i> (Redness)	$\text{NO}_3^-$	-5.1 $\pm$ 0.2	-4.4 $\pm$ 0.3	-3.2 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.2	83.9**
	$\text{PO}_4^{3-}$	-4.6 $\pm$ 0.2	-4.2 $\pm$ 0.2	-3.9 $\pm$ 0.2	-3.0 $\pm$ 0.5	-2.9 $\pm$ 0.5	-2.2 $\pm$ 0.4	31.1**
<i>b</i> (Yellowness)	$\text{NO}_3^-$	14.3 $\pm$ 0.4	12.8 $\pm$ 0.6	11.9 $\pm$ 0.1	9.8 $\pm$ 0.3	10.4 $\pm$ 0.4	9.1 $\pm$ 0.3	3.86*
	$\text{PO}_4^{3-}$	12.9 $\pm$ 0.6	11.9 $\pm$ 0.2	11.6 $\pm$ 0.2	11.3 $\pm$ 0.3	10.9 $\pm$ 0.2	10.6 $\pm$ 0.2	-

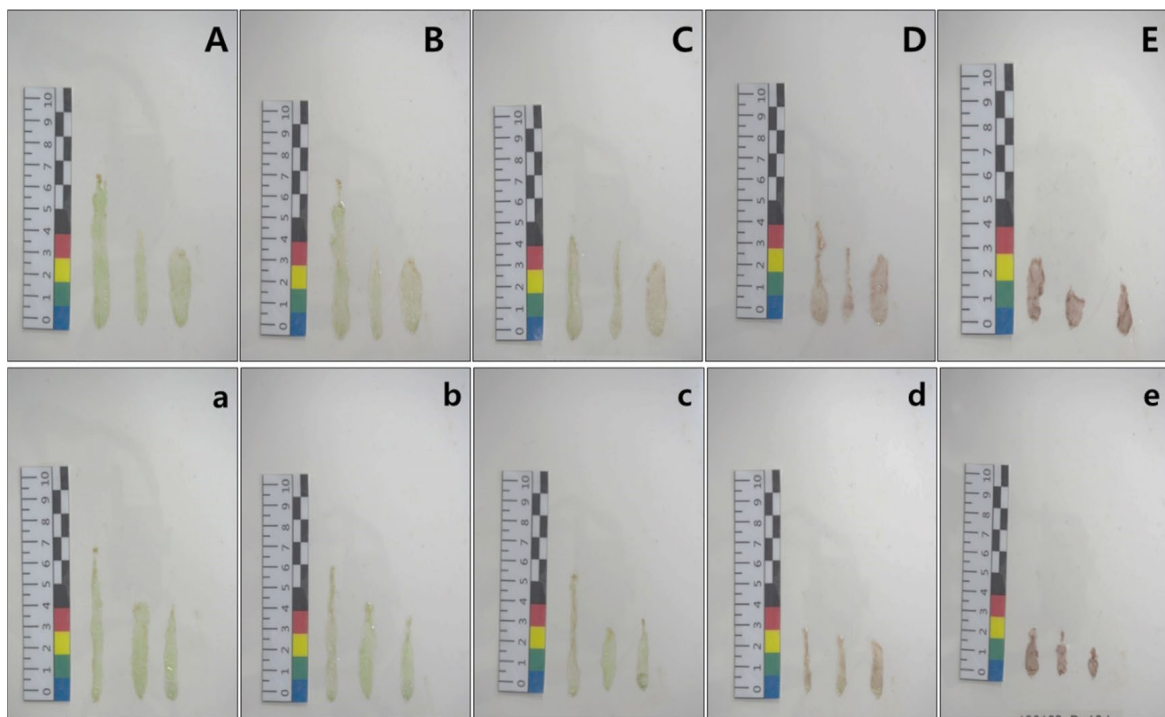
\*: Differences between measuring time are indicated by corresponding one-way ANOVA *F*-values and associated *p*-values. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01



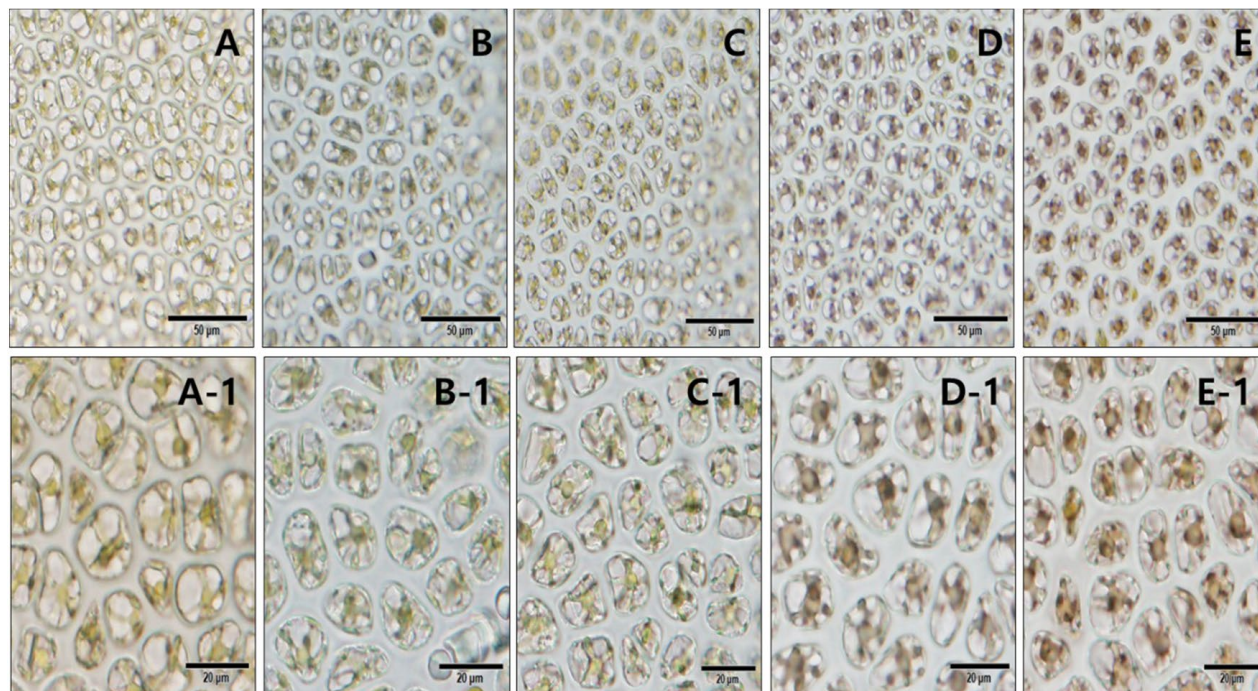
**Fig. 4.** Location of redness (a) and yellowness (b) values on the chromaticity diagram in 0 to 14-day cultures of *Pyropia yezoensis* in phosphate-added medium.

소 합성을 저하시켜 광합성 효율에 영향을 주는 것으로 판단되었다.

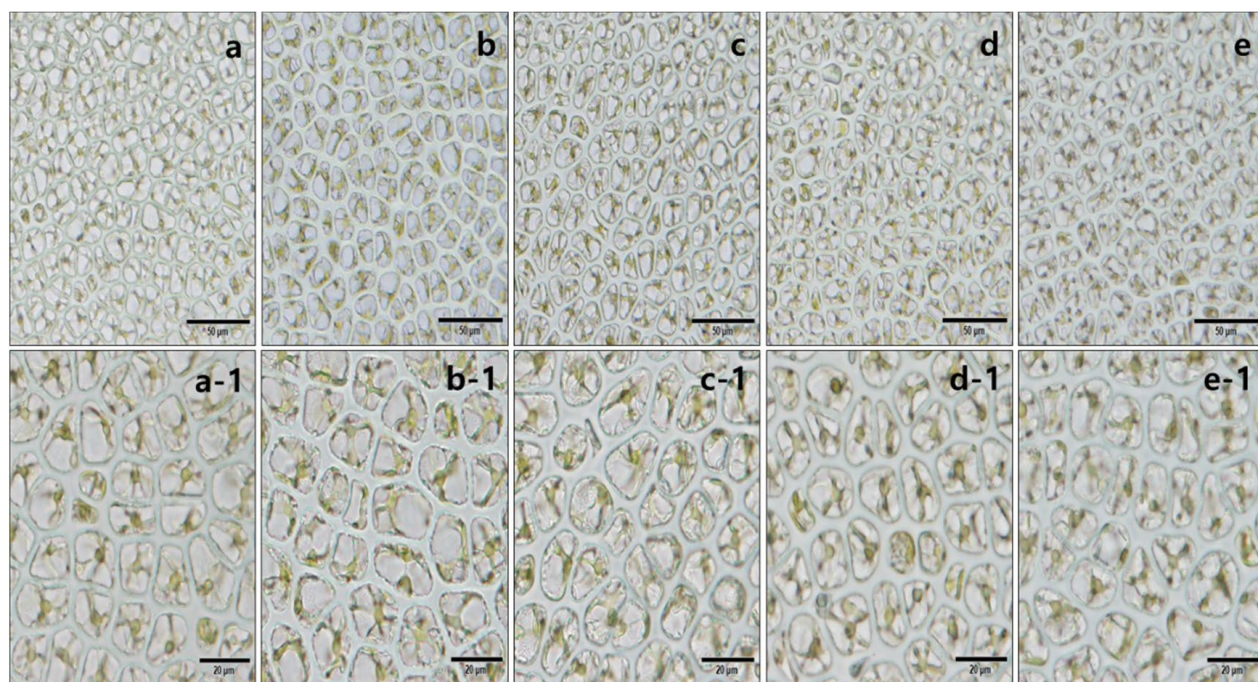
황백화로 인한 김 엽체의 색택 변화는 색차계 값으로 빠르게 판단할 수 있으며, 색차계의 적색지수 값이 2.6 이하와 황색지수 값이 15.0 이상일 때 황백화 김 엽체로 판단하였다 (Lee *et al.* 2018). 본 연구에서는 질산염( $\text{NO}_3^-$ )를 공급한 조건 ( $300 \mu\text{M}$ )에서 적색지수 (a) 값은  $-5.1$ 에서  $0.9$ 로 증가하였으며, 황색지수 (b) 값은  $14.3$ 에서  $9.1$ 로 감소하였다 (Table 1, Fig. 3). 인산염 ( $\text{PO}_4^{3-}$ )을 공급한 조건 ( $30 \mu\text{M}$ )에서는 적색지수 (a) 값은  $-4.6$ 에서  $-2.2$ 로 증가하였으며, 황색지수 (b) 값은  $12.9$ 에서  $10.6$ 로 감소하였다 (Table 1, Fig. 4). 또한 색차계로 측정된 적색지수와 황색지수는 황백화된 김 엽체의 회복을 판단하는 유의한 값으로 판단되었다. 질산염 ( $\text{NO}_3^-$ )를 공급한 조건 ( $300 \mu\text{M}$ )에서 명도 (L), 적색지수 (a)와 황색지수 (b)는 시간에 따른 황백화 회복 정도를 유의하게 판단하였다 (Table 1). 인산염 ( $\text{PO}_4^{3-}$ )을 공급한 조건 ( $30 \mu\text{M}$ )에서는 명도 (L)와 적색지수 (a)는 시간에 따른 황백화 회복 정도를 판단하는데 유의하였으나, 황색지수 (b)는 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table 1).



**Fig 5.** Color recovery of *Pyropia yezoensis* during 14 days of cultivation (A: nitrate 0 day, B: nitrate 1 day, C: 2 days, D: nitrate 5 days, E: nitrate 7 days, a: phosphate 0 day, b: phosphate 1 day, c: phosphate 2 days, d: phosphate 5 days, e: phosphate 7 days).



**Fig. 6.** Light microscopy images of *Pyropia yezoensis* cells cultured in nitrate-added medium (A, A-1: 0 days; B, B-1: 1 day; C, C-1: 2 days; D, D-1: 5 days; E, E-1: 7 days). Scale bars are 50 µm (A–E) and 20 µm (A1–E1).



**Fig. 7.** Light microscopy images of *Pyropia yezoensis* cells cultured in phosphate-added medium (a, a-1: 0 day; b, b-1: 1 day; c, c-1: 2 days; d, d-1: 5 days; e, e-1: 7 days). Scale bars are 50 µm (a–e) and 20 µm (a1–e1).

색차계의 수치화 된 값들은 무기영양분의 공급에 따른 황백화 김 엽체의 회복을 판단하는데 유용하였다(Lee *et al.* 2018).

황백화된 김 엽체는 색소함량 감소, 엽록체 축소, 세포 내 액포 증대와 세포간극 확대의 증상을 나타내는 것으로 알려져 있다(Ueki *et al.* 2010; Lee *et al.* 2018). 본 연구에서는 황백화 유도시 나타난 대표적인 황백화 증상(액포 비대, 색택 변화)이 무기영양분 공급에 따라 정상적으로 회복하는지를 확인하였다. 김 엽체의 색택은 질산염( $\text{NO}_3^-$ )를 공급한 조건( $300 \mu\text{M}$ )에서 2일 경과 후부터 색택 회복이 나타났으며, 인산염( $\text{PO}_4^{3-}$ )을 공급한 조건( $30 \mu\text{M}$ )에서는 5일 경과 후부터 색택 회복이 관찰되었다(Fig. 5). 세포의 구조는 질산염( $\text{NO}_3^-$ )를 공급한 조건( $300 \mu\text{M}$ )에서 2일 경과 후부터 액포 비대가 감소하고 엽록체 증가가 나타났으며(Fig. 6), 인산염( $\text{PO}_4^{3-}$ )을 공급한 조건( $30 \mu\text{M}$ )에서는 5일 경과 후부터 엽록체 증가가 관찰되었다(Fig. 7). 황백화된 김 엽체의 색택과 세포 구조는 무기영양분을 공급 후 배양시간이 경과할수록 정상 김 엽체로 회복되었으며, 인산염( $\text{PO}_4^{3-}$ )보다 질산염( $\text{NO}_3^-$ )을 공급한 조건에서 빠르게 나타났다.

실내실험 결과 황백화 김은 무기영양분이 지속적으로 공급될 경우 영양성분에 따라 차이는 있지만 정상 김 엽체로 회복되었다. 이러한 결과는 김 양식장의 무기영양염 농도에 따른 황백화 발생 예보와 영양염 공급을 통한 황백화 예방에 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

## 적 요

빈영양해수에서 배양하여 황백화를 유도한 김 엽체는  $\text{NO}_3^-$  ( $300 \mu\text{M}$ )와  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $30 \mu\text{M}$ )를 공급하여 시간의 경과에 따른 회복 정도를 분석하였다.  $\text{NO}_3^-$  공급 조건에서는 배양 2일 후부터 김 엽체의 회복이 나타났으며,  $\text{PO}_4^{3-}$  공급 조건에서는 배양 5일 후부터 김 엽체의 회복이 관찰되었다. 색차계의 수치화 된 값들은 황백화 김 엽체의 회복을 판단하는데 유용하였다. 황백화 김은 무기영양분의 공급으로 비대한 액포가 축소되고, 색택이 회복되는 것으로 나타났다.

## 사 사

본 논문은 2019년도 국립수산물과학원의 연구비 지원

(R2019009)으로 수행된 연구이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Amano H and H Noda. 1987. Effect of nitrogenous fertilization on the recovery of discolored fronds of *Porphyra yezoensis*. Bot. Mar. 30:467-473.
- Hori Y, S Mochizuki and N Shimamoto. 2008. Relationship between the discoloration of cultivated *Porphyra* Thalii and long-term changes of the environmental factors in the northern part of Harima-nada, Eastern Seto Inland Sea, Japan. Bull. Jpn. Soc. Fish. Oceanogr. 72:107-112.
- Hwang MS and IK Lee. 2001. Taxonomy of the Genus *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) from Korea. Algae 16:233-273.
- Ishii M, K Hasegawa and Y Matsuyama. 2008. Environmental factors influencing *Porphyra* (Nori) farming in Tokyo Bay: Long-term changes in inorganic nutrient and recent proliferation of diatoms. Bull. Jpn. Soc. Fish. Oceanogr. 72:22-29.
- Kang JW. 1970. Species of cultivated *Porphyra* in Korea. Kor. J. Fish Aquat. Sci. 3:77-92.
- Kang JW and NP Koh. 1977. Seaweed Cultivation. Korea Textbook Co. Ltd. Press. Busan.
- Lee SY, YH Kim, JE Lee and EK Hwang. 2018. Evaluation of the discoloration of *Pyropia yezoensis* Ueda using a colorimeter. Korean J. Environ. Biol. 36:620-625.
- Matsuoka S, S Yoshimatsu, A Ono, K Ichim, M Fujiwara, K Honada and K Tasa. 2005. Discoloration of Nori (*Porphyra*) and characteristics of water quality in Eastern Bisan Seto. Bukk. Coast. Oceanogr. 43:77-84.
- MOF. 2019. Fisheries Statistics. Ministry of Oceans and Fisheries. Sejong, Korea. <http://www.fips.go.kr/p/S020304/>. Accessed 20: Sep 2019.
- NFRDI. 2015. Report of NFRDI 2014 Projects (Study on the chlorosis phenomena in cultivated *Phyropia*). National Fisheries Research and Development Institute. Busan. p. 50.
- Nishikawa T and M Yamaguchi. 2006. Effect of temperature on light-limited growth of the harmful diatom *Eucampia zodiacus* Ehrenberg, a causative organism in the discoloration of *Porphyra* thalli. Harmful Algae 5:141-147.
- Pereira R, G Kraemer, C Yarish and I Sousa-pinto. 2008. Nitrogen uptake by gametophytes of *Porphyra dioica* (Bangiales, Rhodophyta) under controlled-culture conditions. Eur. J. Phycol. 43:107-118.
- Sakaguchi KN, N Ochiai, CS Park, M Kakinuma and H Amano. 2003. Evaluation of discoloration in harvested laver *Porphyra yezoensis* and recovery after treatment with ammonium sulfate enriched seawater. Nippon Suisan Gakkaishi 69:399-404.

Tanda M and K Harada. 2012. Nutrient environment production in Harimananda, Eastern Seto Inland, Japan. *Aquat. Biol.* 34:132–141.

Ueki C, A Murakami, T Kato, N Saga and T Motomura. 2010. Effects of nutrient deprivation on photosynthetic pigments and

ultrastructure of chloroplast in *Porphyra yezoensis*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 76:375–382.

Yoshida T, M Notoya, N Kikuchi and M Mitaya. 1997. Catalogue of species of *Porphyra* in the world, with special reference to the type locality and bibliography. *Nat. Hist. Res.* 3:5–18.