



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2022년 2월

석사학위 논문

완도 해조상 및
대형 갈조식물 원형질체(protoplast)
배양에 관한 연구

조선대학교 대학원

글로벌바이오융합학과

최 광 철

완도 해조상 및
대형 갈조식물 원형질체(protoplast)
배양에 관한 연구

**Studies on the Seaweed Flora of Wando
and Cultivation of Protoplasts in Brown Macroalgae**

2022년 2월 25일

조선대학교 대학원

글로벌바이오융합학과

최 광 철

완도 해조상 및
대형 갈조식물 원형질체(protoplast)
배양에 관한 연구

지도교수 조태오

이 논문을 이학석사학위 신청 논문으로 제출함

2021년 10월

조선대학교 대학원

글로벌바이오융합학과

최 광 철

최광철의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 송상기 (인)

위 원 조선대학교 교수 이한용 (인)

위 원 조선대학교 교수 조태오 (인)

2021년 12월

조선대학교 대학원

목차

LIST OF TABLES	III
LIST OF FIGURES	IV
ABSTRACT	V
Part I . 완도군 정도리 조간대 해조류의 계절별 종 다양성 조사	1
1. 서론	1
2. 재료 및 방법	4
2.1. 조사 일정과 조사 지역	4
2.2. 해조류 채집, 운반과 처리	7
2.3. 종조성과 기능형군	7
2.4. C/P, R/P, (C+R)/P 값	8
2.5. 군집의 중요도	8
3. 결과	9
3.1. 종조성	9
3.2. 기능형군	14
3.3. C/P, R/P, (C+R)/P	16
3.4. 우점도	18
4. 고찰	20

**PART II. 감태(*Ecklonia cava*)의 포자체로부터
원형질체(protoplast)를 분리하는 최적 조건 연구 24**

1. 서론24

2. 재료 및 방법27

 2.1. 감태 포자체 확보27

 2.2. 원형질체 분리 최적 조건 및 **significant factors** 확인28

 3.1. 엽체의 크기와 원형질체 분리 최적화와의 관계31

3. 결과32

 3.2. 감태 포자체의 발생.....32

 3.3. 원형질체 분리의 최적화 조건34

 3.4. **Significant factors**의 확인36

 3.5. 엽체의 크기와 원형질체 분리 최적화와의 관계38

4. 고찰40

5. 참 고문헌44

LIST OF TABLES

Table 1. A list of marine benthic algae investigated seasonally in Jeongdo-ri, Wando.....	10
Table 2. Total species number of seaweed functional form in four seasons collected in Jeongdo-ri, Wando.	15
Table 3. Comparisons of flora characteristics ratio in Jeongdo-ri, Wando.....	17
Table 4. Major species based on the total biomass at Jeongdo-ri, Wando. (IV \geq 10).....	19
Table 5. Level of factors used in split-plot design for protoplast production from <i>Ecklonia</i> <i>cava</i> sporophytes	30

LIST OF FIGURES

Fig. 1. The map showing sampling sites in Jeongdo-ri of Korea	5
Fig. 2. Seasonal change of seawater in average surface seawater temperature, DO, salinity (data from KHOA, NIFS)	6
Fig. 3. Protoplast isolation from <i>Ecklonia cava</i>	33
Fig. 4. Protoplast yield from <i>Ecklonia cava</i> sporophyte obtained using different enzyme combinations with chelation pretreatment (20 mM EGTA)	35
Fig. 5. Pareto chart drawn plot of the standardized effects and Normal probability plot of the standardized effects for protoplast yield from <i>Ecklonia cava</i> sporophyte.....	37
Fig. 6. The average of protoplast yield from <i>Ecklonia cava</i> sporophyte obtained using thallus fragments of various size.	39

ABSTRACT

A study on the Seaweed Flora of Wando and Cultivation of Protoplast in Brown Macroalgae

Gwang Chul Choi

Advisor: Prof. Tae Oh Cho, Ph.D.

Department of Integrative Biological Science

Graduate School of Chosun University

In this study, I investigated the diversity of seaweeds and their changes in the coastal rocky area of Jeongdo-ri, Wando-Gun, Korea from 2019 to 2020. 135 species were identified based on morphological and molecular approaches. Sheet forms, filamentous forms and coarsely branched forms, which are ESG (ecological state group) II, were more than 60% in all seasons using Litter and Litter (1984) and Orfanidis et al. (2001). Using a 50 × 50 cm² quadrat method, it was identified that seasonal dominant species (highest value of IV) in upper, middle and lower areas of intertidal zone are *Gloiopeltis furcata*, *Monostroma nitidum* and *Chondracanthus tenellus* in winter; *Ulva australis*, *Corallina pilulifera* and *Corallina pilulifera* in spring; *Ulva australis*, *Sargassum fusiforme* and *Chondracanthus tenellus* in summer; *Chondracanthus intermedius*, *Chondria crassicaulis*, *Chondracanthus tenellus* in fall.

Ecklonia cava, a large brown alga, is in the spotlight as a major species that creates artificial sea forests in coastal ecosystem restoration programs and is mentioned as a candidate for drug development using extracts such as fucoidan and phlorotannin for liver, heart, nerve protection, and immunity. Various studies are being conducted on compound production and modification using *E. cava*. Recently, protoplast culture has been used as a method for

cultivating seaweed in large quantities. This study was planned to develop a new aquaculture method by mixing enzymes and chelate pretreatment agents to find optimal conditions for separating protoplasts from sporophytes of *E. cava*. Through this study, I determined the optimal conditions for protoplast preparation such as mixing enzymes, chelate pretreatment, pH / time / temperature for incubation, osmotic pressure, proper thallus fragment size, etc., which are the main factors of protoplast separation, were derived. The results of this study are expected to be used in aquaculture to produce *E. cava*, that would create artificial marine forests, and secure biological quantities.

Part I. 완도군 정도리 조간대 해조류의 계절별 종 다양성 조사

1. 서론

오래전부터 해조류를 식량으로 이용하고 있는 한국에서 해조류는 중요한 자원이었고, 한국 해조류 다양성에 대한 연구는 1966년부터 시작하여 다양한 방법과 장소에서 이루어졌다(Kang 1966, Kim & Lee 1985, Lee & Kang 1986, Lee 2001, Lee & Lee 1990, Park & Kim 1990, Yoo et al. 1996). 생물다양성의 중요성이 부각되면서, 해조상 연구도 중요하게 여겨지고 있다. 해조류는 부착생물이기 때문에 서식지의 환경변화에 빠르게 반응하여, 해양생태계의 환경변화를 예측하는 지표로 사용된다(Kim et al. 2013). 특정 지역의 해조상 연구는 그 지역의 해양생태계와 해양 환경에 대해 파악하는 생물학적 지시자로 사용할 수 있으며(Wells et al. 2007), 주기적인 연구는 해조상 및 해양생태계의 변화를 파악하여 환경의 변화를 관찰하는 표본으로 사용할 수 있는 장점이 있다. 환경변화로 인한 해조상 변화에 대한 연구는 전 세계적으로 수행되고 있고, 지구 온난화로 인한 수온상승과 해양 산성화 또한 해조류에 영향을 주는 것으로 확인되었다(Augyté & haughnessy 2014). 한국에는 지구온난화 등 다양한 요소로 인한 해조류 다양성의 변화에 대비하여 앞으로의 해조상 연구들을 위해 해조상에 대한 자료를 축적하여 보관하는 것이 필요하다(Orfanidis et al. 2001, Diaz-Pulido et al. 2011, Roleda et al. 2012).

한국의 남해안은 해안선이 복잡해 지역마다 수온, 염도 등이 달라 서식하는 해조류의 종조성에 차이가 있다(Kang 1966, Sohn 1987, Choi 1992). 해조류의 종조성에

차이가 있음에 따라 해조상의 특징에도 차이를 볼 수 있는데, Choi (2008)의 광양만 조사에서는 온대성 해조상이 나타난다고 판단하였고, Yoo et al. (2014)은 정자도의 해조상은 혼합성 해조상으로 특정하였으며, Oh (2015)는 한려해상국립공원의 9개의 정점이 한대성에서 혼합성까지 다양한 형태를 보인다고 보고하였고, Han et al. (2018)은 남해의 4개 해역에서 혼합성 해조상과 열대성 해조상이 나타난다고 보고하였다.

전라남도 완도군은 대한민국의 남해안에 위치하고 있으며 주변에 170여 개의 유인 및 무인도서와 함께 다도해해상국립공원에 포함되어 있다. 완도의 정도리는 해조류들의 다양성이 풍부한 지역 중 하나이다. 이 지역에 대한 해조상의 연구는 Kang (1966)이 116종을 소개하였고, Lee et al. (1983)은 하계 해조상을 조사하여 146종을 보고하였다. Choi et al. (1989)은 완도군 정도리에 총 119종을, Choi and Moon (2000)이 동계 기간에 87종을 동정하였으며, Jang (2012)은 정도리를 포함한 7개의 지역에서 연구를 수행하였으며, 정도리의 조간대 지역에서 30종 조하대 지역에서 38종으로 총 53종을 보고하였다. 또한, Choi and Moon (2000)이 상부에서 불등풀가사리 (*Gloiopeltis furcata*), 중부에서 툃(*Sargassum fusiforme*), 하부에서 참보라색우무 (*Symphocladia latiuscula*)를 우점종으로 보고하였다. Jang (2012)은 계절별 우점종으로 춘계는 지충이(*Sargassum thunbergii*)를, 하계에서는 우뭇가사리(*Gelidium amansii*)를, 추계에는 서실(*Chondria crassicaulis*), 동계에서는 툃(*Sargassum fusiforme*)으로 보고하였다. 또한, Jang (2012)은 해조상을 특정하는 지표들(Feldmann 1937, Segawa 1956, Cheney 1977)을 사용하여 조사지점의 해조상을 파악하였고, 정도리는 혼합형 해조상을 나타낸다고 보고하였지만, 이후 완도군 정도리의 해조상을 사계절 동안 집중적으로 조사한 연구는 없었다.

본 연구는 완도군 정도리를 사계절에 걸쳐 집중적으로 조사하여 조간대에 분포하는 해조류들의 특징과 계절별 해조상을 정리하고 빈도와 피도를 이용해 우점

종들을 파악하여 기존의 연구들과 비교하여 완도군 정도리의 해조류 다양성 변화 및 생물량 변동을 파악하는데 있다.

2. 재료 및 방법

2.1. 조사 일정과 조사 지역

본 연구는 전라남도 완도군 정도리의 암반지역(34°17'45.98"N, 126°42'05.26"E)에서 2020년 2월부터 2020년 11월까지 4번에 걸쳐 계절별로 수행되었다(Fig. 1). 조사 날짜의 평균 표층 수온, 용존산소량(DO), 염도는 국립수산과학원과 국립해양조사원의 자료를 참조하였다(Fig. 2).

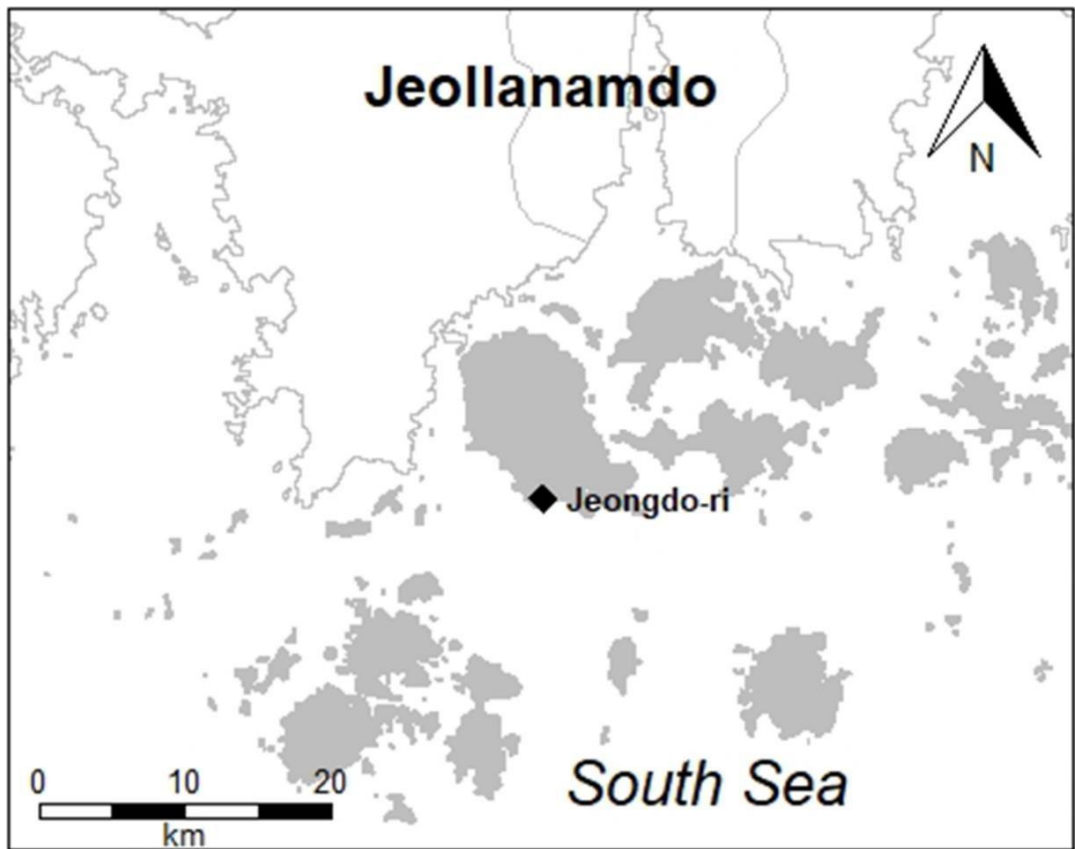


Fig. 1. The map showing sampling sites in Jeongdo-ri of Korea

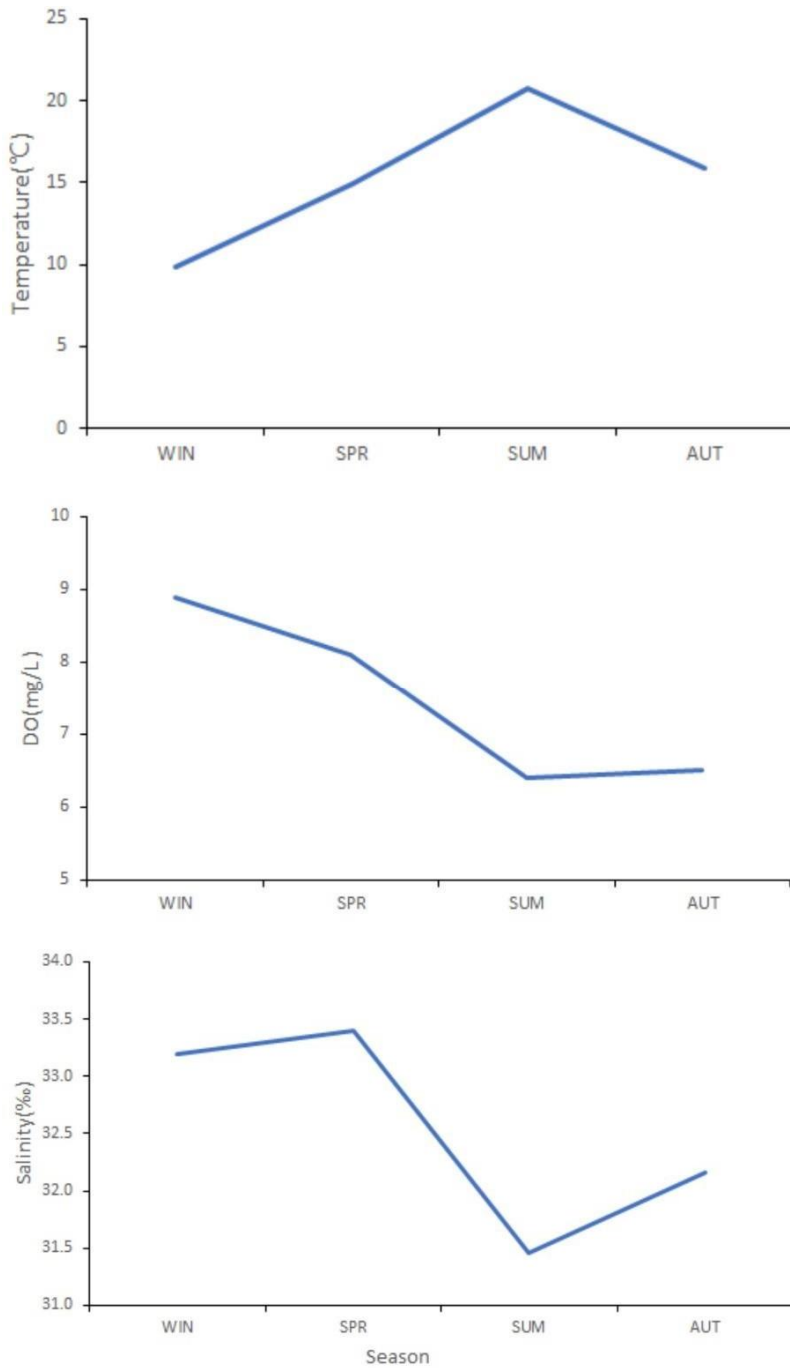


Fig. 2. Seasonal change of seawater in average surface seawater temperature, DO, salinity (data from KHOA, NIFS).

2.2. 해조류 채집, 운반과 처리

식물상 연구는 정도리 암반지역에 서식하는 해조류들의 종 다양성을 파악하기 위해 조간대 지역과 조수 웅덩이에서 수행되었으며 생육하는 해조류 각 종들을 직접 채집하여 아이스박스에 넣은 후 실험실로 운반하였다. 각 개체들의 부패를 방지하기 위해 5% 포르말린-해수용액으로 고정한 후 각 종들의 형태학적 특징들을 기록하며 동정을 진행하였다. 동정을 마친 해조류들은 건조표본, 슬라이드표본을 제작하여 보관하였다. 추후 분자학적 연구를 위해 각 개체들을 채집 후 일부를 떼어내어 Silicagel blue(Medium granular) (대정화금)과 함께 보관하였다.

2.3. 종조성과 기능형군

해조류 동정은 외부형태적 특징과 내부구조에 기반하여 이루어졌으며, 각 종들은 엽체의 특징에 따라 엽상형(sheet form), 사상형(filamentous form), 성긴분기형(coarsely branched form), 각상형(crustose form), 유절산호말형(jointed calcareous form), 다육질형(thick leathery form)의 6가지 그룹으로 구분하였다(Littler & Littler 1984). 해조류의 기능형을 기반으로 생물학적 상태그룹 ESG(Ecological State Group) I(sheet form, filamentous form, coarsely branched form), ESG II(crustose form, jointed calcareous form, thick leathery form)로 구분하였다(Orfanidis et al. 2001, Orfanidis et al. 2003).

2.4. C/P, R/P, (C+R)/P 값

해조상의 특성을 파악하기 위한 지수로 갈조류에 대한 녹조류의 비(C/P), 갈조류에 대한 홍조류의 비(R/P), 갈조류에 대한 녹조류와 홍조류 합 의 비(C+R/P)를 확인하였다(Feldmann 1937, Segawa 1956, Cheney 1977).

2.5. 군집의 중요도

출현하는 종들의 생물량과 생태적 지위를 살펴보고자 50 × 50 cm² 방형구를 이용하여 정량조사를 실시하였다. 방형구 조사는 조간대 해조류들이 다양하게 출현하며, 일정한 경사를 가지고, 평탄한 지역에서 진행되었다. 조사지역을 가장 높은 지점을 기준으로 0-4 m를 상부, 4-9 m를 중부, 9 m부터를 하부로 구분하였고, 각 구 역마다 무작위로 방형구를 3번씩 놓아 방형구 조사를 진행하였다. 본 조사를 통해 빈도(F)와 피도(C)를 조사하여 상대빈도(RF), 상대피도(RC)를 도출한 다음 이들의 산술평균을 구하여 중요도(IV)를 측정하여 우점종을 파악하였다(Mueller-Dombois D & Ellenberg H. 1974, Yoo & Lee 1980).

$$\text{빈도(F)} = \{\text{출현종(i)이 있는 방형구의 수} / \text{세분된 소 방형구의 수}\} \times 100$$

$$\text{피도(C)} = \{\text{출현종(i)이 차지하는 면적} / \text{방형구의 면적}\} \times 100$$

$$\text{상대빈도(RF)} = (\text{i종의 빈도 합} / \text{전 종의 빈도 합}) \times 100$$

$$\text{상대피도(RC)} = (\text{i종의 피도 합} / \text{전 종의 피도 합}) \times 100$$

$$\text{중요도(IV)} = (\text{RC} + \text{RF}) / 2$$

3. 결과

3.1. 종조성

본 연구기간에 완도군 정도리 조간대 암반지역에 출현한 해조류는 총 135종으로 녹조류 13종(9.6%), 갈조류 18종(13.3%), 홍조류 104종(77%)으로 홍조류가 가장 많이 출현하였다. 계절별 출현 종수는 겨울철에 총 74종으로 녹조류 9종, 갈조류 12종, 홍조류 53종이 출현하였고, 봄에 총 86종으로 가장 많았으며, 녹조류 7종, 갈조류 14종, 홍조류 65종이 동정되었고, 여름에 녹조류 5종, 갈조류 5종, 홍조류 54종, 총 64종으로 가장 적었고, 가을철의 출현 종수는 총 75종으로 녹조류 7종, 갈조류 11종, 홍조류 57종을 동정하였다. 계절별 출현 종수의 비율은 녹조류 5 - 9종(7.8% - 12.2%), 갈조류 5 - 14종(7.8% - 16.3%), 홍조류 53 - 65종(71.6% - 84.4%)로 홍조류의 비율이 가장 높았다. 완도군 정도리에서 연중 출현한 해조류는 녹조류 3종, 갈조류 4종, 홍조류 22종으로 총 29종이었다(Table 1).

Table 1. A list of marine benthic algae investigated seasonally in Jeongdo-ri, Wando.

Species	Season			
	Winter	Spring	Summer	Autumn
Chlorophyta				
<i>Bryopsis plumosa</i>			+	+
<i>Cladophora albida</i>	+			+
<i>Cladophora stimpsonii</i>	+			
<i>Codium fragile</i>		+		
<i>Codium hubbsii</i>		+	+	+
<i>Monostroma crassidermum</i>	+			
<i>Monostroma nitidum</i>	+	+		
<i>Monostroma</i> sp.	+			
<i>Ulva australis</i>	+	+	+	+
<i>Ulva compressa</i>	+	+	+	+
<i>Ulva conglobata</i>	+	+	+	+
<i>Ulva linza</i>	+	+		
<i>Ulva taeniata</i>				+
Ochrophyta-phaeophyceae				
<i>Acinetospora asiatica</i>	+	+		
<i>Colpomenia peregrina</i>		+		+
<i>Colpomenia sinuosa</i>	+			
<i>Dictyota dichotoma</i>		+		+
<i>Feldmannia irregularis</i>		+		
<i>Ishige foliacea</i>	+			
<i>Ishige okamurae</i>	+	+		+
<i>Myelophycus simplex</i>	+	+	+	+
<i>Planosiphon gracilis</i>	+			
<i>Rugulopteryx okamurae</i>	+	+		+
<i>Sargassum fusiforme</i>	+	+	+	+
<i>Sargassum horneri</i>		+		
<i>Sargassum macrocarpum</i>			+	+
<i>Sargassum micracanthum</i>	+	+		+
<i>Sargassum muticum</i>		+		+
<i>Sargassum thunbergii</i>	+	+	+	+
<i>Scytosiphon lomenteria</i>	+	+		
<i>Sphacelaria fusca</i>	+	+	+	+

Table 1. (continued)

Species	Season			
	Winter	Spring	Summer	Autumn
Rhodophyta				
<i>Acrosorium ciliolatum</i>	+	+	+	+
<i>Acrosorium polyneurum</i>	+	+	+	+
<i>Acrosorium yendoi</i>	+	+	+	+
<i>Agarophyton vermiculophylla</i>		+		
<i>Ahnfeltiopsis flabelliformis</i>	+	+	+	+
<i>Alatocladia modesta</i>	+	+	+	+
<i>Amphiroa anceps</i>		+		
<i>Amphiroa beauvoisii</i>			+	+
<i>Asparagopsis taxiformis</i>			+	
<i>Calliblepharis saidana</i>		+		
<i>Callophyllis adhaerens</i>				+
<i>Callophyllis adnata</i>	+	+	+	+
<i>Callophyllis japonica</i>		+	+	+
<i>Callophyllis rhynchocarpus</i>			+	
<i>Caulacanthus ustulatus</i>	+	+	+	+
<i>Centroceras gasparrinii</i>	+		+	+
<i>Ceramium boydenii</i>	+		+	+
<i>Ceramium diaphanum</i>	+	+		+
<i>Ceramium japonicum</i>	+	+		+
<i>Chondracanthus intermedius</i>		+	+	+
<i>Chondracanthus tenellus</i>	+	+	+	+
<i>Chondria crassicaulis</i>	+	+	+	+
<i>Chondrophycus cartilagineus</i>			+	+
<i>Chondrus canaliculatus</i>			+	
<i>Chondrus nipponicus</i>			+	+
<i>Chondrus ocellatus</i>	+	+	+	+
<i>Chondrus sp.</i>		+		
<i>Chondrus verrucosus</i>	+	+	+	+
<i>Colaçonema codicola</i>		+		
<i>Corallina aberrans</i>		+	+	+
<i>Corallina crassisima</i>	+	+	+	
<i>Corallina ferreyrae</i>		+		+
<i>Corallina officinalis</i>	+	+	+	
<i>Corallina pilulifera</i>	+	+	+	+
<i>Cryptonemia palmetta</i>		+	+	

Table 1. (continued)

Species	Season			
	Winter	Spring	Summer	Autumn
Rhodophyta				
<i>Dasya collabens</i>				+
<i>Dasyclonium</i> sp.		+		
<i>Dumontia simplex</i>	+	+		
<i>ErythroGLOSSUM minimum</i>		+	+	
<i>Fushitsunagia catenata</i>		+	+	+
<i>Gelidium amansii</i>		+		
<i>Gelidium australe</i>			+	
<i>Gelidium coreanum</i>	+			
<i>Gelidium divaricatum</i>	+	+	+	+
<i>Gelidium elegans</i>	+	+	+	+
<i>Gelidium jejuensis</i>				+
<i>Gloiopeltis complanata</i>	+	+		
<i>Gloiopeltis furcata</i>	+	+	+	+
<i>Gloiopeltis tenax</i>		+	+	
<i>Gloiosiphonia capillaris</i>	+			
<i>Gracilaria cuneifolia</i>				+
<i>Gracilaria parvispora</i>				+
<i>Gracilaria</i> sp.	+	+		
<i>Gracilaria textorii</i>		+	+	
<i>Grateloupia acuminata</i>	+			
<i>Grateloupia asiatica</i>	+	+		+
<i>Grateloupia chiangii</i>	+	+	+	+
<i>Grateloupia constricta</i>	+			
<i>Grateloupia elata</i>	+		+	+
<i>Grateloupia elliptica</i>	+	+	+	+
<i>Grateloupia imbricata</i>			+	+
<i>Grateloupia patens</i>	+			
<i>Grateloupia</i> sp.		+		
<i>Grateloupia turuturu</i>	+	+		+
<i>Griffithsia japonica</i>				+
<i>Herpochondria corallinae</i>	+	+	+	+
<i>Herpochondria dentata</i>		+		
<i>Herpochondria elegans</i>	+			+
<i>Heterosiphonia pulchra</i>		+	+	+

Table 1. (continued)

Species	Season			
	Winter	Spring	Summer	Autumn
Rhodophyta				
<i>Hypnea asiatica</i>			+	+
<i>Hypnea cervicornis</i>	+			
<i>Hypnea pannosa</i>			+	
<i>Jania adhaerens</i>	+		+	+
<i>Jania rubens</i>	+		+	
<i>Jania</i> sp.	+			
<i>Laurencia obtusa</i>	+	+	+	+
<i>Laurencia pinnata</i>		+		
<i>Laurencia pumila</i>		+		
<i>Laurencia venusta</i>		+		+
<i>Lithophyllum</i> sp.1			+	
<i>Lithophyllum</i> sp.2			+	
<i>Lomentaria flaccida</i>	+	+		
<i>Neosiphonia japonica</i>		+		
<i>Neosiphonia simplex</i>	+			
<i>Neosiphonia</i> sp.		+		
<i>Pachymeniopsis lanceolata</i>		+	+	
<i>Palisada flagellifera</i>			+	+
<i>Palisada intermedia</i>			+	
<i>Peyssonellia</i> sp.	+	+		+
<i>Peyssonellia</i> sp.2.				+
<i>Phycocalidia suborbiculata</i>	+	+		+
<i>Pleonosporium pusillum</i>	+	+		+
<i>Pleonosporium segawae</i>		+		+
<i>Pleonosporium</i> sp.	+			
<i>Plocamium telfairiae</i>	+	+	+	+
<i>Pneophyllum zostericola</i>		+		
<i>Polyopes affinis</i>	+	+	+	+
<i>Polysiphonia morrowii</i>	+			
<i>Pterocladia capillace</i>		+	+	+
<i>Symphyocladia latiuscula</i>	+	+	+	+
<i>Symphyocladia linearis</i>	+			
<i>Symphyocladia</i> sp.		+		
<i>Wrangelia plumosa</i>				+

3.2. 기능형군

출현한 해조류 135종을 6개의 기능형으로 구분하면, 엽상형(sheet form) 20종(14.8%), 사상형(filamentous form) 24종(17.8%), 성긴분기형(coarsely branched form) 53종(39.3%), 각상형(crustose form) 5종(3.7%), 유절산호말형(jointed calcareous form) 11종(8.1%), 다육질형(thick leathery form) 22종(16.3%)으로 성긴분기형이 가장 많았다. 계절별로 구분하였을 때, 겨울에는 총 74종 중 엽상형 13종(17.6%), 사상형 13종(17.6%), 성긴분기형 29종(39.2%), 각상형 1종(1.4%), 유절산호말형 7종(9.4%), 다육질형 11종(14.8%)으로 분류되었고, 봄에는 86종 중 엽상형 16종(18.6%), 사상형 15종(17.5%), 성긴분기형 32종(37.2%), 각상형 2종(2.3%), 유절산호말형 7종(8.1%), 다육질형 14종(16.3%)이 나타났고, 여름에 64종 중 엽상형 11종(17.2%), 사상형 6종(9.4%), 성긴분기형 25종(39.1%), 각상형 2종(3.1%), 유절산호말형 8종(12.5%), 다육질형 12종(18.7%)이 출현하였으며, 가을은 75종 중 엽상형 13종(17.3%), 사상형 13종(17.3%), 성긴분기형 28종(37.3%), 각상형 2종(2.7%), 유절산호말형 6종(8%), 다육질형 13종(17.3%)이었다.

135종 중에 ESG I에 속하는 종(sheet form, filamentous form, coarsely branched form)은 97종(71.9%)이고, ESG II에 속하는 종(crustose form, jointed calcareous form, thick leathery form)은 38종(28.1%)이었다(Table 2). 계절별로 보면 겨울철에 출현하는 74종 중 ESG I에 속하는 종은 19종이고 ESG II에 속하는 종은 55종으로 분류되었고, 봄에 출현하는 86종 중 ESG I에 속하는 종은 23종이고 ESG II에 속하는 종은 63종이 나타났고, 여름철에 출현하는 64종 중 ESG I에 속하는 종은 22종이고 ESG II에 속하는 종은 42종이고, 가을에 출현하는 75종 중 ESG I에 속하는 종은 21종이고 ESG II에 속하는 종은 54종이었다.

Table 2. Total species number of seaweed functional form in four seasons collected in Jeongdo-ri, Wando. (S; Sheet form, F; Filamentous form, CB; Coarsely branched form, C; Crustose form, JC; Jointed calcareous form, TL; Thick leathery form)

F-form	Winter	Spring	Summer	Autumn	Total
S	13(17.6%)	16(18.6%)	11(17.2%)	13(17.3%)	20(14.8%)
F	13(17.6%)	15(17.5%)	6(9.4%)	13(17.3%)	24(17.8%)
CB	29(39.2%)	32(37.2%)	25(39.1%)	28(37.3%)	53(39.3%)
C	1(1.4%)	2(2.3%)	2(3.1%)	2(2.7%)	5(3.7%)
JC	7(9.4%)	7(8.1%)	8(12.5%)	6(8%)	11(8.1%)
TL	11(14.8%)	14(16.3%)	12(18.7%)	13(17.3%)	22(16.3%)
Total	74(100%)	86(100%)	64(100%)	75(100%)	135(100%)

3.3. C/P, R/P, (C+R)/P

해조상의 특성을 파악하기 위해 갈조류에 대한 녹조류의 비(C/P), 갈조류에 대한 홍조류의 비(R/P), 갈조류에 대한 녹조류와 홍조류 합계의 비(C+R/P)를 구한 값을 보면 겨울에는 C/P값이 0.8, R/P값은 4.4, (C+R)/P값은 5.2이었고, 봄의 C/P값은 0.5, R/P값이 4.6, (C+R)/P값은 5.1로 가장 낮았고, 여름에는 C/P값이 1, R/P값은 10.8, (C+R)/P값은 11.8로 가장 높았으며, 가을의 C/P값은 0.6, R/P값은 5.2, (C+R)/P값이 5.8으로 평균 C/P값은 0.7, R/P값은 5.8, (C+R)/P값은 6.5로 나타났다(Table 3).

Table 3. Comparisons of flora characteristics ratio in Jeongdo-ri, Wando. (C; Chlorophyta, P; Phaeophyceae, R; Rhodophyta)

	C/P	R/P	C+R/P
Winter	0.8	4.4	5.2
Spring	0.5	4.6	5.1
Summer	1.0	10.8	11.8
Autumn	0.7	5.2	5.8
Average	0.7	5.8	6.5

3.4. 우점도

우점도는 빈도(F), 피도(C), 상대빈도(RF), 상대피도(RC)의 값을 이용하여 중요 값(Important Value, $IV \geq 10$)을 산출하였다. 완도군 정도리 조간대의 구역별 우점종은 겨울철 상부에서 불등풀가사리(*Gloiopeltis furcata*)가 52.9%, 중부에서 참흄파래(*Monostroma nitidum*)는 32.9%, 하부에서 돌가사리(*Chondracanthus tenellus*)가 25.6%로 우점하였고, 봄에서 상부는 구멍갈파래(*Ulva australis*)가 38.6%, 중부와 하부는 작은 구슬산호말(*Corallina pilulifera*)이 각각 38.2%와 24.3%로 우점하였으며, 여름철의 상부에서는 구멍갈파래(*Ulva australis*)가 26.6%, 중부에서 지충이(*Sargassum fusiforme*)가 27.1%, 하부에서는 돌가사리(*Chondracanthus tenellus*)가 29.6%로 우점하였다. 가을철의 우점종으로는 상부에서 애기돌가사리(*Chondracanthus intermedius*)가 47.9%, 중부에서 서실(*Chondria crassicaulis*)이 44.1%, 하부는 돌가사리 (*Chondracanthus tenellus*)가 51.2%로 산출되어 각 구역에서 계절별 우점종 변화를 보였다(Table 4).

Table 4. Major species based on the total biomass at Jeongdo-ri, Wando. (IV \geq 10)

Intertidal zone	Winter	IV	Spring	IV	Summer	IV	Autumn	IV
Upper	<i>Gloiopeltis furcata</i>	52.9	<i>Ulva australis</i>	38.6	<i>Ulva australis</i>	26.6	<i>Chondracanthus intermedius</i>	47.9
	<i>Gelidium divaricatum</i>	13.7	<i>Gloiopeltis furcata</i>	26.7	<i>Gloiopeltis furcata</i>	23.2	<i>Gloiopeltis furcata</i>	15.2
	<i>Pyropia suborbiculata</i>	12.5			<i>Chondracanthus intermedius</i>	13	<i>Chondria crassicaulis</i>	12.4
	<i>Monostroma nitidum</i>	10.2			<i>Gelidium divaricatum</i>	12.7		
Middle	<i>Monostroma nitidum</i>	32.9	<i>Corallina pilulifera</i>	38.2	<i>Sargassum fusiforme</i>	27.1	<i>Chondria crassicaulis</i>	44.1
	<i>Corallina pilulifera</i>	18	<i>Ulva australis</i>	24.1	<i>Ulva australis</i>	22.5	<i>Chondracanthus intermedius</i>	21.6
	<i>Sargassum thunbergii</i>	17.2	<i>Sargassum thunbergii</i>	15.7	<i>Corallina pilulifera</i>	19.4	<i>Sargassum thunbergii</i>	12.8
					<i>Chondracanthus intermedius</i>	15		
				<i>Sargassum thunbergii</i>	11.1			
Lower	<i>Chondracanthus tenellus</i>	25.6	<i>Corallina pilulifera</i>	24.3	<i>Chondracanthus tenellus</i>	29.6	<i>Chondracanthus tenellus</i>	51.2
	<i>Ahnfeltiopsis flabelliformis</i>	15.8	<i>Grateloupia elliptica</i>	18	<i>Ulva australis</i>	13.2	<i>Chondria crassicaulis</i>	17.6
	<i>Chondrus ocellatus</i>	14.9	<i>Chondracanthus tenellus</i>	14.9	<i>Chondrus ocellatus</i>	10.8	<i>Grateloupia elliptica</i>	16.7
	<i>Grateloupia elliptica</i>	12.5	<i>Sargassum fusiforme</i>	11.2				
	<i>Chondria crassicaulis</i>	12.2						

4. 고찰

본 연구기간 동안 완도군 정도리 조간대 암반지역에 출현한 해조류는 총 135종으로 녹조류 13종 갈조류 18종, 홍조류 104종이었다. 봄에 총 86종으로 가장 많은 해조류가 관찰되었고, 여름에 총 64종으로 가장 적은 해조류가 관찰되었다. 가을에는 75종 겨울에는 74종이 동정되었다. 이는 본 연구에서 사계절을 조사하여 보고한 137종은 Jang (2012)이 보고한 37종보다 더 많은 종수가 출현하였다. 하지만, 겨울에 Choi & Moon (2000)이 조사 보고한 87종과 비교하였을 때는 본 연구는 74종으로 적은 종수가 출현하였다. 종 리스트를 비교하였을 때, Choi & Moon (2000)의 조사에선 발견되었지만 본 연구에서는 발견되지 않은 몇몇 종들이 있었는데, 뚝부기(*Silvetia siliquosa*), 바위두둑(*Leathesia marina*) 등이 있다. 완도군 정도리와 같은 다도해해상국립공원에 속해 있는 흑산도, 진도 등 9개 지점의 하계 해조상을 조사한 Park et al. (2009)은 각 도서에 따라 녹조류 5 - 11종, 갈조류 8 - 19종, 홍조류 23 - 37종으로 나타났다고 하였으며 홍도에서 37종으로 가장 적은 종을 신지도에서 64종으로 가장 많은 종이 출현하였다고 보고하였다. 본 연구의 하계 해조상 조사 결과와 비교하였을 때, 정도리와 가장 근접한 신지도에서 64종이 출현하였다. 신지도에서는 녹조류 11종, 갈조류 17종, 홍조류 36종이 본 연구에서는 녹조류 5종, 갈조류 5종, 홍조류 54종으로 종조성에서는 차이가 있음을 알 수 있다. 이러한 결과들은 기존의 연구와 조사 시기, 조사방법 및 장소의 차이에 의해 나타나기도 하는 것으로 알려져 있다 (Oh et al. 2002, Kim et al. 2008).

본 연구기간 동안 확인된 135종 중 엽상형(sheet form) 20종(14.8%), 사상형(filamentous form) 24종(17.8%), 성긴분기형(coarsely branched form) 53종(39.3%), 다육질형(thick leathery form) 22종(16.3%), 유절산호말형(jointed calcareous form) 11종(8.1%), 각

상형(*crustose form*) 5종(3.7%)으로 성긴분기형이 가장 많이 나타났고, 각상형이 가장 적게 나타났다. 사계절 각각을 보아도 모두 성긴분기형(*coarsely branched form*)이 가장 높은 비율을, 각상형(*crustose form*)이 가장 적은 비율을 차지한다. 본 연구에서는 겨울 1종, 봄, 여름, 가을에 각각 2종을 확인하였다. Kim et al. (2008)은 채집 및 동정의 어려움으로 각상형을 제외하기도 하였다. 본 지역의 해조류의 Ecological State Group(ESG) (ORFANIDIS et al. 2001)을 확인해 보았을 때, 안정된 환경에서 서식하며 생장이 느린 다년생 해조류로 구성된 ESG I에 속한 종이 38종, 환경적 스트레스가 심한 교란 혹은 오염지역에서 빠른 생장을 하며 생산력이 높은 해조류로 구성된 ESG II에 속한 종이 97종으로 ESG II에 속한 종의 비율이 더 높은 것을 보아 환경적 스트레스가 어느 정도 있는 것으로 보인다. 정도리는 관광지 중 하나로 사람의 왕래가 잦고 가까운 곳에 마을과 논, 양식장이 있어 환경적 스트레스가 많을 것으로 추정된다(Choi & Moon 2000).

계절별 출현한 해조류의 종수를 근거로 해조상의 특성을 파악하기 위해 R/P, C/P, (C+R)/P를 사용하였다. R/P의 값은 1 이하일 때 한대성 해역, 1 - 4일 때 온대성 해역, 4 이상일 때 열대성 해역으로 구분하고 있고(Feldmann 1937), C/P의 값은 0.4 보다 작을 때 한대성 해역, 0.4 - 1.5일 때 온·한대성 해역, 1.5보다 클 때 열대성 해역으로 구분하며(Segawa 1956), (C+R)/P값은 3보다 작을 때 온대성 또는 한대성으로 구분하고, 6보다 클 때 열대성으로 구분하여 그 사이의 값은 혼합형으로 구분한다(Cheney 1977). 본 연구에서 계산한 사계절 값의 평균을 보면 R/P값은 5.8, C/P는 0.7, (C+R)/P는 6.5로 나타났다. 이 값을 근거로 R/P, (C+R)/P값의 기준으로는 열대성 해역이 나타났지만, C/P는 온·한대성 해역으로 나타나 종합적으로 혼합성 해역으로 볼 수 있다. Jang (2012)의 연구 결과와 비교하면, Jang (2012)의 (C+R)/P는 혼합성 (3.82)이고, 본 연구는 열대성(6.5)으로 전체적으로 열대성으로 변화하는 것을 볼 수 있다.

빈도와 피도에 따른 정도리의 조간대 계절별 우점종은 상부에서 불등풀가사리 (*Gloiopeltis furcata*) (겨울), 구멍갈파래(*Ulva australis*) (봄, 여름), 애기돌가사리 (*Chondracanthus intermedius*) (가을)이었고, 중부에서 참흙파래(*Monostroma nitidum*) (겨울), 작은구슬산호말(*Corallina pilulifera*) (봄), 지충이(*Sargassum fusiforme*) (여름), 서실 (*Chondria crassicaulis*) (가을)이 나타났고, 하부에서 돌가사리(*Chondracanthus tenellus*) (겨울, 여름, 가을), 작은구슬산호말(*Corallina pilulifera*) (봄)으로 중부에서는 계절별로 다른 종들이 우점하였지만, 상부는 구멍갈파래(*Ulva australis*). 하부는 돌가사리 (*Chondracanthus tenellus*)가 주로 우점하는 것을 확인할 수 있었다. 조간대 전체로는 겨울에 참흙파래(*Monostroma nitidum*), 봄에 작은구슬산호말(*Corallina pilulifera*), 여름에 구멍갈파래(*Ulva australis*), 가을에 서실(*Chondria crassicaulis*)의 가장 많은 것으로 확인되었다. Jang (2012)의 조간대 우점도 조사는 겨울에 툿(*Sargassum fusiforme*), 봄에 지충이(*Sargassum thunbergii*), 여름에 우뭇가사리(*Gelidium amansii*), 가을에 서실 (*Chondria crassicaulis*)이 가장 높은 중요도 값을 보였는데 가을을 제외하고는 다른 종이 우점하는 것을 볼 수 있다. 겨울에 수행된 Choi & Moon (2000)의 상·중·하부 구역의 우점도 조사를 보면 상부에서 불등풀가사리(*Gloiopeltis furcata*), 중부는 툿 (*Sargassum fusiforme*), 하부는 참보라색우무(*Symphyclocladia latiuscula*)가 우점한다고 하였다. 본 연구의 겨울 우점도 조사와 비교하면, 상부는 동일하고, 중부와 하부에서는 다른 종이 우점하는 것을 볼 수 있다. 같은 겨울에 조사이지만, Choi & Moon (2000)의 조사는 12월, 본 연구는 2월이라는 점으로 인해 나타난 차이라고 추측된다.

결론적으로 완도군 정도리에서 확인된 해조류는 총 135종으로 봄에 86종으로 가장 많으며, 여름에 급격히 감소하고 가을에 증가하는 모습을 보였다. 6가지 기능형군(Functional Form group)중 성긴분기형(coarsely branched form)이 39.3%로 가장 높은 비율을, 각상형(crustose form)이 3.6%로 가장 적은 비율을 보였다. 정도리에 서식

하는 해조류는 ESG II에 속하는 해조류가 전체의 71.8%를 차지하는 것으로 보아 해양 환경의 교란과 오염이 잦은 지역으로 추정된다. 본 연구에서 해조상의 특성을 파악하기 위한 R/P, C/P, (C+R)/P값의 평균을 보면 각각 5.8, 0.7, 6.5로 열대, 온·한대, 열대로 혼합성으로 확인되었고, 이전의 연구와 지수를 비교하면 증가하여 전체적으로 열대성으로 변화하는 것을 확인하였다. 각 계절별로 IV(Importance Value)가 가장 높은 해조류는 겨울에 참흄파래(*Monostroma nitidum*), 봄에 작은구슬산호말(*Corallina pilulifera*), 여름에 구멍갈파래(*Ulva australis*), 가을에 서실(*Chondria crassicaulis*)이었다. 앞으로의 환경변화와 완도의 해양산업 발달로 인해 해양생태계의 교란이 더욱 심화될 것으로 생각된다. 따라서 해양생태계를 보전하기 위해 지속적인 연구와 모니터링을 통하여 해조류 다양성 변화 및 생물량 변동에 대한 자료를 축적하고, 환경 변화에 대한 대응 방법을 마련하는 것이 필요하다.

PART II. 감태(*Ecklonia cava*)의 포자체로부터 원형질체(protoplast)를 분리하는 최적 조건 연구

1. 서론

한국을 비롯한 아시아 국가에서 해조류는 식량자원이나 사료 등으로 오랜 시간 동안 사용되어왔다(Critchley 1993). 미역, 김, 다시마 등 유용한 해조류들은 양식을 통해 다량 생산하였고, 한국을 비롯한 일본, 중국에서는 양식 기술들이 발달되었다(Kawashima 1984, Tseng 1987, Ohno & Matsuoka 1993, Oohusa 1993).

대형 갈조류인 감태(*Ecklonia cava*)는 다시마목(Laminariales) 감태과 (Lessoniaceae)에 속하며 한국 연안과 일본에 분포한다(Yoshida et al. 2000, Lee & Kang 2001). 해양 생태계에서 해중림을 구성하여 1차 생산자의 역할과 동시에(Kang & Yoo 1993, Brown & Lamare 1994), 해양생물들의 서식처와 산란장을 제공하는 중요한 역할을 하며(Kang 1966, Ohno 1985, Yokohama et al. 1987, Tominaga et al. 2004) 최근에는 연안생태계를 복원하는 프로그램에서 인공 해중림을 조성하는 주요 종으로 각광받고 있다(Hong & Choa 2008, Kang 2011, Kim et al. 2020). 또한, 감태는 다른 갈조류들이 가지고 있는 후코이단(fucoidan)의 추출원으로 사용하고 있고(Heo et al. 2003), 폴리페놀의 일종인 Phlorotannin을 다량으로 함유하고 있다고 알려져 있다(Ahn et al. 2007). 이러한 성분들을 이용하여 간, 심장, 신경보호와 면역, 고지혈증 및 당뇨병 등에 이용되는 약물을 개발하는데 잠재적인 후보로 평가받고 있다(Shibata et al. 2007, Heo et al. 2009, Wijesekara et al. 2010, Li & Kim 2011, Wijesinghe & Jeon 2012, Koirala et al. 2017, Kim et al. 2019).

감태는 육안으로 볼 수 있는 포자체 세대와 매우 작은 사상체인 배우체 세대로 나누어지는 이형세대교번을 하는 해조류로(Kang & Chung 2015), 감태가 가진 유용한 물질 추출과 식량자원으로 이용하기 위해 감태를 양식하려는 시도와 감태 양식에 대한 연구가 이루어졌다(Hwang et al. 2010, Hwang et al. 2013). 우리나라에서 미역, 다시마 등의 양식 방법은 모조로부터 유주자를 채취하여 양식하는 방법(생활사 기반 양식)을 사용하고 있다. 하지만, 이 방법을 감태에 적용시킨다면 문제점이 발생할 수 있다. 유주자를 얻기 위해 많은 양의 모조가 필요한데 자연환경에서 감태를 대량으로 채취하면 자연균락이 훼손될 수 있고, 계절에 영향을 받으며 해양환경에 따라 감태의 채취가 불안정할 수 있다. 또한, 생활사 기반 양식 방법은 수확 후 다음 양식에 사용할 이형세대를 유지해야하는 단점이 있다. 해조류는 중금속에 대한 친화력이 높아 이로 인해 축적되는 중금속 또한 문제가 된다(Bryan & Hummerstone 1973, Schiewer & Wong 1999, Besada et al. 2009). 이러한 문제들을 해결하기 위해 시간과 비용을 줄일 수 있고, 안정적으로 감태를 확보하며 품질을 향상할 수 있는 양식 방법을 개발하는 것이 필요하다.

원형질체(Protoplasts)는 세포벽이 제거된 식물세포이다(Reddy et al. 2006). 또한, 원형질체는 하나의 세포에서 하나의 식물체로 재생할 수 있는 잠재적인 전능성을 가지고 있어 식물 생물공학에서 Transformation과 Somatic hybridization에 사용되는 세포로써 주목받았다(Davey et al. 2005). 해조류에서 원형질체를 추출하는 기술은 1970년에 보고되었지만(Tatewaki & Nagata 1970, Enomoto & Hirose 1972, Kobayashi 1975), Millner et al. (1979)가 효소를 이용한 원형질체 추출 방법을 개발하고 나서야 살아있는 다수의 원형질체를 추출하는 것이 가능해졌다. 원형질체의 생존력과 재생력은 조직의 전처리, 효소, pH, 삼투압, 배양 온도 등에 영향을 받는다(Butler et al. 1989, Bjork et al. 1990, Zablackis et al. 1993, Araki et al. 1994, 1998, Chen & Chiang 1994, Mollet et al. 1995, Benet et al. 1997, Chen 1998, Chen & Shih 2000, Shikh et al. 2005; Reddy et al.

2008). 해조류에서 원형질체 분리는 미역(*Undaria pinnatifida*), 고리매(*Scytosiphon lomentaria*), 참가시그물바탕말(*Dictyopterus pacifica*), 세가닥갯쇠털(*Sphacelaria fusca*)등에서 연구되었다(Fujita & Migita. 1985, Avila-Peltroche et al. 2020, Avila-Peltroche & Won. 2020, Avila-Peltroche et al. 2021).

본 연구는 감태에서 원형질체를 이용하여 배양하는 기술을 개발하는 것을 목표로 하고 있으며, 첫 번째 단계로 감태의 원형질체를 분리에 영향을 주는 효소 조성, Temperature, Osmolality, Time, pH, chelation pre-treatment의 최적 조건을 찾아내기 위해 수행되었다.

2. 재료 및 방법

2.1. 감태 포자체 확보

본 연구에 사용할 감태의 포자체를 배양하기 위해 2021년 4월 16일 부산 기장군 기장을 연화리(35°12'56.43"N, 129°13'30.59"E)에서 감태(*Ecklonia cava* Kjellman)의 포자체를 채집하였다. 채집된 개체는 아이스박스에 넣어 실험실로 운반하여 감태의 포자염을 확인하였다. 감태의 포자 확보를 위해 채집된 감태는 광학현미경(OLYMPUS DP71)을 이용하여 포자낭이 있는 엽체를 확인하고, 감태 포자체의 포자낭이 있는 엽체 부분을 확보하였다. 포자염으로부터 포자를 방출시키는 방법은 Avila-Peltroche et al.(2020)를 참고하였다. 확보한 포자염은 Clean Bench(HB-402)에서 물리적으로 다른 해조류, Bacteria, fungi 등 다른 생물을 제거를 위해 razor blade로 조직의 표면을 긁어내고, 화학적 제거를 위해 betadine 1%에 30초 동안 넣어 두었다. 다른 생물들이 제거된 감태 조직을 autoclaved seawater로 씻어내고 물기를 제거하였다. 물기가 제거된 조직들을 깨끗한 paper towel이 깔린 petri dish에 옮기고 알루미늄 호일로 감싸 빛을 차단한 뒤, 냉장고에 넣고 밤새 동안 (8시간 이상) 보관하였다. 그 후 포자 방출을 위해 멸균된 seawater가 들어있는 비커에 넣고 15°C에 6시간 동안 culture chamber(HB-305S)에서 보관하였다.

방출시킨 포자들은 새로운 petri dish에 옮기고, 2 - 3일 간격으로 medium(PES medium)을 갈아주며 암·수 배우자체들을 culture chamber(HB-305S)에서 15°C, 20 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에 배양하였다. 발생시킨 배우자체들은 암·수를 따로 분리하지 않고 배양 조건을 유지하며 같은 petri dish안에서 수정시켜 새로운 포자체를 확보, 수정된 포자체는 두 달 동안 1L 원형플라스크에서 크기가 2 - 3cm 되도록 배양하였다.

2.2. 원형질체 분리 최적 조건 및 significant factors 확인

감태의 원형질체 확보를 위해 2 – 3cm 크기로 성장한 어린 감태 포자체를 이용하여 원형질체를 분리하는 최적 조건과 significant factor를 찾아내는 실험을 실행하였다. 감태의 원형질체를 분리하는 factors는 Avila-Peltroche et al.(2020)의 이전 연구를 참고하여 7가지 factors(Cellulase RS, Alginate lyase, Osmolality, Temperature, Time, pH, Chelation pre-treatment)를 선정하였다. 원형질체 생산에 최적 조건을 선정하기 위해 각각의 factor들을 minitab version 20.4(USA) 통계 프로그램 중 2-level split-plot(Hard To Change)설계 방법을 이용하여 Cellulase RS는 0.5%와 2%, Alginate lyase는 2 U mL⁻¹와 6 U mL⁻¹, Osmolality은 1x (1570 mOsm)와 2x (3140 mOsm), 반응온도는 15°C와 25°C, 반응시간은 2시간(h)과 6시간, pH는 5.8과 7.5, Chelation pre-treatment은 0분(min)과 20분으로 총 32개의 실험군을 만들어 진행하였다(Table.5). 7가지 factors 중 반응온도를 HTC(Hard-To-Change) Factor로 설정하여 15°C (HB-305S)와 25°C (JSSI- 100C)에서 실험을 진행하였다. 1L 원형 플라스크에서 키운 감태 포자체의 기부와 상부를 제거하고 중간부분의 포자체를 razor blade로 무작위 크기로 자른 후 건조 무게가 10 – 30mg의 감태 포자체 조각을 온도 조건에 따라 2개의 24-wall plate에 각각 16개씩 넣었다.

효소 용액을 만드는 데에 사용한 solution으로 Osmolality을 설정하였다. 1x의 solution은 40mL에 NaCl (0.936 g), MgCl₂ (1.056 g), MgSO₄ (0.106 g), KCl (0.476 g), CaCl₂ (0.012 g)를 넣어 만들었다. 2x의 solution은 40mL에 NaCl (1.874 g), MgCl₂ (2.114 g), MgSO₄ (0.211 g), KCl (0.953 g), CaCl₂ (0.024 g)를 넣어 만들었다. 각 혼합물의 pH 측정에는 pH meter(Orion 3 star)를 이용하였으며, 2N HCl과 1M NaOH로 pH 5.8과 pH 7.5로 조절하였다. pH 5.8로 조절된 혼합물에는 MES(2x solution: 0.078 g, 1x solution: 0.039 g)를 추가로 넣었고, pH 7.5로 조절된 혼합물에는 HEPES(2x solution: 0.096 g, 1x solution:

0.048 g)를 추가로 넣어 혼합물을 완성하였다. 완성된 혼합물은 0.22 μm 필터로 거른 후 사용하였다.

Chelation pre-treatment는 calcium-chelating solution (665 mM NaCl, 30 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 30 mM MgSO_4 , 20 mM KCl, 20 mM ethylene glycol-bis(β -amino-ethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrasodium salt (EGTA- Na_4) as calcium chelator, pH 5.5)을 사용하였다(Coelho et al. 2012). Chelation pre-treatment 이후, 준비된 32개의 혼합물을 각각 넣어준 후 15 $^\circ\text{C}$ 와 25 $^\circ\text{C}$ 로 설정된 chamber에서 반응시켰다. 2시간, 6시간 이후 plate에서 원형질체의 수를 측정하였다. 원형질체 측정방법은 반응이 끝난 용액을 pipette으로 4 - 5회 정도 풀어준 뒤 25 μm 나일론 망으로 원형질체들을 여과하여 100 \times g에서 10분 동안 원심분리한 후, 상층액의 일부를 제거하여 농축시킨 후, haemocytometer (Marienfeld-superior)를 이용하여 광학현미경에서 30 μl volume의 protoplast yield를 측정하였다. 측정된 원형질체의 수와 원형질체를 추출한 감태 조각의 무게, 상층액의 일부를 제거한 후 solution의 volume으로 각 실험군의 protoplast yield를 계산하였다.

각 실험군에서 얻은 protoplast yield를 바탕으로 minitab version 20.4(USA)의 설계 분석을 통해 7가지 factors 중 어떤 factor가 단일적인 significant factor인지 분석하였다.

Table 5. Combinations and concentrations of enzyme mixtures and factors for protoplast isolation from *Ecklonia cava* sporophytes

RunOrder	Cellulase RS (%)	Alginate lyase (U mL ⁻¹)	Osmolarity (x)	Temperature (°C)	Time (h)	pH	Chelation pre-treatment(min)
1	0.5	6	1	15	2	5.8	20
2	2	2	2	15	2	7.5	20
3	2	2	1	15	2	5.8	0
4	2	6	2	15	6	5.8	20
5	0.5	6	2	15	2	7.5	0
6	0.5	2	2	15	6	5.8	0
7	2	6	1	15	6	7.5	0
8	0.5	2	1	15	6	7.5	20
9	0.5	6	2	25	2	5.8	20
10	2	2	1	25	2	7.5	20
11	2	6	1	25	6	5.8	20
12	2	2	2	25	2	5.8	0
13	0.5	6	1	25	2	7.5	0
14	0.5	2	2	25	6	7.5	20
15	0.5	2	1	25	6	5.8	0
16	2	6	2	25	6	7.5	0
17	2	2	1	15	2	5.8	20
18	2	6	1	15	6	7.5	20
19	0.5	2	2	15	6	5.8	20
20	0.5	2	1	15	6	7.5	0
21	0.5	6	2	15	2	7.5	20
22	0.5	6	1	15	2	5.8	0
23	2	2	2	15	2	7.5	0
24	2	6	2	15	6	5.8	0
25	0.5	2	1	25	6	5.8	20
26	0.5	6	1	25	2	7.5	20
27	2	2	2	25	2	5.8	20
28	0.5	2	2	25	6	7.5	0
29	0.5	6	2	25	2	5.8	0
30	2	6	2	25	6	7.5	20
31	2	6	1	25	6	5.8	0
32	2	2	1	25	2	7.5	0

3.1. 엽체의 크기와 원형질체 분리 최적화와의 관계

원형질체를 확보하는 최적의 조건을 확인한 후 감태 조각의 크기는 어떤 영향이 있는지 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 감태 조각들을 $1 \times 1 \text{ mm}^2$, $2 \times 2 \text{ mm}^2$, $4 \times 4 \text{ mm}^2$, $6 \times 6 \text{ mm}^2$ 의 크기로 잘라 각각의 크기로 잘라진 3 – 6 mg의 감태 조각들을 조건으로 각 크기당 4회 반응하여, protoplast yield를 확인하여 R Studio version 1.4.1106 (USA)으로 분산분석(ANOVA; Analysis of variance)하여 비교하였다.

3. 결과

3.2. 감태 포자체의 발생

Dark stress, Dry stress를 받은 감태의 포자체를 멸균된 seawater에 6시간 동안 보관한 결과 많은 양의 포자들을 얻을 수 있었다. 한 달이 지난 후, 각 포자들은 male gametophyte와 female gametophyte로 발달 및 성장하였다. 한 달 동안의 성장 후에 female gametophyte에서 egg가 형성되는 것이 관찰되었다. 일주일 후, 수정이 이루어져 새로운 포자체가 형성되었다(Fig. 3A).

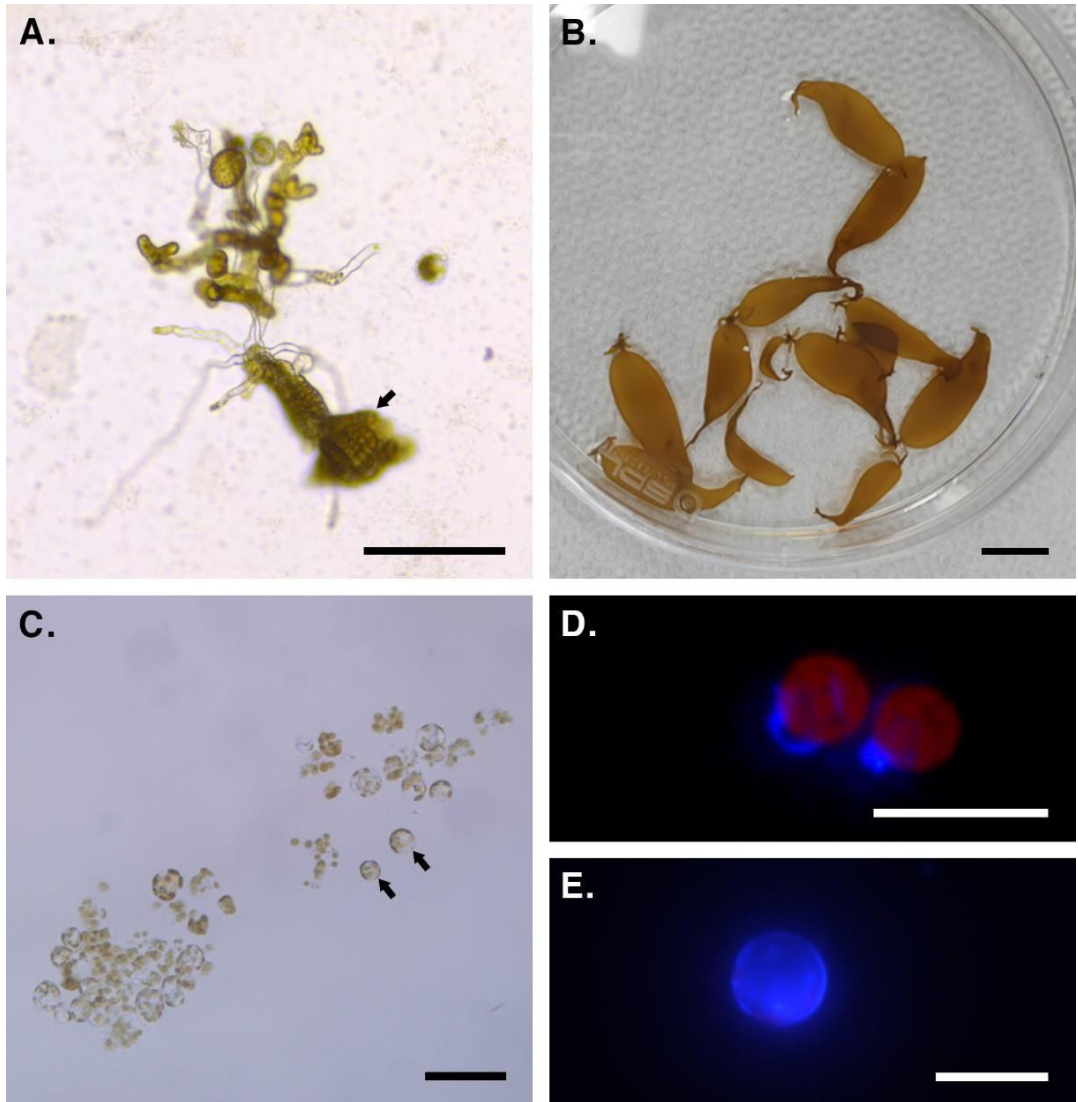


Fig. 3. Protoplast isolation from *Ecklonia cava*. **A.** A new sporophyte develops from a gametophyte (arrow) (bar = 200 µm). **B.** Mature macrothalli after 2 months in suspension culture (bar = 1 cm). **C.** Freshly isolated protoplasts produced from the cortex (arrows) (bar = 100 µm). **D.** True protoplasts with chlorophyll (red) autofluorescence under inverted fluorescence microscope and cell walls (blue) (bar = 50 µm). **E.** Protoplast with regenerated cell wall (bar = 50 µm).

3.3. 원형질체 분리의 최적화 조건

7가지 요소(Cellulase RS, Alginate lyase, Osmolality, temperature, time, pH, Chelation pre-treatment)를 조합하여 설계한 32가지의 추출 조건들에서 $5.29 \times 10^4 - 2.82 \times 10^6$ 으로 다양한 수율의 원형질체들이 추출되었다. 32가지의 추출 조건들 중에서 18 RunOrder인 2%의 Cellulase RS, 6 U mL^{-1} 의 alginate lyase, 1570 mOsm의 osmolality, 15°C 의 배양온도, 6시간의 반응시간, pH 7.5, 20분 동안의 Chelation pre-treatment의 혼합물에서 2.82×10^6 의 원형질체가 130 μL 로 농축된 16mg의 감태 포자체 조각에서 추출되어 총 2.29×10^7 로 가장 많은 양의 원형질체가 추출되었다(Fig. 4).

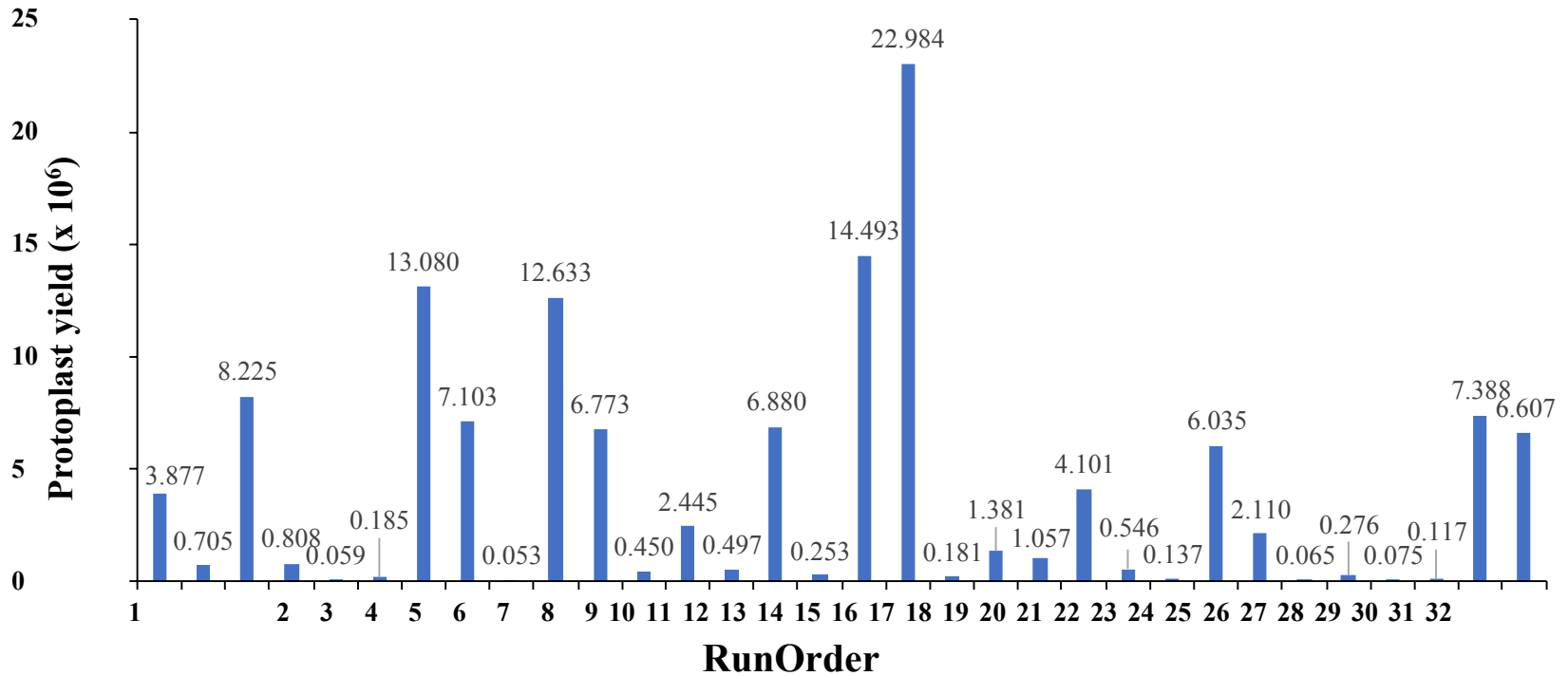


Fig. 4. Protoplast yield from *Ecklonia cava* sporophyte obtained using different enzyme combinations with chelation pretreatment (20 mM EGTA).

3.4. Significant factors의 확인

32가지의 조건들에서 얻은 protoplast yield 값을 바탕으로 Minitab을 이용하여 분석하여 얻은 Pareto Chart of the Standardized Effects 그래프에서 Standardized Effects 2.36을 기준으로 더 높은 값을 나타낸 단일적인 significant factors는 Cellulase RS, Chelation pre-treatment, Osmolarity로 분석되었고 그 외 다른 요소들은 Temperature · Alginate lyase, Alginate lyase · pH 등 복합적인 요소들이었다(Fig. 5A). significant factors로 분석된 세 가지 factors가 protoplast를 추출하는데 주는 영향의 방향성을 Normal Plot of the Standardized Effects 그래프로 분석한 결과 Cellulase RS와 Chelation pre-treatment는 비례적으로 영향을 주고, Osmolarity는 반비례적으로 영향을 준다는 분석 결과를 얻었다(Fig. 5B).

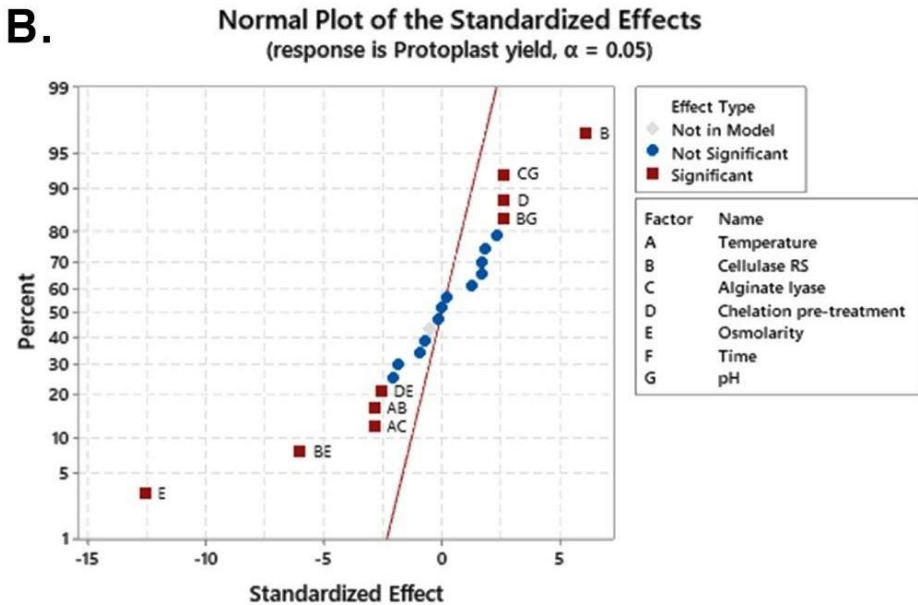
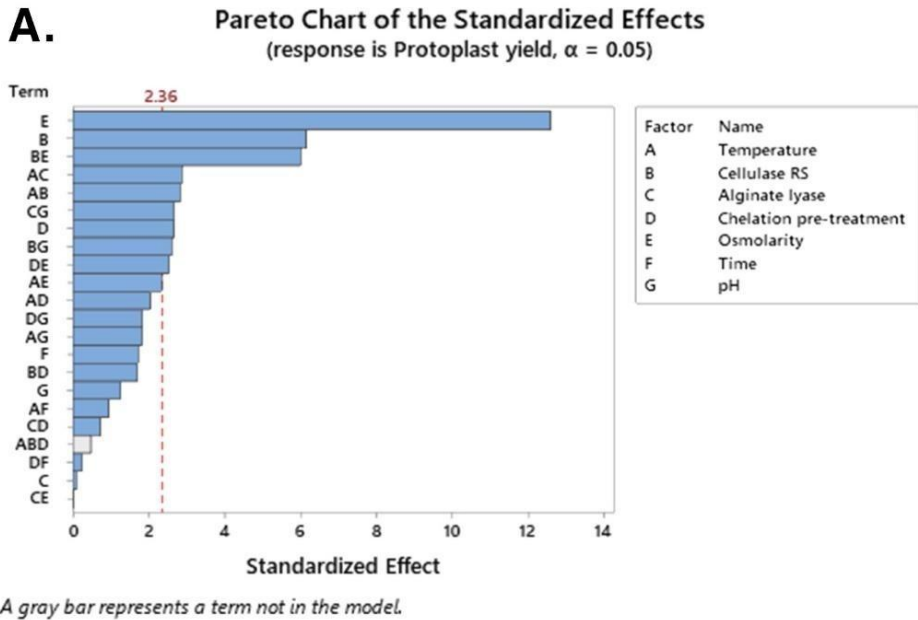


Fig. 5. A. Pareto chart drawn plot of the standardized effects and B. Normal probability plot of the standardized effects for protoplast yield from *E. cava* sporophyte.

3.5. 엽체의 크기와 원형질체 분리 최적화와의 관계

각 크기별로 얻은 protoplast yield의 평균을 비교하였을 때에는 $6 \times 6 \text{ mm}^2$ 크기에서 2.434×10^6 으로 가장 높은 protoplast yield를 얻었고, $4 \times 4 \text{ mm}^2$ 크기에서 5.34×10^5 로 가장 낮은 protoplast yield를 얻었다(Fig. 6). 이 결과만으로 보았을 때, $6 \times 6 \text{ mm}^2$ 크기가 가장 많은 protoplast를 추출할 수 있을 것으로 보이나, $2 \times 2 \text{ mm}^2$ 와 $1 \times 1 \text{ mm}^2$ 크기의 엽체에서 protoplast yield가 각각 1.738×10^6 과 1.852×10^6 인 점과 평균의 표준편차의 범위를 포함하여 R studio를 이용하여 실행한 분산분석(ANOVA; Analysis of variance)에서 엽체의 크기는 protoplast를 추출하는데 크게 영향을 주지 않는다는 분석 결과를 보여주었다.

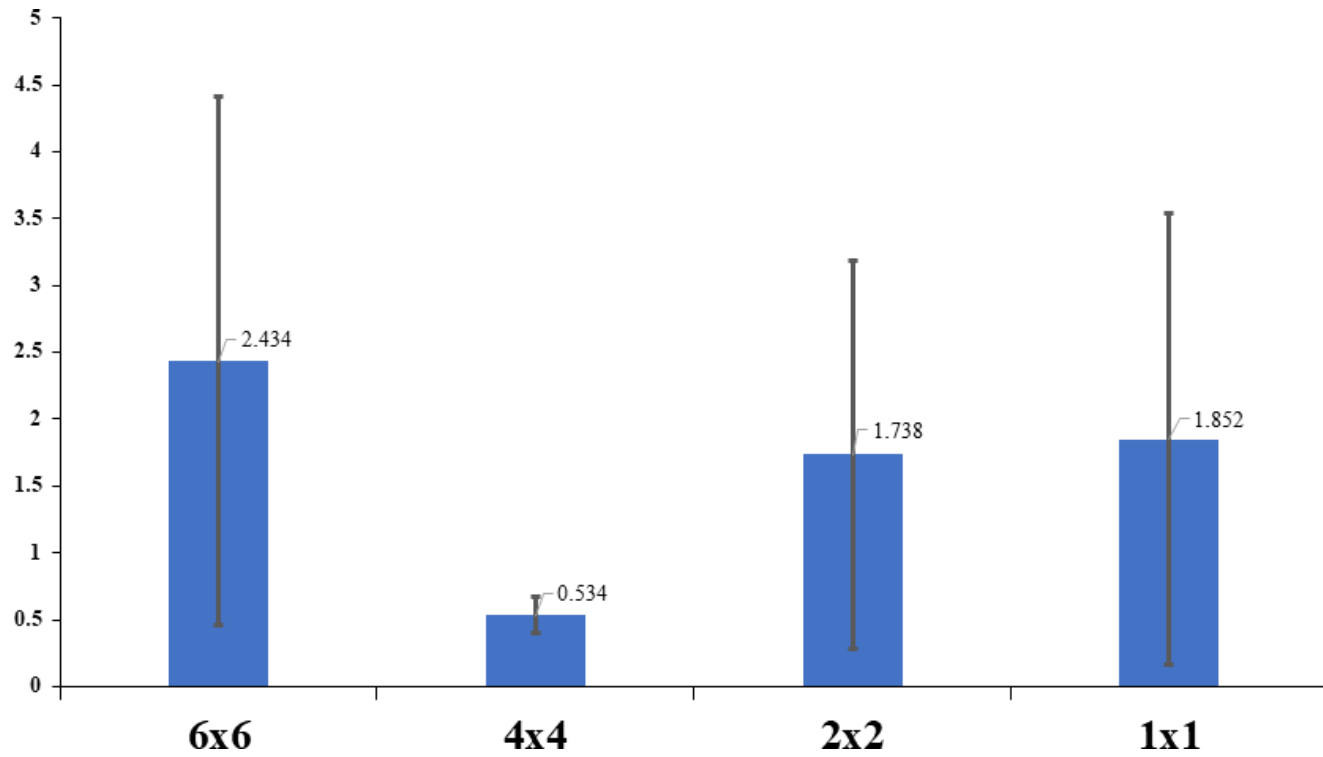


Fig. 6. The average of protoplast yield from *Ecklonia cava* sporophyte obtained using thallus fragments of various size.

4. 고찰

해조류에서 Protoplast에 대한 연구는 1985년 *Undaria pinnatifida* (Fujita and Migita, 1985)를 이용한 내용을 시작으로 *Ectocarpus siliculosus*(Kuhlenkamp & Müller, 1994), *Macrocystis pyrifera* (Varvarigos et al., 2004) *Sphacelaria fusca* (Avila-Peltroche & Won, 2020), *Dictyopteris pacifica* (Avila-Peltroche et al. 2021), *Scytosiphon lomentaria* (Avila-Peltroche et al. 2021) 등 다양한 해조류에서 연구되었다. 본 연구를 통해 감태의 protoplast를 다양한 연구에 이용하기 위해 protoplast를 추출하는 기술을 확립하는 과정으로 감태의 protoplast를 추출하는데 작용하는 7가지 factors의 최적 조건과 significant factors를 알아보았다. 본 연구를 통해 알아낸 감태의 protoplast를 추출하는 최적의 조건은 2%의 Cellulase RS, 6 U mL⁻¹의 Alginate lyase, 1570 mOsm의 Osmolality, 15°C의 temperature, 6시간의 time, pH 7.5, 20 min의 Chelation pre-treatment의 조건에서 2.298×10^7 protoplasts/g FW였다. 이전 연구들의 protoplast를 추출하는 최적의 조건과 비교하였을 때, *Dictyopteris pacifica* (Avila-Peltroche et al. 2021)의 최적 조건인 1%의 Cellulase RS, 4 U mL⁻¹의 Alginate lyase, 1570 mOsm의 Osmolality, 20°C의 temperature, 4시간의 time, pH 6, 20 min의 Chelation pre-treatment 조건에서는 4.854×10^6 protoplasts/g FW이었고, *Scytosiphon lomentaria* (Avila-Peltroche et al. 2021)의 1%의 Cellulase RS, 4 U mL⁻¹의 Alginate lyase, 1570 mOsm의 Osmolality, 20°C의 temperature, 4시간의 time, pH 6, 20 min의 Chelation pre-treatment 조건에서는 7.654×10^7 protoplasts/g FW이었으며, *Sphacelaria fusca*(Avila-Peltroche & Won, 2020)의 1%의 Cellulase RS, 4 U mL⁻¹의 Alginate lyase, 2512 mOsm의 Osmolality, 20°C의 temperature, 6시간의 time, pH 6, 20 min의 Chelation pre-treatment 조건에서는 1.508×10^5 protoplasts/g FW이었다. *Undaria pinnatifida* male과 female gametophytes (Avila-Peltroche et al. 2020)의 2%의 Cellulase RS, 3 U mL⁻¹의 Alginate lyase,

1570 mOsm의 Osmolality, 20°C의 temperature, 4시간의 time, pH 6, 20 min의 Chelation pre-treatment 조건에서는 각각 1.17×10^5 protoplasts/g FW, 2.66×10^5 protoplasts/g FW인 결과들과 일부 factors에서 조금씩 차이가 있다. 이러한 차이는 protoplast를 추출하는 최적 조건과 protoplast yield는 종 특이적으로 다르다는 것으로 분석할 수 있다. Chelation pre-treatment는 본 연구와 이전 연구들에서 모두 같은 조건인 것과 *Hecatonema terminale* (Avila-Peltroche et al. 2019), *Ectocarpus* (Coelho S. M et al. 2012), *Saccharina latissimi* (Butler D. M et al. 1989), *Macrocystis pyrifera* (Kloareg B. et al. 1989)에 서도 Chelation pre-treatment가 긍정적인 영향을 보였다는 것을 보아 Chelation pre-treatment는 protoplast를 추출하는데 필요한 것으로 생각된다.

감태 포자체의 Significant factors는 Cellulase RS, Chelation pre-treatment, Osmolarity 로 분석이 되었다. 이전 연구에서 분석한 다른 해조류들의 Significant factors와 비교 하면, *Dictyopteris pacifica* (Avila-Peltroche et al. 2021)와 *Scytosiphon lomentaria* (Avila-Peltroche et al. 2021)는 Chelation pre-treatment, *Sphacelaria fusca* (Avila-Peltroche & Won, 2020)는 Chelation pre-treatment와 Osmolarity이고, *Undaria pinnatifida* (Avila-Peltroche et al. 2020)의 male gametophytes는 pH와 Osmolarity, female gametophytes는 pH, Osmolarity, time으로 significant factors도 종마다 차이가 있다는 것을 알 수 있다. 앞서 Chelation pre-treatment는 protoplast를 추출하는데 필요한 것이라고 하였는데 *Undaria pinnatifida* (Avila-Peltroche et al. 2020)의 연구에서 Chelation pre-treatment는 significant factor에 포함되어있지 않다. 본 연구에서 Chelation pre-treatment을 한 조건과 하지 않은 조건의 protoplast yield는 1.263×10^7 protoplasts/g FW와 2.298×10^7 protoplasts/g FW으로 약 2배 차이가 난다. 또한, 이전 연구인 *Dictyopteris pacifica* (Avila-Peltroche et al. 2021)에서는 1.98×10^6 protoplasts g^{-1} FW와 4.85×10^6 protoplasts g^{-1} FW이고, *Scytosiphon lomentaria* (Avila- Peltroche et al. 2021)는 6.554×10^7 protoplasts g^{-1} FW와 7.654×10^7

protoplasts g^{-1} FW로 Chelation pre-treatment의 유무에 따라 protoplast yield에 차이가 있다는 것을 알 수 있다. 그리고 *Sphacelaria fusca*를 연구한 Avila-Peltroche & Won (2020)은 Ducreux & Kloareg (1988)의 연구 결과와 비교하였고, protoplast를 추출하는데 Chelation pre-treatment는 중요한 요인이라고 하였다.

본 연구에서 감태의 크기와 protoplast yield는 큰 연관성이 없다고 밝혀졌다. 본 연구에선 각 크기별로 4개의 실험군으로 실험을 진행하여 평균값을 사용하였는데, $6 \times 6 \text{ mm}^2$ 실험군에서 각각 5.16×10^6 protoplasts g^{-1} FW, 2.604×10^6 protoplasts g^{-1} FW, 1.166×10^6 protoplasts g^{-1} FW, 8.05×10^5 protoplasts g^{-1} FW이었고, $4 \times 4 \text{ mm}^2$ 실험군은 5.833×10^5 protoplasts g^{-1} FW, 3.796×10^5 protoplasts g^{-1} FW, 4.812×10^5 protoplasts g^{-1} FW, 6.906×10^5 protoplasts g^{-1} FW이었으며, $2 \times 2 \text{ mm}^2$ 실험군은 5.812×10^5 protoplasts g^{-1} FW, 3.825×10^6 protoplasts g^{-1} FW, 9.625×10^5 protoplasts g^{-1} FW, 1.583×10^6 protoplasts g^{-1} FW이고, $1 \times 1 \text{ mm}^2$ 실험군은 6.093×10^5 protoplasts g^{-1} FW, 5.541×10^5 protoplasts g^{-1} FW, 2.1×10^6 protoplasts g^{-1} FW, 4.143×10^6 protoplasts g^{-1} FW으로 같은 크기에서도 protoplast yield에 차이가 있음을 알 수 있다. Ronelie C. Salvador & Augusto E. Serrano (2005)는 *Kappaphycus alvarezii*의 protoplast yield를 효율적으로 추출하기 위해 조직을 조각($<1 \text{ mm}^2$)으로 잘라 표면적을 넓혀 실험을 진행하였지만, 이 과정은 영향을 미치지 않은 것으로 보인다고 하였다.

결과적으로 감태의 포자체로부터 protoplast를 추출하는 최적의 조건(2%의 Cellulase RS, 6 U mL^{-1} 의 Alginate lyase, 1570 mOsm의 Osmolality, 15°C 의 반응온도, 6시간의 반응시간, pH 7.5, 20 min의 Chelation pre-treatment과 Significant factors(Cellulase RS, Chelation pre-treatment, Osmolarity), 엽체 크기와 관계를 알아내었다. 본 연구의 결과를 통해 최근에 사용하고 있는 response surface methodology(RSM)을 이용하여 좀 더 효율적으로 protoplast를 추출할 수 있는 Significant factors의 조건을 찾을 수 있

을 것으로 보인다. 이후, protoplast의 재생 및 배양방법을 찾는 연구를 통해 감태의 protoplast를 이용하는 양식 방법이 만들어진다면, protoplast를 이용한 대량생산으로 감태를 이용한 다른 연구나 상업적으로 필요한 감태를 충분히 공급하는 것이 가능할 것으로 보인다.

5. 참고문헌

- Choi D. S. & Moon B. C. 2000. 완도 해안의 해조류.
- Choi D. S., Yoon T. S. & Lee I. K. 1989. 완도 정도리의 해조상. 연안생물연구 6(1): 97 – 109.
- Jang U. 2012. 완도해역 해조상.
- Kang. 1968. 한국동식물도감 제8권 식물편(해조류). 문교부 pp. 465.
- Kim Y. H. & Lee I. K. 1985. 서해안 무창포의 조간대 해조 군집구조의 분석. 식물학회지 28: 149 – 164.
- Lee I. K., Lee H. B., Boo S. M. 1983. 진도 인근도서의 하계 해조상. 자연실태종합보고서 3: 291 – 312.
- Lee J. W. 2001. 해조류의 수평 및 수직분포. 이인규 등 22인. 한국의 조류: 생태와 응용. 아카데미서적. pp.187 – 204.
- Lee J. W. & Lee H. B. 1990. 서해안 태안반도의 해조분포. 청주대학교 산업과학연구 8: 245 – 257.
- Lee K. I. & Kang W. J. 1986. 韓國産 海藻類의 目錄. 한국조류학회. 1: 311 – 325.
- Park Y. S. & Kim Y. H. 1990. 서해안 하계 해조류 분포에 관한 식물지리학적 연구. 조류학회지 5: 39 – 50.
- Yoo J. S., Kim Y. H. & Lee I. K. 1996. 인천항 선거 생태계 부착 해조군집의 동태. 조류학회지 11: 295 – 307.
- Ahn G. N., Kim K. N., Cha S. H., Song C. B., Lee J. H., Heo M. S., Yeo I. K., Lee N. H., Jee Y. H., Kim J. S., Heu M. S. & Jeon Y. J. 2007. Antioxidant activities of phlorotannins purified from *Ecklonia cava* on free radical scavenging using ESR and H₂O₂-mediated DNA damage. Eur Food Res Technol 226, 71 – 79.

- Ahn J. K., Yoo K. D., Oh J. C., Lee J. I., Yoon H. D. & Kim Y. H. 2017. Species Composition and Vertical Distribution of Marine Algal Communities at the Taean Peninsula of the West Coast of Korea. *Korean J Fish Aquat Sci* 50(1),055 – 064.
- Araki T, Hayakawa M, Tamaru Y, Yoshimatsu K& Morishita T. 1994. Isolation and regeneration of haploid protoplasts from *Bangia atropurpurea* (Rhodophyta) with marine bacterial enzymes. *J Phycol* 30:1040 – 1046.
- Augytė S & Shaughnessy FJ. 2014. A floristic analysis of the marine algae and seagrasses between cape Mendocino, California and cape Blanco, Oregon, USA. *Bot Mar* 54, 251 – 263.
- Avila-Peltroche J, Won B. Y. & Cho T. O. 2020. Optimization of protoplast isolation from the gametophytes of brown alga *Undaria pinnatifida* using response surface methodology. *Journal of Applied Phycology* 32:2233 – 2244.
- Avila-Peltroche J, Won B. Y. & Cho T. O. 2021. Protoplast isolation from *Dictyopteris pacifica* and *Scytosiphon lomentaria*, using a simple commercial enzyme preparation. *J Genet Eng Biotechnol*. 2021 Sep 3;19(1):135. doi: 10.1186/s43141-021-00226-y.
- Avila-Peltroche J & Won B. Y. 2020. Protoplast production from *Sphacelaria fusca* (Sphacelariales, Phaeophyceae) using commercial enzymes. *J Mar Biosci Biotechnol*. 12:50 – 58.
- Avila-Peltroche, J., Won B. Y. & Cho T. O. 2019. Protoplast isolation and regeneration from *Hecatonema terminale* (Ectocarpales, Phaeophyceae) using a simple mixture of commercial enzymes. *J. Appl. Phycol*. 31, 1873 – 1881.
- Benet H., Gall E., Asensi A., Kloareg B. 1997. Protoplast regeneration from gametophytes and sporophytes of some species in the order Laminariales (Phaeophyceae). *Protoplasma* 199:39 – 48.
- Besada V., Andrade J. M., Schultze F. & González J. J. 2009. Heavy metals in edible seaweeds commercialised for human consumption. *J. Mar. Syst.* 75:305 – 313.
- Bjork M., Ekman P., Wallin A. & Pedersén M. 1990. Effects of growth rate and other factors on

- protoplast yield from four species of *Gracilaria* (Rhodophyta). Bot Mar 33:433 – 439.
- Brown M. T. & Lamare M. D. 1994. The distribution of *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar within Timaru Harbour, New Zealand. Jpn J Phycol 42, 63 – 70.
- Bryan G. W. & Hummerstone L. G. 1973. Brown seaweed as an indicator of heavy metals in estuaries in south-west England. J. Mar. Biol. Assoc. U.K. 53:705 – 720.
- Butler D. M., Ostgaard K., Boyen C., Evans L. V., Jensen A. & Kloareg B. 1989. Isolation conditions for high yields of protoplasts from *Laminaria saccharina* and *L. digitata* (Phaeophyceae). J. Exp. Bot. 40, 1237 – 1246.
- Cheney D. P. 1977. R and C/P- A new improved ratio for comparing seaweed floras. Suppl. J. Phycol. 13: 129.
- Chen Y. C. 1998. Development of protoplasts from holdfasts and vegetative thalli of *Monostroma latissimum* (Chlorophyta, Monostromatacae) for algal seed stock. J Phycol 34:1075 – 1081.
- Chen Y. C. & Chiang Y. M. 1994. Development of protoplasts from *Grateloupia sparsa* and *G. filicina* (Halymeniaceae, Rhodophyta). Bot Mar 37:361 – 366.
- Chen Y. C. & Shih H. C. 2000. Development of protoplasts of *Ulva fasciata* (Chlorophyta) for algal seed stock. J Phycol 36:608 – 615.
- Choi C. G. & Huh S. H. 2008. Composition of Marine Algal Community at the Intertidal Zone in Gwangyang Bay, South Sea, Korea. J. Kor. Fish. Soc. 41(3), 201 – 207.
- Choi D.S. 1992. On the state of marine algal resources in the west-southern coast of Korea. Bull Inst Litt Environ 9, 81 – 103.
- Critchley A. T. 1993. Introduction-Seaweed resources. In: Ohno M., Critchley A. T. (eds) Seaweed cultivation and marine ranching. Jap Int Coop Agency, Yokosuka, Japan, 1 – 6.
- Coelho S. M., Scornet D., Rousvoal S., Peters N., Darteville L., Peters A. F. & Cock J. M. 2012. Isolation and regeneration of protoplast from *Ectocarpus*. Cold Spring Harb. Protoc 2012, 361 – 364. doi: 10.1101/pdb.prot067959.
- Davey M. R., Anthony P., Power J. B. & Lowe K. C. 2005. Plant protoplasts: status and

- biotechnological perspectives. *Biotechnol Adv* 23:131 – 171.
- Díaz -Pulido G., Gouezo M., Tilvrook B., Dove S. & Anthony KRN. 2011. High CO₂ enhances the competitive strength of seaweeds over corals. *Ecol Lett* 14, 156 – 162. [http://dx.doi.org/ 10.1111/j.1461-0248.2010.01565.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01565.x).
- Ducreux G. & Kloareg B. 1988. Plant regeneration from protoplast of *Sphacelaria* (Phaeophyceae). *Planta* 174, 25 – 29.
- Enomoto K. & Hirose H. 1972. Culture studies on artificially induced aplanospores in the marine alga *Boergesenia forbesii* (Harvey) Feldman (Chlorophyceae, Siphonocladales). *Phycologia* 11:119 – 122.
- Feldmann J. 1937. Recherches sur la vegetation marine de la Mediterranee. *Rev. Alg.* 10: 1 – 340
- Fujita Y. & Migita S. 1985. Isolation and culture of protoplasts from some seaweeds. *Bull. Fac. Fish. Nagasaki Univ.* 57: 39 – 45.
- Han S. J., Hwang S. I., Jun S. K., Kim D. K. & Shin J. A. 2018. An Ecological Evaluation of Summer Marine Algal Flora in Eastern coast of Namhae. *JFM SE*, 30(3), pp. 819 – 829.
- Heo S. J., Jeon Y. J., Lee J., Kim H. T. & Lee K. W. 2003. Antioxidant effect of enzymatic hydrolyzate from a kelp, *Ecklonia cava*. *Algae* 18, 341 – 348.
- Heo S. J., Ko S. C., Cha S. H., Kang D. H., Park H. S., Choi Y. U., Kim D., Jung W. K. & Jeon Y. J. 2009. Effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on melanogenesis and their protective effect against photo-oxidative stress induced by UV-B radiation. *Toxicol. In Vitro* 23:1123 – 1130.
- Hong C. H. & Choa J. H. 2008. An experimental study on development of artificial reefs using volcanic stones for marine forests. *J. Ocean Eng. Technol.* 22:103 – 108.
- Hwang E. K., Choi H. G. & Kim J. K. 2020. Seaweed resources of Korea. *Botanica Marina* 63(4): 395 – 405.
- Hwang E. K., Gong Y. G., HA D. S. & Park C. S. 2010. Nursery and Main Culture Conditions for Mass Cultivation of the Brown Alga, *Ecklonia cava* Kjellman. *Kor J Fish*

- Aquat Sci 43(6), 687 – 692.
- Hwang E. K., Hwang I. K., Park E. J., Gong Y. G. & Park C. S. 2013. Cultivation Technique of *Ecklonia cava* Kjellman for Restoration of Natural Resources. Korean J. Environ. Biol. 31(4) : 347 – 352.
- Hwang E. K. & Park C. S. 2020. Seaweed cultivation and utilization of Korea. Algae 2020, 35(2): 107 – 121.
- Jung S. W., Jeon B. H. & Choi C. G. 2019. Characteristics of Summer Marine Algal Community and Barren Ground in the Southern Coast of Jeju, Korea. Journal of the Korean Society of Marine Environment & Safety, Vol. 25, No. 2, pp. 212 – 219.
- Kang J. W. 1966. On the geographical distribution of marine algae in Korea. Bull. Pusan Fish. Coll. 7:1 – 125.
- Kang J. W & Chung I. K. 2015. Effects of Temperature and Light Intensity on the Gametophyte Fragment Growth of *Ecklonia cava* Kjellman (Laminariales, Phaeophyta). Korean J Fish Aquat Sci 48(5), 704 – 711.
- Kang L. S. & Yoo S. J. 1993. The acute toxicity of three oils to the early life of *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar. Korean J Phycol 8, 77 – 82.
- Kang S. K. 2011. Economic analysis of the seaweed forest creation project: the case of Jeju Woodo Seokwang-ri. J. Fish. Bus. Admin. 42:37 – 55.
- Kawashima S. 1984. Kombu cultivation in Japan for human foodstuff. Jap J Phycol 32, 379 – 394.
- Kim D. H., 2010. Global Warming Effect on Marine Environments and Measure Practices against Global Warming. Journal of Korean Society of Marine Environment & Safety; 16(4), pp. 421 – 425.
- Kim H. J., Im C. Y. & Chung M. S. 2019. Inhibitory Effects of *Ecklonia cava* Ethanol Extract against Noroviruses Causing Foodborne Diseases. Korean J Food Cook Sci Vol. 35, No. 6, 664 – 671.
- Kim M. S., Kim M., Chung M. H., Kim J. H. & Chung I. K. 2008. Species composition and

- biomass of intertidal seaweeds in Chuja island. *Algae* 23, 301 – 310.
- Kim Y. D., Gong Y. G., Jeon C. Y., Song H. I., Park M. S., Lee C. S., Yoo H. I. & Kim Y. H. 2010. Marine Algal Flora and Community Structure in Daejin on the Mid-East Coast of Korea. *Kor J Fish Aquat Sci* 43(5), 532 – 539.
- Kim Y. K., Lee J. Y., Kwak I. S. & Kim J. K. 2020. Diffusion characteristics of *Ecklonia cava* spores around marine forest reefs. *J. Korean Soc. Mar. Environ. Saf.* 26:93 – 102.
- Kim Y. S., Yang E. A. & Nam K. W. 2013. Benthic marine algal flora and community structure of Eocheongdo in western coast of Korea, *Korean J. Environ. Ecol.* 27, 655 – 665.
- Kloareg B., Polne-Fuller M. & Gibor, A. 1989. Mass production of viable protoplasts from *Macrocystis pyrifera*. *Plant Sci.* 62, 105 – 112.
- Kobayashi K. 1975. Growth of extra cellular protoplasts of *Bryopsis maxima* in an agar medium. *Bull Tokyo Gakugei Univ Ser* 27:1 – 5.
- Koirala P., Jung H. A. & Choi J. S. 2017. Recent advances in pharmacological research on *Ecklonia* species: a review. *Arch. Pharm. Res.* 40:981 – 1005.
- Kuhlenkamp R. & Müller D. G. 1994. Isolation and Regeneration of Protoplasts from Healthy and Virus-infected Gametophytes of *Ectocarpus siliculosus* (Phaeophyceae). *Botanica marina.* 37: 525 – 530. <https://doi.org/10.1515/botm.1994.37.6.525>
- Lee Y. P. & Kang S. Y. 2001. A catalogue of the seaweeds in Korea. Publishing Department of Cheju National University. Jeju, Korea.
- Littler M. M. & Littler D. S. 1984. Relationships between macroalgal functional form groups and substrate stability in a subtropical rocky intertidal system. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 74: 13 – 34.
- Li Y. X. & Kim S. K. 2011. Utilization of seaweed derived ingredients as potential antioxidants and functional ingredients in the food industry: An overview. *Food Sci. Biotechnol.* 20:1461 – 1466.
- Mollet J. C., Verdus M. C., Kling R. & Morvan H. 1995. Improved protoplast yield and cell wall regeneration in *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenfuss (Gracilariales, Rhodophyta).

- J Exp Bot 46:239 – 247.
- Mueller-Dombois D. & Ellenberg H. 1974. Aims and Methods of Vegetation Ecology. John Wiley and Sons, New York, U.S.A., 1 – 547.
- Oh B. G., Lee J. W. & Lee H. B. 2002. A summer marine benthic algal flora and community of uninhabited islands in Haenamgun, southern coast of Korea. J Kor Fish Soc 35, 57 – 63.
- Oh J. C., Ahn J. K., Kim C. D., Jeong J. B. & Choi H. G. 2015. Seasonal Variations in the Macroalgal Flora and Community Structure in Hallyeohaesang National Park on the South Coast of Korea. Korean J Fish Aquat Sci 48(5),768 – 775.
- Ohno M. 1985. Marine forest-its ecology and constructing technology. Kaiyo Kagaku 17:706 – 713.
- Ohno M. & Matsuoka M. 1993. *Undaria* cultivation 'Wakame'. In: Ohno M., Critchley A. T. (eds) Seaweed cultivation and marine ranching. Jap Int Coop Agency, Yokosuka, Japan, 41 – 50.
- Oohusa T. 1993. The cultivation of *Porphyra* 'Nori'. In: Ohno M, Critchley AT (eds) Seaweed cultivation and marine ranching. Jap Int Coop Agency, Yokosuka, Japan, 57 – 74.
- Orfanidis S., Panayotidis P. & Stamatis N. 2001. Ecological evaluation of transitional and coastal waters: A marine benthic macrophytes-based model. Mediterr Mar Sci 2, 45 – 65. <http://dx.doi.org/10.12681/mms.266>.
- Orfanidis S., Panayotidis P. & Stamatis N. 2003. An insight to the ecological evaluation index (EEI), Ecol. Indic., 3, 27 – 33.
- Reddy C. R. K., Dipakkore S., Kumar G. K., Jha B., Cheney D. P. & Fujita Y. 2006. An improved enzyme preparation for rapid mass production of protoplasts as seed stock for aquaculture of macrophytic marine green algae. Aquaculture 260:290 – 297.
- Reddy C. R. K., Gupta M. K. & Mantri V. A. 2008. Seaweed protoplasts: status, biotechnological perspectives and needs. J Appl Phycol 20:619 – 632.
- Roleda M. Y., Morris J. N., McGraw C. M. & Hurd C. L. 2012. Ocean acidification and seaweed reproduction: Increased CO₂ ameliorates the negative effect of lowered pH on meiospore

- germination in the giant kelp *Macrocystis pyrifera* (Laminariales, Phaeophyceae). *Global Change Biol* 18, 854 – 864. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2486.2011.02594x>.
- Ronelie C. Salvador & Augusto E. Serrano. 2005. Isolation of protoplasts from tissue fragments of Philippine cultivars of *Kappaphycus alvarezii* (Solieriaceae, Rhodophyta). *J Appl Phycol*. 2005;17(1):15 – 22. doi: 10.1007/s10811-005-5516-5.
- Schiewer S. & Wong M. H. 1999. Metal binding stoichiometry and isotherm choice in biosorption. *Environ. Sci. Technol.* 33:3821 – 3828.
- Segawa S. 1956. Colored illustrations of the seaweeds of Japan. Osaka, Pub. Co., LTD. 195 pp.
- Shibata T., Ishimaru K., Kawaguchi S., Yoshikawa H. & Hama Y. 2007. Antioxidant activities of phlorotannins isolated from Japanese Laminariaceae. *J. Appl. Phycol.* 20:705 – 711.
- Shikh D., Reddy C. R. K. & Bhavanath J. 2005. Production and seeding of protoplasts of *Porphyra okhaensis* (Bangiales, Rhodophyta) in laboratory culture. *J Appl Phycol* 17:331 – 337.
- Sohn C. H. 1987. Phytogeographical characterization and quantitative analysis of algal communities in Korea. Ph. D. Thesis. Chonnam National Univ., Kwangju, Korea, 1 – 111.
- Tatewaki M. & Nagata K. 1970. Surviving protoplasts in vitro and their development in *Bryopsis*. *J Phycol* 6:401 – 403.
- Tominaga H., Serisawa Y. & Ohno M. 2004. Seasonal changes in net production of the bladelets and size of the proximal blade of *Ecklonia cava* in Tosa Bay, Kochi Prefecture. *Jpn. J. Phycol.* 52:13 – 19.
- Tseng C. K. 1987. Laminaria mariculture in China. In: Doty MS, Caddy JF and Santelices B (eds) Case studies of seven commercial seaweed resources. FAO Fish Tech Paper 281 FAO, Rome.
- Varvarigos V., Katsaros C. & Galatis B. 2004. Radial F-actin configurations are involved in polarization during protoplast germination and thallus branching of *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyceae, Laminariales). *Phycologia*, 43: 693 – 702.
- Wells E., Wilkinson M., Wood P. & Scanlan C. 2007. The use of macroalgal species richness

- and composition on inter tidal rocky seashores in the assessment of ecological quality under the European water framework directive. *Mar Pollut Bull* 55, 151 – 161.
- Wijesekara I., Yoon N. Y. & Kim S. K. 2010. Phlorotannins from *Ecklonia cava* (Phaeophyceae): Biological activities and potential health benefits. *Biofactors* 36:408 – 414.
- Wijesinghe W. A. J. P. & Jeon Y. J. 2012. Exploiting biological activities of brown seaweed *Ecklonia cava* for potential industrial applications: a review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 63:225 – 235.
- Yokohama Y., Tanaka J. & Chihara M. 1987. Productivity of the *Ecklonia cava* community in a bay of Izu Peninsula on the Pacific Coast of Japan. *Bot. Mag. Tokyo* 100:129 – 141.
- Yoo H. I., Jeong B. K., Park J. K., Heo J. S., Park M. S. & Choi H. G. 2014. Seasonal Variability of Marine Algal Flora and Community Structure at Jungjado, on the South Coast of Korea. *Kor J Fish Aquat Sci* 47(6),927 – 934.
- Yoo S. A. & Lee I. K. 1980. A study on the algal communities in the South Cost of Korea. *Proc. Coll. Natural Sci. SNU.* 5: 109 – 138.
- Yoshida T., Yoshinaga K. & Nakajima Y. 2000. Check list of marine algae of Japan (revised in 2000). *Jpn. J. Phycol.* 48:113 – 166.
- Zablackis E., Vreeland V. & Kloareg B. 1993. Isolation of protoplasts from *Kappaphycus alvarezii* var. *tambalang* (Rhodophyta) and secretion of iota-carrageenan fragments by cultured cells *J Exp Bot* 44:1515 – 1522.

6. Acknowledgement

2018년에 학교를 중퇴하려고 생각하였었는데 실험실에 들어가고 대학원에 입학하여 석사 졸업을 앞두고 있는 것이 믿기지 않습니다. 짧다면 짧고 길다면 긴 시간동안 저를 응원해주시고 믿어 주신 분들께 감사의 인사를 전하고자 합니다.

먼저 저의 대학원 생활을 누구보다도 응원해 주신 부모님께 감사드립니다. 학부생 때 참가한 연구공모전과 대학원 입학 후 참가하였던 여러 학회들을 준비하면서 힘들 때, 그리고 점점 지쳐가 있을 때 저에게 할 수 있다는 자신감을 주고 잘하고 있다는 응원은 언제나 기억할 것입니다. 그 응원 덕분에 여기까지 올 수 있었다고 과언이 아닐까 싶습니다. 그리고 가끔 저에게 활력을 불어넣어준 우리 형, 공모전에서 수상했을 때 축하해 주신 친척분들 모두 감사합니다.

저의 대학원 생활동안 많은 것을 지도해 주시고 많은 것을 경험하게 해 주신 조태오 교수님께 감사합니다. 교수님 덕분에 배움과 깨달음의 즐거움, 연구에 대한 성취감들을 알게 되었습니다. 그리고 많은 것을 가르쳐 주신 원부연 박사님도 감사합니다. 제 학위 논문을 심사하시느라 고생하신 송상기 교수님과 새로 부임하신 이한용 교수님, 실험실에 찾아가거나 복도에서 마주치면 반갑게 인사를 받아 주시던 전택중 교수님과 이준식 교수님, 수업시간에 발표자료에 대해 많은 조언을 알려주신 이현화 교수님, 생각을 풍부하게 할 수 있도록 만들어 주신 조광원 교수님, 여러 질문에 대해 열정적으로 답변을 주신 윤성명 교수님 그리고 저희 평생 지도 교수님이셨던 박현용 교수님 모두 감사합니다.

처음 실험실에 들어왔을 때 저를 반겨주었던 정소영 박사님, Ph.D. Avila-Peltroche Jose Giovanni Jesus, Oteng'O Job Antony Otinga, 전진(이현) 누나, 의철이형 모두 감사합니다. 덕분에 즐거운 실험실 생활을 할 수 있었던 것 같습니다. 그리고 돌아온 동진이 형, 실험실 생활을 시작한 기연이, 새로 온 Romero Orozco Paola Rosa 덕분에 즐거

웠던 실험실 생활을 더욱 즐거웠습니다.

학교를 중퇴할 생각으로 방황하고 있던 저에게 실험실 생활을 제안한 김원범, 박사과정 잘하고 난 먼저 졸업한다. 대학원 입학 동기인 정준한, 구하준 그리고 학부 동기이지만 대학원 선배인 김진솔, 이번에 복학한 문준호, 올해 대학원 입학한 서지성, 기상철, 정유석, 정동원, 손대현, 그리고 다른 과에서 온 임예은 모두 내년에 좋은 결과 있길 바란다. 많은 이야기를 해 주신 하늘 같은 선배님들 김미은 박사님, 주원이형, 영빈이형, 요한이형, 수민이형, 경민이형, 주호형 감사합니다. 학부생으로 실험실 생활중인 한우리, 한나라, 이현유, 이정률, 김이주, 장목인, 강성훈, 이창민, 박연진, 이민지 다들 열심히 공부하면 좋은 결과가 있을 거야. 졸업 후 자주 연락하는 현성이형, 승태형 조만간 다같이 놀러가요.

거의 매일 전화로 재미있는 얘기를 하는 박재중, 조만간 인천으로 놀러 갈게야 지금은 천안에 있구나. 완도로 내려가면 항상 있는 서미소, 군산에서 같은 해양쪽으로 일하는 중인 이재현, 새로운 노트북 살 때 도와준 하민석, 타지에서 열심히 일하는 김승찬, 가끔 생사 확인되는 김민성 모두 조만간 봤으면 좋겠다.

마지막으로 저의 실험실 생활 중에 돌아가신 외할머니, 잘 지내시죠? 물론 외할아버지, 친할아버지, 친할머니도요. 저는 이번에 대학원 석사 졸업을 앞두고 있습니다. 먼 곳에서 저를 응원해 주신 것에 감사합니다. 학위 논문 나오면 가지고 찾아뵙게요. 보고 싶습니다.

긴 글 읽어주셔서 감사드리며 석사과정 동안 배운 것들을 잘 활용할 수 있는 사람이 되겠습니다. 이상 석사 학위논문을 마치겠습니다. 최광철 올림.