

북극 다산과학기지 주변 시료의 지방산 분석
Fatty Acids Analysis of Soils around the Arctic Station, Dasan



건국대학교

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “다산과학기지 기반 지질-대기-생태 환경변화 연구”과제의 위탁 연구“북극 다산과학기지 주변 시료의 지방산 분석”과제의 최종보고서(보고서 제목:“(위탁과제 최종보고서)”)로 제출합니다.



총괄연구책임자	: 이 유 경
위탁연구기관명	: 건국대학교
위탁연구책임자	: 양 영 헌
위탁참여연구원	: 김 정 호
“	: 홍 주 원

보고서 초록

위탁연구과제명	북극 다산과학기지 주변 시료의 지방산 분석				
위탁연구책임자	양 영 현	해당단계 참여연구원수	9명	해당단계 연구비	150,000,000
연구기관명 및 소속부서명	건국대학교 생물공학과		참여기업명	해당사항 없음	
국제공동연구	상대국명 : 상대국연구기관명 :				
요약				보고서 면수	165 쪽
<p>본 과제의 목표인 다산과학기지 기반 지질-대기-생태 환경변화 연구의 위탁 연구로 다산과학기지 주변 빙하 후퇴 지역에서 빙하 소멸 시기에 따른 유기물, 미생물 변화 파악을 목적으로 대표적인 유기물 지표인 지방산 분석을 위한 연구이다. 이번 연구를 통하여 토양 시료 내 지방산 표지 인자 분석을 위한 추출 조건 최적화, 탄소 저장 물질 분석 기술 수립을 통한 다산과학기지 주변 빙하 후퇴 지역 토양 표지 인자 비교 분석, Nutrient depletion 조건 적용을 통한 극지 미생물의 탄소 저장 물질 분석 등의 연구를 수행하였으며, 이를 통하여 빙하 후퇴시기에 따른 미생물 군집 분석을 위한 지방산 표지 인자 분석을 실시하였다. 다산 기지 부근의 Midtre Lovenbreen 지역을 직접 탐사하여, 빙하 후퇴지역에 따른 12개 지역에서의 시료를 획득하여, 이를 Phospholipid fatty acid analysis (PLFA)방법을 통하여 미생물 군집 분석을 실시하였으며, 이에 따른 미생물의 분포 변화, 비옥도 변화, 미생물 개체수의 변화 등을 관측할 수 있었으며, 빙하후퇴시기와의 상관관계를 확인할 수 있었다. PLFA 방법을 통한 미생물 군집방법을 다산 기지 기반 극지 미생물에 분석에 적용한 연구 결과로 타지역 분석으로 영역을 확대할 수 있다..</p>					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	다산기지, 지방산 분석, 지방산마커, 미생물 군집 분석, 극지미생물			
	영 어	Dasan, Fatty acid analysis, Fatty acid marker, Microbiome analysis, polar bacteria			

요 약 문

I. 제 목

북극 다산과학기지 주변 시료의 지방산 분석

II. 연구개발의 목적 및 필요성

빙하 후퇴 지역의 빙하 소멸 시기 및 지형에 따른 유기물 변화를 파악하기 위하여 대표적인 지표인 지방산 분석을 통한 토양 미생물 분석 및 이를 통한 환경/지역 간 미생물 연구

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 효율적 지방회수 방법의 확립
 - 지질 회수 및 유도체화법 확립
 - 지질 종류별 분획법 확립
- 극지 균주의 lipid 생산 조건 최적화
 - 극지 균주에서의 지방산 생산 검출
- 북극 토양 유래의 lipid marker 분석
 - 샘플링이 완료된 토양 시료의 lipid marker의 추출 및 분석
 - Lipid marker를 이용한 미생물 군집 유추
- 북극 토양 미생물의 순수분리 및 지질대사체 분석
 - 북극의 토양 샘플로부터 미생물을 순수분리
 - 균주의 생화학 실험 및 지질 대사체 분석 및 비교
- 북극 빙하 후퇴 시기 별 대표 지역 간 균종 비교
 - 급속도로 후퇴하는 빙하에 따른 각 sampling site 별 토양 시료 sample 의 PLFA 추출 및 분석.
 - Lipid marker를 이용한 미생물 군집 유추 후 해빙 시기 별 total

- PLFA (살아있는 생물량)와 기질 농도, 저온 스트레스에 관한 연구.
- 해빙에 따른 균종 변화를 NGS를 통해 분석 및 연구.
- Rank abundance를 통한 미생물 종 수 예측

● 극지 미생물 lipid marker 비교 연구

- 다양한 북극 미생물 (*Bacillus* 류) 의 지방산 분석.
- *Bacillus. sp* 별 생화학 실험 및 지질 대사체 분석 및 비교.

IV. 연구개발 결과

● 효율적 지방회수 방법의 확립

- 토양으로부터 지방 추출 공정 확립 및 최적화하여 극지 토양으로부터 지방 추출 준비 완료
- 토양으로부터 2가지의 선택적 유도체화 방법을 통한 분석법을 확립하여 극지 토양을 추출서부터 지방산 분석법 구축.
- 컬럼 크로마토그래피를 활용하여 효과적으로 PLFA를 분획한 후 GC-FID, GC-MS 분석 완료
- 전체 지질 분석 뿐만 아니라 PLFA 분획 완료 후 GC-MS 분석 완료 및 peak 검출 가능하게 함. 아울러 북극 시료 2개에 현재 적용하여 지방산 추출에 성공함.

● 북극 토양 유래의 lipid marker 분석

- 샘플링 완료된 북극 토양 시료로부터 지질을 추출하여 최적화된 컬럼 크로마토그래피를 활용하여 인지질 지방산(PLFA)을 분획
- 최적화된 유도체화 방법인 Alakline mild methanolysis 방법으로 인지질 지방산(PLFA)을 질량분석기(GC-MS)로 지방산 분석완료
- 기존 문헌 및 GC-MS 운용상에 분석 가능한 PLFA를 적용하여 PLFA-미생물 간의 상호 관계를 적용함
- 이러한 lipid marker를 이용하여 총 8개의 site에 대한 미생물 군집 분석을 완료함

● 북극 빙하 후퇴 시기 별 대표 지역 간 미생물 균종 비교

- 전년도 샘플 분석을 통해 얻은 지방산 분포를 이용해 PCA (주성분 분석) 실시.
- PCA를 이용하여 나온 유사성이 가장 큰 세 지역들의 샘플을 Group화 함.
- 기존 authentic data를 토대로 한 PLFA 데이터에 대한 비교 및 해석을 완료함.

- 선정된 3 가지 sample로 빙하가 녹은 후 흐른 시간에 따라 total PLFA와 기질농도, 저온 스트레스에 관한 경향성 확인.
 - NGS를 통한 미생물 군집 분류 및 분포 분석
 - 각 후퇴 시기 별 지역들에서 샘플링이 완료된 북극 토양 시료로부터 지질을 추출하여 최적화된 Column Chromatography 를 활용하여 인지질 지방산(PLFA)을 분석
- 극지 균주의 lipid 생산 조건 최적화
 - 극지 균주인 *Bacillus pumilus*의 활용 가능한 탄소원 확인 (Glucose, cellobiose 등)
 - 여러 탄소원을 활용한 극지 미생물 유래 지방산 생산 및 지방산 측정법 확립하여 이를 통한 2차년도의 극지 미생물 지방산 분석이 가능하게 됨.
 - 북극 토양 미생물의 순수분리 및 지질대사체 분석
 - 북극 다산과학기지 주변 토양으로부터 얻은 10여종의 미생물 순수분리 및 기초 활성 테스트를 통한 극지 미생물의 성장 패턴 및 관련 효소 관측
 - 극지 유래 *Pseudomonas sp.* 에 대한 온도, pH, NaCl 농도에 따른 성장 여부 등의 생화학 실험 수행
 - 극지 미생물 lipid marker 비교 연구
 - 극지 유래 *Bacillus sp.* 에 대해 온도에 따른 total fatty acid 변화 경향성 분석 및 확인.
 - *Bacillus pumilus* PAMC 23174 균주의 배양 조건에 따른 PLFA 분석 및 경향성 연구.

V. 연구개발결과의 활용계획

- 다산기지 주변 토양의 지방산 분석을 통한 미생물 군집 분석, 미생물 군락 구조 예측, 환경적 요인 예측
- 동토층과 극지 미생물에 대한 상관관계를 추정하는 체계적 연구 적용
- 지방대사체 프로파일링 기술을 이용한 극지 미생물 군집 분석 및 다양한 지방 대사 연구로 활용
- 북극 토양 Sample을 이용한 생화학 실험 결과를 토대로 대사체 분석에 활용

- 북극 토양의 lipid marker를 통해 극지 미생물 군집 분석 및 토양 환경을 유추
- 북극 토양에서 분리한 미생물을 활용하여, 실험적으로 확인한 데이터를 토대로 대사체 분석 및 생태계 변화에 따른 모델링에 활용



S U M M A R Y

I. Title

Fatty acid analysis of soil samples nearby
Dasan Arctic Research Station

II. Purpose and Necessity of R&D

To recognize environmental organic sources belonging to thawing of glaciers, its indicator such as microbial PLFA and also environmental/regional microbial research is needed.

III. Contents and Extent of R&D

- Management of efficient fatty acid extraction method
 - Fatty acid extraction & derivatization
 - Descriptive fractionation of fatty acids

- Optimization of arctic microbial lipid production condition
 - Detection of arctic microbial lipid production

- Lipid marker analysis of arctic soil sample
 - Lipid extraction from soil sample
 - Inference of microbial community by lipid marker

- Pure culture of arctic microbe & analysis of lipid derivatives

- Comparison of microbes between different sampling sites which depends on thawing period
 - Microbial PLFA extraction & analysis of each soil sample from different sampling sites.
 - Total PLFA, substrate concentration, cold stress researching after analogizing microbial community by lipid marker

- Researching alteration of microbes according to melting glacier by NGS (Next generation sequencing) method
- Estimating microbial variety & quantity with Rank abundance.

- Research of arctic microbe's lipid marker
 - Fatty acid analysis of various arctic microbes
 - Lipid derivative analysis & biochemical experiments of *Bacillus*. sp

IV. R&D Results

- Management of efficient fatty acid extraction method
 - Optimization of lipid extraction from soil
 - Established 2 kinds of selective derivatization
 - PLFA fraction analysis using column chromatography by GC-FID & GC-MS
- Optimization of arctic microbial lipid production condition
 - Identification of usable carbon source for arctic bacteria, *Bacillus pumilus*
 - Lipid production using different carbon sources & analysis
- Lipid marker analysis of arctic soil sample
 - Lipid extraction from soil sample & fractionation of PLFA using optimized column chromatography
 - PLFA analysis using optimized alkaline mild methanolysis method
 - Application of PLFA on GC-MS management & adjustment between PLFA-microbes
 - Analysis of microbial community on 8 sampling sites by lipid marker
- Pure culture of arctic microbe & analysis of lipid derivatives
 - Pure cultured microbes from nearby Dasan arctic research center & checked growth pattern and enzymes
 - Biochemical tests about temperature, pH, NaCl concentration with *Pseudomonas* sp. derived from arctic soil
- Comparison of microbes between different sampling sites which depends on thawing period
 - PLFA data comparison based on existing authentic data with grouping

samples by PCA method

- Identification of soil sample's total PLFA, substrate concentration, cold stress
- Confirmation of analyzing microbial communities by NGS method

- Research of arctic microbe's lipid marker
 - Analysis on Bacillus sp. 's total fatty acid alteration of temperature
 - Researching variation of PLFA contents of Bacillus pumilus PAMC 23174 strain according to fermentation condition

V. Application Plans of R&D Results

- Estimation of arctic soil's environmental condition & microbial community analysis by lipid markers

- Analysis of derivatives using microbes from arctic soil & modelling of environmental alteration



목 차

제 1 장 서론

- * 연구개발의 목적, 필요성 및 범위 등을 기술

제 2 장 국내외 기술개발 현황

- * 국·내외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국·내외 기술개발현황에
서 차지하는 위치 등을 기술

제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

- * 이론적, 실험적 접근방법, 연구내용, 연구결과를 기술

제 4장 연구 개발 목표 달성도 및 대외기여도

- * 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분
야의 기술발전에서의 기여도 등을 기술

제 5 장 연구 개발 결과의 활용계획

- * 추가연구의 필요성, 타 연구에의 응용, 기업화 추진방안을 기술
- * 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능함.

제 6 장 참고문헌

- * 보고서 작성 시 인용된 모든 참고 문헌을 열거한다.

제 1 장 서론

제 1 절 연구의 목적

본 과제의 목적은 다산과학기지 주변 빙하 후퇴 지역에서 빙하 소멸 시기 및 지형에 따른 대기·유기물·생태계 변화를 파악하고자 함이며, 스발바르 및 그린란드의 고환경 특성 및 지질·광물·지구화학 특성 이해하는 것이다.

따라서 이러한 목표를 수행하기 위한 위탁과제로서

다산과학기지 주변 빙하 후퇴 지역에서 지형에 따른 토양 내 유기물 변화를 모니터링 할 수 있는 지방산 표지 인자 분석 기술 수립

을 과제의 목표로 한다.

제 2 절 연구의 필요성

북극은 지구의 기상 기후 및 해류의 순환 등을 통해 지구의 환경 변화에 중요한 역할 수행한다. 북극에서 지구의 기후를 만들어 내기 때문에 그 지역의 변화가 지구 전체에 중대한 영향을 미치기 때문이다. 지난 년간 북극에서 관측된 겨울철 평균 기온이 10~15 °C 정도 수준이나 상승하는 변화가 있었다.

최근 발간되는 북극관련 연구결과를 보면 1970년대 초반부터 북극양 중앙부의 바다 얼음의 두께가 30 % 이상 감소하였으며 최근 북극 얼음 면적은 매 10 년간 4 %씩 감소하고 있다고 한다. 이에 따라서 북극의 차가운 대기가 한반도의 기후 변화에 영향을 미치며 기온상승으로 인한 해빙의 감소 및 기류의 변화 등의 기상 이변 현상이 야기되고 있다.

이와 같이 북극의 기후변화가 초국가적 현상으로 영향을 미치므로 이에 대한 관심과 지속적인 연구의 필요성이 제기되며, 기후변화에 대한 예측과 대비가 요구된다.

수많은 빙하가 해빙되고 있는 가운데 몇 만 년 간 얼어있던 북극의 땅이 표출되면서 유기물의 출입이 시작되고 첫 번째로 미생물 군집이 토양을 점령하게 된다. 그렇기 때문에 다산기지 주변의 빙하가 순차적으로 녹고 있는 Midtre Geikiebrean 지역을 모델로 하여 토양 내 지방산 측정을 통한 미생물 군집 분포의 예측을 수행하였다.

제 3 절 연구의 범위 및 연구체계

북극의 유기물의 흐름 및 미생물 군집의 다양성 연구의 필요성에 의해서, 다산과 학기지 주변 빙하 후퇴 지역에서 지형에 따른 토양 내 유기물 변화를 모니터링 할 수 있는 지방산 표지 인자 분석 기술을 수립한다.

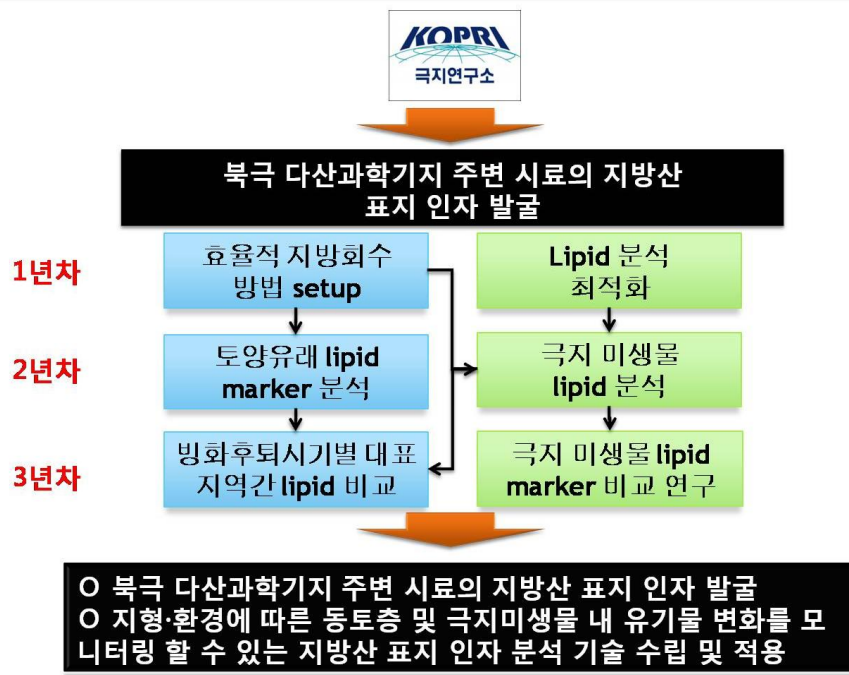
본 과제의 목표를 이루기 위하여

- 빙하 후퇴 지역의 빙하 소멸 시기 및 지형에 따른 유기물 변화를 파악하기 위하여 대표적인 유기물 지표인 지방산 분석 필요
- 극지연구소에 지방산을 정밀하게 분석할 위탁연구 필요



- 토양 시료 내 지방산 표지 인자 분석을 위한 추출 조건 최적화
- 지방산 및 탄소 저장 물질 분석 기술 수립을 통한 다산과학기지 주변 빙하 후퇴 지역 토양 표지 인자 비교 분석
- Nutrient depletion 조건 적용을 통한 극지 미생물의 지방산 표지 및 탄소 저장 물질 인자 분석

이를 통하여 지형에 따른 토양 내 유기물 변화를 모니터링 할 수 있는 지방산 표지 인자 분석 기술을 수립할 수 있다.



본 연구는 북극 다산과학기지 주변의 토양 샘플로부터 지방산 표지 인자를 발굴하기 위하여 1 년차에 토양으로부터 지질을 효과적으로 회수하는 조건을 확립하고 GC-MS 기기를 이용하여 지질을 분석하기에 적합한 분석조건을 설정하는 것을 목표로 한다. 2 년차에는 확립된 토양 인지질 분석법을 이용하여 토양 유래의 lipid marker를 정성 및 정량 분석함과 동시에 토양으로부터 분리된 극지 미생물의 지질을 분석하는 것이 세부 계획이다. 또한 마지막 3 년차에는 북극의 샘플링 지역에서 빙하가 후퇴한 시기별 토양의 lipid marker의 프로파일링을 비교함으로써 지구 온난화에 따른 해빙지역의 첫 번째 우점 미생물들의 군집과 유기물의 흐름을 연구하는 것을 계획하고 있다. 이와 더불어 극지 미생물의 lipid marker들을 비교 및 분석하여 새로운 marker를 발굴하여 최종적으로 지형과 환경에 따른 동토층 및 극지미생물 내 유기물 변화를 모니터링 할 수 있는 지방산 표지 인자 분석 기술을 수립하고 적용할 수 있다.

[연차별 연구목표]

연차	연구 목표	연구 내용
1차 연도 (2014)	다산과학기지 주변 지방산 분석을 위한 토양 내 지방산 회수 기술 개발	효율적 지방회수 방법 setup
		Lipid 생산 조건 최적화
2차 연도 (2015)	다산과학기지 주변 지방산 분석을 위한 토양 내 지방산 분석 기술 개발	토양유래 lipid marker 분석
		Total lipid 극지 미생물 지질대사체 분석
3차 연도 (2016)	다산과학기지 주변 토양 내 환경 간/지 역 간 지방산 변화 비교	다른 환경 간/지역 간 lipid 변화 비교
		미생물 균종 간 비교

연구 목표는 다산과학기지 주변 토양 내 환경 간/지역 간 지방산 변화를 비교하는 것이며, 해빙 시기에 따라 채취 된 토양 sample을 PLFA 추출 및 분석으로 2년차 연구 결과로 수립된 Lipid marker를 이용하여 미생물 군집을 유추하고 total PLFA와 기질 농도, 저온 스트레스와 관련된 연구를 진행하였다. 해빙 시기에 따른 균종 변화는 NGS를 통해 분석하였으며 추가적으로 PLFA를 이용하여 정량성을 더하였다.

또한 극지 유래 미생물의 lipid marker를 비교함으로써 배양 조건에 따른 결과 data를 통해 극지 환경의 변화에 맞는 미생물의 종류와 지방산 pattern을 도출해낼 수 있다. 극지 유래 미생물은 Polar and Alpine Microbial Collection (PAMC)으로부터 얻은 균주를 사용하였다.

이는 차후 기후 변화에 따른 예측과 대비를 위한 생태계 모델링에 활용 될 것이다.

제 4 절 성과지표

□ 정성적 성과

성과목표	세부목표		평가지표 (핵심성과 스펙)	검증방법	가 중 치 (%)
1. 토양 시료 내 지방산 및 탄소 저장 물질 분석 기술을 통한 지역·환경 간 표지인자 비교 분석	1-1	효율적 지방회수 방법 setup	- 효율적 지방회수 방법 연구 - 토양 유래 lipid 회수 가능성 확인	- 분석결과 제시	15
	1-2	토양유래 lipid marker 분석	- Lipid 수종 이상 분석 정량화	- 분석결과 제시	15
	1-3	다른 환경 간/지역 간 lipid 변화 비교	- 다른 환경/ 지역 간 lipid 패턴 변화 비교 분석 - 관련성 연구	- 분석결과 제시	20
2. Nutrient depletion 조건 적용을 통한 극지미생물의 지방산 표지인자 및 탄소 저장 물질 분석	2-1	Lipid 생산 조건 최적화	- Nutrient 조건에 따른 극지 미생물 지방산 생산 연구	- 분석결과 제시	20
	2-2	극지 미생물 지질대사체 분석	- 극지 미생물의 total lipid 분석 - 미생물 지방 표지인자 연구	- 분석결과 제시	10
	2-3	종간 비교	- 다양한 미생물간 지질 대사체 비교 연구	- 분석결과 제시 - 논문 투고	20

성과목표	세부목표		평가지표 (핵심성과 스펙)	검증방법	가 중 치 (%)
3. 북극 토양 지방산 추출 하여 얻은 PLFA 분석결과를 토대로 lipid marker 분석 및 비교	3-1	북극 토양으로부터 지방산(PLFA) 분리	- 북극 토양의 지방산 추출 확인 - 사용되는 인지질 지방산(PLFA) 분리	- 분석결과 제시	15
	3-2	GC-MS 분석	- PLFA 수종 이상 분석 정량화	- 분석결과 제시	15
	3-3	기존의 lipid marker를 토대로 비교 및 분석	- 다른 환경/ 지역 간 lipid 패턴 변화 비교 분석 - 관련성 연구	- 분석결과 제시	20
4. 북극 토양에서 순수 분리한 미생물의 생화학특성 및 지질대사체 분석	4-1	북극 토양으로부터 미생물 순수분리	- 극지 미생물의 순수분리 확인	- 분석결과 제시	10
	4-2	분리한 북극 미생물의 생화학 특성 분석	- 다양한 환경 인자에서 성장한 미생물 특성 연구	- 분석결과 제시	20
	4-3	다양한 북극 미생물의 지질 대사체 분석	- 다양한 북극 미생물간 지질 대사체 비교 연구	- 분석결과 제시 - 논문 투고	20

성과목표	세부목표		평가지표 (핵심성과 스펙)	검증방법	가 중 치 (%)
5. 북극 빙하 후퇴 시기 별 대표 지역 간 미생물 군중 비교	5-1	Sampling site 별 PLFA 분석	- PCA에 의한 대표 sample 선정 - Total PLFA, 기질 농도, 저온 스트레스 지수에 대한 경향성 확인	- 분석결과 제시	15
	5-2	Rank abundance 분석	- 미생물 종의 분포도 분석	- 분석결과 제시	15
	5-3	NGS를 통한 미생물 군집 분포 비교	- 토양으로부터 DNA 추출 - NGS 분석을 통한 미생물 군집 분류 및 분포 차이점 분석	- 분석결과 제시	20
6. 극지 미생물 lipid marker 비교 연구	6-1	다양한 극지 유래 미생물의 지방산 분석 및 비교	다양한 북극 미생물간 지질 대사체 비교 연구	- 분석결과 제시	10
	6-2	<i>Bacillus pumilus</i> 23174의 배양온도에 따른 지방산 비교	- 극지 유래의 미생물의 성장 환경에 따른 지방산 분석	- 분석결과 제시	20
	6-3	<i>Bacillus pumilus</i> 23174의 배양액 조성에 따른 지방산 profiling	- 다양한 성장 인자에서 배양한 미생물 특성 연구	- 분석결과 제시	20

□ 정량적 성과 (3년)

구분		계획					
논문		국외			국내		
		SCI (주/공동)	기타 (주/공동)	소계 (주/공동)	SCI (주/공동)	기타 (주/공동)	소계 (주/공동)
		3/2	/	3/2	/	/	/
Proceeding		국외			국내		
단행본(저서)		/					
특허	출원	국외			국내		
	등록				1		
기술실시계약							
세미나개최							
인터넷사이트 개설							
기타사항							

3개년 결과 (주저자: 8편, 공저자: 1편, 특허 1편)

1. Starch based polyhydroxybutyrate production in engineered Escherichia coli. Bhatia SK, Shim YH, Jeon JM, Brigham CJ, Kim YH, Kim HJ, Seo HM, Lee JH, Kim JH, Yi DH, Lee YK, Yang YH. Bioprocess Biosyst Eng. 2015, 38: 1479-1484. (IF: 1.8)
2. Lipase-Catalyzed Production of 6-O-cinnamoyl-sorbitol from D-sorbitol and Cinnamic Acid Esters. Kim JH, Bhatia SK, Yoo D, Seo HM, Yi DH, Kim HJ, Lee JH, Choi KY, Kim KJ, Lee YK, Yang YH. Appl Biochem Biotechnol. 2015, 76:244-52. (IF: 1.7)
3. Increased vulnerability to physical stress by inactivation of NdgR in Streptomyces coelicolor. Lee BR, Yi DH, Song E, Bhatia SK, Lee JH, Kim YG, Park SH, Lee YK, Kim BG, Yang YH. Appl Biochem Biotechnol. 2015 175:3673-82 (IF: 1.7)
4. Application of diethyl ethoxymethylenemalonate (DEEMM) derivatization for monitoring of lysine decarboxylase activity, Kim YH, Kim HJ, Shin JH, Bhatia SK, Seo HM, Kim YG, Lee YK, Yang YH, Park K, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 2015, 115: 151 - 154 (IF: 2.7)
5. A MALDI-MS-based quantitative targeted glycomics (MALDI-QTaG) for total N-glycan analysis, Kim KG, Kim YW, Hwang CH, Park HG, Jeong JH, Choi KY, Yang YH, Koo M, Kim YG, Biotechnology letters 2015, 159,189-196 (IF: 1.7)

6. Application of a Non-halogenated Solvent, Methyl Ethyl Ketone (MEK) for Recovery of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(HB-co-HV)] from Bacterial Cells. Yang YH, Jeon JM, Yi DH, Kim JH, Seo HM, Rha C, Sinskey AJ, Brigham CJ. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2015, 20: 291-297 (IF: 1.2)
 7. Production and structural characterization of a novel exopolysaccharide from psychrotrophic arctic glacier soil bacterium *Flavobacterium* sp. ASB 3-3. Sathiyannarayanan G, Yi DH, Bhatia SK, Kim JH, Seo HM, Kim YG, Park SH, Jeong D, Jung S, Jung JY, Lee YK, Yang YH, *RSC advances* 2015, 5, 84492-84502 (IF: 3.84)
 8. Sensitive change of iso-branched fatty acid (iso-15:0) in *Bacillus pumilus* PAMC 23174 in response to environmental changes. Yi DH, Sathiyannarayanan G, Seo HM, Kim JH, Bhatia SK, Kim YG, Park SH, Jung JY, Lee YK, Yang YH. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2015 Nov 13
 9. Metal removal and reduction potential of an exopolysaccharide produced by Arctic psychrotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. PAMC 28620, Sathiyannarayanan G, Bhatia SK, Kim HJ, Kim JH, Jeon JM, Kim YG, Park SH, Lee SH, Lee YK, Yang YH *RSC advances* 2016, 6, 96870-96881 (IF: 3.84)
- 특허” 결빙 예방 활성을 가진 극지 유래 엑소폴리사카라이드 생산 균주 (10-2016-0115889)

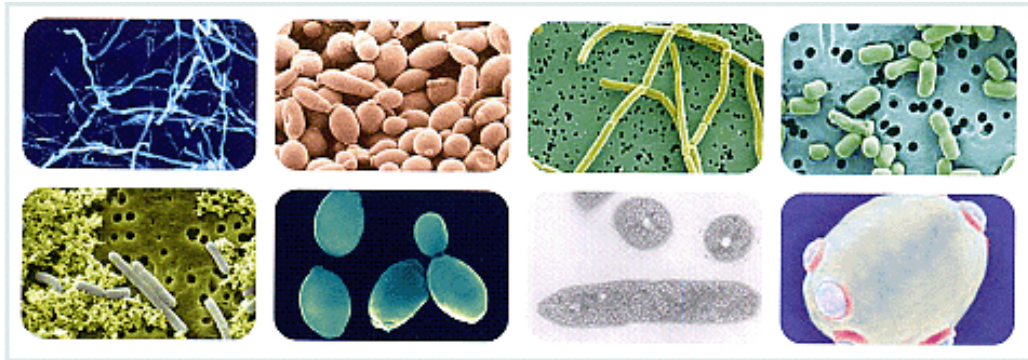
극지연구소

제 2 장 국내외 기술개발 현황

토양은 식생의 분포형태를 좌우하는 중요한 환경인자로 식생에 큰 영향을 미치는 다양한 미생물들을 함유하고 있다. 토양에는 수많은 미생물들이 존재하며¹⁾, 토양으로 유입되는 다양한 유기물들을 효소를 분비하여 분해하여, 단량체를 만들고, 호르몬, 비타민, 식물생장촉진 물질 등을 생산하여 식물의 성장에 도움을 준다. 아울러 미생물은 탄소, 질소, 인산 등의 물질 분해와 순환에 중요한 영향을 주며²⁾, 토양 미생물 개체군과 활성은 유기물 분해, 영양소 순환, 토양구조형성 및 안정성 등을 매개하므로 토양의 질에 미치는 영향이 크며³⁾, 역으로 토양 미생물의 활성은 토양 유형, 토양공극 크기, pH, 온도와 수분함량, 유기물, 중금속 등 생물학적, 비생물학적 요인의 영향을 받아 변화하게 된다⁴⁾. 이러한 토양과 토양미생물의 상호작용을 기반으로 토양미생물의 군집과 활성 분석을 통하여 토양의 상태와 변화를 해석할 수 있으며, 이를 통한 과거의 기후나 생태에 의해 받아왔던 영향을 알 수 있으며, 이러한 토양 미생물의 변화가 토양에 어떤 영향을 미치게 될 것이고, 또한 다시 식생과 기후에 어떠한 영향을 미치게 될 것인지에 대한 연구는 산업적, 학문적 연구가 가능하다고 할 수 있다⁵⁾.

토양미생물은 크게 세균, 방선균, 사상균, 조류, 원생동물 등 5종류로 나눌 수 있다. 이들은 토양 환경에 따라 다양하게 변화하게 되며 또한 토양에게 상호적인 영향을 미치기도 한다. 그러므로 토양 미생물 군집에 대한 연구를 통해서 토양의 상태 및 유기물의 흐름을 추측할 수 있고 나아가 장기적으로 보았을 때 토양에 어떤 영향을 미칠지 예측할 수 있다.

-
- 1) 진현오, 이명중, 신영오, 김정제, 전상근. 1994. 삼림토양학. 향문사. pp.325.
 - 2) 현해남, 좌재호, 2012. 한라산국립공원 자연자원조사. 제주특별자치도 한라산연구소, 1-13
 - 3) 박기춘, 김수정, 2010. 고추재배지에서 퇴비사용에 따른 토양 미생물의 인지질지방산 변화. 한국토양비료학회지 43, 194-199.
 - 4) Manzoni S, Porpotato A. 2007. A theoretical analysis of nonlinearities and feedbacks in soil carbon and nitrogen cycles. *Soil Biol. Biochem.* 39:1542-1556.
 - 5) Paul EA, Clark FE. 1989. In *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, San Diego, CA.;Hawksworth DL. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res* 105:1422 - 2.;Straatsma G, Ayer F, Egli S. 2001. Species richness, abundance, and phenology of fungal fruit bodies over 21 years in a Swiss forest plot. *Mycoll Res* 105:515 - 523.;Torsvik V, Ovreas L, and Thingstad TF. 2002. Prokaryotic diversity - Magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* 296, 1064 - 1066.



- ◎ *Bacillus subtilis* (농촌진흥청 특허균주 포함)
- ◎ *Azotobacter* sp. (질화세균)
- ◎ Phototrophic bacteria (*Rhodospseudomonas* sp.)
- ◎ *Streptomyces* sp. (방선균)
- ◎ *Pseudomonas maltophilia* (항균활성 미생물)
- ◎ *Pseudomonas putida*

그림 1. 토양 내 미생물 종류와 현미경 사진⁶⁾



6) <http://www.obtkorea.com>

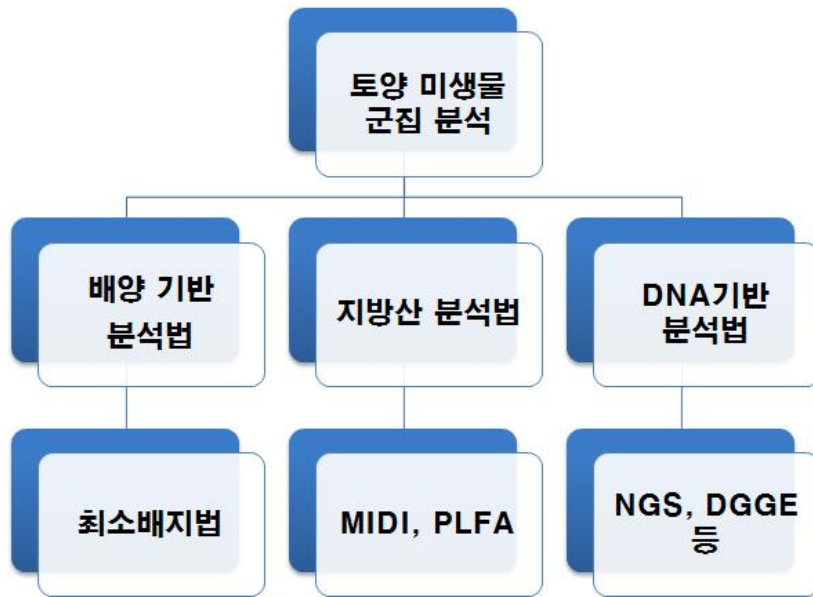


그림 2. 토양 내 미생물 군집 분석 방법들(배양 기반 분석법, 지방산 분석법, DNA기반 분석법)



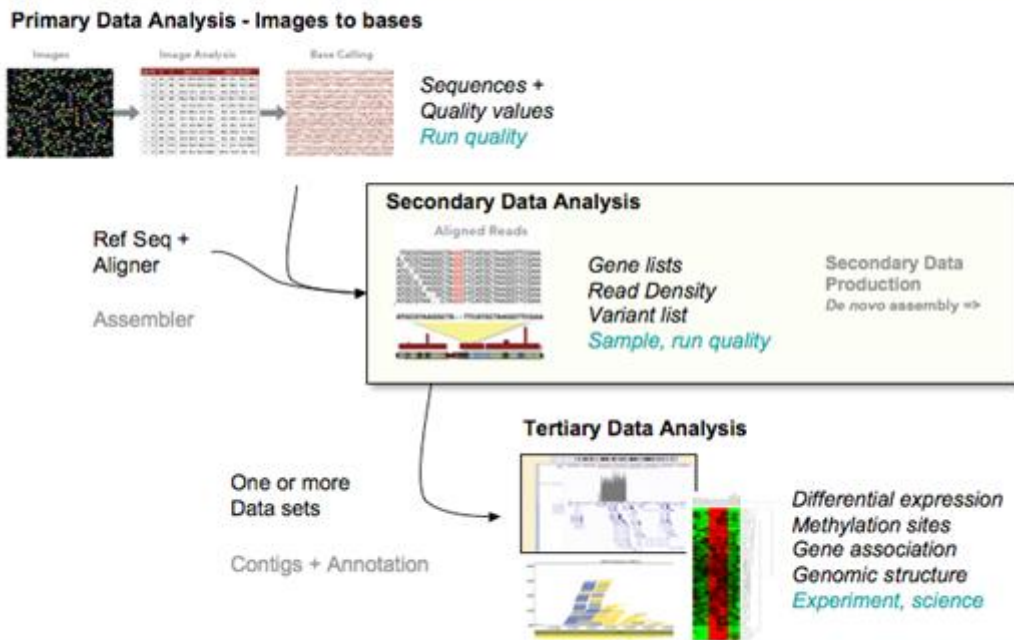
이러한 미생물의 활성, 군집을 평가하는 방법으로 DNA 기반의 방법들, 배양 기반의 방법들, 인지질 기반의 방법들이 사용되고 있으며, 기술상의 차이로 다양한 방법들이 존재하고 있으나, 원리는 크게 위의 세 가지 방법이 활용된다⁷⁾. DNA 방법으로는 Polymerase Chain Reaction (PCR) 기반의 방법들인 Next Generation Sequencing (NGS), Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 등이 대표적으로 있으며 이러한 방법은 토양으로부터 DNA를 추출하여 특정한 지표 유전자 도구를 사용하여 분석하게 되며, 시간은 다소 걸리나 특정 균주 유래의 특정 DNA를 확인할 수 있는 방법으로 즐겨 쓰인다. 특히 NGS와 같은 최신 기술은 수백에서 수천 개 이상의 균주들을 한 번에 찾아낼 수 있는 기술로 토양뿐만 아니라 장내 세균 연구 등에도 널리 쓰이고 있다⁸⁾. 하지만 방대한 양의 데이터를 제공하고 있지만 아직은 고가의 비용과 상당한 분석 시간, PCR 증폭으로 인한 편향 현상, total viable biomass를 제공하지 못하고 있는 부분에서 보완이 필요한 부분이 있다.



7) Widmera F, Flieûbach A, LaczkoÂ E, Schulze-Aurichd J, Zeyer J.(2001) Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA-, PLFA-, and Biologe-analyses Soil Biology & Biochemistry. 33, 1029-1036.; Ramsey PW, Rillig MC, Feris KP, Holben WE, Gannon JE. 2006. Choice of methods for soil microbial community analysis: PLFA maximizes power compared to CLPP and PCR-based approaches. Pedobiologia 50:275--280.

8) Pompanon F, Deagle BE, Symondson WO, Brown DS, Jarman SN, Taberlet P. 2012. Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing., Mol Ecol. 221: 1931-1950.

NGS Data are Analyzed in Three Phases



© Copyright 2000 Geospiza, Inc. All Rights Reserved.

Page 5

geospiza

그림 3. NGS data are analyzed in three phases, Primary data analysis, Secondary data analysis and Tertiary data analysis.(Geospiza)⁹⁾

9) http://lpm.hms.harvard.edu/palaver/sites/default/files/11_03_22_Dennis_Wall_2.pdf

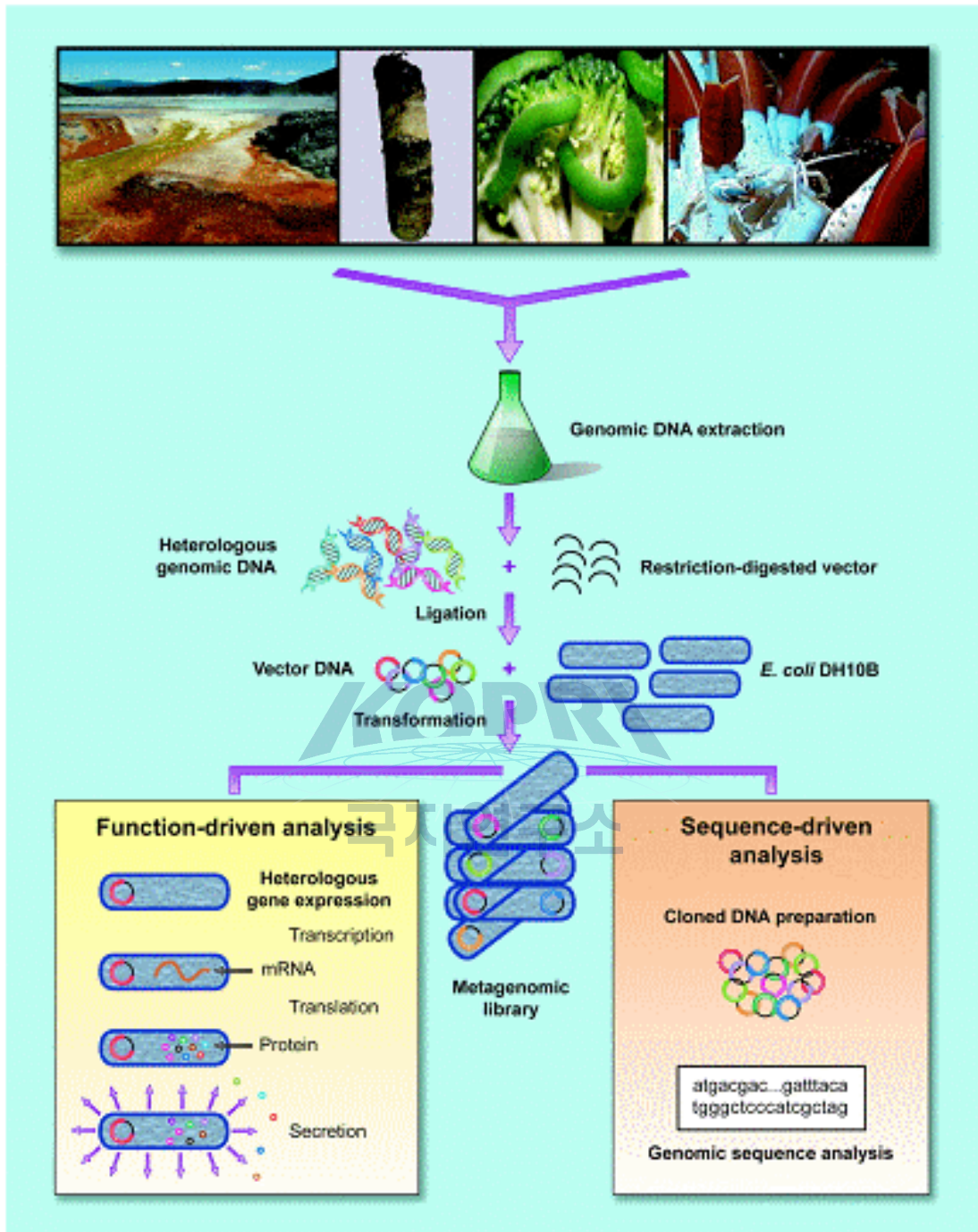


그림 4. 토양 미생물의 메타지놈을 통한 연구방법¹⁰⁾

¹⁰⁾ Handelsman, 2004)

배양 기반의 방법은 토양 전체의 미생물들을 96 well gram negative plate (Biolog™) 에 도말하여 호기성, heterotrophic 미생물의 성장을 지시약의 색변화를 통하여 관찰하여 기질활용과 대사활동에 대한 정보를 얻어 군집의 활동을 유추할 수 있다¹¹⁾. 다양한 기질을 함유한 최소배지 기반의 Biolog에 의한 기질 이용성의 차이로 보는 토양 미생물상의 차이는 유기물 사용에 의해 변화된 토양 미생물상의 최종 활동성의 차이를 보여준다¹²⁾. 이러한 방법은 Community Level Substrate Utilization (CLSU) 혹은 Community Level Physiological Profiling (CLPP)라고도 불리며, 많은 데이터와 미생물 군집에 따라 민감하게 관측할 수 있지만, 미생물의 배양을 필요로 하여, 분석을 위해 배양이 잘되는 미생물과 실제 토양에서 잘 자라는 미생물 간의 차이가 발생할 수 있고, 대사 속도로 인한 편향이 해석을 어렵게 한다. Biolog 방법은 다음 장에서도 소개되겠지만 96 well plate에 약 1000여개의 다른 대사 물질을 통하여 미생물들을 배양하여 대사 가능 여부를 지시약과 자동화된 장비를 사용하여 빠르게 분석할 수 있는 방법으로 잘 소개되어 있다. 보통의 경우는 한 균주의 대사 경로와 탄소원, 질소원 스크리닝에 사용되거나 영양분에 따른 군집 분석의 방법으로도 활용되고 있다.



-
- 11) Garland JL. 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. FEMS Microbiol Ecol 24:289-300.
- 12) Gomez E, Ferreras L, Toresani S. 2006. Soil bacterial functional diversity as influenced by organic amendment application. Bioresource Technology 97 : 1484-1489.



그림 5. 96 well plate와 자동화된 장비를 사용한 Biolog 분석법



인지질 지방산을 분석하는 방법은 PCR이나 배양 등의 편향을 일으킬 수 있는 과정이 없어 자연 상태의 데이터를 얻을 수 있으며, 인지질 지방산(PLFA)은 살아 있는 미생물에만 존재하여 배양이 어려운 미생물까지도 정량할 수 있어 미생물의 활성을 평가하는데 유용하다¹³⁾. 토양 미생물상의 관찰은 정성적, 정량적 관찰을 동시에 할 필요가 있을 뿐만 아니라 일반 배지에서 자라지 않는 대부분의 토양 미생물도 관찰할 필요가 있다. 세포막의 구성성분인 인지질지방산(Phospholipid fatty acid: PLFA)을 토양에서 직접 추출하여 GC-MIDI (MIDI Inc., Newark, DE)로 정성·정량적으로 분석하는 방법은 토양미생물을 배지에 배양할 필요가 없을 뿐만 아니라 정성과 정량이 동시에 가능하기 때문에 토양 미생물상 분석의 대표적인 방법으로 활용되고 있다¹⁴⁾. 이들 지방산 중에서 특정 지방산이 특정 토양 미생물군의 지표가 될 수 있는데, 이 지표를 이용하여 각 미생물 군의 차이를 관찰하거나¹⁵⁾ 모든 지방산 구성을 다변량분석으로 미생물 군락의 차이를 육안으로 관찰할 수도 있다(Ludvigsen et al., 1997)¹⁶⁾. 이러한 여러 가지 방법을 단독 혹은 여러 가지 방법을 함께 활용하여 토양 내의 미생물 군집을 보다 확실하게 분석하기 위하여 활용되고 있다.

인지질 지방산 (Phospholipid fatty acids)은 세포의 membrane을 구성하는 주요 지방 성분으로, 미생물의 chemotaxonomic 표지 인자로 활용되어 미생물의 생태에 널리 활용되는 대상 분자이다. 인지질 지방산은 비누화·에스테르화되며 (saponification & esterification) 지방산 분석을 통하여 미생물 총량과 토양에 살고 있는 미생물의 구성 변화를 관측할 수 있게 된다¹⁷⁾. 토양의 어떤 종류의 미생물이 살고 있다면, 그 미생물은 반드시 세포벽을 가지고 있고, 그 세포벽을 구성하고 있는 인지질 지방산은 분석이 되며, 그 인지질 지방산은 미생물의 종류마다 달라서 그 인지질 지방산을 분석하게 될 때 미생물의 종류와 그 양을 관측할 수 있게 되는 원리가 적용 된다.

이러한 이유로 인지질 지방산 분석은 토양 생태계를 이루는 미생물 분석에 있어 상대적으로 간단하고, 빠르며, 민감하고, 비싸지 않으며, 재현성이 있어 효율적이라 할 수 있다. 하지만 이 방법은 특정한 구성 성분을 자세히 알아 낼 수 없으며, 여러 균종에서 발견되는 지방산 표지인자를 사용하게 되는 가능성의 문제, 인지질 지방산의 불안정성에 기인하는 빠른 분해 등의 문제점들을 안고 있다¹⁸⁾. 그럼에도

13) Green CT, Scow KM. 2008. Analysis of phospholipid fatty acids(PLFA) to characterize microbial communities in aquifers. *Hydrogeo. J* 8:126-141.

14) Kaur A, Chaudhary A, Choudhary R, Kaushik R. 2005. Phospholipid fatty acid - A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Current Sci.* 89:1103-1112.

15) Li WH, Zhang CB, Jiang HB, Xin GR, Yang ZY. 2006. Changes in soil microbial community associated with invasion of the exotic weed *Mikania micrantha*. *Plant Soil.* 281:309-324.

16) Ludvigsen L, Albrechtsen HJ, Holst H, Christensen TH. 1997. Correlating phospholipid fatty acids (PLFA) in a landfill leachate polluted aquifer with biogeochemical factors by multivariate statistical methods. *Fems Microbiology Reviews* 20:447-460.

17) Bossio DA, Scow KM. 1998. Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns. *Microbiol Ecol* 35:265-278.

18) Frostegård A, Tunlid A, Bååth E. 2011. Use and misuse of PLFA measurements in soils, *Soil Biology & Biochemistry* 43:1621-1625.; Pratt B, Riesen R, Johnston CG. 2012. PLFA Analyses of Microbial Communities

도 불구하고, 현재까지 300여 편 (NCBI PUBMED¹⁹⁾ 기준)에 달하는 논문들을 통하여 그 활용성과 실험 방법으로써의 안정성은 이미 확보되어 활용되고 있는 방법이다.



Associated with PAH-Contaminated Riverbank Sediment. Microb Ecol 64:680 - 691

19) www.pubmed.com

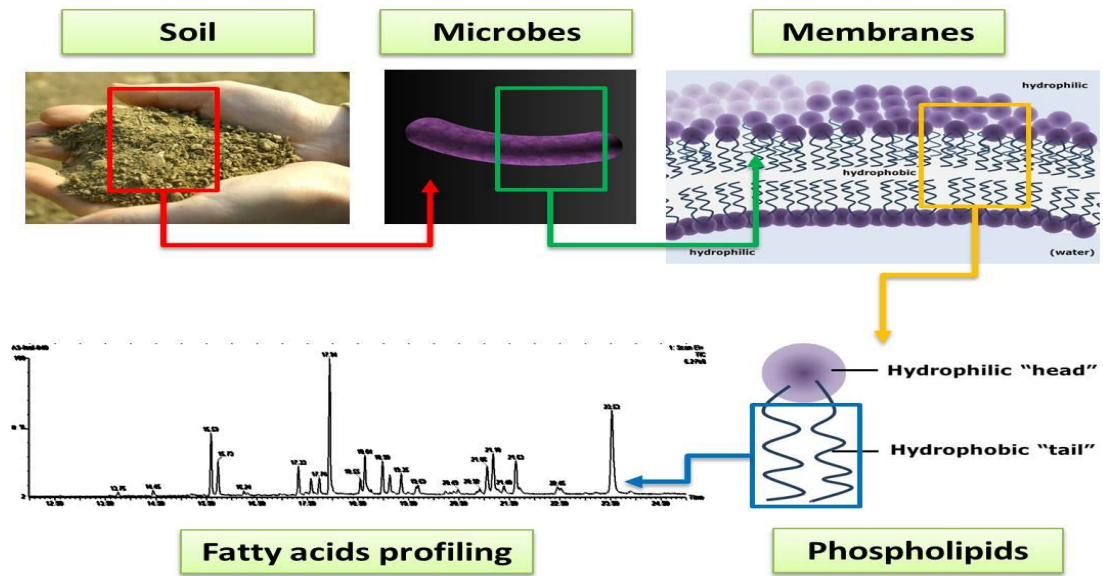


그림 6. 토양 미생물의 막에 존재하는 phospholipid 지방산 분석



토양분야에서 매우 중요한 토양 미생물의 분석 방법 중에 인지질 지방산 방법에 대한 연구는 토양 생태계를 이루는 미생물 분석에 있어 상대적으로 간단하고, 빠르며, 민감하고, 비싸지 않으며, 재현성이 있어 효율적인 시스템이다. 또한 이러한 시스템을 통하여 미생물의 군집 분석이나 군락의 구조 분석, 과거 어떠한 환경 하에 토양이 영향을 받아왔는지에 대한 해석이 가능하여 널리 사용되어 왔으나, 국내에서는 상대적으로 DNA나 배양에 의한 방법에 비해 기술적으로 연구자들의 진입장벽이 크다고는 할 수 없으나, Sequencing회사나 NGS 분석회사들, 배지 판매회사들이 존재하여 과학자들의 연구를 지원하는 시스템이 있는 두 가지 방법에 비해 과학자들이 분석 기관들에 의뢰하기에는 다소간의 어려움이 있어 국내에는 아주 널리 사용 되지 않고 있는 부분이 있다.

그러한 이유로 실험을 위한 분석법 확립이 필요하며, 이를 위한 추출법, 분획법, 분석법, 해석법등에 대한 종합적인 연구가 필요한 실정이다. 하지만 일단 확립이 된 후에는 토양미생물의 군집과 활성 분석과 나아가 토양과 토양미생물의 상호작용에 대한 연구를 통하여 미래의 식생과 기후에 어떠한 영향을 미치게 될 것인지에 대한 연구와, 기후, 식생의 산업적, 환경적, 학문적 파급력이 있다고 할 수 있다.



제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 : 이론적 접근방법

1. 연구 목표에 따른 이론적 접근 방향

빙하 후퇴 지역의 빙하 소멸 시기 및 지형에 따른 유기물 변화를 파악하기 위하여 대표적인 유기물 지표인 지방산을 정밀하게 분석할 위탁연구의 필요성이 제기되었다.

이전 연도에 연구되었던 지방산 추출 및 분석 방법을 통해 북극 빙하 후퇴 시기 별 지역 간 미생물 균종을 비교하였다. 또한 극지 유래 미생물의 lipid marker 비교 연구를 통해 배양 환경과 조건에 따른 PLFA 분석을 하여 경향성을 분석 및 연구하였다.

2. 토양 시료의 Group 화 및 Sample에 따른 total PLFA와 기질 농도, 저온 스트레스에 관한 경향성 확인, NGS를 이용한 미생물 분포 분석

극지 연구소의 도움 및 실험자들이 북극 다산과학기지 주변의 site에 직접 방문하여 채취한 북극 토양 시료(Midtre Lovénbreen)을 활용하여 토양 샘플의 지질 추출 및 인지질 지방산(PLFA) 분석을 수행하였다. 토양 샘플은 PCA를 통해 group화를 거쳐 이에 따른 total PLFA, 기질 농도, 저온 스트레스에 관한 경향성을 도출하였다. 이를 통하여 해빙에 따른 극지 토양의 환경적 영향에 대해 다양한 측면에서 관찰 할 수 있다.

3. 극지 유래 미생물의 lipid marker 비교 연구

다양한 북극 극지 유래 미생물을 이용하여, 이에 따른 미생물의 지방산 분석 및 비교로 균주간의 다른 지방산 패턴을 볼 수 있었다.

또한 극지 유래 미생물 중 하나인 *Bacillus pumilus* PAMC 23174를 배양 환경 및 조건에 따라 PLFA를 분석하여 지방산 변화의 경향성을 확인했다.

제 2 절 : 실험적 접근방법

[토양으로부터 지방산 추출을 위한 실험 방법]

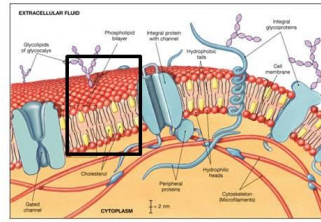
토양을 깊이 0-10 cm 정도의 3-5곳 정도의 다른 site에서 전체 양 약40 g 정도의 토양 시료를 채취하여, 밀폐용기에 넣어 얼음에 넣어 빠른 시간 내에 이동시킨다. 바로 사용할 시료를 제외한 나머지 시료는 -80도 냉동고에 보관한다. 가져온 흙을 2mm 정도의 체를 사용하여 걸러 내려온 흙을 사용하게 된다. 20g 정도의 흙을 모아, 20g (10g x 2) 의 시료를 사용하여 멸균된 튜브에 담고 여기에 메탄올 12 mL, 클로로포름 6 mL, phosphate buffer를 차례로 넣는다.

Vortexing을 한 후 15분 동안 sonication을 하여 lipid를 solvent로 용출시킨다. 원심분리(1000 rpm, 3분)를 행하여 유리 피펫으로 상층 액을 빨아들인 후 새 용기에 담는다. 앞의 지질추출 과정을 3-6회 반복한다. 이후 rotary evaporator나 N2 evaporator를 사용하여 solvent들을 날려 이후 분획이나, GC 분석을 위한 유도체화에 적용하여 분석하게 된다.





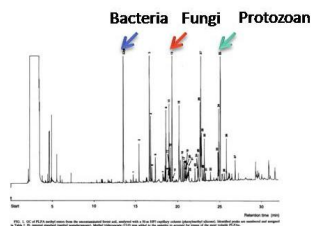
Culturable or
Unculturable
strains



Extraction of Lipid



PLFA analysis



Interpretation

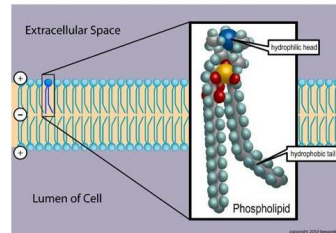


그림 7. 토양 시료로부터 PLFA를 분석하는 방법의 모식도



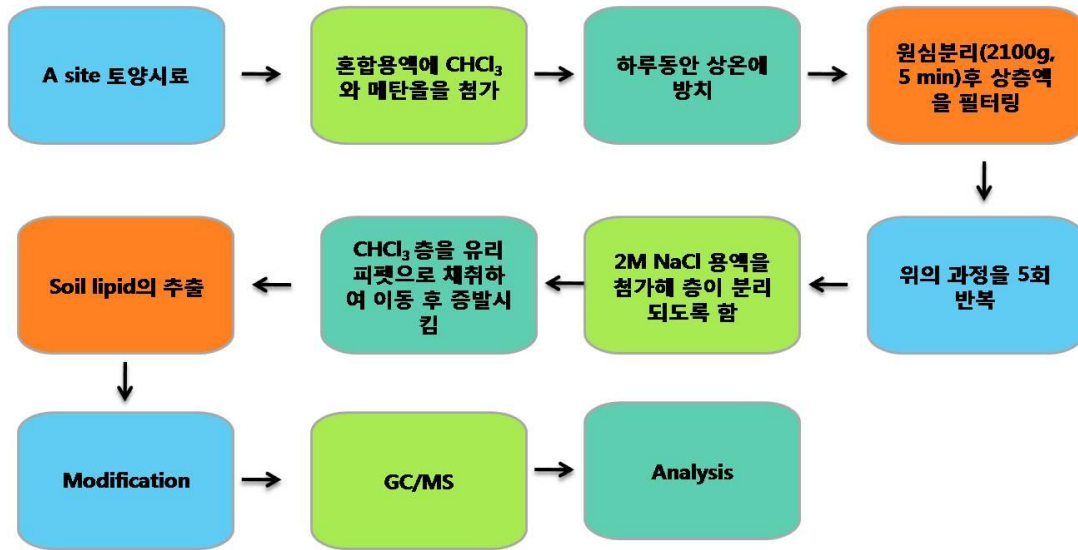


그림 8. 확립한 PLFA 분석 과정의 순서



4. 토양 유래 lipid marker 분석

Gas Chromatography를 이용한 fatty acid 분석 방법을 확립하였으며, GC-MS를 이용하여 standard (FAME mix) 시료를 분석하고 standard 시료에서의 fatty acid의 retention time을 확인하였다. 이를 바탕으로 Bligh & Dyer method를 이용하여 추출한 지방의 fatty acid의 profile을 분석하였다. GC의 분석조건으로 Clarus 680 GC 모델을 이용하여 160 °C에서 2 분간 유지 후 10 °C/ min 의 속도로 300 °C로 승온시킨 후 2 분간 유지하였으며 He gas를 이동상으로하여 1.0 mL/min 속도로 흘려주었다.

Standard 시료는 C4-C24 Even Carbon (Supelco, USA), FAME Mix C14-C22 (Supelco, USA), and NHI-D FAME Mix (Supelco, USA)를 이용하였고, 시료는 methanol과 H₂SO₄, chloroform을 첨가한 후 100 °C에서 2시간 30 분간 가열 및 냉각하여 FAME으로 변환하였다.

앞서 언급한 FAME standard 샘플을 각각 10, 100, 1000 ppm의 농도별로 GC-MS로 분석하여 FAME의 RT 값 및 internal standard에 대한 area의 관계식을 도출함으로써 정량 분석을 위한 기반을 확립하였다. 이외에 GC-MS 소프트웨어의 NIST library search를 통하여 얻은 FAME의 RT 값까지 추가하여 총 46 개의 지방산이 분석 가능하도록 하였다. 또한 이들 지방산 중 미생물 군집의 PLFA marker로 쓰이는 지표들에 대하여 이전 연구로부터 자료를 수집 하였다.

극지연구소

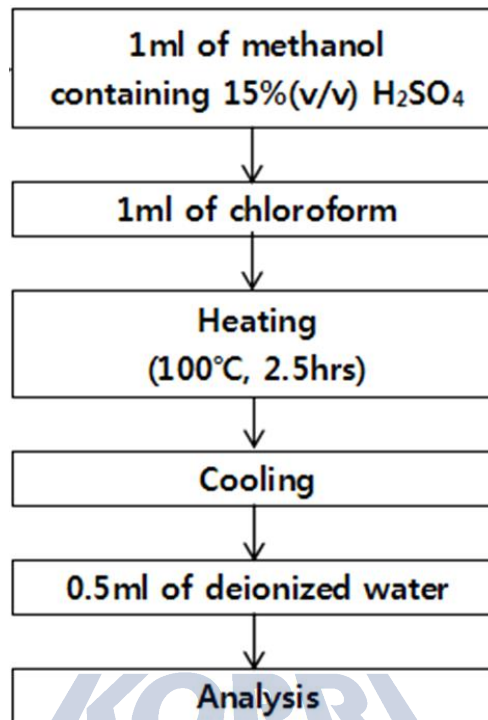


그림 9. FAME (fatty acid methyl esters) 제조를 위한 모식도.

[Thin Layer Chromatography(TLC)를 이용한 지방의 분석]

표준시료로 사용한 실험 결과 Mono, Di, Triglyceride와 Cholesterol의 Rf값을 확인 할 수 있어 Mono, Di, Triglyceride가 존재하는 것을 확인할 수 있으며 Mono, Di, Triglyceride Mix를 TLC를 이용하여 분석한 결과 reference와 비교하였을 때 Hexane : Ethyl ether : Formic acid (80 : 20 : 2, v/v)를 전개용매로 사용하여 분석 할 수 있다.



그림 10. TLC를 이용한 지방의 분리 실험

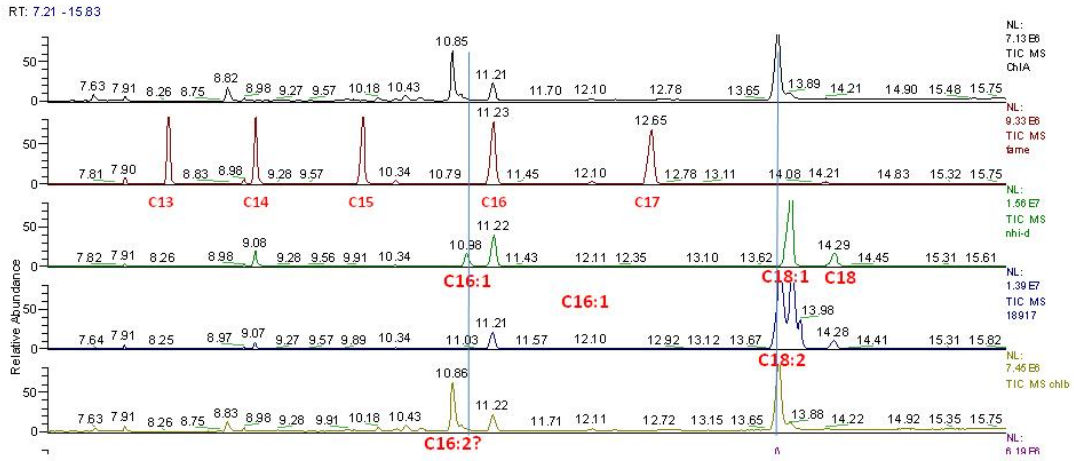


그림 11. FAME standard 샘플을 GC-MS를 활용하여 지방산 분석한 크로마토그램.



[High Performance Liquid Chromatography를 이용한 지방 분석]

HPLC를 이용하여 분리한 지방을 정량적으로 분석할 수 있음. 전개용매로 A 용매 (hexane), B 용매 (methyl tertiary-butyl ether)를 0.5 μm membrane filter를 이용하여 filtration한 후, gradient 조건에서 실험할 수 있음. Standard는 Mono, Di, Triglyceride Mix와 Cholesterol, Phospholipid를 각각 Chloroform에 녹여서 HPLC로 분석할 수 있다.

HPLC의 분석은 Spherisorb® 5 μm silica column을 이용하고 분석조건으로 column 온도는 35 $^{\circ}\text{C}$, UV/Vis detector를 이용하여 205 nm, 275 nm에서 분석할 수 있으며, gradient 조건은 아래 표와 같이 사용하였고, 각각의 Retention time은 아래와 같다.

효과적이고 선택적인 지방산 분석을 위해서는 먼저 세포에서 highly abundant한 cholesterol과 triglyceride를 먼저 분획한 후 다른 elution 조건에서 mono/diglyceride, fatty acid, phospholipid를 각각 분획하여 얻는 기술을 확보하였다.

LC-MS 기반 비교대사체 프로파일링을 위해 동일한 조건에서 각각 대사체를 확보 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$)한 후 이를 LC-MS 이용하여 chromatogram을 얻었고, 통계적 데이터 처리과정 (p-value < 0.05, fold changes > 4)을 거쳐 대조군 시료와 비교하여 선택적으로 증가 또는 감소한 peak를 찾아 이에 해당하는 지방산을 질량값을 이용하여 규명했다.

극지연구소

표 1. HPLC를 이용한 지방 분석에서의 Gradient 조건

Time(min)	A(%)	B(%)	Flow rate(ml/min)
0	98	2	1.5
3	98	2	1.5
15	80	20	1.5
20	0	100	1.5
50	0	100	1.5



표 2. High Performance Liquid Chromatography에서의 Cholesterol, Mono, Di, Triglyceride, Phospholipid의 Retention time

	Retention time (min)	UV (nm)
Cholesterol	22.3	205
Monoglyceride	26.3	205
1,2 Diglyceride	22.0	205
1,3 Diglyceride	21.2	205
Triglyceride	12.5	205
Phospholipid	24.8	275



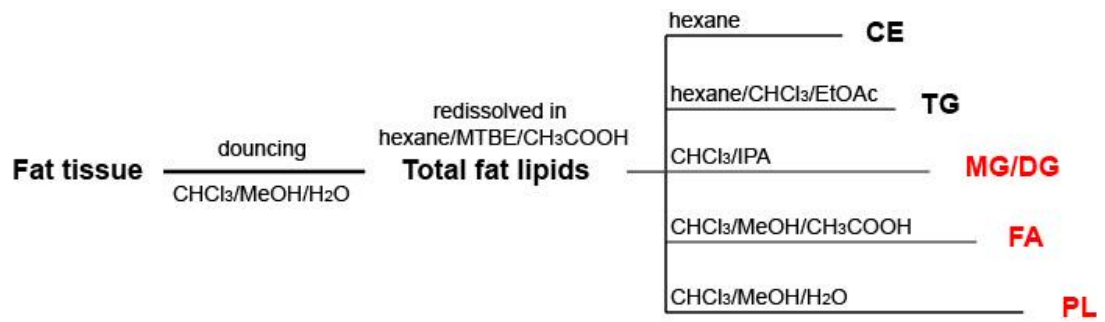


그림 12. 세포 및 조직으로부터 지방산 분획 기술 개발



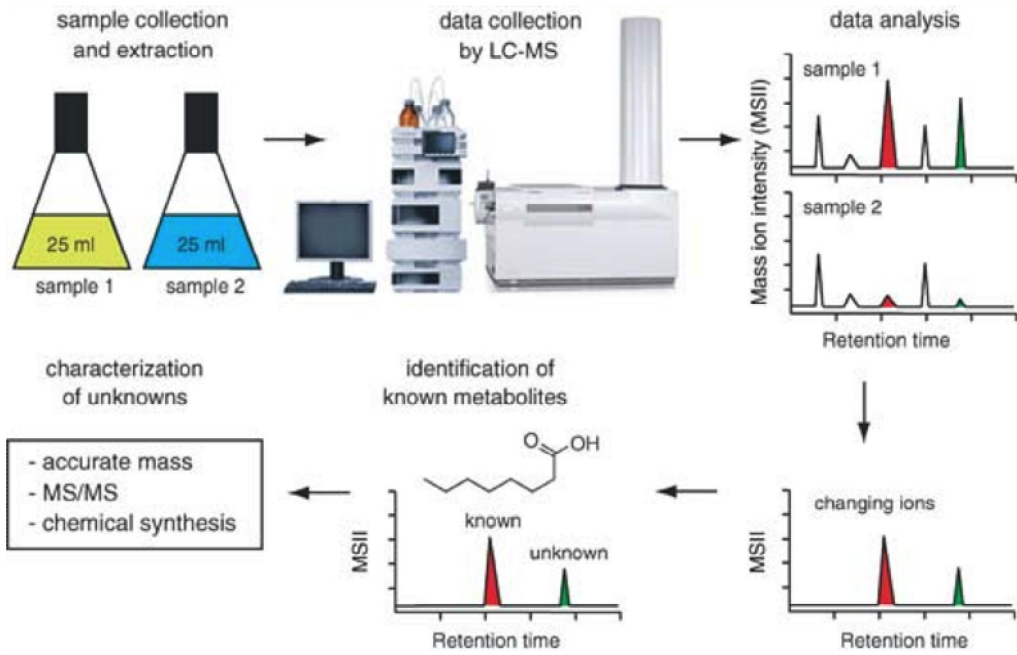


그림 13. LC-MS를 이용한 비교 대사체 프로파일링



3. Lipids 생산 최적화 방법 도입

Lipids는 미생물의 membrane 구성 성분 및 저장 물질로 활용되며, 저장물질의 용도의 lipid의 경우 환경의 탄소원, 질소원의 영향을 많이 받는다. 이러한 이유로 lipid의 생산성을 높이는 C/N ratio 비교 실험을 통하여 lipid생산 최적화 방법이 필요하였다. Membrane에 활용되는 phospholipid에 대해서는 C/N ratio가 어떠한 영향을 미치는 지에 대한 정확한 보고는 없으나, 환경적 요인에 의해 그 생산이 영향을 크게 받을 것으로 보이는 바, 이와 관련한 최적화 및 극지 미생물 특이적인 lipid marker 혹은 저온 특이적인 marker들을 위에서 설명된 바와 같은 lipid 분석법을 통하여 분석 할 수 있다. 실험 결과에 대한 예상으로 phospholipid에는 영향이 크게 없을 것으로 예상되며, neutral lipid의 생산성에 큰 영향이 있어 전체적인 total lipid의 양의 변화가 예상된다. 다만 대개의 경우 C/N ratio는 미생물의 성장과 지방산 생산과의 균형을 맞추는 역할이 있어 어느 한쪽의 결과가 확연히 예상되지는 않는다. 즉 C/N ratio가 올라가게 되면 성장은 감소하게 되나 세포내의 지방산 생산량은 증가하게 되며 반대로 C/N ratio가 적어지게 되면 성장은 증가하나 세포내 지방산 생산량은 감소하게 되는 현상이 일어나게 된다. 여러 가지 이유가 있을 수 있으나, 질소원이 대개의 경우 2차대사의 신호가 되고 세포의 영향상태를 판단하는 대표적인 지시자라는 부분을 고려해 볼 때 위와 같은 현상은 이해할 수 있다. 이러한 연구 방향은 극지 미생물을 대상으로 많이 수행이 되지는 않고 있어 극지 미생물의 지방산 생산연구와 생산을 위한 최적화 방법은 필요한 연구라 할 수 있다.

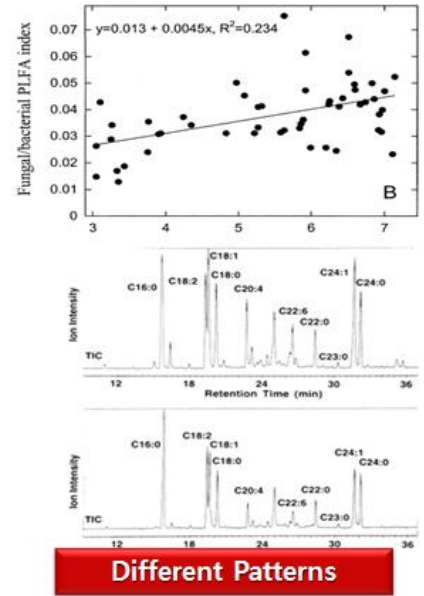
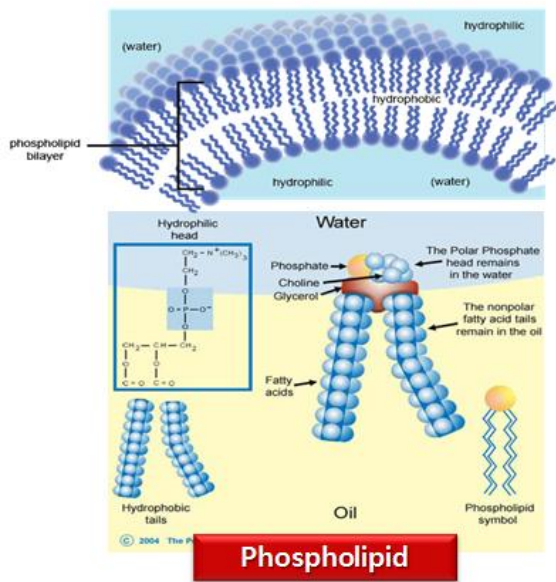


그림 14. 미생물의 세포막을 구성하고 있는 인지질의 구조와 인지질의 지방산 종류에 따른 profiling



[확립한 효율적 방법을 이용한 북극 토양으로부터 지질 추출]

북극 다산과학기지 Ny-Ålesund 의 Midtre Lovénbreen 로부터 12 구역의 토양 샘플 확보하였다(주변의 Date 2014-07-19~30). 과거 빙하로 덮혀 있던 빙하 후퇴 지역인 북극의 Midtre Lovénbreen, Ny-Ålesund 에서 총 12 구역의 토양을 샘플링하였으며 (2014년 7월) 아래의 그림과 같이 Location no. 303 방향이 눈이 녹고 있는 지역이다.

각 구역의 북극 토양의 30 g를 멸균된 튜브에 담고 여기에 메탄올 20 mL, 클로로포름 10 mL, phosphate buffer 10 mL을 차례로 넣은 후 밀봉함. 2분간 vortexing을 한 후 15분 동안 sonication을 하여 lipid를 solvent로 용출시킨다. 원심분리(1000 rpm, 3분)를 행하여 유리 피펫으로 상층 액을 빨아들인 후 새 용기에 담는다. 앞의 지질추출 과정을 3-6회 반복한다. 이후 rotary evaporator나 N₂ evaporator를 사용하여 solvent들을 날린 후, 확립된 silicic acid 컬럼 크로마토그래피 방법을 이용해 Phospholipid(PLFA) 분리 후, GC 분석을 위한 유도체화에 적용하여 분석하게 된다.



Procedures

- 1) Lipid extraction (Bligh&Dyer method)
- 2) Column chromatography (Silica gel)
 - Neutral lipid (NL), eluted by 15 ml chloroform
 - Glycolipid (GL), eluted by 15 ml acetone
 - Phospholipid (PL), eluted by 15 ml methanol
- 3) Methanolysis
 - FAME
 - Mild methanolysis
- 4) Syringe filtering(PVDF)

그림 15. 토양으로부터 지질을 추출하고 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 지질을 분리하는 과정



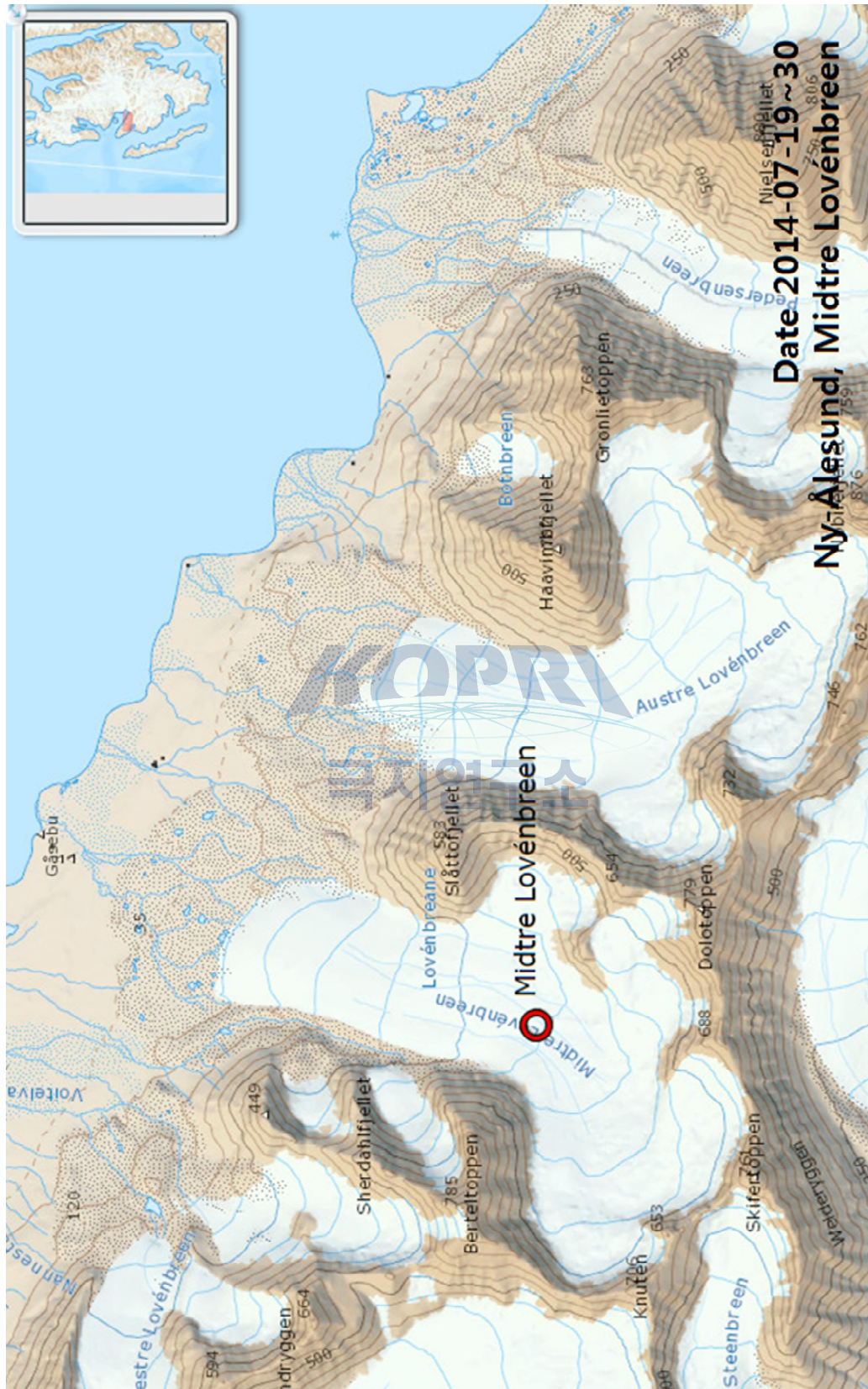


그림 16. 샘플링 사이트의 지도 (Midtre Lovénbreen, Ny-Ålesund from TopoSvalbard)

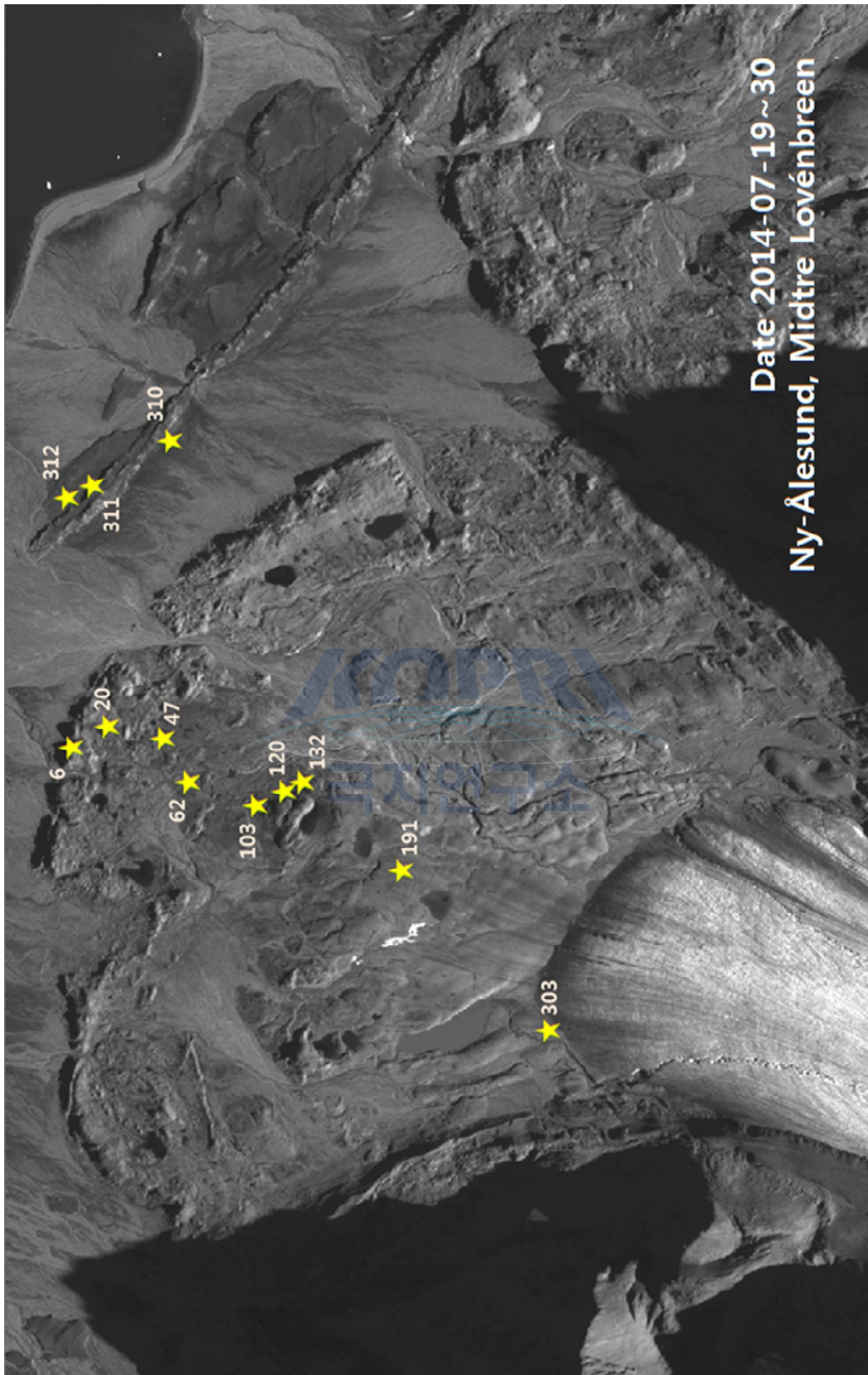


그림 17. 위성 지도에서 샘플링 사이트의 위치 (Midtre Lovénbreen, Ny-Ålesund)

[지질의 분획을 위한 silicic acid 컬럼 크로마토그래피 및 분석을 위한 유도체화 방법]

지름 1.1 cm glass column을 iron stand에 clamp로 수직으로 단단히 고정시킨 후 솜을 유리막대로 컬럼의 가장 밑 부분까지 밀어 넣은 후 sea sand를 적당량 넣는다. Chloroform 5 mL glass pipet으로 조심스럽게 컬럼 안으로 흘려주어 2-3 번 washing한다. 이 때 솜 아래쪽에 기포가 생기지 않을 때까지 충분히 흘려준다. 기포가 생기면 속도가 매우 느려지고 효율이 좋지 않다.

Silicic acid(100-200 mesh)를 0.3 g 측정해서 200 mL 비커에 넣고 chloroform 5mL 에 불린 후 glass column에 붓는다. 그리고 chloroform으로 packing이 잘 될 때까지 washing해주고 packing이 완전히 될 때까지 20분정도 기다린다.

Column이 무너지는 것을 방지하기 위하여 sea sand를 0.5 cm정도로 silicic acid 위에 넣어 준 뒤, chloroform이 sea sand 바로 윗부분 까지 오도록 밸브를 열어 흘려보내준다.

Lipid sample을 1 mL chloroform에 녹여서 column에 붓고 silicic acid에 샘플을 binding 시킨 상태로 1 분 방치한다.

첫 번째 용매인 chloroform을 5 mL 흘려주면 neutral lipid가 용출되며, 두 번째 용매인 acetone을 5 mL 흘려주면 glycolipid가 용출된다. 그리고 세 번째 용매인 methanol을 5 mL 흘려주면 이 실험에서 목적으로 하는 phospholipid가 용출된다. Phospholipid의 분획을 test tube에 받아서 시린지 질소농축기로 용매를 모두 증발 시킨다.

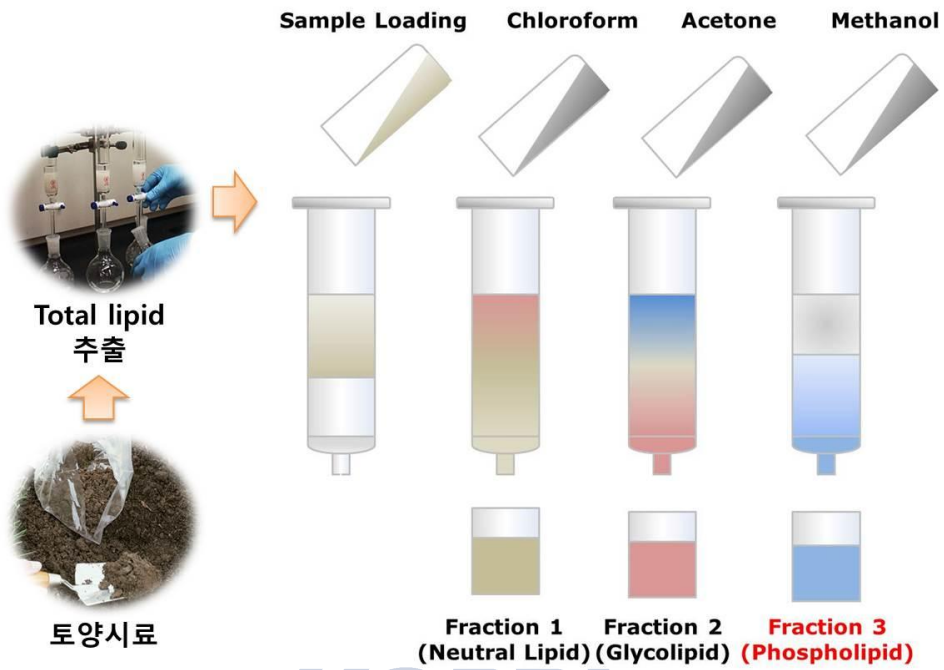
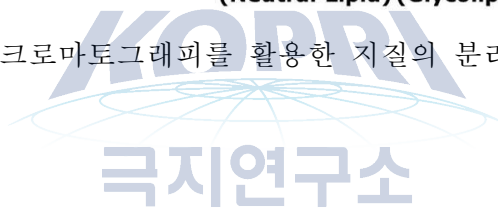


그림 18. 컬럼 크로마토그래피를 활용한 지질의 분리 모식도



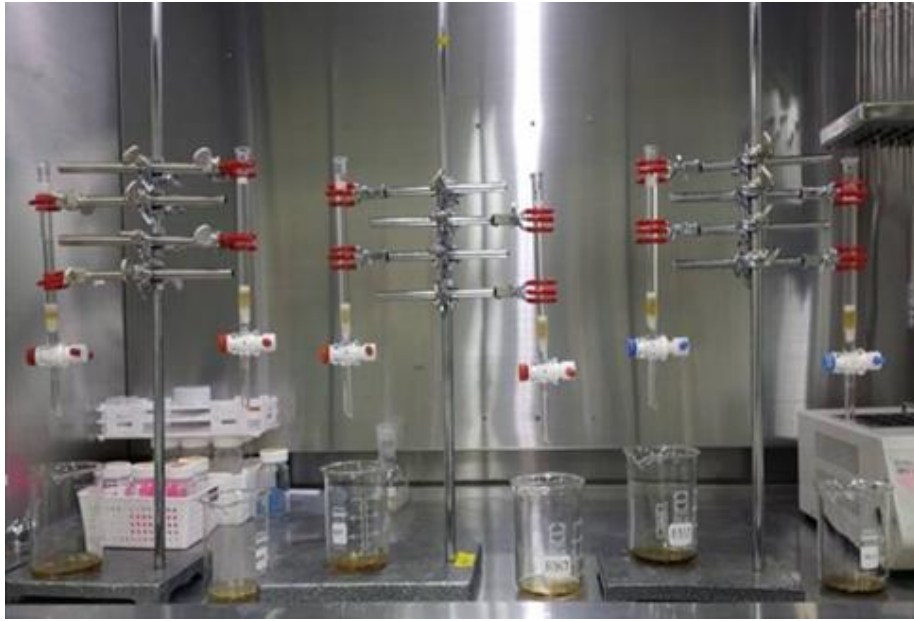


그림 19. 분석법 최적화를 통해 확립한 방법으로 폼 후드에 컬럼을
설치한 모습



그 다음 최적화된 유도체화 방법인 Mild Alkaline Methanolysis를 이용해 유도체화한다. 유도체화 방법은 먼저 추출된 phospholipid가 담겨있는 test tube에 1 mL methanol/toluene(1:1, v/v)로 녹인다. 그리고 1 mL의 0.2 M-methanolic KOH를 넣고 37 °C에서 15분간 반응시킨다(Incubation). 2 mL hexane, 0.3 mL 1M-acetic acid, 2 mL water를 넣고 vortexing하면 층이 분리된다. Hexane(upper)층을 분리 후 2 mL hexane을 추가해서 넣고 한 번 더 extraction 해준다. 시린지 질소농축기에 50 °C 조건에서 20 분동안 hexane을 모두 날린다. Test tube에는 유도체화된 PLFA만 남게 된다.



표 3. 특정 미생물 군집을 나타내는 PLFA marker

Microbial group	Specific PLFA markers	PLFA group
Bacteria	14:0, 15:0, 17:0	Multiple groups
Gram(+)	i14:0, i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0, i18:0	Branched
Gram(-)	cy17:0, cy19:0, 16:1w7, 17:1w9, 18:1w7, 18:1w5	Cyclopropyl, mono
Fungi	18:2w6,9c, 18:3w6, 18:3w3	Polyunsaturated
Actinomycetes	10Me16:0, 10Me17:0, 10Me18:0, i17:1w7c	10-Methyl branched
Eukaryote	16:0, 16:1w9c, 16:1w5c, 18:1w9c, 18:1w7c, 18:1w7t, 20:1, 21:0	
Methanobacter	16:1w8c, 18:1w8	
Anaerobe	14:1w7cDMA, i15:0DMA, 16:1w7cDMA, 18:0DMA, 18:2DMA, 19:0cy9,10DMA	
Protozoa	20:2w6, 20:3w6, 20:4w6	Polyunsaturated
Plants	18:1w9c, 18:1w11c, 18:3w3, 20:5w3, 20:0, 21:0, 22:0, 23:0, 24:0, 25:0, 26:0	Long saturated, straight



이전 연구들에 따르면 각 미생물 군집을 나타내는 PLFA marker들이 있는데 주로 20종 이상의 marker를 이용하여 미생물 군집의 분포를 예측한다. Unidentified bacteria의 경우 지표로써 14:0, 15:0, 17:0의 지방산이 쓰이며, gram(+)균의 경우 i14:0, i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0, 그리고 i18:0처럼 탄소사슬 끝에서부터 첫 번째 또는 두 번째에 메틸기가 달린 branched 형태의 지방산이 이용된다. Gram(-)균의 경우 cy17:0, cy19:0와 같은 cyclo form의 지방산과 16:1, 17:1, 18:1 등의 monounsaturated form의 지방산이 포함된다. 또한 Actinomycetes는 10Me16:0, 10Me17:0, 10Me18:0처럼 10번 위치에 메틸기를 포함하는 10-methyl branched form과 i17:1를 marker로써 이용하며 Fungi 그룹은 18:2, 18:3 등의 polyunsaturated form을 포함한다.

다시 한 번 정리하자면, 미생물 분포비율은 미생물마다 활용되는 지방산 지표를 활용하여, 분석된 지방산을 지방산 분석지표에 따라 세균, 방선균, 사상균, 진핵생물, 식물유래 지방산 등으로 분류하여 미생물 단위별 인지질 지방산 값의 총량 및 전체 비율로 나타낼 수 있다²⁰⁾. 일반 박테리아 그룹 양성균은 iso-14:0, i15:0, anteiso-15:0, i16:0, i17:0, a17:0, i18:0, 그람 음성균은 cyclo-17:0, cy19:0, 16:1 ω 7, 17:1 ω 9, 18:1 ω 7, 사상균은 18:2 ω 6,9cis, 18:3 ω 6, 18:3 ω 3, 방선균은 10-Metyl-16:0, 10-Me17:0, 10-Me18:0, i17:1 ω 7c, 진핵생물은 16:0, 16:1 ω 9c, 16:1 ω 5c, 18:1 ω 9c, 18:1 ω 7c, 18:1 ω 7trans, 20:1, 21:0 등의 지표지방산을 이용하였다. 그람음성세균과 그람양성세균 지방산함량을 더해 세균의 함량을 나타낼 수 있다.

위의 여러 예에서 보았듯이 지방산 표지 인자를 사용하여 분석된 지방산으로부터 미생물 종류와 상관관계를 연결할 수 있으며, 지방산 생물지표를 이용하여 토양 내 미생물 군락의 구조를 예상할 수 있다. 인지질 지방산의 총량을 활용한 viable biomass의 양 측정, 탄소 영양원이 적은 조건에서 탄소 영양원이 풍부한 조건으로 이동 지표로 그람음성세균/그람양성세균(G-/G+)²¹⁾, 토양 유기물함량 지표로 곰팡이/세균 (F/B) ²²⁾스트레스의 상태를 볼 수 있는 단불포화/포화, Trans/Cis, Cyclo/Precursor, Anteiso/Iso 등의 다양한 지방산 지표들이 존재하며 이를 활용한 토양에 대한 해석들이 가능하다 (Table 2).

-
- 20) Li WH, Zhang CB, Jiang HB, Xin GR. Yang ZY. 2006. Changes in soil microbial community associated with invasion of the exotic weed *Mikania micrantha*. *Plant Soil*. 281:309-324.; Rahman MH, Okubo A, Sugiyama S, Mayland HF. 2008. Physical, chemical and microbiological properties of an Andisol as related to land use and tillage practice. *Soil Till. Res.* 101:10-19.
- 21) Borga P, Nilsson M, Tunlid A. 1994. Bacterial communities in peat in relation to botanical composition as revealed by phospholipid fatty-acid analysis. *Soil Biol. Biochem* 26:841-848.; Yao, H, He Z, Wilson MJ, Campbell CD. 2000. Microbial biomass and community structure in a sequence of soils with increasing fertility and changing land use. *Microb Eco* 40:223-237.
- 22) Bardgett RD, Hobbs PJ, Frostegard A..1996. Changes in soil fungal: bacterial biomass ratios following reductions in the intensity of management of an upland grassland. *Biol Fertil Soils* 22:261-264.; Frostegard A, Baath E. 1996. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biol. Fertil. Soils* 22:59-65.

표 4. 지방산 지표들과 군락 구조와의 상관관계

지방산 지표들	지표의 수치	해석
PLFA	높을수록	Viable biomass 양이 높음.
곰팡이/세균	> 1	토양유기물 함량이 높음.
단불포화/포화	> 1	호기성과 높은 기질 농도 조건을 가짐.
Trans/Cis monoenoic	> 1	Toxic한 물질에 노출되었음.
cy19:0/18:1 ω 7c cy17:0/16:1 ω 7c	> 1	불량한 환경적 특성, stress와 toxicity가 증가함, 양분 결핍, 낮은 pH, 중금속 오염, 제초제, 경운, 고온 등의 환경지표
Anteiso/Iso	> 1	Cold stress에 노출되었음.
그램음성균/그램양성균	> 1	탄소영양원이 증가하고 있음, 온도가 낮아짐.



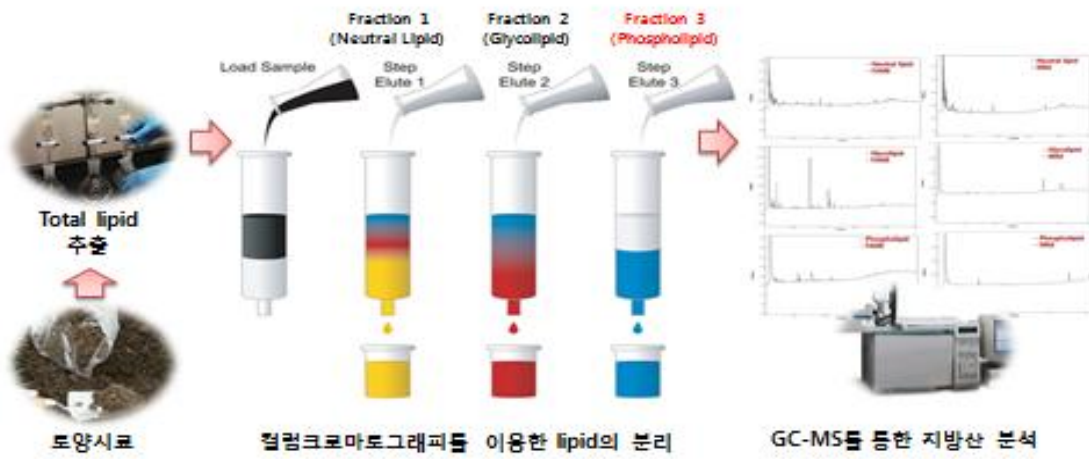


그림 20. 토양시료로부터 lipid를 추출하여 PLFA를 GC-MS로 분석하는 과정



제 2 절 : 연구 수행 내용 및 결과

1. 효율적 지방회수 방법의 확립

토양에는 미생물의 활동이 다른 환경에 비하여 매우 미미한 편에 속함으로 토양 속 지방산을 분석하기 위해서는 효율성이 높은 추출법이 요구된다. 따라서 일반적으로 지질추출에 사용되는 Bligh & Dyer법을 이용하여 수율이 높은 추출 조건을 확립하고 토양으로부터 지질을 추출하여 이를 silicic acid 컬럼 크로마토그래피를 이용해 각각의 지질 종류별로 분획하여 하였다. 이와 같은 실험을 위하여 N2 evaporator를 활용하였으며, 최대 부피 10mL 내의 시료들을 효과적으로 증발시켜 빠른 회수를 할 수 있는 장비를 적용하였다. Phospholipid의 불안정성을 생각하고 결과의 중요성을 고려할 때 추출에서부터 분획과정은 빠른 시간내에 수행되어야 하며, 여러 경로를 통하여 들어 올 수 있는 phosphatase의 차단을 막기 위해서 충분히 깨끗한 환경에서 실험을 수행하여야 함을 실험의 시행착오 과정들을 통하여 알 수 있었다. 시료의 보관은 토양상태에서 바로 -80도 냉장고에 장기 보관하거나 토양 시료를 냉장고로부터 들고 나왔을 때는 추출, 분획, 유도체화 까지 모든 과정을 연속적으로 수행하여야 phospholipid의 원활한 회수와 결과간의 상관성이 유지됨을 알 수 있었다.



[지질의 분획을 위한 silicic acid 컬럼 크로마토그래피]

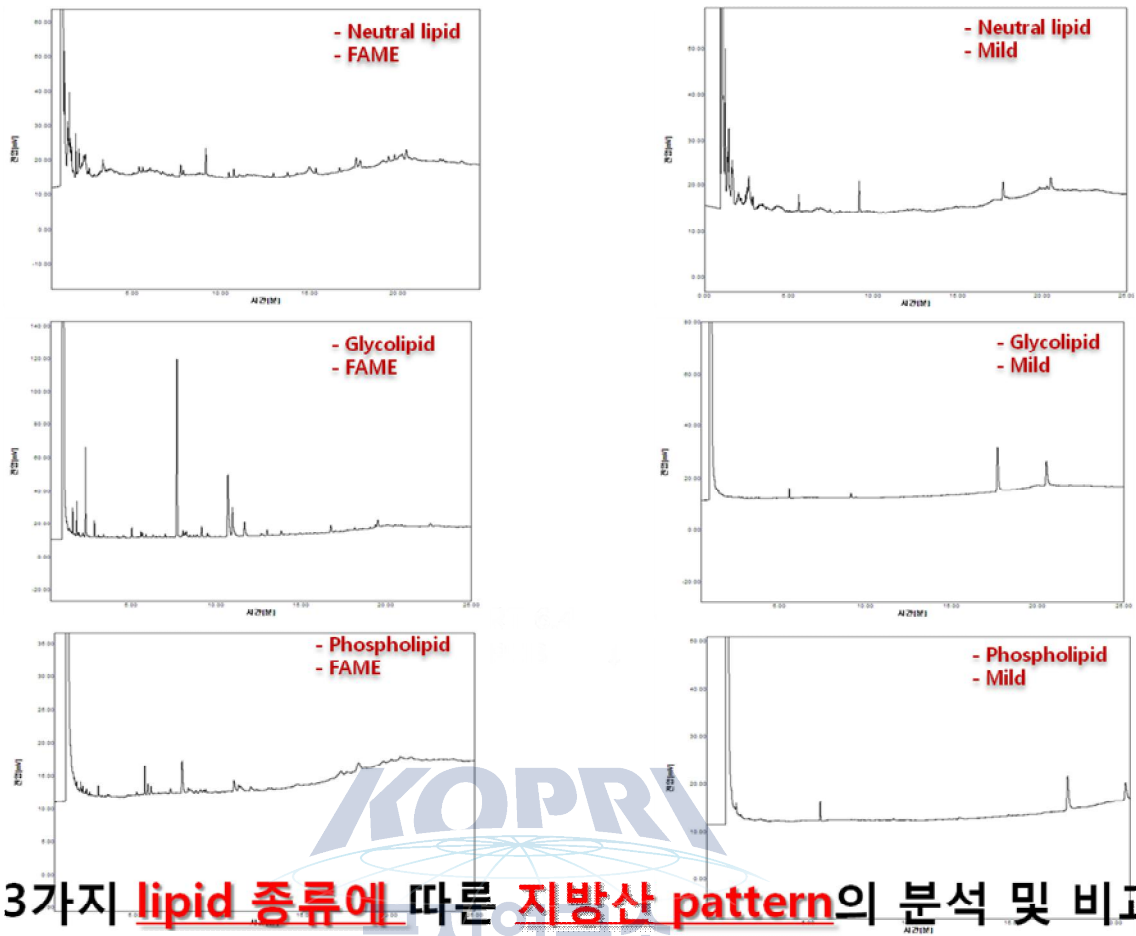
컬럼 크로마토그래피법을 이용하여 지질을 분획 시, 각기 다른 세 가지 종류의 lipid들이 용출되는데 neutral lipid, glycolipid 그리고 phospholipid 이다. 이들을 황산을 이용한 strong transesterification 방법과 톨루엔을 이용한 mild transesterification 방법을 이용해서 fatty acid methyl ester(FAME) 형태로 유도체화 시킨 후 GC-FID로 지방산 분석을 진행하였다.

실험결과에 따르면 분리된 세 종류의 지질은 각각 다른 지방산 프로파일링을 가지고 있으며 종류에 따라 검출되는 양이 상이한 것을 알 수 있었다. 또한 유도체화법에 따라서 생성되는 FAME의 종류가 다른 것을 확인했다.

분획된 지질은 neutral lipid, glycolipid, phospholipid로서 이 중 phosphate기를 가지고 있는 phospholipid는 미생물 막을 구성하는 성분이며 후에 토양 속 미생물 군집분포를 탐색하는 데에 핵심이 된다.

또한 지방산을 GC로 분석하기 위해서는 phospholipid로부터 지방산을 해리시키는 transesterification과 methylation 과정이 필요한데 다양한 유도체화 방법을 비교하여 가장 적합한 방법을 찾아내어 도입했다. 따라서 끓는점이 낮아진 FAME 유도체를 GC-MS로 분석하여 이들을 비교 분석함으로써 연구가 진행되고 있다.





3가지 lipid 종류에 따른 지방산 pattern의 분석 및 비교

그림 21. GC-FID를 이용한 분획된 지질 분류별 지방산 프로파일링

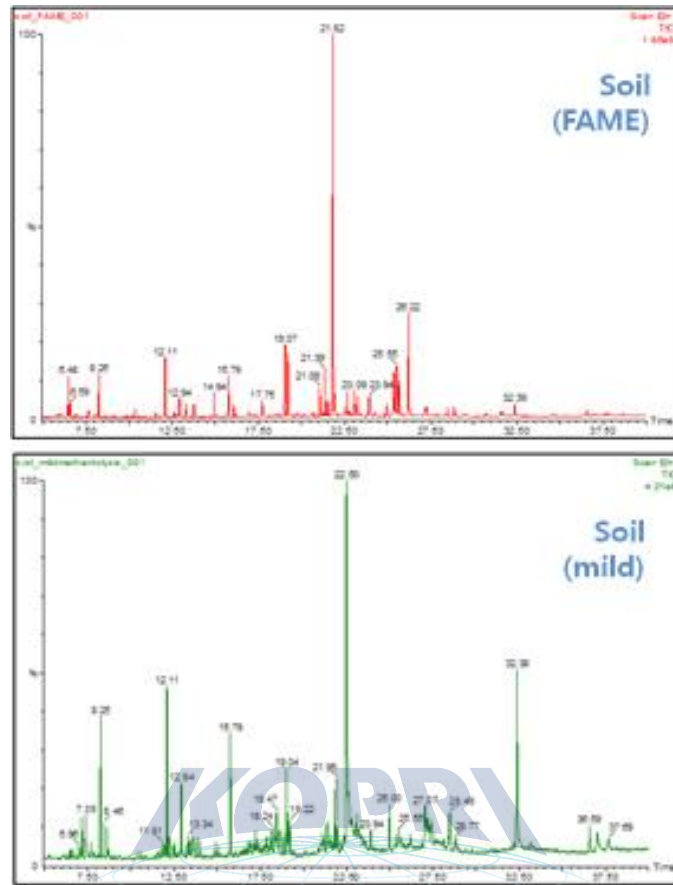


그림 22. 다른 유도체화 방법을 같은 샘플에 적용하여 지방산을 GC-MS 분석한 크로마토그램

2. PLFA분석법 확립

샘플 분석에 앞서 이전 연구로부터 쓰여진 미생물 군에 대한 PLFA marker에 대한 정보를 수집하였고, 아래와 같은 표를 얻을 수 있었다. 이들은 각 그룹을 대표하는 지방산으로써 미생물 군집 비율과 정량적인 결과를 도출하는 데에 밑바탕이 되는 자료로 쓰였다.

PLFA 분석을 수행하기 위한 실험법의 대략적인 모식도이다. 크게 샘플링한 토양으로부터 지질을 회수하여 인지질을 분리해내는 과정과 유도체화 반응을 시킨 후 GC-MS로 분석하고 해석하는 과정으로 나뉜다.

현재까지 PLFA와 관련된 여러 보고들이 있어 분석과 함께 해석의 과정도 상당한 시간이 걸리는 부분이 있다. 일단 현재까지 알려진 PLFA 관련 지방산 표시자는 약 80여개 정도이며, 보고에 따라 다르지만 최소 20 여개의 PLFA 정도로 군집 분석이 가능하다. 본 연구팀에서는 50여개의 PLFA를 분석할 수 있었으며, 약 30 여개의 미생물과의 연관관계를 맺을 수 있는 표시자들을 사용할 수 있었다. 분석 방법의 경우 GC-FID에 비해 GC-MS가 약 10-100배 이상의 감도를 보여, 초기에는 GC-FID 위주의 분석법과 결과 생성을 하였다면, 이후에는 GC-MS를 활용한 자료 수집이 이루어졌다.



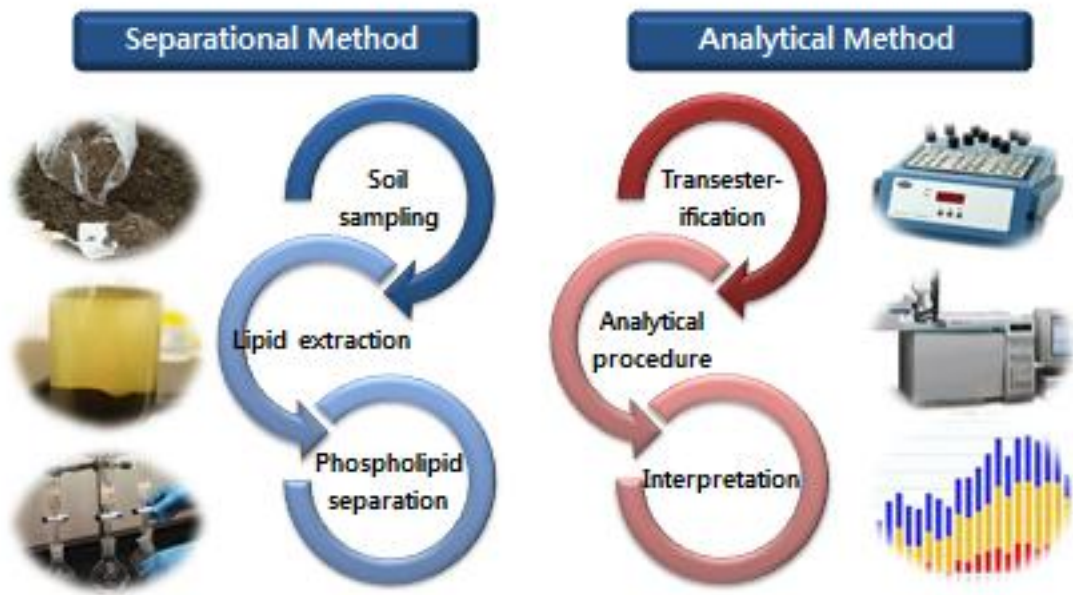


그림 23. PLFA법을 수행하기 위한 분리 및 분석 방법의 모식도



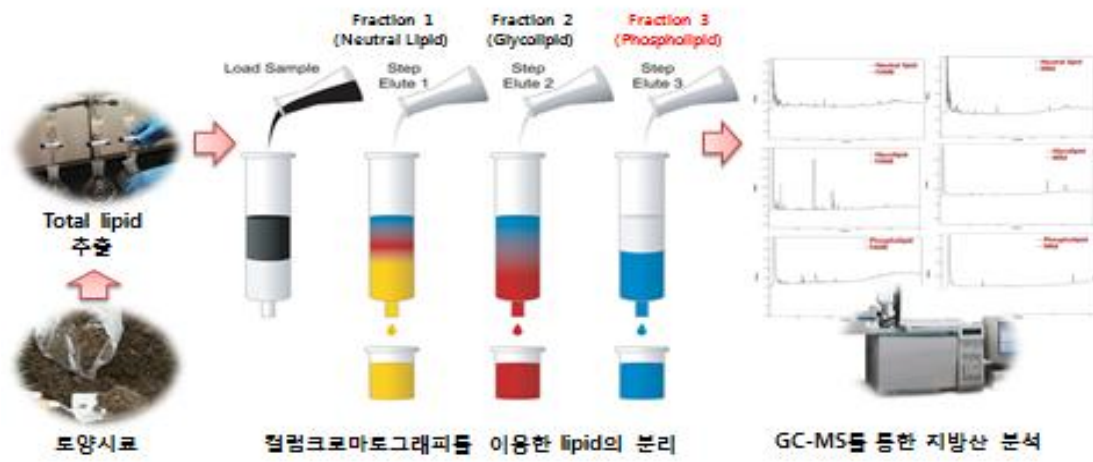


그림 24. 토양시료로부터 lipid를 추출하여 PLFA를 GC-MS로 분석하는 과정.



PLFA marker들은 GC-MS를 이용해 측정된 지방산 프로파일링을 정량 분석한 이후에 미생물 군집 데이터를 수집하는데 중요한 정보를 제공한다.

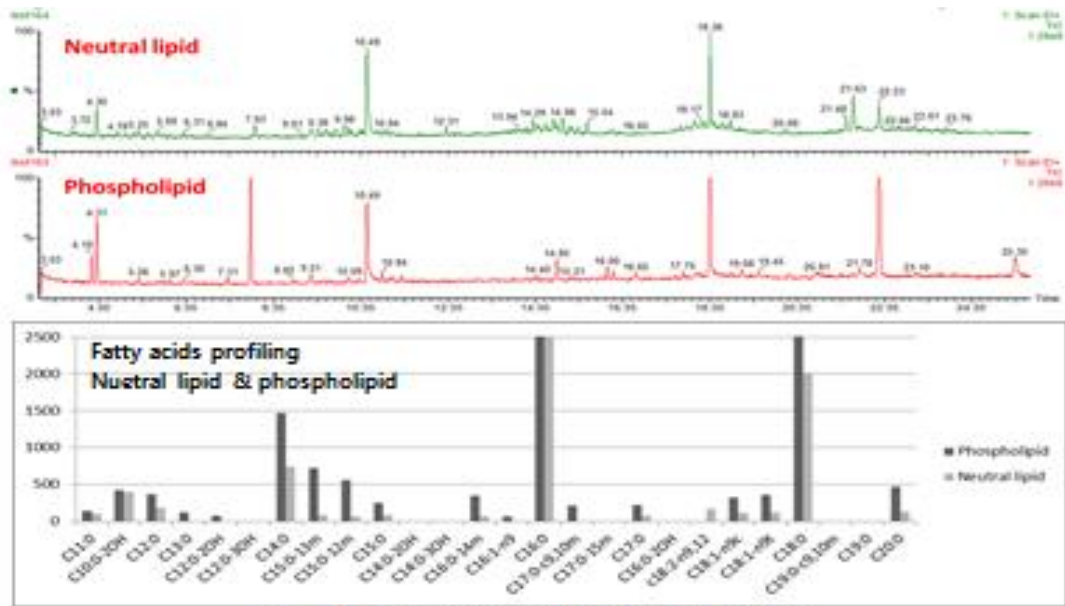
지질을 분리할 시에는 silicic acid를 이용한 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 각 분자 특성에 맞는 용매를 흘려줌으로써 지질의 분획을 얻는데 세 번째 분획에서 우리가 분석하고자하는 인지질을 얻게 된다.

확립한 지질의 분리방법 및 GC-MS 분석법을 활용하여 건국대 공대 B동 앞의 토양 40 g을 채집하여 neutral lipid와 phospholipid를 GC-MS로 분석한 결과이며, lipid marker에 따른 상대적인 양을 나타낸 그림이다.

최적화 및 최소화된 PLFA법을 활용하여 건국대 공대 앞의 토양으로 확립한 분석법을 테스트하였다. 10 g의 토양을 총 부피 35 mL의 용매로 지질을 추출하였고, silicic acid 컬럼 크로마토그래피법으로 neutral lipid와 phospholipid 분획을 얻어 alkaline mild methylation시켰다. 반복실험 2 회로 측정하였으며, GC-MS로 유도체화 된 지방산을 측정하였다. (그림 x)

그 결과, neutral lipid와 phospholipid의 지방산 프로파일링이 다른 것을 확인했으며 이전 연구들에 따르면 phospholipid는 세포가 죽으면 수십 분 내 분해되므로 살아있는 미생물 세포의 군집을 나타내는 것으로 알려져 있다.





- Sampling site : 공대B동 앞 건너편 건물 사이의 토양
- Sampling amount : 10 g *2 (duplicate)
- B&L lipid extraction : total 35 ml

그림 25. 확립한 실험법을 이용한 주변 토양시료의 분석 결과



3. 분석법 최적화

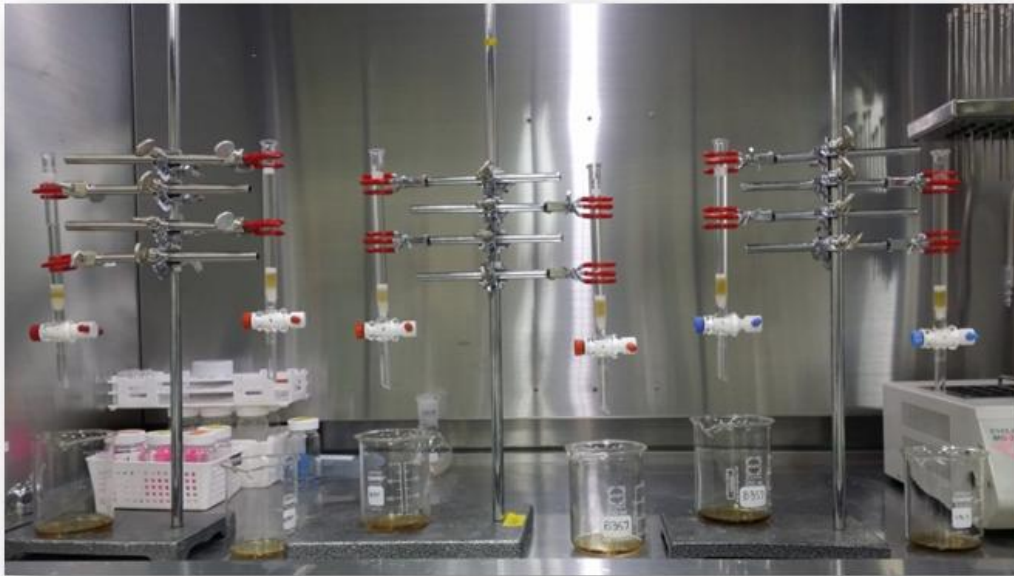
① PLFA법의 최소화

PLFA법은 과정이 길고 시간이 오래 걸리며 지질 분리를 위한 컬럼 크로마토그래피를 할 때 몸에 좋지 않은 유기용매를 다량 사용하기 때문에 이런 불편한 점을 해소하고 한 번에 수용할 수 있는 샘플 수를 늘리기 위하여 실험적인 최적화가 요구되었다.

또한, GC-MS를 이용하여 정성분석뿐만 아니라 정량분석이 가능한 시스템을 구축하기 위하여 2 가지 standard mixture와 1 가지 internal standard fatty acid methyl ester를 이용해 기기의 시간차이에 따른 오차와 일관성에 대한 문제를 해결하였다.

그 결과 사용되는 샘플의 양을 3배 축소하여 분석에 필요한 최소량을 확립하였으며 그에 따라 lipid extraction에 사용되는 용매의 total volume과 컬럼 크로마토그래피의 컬럼 사이즈, 유기용매, 시간 등을 최소화 및 최적화 하였다. 따라서 시간과 노동력이 많이 소모되는 컬럼 크로마토그래피 실험 시 한 폼후드 내에서 동시에 용출할 수 있는 컬럼 개수는 6개가 되었다. 앞의 실험들을 통해서 확립한 분석법을 적용하여 환경조건이 확연히 다른 두 지역 A, B로부터 토양을 채집하여 PLFA분석한 결과이다.

극지연구소



- **Optimization of PLFA method for efficiency**
 - Minimize sample size : 30 → 10 g
 - Lipid extraction volume : 50 → 25 ml
 - Column chromatography diameter : 2 → 1.1 cm
 - 동시 분석가능한 최대 갯수 : 6 columns
 - Save process time and solvent amount

그림 26. 분석법 최적화를 통해 확립한 방법으로 폼 후드에 컬럼을 설치한 모습.

② 샘플 종류 및 양에 따른 PLFA 프로파일링

토양 샘플의 PLFA 분석 시 이용되는 토양의 양을 최소화하면서 GC-MS로 분석하기에 적당한 감도의 농도가 측정되도록 하는 최적화를 위한 실험을 진행하였다. 따라서 환경이 다른 두 지역의 샘플을 채집하여 5 g, 10 g, 20 g, 40 g 의 토양에 대한 정량분석을 실시했다. 그 결과 10 g 또는 20 g의 샘플을 이용하였을 때 GC-MS 크로마토그램 상의 피크가 적절한 감도로 표시되는 것을 확인할 수 있었다.

③ PLFA stability test

북극으로부터 샘플을 채취하여 분석하는 장소로 이동하는 데에 온도와 시간이 상대적으로 짧지 않으므로, PLFA의 안정성에 대한 테스트를 진행하였다. 실험은 두 가지 조건에서 진행되었는데, 온도 조건을 15 °C와 -80 °C로 맞춘 후 7일간 보관하였을 때 phospholipid가 갖고 있는 안정성을 비교하였다. 실험 결과, 두 종류의 토양 A, B에 대해서 각각 total PLFA concentration이 42,87 mg과 17.66 mg 이 줄어드는 것을 확인했다. 한 종의 PLFA marker는 15 °C에서 7일간 보관하였을 때 증가하는 경향을 보였는데 이것은 온도 변화로 인해 한 균집의 미생물의 분포 비율이 증가하면서 나타난 현상으로 사료된다.

따라서 북극에서 샘플을 채집한 이후에 가능한한 저온으로 유지시키는 것이 샘플의 상태를 신선하게 보관할 수 있다.

④ 온도와 보관기간에 따른 인지질 지방산의 안정성 연구

북극에서 샘플링 이후에 분석에 이르기 까지 최소 일주일 이상의 보관기간이 소요되므로, 온도와 보관시간에 따른 PLFA의 안정성을 측정하기 위하여 이 실험을 진행하였다. 앞서 언급되었던 토양샘플 A와 B를 각각 15 °C에서 7일간 보관했고 그 이후에 똑같은 실험 과정으로 PLFA를 분석하여 전후의 변화를 그래프로 나타내었다. Total PLFA amount의 경우 A는 ? mg/kg soil, B는 ? mg/kg soil 수준으로 감소하는 경향을 보였고 각각의 PLFA marker에 대해서는 지방사나 종류마다 감소나 증가 폭이 다르지만 대체적으로 큰 변화가 있었음을 알 수 있다. 따라서 북극에서 샘플링 이후 가능한한 -80 °C 부근의 저온에서 유지하는 것이 실험 결과에 유리한 것을 알 수 있었다.

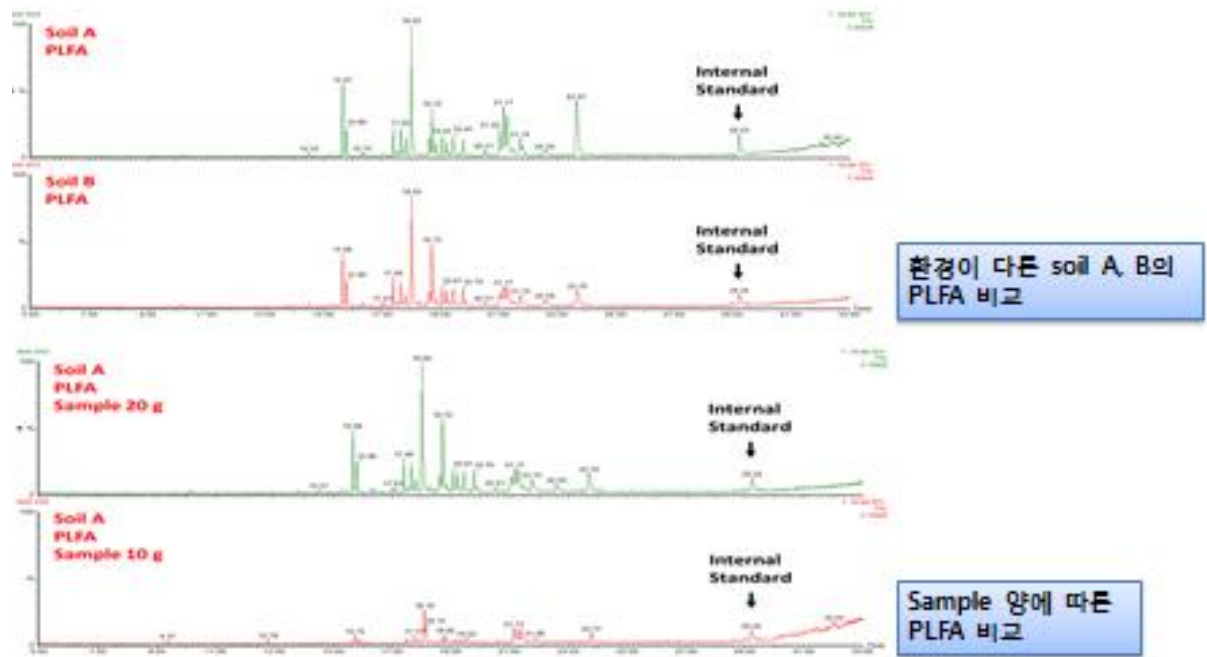


그림 27. 확립된 PLFA법을 이용한 토양시료 분석 결과.



- Sampling date : 2014-07-14
- Sampling site
 - Soil A : 일감호 주변 풀과 나무
 - Soil B : 궁대 앞 언덕 숲
- Storage
 - 15, -80 트
 - 7 days
 - Duplicate

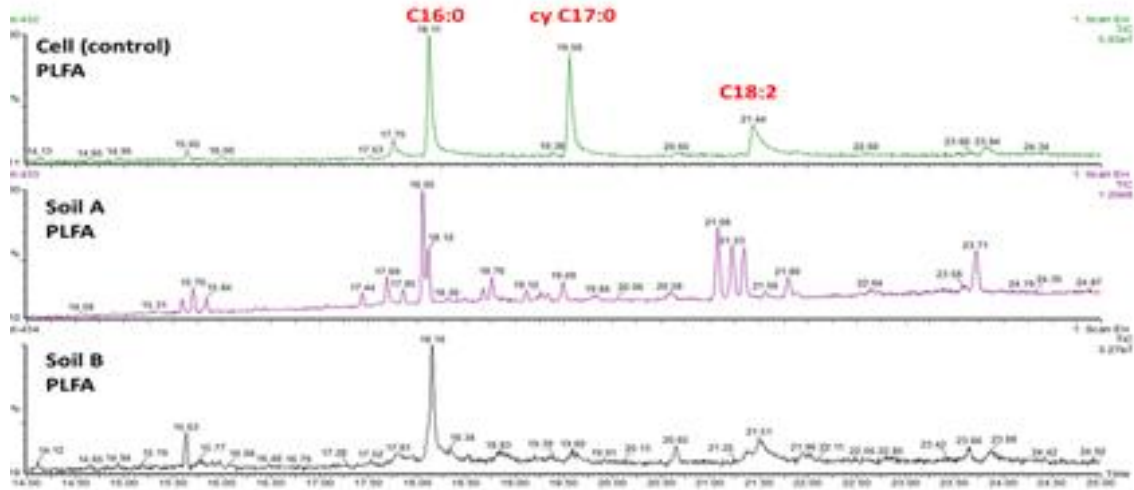


그림 28. 환경이 다른 두 지역 토양의 PLFA 프로파일링 비교.



PLFA stability test

토양을 7일간 15 °C에서 보관 후 PLFA의 양 변화

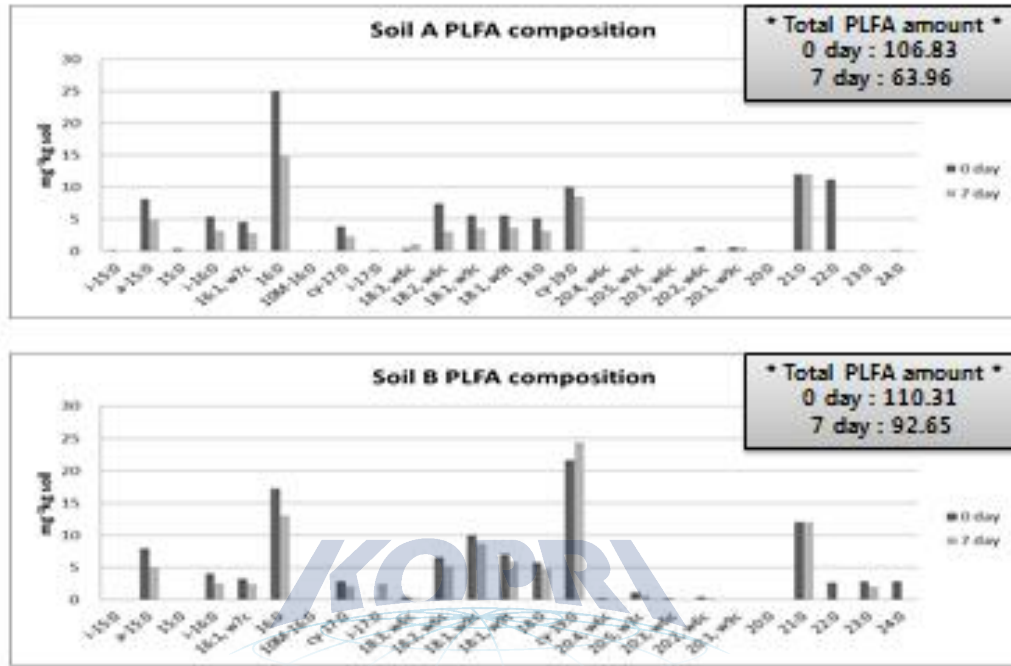


그림 29. 보관 온도와 시간에 따른 PLFA 안정성 테스트 결과.

4. 극지 균주의 lipid 생산 조건 최적화

극지연구소에서 보관중인 PAMC 23174 *Bacillus pumilus* 균주의 whole cell 지방산 프로파일링과 탄소원 종류 및 농도에 따른 지방산 생산량의 변화를 연구했으며, 특이적으로 D-cellobiose를 분해할 수 있는 균주로서 glucose를 이용할 때와는 생산되는 지방산의 양이 확연하게 차이가 나는 것을 확인했다. 탄소원과 양에 따라서 원하는 지방산을 선택적으로 생산할 수 있으며 이 균주의 lipid 생산 조건 최적화가 진행되었다. 이전의 다른 연구에서 처음으로 *Bacillus pumilus* 균주의 탄소원을 확인하였을 때 glucose와 cellulose에서 잘 자라는 특성을 보여 이를 비교하고자 하였으며, 성장은 glucose에서 확연히 cellulose에 비해 잘 자라는 것을 볼 수 있었으나, cellobiose에서 자라는 것으로 보아 *Bacillus pumilus*가 cellulase를 가지고 있음을 알 수 있다. 전체 지방산 profile을 통하여 지방산 생산 분포를 보면 glucose와 cellulose가 사용될 때 서로 크게 차이를 알 수 있으며, glucose의 경우 C16:0이 주 지방산으로 보이는 반면, cellobiose의 경우 13methyl-C16등과 같은 다른 지방산 피크들이 검출됨을 알 수 있다. 이로 C/N ratio에 따른 지방산의 총량의 변화와 함께, 탄소원의 종류에 따른 지방산 패턴의 변화도 있는 것으로 결과가 나왔으며, 그 영양 상태와 지방산 변화에 대한 상관 관계 연구도 의미가 있을 것으로 보인다.



Growth of *Bacillus pumilus* by different carbon source

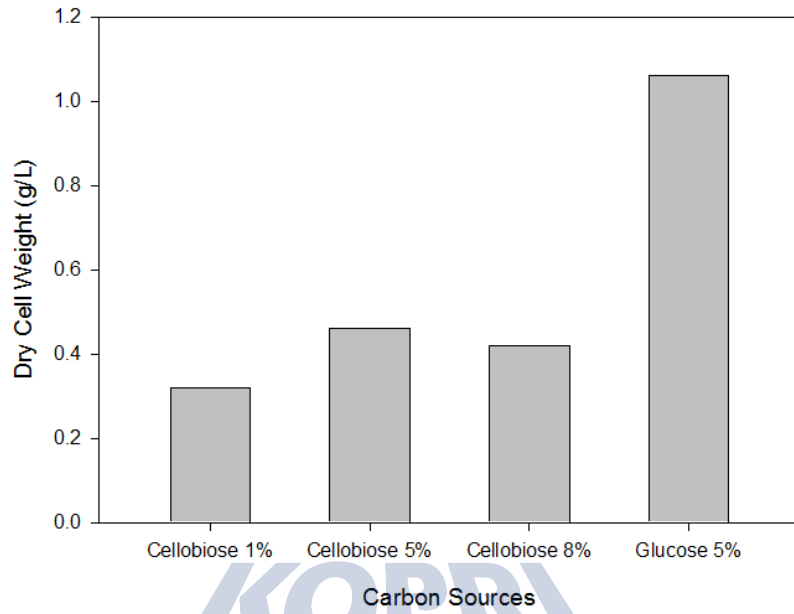


그림 30. 탄소원 종류 및 농도에 따른 PAMC 23172 *Bacillus pumilus*의 성장의 차이

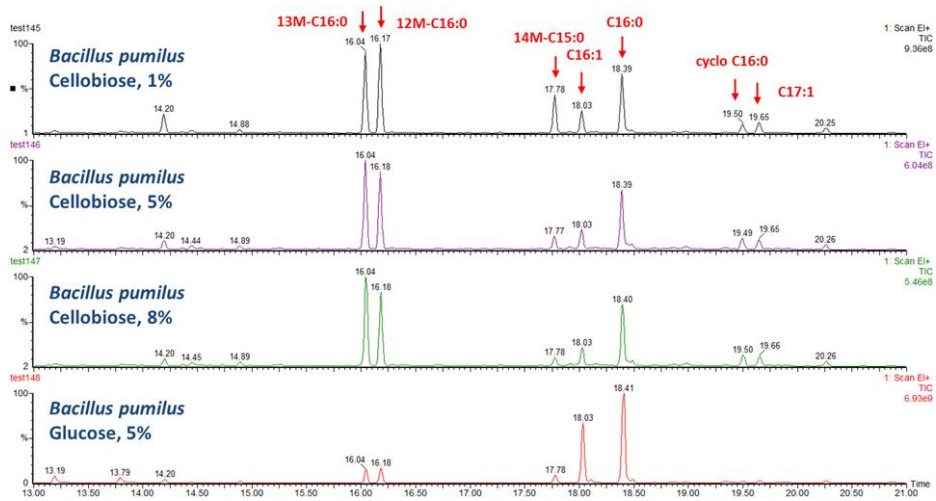


그림 31. 탄소원 종류 및 농도에 따른 PAMC 23172 *Bacillus pumilus*의 지방산 생산량의 차이를 GC-MS로 분석한 크로마토그램



5. 다산기지 주변 북극 토양 샘플링

가. 북극 토양 샘플링

과거 빙하로 덮혀 있던 빙하 후퇴지역인 북극의 Midtre Lovénbreen, Ny-Ålesund 에서 총 12 구역의 토양을 샘플링하였으며 (2014년 7월) 아래의 그림과 같이 Location no. 303 방향이 눈이 녹고 있는 지역이다.

토양 채집 후 샘플링 정보와 기후정보, 온도에 관한 정보이다. pH 측정 결과의 경우 눈에서 가까운 샘플일수록 pH가 높게 나타났다. 따라서 눈에서 녹은 지 오래된 토양일수록 pH가 낮아진 것이라고 할 수 있다. Soil type의 분류기준은 빙하와의 거리에 따라 그룹을 나누었다.

나. PLFA 분석 결과

확립한 PLFA 분석법에 따라 PLFA profile을 얻은 결과는 다음과 같다. 실험은 토양 40 g을 가지고 진행되었으며 반복실험 2 회에 해당한다. 탄소 수 21개의 지방산사슬 (Heicosaenoic acid, 21:0)은 internal standard로써 GC-MS 찍기 전에 spiking했다.



표 5. 북극 토양 샘플링 정보

Sample ID	Location	*Soil type	Depth	Measured pH	Adjusted PH	Environment (vegetation)
AS-01	6	A	0-5 cm	-	-	
AS-02	20	A	0-5 cm	6.32	7.09	
AS-03	47	A	0-5 cm	6.46	7.22	
AS-04	62	A	0-5 cm	6.64	7.38	
AS-05	103	B	0-5 cm	6.58	7.33	
AS-06	120	B	0-5 cm	6.66	7.40	
AS-07	132	B	0-5 cm	6.68	7.42	
AS-08	191	C	0-5 cm	6.84	7.56	
AS-09	303	C	0-5 cm	6.86	7.58	
AS-10	310	-	0-5 cm	-	-	Abundant
AS-11	311	-	0-5 cm	-	-	Abundant
AS-12	312	-	0-5 cm	-	-	Abundant

* Soil type : C로 갈수록 빙하와 가까움(녹은지 오래되지 않음)



인지질 지방산을 지방산 분석지표를 이용하여 그램 양성세균, 그램 음성세균, 방선균, 사상균으로 분류하여 미생물 분포비율을 Fig. X에 나타내었다. 분석이 완료된 토양시료 AS-02, AS-03의 토양 미생물 체량은 전자의 경우 $0.9171 \text{ mg kg}^{-1}$, 후자의 경우 $4.0765 \text{ mg kg}^{-1}$,으로 두 샘플간의 차이가 4.4 배 정도이다. 그램 양성세균은 AS-02와 AS-03샘플에서 각각 20.2 %와 7.9 %였고, 그램 음성세균의 경우에는 19.5 %와 18.3 % 수준으로 비슷하게 측정됐다. 사상균은 순서대로 28.7 % 와 39.9 %의 비율을, 방선균은 6.6 %와 4.7 %의 분포비율을 차지하는 것으로 나타났다.

토양 미생물의 군락상태에 의한 토양의 스트레스 지수를 알아보기 위해 기존에 사용되던 지표로서 곰팡이/세균 지방산, Iso형태 지방산/Anteiso형태 지방산, 포화지방산/불포화지방산 등의 지수들을 분석한 것이 그림 X에 표기되었다. 지표들 중 곰팡이/세균(Fungi/Bacteria) 비율은 AS-02에서 0.4849, AS-03에서 0.7409로 AS-03 토양샘플이 유기물 함량이 상대적으로 높은 것으로 나타났다. 주요 생물학 지표 중에서 곰팡이/세균의 비율은 토양 유기물 함량의 지표가 된다²³⁾.

호기성과 높은 기질 농도의 지표가 되는 포화지방산/단불포화지방산의 비율은 AS-02에서 2.0987과 AS-03에서 0.4728로 측정되었다. 탄소 영양원이 적은 조건에서 탄소 영양원이 풍부한 조건으로 이동의 지표가 될 수 있는 그램음성균/그램양성균²⁴⁾은 AS-02은 0.9657이었고 AS-03은 2.3239로 후자가 2.4 배 수준으로 높은 경향을 보였다.

양분 결핍, 낮은 pH, 중극속 오염, 제제, 경운, 고온 등 환경조건의 지표가 되는 cy19:0/18:1w7c의 비율²⁵⁾은 AS-02에서 0.0312였고, AS-03에서 8.7015로 AS-03이 상대적으로 높았다. 이상의 자료들을 종합하여 볼 때, 토양의 미생물이 외부적인 요소에 의하여 살아있는 미생물 총량이 다름을 알 수 있었으며, 그 영향으로 곰팡이/세균 비율, 단불포화 지방산/포화지방산의 비율, 그램음성균/그램양성균, cy19:0/18:1w7c의 비율 등이 미생물들이 살기 좋지 않은 방향으로 스트레스를 받았음을 인지질 지방 분석으로 알 수 있다.

이를 통하여 인지질 지방산 분석을 통하여 미생물 군집 및 미생물 군락 구조를 알 수 있었으며, 환경적 요인들이 미치는 영향까지도 추정할 수 있을 것으로 예상된다. 본 데이터에서는 다른 통계방법을 적용하지는 않았지만 여러 개 데이터에서 전체 미생물 군락의 차이를 조사하기 위하여 PCA(principal component analysis, 주성분 분석) 방법들을 도입하여 주요인 분석 및 상관관계들을 조사할 계획이다²⁶⁾.

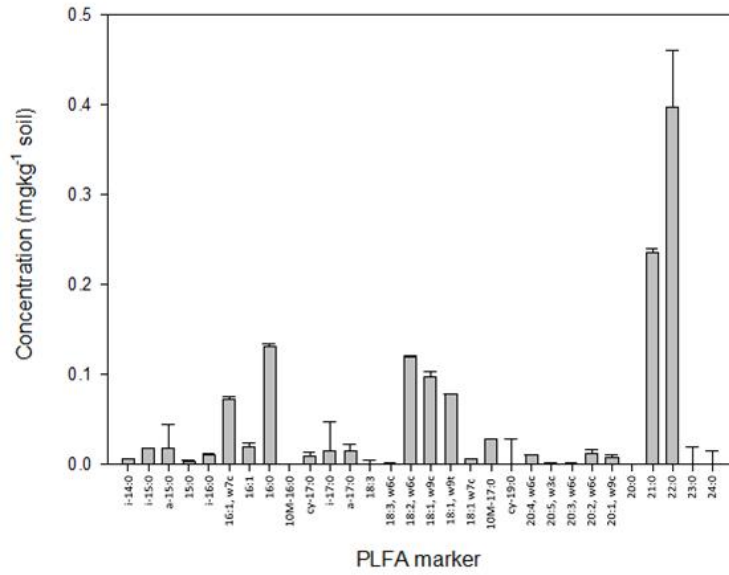
23) Bardgett RD, Hobbs PJ, Frostegard A..1996. Changes in soil fungal: bacterial biomass ratios following reductions in the intensity of management of an upland grassland. *Biol Fertil Soils* 22:261-264.;Frostegard A, Baath E. 1996. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biol. Fertil. Soils* 22:59-65.

24) Borga P, Nilsson M, Tunlid A. 1994. Bacterial communities in peat in relation to botanical composition as revealed by phospholipid fatty-acid analysis. *Soil Biol. Biochem* 26:841-848.

25) Kaur A, Chaudhary A, Choudhary R. Kaushik R. 2005. Phospholipid fatty acid - A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Current Sci.* 89:1103-1112.

26) Wu Y, Ding N, Wang G, Xu J, Wu J, Brookes PC. 2009. Effects of different soil weights, storage times and extraction methods on soil phospholipid fatty acid analyses, *Geoderma* 150:171 - 178.

PLFA profile (AS-02)



PLFA profile (AS-03)

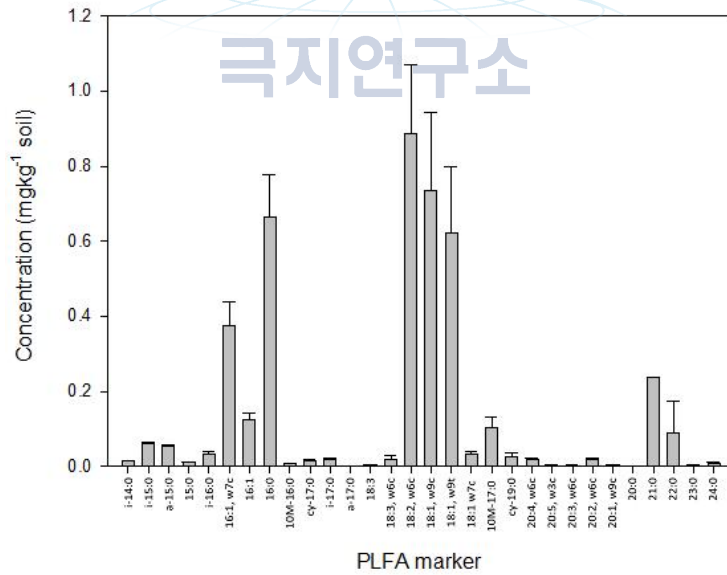


그림 35. 토양 샘플의 PLFA marker 프로파일링 (AS-02, AS-03)

표 6. 토양 샘플의 미생물 군집 별 PLFA 조성파 microbial stress indicator (AS-02, AS-03)

Group	Concentration (mg/kg soil)
Microbial PLFA components	
Total (mg/kg soil)	0.9171
Bacteria	0.2476
G+	0.0845
G-	0.0816
Fungi	0.1200
Eukaryote	0.4988
Protozoa	0.0231
Actinomycete	0.0276
Fungi/Bacteria	0.4849
Microbial stress indicator	
Sat/Monosat	2.0987
Iso/Anteiso	2.9126

Group	Concentration (mg/kg soil)
Microbial PLFA components	
Total (mg/kg soil)	4.0765
Bacteria	1.2289
G+	0.1797
G-	0.4176
Fungi	0.9105
Eukaryote	1.7927
Protozoa	0.0362
Actinomycete	0.1083
Fungi/Bacteria	0.7409
Microbial stress indicator	
Sat/Monosat	0.4724
Iso/Anteiso	2.3840

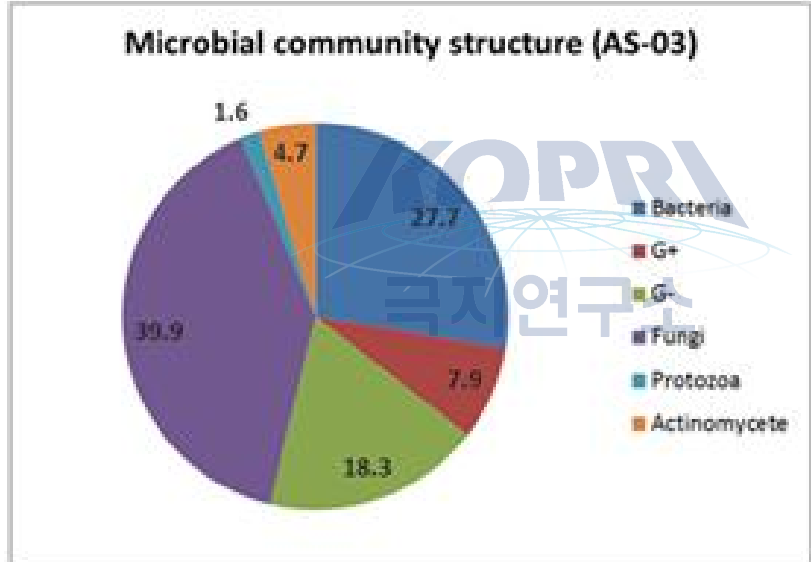
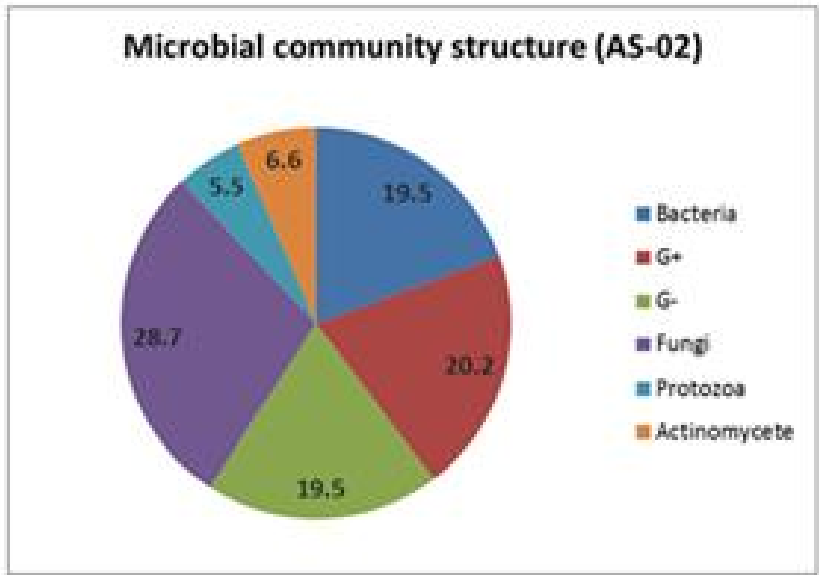


그림 36. 토양 샘플의 미생물 군집 구조 (AS-02, AS-03)

1. 샘플링이 완료된 토양 시료의 lipid marker의 추출 및 분석

샘플링 완료된 북극 토양 시료로부터 지질을 추출하여 최적화하였던 silicic acid 컬럼 크로마토그래피법으로 인지질 지방산(Phospholipid-derived Fatty Acids, PLFA)을 분획하였다. 북극 토양 시료는 총 12구역으로부터 샘플링하였고, 분획한 PLFA를 가스크로마토그래프에 분석하기 위해서는 끓는점을 낮춰주는 Alkaline mild methanolysis 방법으로 메틸에스테르화 시킨 후 가스크로마토그래프 질량분석계(GC-MS)를 이용하여 지방산을 측정하였다.

내부표준물질(Internal standard)로 Heneicosanoic acid(21:0)를 이용하여 지방산 프로파일링을 정성 및 정량 분석하였다. 이를 통하여 아래 그림 _과 같은 서로 다른 PLFA 분석결과를 얻을 수 있었다. 이는 북극 토양으로도 효과적으로 PLFA를 분획하고 분석할 수 있다는 것을 보여 줄 수 있었고, 다만 북극 토양은 기존의 실험하였던 일반 토양만큼 미생물 군집이 풍부하지 않기 때문에 GC-MS로 분석할 수 있는 PLFA 양을 늘리기 위해, 토양 샘플을 최소 30 g 이상으로 지질 추출하여야 한다.



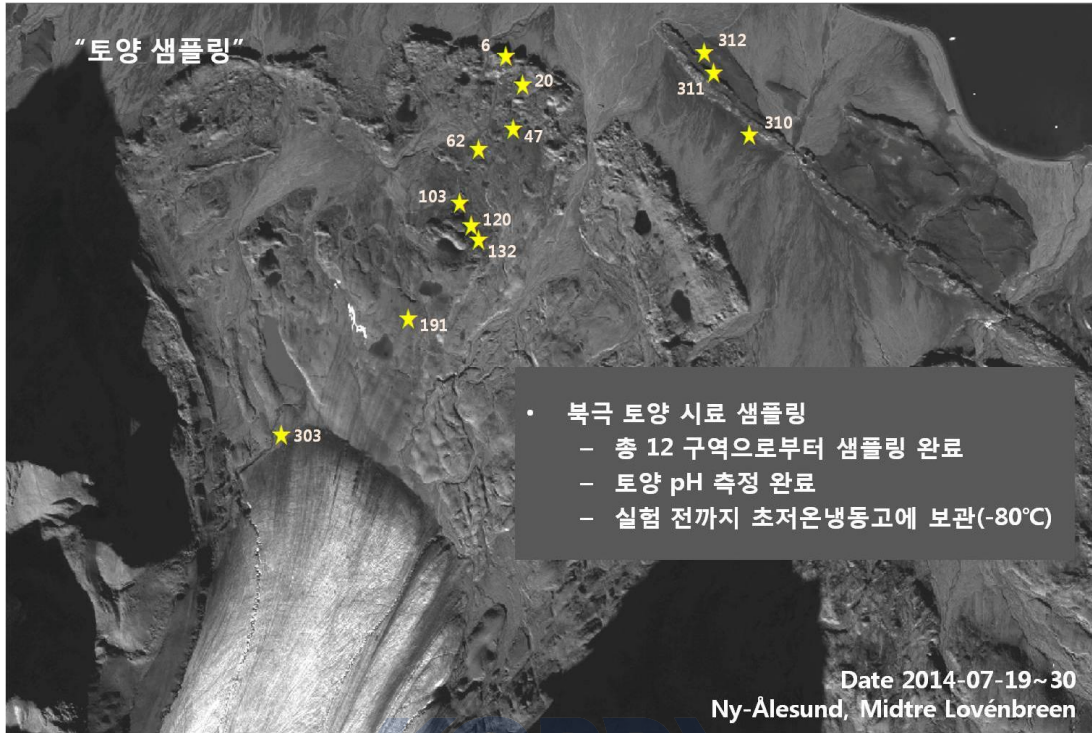


그림 37. Midtre Lovenbreen 지역의 북극 토양 샘플 채취 장소



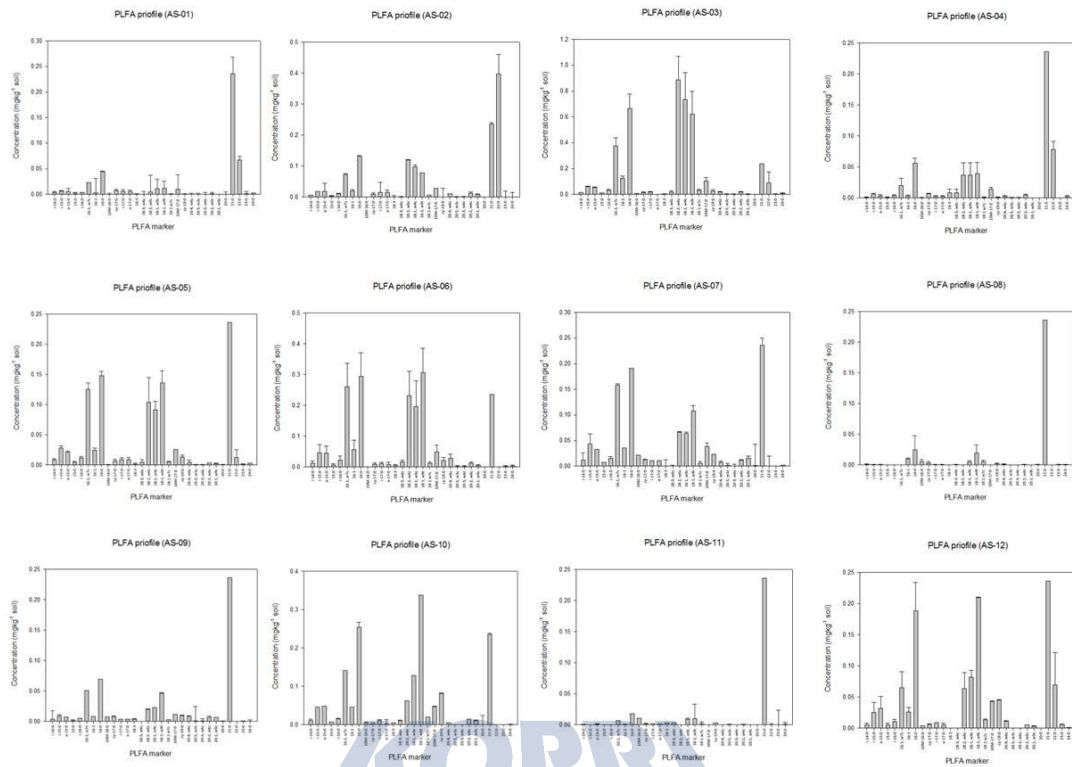


그림 38. Midtre Lovenbreen 지역 북극 토양 샘플의 PLFA data

극지연구소

3. 북극의 토양 샘플로부터 미생물을 순수분리

북극 다산과학기지 주변의 Ny-Ålesund 의 Midtre Lovénbreen 로부터 얻은 토양으로부터 10여종 이상의 미생물을 순수분리하였다. 순수분리는 대부분의 미생물이 성장한다고 알려져 있고 영양분이 풍부한 배지인 Nutrient agar(영양배지, Peptone 5 g/l, Beef extract 3.0 g/l, pH 6.8)를 이용하여 고체배지를 만들고 그 위 북극토양을 희석한 샘플들을 도말하여 극지 미생물 콜로니(colony, 집락체)들을 얻을 수 있었다. 얻은 극지 미생물 콜로니를 아래의 그림과 같이 다시 분리하여 각각 번호를 매겨 사용하였다.

각각의 미생물들을 특이적인 효소나 성장 조건, pigment 등에 대한 기초적인 실험들을 수행하였다. 이를 통해서 극지미생물의 성장 패턴 및 관련 효소들을 관찰할 수 있다.



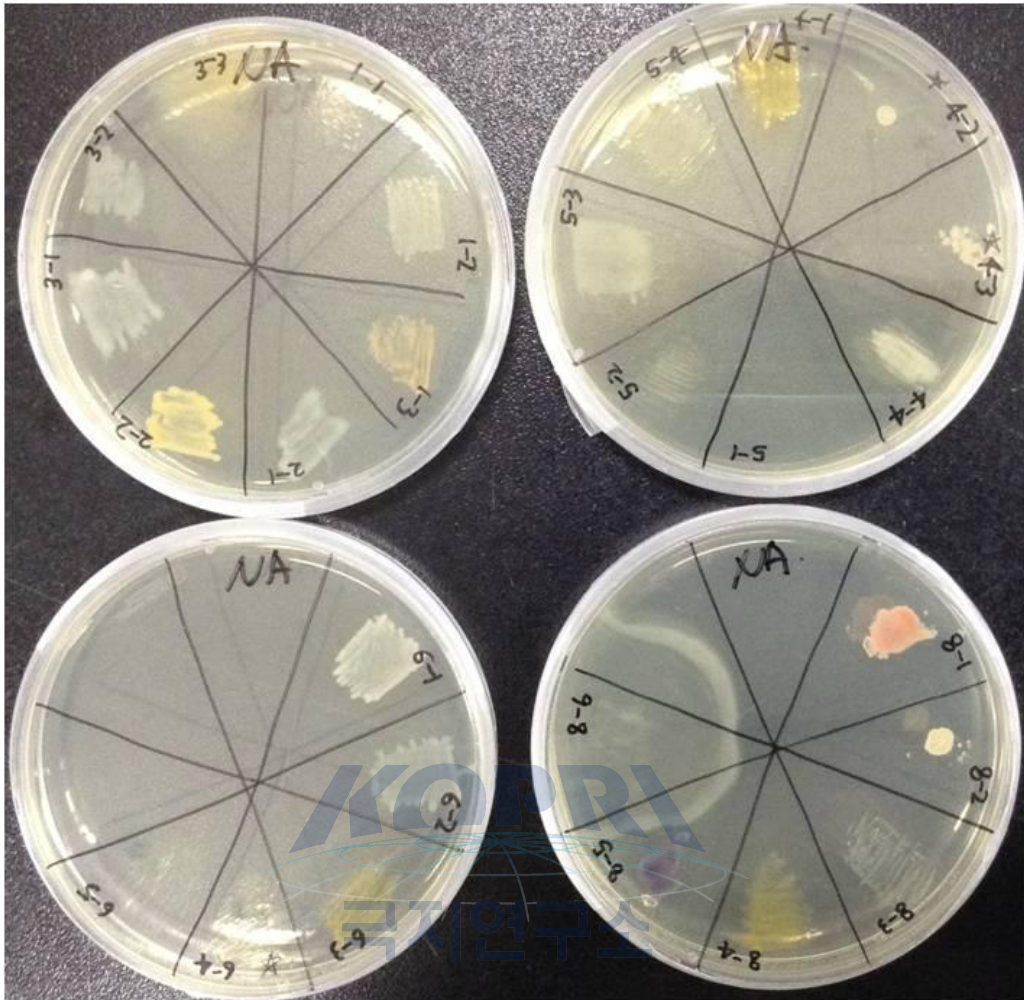


그림 39. 북극 토양 샘플로부터 분리한 미생물

4. 균주의 생화학 실험 및 지질 대사체 분석 및 비교

극지 토양에서 분리한 미생물 중에서 16s rRNA sequencing을 통해 이 미생물의 동정을 하였다. 그 결과 16s rRNA sequencing 통해서도 동정이 되지 않는 미생물들도 있는 반면, 종 또는 속까지 동정이 가능한 미생물들이 있었다. 이 중에서 5가지 미생물(*Pseudomonas sp.* : 8-6, 6-4, psy1, 2, 3)들을 선정하여 온도, pH, NaCl 농도에 따른 성장을 비교하는 생화학 실험을 수행하여 각각 어떤 성장 특성을 가지고 있는지 확인하였다.

미생물 분리에서 사용한 고체배지인 Nutrient broth agar를 사용하여 성장을 비교하였고, '+'가 많을수록 생장이 높은, '-'가 낮을수록 생장이 낮은 것을 나타낸다. '-'로 나타낸 것은 생장이 전혀 없는 것으로 나타내었다. 온도의 조건은 극지 미생물이기 때문에 저온 조건인 4, 20 °C와 일반적인 미생물 배양온도인 30, 37 °C으로 수행하였다. 극지미생물인 만큼 4, 20 °C에서 높은 성장을 보였다. 하지만 일반 미생물 배양온도인 30, 37 °C에서는 생장이 낮아지거나 전혀 자라지 못한 것을 알 수 있었다. 일반적인 *Pseudomonas sp.*의 최적온도인 30 °C와 다른 것을 볼 수 있는데 이는 같은 속의 미생물이어도 극지토양, 즉 저온 환경에서 서식하는 미생물은 그 환경에 적응하여 최적으로 성장할 수 있는 온도가 4 ~ 20 °C인 것을 알 수 있었다.

pH의 경우에는 중성 pH 7 부근에서 생장이 높은 것을 나타내었는데, 산성인 조건인 pH 3 ~ 5보다 보다 염기성 조건인 pH 9 ~ 11에서 더 잘 성장하는 것을 볼 수 있었다. NaCl 농도별 조건에서는 낮은 농도인 0.1 ~ 0.25 M에서 대부분 높은 성장을 나타내었다. 높은 NaCl 농도에서도 성장하는 것을 볼 수 있지만 상대적으로 낮았다. 따라서 이 극지미생물들은 낮은 NaCl 농도에 대한 내성을 가지는 약호염성인 미생물로 볼 수 있다.

표 7. 선정된 균주의 생장 조건 비교

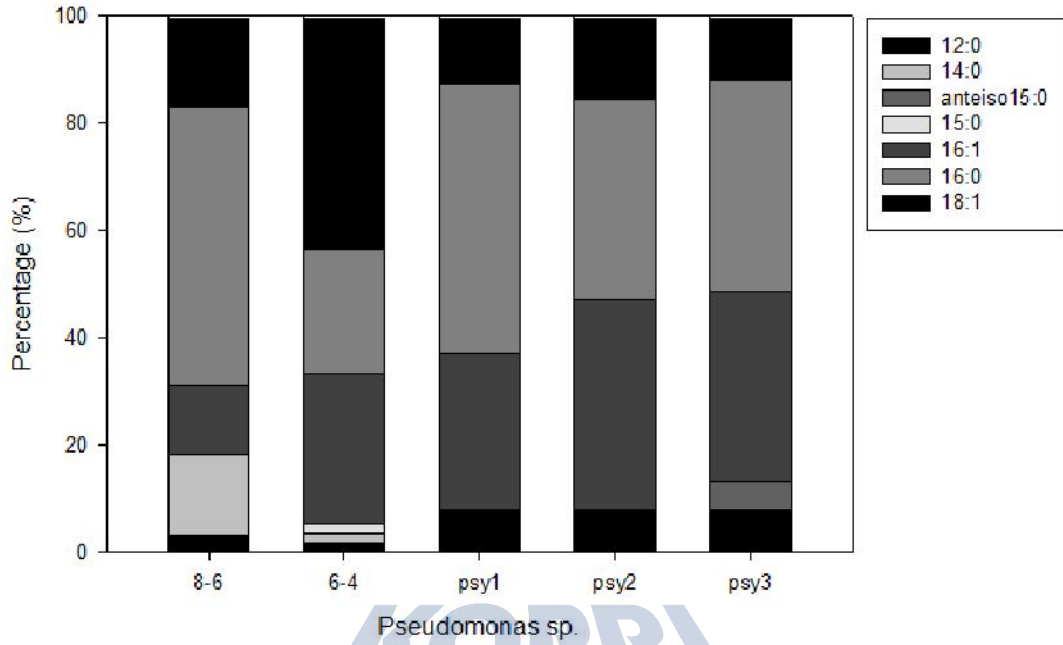
Condition	8-6	6-4	psy1	psy2	Psy3
4 °C	+++	+	+++	+++	+++
20 °C	+	+++	+++	+++	+++
30 °C	+	-	+++	++	++
37 °C	-	-	-	-	-
pH3	-	-	-	-	-
pH 5	+	+	+++	+++	+++
pH 7	+++	+	++	-	-
pH 9	+++	+	+++	++	++
pH 11	+++	-	+++	++	++
pH 13	-	-	-	-	-
NaCl 0.1 M	+++	+	+++	+++	+++
NaCl 0.25 M	+++	+++	+++	++	++
NaCl 0.5 M	++	++	-	-	+
NaCl 1.0 M	+	+	+	+	+



위에서 선정된 5개의 극지미생물들의 평균적인 성장 조건에서 배양하여 총 지방산의 구성을 분석하였다. pys1, 2, 3 세 가지 *Pseudomonas sp.* 에서는 C14:0 와 anteiso 15:0을 중심으로 하는 지방산 패턴의 결과가 나왔다. 6-4 의 극지미생물은 위 세 가지 극지미생물과 지방산 패턴이 비슷하지만 C12:0의 비율이 상대적으로 높았다. 8-6은 총 지방산의 절반정도가 C14:0 이 차지하였다. 일반적인 환경에서 서식하는 미생물의 지방산 구성요소의 비슷한 경향을 보이고, 불포화 지방산보다는 저온환경에 적응된 포화지방산이 많이 차지하는 패턴이었다. 이를 통해서 분리된 극지 *Pseudomonas* 에 대한 지질 대사체를 분석 수행할 수 있음을 보였다.



Total Fatty Acids Composition



Pseudomonas sp.

그림 40. 선정된 균주의 지질 대사체 분석

극지연구소

[지방산 분포를 사용한 PCA sample grouping]

북극 다산과학기지 Ny-Ålesund 의 Midtre Lovénbreen 로부터 12 구역의 토양 샘플 확보하였다(주변의 Date 2014-07-19~30). 과거 빙하로 덮혀 있던 빙하 후퇴 지역인 북극의 Midtre Lovénbreen, Ny-Ålesund 에서 총 12 구역의 토양을 샘플링하였으며 (2014년 7월) 아래의 그림과 같이 Location no. 303 방향이 눈이 녹고 있는 지역이다.

PLFA법에 의해 나오는 데이터의 양과 수가 많기 때문에 본 과제에서는 PCA (Principal component analysis, 주성분 분석)을 이용한 통계학적 방법으로 접근하여 빙하가 녹은 시기에 따라 세가지 대표 그룹을 선정하여 실험을 진행하였다.

이에 따라 전년도 샘플 분석을 통하여 얻은 지방산 분포를 이용해 각 구역에 대한 PLFA 데이터의 해석을 하고 PCA을 실시하였다. PCA는 데이터 집합을 효율적으로 분석하는 기법으로 데이터를 한 개의 축으로 사상시켰을 때 그 분산이 가장 커지는 축이 첫 번째 좌표축으로 오고, 두 번째로 커지는 축이 두 번째 좌표축이 된다. 이는 새로운 좌표계로 데이터를 선형 변환하는 것으로 각각의 축의 데이터를 가장 중요한 성분으로 위치시킨다. 이를 이용하여 나온 유사성이 큰 세 지역의 샘플들을 아래의 그림과 같이 권역으로 묶어 분석한다.

이에 따른 sampling site를 묶은 결과 초기에는 비슷하다가 최종적으로 해빙이 많이 진행된 sample간의 연관성으로 차이가 커진 것으로 보인다.

극지연구소

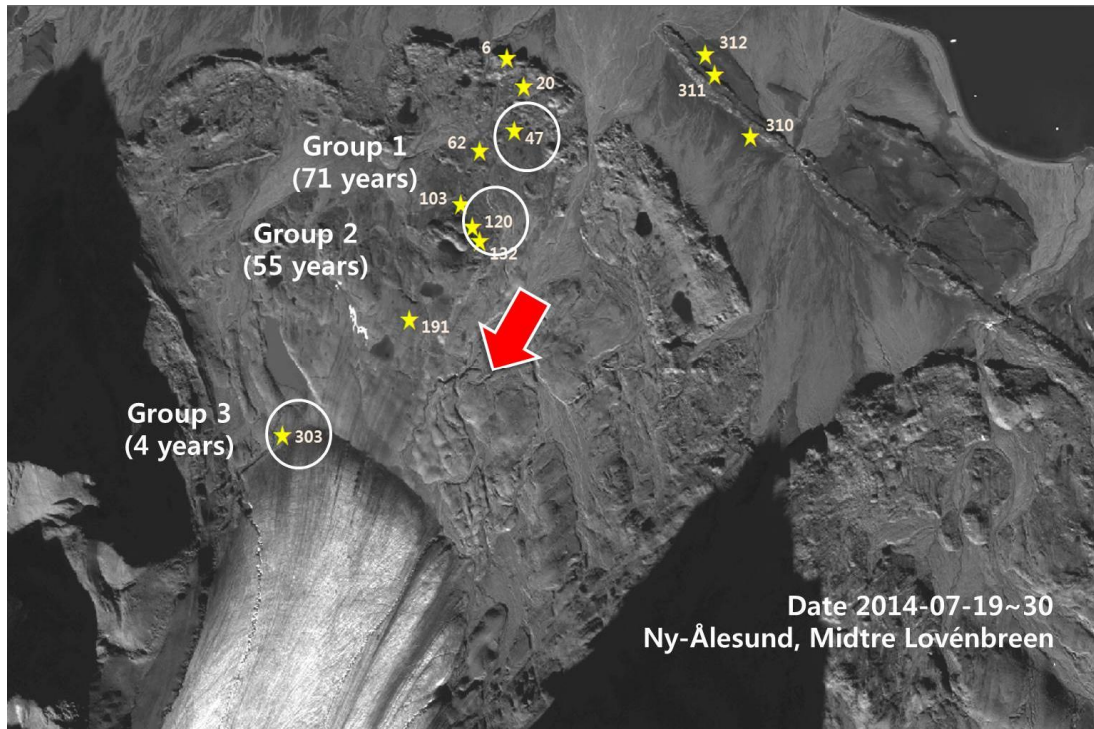


그림 41. 선정된 대표 샘플의 지도상 위치
 (빙하가 녹은 후 흐른 시간에 따라, 300번: 4년, 120번: 55년, 47번: 71년)



표 8. 채취한 샘플들에 대한 환경 정보

Location No.	*Soil type	**Glacier retreat time	***Wind	Aspect	Slope	Depth	Soil pH
20	A	1937	face	8.83733	7.73945	0-5 cm	7.09
47	A	1944	abris	159.872	10.5389	0-5 cm	7.22
62	A	1949	abris	45.7266	3.9214	0-5 cm	7.38
103	B	1957	face	62.5061	16.7078	0-5 cm	7.33
120	B	1960	abris	104.461	6.06028	0-5 cm	7.40
132	B	1961	abris	39.102	18.1267	0-5 cm	7.42
191	C	1978	abris	342.511	3.53635	0-5 cm	7.56
303	C	2011	-	352.383	15.3796	0-5 cm	7.58

* Soil type : 빙하로부터 거리에 따라 나눈 그룹, C로 갈수록 빙하와 가까움

** Glacier retreat time : 해빙이 시작된 시기 (년)

*** Wind : face (dominant winds are directly in front of face), abris (dominant winds with no direction)



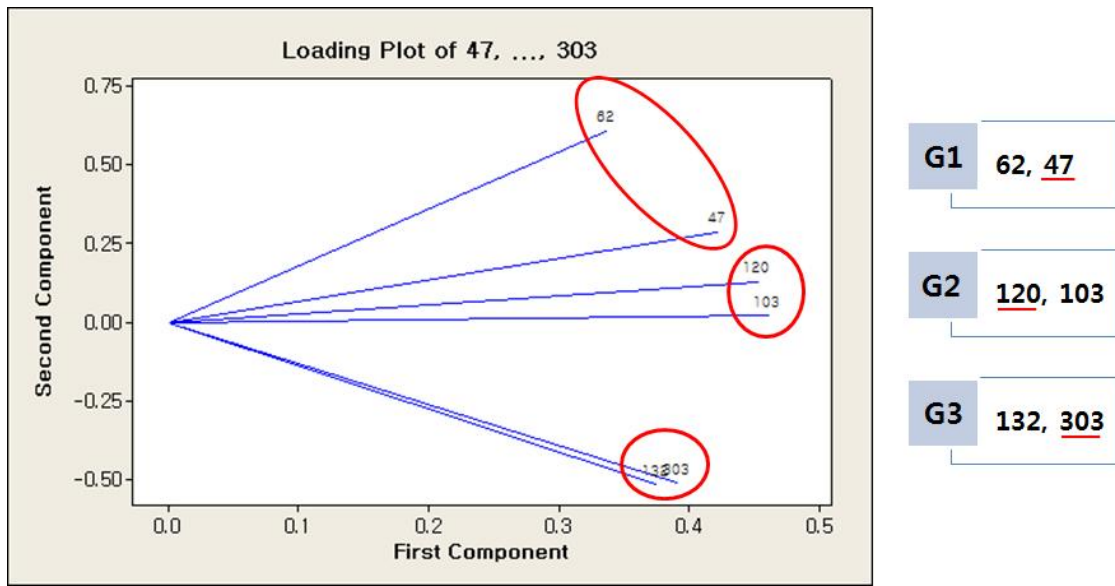


그림 42. PCA(주성분 분석)를 이용한 대표 샘플의 그룹화 및 선별



[해빙 시기에 따른 미생물 군집 별 Total PLFA 측정]

총 12 군데 북극 토양 site 중에서 PLFA 프로파일링 결과가 비슷한 경향을 보이는 것들을 대표로 8 site를 선정하여 미생물 군집 분석을 실시하였다. 미생물 군집 분석은 위의 미생물 군집별 PLFA 마커에 따른 미생물 군집별 농도와 스트레스 지수를 나타낸 것이다. Total (mg/kg soil)은 토양 내에 살아있는 생물량을 나타는 것이고, 관찰하고자 하는 미생물 군집으로는 그람 양성(+) 박테리아, 그람 음성(-) 박테리아, Fungi, Eukaryote, Protozoa, Actinomycete 의 분포 정보를 확인할 수 있었다.

해빙 후 시간이 지남에 따라 미생물의 군집별 PLFA 농도 변화는 Total PLFA를 측정해 살아있는 생물량을 유추하게 된다. 아래의 그림을 보면 해빙이 진행됨에 따라 그람 양성 세균/그람 음성 세균(Gram (+), Gram (-)), Fungi, Protozoa, Actinomycete 에 대한 모든 종류의 미생물의 total PLFA(살아있는 생물량)가 점차 증가하는 추세를 보인다. 이는 북극 토양이 해빙 된 시간에 따라 온도의 증가와 기질의 농도, 영양원의 변화 등이 원인이 된다.

또한 해빙시기의 변화에 따른 미생물 군집 분포 변화를 보면 PCA 분석방법을 이용한 그룹화를 토대로 박테리아에 대한 곰팡이 군집의 비율이 감소 추세가 낮아짐을 보였고, 방선균, Protozoa 군집은 해빙이 오래됨에 따라 해당 PLFA가 증가하는 양상을 보인다. 이러한 군집 별 추세 변화는 microbial stress indicator로서 나타내고 이용되어질 수 있다.

표 9. 선정된 8개 북극 토양 샘플의 PLFA 분석을 통한 미생물 분류별 총 대비 구성하고 있는 비율

Group / %	20	47	62	103	120	132	191	303
Bacteria	19.5	27.7	24.9	27.1	28.7	20	23	53.5
G+	20.2	7.9	11.4	16.7	13.1	21.6	15.8	9.2
G-	19.5	18.3	17.1	27.9	26.6	33.5	33	13.6
Fungi	28.7	39.9	33.4	21.1	23.1	11.5	11.5	2.2
Protozoa	5.5	1.6	4.3	1.9	3.9	3.3	7.6	5.6
Actinomycete	6.6	4.7	8.9	5.1	4.5	10.2	9.2	15.9



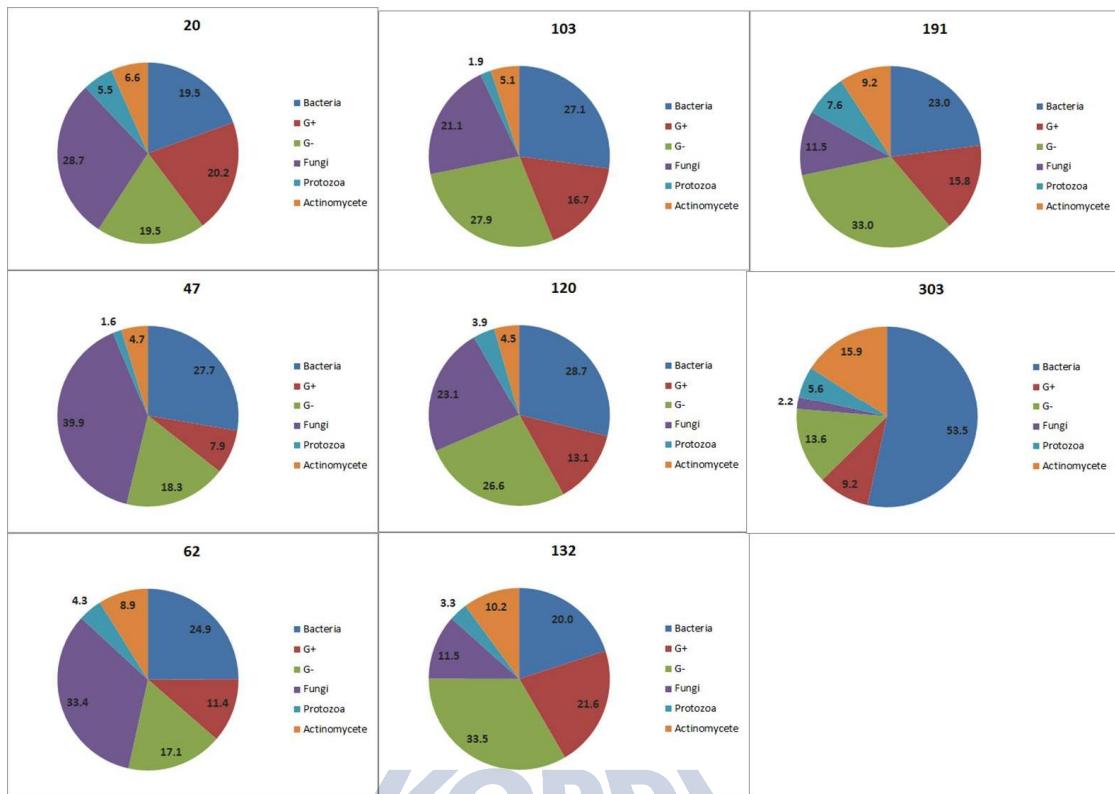


그림 43. 선정된 8개 북극 토양 샘플의 PLFA 분석을 통한 미생물 분류별 총 대비 구성하고 있는 비율

KOPRI
극지연구소

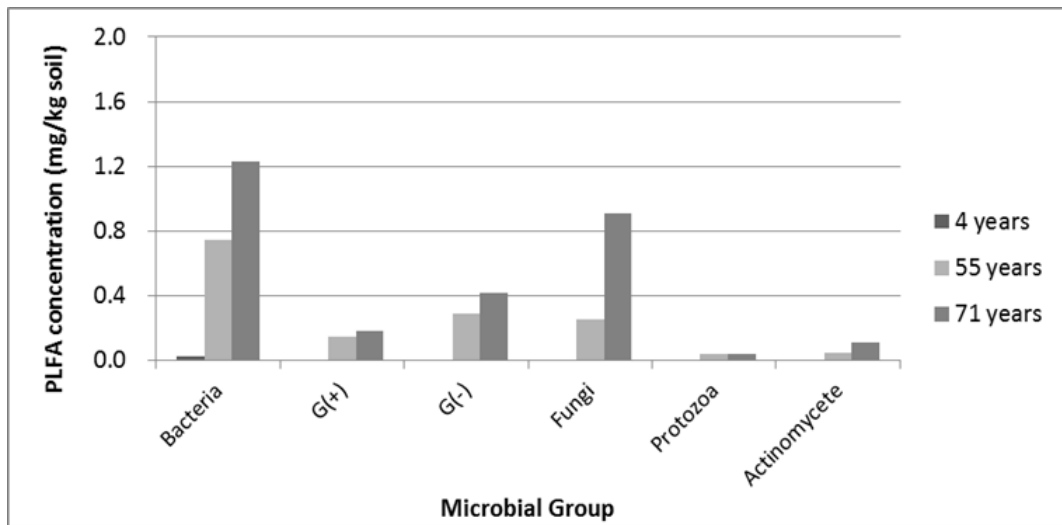


그림 44. 선정된 대표 3개 샘플의 해빙 후 시간이 지남에 따라 미생물 군집별 PLFA 농도 변화



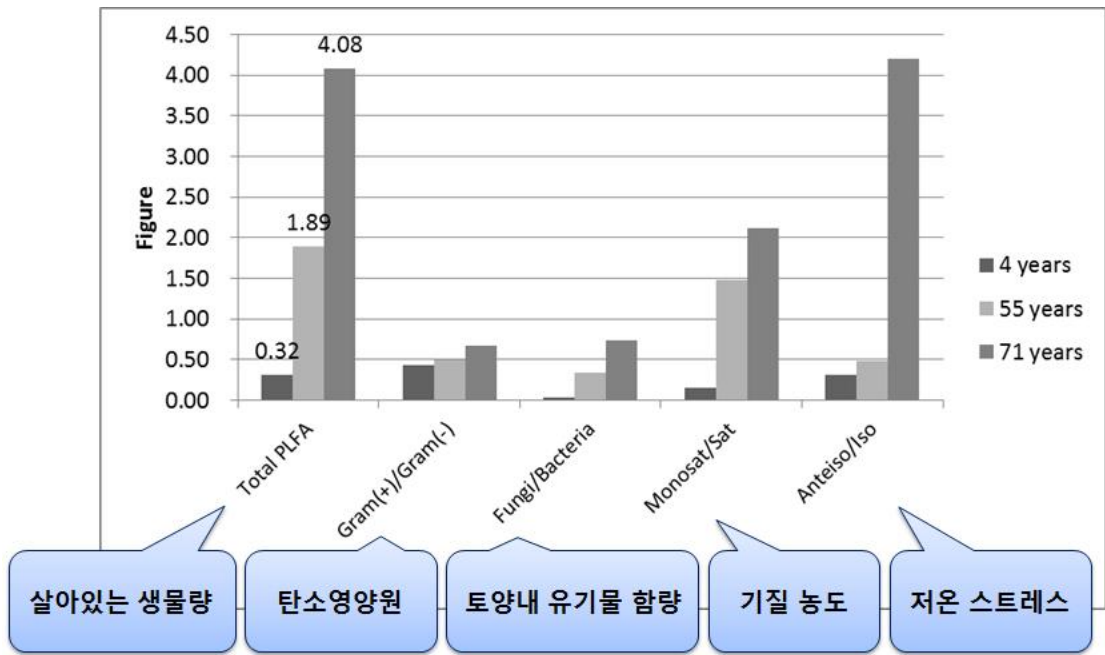


그림 45. 선정된 대표 3개 샘플의 해빙 시기별 PLFA, Gram +/- 비율, Fungi/Bacteria 비율, 기질 농도, 저온스트레스 지표 비교



[미생물 군집 별 microbial stress indicator 활용]

미생물 군집 분석은 위의 미생물 군집별 PLFA marker에 따른 군락 구조 별 상관관계를 통해 스트레스 지수를 나타내는데 활용된다. Total PLFA(mg/kg soil)은 토양 내에 살아있는 생물량을 나타는 것이고, 관찰하고자 하는 미생물 군집으로는 그람 양성(+) 박테리아, 그람 음성(-) 박테리아, Fungi, Eukaryote, Protozoa, Actinomycete 의 분포 정보를 확인할 수 있다.

미생물 스트레스 지표(Microbial stress indicator)로서 Fungi/Bacteria의 군집 비율, Saturated fatty acid/Monosaturated fatty acid, 그리고 Iso form/Anteiso form PLFA들이 있다. Fungi/Bacteria의 값이 높을수록 토양 내 유기물 함량이 높은 것을 나타내고, Saturated fatty acid/Monosaturated fatty acid의 값이 낮을수록 기질 농도가 높은 것을 나타낸다. 그리고 Iso form/Anteiso form PLFA의 값은 저온 스트레스를 나타내는 것인데, 값이 적을수록 저온 스트레스를 받은 것으로 확인할 수 있다. 빙하가 해빙함에 따른 스트레스 지표를 조사 및 계산한 결과 해빙이 오래 되었을수록 토양 내 유기물 함량과 기질 농도, 저온 스트레스가 모두 증가함을 미생물의 군락 구조 분석을 통해 볼 수 있다.



표 10. 선정된 8개 토양 샘플의 PLFA 분석을 통한 미생물 총량 및 스트레스 지수 분석

Group	Concentration (mg/kg soil)							
	Location No.	20	47	62	103	120	132	191
Microbial PLFA components								
Total (mg/kg soil)	0.9171	4.0765	0.4950	1.0280	1.8901	1.1253	0.5573	0.3155
Bacteria	0.2476	1.2289	0.0865	0.3740	0.7480	0.4340	0.1517	0.0274
G(+)	0.0845	0.1797	0.0185	0.0872	0.1435	0.1248	0.0334	0.0033
G(-)	0.0816	0.4176	0.0277	0.1455	0.2907	0.1935	0.0697	0.0049
Fungi	0.1200	0.9105	0.0540	0.1101	0.2525	0.0666	0.0243	0.0008
Eukaryote	0.4988	1.7927	0.3331	0.5073	0.7986	0.5470	0.3459	0.2794
Protozoa	0.0231	0.0362	0.0069	0.0099	0.0421	0.0190	0.0160	0.0020
Actinomycete	0.0276	0.1083	0.0144	0.0266	0.0489	0.0587	0.0195	0.0057
Microbial stress indicator								
Fungi/Bacteria	0.4849	0.7409	0.6238	0.2944	0.3375	0.1535	0.1599	0.0302
Sat/Monosat	2.0987	0.4724	2.5587	1.0658	0.6759	1.3821	2.1136	6.6369
Iso/Anteiso	2.9126	2.3840	3.7781	2.6587	2.0823	2.5056	2.9949	3.1538

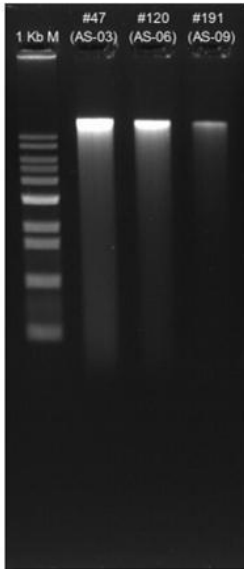


[NGS와 Rank abundance를 통한 미생물 종의 분포 분석]

DNA 추출을 위해 Kit를 이용하여 토양의 DNA quantity와 quality를 Nanodrop으로 분석해 본 결과 빙하가 해빙된 지 오래 되었을수록 DNA concentration과 이에 따른 quantity가 증가하는 추세를 보이는데 이는 PLFA와 같이 수치적으로 미생물의 양을 알 수는 없지만 증가하는 경향성을 보이는 것은 확인할 수 있다. 그리고 NGS를 통한 DNA 분석으로 군집 분석을 한 결과 아래의 'Double Pie Chart'와 같이 Phylum 수준에서는 Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Acidobacteria, Chloroflexi, Planctomycetes에 대한 분포가 나타났다.

Double Pie Chart에서 내부의 원은 Phylum 수준에서의 분석을 나타내며 외부의 원은 Family 수준으로 분석한 결과이다. NGS 분석결과를 토대로 각 Phylum 수준의 비율을 비교한 결과 중 Bacteroidetes의 경우 해빙에 따른 microbial community composition(%)가 비례하여 증가하는 것을 보아 차후에 해빙 시기나 환경에 대한 지표로 활용 될 수 있을 것이다.





	Sample Name	Conc. (Nanodrop) (ng/ul)	260/280	Volume (ul)	Total amount (ng)
1	71 years	38.366	1.938	30	1150.98
2	55 years	28.704	2.084	30	861.12
3	4 years	18.619	2.328	34	633.046

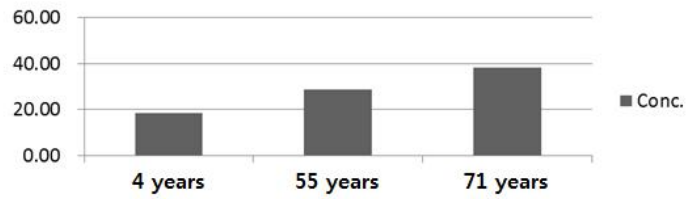


그림 46. 선정된 대표 3개 샘플의 DNA 추출 Kit를 이용해 토양 내 DNA의 quality와 quantity 확인 결과



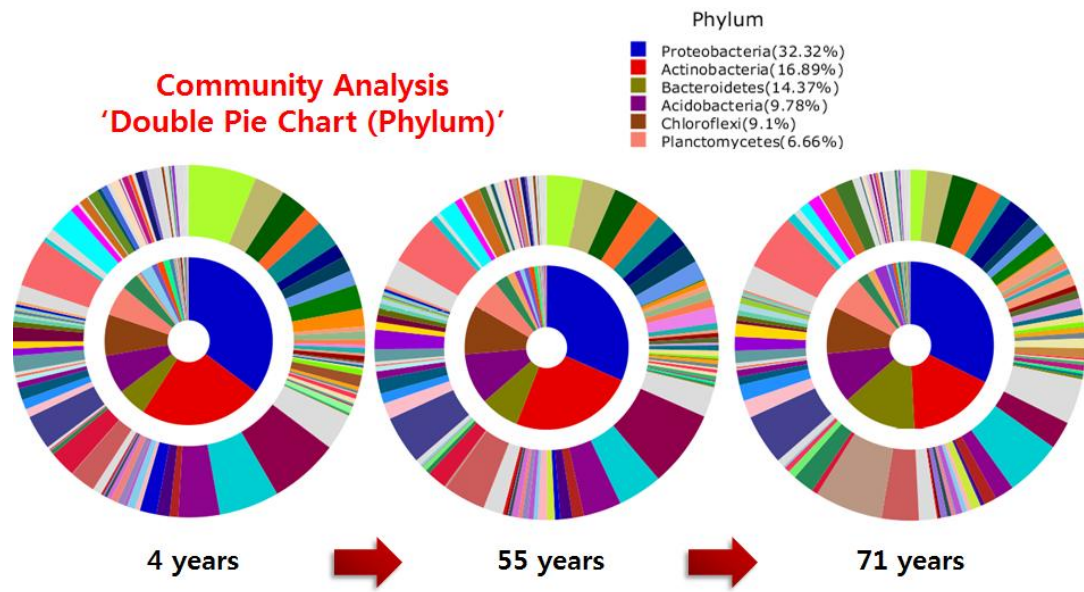


그림 47. 선정된 대표 3개 샘플의 NGS 분석결과를 토대로 군집별로 분류한 그래프



Proteobacteria는 *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Helicobacter*와 같은 Gram 음성균을 말하며 Actinobacteria는 *Streptomyces*와 같은 높은 G/C content를 가지는 그람 양성균이 이에 해당한다. Bacteroidetes의 경우 혐기성, 호기성, 그람 음성균, spore 비형성균, rod-shaped bacteria 등이 해당되며 sphingolipid를 생산하는 *Sphingobacteriia*가 이에 해당한다. Acidobacteria는 *Holophaga foetida*, *Bryobacter aggregatus*와 같은 균주가 해당하며 Planctomycetes는 물속에서 성장하며 출아를 통해 자라고 균체의 세포벽에 펩티도글리칸이 결합되어있는 특징이 있다. 이를 토대로 그림 14와 같이 NGS 결과에 따른 군집별 구성 비율을 보면 해빙된 시간에 따라 Proteobacteria와, Acidobacteria, Chloroflexi, Planctomycetese 들은 큰 변화를 보이지 않았고, 앞에서 언급했던 것과 같이 Bacteroidetes의 비율은 증가하는 것을 보인다. 하지만 Actinobacteria의 경우는 해빙이 가장 오래된 site에서 비율이 비교적 낮게 나왔다. 이는 환경이 더 어려운 곳에서 성장할 수 있는 Actinobacteria의 특성상, 해빙이 오래된 토양에서는 다른 미생물 군집들도 충분히 성장할 수 있는 조건이 되면서 자연스럽게 Actinobacteria의 비율이 낮아진 것으로 해석할 수 있다.

Rank abundance를 통한 미생물 군집 분포 분석의 경우 Whittaker plot이라고도 불리며 생물다양성의 요소로 사용되어진다. 이는 우점 및 결점종의 분류에 사용하는데 결과 그래프에 따르면 해빙 이후 100종 이하의 소수 종이 분포 비율을 독점하고 있음을 확인 할 수 있다. 이는 북극이 아닌 온대성 기후인 우리나라의 토양에서는 소수의 미생물 종이 독점하고 있는 것이 아닌, 다수의 미생물 종이 분포하고 있는 것과 비교해서 해석할 수 있다. 즉 북극 토양의 경우는 다양한 미생물이 성장하기에 충분한 조건이 아니기 때문에, 극한의 조건에서 성장할 수 있는 소수의 미생물들이 분포하고 있다는 것을 알 수 있다.

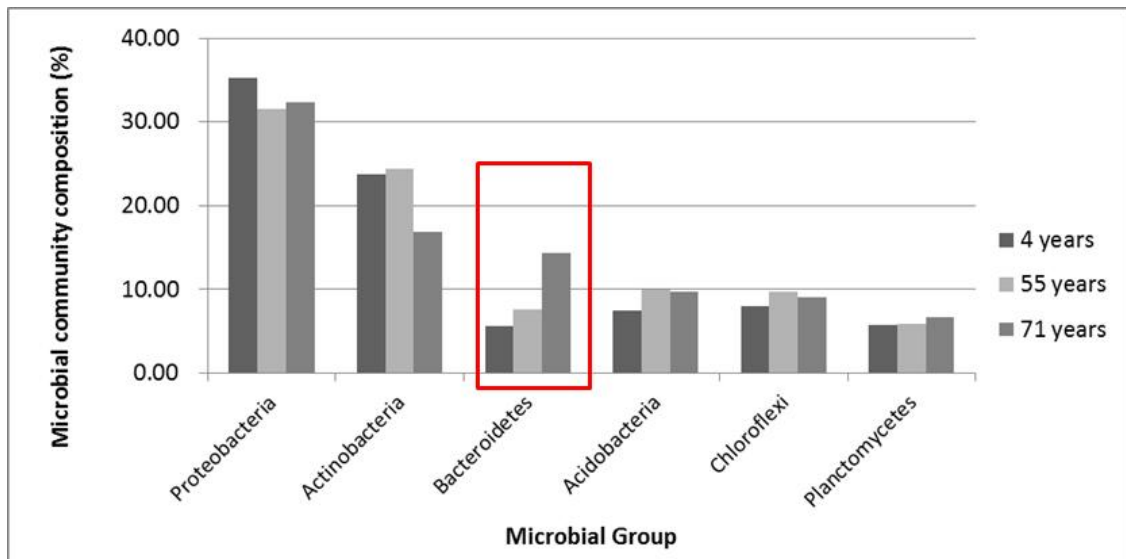


그림 48. 선정된 대표 3개 샘플의 NGS 분석 결과에 의한 미생물 군집 분포



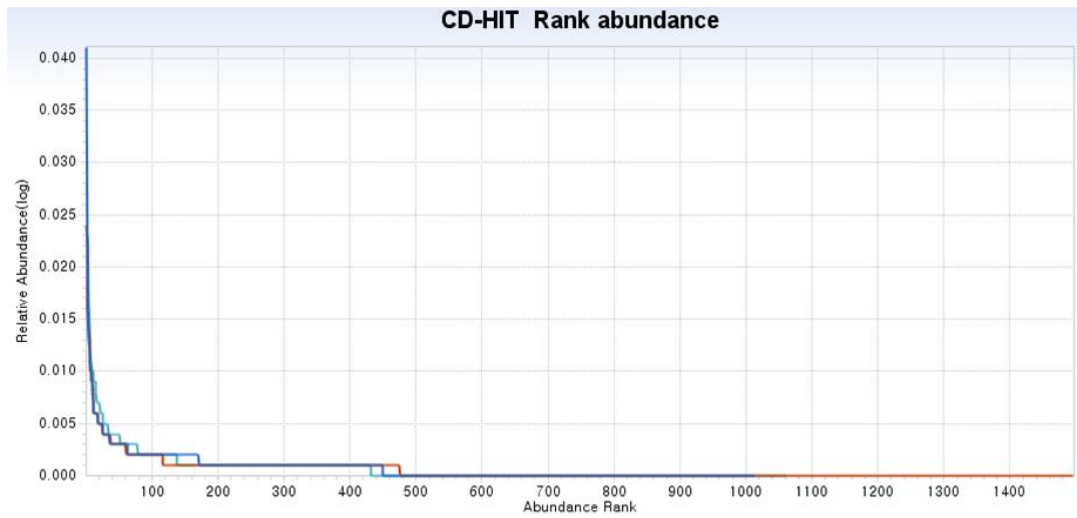


그림 49. Rank abundance를 통해 선정된 대표 3개 샘플이 100종 이하의 소수 미생물종이 독점하고 있음을 나타내는 결과 그래프



[DHY 지수를 대입한 NGS와 PLFA를 통한 미생물 종의 분포 분석]

NGS 분석방법의 경우 16S rRNA sequencing을 통해 DNA 기반으로 Bacteria 계통에 속하는 종은 상세히 분류되지만 정량성이 보장되지 않는다는 단점이 있다. 이는 PLFA법과 NGS 기술을 통해 얻은 데이터를 보완시켜 미생물 군집 분포의 변화를 예측하게 된다. PLFA는 NGS에 비해 미생물 군집에 대해 정량성을 알 수 있으며 미생물 총량, 스트레스 지수 등의 추가 정보 등을 얻을 수 있기 때문에 이를 보완할 수 있다.

정량적 분석이 보완되어야 하는 NGS의 경우 DHY 지수를 통해 정량의 개념을 확립한다. 이는 상대적으로 경제적인 PLFA법으로 대표 샘플을 선별 할 수 있다는 것에 기여한다.

DHY 지수의 경우 정성적으로 풍부한 데이터를 제공하는 NGS와 정량적인 정보를 제공하는 PLFA법을 융합하는 것으로 미생물 총량 대비 종의 다양성을 한눈에 보기 쉽게 입체적으로 나타낼 수 있는 장점이 있다. 이는 DHY 상수를 이용해 DHY 지수의 값을 무차원으로 변환하며, 1(가장 보편적인 상태의 다양성과 미생물 총량일 때 DHY 지수가 1, 즉 평균값으로부터 나온 값)을 기준으로 미생물 총량 대비 다양성을 나타내어 준다.



$$(DHY지수) = [0.0001 * (NGS 종 개수) / (미생물 총량(mg/kg))] * (DHY상수)$$

DHY 상수 = 군집의 종류 마다 다름

표 11 . 선정된 대표 3개 샘플을 PLFA법과 NGS 방법에 의한 미생물 군집 비교

		4 years		55 years		71 years	
NGS data	Total	Number	%	Number	%	Number	%
	Bacteria	5036	100	5095	100	2658	100
	Proteobacteria	4915	97.6	5036	98.8	2648	99.6
	Actinobacteria	1778	35.3	1608	31.6	859	32.3
	Bacteroidetes	375	23.8	1244	24.4	449	16.9
	Acidobacteria	283	5.6	391	7.7	382	14.4
	Chloroflexi	375	7.5	511	10.0	260	9.8
	Planctomycetes	402	8.0	498	9.8	242	9.1
	Eukarya	293	5.8	299	5.9	177	6.7
		121	2.4	59	1.2	10	0.4
PLFA data	Total	Conc. (mg/kg)	%	Conc. (mg/kg)	%	Conc. (mg/kg)	%
	Bacteria	0.3155	100	1.8901	100	4.0765	100
	G(+)	0.0274	27.2	0.748	28.7	1.2289	53.1
	G(-)	0.0033	7.9	0.1435	13.2	0.1797	9.3
	Actinomycetes	0.0049	18.3	0.2907	26.6	0.4176	13.7
	Fungi	0.0057	4.7	0.0489	4.5	0.1083	15.9
		0.0008	19.9	0.2525	23.1	0.9105	2.3



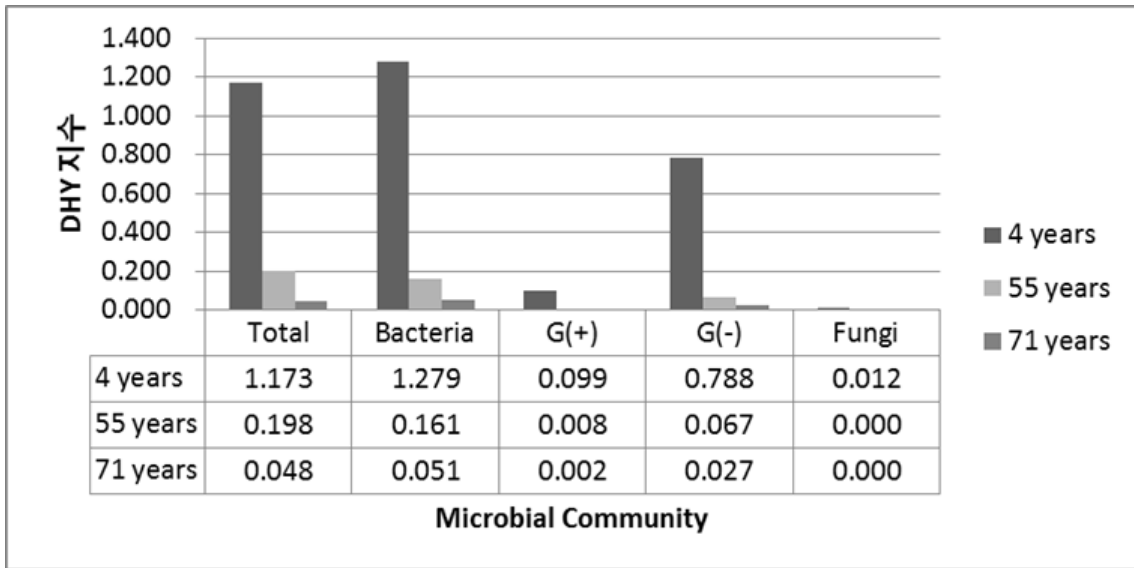


그림 50. 선정된 대표 3개 샘플을 NGS와 PLFA 분석결과를 토대로 위의 DHY 지수에 적용한 결과. 빙하가 녹은 후 시간이 지날수록 토양 내 미생물 군집의 미생물의 총량 대비 다양성이 100배 이상 감소하는 것을 확인



[극지 유래 미생물을 이용한 lipid marker 비교 연구]

북극 토양 샘플의 PLFA 프로파일링 데이터를 토대로, 이전 연구로부터 쓰여진 미생물 군에 대한 PLFA marker에 대한 정보를 수집한 결과가 얻을 수 있었다. 이들은 각 그룹을 대표하는 지방산으로써 미생물 군집 비율과 정량적인 결과를 도출하는 데에 밑바탕이 되는 자료로 쓰였다.

본 연구팀에서는 극지 유래 미생물인 *Bacillus sp.* 인 *Bacillus thuringiensis* (PAMC 23133)와 *Bacillus pumilus* (PAMC 23174)와 일반 *Bacillus sp.* 인 *Bacillus thuringiensis* (KCTC 3452)와 *Bacillus cereus* (KCTC 3624) 에 total fatty acid를 분석하였다. 그 중에서 극지 유래 미생물 중 하나인 *Bacillus pumilus* PAMC 23174 균주를 선택하여 온도와 배양 성분에 따른 PLFA 변화 및 경향성을 확인하였다. 또한 *Bacillus pumilus* PAMC 23174의 주요 지방산을 GC-MS를 통해 분석한 결과 13-Methyl tetradecanoate와 12-Methyl tetradecanoate가 가장 높은 비율로 분석되었고 Methylene hexadecanoate, Palmitate, cis-10-Hetadecanoate 등의 지방산이 분석되었다.



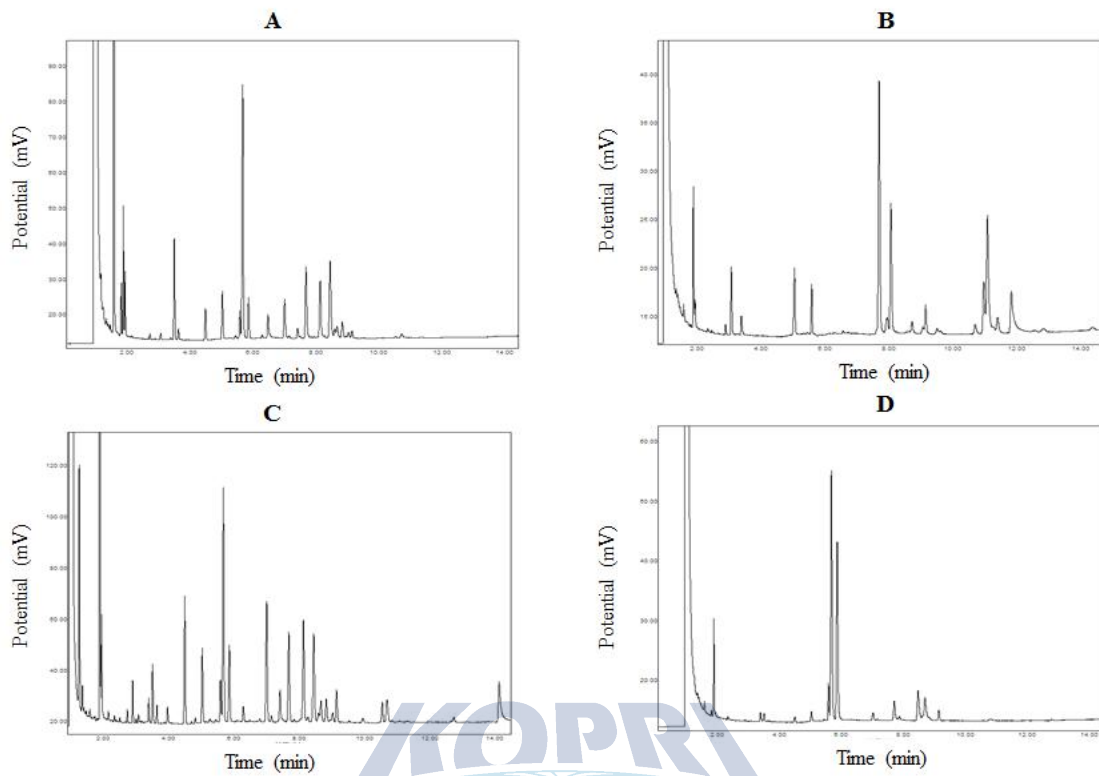


그림 51. 극지유래의 *Bacillus sp.* 및 일반 *Bacillus sp.* 들의 total fatty acid 분석 결과 (A. *Bacillus thuringiensis* (KCTC 3452), B. *Bacillus cereus* (KCTC 3624), C *Bacillus thuringiensis* (PAMC 23133), D. *Bacillus pumilus* (PAMC 23174))

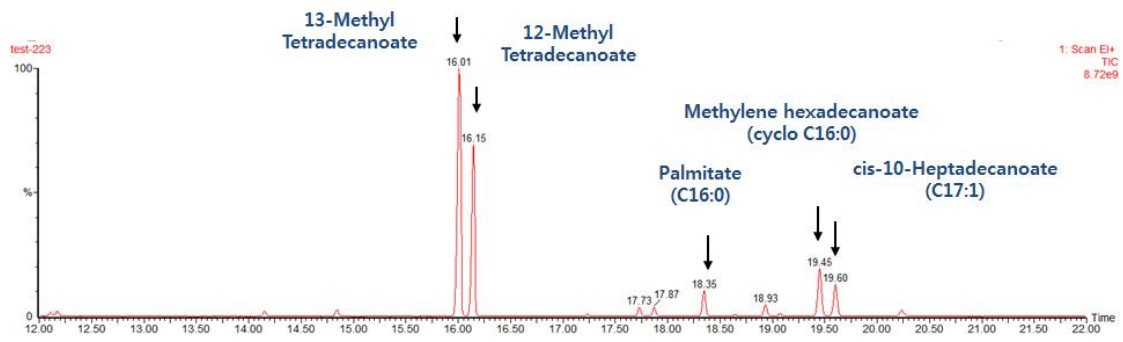


그림 52. GC-MS를 통해 극지 유래의 *Bacillus pumilus* PAMC 23174 의 주요한 지방산 분석



선택한 극지 유래 미생물인 *Bacillus pumilus* PAMC 23174의 배양 온도 조건을 다르게 했을 때 각각의 PLFA 비율을 비교하였다. 온도가 낮아질수록 anteiso-15:0 지방산이 증가하는 경향을 보이고 iso-15:0는 30도 이하의 조건에서는 감소하는 경향을 보였다. 이는 Anteiso/Iso의 비율을 토대로 온도가 낮아지는 cold stress에 지표로 확인할 수 있었다.

그리고 미생물을 배양 시 영양분이 풍부한 TSB배지와 비교적 결핍된 조건인 minimal media(glucose 첨가)의 조건에서 PLFA를 분석하였다. 영양분이 부족한 조건에서는 iso-15:0, anteiso-15:0 의 지방산이 감소하는 반면, 16:1, 16:0 의 지방산은 증가하는 경향을 보여 이들을 양분 스트레스에 관한 지표로 확인할 수 있었다.



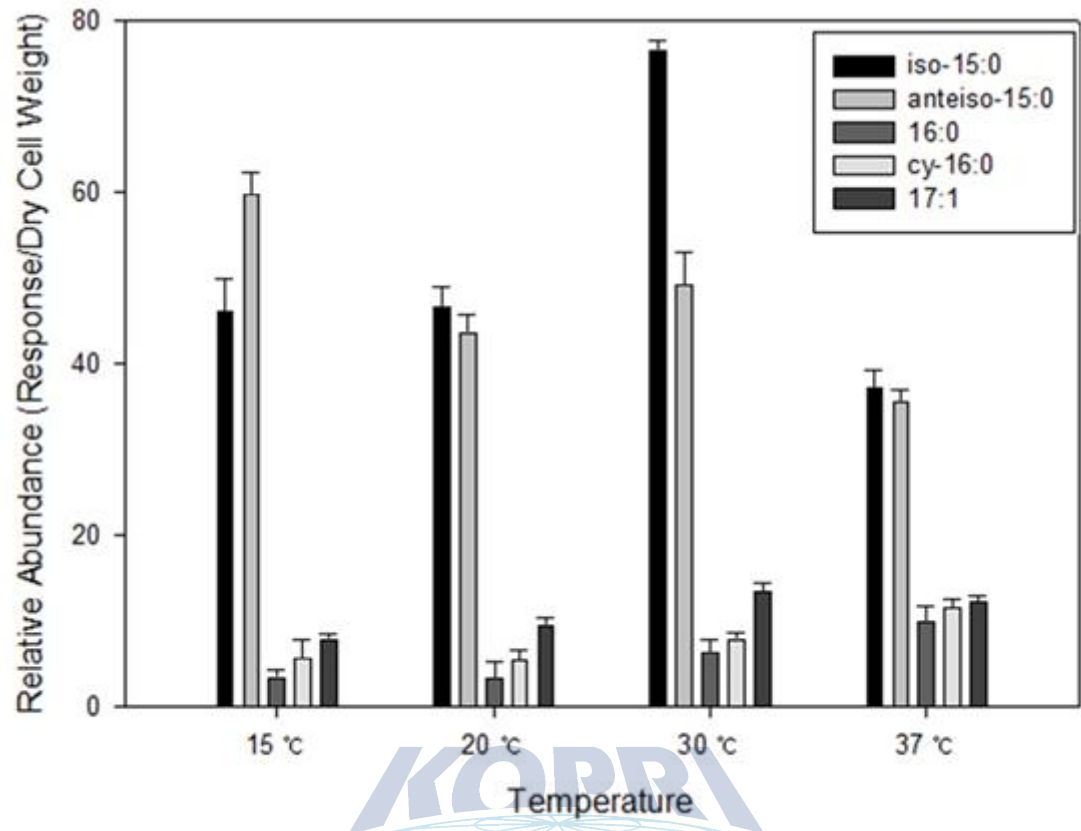


그림 53. *Bacillus pumilus* PAMC 23174 의 배양 온도에 따른 지방산의 profiling

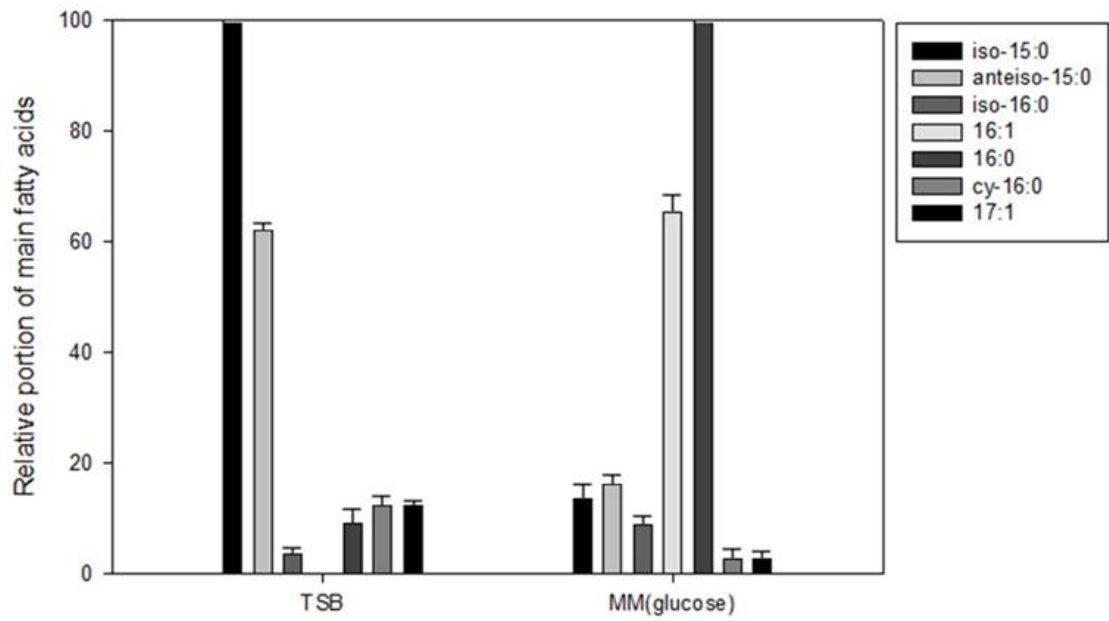


그림 54. *Bacillus pumilus* PAMC 23174의 배양 성분의 제한에 따른 지방산의 변화 분석



표 12. 각각 다른 조건의 배양액에 따른 *Bacillus pumilus* PAMC 23174의 anteiso-와 iso- 형태의 지방산의 비율

Table 2 The ratio of anteiso- and iso- form fatty acids produced by *Bacillus pumilus* PAMC 23174 in each medium

Media	Growth temperature (°C)	Percentage of total fatty acid (%)					Anteiso/Iso ratio
		Iso-15:0	Anteiso-15:0	C16:0	Cy-C16:0	C17:1	
TSB (Leu)	30	51.0 ± 1.23	43.7 ± 2.04	0.4 ± 0.02	2.8 ± 0.11	2.1 ± 0.03	0.86
TSB (Ile)	30	36.3 ± 1.10	55.3 ± 1.95	0.2 ± 0.01	5.2 ± 0.21	3.1 ± 0.07	1.53
TSB (Val)	30	42.5 ± 1.41	54.4 ± 2.69	-	3.1 ± 0.16	-	1.28
TSB (Leu, Ile, Val)	30	47.9 ± 2.03	46.1 ± 1.51	0.8 ± 0.10	5.2 ± 0.09	-	0.96
TSB (Leu), cold shock	30	53.4 ± 2.11	46.1 ± 1.90	0.4 ± 0.05	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.86
TSB (Ile), cold shock	30	31.7 ± 1.45	67.6 ± 3.56	0.5 ± 0.04	0.2 ± 0.01	-	2.13
TSB (Val), cold shock	30	38.3 ± 0.77	61.2 ± 1.57	0.3 ± 0.05	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.01	1.60
TSB (Leu, Ile, Val), cold shock	30	36.6 ± 0.98	61.9 ± 2.32	0.6 ± 0.03	0.7 ± 0.02	0.2 ± 0.01	1.69



제 4 장 연구 개발 목표 달성도 및 대외기여도

제 1 절 연도별 연구목표

성과목표	세부목표		달성 주요내용	달성도(%)
다산과학기 지 주변 지방산 분석을 위한 토양 내 지방산 회수기술 개발	1-1	효율적 지방회수 방법 setup	토양에는 미생물의 활동이 다른 환경에 비하여 매우 미미하여 토양 속 지방산을 분석하기 위해서는 효과적인 추출법이 요구됨. 지질 추출에 사용되는 Bligh&dye법을 활용하여 수율이 높은 추출 조건을 확립하고, 다양한 유도체법을 비교하였으며, 최종적으로 토양으로부터 지질을 추출하여 이를 컬럼 크로마토그래피를 이용해 각각의 지질 종류별로 분석이 가능하게 하였음.	100%
	1-2	Lipid 생산 조건 최적화	모델 study로 극지 유래 미생물 <i>Bacillus pumilus</i> 균주의 다른 종류의 탄소원과 농도에 따른 지방산 생산량의 변화를 연구하여, 미생물 단위에서의 지방산 생산 관측 및 지방산 프로파일링이 가능함을 확인하였으며, 차년도의 극지 미생물의 지방산 측정을 가능하게 하는 생산 조건을 찾을 수 있었음.	100%

다산과학기지 주변 지방산 분석을 위한 토양 내 지방산 분석기술 개발	2-1	북극 토양 유래의 lipid marker 분석	북극 다산과학기지 주변의 Ny-Ålesund 의 Midtre Lovénbreen 로부터 얻은 토양 샘플을 활용하여 토양 샘플의 지질 추출 및 인지질 지방산 (PLFA) 분석을 수행하여 PLFA 마커를 획득하여 이로부터 미생물 군집별 PLFA 농도와 스트레스 지수를 얻었음. 이를 통하여 빙하의 영향을 다양한 측면에서 관찰할 수 있었음.	100%
	2-2	북극 토양 미생물의 순수 분리 및 지질대사체 분석	북극 다산과학기지 주변의 Ny-Ålesund 의 Midtre Lovénbreen 로부터 얻은 토양으로부터 10여종 이상의 미생물 샘플을 얻었으며 5종 이상 미생물에 대한 성장 조건 및 지질 대사체에 관한 분석을 통한 균주간의 차이를 볼 수 있었음	100%
다산과학기지 주변 토양 내 환경 간/지역 간 지방산 변화 비교	3-1	북극 빙하 후퇴 시기 별 대표 지역 간 미생물 균종 비교	북극 다산과학기지 주변의 Ny-Ålesund 의 Midtre Lovénbreen 로부터 얻은 토양 샘플을 활용하여 토양 샘플의 지질 추출 및 인지질 지방산 (PLFA) 분석을 수행하여 기질농도, 저온 스트레스 등의 경향성을 확인함. 이를 통하여 빙하의 영향을 다양한 측면에서 관찰할 수 있었음.	100%

<p>다산과학기 지 주변 토양 내 환경 간/지역 간 지방산 변화 비교</p>	<p>3-2</p>	<p>극지 유래미생 물 lipid marker 비교 연구</p>	<p>북극 극지 토양으로부터 유래 된 다 양한미생물 샘플을 통해 이들 간의 지질 대사체 비교에 관한 분석을 통 한 균주간의 차이를 볼 수 있었음</p>	<p>100%</p>
--	------------	---	--	-------------



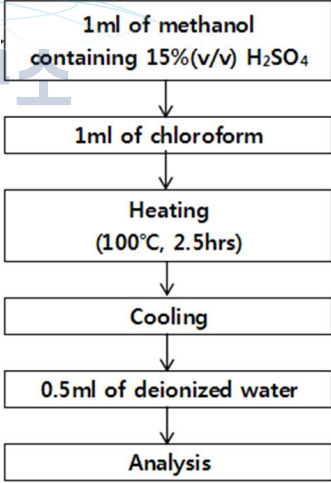
제 2 절 평가의 착안점

연도	성과목표	세부목표	가중치	평가의 착안점 및 척도
1차년도 (2014)	다산과학기지 주변 지방산 분석을 위한 토양 내 지방산 회수기술 개발	○ 효율적 지방회수방법 setup	80	1. 토양 유래 PLFA 추출 가능 여부, 분획 가능여부, 분석 가 능 여부 2. 미생물 유래 지방산 생산 및 분석 가능 여부 3. 이를 활용한 극지 공동 연 구 수행 가능 여부
		○ Lipid 생산 조건 최적화	20	
2차년도 (2015)	다산과학기지 주변 지방산 분석을 위한 토양 내 지방산 회수기술 개발	○ 북극 토양 유래의 lipid marker 분석	80	1. 북극 토양으로부터 lipid 추 출 여부 2. 북극 토양으로부터 PLFA 분석 후 미생물 군집 분석 여 부 3. 북극 토양 미생물의 순수 분리 여부 4. 지질 대사체 분석 여부
		○ 북극 토양 미생물의 순수 분리 및 지질 대사체 분석	20	
3차 연도 (2016)	다산과학기지 주변 토양 내 환경 간/지역 간 지방산 변화 비교	○ 북극 빙하 후퇴 시기 별 대표 지역 간 미생물 균종 비교	80	1. 북극 빙하 후퇴 시기 별 PLFA, 기질농도, 스트레스 측 정 및 분석 여부 2. 북극 토양으로부터 PLFA 분석 및 미생물 군집 분석 여 부 3. 북극 극지 유래 토양 미생 물의 분석 여부 4. 지질 대사체 분석 여부
		○ 극지 유래 미생물 lipid marker 비교 연구	20	

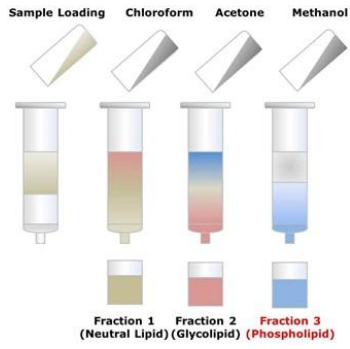
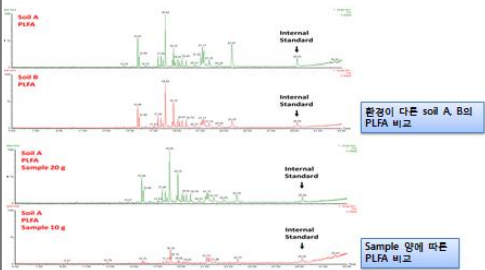
제 3 절 연구수행 세부 내용 및 결과(우수성)

□ 성과목표 1: 효율적 지방회수 방법의 확립

○ 세부목표 1-1: 지질 회수 및 유도체화법 확립

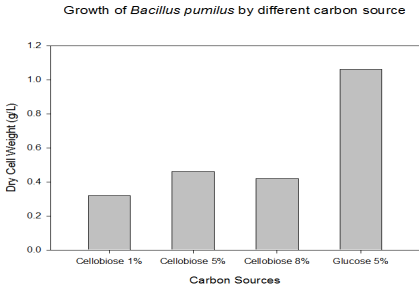
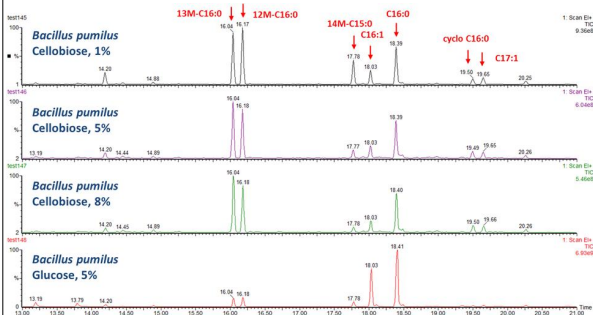
연구 내용	연구 결과(우수성)
지방 추출 공정 확립	- 지방 추출 공정 연구를 통한 분석 flow 확립 - 지방산 측정이 가능한 적정 sample량 및 추출 조건 확립 ⇒ 토양으로부터 지방 추출 공정 확립 및 최적화하여 극지 토양으로부터 지방 추출 준비 완료
유도체화법 확립	- 지질 분석을 위한 GC-FID, GC-MS 분석 조건 확립 - GC 분석에 필수적인 유도체화 방법 확립 <div style="text-align: center;">  <pre> graph TD A[1ml of methanol containing 15%(v/v) H2SO4] --> B[1ml of chloroform] B --> C[Heating (100°C, 2.5hrs)] C --> D[Cooling] D --> E[0.5ml of deionized water] E --> F[Analysis] </pre> </div> 그림 55. FAME (fatty acid methyl esters) 제조를 위한 모식도. ⇒ 토양으로부터 2가지의 선택적 유도체화 방법을 통한 분석법을 확립하여 극지토양을 추출서부터 지방산 분석이 가능하게 하였음.

○ 세부목표 1-2: 지질 종류별 분획법 확립

연구 내용	연구 결과(우수성)
<p>Column 크로마토그래피를 이용한 지질 종류별 분획 확립</p>	<p>- PLFA를 선택적으로 분리하기 위한 컬럼 크로마토그래피 방법 확립</p> <p>- GC-FID를 통한 분획된 sample별 lipid 검출 여부 확인</p>  <p>그림 56. 컬럼 크로마토그래피를 활용한 지질의 분리 모식도</p> <p>⇒ <u>Column 크로마토그래피를 활용하여 효과적으로 PLFA를 분획한 후 GC-FID 분석 완료</u></p>
<p>토양 유래 지질 분석</p>	<p>- 주변 토양 시료를 통하여 진술한 방법들 (추출, 분획, 유도체화, GC 분석)을 통하여 PLFA 분석</p>  <p>그림 57. 확립된 PLFA법을 이용한 토양시료 분석 결과.</p> <p>⇒ <u>전체 지질 분석 뿐만 아니라 PLFA 분획 완료 후 GC-MS 분석 완료 및 peak 검출 가능하게 함. 아울러 북극 시료 2개에 현재 적용하여 지방산 추출에 성공함.</u></p>

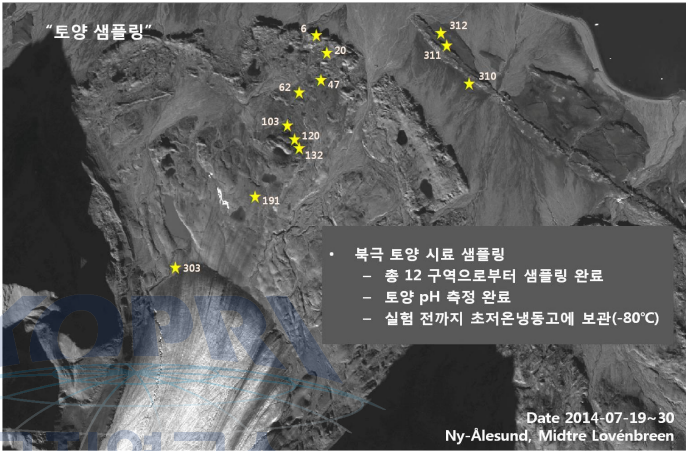
□ 성과목표 : 극지 균주의 lipid 생산 조건 최적화

○ 세부목표 2-1: 극지 균주에서의 지방산 생산 검출

연구 내용	연구 결과 (우수성)
<p>균주 특성 확인</p>	<p>- API kit등을 활용한 극지 미생물의 신규 탄소원 검색 (탄소원으로 cellobiose를 이용하는 균주의 검출)</p>  <p>그림 58. 탄소원 종류 및 농도에 따른 PAMC 23172 <i>Bacillus pumilus</i>의 성장의 차이 ⇒ API 50CH kit로 <i>Bacillus pumilus</i>의 활용가 능한 탄소원 확인 (Glucose, cellobiose 등)</p>
<p>탄소원 종류 및 농도에 따른 지방산 생산량의 변화를 연구</p>	<p>- 탄소원 종류 및 농도에 따른 <i>Bacillus pumilus</i>의 성장 확인</p> <p>- GC-MS를 통한 <i>Bacillus pumilus</i>의 지방산 생산 확인</p>  <p>그림 59. 탄소원 종류 및 농도에 따른 PAMC 23172 <i>Bacillus pumilus</i>의 지방산 생산량의 차이를 GC-MS로 분석한 크로마토그램 ⇒ 여러 탄소원을 활용한 극지 미생물 유래 지방산 생산 및 지방산 측정법 확립하여 이를 통한 2차년도의 극지 미생물 지방산 분석이 가능하게 됨.</p>

□ 성과목표 : 북극 토양 유래의 lipid marker 분석

○ 세부목표 1: Lipid marker의 분석 및 미생물 군집 분석

연구 내용	연구 결과(우수성)
<p>샘플링이 완료된 토양 시료의 lipid marker의 추출 및 분석</p>	<p>- 샘플링이 완료된 북극 토양 시료로부터 지질을 추출하여 Silicic acid 컬럼 크로마토그래피법으로 인지질 지방산(PLFA)을 분석</p>  <p>그림 60. 지역의 북극 토양 샘플 채취 지역</p> <p>- Alkaline mild methanolysis 방법으로 인지질 지방산(PLFA)를 메틸에스테르화 시킨 후 질량분석기(GC-MS)를 이용하여 지방산을 측정</p> <p>- 내부표준물질로 Heneicosanoic acid(21:0)를 이용하여 지방산 프로파일링을 정성 및 정량 분석</p>

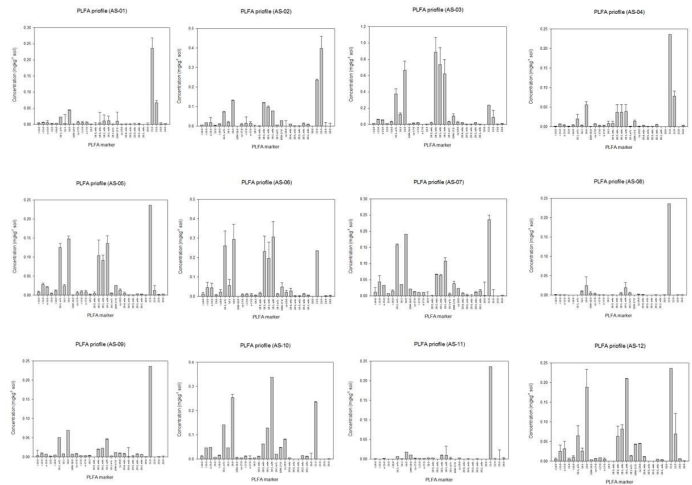


그림 61. 지역 북극 토양 샘플의 PLFA data

⇒ 북극 토양으로 부터 효과적인 PLFA 분석 완료 및 GC 분석 완료

Lipid marker를 이용한 미생물 군집 유추

- 기존 문헌 및 GC-MS 운용상에 분석 가능한 PLFA를 적용하여 PLFA-미생물 간의 상호 관계를 적용하였음.

Microbial group	Specific PLFA markers	PLFA group
Other Bacteria	14:0, 15:0, 17:0	Multiple groups
Gram(+)	i14:0, i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0, i18:0	Branched
Gram(-)	cy17:0, cy19:0, 16:1w7, 17:1w9, 18:1w7, 18:1w5	Cyclopropyl, mono
Fungi	18:2w6, 9c, 18:3w6, 18:3w3	Polyunsaturated
Actinomycetes	10Me16:0, 10Me17:0, 10Me18:0, i17:1w7c	10-Methyl branched
Eukaryote	16:0, 16:1w9c, 16:1w5c, 18:1w9c, 18:1w7c, 18:1w7t, 20:1, 21:0	
Methanobacter	16:1w8c, 18:1w8	
Anaerobe	14:1w7cDMA, i15:0DMA, 16:1w7cDMA, 18:0DMA, 18:2DMA, 19:0cy9, 10DMA	
Protozoa	20:2w6, 20:3w6, 20:4w6	Polyunsaturated
Plants	18:1w9c, 18:1w11c, 18:3w3, 20:5w3, 20:0, 21:0, 22:0, 23:0, 24:0, 25:0, 26:0	Long saturated

그림 62. 미생물 군집별 PLFA marker

- 이러한 PLFA분석 방법을 적용하여 8개 site에 대한 미생물 군집 분석을 실시하였음.
 - 이를 통하여 Bacteria, Fungi, Eukaryote, Actinomycete 등에 대한 분포 정보를 얻을 수 있었으며, 환경적 요인 지수들인 Fungi/Bacteria, Sat/Monosaturate, Iso/Anteiso 등의 정보들로 토양의 환경적 요인들을 유추 할 수 있음.

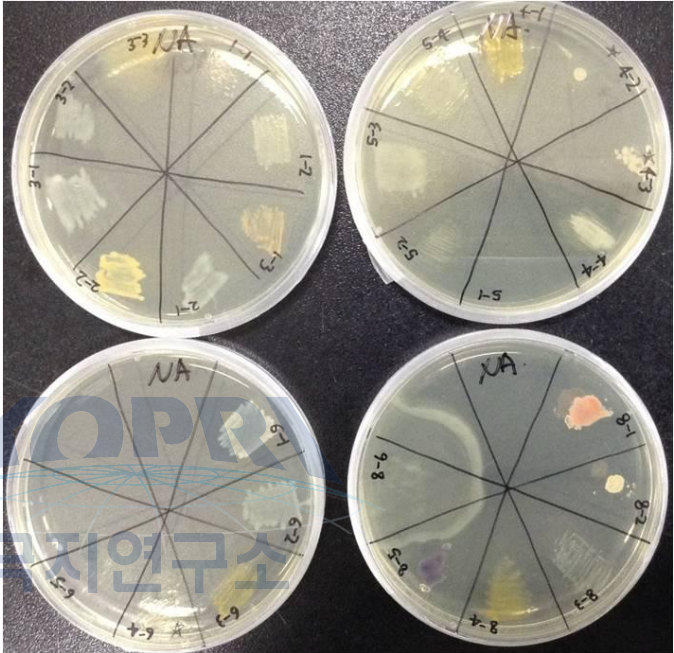
Group	Concentration (mg/kg soil)							
	20	47	62	103	120	132	191	303
Microbial PLFA components								
Total (mg/kg soil)	0.9171	4.0765	0.4950	1.0280	1.8901	1.1253	0.5573	0.3155
Bacteria	0.2476	1.2289	0.0865	0.3740	0.7480	0.4340	0.1517	0.0274
G(+)	0.0845	0.1797	0.0185	0.0872	0.1435	0.1248	0.0334	0.0033
G(-)	0.0816	0.4176	0.0277	0.1455	0.2907	0.1935	0.0697	0.0049
Fungi	0.1200	0.9105	0.0540	0.1101	0.2525	0.0666	0.0243	0.0008
Eukaryote	0.4988	1.7927	0.3331	0.5073	0.7986	0.5470	0.3459	0.2794
Protozoa	0.0231	0.0362	0.0069	0.0099	0.0421	0.0190	0.0160	0.0020
Actinomycete	0.0276	0.1083	0.0144	0.0266	0.0489	0.0587	0.0195	0.0057
Microbial stress indicator								
Fungi/Bacteria	0.4849	0.7409	0.6238	0.2944	0.3375	0.1535	0.1599	0.0302
Sat/Monosat	2.0987	0.4724	2.5587	1.0658	0.6759	1.3821	2.1136	6.6369
Iso/Anteiso	2.9126	2.3840	3.7781	2.6587	2.0823	2.5056	2.9949	3.1538

그림 63. 선정된 8개 북극 토양 샘플의 PLFA 분석을 통한 미생물 총량 및 스트레스 지수 분석

⇒ 북극 토양 8개 site의 PLFA 분석을 통한 미생물 총량 및 분포 확인



○ 세부목표 2: 북극 토양 미생물의 순수분리 및 지질대사체 분석

연구 내용	연구 결과(우수성)
<p>북극의 토양 샘플로부터 미생물을 순수분리</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 북극 다산과학기지 주변의 Ny-Ålesund 의 Midtre Lovénbreen 로부터 얻은 토양으로부터 10 여종 이상의 미생물 샘플을 획득 - 특이적인 효소나 성장 조건, pigment 등에 대한 기초적인 실험을 수행  <p>그림 64. 북극 토양 샘플로부터 분리한 미생물</p> <p>⇒ 극지 유래 미생물 순수 분리 및 기초 활성 테스트를 통한 극지 미생물의 성장 패턴 및 관련 효소 관측</p>
<p>균주의 생화학 실험 및 지질 대사체 분석 및 비교</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 극지 유래 <i>Pseudomonas</i> sp. 에 대한 온도, pH, NaCl 농도에 따른 성장 여부 등의 생화학 실험 수행

Condition	8-6	6-4	psy1	psy2	Psy3
4 °C	+++	+	+++	+++	+++
20 °C	+	+++	+++	+++	+++
30 °C	+	-	+++	++	++
37 °C	-	-	-	-	-
pH3	-	-	-	-	-
pH 5	+	+	+++	+++	+++
pH 7	+++	+	++	++	++
pH 9	+++	+	+++	++	++
pH 11	+++	-	+++	++	++
pH 13	-	-	-	-	-
NaCl 0.1 M	+++	+	+++	+++	+++
NaCl 0.25 M	+++	+++	+++	++	++
NaCl 0.5 M	++	++	-	-	+
NaCl 1.0 M	+	+	+	+	+

그림 65. 선정된 균주의 성장 조건 비교

- 극지 유래 *Pseudomonas* sp. 에 지방산 패턴과 각각의 구성 비율을 측정

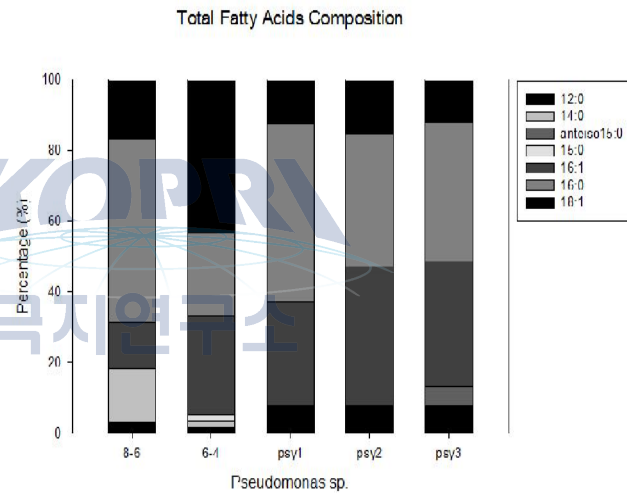


그림 66. 선정된 균주의 지질 대사체 분석

⇒ 분리된 극지 *Pseudomonas*에 대한 지질 대사체 분석 수행

□ 성과목표 : 북극 빙하 후퇴 시기 별 대표 지역 간 균종 비교

○ 세부목표 1 : 후퇴하는 빙하에 따른 각 sampling site 별 토양 시료 sample 의 PLFA 추출 및 분석

연구 내용	연구 결과(우수성)
<p>해빙 시간에 따른 PLFA 분석을 통한 경향성 확인.</p>	<p>- 샘플 분석을 통해 얻은 지방산 분포를 이용해 PCA (주성분 분석) 실시 후 유사성이 큰 세 지역의 sample group화</p>  <p>Date 2014-07-19~30 Ny-Ålesund, Midtre Lovénbreen</p> <p>그림 67. 선정된 대표 샘플의 지도상 위치 (빙하가 녹은 후 흐른 시간에 따라, 300번: 4년, 120번: 55년, 47번: 71년)</p> <p>- 선정된 3 가지 sample로 빙하가 녹은 후 흐른 시간에 따라 total PLFA와 기질농도, 저온 스트레스에 관한 경향성 확인</p> <p>⇒ 유사한 빙하 후퇴 시기를 가진 지역들을 모아 평균적인 특성 분석 실시</p>

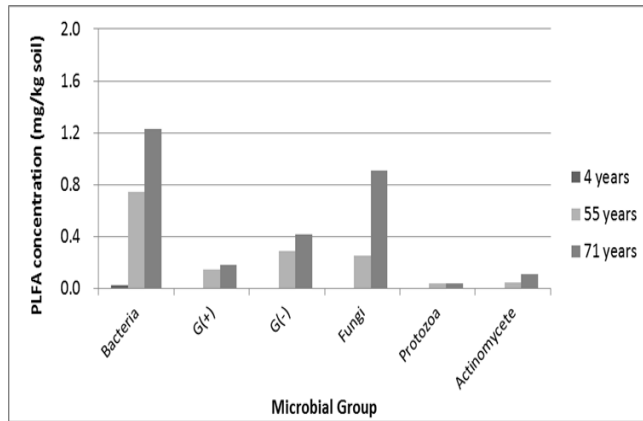


그림 68. 해빙 후 시간이 지남에 따라 미생물 군집별 PLFA 농도 변화

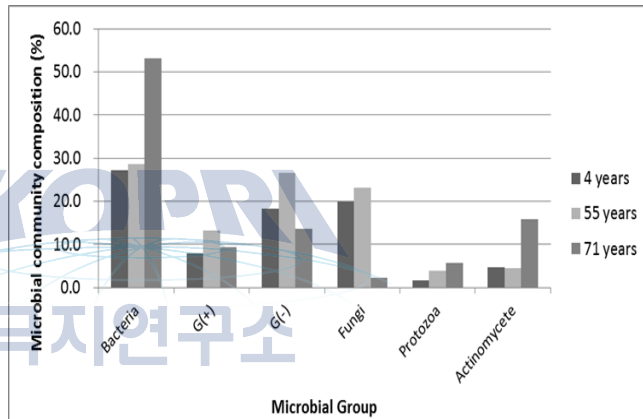


그림 69. 해빙 후 시간이 지남에 따라 미생물 군집의 분포 비율 변화

⇒ 빙하 후퇴 시기에 따른 미생물 특성 분석 완료

NGS와 PLFA 분석을 통한 미생물 군집 별 분류 및 연구

- NGS 분석을 통해 DNA 양을 측정하고 미생물의 군집 비율 및 분포를 분석

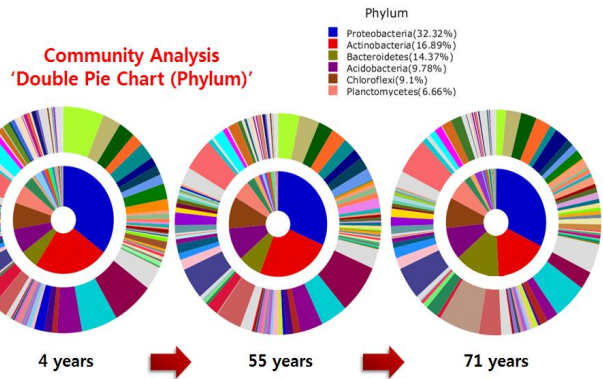


그림 70. 3개 대표 샘플의 NGS 분석결과를 토대로 군집별로 분류한 그래프



	Sample Name	Conc. (Nanodrop (ng/ul)	260/280	Volume (ul)	Total amount (ng)
1	71 years	38.366	1.938	30	1150.98
2	55 years	28.704	2.084	30	861.12
3	4 years	18.619	2.328	34	633.046

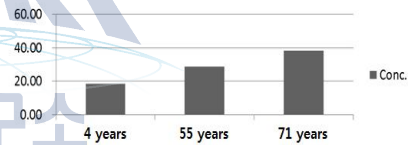


그림 71. 3개 대표 샘플을 Kit를 이용해 DNA 추출 후 quality와 quantity 확인 결과

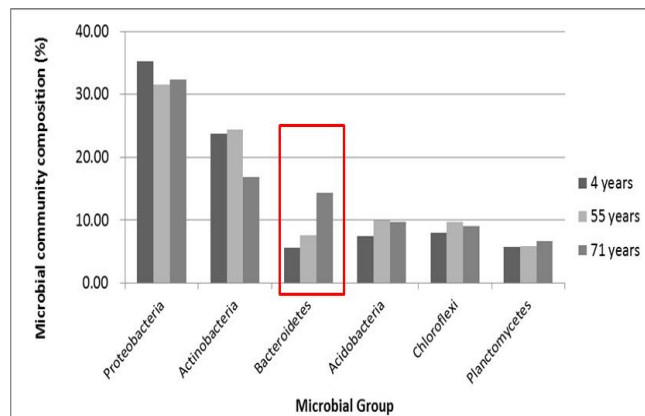


그림 72. NGS 분석 결과에 의한 미생물 군집 분포

	4 years		55 years		71 years		
	Number	%	Number	%	Number	%	
NGS data	Total	5036	100	5095	100	2658	100
	Bacteria	4915	97.6	5036	98.8	2648	99.6
	Proteobacteria	1778	35.3	1608	31.6	859	32.3
	Actinobacteria	375	23.8	1244	24.4	449	16.9
	Bacteroidetes	283	5.6	391	7.7	382	14.4
	Acidobacteria	375	7.5	511	10.0	260	9.8
	Chloroflexi	402	8.0	498	9.8	242	9.1
	Planctomycetes	293	5.8	299	5.9	177	6.7
Eukarya	121	2.4	59	1.2	10	0.4	
PLFA data	Conc. (mg/kg)	0.3155	100	1.8901	100	4.0765	100
	Bacteria	0.0274	27.2	0.748	28.7	1.2289	53.1
	G(+)	0.0033	7.9	0.1435	13.2	0.1797	9.3
	G(-)	0.0049	18.3	0.2907	26.6	0.4176	13.7
	Actinomycetes	0.0057	4.7	0.0489	4.5	0.1083	15.9
	Fungi	0.0008	19.9	0.2525	23.1	0.9105	2.3

그림 73. PLFA 법과 NGS 방법에 의한 미생물 군집 비교

⇒ PLFA와 NGS를 활용한 복극 토양의 다중적 군집 분석 완료



○ 세부목표 2 : 극지 유래 미생물 lipid marker 비교 연구

연구 내용	연구 결과(우수성)
<p>극지 유래 <i>Bacillus sp.</i> 에 대해 온도에 따른 total fatty acid 변화 경향성 분석 및 확인</p>	<p>- 북극 극지 유래의 미생물인 <i>Bacillus sp.</i> 에 대한 온도 조건에 따른 총 지방산의 변화 양상을 분석</p> <div style="text-align: center;"> </div> <p>그림 74. 극지유래의 <i>Bacillus sp.</i> 및 일반 <i>Bacillus sp.</i> 들의 total fatty acid 분석 결과 (A. <i>Bacillus thuringiensis</i> (KCTC 3452), B. <i>Bacillus cereus</i> (KCTC 3624), C <i>Bacillus thuringiensis</i> (PAMC 23133), D. <i>Bacillus pumilus</i> (PAMC 23174))</p> <p>⇒ <u>환경에 따른 미생물의 lipid 변화 관측</u></p>
<p><i>Bacillus pumilus</i> PAMC 23174 균주의 배양 조건에 따른 PLFA 분석 및 경향성 연구</p>	<p>- 극지 유래 <i>Bacillus pumilus</i> PAMC 23174 에 대한 다양한 배양 조건 및 환경에 따른 지방산 변화 및 지표 도출</p> <p>⇒ <u>유의미한 지방산 분석 실시 및 이를 통한 온도와 관련한 인자 발굴</u></p>

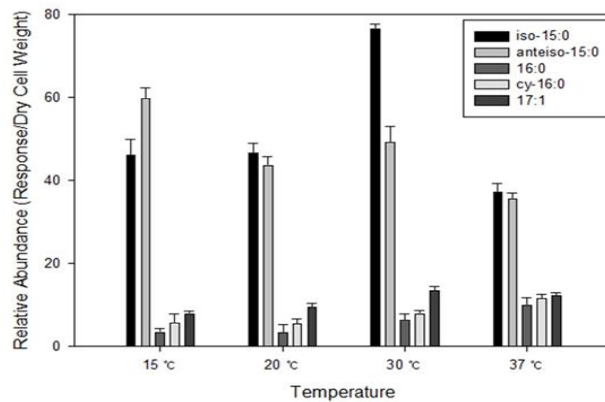


그림 75. *Bacillus pumilus* PAMC 23174 의 배양 온도에 따른 지방산의 profiling

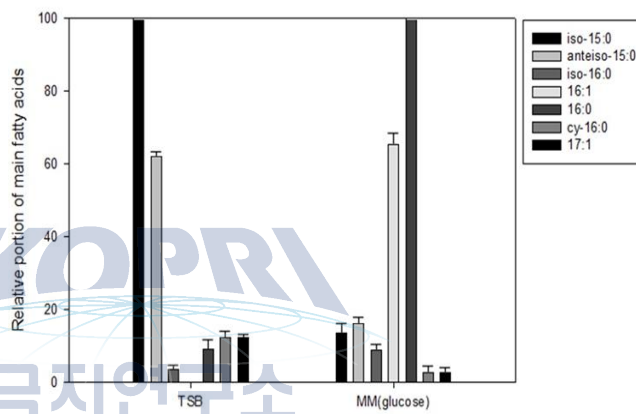


그림 76. *Bacillus pumilus* PAMC 23174의 배양 성분의 제한에 따른 지방산의 변화 분석

Table 2 The ratio of anteiso- and iso- form fatty acids produced by *Bacillus pumilus* PAMC 23174 in each medium

Media	Growth temperature (°C)	Percentage of total fatty acid (%)					Anteiso/Iso ratio
		Iso-15:0	Anteiso-15:0	C16:0	Cy-C16:0	C17:1	
TSB (Leu)	30	51.0 ± 1.23	43.7 ± 2.04	0.4 ± 0.02	2.8 ± 0.11	2.1 ± 0.03	0.86
TSB (Ile)	30	36.3 ± 1.10	55.3 ± 1.95	0.2 ± 0.01	5.2 ± 0.21	3.1 ± 0.07	1.53
TSB (Val)	30	42.5 ± 1.41	54.4 ± 2.69	-	3.1 ± 0.16	-	1.28
TSB (Leu, Ile, Val)	30	47.9 ± 2.03	46.1 ± 1.51	0.8 ± 0.10	5.2 ± 0.09	-	0.96
TSB (Leu), cold shock	30	53.4 ± 2.11	46.1 ± 1.90	0.4 ± 0.05	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.86
TSB (Ile), cold shock	30	31.7 ± 1.45	67.6 ± 3.56	0.5 ± 0.04	0.2 ± 0.01	-	2.13
TSB (Val), cold shock	30	38.3 ± 0.77	61.2 ± 1.57	0.3 ± 0.05	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.01	1.60
TSB (Leu, Ile, Val), cold shock	30	36.6 ± 0.98	61.9 ± 2.32	0.6 ± 0.03	0.7 ± 0.02	0.2 ± 0.01	1.69

표 13. 각각 다른 조건의 배양액에 따른 *Bacillus pumilus* PAMC 23174의 anteiso- 와 iso- 형태의 지방산의 비율

제 4 절 관련분야 기여도

○ 학술회의 발표

-춘계 공업화학회

Biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from butyrate using engineered *Ralstonia eutropha* 양영현† ·전종민·김현중·김용현·이다혜·이주희·Brigham CJ*

-춘계 화학공학회

Enzymatic synthesis of diamine compounds, 양영현† ·김현중·김용현·신지혜 박경문

-대사체학회

Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) containing a predominant amount of 3-hydroxyvalerate by CoA-engineering 양영현, 전종민, Shashi Kant Bhatia, 이주희, 김현중, 서형민, 김용현, 이다혜, Brigham CJ, 송은정

-미생물 생명공학회

Production of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate)(P(HB-co-HV) containing predominant amount of 3-hydroxyvalerate in *Escherichia coli*

-Japan-Korea Biomass Symposium

Production of bioplastics from volatile fatty acids

-추계 생물 공학회

Enzymatic synthesis of bio-based diamine compounds

3개년 결과 (주저자: 8편, 공저자: 1편, 특허 1편)

1. Starch based polyhydroxybutyrate production in engineered *Escherichia coli*. Bhatia SK, Shim YH, Jeon JM, Brigham CJ, Kim YH, Kim HJ, Seo HM, Lee JH, Kim JH, Yi DH, Lee YK, Yang YH. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2015, 38: 1479-1484. (IF: 1.8)

2. Lipase-Catalyzed Production of 6-O-cinnamoyl-sorbitol from D-sorbitol and Cinnamic Acid Esters. Kim JH, Bhatia SK, Yoo D, Seo HM, Yi DH, Kim HJ, Lee JH, Choi KY, Kim KJ, Lee YK, Yang YH. *Appl Biochem Biotechnol.* 2015, 76:244-52. (IF: 1.7)

3. Increased vulnerability to physical stress by inactivation of NdgR in *Streptomyces coelicolor*. Lee BR, Yi DH, Song E, Bhatia SK, Lee JH, Kim YG, Park SH, Lee YK, Kim BG, Yang YH. *Appl Biochem Biotechnol*. 2015 175:3673-82 (IF: 1.7)
 4. Application of diethyl ethoxymethylenemalonate (DEEMM) derivatization for monitoring of lysine decarboxylase activity, Kim YH, Kim HJ, Shin JH, Bhatia SK, Seo HM, Kim YG, Lee YK, Yang YH, Park K, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2015, 115: 151 - 154 (IF: 2.7)
 5. A MALDI-MS-based quantitative targeted glycomics (MALDI-QTaG) for total N-glycan analysis, Kim KG, Kim YW, Hwang CH, Park HG, Jeong JH, Choi KY, Yang YH, Koo M, Kim YG, *Biotechnology letters* 2015, 159,189-196 (IF: 1.7)
 6. Application of a Non-halogenated Solvent, Methyl Ethyl Ketone (MEK) for Recovery of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(HB- co-HV)] from Bacterial Cells. Yang YH, Jeon JM, Yi DH, Kim JH, Seo HM, Rha C, Sinskey AJ, Brigham CJ. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2015, 20: 291-297 (IF: 1.2)
 7. Production and structural characterization of a novel exopolysaccharide from psychrotrophic arctic glacier soil bacterium *Flavobacterium* sp. ASB 3-3. Sathiyannarayanan G, Yi DH, Bhatia SK, Kim JH, Seo HM, Kim YG, Park SH, Jeong D, Jung S, Jung JY, Lee YK, Yang YH, *RSC advances* 2015, 5, 84492-84502 (IF: 3.84)
 8. Sensitive change of iso-branched fatty acid (iso-15:0) in *Bacillus pumilus* PAMC 23174 in response to environmental changes. Yi DH, Sathiyannarayanan G, Seo HM, Kim JH, Bhatia SK, Kim YG, Park SH, Jung JY, Lee YK, Yang YH. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2015 Nov 13
 9. Metal removal and reduction potential of an exopolysaccharide produced by Arctic psychrotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. PAMC 28620, Sathiyannarayanan G, Bhatia SK, Kim HJ, Kim JH, Jeon JM, Kim YG, Park SH, Lee SH, Lee YK, Yang YH *RSC advances* 2016, 6, 96870-96881 (IF: 3.84)
- 특허” 결빙 예방 활성을 가진 극지 유래 엑소폴리사카라이드 생산 균주 (10-2016-0115889)

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

가. 추가 연구의 필요성 및 타연구와의 응용

- 본 연구개발 결과는 연구기간 3년의 과제 중 1년차 결과로 전체 목표인 다산 과학기지 주변 빙하 후퇴 지역에서 지형에 따른 토양 내 유기물 변화를 모니터링 할 수 있는 지방산 표지 인자 분석 기술 수립의 목적 중 1차 연도에는 극지 토양내 지방산 회수 및 분획 분석 기술의 확립을 목적으로 수행되었음. 이에 추가 연구 내용으로 다산과학기지 주변에서 수집된 토양에 대한 분석을 수행하여 미생물의 군집을 분석하고 이를 토양,환경 요인들과 함께 상호작용을 연구하고자 함.
- 본 연구에서 수행된 지방산 분석법은 국내 일반토양에도 언제든지 적용할 수 있는 바 친환경 제제나 오염원들에 의한 토양 미생물 군집 변화 연구 등에도 충분히 이용될 수 있음

나. 학술적 파급효과

- 본 연구의 연구결과는 극지 미생물 연구에서 동토층과 극지 미생물 군주들에 대한 체계적인 연구로 토양의 유기물 변화를 모니터링하며, 극지 미생물을 통한 저온 미생물의 기능 및 대사체 분석에 활용될 수 있음.
- 본 연구에서 발견된 지방 표지 인자나 특정 군주의 지방 표지 인자 정보는 이후 기후 온난화 정보 시에 유용한 표지 인자로 활용될 수 있으며, 이를 통한 지구 온난화로 인한 미래 생태계 변화의 예측 등에 활용될 수 있음.
- 지방 대사체 프로파일링 기술을 이용한 신규 극지 미생물의 대사산물 규명을 통해 뛰어난 생리활성을 가진 유용 생물 소재 확보에 적극 활용될 수 있음.
- 본 연구를 통하여 주로 유전체 사업에 초점을 맞춘 국내 극지연구의 다각화에 기여할 수 있으며 산업적으로 중요한 군주 및 단백질의 원천으로써의 극지 연구소의 위상도 올라갈 것으로 보임.

다. 경제적 파급효과

- 전문한 바와 같이 극지 미생물 연구 플랫폼의 구축은 다양한 극지 미생물 연구에 활용되어 극지 미생물 연구의 저변 확대 및 산업적 영향력을 극대화 할 것임. 그 결과로 풍부한 자원의 보고이지만 접근이 쉽지 않고 어렵게 느껴졌던 극지 연구에 대한 인식 전환과 유전체 기반의 극지 연구를 대사체/단백질 기반의 연구들로 다각화 할 수 있는 계기가 될 수 있을 것으로 기대함.

- 동토층의 유기물 변화의 관측은 극지 미생물 및 극지 식물의 성장에 영향을 미치는 인자를 파악할 수 있는 좋은 자료가 됨으로 향후 기후 변화에 따른 영향을 예측할 수 있는 근거가 되어 식량자원이나 관광자원 관련 산업에 큰 영향을 미칠 것으로 사료됨.



제 6 장 참고문헌

Bardgett RD, Hobbs PJ, Frostegard A..1996. Changes in soil fungal: bacterial biomass ratios following reductions in the intensity of management of an upland grassland. *Biol Fertil Soils* 22:261-264.

Borga P, Nilsson M, Tunlid A. 1994. Bacterial communities in peat in relation to botanical composition as revealed by phospholipid fatty-acid analysis. *Soil Biol. Biochem* 26:841-848.

Bossio DA, Scow KM. 1998. Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns. *Microbiol Ecol* 35:265-278.

Bossio DA, Scow KM, Gunapala N, Graham KJ. 1998. Determinants of soil microbial communities: Effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microbial Ecology* 36:1-12.

Frostegard A, Baath E. 1996. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biol. Fertil. Soils* 22:59-65.

Frostegård A, Tunlid A. Bååth E. 2011. Use and misuse of PLFA measurements in soils, *Soil Biology & Biochemistry* 43:1621-1625

Garland, JL. 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* 24:289-300.

Gomez E, Ferreras L, Toresani S. 2006. Soil bacterial functional diversity as influenced by organic amendment application. *Bioresource Technology* 97 : 1484-1489.

Green CT, Scow KM. 2008. Analysis of phospholipid fatty acids(PLFA) to characterize microbial communities in aquifers. *Hydrogeo. J* 8:126-141.

Hawksworth DL. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res* 105:1422 - 2.

Kaur A, Chaudhary A, Choudhary R. Kaushik R. 2005. Phospholipid fatty acid - A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Current Sci.* 89:1103-1112.

Li WH, Zhang CB, Jiang HB, Xin GR. Yang ZY. 2006. Changes in soil microbial community associated with invasion of the exotic weed *Mikania micrantha*. *Plant Soil.* 281:309-324.

Ludvigsen L, Albrechtsen HJ, Holst H, Christensen TH. 1997. Correlating phospholipid fatty acids (PLFA) in a landfill leachate polluted aquifer with biogeochemical factors by multivariate statistical methods. *Fems Microbiology Reviews* 20:447-460.

Manzoni S, Porpotato A. 2007. A theoretical analysis of nonlinearities and feedbacks in soil carbon and nitrogen cycles. *Soil Biol. Biochem.* 39:1542-1556.

Paul EA. Clark FE.. 1989. In *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, San Diego, CA.

Pratt B. Riesen R, Johnston CG. 2012. PLFA Analyses of Microbial Communities Associated with PAH-Contaminated Riverbank Sediment. *Microb Ecol* 64:680 - 691

Peacock AD, Mullen, MD, Ringelberg DB, Tyler DD, Hedrick DB, Gale PM, White DC. 2001. Soil microbial community responses to dairy manure or ammonium nitrate applications. *Soil Biol. Biochem.* 33:1011-1019.

Pompanon F, Deagle BE, Symondson WO, Brown DS, Jarman SN, Taberlet P. 2012. Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing., *Mol Ecol.* 221: 1931-1950.

Rahman, M. H., A. Okubo, S. Sugiyama, and H. F. Mayland. 2008. Physical, chemical and microbiological properties of an Andisol as related to land use and tillage practice. *Soil Till. Res.* 101:10-19.

Ramsey PW, Rillig MC, Feris KP. Holben WE, Gannon JE. 2006. Choice of methods for soil microbial community analysis: PLFA maximizes power

compared to CLPP and PCR-based approaches. *Pedobiologia* 50:275–280.

Straatsma G, Ayer F, Egli S. 2001. Species richness, abundance, and phenology of fungal fruit bodies over 21 years in a Swiss forest plot. *Mycoll Res* 105:515–523.

Torsvik V, Ovreas L, and Thingstad TF. 2002. Prokaryotic diversity – Magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* 296, 1064–1066.

Widmera F, Flieûbach A, Laczko E, Schulze-Aurichd J, Zeyer J.(2001) Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA-, PLFA-, and Biolog-analyses *Soil Biology & Biochemistry*. 33, 1029–1036.

Wu Y, Ding N, Wang G, Xu J, Wu J, Brookes PC. 2009. Effects of different soil weights, storage times and extraction methods on soil phospholipid fatty acid analyses, *Geoderma* 150:171–178.

Yao, H, He Z, Wilson MJ, Campbell CD. 2000. Microbial biomass and community structure in a sequence of soils with increasing fertility and changing land use. *Microb Eco* 40:223–237.

진현오, 이명종, 신영오, 김정제, 전상근. 1994. 삼림토양학. 향문사. pp.325.

박기춘, 김수정, 2010. 고추재배지에서 퇴비시용에 따른 토양 미생물의 인지질지방산 변화. *한국토양비료학회지* 43, 194–199.

현해남, 좌재호, 2012. 한라산국립공원 자연자원조사. 제주특별자치도 한라산연구소, 1–13

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【참조번호】	1060644
【출원구분】	특허출원
【출원인】	
【명칭】	건국대학교 산학협력단
【특허고객번호】	2-2004-015764-8
【지분】	70/100
【출원인】	
【명칭】	한국해양과학기술원
【특허고객번호】	1-2012-034461-6
【지분】	30/100
【대리인】	
【명칭】	특허법인어룡리온
【대리인번호】	9-2016-100061-5
【지정된변리사】	양석주
【포괄위임등록번호】	2016-031581-1
【발명의 국문명칭】	플라보박테리움(Flavobacterium) ASB3-3 균주, 이를 통한 엑소폴리사카라이드(Ecopolysaccharide, EPS) 및 이의 생산방법 및 이를 포함하는 항동결용 조성물
【발명의 영문명칭】	Flavobacterium sp. ASB3-3, EPS produced from the ASB3-3, and method for production of the EPS and composition of cryoprotectant

【주소】 서울특별시 강남구 압구정로 113, 25동 906호 (압구정동, 미성아파트)

【국적】 KR

【출원언어】 국어

【심사청구】 청구

【공지에외적용대상증명서류의 내용】

【공개형태】 논문발표

【공개일자】 2015.09.22

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 2015A4230024

【부처명】 미래창조과학부

【연구관리 전문기관】 한국연구재단

【연구사업명】 거대과학연구개발사업(해양극지기초원천기술개발)

【연구과제명】 해양유래 고효율성 hydrolyase를 가진 한국형 내염 박테리아연구

【기여율】 1/2

【주관기관】 건국대학교

【연구기간】 2015.06.23 ~ 2016.06.22

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 PE16030

【부처명】 해양수산부

【연구관리 전문기관】 한국해양과학기술원 부설 극지연구소

【연구사업명】 기관주요사업
【연구과제명】 다산과학기지 기반 지질-대기-생태 환경변화 연구
【기여율】 1/2
【주관기관】 한국해양과학기술원 부설 극지연구소
【연구기간】 2014.01.01 ~ 2016.12.31
【취지】 위와 같이 특허청장에게 제출합니다.

대리인 특허법인이룡리온 (서명 또는 인)

【수수료】

【출원료】 0 면 46,000 원
【가산출원료】 35 면 0 원
【우선권주장료】 0 건 0 원
【심사청구료】 11 항 627,000 원
【합계】 673,000 원
【감면사유】 정부출연연구기관(50%감면)[1], 전달조직(50%감면)[1]
【감면후 수수료】 336,500 원
【첨부서류】 1. 공지에외적용대상(신규성상실의예외, 출원시의특례)규정을 적용받기 위한 증명서류_1통

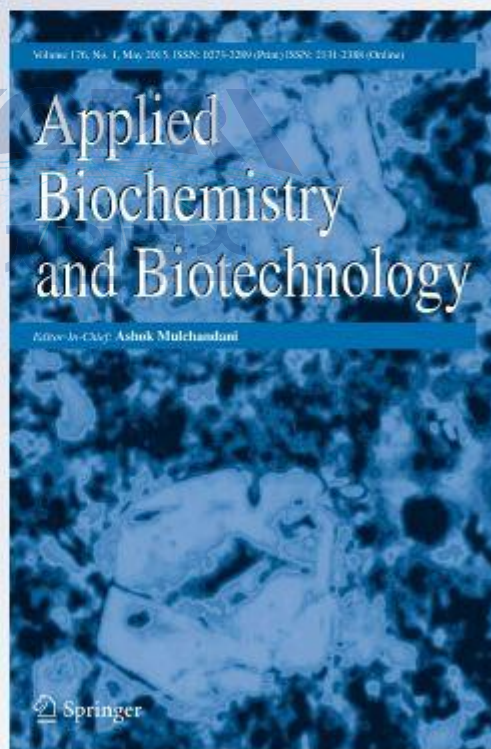
Lipase-Catalyzed Production of 6-O-cinnamoyl-sorbitol from D-sorbitol and Cinnamic Acid Esters

Jung-Ho Kim, Shashi Kant Bhatia, Dongwon Yoo, Hyung Min Seo, Da-Hye Yi, Hyun Joong Kim, Ju Hee Lee, Kwon-Young Choi, Kwang Jin Kim, et al.

Applied Biochemistry and Biotechnology
Part A: Enzyme Engineering and Biotechnology

ISSN 0273-2289
Volume 176
Number 1

Appl Biochem Biotechnol (2015)
176:244-252
DOI 10.1007/s12010-015-1570-x



 Springer

applications in the cosmetic field as fragrance material, thickener, and humectants [27]. In addition, there has been a report on the synergistic effect for radical scavenging activity by combining two different molecules to make an ester form [28]. Based on this idea, the radical scavenging activity by DPPH assay was examined (Fig. 4). Substrates, D-sorbitol and vinyl cinnamate, as well as the products, cinnamic acid and 6-*O*-cinnamoyl-sorbitol, were examined for scavenging activity. When 1–10 mM of cinnamic acid, sorbitol, vinyl cinnamate, and 6-*O*-cinnamoyl-sorbitol were examined, only 6-*O*-cinnamoyl-sorbitol showed 30 % radical scavenging activity. Compared to the ascorbic acid (control), at the range between 0 and 100 μ M, it showed 8 % activity, while ascorbic acid showed 60 % at 100 μ M. Although the current analysis showed a lower activity than ascorbic acid at 100 μ M, but considering that their substrates were not showing any radical scavenging activity, it thus provides great insights and potential for possible applications in cosmetics.

Conclusion

In this study, we attempted to improve the property of cinnamic acid by esterification with sorbitol and tried to explore the synergistic effects of both compounds together in a reaction. The enzyme-catalyzed synthesis of 6-*O*-cinnamoyl-sorbitol using D-sorbitol and vinyl cinnamate was performed in an organic solvent under mild conditions, resulting the production of 6-*O*-cinnamoyl-sorbitol, which also possesses the substrate specificities of a cinnamate derivative. The synthesized 6-*O*-cinnamoyl-sorbitol showed a considerable radical scavenging activity. Although, the optimization of production to improve the yield is still needed, and our study provides novel insights in the functional modification of cinnamic acid, and this would be the first report on the production of 6-*O*-cinnamoyl-sorbitol in vitro.

Acknowledgments The authors follow the Instructions for Authors to make sure their manuscript complies to the ethical rules applicable for this journal. The study was partially supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (NRF-2013R1A1A2A10004690), by KOPRI (PE14030), and by the R& D Program of MOTIE/KEIT (10048350) and “Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project title: Isolation and identification of rhizobacteria for indoor VOCs removal, Project No. 010205022014)”. Rural Development Administration, Republic of Korea. In addition, this research was supported by the 2014 KU Brain Pool of Konkuk University.

References

1. Liu, L., Hudgins, W. R., Shack, S., Yin, M. Q., & Samid, D. (1995). Cinnamic acid: a natural product with potential use in cancer intervention. *International Journal of Cancer*, *62*, 345–350.
2. Humphreys, J. M., & Chapple, C. (2002). Rewriting the lignin roadmap. *Current Opinion in Plant Biology*, *5*, 224–229.
3. Boudet, A. M., Kajita, S., Grima-Pettenati, J., & Goffner, D. (2003). Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. *Trends in Plant Science*, *8*, 576–581.
4. Mi, J., Sun, Z. H., Zhong, M. H., Yang, Y. H., Chen, T., Xiong, G. J., Luo, H., & Qi, X. Q. (2012). Predictive factors of chronic thromboembolic pulmonary hypertension in patients with acute pulmonary thromboembolism. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*, *40*, 497–501.
5. Lone, R., Shuaib, R., & Koul, K. K. (2014). Role of cinnamate and cinnamate derivatives in pharmacology. *Global Journal of Pharmacology*, *8*, 328–335.

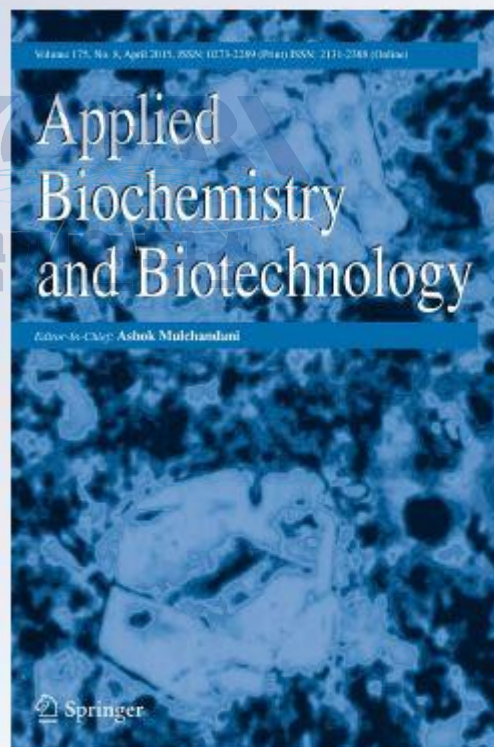
*Increased Vulnerability to Physical Stress
by Inactivation of NdgR in Streptomyces
coelicolor*

**Bo-Rahm Lee, Da-Hye Yi, Eunjung Song,
Shashi Kant Bhatia, Ju Hee Lee, Yun-
Gon Kim, Sung-Hee Park, Yoo Kyung
Lee, Byung-Gee Kim, et al.**

**Applied Biochemistry and
Biotechnology**
Part A: Enzyme Engineering and
Biotechnology

ISSN 0273-2289
Volume 175
Number 8

Appl Biochem Biotechnol (2015)
175:3673-3682
DOI 10.1007/s12010-015-1536-z



 Springer

Acknowledgments The study was partially supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (NRF-2013R1A1A2A10004690), by KOPRI (PE14030), by the R&D Program of MOTIE/KEIT (10049674) and the Energy Efficiency & Resources of the Korea Institute of Energy Technology Evaluation and Planning (KETEP) grant funded by the Korea Government Ministry of Trade, Industry and Energy (2013303000300).

References

1. Beck, H. C. (2005). Branched-chain fatty acid biosynthesis in a branched-chain amino acid aminotransferase mutant of *Staphylococcus carnosus*. *FEMS Microbiology Letters*, *243*(1), 37–44.
2. Bertram, R., Schlicht, M., Mahr, K., Nothhaft, H., Sauer, M. H., Jr., & Tilgner, F. (2004). In silico and transcriptional analysis of carbohydrate uptake systems of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, *186*(5), 1362–1373.
3. Bibb, M. J. (2005). Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current Opinion in Microbiology*, *8*(2), 208–215.
4. Bystrykh, L. V., Fernandez-Moreno, M. A., Herrema, J. K., Malpartida, F., Hopwood, D. A., & Dijkhuizen, L. (1996). Production of actinorhodin-related “blue pigments” by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, *178*(8), 2238–2244.
5. Chater, K. F. (2001). Regulation of sporulation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a checkpoint multiplex? *Current Opinion in Microbiology*, *4*(6), 667–673.
6. Claessen, D., de Jong, W., Dijkhuizen, L., & Wosten, H. A. (2006). Regulation of *Streptomyces* development: reach for the sky! *Trends in Microbiology*, *14*(7), 313–319.
7. Druzhinina, I. S., Schmoll, M., Seiboth, B., & Kubicek, C. P. (2006). Global carbon utilization profiles of wild-type, mutant, and transformant strains of *Hypocrea jecorina*. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(3), 2126–2133.
8. Fernandes, M. F., Saxena, J., & Dick, R. P. (2013). Comparison of whole-cell fatty acid (MIDI) or phospholipid fatty acid (PLFA) extractants as biomarkers to profile soil microbial communities. *Microbial Ecology*, *66*(1), 145–157.
9. Fujii, T., Gramajo, H. C., Takano, E., & Bibb, M. J. (1996). *redD* and *acII-ORF4*, pathway-specific regulatory genes for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2), are transcribed in vitro by an RNA polymerase holoenzyme containing sigma hrdD. *Journal of Bacteriology*, *178*(11), 3402–3405.
10. Kieser, T., Bibb, M. J., Bultner, M. J., Chater, K., & Hopwood, D. A. (2000). *Practical streptomycetes genetics*. Norwich Research Park: John Innes Centre.
11. Kim, J. N., Yi, J. S., Lee, B. R., Kim, E. J., Kim, M. W., Song, Y., Cho, B. K., & Kim, B. G. (2012). A versatile PCR-based tandem epitope tagging system for *Streptomyces coelicolor* genome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *424*(1), 22–27.
12. Kim, S. H., Lee, B. R., Kim, J. N., & Kim, B. G. (2012). *NdgR*, a common transcriptional activator for methionine and leucine biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Bacteriology*, *194*(24), 6837–6846.
13. Klein, W., Weber, M. H., & Marahiel, M. A. (1999). Cold shock response of *Bacillus subtilis*: isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures. *Journal of Bacteriology*, *181*(17), 5341–5349.
14. Massey, L. K., Sokatch, J. R., & Conrad, R. S. (1976). Branched-chain amino acid catabolism in bacteria. *Bacteriological Reviews*, *40*(1), 42–54.
15. Mentzen, W. I., Peng, J., Ransom, N., Nikolau, B. J., & Wurtele, E. S. (2008). Articulation of three core metabolic processes in *Arabidopsis*: fatty acid biosynthesis, leucine catabolism and starch metabolism. *BMC Plant Biology*, *8*, 76.
16. Park, S. S., Yang, Y. H., Song, E., Kim, E. J., Kim, W. S., Sohn, J. K., Lee, H. C., Liou, K. K., & Kim, B. G. (2009). Mass spectrometric screening of transcriptional regulators involved in antibiotic biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *36*(8), 1073–1083.
17. Yang, Y. H., Song, E., Kim, E. J., Lee, K., Kim, W. S., Park, S. S., Hahn, J. S., & Kim, B. G. (2009). *NdgR*, an IclR-like regulator involved in amino-acid-dependent growth, quorum sensing, and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *82*(3), 501–511.

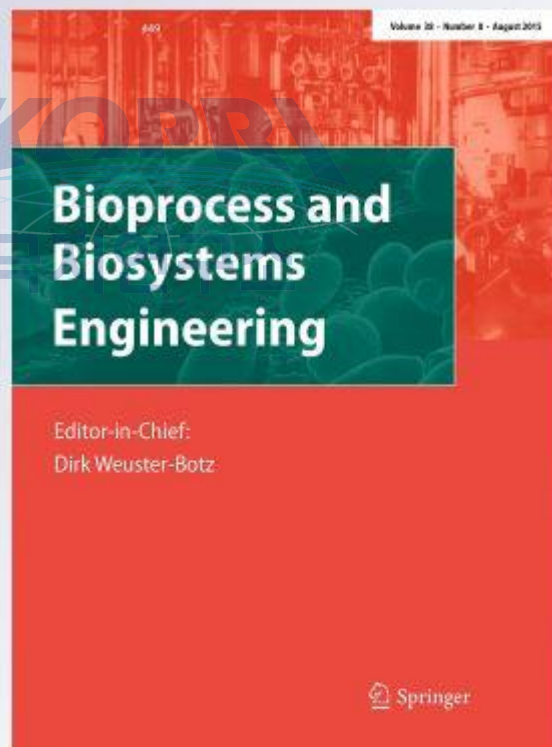
*Starch based polyhydroxybutyrate
production in engineered Escherichia coli*

**Shashi Kant Bhatia, Young-Ha Shim,
Jong-Min Jeon, Christopher J. Brigham,
Yong-Hyun Kim, Hyun-Joong Kim,
Hyung-Min Seo, et al.**

**Bioprocess and Biosystems
Engineering**

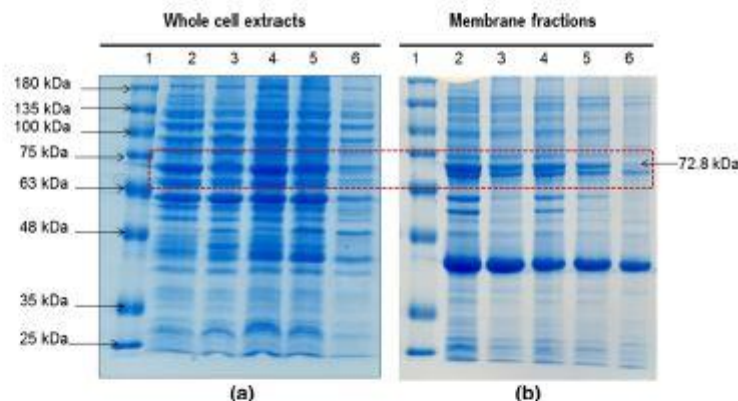
ISSN 1615-7591
Volume 38
Number 8

Bioprocess Biosyst Eng (2015)
38:1479-1484
DOI 10.1007/s00449-015-1390-y



 Springer

Fig. 6 SDS-PAGE showing the effect of osmoprotectant (ethanol 3 %, sucrose 4 %, glycine betaine 10 mM and NaCl 4 %) on expression of amylase (72.8 kDa). **a** Whole cell extract showed total soluble protein fraction, **b** membrane fraction representing, insoluble protein fraction of different culture obtained after growing *E. coli* SKB99 in presence of various osmoprotectant, *lane 1* marker, *lane 2* control, *lane 3* ethanol, *lane 4* sucrose, *lane 5* glycine betaine and *lane 6* NaCl



Osmoprotectants effect on PHA accumulation

Overexpression of recombinant proteins in *E. coli* mostly leads to misfold and accumulation as soluble aggregates or inclusion bodies. Different osmoprotectants were tried to increase the fraction of expressed proteins in soluble form. SDS-PAGE analysis results confirmed the change in PHA accumulation as there was an increase in the soluble amylase fraction (72.8 kDa, whole cell extract, Fig. 6a) and decrease in inclusion body of amylase (membrane fraction) was observed in the presence of osmoprotectant (Fig. 6b). An increase in the soluble amylase fraction was recorded, i.e. 18.2 and 8.1 % for glycine betaine and sucrose, respectively. Glycine betaine proved as efficient osmoprotectant and increased secreted amylase fraction (14.3 %), which resulted in a 17 % increase in PHA accumulation without effecting biomass. Sucrose, a non metabolizable sugar for *E. coli* also have a positive effect and increase 5 % PHA accumulation while ethanol and NaCl have a negative effect (Fig. 7). Osmoprotectants have very little effect on growth. Under the optimized set of condition with 10 mM glycine betaine as the osmoprotectant, PHA accumulation process was performed at 100 mL scale and 57.4 % PHA accumulation was recorded with 1.24 gL^{-1} productivity. Engineered *E. coli* strain SKB99 can accumulate up to 57.4 % of its CDM as PHB on starch, while 41.3 and 47.3 % PHB accumulation was shown in other recombinant *E. coli* strains grown on glucose and glycerol as the carbon source, respectively [19, 20]. The main advantage of this bioprocess is the utilization of starch as carbon source which is a renewable and second most abundant carbon source [11]. The effective role of the various osmoprotectant (polyol, betaine, NaCl and ethanol) for expression of recombinant protein in *E. coli* has been explored for better protein expression [21–23].

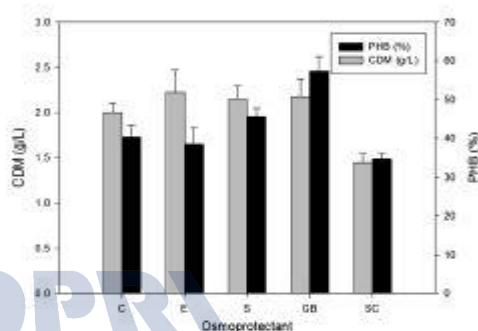


Fig. 7 Effect of different osmoprotectant on PHA accumulation and biomass production. Different symbols used to represent various osmoprotectants as: control (C), ethanol (E), sucrose (S), glycine betaine (GB) and sodium chloride (SC)

Conclusions

Production of PHA using various microbes and *E. coli* from various carbon source has been known for several years, its production using starch has not been explored yet. The results obtained in this study showed that engineered *E. coli* has the potential to utilize starch, the second most abundant carbon source, for PHA production. Thus, the result provided here presents a new approach for commercially valuable product and addition of the osmoprotectant during the culture condition enhanced soluble protein fraction which can increase the productivity.

Acknowledgments The authors have declared no conflict of interest. This work was partially supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (NRF-2013R1A1A2A10004690), Korea

A MALDI-MS-based quantitative targeted glycomics (MALDI-QTaG) for total *N*-glycan analysis

Kyoung-Jin Kim · Yoon-Woo Kim · Cheol-Hwan Hwang ·
Han-Gyu Park · Yung-Hun Yang · Miyoung Koo ·
Yun-Gon Kim

Received: 1 April 2015 / Accepted: 3 June 2015
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2015

Abstract

Objectives To develop a sensitive and quantitative method for monitoring the abnormal glycosylation of clinical and biopharmaceutical products.

Results MALDI-MS-based quantitative targeted glycomics (MALDI-QTaG) was proposed for sensitive and quantitative analysis of total *N*-glycans. The derivatization reactions (i.e., amidation of sialic acid and incorporation of a positive charge moiety into the reducing end) dramatically increased the linearity ($R^2 > 0.99$) and sensitivity (limit of detection is 0.5 pmol/glycoprotein) relative to underivatized glycans. In addition, the analytical strategy was

chromatographic purification-free and non-laborious process accessible to the high-throughput analyses. We used MALDI-QTaG to analyze the *N*-glycans of α -fetoprotein (AFP) purified from normal cord blood and HCC cell line (Huh7 cells). The total percentages of core-fucosylated AFP *N*-glycans from Huh7 cells and normal cord blood were 98 and 18 %, respectively.

Conclusions This MALDI-MS-based glycomics technology has wide applications in many clinical and bioengineering fields requiring sensitive, quantitative and fast *N*-glycosylation validation.

Keywords Abnormal glycosylation · Chemical derivatization · MALDI-MS · *N*-Glycan · Glycosylation · Quantitative analysis · UPLC

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10529-015-1881-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

K.-J. Kim · Y.-W. Kim · C.-H. Hwang ·
H.-G. Park · Y.-G. Kim (✉)
Department of Chemical Engineering, Soongsil
University, Seoul 156-743, Korea
e-mail: ygkim@ssu.ac.kr

Y.-H. Yang
Department of Microbial Engineering, College of
Engineering, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

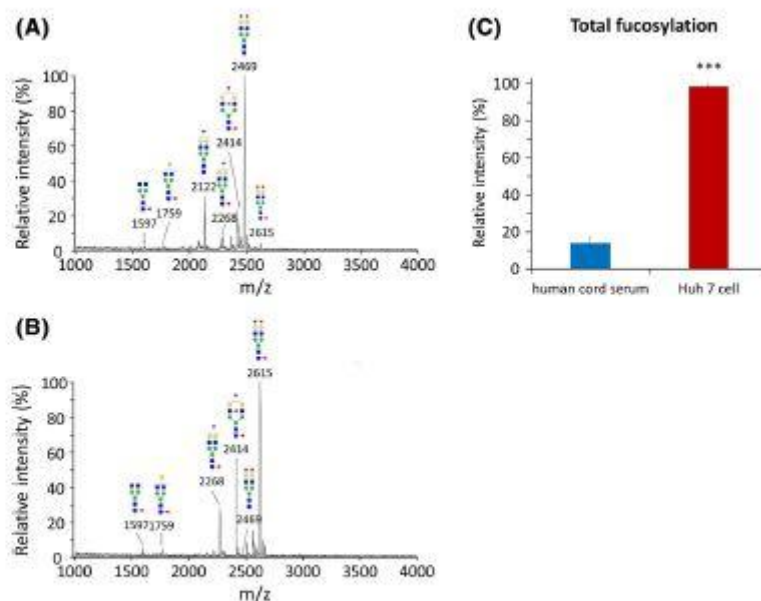
M. Koo
Immunoassay Tech. Lab, Healthcare Group, Future
Technology R&D Division, SK Telecom, Anyang,
Gyeonggi-do 463-784, Korea

Introduction

Protein glycosylation is highly susceptible to the biological and physiological conditions of the organism including the presence of various cancers (Kobata 1992). The altered glycosylation pattern of the proteins is therefore a hallmark for a cellular pathology. However, the sensitive characterization of disease or disorder-associated glycans is challenging due to the structural complexity of glycans (Durand and Seta 2000).

LC-MS/MS-based glycomics has been one of the most powerful tools for the structural characterization of glycans. For the untargeted glycomics to identify

Fig. 4 MALDI spectra of total *N*-glycans derived from α -fetoprotein (AFP) of **a** human cord serum and **b** Huh7 cell. **c** Direct comparison of the total fucosylation via MALDI-QTaG method between *N*-glycans derived from AFP of human cord serum and Huh7 hepatocarcinoma cells (***P* value < 0.001; *P* values were derived from the two-tailed Student's *t* test, *n* = 3; different human/Huh 7 cells. *Error bars* show SEM)



the early diagnosis of hepatocellular carcinoma (HCC) (Aoyagi et al. 1988). Therefore, a sensitive and reliable quantitation method would be valuable to monitor the core-fucosylation levels in the HCC. In here, we used the MALDI-QTaG method to analyze the *N*-glycans of AFPs purified from normal cord blood and HCC cell line (Huh7 cells). The AFP from normal human cord blood could be a control sample for monitoring the changes of core-fucosylation of AFPs in HCC condition.

Figure 4 shows MALDI-MS profiles of the *N*-glycans of AFPs (150 μ g from Huh7 cells and of commercial products). The relative peak area percentage of each core-fucosylated *N*-glycan of AFPs originated from Huh7 cells was distinctly higher than one from normal cord blood in Supplementary Table 1. As shown in Fig. 4c, the total percentage of core-fucosylated AFP *N*-glycans from Huh7 cells and normal cord blood was 98 and 17.8 %, respectively. The most abundant core-fucosylated AFP *N*-glycan structure from Huh7 cells was the sialylated bi-antennary structure with a core fucosylation ($m/z = 2615$, 71.7 %). Thus, our method may be applicable to relatively quantify the total *N*-glycans from

different cells or tissues for clinical or biopharmaceutical engineering applications.

Conclusion

We have introduced a robust and purification-free method based on MALDI-MS that enables the quantitative analysis of targeted glycome. As a proof-of-concept, the reliability and reproducibility of the proposed method were successfully demonstrated by analysis of model glycoproteins (bovine fetuin, human IgG), complex glycoprotein mixtures (normal human serum) and cellular products (α -fetoproteins originating from Huh7 cells). Taken together, MALDI-QTaG method is valuable for robust, sensitive, high-throughput and quantitative analysis of *N*-glycans and will open new venues in clinical and biopharmaceutical testing and evaluation with advanced technologies such as liquid handling robotics to develop an automated high-throughput glycomics system.

Acknowledgments This work was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) (NRF-2013R1A1A1004998) and Polar Academic Program (PAP, PD13010) from KOPRI.



Application of diethyl ethoxymethylenemalonate (DEEMM) derivatization for monitoring of lysine decarboxylase activity



Yong Hyun Kim^a, Hyun Joong Kim^a, Ji-Hyun Shin^b, Shashi Kant Bhatia^a, Hyung-Min Seo^a, Yun-Gon Kim^c, Yoo Kyung Lee^d, Yung-Hun Yang^{a,e,*}, Kyungmoon Park^{b,**}

^a Department of Biological Engineering, College of Engineering, Konkuk University, Seoul 143-701, Republic of Korea

^b Department of Biological and Chemical Engineering, Hongik University, Sejong Ro 2639, Jochiwon, Sejong city, Republic of Korea

^c Department of Chemical Engineering, Soongsil University, 511 Sangdo-dong, Seoul 156-743, Republic of Korea

^d Division of Life Sciences, Korea Polar Research Institute, 12 Gaetbeol-ro, Yeosu-gu, Incheon 406-840, Republic of Korea

^e Institute for Ubiquitous Information Technology and Applications (CBRU), Konkuk University, Seoul 143-701, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 August 2014

Received in revised form 27 January 2015

Accepted 29 January 2015

Available online 18 February 2015

Keywords:

Highly sensitive method

Diethyl ethoxymethylenemalonate

Diamine analysis

Cadaverine

Corynebacterium glutamicum

ABSTRACT

Aliphatic diamines have been used as chemical reagents for the monomers of polyamides (i.e., Nylon 46, Nylon 510, Nylon 66, Nylon 610 and so on), and can be made from lysine, arginine or ornithine by the metabolism of microbes through decarboxylases. However, the conventional derivatization methods for the HPLC-based quantitative analysis of aliphatic diamines exhibit poor sensitivity and efficiency for the monitoring of enzyme activity. In this study, a chemical derivatization method using diethyl ethoxymethylenemalonate (DEEMM) was applied to monitor lysine decarboxylase activity for the production of cadaverine by measuring the levels of intracellular and secreted lysine and cadaverine. The calibration graphs for the determination of 2,4-diaminobutyrate, 2,6-diaminopimelic acid, ornithine, arginine, lysine, 1,3-diaminopropane, putrescine dihydrochloride, cadaverine, hexamethylenediamine, and 1,7-diaminoheptane were measured by the highly sensitive method using DEEMM, and a linear relationship was observed for each diamine compound, with limits of detection up to 0.001 mM. Application of this method will be useful for the sensitive monitoring of lysine decarboxylase reactions through the detection of substrates containing amine groups and products with diamines using HPLC and a UV detector.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Aliphatic diamines such as 1,3-diaminopropane (C3), 1,4-diamine (putrescine) (C4), 1,5-diamine (cadaverine) (C5), hexamethylenediamine (C6) and heptamethylenediamine (C7) are widely used as chemical reagents in the preparation of polyamides, polyimides and polyureas [1], with an additional use as chelating agents for analytical purposes [2]. They are made by petroleum-based methods, and have been found to have high potential for the production of polyamide, which can be made by reaction of aliphatic diamines and dicarboxylic acid [3]. However, the

petrochemical route suffers from the drawbacks of limited supply and rising price of fossil fuels, as well as low eco-efficiency [4]. As an alternative, aliphatic diamines can also be made by enzymatic methods or by whole cells through the use of decarboxylases of ornithine, lysine, and arginine. Among these chemicals, cadaverine, produced by lysine decarboxylase with lysine as a substrate, is well known in the drug industry [7]. It is particularly relevant in the production of bio-polyamides derived from renewable feedstock, as a replacement for conventional polyamides derived from petrochemicals [8]. The existence of lysine decarboxylases in anaerobic bacteria and eukaryotes has been well-reported [9], and there are several different types and, for example, CadA is expressed in low pH environments, while LdcC is constitutively expressed in metabolic pathways to protect cells from the drop of pH [5,6].

To detect decarboxylase activities, pH indicators [10], enzyme coupling [11], and HPLC methods are commonly used [12,13]. Among them, HPLC generally gives the best results with repeatable and stable data, although it requires derivatization of the analytes

* Corresponding author at: Department of Biological Engineering, College of Engineering, Konkuk University, Seoul 143-701, Republic of Korea. Tel.: +82 44 868 6941; fax: +82 2 3437 8360.

** Corresponding author. Fax: +82 44 868 6941.

E-mail addresses: seokor@konkuk.ac.kr (Y.-H. Yang), pkm2510@hongik.ac.kr (K. Park).

Table 1
Retention times and detection limits for determining diamine concentrations through reversed-phase HPLC.

Diamines	OPA		DEEMM		Relative intensity to OPA (Fold)
	Retention time (min)	Detection limit (mM) ^a	Retention time (min)	Detection limit (mM)	
1,3-Diaminopropane	29.0	>0.1	21.0	>0.001	26.6
1,4-Diaminobutane	32.5	>0.01	24.0	>0.001	15.1
1,5-Diaminopentane	34.0	>0.01	26.8	>0.001	15.4
1,6-Diaminohexane	39.0	>0.01	30.1	>0.001	19.2
1,7-Diaminoheptane	41.4	>0.01	33.2	>0.001	19.6

^a Detection limit (DL): concentration at which the analytic peak above the peak area of 3 mV can be detected.

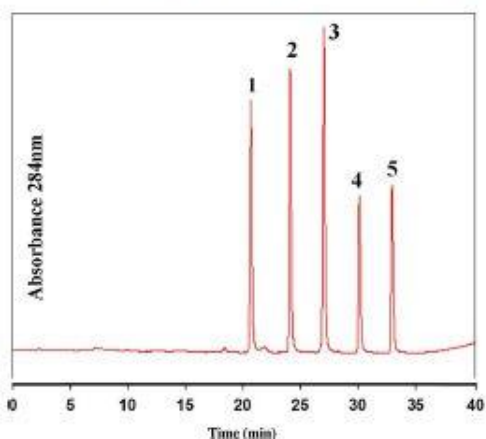


Fig. 5. HPLC profiles of diamines derivatized by DEEMM: 1 – diaminopropane, 2 – diaminobutane, 3 – diaminopentane, 4 – diaminohexane, and 5 – diaminohexane.

one of the most well-known derivatization molecules for amino acids [28]. When comparing DEEMM with OPA for the derivatization of diamines 1,3-diaminopropane, 1,4-diaminobutane, 1,5-diaminopentane, 1,6-diaminohexane, and 1,7-diaminoheptane, DEEMM showed at least 10-fold higher sensitivity than OPA with the use of very small amounts of samples, resulting in very low limits of detection (Table 1). Depending on the molecules, DEEMM had a detection limit of about 0.001 mM while OPA required 0.1–0.01 mM for detection, which suggests that DEEMM is a more effective molecule for the detection of diamines (Table 1 and Fig. 5). Correlation coefficients showed linear correlation from 0.001 to 1 mM of diamines with small standard deviation, suggesting that DEEMM derivatization can be used for the stable quantification of diamines (Supplementary Table 4). Derivatization with DEEMM is known to require a reaction time of up to 2 h [29]. However, when the reaction time of 5 min was compared to that of 2 h, the 5 min reaction produced 70% of the sensitivity of that shown by the 2 h reaction for derivatization with DEEMM (data not shown).

4. Conclusions

Highly sensitive derivatization methods were applied to monitor diamines and their substrates with an HPLC–UV detector using diethyl ethoxymethylenemalonate, through which the enzymatic reactions of lysine decarboxylases were monitored by measuring the intracellular and secreted lysine and cadaverine produced by *E. coli* and *C. glutamicum* strains. This will be a very useful method for the detection of industrially crucial diamines, and for the

monitoring of decarboxylase reactions for the production of various polyamide monomers.

Acknowledgements

The work was partially supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF), and funded by the Ministry of Education (NRF-2013R1A1A2A10004690), by KOPRI (PE14030), and by the R&D Program of MOTIE/KEIT [10047910, Production of biobased cadaverine and polymerization of Bio-polyamide 510]. In addition, this research was supported by the 2014 KU Brain Pool of Konkuk University.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.01.018>.

References

- [1] A. Asan, J. Gıldak, *Mikrochim. Acta* 132 (1999) 13–16.
- [2] P.F. Gao, Z.X. Zhang, X.F. Guo, H. Wang, H.S. Zhang, *Talanta* 84 (2011) 1093–1098.
- [3] G.S. Isou, Y.L. Yang, Y.L.Q. Su, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 44 (2006) 2587–2603.
- [4] S. Kind, C. Wittmann, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91 (2011) 1287–1296.
- [5] S.B. Cui, M.J. Miguez-Arrizado, B. Becker, W.H. Holzappel, M.C. Vidal-Carou, *Food Microbiol.* 25 (2008) 269–277.
- [6] P.J. Monsan, *J. Bacteriol.* 189 (2007) 2249–2261.
- [7] W.H. Wu, D.R. Morris, *J. Biol. Chem.* 248 (1973) 1687–1695.
- [8] T. Mimitsuka, H. Sawai, M. Hatsu, K. Yamada, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71 (2007) 2130–2135.
- [9] Y. Takatsuka, Y. Yamaguchi, M. Ono, Y. Kamio, *J. Bacteriol.* 182 (2000) 6732–6741.
- [10] S. Bover-Cid, W.H. Holzappel, *Int. J. Food Microbiol.* 53 (1999) 33–41.
- [11] J. Janne, H.G. Williams-Ashman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42 (1971) 222–229.
- [12] H.E. Flores, A.W. Galston, *Plant Physiol.* 69 (1982) 701–706.
- [13] J. Kvannes, T. Flatmark, *J. Chromatogr.* 419 (1987) 291–295.
- [14] D.R. Knapp, *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*, 1979, pp. 6.
- [15] K.B. Male, J.H. Luong, *J. Chromatogr. A* 926 (2001) 309–317.
- [16] S. Hernandez-Cassou, J. Saurina, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (2011) 1270–1281.
- [17] B.N. Jones, J.P. Gilligan, *J. Chromatogr.* 266 (1983) 471–482.
- [18] P. Koski, I.M. Helander, M. Sarvas, M. Vaara, *Anal. Biochem.* 164 (1987) 261–266.
- [19] Y. Tapuhi, D.E. Schmidt, W. Lindner, B.L. Karger, *Anal. Biochem.* 115 (1981) 123–129.
- [20] Z.G. Qian, X.X. Xia, S.Y. Lee, *Biotechnol. Bioeng.* 108 (2011) 93–103.
- [21] R.M. Callejon, A.M. Troncoso, M.L. Morales, *Talanta* 81 (2010) 1143–1152.
- [22] R. Rehane, K. Herodes, *Anal. Chim. Acta* 672 (2010) 79–84.
- [23] B. Redruello, V. Ladero, I. Guesta, J.R. Alvarez-Buylla, M.C. Martin, M. Fernandez, M.A. Alvarez, *Food Chem.* 139 (2013) 1029–1035.
- [24] M. Alai, J.L. Navarro, J. Giron, E. Vioque, *J. Chromatogr.* 591 (1992) 181–186.
- [25] P.M. Izquierdo Canas, S. Gomez Alonso, P. Ruiz Perez, S. Sesena Prieto, E. Garcia Romero, M.L. Palop Herreros, *J. Food Prot.* 72 (2009) 907–910.
- [26] E.F. Gale, H.M. Epps, *Biochem. J.* 38 (1944) 232–242.
- [27] M.R. Alberto, M.E. Arena, M.C.M. de Nadra, *Food Control* 13 (2002) 125–129.
- [28] S. Gomez-Alonso, I. Hermosin-Gutierrez, E. Garcia-Romero, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 608–613.

Application of a Non-halogenated Solvent, Methyl Ethyl Ketone (MEK) for Recovery of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(HB-co-HV)] from Bacterial Cells

Yung-Hun Yang, Jong-Min Jeon, Da Hye Yi, Jung-Ho Kim, Hyung-Min Seo, ChoKyun Rha, Anthony J. Sinskey, and Christopher J. Brigham

Received: 11 August 2014 / Revised: 3 November 2014 / Accepted: 8 November 2014
© The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering and Springer 2015

Abstract Conventional solvent-based methods are still the most practical approaches for recovery of polyhydroxyalkanoate (PHA) polymer from cellular biomass, even though potential alternatives exist, including chemical, mechanical, and enzymatic methods. It is still necessary, however, to avoid dangerous and environmentally unfriendly solvents (e.g., chloroform and dichloromethane) in the polymer recovery process. In the work presented here, we applied various solvent systems to recover PHA from *Ralstonia eutropha* and recombinant *Escherichia coli* cells. It was demonstrated that methyl ethyl ketone (MEK) is a promising solvent for PHA recovery from bacterial cells, particularly for the copolymer poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) [P(HB-co-HV)], exhibiting > 90% polymer recovery. Even though MEK did not solubilize PHAs to the same extent as chloroform, it can recover a comparable

amount of polymer because of its processing advantages, such as the low viscosity of the MEK/PHA solution, and the lower density of MEK as compared to cellular components. MEK was found to be the best alternative, non-halogenated solvent among examined candidates for recovery of P(HB-co-HV) from cells. The MEK treatment of PHA-containing cells further allowed us to eliminate several costly and lengthy steps in the extraction process, such as cell lysis, centrifugation, and filtration.

Keywords: polyhydroxyalkanoate, recovery, solvent extraction, poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate), methyl-ethylketone

1. Introduction

Naturally occurring polyesters, polyhydroxyalkanoates (PHAs), have been studied for several decades. Their importance has been emphasized as an alternative for petroleum-based plastics by virtue of their physicochemical properties and biodegradability [1,2]. PHAs exhibit superior biocompatibility and have been used to develop materials for medical applications including sutures, artificial organ construction scaffolds, and therapeutic composites [3]. For most bacteria, including the model organism of PHA biosynthesis, *Ralstonia eutropha*, polymer production is induced when carbon is plentiful and nutrients such as nitrogen, sulfur, oxygen, or phosphate are in short supply [4]. However, biosynthesis of polymer has also been shown to occur concomitantly with growth in certain organisms [5]. As storage materials for excess carbon and reducing potential, PHAs can comprise over 80% of the cell's dry

Yung-Hun Yang, Jong-Min Jeon, Da Hye Yi, Jung-Ho Kim, Hyung-Min Seo
Department of Biological Engineering, College of Engineering, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

ChoKyun Rha
Biomaterials Science and Engineering Laboratory, Massachusetts Institute of Technology, 77 Massachusetts Avenue, Cambridge, MA 02139, USA

Anthony J. Sinskey, Christopher J. Brigham
Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, 77 Massachusetts Avenue, Cambridge, MA 02139, USA

Anthony J. Sinskey
Engineering Systems Division, Massachusetts Institute of Technology, 77 Massachusetts Avenue, Cambridge, MA 02139, USA

Christopher J. Brigham
Department of Bioengineering, University of Massachusetts Dartmouth, 285 Old Westport Road, North Dartmouth, MA 02747, USA
Tel: +1-508-999-9149; Fax: +1-508-999-9139
E-mail: cbrigham@umassd.edu

time, temperature and ratio of cell dry weight to volume of MEK used. Using MEK (10 mg cells/ 1 mL MEK), the solubility of P(HB-co-10 wt% HV) increased with increasing temperature. When MEK was applied to cells containing P(HB-co-10 wt% HV), recovery at 25°C was only 30% of the amount recovered at 60°C (Fig. 3A).

To find an optimal PHA:solvent ratio, different ratios of dry cell weight (g) to MEK (mL) were examined. At a ratio of 1:50 (0.3 g dry cells: 15 mL of MEK or 2 w/v%), a recovery yield of 50.7% and a yield of 30.5% were observed. The recovery yield is defined as the mass percentage of polymer recovered from the cells (mass PHA recovered/mass PHA present in cells), while the yield is the mass percentage of total biomass that is recovered as PHA (mass PHA recovered/initial (dry cell mass)). With 1.5 w/v% and 2.0 w/v% PHA solutions, a recovery yield of $93.8 \pm 0.6\%$ with purity of $91.4 \pm 0.3\%$ and a yield of $56.5 \pm 0.4\%$, respectively, were seen (Fig. 3B) using 0.3 g dried cells. In this work, the optimal reaction time to extract P(HB-co-10 wt% HV) polymer from cells was shown to be 60 min at 60°C (Fig. 3C).

4. Conclusion

Applying an MEK solvent system to polymer-containing cells was found to be the best alternative solvent tested for recovery of P(HB-co-HV), and demonstrated promise in recovering other polymers examined in this study (P(HB-co-HHx) and P4HB). Although MEK exhibited lower solubility towards PHAs than chloroform, it delivered comparable recovery yield with chloroform due to its processing advantages, such as low viscosity and easy separation by sedimentation. MEK-based recovery allowed for potential elimination of several costly and lengthy steps in the extraction process, such as cell lysis and filtration. As a result, MEK-based extraction represents a simplified PHA extraction process, potentially reducing capital, operational, and material costs. This is especially true if solvent recycling is employed in a recovery process, although care must be employed in the selection of a precipitant, in order to ensure recovery of usable solvent in the absence of a solvent/precipitant azeotrope. Furthermore, MEK-based extractions have the potential to significantly reduce cycle times, greatly improving the overall environmental safety of the polymer extraction.

Acknowledgements

The authors thank Mr. Jacob Palmer and Mr. John Quimby for their contributions to this manuscript. The work was

partially supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (NRF-2013R1A1A2A10004690), KOPRI (PE14030), the Energy Efficiency & Resources of the Korea Institute of Energy Technology Evaluation and Planning (KETEP) grant funded by the Korea Government Ministry of Trade, Industry and Energy (20133030000300), R&D Program of MOTIE/KEIT [10047910], and National Research Foundation of Korea Grant (NRF-2011-619-E0002).

References

- Madison, L. L. and G. W. Huisman (1999) Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 21-53.
- Steinbüchel, A. and B. Fuchtenbusch (1998) Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends Biotechnol.* 16: 419-427.
- Chen, G. Q. (2009) A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chem. Soc. Rev.* 38: 2434-2446.
- Anderson, A. J. and E. A. Dawes (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54: 450-472.
- Jeon, J. M., C. J. Brigham, Y. H. Kim, H. J. Kim, D. H. Yi, H. Kim, C. Rha, A. J. Sinskey, and Y. H. Yang (2014) Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (P(HB-co-HHx)) from butyrate using engineered *Ralstonia eutropha*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: 5461-5469.
- Klanna, S. and A. K. Srivastava (2005) A simple structured mathematical model for biopolymer (PHB) production. *Biotechnol. Prog.* 21: 830-838.
- Sim, S. J., K. D. Snell, S. A. Hogan, J. Stubbe, C. Rha, and A. J. Sinskey (1997) PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate *in vivo*. *Nat. Biotechnol.* 15: 63-67.
- Riedel, S. L., J. Bader, C. J. Brigham, C. F. Budde, Z. A. Yusuf, C. Rha, and A. J. Sinskey (2012) Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by *Ralstonia eutropha* in high cell density palm oil fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 109: 74-83.
- Jendrossek, D. and R. Handrick (2002) Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Ann. Rev. Microbiol.* 56: 403-432.
- Doi, Y., S. Kitamura, and H. Abe (1995) Microbial Synthesis and Characterization of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate). *Macromol.* 28: 4822-4828.
- Megaert, J., C. Anderson, A. Wouters, J. Swings, and K. Kersters (1992) Biodegradation of polyhydroxyalkanoates. *FEMS Microbiol. Rev.* 9: 317-321.
- Choi, J. I. and S. Y. Lee (1999) Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals. *Biotechnol. Bioeng.* 62: 546-553.
- Hahn, S. K., Y. K. Chang, B. S. Kim, and H. N. Chang (1994) Optimization of microbial poly(3-hydroxybutyrate) recover using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnol. Bioeng.* 44: 256-261.
- Kunasundari, B. and K. Sudesh (2011) Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. *Express Polym. Lett.* 5: 620-634.

PAPER



Cite this: *RSC Adv.*, 2015, 5, 84492

Exopolysaccharide from psychrotrophic Arctic glacier soil bacterium *Flavobacterium* sp. ASB 3-3 and its potential applications†

Ganesan Sathiyarayanan,^a Da-Hye Yi,^a Shashi Kant Bhatia,^a Jung-Ho Kim,^a Hyung Min Seo,^a Yun-Gon Kim,^b Sung-Hee Park,^c Daham Jeong,^{d,e} Seunho Jung,^{d,e} Ji-Young Jung,^f Yoo Kyung Lee^f and Yung-Hun Yang^{*a,e}

A novel exopolysaccharide (EPS) producing psychrotrophic bacterium *Flavobacterium* sp. ASB 3-3 was isolated from Arctic glacier soil and identified. The optimum fermentation conditions for EPS production were an initial medium pH of 7.2 and an initial inoculum size of 5% (v/v). The maximum yield of EPS ($7.25 \pm 0.26 \text{ g L}^{-1}$) was obtained after cultivation at 25 °C for 120 h with glycerol as the sole carbon source. The EPS was purified and its structural characteristics were analyzed by ¹H and ¹³C NMR. The predominant repeating units of this EPS are (α, β) D-glucose and D-galactose and it is different from the structure of EPSs produced by other Arctic and Antarctic bacteria, which have mannose units. In addition, EPS has demonstrated a comparable emulsifying property than SDS and flocculating properties with kaolinite, suggesting their potential applications in various industries. The EPS also significantly improved the tolerance of *Flavobacterium* sp. and *Escherichia coli* from freeze–thaw cycles, suggesting that it might be used to survive in polar regions and it can have possible usage as microbial cryoprotectants.

Received 28th July 2015
Accepted 22nd September 2015
DOI: 10.1039/c5ra14978a
www.rsc.org/advances

1. Introduction

The increased demand of natural polysaccharides for industrial applications has led to increased consideration of bacterial exopolysaccharides (EPSs). The bacterial EPSs are long-chain branched hetero- or homo-polysaccharides comprising repeated units of the monosaccharide moieties which are synthesized and secreted by bacteria when in the presence of an excess of the carbon source in the growth medium or under stressful environments.^{1–4} Due to their physical and chemical properties, the bacterial EPSs are widely used in the different industrial sectors as bioflocculants, bioabsorbants, stabilizers, emulsifiers, drug carriers, ion exchange resins and thickening agents.^{5–7} The EPSs are also used in medical fields as anti-

tumor, anti-viral and anti-inflammatory agents.^{8,9} At present, there has been an increasing interest in search of novel EPSs and few of them are being currently marketed as commercial products, and include xanthan, alginates, cellulose, pullulan, gellan, hyaluronic acid and succinoglycan from different bacterial strains.^{1,4,5}

Emulsifiers and flocculants have been used extensively in almost every industrial sector of modern industry today.¹⁰ A large fraction of emulsifiers and flocculants are produced by chemical synthesis and this raises concern over their potential toxicological effects to the natural environment. Because of the limitations of these chemical emulsifiers and flocculants, biopolymers produced by various microorganisms are being investigated as alternative emulsifiers and flocculants.^{4,5,11} Biopolymers are biodegradable and their intermediates and by-products are harmless towards human beings and the environment. In addition, microbial derived polymers can exhibit enhanced performance and greater functional diversity than synthetic polymers.^{6,12} It has been reported that many bacteria are able to produce EPS based emulsifying and flocculating agents for enhanced oil recovery/or hydrocarbon degradation and waste-water treatment, respectively.^{2,3,5,12,13} Hence, high molecular weight EPSs with emulsifying and flocculating properties are of particular interest for various biotechnological and industrial sectors.

The production of EPS is an exclusive metabolic process as different polysaccharides with unique functional properties can be produced from different strains of the same species.^{7,9} Due to

^aDepartment of Biological Engineering, College of Engineering, Konkuk University, Seoul 143-701, South Korea. E-mail: seokor@konkuk.ac.kr; Fax: +82-2-3437-8360; Tel: +82-2-450-3936

^bChemical Engineering, Soongsil University, 511 Sangdo-dong, Seoul 156-743, South Korea

^cFood Ingredients Center, Foods R&D, Cheiljedang, Guro-dong, Guro-Gu, Seoul 152-051, South Korea

^dDepartment of Bioscience and Biotechnology, Konkuk University, Seoul 143-701, South Korea

^eMicrobial Carbohydrate Resource Bank, Konkuk University, Seoul 143-701, South Korea

^fKorea Polar Research Institute, 26 Songdomirae-ro, Yeosu-si, 54900, South Korea
† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c5ra14978a

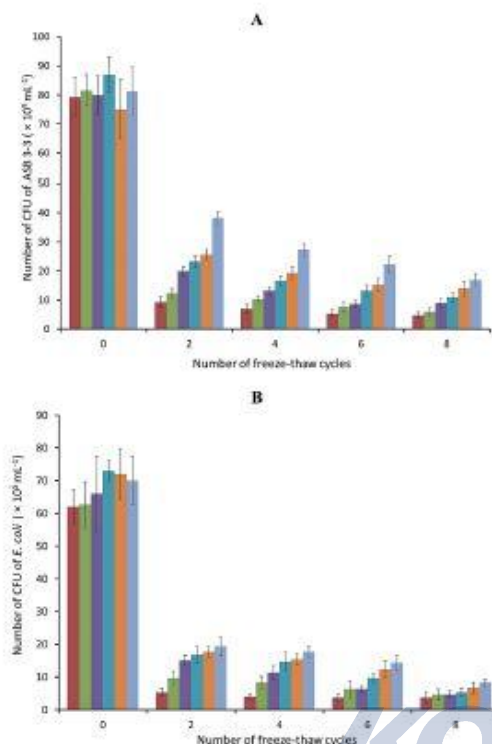


Fig. 6 Cryoprotective activity of the EPS on Arctic *Flavobacterium* sp. strain ASB 3-3 (A) and *E. coli* DH5 α (B) after 0, 2, 4, 6 and 8th freeze-thaw cycles (-74°C). The values shown are means \pm SDs from three experimental replicates. Maroon bars, absence of EPS; light green bars, 5.0 mg mL⁻¹ EPS; purple bars, 10 mg mL⁻¹ EPS; dark cyan bars, 20 mg mL⁻¹ EPS; light orange bars, 30 mg mL⁻¹ EPS; navy blue bars, 50 mg mL⁻¹ EPS.

after recurrent freeze-thaw cycles, the number of surviving cells of both strain ASB 3-3 and *E. coli* DH5 α was reduced with an increase in the number of freeze-thaw cycles in the presence/or absence of the purified EPS. In the presence of 50 mg mL⁻¹ purified EPS, the number of surviving cells of strain ASB 3-3 was reduced from 38.33 ± 2.05 to 27.33 ± 2.05 , 22.33 ± 2.86 and 17 ± 2.16 CFU $\times 10^{-5}$ mL⁻¹ after 4th, 6th and 8th freeze-thaw cycles, respectively, and that of *E. coli* DH5 α was reduced from 19.33 ± 2.86 to 17.66 ± 1.69 , 14.33 ± 2.05 and 8.33 ± 1.24 CFU $\times 10^{-5}$ mL⁻¹, respectively. The ecological roles of EPSs from bacteria are linked to their ecological niches and their natural environment from which they have been isolated.¹⁶ Freeze-thaw cycles are rather common in the polar regions of the Arctic and Antarctic environment and there are very few reports available in the aspect of cryoprotective effect of EPS isolated from polar bacteria.^{1,20} There has been no report on the cryoprotective activity of EPSs from Arctic soil bacteria. Our result showed that the EPS produced by the Arctic sea strain ASB 3-3 significantly

improved the survival of the strain during recurring freeze-thaw cycles, which suggests that the EPS produced by strain ASB 3-3 would be beneficial for the strain to adapt to the freeze-thaw polar environment. In addition, the EPS also promotes the survival rate of *E. coli*, which suggests that, this EPS might have biotechnological potential as a cryoprotective agent.

4. Conclusions

This work describes a novel EPS produced from a psychrotrophic Arctic soil bacterium *Flavobacterium* sp. ASB 3-3 grown on glycerol. The produced EPS polymer is a highly complex heteropolysaccharide composed of repeating units of glucose and galactose. The strain ASB 3-3 produces a high quantity of EPS and the EPS showed an excellent emulsifying and flocculating activity, suggesting its potential industrial utility in enhanced oil recovery or bioremediation of hydrocarbons and waste water treatment. This EPS also exhibits a significant cryoprotective effect on both *Flavobacterium* sp. ASB 3-3 and *E. coli* DH5 α , and it can be used as a microbial cryoprotective agent.

Acknowledgements

The study was partially supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (NRF-2013 R1A1A2A1 0004690), (NRF-2015 R1A2A2A0 4006014) and Korea Polar Research Institute (PE15030). This research was supported by the Bio & Medical Technology Development Program of the NRF funded by the Korean government, MISP (NRF-2015M3A9B8031831) and the Energy Efficiency & Resources of the Korea Institute of Energy Technology Evaluation and Planning (KETEP) grant funded by the Korea Government Ministry of Trade, Industry and Energy (20133030000300).

References

- 1 F. Freitas, V. D. Alves, J. Pais, N. Costa, C. Oliveira, L. Mafra, L. Hilliou, R. Oliveira and M. A. M. Reis, *Bioresour. Technol.*, 2009, **100**, 859–865.
- 2 I. Llamas, H. Amjres, J. A. Mata, E. Quesada and V. Béjar, *Molecules*, 2012, **17**, 7103.
- 3 A. Poli, G. Anzelmo and B. Nicolaus, *Mar. Drugs*, 2010, **8**, 1779.
- 4 G. Sathiyarayanan, V. Vignesh, G. Saibaba, A. Vinothkanna, K. Dineshkumar, M. B. Viswanathan and J. Selvin, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 22817–22827.
- 5 M. M. Camargo-de-Morais, S. A. F. Ramos, M. C. B. Pimentel, M. A. de Morais Jr and J. L. Lima Filho, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, **19**, 191–194.
- 6 L. Wang, F. Ma, Y. Qu, D. Sun, A. Li, J. Guo and B. Yu, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, **27**, 2559–2565.
- 7 U. J. Yun and H. D. Park, *Lett. Appl. Microbiol.*, 2003, **36**, 282–287.
- 8 P. L. Pham, I. Dupont, D. Roy, G. Lapointe and J. Cerning, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**, 2302–2310.

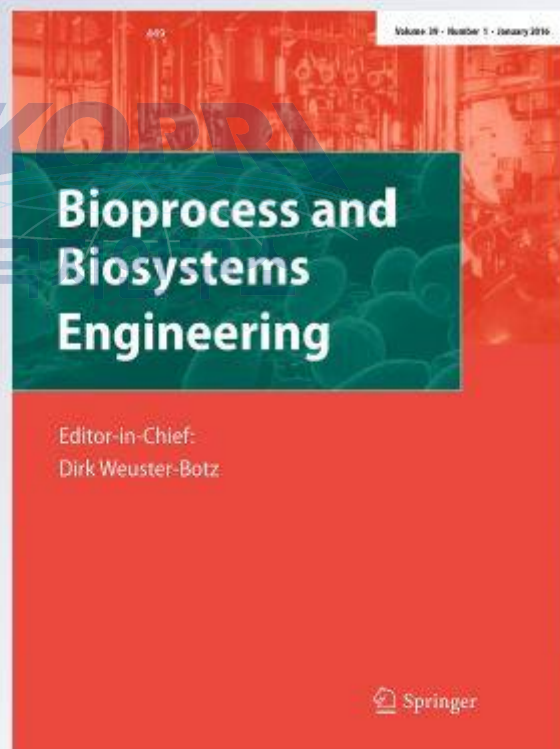
Sensitive change of iso-branched fatty acid (iso-15:0) in Bacillus pumilus PAMC 23174 in response to environmental changes

Da-Hye Yi, Ganesan Sathiyarayanan, Hyung Min Seo, Jung-Ho Kim, Shashi Kant Bhatia, Yun-Gon Kim, Sung-Hee Park, Ji-Young Jung, et al.

Bioprocess and Biosystems Engineering

ISSN 1615-7591
Volume 39
Number 1

Bioprocess Biosyst Eng (2016)
39:159-167
DOI 10.1007/s00449-015-1500-x



 Springer

Table 2 The ratio of anteiso- and iso- form fatty acids produced by *Bacillus pumilus* PAMC 23174 in each medium

Media	Growth temperature (°C)	Percentage of total fatty acid (%)					Anteiso/Iso ratio
		Iso-15:0	Anteiso-15:0	C16:0	Cy-C16:0	C17:1	
TSB (Leu)	30	51.0 ± 1.23	43.7 ± 2.04	0.4 ± 0.02	2.8 ± 0.11	2.1 ± 0.03	0.86
TSB (Ile)	30	36.3 ± 1.10	55.3 ± 1.95	0.2 ± 0.01	5.2 ± 0.21	3.1 ± 0.07	1.53
TSB (Val)	30	42.5 ± 1.41	54.4 ± 2.69	–	3.1 ± 0.16	–	1.28
TSB (Leu, Ile, Val)	30	47.9 ± 2.03	46.1 ± 1.51	0.8 ± 0.10	5.2 ± 0.09	–	0.96
TSB (Leu), cold shock	30	53.4 ± 2.11	46.1 ± 1.90	0.4 ± 0.05	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.86
TSB (Ile), cold shock	30	31.7 ± 1.45	67.6 ± 3.56	0.5 ± 0.04	0.2 ± 0.01	–	2.13
TSB (Val), cold shock	30	38.3 ± 0.77	61.2 ± 1.57	0.3 ± 0.05	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.01	1.60
TSB (Leu, Ile, Val), cold shock	30	36.6 ± 0.98	61.9 ± 2.32	0.6 ± 0.03	0.7 ± 0.02	0.2 ± 0.01	1.69

bacterial responses according to cold shock. When the cells were treated by cold shock, the anteiso/iso ratio was increased in all samples except leucine-added sample and also the medium with only leucine exhibits anteiso/iso ratio about 0.86 after the cold shock treatment. This might be due to leucine being as a precursor for iso-form fatty acid synthesis with 15 and 17 carbons. In previous reports, anteiso-form fatty acids were increased in order to withstand at low temperatures, but the change in the ratio was relatively trivial when compared to other bacterial strains. The overall nutritional effect especially leucine addition seemed to be superior to the effect of temperature by cold shock.

Conclusions

In this study, we investigated that, how bacteria can live and change their metabolic activities in polar environment at different temperatures. The polar bacterium *B. pumilus* exhibits a unique and simple lipid pattern when compared to other polar and non-polar strains and its iso-15:0 syntheses was sensitively changed in response to varying environmental conditions which further affects the balance of anteiso- and iso-form fatty acids. The synthesis of simple pattern of total fatty acids in *B. pumilus* is unclear and this strain could be useful to study about the changes of fatty acid synthesis in polar bacteria due to the different environmental conditions and nutritional fluctuations. Further, this study also provides evidence for the adaptation of bacteria in an extreme condition and their metabolic rearrangements.

Acknowledgments The study was partially supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (NRF-2015M1A5A1046168), (NRF-2015M1A5A1037196) and Korea Polar Research Institute (PE15030). This research was supported by Advanced Production Technology Development Program, Ministry of Agriculture, Food

and Rural Affairs, Republic of Korea (1201349190011) and the Energy Efficiency & Resources of the Korea Institute of Energy Technology Evaluation and Planning (KETEP) grant funded by the Korea Government Ministry of Trade, Industry and Energy (20133030000300).

References

- Kempf B, Bremer E (1998) Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol* 170(5):319–330
- Zhu K, Ding X, Julotok M, Wilkinson BJ (2005) Exogenous isoleucine and fatty acid shortening ensure the high content of anteiso-C-15:0 fatty acid required for low-temperature growth of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 71(12):8002–8007
- Giovis ES, McDowell DA, Blair IS, Wilkinson BJ (2007) Role of branched-chain fatty acids in pH stress tolerance in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 73(3):997–1001
- Pepi M, Heipieper HU, Fischer J, Ruta M, Volterrani M, Focardi SE (2008) Membrane fatty acids adaptive profile in the simultaneous presence of arsenic and toluene in *Bacillus* sp ORAs2 and *Pseudomonas* sp ORAs5 strains. *Extremophiles* 12(3):343–349
- Kaneda T (1967) Fatty acids in the genus *Bacillus*. I. Iso- and anteiso-fatty acids as characteristic constituents of lipids in 10 species. *J Bacteriol* 93(3):894–903
- Kaneda T (1963) Valine as a source of the branched short chain precursor in the biosynthesis of iso-C14, iso-C15, iso-C16 and iso-C17 fatty acids by *Bacillus subtilis*. *Biochem Biophys Res Commun* 10(3):283–287
- Murata T (1978) Analysis of fatty acid methyl esters by a gas-liquid chromatography-chemical ionization mass spectrometry computer system. *J Lipid Res* 19(2):166–171
- Takemoto Y, Suzuki Y, Horibe R, Shimozawa N, Wanders RJ, Kondo N (2003) Gas chromatography/mass spectrometry analysis of very long chain fatty acids, docosahexaenoic acid, phytanic acid and plasmalogen for the screening of peroxisomal disorders. *Brain Dev* 25(7):481–487
- Delille D, Perret E (1989) Influence of temperature on the growth potential of Southern polar marine bacteria. *Microb Ecol* 18(2):117–123
- Knoblauch C, Jorgensen BB (1999) Effect of temperature on sulphate reduction, growth rate and growth yield in five psychrophilic sulphate-reducing bacteria from Arctic sediments. *Environ Microbiol* 1(5):457–467

PAPER

Cite this: *RSC Adv.*, 2016, 6, 96870

Metal removal and reduction potential of an exopolysaccharide produced by Arctic psychrotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. PAMC 28620†

Ganesan Sathiyarayanan,^a Shashi Kant Bhatia,^a Hyun Joong Kim,^a Jung-Ho Kim,^a Jong-Min Jeon,^a Yun-Gon Kim,^b Sung-Hee Park,^c Sang Hyun Lee,^a Yoo Kyung Lee^d and Yung-Hun Yang^{*ae}

An exopolysaccharide (EPS) was produced from psychrotrophic Arctic glacier fore-field soil bacterium *Pseudomonas* sp. PAMC 28620 using glycerol enriched medium and the maximum productivity $7.24 \pm 0.31 \text{ g L}^{-1}$ of EPS was obtained after 168 h of fermentation. The EPS was purified and analysed by HPLC, GC-MS, FT-IR, ^1H and ^{13}C NMR. The EPS obtained from Arctic strain PAMC 28620 exhibits a distinctive structural composition and the constituent sugar monomers are rhamnose, galactose, glucose, fucose, mannose and ribose. The purified EPS has shown excellent flocculating and emulsification capacities with promising biotechnological and ecological implications. From the metal removal experiments, the EPS exhibited remarkable metal adsorption (99%) potential adopting the order $\text{Fe}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$. FE-SEM combined with EDX analysis has shown that the metal ions were complexed or immobilized onto the EPS matrix and further reduced to nanoparticles (150–950 nm). This study is significant in terms of metal removal and reduction potential of Arctic bacterial EPS and the possible ecological roles of the EPS in Arctic environment.

Received 7th July 2016
Accepted 29th September 2016

DOI: 10.1039/c6ra17450g

www.rsc.org/advances

1. Introduction

Extremophilic bacteria are life forms that thrive in extreme conditions of temperature, pH, ionic concentration (salt/sugar), pressure and ionizing radiation. In particular, most of the bacteria that exist in polar environments produce exopolysaccharides (EPSs) as cryoprotectants to survive in extreme cold weather condition and these bacteria have developed delicate mechanisms that allow them to deal with various kinds of environmental stresses.^{1,2} The structural features of some bacterial EPSs from the Arctic and Antarctic environments have been previously studied,^{3–7} however, there have been very few reports on their ecological and biotechnological implications.^{1,8}

Bacterial and algal EPSs are believed to be essential for the aggregate development, adhesion to surfaces, biofilm formation, and nutrient uptake (organic or inorganic) in the Arctic/Antarctic environment.^{9,10} At present, bacteria from polar regions are being recognized as a rich source of various biological macromolecules that are of special interest towards various biotechnological applications.^{7,10} However, there are very few reports on the EPSs from Arctic glacier fore-field soil bacteria and the structure, ecological and biotechnological implications of these EPSs are yet to be identified.

The field of bacterial EPSs is well-established for years and EPSs are well known for numerous viable applications in various industries like pharmaceuticals, food, cosmetics, oil recovery, paper industry, and also in bioremediation.^{11,12} Also, there has been a growing interest for the exploration of unique EPSs and some of them are now being sold in market such as bacterial alginates, gellan, pullulan, xanthan, welan, dextran levan etc.^{13,12} EPS-based polymers are completely biodegradable and their catabolic intermediates are environmentally benign in nature. It has also been reported that most of the bacterial EPSs could act as flocculating, emulsifying, and metal removal (bio-sorbents) agents in wastewater treatment, hydrocarbon degradation, and heavy metal bioremediation, respectively.^{7,13,14} The process of metal bioremediation must be simple, reasonably inexpensive, and ecofriendly in nature.¹⁵ Due to the economic

^aDepartment of Biological Engineering, College of Engineering, Konkuk University, Seoul 143-701, South Korea. E-mail: seokn@konkuk.ac.kr; Fax: +82-2-3437-8360; Tel: +82-2-450-3936

^bDepartment of Chemical Engineering, Soongsil University, 511 Sangdo-dong, Seoul 156-743, South Korea

^cFood Ingredients Center, Foods R&D, Cheljedang Guro-dong, Guro-Gu, Seoul 152-051, South Korea

^dDivision of Life Sciences, Korea Polar Research Institute, 26 Songdomirae-ro, Yeosu-gu, Incheon, 21990 South Korea

^eInstitute for Ubiquitous Information Technology and Applications Konkuk University, Seoul 143-701, South Korea

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c6ra17450g

gellan,⁶⁰ levan,⁶¹ succinoglycan⁶² and other structurally unknown EPS⁶³ have been used to synthesize various metallic nanoparticles. To our knowledge, there is no report on the metal reduction led by Arctic/Antarctic bacterial EPSs. Although, the precise mechanism of reduction and stabilization of metal nanoparticles by EPS still remain to be elucidated. The behavior of trace metal nanoparticles in polar environment is needed to be explored and these nanomaterials may play a vital role in the fundamental processes at the water–mineral–cell interface in Arctic glacier environment.

4. Conclusions

The EPS purified from Arctic strain *Pseudomonas* sp. PAMC 28620 exhibits a distinctive and novel structural composition with rare sugars. In addition, the purified EPS had shown a significant emulsification and flocculating properties suggesting its ecological roles in the polar environments. For the first time, the metal complexation and reducing nature of EPS purified from Arctic bacterium (*Pseudomonas* sp. PAMC 28620) were analyzed. The EPS has exhibited a great capacity to bind with range of metal cations due to polyanionic nature and its metal removal potential is highly commendable. The metal ions were almost completely removed from the aqueous solution and this EPS can be used to develop an effective biosorbent for the heavy metal removal from aqueous solutions. During the metal absorption, the metal cations were reduced to nanoparticles (150–950 nm) and immobilized onto the EPS matrix. The significant effect of EPS in the metal reduction (as nanoparticles) suggests that bacterial EPS could have an important role in biogeochemical cycling of trace metals in the Arctic environment.

Acknowledgements

The author G. Sathiyarayanan would like to thank KU Brain Pool Fellowship Program (2016–2017) of Konkuk University, Seoul, South Korea. The study was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (NRF-2015R1A2A2A04006014) and (NRF-2015M1A5A1037196), and Korea Polar Research Institute (PE16030). This study is also partially supported by Advanced Production Technology Development Program, Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Republic of Korea (1201349190011).

References

- 1 G. Qin, L. Zhu, X. Chen, P. G. Wang and Y. Zhang, *Microbiology*, 2007, **153**, 1566–1572.
- 2 M. C. A. Nichols, S. Garon, J. P. Bowman, G. Raguénès and J. Guézennec, *J. Appl. Microbiol.*, 2004, **96**, 1057–1066.
- 3 G. Sathiyarayanan, D.-H. Yi, S. K. Bhatia, J.-H. Kim, H. M. Seo, Y.-G. Kim, S.-H. Park, D. Jeong, S. Jung, J.-Y. Jung, Y. K. Lee and Y. H. Yang, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 84492–84502.
- 4 C. Nichols, S. Lardière, J. Bowman, P. Nichols, J. A. E. Gibson and J. Guézennec, *Microb. Ecol.*, 2005, **49**, 578–589.
- 5 S. Carillo, A. Casillo, G. Pieretti, E. Parrilli, F. Sannino, M. Bayer-Giraldi, S. Cosconati, E. Novellino, M. Ewert, J. W. Deming, R. Lanzetta, G. Marino, M. Parrilli, A. Randazzo, M. L. Tutino and M. M. Corsaro, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 179–189.
- 6 M. M. Corsaro, R. Lanzetta, E. Parrilli, M. Parrilli, M. L. Tutino and S. Um marino, *J. Bacteriol.*, 2004, **186**, 29–34.
- 7 A. Poli, G. Anzelmo and B. Nicolaus, *Mar. Drugs*, 2010, **8**, 1779.
- 8 S.-B. Liu, X.-L. Chen, H.-L. He, X.-Y. Zhang, B.-B. Xie, Y. Yu, B. Chen, B.-C. Zhou and Y.-Z. Zhang, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2013, **79**, 224–230.
- 9 C. Krembs, H. Eicken, K. Junge and J. W. Deming, *Deep Sea Res., Part 1*, 2002, **49**, 2163–2181.
- 10 A.-M. Gounot, *J. Appl. Bacteriol.*, 1991, **71**, 386–397.
- 11 C. Roca, V. D. Alves, F. Freitas and M. A. Reis, *Front. Microbiol.*, 2015, **6**, 288.
- 12 U. U. Nwodo, E. Green and A. I. Okoh, *Int. J. Mol. Sci.*, 2012, **13**, 14002–14015.
- 13 I. Llamas, H. Amjres, J. A. Mata, E. Quesada and V. Béjar, *Molecules*, 2012, **17**, 7103.
- 14 K. Okaiyeto, U. U. Nwodo, I. V. Mabinya and A. I. Okoh, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2013, **10**, 5097–5110.
- 15 D. H. Nies, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999, **51**, 730–750.
- 16 M. Loaçc, R. Olier and J. Guezennec, *Water Res.*, 1997, **31**, 1171–1179.
- 17 J. Morillo, M. Aguilera, A. Ramos-Cormenzana and M. Monteoliva-Sánchez, *Curr. Microbiol.*, 2006, **53**, 189–193.
- 18 H. Maalje, N. Hmidet, C. Boisset, L. Buon, A. Heyraud and M. Nasri, *J. Appl. Microbiol.*, 2015, **118**, 356–367.
- 19 J. Morillo Pérez, R. Garcia-Ribera, T. Quesada, M. Aguilera, A. Ramos-Cormenzana and M. Monteoliva-Sánchez, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, **24**, 2699–2704.
- 20 M. Polak-Berecka, D. Szawajgier and A. Waško, *J. Food Sci.*, 2014, **79**, T2404–T2408.
- 21 S. Pereira, E. Michelletti, A. Zille, A. Santos, P. Moradas-Ferreira, P. Tamagnini and R. De Philippis, *Microbiology*, 2011, **157**, 451–458.
- 22 C. S. Hassler, E. Alasonati, C. A. Mancuso Nichols and V. I. Slaveykova, *Mar. Chem.*, 2011, **123**, 88–98.
- 23 O. Braissant, A. W. Decho, C. Dupraz, C. Glunk, K. M. Przekop and P. T. Visscher, *Geobiology*, 2007, **5**, 401–411.
- 24 F. Kang, P. J. Alvarez and D. Zhu, *Environ. Sci. Technol.*, 2014, **48**, 316–322.
- 25 C. E. Raja, K. Anbazhagan and G. S. Selvam, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, **22**, 577–585.
- 26 S. Choudhary and P. Sar, *Bioresour. Technol.*, 2009, **100**, 2482–2492.
- 27 S. H. A. Hassan, R. N. N. Abskharon, S. M. F. Gad El-Rab and A. A. M. Shoreit, *J. Basic Microbiol.*, 2008, **48**, 168–176.
- 28 A. M. Marqués, I. Estañol, J. M. Alsina, C. Fusté, D. Simon-Pujol, J. Guinea and F. Congregado, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1986, **52**, 1221–1223.



1. 이 보고서는 극지연구소 위탁과제 연구결과 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 위탁연구과제로 수행한 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.