TSPM15040-078-6

북극해 환경변화에 따른 해빙 미소생물들의 적응 기작 및 활용연구

Study of cold-adaptation of sea ice microorganisms under Arctic environmental changes



부경대학교 산학협력단

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 "양극해 환경변화 이해 및 활용연구"과제의 위탁연구 "북극해 환경변화에 따른 해빙 미소생물들의 적응 기작 및 활용연구"과제의 최종보고서로 제출합니다.



2016 . 07 . 14 .

총괄연구책임자 : 강성호

위탁연구기관명 : 부경대학교 산학협력단

위탁연구책임자 : 김 학 준

위탁참여연구원 : 구 본 원

" : 김 동 우

" : 김 도 아

보고서 초록

위탁연구과제명	위탁연구과제명 북극해 환경변화에 따른 해빙 미소생물들의 적응 기작 및 활용연구					
위탁연구책임자	김 학 준	해당단계 참여연구원수	4명	해당단계 연구비	4,0	00 만원
연구기관명 및 소속부서명	부경대 산학협	학교 적단	참여기업명			
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :			
요약(연구결과를	중심으로 개조식 5	500자이내)			보고서 면수	55
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이대) 보고서 면수 55 ○ 해빙 미세조류 및 박테리아는 해빙권의 일원으로 해빙의 구조에 큰 영향을 미치는 생물 구성요소임. 이에 대한 연구는 극히 미미한 수준임						
색인어	한 글 해빙,세	포외다당체, 얼	음결합, 항산화 활성	, 동결보존		
(각 5개 이상) 영 어 Sea ice, Exopolysaccharide, Ice-binding, Antioxidant activity, Cryopreservation					preservation	

요 약 문

- I.제 목
- 북극해 환경변화에 따른 해빙 미소생물들의 적응 기작 및 활용연구
- Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성
- O 목적
- EPS, 얼음결합 당단백질 분비 해빙 미세조류 확보 및 물질의 특성 분석
- O 필요성
- 기술적 측면에서 보자면, 현재 해빙은 계속 하여 감소하고 있으며 해빙 감소 속도 또한 가속화 되고 있음. 이로 인하여 표층수의 염분도가 감소하고, 염분도가 비교 적 낮은 북태평양 표층수의 유입과 주변 대륙의 강에서 유입되는 담수의 양이 증 가로 인해 저염화 현상이 일어나고 이 때문에 전 지구적인 열염분 순환 시스템에 직접적으로 영향을 미치게 됨
- 극지 해역의 환경변화로 인해 해빙 미세조류와 해빙 형성 및 이에 따른 해빙 생태 계에 미치는 영향을 분석하는 것은 향후 극지 해역의 생태계변화를 이해하는데 필 수적인 연구가 될 것임
- 경제산업적 측면에서 보자면, 북극해빙 감소가 지속될 경우 2040년대까지 최소 400
 조 달러의 기후변화 비용이 발생할 것으로 예상됨. 극지연구를 통한 과학적 근거
 자료는 이런 기후변화에 따른 대응책 마련에 활용될 전략적 자산임

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

O 해빙 미소생물 배양

- EPS(exopolysaccharide) 및 glycoprotein 생성 해빙 미소생물 확보 및 배양
- 해빙 미세조류 대량배양 시스템 구축
- 배양 조건에 따른 exopolysaccharides 및 단백질 분비 연구 - 배양 조건(온도, 염도)에 따른 EPS 및 단백질 생성능 비교

- 미소생물이 생성하는 EPS 조성 문헌 자료 수집
- O Ethanol 침전법을 통한 EPS 추출 및 분석
- 최적 배양 조건에서의 EPS 추출
- 온도 이력 활성과 얼음 재결정화 억제 활성, 얼음 흡착 유지를 통한 얼음결합 특성 분석
- 항산화 활성과 동결보존능 확인

IV. 연구개발결과

- O 해빙 미소생물들의 EPS 성분 및 특성 분석
- Synedropsis sp.가 분비하는 세포외다당(EPS_S)은 성분원소 분석에서 황의 비율 5.43%로 높게 나타났으며 황산 에스터 함량 역시 40.4%로 높게 나타난 것으로 보 아 황산 퓨칸 (sulfated fucans)으로 생각됨
- 성분당 분석을 통하여 주요 성분당으로 fucose(36.2%), rhamnose(27.9%), xylose(23.2%)가 나왔으며 분광학적 분석 결과가 이를 지지해줌

O EPS 얼음결합 특성 분석

 조류 배양액 추출 EPS는 xanthan gum과, 박테리아 배양액 추출 EPS는 배양액과 결정 모양이 유사했으나 모든 EPS에서 온도 이력 활성은 나타내지 않았고, 얼음 재결정화 억제 활성 역시 나타내지 않았음

얼음 흡착 유지 실험을 통하여 구한 xanthan gum과 EPS_S의 Keffs (0.42±0.02, 0.44±0.02), Keffe (0.41±0.01, 0.42±0.01) 를 이용하여 Is를 계산한 결과 거의 1과 비 슷한 값이므로 이는 얼음과 직접적 결합을 하지 않는 것으로 생각됨

O EPS의 생리활성

- EPS_F는 수산화 라디칼 소거능에서 다른 EPS와 비슷한 항산화 효과를 나타내었으
 나 DPPH 라디칼 소거능에서는 대조구로 사용된 xanthan gum에 비하여 15배 높
 은 항산화 활성을 나타내었음
- EPS_F 1%의 경우 24시간(70.66±5.4%)과 48시간(66.13±2.0%)에서 모두 높은 생존율
 을 보였으나, EPS_S와 EPS_P는 예상과는 달리 생존율이 모두 0%가 나왔는데 이는
 두 EPS가 모두 항균성이 있다는 것을 보여주는 결과임

V. 연구개발결과의 활용계획

- O 북극 해빙 미소생물의 배양 기술 확보에 기초 자료로 활용. 또 환경유전체 분석을 통한 유용유전자 검색 및 적응 기작 관련 유용 저온효소 발굴 연구
- O EPS의 구성성분과 생리적 활성을 분석함으로 해빙 EPS의 역할 규명에 기초 자료 제공

- 해빙 생태계 변화를 분석함으로써 향후 해빙 감소와 지구 온난화 등이 초래할 막 대한 경제적 손실에 선제적 대응 가능
- 건강보조제, 식품 등에 활용 가능한 exopolysaccharide의 산업화에 도움이 될 것 으로 예상



S U M M A R Y (영 문 요 약 문)

I. Title

- O Application research and adaption mecanism of sea ice meiofauna on the Arctic ocean environmental change.
- II. Purpose and Necessity of R&D
- O In terms of impact on technology, now sea ice is on the decrease and the rate of decrease also accelerates. This resulted in the decrease of salinity of surface layer water. The inflow of the North Pacific surface layer water and the increase of fresh water from the river of surrounding continent that has a relatively low level of salinity causes the Salinity Decrease phenomenon. Because of this, global thermohaline circulation is directly affected.
- O Because of environmental change in Arctic Ice-covered Waters, the analysis of effects on the sea ice ecosystem by a sea ice microalgae and a formation of sea ice will be an essential research to understand the Ecosystem Change in Arctic Ice-covered Waters.
- O In terms of impact on economy industry, if the decrease of Sea ice in the Arctic continues, It will be expected to cost at least 400 trillion dollars by 2040s. A scientific evidentiary material is strategic platform that will be utilized in accordance with these Climatic Change.
- III. Contents and Extent of R&D
- O Sea ice microorganisms culture
- Securing of EPS and/or ice-binding protein-producing sea ice microorganisms
- Sea ice microalgae culture system constructed bulk

- O EPS and ice-binding protein extraction from culture media of microorganism at various conditions
- Comparison of EPS and ice-binding protein production at various conditions
- Collection of reference material about EPS composition from microorganism

O EPS extraction used Ethanol precipitation and analysis

- EPS extraction at the optimal culture condition
- Ice-binding characterization of EPS though the temperature history activity, ice-recrystallization inhibition activity and ice absorption test
- IV. R&D Results
- O EPS composition and characterization of sea ice microorganisms
- Exopolysaccharides of Synedropsis sp. is sulfated fucans because that is largely composed of sulfur(5.43%) and sulfuric ester(40.4%).
- Component sugar analysis and microscopic analysis show that main polysaccharides is fucose(36.2%) and rhamnose(27.9%), xylose(23.2%) and minor polysaccharides is galactose(11.2%) and glucose(1.4%).

O Ice-binding characterization of EPS

- Ice-crystall shape of extracted EPS from the algae culture media is similar to xanthan gum and that from the bacteria culture media looks like bacteria culture media. But all EPS doesn't show temperature history activity and ice-recrystallization inhibition activity.
- In ice absorption test, Is values of xanthan gum and EPS_S are 0.97±0.05 and 0.95±0.08. Because there is similar 1, we think that EPS doesn't bind to ice.

O Bioactivity of EPS

- Hydroxyl radical scavenging activity of EPS_F is similar to that other of EPSs, while DPPH radical scavenging activity is a 15-fold higher activity compared to the xanthan gum used as a control.
- EPS_F 1% showed very high survival rate (24hours; 70.66±5.4% and 48hours; 66.13±2.0%), while EPS_S and EPS_P showed 0% survival rate. These result are not as expected. Thus we concluded that EPS_S and EPS_P have antibacterial activity from the results.
- V. Application Plans of R&D Results

- O Utilization as basic data to culture technology secure of sea ice microorganism in the Arctic Ocean.
- O Search for the useful genes through the analysis of environmental dielectric and research for excavation of cold-active enzyme that is related to adaptation mechanism.
- O Supplying preliminary data to investigate the role of sea ice EPS by analyzing its components and physiological activity.
- O Correspondence possibility for numerous economic loss caused by the decrease of sea ice and the global warming in the future.
- O Expectation that is helpful for industrialization of exopolysaccharide that can be used for food and dietary supp



목 차

제	1 장 서론
	제 1 절 필요성
	제 2 절 목적
	제 3 절 범위
제	2 장 국내외 기술개발 현황
	제 1 절 국외 기술개발 현황
	제 2 절 국내 기술개발 현황
	제 3 절 종합 결론
제	3 장 연구개발수행 내용 및 결과
	제 1 절 연구개발 수행 내용
	제 2 절 연구개발 수행 결과
- 7]]	
~1 ·	4 성 연구개럴국표 일정도 및 내외가역도 ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
제	5 장 연구개발결과의 활용계획
	제 1 절 연구결과의 활용방안
	제 2 절 기대성과 및 파급효과
제	6 장 잠고분헌

제 1 장 서론

제 1 절 필요성

1. 기술적 측면

- 2012년 초 보고에 의하면, 지난 50년대 이후 북극은 연 평균 2-3℃의 온도가 상승하였고 겨 울철에는 4℃까지 상승하였음. 무엇보다도 더욱 심각한 현상은 북극해의 해빙 감소가 급격 히 진행되고 있는 사실임. 1979년 위성 관측이 시작된 이후 21세기 들어 해빙 감소 속도가 가속화되어 2007년 9월 이후 지난 5년 동안 북극해의 얼음은 과거에 비교하여 약 40 %가 감소하였음. 2007년 9월 16일 서북극해는 417만 km²로 역대 최소 면적으로 감소하였고 2011년 9월 15일에는 4.33만 km²로 역대 2번째로 해빙이 감소하였음
- 최근 급격히 해빙이 녹으면서 표층수의 염분도가 감소하고 염분도가 비교적 낮은 북태평양 표층수의 유입이 증가하는 것 이외에 주변 대륙의 강수량이 증가하면서 대규모 강에서 유 입되는 담수의 유입이 증가하고 있음. 이렇게 지구온난화에 의한 서북극해 표층수의 저염화 현상은 북극해 해빙형성 및 북대서양 심층수의 생성뿐 아니라 전 지구적인 열염분 순환시 스템에 직접적으로 영향을 미치게 됨 (남승일 외, 2012)
- 해빙 미세조류, 박테리아 등은 해빙 형성 중에 얼음의 물리·화학적 특성을 바꿈으로서 해빙
 을 다양한 생명체가 서식할 수 있는 생태계로 만듬
- O 극지 해역의 환경변화로 인해 해빙 미세조류와 해빙 형성 및 이에 따른 해빙 생태계에 미 치는 영향을 분석하는 것은 향후 극지 해역의 생태계변화를 이해하는 데 필수적인 연구가 될 것임
- 2. 경제산업적 측면
- 지구 시스템의 핵심적 기능을 수행하는 북극의 해빙감소는 막대한 경제적 비용을 초래함.
 지구 온난화로 인한 해빙감소, 이에 따른 대륙붕 및 영구동토층에서 유출되는 메탄양은 지 구 온난화를 가속시킬 것으로 예상됨
- 북극해빙 감소로 단기적으로는 일부 산업의 경제적 이익이 발생할 수 있으나 현재와 같은 변화가 지속될 경우, 2040년대까지 최소 400조 달러의 기후변화 비용을 부담해야 할 것으로 예상됨
- 극지연구를 통한 과학적 근거 자료는 기후변화 대응책 마련에 활용될 전략적 자산임 (Whiteman, G. et al., 2013)
- 3. 사회문화적 측면
- 급격한 환경변화로 인해 환경오염, 동·식물 멸종과 같은 생태계 재앙 등 심각한 경제·문화 적 손실을 야기할 것으로 예상됨. 이와 관련하여 정부차원의 다각적이고 체계적인 대응책 마련이 시급하다고 생각됨

O 양극해 환경변화 연구의 결과를 바탕으로 선제적인 환경변화 대응책을 마련함으로써 국민 삶의 질 향상에 부응하고 안전한 사회 조성에 기여할 수 있음

제 2 절 목적

○ 해빙미소생물의 세포외 다당체 연구는 극히 제한적이며 이들이 해빙의 구조와 생태계에 미 치는 영향에 대한 연구는 더욱 미진한 상태임. 따라서 세포외 다당체를 생산하는 해빙 미소 생물을 확보하고 이들이 환경변화에 따라 세포외다당체와 결빙방지단백질 생산이 어떻게 변화되는지를 살펴볼 필요성이 높음. 이는 세포외다당체와 결빙방지단백질이 해빙의 구조에 미치는 영향에 관한 실험을 할 때 기초자료 및 실험설계의 바탕이 될 수 있을 것으로 생각 됨

제 3 절 범위

1. 극지 해빙 미소생물 배양
O 극지 해빙 우점 미세조류 및 박테리아 각 5종 배양
O EPS 및 단백질 분비 종 각각 2 종선별

2. 배양 조건에 따른 EPS, 단백질 분비 연구 22 구소
O 온도, 염도, 광량 등 환경 변화에 따른 미세조류 및 박테리아 배양
O 각 배양 조건에서 확보한 EPS의 당 조성 분석 및 세포외 분비 단백질의 조성 분석

3. 극지 해빙 미세조류 대량배양
O 대량 배양 시스템 구축
O 각 조건별 대량배양 실시

4. EPS 및 얼음결합 당단백질 추출
O EPS 및 얼음결합 당단백질 추출
O EPS의 당 조성 및 세포외 분비 단백질 검증

5. EPS와 얼음결합 당단백질 조성에 따른 해빙구조 분석 O Small-scale cold-finger 방법을 이용한 해빙 형성 및 해빙 미세구조 분석

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국외 기술개발 현황

1. 북극 해빙 구조와 해빙 미소생물

○ 북극 해빙의 감소와 북극생태계의 급격한 변화

- 해빙의 감소와 얇아짐에 따라 더 많은 태양복사선이 해양표층을 통과하므로 바닷물의 온
 도가 상승하고 있음
- 실제 북극 우점 동물 플랑크톤인 요각류 Calanus hyperboreus 와 C. glaciali 가 대서양
 종인 C. finmarchicus 로 대치되고 있음. 또한 북극 대구 Arctogadus glacialis 도 대서양
 어종인 Gadus morhua 로 바뀌고 있음 (Shiermeier, 2012)
- 해빙의 구조형성에 영향을 미치는 해빙 미소생물에 대한 연구는 미국 워싱턴 주립대의 Deming 교수팀에서 주도적으로 수행 중임 (Krembs et al., 2011)
 - 북극 해빙 미세조류인 *Melosira artica* 가 생산하는 EPS가 해빙의 내부구조를 더욱 복잡 하게 만듦으로써 서식가능하게 만들며 따라서 일차 생산이 높아짐
 - 해빙내 EPS가 영양분의 유출을 막고 포식자로부터 미소생물을 보호하며 미소생물들이 쉽
 게 이동할 수 있는 공간을 만드는 것으로 보임
 - EPS외에 세포외 당단백질도 해빙내부의 염수통로 형성에 상당한 기여를 하는 것으로 알 려져 있지만 EPS와 상호작용에 대한 연구는 아직 미진함
- 해빙 미소생물의 세포외 분비 단백질에 대한 연구는 미국 네바다주립대의 Raymond 교수가 주도적으로 수행 중임 (Raymond, 2011)
 - 남극해빙 박테리아와 미세조류의 얼음결합 단백질이 얼음 형성에 영향을 끼치며 특히 염
 수통로를 형성하여 영양분들이 염수통로에 더 많이 잔류하도록 하는 것으로 보임
 - 대부분의 해빙 미세조류와 박테리아가 얼음결합 단백질을 생산할 수 있는 것으로 보고되
 었지만 실제 분비되는 지에 대한 연구는 미진함
 - 또한 얼음결합 단백질이 해빙의 형성과 구조에 미치는 영향에 대한 연구도 초기 상태임

2. 호냉성 해빙생물의 저온 및 환경변화 적응

- 환경변화와 적응 기작에 대한 분자생물학적, 전사체적, 단백질체학적 연구가 활발히 수행 중에 있음
- 특히 해빙 생태계와 대기를 연결하는 해빙 미세조류의 DMSP 생산과 관련한 연구가 주목 을 끌고 있음. 생물기원 기체인 DMS는 구름 응결핵으로 작용하여 기온을 낮추는데 기여하 는 것으로 생각됨. 또한 DMSP 생산을 분자수준에서 규명하기 위한 DMSP 효소의 구조 연 구의 결과가 본격적으로 나오기 시작함. 해양생태계의 변화는 DMS 발생량에 영향을 미칠 것으로 예상되며 이에 대한 연구가 수행중임

제 2 절 국내 기술개발 현황

- 1. 우리나라의 해빙 연구는 주로 해빙과 해빙생태계의 변화 연구 수행
- 극지연구소를 중심으로 인공위성 원격탐사를 이용한 극지해빙의 변동 및 해색 분석을 통한 플랑크톤의 시공간 분포 특성파악 연구
- 베링-척치해 식물플랑크톤의 군집구조 파악 및 색소분석, 일차생산량에 영향을 주는 물리화 학적 요인을 파악하는 연구 수행
- 2. 생명공학적 측면에서 해빙서식 호냉성 생물연구에 치중
- 극지연구소를 중심으로 남·북극 미세조류, 박테리아, 지의류 등을 확보하고 이에 대한 활용 연구에 치중
- O 특히 극지고유 유전자원 확보 및 이용기술 개발 사업을 통해 BT분야에서 사업화가 가능한 유용물질과 신소재 개발을 수행하여 왔으면 일부는 바이오산업 소재로 활용되는 등 성과를 달성한 바 있음

제 3 절 종합 결론



- 극지해양환경 변화가 극지 해빙의 구조에 미치는 영향을 생물학적 관점에서 연구
 - 해빙 미세조류 및 박테리아는 해빙권의 일원으로 해빙의 구조에 큰 영향을 미치는 생물 구성요소임. 이에 대한 연구는 극히 미미한 수준임
 - 극지는 환경변화가 급격히 일어날 수 있는 지역으로 환경변화에 따라 해빙의 구조는 생태
 계에 영향을 주고 결국 지구 전환경과 생태계에 미치는 파급효과도 높음
 - 본 연구팀은 극지 생물에 대한 높은 이해와 유용물질 (결빙방지 단백질, 세포외다당체) 분
 리 경험을 바탕으로 실제 환경변화에 따른 해빙의 구조를 실험실 수준에서 모의함으로써
 환경변화와 해빙의 구조 변화 연구가 가능함
 - 이를 통해 환경변화가 극지 해빙 구조 나아가 생태계에 미치는 영향에 대한 기초자료 제
 공

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발 수행 내용

1. 문헌 조사를 통한 선행연구 분석

가. Bacteria에서 EPS 및 glycoprotein 생성에 관한 선행연구

- 나. EPS를 생산하는 미생물
- 2. 해빙 미소생물 분양 및 배양
 - 가. 해빙 미소생물 선별 및 배양
 - (1) 해빙 미세조류

사용 조류는 Synedropsis sp.와 Porosira pseudodenticulata이다. Synedropsis sp.는 기 본 배지 및 염도변화에 따른 EPS 추출량 비교 실험에서 f/2 배지 (Guilard R.R.L. et al. 1962) 를 사용하였다. Seed culture는 두 조류 모두 2℃, 34‰ 으로 실시하였고, 본배양은 seed culture 한것을 103cells/ml로 희석하여 총 네가지 환경(①2℃,34‰ ②2℃,70‰ ③-3℃,34‰ ④-3℃,70‰)에서 세 번씩 실시하였다.

사용 균주는 Flavobacterium frigoris PS1으로 그람 음성균이며 남극 맥머도 앞바다의 해빙에서 분리된 박테리아이다. 기본 배지는 Marine broth(Difco 2216)를 사용하였고, 염 도 (NaCl)변화에 따른 EPS 추출량 비교 실험에서만 염도 조절이 가능한 Luria-Bertani broth를 사용하였다. Seed culture는 5℃에서 배양하였고 본 배양은 seed culture를 1:100 희석하여 5℃에서 200rpm으로 실시하였다. 대조구로 Colwellia psychrerythreae를 사용하 였다.

나. 해빙 미소생물의 최적 성장, 광합성 활성 및 EPS 생산 조건

(1) 생존률 측정

미세조류의 생존률 측정은 다음과 같이 하였다. Tryphan Blue 1% stock solution 3mL 과 PBS 7mL을 혼합하여 Tryphan Blue working solution을 제조한다. 세포부유액 (2~5×106 cells/mL)에 동량의 Tryphan Blue working solution은 동량을 혼합한다. 염색 된 세포부유액을 Neubauer chamber에 채우고 살아있는 세포와 사멸 세포를 3분 이내 에 감별 계수하여 세포 생존율 %를 구한다. 최소 총 200개 이상의 세포를 계수한다. 박 테리아의 성장은 595nm에서 Optical density로 측정하였다.

(2) phyto-PAM을 이용한 광합성 활성 측정
 배양 시간에 따른 미세조류의 광합성효율(Fm/Fv)은 Phyto-PAM (Walz, Effectrich,

⁽²⁾ 해빙 박테리아

Germany)을 사용하여 측정하였다. 측정 전 최소 15분간 미세조류를 암적응시킨 후 Phyto-PAM의 세팅 조도는 8, 16, 32, 64, 90, 120, 210, 295, 350, 435 µmol photons m-2 s-1 로 설정하여 20초 간격으로 측정하였다. 광합성효율은 다음 식으로 계산하였다. $\frac{F_v}{F_m} = \frac{\left(F_m - F_0\right)}{F_m}$ Fm= 최대형광효율, Fo= 최소형광효율

(3) 온도 및 염도에 대한 성장곡선, 광합성 활성 및 EPS 생산

3. EPS 생산을 위한 해빙 미소생물의 대량 배양 및 EPS 추출, 특성 규명

가. 대량 배양을 통한 EPS 생산 시스템 구축

(1) 해빙 미세조류

대용량냉장고의 냉장실을 사용하여 본배양 온도인 2℃를 유지하였고, 냉장실 내부에 형 광등을 설치하여 2000lux의 광량을 확보하였다. 공기압축기(서원콤프레샤(주), Korea) 및 공기여과기(GSA Co., Ltd., Korea)를 통하여 냉장실 내부에 비치한 20L PET 카보이 (NALGENE, USA)에 멸균된 외부공기를 주입하여 통기배양을 실시하였고, 조절벨브를 통하여 각 카보이마다 멸균공기가 균일하게 공급되면서 조류의 순환이 잘 이루어지도록 조절하였다.

(2) 해빙 박테리아

배지는 Marine broth (Difco 2216)를 사용했다. seed culture는 5 ℃, 200rpm에서 72시 간을 배양했다. 본 배양은 seed culture를 1:100으로 희석해서 접종하고 5 ℃, 200rpm에 서 72시간을 배양, 5 ℃와 -5 ℃로 온도 조건 변화 후 이어서 계속 배양한다. 조건 변화 후부터 1일차, 2일차, 3일차까지의 배양액을 취해 상층액을 샘플링하였다. 얻은 샘플별로 당과 단백질 정량을 수행하였다.

나. EPS 추출

해빙 미세조류와 박테리아의 EPS 추출은 동일한 방법을 사용하여 수행하였다. 배양액을 원심분리 (8,000rpm, 40min)하여 상층액을 회수하였다. Crude EPS를 교반하면서 cold ethanol 3 vol을 첨가하고 4 ℃에서 하룻밤동안 방치한 뒤, 원심분리 (8,000rpm, 40min)하 여 펠렛을 수거하였다. 상등액 제거 후 남아있는 펠렛에 증류수로 녹였다. 용액을 투석막 (MWCO 1,000)에 넣고 상온에서 투석을 총 6회 (dH2O 6회, ddH2O 2회) 실시하였다. 투석 이 끝난 후 용액을 수거해 동결건조를 시켜 사용하였다.

다. 당 및 단백질 함량 측정

총 탄수화물 함량은 표준물질 D-glucose를 사용하여 Phenol-sulfuric acid 방법으로 490 nm에서 측정하였다 (Dubois et al, 1956). 간략하게 기술하면 시료 2mL에 5% phenol solution 1mL를 첨가 후 vortex를 혼합하였다. 여기에 황산 (95%) 5mL을 첨가하고 vortex

를 한 다음 상온에 30분 방치하였다. 그 다음 490nm에서 OD를 측정하였다. 표준물질 곡선 은 glucose를 이용하여 위와 동일한 방법으로 수행하여 작성하였다. 단백질의 함량은 Bradford 방법으로 정량하였다 (Bradford 1976). Bradford 용액 (G-250 50mg, methanol 50mL, phosphoric acid(85%, w/v) 100mL, distilled water 850mL) 1mL와 시료 20ul를 혼 합한 다음 상온에서 5분간 방치한다. 이를 595nm 파장에서 흡광도를 측정한다. 표준물질 곡선은 BSA(bovine serum albumin)를 이용하여 작성하였다.

라. EPS의 성분 원소 분석 및 크기배제 크로마토그래피

EPS의 탄소, 수소, 산소, 질소, 황 등 원소의 질량 백분율 분석은 Vario Macro/Micro (Elementar, Germany)를 이용하여 수행하였다. 건조된 EPS를 분쇄한 후 약 1 mg을 분석 에 사용하였다. 시료를 1,115 °C 정도의 고온에서 산화 분해한 후 환원과정을 거쳐 열전도 도 검출기로 원소의 종류와 함량을 측정하였다. 설파닐아마이드 (sulfanilamide) 를 표준물 질로 사용하였다. EPS의 조추출물의 크기 크로마토그래피는 젤침투 크로마토그래피를 사용하였으며 용출물의 크기 분석을 위해 Multi-Angle Light Scattering을 이용하였다.

마. EPS 단당성분 및 글리코시딕 결합분석

EPS의 단당 조성을 분석을 위해 EPS 약 10 mg을 4 M trifluoroacetic acid에 녹인후 100 °C에서 6시간 동안 가수분해 하였다. 가수분해 수용액은 NaBD4를 이용하여 환원하였고, acetic anhydride로 아세틸화 하였다. 시료는 Bao 와 You (2011)방법으로 분석하였다. 시료 를 HP-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)에 주입한 후 기체 크로마토그래피-질량 분석기 (6890N/MSD5973, Agilent Technologies, Santa Clara, CA)를 이용하여 분석하였다.

EPS의 글리코시딕 결합은 Ciucanu 와 Kerek (1984)의 방법으로 수행하였고, 앞의 장비로 분석하였다. Hakomori 방법을 약간 변형하여 수행하였다. 시료 2-3 mg을 질소기체 하에서 0.5 ml dimethylsulfoxide (DMSO)에 녹인 후, CH3I 0.3 ml과 분말 NaOH로 메틸화한다. 완전히 메틸화된 시료를 4 M trifluoroacetic acid로 100 °C에서 6시간 동안 반응하여 산 가수분해하여 부분적으로 메틸화된 알디톨 아세테이트를 제조한다. 가수분해 산물은 NaBD4를 이용하여 환원하였고, acetic anhydride로 아세틸화 하였다. 부분적으로 메틸화된 알디톨 아세테이트는 HP-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)에 주입한 후 기체 크로마토그래피-질량 분석기 (6890N/MSD5973, Agilent Technologies, Santa Clara, CA)를 이용하여 분석하였다.

바. EPS 황산 및 유론산 함량 분석

EPS의 황산 함량은 barium chloride gelatin 방법으로 결정하였다 (Souza et al. 2012). 글 리코시딕 HP-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)에 주입한 후 기체 크로마토그래피-질량 분석기 (6890N/MSD5973, Agilent Technologies, Santa Clara, CA)를 이용하여 분석하였다.

사. EPS의 FT-IR 측정

건조된 EPS 시료 약 2 mg을 100 mg의 KBr과 혼합한 후 7 kg cm-2의 압력으로 투명한 펠릿을 제작하였다 (Yu et al 2007). 시료를 Nicolet 6700 FT-IR spectrophotomer (Thermo Scientific, USA)에 탑재하고 스펙트럼을 기록하였다. 데이터 수집 조건은 spectral region 4000 - 400 cm-1, resolution 2 cm-1, 25 ℃ 이었다. 스펙트럼은 10-point 필터 하였고 베이스 라인을 교정하였다. 중복된 띠들의 파동수를 결정하기 위하여 스펙트 럼의 이차 도함수를 사용하였다.

아. EPS의 NMR 측정

NMR 실험은 60°C에서 JEOL JNM ECP-600 spectrometer를 사용하여 측정하였다. NMR spectrometer의 기본 주파수는 프로톤(1H) 600.13 MHz이다. EPS 시료 내 교환가능한 양 성자는 중수(D2O)로 2회 동결건조를 실시하여 중수소로 치환하였다. 최종 시료는 건조 시 료 약 10 mg을 99.9% D2O 0.5 ml에 녹여 제조하였다 화학적 이동은 TMS (tetramethyl silane)를 표준물질로 하여 상대적 값으로 나타내었다. DOH 신호는 이완되는 동안 낮은 전 력의 펄스를 조사함으로써 억제하였다. 1D 1H NMR 스펙트럼은 JEOL사에서 제공하는 펄 스프로그램을 이용하여 획득하였다.

자. EPS의 입도크기 분석

EPS의 입도분석은 Malvern 사의 ZS-90을 이용하여 측정하였다. EPS, Xanthan Gum 각 각을 증류수에 일정량 녹여 25°C에서 실험을 수행하였다.

차. EPS의 항산화 활성 측정

(1) DPPH 라디칼 소거능

DPPH 자유 라디칼 소거능 측정은 Xiong et al. (2013) 에 기술된 방법을 수정하여 사 용하였다. 500ul(1mg/ml와 0.5mg/ml) EPS 용액을 500ul의 DPPH(0.1mM)의 에탄올 용액 에 첨가하였다. 대조구로 ascorbic acid(JUNSEI, Japan)(10ug/ml와 8ug/ml, 4ug/ml, 2ug/ml, 1ug/ml)와 xanthan gum(SIGMA, USA)(1mg/ml와 0.5mg/ml)을 사용하였다. 10 초간 격렬하게 혼합한 후, 용액을 2.5ml cuvette(Kartell, Italy)에 옮기고, EPS의 DPPH 라디칼 소거능을 BioDrop Touch Duo(BioDrop, England)을 이용하여 517nm에서 측정하 였다. DPPH 라디칼 소거능은 아래 방정식으로 계산하였다.

DPPH라디칼소거능(%) = $[1 - (A - A_b)/A_0] \times 100$

A; 시료와 DPPH 반응 후 흡광도

Ab; 시료의 흡광도

A0; DPPH의 흡광도

(2) 과산화수소 라디칼 소거능

과산화수소 라디칼 소거능 측정은 Xiong et al. (2013) 에 기술된 방법을 수정하여 사용 하였다. 측정에 사용된 시료는 Na2HPO4-NaH2PO4 용액에 녹여 수용액 상태로 사용하 였다. 측정 시료는 EPS_P와 EPS_P, EPS_F를 각각 1mg/ml과 0.5mg/ml로 준비하였고, 대조구로써 ascorbic acid(JUNSEI, Japan)를 600ug/ml와 400ug/ml, 200ug/ml, 100ug/ml, 50ug/ml을 준비하였고, xanthan gum(SIGMA, USA)의 경우 1mg/ml와 0.5mg/ml을 준비 하였다.

측정은 시료 400ul에 hydrogen peroxide(SAMCUN, Korea) 1ul를 첨가하여 10분간 상 온에서 반응 후 측정하였다. 반응시간 동안 30초씩 총 6회 pipetting을 통하여 섞어주었 다. 반응 후 측정은 BioDrop Touch Duo(BioDrop, England)를 사용하여 230nm에서 측정 하였고, 수산화 라디칼 소거능은 아래 방정식으로 계산하였다.

> 수산화라디칼소거능(%)= [1-(A-A_b)/A₀]×100 A; 시료와 H2O2 반응 후 흡광도 Ab; 시료의 흡광도 A0; H2O2의 흡광도

카. EPS의 얼음 결합 특성 분석

(1) 온도 이력 활성

EPS에 의한 얼음결정의 형태 변화는 디지털 카메라가 장착된 나노리터 삼투압계 (nanoliter osmometer, Otago osmometers, New Zealand)로 관찰하였다. 약 1, 0.1, 0.01 mg/ml EPS 용액 2 ॥를 시료 디스크내 구멍에 주입한 다음, 시료 디스크를 콜드 스테이 지에 탑재한다. 콜드 스테이지의 온도를 - 20°C로 급속으로 내려 큰 크기의 다결정성 얼 음을 만든다. 수 초~수 분 후 시료 구멍내 얼음의 형태를 관찰하면서 콜드 스테이지의 온도를 - 20°C에서 천천히 얼음의 녹는점 근처 까지 높인다. 녹는점 부근에서 얼음의 단 일 결정이 관찰되면 이번에는 반대로 천천히 온도를 내리면서 얼음 구조의 변화를 관찰 한다. 결빙방지단백질의 경우 온도가 하강해도 얼음 결정이 커지지 않고 일정한 형태를 유지하는 것을 관찰할 수 있는데, 용액의 온도가 어는점 이하로 내려가면 그때부터 급격 하게 얼음 결정이 성장하는 것을 볼 수 있다. 대조구로 f/2 배지 또는 증류수를 사용하였 다.

(2) 얼음재결정화 억제

EPS의 얼음 재결정화 억제는 splat assay이용하여 측정하였다. 0.1, 0.01, 0.001ug/ml을 함유한 수용액 10 ul를 약 2 미터 높이에서 드라이 아이스를 이용 - 80°C까지 냉각시킨 알루미늄 블록 위에 떨어뜨린다. 이때 떨어진 용액은 알루미늄 표면에 충돌하는 순간 얼 어붙는데 두께 약 20μm 이하, 직경 약 1 cm의 얇은 웨이퍼 형태가 된다. 이 웨이퍼를 조심스럽게 떼어서 두 개의 커버 글라스 사이에 넣고 최대한 빠르게 - 8°C로 고정된 콜 드 스테이지에 올려 어닐링(annealing) 시킨다. 그리고 60-120분 동안 얼음의 크기 변화 를 현미경으로 관찰하고 디지털 카메라로 기록하였다. 대조구로 f/2, xanthan gum을 사 용하였다. 각 시료의 얼음재결정화 억제 활성 비교는 -8°C에서 30분간 어닐링한 시료의 이미지를 획득한 후 분석하였다. 이미지 분석은 Image J를 이용하여 각 시료에서 크기가 최대인 10개의 결정을 취한 후 면적을 계산하고 평균입자 크기 (MGS) 를 구하였다. 이 값들을 대조구로 사용한 f/2의 평균입자 크기와 비교하여 상대적으로 비교하였다. 얼음재 결정화 억제 활성은 f/2 대조구의 상대적 백분율로 보고하였다. 높은 백분율 값은 평균입 자 크기가 크다는 것으로 얼음재결정화 억제 활성이 약함을 의미한다.

(3) 얼음흡착 유지

해빙 형성시 EPS가 해빙내에 얼마나 흡착 유지되는지 알아보기 위하여 추출한 다당의 흡착유지 실험을 콜드핑거가 장착된 장치를 사용하여 수행하였다. 콜드핑거 장치는 냉각 수 (-5°C)가 지속적으로 흐르는 콜드핑거와 약 -1.9°C가 유지되는 단열된 상자로 구성 하였다. 약 2°C 시료 200 ml 이 들어있는 비이커를 얼음으로 채워진 -2°C의 단열 상자 내에 위치한 다음, 실험이 진행중인 동안 마그네틱 바를 이용하여 계속 교반하였다. 콜드 핑거를 시료에 담근 후 약 5시간 동안 얼음이 자랄 수 있도록 방치하였다. 시료의 온도 를 지속적으로 모니터링 하였다. 각 실험이 끝난 후 콜드핑거를 제거하고 형성된 얼음을 제거하였다. 제거된 얼음을 녹인 후 그 부피와 염분의 농도와 당함량을 측정하였다. 대조 구로 f/2배지와 xanthan gum을 사용하였다. 얼음에 흡착 유지되는 세포의 다당을 정량 적으로 기술하기 위하여 Ewert와 Deming (2011)의 공식을 이용하였다. 간단히 설명하면 먼저 얼음에 흡착된 염의 비율은 염 유효분리계수 (effective segregation coefficients, k_{eff})로 나타내었다.

 $k_{eff_S} = rac{S_{ice}}{S_{sol}}$ 여기에서 S_{ice} 는 얼음에 흡착된 염의 농도이며 S_{sol} 는 시료에 들어있던

총 염분의 농도를 말한다.

이 공식을 좀 더 확장하면 EPS의 유효분리계수를 구할 수 있다.

 $k_{eff_E} = \frac{EPS_{ice}}{EPS_{sol}}$ 여기에서 EPS_{ice} 는 얼음에 흡착된 EPS의 농도이며 EPS_{sol} 는 용액 내에 들어있던 총 EPS의 농도를 말한다. 바닷물속의 용존 용질(본 연구에서는

용액 내에 들어있던 총 EPS의 동도를 말한다. 바닷물적의 용존 용질(본 연구에서는 EPS)이 얼음과 결합하지 않는다면, 일반적인 염분의 분리되는 정도에 비례할 것이다. 따라서 용질의 얼음흡착 유지 정도는 염과 비교함으로써 보정할 수 있을 것이다.

보정된 강화 지수는 $I_s = \frac{k_{eff_X}}{k_{eff_S}}$ 로 나타낼 수 있다. 여기에서 k_{eff_X} 는 용질 X의 분리

계수이다. 만약 $I_s = 1$ 이라면 둘 다 얼음에서 배출되는 정도가 같다는 것이고, 만약 $I_s > 1$ 이라면 용질이 선택적으로 얼음 내에서 흡착 유지되는 것을 의미한다.

타. EPS의 동결보존 활성 측정

동결보호제로서 EPS의 활성을 측정하였다 (Jiang et al, 2011). 동결보존 활성은 대장균인 E.coli DH5a에 일정량의 EPS를 넣고 -20°C에서 24시간, 48시간 동결한 후 생존한 대장균 의 수를 상대적으로 나타내었다. 대조구로 생리식염수, 20% 글리세롤, xanthan gum을 사 용하였다. 약술하면, E.coli DH5a를 LB 배지에 접종한 후 37°C에서 하룻밤 동안 배양하였 다. 이튿날 1:100으로 희석하여 동일배지에 접종하고 OD600=1.2에 이를 때 까지 배양하였 다. 균을 생리식염수로 10-4배 희석하였다. 희석한 균 100 μ를 1.5 ml 마이크로튜브에 분 주하고 최종 농도가 각각 1 mg/ml, 10 mg/ml이 되도록 EPS 용액을 첨가하였다. 생리식염 수를 이용하여 최종 부피가 500 μl가 되도록 한 후 잘 혼합하였다. 혼합된 균 시료를 -20°C에서 24시간, 48시간 보관하였다. 보관된 시료를 꺼내고 상온에서 해동시킨 후 LB한천 배지위에 일정량 도말한 후 37°C에서 하룻밤 동안 배양하였다. 각 시료의 콜로니수는 대조 구와 비교하여 상대적으로 나타내었다.

제 2 절 연구개발 수행 결과

1. 문헌 조사를 통한 선행연구 분석

- 가. Bacteria에서 EPS 및 glycoprotein 생성에 관한 선행연구 Isolation and Characterization of Biofilm Producing Bacteria from Arabian Sea, Nidhs. P, 2014
 - 이 연구에 의하면 EPS와 단백질 모두 배양 시간, pH, 온도에 영향을 받는다고 알려져 있다.
 - 배양 시간과 pH는 영향을 많이 받는 반면에 온도에서는 미미한 차이만이 존재하였다.
 - C. psychrerythraea 34H와 F. figoris PS1 역시 온도에서 차이는 나겠지만 미미한 것으 로 예상되고, 염도 역시 많은 차이는 없을 것으로 예상된다.



(그림 1) Total Carbohydrate. A; Crude EPS, 37℃, B; Dry EPS, 37℃. C; Crude EPS, 27℃, D; Dry EPS, 27℃



(그림 2) Total protein. A; Crude EPS, 37℃, B; Dry EPS, 37℃, C; Crude EPS, 27℃, D; Dry EPS, 27℃

나. EPS를 생산하는 미생물

Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and

extraction, F. Donot, 2012

- 이 논문을 참고 하였을 때, microalgae는 CO2를 substrate로 가지며 bacteria는 단당류 를 substrate로 가진다.
- O Bacteria의 경우 celluse, alginate, dextran, curdlan, gellan, xanthan 등을 exopolysaccharides로 분비하였다.

Microorganisms	Exopolysaccharides	Microbial strains	Substrates	EPS concentration (g/L)	Growing conditions
Microalgae		Prophyridium cruentum	CO ₂	0.1-0.3	pH=7 20℃
		Botryococcus braunii	CO ₂	2.5	pH=7 25℃
(Diatoms)		Amphora holsatica	CO ₂	0.027	
		Navicula directa	CO ₂	0.026	
		Melosira nummuloides	CO ₂	0.0022	
Bacteria	Celluse	Acetobacter xylinum	Fructose/ glucose	7-23-6	pH=4-5 30℃
		<i>Acinetobacter</i> sp.	Ehanol/ diesel	4.7	pH=7 30℃
	Alginate	Pseudomonas aerugina	Xylose	0.4	30−37℃
		Azobacter sp.	Glucose/ fructose	1.1-7.5	pH=7 35℃
	Dextran and derivatives	<i>Leucomostoc</i> sp.	Sucrose	8.17	pH=5.5 35℃
	Curdlan	Agrobacterium	Glucose/ sucrose	5.02-76	pH=7.5 30℃

(표 1) Principal exopolysaccharides produced by microalgae and bacteria.

2. 해빙 미소생물의 배양 조건에 따른 EPS 생산 및 대량배양 시스템 구축

가. 해빙 미세조류의 EPS 생산

(1) 해빙 미세조류의 환경에 따른 광합성효율

해빙 미세조류의 온도 및 염도 환경에 따른 광합성효율을 측정하기 위하여 Phyto-PAM을 이용하였다. 측정 전 조류를 15분간 암적응시킨 후 측정하였으며, 조도는 8, 16, 32, 64, 90, 120, 210, 295, 350, 435 µmol photons m-2 s-1 로 설정하여 20초 간 격으로 측정하였다. 두 조류 모두 원래의 염도환경인 34‰에서 광합성효율이 가장 높게 나타났으며, 환경적 스트레스 배양조건인 70‰에서는 상대적으로 낮은 수치를 나타내었 다. 그러나 온도에서는 유효한 차이를 보이지 않았다. 이는 -3℃ 또한 광합성에 관련된 효소의 활성이 떨어지지 않기 때문인 것으로 보인다.



(그림 3) Synedropsis sp. -3℃, 34‰의 광합성 yield.



(그림 4) *Synedropsis* sp. -3℃, 70‰의 광합성 yield.



(그림 5) *P.pseudodenticulata* -3℃, 34‰의 광합성 yield.



(그림 6) *P.pseudodenticulata* -3℃, 70‰의 광합성 yield.



(그림 7) *Synedropsis* sp. 2℃, 34‰의 광합성 yield.



(그림 8) *Synedropsis* sp. 2℃, 70‰의 광합성 yield.



(그림 9) P.pseudodenticulata 2℃, 34‰의 광합성 yield.



(그림 10) P.pseudodenticulata 2℃, 70‰의 광합성 yield.

(2) 해빙 미세조류의 환경에 따른 EPS 생성량

해빙 미세조류의 온도 및 염도에 따른 EPS 생성량을 온도와 염도는 두 해빙 미세조류 가 생육하는데 적합한 2℃와 34‰을 기초로 환경적 스트레스 배양조건인 - 3℃와 70‰을 추가하여 총 4가지 조건으로 14일간 실험하였다.

실험결과 두 조류 모두 환경적 스트레스 배양조건인 -3℃와 70‰에서는 EPS를 거의 생 성하지 않거나 적은 EPS를 생성하였다. 온도에 의한 경우 -3℃의 조건에서 Synedropsis sp.는 염도에 관련없이 EPS를 거의 생성하지 않는 것을 확인하였고, P.pseudodenticulata는 14일차에서 적은 EPS를 생성하는 것을 확인하였다.

또한 염도에 의한 차이(34,70‰)는 두 조류 모두 14일차에서 34‰이 70‰에 비해 약 2배 의 EPS를 더 생성하였다. 이는 낮은 온도에 의해 EPS를 생성하는 효소의 활성이 낮아 져 이러한 결과를 나타내는 것으로 보인다.



(그림 11) *P.pseudodenticulata* -3℃, 34‰의 EPS 생성량.



(그림 12) *P.pseudodenticulata* -3℃, 70‰의 EPS 생성량.



(그림 13) *Synedropsis* sp. 2℃, 34‰의 EPS 생성량.



(그림 14) *Synedropsis* sp. 2℃, 70‰의 EPS 생성량.



(그림 15) *P.pseudodenticulata* 2°C, 34‰의 EPS 생성량.



(그림 16) *P.pseudodenticulata* 2°C, 70‰의 EPS 생성량.

- 나. 해빙 박테리아의 EPS 생산
 - (1) 배양온도에 따른 EPS 생산

온도에 따른 EPS 및 glycoprotein의 생성량 비교 실험은 Marine broth를 사용하였다. 그 결과 5℃에서 가장 많은 EPS(14.55 ug/mL)를 생성하였고, 15℃에서 가장 적은 EPS(9.44 ug/mL)을 생성하였다. 하지만 균주의 생장 속도는 15℃에서 가장 빨랐다. 이 같은 결과로 미루어 볼 때 균주의 최적 생장 온도와 EPS 생산 최적 온도에는 차이가 있 으며 그 이유는 EPS가 균주의 생장에 비필수적인 요소로 분석되어진다. 생장 환경에 따 라 필요에 의하여 생성하는 물질로써 EPS 획득을 위한 최적 온도는 5℃이다. Glycoprotein 역시 5℃에서 3.87 ug/mL로 가장 많은 양이 생성되어졌으며 15℃에서 소량 만이 측정되었다.







(그림 18) F. frigoris PS1의 온도에 따른 glycoprotein 생성량.

(2) 염도에 따른 EPS 생산

염도에 따른 EPS 및 glycoprotein 생성량 비교 실험은 LB broth를 사용하여 5℃에서 배양하였다. 그 결과 0‰; 5.46 ug/mL, 10‰; 6.31 ug/mL, 20‰; 6.68 ug/mL, 30‰; 8.25 ug/mL, 40‰; 6.90 ug/mL 로 측정되었다. 결과로 보았을 때 바닷물의 염도와 가장 유사 한 30‰에서 가장 많은 EPS를 생성하였고 0‰에서 가장 적은 양의 EPS를 생성하였다. Glycoprotein 역시 30‰에서 5.31 ug/mL로 가장 많은 양을 생성하였고 0‰에서 0 ug/mL 로 가장 적은 양의 glycoprotein을 생성하였다.

결과 중 30‰에서 가장 많은 양의 EPS(8.25 ug/mL)를 생성하였는데 이 값은 Marine

broth에서 배양했을 때 보다는 적은 양이다. 그 이유는 균주가 필요에 의해 EPS를 더욱 많이 생성하게 되는데, 이 실험에서 사용한 LB 배지 같은 경우에는 영양배지로써 풍부한 영양분을 함유하고 있어 균주가 생장하는데 어려움이 없다. 그에 반하여 Marine broth는 바닷물과 유사한 영양분으로 여러 가지 영양분을 함유하고 있지만 풍부하지는 않다. 이 런 이유로 인하여 균주는 LB보다 MB에서 더욱 많은 EPS를 생성하였다고 볼 수 있다.





(그림 20) F. frigoris PS1의 염도에 따른 glycoprotein 생성량.

다. 해빙 미세조류의 대량배양 시스템 구축



(그림 21) 해빙 미세조류 대량 배양 시스템.
①공기압축기, ②1차 공기여과기, ③2차 공기여과기,
④Synedropsis sp. 배양 카보이, ⑤P.pseudodenticulata 배양 카보이

극지연구소

3. 해빙 미소생물의 EPS 추출 및 특성 분석

가. 해빙 미소생물의 EPS 추출

(1) 해빙 미세조류의 EPS 및 기타 성분 정량

Ethanol을 이용한 EPS를 추출하는 과정 중 수행한 정량을 아래 그래프에 나타냈다(그 림 22, 23). 추출을 진행하는 동안 당의 농도는 증가함을 보이나 반대로 단백질의 양은 줄어듧을 알 수 있다. 추출을 진행하는 동안 최소한의 용매만을 사용하여 농축을 실시하 였기 때문에 당의 농도가 증가한 것으로 판단된다. 투석 후 단백질이 줄어든 것은 당에 비하여 단백질의 크기가 작기 때문에 투석하는 동안 대부분의 단백질이 멤브레인을 빠져 나갔을 것으로 생각된다.



(그림 22) Porosira pseudodenticulata의 EPS 추출 과정 중 정량.



(그림 23) Synedropsis sp. 의 EPS 추출 과정 중 정량.

(2) 해빙 박테리아의 EPS 및 기타 성분 정량

박테리아의 당과 단백질 정량은 시간별로 얻은 샘플을 측정했다. 사용한 배지는 Marine broth 이며, 72시간을 배양한 후 온도에 따라 1일차, 2일차, 3일차를 비교했다. 72시간 배양 후 OD600의 값은 1.73 이었다.

당의 경우, PSA (Phenol-sulfuric acid) 방법을 사용하여 정량하였다. 그 결과 5 ℃, 1일 차에서 가장 많은 함량 (98.36 ug/ml)을 나타냈다. 그 후 시간이 지날수록 당의 양이 점 차 줄어가는 결과를 보였다. 5 ℃의 결과가 줄어드는 것에 반해 -5 ℃에서는 미미하나마 당의 양이 늘어나는 것을 볼 수 있었다. 이는 5 ℃와 -5 ℃ 에서의 균주의 성장 속도가 다름에서 비롯된 결과인 듯하다. 5 ℃의 경우 1일차에서 OD600의 값이 2.569였고, -5 ℃ 의 경우 2.26이었다. 이후 5 ℃에서는 2일차와 3일차에서도 비슷한 OD600의 값 (2.689, 2.506) 을 보였고, -5 ℃에서는 증가하는 값 (2.452, 2.527)을 보였다. 이로 미루어 볼 때, 균주의 개체가 정체되어있는 시기에서는 생성하는 당의 양보다 탄소원으로 소모하는 당 의 양이 더 많고 개체가 늘어나는 시기에서는 소모된 당의 양보다 생성하는 당이 많다고 분석되어진다(그림 24).

단백질의 경우 Bradford 방법을 사용하였으며, 당과 같은 시간별 샘플을 측정하였다. 당 이 늘어나거나 줄어듦을 나타내는 것에 비해 단백질은 특정 시간에서 함량이 많았다. 5 ℃와 -5 ℃, 두 경우 모두에서 2일차에서 가장 많은 양 (20.70 ug/ml, 40.89 ug/ml)이 측 정되었고, 5 ℃보다, -5 ℃에서 더 많이 생성했다. 당이 5 ℃에서 더 많은 양을 보인 것 에 비해 단백질은 -5 ℃에서 더 크게 나타났다(그림 25). 이는 환경에 따른 생장 요소라 고 분석되어진다. 해양 환경에서는 해빙이 만들어지고, 미소 생물은 이에 붙어서 사는 경 우가 많다. 따라서 생물체는 얼음에 의한 피해를 최소화 시키려 적응할 것이다 (Krembs et al. 2008; Deming et al, 2002; Nichols 2005; Marx 2009). 5 ℃의 환경에서는 그런 피 해를 받을 일이 상대적으로 적기 때문에 단백질이 나타내는 결과가 그에 의한 것으로 보 여 진다.



(그림 24) 시간별 샘플 당 정량.



(그림 25) 시간별 샘플 단백질 정량.

나. 해빙 미소생물의 EPS 성분 및 특성 분석

(1) 성분 원소 분석

추출한 EPS_S, EPS_P의 네 가지 성분원소 분석을 실시하였다. EPS_S와 EPS_P 각각 의 경우 탄소는 26.3%와 6.25%, 수소는 3.88%와 1.96%, 질소는 1.57%와 0.09%, 황은 5.43%와 7.9%였다 (표 2). 이 결과는 두 EPS 모두에 황산염 그룹이 존재한다는 것을 의 미한다. 하지만 EPS_P의 경우 다른 성분원소가 다량 혼합되어 있음 나타내고 있다. 따라 서 EPS_P에 대한 성분당 분석, 분자량 분석, 황산 및 유론산 함량 분석 등은 수행하지 아니하였다.

(표 2) EPS_S와 EPS_P의 원소 분석

Element	Theoretical composition (% w/w/)	Experimental Composition (% w/w)	Experimental Composition (% w/w)
	Sulfanilamide	EPS_S	EPS_P
% C	41.81	26.3	6.25
% H	4.65	3.88	1.96
% N	16.25	1.57	0.09
% S	18.62	5.43	7.9

(2) 유론산과 황산의 함량 및 구성당의 조성

표 3에 EPS_S의 각 성분 분석을 정리하였다. EPS_S는 5.9% 유론산, 40.4% 의 황산 에

스터를 각각 함유하고 있다. 이 데이터는 이 세포외다당이 매우 황산화된 다당임을 보여 준다. 카라기난이 40% 가량 황산화된 다당이다 (Witvrouw and De Clercq 1997). 이는 다른 규조류의 다당류 분석의 결과와 일치한다. 표 3과 같이, 구성 단당류의 조성을 살펴 보면 fucose, rhamnose, xylose가 주요 성분당으로 각각 36.2%, 27.9%, 23.2%를 차지하 며 Galactose, Glucose가 미량 성분당으로 각각 11.2%, 1,4% 존재한다. 미세조류에서 세 포외다당으로 fucose, rhamnose, xylose 등은 주요 구성당으로 알려져있는데 (Gügi et al. 2015) 극지 호냉성 규조류인 Synedropsis도 유사한 구성 성분당으로 생합성된 세포외다 당을 분비하는 것으로 판단된다. 높은 황산 함량과 단당류의 구성을 볼 때 Synderopsis 가 분비하는 세포외다당(EPS_S)은 황산 퓨칸 (sulfated fucans)으로 생각된다.

Components	EPS
Uronic acid(%)	5.9±0.1
Sulfate(%) Monosccharide content	40.4±0.7
Rhamnose(%)	27.9
Fucose(%)	36.2
Xylose(%)	23.2
Mannose(%)	0.1
Glucose(%)	1.4
Galactose(%)	11.2

(표 3) EPS_S 유론산, 황산 함량 및 구성 당 조성



(그림 26) EPS_S의 주요 구성당의 화학 구조 (A) 및 EPS_S 성분당 분 석의 용출 프로파일(B). 왼쪽부터 rhamnose, fucose, xylose, mannose, glucose, galactose

극지연구소

EPS_S의 분자량을 MALS (Multi-Angle Light Scattering) 디텍터가 장착된 젤 침투 크로마토그래피로 추정하였다. 그림 27과 같이 조추출물인 EPS_S는 크로마토그램에서 크게 두 개의 봉우리가 나타났는데 이는 조추출물이 균질한 시료가 아니라는 것을 의미 한다. 각 봉우리에 해당하는 EPS 성분을 MALS 데이터로 분석해 본 결과, 각각 8.3 × 105 Da, 7.9 × 105 Da이었다. 또한 각 봉우리 내의 당 폴리머들의 다분산성 지수 (polydispersity index)를 보면 약 1.1~1.3으로 질량의 다분산 정도가 크지 않은 것으로 나 타났다.



첫 번째 봉우리는 35-38분 사이에, 두 번째 봉우리는 약 48-51분 사이에 용출되었다.

다. EPS의 분광학적 분석

(1) FT-IR 분석

추출한 EPS_S, EPS_P, EPS_F의 FT-IR 스펙트럼을 그림 28에 나타내었다. 시료의 FT-IR 스펙트럼 파수 지정은 문헌을 참고하였다 (Sekkal and Legrand 1993; Sekkal et al. 1993; Synytsya et al. 2003; Pereira et al. 2003; Qiu et al. 2006). 그림 28의 스펙트 럼을 보면, 1219 and 1211 cm-1 파수에 강하고 넓은 적외선 띠들이 보이는 데, 이는 황 산 에스터의 O=S=O에 의한 비대청적 신장 전동과 COH, CC, CO 진동들이 기여하는 것 으로 해석 할 수 있다. 이 띠들의 강도가 황산화 전도와 비례한다 (Pereira et al. 2009). 또한 840 cm-1의 신호는 galactopyranosyl 잔기의 황산 에스터가 축 방향으로 향한 것을 나타낸다 (Qiu et al. 2006). 하지만 840 cm-1의 신호가 넓고 또 어깨 부분이 존재하기 때문에 galactose 단위에 6-sulfate와 3,6 anhydrogalactosyl 단위에 2-sulfate ester 그룹 이 있을 가능성을 완전히 배제할 수 없다 (Falshaw et al. 2005). 586과 587 cm-1의 적 외선 피크는 sulfate O=S=O의 대칭 비대칭 변형에 의한다. 그리고 1200-970 cm-1의 적 외선 띠들은 주로 피라노이드 고리의 CC, CO 신장과 글리코시딕 결합의 COC 신장에 의한다. 모든 다당류는 흔히 이 지역에서 강하게 흡수한다 (Synytsya et al. 2003).



(그림 28) FT-IR spectrum. (A) EPS_S, (B) EPS_P, (C) EPS_F.

(2) 핵자기분광법 (NMR) 분석

EPS_S의 1H NMR 스펙트럼 데이터를 분석해 보면 fucose, rhamnose, xylose의 특성을 잘 보여줌으로써 앞서 분석한 성분당 데이터를 지지해 준다 (그림 29). 각 당과 유론산의 아노머 양성자는 5.0 ppm 부근(A)에서 나타나며, 또한 각 당의 메틸 그룹이 1.2~1.4 ppm 지역 (E)에 나타났다 (Chevolot et al. 1999; Saboural P et al. 2014). 황산화된 H2, H3, H4, H5 신호들은 4.10에서 4.66 ppm (B 상자)에서 나타난 반면 황산화되지 않은 H2, H3, H4, H5 신호들은 3에서 4.2 ppm 사이(C 상자)에서 나타났다. 특히 아세틸화 그룹 은 D 지역에서 주로 나타났다.



(그림 29) EPS_S의 1H NMR 스펙트럼 (600 MHz, 99.9% D₂O). (A) 각 성분당의 아모머 양성자, (B) 황산화된 당의 H2, H3, H4, H5 (C) 비황산화된 당의 H2, H3, H4, H5 (D) 당의 메틸그룹 양성자 (H6)

4. EPS 얼음결합 및 생리활성 특성 분석

가. EPS의 얼음결합 특성

(1) EPS의 온도 이력 활성

일반적으로 용액은 녹는점과 어는점이 같아, 같은 온도에서 응고와 융해가 같이 일어난 다. 그러나 저온에서 살아가는 생물의 경우 주변 환경의 온도가 낮기 때문에, 그에 적응 하기 위해 어는점을 낮추는 물질을 생성한다. 알려진 것이 결빙방지단백질이다. 결빙방지 단백질의 경우 얼음과 결합해 성장을 저해하기 때문에, 활성에 따라 낮춰진 어는점까지 는 얼음 결정이 성장하지 않는 모습을 나타내나 그 온도보다 낮아지는 경우 급격하게 얼 음이 커지는 것을 관찰할 수 있다 (Hackwon Do et al. 2012; K.S. Park et al. 2012). 대 조구로 사용한 f/2배지의 경우, 얼음 결정이 크기를 유지하는 구간 없이 서서히 커지는 모습을 관찰할 수 있었다.

실험은 배양한 시간에 따른 배양액의 상층과 일정 농도의 정제 EPS 용액의 온도 이력 활성을 비교해보았다.

- (가) 해빙 미세조류
 - ① 배양액

Porosira pseudodenticulata 보다 당의 함량이 높게 나왔던 Synedropsis sp. 의 0일 차와 14일차 배양액의 온도 이력 효과를 비교했다. 0일차와 14일차의 배양액 상층 둘 다 약 0.03 ℃ 정도의 온도 이력 구간을 보였다. 또한, 대조구인 f/2 배지의 얼음 단 결정 모양이 원형으로 커지는 것에 비해 배양액은 특정한 모양을 나타내는 것을 확 인할 수 있었다.

② EPS

정제한 EPS를 1mg/ml을 만들고 이를 희석해 0.1mg/ml, 0.01mg/ml 의 농도에서 측 정하였다. EPS를 녹인 용액의 경우 얼음 결정이 유지 되는 구간을 잡기가 힘들었고, 같은 온도에서도 진행되던 상태에 따라 응고되기도 융해되기도 하는 모습을 보였다. 따라서 조류 유래 EPS의 경우에는 온도 이력 활성이 없는 것으로 보여 진다.

(나) 해빙 박테리아

① 배양액



온도별, 시간별 샘플을 측정하여 비교했다. 당과 단백질 정량과 같은 시간대의 샘플 을 측정하였으며, 5 ℃, -5 ℃ 둘 다 단백질이 가장 많이 나왔던 시간인 2일차에서 온도 이력 구간이 가장 넓었다. 5 ℃의 경우 약 0.06 ℃, -5 ℃의 경우 약 0.07 ℃의 값을 나타냈는데 온도 이력 활성이 뛰어나다고 볼 순 없지만, 미미하나마 존재함을 확인했다. 이 경우 위에서 나타낸 당, 단백질의 양과 관련지어 생각해보면 온도 이력 활성이 단백질의 양이 연관되어 있다는 결과를 얻을 수 있다. 다만 Flavobacterium frigoris PS1 의 경우 온도 이력 활성이 매우 뛰어난 IBP (Ice-biniding protein)를 생 산한다는 사실이 알려져 있고, 배양액의 결과는 그에 한참 못 미친다. 이러한 수치는 단백질의 농도가 낮기 때문에 얻어진 결과라고 분석되어진다.

② EPS

정제한 EPS를 0.1mg/ml로 만들어 측정하였다. 배양액에서 보였던 바와 달리 EPS 를 녹인 용액에서는 온도 이력 구간을 볼 수 없었다. 온도 변화의 폭도 일정치 않고, 같은 온도에서도 상태가 변하는 바를 관찰할 수 있었다. 따라서 정제하여 얻은 균 EPS에서는 온도 이력 활성을 볼 수 없었다.

공통적으로 EPS를 녹인 용액의 경우, 농도가 높을수록 점성이 증가하였다. 그로 인 해 디스크 내에서의 열전달이 용이하지 않아 우리가 원하는 온도 변화를 주었을 때, 보다 변화의 폭이 심하게 나타났다. 그렇기에 원하는 온도를 맞추기가 쉽지 않았고 얼음의 단결정을 유지, 관찰하기에 어려웠다.



(그림 30) 배양액과 EPS 시료의 얼음 단결정 모양

(2) EPS의 얼음재결정화 억제 활성

얼음재결정화 억제 활성은 물질이 얼음에 붙음으로써 얼음결정의 성장을 방해하기 때문 에 나타나는 활성이다. 이 같은 활성을 가진 물질은 세포의 동결보존에 사용되어질 수 있다. 얼음이 생성될 때 결정의 크기가 커지면서 세포의 표면에 손상을 줌으로 세포의 소실이 많이 발생한다. 얼음재결정화 억제제를 첨가해줌으로써 결정으로 인한 세포 손상 을 막을 수 있다 (Kim et al. 2015).

측정한 xanthan gum과 EPS 시료의 얼음재결정화 억제능을 그림 31에 나타내었다. EPS_S 0.1%의 경우 100±4.4%로 f/2와 똑같았고, EPS_F 0.001%의 경우 51.81±3.7%로 가장 큰 차이를 보였다. EPS_P의 경우 평균 78%로 3가지 농도에서 모두 비슷하게 나타 났다. 모든 시료에서 큰 경향성은 나타나지 않았으나 약간씩의 활성은 모두 가지고 있다 고 생각되어진다.



(3) EPS의 얼음흡착 유지

EPS의 얼음흡착 유지는 콜드핑거 장치를 제작하여 실험을 수행하였다 (그림 32A). 각 시료에 대해 동일한 실험을 3회 반복하여 실시하였다. 그리고 EPS의 얼음흡착 실험은 EPS 시료 확보의 문제로 EPS_S 만으로 실시하였다. 대조구로 Xanthan Gum을 사용하 였다. 얼음 성장시 용액에 존재하는 염은 얼음에서 배제되기 때문에 염의 Keffs 값은 항 상 1보다 작다. 표 4와 같이 본 실험에서 f/2로 실시한 대조구 실험에서도 Keffs는 0.44±0.01값을 보였다 (사진 32B). 이 값은 Ewert와 Deming (2011)이 제시한 0.39 ± 0.01 과 거의 일치한다. 또한 세포외다당 용액에 들어있는 염도 f/2에 포함된 염과 같은 정도 의 Keffs 값을 보일 것으로 예상할 수 있다. 예상한 바와 같이 수용액의 조성에 상관없 이 염은 비슷한 정도로 얼음성장시 배제되었다 (표 4). Xantham Gum과 EPS_S는 각각 0.42±0.02와 0.44±0.02를 보였다.

(표 4) 얼음흡착 전·후의 염의 농도.

Solution		Koffs		
	Initial ^a	Ice ^b	Unfrozen ^c	
F/2	35.5±0.5	15.6±0.3	44.7±0.6	0.44±0.01
Xanthan Gum	35.7±0.3	15.3±0.6	41.3±1.2	0.42±0.02
EPS_S	35.8±0.3	15.7±0.8	45.3±0.6	0.44±0.02

a; Initial은 얼음성장 전의 초기 수용액을 의미한다.

b; Ice는 콜드핑거를 통해 성장한 얼음을 의미한다.

c; Unfrozen은 얼지 않은 수용액 부분을을 의미한다.

세포의다당이 얼음 성장시 흡착되지 않는다면 염과 유사한 Keffe 값을 보일 것이고 만 약 흡착이 된다면 Keffe 값이 Keffs 보다 클 것이다. 흥미롭게도 본 실험에서 Xanthan Gum과 EPS_S의 Keffe는 Keffs와 거의 비슷한 각각 0.41±0.01와 0.42±0.01를 보였다. Xanthan Gum은 Xanthomonas campestris가 분비하는 세포외다당이어서 해빙과 무관하 므로 얼음흡착 가능성이 거의 없는 것으로 생각되어 대조구로 사용하였고 결과 값에서 나타난 것처럼 얼음에 대한 흡착이 이루어지지 않은 것으로 판단할 수 있다. Xanthan Gum에 대한 Keffs와 Keffe비, 즉 Is를 보면 거의 1의 값을 나타낸다. 이는 Xanthan Gum이나 염 모두 얼음 성장시 같은 정도로 배제된다는 것을 의미한다. 즉 Xanthan Gum은 얼음 흡착이 이루어지지 않는 것으로 볼 수 있다. Ewert와 Deming (2011)는 호 냉성 박테리아인 Colwellia psychrerythraea의 EPS-얼음 흡착 실험을 통해 EPS가 선택 적으로 얼음에 흡착된다는 의견을 제시하였다. 해빙 미세조류인 Synedropsis 속의 EPS 도 얼음과의 흡착이 어느 정도가 있을 것으로 예상할 수 있다. 하지만 예상과 달리 EPS_S는 실제 얼음과 직접적 결합을 하지 않는 것으로 실험 결과 밝혀졌다 (표 5).

(丑	5)	얼음흡착	전·후의	당의	농도.
----	----	------	------	----	-----

Solution	Carboh	Carbohydratecontent(µg/mL)			h
	Initial ^a	Ice ^b	Unfrozen ^c		15
F/2	0	0	0	-	-
Xanthan Gum	62.9±0.8	25.71±0.4	77.71±0.9	0.41±0.01	0.97±0.05
EPS_S	63.3±0.8	26.5±0.5	76.2±1.1	0.42±0.01	0.95±0.08
a; Initial은 얼음	음성장 전의	초기 수용액을	을 의미한다.		

b; Ice는 콜드핑거를 통해 성장한 얼음을 의미한다.

c; Unfrozen은 얼지 않은 수용액 부분을을 의미한다.





(그림 32) EPS의 얼음흡착 유지 실험. (A) 콜드핑거 장치. (B) f/2를 이 용한 얼음생성.

101

(B)

나. EPS의 생리활성

(1) 항산화 활성 측정

(A)

라디칼 소거는 라디칼과 항산화제가 반응할 때 항산화제의 수소원자에 의해 라디칼이 환원됨으로써 일어난다. 여기에는 항산화제의 화학적인 작용과 더불어 이동성과 같은 물 리적인 작용도 중요한 요소로 작용한다. 이런 이유로 인하여 중합체의 경우 고농도에서 점성이 증가하여 이동성이 떨어지므로 ascorbic acid와 같은 분자보다 반응이 천천히 일 어나게 된다 (Y. Wu et al. 2016).

DPPH의 라디칼은 517nm에서 안정적인 흡광도를 보여주며 항산화제와 반응하면 흡광 도가 감소한다. 그림 33에 대조구로 사용한 ascorbic acid의 DPPH 라디칼 소거능 결과를 나타내었다. 농도가 증가할수록 라디칼 소거능이 증가하였으며, 8ug/ml의 저농도에서 50%이상의 라디칼 소거능을 보였다. 그림 34에는 xanthan gum과 EPS 시료의 라디칼 소거능을 나타내었다. X. Xiong et al.(2013)의 측정에서는 xanthan gum의 경우 1mg/ml 에서 50%정도의 활성을 나타내었다. 이는 본 실험의 결과(xanthan gum의 경우 1mg/ml 에서 2%)와 차이를 보였는데 그 이유는 X. Xiong et al.(2013) 경우 산과 염기를 이용하 여 xanthan gum을 oligo 형태로 분해하여 실험을 하였기 때문이라고 생각한다. 우리는 추출한 polymer 형태의 EPS와 비교하기 위하여 xanthan gum을 polymer상태에서 실험 하였다. Xanthan gum과 비교하여 EPS의 경우 1mg/ml에서 EPS_S; 8.31%, EPS_P; 5.17%, EPS_F; 30.11%로 보다 높은 라디칼 소거능을 보였다. 특히 EPS_F의 경우 xanthan gum의 활성에 15배에 해당하는 가장 높은 활성을 보였다. H2O2는 낮은 반응성을 가지고 있지만, Fe2+ 또는 Cu2+와 반응하여 수산화 라디칼을 형성하기도 한다 (X. Xiong et al. 2013). 이렇게 생성된 수산화 라디칼은 반응성이 매우 강하고, 반감기가 나노초 정도로 매우 짧다. 이런 짧은 수명에도 불구하고 거의 모든 종 류의 분자들을 공격하여 필수 분자들을 없애버린다. 이를 예방하기 위한 항산화 작용으 로 H2O2가 있다.

그림 35에는 대조구로 사용한 ascorbic acid의 수산화 라디칼 소거능을 나타내었다. Ascorbic acid는 400ug/ml에서 50% 이상의 수산화 라디칼 소거능을 보였으면 DPPH 라 디칼 소거능 보다는 고농도에서 활성을 보였다. 그림 36에는 xanthan gum과 EPS 시료 의 수산화 라디칼 소거능을 나타내었다. Xanthan gum은 1mg/ml에서 15.78%로 DPPH 라디칼 소거능보다 높은 활성을 보였다. EPS의 경우 1mg/ml에서 EPS_S; 17.46%, EPS_P; 27.66%, EPS_F; 23.57%로 xanthan gum보다 모두 높은 활성을 나타내었다. EPS_S와 EPS_P의 경우 DPPH 라디칼 소거능보다 수산화 라디칼 소거능이 더 높았다. EPS_F의 경우 DPPH 라디칼 소거능이 더 높은 것으로 나타났으나, 다른 시료에 비하여 둘 다 높은 활성을 보였다.



(그림 33) Ascorbic acid의 DPPH 라디칼 소거능.



(그림 34) Xanthan gum(XG)과 EPS 시료의 DPPH 라디칼 소거능.



(그림 35) Ascorbic acid의 과산화수소 라디칼 소거능.



(그림 36) Xanthan gum(XG)과 EPS 시료의 과산화수소 라디칼 소거능.

(2) 동결보호능 측정

동결보호능 측정 결과는 그림 37(24시간)과 그림 38(48시간)에 나타내었다. 생존율이 나 타난 모든 시료에서는 시간에 따라 생존율이 감소하는 경향을 보였으며, EPS_F 1%은 24시간과 48시간의 생존율 차이가 4.52로 가장 적게 나타났다. 또한 생존율에서도 EPS_F 1%가 24시간(70.66±5.4%)과 48시간(66.13±2.0%) 모두에서 가장 높은 생존율을 보였다. EPS_F 0.1%에서는 xanthan gum 0.1% 보다 낮은 생존율을 보였으나 EPS_F 1%에서는 급격한 생존율 증가로 xanthan gum 1% 보다 높은 수치를 나타내었다. 이에 반하여 EPS_S의 경우 최대 0.4(0.1%, 48시간)의 오차가 발생하였으나 모두 0%가 나타났 고, EPS_P의 경우 농도에 반비례하는 결과가 나타났다. 이 결과로 미루어보아 EPS_S와 EPS_P의 경우 항균효과를 가진 EPS가 포함이 된 것으로 생각된다. EPS_P의 경우 항균 효과를 가진 EPS가 포함이 되어 있으나 그 양이 적거나 혹은 효과가 미미한 EPS가 존 재하여 0.1%에서는 생존율이 나타나 것으로 판단된다. 하지만 EPS_S의 경우 항균성이 0.1%에서도 생존율이 나타나지 않은 것으로 보아 항균성이 강한 EPS나 다량의 항균 EPS가 포함이 된 것으로 생각된다.







(그림 38) Xanthan gum과 EPS 시료를 첨가한 *E. coli*의 생존율 (48시 간).

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

- 본 연구의 최종 목표는 '해빙 미소생물의 환경적응에 의한 Exopolysaccharides(EPS, 세포외 다당체)와 얼음결합 당단백질이 해빙의 구조와 해빙 생태계에 미치는 영향 분석'임
- 이를 위하여 1차년도에 EPS 및 단백질 분비 종을 선별하여 조류 2종과 박테리아 1종을 확
 보. EPS 분비 최적 조건을 분석
- 조류 및 박테리아를 최적 조건에서 배양한 다음 배양액에서 EPS를 추출하고, 성분당 및 유 론산, 황산 에스터의 함량을 분석하고 분광학적 분석(FT-IR과 NMR분석)을 통하여 성분을 재확인하였음
- O EPS가 해빙 구조에 미치는 영향을 알아보고자 EPS의 얼음결합 특성을 분석함. 온도 이력 활성과 얼음 재결정화 억제 활성, 얼음 흡착 유지에서 모두 활성을 보이지 않아 예상과는 달리 얼음과 직접적 결합을 하지 않는 것으로 생각됨
- 그 외 추가적으로 생리활성(항산화 효과, 동결보존)을 분석. 대조구로 사용한 xanthan gum 에 비하여 3가지 시료 모두 높은 항산화 활성을 보였음. 그 중 박테리아의 EPS의 경우 DPPH 라디칼 소거능에서 xanthan gum에 비하여 15배 높은 고활성을 보였음. 동결보존에 서 역시 박테리아의 EPS가 고효율을 나타냈으며, 조류의 EPS의 경우 예상과는 달리 항균 성을 보였음.

해당연도	세부 연구개발 목표	세부 연구개발 내용	달성도
2014년 (1차년도)	EPS, 얼음결합 당단백질 생산 해빙 미소생물 확보	- 극지 해빙 미세조류 및 박테리아 배양 - EPS, 단백질 분비 종 선별	100%
	배양 조건에 따른 EPS, 단백질 분비 연구	- EPS의 당 조성 분석 - 세포외 분비 단백질의 조성 분석	80%
2015년 (2차년도)	해빙 미세조류 대량배양	- 해빙 미세조류 대량 배양 - EPS 및 얼음결합 당단백질 추출	100%
	해빙 구조 분석	- EPS와 얼음결합 당단백질 조성에 따른 해빙구조 분석	80%

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 연구결과의 활용방안

- O 북극 해빙 미소생물은 대부분 호냉성으로 특성에 맞는 배양 기술 확보에 기초 자료로 활용
- 해빙 미소생물의 환경유전체 분석을 통한 유용유전자 검색 및 적응 기작 관련 유용 저온효
 소를 발굴할 수 있는 기초 자료로 사용
- O 예상과 달리, 현재까지의 연구 결과에서 미세조류의 exopolysaccharide에서는 얼음 결합 특 성과 동결보호능이 관찰되지 않음. 또한 미세조류와 박테리아의 exopolysaccharide가 구성 성분이나 생리적 활성이 다른 것으로 판단됨. 따라서 후속 연구를 통해 이를 조사할 경우 해빙 EPS의 역할 규명에 기초 자료 제공

제 2 절 기대성과 및 파급효과

- O 2040년까지 최소 400조 달러 이상의 기후변화 비용 부담 발생할 것으로 예상됨. 환경변화에 의한 해빙감소와 해빙생태계 변화를 파악함으로써 향후 해빙 감소와 지구 온난화 등이 초 래할 막대한 경제적 손실에 선제적인 대응
- 극지 생물에 대한 높은 이해와 유용물질 분리 경험을 바탕으로 환경 변화에 따른 해빙 생 태계를 예측할 수 있는 전문 연구 인력 양성
- O Exopolysaccharide의 발현 미생물을 파악하고 연구함으로써, 환경적·산업적으로 가치가 있는 exopolysaccharide의 산업화에 도움이 될 것으로 예상됨. 많은 exopolysaccharide의 경우 항산화, 항염증, 항바이러스, 항박테리아, 항암, 면역강화등의 생리활성을 보이는데, 예비 실험 결과 항산화뿐만이 아닌 항박테리아 활성도 보이는 것으로 관찰됨. 미지의 해빙 exopolysaccharide에 대한 생리활성 연구는 exopolysaccharide의 활용 분야를 늘려 주는 것과 더불어 다양한 분야에서의 상용화로 이어지기 위한 기초 제공

제 6 장 참고문헌

Bao H, You S (2011) Molecular characterisitics of water-soluble Extracts from Hypsizigus marmoreus and their in vitro growth inhibition of various cancer cell lines and immunomodulatory function in raw 264.7 cell. Biosci Biotechnol Biochem 75(5): 891–898.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72(1-2): 248 - 254.

Chevolot L, Foucault A, Chaubet F, Kervarec N, Sinquin C, Fisher AM, Boisson-Vidal C (1999) Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity. Carbohydr Res 319: 154–165.

Ciucanu I, Kerek F (1984) A Simple and Rapid Method for the Permethylation of Carbohydrates. Carbohydr Res 131(2):209–217.

Deming JW (2002) Psychrophiles and polar regions. Curr Opin Microbiol 5: 301-309.

Do H, Lee JH, Lee SG, Kim HJ. (2012) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of an ice-binding protein (FfIBP) from Flavobacterium frigoris PS1. Acta Cryst F68: 806 - 809.

Donot F, Fontana A. Baccous JC, Schorr-Galindo S (2012) Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. Carbohydr Polym 87: 951–962.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers Pa, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem 28(3): 350 - 356.

Ewert M, Deming JW (2011) Selective retention in saline ice of extracellular polysaccharides produced by the cold-adapted marine bacterium Colwellia psychrerythraea strain 34H. Ann Glaciology 52(57): 111 - 117.

Falshaw R, Furneaux RH, Stevenson DE (2005) Structural analysis of carrageenans from the red alga, Callophyllis hombroniana Mont. Kütz (Kallymeniaceae, Rhodophyta). Carbohydr Res 340(6): 1149 - 1158.

Gügi B, Le Costaouec, Burel C, Lerouge P, Helbert W, Bardor M (2015) Diatom-specific oligosaccharide and polysaccharide structures help to unravel biosynthetic capabilities in diatoms. Mar Drugs 13: 5993–6018.

Guillard RRL, Ryther JH (1962) Studies of marine planktonic diatoms: I. Cyclotella nana Hustedt, and Detonula confervacea (cleve) gran. Can J Microbiol 8: 229 - 239.

Jiang M, Ma J, Qiu LM (2011) Cryoprotective effect of an insect antifreeze protein MpAFP 698 and its mutants from the desert beetle Microdera punctipennis. Cryo Letters 32(5): 436–446.

Kim HJ, Shim HE, Lee JH, Kang Y–C, Hur YB (2015) Ice-binding protein Derived from Glaciozyma Can Improve the Viability of Cryopreserved Mammalian Cells. J Microbiol Biotechnol 25(12): 1989–1996.

Krembs C, Deming JW (2008) The role of exopolymers in microbial adaptation to sea ice. In book: Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology, pp.247–264.

Marx JG, Carpenter SD, Deming JW. (2009) Production of cryoprotectant extracellular polysaccharide substances (EPS) by the marine psychrophilic bacterium Colwellia psychrerythraea strain 34H under extreme conditions. Can J Microbiol 55: 63–72.

Nichols CA, Guezennec J, Bowman JP (2005) Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the Southern Ocean, sea ice, and deep sea hydrothermal vents: a review. Mar Biotechnol 7: 253–271.

Nisha P, Thangavel M (2014) Isolation and Characterization of Biofilm Producing Bacteria from Arabian Sea. Res J Recent Sci 3: 132–136.

Park KS, Do H, Lee JH, Park SI, Kim EJ, Kim S-J, Kang S-H, Kim HJ (2012) Characterization of the ice-binding protein from Arctic yeast Leucosporidium sp. AY30. Cryobiology 64: 286 - 296.

Pereira L, Amado AM, Critchley AT, van de Velde F, Ribeiro-Claro PJA (2009) Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). Food Hydrocoll 23(7): 1903 - 1909. Pereira L, Sousa A, Coelho H, Amado AM, Ribeiro-Claro PJA (2003) Use of FTIR, FT-Raman and 13C-NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. Biomol Eng 20(4-6): 223 - 228.

Qiu X, Amarasekara A, Doctor V (2006) Effect of oversulfation on the chemical and biological properties of fucoidan. Carbohydr Polym 63(2): 224 - 228.

Saboural P, Chaubet F, Rouzet F, Al-Shoukr F, Azzouna RB, Bouchemal N, Picton L, Louedec L, Maire M, Rolland L, Potier G, Le Guludec D, Letourneur D, Chauvierre (2014) Purification of a low molecular weight fucoidan for SPECT molecular imaging of myocardial infarction. Mar Drugs 12: 4851–4867.

Schoenrock KM, Amsler CD, McClintock JB, Baker BJ (2015) Life history bias in endophyte infection of the Antarctic rhodophyte, Iridaea cordata. Bot Mar 58(1): 1 - 8.

Sekkal M, Legrand P (1993) A spectroscopic investigation of the carrageenans and agar in the 1500-100 cm-1spectral range. Spectrochim Acta Part A Mol Spectrosc 49(2): 209 - 221.

Sekkal M, Legrand P, Huvenne JP, Verdus MC (1993) The use of FTIR microspectrometry as a new tool for the identification in situ of polygalactanes in red seaweeds. J Mol Struct 294: 227 - 230.

Souza BWS, Cerqueira MA, Bourbon AI, Pinheiro AC, Martins JT, Teixeira JA, Coimbra MA, Vicente AA (2012) Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed Gracilaria birdiae. Food Hydrocoll 27(2): 287 - 292.

Synytsya A, Čopíková J, Matějka P, Machovič V (2003) Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins. Carbohydr Polym 54(1): 97 - 106.

Witvrouw M, De Clercq E (1997) Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. Gen Pharmacol Vasc Syst 29(4): 497 - 511.

Wu Y, Hui D, Eskin NAM, Cui SW (2016) Water-soluble yellow mustard mucilage: A novel ingredient with potent antioxidant properties. Int J Biol Macromol In press

Xiong X, Li M, Xie J, Jin Q, Xue B, Sun T (2013) Antioxidantactivity of xanthan oligosaccharides prepared by different degradation methods. Carbohydr Polym 92: 1166–1171.

Yu G, Hu Y, Yang B, Zhao X, Wang P, Ji G, Wu J, Guan H (2010) Extraction, isolation and structural characterization of polysaccharides from a red alga Gloiopeltis furcata. J Ocean Univ China 9(2): 193 - 197.



