

BSPN 507-00-1628-3

해양미생물 다양성 확보 및
유전자원 이용기술 개발

Utilization of Genetic Resources and Procurement
of Marine Microbial Diversity

2004. 8.

한국해양연구원

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부장관 귀하

본 보고서를 “해양미생물 다양성 확보 및 유전자원 이용기술 개발” 과제의
2단계 1차년도 최종보고서로 제출합니다.

2004. 8

주관연구기관명: 한국해양연구원

주관연구책임자: 이 홍 금

참 여 연 구 원: 권개경, 이유경, 이정현,
현정호, 임정한, 이은영
김성진, 김효원, 조경희,
박재현, 박규진, 이현상
안세훈, 박정애, 이재형
이미란, 성기철, 이순재
류향선, 조현희

여 백

보고서 초록

과제관리번호	M1-0104-00-0001	총 연구기간	2001.7.11 -2004.7.10	단계 구분	2단계 1차년도
연구사업명	중 사업명	국가지정연구실사업			
	세부사업명				
연구과제명	중 과제명				
	세부(단위)과제명	해양미생물 다양성 확보 및 유전자원 이용기술			
연구책임자	이홍금	해당단계 참여연구원수	총 : 17 명 내부 : 4 명 외부 : 11 명	총 연구비	정부 : 1,036,412 천원 기업 : 천원 계 : 1,036,412 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국해양연구원 극지연구소		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :	상대국연구기관명 :			
위탁연구	연구기관명 :	연구책임자 :			
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	352
<p>1. 생물막 균주 확보 :</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 총 2,132주의 미생물 분리 및 보존 (아크릴 표면에 부착하는 세균 339주, 유리표면에 부착하는 세균 220주 및 전국 연안의 자연 생물막으로부터 세균 970, 남조세균 603주 분리, 보존) <p>2. 해양생물막 형성 기작 :</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 생물막 형성 미생물 군집의 시간별 특성 변화 ○ 생물막 구성 미생물 군집의 다양성 변화 ○ 생물막 형성과정에 세포표면 소수성이 중요하게 작용 <p>3. 해양생물막 형성 미생물 다양성 조사 :</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 해양생물막에서 다양한 신종 후보 미생물 발견(73 균주) <p>4. 해양생물막 형성 미생물의 이용 :</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 해양생물막으로부터 유용성 균주 검색 ○ 세포의 다당류 생산 돌연변이주 제조 - <i>Hahella chejuensis</i> 무색소 변이주 m10356 개발 ○ 살조능 우수 해양미생물 색소 발견 - <i>Hahella chejuensis</i> 적색색소는 0.1 ppm에서 30분간 적조생물 <i>Cochlodinium polykrikoides</i>에 대한 살조효능 95% <p>5. 해양미생물 유전자 분리·확보 :</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 세포외물질을 생산하는 해양미생물의 간편한 DNA 추출방법 개발 ○ 모델 해양미생물 <i>Hahella chejuensis</i>의 gene DNA library 구축 (1.8 X 10³ Mb) ○ 생물막내 배양불가 미생물 유전체 BAC 라이브러리 구축 (50Mb) 					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	해양생물막, 생물막 조절조건, 유전자 기능분석, 유용유전자 탐색, 생물막형성 미생물다양성 분석			
	영 어	biofilm-forming marine microorganism, biofilm controlling condition, gene function analysis, gene screening, diversity of marine biofilm microorganisms			

여 백

요 약 문

I. 제 목

해양미생물 다양성 확보 및 유전자원 이용기술

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최종목표 : 해양환경의 생물막내에 서식하는 미생물 유전자원을 확보하고, 이들의 생체기능과 유전정보 분석에 기초한 유용성 검색 및 활용기술의 개발

1단계 목표 : 해양미생물 유전자원의 확보 및 기능분석

- 해양생물막을 대상으로 배양가능한 해양미생물 분리보전
- 배양가능 미생물의 유용성 검색 및 유전자원의 확보
- 배양불가 미생물 유전자원의 분리확보

2단계 목표 : 유용성 검색기법 개발 및 유용자원화

- 생물막 환경내 미생물의 활용기술 개발
- 해양미생물 유전자원의 산업적 이용기술의 모델로 세포외다당류 생합성 및 고분자물질 분해효소 관련 유전자 탐색기술 개발
- 분리확보된 유전자원을 대상으로 유용유전자 분리 및 활용

2단계 1차년도 목표 : 생물막 부착환경 규명

해양유래 유용유전자의 탐색기법 개발

해양생물막은 연안, 조류양식용 구조물, 패류양식용 구조물 등의 표면에서 성장하는 생물체에 의해 형성되는 자연현상의 일종으로 세균, 미세조류 등의 다양한 해양미생물이 군집을 이루어 서식하고 있으나 생물막 매트릭스내의 종조성이나 미세환경에 대한 연구가 일천한 상황이다. 해양생물막은 미생물다양성의 분석, 유전자원의 분리, 이용기술의 개발 및 적용을 위한 다양성 연구의 모델 서식지이며 선박과 해양구조물에 끼치는 피해로 인해 부정적인 측면을 제어하고 양식산업에서 긍정적인 측면을 이용하며 고분자물질을 산업 공정에 이용하는 등 파급효과가 큰 연구대상 해양환경이다. 따라서 해양환경 중 생물막의 미생물 자원을 대상으로 미생물의 분리/배양기술, 첨단 분류/동정기술, 유전자 특성/기능분석기술 개발, 생체 및 유전자 활용기술을 통한 가치평가를 거쳐 (1) 새로운 생체기능이나 형질을 가진 해양미생물을 산업적으로 이용 및 (2) 국내 해양미생물 다양성 보전을 위한 핵심기술의 개발이 필요하다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 해양생물막 미생물 분리·보전

- 시료채취
- 순수분리 배양
- 초저온 냉동고에 보전

2. 해양생물막 형성 기작 조사

- 생물막 형성 미생물 군집의 시간별 특성 변화
 - 부착판 설치
 - 총세균수, 종속영양세균, 세포외 효소 활성, 기질이용 변화
- 생물막 형성 미생물 군집의 다양성 변화
 - 말단제한절편다형성 분석(T-RFLP법)에 의한 종변화 분석
 - 초기 생물막에서 세균 천이과정 연구
- 생물막 조절기작 연구
 - 세균 특성에 따른 생물막 생성과정에서의 상호작용 연구

- 해양생물막 표준균주 도출

3. 해양생물막 형성 미생물 다양성 조사

- 분리 균주의 염기서열 분석
- 분리균주의 분류군별 조성
- 분리균주의 계통학적 분류

4. 분리미생물의 유용성

- 표면부착능 검색
- 세포표면의 소수성 검색
- 세포외다당류 생성 검색
- 세포외다당류생산 돌연변이주 개발
 - *Hahella chejuensis* 무색소 변이주 제조
 - 세포외다당류 생산 최적조건
 - 세포외다당류의 유화안정능 조사
 - 세포외다당류의 특성조사
 - 세포외다당류의 물성 조사
- 해양미생물 유래 색소의 살조 효능
 - *Hahella chejuensis* 유래 적색색소 분리
 - 살조효능 조사
 - 적색색소의 특성 조사
 - 현장실험을 위한 *in situ* 시험

5. 해양미생물 유전자 분리 추출

- 세포외물질 생산 미생물의 DNA 추출방법 개발
- *Hahella*의 genomic DNA library구축 및 EPS 관련 유전자 cloning
- 배양불가 생물막 미생물유전체 BAC library 구축

IV. 연구개발 결과

1. 해양생물막 구성 미생물 다양성 확보

다양한 해양미생물 유전자원을 확보하기 위하여 해양생물막 시료를 채취하고 한천 배지에 도말하여 세균을 분리하여 냉동보존하였다. 전국연안에서 세균 1,525주, 남조세균 607주로 총 2,132균주를 확보하였다 (아크릴 표면에 부착하는 세균 339주, 유리표면에 부착하는 세균 216주와 남조세균 4주 및 전국 연안의 자연 생물막으로부터 세균 970, 남조세균 603주 분리, 보존). 분리균주 중 다수가 세포외 고분자 다당류 생성능력을 보였으며 세포표면 소수성, 부착능 등이 우수한 다수의 세균도 확보되었다.

2. 해양생물막 형성 기작

가. 생물막 형성 미생물 군집의 시간별 특성 변화

해양생물막 형성의 초기과정을 이해하고 생물막 생성에 관여하는 미생물 자원을 확보하기 위하여 부착판을 10 개월 간 설치한 후 생물막을 회수하여 세균수와 생물막 군집의 세포외 효소활성을 측정된 결과 3일을 기준으로 세균수 및 세포외 효소활성이 급격한 변화함을 확인하였다. 생물막이 성숙된 후에는 고등생물들이 가입함에 따라 생물막 군집의 다양성과 두께에는 변화가 생겼지만 세균수와 세포외 효소활성은 계절변동만을 보였다.

나. 생물막 형성 미생물 군집의 다양성 변화

DNA의 말단절편방법을 이용하여 해양생물막 생성 초기과정에서 우점도 변화 및 생물막 구성 미생물의 천이를 조사한 결과 아크릴 표면에 부착하는 세균의 16S rDNA 말단 절편의 풍부도는 3일을 기준으로 크게 증가하였으나 2개월 이후 감소하였다. 각 T-RF의 비율을 기준으로 집괴분석을 수행한 결과 생물막을 구성하는 세균군집은 해수의 세균과 큰 차이를 보였으며 생물막 내에서도 3일을 기준으로 조성에 큰 변화를 보임. 생물막 형성 초기와 성숙 초기단계에서 다양성 지수에는 큰 변화가 없으나 성숙 후기에는 다양성이 감소되었다. 한편 초기 생물막에서 배양세균의 천이과정을 조사한

결과에 따르면 1일 이내의 기간에는 주로 CFB group의 세균과 *v-proteobacteria*에 속하는 세균들이 중요한 역할을 하며 이후 *a-proteobacteria*에 속하는 세균의 비중이 증가하는 것으로 나타났다.

다. 생물막 형성과정에 세포표면 소수성이 중요하게 작용!

세균의 특성에 따라 생물막 형성과정에서의 역할이 다를 것으로 보고 표면부착능, 세포표면소수성, 세포외 고분자물질 생산 등을 기준으로 선발한 4 균주의 초기 생물막 형성과정에서의 종조성변화를 추적하였다. 결과적으로 세포표면 소수성이 높은 세균이 생물막 형성에 가장 우선적인 역할을 하는 것으로 확인되었으며 표면부착능은 생물막의 안정화에 관여하는 것으로 나타났다. 세포외 고분자물질의 경우에는 그 역할을 뚜렷이 확인할 수 없었다. 앞으로 유기물, 무기영양원, 독성물질 등 다양한 요소가 생물막 생성에 미치는 영향을 조사함으로써 생물막 생성 과정에서의 세균간 상호조절기작을 규명한다. 생물막 조절기작에 부가하여 전국연안에서 분리한 생물막 초기미생물의 특성과 종분석을 통하여 표준균주를 도출하고자 하였다. 현재 표면부착능과 세포표면 소수성, 출현 빈도 등을 기준으로 *Psychroserpens*속에 속하는 13441과 13605, 13650, *Pseudoalteromonas*속에 속하는 13381과 13380, *Erythrobacter*속에 속하는 13405, 13603, 13604, 13613, *Bacillus*속에 속하는 13384, 13385, 13611 외에 동정이 되지 않은 균주로서 13644, *Roseobacter*속에 속하는 13538과 *Brevibacterium*속의 13369, 13540, 13541를 후보균주로 선정하였다. 이 외에 *Micrococcus*속의 13389균주는 부착성과 세포표면 소수성이 모두 높아 후보균주로 선정하였다.

3. 해양생물막 형성 미생물 다양성 조사 및 신종 후보 미생물 다수 발견

생물막 형성 초기과정에 관여하는 미생물의 종 다양성 및 한국 연안의 공통세균을 도출하기 위하여 부착판에 3일내에 생성된 생물막에서 분리된 세균 중 55 균주의 16S rDNA 염기서열 분석 결과 Proteobacteria 58.2%, CFB group 16.4%, low GC Gram positive bacteria 16.4%, Actinobacteria 9.1%의 조성을 보였다. 분석이 진행 된 동·서·남해 지역에서 공통적으로 출현하는 종은 발견되지 않아 생물막생성 초기과정에 관여하는 세균들이 해역의 환경 특성에 따라 달라지는 것으로 사료된다. 55 균주 중 34.5%가 지금까지 미배양되었거나 미동정된 종으로 확인되었으며 2단계의 정밀 동정

연구를 통하여 많은 수가 신종으로 보고될 것으로 예상된다.

해양연안 생물막을 구성하는 미생물의 종 다양성 및 공통으로 존재하는 세균을 선정하기 위하여 동·서·남해안 6곳의 생물막에서 분리된 세균 164 균주를 대상으로 DNA 염기서열 분석 결과 Proteobacteria 68.9%, CFB group 9.8%, low GC Gram positive bacteria 8.5%, Actinobacteria 12.8%의 조성을 보였다. 분석된 세균은 총 36개 속으로 분류되었으며 73 균주가 미동정 혹은 배양되지 않았던 종이어서 앞으로 신종으로 보고할 계획이다. 연구 지역에 공통으로 분포하는 균주는 아직 발견되지 않았으며 지역에 따라 미생물 종조성에 차이를 보였다. *Erythrobacter* 속, *Roseobacter* 속, *Pseudoalteromonas* 속에 속하는 균주가 비교적 넓은 지역에서 출현하였다. 따라서 방오 효능 평가시 연안에 따라 각기 다른 표준균주의 선정이 예상된다.

4. 해양생물막 형성 미생물의 이용

가. 해양생물막으로부터 유용성 균주 검색

전국연안 해양생물막에서 분리된 2,000여 균주의 미생물을 대상으로 세포표면의 소수성 및 세포외다당류 생성능을 조사한 결과 소수성이 우수한 균주 및 세포외다당류 생성능이 우수한 균주를 1차로 선별하였다. 이 균주는 2단계에는 정밀 응용검사를 거쳐 차후 산업용 소재 개발에 활용할 예정이다.

거제도 장목만에서 분리된 균주 대상으로 세포표면 소수성과 표면부착능 우수균주를 선별하였다. 세포표면 소수성은 BATH 방법으로 측정하였는데 조사대상 66균주 중 54균주는 30% 미만의 소수도 보였다. 표면부착능은 polystyrene 표면에 부착하는 능력으로 측정하였는데 3일 배양 후 씻겨나가지 않은 세균에 crystal violet 염색 후 0.2 이상의 OD값을 보이는 균주 선별하였다. 조사대상 106균주 중 90균주는 OD값 0.1 미만의 낮은 부착능을 보였다. 세포외다당류를 생산하는 미생물 확보를 위하여 phenol-sulfuric acid 정량법 이용하여 OD (488 nm) 2.0 이상인 균주 선별하였다. 균주 12842, 12844 균주는 높은 점도를 보였다.

나. 세포외 다당류 생산 *Hahella chejuensis* 무색소 변이주 m10356 제조

세포외다당류의 생성이 우수한 *Hahella chejuensis* 96CJ10356에서 무색소 변이주를 돌연변이원인 EMS를 처리하여 유도, 선발하였다. EMS에 의하여 유도된 변이주가 생

산하는 세포외다당류 (p-m10356)는 96CJ10356 균주에서 생산된 EPS-R과는 다르게 적색색소의 침적이 없는 무색의 다당체로 p-m10356의 유화안정능은 244시간까지 유화안정능이 유지되어 비교된 xanthan gum 보다 우수한 유화안정능을 가지고 있어 그 이용이 가능하다. p-m10356 생산은 최적 생산조건에서 19.2 g/ℓ으로 조사되었으며, p-m10356을 구성하는 환원당의 주성분은 glucose, galactose 및 galacturonic acid의 당량비 (molar ratio)는 대략 1 : 1 : 1.1 정도로 3종의 당이 유사한 몰 구성비를 유지하는 것으로 조사되었으며, 분자량은 1.39×10^6 Da이었다. 리올로지 분석 결과, p-m10356는 non-Newtonian fluid로 Power-Low model에 의한 pseudoplastic한 물성을 갖는 것으로 조사되었으며, 유체성으로 p-m10356 1.0%의 굳기지수 (consistency index; K)는 407.6, 유동 지수 (flow behavior index; n)는 0.75이고, Huggins 방정식에 의한 고유점도는 68.1 dl/g 및 Karamer 방정식에 의한 고유점도는 58.8 dl/g이었다. 또한 온도에 대하여 가역용액 (reversible fluid)의 특징을 가지고 있었으며, pH 및 염(salt)에 매우 안정한 물성을 가지고 있었다.

다. 살조능 우수 해양미생물 색소 발견

Hahella chejuensis 96CJ10356 균주에서 분리된 적색색소 (RP10356; Rf 0.88; 밝은 적색)가 적조원인 미세조류 실험대상 5종중에 선택적으로 *Cochlodinium polykrikoides*, *Gyrodinium impudicum* 및 *Heterosigma akashiwo* 등에 살조효과를 가지는 것으로 조사되었다. 살조효과는 조색소는 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 처리 후 30분에 조색소는 3.8%, 1시간에 11.5% 및 24 시간 후 72.1%이었으나, RP10356의 살조효과의 최저농도 실험결과 0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 처리 후 30분에 63.7%, 1시간에 95.3%의 살조효과를 나타내었다. 따라서 조 추출액내 존재하는 RP10356에 의한 살조효과인 것으로 조사되었으며, *C. polykrikoides*에 대한 살조물질 phlorotannin 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 비교하여 우수한 살조효과를 가지며, 현장예비 실험결과, 살조효과가 있는 것으로 조사되었다.

5. 해양미생물 유전자 분리 · 확보

가. 세포외물질을 생산하는 해양미생물의 간편한 DNA 추출방법 개발

생물막 형성 미생물을 실내 배양하여 분자생물학적인 연구를 수행하고자 할 때 이런 다당류와 같은 분비물질이 핵산의 분리를 저해하여 연구에 어려움을 겪게 되었다.

일반적인 미생물 DNA purification kit나 토양에서 DNA를 분리하는 상업용 kit를 사용했을 때 세포외다당류 분비 미생물로부터 순도 높은 고분자의 DNA를 추출할 수 없었기 때문에 본 연구실에서는 세포외물질을 생산하는 해양미생물로부터 간편하게 DNA를 추출하는 새로운 방법을 개발하였다. 이 방법으로 추출된 DNA는 PCR, PFGE, 제한효소 처리, genomic DNA blot hybridization, 및 genomic DNA library 구축 등의 분자생물학적인 연구 수행에 적합한 양질의 DNA로 확인되었다.

나. 모델 해양미생물 *Hahella chejuensis*의 gene DNA library 구축

Genomic DNA library의 경우 평균 크기 10 kb의 DNA 절편을 ZAP Express vector (Stratagene)에 삽입하여 1.8×10^3 Mb 크기의 하였다. 이때 흰색의 recombinant plaques는 파란색의 background plaques의 380배 정도이므로 효율이 좋은 library로 확인되었다. 본 library로부터 다당류 대사관련 효소의 유전자를 분리하는 작업을 수행하였으며 현재 3 part, 12개의 유전자를 cloning하였다. 차후 이들 유전자 기능 규명을 위한 연구를 진행할 계획이다.

다. 생물막내 배양불가 미생물 유전체 BAC 라이브러리 구축 (50Mb)

해양생물막으로부터 DNA 추출 방법 및 BAC library 조제방법을 확립하였으며 경남 거제시 장목만에서 인공기저인 아크릴판에 7일 동안 형성된 해양 생물막을 대상으로 크기가 20 kb 이상의 DNA를 분리하였고 포스미드 (fosmid) 벡터내에 삽입하여 대장균 (*E. coli*) 숙주에 포스미드 라이브러리를 구축하여 생물막 형성과 관련된 배양불가 미생물의 유전자원 50 Mb을 확보하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

국내 연안 생물막에서 분리한 균주는 국내 학계 및 산업계의 관련 연구자에게 유용물질 탐색, 방오효능 평가, 유전체 연구 등을 위해 제공될 수 있으며 신종 후보미생물은 정밀 동정후 국제 미생물 분류학회에 등록할 계획이다.

생물막에서의 미생물 천이, 우점종 규명, 부착조절에 대한 기초연구는 방오물질 개발, 패류 및 해조류 양식 관련 기술개발의 기반으로 활용하며 어떤 미생물 종이 연안

생물막에 공통적으로 출현하는 가를 분석 한 후 방오효능평가의 기준이 될 미생물 표준균주를 도출할 계획이다.

분리 미생물 중 세포외다당류 생성, 세포표면 소수성, 부착능 등이 우수한 균주는 2단계에 정밀 생체기능 연구를 통하여 고부가가치 물질 생산용 미생물 개발에 활용할 예정이다. *Hahella chejuensis* 변이균주 m10356에서 생산한 p-m10356은 유화안정제로 활용할 계획이며, 분리된 적색색소는 살조능이 우수함으로 친환경적 적조제어제로 개발하고 색소생산 관련 유전자 연구를 통하여 색소 대량생산을 위한 형질전환 미생물 개발에 활용할 예정이다.

여 백

SUMMARY

I. Title

Utilization of genetic resources and procurement of marine microbial diversity

II. Objective and Significance

Final Goal : Procurement of genetic resources from marine microorganisms that inhabit in marine biofilm, analysis of their function and usefulness, and development of technique for practical use

Objective of the first step: Procurement of genetic resource from marine microorganisms and analysis of their function

- Isolation & preservation of marine microorganisms from marine biofilm
- Procurement of genetic resources from culturable microorganism and analysis of their usefulness
- Isolation of genetic resources from unculturable microorganisms

Microorganisms can adhere to natural or artificial surfaces, and form sessile multicellular communities known as biofilms. In marine environment, biofilms cover most of solid surfaces such as rocks, ships, loops, marine animals, algae, etc. of subtidal and intertidal regions. Although biofilms consist of microbial cells such as bacteria, fungi, algae and protozoa, species composition or micro-environment of biofilm have not been well studied until now. Marine biofilm is a good model for study of microbial diversity and procurement of genetic resource. Furthermore,

marine biofilm is an industrial implement for aquaculture of shellfishes and alga and for antifouling study. Therefore, we need to develop "Core Technology" for marine microbial diversity (1) to use marine microorganisms in industry, and (2) to preserve diversity of marine microorganism.

III. Contents and Scope

1. Isolation and preservation of marine microorganisms from marine biofilm

- Sample collection
- Isolation and pure culture
- Preservation in deep-freezer

2. Analysis of marine biofilm forming process

- Succession of marine microorganisms in marine biofilm
 - installation of acrylic coupons
 - Analysis of total number of bacteria and viable heterotrophic bacteria, extracellular enzyme activities (EEA) and metabolic diversity
- Diversity analysis of marine microorganisms in marine biofilm
 - Analysis of change in species composition using T-RFLP method
 - Analysis of compositional changes of cultured bacteria from initial phase of biofilm formation
- Studies on regulation factors of biofilm formation
 - Analysis of interaction between microorganisms has different characteristics during biofilm formation
 - Selection of standard marine-biofilm forming bacteria based on cell surface hydrophobicity, attachment ability and production of quorum sensing signal

3. Diversity analysis of culturable marine microorganisms from marine biofilm

- Sequence analysis of bacterial isolates
- Systematic composition of bacterial isolates
- Phylogenetic analysis of bacterial isolates

4. Usefulness of bacterial isolates

- Analysis of attachment ability
- Analysis of cell surface hydrophobicity
- Analysis of production of EPS (extracellular polysaccharide)
- Development of mutants producing EPS (extracellular polysaccharide)
 - Development of *Hahella chejuensis* colorless mutants
 - Optimum condition of EPS production
 - Analysis of emulsifying stability of EPS
 - Analysis of characterization of p-m10356
 - Analysis of rheological properties of EPS
- Algicidal effect of marine bacterial pigment
 - Isolation of pigment from *Hahella chejuensis*
 - Analysis of algicidal effect
 - Analysis of pigment characterization
 - On situ test for the field test in algicidal effect

5. Isolation of genetic resources from marine microorganism

- Development of DNA extraction method from microorganisms producing extracellular materials
- Construction of genomic DNA library of *Hahella chejuensis*
- Construction of BAC library of unculturable biofilm microorganisms

IV. Results

1. Isolation and preservation of marine microorganisms from marine biofilm

Various microbial strains were isolated from marine biofilm formed on coastal region and stored under deep freezing condition. Total 1,525 strains of bacteria and 607 strains of cyanobacteria were isolated and stored. The sources were as follows; 339 bacteria isolated from acrylic surfaces, 216 bacteria and 4 cyanobacteria isolated from glass surfaces, 970 bacteria isolated from natural biofilm and 603 cyanobacteria isolated from natural biofilm. Many of the isolates could produce high molecular weight EPS and/or high values of cell surface hydrophobicity or attachment ability.

2. Analysis of process of marine biofilm formation

A. Fluctuation of microbial communities in biofilm matrix during early stage of biofilm formation and seasonal progress

To evaluate the initial process of biofilm formation in seawater and procuring microbial resources from biofilm matrix, we investigated the changes of bacterial number and extracellular enzyme activities for 10 months after emerging acrylic surfaces in seawater. The numbers and activities of bacteria in biofilm matrix showed exponential growth after 3 to 4 days of adaptation. Although the thickness of biofilm increased with the maturation and settlement of higher organisms in biofilm matrix, bacterial numbers and activities in biofilm matrix only showed seasonal fluctuation.

B. Succession of microbial community in biofilm matrix

Succession of microbial community in biofilm matrix was investigated with the T-RFLP fingerprinting method of 16S rDNA fragments during the formation of biofilm. Although the diversity index was not showing significant difference, the richness of T-RFs increased markedly after 3 days of biofilm formation. Cluster

analysis revealed that microbial community structure was absolutely different between microorganisms before attachment and after attachment. The community structure changed with the progress of biofilm maturation and diversity was decreased after 2 months of exposure in seawater. During the early phase of biofilm formation, CFB group bacteria and γ -proteobacteria group bacteria were major constituents of cultivated bacteria within one day and success to strains belonging to α -proteobacteria.

C. Studies on regulation factors of biofilm formation

Among the selected strains, strain showing high value of cell surface hydrophobicity attached faster than other strains, has high attachment ability or low values of two characteristics. Attachment ability might play to stabilization of biofilm structure. Various controlling factors will studied further. Besides the regulation factors, selection of standard marine-biofilm forming strains were conducted. Based on cell surface hydrophobicity, attachment ability and frequency of appearance, 3 strains belonging to *Psychroserpens*, 2 strains belong to *Pseudoalteromonas*, 4 strains belonging to *Erythrobacter*, 3 strains belonging to *Bacillus* and unidentified strain 13644 were selected as candidature of standard strains, One *Roseobacter* species, 3 *Brevibacterium* strains and one *Micrococcus* species also selected.

3. Diversity of biofilm forming bacteria

Biofilm forming bacteria were isolated from the early phase of biofilm formation and matured biofilm and their phylogenetic properties were investigated in order to procure standard bacterial strains for biofilm control studies. Sampling was done at 6 different seashore area of Korean Peninsula. The results of partial sequence of 16S rDNA revealed that 76 isolates from early phase of biofilm formation could be assigned to 26 known genera which have been reported widespread in marine environment. Among the analyzed, proportion of each phylogenetic group was as following; 32.0% of α -Proteobacteria, 26.7% of γ

-Proteobacteria, 26.7% of Gram positive bacteria and 14.7% of CFB group bacteria. Bacterial isolates from mature biofilm also showed high diversity. 164 analyzed isolates composed 68.9% of Proteobacteria, 9.8% of CFB group, 8.5% of low GC Gram positive bacteria, and 12.8% of Actinobacteria. They were assigned to 36 genera and about half of the isolates had been reported previously as uncultured or unidentified in GenBank database. Bacteria belonging to genus Erythrobacter, Roseobacter Pseudoalteromonas and Psychroserpens were detected more than 3 different sampling areas. As any bacterial genus was detected in all sampling areas, standard strains will vary with geographical variation.

4. Utilization of marine biofilm-forming microorganisms

A. Screening of valuable bacteria from isolates

The bacterial isolates showing high values of cell surface hydrophobicity, attachment ability and/or EPS producibility were pre-selected from the about 2,000 isolated strains. The selected were as follows; 12 strains showing more than 50% of cell surface hydrophobicity, 9 strains showing more than 10 of attachment ability, and 6 strains producing high amounts of EPS. They will be investigated more and developed as new materials for industrial application.

B. Development of *Hahella chejuensis* colorless mutant producing exopolysaccharides

By treatment of mutagen EMS with *Hahella chejuensis*, a colorless mutant, strain m10356 was selected, which produced white exopolysaccharide. The p-m10356 produced by m10356 maintains emulsifying stability by 244 hr. The optimum productivity for p-m10356 is 19.2 g/ℓ. The p-m10356 had a molecular weight of 1.39×10^6 daltons, and was characterized as a heteropolysaccharide of glucose, galactose and galacturonic acid (molar ratio, 1:1:1.1). The rheological properties of p-m10356 had been studied. The intrinsic viscosity of p-m10356 was 68.1 and 58.5 g/dl by Huggins equation and Kraemer equation. Aqueous dispersions of p-KG03 at the concentrations 0.1 -1.0%

(w/w) showed marked shear-thinning properties as Power-Law behavior. In aqueous dispersions of 1.0% (w/w) p-m10356, consistency index (K) and flow behavior index (n) were 407 and 0.75, respectively. And p-KG03 was stable to pH and salts (NaCl and CaCl₂).

C. Algicidal effect of pigment from marine bacteria

Red pigment (RP10356; R_f 0.88; dark red) produced by *Hahella chejuensis* 96CJ10356 killed microalgae such as *Cochlodinium polykrikoides*, *Gyrodinium impudicum* and *Heterosigma akashiwo* that induce red tide. Algicidal effect of RP10356 was much greater than previously reported algicide, phlorotannin. In field test, RP10356 also have algicidal effect against *C. polykrikoides*.

5. Isolation and procurement of genetic resource of marine microorganisms

A. Development of DNA extraction method from microorganism producing extracellular materials

Marine bacteria producing extracellular materials is difficult to isolate DNA, because extracellular materials such as polysaccharides, glycoproteins, and lipopolysaccharides can interfere with the DNA extraction process by absorbing the DNA. Furthermore, the polysaccharides co-precipitate with the DNA during the extraction procedures, which leads to problems, such as poor yields and subsequent interference with restriction endonuclease digestion. The successful application of molecular techniques relies on the effective recovery of DNA from samples. Therefore, a reproducible, simple, and rapid protocol for DNA extraction is essential for molecular studies on these marine bacteria. We developed a simple method for extracting DNA from the marine bacteria. The extracted DNA is of high quality and suitable for molecular analyses, such as PCR, restriction enzyme digestion, genomic DNA blot hybridization, and genomic DNA library construction. We used this method to extract genomic DNA from several other marine bacteria. Our method is a reproducible, simple, and rapid technique for routine DNA extractions from marine bacteria. Furthermore, the low cost of this method makes it attractive for

large-scale studies.

B. Construction of genomic DNA library of *Hahella chejuensis*

The average size of 10 kb DNA fragment was inserted into ZAP Express vector (Stratagene). Total size of genomic DNA library of *Hahella chejuensis* was 1.8×10^3 Mb. Twelve clones divided into 3 polysaccharide-producing genes from this library was cloned and to be analyzed further.

C. Construction of BAC library of unculturable biofilm bacteria (50Mb)

We isolated large size of DNA (> 20 kb) from marine biofilm formed on acrylic coupons for 7 days. The isolated DNA was inserted in Fosmid vector, and we constructed Fosmid library containing 50 Mb unculturable biofilm microorganism.

V. Application of this research

The marine bacteria isolated from marine biofilm will be offered to scientist and industry. They can be used to screen useful materials, test for antifouling agents, genomic study. Papers on new species candidates will be submitted to international microbial systematics journals.

Studies on microbial succession, dominant species, regulation of attachment of biofilm bacteria can be applied to aquaculture of algae and shellfish and to development of antifouling agent by selection of standard bacteria for antifouling test.

In the second step of this project, we are going to develop microorganisms to produce novel biomaterials. We also develop red-tide killing pigment from *Hahella chejuensis* and transformed bacteria for mass production of the pigment.

CONTENTS

Abstract	3
Summary	5
Contents	23
List of Figures	33
List of Tables	39
Chapter 1. Introduction	43
Section 1. Objective	43
Section 2. Necessity	45
1. Technical aspect	45
2. Economic aspect	45
3. Social aspect	46
Section 3. Scope	47
Chapter 2. State of the research	53
Section 1. Trend of technology	53
1. Developed country	53
2. Korea	54
3. Prospect	55
Section 2. Research trend on marine biofilm	56
Section 3. Research trend in microbial genomics	60
Chapter 3. Results of this study	69
Section 1. Procurement of microorganisms from marine biofilm	69
1. Theoretical & experimental approaches	69
2. Results	71
Section 2. Succession of marine microorganisms in marine biofilm	75
1. Theoretical & experimental approaches	75

A. Sampling sites	75
B. Installation of acrylic coupons	75
C. Pretreatment	78
D. Total bacteria numbers	78
E. Colony forming units	80
F. Extracellular enzyme activity	80
G. Diversity of substrates utilization	80
2. Results	81
A. Marine biofilm forming process	81
B. Total bacteria numbers	81
C. Colony forming units	84
D. Extracellular enzyme activity	84
E. Diversity of substrates utilization	87
Section 3. Change in diversity of microorganisms in marine biofilm	89
1. Theoretical & experimental approaches	89
1.1. Traces of changes of community structure based on T-RFLP method	
A. Change in community structure	89
B. DNA extraction	89
C. PCR (Polymerase Chain Reaction)	90
D. T-RFLP	92
1.2. Succession of cultivated biofilm bacteria & Total bacteria	92
A. Study area and time	92
B. Setting experimental system and sampling	93
C. Culture & Isolation of microorganisms	93
2. Results	96
2.1 Traces of changes of community structure based on T-RFLP method	
A. Amplification of 16S rDNA	96
B. T-RFLP	100
2.2 Succession of cultivated biofilm bacteria & Total bacteria	100
Section 4. Diversity analysis of microorganisms from marine biofilm	117

1. Theoretical & experimental approaches	117
2. Results	121
A. Microorganism diversity in early stage	121
B. Microorganism diversity of natural marine biofilm	131
Section 5. Utilization of microorganisms forming marine biofilm	135
1. Theoretical & experimental approaches	135
A. Cell surface hydrophobicity	135
B. Attachment ability	135
C. RFLP typing	136
D. EPS productivity	136
2. Results	139
A. Cell surface hydrophobicity	139
B. Attachment ability	142
C. RFLP type	144
D. EPS productivity	146
Section 6. Procuring standard marine-biofilm bacteria and regulation	
factor of biofilm formation	148
1. Theoretical & experimental approaches	148
A. Selection of standard marine biofilm strains from bacterial strains	
isolated at early phase of biofilm	148
B. Interaction of strains during biofilm formation	149
2. Results and Discussion	152
A. Selection of standard marine biofilm strains from bacterial strains	
isolated at early phase of biofilm	152
B. Interaction of strains during biofilm formation	158
Section 7. Development of <i>Hahella chejuensis</i> colorless mutants	171
1. Theoretical & experimental approaches	174
A. Development of mutant	174
B. Optimal condition for mutant	175
C. Properties of EPS produced by mutant strain	180

2. Results	183
A. Development of mutant	183
B. Optimal condition for mutant	188
C. Properties of EPS produced by mutant strain	200
Section 8. Algaeicidal pigment from marine bacteria	222
1. Theoretical & experimental approaches	224
2. Results	234
Section 9. Development of DNA extraction method	255
1. Theoretical & experimental approaches	255
2. Results	257
Section 10. Construction of genomic DNA library of <i>Hahella chejuensis</i>	263
1. Theoretical & experimental approaches	263
2. Results	265
Section 11. Isolation of genes concerned in EPS production	266
1. Theoretical & experimental approaches	266
2. Results	266
Section 12. Construction of BAC library of unculturable microorganisms	284
Chapter 4. Achievement & contribution	289
Section 1. Objective & scope of research	289
1. Final objective	289
2. Objective & scope for each step and research year	290
A. Objective of the first step	290
B. Yearly objective	291
Section 2. Achievement	292
Section 3. Outcome	294
1. Patents	294
2. Papers	295
3. Proceedings	296
Section 4. Contribution	298

Chapter 5. Plan for application of the result	303
Section 1. Examples of successful results	303
Section 2. Plan for application	304
Chapter 6. Information of science & technology	307
Section 1. APEC 2001 workshop	307
Section 2. AWI workshop	310
Section 3. Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference (APMBC 2002)	314
Section 4. Marine Biotechnology: Basics and Applications (MBBA 2003)	315
Section 5 Analysis of KOSEN manuscript - Marine biotechnology in 21th century	316
Section 6. ASM COntference on biofilm	323
Chapter 7. Reference	327
Appendix Plan for application of this result	337

목 차

보고서 초록	3
요 약 문	5
SUMMARY	15
CONTENTS	23
목 차	28
List of Figures	33
List of Tables	39
제 1 장 연구개발과제의 개요	43
제 1 절 연구목적	43
제 2 절 필요성	45
1. 기술적 측면	45
2. 경제·산업적 측면	45
3. 사회·문화적 측면	46
제 3 절 범위	47
제 2 장 국내외 기술개발 현황	53
제 1 절 국내외 기술동향 및 수준	53
1. 선진국의 동향	53
2. 국내의 동향	54
3. 앞으로의 전망	55
제 2 절 해양생물막 연구 동향	56
제 3 절 미생물 유전체 연구 동향	60
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	69
제 1 절 생물막 균주 확보	69
1. 이론적, 실험적 접근방법	69

2. 연구결과	71
제 2 절 해양생물막 형성 미생물 군집의 시간별 특성 변화	75
1. 이론적, 실험적 접근방법	75
가. 생물막 형성 과정 모니터링을 위한 실험 기간 및 장소	75
나. 부착판 설치 및 시료채취	75
다. 시료 전처리	78
라. 총세균수 (Total bacteria number)	78
마. 종속 영양 세균 (Colony forming unit)	80
바. 세포외 효소 활성 (Extracellular Enzyme Activity)	80
사. 기질 이용 다양성	80
2. 연구결과	81
가. 해수내 생물막 형성 과정 연구	81
나. 총세균수 (Total bacteria number)	81
다. 배양가능 세균 (colony forming unit)	84
라. 세포외 효소 활성	84
마. 기질 이용 다양성	87
제 3 절 생물막 구성 미생물 군집의 다양성 변화	89
1. 이론적, 실험적 접근방법	89
1.1. T-RAFLP 방법에 기초한 세균군집의 구조변화	89
가. 군집 구조 변화	89
나. DNA extraction	89
다. PCR (Polymerase Chain Reaction)	90
라. 말단제한절편다형성 분석	92
1.2. 생물막 배양세균의 종조성변화 및 DGGE를 이용한 미생물 군집 천이과정 연구	92
가. 생물막 미생물군집 천이 과정 연구시기 및 장소	92
나. 부착판 설치 및 시료채취	93
다. 미생물 배양 및 분리	93
2. 연구결과	96
2.1 T-RAFLP 방법을 이용한 생물막 미생물군집구조 변화 연구	96

가. 16S rDNA 증폭	96
나. 말단제한절편다형성 분석	100
2.2 생물막 미생물 군집 천이과정 연구	100
제 4 절 해양생물막 형성 미생물 다양성 조사	117
1. 이론적, 실험적 접근방법	117
2. 연구 결과	121
가. 생물막 형성 초기과정에 분리된 미생물 다양성	121
나. 자연생물막에 존재하는 미생물 다양성	131
제 5 절 해양생물막 형성 미생물의 이용	135
1. 이론적, 실험적 접근방법	135
가. 세포 표면 소수성	135
나. 부착능 (Attachment ability)	135
다. RFLP typing	136
라. EPS 생산력	136
2. 연구 결과	139
가. 분리 미생물의 세포표면 소수성	139
나. 부착성 (Attachment ability)	142
다. RFLP type 및 균주 선발	144
라. 선발 균주의 총 EPS 생산량	146
제 6 절 해양생물막 표준균주 후보 도출 및 생물막 생성 조절요인 연구	148
1. 이론적 실험적 접근방법	148
가. 생물막 생성 초기균주 중 생물막 표준균주 선발	148
나. 생물막 형성 과정 중 균주의 상호 영향에 관한 연구	149
2. 결과 및 고찰	152
가. 생물막 생성 초기균주 중 생물막 표준균주 선발	152
나. 생물막 형성 과정 중 균주간 상호 영향에 관한 연구	158
제 7 절 세포외 다당류 생산 돌연변이주 제조	171
1. 이론적, 실험적 접근방법	174
가. 돌연변이주 제조	174
나. 최적조건 확립	175

다. 돌연변이주가 생산하는 EPS 특성 조사	180
2. 연구결과	183
가. 돌연변이주 제조	183
나. 돌연변이주의 다당류 생산 최적조건	188
다. 돌연변이주가 생산하는 EPS 특성	200
제 8 절 살조능 우수 해양미생물 색소 및 활용기술 개발	222
1. 이론적, 실험적 접근방법	224
2. 연구결과	234
제 9 절 세포외물질을 생산하는 해양미생물의 간편한	
DNA 추출방법 개발	255
1. 이론적, 실험적 접근방법	255
2. 연구결과	257
제 10 절 모델 해양미생물 <i>Hahella chejuensis</i> 의 genomic DNA	
library 구축	263
1. 이론적, 실험적 접근방법	263
2. 연구결과	265
제 11 절 세포외 다당류 생산 관련 유전자 분리	266
1. 이론적, 실험적 접근방법	266
2. 연구결과	266
제 12 절 생물막내 배양불가 미생물 유전체 BAC 라이브러리	
구축 (50Mb)	284
제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도	289
제 1 절 연구목표 및 연구내용	289
1. 최종목표	289
2. 단계별/연차별 연구목표 및 연구내용	290
가. 단계별 연구목표	290
나. 1단계 연차별 연구개발 목표	291
제 2 절 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표 달성도	292
제 3 절 연구개발성과 현황	294

1. 특허출원/등록	294
2. 논문게재/투고	295
3. 학술발표	296
제 4 절 관련분야의 기술발전에의 기여도	298
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	303
제 1 절 연구개발결과의 대표적 성공사례	303
제 2 절 활용계획	304
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	307
제 1 절 APEC 2001 해양생물훈련과정	307
제 2 절 AWI 워크샵	310
제 3 절 아시아태평양 해양생물공학회 (APMBC 2002)	314
제 4 절 Marine Biotechnology : Basics and Applications 학회 (MBBA 2003)	315
제 5 절 KOSEN 자료분석 - 21세기의 해양생명공학	316
제 6 절 미국미생물학회 생물막 특별학회 (ASM Biofilm Conference)	323
제 7 장 참 고 문 헌	327
특정연구개발사업 연구결과 활용계획서	337

List of Figures

Fig. 1-1. Purpose of studies on marine microbial diversity of marine biofilm.	44
Fig. 1-2. Scheme for isolation, function analysis and utilization of genetic resources of marine microorganisms.	49
Fig. 3-1. Sampling sites in this study	72
Fig. 3-2. Marine biofilms formed on various marine architectures	73
Fig. 3-3. Scene of experimental buoy system in South Sea Institute	76
Fig. 3-4. Scheme of acrylic holder & slides	77
Fig. 3-5. Procedures for analysis of marine biofilm	79
Fig. 3-6. Photograph of biofilm formed on acrylic surface	82
Fig. 3-7. Total bacterial number on acrylic surface at each sampling time	83
Fig. 3-8. Culturable bacterial number on acrylic surface at each sampling time	85
Fig. 3-9. Changes of extracellular enzyme activities	86
Fig. 3-10. Preparation of Acryl surface and pre-treatment and harvest of produced biofilm	94
Fig. 3-11. Total DNA extracted from nine coupons and seawater control.	97
Fig. 3-12. Amplification of bacterial 16S rDNAs from total DNAs of biofilm coupons.	99
Fig. 3-13. Amplification of archaeal 16S rDNAs from total DNAs of biofilm coupons	99
Fig. 3-14. Bacterial T-RFLP pattern generated from HhaI digests	101
Fig. 3-15. Archaeal T-RFLP generated from Hha I digests and its distribution pattern of T-RFs on acrylic surface.	104
Fig. 3-16. Dendrogram of community relatedness of biofilm forming bacteria based on Spearman coefficient. Comparison of T-RFLP fingerprinting was conducted with WPGMA method.	107
Fig. 3-17. Dendrogram of community relatedness of biofilm forming microbial	

community (bacteria + achaea) based on Spearman coefficient..	108
Fig. 3-18. Composition of cultivated bacteria during the initial phase of biofilm formation.	114
Fig. 3-19. Graphic illustration of cultured bacterial succession during the initial phase of biofilm formation on acrylic surface in seawater.	116
Fig. 3-20. Culturable bacteria isolated from marine biofilms	120
Fig. 3-21. Number of culturable bacteria on acrylic surface from each sampling site.	122
Fig. 3-22. Composition of bacteria isolated from acrylic surface emerged in seawater for 3 days.	124
Fig. 3-23. Phylogenetic position of isolated bacteria from acrylic surfaces belonging to gram positive group based on partial sequence of 16S rDNA fragments.	126
Fig. 3-24. Phylogenetic position of isolated bacteria from acrylic surfaces belonging to CFB group based on partial sequence of 16S rDNA fragments.	128
Fig. 3-25. Phylogenetic position of isolated bacteria from acrylic surfaces belonging to α -proteobacteria based on partial sequence of 16S rDNA fragments.	129
Fig. 3-26. Phylogenetic position of isolated bacteria from acrylic surfaces belonging to γ -proteobacteria based on partial sequence of 16S rDNA fragments.	130
Fig. 3-27. Attachment properties measured with crystal violets on 96well microplate	138
Fig. 3-28. Cell surface hydrophobicity of isolated strains after 3 days of incubation.	141
Fig. 3-29. RFLP pattern analysis of strains isolated at early phase of biofilm formation after digested with HaeIII.	145
Fig. 3-30. Production of total EPS by the selected strains cultivated on ZoBell 2216e medium.	147
Fig. 3-31. Procedures for anlysis of interaction among selected strains	150

Fig. 3-32. Comparison of attachment ability and cell surface hydrophobicity of tested strains.	157
Fig. 3-33. Rooted neighbour-joining tree based on 16S rDNA sequence data.	159
Fig. 3-34. Effect of temperature on the cell growth of selected 4 strains	160
Fig. 3-35. Effect of salinity on cell growth of selected 4 strains	161
Fig. 3-36. Effect of pH on cell growth of selected 4 strains	162
Fig. 3-37. Growth curve of selected 4 strains on ZoBell 2216e broth	163
Fig. 3-38. Increase of bacterial biomass on acrylic surface during the mixed-culture of selected strains	167
Fig. 3-39. Changes of Representative T-RFs of selected 4 strains	170
Fig. 3-40. Mutants of exopolysaccharide-producing marine bacteria <i>Hahella</i> <i>chejuensis</i>	184
Fig. 3-41. Effect of media volume on the production of p-m10356 and cell growth.	191
Fig. 3-42. Effect of inoculum size on the production of p-m10356 and cell growth.	192
Fig. 3-43. Effect of carbon sources on the production of p-m10356 and cell growth.	193
Fig. 3-44. Effect of sucrose concentrations on the production of p-m10356 and cell growth.	194
Fig. 3-45. Effect of nitrogen sources on the production of p-m10356 and cell growth.	195
Fig. 3-46. Effect of C/N ratios of the production of p-m10356 and cell growth.	196
Fig. 3-47. Optimum condition for production of exopolysaccharide p-m10356 produced by white mutant m10356.	198
Fig. 3-48. White mutant of <i>Hahella chejuensis</i> 96CJ10356	199
Fig. 3-49. The photograph of emulsifying stability of various polysaccharide and p-m10356	202
Fig. 3-50. Ultra-microstructure of p-m10356 by Scanning Electron Microscopy.	203

Fig. 3-51. TLC chromatogram of hydrolyzed of p-m10356.	204
Fig. 3-52. Capillary electrophoresis chromatogram of hydrolyzed of p-m10356 for the monosaccharide analysis.	205
Fig. 3-53. Estimation of molecular weight of p-m10356 using Sephadose 4B gel chromatography.	207
Fig. 3-54. Differential scanning calorimeter thermogram of p-m10356.	208
Fig. 3-55. Relationship between shear stress and shear rate of p-m10356 1.0% solution.	210
Fig. 3-56. Relationship between shear stress and shear rate of p-m10356 1.0% solution for the consistency index (K) and flow behavior index (η) analysis.	211
Fig. 3-57. Relationship between shear stress and shear rate of p-m10356 at different concentrations.	213
Fig. 3-58. Relationship between shear stress and shear rate of p-m10356 by heat treatment.	214
Fig. 3-59. Relationship between shear stress and shear rate of p-m10356 at different pH.	215
Fig. 3-60. Relationship between shear stress and shear rate of p-m10356 at different concentrations of NaCl.	217
Fig. 3-61. Relationship between shear stress and shear rate of p-m10356 at different concentrations of CaCl ₂	218
Fig. 3-62. Relationship between shear stress and shear rate of p-m10356 at different temperature.	219
Fig. 3-63. Intrinsic viscosity of p-m10356 fluid calculated by reduced viscosity equation.	221
Fig. 3-64. The colony type of <i>Hahella chejuensis</i> 96CJ10356.	226
Fig. 3-65. Purification process of RP10356.	227
Fig. 3-66. The photograph of red-tides area for the field test of algicidal activity.	232
Fig. 3-67. Field Algicidal effect test by red pigment using reaction bottle	

<i>in situ</i>	233
Fig. 3-68. The algicidal effects of red pigment (crude) from <i>Hahella chejuensis</i> 96CO10356.	235
Fig. 3-69. The photography of algicidal effects for the red-tide 5 species by crude red pigment from <i>Hahella chjuensis</i> 96CO10356.	236
Fig. 3-70. Algicidal effect of RP10356 against <i>Cochlodinium polykrikoides</i>	238
Fig. 3-71. Algicidal process of RP10356 with <i>Cochlodinium polykrikoides</i>	239
Fig. 3-72. TLC isolation of red pigment from <i>Hahella chejuensis</i> 96CO10356.	240
Fig. 3-73. UV spectrum of RP10356	241
Fig. 3-74. TLC isolation of RP10356 by silica chromatography.	242
Fig. 3-75. HPLC chromatogram of RP10356 from <i>Hahella chjuensis</i> 96CO10356.	244
Fig. 3-76. Red-tide Youngpo-Ri Gosung-Gun Kungsangnam-do, Korea.	247
Fig. 3-77. Algicidal effect of RP10356 in the res-tide sea-water by <i>Cochlodinium</i> <i>polykrikoides</i> in Gan-gu, Yungduk-Gun Kyungsang buk-do, Korea.	248
Fig. 3-78. Algicidal effect of red-pigment in the res-tide sea-water by <i>Cochlodinium polykrikoides</i> in Youngpo-Ri Gosung-Gun Kungsangnam-do, Korea.	249
Fig. 3-79. The photography of algicidal pattern of <i>Cochlodinium polykrikoides</i> by RP10356	250
Fig. 3-80. The photography of algicidal types of <i>Cochlodinium polykrikoides</i> by RP10356. A. normal cell lyses, B. non-chain burst type.	251
Fig. 3-81. Production of RP10356 using 5L fermenter.	254
Fig. 3-82. Total DNA extracted from <i>Hahella chejuensis</i> (H), the <i>Streptomyces</i> sp. (S), and the <i>Cytophaga</i> sp. (C) on a 0.7% agarose gel. M, <i>Hind</i> III digested Lamda DNA size marker (in kb).	259
Fig. 3-83. PFGE analysis of DNA from the <i>Cytophaga</i> sp. (C). M, <i>Hind</i> III digested Lamda DNA size marker (in kb).	260
Fig. 3-84. PCR amplification of the16S rDNA fragments from the extracted DNA as the template.	261
Fig. 3-85. Genomic Southern blot hybridization of <i>Hahella chejuensis</i> using	

the 16S rDNA probe.	262
Fig. 3-86. Map of the ZAP Express vector	264
Fig. 3-87. Map of pGEM-T Easy/EPS 1.	267
Fig. 3-88. Map of pGEM-T Easy/EPS 2.	268
Fig. 3-89. Map of pGEM-T Easy/EPS 3.	269
Fig. 3-90. Nucleotide and deduced amino acid sequences of HC030701_38.	271
Fig. 3-91. Nucleotide and deduced amino acid sequences of HC030701_39.	272
Fig. 3-92. Nucleotide and deduced amino acid sequences of HC030701_40.	273
Fig. 3-93. Nucleotide and deduced amino acid sequences of HC030701_41.	274
Fig. 3-94. Nucleotide and deduced amino acid sequences of HC030701_42.	275
Fig. 3-95. Nucleotide and deduced amino acid sequences of HC030701_44.	276
Fig. 3-96. Nucleotide and deduced amino acid sequences of HC030701_45.	277
Fig. 3-97. Nucleotide and deduced amino acid sequences of HC030701_46.	278
Fig. 3-98. Nucleotide and deduced amino acid sequences of HC030701_48.	279
Fig. 3-99. Nucleotide and deduced amino acid sequences of HC030701_50.	280
Fig. 3-100. Nucleotide and deduced amino acid sequences of HC030701_51.	281
Fig. 3-101. Nucleotide and deduced amino acid sequences of HC030701_52.	282
Fig. 3-102. Photograph of an acrylic plates setting as artificial substrata for marine biofilm fomation.	285
Fig. 3-103. DNA extraction and construction of fosmid library from marine biofilm.	286

List of Tables

Table 1-1. Core technology for studies on marine microbial diversity.	48
Table 2-1. Proposed effects of microbial EPS.	59
Table 2-2. List of marine microorganisms whose whole genome sequencing was finished.	64
Table 3-1. Components of media for isolating marine microorganisms.	70
Table 3-2. Origin of isolated strains	74
Table 3-3. Used number of substrates on Microlog GN2 plate	88
Table 3-4. Sequences of primers used for bacterial and archaeal 16S rDNA analysis	91
Table 3-5. Summary of bacterial T-RFs from seawater and biofilm formed on acrylic surface.	102
Table 3-6. Summary of archaeal T-RFs from seawater and biofilm formed on acrylic surface.	105
Table. 3-7. Summary of strain isolation from initial phase of biofilm formation.	110
Table 3-8. List of strains isolated from early phase of biofilm formed on acrylic surface	112
Table 3-9. List of bacterial strains isolated from seawater environment during the period of biofilm succession experiment	113
Table 3-10. Nearest neighbour of the isolates from acrylic surfaces emerged in seawater for 3 days based on 16S rDNA partial sequence.	123
Table 3-11. Classification of isolated bacteria from 6 nearshore area of Korean Peninsula based on 16S rDNA partial sequence	132
Table 3-12. Cell surface hydrophobic properties of isolated microorganisms after 5 days of incubation.	140
Table 3-13. Attachment properties of isolated bacteria measured on 96 well microplate.	143
Table 3-14. Cell surface hydrophobicities of strains isolated from acrylic	

surface emerged in seawater for 3 days.	155
Table 3-15. Attachment ability of strains isolated from acrylic surface emerged in seawater for 3 days.	156
Table 3-16. Utilization of substrates by selected 4 strains	165
Table 3-17. Proposed effects of biofilm due to microbial exopolysaccharides.	173
Table 3-18. The compositions of STN media.	176
Table 3-19. The compositions of SZoBell media.	177
Table 3-20. The compositions of M-m10356 media.	179
Table 3-21. Mutants list of exopolysaccharide-producing marine bacteria <i>Hahella chejuensis</i>	185
Table 3-22. The physical conditions of p-m10356 production.	190
Table 3-23. Emulsifying stability of p-m10356	201
Table 3-24. Solubility test of p-m10356 in various solvents.	209
Table 3-25. Viscosity for the concentration of p-m10356 fluid calculated by several equation at 25°C.	220
Table 3-26. The compositions of ZoBell2216e and SZoBell media.	225
Table 3-27. Tested algicidal activity spectrum of red-tide species	229
Table 3-28. The compositions of f/2 media.	230
Table 3-29. Exopolysaccharide-producing genes cloned in this study.	270

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구 목적

제 2 절 필요성

제 3 절 범위

여 백

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구목적

생물다양성이란 유전자의 다양성, 종의 다양성 그리고 생태계의 다양성을 포함하는 생물자원의 총칭으로 생명산업의 자원으로서의 경제적 가치뿐만 아니라, 생태학적 가치, 문화적 가치를 고려하여 **환경친화적인 지속가능개발**이 필요하다.

지구상의 생물종의 80%가 서식하는 해양은 육상과는 염도, 온도 등의 환경조건 때문에 해양생물은 독특한 구조, 물질대사 경로, 감각 및 방어기작 등을 보유하고 있으나 아직 1% 미만의 생물이 연구되었으므로 생명공학기술의 새로운 돌파구를 마련할 수 있는 무한한 잠재력을 보유하고 있다. 미생물은 생태계에서 분해자로서의 역할 뿐만 아니라 유용물질의 생산자로서 중요하다. 또한 실험실, 유전자은행 등 현지외의 보전이 가능하며 또한 유용물질의 대량생산을 위한 형질전환 공업용 균주의 개발과 대량배양을 통한 생물공정의 개발 등으로 생물산업계에서는 중요한 생물자원이다.

본 연구의 목적은 다양한 국내 해양환경 중(연안, 연근해, 퇴적물, 해양생물체, 염전 등) 해양생물다양성연구의 핵심이 되는 미생물의 확보와 이용기술의 개발, 그리고 해양환경보전에도 파급효과가 큰 **연구대상 서식환경의 선택과 집중**으로 기술개발의 효율성을 높이는데 있다. 그 대상으로서 **해양생물막**은 연안, 조류양식용 구조물, 패류양식용 구조물 등의 표면에서 성장하는 생물체에 의해 형성되는 자연현상의 일종으로 세균, 미세조류 등의 다양한 해양미생물이 군집을 이루어 서식하고 있으나 생물막 매트릭스내의 종조성이나 미세환경에 대한 연구가 일천한 상황이다. 해양생물막은 미생물다양성의 분석, 유전자원의 분리, 이용기술의 개발 및 적용을 위한 **다양성 연구의 모델 서식지**이며 선박과 해양구조물에 끼치는 피해로 인해 부정적인 측면을 제어하고 양식산업에서 긍정적인 측면을 이용하며 고분자물질을 산업 공정에 이용하는 등 파급효과가 큰 연구대상 해양환경이다. 해양생물다양성 연구의 대상으로 해양생물막 미생물의 다양성 분석과 이용기술의 개발을 통하여 국내 생물자원의 확보와 지속가능한 개발에 기여하고자한다.

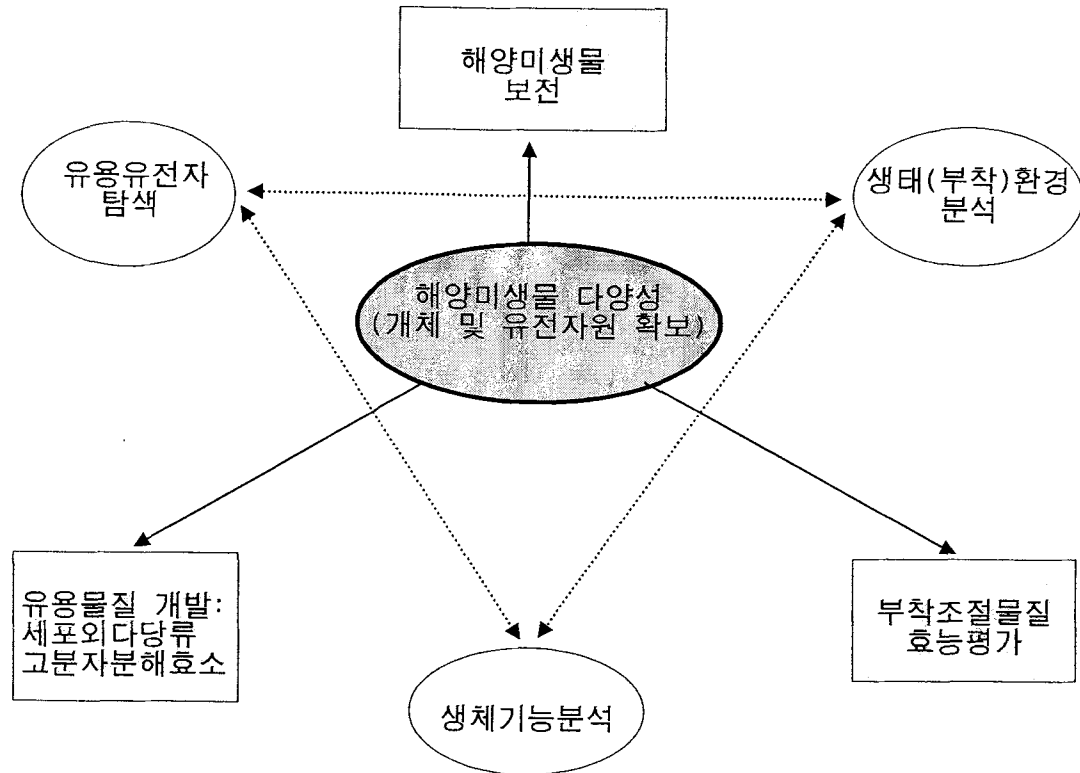


Fig. 1-1. Purpose of studies on marine microbial diversity of marine biofilm.

제 2 절 필요성

1. 기술적 측면

생체개량기술의 개발이나 생물공정기술의 개발 등 생명공학의 기술혁신을 위해서는 원천적으로 새로운 생체기능이나 형질을 가진 생물종이나 효소 또는 유전자의 탐색 및 확보가 선행되어야 하며, 이를 통해 생체기능 또는 생물공정의 생산성과 경제성을 향상시킬 수 있다. 해양미생물은 새로운 기능의 생물소재를 제공해 줄 수 있는 가능성이 무한하며 육상 환경에서 서식하는 생물 연구의 한계를 넘어서서 생명공학기술의 새로운 돌파구를 마련해 줄 수 있는 중요한 자원이다. 따라서 해양미생물의 생명공학적인 이용을 위해서는 이들의 생물다양성을 확보하고 유전자원을 분리하며 이용가능한 방법을 찾는 기술의 개발이 절대적으로 필요하다. 자연계에서 분리한 유용미생물은 잘 보존되고 배양되어야만 개량육종과 발효공정에 알맞도록 산업적으로 이용될 수 있으며, 정확하게 동정되어야 균주의 신규성 확인 및 특허등록이 가능하므로, 새로운 해양미생물 균주 분리, 보존 및 침단의 생리생화학적 방법뿐만 아니라 유전자 염기서열분석을 통한 계통학적 분석법을 이용한 분류 방법 기술을 개발이 필요하다. 한편 자원환경의 미생물은 실험실 환경에서 배양 가능한 종이 1% 미만이므로 나머지 99% 정도의 배양되지 않은 종들도 활용하기 위해서는 새로운 배양 방법과 침단의 BAC(Bacterial Artificial Chromosome) 벡터 등을 이용한 미생물 계놈의 기능해석과 유용유전자의 탐색기술 개발이 요구되고 있다.

2. 경제·산업적 측면

생명공학산업은 21세기 국가 기간사업으로 지정되었으며, 정보통신산업과 더불어 국가경쟁력을 좌우할 것으로 전망된다. 세계생명공학시장은 1998년 376 억 \$에서 평균 13%의 성장을 통해 2010년에는 약 1,500 억 \$을 상회할 것으로 예측되며 이중 10% 이상을 해양생명공학산업제품이 차지할 것으로 전망된다. 국제 경쟁력있는 생물소재의 탐색 및 산업화를 위해서 새로운 미생물자원 확보에 대한 수요는 급증할 것이다. 생물다양성 협약에 따라 생물자원의 무기화현상이 더욱 심화될 것이며 국가차원의 생물자원확보와 지속 가능한 이용기술 개발이 생체분자공학, 생체촉매 설계, 생물반응기, 생체저분자 의약활성물질, 생물학적 환경복원 등의 생물산업에 미치는 직접적인 영향도

증대될 것이다. 현재 해양미생물의 분리 및 이용기술은 화학산업계와 생물벤처산업계의 고기능 생물촉매기술, 생리활성 의약품 및 농약제 개발, 생물학적 오염처리기술에 새로운 생물학적 소재를 제공할 수 있다. 현재 세계시장 중 생물화학시장은 26억 \$, 환경생명공학시장은 53억 \$, 바이오의약시장은 193억 \$이나, 국내시장규모는 각각 3천 \$, 5천 \$, 3억 \$ 정도밖에 미치지 못하고 있으나 국내생명공학산업은 2005년에는 3.2% 성장이 예측되며 약 3조원의 시장형성이 예측된다. **본 국가지정연구실사업에서 수행하고자 하는 해양미생물 다양성의 확보 및 유전자원 이용기술은 생물막 형성에 관여하는 점착성 중합체인 세포외다당류 합성 관련 유전자, 표면부착에 관여하는 고분자물질, 유용효소 유전자의 분리와 형질전환 미생물균주의 개발 등은 생물소재 시장뿐만 아니라 선박, 해양구조물, 도료, 수산양식, 및 고분자물질 산업 공정 등 생물막 형성 제어와 관련된 환경산업에서도 경제적 가치가 매우 큰 핵심기술이다.**

3. 사회·문화적 측면

전세계적으로 생물다양성의 손실과 지구환경의 위협을 느껴 1992년 리우에서 채택된 '의제 21'의 실천계획중의 하나가 국가 관할권내 해양생물자원의 지속적 이용 및 보존분야이지만 대한민국 관할권내 연근해 해양생물자원의 지속적 이용과 보존을 위한 현 국가정책은 매우 미진한 수준으로 연안의 해양생물자원은 점차 고갈되고 있으며 다각적으로 이용할 수 있는 방안이 모색되어지지 않고 있는 실정이다. 국제 생물다양성 협약의 가입으로 국내 생물자원의 보호와 이용에 대한 권리보호를 위하여, 해양생물자원의 보존 및 활용에 대한 실천계획의 수행과 함께 해양미생물을 확보하여 연구자에게 제공하는 시스템이 요구될 것이다. 해양미생물 다양성의 산업적 이용기술은 환경 폐기물 제거, 에너지 생산, 의약, 산업 공정, 농업 및 다양한 생명공학산업에 이용 가능한 미생물 균주를 확보하고 유용유전자원을 발굴함으로써 환경 정화, 국민 복지와 의료, 산업 및 농업 등의 분야에 기여할 것이다. 따라서 본 기술개발 연구는 다양한 해양미생물로부터 새로운 유용 생물학적 소재를 찾아서 해양생물자원의 경제적 고부가가치를 창출해 내고 향후 산업체의 해양생명공학분야의 참여를 유도함으로써, 유용생물자원 보존과 **환경친화적인 지속가능개발 (ESSD, Environmentally Sound & Sustainable Development)**을 위한 생명공학의 주요 기반기술을 개발할 수 있는 연구다.

제 3 절 범위

본 연구과제에서 대상이 될 기술개발은 (표 1-1) 해양생명공학분야 중 미생물의 분리/배양기술, 첨단 분류/동정기술, 유전자 특성/기능분석기술 개발, 생체 및 유전자 활용기술을 통한 가치평가를 거쳐 (Fig. 1-2) (1) 새로운 생체기능이나 형질을 가진 해양미생물을 산업적으로 이용 및 (2) 국내 해양미생물 다양성 보전을 위한 핵심기술로서 연구대상 및 개발 핵심기술은 표 1-1 및 그림 1-2와 같다.

Table 1-1. Core technology for studies on marine microbial diversity.

해양미생물 다양성 연구의 핵심 기술

	미생물 분리/배양기술	유용유전자분석/확보 기술	생체기능 및 유전자 이용기술
연구 대상	<ul style="list-style-type: none"> • 해양환경의 생물막 • 세균, 고세균, 남조류 • 분리배지, 배양조건 	<ul style="list-style-type: none"> • 첨단 동정방법 • 유전자다양성(SSCP, DGGE, T-RFLP) 분석 • 유용유전자 탐색 	<ul style="list-style-type: none"> • 유전자 발현 • 산업적으로 유용한 세포외다당류, 고분자물질분해효소

해양미생물 유전자의 분리, 기능분석, 이용기술 개발과정

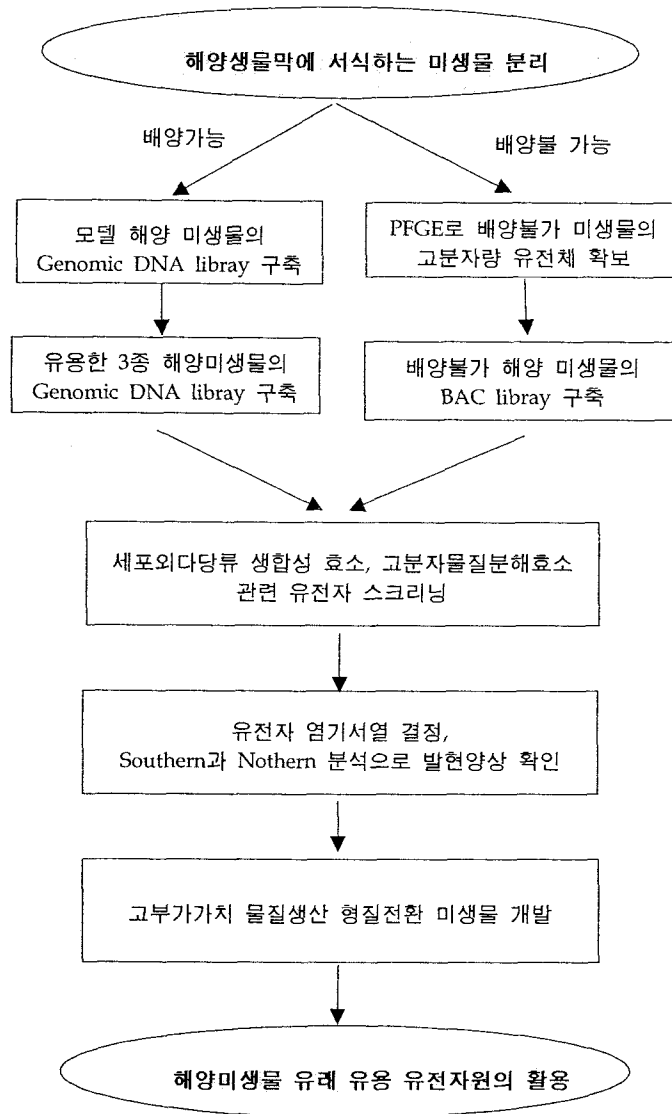


Fig. 1-2. Scheme for isolation, function analysis and utilization of genetic resources of marine microorganisms.

여 백

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 기술동향 및 수준

제 2 절 해양생물막 연구 동향

제 3 절 미생물 유전체 연구 동향

여 백

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 기술동향 및 수준

1. 선진국의 동향

선진국의 경우 이미 의약품, 신소재 등 유용신물질 개발대상이 육상생물로부터 해양생물로 점차 이전하는 추세이며, 해양생명공학 기술개발비의 비중은 절대투자가 높고 투자비의 증가율이 높다. 또한 생물다양성 협약, 해양생물자원 보존협약을 통한 자국의 해양생물자원 보호 및 해양생물자원 이용이 활발하다. 미생물자원은 현재 선진국 중심으로 치열한 확보전쟁에 있으며 OECD 생명공학 작업반에서는 선진국중심의 미생물 자원화 방안을 수립하였다. 일본의 경우 심해의 미생물을 대상으로 내압, 내열, 내냉 기작과 특수단백질 등 생체물질의 특성을 규명하는 기초연구의 수행과 함께 심해 미생물의 실험시스템과 계통보전에 관한 연구지원사업도 추진되고 있다. 미국은 NSF 지원으로 1997년에 하와이대학에 설립된 MarBEC(Marine Bioproducts Engineering Center)에서는 화산, 심해, 화산 카터, 하와이 해역 등에서 분리한 미생물을 대상으로 효소, 색소, 생리활성 물질의 탐색과 유전자 분석 및 계통분류학적 연구 그리고 culture collection을 유지하고 있다. 산업적 응용사례로는 호염성 해양미생물로부터 항생제 istamycin, biopolymer, glycine betaine 생산, 내한성 미생물의 경우 세제용효소의 개발, 빙핵활성 단백질생산, 내한성 유전자를 이용한 α_2 -interferon의 안정화 등 다양한 방면에서 이용되고 있으며 앞으로 새로운 기능이 밝혀짐에 따라 산업적 이용은 더욱 확대될 것이다. 한편 미생물의 산업적 이용 가능성 때문에 미국의 DOE, ONR, NSF, OBER, NIH와 같은 기관을 필두로, 유럽연합의 EU나 European & Canadian Consortium뿐 아니라 독일의 Ministry of Lower Saxony, Byk Gulden, BMBF, 프랑스의 Institut Pasteur와 MENRT, 영국의 MAFF, BBSRC, 네덜란드 NWO, 벨기에 Region Wallonne, 스웨덴 SSF, 남미의 브라질 FAPESP, 아시아의 일본 NITE과 중국 CNCBD, Chinese Ministry of Public Health에서도 국가 차원에서 미생물 유전체 연구를 집중적으로 지원하고 있다. 뿐만아니라 Diversa Corporation, Molecular Dynamics, Integrated Genomics Inc., Beowulf Genomics, BASF, Dairy Management, Inc., Merck Genome Research Institute와 같은 생명공학기업에서도 미생물 유전체를 분석하고 특

허화하고 있는 실정이다. 현재까지 알려진 미생물 genome project는 203 균주에 대하여 수행되고 있으며 현재 연구가 진행중인 미생물은 병원균에 편중되어 있다. 그 중 6종의 해양 미생물의 유전체도 분석되었는데 주로 심해 열수구에서 채집되어 산업적인 이용가치가 있는 균주들이었으며 현재 연구가 진행중인 해양 미생물은 *Prochlorococcus marinus*, *Prochlorococcus marinus*, *Synechococcus*, *Thalassiosira pseudonana* 정도이어서 우리나라에서 시도하는 해양미생물의 유전자원 탐색이 충분히 경쟁력을 가질 것으로 기대되고 있다.

2. 국내의 동향

미생물자원의 확보는 생명공학연구원 유전자은행을 중심으로 서울대학교, 한국중균협회, 농업과학기술원 등에서 주로 육상 미생물 분리 및 이용기술에 대한 연구를 수행하여 왔으나, 국내보존 미생물균주 중 유전자은행에 보존되어 공인된 것이 15,000 여주로 일본의 십분의 일 수준이다. 한국해양연구원에서는 심해, 극지, 연안해양 등을 대상으로 호염성, 내염성 등의 미생물을 약 10,000주 정도를 분리, 보존, 이용하고 있으며 제주해역의 생물다양성연구를 수행하였으나, 현재 해양미생물을 전문으로 수집, 분류 및 공식적인 보존과 분양을 위한 기관은 없는 상태이다. 이용분야에 있어서 산업계는 (주)제일제당, (주)대상, (주)한미약품 등을 중심으로 생물촉매의 탐색과 응용기술에 대한 연구를 수행하고 있으며 (주)종근당, (주)제일제당 등을 중심으로 신규생리활성 물질의 개발을 위하여 해양미생물을 대상으로 탐색한 바 있다. 현재 해양관련 국공립연구소 및 기업에서 일부 해양생물응용기술 관련 연구를 수행하고 있으나, 대부분 안정적 재원, 시설 및 전문가 부족으로 체계적인 접근이 제한적인 실정이다.

당해기관의 연구실적으로 미생물 균주 분리, 배양, 보존 및 동정부분에 있어서는 제주도를 비롯하여 국내 연안의 해수, 퇴적토, 해양생물로부터 10,000 여주의 미생물을 분리하여 스크리닝한 후 냉동보존 중이다. 해수에 생물막을 형성하는 미생물군집을 대상으로 점착성 물질을 형성하는 미생물의 계수방법 등, 혐기 환경에서의 미생물 분리 및 활성측정 등 서식환경 분석 연구, 해면과 산호의 공생미생물의 분리 및 분자계통학적 방법으로 분류하였다. 이용능 부분에서는 세포표면의 소수성이 강한 물질의 생물학적 탈유화제로서 이용, 세포독성능, Topoisomerase I 저해제 탐색방법이 구축되었으며, 탈유화능 및 소수성, 유화안정능, 응집활성능 및 분산제로서의 응용성 조사 방법이 확

립되었다. 제주 마라도 해안에서 분리한 미생물 중 세포외다당류를 생산하는 미생물 96CJ10356 균주가 새로운 속의 미생물임을 밝히고 *Hahella chejuensis*로 명명하였는데 이는 국내에서 속 단위의 신규 미생물로는 두 번째 보고된 것이며 해양에서는 최초로 보고가 된 것이다. 이 균주는 새로운 형의 생체고분자물질로 추정되는 다당류 EPS-R을 생산하여 해양미생물 다양성의 확보가 생명공학의 새로운 소재를 찾기 위해 필요함을 입증한 예가 되었다.

다양성 연구관련 현 기술상태의 취약성으로는 해양관련 국공립연구소 및 기업에서 일부 해양생물응용기술 관련 연구를 수행하고 있으나, 대부분 안정적 재원, 시설 및 전문가 부족으로 체계적인 접근이 제한적인 실정이다. 전반적인 기술수준을 선진국과 비교할 때 기술의 일부는 매우 열악한 수준이다. 국내 관련 산학연 주체별 관련기술(인력, 시설, 자금 등)은 선진국과 대비할 때, 우수한 연구 인력과 연구능력을 확보하고 있다고 판단되나 채집장비, 배양시설 및 연구자금은 매우 열악한 수준이다. 특히 해양미생물의 경우 국내연구진에 의한 확보가 미비하며 유용유전자 발굴의 경우 대부분 선진국에서 분리하여 기탁된 균주를 이용한 연구가 주로 수행되고 있어 국제경쟁력이 있는 신규 미생물 및 유전자원의 확보가 필요하다.

선진외국의 기술수준 대비 국내의 기술수준은 다음과 같다.

핵심 요소기술		선진외국기술수준 대비 국내 기술수준
해양미생물의 분리 및 보전 기술	• 채집기술	60%
	• 분리, 배양기술	60%
	• 보전기술	80%
	• 미생물 동정, 분류기술	100%
유용유전자의 탐색 및 확보기술	• 유전자 분석	100%
	• 유용유전자 탐색기술	40%
	• 유전자 기능분석기술	70%
유용유전자 및 생체물질 이용기술	• 유용물질 탐색·응용기술	60%
	• 항시적 발현기술	80%
	• 극한환경 미생물 대량배양기술	30%

3. 앞으로의 전망

해양미생물 다양성의 산업적 이용기술에서 요구되는 해양미생물의 채집, 분리, 배양, 보존, 미생물 동정 및 분류기술, 그리고 유용유전자 탐색 및 분석기술은 생물소재가 한국 해양에서 채취된다는 지역적 특성이 있으며 채집된 해양미생물의 상당수가 우리나라 해역에서만 서식하는 고유종일 가능성을 고려할 때 생물자원의 확보 차원에서 기술도입이 현재 상황에서는 불가능하다고 판단된다. 특히 생물자원의 확보가 생명공학 산업에서 원천기술의 확보로 인식되면서 유용 생물자원의 선점을 경쟁력으로 삼는 생명공학산업의 특성으로 인해 외국으로부터 해양미생물 다양성의 산업적 이용기술 도입은 거의 불가능하다고 사료된다.

현재 선진국에 비해 해양미생물 채집 분리기술, 생리활성물질이나 생물촉매의 탐색기술등 극한미생물을 포함한 해양미생물 이용 및 산업화기술에서 60%이하로 기술수준 격차가 있으나, 앞으로 국내에서도 국내고유의 다양한 해양미생물 및 극지, 심해 등에서 새로운 해양미생물을 분리확보가 가능하다. 분리확보된 해양미생물을 산업적으로 유용한 물질 개발에 활용하며 아울러 분리균주에 대한 정보를 국내 타 연구진에게도 제공한다면 5년 후 정도에서는 선진국 기술수준의 90% 정도로 기술격차를 줄일 수 있고, 따라서 고부가가치 생물소재의 개발기술 측면에 있어서는 선진국과 대등한 수준에 이를 수 있을 것이다.

제 2 절 해양생물막 연구 동향

환경에 노출된 다양한 표면들에 유기물이 흡착되면, 이 표면에는 미생물이 붙게 된다 (Cooksey and Wigglerworth-Cooksey, 1995). 토양에 노출된 유리 슬라이드에 미생물이 부착하는 것이 관찰된 이후 많은 연구자들이 다양한 표면에 부착하는 미생물에 관하여 보고하였다 (van Loosdercht *et al.*, 1990; Marshall, 1992; Denyer *et al.*, 1993; Cooksey and Wigglerworth-Cooksey, 1995; Leriche *et al.*, 2000; Beech *et al.*, 2001). 생물막은 토양과 물의 경계면 외에 물과 공기, 물과 기름, 토양과 공기 등의 접촉부위에도 생성된다 (Costerton *et al.*, 1995; Flemming, 1996). 토양에 비해 상대적으로 유기물의 함량이 적은 해양과 같은 빈영양 환경에서 미생물은 생존을 위해 좀 더 유리한 조

건을 획득하는 한 방법으로 부착생활을 하게 된다 (Costerton *et al.*, 1978; Dawson *et al.*, 1981; Marshall, 1988). 해양에서 미생물의 부착은 부유 물질, 암반, 생물의 표면 같은 자연물질 외에 금속 표면, 콘크리트 등과 같은 인공 구조물 등 다양한 기질에서 이루어지고 있다. 부착표면은 charge-charge 혹은 hydrophobic interaction 등의 다양한 물리화학적 요인들에 의해 유기물을 흡착, 농축시키는 역할을 한다 (Beveridge *et al.* 1997). 이렇게 유기물이 흡착된 표면에 미생물이 생물막을 형성하게 될 경우 i) 영양물질 획득 기회의 증대 및 대사과정의 공유 등을 통한 물질대사의 이득, ii) 독성물질, 항생제 등의 위협으로부터의 보호 (예로서 biofilm 내의 cell은 planktonic mode의 cell에 비해 약 500배 정도 더 강한 항생제 내성을 보인다), iii) 세포외 효소활성의 유지, iv) 포식자로부터의 보호, v) 새로운 유전형질의 획득 가능성 증대 등 다양한 이점을 얻게 된다 (Stickler 1999, Dang & Lovell 2000, Tolker-Nielsen & Molin 2000). 따라서 해수에 노출된 표면은 빠른 시간 안에 미생물 군집이 성장하게 된다. 어떤 면에서 planktonic mode는 자연계에서는 오히려 예외적인 생활방식으로서 더 나은 서식처를 찾기 위한 전이과정으로 이해될 수도 있다 (Beveridge *et al.* 1997, Stickler 1999).

생물막 형성과 관련하여 Marshall은 부착과정이 두 단계로 나뉘어 이루어진다고 제안하였다 (Marshall *et al.*, 1971). 첫 번째 단계는 매우 빨리 일어나 부착능이 상대적으로 약하고 가역적이며 세포의 운동 상태를 유지하면서 세포와 세포간의 접촉, 세포와 기질 표면사이에서 서로 잡아당기는 Van der Waal's 인력과 전자층 (electron layer)의 척력이 작용하여 미생물과 부착 기질 사이에는 좁지만 일정한 간극이 존재한다고 하였다. 이에 반해 두 번째 단계에서는 비가역적인 단단한 부착이 이루어지며 이 과정으로 이행되기까지는 초기 부착 후 최소 3시간을 필요로 하는 것으로 보고하였다. 두 번째 단계에 들어서면 생물막은 흐르는 물로 세척을 하여도 부착된 표면으로부터 쉽게 탈리되지 않는다고 하였다. 미생물 부착의 전후관계를 포함하여 생물막 형성 초기과정을 살펴보면 i) 먼저 표면에 유기 혹은 무기입자들이 부착되고 ii) 다음으로 pioneer organism이 부착하며 iii) 1차 부착자들의 성장과 증식이 있고, iv) 마지막으로 biofilm matrix의 성숙이 이어진다 (Dang & Lovell 2000). 표면에서의 부착과정에는 내적인 요소로서 cell의 운동성이 매우 중요한 역할을 하는 것으로 이해되고 있다 (Mireles II *et al.* 2001). 또한 부착 기질 표면의 소수성, 산성도, 전하 상태 등에 의해 부착 속도가 달라지기도 하며 표면의 거칠기와 전단응력이 생물막 초기 형성에 영향을 주기도 한다. 초기 부착 이후 집락 형성 과정동안 미생물은 다당류를 비롯하여 핵산, 지방산, 단백질

등의 물질들을 분비하고 이로 인해 중합체 및 미생물들간의 상호 작용 등에 의해 생물막이 형성된다. 이렇게 형성된 생물막에 따개비 등을 비롯하여 부착생활을 하는 해양 생물들의 유생이 가입하고 변태과정을 거쳐 성장함에 따라 생물막은 biofouling의 단계로 진행된다.

세균이 세포외로 분비하는 다양한 물질을 EPS (extracellular polymeric substances)로 통칭하는데 그 주성분은 다당류다. EPS는 미생물의 생존에 필요한 여러 물질을 함유하고 그들의 성장을 향상시키는 역할을 하며 생물막 형성 초기에 표면의 부착, colonization 과정에 매우 중요한 역할을 담당한다 (Boyd and Chakrabarty, 1995; Costerton *et al.*, 1995). 또한 생물막 구조형성, 수분 증발 억제, 미생물 세포의 응집 및 외부로부터 스트레스를 완화 시켜주는 역할을 한다 (Sutherland, 1999). 이와 관련하여 미생물 유래의 EPS는 “미생물 군체를 형성하는데 사용되는 생물체의 세포외 중합 기질체”로 정의할 수 있으며 (Geesey, 1982) 그 안에서는 미생물과 다른 물질들이 유기 중합체와 결합하는 일이 빈번하게 일어난다 (Charaklis and Wilderer, 1989). 또한 원생 동물이나 bacteriophage 등으로부터 보호막의 역할을 하거나, 병원균일 경우 보호막 및 감염 기작의 신호전달체로 작용하거나 환경 내에서 독성물질이나 중금속 이온 등의 착화합물을 형성하는 등의 역할을 한다. 따라서 EPS에 의하여 형성된 생물막은 병원균의 감염성에 필수적이고 미생물이 서식환경의 불리한 조건에서도 생존이 가능하게 하며 미생물과 다른 생물의 공생관계를 유지하는데 도움을 준다. 한편으론 EPS생성 저해로 미생물에 의한 생물막 형성이 저해된다는 보고도 있다 (Table 2-1, Cammarota and Sant’Anna Jr., 1998; Brown and Gilbert, 1993). 즉, 부착생활 (생물막 형성)이 미생물에게 제공하는 다양한 이점은 주로 생물막을 구성하고 있는 EPS의 기능으로 볼 수 있을 정도로 EPS의 역할은 중요하다. EPS 생산은 자연계 미생물의 일반적인 특성으로 조류, 균류와 같은 진핵생물에서도 생성된다. 생물막 구성 물질인 세포외 다당류는 생물막의 형성 및 생물막 내의 세균 성장과 밀접한 관련이 있으며 생물막의 형태는 환경 조건과 그에 따른 구성 미생물 종에 따른 성장특성에 많은 영향을 받는다.

Table 2-1. Proposed effects of microbial EPS.

Function	Relevance
Adhesion to surface	Initial step in colonization of inert and tissue surfaces, accumulation of bacteria on nutrient-rich surfaces in oligotrophic environments
Aggregation of bacterial cells formation of flocs and biofilms	Bridging between cells and inorganic particles trapped from the environment, immobilization of mixed bacterial population, basis for development of high cell densities, generation of a medium for communication processes, cause for biofouling and biocorrosion events
Cell – cell recognition	Symbiotic relationships with plants or animals, initiation of pathogenic processes
Structural elements of biofilms	Mediation of mechanical stability of biofilms (frequently in conjunction with multivalent cations), determination of the shape of EPS structure (capsule, slime, sheath)
Protective barrier	Resistance to nonspecific and specific host defenses (complement – mediated killing, phagocytosis, antibody response, free radical generation), resistance to certain biocides including disinfectants and antibiotics, protection of cyanobacterial nitrogenase from harmful effects
Retention of water	Prevention of desiccation under water-deficient conditions
Sorption of exogenous organic compounds	Scavenging and accumulation of nutrients from the environment, sorption of xenobiotics (detoxification)
Sorption of inorganic ions	Accumulation of toxic metal ions (detoxification), promotion of polysaccharide gel formation, mineral formation
Enzymatic activities	Digestion of exogenous macromolecules for nutrient acquisition, release of biofilm cells by degradation of structural EPS of the biofilm
Interaction of polysaccharides with enzymes	Accumulation / retention and stabilization of secreted enzymes

인간생활과 관련하여 생물막은 폐수 처리, 난분해성 물질의 분해 및 양식 산업 등에 이용될 수 있다. 다른 한편으로 금속표면에 형성된 생물막은 미생물 유래 다당류와 금속간의 정전기적 금속 결합으로 부식작용을 촉진시킬 수도 있으며 이를 biocorrosion이라 한다 (Beech and Gaylarde, 1991; Costerton *et al.*, 1987; Bass *et al.*, 1998). 열 교환기, 파이프, 선박 표면 및 기타 다른 산업 장비 등 지속적인 내구성을 요구하는 장비나 제품에 형성된 생물막은 부식, 파손과 같은 심각한 문제를 일으키며 선박 표면에 형성된 생물막은 선박의 운항속도를 떨어뜨려 연료비를 크게 증가시키기도 한다. 또한 의료분야에서 생체 내에 이식된 장비나 약품 투여 장비에 생물막이 형성되어 세균성 질병을 유발할 수도 있다 (Costerton *et al.*, 1987). 이에 따라 생물막을 제거하기 위하여 많은 시간과 노력 비용이 소모되고 있으며 생물막 형성의 조절을 위한 많은 연구들이 진행되고 있다 (Little 1984; Geesey and White, 1990; Melo, 1992; Allison *et al.*, 1998). 현재 연구가 진행되고 있는 주된 분야는 의료, 치의학 분야이며 부분적으로 폐수처리공정과 수처리 등의 과정에서 생성되는 생물막생성세균에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 대표적인 생물막 형성 세균인 *Pseudomonas aeruginosa*나 *Streptococcus mutans* 등의 경우 생물막 형성에 관여하는 유전자의 역할, 생물막 형성에 따른 대사과정의 변화, signaling mechanism (quorum sensing) 등이 유전체 수준에서 연구되고 있을 정도로 의료, 치의학 분야에서의 생물막 생성 및 병원성과 관련된 연구가 활발히 진행되고 있다 (Geoffrey *et al.*, 2001; De Kievit *et al.*, 2001; Heydorn *et al.*, 2002). 이에 반해 해양에서는 황 환원세균들을 비롯한 해양 미생물들의 생물막 형성으로 선박을 비롯한 장비들의 부식 등 막대한 경제적 피해가 일어나고 있지만 아직까지 생물막 형성 및 이의 억제와 관련된 연구정보는 희귀한 편이다 (Allison *et al.*, 1998; Stickler 1999, Davey & O'Toole 2000; Leonard 2000; Beech *et al.*, 2001).

제 3 절 미생물 유전체 연구 동향

미생물의 다양성과 환경에 대한 넓은 적응력을 이용할 때 환경 폐기물 제거, 에너지 생산, 의약, 산업 공정, 농업 및 다양한 생명공학산업에서 오랫동안 풀지 못했던 숙제들의 해답을 얻을 것으로 기대하고 있다. 무엇보다 대다수 미생물의 경우, 사람 등 고등동물보다는 훨씬 작은 사이즈의 유전자를 가지고 있으며, 이것은 유전체 연구 재

료로 미생물이 갖는 가장 큰 매력이다. 이와 같은 이유로 미국 DOE에서는 1994년에 미생물 유전체 연구계획(Microbial Genome Program; MGP)을 수립하고 다양한 미생물에 대한 유전체 연구를 수행하여 왔다. 미생물은 또한 사람의 질병과 밀접한 관계를 갖고 있다. 따라서 병을 일으키는 직접적 원인인 미생물 유전자의 기능을 연구함으로써 치료 및 예방제의 개발이 가능한 것이다. 여기엔 한국인의 경우 단위 인구당 사망률 세계 1위인 간질환의 주요원인인 B형 및 C형 간염바이러스, 위궤양의 직접 원인균인 헬리코박터, 전세계 최고의 사망률을 보이고 있는 말라리아 병원균 등이 포함된다. 이 때문에 영국의 제약회사인 웰컴 트러스트(Wellcome Trust)는 Sanger Pathogen Programme을 통해 신약개발을 목표로 병원균 유전체를 분석하고 있으며 병원균 유전체연구조합(Pathogen Consortium)을 구성하여 앞으로 4년 내에 모든 병원균에 대한 모든 유전체 연구를 종료하겠다는 계획을 표방하고 있는 것이다.

현재까지 알려진 원핵생물의 genome project는 206 균주에 대하여 수행되고 있으며, 그 중 2001년 4월 완전한 염기서열이 발표된 원핵생물은 총 45 균주로 고세균이 9 균주, 세균이 36 균주이었다. 그 뒤 2002년 2월 그 숫자는 총 70 균주로 증가했으며 이 중 고세균이 13 균주, 박테리아가 57 균주이었다. 2003년 현재 완전한 염기서열이 발표된 원핵생물은 총 144 균주로, 이 중 고세균이 17 균주이고 박테리아가 127 균주를 차지한다 ([wit.integratedgenomics.com/GOLD/index.cgi?want=](http://wit.integratedgenomics.com/GOLD/index.cgi?want=Published+Complete+Genomes)

[Published+Complete+Genomes](http://wit.integratedgenomics.com/GOLD/index.cgi?want=Published+Complete+Genomes)).

미생물 유전체 분석 연구를 지원하고 있는 기관으로는 미국 에너지성 (DOE), ONR (Office of Naval Research), NIDCR (National Institute of Dental and Craniofacial Research), DARPA (Defense Advanced Research Projects Agency), NSF (National Science Foundation), NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases), OBER (Office of Biological and Environmental Research), USDA (United States Department of Agriculture), 국립보건원 (NIH)으로 가장 다양하다. 이와 별도로 민간기업인 Diversa Corporation (San Diego, CA), Molecular Dynamics (Sunnyvale, CA), Integrated Genomics Inc. (Chicago, IL), Dairy Management, Inc., Merck Genome Research Institute (West Point, PA) 등에서도 미생물 유전체 연구를 집중적으로 지원하고 있는 실정이다. 유럽연합의 경우 European Union나 European & Canadian Consortium에서 공동으로 지원하기도 하지만 각 국에서 독자적인 연구도

수행하고 있다. 영국의 제약회사인 웰컴 트러스트(Wellcome Trust)는 영국의 생거 유전체 연구소(Sanger Genome Center)의 Sanger Pathogen Programme을 통해 신약개발을 목표로 현재 18종의 병원균 유전체를 분석하고 있다. 이밖에도 MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food), BBSRC (Biotechnology and Biological Sciences Research Council)와 같은 정부 기관과 Beowulf Genomics 같은 기업에서 미생물 유전체 연구를 지원하고 있다. 프랑스는 주로 인간 유전체 연구에 집중적인 투자를 하고 있으며 미생물 유전체 연구는 Institut Pasteur와 MENRT에서 지원하고 있다. 독일의 Ministry of Lower Saxony, BYK Gulden, BMBF (Bundes Ministerium für Bildung und Forschung), BASF, 네덜란드 NWO (Netherlands Organization for Scientific Research), 벨기에 Region Wallonne, 스웨덴 SSF (Swedish Foundation for Strategic Research) 등에서도 미생물 유전체 연구를 적극 지원하고 있다. 그밖에 남미의 브라질에서는 FAPESP (The State of Sao Paulo Research Foundation)에서, 아시아는 일본 NITE (National Institute of Technology and Evaluation)과 중국 CNCBD, Chinese Ministry of Public Health 등에서 국가적으로 미생물 유전체 연구를 지원하고 있다. 일본은 과기처, 후생성, 농림성, 문부성 및 통상성의 주관으로 인체 및 모델생물 유전체 연구를 추진하였으며 일부 산업미생물은 전체 염기서열 분석을 완료한 상태이다.

선진 7개국뿐만 아니라 유럽과 남미, 아시아 등 전 세계 4,000여 개 연구기관이 ‘유전자전쟁’ 중인 현재, 우리나라는 2002년부터 21C 프론티어 연구개발사업 ‘미생물 유전체 활용기술 개발사업단’을 통해 2012년까지 국내외의 다양한 미생물 10종의 유전체 분석을 목표로 활발히 연구를 진행하고 있다. 이 연구단은 이미 식물생장을 촉진하고 병저항성을 높여주는 *Paenibacillus polymyxa* E681, 유용한 세포외다당류와 적조 살상 색소를 합성하는 *Hahella chejuensis* 96CJ10356, 김치의 우점종인 *Leuconostoc citreum* KM20의 유전체 초안을 완성한 상태이다(<http://genepool.pdrc.re.kr/gem>). 이중 *Hahella chejuensis*는 한국해양연구원 이홍금 박사가 제주 마라도에서 분리한 신속 해양 미생물이다. 이밖에도 인간 유전체 기능연구 사업단에서 위암이나 위염과 관련이 깊은 것으로 알려진 *Helicobacter pylori*의 유전체를 분석하였고 마크로젠이 알코올 발효균주인 *Zymomonas mobilis*의 전체 염기 서열을 해독하였다.

해양미생물 유전체 연구 현황으로는 지금까지 모두 고세균 10종, 세균 13종의 해양미생물의 유전체가 분석되었는데, 특히 고세균은 심해 열수구에서 분리된 균주들로

주로 산업적인 이용가치가 있는 균주들이었다(표 2-2).

고세균 중에 *Methanococcus jannaschii*, *Pyrococcus horikoshii*, *Aeropyrum pernix*, *Pyrococcus abyssi*, *Pyrobaculum aerophilum*는 심해저 열수구에서 분리된 고세균이고, *Archaeoglobus fulgidus*는 고온 환경에서 황화합물을 환원시키는 고세균으로 유전체 연구가 완료되었다. 한편 일본 Japan Marine Science and Technology Center에서는 심해저에서 채집한 *Alkaliphilic extremophiles*인 *Bacillus halodurans*의 전체 염기서열을 분석하였고 TIGR에서 대양에 떠다니는 해양 세균인 *Caulobacter crescentus*의 전체 염기서열을 밝혔다. 세균의 경우 현재 완료된 유전체 연구는 주로 병원균을 위주로 수행되었으며 해양미생물은 10%에 불과하다. *Aquifex aeolicus* VF5, *Bacillus halodurans* C-125, *Oceanobacillus iheyensis* HTE831 그리고 *Thermotoga maritima* MSB8가 극한 해양미생물이었고 나머지는 주로 광합성을 하는 남세균이었다. 또한 병원성 세균인 속 3종의 유전체 분석이 완료되었는데 이 중에는 우리나라 전남대학교 이준행 교수가 발표한 *Vibrio vulnificus* CMCP6도 있다.

Table 2-2. List of marine microorganisms whose whole genome sequencing was finished.

Organism	Size (ORF)	Description
ARCHAEA		
* <i>Aeropyrum pernix</i> k1	1669 kb (2620)	Marine aerobic hyperthermophilic Crenarchaeon
* <i>Archaeoglobus fulgidus</i> DSM4304	2178 kb (2493)	Marine hyperthermophilic Euryarchaeon; Sulphate reducer found in hydrothermal environment
* <i>Halobacterium</i> sp. NRC-1	2014 kb (2058)	Extreme halophile Euryarchaeon
* <i>Methanococcus jannaschii</i> DSM2661	1664 kb (1750)	Autotrophic Euryarchaeon isolated from a deep-sea thermal vent
* <i>Methanopyrus kandleri</i> AV19	1694 kb (1691)	Marine hyperthermophilic Euryarchaeon isolated from a 2,000-m-deep "black smoker" chimney
* <i>Nanoarchaeum equitans</i>	500 kb	Marine hyperthermophilic symbiotic Nanoarchaeon
* <i>Pyrobaculum aerophilum</i> IM2	2222 kb (2587)	Marine hyperthermophilic Crenarchaeon growing optimally at 100°C
* <i>Pyrococcus abyssi</i> GE5	1765 kb (1765)	Marine Euryarchaeon isolated from a hot spring situated deep-sea
* <i>Pyrococcus furiosus</i> DSM 3638	1908 kb (2065)	Marine heterotrophic Euryarchaeon growing optimally at 100°C
* <i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3	1738 kb (1979)	Marine hyperthermophilic Euryarchaeon isolated from the hydrothermal vent
BACTERIA		
* <i>Aquifex aeolicus</i> VF5	1551 kb (1544)	Aquificae, Marine hyperthermophilic bacterium
* <i>Bacillus halodurans</i> C-125	4202 kb (4066)	Alkaliphilic deep-sea extremophiles
* <i>Oceanobacillus ihyensensis</i> HTE831	3630 kb (3496)	Gram+ deep-sea extremely halotolerant and alkaliphilic species
* <i>Pirellula</i> sp.1	1751 kb (1884)	Planctomycetes, marine, aerobic, heterotrophic representative of the order
* <i>Prochlorococcus marinus</i> CCMP1375 (SS120)	6397 kb (5615)	Marine cyanobacteria, the most abundant photosynthetic organisms on Earth
* <i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313	2400 kb (2400)	Marine cyanobacteria, the most abundant photosynthetic organisms on Earth
* <i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>pastoris</i> CCMP1378 (MED4)	1657 kb (1700)	Marine cyanobacteria, the most abundant photosynthetic organisms on Earth
* <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 ATCC700550	4969 kb (4931)	γ-proteobacterium metal ion-reducing bacterium
* <i>Synechococcus</i> sp. WH8102	2400 kb	Marine cyanobacteria, unicellular, photoautotrophic, facultative glucose-heterotrophic bacteria
* <i>Thermotoga maritima</i> MSB8	1860 kb (1877)	Thermotoga hyperthermophilic eubacteria isolated from geothermal heated marine sediment
* <i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633	5165 kb (4832)	γ-proteobacterium pathogen causing food-borne gastroenteritis
* <i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6 (KOREA)	5211 kb (5028)	γ-proteobacterium pathogen causing primary septicemia and wound infections
* <i>Vibrio vulnificus</i> YJ016	5211 kb (5028)	γ-proteobacterium pathogen causing liver functional disorders or chronic liver diseases

Table 2-2. Continued.

Organism	Publication (Date)	Database
ARCHAEA		
* <i>Aeropyrum pernix</i> k1	DNA Research 6:83-101 (1999. 4. 30)	www.bio.nite.go.jp:8080/dogan/MicroTop?GENOME_ID=ape_G1
* <i>Archaeoglobus fulgidus</i> DSM4304	Nature 390:364-370 (1997. 11. 27)	www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/GenomePage3.spl?database=gaf
* <i>Halobacterium</i> sp. NRC-1	PNAS 97:12176-12181 (2000. 10. 24)	zdna.micro.umass.edu/haloweb
* <i>Methanococcus jannaschii</i> DSM2661	Science 273:1058-1073 (1996. 9. 28)	www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/GenomePage3.spl?database=arg
* <i>Methanopyrus kandleri</i> AV19	PNAS 99:4644-4649 (2002. 4. 2)	www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/GenomePage3.spl?database=ntmk01
* <i>Nanoarchaeum equitans</i>	PNAS (2003. 10. 13)	
* <i>Pyrobaculum aerophilum</i> IM2	PNAS 99:984-989 (2002. 1. 22)	www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/framik?db=Genome&gi=227
* <i>Pyrococcus abyssi</i> GE5	Unpublished (2002. 2. 13)	www.genoscope.cns.fr/Pab
* <i>Pyrococcus furiosus</i> DSM 3638	Meth. Enzymol. 330:134-157 (2002. 2. 12)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=AE009950
* <i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3	DNA Research 5:55-76 (1998. 4. 30)	www.bio.nite.go.jp
BACTERIA		
* <i>Aquifex aeolicus</i> VF5	Nature 392:353-358 (1998. 3. 26)	wit.mcs.anl.gov/WIT/CGI/org.cgi?compare=&user=&org=AA
* <i>Bacillus halodurans</i> C-125	Extremophiles 4: 99-108 (2000. 4. 10)	www.jamstec.go.jp/genomebase/micrHome_bha.html
* <i>Oceanobacillus iheyensis</i> HTE831	NAR30, 3927-3935 (2002. 9. 7)	www.jamstec.go.jp/genomebase/micrHome_obi.html
* <i>Pirellula</i> sp.1	PNAS 100:8298-303 (2003. 7. 8)	www.micro-genomes.mpg.de/pirellula/
* <i>Prochlorococcus marinus</i> CCMP1375 (SS120)	PNAS 100:10020-5 (2003. 8. 13)	www.sb-roscoff.fr/Phyto/ProSS120/
* <i>Prochlorococcus marinus</i> MIT9313	Nature 424:1042-7 (2003. 8. 13)	www.jgi.doe.gov/JGI_microbial/html/prochlorococcus/prochlo_homepage.html
* <i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>pastoris</i> CCMP1378 (MED4)	Nature 424:1042-7 (2003. 8. 13)	www.jgi.doe.gov/JGI_microbial/html/prochlorococcus/prochlo_homepage.html
* <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 ATCC700550	Nature Biotechnol. 20:1118-23 (2002. 10. 7)	www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/GenomePage3.spl?database=gsp
* <i>Synechococcus</i> sp. WH8102	Nature 424:1037-42 (2003. 8. 13)	columba.ebi.ac.uk:8765/ext-genequiz/genomes/cy9709/index.html
* <i>Thermotoga maritima</i> MSB8	Nature 399:323-329 (1999. 5. 27)	www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/GenomePage3.spl?database=btm
* <i>Vibrio parahaemolyticus</i> RIMD 2210633	Lancet 361:743-9 (2003. 3. 1)	genome.gen-info.osaka-u.ac.jp/bacteria/vpara/
* <i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6 (KOREA)	Unpublished (2002. 12. 23)	www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/framik.cgi?db=Genome&gi=269
* <i>Vibrio vulnificus</i> YJ016	Unpublished (2003)	genome.nhri.org.tw/VV/index.php

여 백

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

- 제 1 절 생물막 균주 확보
- 제 2 절 해양생물막 형성 미생물 군집의 시간별 특성 변화
- 제 3 절 생물막 구성 미생물 군집의 다양성 변화
- 제 4 절 해양생물막 형성 미생물 다양성 조사
- 제 5 절 해양생물막 형성 미생물의 이용
- 제 6 절 해양생물막 표준균주 후보 도출 및 생물막 생성 조절요인
연구
- 제 7 절 세포외 다당류 생산 돌연변이주 제조
- 제 8 절 살조능 우수 해양미생물 색소 발견
- 제 9 절 세포외물질을 생산하는 해양미생물의 간편한 DNA
추출방법 개발
- 제 10 절 모델 해양미생물 *Hahella chejuensis*의 gene DNA
library 구축
- 제 11 절 세포외 다당류 생산 관련 유전자 분리
- 제 12 절 생물막내 배양불가 미생물 유전체 BAC 라이브러리구축

여 백

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 생물막 균주 확보

다양한 해양미생물 유전자원을 확보하기 위하여 해양생물막 시료를 채취하고 한천 배지에 도말하여 세균을 분리하여 냉동보존하였다. 전국연안에서 세균 1,525주, 남조세균 607주로 총 2,132균주를 확보하였는데 분리균주 중 다수가 세포외 고분자 다당류 생성능력을 보였으며 세포표면 소수성, 부착능, 한천 분해능 등이 우수한 다수의 세균도 확보되었다.

1. 이론적, 실험적 접근방법

다양한 해양 생물막에서 미생물을 얻기 위하여 방조제, 하천유입해역 등을 비롯한 국내 연안에서 해양 생물막 시료를 채취한 후 배양시켜 형성된 콜로니를 순수분리하였다.

해안 지역내 해수 노출 부위에 다양하게 형성된 시설물 및 부유물에서 생물막 형성 여부를 육안으로 관찰하고 기 형성된 부위에서 시료를 채취하였다. 현장에서 생물막의 형성부위를 면봉을 이용하여 시료를 채취하였다.

생물막을 형성하는 해양 미생물을 채취하기 위하여 사용한 플라스틱 슬라이드는 25 x 75 mm² 및 1 mm 두께를 사용하였으며, 생물막 형성실험에 사용하기 이전에 유기물을 완전히 제거하기 위하여 1 N HCl에 24시간 담근 후 여과멸균 증류수 세척하여 80℃에서 5시간 건조하여 사용하였다. 슬라이드에 부착한 해양 미생물의 분리를 위하여 홀더에서 회수한 플라스틱 슬라이드를 여과멸균 증류수로 세척하여 표면에 부착하지 않은 세균을 제거하고 플라스틱 슬라이드 표면을 cell scraper (Cornibg, U.S.A)를 이용하여 10 ml의 여과멸균 숙성해수에 긁어 넣은 후 100 μ l를 ZoBell 고체배지 (Table 3-1)에 도말하고 3일간 25℃, 암 배양하여 형성된 colony를 관찰하였다.

Table 3-1. Components of media for isolating marine microorganisms.

Media Component	DZobell	Zobell	SZobell
Glucose			20 g
peptone	5 g	0.5 g	5 g
yeast extract	1 g	0.1 g	1 g
FePO ₄	0.01 g	0.01 g	0.01 g
aged sea water	750 ml	750 ml	750 ml
distilled water	250 ml	250 ml	250 ml
pH	7.2	7.2	7.2

2. 연구결과

본 연구에서는 해양 생물막의 형성 기작을 이해하기 위하여 우리나라 동해중부(강릉), 동해남부(포항), 남해동부(여수), 남해서부(목포), 서해남부(변산), 서해중부(인천) 6개 지역에서 생물막을 채집하고 이로부터 미생물을 분리, 배양하여 해양미생물 다양성 자원을 확보하였다 (Figs 3-1, 3-2; Table 3-2). 순수분리한 콜로니는 20% glycerol 용액에 혼탁한 후 -70℃ 초저온 냉동고에 보존하였다. 2004년 4월, 생물막 균주의 전이과정을 연구하기 위해 경상남도 거제시 장목만에 설치한 아크릴판으로부터 날자에 따라 총 1090균주를 분리하였으며 RFLP typing의 결과로 이 중 421 균주를 1차 선별하였다. 현재 특성이 다른 균주를 선별하는 작업을 진행하고 있다.

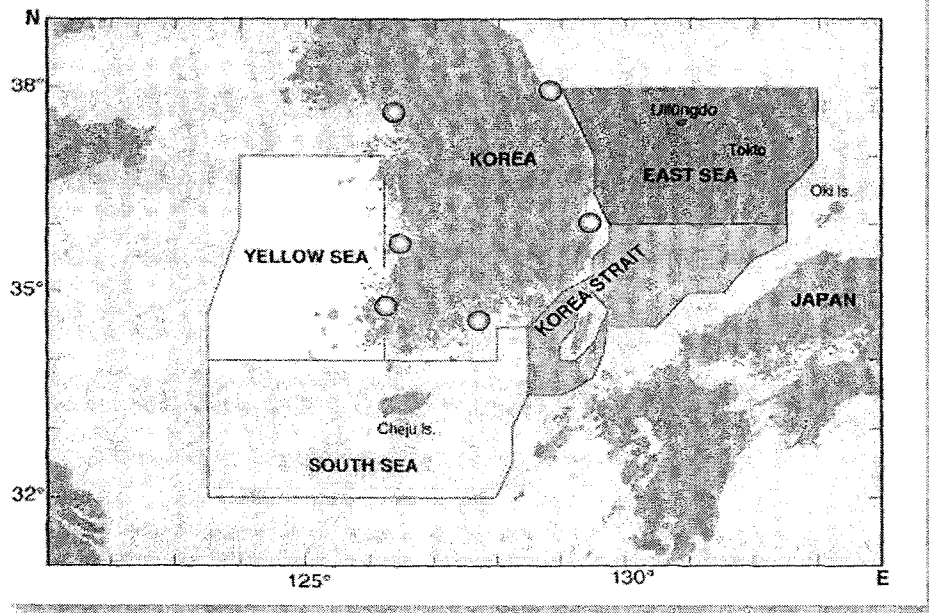


Fig 3-1. Sampling sites in this study



Fig 3-2. Marine biofilms formed on various marine architectures

Table 3-2. Origin of isolated strains

		East Sea		South Sea		Yellow Sea		Sum
		Middle	South	East	West	South	Middle	
Natural biofilm	Bacteria	49	52	373	222	222	52	970
	Cyanobacteria		6	156	322	119		603
Acrylic surface	Bacteria	62	29	200	13	25	10	339
Glass surface	Bacteria						216	216
	Cyanobacteria						4	4
Sum		111	87	729	557	366	282	2132

제 2 절 해양생물막 형성 미생물 군집의 시간별 특성 변화

해양생물막 형성의 초기과정을 이해하고 생물막 생성에 관여하는 미생물 자원을 확보하기 위하여 부착판을 10개월 간 설치한 후 생물막을 회수하여 세균수와 생물막 군집의 세포의 효소활성을 측정된 결과 3일을 기준으로 세균수 및 세포의 효소활성이 급격한 변화함을 확인하였다. 생물막이 성숙된 후에는 고등생물들이 가입함에 따라 생물막 군집의 다양성과 두께에는 변화가 생겼지만 세균수와 세포의 효소활성은 계절변동만을 보였다.

1. 이론적, 실험적 접근방법

가. 생물막 형성 과정 모니터링을 위한 실험 기간 및 장소

생물막 형성 과정에 대한 연구는 2001년 10월 경상남도 거제시 장목읍의 한국해양연구원 남해연구소에 설치된 연구용 부이에서 수행하였다 (Fig. 3-3). 초기 생물막 형성 과정을 이해하기 위하여 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 시간 및 144 시간째에 시료를 채취하여 분석하였으며 연간변화를 관찰하기 위하여 2개월과 6개월 10개월째에 시료를 채취하여 분석하였다. 부착판 설치시기의 수온은 평균 18℃, 염도는 32‰ 내외였으며 다른 시기에 비해 해수 내 inorganic nutrient의 농도가 높은 것으로 보고되었다. 부착판을 설치한 위치의 수심은 평균 7m정도였다.

나. 부착판 설치 및 시료채취

부착 기질로 사용된 아크릴 쿠폰 (25mm × 75mm × 1mm)은 실험에 사용하기 전에 1N HCl로 24 시간동안 처리하여 표면에 붙은 유기물을 완전히 제거하였으며 여과 멸균된 3차 증류수로 여러 번에 걸쳐 HCl을 완전히 씻어 낸 후 75℃ dry-oven에 12시간 이상 건조시켰다 (Lee *et al.*, 1999). Fig. 3-4에서 보는 것과 같이 전처리된 아크릴 쿠폰을 10개씩 아크릴 홀더에 고정시켜 부착판이 해류방향에 정면이 되도록 수심 약 1.5m에 계류하였다. 시간별로 아크릴 홀더에서 쿠폰을 회수하여 해수 내 생물막 형성 과정연구와 미생물들을 분리, 보존하기 위한 목적으로 이용하였다.

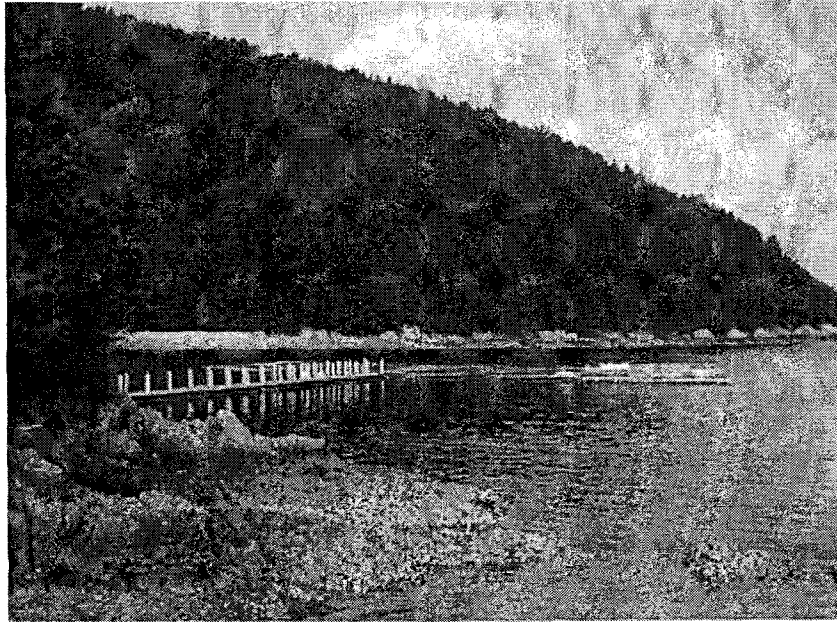


Fig. 3-3. Scene of experimental buoy system in South Sea Institute

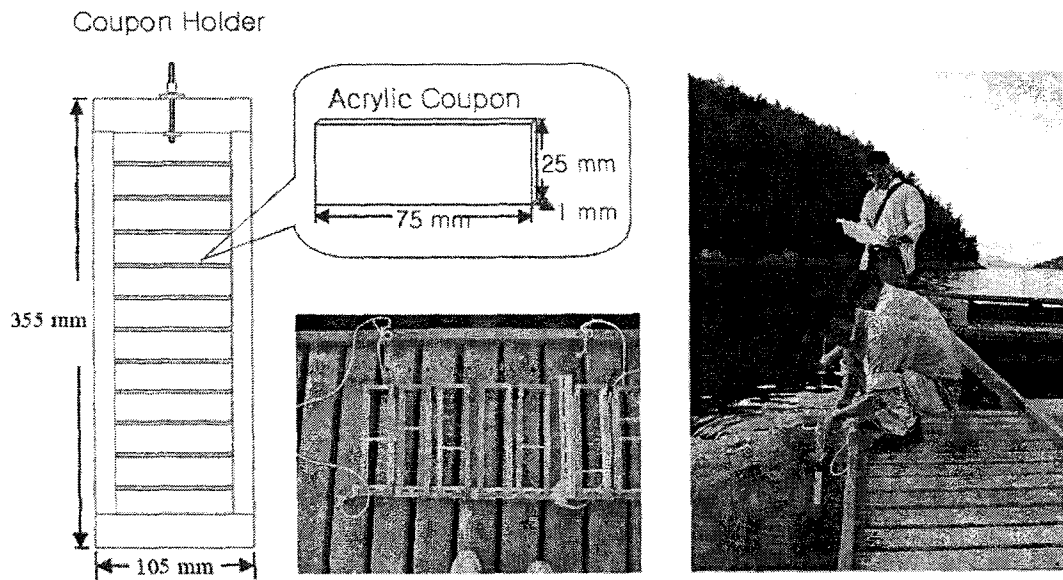


Fig. 3-4. Scheme of acrylic holder & slides

다. 시료 전처리

채취한 생물막 시료는 목적에 따라 Fig. 3-5의 scheme을 따라 처리하였다. 각각의 과정을 간략히 설명하면 다음과 같다. 여과 멸균 해수로 가볍게 세척하여 아크릴 표면에 생성된 생물막 외곽에 붙은 particle들을 제거하였다. 총 세균수 측정을 위한 시료는 여과멸균 해수 50 ml에 1% 농도의 formalin이 첨가된 conical tube에 아크릴 쿠폰을 넣어 세균을 고정시킨 후 분석 전까지 냉장 보관하였다. 종속 영양 세균수, 기질 이용 다양성과 세포의 효소 활성 측정을 위하여 시간별로 회수한 아크릴 쿠폰을 멸균된 칼로 긁어서 모은 후 50 ml의 여과 멸균한 해수가 들어 있는 conical tube에 현탁하여 강하게 20분간 교반함으로써 biofilm slurry를 만들었다. 균집 구조 변화 분석용 시료들은 드라이 아이스에 냉동 보관하였다.

라. 총세균수 (Total bacteria number)

1% formaline 용액에 고정된 아크릴 쿠폰을 sonic bath (Brason 8210)에서 30초씩 7회 sonication하여 아크릴 쿠폰에 부착된 세균을 탈착시켰다 (Lee *et al.* 1999). Sonication 할 때 마다 1% formalin이 첨가된 여과 해수 50 ml를 새것으로 갈아주었으며 sonication이 끝난 시료는 500 ml bottle에 모았다. 이렇게 얻어진 시료 중 cell density에 따라 0.2~500 ml를 취하여 black polycarbonate filter paper ($\varnothing = 0.2 \mu\text{m}$, nucleopore)에 여과 흡착시킨 뒤 1 ml의 DAPI (5 mg/l, 2,4-diamidino -phenyl-indol) 용액으로 염색한 후 형광현미경 (Axioplan, Carl Zeiss, Germany)하에서 1000배의 배율로 최소 20 필드를 관찰하여 쿠폰 표면적당 세균수를 구하였다.

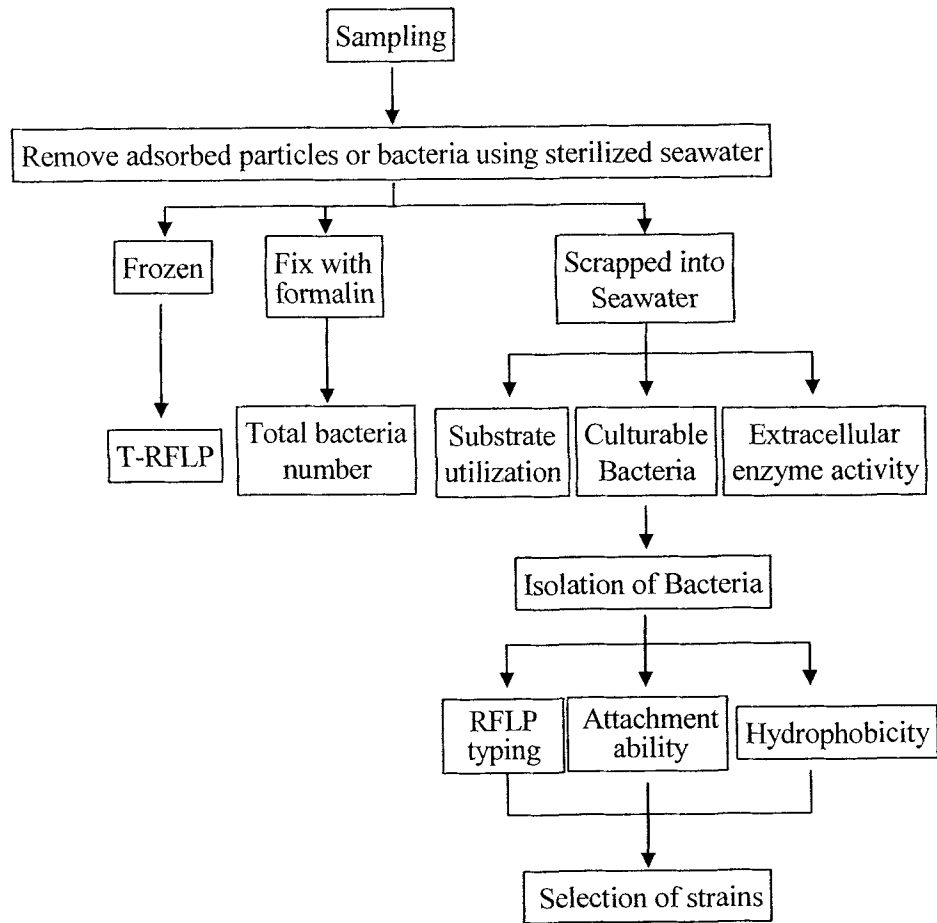


Fig. 3-5. Procedures for analysis of marine biofilm

마. 종속 영양 세균 (Colony forming unit)

전 처리 과정에서 준비된 biofilm slurry를 멸균 해수로 연속 희석한 후 ZoBell 2216e 한천배지에 100 μl 씩 접종하여 25°C에서 5일간 배양한 뒤 agar plate에 형성된 세균 집락을 계수하였다. 이 중 형태가 다른 집락들을 단일균주로 확인 될 때 까지 3차 streak 과정을 거쳐 순수 분리하였다. 순수 분리된 균주들은 20% glycerol 용액이 첨가된 ZoBell 2216e 액체 배지에 현탁하여 -70°C에 냉동 보관하였다.

마. 세포외 효소 활성 (Extracellular Enzyme Activity)

아크릴 쿠폰에 부착된 미생물의 활성변화의 지표로서 세포외 aminopeptidase, β -D-glucosidase와 phosphatase의 활성을 측정하였다 (Hoppe, 1993). Biofilm slurry를 950 μl 씩 18개의 96well Masterblock (1 ml)에 접종한 후 각각 3개의 well에 형광물질로 표지된 3 가지의 기질들 (Leu-MCA, MUF- β -D-glucosidase, MUF-phosphatase)을 최종 농도 2.5, 100 μmol 이 되도록 첨가하였다. 실온에서 배양하면서 배양 초기와 3시간 단위로 100 μl 씩의 시료를 취하여 glycine-ammonia 용액 (pH 10.5) 200 μl 를 첨가하여 pH를 높여 준 다음 Microplate용 형광광도계 (Fluoroscan Ascent, Labsystem)로 형광도를 측정하였다. 시료의 형광을 측정할 때마다 MCA로 표준 곡선을 잡아 농도계산에 이용하였다.

사. 기질 이용 다양성

시기별로 회수된 아크릴 쿠폰에 부착된 생물막 세균들의 생리적 특성을 파악하기 위해 Biolog사의 Microlog GN plate를 이용하여 생물막형성 세균의 기질 이용 다양성을 측정하였다. 전 처리과정에서 준비된 biofilm slurry를 강하게 10~20분간 흔들어서 다음 각 well에 100 μl 씩 접종하여 실온에서 7일간 배양하였다. 배양이 끝난 후 눈으로 발색도를 확인하여 기록하는 한편 540 nm에서 microplate reader (THERMO Max, Molecular Devices)를 이용하여 O.D. 값을 측정하였다.

2. 연구결과

가. 해수내 생물막 형성 과정 연구

해수에 노출시킨 아크릴 쿠폰을 시간별로 회수하였다. Fig. 3-6에서 보는 바와 같이 3일째까지는 아크릴 쿠폰에서 생물막을 육안으로 관찰할 수 없었고 4일째부터 육안으로 관찰할 수 있을 정도로 생물막이 성장하였으며 2개월 이후부터는 고등생물이 아크릴 표면에 형성된 생물막에 출현하였다. 또한 이들 고등생물은 2개월째에 주로 석회관 갯지렁이와 따개비가 출현하였으나 6개월째에는 진주담치 새끼와 파래, bryozoa 등이, 10개월 후에는 진주담치 성체와 bryozoa 등이 아크릴 표면을 덮을 정도로 성장하였다.

나. 총세균수 (Total bacteria number)

아크릴 쿠폰 표면에는 해수에 접촉한 1일 이내에 1.85×10^5 cells/cm²의 세균이 부착하였다. 그러나 3일째에 3.49×10^5 cells/cm²으로 1일에서 3일 사이에는 소폭 증가하는데 그쳤으며 3일 이후부터 지수적인 증가를 보여 6일째에는 9.73×10^6 cells/cm² 수준으로 성장하였다. 이후 생물막의 성장과 함께 54일째에는 4.28×10^8 cells/cm² 수준으로 증가하였으며 6개월, 10개월 후에도 54일째와 유사한 수준의 세균수를 보였다 (Fig. 3-7). Lee *et al.* (1999)은 유리표면을 해수에 노출시켰을 경우 3일 동안 3.91×10^6 cells/cm²의 세균이 부착한 것으로 보고하였으며 Choi *et al.* (1996)은 인천항에서 6일간 유리와 아크릴 쿠폰을 노출시켰을 때, 각각 $4.0 \sim 10.7 \times 10^7$ cells/cm²와 $15.8 \sim 46.4 \times 10^5$ cells/cm²의 세균이 부착한 것으로 보고하여 한국 연안해수에서는 초기 생물막 형성 속도는 지역에 관계없이 유사한 것으로 판단된다. 6개월, 10개월 동안 해수에 노출시킨 아크릴 쿠폰에서는 석회관 갯지렁이, 파래, 따개비와 진주담치 등 거대 생물들이 가입하여 이들 고등생물에 부착하거나 공생하는 미생물들이 추가됨으로써 단위 면적당 세균수가 증가할 것으로 예상하였으나 6개월, 10개월째의 세균수는 2개월째와 비교하여 큰 차이를 보이지 않았다. 이것은 부착표면의 변화와 이에 따른 표면적당 밀도 등이 아크릴표면과는 다르기 때문인 것으로 추정된다. 한편 초기 6일간의 세균수 변화로부터 유추해 보면 초기에 부착된 미생물이 성장하기까지 3~4일의 적응기간이 필요한 것으로 생각된다.

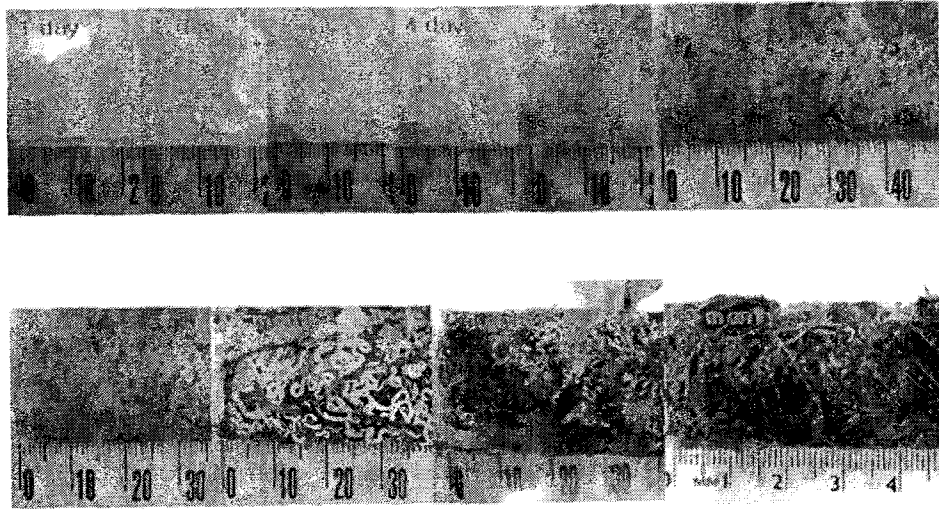


Fig. 3-6. Photograph of biofilm formed on acrylic surface

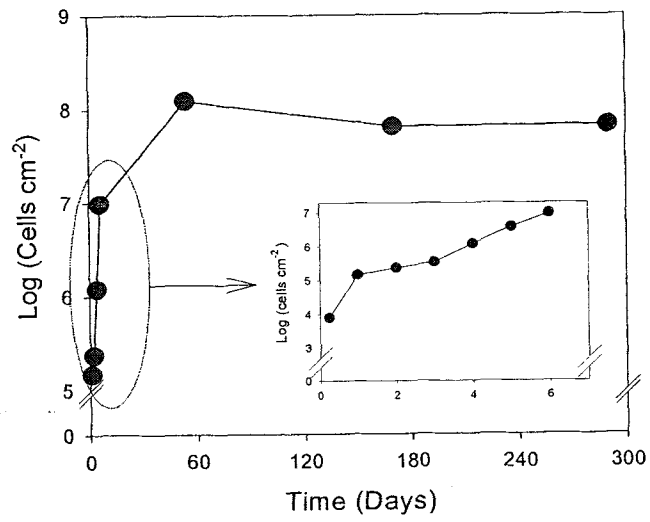


Fig. 3-7. Total bacterial number on acrylic surface at each sampling time

다. 배양가능 세균 (colony forming unit)

아크릴 쿠폰에 부착된 배양 가능 세균수는 1일 이내에 8.22×10^2 CFU/cm²이었으며 총 세균수와 마찬가지로 1~3일 사이에는 뚜렷한 변화를 보이지 않았다 (Fig. 3-8). 4일 이후 지수적인 증가를 보여 6일째 4.28×10^5 CFU/cm²로 증가하였으며 54일째에 3.63×10^6 CFU/cm²로 증가하였다. 총 세균수와 배양가능 세균수의 결과에서 확인된 것과 같이 세균 부착은 모두 1일 이내의 짧은 기간동안 부착이 진행되지만 3일 혹은 4일간의 정체기간을 거친 후 지수적인 증가를 보였다. 총세균수에 대한 배양세균수는 0.44~4.40%의 비율을 보였으며 지수성장기에 비율이 증가하는 경향을 보여 생물막의 안정과 함께 세균활성의 증가가 있었던 것으로 생각된다.

라. 세포외 효소 활성

세포외 효소 중 단백질 분해에 관여하는 효소인 aminopeptidase 활성은 1~4일 사이에 1.996~2.395 nmol/cm²/hr 사이에서 fluctuation을 보인 후 지수적으로 증가하여 6일째에 97.881 nmol/cm²/hr의 높은 활성을 보였다 (Fig. 3-9). 그러나 54일 이후로 aminopeptidase 활성 변화가 거의 없는 것으로 볼 때 생물막의 성숙에 따라 그 역할이 감소했을 가능성을 시사한다. β -D-Glucosidase는 3일까지 검출한계 이하의 낮은 활성을 보인 후 급격히 증가하여 6일째에 9.423 nmol/cm²/hr의 활성을 보였으며 실험 개시 54일째에 31.48 nmol/cm²/hr로 활성은 낮지만 지속적인 증가를 보였다. β -D-Glucosidase의 낮은 활성은 생물막내에서 탄수화물이 초기 생물막 형성과정에 탄소원으로서의 중요성이 높지 않기 때문인 것으로 추측된다. Phosphatase는 처음 3일간 0.5 nmol/cm²/hr내외의 활성을 보인 후 4일 이후 지수적인 증가를 보여 6일째에 167.86 nmol/cm²/hr의 높은 활성을 보였다. Phosphatase 활성은 54일째에도 935.43 nmol/cm²/hr로 가장 높은 활성을 보였다. Phosphatase의 높은 활성은 생물막 내에서 인산염이 성장의 제한 요인으로 작용할 가능성을 시사한다. 세균의 세포외 효소활성은 세균수 변화와 마찬가지로 기질의 종류에 따라 3~4일간의 정체기간을 보였다. 효소활성의 지수적인 증가는 세균수의 증가와 일치하지만 한편으로 활성을 총세균수로 나눈 unit activity가 세포외 효소활성의 지수적 증가기에 크게 증가하였던 점을 감안할 때 생물막의 안정과 함께 개별 세균의 활성도 함께 증가한 것으로 생각된다.

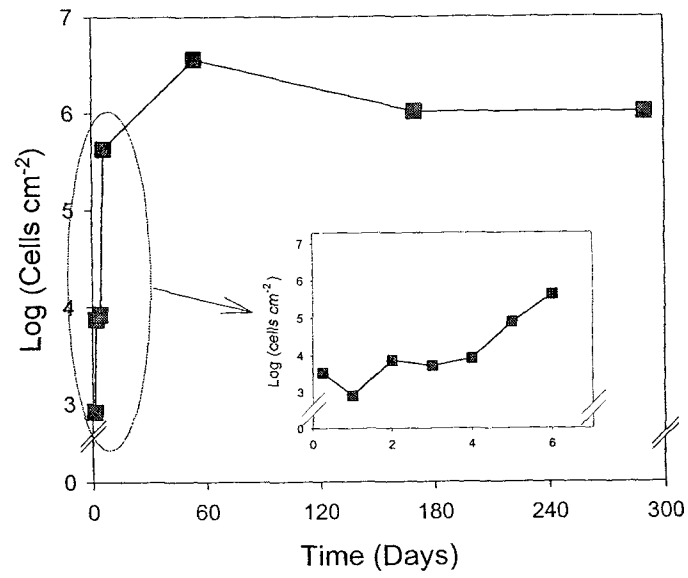


Fig. 3-8. Culturable bacterial number on acrylic surface at each sampling time

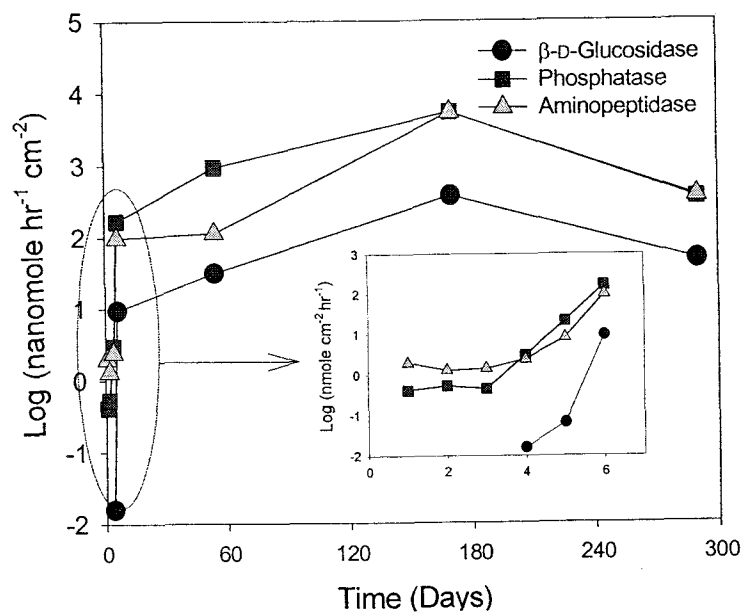


Fig. 3-9. Changes of extracellular enzyme activities

마. 기질 이용 다양성

양의 값을 보인 GN microplate의 평균 O.D.값은 시간경과에 따라 0.034 (6시간), 0.025 (12시간), 0.100 (24시간), 0.145 (48시간), 0.172 (72시간), 0.192 (96시간), 0.491 (120시간), 0.497 (144시간)로 증가하였다. 초기 1일간 O.D.는 빠른 속도로 증가하였으나 이후 4일까지는 세균수, 세포외 활성의 변화에서와 마찬가지로 정체기를 보여 기질 이용도가 세균수 및 활성을 반영하는 것으로 생각된다. 부착판 설치 4~5일 사이에 O.D.값의 급격한 증가를 보여 세균수와 활성의 증가에 따른 기질 이용도의 증가를 반영하였다. 6일째에는 5일째와 유사한 수준의 O.D.값을 보였으며 54일째에는 0.735로 기질이용도가 완만하게 증가하였다. 이용된 기질의 수도 1일 24개, 2일 33개, 3일과 4일은 38개, 5일 77개, 6일 79개로 5일 이후 급격하게 증가하였다. 이용된 기질은 초기에 주로 탄수화물, 유기산, 아미노산 등이었으며 점차 고분자물질과 ester-bond가 있는 화합물 등 상대적으로 이용이 어려운 기질들로 이용범위가 확대되었으며 3일째에는 amide, aromatic compounds, alcohol 계통의 물질들도 이용하였다 (Table 3-3). 4일째까지 이용되는 기질의 범위가 확대되었으나 한편으로 이용되는 기질의 종류는 조금씩 변화를 보여 동일한 개수가 이용된 3일째와 4일째의 생물막 미생물군집의 경우에도 이용 경향은 다르게 나타났다. 실제로 3일째에 이용된 38 기질 중 11가지는 4일째에 다른 기질로 대체되었으며 12 종류는 2일째에는 이용되지 않던 기질이다. 그러나 5일째부터는 거의 모든 기질을 이용하는 것으로 나타났으며 2개월, 6개월 후에도 이용기질의 부분적인 증가가 있었다. 한편 탄수화물과 아미노산의 경우 초기부터 이용이 가장 활발하였으며 제공된 모든 기질이 이용된 반면 유기산의 일부, amides 및 amine계통의 물질은 완전히 이용되지 못하는 것으로 나타났다. 이상의 결과로 볼 때 생물막 내 세균군집은 수의 증가에 따라 기질이용의 다양성도 증가하였으나 한편으로 초기에 이용되는 기질의 종류가 계속 바뀌므로써 초기 생물막 내 군집구조의 변화를 반영해 주는 것으로 생각된다.

Table 3-3. Used number of substrates on Microlog GN2 plate

Day	1/4	1	2	3	4	5	6	54	170
Polymers (5)		4	2	1	4	5	5	5	5
CH & deriv. (28)	6	10	11	13	12	25	26	27	28
Methylesters (2)		1	1		1	2	2	2	2
Carboxylic acid (24)	3	1	7	8	8	15	17	17	20
Brominated (1)						1		1	1
Amides (3)				1		2	2	1	2
AA & deriv. (20)	7	8	12	12	10	19	19	19	20
Aromatics (4)				2	2	4	4	4	4
Amines (3)						1	1	2	2
Alcohols (2)				1		11	1	1	2
Phosphorylated (3)						2	2	3	3
Total (95)	16	24	33	38	38	77	79	82	89

제 3 절 생물막 구성 미생물 군집의 다양성 변화

DNA의 말단절편방법을 이용하여 해양생물막 생성 초기과정에서 우점도 변화 및 생물막 구성 미생물의 천이를 조사한 결과 아크릴 표면에 부착하는 세균의 16S rDNA 말단 절편의 풍부도는 3일을 기준으로 크게 증가하였으나 2개월 이후 감소하였다. 각 T-RF의 비율을 기준으로 집괴분석을 수행한 결과 생물막을 구성하는 세균군집은 해수의 세균과 큰 차이를 보였으며 생물막 내에서도 3일을 기준으로 조성에 큰 변화를 보였다. 생물막 형성 초기와 성숙 초기단계에서 다양성 지수에는 큰 변화가 없으나 성숙 후기에는 다양성이 감소되었다. 2단계 1차년도에는 T-RFLP 결과를 검증하기 위하여 생물막 형성과정에서 배양세균의 종조성 변화와 DGGE (Density gradient gel electrophoresis) 방법을 이용하여 전체 세균군집의 다양성 변화를 추적함으로써 생물막 형성에 따른 세균군집의 천이과정을 조사하였다.

1. 이론적, 실험적 접근방법

1.1. T-RAFLP 방법에 기초한 세균군집의 구조변화

가. 군집 구조 변화

해수에 노출시킨 아크릴 표면에 부착된 생물막 내 미생물의 16S rDNA를 HEX (Hexachlorofluorescin) 형광물질로 표지된 primer를 이용하여 증폭시킨 후 T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 분석방법 (Liu *et al.*, 1997; 한국해양연구소, 1999)을 이용하여 시간 경과에 따른 군집구조 변화를 조사하였다.

나. DNA extraction

전체 DNA 추출을 위해 70% ethanol로 멸균된 칼로 아크릴 쿠폰에 붙어 있는 생물막을 유실되지 않게 scrapping하여 2 ml microtube에 나누어 담았다. Tube에 buffer (artificial sea water; 0.45 M NaCl, 0.011 M KCl, 0.007 M Na₂HCO₃) 1 ml를 첨가한 후 12,000×g에서 20분간 원심 분리하였다. Scrapping 하고 난 아크릴 쿠폰은 50 ml

conical tube에 buffer 45 ml와 함께 담고 sonic bath에서 30초씩 6회 (총 3분) 초음파 처리를 하였다. Tube에서 슬라이드를 제거한 후 원심분리 (4,000×g, 20분)시켜 상등액을 제거하였다. 침전물은 scrapping한 시료와 함께 모아서 2×TENS용액 (100 mM Tris-HCl, 40 mM sodium EDTA, 200 mM sodium chloride) 1 ml을 넣고 섞어 주었다. Glass bead (150~212 μm, Sigma) 500 mg을 넣고 3분간 bead-beating (3110BX, BioSpec Products Inc.)을 실시하였다. 핵산이 포함된 파쇄액을 15,000×g에서 10분간 상온에서 원심분리하고 상층액을 새로운 tube에 옮겼다. 상층액과 동량의 phenol : chloroform : isoamylalcohol (25 : 24 : 1)용액을 넣어 적당하게 혼합한 다음 15,000×g에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 새로운 tube에 옮겨 주었다. Tube에 3M sodium acetate (pH 5.2)와 isopropanol을 각각 추출액의 0.1, 1배의 비율로 넣어 주었다. -20℃에서 2시간 방치하여 DNA를 침전시킨 후 15,000×g에서 20분간 원심분리시켜 상등액을 제거하였다. 핵산 침전물에 포함된 humic acid를 제거하기 위해 침전물을 50 μl TE buffer (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 녹인 다음 PVPP (polyvinylpolypyrrolidone; Sigma) microspin column을 통과시켰다 (Lee *et. al.*, 1998). PVPP column의 제조 방법은 다음과 같다. 분말 상태의 PVPP를 3 N HCl 용액으로 세척한 다음 증류수로 수회 세척하고 다시 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer로 세척하였다. pH 8.0이 되도록 조정하여 PVPP slurry를 고압멸균 (121℃, 15분)하였다. Micro Bio-Spin column에 멸균된 PVPP 분말 1 ml을 충전 시키고 12,000×g에서 1 분간 상온에서 원심분리하여 완충액을 제거하였다. Column을 새로운 tube에 옮긴 다음 핵산 추출액을 column에 넣고 12,000×g에서 2분간 원심분리하여 humic acid가 제거된 핵산을 회수하였다. 핵산은 0.8% 아가로스젤 상에서 순도 및 양을 확인하였다.

다. PCR (Polymerase Chain Reaction)

유전자 증폭에는 형광물질로 표지된 HEX-27F (Giovannoni, 1991) 및 HEX-Arch-21F (DeLong, 1992)와 1518R과 Arch958R (Table 3-4)를 제작 의뢰 (PE Applied Biosystems)하여 사용하였다. PCR 조건은 1 × *Taq* buffer, 0.2 mM dNTPs, 5% DMSO, 0.1% BSA, primer 0.2 μM, *Taq* DNA polymerase (Takara, Japan) 0.5 unit, Template DNA 약 10~100 ng으로 하였다. 반응 부피 50 μl용량으로 핵산 증폭기 모델 2400 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA 94404)을 이용하여 94℃

Table 3-4. Sequences of primers used for bacterial and archaeal 16S rDNA analysis

Primer	Specificity	Sequence(5'-3')	Target* position
27F	Bacterial	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'	8-27
1522R	Bacterial	5'-AAG GAG GTG ATC CAN CCR CA-3'	1541-1522
21F	Achaeal	5'-TTC CGG TTG ATC CYG CCG GA-3'	2-21
958R	Achaeal	5'-CCA CAG GTG GTC ATC GAG AGA TC-3'	980-958

* Sequence position of *E.coli*

에서 5분간 반응 후 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 2분으로 35회 반복반응 후 72°C에서 7분간 더 반응 시켰다. 형광물질로 표지된 PCR 산물은 PCR Preps. DNA Purification System (Promega Corp.)을 사용하여 정제하였고, 최종 부피는 50 μ l로 하였다. 정제된 PCR산물은 4염기서열을 인지하는 제한 효소 *Hha*I (GCG'C; Promega Corp.)으로 최종 부피 20 μ l로 하여 처리하였다.

라. 말단제한절편다형성 분석

PCR 산물을 3 M sodium acetate (pH 4.6)와 95 % ethanol을 이용하여 농축시킨 후 loading용 용액 (deionized formamide:loading dye:standard (Rox 2500; ABI) = 20:2:1) 3 μ l에 녹였다. 형광물질로 표지된 DNA standard의 길이는 37, 94, 109, 116, 172, 186, 222, 233, 238, 269, 361, 470, 536, 827 bp였다. 이 혼합액을 잘 섞어주고 95°C에서 2 분간 중탕하여 denature시킨 다음 얼음에서 보관하였다. T-RFLP용 gel은 4.5 % polyacrylamide gel을 사용하였다. Gel 용액에 10×TBE buffer 5 ml과 LongRanger (BMA, Rockland, ME) gel solution 5 ml를 첨가하였다. Urea 농도가 6 M 이 되도록 total volume을 50 ml로 준비하고 membrane filter (pore size 0.2 μ m)를 이용하여 걸러준 후 10분에서 15분간 압력 펌프를 사용하여 기포를 완전히 제거하고 10 % APS (ammonium persulfate) 250 μ l와 TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) 35 μ l를 기포가 생기지 않게 첨가하여 혼합시켰다. 혼합이 끝난 후 50 ml 주사기를 이용하여 gel board에 resin을 채운 후 2시간 30분간 굳도록 하였다. Gel이 굳으면 자동염기서열장치 ABI 377 (Applied Biosystems Instrument)에 gel board를 장착하고 1×TBE loading buffer를 충전시켰으며 시료를 넣기 전 30분간 pre run을 수행하여 gel의 상태를 확인한 후 위에서 준비된 denatured sample 2.0 μ l를 loading하고 GS Run 36D-2400 옵션으로 4시간 전개시켰다. 전개가 끝난 후 GeneScan software (ABI; version 2.1)를 이용하여 standard와 비교하여 말단 절편의 크기를 분석하였다. Peak detection 옵션은 Green 80, Red 50으로 하였으며 Local Southern Method를 이용하여 데이터 포인트 900에서 10,000까지 분석하였다

1.2. 생물막 배양세균의 종조성변화 및 DGGE를 이용한 미생물 군집 천이과정 연구

가. 생물막 미생물군집 천이 과정 연구시기 및 장소

2004년 4월에 실시된 생물막 미생물군집의 천이과정 연구는 2001년 10월에 생물막 생성과정을 연구하였던 경상남도 거제시 장목읍의 한국해양연구원 남해연구소에 설치된 연구용 부이에서 수행하였다 (Fig. 3-3). 초기 생물막 형성 과정에서의 미생물 종조성 변화를 파악하기 위하여 6, 12 시간과 하루단위로 10일까지 아크릴판에 생성된 생물막으로부터 세균을 분리하는 한편 유전자분석을 실시하였다. 부착판 설치시기의 수온은 평균 16℃, 염도는 32‰ 내외였다.

나. 부착판 설치 및 시료채취

부착 기질로 사용된 아크릴 판 (150mm × 210mm × 1mm)은 제 2절에서 기술한 것과 동일한 방법으로 산세척을 실시한 후 사용하였다 (Lee *et al.*, 1999). 전처리된 아크릴판을 20개씩 금속봉에 고정시켜 부착판이 해류방향에 정면이 되도록 수심 약 1m에 계류하였다 (Fig. 3-10). 시간별로 아크릴 판을 회수한 다음 부착세균 이외의 물질과 세균을 제거하기 위하여 표면을 멸균해수로 가볍게 씻어낸 후 멸균된 면도칼로 표면에 형성된 생물막을 긁어내어 50 ml용량의 conical tube 혹은 9 ml의 멸균해수가 든 희석용 vial에 일정량씩 담았다. 채취된 시료는 당일에 DNA를 추출하거나 미생물 분리과정을 진행하였다.

다. 미생물 배양 및 분리

멸균희석수 vial에 채취한 생물막 시료를 멸균 해수로 연속 희석한 후 ZoBell 2216e 한천배지에 100 μ l씩 접종하여 25℃에서 3일간 배양한 뒤 agar plate에 형성된 세균 집락을 분리하였다. 종조성 변화 추적을 목적으로 하였으므로 형성된 모든 집락을 분리하여 단일 균주로 확인 될 때 까지 ZoBell 2216e 한천배지에 3차 streak 과정을 거쳤다. 이 중 형태가 다른 집락들을 단일균주로 확인 될 때 까지 3차 streak 과정을 거쳐 순수 분리하였다. 순수분리된 균주들은 16S rDNA를 증폭시키기 위해 96 well microplate에 접종하여 배양하였다.

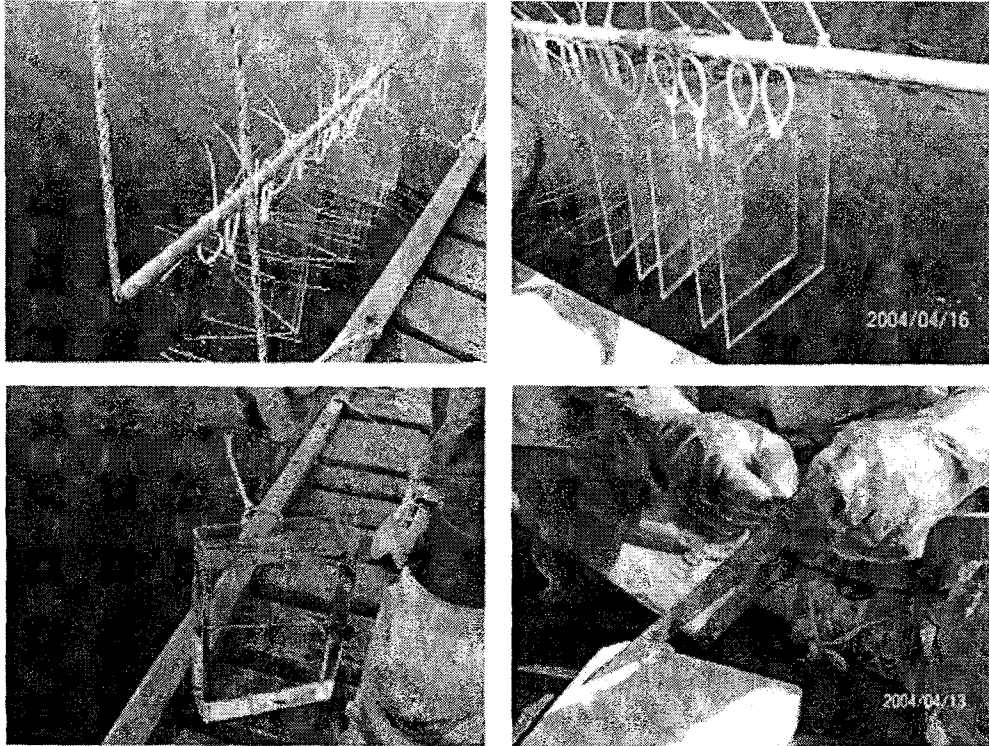


Fig. 3-10. Preparation of Acryl surface and pre-treatment and harvest of produced biofilm

라. 분리세균의 16S rDNA 증폭, 염기서열 분석 및 천이과정 분석

배양된 세균의 16S rDNA는 PCR primer 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1522R (5'-AAG GAG GTT ATC CAN CCR CA-3')를 활용하여 direct PCR 방법을 통하여 증폭시켰다. High pure PCR product Purification Kit (Roche, Germany)로 정제한 뒤 4 염기서열을 인지하는 restriction enzyme *HhaI*으로 자른 뒤 RFLP pattern을 비교하여 각 시간대별로 다른 pattern을 보인 균주들을 선별하였다. 선별된 균주는 ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)로 염기서열을 분석하였다. 이때 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 518R (5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG G-3')를 sequencing primer로 사용하였다. 분석에 사용한 염기서열의 길이는 362 - 484 bp이었으며 평균길이는 451 bp이었다. 염기서열의 상동성 분석은 NCBI의 Advanced BLAST search program을 사용하였다. 분석된 염기서열로부터 상동성이 높은 종들을 확인하고 이들 종의 시기별 출현양상을 확인하여 천이과정을 분석하였다.

마. 생물막시료로부터 총 DNA 추출

DGGE 방법을 이용하여 생물막 미생물의 천이과정을 분석하기 위하여 채취된 생물막으로부터 총 DNA를 추출하였다. 액체질소를 이용하여 2회 반복하여 Freeze-thawing 과정을 거쳐 세포를 파쇄시킨 후 DNA를 추출하였다. DNA 추출의 자세한 과정은 Lee et al. (2003)과 본 보고서의 제 11절에 자세히 수록되어있다. DNA 추출 여부는 전기영동과정을 거쳐 확인하였다. 추출된 DNA는 DGGE 분석 전까지 냉동상태로 보존하였다.

2. 연구결과

2.1. T-RFLP 방법을 이용한 생물막 미생물군집구조 변화 연구

가. 16S rDNA 증폭

시기별로 회수한 아크릴 쿠폰에서 추출한 DNA 수득율은 12시간에서 144시간이 경과된 시료의 경우 $0.08 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 이하였으며, 54일 이후의 시료는 $0.26 \sim 1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 범위 내에 있었다 (Fig. 3-11). 시간별로 회수하여 추출한 DNA를 형광물질이 표지된 Eubacterial primer Hex-27F와 1518R을 이용하여 PCR 반응을 수행한 결과 각 9개의 시간별 아크릴 쿠폰과 대조군으로 사용된 해수에서 bacterial SSU rDNA 중 16S DNA 부분을 증폭한 것에 해당하는 1.5kb의 band를 확인하였다. 모든 아크릴 쿠폰에서 Archaeal specific primer를 사용하여 증폭된 archaeal 16S rDNAs 일부분에 해당하는 900 bp 크기의 band를 확인할 수 있었다 (Figs 3-12, 3-13).

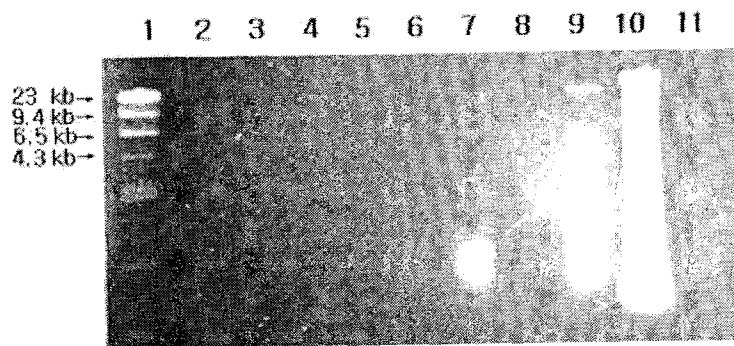


Fig. 3-11. Total DNA extracted from nine coupons and seawater control.
Lane 1 contains Hind III-digested lamda DNA molecular size markers
Lanes: 2, 12 hr; 3, 24 hr; 4, 48 hr; 5, 72 hr; 6, 96 hr; 7, 120 hr;
8, 144 hr; 9, 66 days; 10, 170 days; 11, seawater (control).

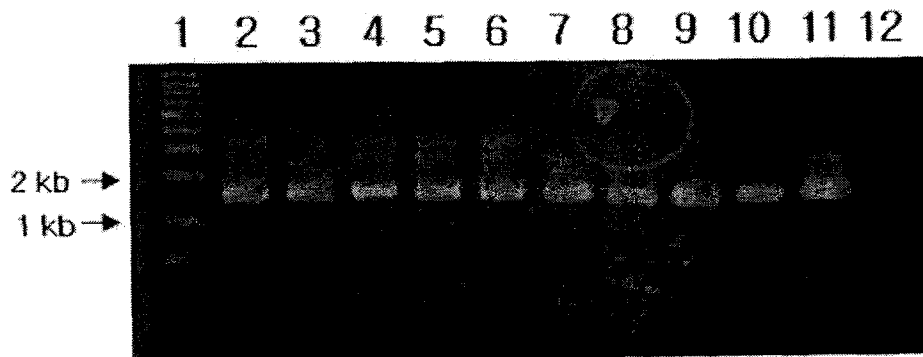


Fig. 3-12. Amplification of bacterial 16S rDNAs from total DNAs of biofilm coupons.

(Lane 1 contains DNA molecular size marker. Lanes: 2, 12 hr; 3, 24 hr; 4, 48 hr; 5, 72 hr; 6, 96 hr; 7, 120 hr; 8, 144 hr; 9, 66 days; 10, 170 days; 11, seawater (control); 12, negative control)

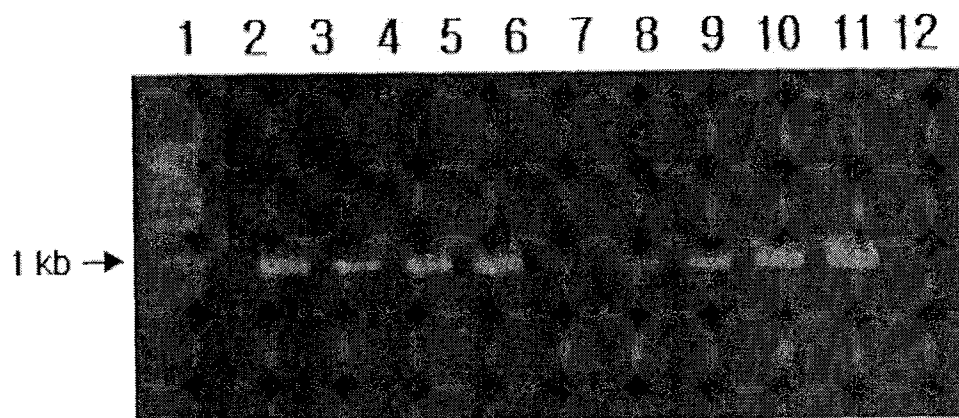


Fig. 3-13. Amplification of archaeal 16S rDNAs from total DNAs of biofilm coupons

(Lane 1 contains DNA molecular size markers. Lanes: 2, 12 hr; 3, 24 hr; 4, 48 hr; 5, 72 hr; 6, 96 hr; 7, 120 hr; 8, 144 hr; 9, 66 days; 10, 170 days; 11, seawater (control); 12, negative control.

나. 말단제한절편다형성 분석

부착판을 해수에 노출시킨 기간에 따라 automatic DNA sequencer의 검출한계범위에서 bacteria의 말단제한절편은 19~56개가 검출되었으며 검출된 말단제한절편의 길이는 37~813 bp였다 (Fig. 3-14). 검출된 T-RF 중 5% 이상의 비율을 보이는 T-RF의 비율은 42.5~54.6%였다 (Table 3-5). 60 bp의 말단제한절편을 가지는 bacteria가 전체 T-RF중 13.8~33.4%로 높은 비율로 검출되었다. 비교적 높은 비율을 보인 T-RF중 201 bp의 T-RF를 가지는 세균은 3일째에 341 bp를 가지는 세균은 4일째에 검출되었다. 520, 673 bp의 T-RF를 가지는 세균은 초기 부착기 후반에 비교적 높은 비율로 검출되었다. 367 bp의 T-RF를 가지는 종은 초기 부착기에 높은 비율을 보였으나 4일째부터 급격히 감소한 후 6일째에는 검출되지 않았다. 210, 374, 376 bp의 T-RF를 가지는 세균도 유사한 경향을 보였으나 2개월 후에도 검출되었다는 점에서 차이를 보였다. 564 bp의 T-RF를 가지는 세균의 경우에도 초기 3일동안만 검출되었다. 이들 세균들은 본격적인 생물막 형성 이전에 관여하였거나, 부착기질의 차이 때문에 정착하지 못한 종일 가능성이 있다. 514 bp의 T-RF를 보이는 종의 경우 초기 부착기 전 기간동안 검출되며 그 비율도 초기 부착기의 중반에 상대적으로 높은 것으로 보아 초기 생물막 형성에 중요한 역할을 할 것으로 추정된다. 82, 203, 343 bp의 T-RF를 보이는 세균은 초기 부착기의 후반에 상대적으로 비율이 증가하였으며 2, 6개월 후에도 높은 비율을 유지하였다. 이 세균들의 경우에도 생물막의 안정적인 성장에 중요한 역할을 하였을 것으로 추정되며 2, 6개월 후에도 높은 비율을 유지하는 것으로 보아 60 bp의 T-RF를 보이는 세균과 함께 생물막을 이루는 중심 세균으로 생각된다. 한편 이들은 석회관 갯지렁이, 파래 등의 고등생물이 정착한 이후에도 우점하는 것으로 보아 기질에 관계없이 강한 부착성을 보이거나 혹은 자연계에 광범위하게 존재하는 것으로 생각된다. 한편 해수에서 검출되었던 35개의 세균 group 중 13개 group은 생물막에서 검출되지 않았으며 10개 group만 6일째까지 계속 검출되었다. 이와 같은 결과는 해수에서 높은 우점도를 보이는 세균군 중 일부만이 생물막에서도 우점적인 위치를 차지하며 생물막에서는 많은 종의 새로운 미생물들이 중심적인 역할을 담당하게 됨을 시사한다. 한편 2개월, 6개월째로 가면서 검출되는 T-RFs의 수가 감소하는 경향을 보여 미생물 군집이 단순화하는 가능성을 보였으나 10개월째에는 다시 T-RFs의 수가 증가하였으며 특별히 우점하는 T-RF도 나타나지 않았다. 이와 같은 결과는 생물막 내부에서의 군집변화에 여류이 되면서 수온이 상승함에 따라 다양한 종류의 미생물들이 새로이 가입하거나 혹은 성장을 보이기 때문인 것으로 사료된다.

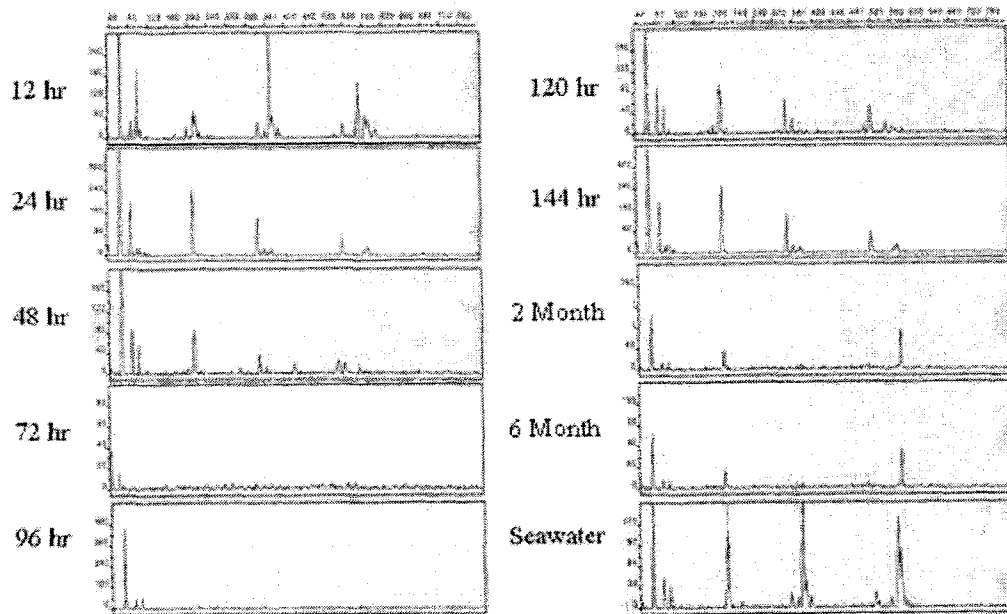


Fig. 3-14. Bacterial T-RFLP pattern generated from *HhaI* digests

Table 3-5. Summary of bacterial T-RFs from seawater and biofilm formed on acrylic surface.

	No. of T-RFs	Size Distribution	Percentage of		Size of Major (5%<) T-RFs (bp)
			1% <	5%<	
Seawater	35	37~675	92.9	54.6	60, 62, 345, 513, 514, 569
1st day	36	37~586	94.9	43.7	60, 95, 367, 548
2nd day	33	37~586	93.6	44.8	60, 367, 564, 571
3rd day	51	37~813	87.8	48.7	60, 343, 367, 569, 571, 573
4th day	52	37~716	84.5	44.8	60, 343, 514, 571
5th day	49	37~716	85.1	42.5	60, 343, 514, 521
6th day	56	37~813	86.3	46.8	60, 201, 203, 514, 521
2 month	35	37~716	81.7	64.7	60, 82, 201, 203, 343, 513
6 month	19	37~574	97.5	69.0	60, 203, 343, 513, 571
10 month	50	35~548	98.66	11.44	40, 57

부착판을 해수에 노출시킨 기간에 따라 Achae의 T-RFs는 2~18개가 검출되었다 (Fig. 3-15; Table 3-6). 검출된 T-RF의 길이는 36~530 bp였다. 해수에서 archaeal 군집은 8개의 T-RFs를 보였으며 그 크기는 52~483 bp였다. 이 중 주요 4 T-RFs의 비율을 보면 (9.3%), 336 (44.1%), 337 (36.1%) and 483 bp (8.1%) 로 전체의 97.7%를 차지하였다. 해수에서 검출된 T-RFs 중 절반 (306, 308, 469, 483 bp)은 생물막에서 검출되지 않았으며 다른 일부 (336 & 337 bp)도 생물막 형성 초기에 급격히 그 비율이 줄어들어 6일 이후에는 검출되지 않았다. 반대로 36, 90, 325, 354 & 357 bp의 T-RF를 보이는 archae group은 생물막에서 새로이 검출되기 시작했으나 36 bp를 보이는 archae 외에는 6일 이후 검출되지 않았다. Archae 중 173, 324, 326, 358 & 361 bp를 보이는 group은 3~4일째부터 검출되기 시작하였으며 36, 52, 62, 326, 358 bp의 T-RF를 보이는 archae는 전 기간을 통해 검출되었다. 이 중 326 bp의 T-RF를 보이는 achae의 비율은 36.6~74.6%로 전체 archae에서 차지하는 비율이 매우 높았다. 336, 337 bp의 T-RF를 가지는 종은 생물막 형성 초기에 감소하는 것으로 미루어 보아 생물막 내에서 경쟁에 이기지 못 하였거나 상대적으로 부착 혹은 EPS 생성능력, 성장률 등이 떨어지는 group인 것으로 사료된다. 반면 324 bp의 T-RF를 가지는 종은 생물막 형성 초기에서 후기까지 빈번하게 나타났으며 그 비중이 점차 증가한 것으로 보아 생물막에 서식하는 주된 archae로 추정할 수 있지만 후기에 부착한 고등생물에 공생하는 종일 가능성도 배제할 수는 없다.

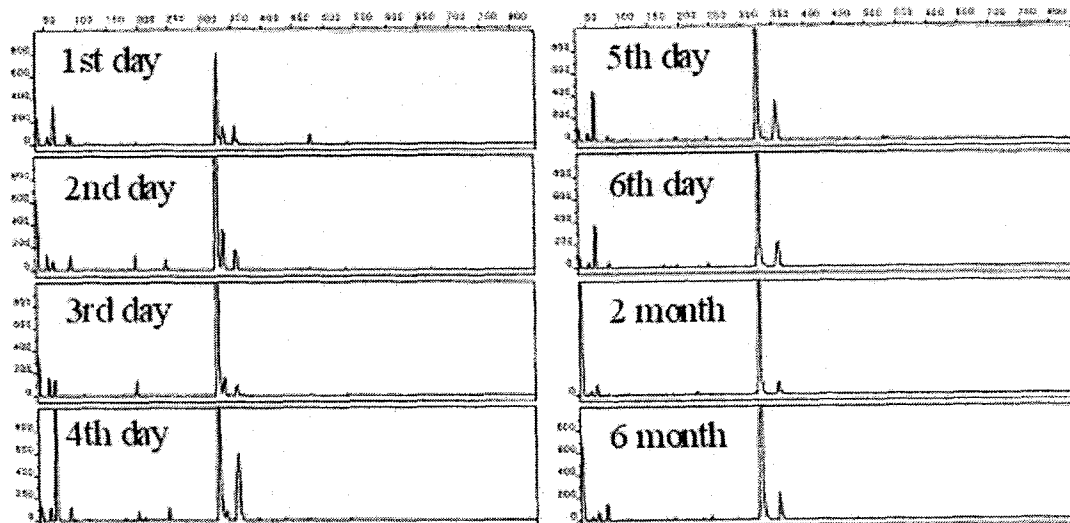


Fig. 3-15. Archaeal T-RFLP generated from *Hha* I digests and its distribution pattern of T-RFs on acrylic surface.

Table 3-6. Summary of archaeal T-RFs from seawater and biofilm formed on acrylic surface.

	No. of T-RFs	Size Distribution	Percentage of		Size of Major (5%<) T-RFs (bp)
			1% <	5%<	
Seawater	8	52~483	97.7	97.7	326, 336, 337, 483
1st day	16	36~477	99.4	71.4	36, 62, 326, 336, 354
2nd day	14	36~361	98.5	81.7	36, 325, 326, 337
3rd day	10	36~477	99.5	81.0	36, 326
4th day	18	36~391	94.5	89.0	62, 326, 356, 358
5th day	14	36~530	95.1	91.0	62, 326, 356, 358
6th day	14	36~361	95.4	90.0	62, 324, 326, 356, 358
2 month	10	36~358	97.4	91.9	36, 324, 326
6 month	11	36~361	97.8	92.1	36, 324, 326
10 month	2	-	100	100	50, 326

하나의 T-RF는 한 종의 미생물에서만 유래하지는 않는다 (Moyer *et al.* 1996, Liu *et al.* 1997, Moeseneder *et al.* 2001). 예로서 제주도 부근에 서식하는 8종의 해면에 공생하는 archaea의 clone 19개를 분석한 결과 제한효소 *Hha* I으로 절단할 경우 모두 326 bp의 T-RF를 보였으나 sequencing 결과에서는 이들 clone이 매우 다양한 archaea groups으로 나뉘어지는 것으로 나타났다 (Lee *et al.*, 2003). 따라서 본 실험과정 중 형성된 생물막에 존재하는 326 bp의 T-RF를 보이는 archaeal group의 경우에도 매우 다양한 종들로부터 유래되었을 가능성이 존재한다. 따라서 T-RFLP 방법을 이용하여 미생물의 다양성 변화를 추적할 경우 여러 제한효소를 이용하여 절편의 변이를 조사할 필요가 있다.

T-RFLP 결과에 기초하여 집괴분석을 실시해 보면 해수와 생물막의 세균군집은 뚜렷이 구분되며 생물막 내에서도 시간에 따라 cluster가 나뉘어지는 것으로 나타났다 (Fig. 3-16). 1~3일째의 미생물 군집과 4~6일째의 미생물 군집은 서로 다른 것으로 나타났다으며 2, 6개월째의 세균군집도 초기 생물막의 세균군집과는 구별되는 것을 확인할 수 있다. T-RFs의 출현양상에서 확인할 수 있었던 것처럼 10개월째의 세균군집은 생물막만이 아니라 초기 해수의 세균군집과도 다른 군집구조를 보였다. 미생물 군집변화를 총체적으로 확인하기 위해 bacteria와 archae의 T-RFs를 동시에 이용하여 집괴분석을 실시하였다. 이때 archae의 비율은 일반적인 결과에 비추어 bacteria의 1/10로 가정하였다. 6개월째까지의 미생물 군집구조는 bacteria만으로 집괴분석을 실시한 경우와 동일한 결과를 보였다 (Fig. 3-17).

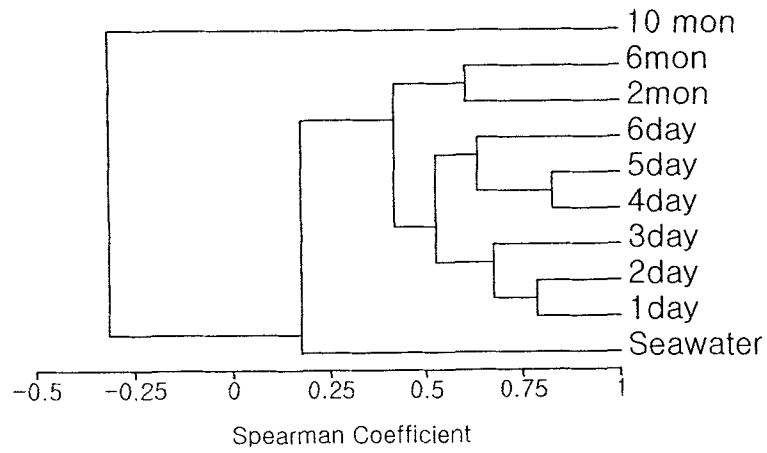


Fig. 3-16. Dendrogram of community relatedness of biofilm forming bacteria based on Spearman coefficient. Comparison of T-RFLP fingerprinting was conducted with WPGMA method.

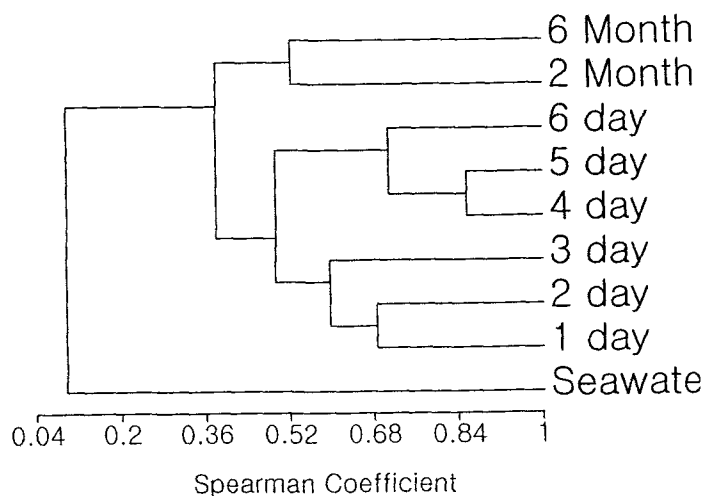


Fig. 3-17. Dendrogram of community relatedness of biofilm forming microbial community (bacteria + archaea) based on Spearman coefficient. Comparison of T-RFLP fingerprinting was conducted with WPGMA method.

일반적으로 T-RFLP 방법은 정량적인 분석법으로는 한계를 지닌 것으로 알려져 있다. 우선적으로 T-RFLP 분석을 위해서는 PCR을 이용한 핵산 증폭과정을 거치게 되는데 PCR에 의한 핵산증폭은 균주의 특성에 따라 그 증폭정도가 다르다. 또한 각각의 균주는 핵산 중에 rRNA에 해당하는 염기서열 copy를 각각 다르게 지니는데 이 차이에 따라서도 개별 균주의 signal은 큰 차이를 보이게 된다. 따라서 T-RFLP 방법으로 정량분석을 실시하기 위해서는 각 균주의 검출한계 및 동량의 균주에 대한 균주간의 검출 비율 등을 정확히 알고 있어야 한다 (한국해양연구소, 1999). 비록 T-RFLP 방법이 제공하는 결과를 정량적인 결과로 해석하기에는 문제가 있지만 T-RFLP 방법으로 얻은 군집구조 정보는 DGGE 방법으로 얻은 결과 (Moeseneder *et al.* 1999), group-specific RNA probe를 이용한 결과 (González *et al.* 2000) 또는 clone을 얻어 rDNA sequence를 분석한 결과 (Lüdemann *et al.* 2000)와도 비교적 유사한 것으로 보고되었다. 따라서 해수에서의 군집구조와 생물막 형성에 따른 군집구조가 크게 달라지는 것과 생물막 내에서도 시간에 따라 군집구조가 달라지는 위 결과는 생물막 형성에 따라 미생물 군집구조가 역동적으로 변하는 것을 잘 보여준다. 본 실험결과에 따르면 이 과정에서 해수환경에서는 소수그룹으로 존재하던 세균군이 달라진 환경조건에 더 잘 적응함에 따라 주요 그룹으로 위상을 달리하기도 하는 것으로 생각되며 그 결과로 초기 생물막에서는 미생물다양성이 해수환경에 비해 증가하는 것으로 추정된다. 군집구조의 변화는 또한 생물막의 성장과 함께 고등생물이 가입한 후 공생 등의 과정으로 유입된 종에 의한 영향도 크게 받을 것으로 생각된다.

2.2. 생물막 미생물군집 천이과정 연구

가. 초기 생물막으로부터 미생물 배양, 분리 및 분석

부착판을 설치한 후 6시간, 12시간, 1~10일까지 총 964균주를 분리하였으며 주변 해수에서 3회에 걸쳐 272균주를 분리하였다 (Table 3-7). 날자별 분리균주 수 및 부착판 단위면적당 세균수는 표와 같다. 분리된 모든 균주를 대상으로 RFLP typing을 실시하여 중복균주를 배제시킨 후 총 266균주에 대해 16S rDNA partial sequence를 분석하였다.

Table. 3-7. Summary of strain isolation from initial phase of biofilm formation.

	No. of Isolated	No. per surface (CFU/cm ² or ml)	No. of analyzed
Seawater	96	8900	22
6 hr	96	1300	20
12 hr	51	700	11
1 day	97	1400	40
2 day	138	1900	19
3 day	76	1800	17
4 day	54	7700	18
5 day	41	9500	8
6 day	78	11400	18
7 day	119	7000	25
8 day	58	72000	14
9 day	132	132000	26
10 day	24	-	12
4 day Seawater	88	7300	14
8 day Seawater	88	7400	9

나. 배양미생물의 종조성

생물막 미생물 천이과정 연구과정에서 분리된 미생물의 종조성은 다음 표 3-8과 같다. Group별로 살펴보면 *Erythrobacter longus*를 비롯하여 *α-proteobacterium* 21종, *Alteromonas macleoidi*를 비롯한 *γ-proteobacterium* 20종, gram 양성세균 3종과 CFB group에 속한 9종이 출현하였다. 이 중 CFB group의 5종을 포함하여 7종이 아직까지 보고된 바 없는 신종 미생물로 추정되고 있으며 동정이 완전히 끝나지 않은 strain들과 높은 유사도를 보인 분리균주도 7종이었으며 분리균주의 16S rDNA 염기서열 분석이 마무리되면 더 많은 수의 신규 미생물이 확보될 것으로 기대된다. 한편 연구기간 동안 해수에서 분리된 미생물의 종조성을 보면 *Planococcus carotinivorans* 등 *α-proteobacterium* 4종, *Alteromonas macleodii* 등 *γ-proteobacterium* 6종 외에 gram 양성균 1종과 CFB group의 신규 미생물 3종이 출현하였다 (Table 3-9). 아크릴 표면에서 생물막을 형성한 종과 해수에서 분리된 종의 구성은 근본적으로 다르지 않았지만 해수에 비해 아크릴 표면의 생물막에서 더 다양한 미생물 종이 출현하였는데 시간경과에 따른 종조성의 변화는 다음 항목에서 분석하도록 한다. 한편 생물막에서 분리된 미생물 중 16S rDNA 부분염기서열 분석이 완료된 미생물들의 group별 분포현황을 보면 *α-proteobacterium*에 속하는 미생물이 약 68%, *γ-proteobacterium*에 속하는 미생물이 14%였으며 CFB group 13%, gram 양성세균이 5%의 비율을 차지하였다 (Fig. 3-18). 이상의 분포현황은 종의 숫자와 관계 없이 전반적으로 *α-proteobacterium*이 생물막의 배양세균 중 우점종을 차지하고 있음을 나타내고 있으며 이는 Dang & Lovell (2000) 이 클론 분석을 통해 얻은 결과와 유사하다.

Table 3-8. List of strains isolated from early phase of biofilm formed on acrylic surface

Class	Genus	Class	Genus
α-proteobacteria	<i>Erythrobacter longus</i>	γ-proteobacteria	<i>Alteromonas macleodii</i>
	<i>Jannaschia helgolandensis</i>		<i>Glaciecola punicea</i>
	<i>Oceanibulbus indoliflex</i>		<i>Marinomonas pontii</i>
	<i>Octadecabacter antarcticus</i>		<i>Marinomonas protea</i>
	<i>Paracoccus carotinifaciens</i>		<i>Neptunomonas naphthovorans</i>
	<i>Roseobacter gallaeciensis</i>		<i>Pseudoalteromonas agrovorans</i>
	<i>Roseobacter</i> sp. PRLIST06		<i>Pseudoalteromonas bacteriolytica</i>
	<i>Roseobacter</i> sp. KAT10		<i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i>
	<i>Roseobacter</i> sp. MED26		<i>Pseudoalteromonas citrea</i>
	<i>Roseobacter</i> sp. SCB28		<i>Pseudoalteromonas distincta</i>
	<i>Ruegeria gelatinovorans</i>		<i>Pseudoalteromonas marina</i>
	<i>Ruegeria meteori</i>		<i>Psychrobacter glacincola</i>
	<i>Sphingomonas flavimaris</i>		<i>Psychrobacter okhotskensis</i>
	<i>Staleyia guttiformis</i>		<i>Shewanella baltica</i>
	<i>Staleyia</i> sp. LM-10		<i>Vibrio gallicus</i>
	<i>Sulfitobacter dubius</i>		<i>Vibrio splendidus</i>
<i>Sulfitobacter mediterraneus</i>	<i>Vibrio tasmaniensis</i>		
<i>Sulfitobacter pontiacus</i>			
<i>Sulfitobacter</i> sp. ARCTIC-P49			
unidentified strain 2			
GP	<i>Bacillus megaterium</i>	CFB	<i>Cellulophaga baltica</i>
	<i>Planococcus maritimus</i>		<i>Flavobacterium</i> sp. 5N-3
	<i>Plantibacter agrosticola</i>		<i>Polaribacter irgensii</i>
	<i>Polaribacter</i> sp. MED18		
	CFB group New species 5		

Table 3-9. List of bacterial strains isolated from seawater environment during the period of biofilm succession experiment

Class	Genus	Class	Genus
α-prot eobact eria	Roseobacter gallaeciensis	γ-prot eobact eria	Alteromonas macleodii
	Planococcus carotinivorans		Glaciecola mesophilus
	Staleyia guttiformis		Pseudoalteromonas bacteriolytica (New species)
	Sulfitobacter mediterraneus		Pseudoalteromonas distincta
			Pseudoalteromonas marina
			Vibrio splendidus
GP	Bacillus macroides	CFB	CFB group New strain 3

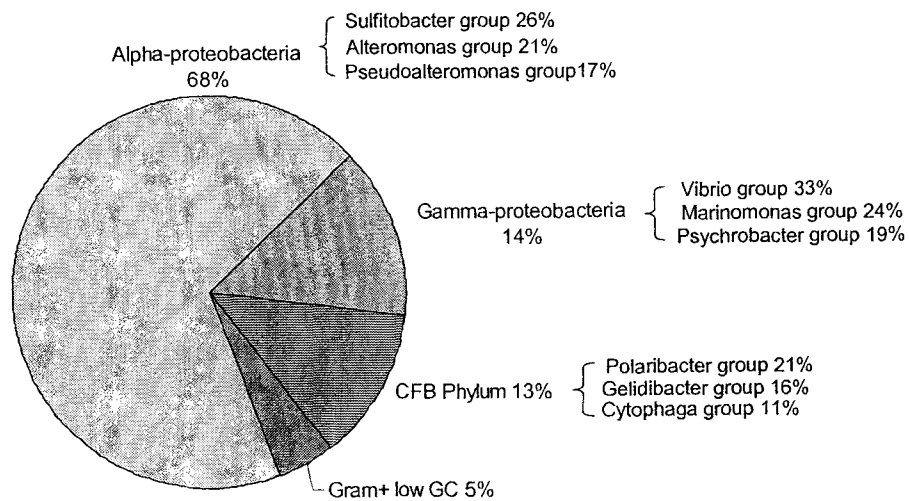


Fig. 3-18. Composition of cultivated bacteria during the initial phase of biofilm formation.

다. 배양세균의 천이과정

날자별로 생물막에서 분리한 세균 중 RLP type에 따라 선별된 균주들의 partial 16S rDNA 염기서열을 분석하였다. 염기서열 분석을 실시한 273균주 중 일부 균주 중 현재 153균주의 분석이 완료되었다. 분석이 완료된 균주의 종분포를 보면 초기 해수에서는 분석이 완료된 8균주 중 *a-proteobacterium* 3, *v-proteobacterium* 3, CFB group과 low GC gram positive bacteria가 각각 1균주씩 검출되었다. 이에 반해 아크릴판에 형성된 생물막에서는 6시간째에 *v-proteobacterium*에 속하는 균주가 16균주 중 8균주로 절반을 차지하였으며 CFB group에 속하는 세균도 6균주로 높은 비율을 보였다. 아크릴판을 해수에 노출시킨 1일 후에는 상대적으로 CFB group의 비율이 줄고 *a-proteobacteria*의 비율이 증가하였다. 부착판을 해수에 노출시킨 2~5일 사이에도 상대적으로 *v-proteobacterium*에 속하는 세균의 비율이 높았으나 5~9일 사이에는 *a-proteobacteria*의 비율이 *v-proteobacterium*보다 높아졌다. 분석이 완료된 균주 중 염기서열의 상동성이 확실한 균주만을 대상으로 하여 시간에 따른 종변화를 분석한 결과는 그림 3-19와 같다. 먼저 *Psychrobacter okhostskensis*, *Flexibacter* sp., *Cytophaga* sp. 41-DBG2 등의 CFB group 세균들과 *Vibrio splendidus*, *Pseudoalteromonas carrageenovora* Ps. marina, *Alteromonas macleodii* 등의 *v-proteobacterium* group, *Sulfobacter pontiacus*와 같은 *a-proteobacteria* group의 세균이 초기에 부착하고 이 중 CFB group의 세균들은 대부분 초기 이후에는 검출되지 않았다. 초기에 아크릴 표면에 부착한 균주 중 *V. splendidus*를 제외한 *proteobacteria* group의 세균들은 조사기간 끝까지 계속 출현하는 것으로 나타나 이들 균주들이 초기 생물막의 핵심 구성원인 것으로 추측된다. 이와는 달리 CFB group에 속하는 bacteria의 경우 대부분 1일 이후 검출되지 않거나 비율이 줄어드는 것으로 볼 때 초기 생물막 형성에는 중요한 역할을 하지만 본격적인 생물막의 성장에는 역할을 하지 못 하는 것으로 보인다. 반면 *Roseobacter* sp. PRLIST06, *Marinomonas pontii* 등은 초기 생물막 형성 중반부에 출현한 후 계속 검출되었으며 *Staleyia guttiformis*, *Neptunomonas naphthovorans* 등은 후기에 출현하는 것으로 볼 때 이들 미생물은 이미 형성된 생물막에 새롭게 부착하거나 혹은 상대적으로 우점도가 낮았던 균주들이 점차로 생물막에서 중심균주로 성장하기 때문인 것으로 추측된다. 앞으로 배양세균의 분류가 완료되고 전체 미생물 군집의 천이과정을 DGGE방법으로 분석한 결과가 나올 경우 생물막 형성과정에서 미생물의 천이과정을 좀 더 확실하게 규명할 수 있을 것으로 기대된다.

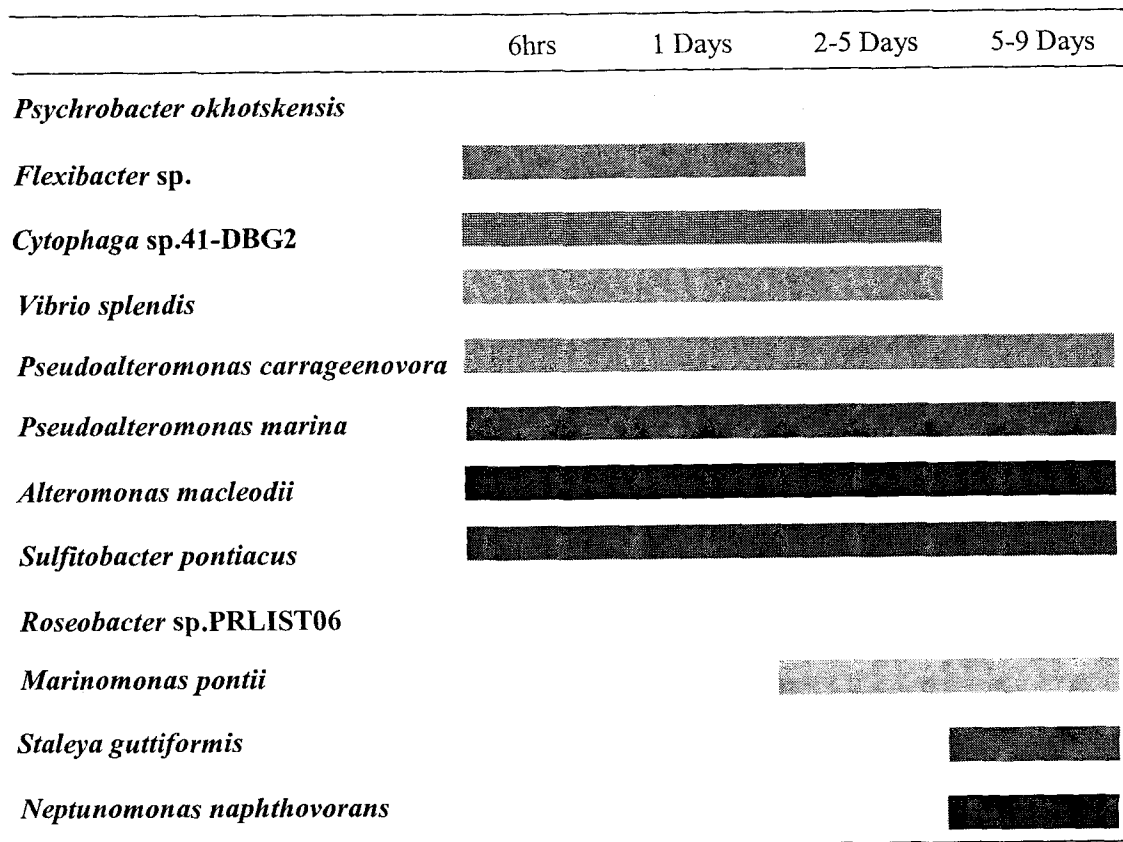


Fig. 3-19. Graphic illustration of cultured bacterial succession during the initial phase of biofilm formation on acrylic surface in seawater.

제 4 절 해양생물막 형성 미생물 다양성 조사

해양연안 생물막을 구성하는 미생물의 종 다양성 및 공통으로 존재하는 세균을 선정하기 위하여 부착판에 3일내에 생성된 생물막에서 분리된 세균 중 76 균주의 16S rDNA 염기서열 분석 결과 Proteobacteria 60.5%, CFB group 14.5%, low GC Gram positive bacteria 18.4%, Actinobacteria 6.6%의 조성을 보였다. 분석이 진행 된 동·서·남해 지역에서 공통적으로 출현하는 종은 발견되지 않아 생물막생성 초기과정에 관여하는 세균들이 해역의 환경 특성에 따라 달라지는 것으로 사료된다. 76 균주 중 33%가 지금까지 미배양되었거나 미동정된 종으로 확인되었으며 2단계의 정밀 동정 연구를 통하여 많이 신종으로 보고될 것으로 예상된다. 한편 동·서·남해안 6곳의 암반, 해안구조물 등에 자연적으로 형성된 생물막에서 분리된 세균 164 균주를 대상으로 DNA 염기서열 분석 결과 Proteobacteria 68.9%, CFB group 9.8%, low GC Gram positive bacteria 8.5%, Actinobacteria 12.8%의 조성을 보였다. 분석된 세균은 총 36개 속으로 분류되었으며 73 균주가 미동정 혹은 배양되지 않았던 종이어서 앞으로 신종으로 보고할 계획이다. 부착판에서와 마찬가지로 연구 지역에 공통으로 분포하는 균주는 없었으며 지역에 따라 미생물 종조성에 차이를 보였다. *Erythrobacter* 속, *Roseobacter* 속, *Pseudoalteromonas* 속에 속하는 균주가 비교적 넓은 지역에서 출현하였다. 따라서 방오효능 평가시 연안에 따라 각기 다른 표준균주의 선정이 예상된다.

1. 이론적, 실험적 접근방법

미생물은 자연 또는 인공기질에 부착하여 다세포성 군집을 형성할 수 있는데, 이것을 생물막(biofilm)이라고 한다 (Dalton and March, 1998). 해양환경에서도 미생물 생물막이 조간대와 조하대의 해수에 닿는 바위나 루프, 배나 다리, 해양 동물이나 해조류의 표면을 덮고 있다. 생물막을 형성하는 대부분의 박테리아는 세포외 고분자 물질을 합성한다 (Lawrence *et al.*, 1991). 이 세포외 고분자 물질은 미생물에게 항상성을 유지하는 안정한 환경을 제공한다 (Wimpenny, 2000). 세포외 고분자 물질은 빈영양 환경인 해수로부터 영양물질의 흡수를 도우며 세포외로 분비된 효소의 활성을 유지시키고 포식자로부터 미생물을 보호하는 역할도 한다 (Wolfaardt *et al.*, 1998; Decho,

2000). 또한 세포의 고분자 물질은 항생제의 확산을 억제하거나 UV, pH 변화, 삼투 변화, 건조 등의 다양한 환경스트레스로부터 미생물을 보호하는 역할을 하기도 한다 (Gilbert *et al.*, 1997; Wingender *et al.*, 2001). 세포의 고분자 물질은 주로 세포의 다당류 (40-95%), 단백질 (1-60%), 핵산 (1-10%)과 지질 (1-40%)로 구성되어 있다 (Davey and O'Toole 2000; Flemming and Wingender 2001). 따라서 생물막은 세포외다당류를 생산하는 박테리아의 좋은 공급원이 되지만, 아직까지 해양 생물막에서 박테리아를 분리, 동정한 연구는 많지 않다 (Davey and O'Toole, 2000). 따라서 본 연구에서는 해양 생물막에 서식하는 박테리아를 분리 배양하고 16S rDNA 염기서열을 이용한 계통분석으로 동정하고자 하였다.

생물막 생성 초기과정에 관여하는 미생물을 분리하기 위한 부착판은 제 2절의 방법에 따라 준비하였다. 준비된 부착판은 Nylon rope에 단 후 weight로 약 1 kg 무게의 돌을 달아주었다. 부착판은 강원도 강릉시의 정동진, 경상북도 포항시, 전라남도 여수시, 목포시, 전라북도 부안군 채석강, 인천직할시의 6곳에 설치하였다. 이 중 강릉과 포항, 부안은 자연해안에 가까운 지역으로 상대적으로 인간활동의 영향을 적게 받는 환경이었다. 강릉의 경우 건설중인 방파제 외곽에 부착판을 설치하였으며 주변 암반에 석회조류가 널리 분포하고 있었다. 포항의 경우에도 공사중인 방파제 외곽에 위치하는 암반에 부착판을 설치하였다. 상대적으로 녹조류와 갈조류가 많이 분포하였다. 목포와 인천은 항구에 설치하였는데 선박의 출입에 따라 기름오염 및 유기오염에 따른 영향을 크게 받는 곳이었다. 여수에서는 돌산대교 부근의 수로에 설치하였는데 선박의 왕래가 잦고 해안선에 축대가 쌓여 있으며 부근에 주택가와 공장, 음식점 등이 밀집하여 환경조건이 자연해안과 항구의 중간정도에 속하였다. 부착판은 2002년 11월 14~16일 사이에 설치하였으며 17~19일 사이에 회수하였다. 설치된 부착판 중 부안의 것은 강한 파도에 의해 파손되어 균주분리를 할 수 없었으며 여수에서는 간조시 바닥에 닿아 일부 퇴적토의 토착균주로 오염되었을 가능성이 존재한다. 인천에 설치한 부착판도 선박 이동에 따라 파손되어 19일에 재설치한 후 22일에 회수하였다. 부착판 설치시 아침 수온은 8~12 °C로 낮은 수온을 보였다. 회수된 부착판에 생성된 생물막을 멸균된 칼로 끊어낸 후 10 ml의 멸균해수에 현탁시켰다. 현탁된 생물막을 멸균해수로 연속희석한 후 ZOBell 2216e 한천배지에 도말하였다. 1주일간의 배양 후 배지에 생성된 집락 중 형태가 다른 집락을 모두 선별하여 새로운 한천배지에 3차 streak하는 과정을 거쳐 균주를 순수분리하였다. 분리된 균주는 모두 20% glycerol 용액에 현탁하여 -70°C에 보존

하였다.

생물막 형성 초기과정에 관여하는 세균 외에 오래된 자연생물막에 존재하는 세균의 다양성을 함께 분석하였다. 부착판을 설치한 곳과 동일한 전국연안 6개의 채집지에서 채집한 생물막은 Zobell 배지에 도말하여 해양미생물을 분리하였다 (Fig. 3-20), 16S rDNA는 PCR primer 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1522R (5'-AAG GAG GTT ATC CAN CCR CA-3')를 활용하여 증폭하였으며, High pure PCR product Purification Kit (Roche, Germany)로 정제한 뒤 ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)로 염기서열을 분석하였다. 이때 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 518R (5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG G-3')를 sequencing primer로 사용하였다. 분석에 사용한 염기서열의 길이는 362 - 484 bp이었으며 평균길이는 451 bp이었다. 염기서열의 상동성 분석은 NCBI의 Advanced BLAST search program을 사용하였으며, 유연관계가 높은 종을 선별하여 CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997)로 정렬한 뒤 PHYDIT (Chun, 1995)으로 2차구조를 고려하며 PHYLIP (Felsenstein, 1993)으로 계통분석을 수행하였다. 이때 neighbor-joining 방법을 사용하였다 (Saitou & Nei, 1987).

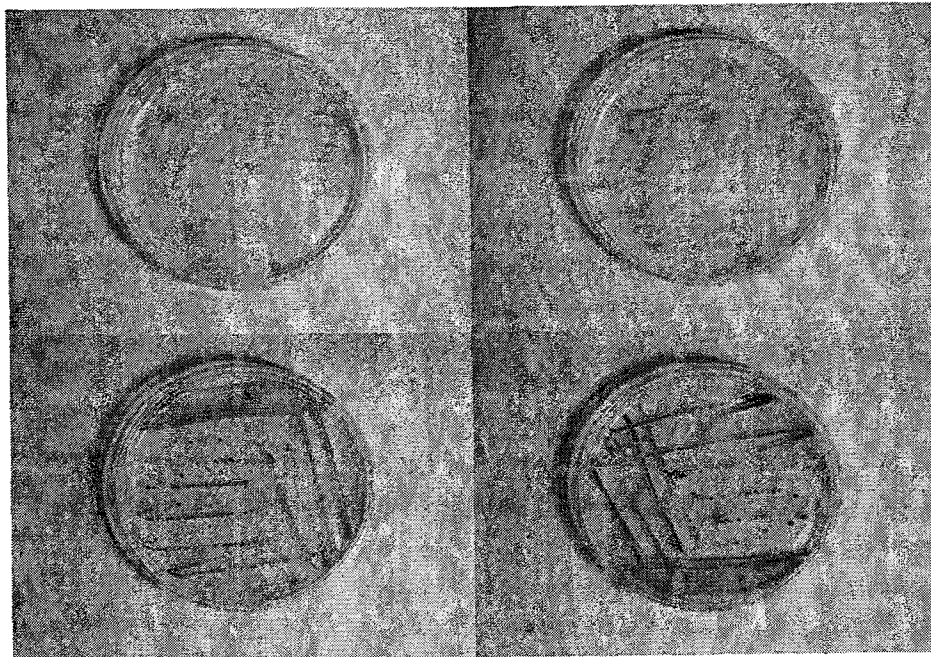


Fig. 3-20. Culturable bacteria isolated from marine biofilms

2. 연구 결과

가. 생물막 형성 초기과정에 분리된 미생물 다양성

각 지역에 설치한 부착판을 3일 후 회수하였을 때 배양가능 세균수는 $2.89 \pm 0.15 \times 10^3 \sim 1.55 \pm 0.13 \times 10^4$ CFU/cm²로 동해안에 설치한 부착판에서 상대적으로 높은 세균수를 보였으며 목포, 인천 등 서해안의 항구에 설치한 부착판에서 낮은 세균수를 보였다 (Fig. 3-21).

배양된 세균을 colony 형태에 따라 선별하였다. 선별된 세균은 3차 streak 과정을 거쳐 순수분리하였으며 이 중 76균주의 16S rDNA 염기서열을 조사하였다. 분리된 세균은 해양환경에 널리 분포하는 5개 group 26개 종으로 분류되었다 (Table 3-10). 분류학적 위치를 확인한 76균주 중 약 35%에 해당하는 26균주는 GenBank Database상에서 아직까지 배양되지 않았거나 미동정으로 보고된 종이였다. GenBank database에 등록된 균주들과 비교할 때 분리균주들은 93.3~100%의 유사도를 보였다. 한 plate에서 배양된 모든 세균을 대상으로 한 것이 아니므로 각 group이 차지하는 비율을 따지는 것은 모순점이 있지만 분리균주 중 30.9%는 α -Proteobacteria에 속했으며 27.3%는 γ -Proteobacteria, 25.5%가 gram positive bacteria, 16.4%가 CFB group에 속하는 것으로 나타났다 (Fig. 3-22). 분리균주 중 어떤 종도 부착판이 설치된 모든 지역에서 출현하지 않았으며 종조성도 지역에 따라 큰 차이를 보였다. 예로서 강릉지역의 부착판에서 분리된 균주 중 약 78%가 proteobacteria에 속하였으며 이는 전체 평균보다 18% 정도 높은 비율이다. 그러나 포항의 경우 proteobacteria의 비율이 30%정도로 평균의 1/2 정도로 큰 차이를 보였다. 모든 지역에 공통된 균주는 없었지만 *Bacillus*속 속한 세균과 *Erythrobacter citreus*, *Pseudoalteromonas*속 세균 및 *Psychrobacter*속 세균은 세 지역 이상에서 출현하였다. 이들 종은 상대적으로 널리 분포하며 생물막 형성 초기과정에 중요하게 작용하는 group인 것으로 생각된다. 연구지역 전체에 공통적으로 출현하는 균주가 분리되지 못한 이유로는 우선 분석 균주수의 부족을 들 수 있다. 표에서 볼 수 있듯이 여수, 목포, 인천의 경우 분석 균주수가 10균주 미만이었다. 항구에 부착판을 설치하였던 인천의 경우 colony 형태측면에서 볼 때 매우 단순한 구성을 보여 부착판 설치지역의 환경특성의 차이점도 공통적으로 출현하는 균주가 나타나지 않은 한 원인인 것으로 생각된다.

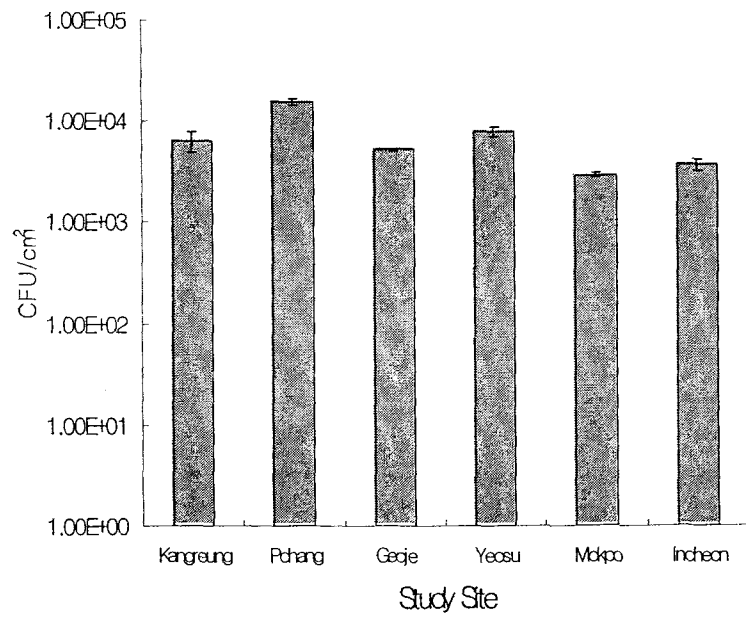


Fig. 3-21. Number of culturable bacteria on acrylic surface from each sampling site.

Table 3-10. Nearlist neighbour of the isolates from acrylic surfaces emerged in seawater for 3 days based on 16S rDNA partial sequence.

Phylogenetic Group	Genus	Kangreung	Pohang	Yeosu	Incheon	Sum
Low GC Gram Positive bacteria	<i>Bacillus</i> sp.	1 (97.3)	3 (99.8-100)			9
	<i>Virgibacillus</i> sp.		4 (99.8-100)			
	<i>Staphylococcus</i> sp.				1 (99.8)	
Actinobacteria	<i>Micrococcus</i> sp.		1 (99.8)			5
	<i>Brevibacterium</i> sp.		1 (99.2)		2 (98.3-98.5)	
	<i>Kocuria</i> sp.	1 (96.1)				
CFB group	<i>Cytophaga</i> sp.	2 (97.1-97.2)	1 (99.8)			9
	<i>Cellulophaga</i> sp.		2 (100)			
	<i>Gelidibacter</i> sp.		3 (94.6-96.1)			
	<i>Tenacibaculum</i> sp.				1 (96.9)	
α -Proteobacteria	<i>Agrobacterium</i> sp.				1 (94.6)	17
	<i>Erythrobacter</i> sp.			1 (99.2)	2 (99.4)	
	<i>Roseobacter</i> sp.	2 (96.1-96.8)		1 (97.6)		
	<i>Ruegeria</i> sp.			1 (98.5)		
	<i>Octadecanobacter</i> sp.				1 (98.5)	
	<i>Sphingomonas</i> sp.		1 (96.9)			
	<i>Staleyia</i> sp.	1 (98.1)				
<i>Sulfitobacter</i> sp.	6 (98.1-100)					
γ -Proteobacteria	<i>Alteromonas</i> sp.	2 (93.3-100)	1 (99.4)			15
	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	2 (99.6-100)	5 (100)			
	<i>Halomonas</i> sp.				1 (99.8)	
	<i>Photobacterium</i> sp.			2 (96.3-96.6)		
	<i>Psychrobacter</i> sp.	1 (99.2)				
	<i>Vibrio splendidus</i>	1 (99.4)				
Sum		19	22	5	9	55

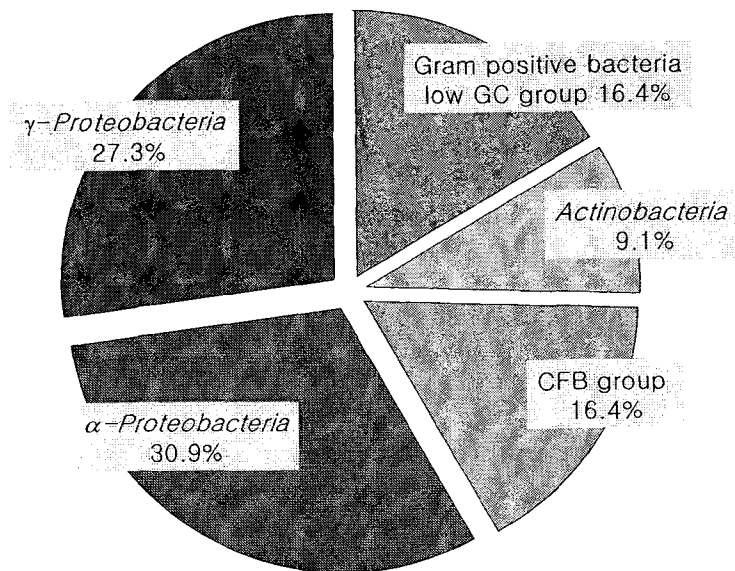


Fig. 3-22. Composition of bacteria isolated from acrylic surface emerged in seawater for 3 days.

Fig. 3-23 ~ 3-26에서는 분리된 균주들의 대표적인 종들을 group별로 묶어 phylogenetic tree를 그렸다. 각 균주의 특성을 소개하면 다음과 같다. 먼저 gram positive에 속하는 균주 중 총 11균주에 대해 분석하였다 (Fig. 3-23). 이 중 4종이 high GC gram positive group에 속하였는데 *Micrococcus*와 *Brevibacterium*, *Kocuria*속에 속하는 세균들로 확인되었다. *Micrococcus*에 속하는 세균으로는 포항에서 분리된 PH13369 균주가 대표적이데 이 균주는 *M. luteus*와 99.8%의 높은 유사도를 보였다. *Micrococcus*는 토양과 생물체의 피부에 널리 분포하는 세균으로 바람을 타고 넓은 지역으로 퍼지며 고염환경에 잘 견디는 것으로 알려져있다. 강릉에서 분리된 KR13669 균주는 *Kocuria rhizophilla*와 93.75%의 유사도를 보여 신종미생물일 가능성을 보였다. 인천에서 분리된 IC13540 균주와 포항에서 분리된 PH13369 균주는 *Brevibacterium* 속에 속하였는데 PH13369 균주의 경우 *B. epidermidis*와 99.4%의 유사도를 보인 반면 IC13540 균주는 다른 균주와 90% 미만의 유사성을 보였다. 이 균주 역시 신종으로서의 가능성이 높은 것으로 사료된다. *B. epidermidis*는 생물체의 피부에서 처음 발견되었으며 cyclic alcohol과 ketones 화합물을 분해하는 것으로 알려져있다.

Low GC gram positive bacteria는 주로 *Bacillus* 속에 속하는 균주들이었으며 *Staphylococcus*속 균주가 포함되었다. 목포에서 분리된 MP13606균주는 *S. warneri*와 100%의 유사도를 보였다. *Staphylococcus*의 경우에도 *Micrococcus*와 유사한 특성을 보이는 것으로 알려져있다. *Bacillus*속 및 *Virgibacillus*속으로 확인된 균주들 중 PH13399 (*B. fusiformis*), MP13610 (*B. subtilis*) 균주는 기존 균주와 높은 유사도를 보인 반면 PH13384 (*B. simplex*), PH13358 (*Virgibacillus picturae*), PH13375 (*B. oleronius*) 및 KR13655 균주는 *Bacillus*속 다른 균주들과는 상대적으로 낮은 유사도를 보여 신종의 가능성이 높았다.

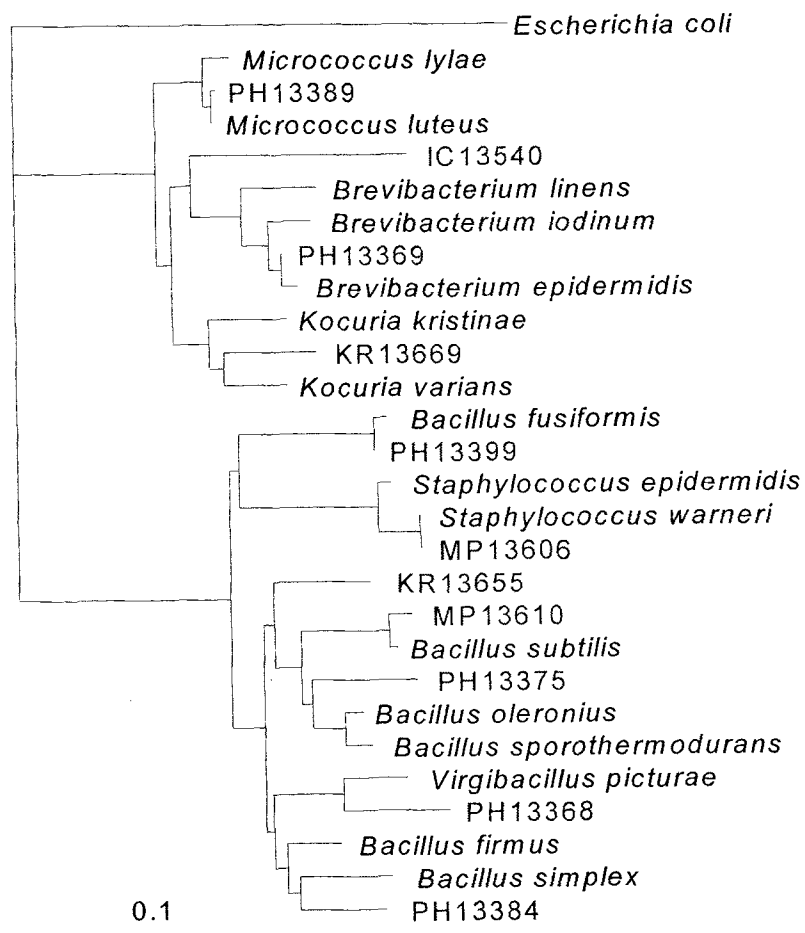


Fig. 3-23. Phylogenetic position of isolated bacteria from acrylic surfaces belonging to gram positive group based on partial sequence of 16S rDNA fragments.

CFB group에 속하는 세균은 *Cytophaga*와 *Tenacibaculum*, *Gelidibacter*속에 속하였다. 유사도가 높은 균주들을 제외한 7종을 대상으로 phylogenetic tree를 그렸다 (Fig. 3-24). 이 중 *C. lytica*와 100%의 유사도를 보인 PH13402 균주와 *G. mesophilus*와 91.94%의 유사도를 보인 KR13650 균주를 제외한 균주들은 다른 균주들과 90% 미만의 낮은 유사도를 보여 분리균주 중 CFB group에 속하는 세균들이 신종일 가능성이 높았다.

*α-proteobacteria*에 속한 세균들 중 유사도가 높은 균주들을 제외한 13균주를 대상으로 phylogenetic analysis를 실시하였다 (Fig. 3-25). 분리균주들은 *Sphingomonas*과와 *Rhodobacteria*과의 2과로 구분되었으며 *Sphingomonas*과에 속한 세 균주는 *S. adhaesiva* (PH13393)와 *Erythrobacter longus* (YS13437) 및 *E. citreus* (YS13604)와 높은 유사도를 보였다. *Rhodobacter*과에 속한 10 균주는 심해성 균주인 *Jannaschia helgolandensis* (KR13622)외에 *Paracoccus kocurii* (KR13671), *Octadecabacter arcticus* (KR13679, KR13621), *Sulfitobacter pontiacus* (KR13627), *Roseobacter litolaris* (KR13626), *Ruegeria gelatinovorans* (YS13442) 및 *Roseobacter gallaeciensis* (YS13439) 등과 비교적 높은 유사성을 보였다. 이 중 YS13439, KR13679, IC13537 등의 균주는 기존 균주와 유사성이 낮은 편에 속하였으며 PH13393, KR13621, KR13626, YS13442 등도 97%미만의 유사도를 보였다. *α-proteobacteria*에 속한 세균들은 대부분 해양환경, 특히 저온환경에서 널리 분포하는 종들이며 *Erythrobacter*속 세균과 같이 광합성세균도 포함되어 있었다.

*γ-proteobacteria*에 속한 균주 중 유사도가 높은 균주를 제외한 9균주를 대상으로 계통분류학적 위치를 확인한 결과 이들 균주는 *Alteromonas*과, *Vibrio*과, *Halomonas*과 및 *Moraxella*과에 속하는 것으로 확인되었다 (Fig. 3-26). *Alteromonas*과에 속한 세균들은 PH13381, PH13401, KR13639, KR13666 및 MP13599 균주였으며 이들은 *Pseudoalteromonas*속과 *Cowellia*속에 속하였다. *Pseudoalteromonas*속에 속한 균주들은 상대적으로 KR13639 균주의 유사도가 낮은 편 (94.02%)이었으나 포항에서 분리된 두 균주는 각각 *P. atlantica* 및 *P. carrageenovora*와 98% 이상의 높은 유사도를 보였다. 반면 *Cowellia*속 두 균주는 모두 낮은 유사도 (94.4, 95.23%)를 보여 신종으로서의 가능성이 높았다. *Vibrio*과의 균주들은 *V. splendidus* (PH13396) 및 *Photobacterium leiognati* (YS13444)와 상대적으로 높은 유사도를 보였다. *Halomonas*과에 속한 IC13659는 *H. venusta*와 높은 유사도를 보였으며 *Moraxella*과의 두 균주 (KR13654, MP13605)는 *Psychrobacter*속에 속하였으나 상대적으로 유사도가 높은 편인 *P. glacicola* 및 *P. frigidicola*와도 95% 미만의 낮은 유사도를 보여 신종으로서의 가능성이 높은 것으로 나타났다.

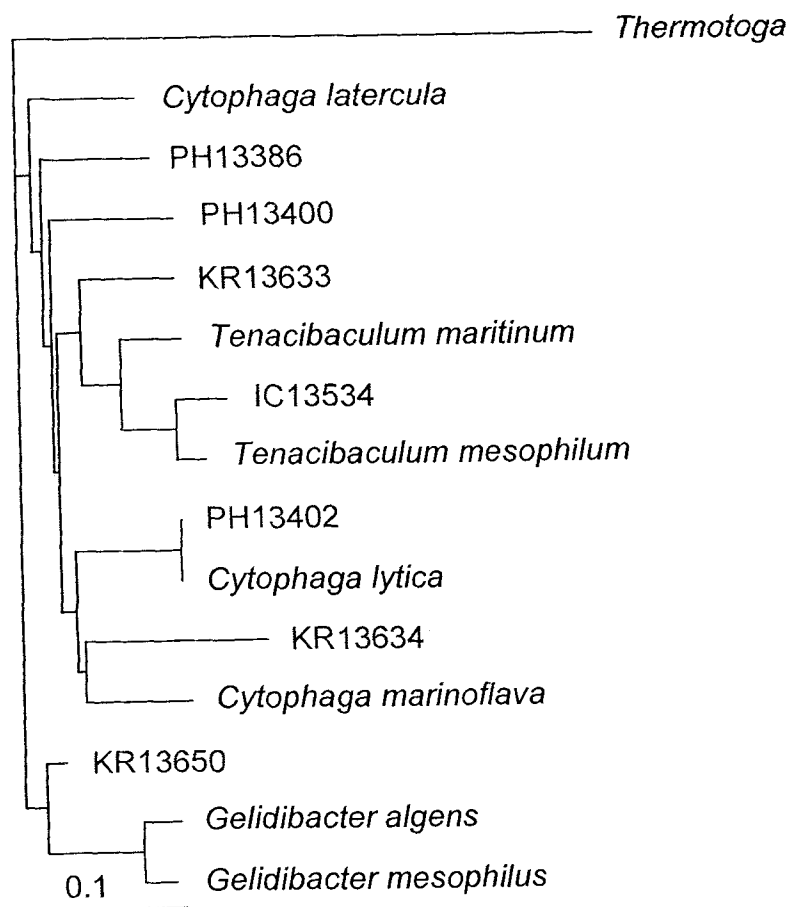


Fig. 3-24. Phylogenetic position of isolated bacteria from acrylic surfaces belonging to CFB group based on partial sequence of 16S rDNA fragments.

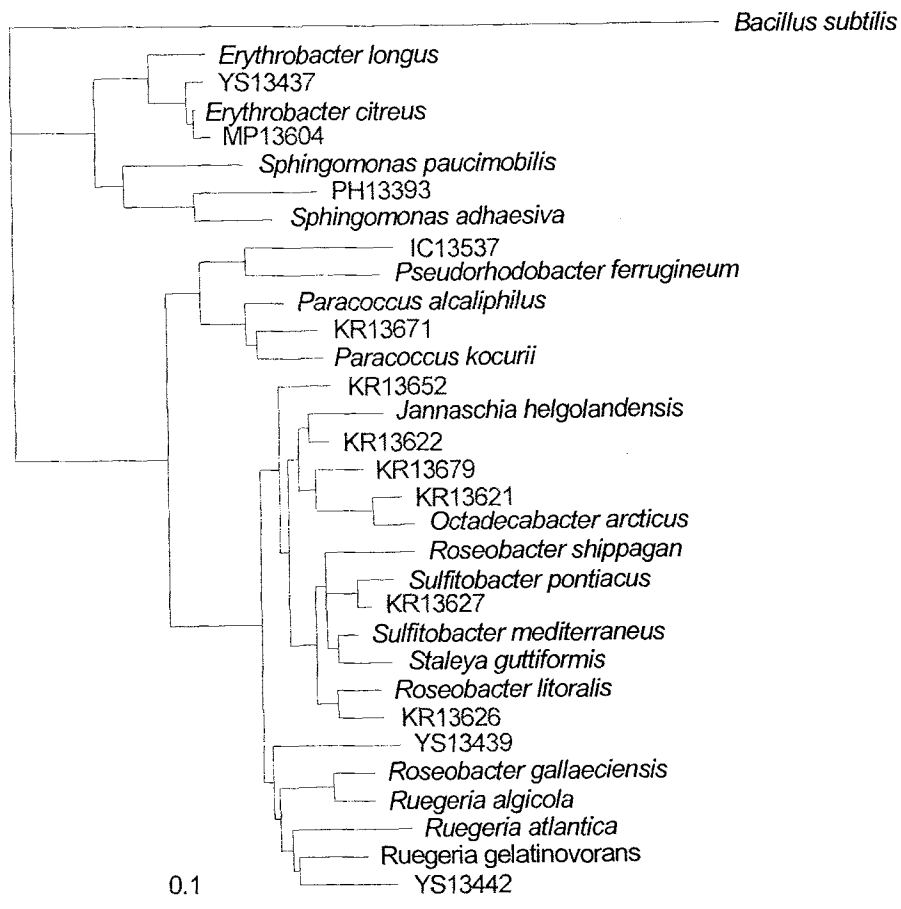


Fig. 3-25. Phylogenetic position of isolated bacteria from acrylic surfaces belonging to α -proteobacteria based on partial sequence of 16S rDNA fragments.

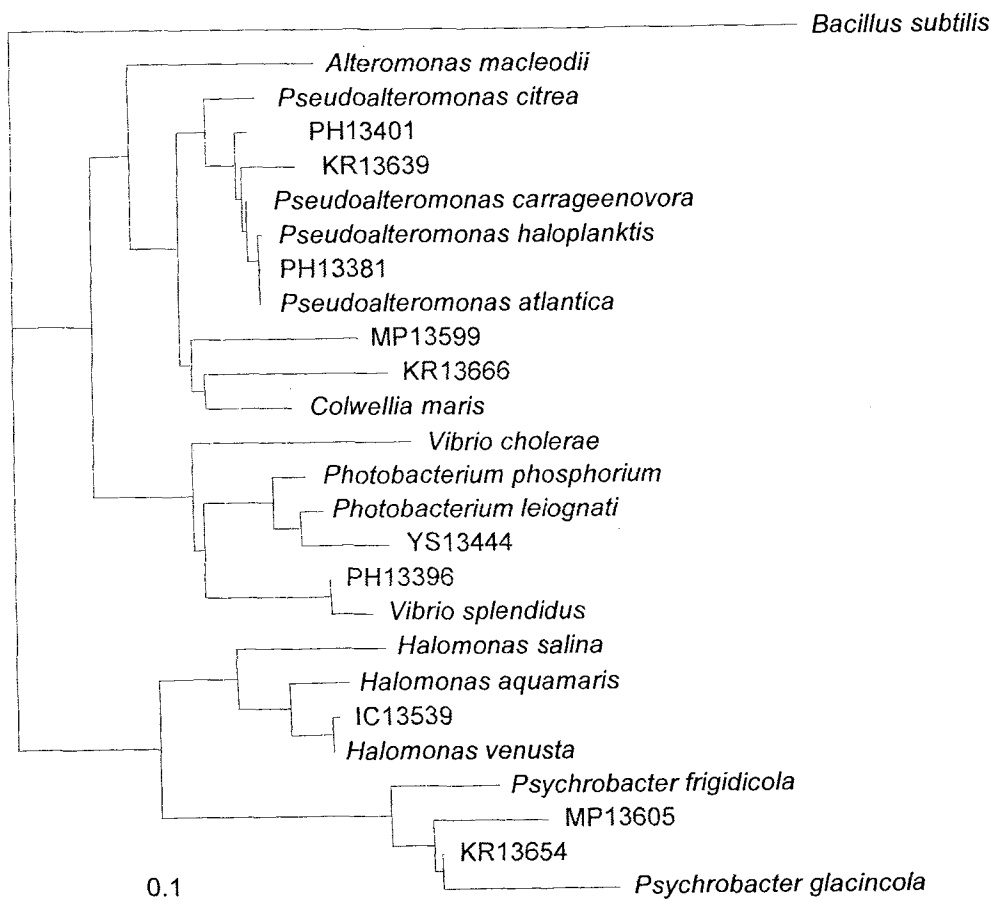


Fig. 3-26. Phylogenetic position of isolated bacteria from acrylic surfaces belonging to γ -proteobacteria based on partial sequence of 16S rDNA fragments.

나. 자연생물막에 존재하는 미생물 다양성

본 연구에서 분리한 해양미생물은 다음 그룹에 속하였다 (Table 3-11).

α -Proteobacteria

이 그룹에 속하는 다수의 균주가 해양 환경에서 분리된 해양미생물이었다. 균주 13109와 13216는 심해 열수구에서 분리된 *Citromicrobium bathyomarinum*와 99% 이상의 상동성을 보였으며, 13268 외 7균주는 지중해에서 분리된 *Erythrobacter citreus*와 97.49% ~ 99.76%의 상동성을 보였다. 13292 외 4 균주는 해양 미생물인 *Ruegeria atlantica* 97.97% ~ 100%의 상동성을 보였다. 13239는 흑해에서 분리된 *Sulfitobacter pontiacus*와 97.11%의 상동성을 보였다.

본 연구에서 분리한 균주 중에는 상업적 응용 가능성이 있는 균주도 있었다. 13733는 토양박테리아인 *Paracoccus carotinifaciens* 100% 상동성을 보였다. 이 균주는 astaxanthin을 합성하는 것으로 알려졌는데 (Tsubokura *et al.*, 1999), 우리가 분리한 13733도 오렌지 색 콜로니를 형성하여 astaxanthin을 합성할 것으로 기대되었다.

Table 3-11. Classification of isolated bacteria from 6 nearshore area of Korean Peninsula based on 16S rDNA partial sequence

Phylogenetic group	Genus	Kangreung	Pohang	Yeosu	Mokpo	Pyunsan	Incheon	Sum
Low GC Gram positive bacteria	<i>Bacillus</i>			2	1	5		14
	<i>Microbacterium</i>	2						
	<i>Staphylococcus</i>	1			2	1		
Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>				3			21
	<i>Brevibacterium</i>	6			4		5	
	<i>Nocardia</i>	1			1			
	<i>Tsakamurella</i>					1		
CFB group	<i>Cellulophaga</i>	2						16
	<i>Cytophaga</i>	4			1			
	<i>Flexibacter</i>			1				
	<i>Psychroserpens</i>						1	
	<i>Tenacibaculum</i>				6			
	<i>Zobellia</i>	1						
α -Proteobacteria	<i>Agrobacterium</i>		1					68
	<i>Azospirillum</i>		1					
	<i>Erythrobacter</i>	1	1	3		9	3	
	<i>Hyphomonas</i>					1		
	<i>Ochrobactrum</i>	1				1		
	<i>Octadecanobacter</i>					1		
	<i>Paracoccus</i>					1	1	
	<i>Mesorhizobium</i>	1						
	<i>Rhizobium</i>					1		
	<i>Roseobacter</i>	4			2	8	1	
	<i>Ruegeria</i>				1	2		
	<i>Sphingomonas</i>	1				3		
	<i>Stapia</i>				1	1		
<i>Sulfotobacter</i>	1				6	4		
Unidentified			2			3		
γ -Proteobacteria	<i>Alcanivorax</i>		1	1				45
	<i>Alteromonas</i>						1	
	<i>Glaciecola</i>	1				1		
	<i>Halomonas</i>			1			3	
	<i>Pseudoalteromonas</i>	4		2	4	5	3	
	<i>Pseudomonas</i>					1		
	<i>Shewanella</i>	1				2	1	
	<i>Stenotrophomonas</i>						2	
	<i>Vibrio</i>		3	1	4	1	1	
Unidentified				1				
Sum		16	9	32	31	51	25	164

또한 새로운 미생물도 다수 확보되었다. 13236 외 4 균주는 *Roseobacter gallaeciensis* 와 95.5% ~ 96.45%, 13266는 *R. litoralis*와 94.72%의 상동성을 보여 신종으로 추정되었다. 이밖에 13293가 *R. atlantica*와 96.31%, 13139가 *Sphingopyxis terrae*와 94.15%의 상동성을 보여 신종으로 추정되었다.

γ-Proteobacteria

이 그룹에 속하는 다수의 균주가 해양 환경에서 분리된 해양미생물이었다. 13300는 심해 열수구에서 분리되었으며 다당류를 방출하는 것으로 알려진 *Alteromonas alvinellae*와 98.41% 상동성을 보였다. 13302 외 2균주는 적조 발생 해수에서 분리된 *Pseudoalteromonas piscicida* 와 100% 상동성을 보였다 (Venkateswaran *et al.*, 2003). 13687와 13684는 해조류를 분해하는 해양미생물 *P. agarovorans*와 100% 상동성을 보였다 (Romanenko *et al.*, 2003). 13264는 해양 미생물인 *P. haloplanktis*와 100% 상동성을 보였다. 13723와 13719는 발틱해에서 분리된 *Shewanella baltica*와 100% 상동성을 보였다 (Ziemke *et al.*, 1998). 13218는 알긴산을 분해하는 해양미생물인 *Vibrio alginolyticus*와 100% 상동성을 보였다. 13281는 해양미생물인 *V. campbellii*와 98.69%의 상동성을 보였으며, 13310는 *V. harveyi*와 98.94%의 상동성을 보였다. 13705와 13706는 수중환경에서 분리된 *V. parahaemolyticus*와 100% 상동성을 보였다 (West *et al.*, 1986). 137021와 13732는 조개의 유생에서 분리된 *V. pomeroyi* 와 99.71%의 상동성을 보였다 (Thompson *et al.*, 2003). 한편, 13294는 조개에 질병을 일으키는 병원균 *V. tubiashii* 와 98.92%의 상동성을 보였다

이 그룹에서도 새로운 미생물이 다수 확보되었다. 13234는 *Pseudoalteromonas porphyrae*, *P. citrea*, *P. gracilis*, and *P. haloplanktis* 와 각각 94.0%, 93.27%, 92.27%, 92.2%의 상동성을 보여 신종으로 추정되었다. 13295도 *V. nereis*와 96.77%, 13238는 산호의 백화현상을 유발하는 *V. shiloi*와 94.08%의 상동성을 보여 신종으로 추정되었다.

CFB group bacteria

이 그룹은 해양미생물이 많은 것으로 알려져 왔다. 균주 13731는 수족관 배출수에서 분리된 *Cytophaga latercula*와 97.97%의 상동성을 보였다 (Nakagawa and Yamasato, 1993). 13685 외 5균주는 해면에서 분리된 *Tenacibaculum mesophilum*와 99.71%의 상동성을 보였다 (Suzuki *et al.*, 2001).

이 그룹에서도 새로운 미생물이 확보되었는데, 13223와 13117는 *Muricauda aquimarina*, *M. flavescens*, 및 *M. ruestringensis* 와 각각 92.22% ~ 96.66%의 상동성을 보여 신종으로 추정되었다. 13295도 *V. nereis*와 96.77%, 13238는 산호의 백화현상을 유발하는 *V. shiloi*와 94.08%의 상동성을 보여 신종으로 추정되었다. 13237와 13261는 *Cytophaga*속 균주들과 76.85% ~ 86.73%의 낮은 상동성을 보여 신속으로 추정되었다.

High GC, Gram positive bacteria

이 그룹은 토양 방선균이 포함된 그룹이다. 균주 13710와 13720는 기름으로 오염된 걸프만에서 분리되었고 탄화수소 분해능력이 있는 것으로 알려진 *Arthrobacter nicotianae*와 97.40%의 상동성을 보였다 (Radwan *et al.*, 2001). 13729와 13730는 치즈에서 분리된 *Brevibacterium casei*와 100%의 상동성을 보였다 (Brennan *et al.*, 2002). 13686와 13689는 cyclic alcohols과 ketones을 분리하는 것으로 알려진 *Brevibacterium epidermidis*와 99.13%의 상동성을 보였다 (Brzostowicz *et al.*, 2002). 13157은 사람에서 분리한 *Corynebacterium propinquum*와 99.32%의 상동성을 보였다. 13111와 13219는 토양 박테리아인 *Microbacterium luteolum*와 99% 이상의 상동성을 보였다. 13106는 중세 벽화와 공기중에서 분리한 *Micrococcus luteus*와 99.55%의 상동성을 보였다. 13269가 부들의 뿌리표면에서 분리한 *Kocuria rhizophila*와 96.21%의 상동성을 보이고, 13196가 *Microbacterium luteolum*와 94.93%의 상동성을 보여 신종으로 추정되었다.

Low GC, Gram positive bacteria

이 그룹에 속하는 대부분의 *Bacillus* 균주는 신종으로 추정되었다. 13280는 *Bacillus pumilus*와 88.5%의 상동성을, 13278는 *B. firmus*와 93.29%의 상동성을 보였다. 13279는 *B. benzoovorans*와 94.59%의 상동성을, 13215은 *B. marisflavi*와 94.36%의 상동성을 보였다. 13128은 우리나라 서해에서 분리된 *B. aquimaris*와 98.09%의 상동성을 보였다. 13214는 우리나라 백령도와 화진포에서 분리된 *B. baekryungensis* 및 *B. hwajinpoensis*와 96.85%의 상동성을 보였다. 균주 113148는 이란의 염전에서 분리된 *Halobacillus karajensis*와 97.58%의 상동성을 보였다. 13168는 *Staphylococcus aureus*와 100% 상동성을 보였다. 13274는 요로감염을 일으키는 *S. epidermidis*와 98.69%의 상동성을 보였다. 13306는 동물에서 분리된 *S. equorum*와 100% 상동성을 보였다. 13717은 항생제 저항성 병원균인 *St. haemolyticus*와 99%의 상동성을 보였다 (Tabe *et al.*, 2001).

제 5 절 해양생물막 형성 미생물의 이용

전국연안 해양생물막에서 분리된 2,000여 균주의 미생물을 대상으로 세포표면의 소수성 및 세포외다당류 생성능을 조사한 결과 소수성이 우수한 균주 및 세포외다당류 생성능이 우수한 균주를 1차로 선별하였다. 이 균주는 2단계에는 정밀 응용검사를 거쳐 차후 산업용 소재 개발에 활용할 예정이다.

1. 이론적, 실험적 접근방법

가. 세포 표면 소수성

BATH (Bacterial Adherence To Hydrocarbon)법을 이용하여 세포 표면 소수성을 측정하였다 (Rosenberg *et al.*, 1980). 단일 종으로 분리된 균주들을 ZoBell 2216e 액체 배지 (25 ml)에 동일한 O.D. (0.02)로 접종한 뒤 25°C 교반 배양기에서 3일간 배양하였다. 3일간 배양된 균체의 배양액은 원심분리 (4,000×g, 10분)시켜 제거하고 균체만을 회수하여 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)로 1회 세척하였다. 여기에 phosphate buffer 3 ml과 triton X-100 1 ml을 첨가하여 1분 동안 강하게 교반하여 균체와 용액을 균일하게 섞이도록 하였다. 이 용액을 원심분리 (4,000×g, 10분)시켜 triton X-100을 제거하였으며 다시 3 ml의 phosphate buffer만을 첨가하여 강하게 교반한 뒤 원심분리 (4,000×g, 10분)시켜 buffer를 제거하였다. 세척 과정은 3회 이상 반복 수행하였다. Triton X-100을 완전히 제거시킨 후 다시 phosphate buffer를 첨가하여 최종 부피를 3 ml로 조절한 뒤 680 nm에서 O.D. (초기)값을 측정하였다. N-hexadecane (Sigma, USA) 200 µl를 첨가하여 1분간 강하게 교반하였다. 20분 동안 시료를 정치시키고 난 후에 다시 680nm에서 O.D. (후기)값을 측정하였다. 초기 O.D.값과 후기 O.D.값을 비교하여 소수성을 계산하였다.

$$\text{Hydrophobicity(\%)} = [1 - (\text{final O.D.} / \text{initial O.D.})] \times 100$$

나. 부착능 (Attachment ability)

부착능 실험은 96well microplate에 분리 균주들을 배양한 후 부착 균주를 crystal violet으로 염색하여 측정하였다 (Fig. 3-24, Loo *et al.*, 2000). 분리 균주를 ZoBell

2216e 액체배지에 동일한 O.D.로 각 well에 100 μ l씩 접종하였다. 25°C에서 3일간 배양한 후 650 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Fig. 3-27). 그리고 각 well을 멸균된 3차 증류수를 이용하여 조심스럽게 배양액을 제거하였다. 65°C oven에서 10분간 건조시킨 다음 0.1% crystal violet 200 μ l를 첨가하여 40분 동안 염색하였다. 과량의 염색시약을 3차 증류수로 3회 이상 세척한 후 각 well에 100% ethanol 200 μ l를 첨가하여 부착세균에 염색된 crystal violet을 추출하였다. Microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정한 후 cell growth와 비교하여 부착능을 계산하였다.

$$\text{Attachment ability} = (650 \text{ nm 흡광도} / 540 \text{ nm 흡광도})$$

다. RFLP typing

선발 균주들의 RFLP typing을 위한 핵산추출과 PCR은 제 3절 나항의 방법과 동일하게 수행하였다. PCR을 통하여 얻어진 16S rDNA와 PCR 반응액 (0.1% BSA 1 μ l, D.W 3 μ l)에 4 염기를 인식하여 절단하는 제한 효소 (*Hae*III; restriction site; GG-CC) 0.2 unit을 넣고 10×buffer C (Promega, USA) 1 μ l를 넣어 준 후 총 반응 부피를 10 μ l로 하여 37°C에서 12시간동안 반응시켰다. 2% agarose gel에 PCR 산물 5~10 μ l를 접종하여 2시간 동안 전기영동 (50 mV)시켰으며 size maker로 DNA Molecular Weight Marker XIII (Roche, USA)를 사용하였다. Gel은 EtBr에 1시간 동안 염색시킨 후 증류수에 같은 시간동안 탈색시켜 UV Illuminator (Vilber Lourmat, Cedex, France)로 DNA band를 확인하였으며 RFLP type을 구분하였다.

라. EPS 생산력

선발 균주들의 EPS 생산력은 ZoBell 2216e 액체 배지에 배양한 후 생산되는 EPS의 양으로 측정하였다. 40 ml의 ZoBell 2216e 액체 배지가 든 삼각 플라스크 (250 ml)에 선발 균주의 균체량이 O.D. 0.01씩 되도록 접종하고 4일 동안 25°C shaking incubator (121 rpm)에서 배양하였다. 배양이 끝난 시료들은 원심분리 (6,000 ×g, 20분)시켜 균체와 배양액을 분리하였다. 회수된 균체를 멸균된 sodium phosphate buffer (pH 7.2)를 이용하여 3회 이상 세척하였다. 균체가 제거된 배양액과 세척액을 혼합한 후 투석막 (D0655, Sigma, USA)을 이용하여 흐르는 증류수에 2일간 투석하여 배양액에 존재하는 염을 제거하였다. 최종 농도 0.3%가 되도록 CPC (cetylpyridinium chloride)를 첨가한 다

음 30분간 천천히 교반시킨 다음 다시 원심 분리시켜 침전물을 회수하였다 (Staneck and Robert, 1974). 침전물에 0.4 M NaCl을 첨가하여 다시 녹인 후 흐르는 증류수에 투석하여 0.4 M NaCl을 제거하였다. 회수된 시료에 2배 볼륨의 100% ethanol을 첨가하여 4°C에서 24시간 냉침시켰다. 침전물을 다시 원심분리 (5,000×g, 20분)시켜 회수한 다음 65°C oven에서 24시간 동안 수분을 제거시킨 후 건조중량을 측정하였다.

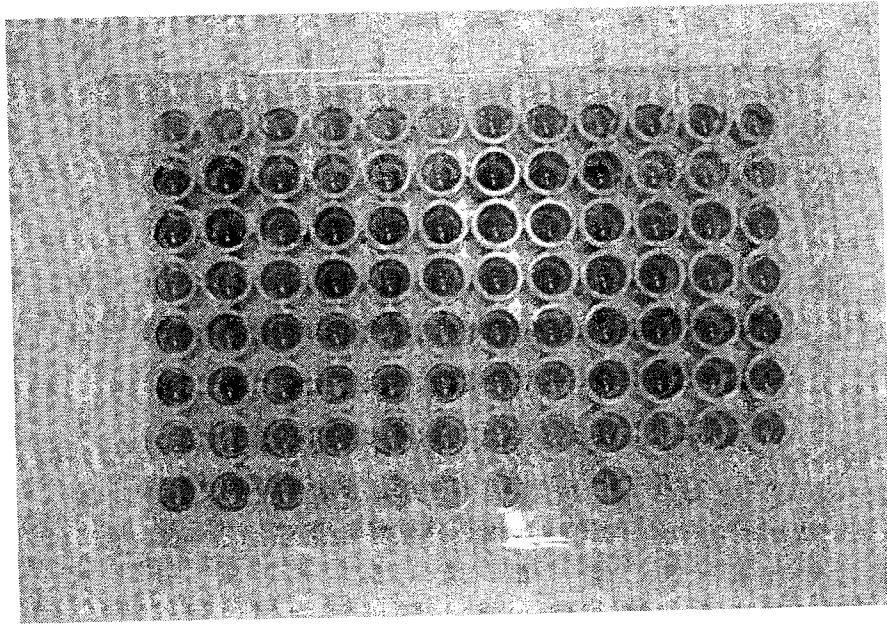


Fig. 3-27. Attachment properties measured with crystal violets on 96well microplate

2. 연구 결과

가. 분리 미생물의 세포표면 소수성

10월과 12월에 분리한 66 균주를 대상으로 세포표면 소수성을 측정한 결과 50% 이상의 소수성을 보이는 12종을 선발하였다. 12 균주 중 가장 높은 소수성을 보인 균주는 13106 (87.5%)이었으며 80% 이상의 소수성을 보인 균주는 13106을 포함한 5종, 70% 이상 3 균주, 60%이상의 소수성을 보인 균주가 1 균주였으며 3 균주가 50% 이상의 소수성을 보였다 (Table 3-12). 다른 54 균주는 30% 미만의 소수성을 나타내었다. 10월에 분리한 34 균주들을 대상으로 재실험을 실시하였다 (Fig. 3-28). 1차 결과와 같이 13106은 가장 높은 소수성을 보이는 것으로 나타났으며 13127, 13139, 13148, 13154와 13156은 34 균주들 중에서도 오차범위를 감안하였을 때 평균 50%에 가까운 소수성을 보이는 것으로 조사되었다. 13106 균주를 대상으로 배양시간에 따른 세포표면 소수성의 차이를 확인했을 때 소수도가 배양 기간과 생리적 상태에 따라 달라지는 것을 확인하였다. 세포 표면의 특성이 부착 여부와 관련 있다는 기존의 연구보고 (Zita and Henmanson, 1997)를 감안할 때 세포 표면의 소수성 측정은 세포의 배양 시간을 감안하여 측정하여야 할 것으로 사료된다.

Table 3-12. Cell surface hydrophobic properties of isolated microorganisms after 5 days of incubation.

Number	Hydrophobicity (%)	Number	Hydrophobicity (%)
13106	85.3	13139	5.9
13107	-	13140	1.3
13108	16.1	13141	1.2
13109	-	13142	2.6
13110	-	13143	18.7
13111	3.9	13144	84.5
13112	3.3	13145	28.6
13113	7.1	13146	76.5
13114	-	13147	52.4
13115	30.2	13148	0.6
13116	0.4	13149	0.9
13117	-	13150	74.0
13118	-	13151	2.6
13119	-	13152	-
13120	13.0	13153	2.7
13121	-	13154	-
13122	30.2	13155	35.1
13123	2.7	13156	-
13124	18.6	13157	54.7
13125	18.5	13158	83.3
13126	66.3	13159	8.5
13127	-	13160	4.1
13128	34.4	13161	45.0
13129	12.0	13162	7.9
13130	32.4	13163	13.0
13131	26.4	13164	8.4
13132	-	13165	36.0
13133	28.4	13166	-
13134	27.2	13167	84.9
13135	56.3	13168	18.6
13136	5.0	13169	39.1
13137	87.5	13170	28.8
13138	77.0	13171	31.0

- : not determined

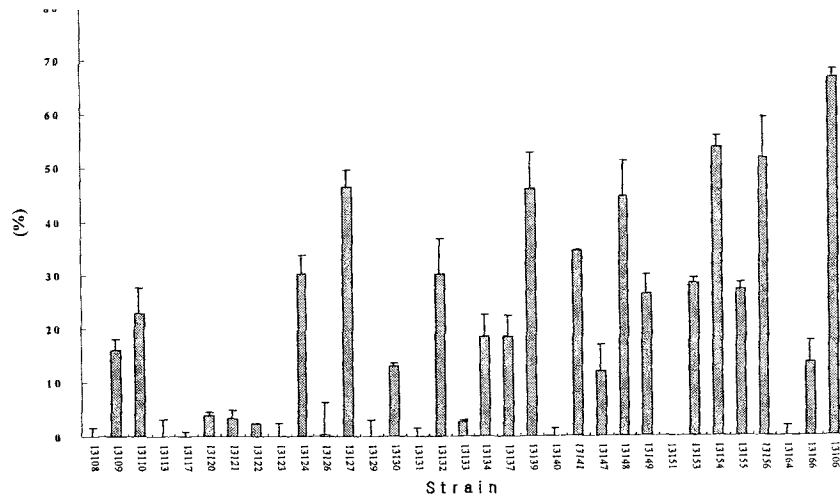


Fig. 3-28. Cell surface hydrophobicity of isolated strains after 3 days of incubation.

나. 부착성 (Attachment ability)

Microplate를 이용하여 분리 균주 26종을 대상으로 부착성을 조사한 결과 0.32~18.92 (평균 7.13)로 나타났다 (Table 3-13). 분리 균주 중 13156이 18.92로 microplate에 대한 부착성이 가장 우수한 것으로 나타났다. 소수성이 우수한 13106은 13156보다 낮은 15.16의 부착성을 보였으나 대상 균주들과 비교하여 볼 때 높은 부착성을 가지는 것으로 조사되었으며 13117, 13120, 13124, 13133, 13141, 13154와 13165도 각각 11.56, 12.46, 12.49, 13.42, 10.09, 11.46, 12.39와 11.19의 값으로 대상 균주들의 평균 부착성보다 높은 부착성을 가지는 것으로 나타났다. 세포표면의 소수성이 높은 13106, 13154와 13156은 부착성 조사에서도 높은 부착성을 나타내었으나 이 3 균주를 제외한 소수성이 우수한 균주 13127, 13139와 13148들은 실험 결과 낮은 부착성을 보였다. 소수성과 부착성이 높은 미생물들이 반드시 생물막 형성에 중요한 역할을 한다고 단정지을 수는 없지만 분리한 균주들은 13106, 13154와 13156은 막 내 미생물의 개체수가 증가하는 3~4일 사이에 생물막에서 분리된 균주임으로 미루어 보아 본격적인 생물막 형성에 직·간접적인 영향을 주었던 균주들로 사료된다.

Table 3-13. Attachment properties of isolated bacteria measured on 96well microplate.

Strain	Attachment (final/initial)	Strain	Attachment (final/initial)
13106	15.16	13137	7.89
13108	3.49	13140	3.86
13109	1.19	13141	11.46
13113	1.02	13147	0.86
13117	11.56	13149	3.66
13120	12.46	13153	2.79
13122	6.02	13154	12.38
13124	12.49	13155	6.26
13126	9.09	13156	18.92
13127	0.99	13161	2.82
13128	0.32	13164	9.76
13132	6.20	13165	11.19
13133	10.09		
13135	3.56		

다. RFLP type 및 균주 선발

생물막 초기에 분리한 균주들의 유전적 차이를 확인하기 위하여 RFLP typing을 수행하였다. 4염기를 인지하는 제한 효소 (*HeaIII*)를 이용하여 선발 균주들의 16S rDNA 염기서열을 잘라 gel상에서 확인하여 본 결과 17가지의 서로 다른 RFLP type을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3-29). 혼합배양과정을 통해 기질 표면 부착에 중요하게 작용하는 요소를 확인하기 위하여 부착과 관련하여 중요한 역할을 하는 요소들로 알려진 세포표면의 소수성과 부착성이 우수한 균주 중 RFLP type에 따라 소수성과 부착성이 우수한 13106 (소수성 66.5%; 부착성 15.16), 소수성이 뛰어난 13154 (소수성 53.7%; 부착성 12.39), 부착성이 우수한 13156 (소수성, 51.6%; 부착성, 18.92)과 일반적인 특성을 보이는 13132 (소수성 30.2%; 부착성 6.02)을 선발하였다.

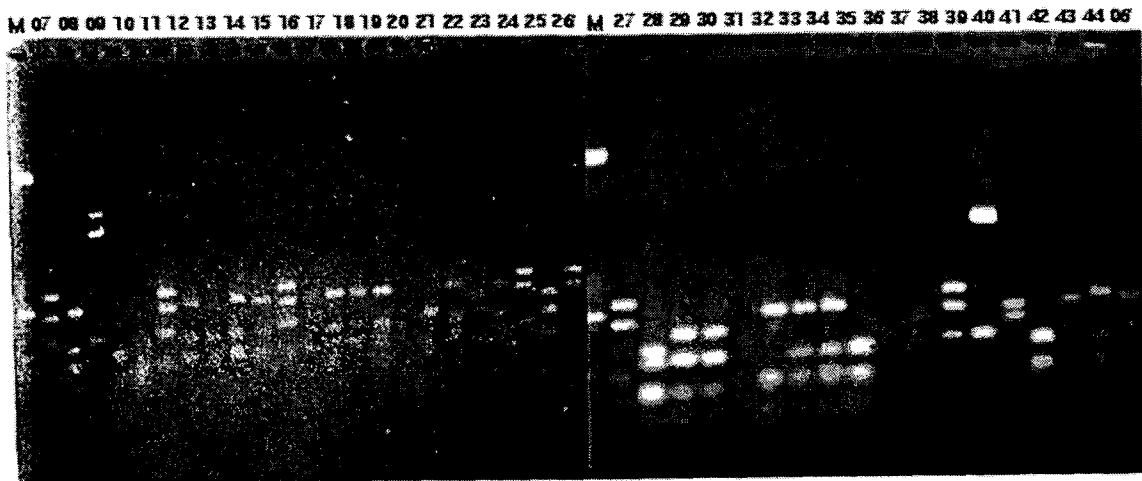


Fig. 3-29. RFLP pattern analysis of strains isolated at early phase of biofilm formation after digested with *Hae*III.

라. 선발 균주의 총 EPS 생산량

각 선발 균주의 생물막 생성과 기질 표면 부착과 관련하여 중요한 세포외부기질 중 하나인 세포외 다당류 (Extracellular Polysaccharide; EPS) 생산량을 조사하였다. 최적 성장조건에서 각각의 균주를 O.D. 0.2로 맞추어 ZoBell 2216e 배지에 접종한 후 4일간 배양하였다. 원심분리와 투석 과정을 거쳐 정제된 균주별 총 EPS 생산량은 13106이 2.18 mg/ml로 가장 높았다 (Fig. 3-30). 13156은 1.28 mg/ml의 EPS 생산력을 보였으며 13154는 0.99 mg/ml의 EPS를 생산하였다. 13132는 0.41 mg/ml로 가장 낮은 EPS 생산량을 보였다.

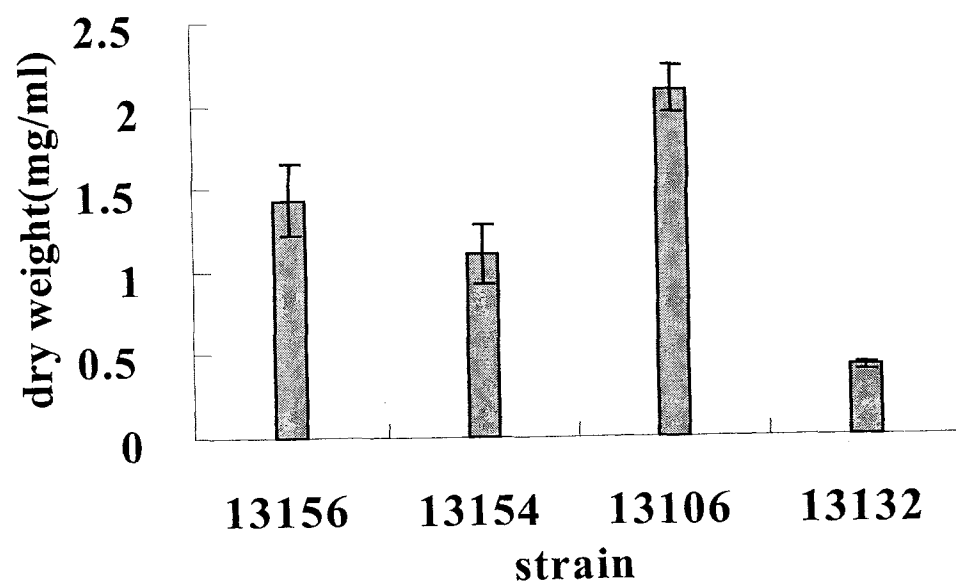


Fig. 3-30. Production of total EPS by the selected strains cultivated on ZoBell 2216e medium.

제 6 절 해양생물막 표준균주 후보 도출 및 생물막 생성 조 절요인 연구

생물체의 표면을 포함하는 해양환경에서 생물막은 부착생물의 유생 착생에 있어 결정적인 역할을 하는 것으로 확인되고 있다. 그러나 한편으로는 생물오손이나 생물부식 등의 현상을 유발함으로써 선박 운항비용의 증가, 냉각관의 부식이나 결석 등으로 인해 공장가동을 일시적으로 중단해야 하는 등 막대한 경제적 손실을 끼치는 원인으로 작용하기도 한다. 또한 이와 같은 경제적 손실을 방지하기 위하여 사용되는 방오도료의 성분이 해양생물의 내분비계 장애물질로 작용함으로써 생태계 파괴와 수산물 생산량을 감소시키는 등 환경적으로도 심각한 영향을 미친다. 따라서 적어도 인공구조물의 경우 표면에 생물막이 생성되지 않도록 혹은 생물막 생성속도를 늦출 수 있도록 적절히 조절되어야 한다. 생물막 생성을 억제하기 위해서는 구조물의 재질을 특수하게 하는 방법도 가능하지만 현재 사용되는 방오도료의 성분에 비해 현저하게 낮은 독성을 지니는 방오물질을 개발하여 이용하는 방법 또한 가능하다. 방오물질의 개발과 관련하여 장기간에 걸쳐 직접 현장실험을 수행함으로써 그 효능을 평가할 수도 있지만 그에 앞서 실험실에서 소규모로 방오효능을 평가하기 위한 시스템을 갖추는 것이 훨씬 효율적이다. 이와 같은 시스템을 구축하기 위해서는 지역과 시기에 구애받지 않는 생물막 표준균주의 확보와 이들 표준균주를 이용하여 정형화된 생물막을 생성시키는 기술의 확보가 필요하다. 이 절에서는 생물막 표준균주 확보를 위한 연구와 생물막 생성과정의 조절 및 방법의 표준화와 관련된 연구 내용 및 결과를 기술한다.

1. 이론적 실험적 접근방법

가. 생물막 생성 초기균주 중 생물막 표준균주 선발

초기 생물막으로부터 분리된 균주들 (제 4절의 가. 생물막 형성 초기과정에서 분리된 미생물 다양성 항에 기술된 전국 연안 각 지역에서 분리된 미생물들)을 대상으로 하여 균주의 세포표면 소수성과 부착능, quorum sensing signal molecules의 생산 여부를 기준으로 하여 생물막 생성능이 우수한 균주를 선발하고자 하였다. 균주의 세포표면 소수성과 부착능은 제 5절의 이론적 실험적 접근방법에 기술된 방법과 동일한 과정을 거쳐 측정하였다. Quorum sensing signal 물질 생산 여부는 AHL (Acyl Homoserine Lactone)이

공급될 경우 β -galactosidase 효소가 발현되도록 유전자 조작된 reporter strain *Agrobacterium tumefaciens* NTL4(pCF218)(pCF372) 균주가 분리세균과 함께 배양할 경우 β -galactosidase 효소활성을 나타내는지의 여부로부터 확인하였다. Reporter strain의 β -galactosidase 발현 여부는 배양 24시간 후 효소의 기질로 X-gal이 도포된 ZoBell 2216e 배지에서 1 cm 간격으로 분리균주와 함께 streak 하여 배양 할 때에 X-gal의 분해 결과로 colony가 청색을 띠는 것으로 확인하였다. 각 특성이 높게 나타난 균주 중 16S rDNA 유전자분석 결과 지역적으로 광범위하게 분포하는 균주들을 우선적으로 선별하였다.

나. 생물막 형성 과정 중 균주의 상호 영향에 관한 연구

제 5절에 기술한 해양생물막 형성 미생물의 이용성을 조사하였던 장목 분리균주들 중에서 세포표면 소수성과 부착능을 기준으로 우수성 여부에 따라 4 균주를 선발하였다. 선발된 4 균주들을 16S rDNA sequence에 근거하여 동정하는 한편 최적 성장 조건과 기질 이용다양성을 조사하였으며 혼합 배양시 시간에 따른 생체량과 군집 구조 변화를 분석하였다. 실험의 개략적인 과정은 그림 3-31과 같다.

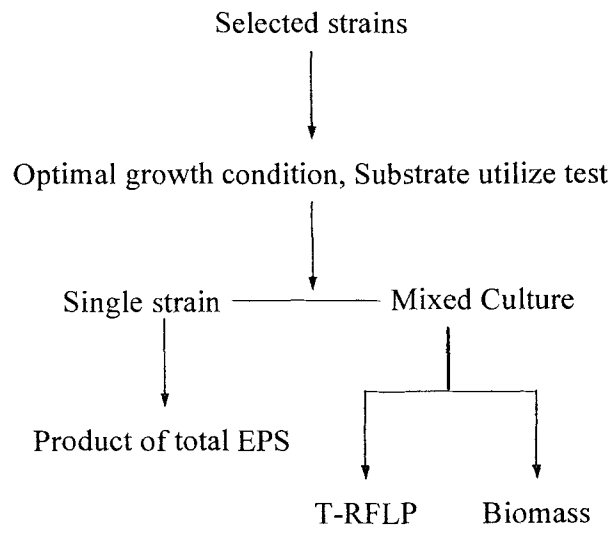


Fig. 3-31. Procedures for analysis of interaction among selected strains

(1) 균주 동정

선발된 균주는 DNA extraction kit (BioNeer)를 사용하여 genomic DNA를 추출한 후 primer 27F와 518R을 사용하여 바항의 방법과 동일한 조건으로 PCR 과정을 수행하였다. 결정된 16S rDNA 염기서열을 Clustal-X로 align 시킨 다음 GeneBank data base와 RDP Database의 자료와 비교하여 분류학적 위치를 결정하였다. 상동성이 높은 균주들의 16S rDNA 염기서열을 내려받아 PHYDIT (developed by Dr. J. S Chun, version 3.2)에서 pairwise align시킨 후 Juke and Cantor distance methods와 Neighbor-joining algorithm을 이용하여 계통도를 그렸다.

(2) 선발 균주의 최적 성장 조건

ZoBell 2216e broth에서 pH, 염도 및 온도조건에 따른 성장도를 측정하여 선발 균주의 최적 성장 조건을 확립하였다. pH조건은 4, 5, 6, 7, 8, 9에서, 염도는 0, 0.5, 1, 2, 3, 5, 7%에서 성장도를 측정하였으며 10, 20, 25, 30, 35, 40°C에서의 배양결과로부터 최적온도를 확립하였다. 온도조건 측정시에는 배양 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96시간째에 배양액을 회수하여 spectrophotometer로 680nm에서 흡광도를 측정하였으며 염도와 pH는 microplate reader로 650 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 흡광도 값은 path length 1cm에 해당하는 값으로 전환하여 표시하였다.

(3) 기질 이용 다양성

선발 균주의 단일 탄소원 이용성은 Biolog사의 GN Microlog plate를 이용하여 95가지의 기질에 대하여 조사하였다. 선발 균주를 해수가 포함된 TSA (trypticase soy agar, Difco) 고형배지에 25°C에서 2일간 배양하였다. 성장된 균체는 멸균된 부유용액 ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 5 g/l, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1 g/l, NaCl 25 g/l)에 현탁하였다. 현탁용액의 혼탁도를 Biolog spectro photometer를 이용하여 0.26으로 조절한 다음 Microlog plate의 각 well에 200 μ l씩 접종하였다. 균체가 접종된 microplate는 25°C에서 3일간 배양하였으며 발색 여부를 눈으로 관찰하였다.

(4) 선발균주의 생물막 생성과정에서의 상호작용

실험에 이용된 아크릴 쿠폰과 홀더는 24시간동안 1 N HCl를 이용하여 유기물들을 제거하고 3차 증류수에 5회 이상 세척하였다. 배양조에 아크릴 쿠폰을 장착한 홀더를 넣고

100 °C에서 30분간 끓여 멸균시켰다. 배양시간은 각각 6, 12, 24, 48, 72, 96시간으로 하였으며 각 시간별로 40 ml의 배양액은 회수하여 균체를 제거한 후 상등액에서 EPS 조성분석을 위해 정제하였다. 시간별로 회수한 아크릴 쿠폰은 생체량과 군집변화를 조사하기 위하여 냉동 보관하였다.

Biomass 측정 ; 회수된 아크릴 쿠폰은 멸균된 3차 증류수로 조심스럽게 세척하여 아크릴 표면에 붙어 있던 유기물들을 제거하였다. 유기물이 제거된 아크릴 쿠폰은 멸균된 칼로 조심스럽게 끊고 1ml의 3차 증류수를 수 회 아크릴 쿠폰에 흘려주어 아크릴 쿠폰에서 완전히 시료를 분리한 후 2 ml micro tube에 시료들을 담았다. 고속원심분리 (13,000×g, 20분)과정을 통하여 상등액을 제거한 후 침전된 시료는 3 ml의 PBS (pH7.2)를 첨가하여 15 ml tube에 현탁시켰다. 시료를 sonication (Sonics & Materials INC. USA)시켜 2분 동안 시료를 파쇄시켰다. 정량에는 Biorad사의 protein 정량 kit를 사용하였다. 파쇄된 시료 800 μ l와 200 μ l의 Coomassie Brilliant Blue G-250 dye를 혼합하여 실온에서 5분간 반응시킨 뒤 595 nm에서 흡광도를 측정한 후 BSA (Bovine Serum Albumin)를 표준 물질로 하여 단백질량으로 환산하였다.

균주 조성 변화 ; 시간별로 회수한 아크릴 쿠폰은 제2절 방향에서와 같은 방법으로 전처리한 다음 멸균된 칼로 생물막을 긁어모았다. 채집된 생물막 시료와 50 μ l의 TE buffer를 microtube에 담고 시료들을 잘 현탁한 다음 100 °C에서 5분, -80 °C에서 5분씩 3회에서 5회 반복하여 cell을 파쇄한 다음 15,000×g에서 20분간 원심 분리하여 DNA가 포함된 상층액 약 50 μ l를 회수하여 HEX-27F와 1518R을 primer로 하여 PCR을 수행하였다. PCR산물은 제2절 방향의 과정에 따라 말단절편 분석 준비를 하였다. 생성된 말단 제한절편 (TRF terminal restriction fragment)의 크기를 정확히 측정하기 위해 자동염기서열장치 (ABI 3100, Applied Biosystems Instrument)를 사용하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 생물막 생성 초기균주 중 생물막 표준균주 선발

생물막 생성과 관련하여 주요 요소로서 3일간 해수에 노출된 아크릴 표면에서 분리한 균주들의 세포표면 소수성과 표면부착능, quorum sensing signal의 생성 여부를 측정하였다. 현재 quorum sensing signal 물질의 생산 여부는 조사 중에 있으며 세포표면 소수

성은 0~96%의 범위를 보였다. 총 84균주 중 25균주가 10% 이상의 세포표면 소수성을 보였으며 이 중 8균주가 50% 이상의 높은 세포표면 소수성을 보였다 (Table 3-14). 지역별로 보면 강릉에서 분리된 23균주 중 4균주가 10% 이상의 세포표면 소수성을 보였으며 이 중 1균주가 50% 이상의 높은 값을 보였다. 포항에서 분리된 29균주 중에서는 8균주가 10% 이상의 세포표면 소수성을, 이 중 2균주가 50% 이상의 높은 값을 보였다. 목포에서 분리된 15 균주 중 7균주가 10% 이상으로 세포표면 소수성을 보였으나 50% 이상의 높은 소수성을 보인 균주는 없었으며 여수에서 분리된 8균주 중 1균주가 10%이상의 높은 소수성을 보였다. 그러나 인천지역의 경우 9균주 중 5균주가 10% 이상, 이 중 4균주가 50% 이상의 높은 세포표면 소수성을 보여 상대적으로 높은 세포표면 소수성을 보이는 균주의 비율이 높게 나타났다.

Polystyrene 재질의 microplate well에서 성장과 부착의 비율로 측정한 개별 세균의 부착능은 0.193~3.971의 범위를 보였다. 부착능을 측정한 84 균주 중 6 균주가 3 이상의 높은 부착능을 보였으며 2~3의 값을 보인 균주가 12균주, 1~2의 값을 보인 균주가 23균주, 1 이하의 값을 보인 균주가 43균주로 반 이상의 균주가 1 이하의 낮은 부착능을 보였다 (Table 3-15). 한편 균주분리 지역별로는 강릉에서 분리된 23균주 중 2 이상의 부착능을 보인 균주는 4균주였으며 포항의 29균주중에서는 7균주, 목포 15균주 중 6균주, 여수 8균주 중 2균주가 2 이상의 부착능을 보였다. 그러나 세포표면 소수성이 높았던 인천연안의 균주들 중에서는 2 이상의 부착능을 보인 균주가 존재하지 않았다.

각 균주의 세포표면 소수성과 부착능을 비교해 보면 50% 이상의 세포표면 소수성을 보인 8균주 중 2 이상의 부착능을 보인 균주는 존재하지 않았다. 즉 세포표면 소수성과 부착능은 한 균주에서 동시에 높은 값을 보이지 않는 것으로 나타났다 (Fig. 3-32). 예외적으로 포항에서 분리된 13389균주의 경우 43%의 세포표면 소수성과 3.971의 부착능을 보여 부착능이 우수한 균주 중 비교적 높은 세포표면 소수성을 보였으며 강릉에서 분리된 13650 균주의 경우에는 67%의 세포표면 소수성과 1.889의 부착능을 보여 세포표면 소수성이 높은 세균 중 비교적 부착능이 우수한 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 세포표면 소수성과 부착능은 초기 생물막 형성과정에서 별도의 기능으로 작용할 가능성을 시사한다. 따라서 생물막 표준균주 선정시 이들 두 특징 중 어느 한 가지 특성에만 비중을 두지 않도록 하여야 할 것으로 사료된다. 이들 두 균주는 16S rDNA 염기서열 분석 결과 각각 *Micrococcus* 속과 *Psychroserpens*속 세균으로 확인되었다. 한편 84균주 중 35균주가 부착성 (1 미만) 또는 소수성 (50% 미만)이 모두 낮게 나타난 것으로 볼 때 생물막 형성

초기에 관여하는 균주들 중 다수가 비특이적으로 부착하거나 혹은 측정된 두 가지 특성 이외의 특성으로 인해 생물막 형성에 관여할 가능성을 지니고 있는 것으로 사료된다. 이와 관련하여 많은 연구자들이 flagella 혹은 pilli와 같이 운동성에 관계된 요소들이 표면부착에 중요하게 작용하는 것으로 보고하였다 (Davey & O'Toole, 2000; Mirelis II *et al.*, 2000). 따라서 운동성과 관련된 요소들을 다음 단계에서 조사하여 표준균주의 최종선발 기준으로 활용할 예정이다.

제 4절에서 확인된 바와 같이 생물막 초기과정에서 분리된 세균 중 16S rDNA sequence를 확인한 55종과 자연생물막에서 분리된 균주 중 16S rDNA sequence가 확인된 164종의 균주 중 조사지역에 모두 출현하는 종은 발견되지 않았다. 이와 같은 결과는 해양의 환경특성에 따라 생물막을 구성하는 미생물이 달라질 수 있음을 시사한다. 이에 따라 분리된 균주 중 비교적 많은 지역에 출현한 종을 표준균주 후보로 하여 이 중 부착성 혹은 세포표면 소수성이 높은 균주들을 1차 후보로 선발하였다. 선발된 후보균주로는 *Psychroserpens*속에 속하는 13441과 13605, 13650, *Pseudo-alteromonas*속에 속하는 13381과 13380, *Erythrobacter*속에 속하는 13405, 13603, 13604, 13613, *Bacillus*속에 속하는 13384, 13385, 13611 외에 동정이 되지 않은 균주로서 13644를 선정하였으며 자연생물막에서 지역적인 분포가 넓게 나타났던 *Roseobacter*속에 속하는 13538과 *Brevibacterium*속의 13369, 13540, 13541를 선정하였다. 이 외에 *Micrococcus*속의 13389균주는 부착성과 세포표면 소수성이 모두 높아 후보균주로 선정하였다.

Table 3-14. Cell surface hydrophobicities of strains isolated from acrylic surface emerged in seawater for 3 days.

Number	Hydrophobicity(%)	Number	Hydrophobicity(%)	Number	Hydrophobicity(%)
13362	-	13404	12	13612	31
13363	-	13405	-	13613	12
13368	-	13435	-	13614	9
13369	96	13436	-	13615	16
13371	-	13437	3	13618	12
13375	3	13440	-	13624	-
13376	1	13441	58	13626	-
13377	-	13442	-	13631	-
13378	39	13444	-	13632	-
13379	-	13534	-	13636	22
13380	-	13535	-	13637	5
13381	92	13536	56	13641	6
13382	-	13537	19	13644	6
13383	1	13538	88	13647	28
13384	-	13539	5	13649	8
13385	12	13540	51	13650	67
13386	-	13541	59	13651	-
13387	-	13542	9	13652	14
13388	13	13599	-	13653	-
13389	43	13600	-	13654	3
13390	-	13602	16	13657	-
13391	-	13603	-	13665	2
13392	-	13604	22	13667	-
13393	19	13605	-	13668	-
13399	-	13606	-	13671	-
13400	3	13608	-	13676	-
13401	-	13610	-	13678	-
13402	-	13611	44	13681	-

Table 3-15. Attachment ability of strains isolated from acrylic surface emerged in seawater for 3 days.

Number	Attachment ability	Number	Attachment ability	Number	Attachment ability
13362	1.020	13404	1.170	13612	0.199
13363	1.750	13405	2.175	13613	2.040
13368	0.586	13435	0.722	13614	0.737
13369	0.393	13436	0.897	13615	1.856
13371	1.235	13437	0.601	13618	1.540
13375	0.769	13440	0.717	13624	1.366
13376	1.260	13441	0.338	13626	0.683
13377	0.994	13442	0.903	13631	2.035
13378	0.942	13444	3.567	13632	1.099
13379	2.799	13534	0.980	13636	1.361
13380	2.937	13535	1.006	13637	0.398
13381	0.775	13536	0.534	13641	0.888
13382	0.432	13537	1.197	13644	3.840
13383	0.510	13538	0.348	13647	2.130
13384	3.017	13539	0.193	13649	1.052
13385	3.380	13540	0.246	13650	1.889
13386	3.809	13541	0.690	13651	0.453
13387	0.751	13542	0.352	13652	0.203
13388	2.041	13599	0.420	13653	1.754
13389	3.971	13600	2.564	13654	2.526
13390	0.503	13602	1.382	13657	0.798
13391	0.730	13603	2.112	13665	1.186
13392	1.350	13604	2.144	13667	0.624
13393	0.320	13605	2.099	13668	1.828
13399	0.290	13606	0.341	13671	0.485
13400	0.633	13608	1.227	13676	0.880
13401	0.456	13610	2.215	13678	1.268
13402	1.648	13611	0.341	13681	1.482

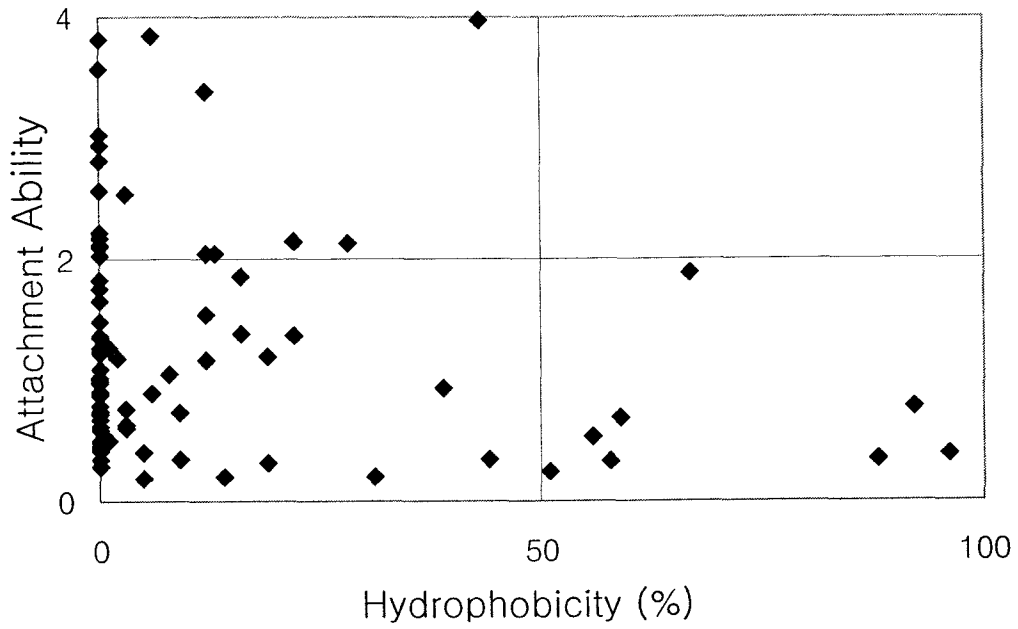


Fig. 3-32. Comparison of attachment ability and cell surface hydrophobicity of tested strains.

나. 생물막 형성 과정 중 균주간 상호 영향에 관한 연구

(1) 16S rDNA sequence에 기초한 선발 균주 동정

소수성과 부착성이 우수한 13106, 소수성과 부착성 중 한 가지씩만 우수한 13154와 13156과 소수성과 부착성이 모두 낮은 13132를 포함하여 선발된 4 균주들의 16S rDNA 염기서열을 GenBank 데이터 베이스 및 RDP database와 비교한 결과 13106은 *Micrococcus luteus*와 98.2%, 13132는 *Silicibacter lacuscaerulens*와 97.8%, 13154는 *Erythrobacter citreus*와 97.6%의 염기서열 유사도를 나타냈다. 13156은 *Erythrobacter longus*와 98.3%의 유사도를 나타냈다. 13106을 제외한 3개의 선발 균주들은 α -Proteobacter에 속하였으며 13106은 high GC gram positive group에 속하였다. 각 균주의 phylogenetic position은 Fig. 3-33에 나타났다.

(2) 선발 균주의 최적 성장 조건

온도 ; 선발된 4 균주들을 O.D. 0.02로 Zobell 2216e 액체배지에 접종한 후 균주 배양 최적 온도 조건을 조사하였다. 배양 96시간후의 흡광도를 측정된 결과 13106은 25°C에서 최적의 성장을 나타냈으며 13132, 13154 및 13156 균주는 30°C에서 높은 세포 성장을 보였다 (Fig. 3-34). 균주 중 13156의 성장이 가장 좋았으며 13132는 13156에 비해 1/3 정도의 성장도를 보였다. 13106 균주는 25°C 부근에서만 높은 성장도를 보여 상대적으로 온도에 민감한 것으로 나타났으며 다른 균주들의 경우 25~35°C 온도범위에서는 큰 차이를 보이지 않았다.

염도 ; 해수 대신 증류수로 조제된 ZoBell 2216e 액체배지에 NaCl로 염농도를 조절된 배지에서 선발 균주들의 최적 염도를 조사한 결과 염농도에 관계없이 성장도가 낮은 13154를 제외한 모든 균주의 최적 염농도는 3%였다 (Fig. 3-35).

pH ; 1N NaOH와 HCl을 이용하여 ZoBell배지의 pH를 조절하여 선발 균주들의 최적 pH를 조사하였다. 13156의 경우는 pH 9에서 O.D. 0.276로 세포성장이 높게 나타났으며 13132, 13106와 13154의 경우는 pH 8에서 각각 O.D. 0.248, 0.102, 0.245로 최고 성장을 나타냈다 (Fig. 3-36). 13154는 pH 6~8에서 고른 세포성장을 보이며 13156은 pH 8에서도 높은 세포성장을 보였다.

이상의 결과에서 13106, 13132, 13154 및 13156 균주의 최적 성장조건은 온도 25°C 이상, 염농도 2.5~3%, pH 7~8인 것으로 나타났다. 이에 따라 혼합배양시의 조건으로 온도 25°C, 염도 2.8%과 pH 7.3을 결정하고 이 조건에서의 성장곡선을 측정하였다 (Fig. 3-37).

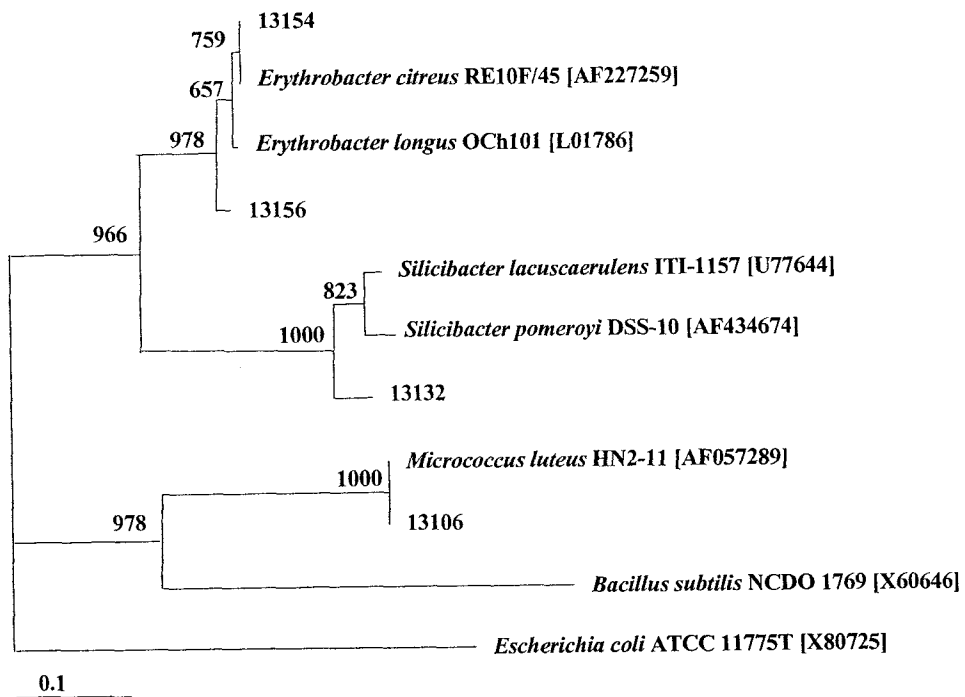


Fig. 3-33. Rooted neighbour-joining tree based on 16S rDNA sequence data

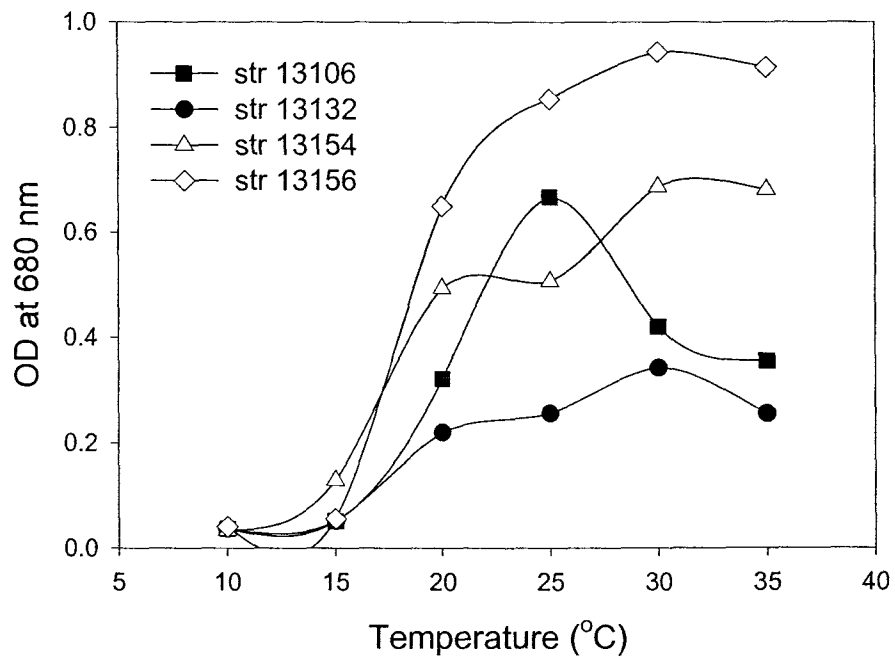


Fig. 3-34. Effect of temperature on the cell growth of selected 4 strains

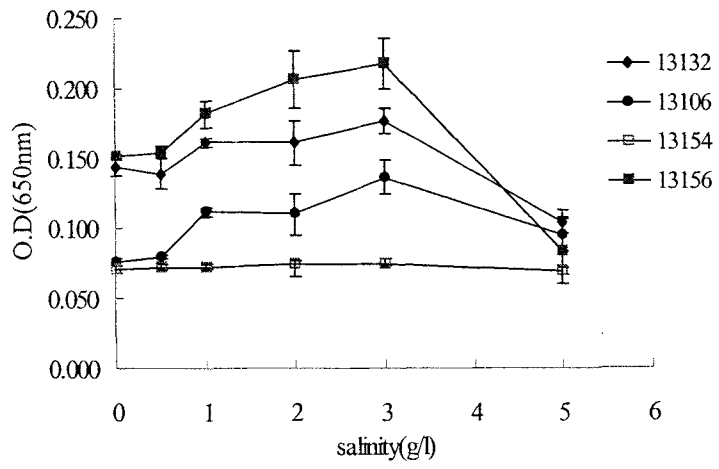


Fig. 3-35. Effect of salinity on cell growth of selected 4 strains

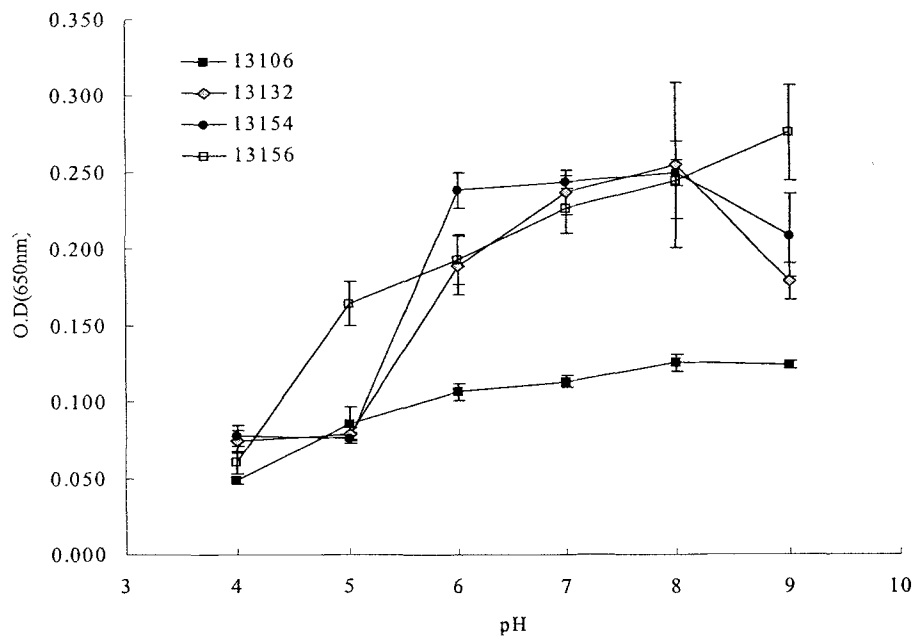


Fig. 3-36. Effect of pH on cell growth of selected 4 strains

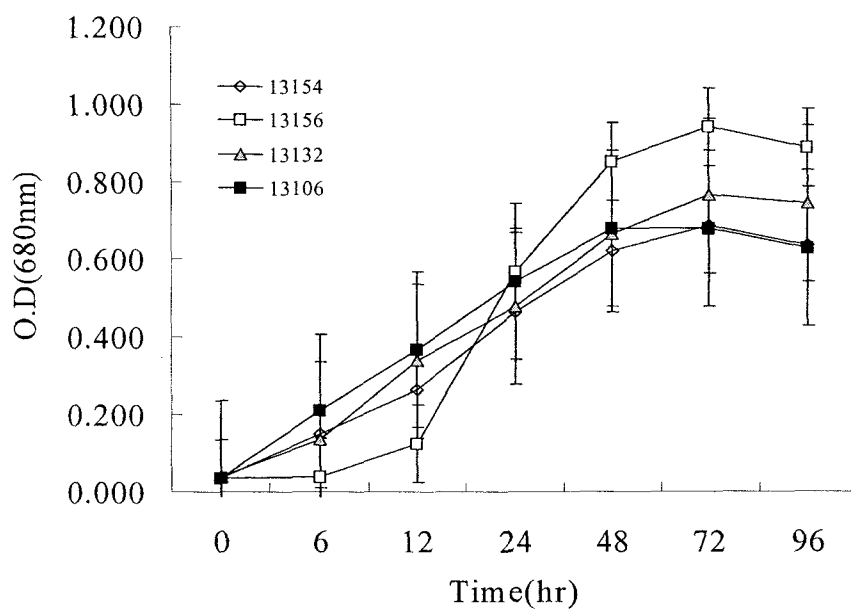


Fig. 3-37. Growth curve of selected 4 strains on ZoBell 2216e broth
(Temperature, 25°C pH, 7.3; salinity, 2.8%).

(2) 선발 균주의 기질 이용 다양성

Biolog사의 GN2 microplate를 이용하여 각 균주의 기질 이용 다양성을 조사하였다. Table 3-16에서 보는 것과 같이 13106은 여러 기질들 중 아미노산계열과 유기산계열의 기질이용성이 높은 것으로 나타났으며 13156은 carbohydrates group과 amino acid group, 13154의 경우 organic acid group과 amino acid group의 기질이용성이 높은 것으로 나타났지만 13106과 비교할 때 기질 이용 다양성은 낮은 편이었다. 13156과 13154는 16S rDNA 염기서열 분석 결과 같은 *Erythrobacter*속으로 나타났지만 기질의 이용도는 다른 것으로 나타났다. 공통적으로 선발 균주들은 amino acid group의 기질 이용성이 다른 기질들에 비해 높은 것으로 나타났다. 해수에 노출시킨 아크릴 표면에서 형성된 생물막의 기질이용다양성을 조사하였을 때 3일 이후에 탄수화물계와 아미노산계열의 기질이용이 다른 기질이용도보다 높았던 것으로 조사되었고 특히 아미노산계열의 기질이용도가 높았던 점이 선발 균주들의 기질 이용 경향과 비슷한 것으로 나타났다.

Table 3-16. Utilization of substrates by selected 4 strains

	13106	13132	13154	13156
Dextrin	+			
Tween 40	++	++	++	++
Tween 80	+	++	++	++
a-D-glucose				+
Maltose		+	+	+
D-mannitol		+		
D-sorbitol				+
Sucrose				+
D-trehalose	+			+
Turanose				++
Xylitol		+		
Methyl pyruvate	++	++		++
mono-Methyl succinate	+	+		++
D-glucuronic acid		+		
a-hydroxy butyric acid	+	++		
b-hydroxy butyric acid		+		
g-hydroxy butyric acid				++
p-hydroxy phenylacetic acid	+		++	++
Itaconic acid	+			
a-keto butyric acid	+	++		+
a-keto glutaric acid	+			
a-keto valeric acid	+	++		
D,L-lactic acid			++	++
Propionic acid				++
D-saccharic acid		+		
Sebacic acid		++		
Succinic acid		+	+	
Succinamic acid		+		
Glucuron amide				+
D-alanine	+			
L-asparagine				+
L-glutamic acid		+		+
glycyl-L-glutamic acid			+	
L-histidine				+
L-leucine				+
L-ornithine				+
L-phenylalanine			++	++
L-pyroglutamic acid			+	++
L-serine				+
L-threonine		+		
D,L-carnithine		+		
g-amino butyric acid		+		
Urocanic acid	+		++	++
Inosine	+	+		
Uridine	+	+		
Thymidine	+			
Putrescine	++		+	++
2-amino ethanol			+	+

(3) 혼합 배양 과정 중 시간별 Biomass 변화

O.D.가 0.06이 되도록 접종한 후 48시간 동안 6시간 간격으로 배양액과 아크릴 쿠펜을 회수하여 세균의 성장도를 측정하였다 (Fig. 3-38). 혼합 배양 과정 중 흡광도로 측정된 배양액 내의 균체는 18시간 이후부터 뚜렷한 증가추세를 보이는 반면 아크릴 표면에 부착된 균주들의 생체량은 18시간째에 $54.5 \mu\text{g/ml}$ 로 초기 18시간까지 빠르게 증가하였으나 18~32시간 사이에는 32시간째에 생체량이 $60 \mu\text{g/ml}$ 로 생체량의 증가가 거의 없었으며 48시간째에 $142.8 \mu\text{g/ml}$ 로 32시간 이후 다시 증가하는 2단계 성장 패턴을 보였다. 장목만의 해수에서 아크릴 표면에 생성되는 생물막의 세균수 변화를 측정하였을 때 해수중의 세균은 1일 이내에 빠르게 아크릴 표면에 부착하였으나 본격적인 성장을 보이기까지 3~4일 정도의 정체를 보였었다. 혼합배양과정에서도 아크릴 표면에서 초기에 빠른 생체량 증가를 보인 후 정체를 보였는데 혼합배양실험의 경우 해수에 비해 초기 미생물의 농도가 매우 높기 때문에 해수에서 관찰된 것과 같은 현상이 좀 더 빠르게 진행된 것으로 생각된다. 부착 초기과정에 빠른 부착을 보인 후 정체를 거치는 현상은 아크릴 표면에 균체가 처음 부착할 경우에는 특별한 상호작용 없이 부착하지만 어느 정도 시간이 지난 후에는 부착된 미생물들간에 상호 경쟁, 협력 등과 같은 복잡한 상호작용이 일어나기 때문인 것으로 추정된다. 앞서 살펴본 바와 같이 이 과정에서 초기 생물막 형성에 중심적인 역할을 할 균주가 안정적인 위치를 점유한 이후부터 생물막이 성장하고 이후 다른 균주들이 생물막 내에서 성장하는 것으로 생각된다. 균주 선발시 소수성과 부착성에 기반하여 선발하였는데 어떤 특성을 지닌 균주가 우선적으로 생물막 형성에 관여하는지를 확인하기 위하여 각 배양시기의 우점종 변화를 T-RFLP 방법으로 확인하였으며 그 결과는 다음 항에 기술하였다.

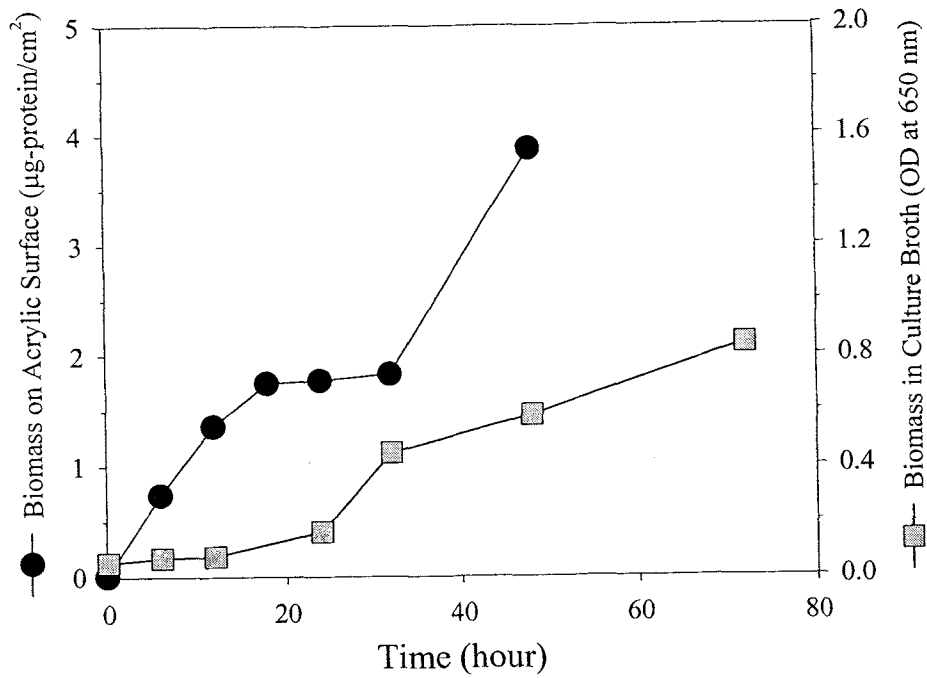


Fig. 3-38. Increase of bacterial biomass on acrylic surface during the mixed-culture of selected strains

(4) 혼합 배양 과정 중 균집 조성 변화

선발균주의 혼합배양과정 중 아크릴 표면에 부착된 균주의 종조성변화는 T-RFLP 방법을 이용하여 분석하였다. 각 균주의 16S rDNA 염기서열로부터 제한효소 종류에 따른 T-RF의 길이를 추정해 본 결과 4 염기(GC'GC)를 인지하는 제한 효소 *HhaI* 으로 절단시킬 경우 말단제한절편의 길이는 72 bp (13156), 76 bp (13154), 176 bp (13106)와 347 bp (13132)인 것으로 나타났으며 실제 측정시에도 1~2 bp의 오차범위에서 예측과 일치하는 결과를 나타내었다. 배양 6시간째에는 낮은 cell 농도로 인해 어떠한 T-RF도 검출되지 않았으며 12시간 이후 13106과 13154에 해당하는 176 bp와 76 bp 크기의 T-RFs가 검출되었다 (Fig. 3-39). 검출된 T-RFs의 면적비율을 보면 13154 균주가 63.8%, 13106 균주가 36.2%를 차지하였다. 반면 13156과 13132에 해당하는 71 bp와 347 bp의 T-RF는 검출되지 않았다. 배양 24시간째에는 13106 균주가 전체 면적의 65.3%를 차지하여 비율이 증가한 반면 12시간째에 높은 비율을 보이던 13154 균주는 31.4%로 그 비중이 감소하였다. 배양 48시간째에 13106균주와 13154, 13156 균주의 T-RFs가 검출되었으며 이때 새로 검출된 13156 균주가 32.3%의 면적을 차지하였고 24시간째에 비율이 상대적으로 낮았던 13154는 38.3%, 높은 비율을 보였던 13106 균주는 28.5%를 차지하였다. 배양 72시간째에 13132 균주가 검출되기 시작하였으나 3.6%로 낮은 비율을 차지하였다. 72시간째 13156, 13154, 13106 균주에 해당하는 T-RFs는 각각 4.7%, 36.5%와 58.8%를 차지하였으며 여전히 13106 및 13154 균주가 아크릴 표면에서 차지하는 비율이 높은 것으로 나타났다. 고체 표면에서 형성된 생물막은 널리 퍼져 있으며 부착 과정은 소수성이 중요하게 작용하는 것으로 생각되고 있다 (van Loosdrech, 1987). 본 실험에서는 혼합균주에 의한 생물막 형성시 초기 과정에 중요하게 작용하는 요소를 확인하기 위하여 세포 표면의 소수성과 부착성의 차이에 근거하여 네 균주를 선발하였다. 결과적으로 보면 소수성과 부착성이 모두 우수한 13106 균주와 상대적으로 소수성이 우수한 13154 균주가 초기 생물막 생성에 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다. 부착성이 우수한 13156 균주의 경우 상대적으로 낮은 비율로 검출되었으며 소수성과 부착성이 모두 낮은 13132 균주의 경우 가장 늦게 낮은 비율로 검출되었다. 13156 균주의 경우 EPS 생산능력도 좋은 편이었지만 본 실험의 배양조건에서는 초기 성장이 느리고 상대적으로 긴 lag phase를 보인다. 이상의 결과로 볼 때 미생물이 아크릴 표면에 부착되는 과정에는 세포표면 소수성과 부착성이 모두 중요하게 작용하지만 한편으로는 세포성장속도도 중요하게 작용하는 것으로 사료된다. 초기 생물막 형성과 관련하여 세

포표면 소수성의 중요성을 보여주는 예로 PVC와 스테인레스 쿠폰에 부착된 미생물의 수를 비교하였을 때 기질 표면이 hydrophobic한 PVC에 더 많은 수의 미생물이 부착된 사례가 있다 (Helke *et al.*, 1993; Sommer *et al.*, 1999). 한편 Helke *et al.* (1993), Sommer *et al.* (1999), Djordjevic *et al.* (2002) 등은 고체 표면에 형성되는 생물막은 균체 성장주기의 영향을 받지 않으며 오히려 미생물의 운동성 (motility)과 세포외 분비 기질 (extracellular polymeric substance) 등이 생물막 형성에 중요한 요소로 작용한다고 하였다. Allison *et al.* (1998)도 EPS의 조성과 생산은 생물막 형성 초기에 기질 표면에 부착하는 기작을 수행하는데 중요한 요인이라고 하였다. 그러나 본 실험에서는 EPS 생산의 영향을 평가하기가 쉽지 않다. EPS생산력과 소수성, 부착성이 대체로 일치하는 결과를 보여 어떤 특성이 먼저 작용하고 어떤 특성이 나중에 작용하는지 평가하기 어렵기 때문이다. 다만 EPS 생산력이 가장 좋은 13106 균주가 13154 균주에 비해 늦게 우점도가 증가하는 것으로 볼 때 EPS 생산은 초기 부착 이후 생물막 성장과정에서 더 중요하게 작용할 것으로 짐작된다.

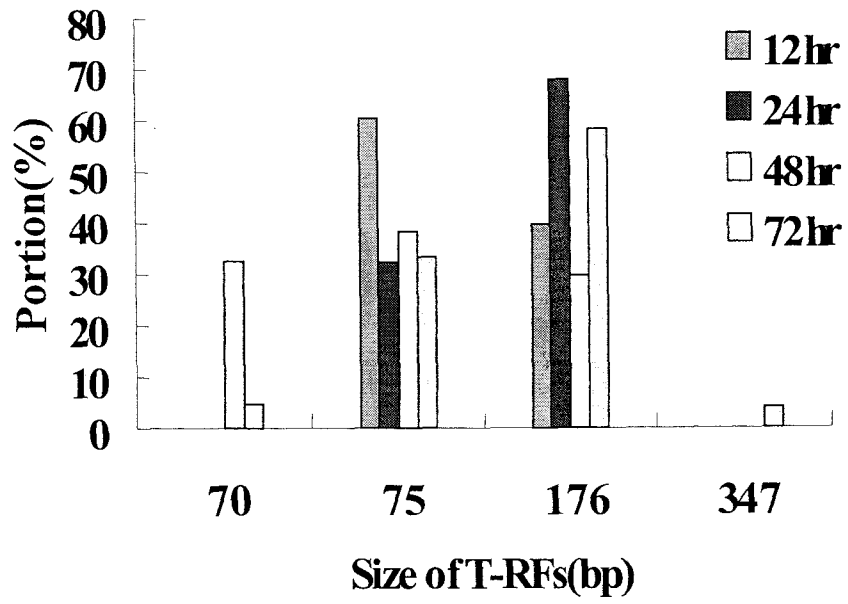


Fig. 3-39. Changes of Representative T-RFs of selected 4 strains

제 7 절 세포외 다당류 생산 돌연변이주 제조

- *Hahella chejuensis* 무색소 변이주 m10356 개발

화학공업의 비약적인 발전은 천연 고분자물질을 대체하는 다양한 성질의 합성 고분자물질의 개발을 발전시켰다. 현대문명에서 광범위하게 사용되어 오고 있는 합성고분자물질은 제조 및 가공이 용이하여 특유의 물성과 낮은 생산비, 안정된 공급 등을 이유로 석유화학을 중심으로 다양한 고분자 물질이 생산되고 있다. 그러나 합성고분자의 반영구적 특성은 환경오염의 원인으로 심각한 사회문제를 야기하고 있어 합성고분자를 대체할 수 있는 이용성이 우수한 생체 고분자물질인 생분해성 천연고분자 물질의 개발이 절실하게 요구되고 있다.

현재 생분해성 고분자 물질은 주로 미생물 (French, 1989), 식물 (Cabib, 1987), 동물 (Sutherland, 1983) 등의 대사과정을 통하여 생합성 되고 있으며 다양한 생물자원에서 생합성 되어 생산되고 있으며, 특히 미생물 유래 다당류와 이들의 유도체는 기존의 생산되고 있는 식물 또는 해산 조류의 천연다당류나 기타 합성 고분자 물질과는 다른 물성과 생리활성을 가지고 있어 천연 생합성 고분자로서의 이용가치가 높은 것으로 보고되고 있으며 (Calvert, 1980), 미생물이 생산하는 다당류의 연구는 1940년대 *Leuconostoc mesenteridos*에 의해 생산되는 dextran이 혈장 증량제로 사용되었던 것을 시작으로, 이후 xanthan gum, pullulan 등 이용성이 가능한 여러 다당류에 대한 연구가 진행되어 왔다 (Brierly *et al.*, 1985).

다당류는 단당과 유도단당이 glucoside 결합에 의하여 형성된 탄수화물계 고분자 화합물로 자연계에 가장 풍부하게 존재하는 생합성 고분자이다. 미생물이 생산하는 다당류는 세포에서의 기능에 따라 3가지 형태로 분류되는데, 탄소원 및 에너지원의 저장물질로 이용되는 poly-B-hydrobutylrate (PHB) 및 glycogen 등의 세포내 다당류 (intercelluar polysaccharide), 세포벽의 구성성분의 형태인 Gram 음성균의 lipopolysaccharide, teichoic acid, β -glucan 및 균류가 생산하는 glucan 등의 세포구조를 이루는 구조다당류 (structure polysaccharide), 그 외 다당류가 세포외로 분비되는 형태로 세포벽의 일부로서 그 주위에 협막을 형성하거나 점질물로서 세포주위나 배지로 분비되는 세포외다당류 (extracellular poysaccharide)로 이들 모두는 미생물에 의하여 생산되는 1, 2 차 대사산물로 알려져 있다. 이중 특히 미생물 유래의 유용물질생산 연

구에 있어 미생물이 생산하는 세포외다당류 (extracellular polysaccharide : EPS)와 이들의 유도체는 생분해성 고분자 (biopolymer)를 생합성 고분자 화합물로 사용하려는 연구가 진행되고 있다 (Margaritis *et al.*, 1985).

미생물 유래의 EPS는 생합성 중합체 (biopolymer)로서 Geesey (1982)는 EPS를 '미생물 군체를 형성하는데 사용되는 생물체의 세포외 중합 기질체'라 하였고, Charaklis & Welderer (1989)는 '미생물의 유기 중합체로 생물막내에서는 미생물과 다른 물질들이 서로 유착, 결합하는 일이 빈번히 일어난다'라고 하였다 (Characklis & Welderer, 1989). EPS는 extracellular polysaccharide, exopolysaccharide, exopolymer로 동일하게 사용되고 있다. 미생물은 EPS내에 함입되어 생물막내(biofilm)에서 집락체를 형성하여 생존하게 된다. EPS 생산은 자연계 미생물의 일반적인 특성으로 이는 세균, achaea 등의 원핵생물과 조류, 균류와 같은 진핵생물에서도 생성된다. 생물막의 형성은 토양과 물의 경계면에서 토양표면 이외에 물과 공기, 물과 기름, 토양과 공기등의 접촉부위에서도 생성된다 (Costerton *et al.*, 1995; Flemming, 1996). 토양과 물의 경계면에서 형성되는 생물막내에서 다당류는 가장 풍부한 물질이며, 인지질을 포함하는 양극성 물질로 단백질과 핵산, humic acid등이 여러 형태로 존재한다 (Neu, 1996). EPS는 미생물의 생존에 필요한 여러 물질을 생물막의 EPS를 통하여 함유하고 그들의 생장을 향상시키는 역할을 하는데 이는 원생동물이나 bacteriophage등으로부터 보호막의 역할을 하거나 병원균의 경우 체내에 형성된 항체에 대하여 보호막 및 감염기작의 신호물질로 작용하고, 환경내에서 독성물질이나 중금속 이온과 착화합물을 형성하는 등의 역할을 한다. 따라서 EPS에 의하여 형성된 생물막은 병원균에 있어 생물의 감염에 필수적이고 미생물이 서식환경의 불리한 조건에서도 생존이 가능하게 하며 미생물과 이외의 다른 생물이 서로 공생관계를 유지하는데 도움을 준다 (Sutherland, 1972; Wilkinson, 1958; Brown *et al.*, 1993) (Table 3-17).

생물막내에는 미생물, EPS, 다가양이온, 생합성물질, 무기염류 등의 입자들이 축적되는데, 특히 EPS는 3차원적 구조물을 형성하고 겔과 유사하며 가수화되어 있고 전하를 띄므로 미생물은 EPS에 함입되어 기질표면에 고정화된다. 따라서 EPS는 기질의 환경에 조절되는 고착세포의 미세환경을 만들어 고착미생물이 환경에 적응할 수 있는 체외각의 경계를 만든다. 일반적으로 생물막내 EPS는 전체 유기물의 50 ~ 90%를 차지한다 (Christensen *et al.*, 1990; Nielsen, *et al.*, 1997).

Table 3-17. Proposed effects of biofilm due to microbial exopolysaccharides.

Function	Relevance
Adhesion to surfaces	Initial step in colonization of inert and tissue surface, accumulation of bacteria on nutrient-rich surfaces in oligotrophic environments
Aggregation of bacterial cells, formation of flocs and biofilms	Bridging between cells and inorganic particles trapped from the environment, immobilization of mixed bacterial populations, basis for development of high cell densities, generation of a medium for communication processes, cause for biofouling and biocorrosion events
Cell-cell recognition	Symbiotic relationships with plants or animals, initiation of pathogenic processes
Structural elements of biofilms	Mediation of mechanical stability of biofilms (frequently in conjunction with multivalent cations), determination of the shape of EPS structure (capsule, slime, sheath)
Protective barrier	Resistance to nonspecific and specific host defenses (complement-mediated killing, phagocytosis, antibody response, free radical generation), resistance to certain biocides including disinfectants and antibiotics, protection of cyanobacterial nitrogenase from harmful effects of oxygen
Retention of water	Prevention of desiccation under water-deficient conditions
Sorption of exogenous organic compounds	Scavenging and accumulation of nutrients from the environment, sorption of xenobiotics (detoxification)
Sorption of inorganic ions	Accumulation of toxic metal ions (detoxification), promotion of polysaccharide gel formation, mineral formation
Enzymatic activities.	Digestion of exogenous macromolecules for nutrient acquisition, release of biofilm cells by degradation of structural EPS of the biofilm
Interaction of polysaccharides with enzymes	Accumulation/retention and stabilization of secreted Enzymes

미생물에 의하여 세포 외로 분비되는 다당류는 미생물을 다른 생물체로부터 보호하거나 항체에 대한 방어 역할, 주위환경의 독성물질을 중화시키거나 금속이온과 착화합물을 형성하며, 건조한 환경에서 세포내의 수분이 증발하는 것을 막는 등의 미생물의 생존에 관련된 여러 가지 기능을 수행하고 있는 물질이다 (Sutherland, 1983). 그러나 미생물의 세포외다당류는 조건에 따라 겔 형성능, 유화안정능, 표면장력의 조절능, 물 흡수능, 점착능, 윤활능 및 필름 형성능 등의 광범위한 기능성을 가지고 있으므로, 식품의 대용물 및 각종 산업의 소재로 이용되고 있다 (Fu and Tseng, 1990; Irene *et al.*, 1990; Low *et al.*, 1998; Marra 1990). 또한, 중금속 흡착능 (Norberg and Persson, 1984), 항종양활성 (Oda *et al.*, 1983)을 가지는 세포외다당류가 보고 되었으며, 특히 미생물성 세포외다당류는 산업적 이용의 높은 잠재력과 함께, 생산 배양조건을 개선하여 생산성을 높일 수 있으며, 단기간에 발효조를 이용한 연속배양에 의해 대량생산이 가능하고, 생산된 세포외다당류의 분리 및 회수가 용이하다. 따라서, 이러한 미생물 및 미세조류성 세포외다당류에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 특히, 미생물성 세포외다당류로 알려진 것은 *Zoogloea sp.*이 생산하는 *zooglan*, *Pseudomonas sp.*, *Vibrio fisheri*, *Cyanothece sp.* 및 *Altermonas macleodii* 등으로부터 생산된 세포외다당류가 있으며, 한국 연안에서 세포외다당류를 생산하는 해양미생물로 알려진 것으로는 *Zoogloea sp.* KCCM 10036 (장 등, 1998) 정도로 그 수가 많지 않다.

Hahella chejuensis 96CJ10356 균주 (KCTC 2396=IMSNU 11157)는 1996년 11월, 제주도에서 채집된 신속의 해양성 미생물로 그람음성의 운동성 간균이며, 이들은 다량의 세포외다당류 (exopolysaccharide) 및 적색색소 (red pigment)를 생산한다 (Lee *et al.*, 2001). 96CJ10356 균주는 다량의 적색색소 생성 균주로 생산된 세포외다당류는 적색색소가 침적되는 문제가 있고 세포외다당류로부터 적색색소의 분리가 어려워 무색소 균주로 개발하고자 색소생성이 없는 돌연변이 균주를 EMS를 처리하여 유도하여 무색소 *Hahella chejuensis* 96CJ10356의 변이주 m10356으로부터 세포외다당류를 생산에 대하여 보고하고자 한다.

1. 이론적, 실험적 접근방법

가. 돌연변이주 제조

H. chejuensis 96CJ10356의 무색소 변이주 유도방법은 다음과 같다. 96CJ10356을 STN 액체배지 (Table 3-18)에서 1일간 25℃, 120rpm으로 배양한 후 배양액 0.1ml을

STN 액체배지에 첨가하여 3회 세척하고 1.0ml의 STN 액체배지에 2M EMS (Ethylmethane sulfonate)를 첨가하여 1 시간 동안 25℃에서 배양하고 Na₂S₂O₃를 최종 6%가 되도록 첨가하여 반응을 중지시켰다. 이 후 3,000xg, 2분으로 원심분리하여 미생물을 회수하고 이를 다시 STN 액체배지로 6 - 10배 희석한 후 이중 0.1ml를 STN 고체배지에 도말한 다음 형성된 미생물 집락을 육안으로 관찰한 후 색소형성이 이루어지지 않은 m10356 변이주를 최종선발 선발하였다.

나. 최적조건 확립

세포외다당류를 생산하기 위한 최적배지의 조성을 위하여 *H. chejuensis* m10356을 이용하여 세포외다당류를 생성하기 위한 최적 생산배지의 조성을 하기의 방법으로 조사하였다. 전배양은 m10356은 ZoBell 고형배지 (Table 3-19)에 도말하여 25℃에서 3일간 배양하였다. 성장된 균락에서 loop를 이용하여 20ml의 ZoBell 액체배지에 접종하여 25℃, 150rpm에서 48시간 진탕배양 하였다.

세균 성장 측정은 배양액 100 μ l를 인산완충액 (pH 7.0)으로 3회 세척하여 세포외다당류를 제거한 후 분광광도계 (UV-VIS 2401PC, Japan)를 이용하여 흡광도 (A₆₆₀)를 측정하고 생물량과 검량선을 작성하여 세균의 성장을 측정하였다. 세포외다당류 측정은 배양액을 원심분리 (10,000xg, 15분)하여 균체를 제거하고, 균체가 제거된 배양액에 2배의 에탄올을 가하여 다당류를 침전시킨 후 다시 원심분리 (5,000 xg, 15 분)하여 침전된 다당류를 회수하였다. 이렇게 회수된 다당류에서 염을 제거하기 위하여 투석막에 인산완충액 (pH 7.0)으로 2일간 투석하여 염을 제거 한 후 Anthron 방법을 이용하여 총 탄수화물의 양을 구하고 세포외다당류와 검량선을 작성하여 세포외다당류를 측정하였다. 기준당은 글루코오스를 이용하였다. 세포외다당류 생산에 요구되는 물리적 요인을 분석하기 위한 배지양 및 접종량에 대한 조사는 250ml 삼각플라스크에 각각 25, 50, 75, 100, 150ml의 ZoBell 액체배지를 넣고, m10356 균주 1.0% (w/v)를 접종한 후, 120rpm, 25℃의 조건으로 3일간 진탕배양한 후 세포성장과 p-m10356의 생성을 조사하였고, 이외 조건은 고 등 (2000)의 조건으로 온도는 25℃, 초발 pH는 7로 하였다.

Table 3-18. The compositions of STN media

Compositions	ZoBell2216e
Sucrose	20 g/ <i>l</i>
Trytone	10 g/ <i>l</i>
NaCl	10 g/ <i>l</i>
MgSO ₄	5 g/ <i>l</i>
CaCl ₂	1 g/ <i>l</i>
KH ₂ PO ₄	0.083 g/ <i>l</i>
K ₂ HPO ₄	0.067 g/ <i>l</i>
FeCl ₃	0.005 g/ <i>l</i>
MnCl ₂	0.001 g/ <i>l</i>
Na ₂ MoO ₄	0.001 g/ <i>l</i>
ZnCl ₂	0.001 g/ <i>l</i>
distilled water	1,000 ml
pH	7.0

Table 3-19. The compositions of SZoBell media

Compositions	SZoBell
glucose	20 g/ <i>l</i>
peptone	5 g/ <i>l</i>
yeast extract	1 g/ <i>l</i>
FePO ₄	0.01 g/ <i>l</i>
aged sea water	750 ml
distilled water	250 ml
Bacto-agar	1.5%
pH	7.2

탄소원은 100ml 삼각플라스크에 ZoBell 배지 20ml를 기준으로 탄소원인 xylose, fructose, glucose, lactose, galactose 및 sucrose를 각각 1.0% (w/v) 농도로 첨가하고, m10356 균주를 2.5 중량%가 되도록 접종하여, 120rpm, 25℃의 조건으로 3일간 진탕 배양한 후 세포성장 및 세포외다당류의 생성을 조사하였고 p-m10356의 생산에 적합한 sucrose의 농도는 과당을 각각 1, 2.5, 5, 7.5, 10.0, 20.0% (w/v)의 농도로 첨가하고, m10356 균주를 2.5%가 되도록 접종하여, 120rpm, 25℃의 조건으로 3일간 진탕 배양한 후 세포성장 및 세포외다당류의 생성을 조사하였다. 질소원은 유기질소원인 yeast extract, pepton, tryptone, malt extract, soytone과 무기질소원인 NH_4NO_3 , NaNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 등을 각각 0.5%씩 첨가하고, m10356 균주를 2.5 중량%가 되도록 접종하여, 120rpm, 25℃의 조건으로 3일간 진탕 배양한 후 세포성장 및 세포외다당류의 생성을 조사하였다. 탄소원대 질소원의 비 (C/N ratio)는 탄소원대 질소원의 비를 각각 0.05, 0.1, 0.5의 비율로 첨가하고, m10356 균주를 2.5 중량%가 되도록 접종하여, 120rpm, 25℃의 조건으로 3일간 진탕 배양한 후 세포성장 및 세포외다당류의 생성을 조사하였다. 다량원소 및 미량원소는 무기인산인 KH_2PO_4 0.083g 및 K_2HPO_4 0.067g, 다량원소로서 NaCl 1%, MgSO_4 5%, CaCl_2 0.07%, 미량원소로는 $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g/l, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.001 g/l, Na_2MoO_4 0.001 g/l, ZnCl_2 0.001 g/l 등의 처리는 고 등 (2000)의 조건을 이용하였다. 또한 p-m10356 생산을 위한 최적 조건은 sucrose 7.5%, tryptone 0.35%, KH_2PO_4 0.083 g/l 및 K_2HPO_4 0.067 g/l, NaCl 10%, MgSO_4 는 5%, CaCl_2 0.1%, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g/l, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.001 g/l, Na_2MoO_4 0.001 g/l, ZnCl_2 0.001 g/l 및 증류수를 첨가하여 최종 용량이 1,000 ml가 되도록 하고, pH 7, 온도 25℃, 접종량 2.5%의 양으로 제조한 배지 조성을 본 발명에서는 "M-m10356"이라 명명하였고, 상기 M-m10356을 p-m10356 생산 최적 배지 조건으로 하였다 (Table 3-20).

5ℓ 회분식 배양기를 이용하여 M-m10356 배지에서 24시간 배양된 균주를 3ℓ의 working volume에 2.5% 접종하여 균주를 배양하고 균체의 성장, 다당류 생산, 다당류의 점도변화 및 pH의 변화를 조사하였다. 이때 배양온도는 25℃이었고, 200 rpm에서 통기량은 1.5 vvm으로 설정하였다.

Table 3-20. The compositions of M-m10356 media

Compositions	ZoBell2216e
Sucrose	75 g/ <i>l</i>
Trytone	3.5 g/ <i>l</i>
NaCl	10 g/ <i>l</i>
MgSO ₄	5 g/ <i>l</i>
CaCl ₂	1 g/ <i>l</i>
KH ₂ PO ₄	0.083 g/ <i>l</i>
K ₂ HPO ₄	0.067 g/ <i>l</i>
FeCl ₃	0.005 g/ <i>l</i>
MnCl ₂	0.001 g/ <i>l</i>
Na ₂ MoO ₄	0.001 g/ <i>l</i>
ZnCl ₂	0.001 g/ <i>l</i>
distilled water	1,000 ml
pH	7.0

다. 돌연변이주가 생산하는 EPS 특성 조사

96CJ10356 변이주 m10356이 생산하는 세포외다당류의 특성을 조사하기 위하여, 배양액으로부터 생성된 세포외다당류, p-m10356을 분리, 정제한 후 분자량, 단당류 조성, 미세구조, 단백질 함량, 열 분해능, 용해도, 유화안정능 및 물성에 대하여 조사하였다.

p-m10356의 분리 및 정제는 96CJ10356 변이주 배양액을 증류수로 2배 희석한 후 최종농도가 0.1 N이 되게 NaOH를 첨가하여 Rotary shaker (S-20, HANA, Korea)로 40분간 교반한 후 원심분리기 (Sorvall RC5C, Dupont, USA)에서 12,000×g에서 30분간 원심분리하여 균체를 1차 제거한 후 상등액을 다시 연속원심분리기 (Sorvall, USA)를 이용하여 12,000×g에서 균체를 2차 제거한 배양액에 2배에 해당하는 100% cold ethanol을 첨가하여 4°C에서 24시간 냉침하여 세포외 다당류를 침전시켰다. 침전된 다당류는 70% cold ethanol로 2회 세척하고 다시 증류수에 녹인 후 이를 0.1N HCl로 중화시키고, 4°C에서 기준양의 3배의 3차 증류수를 연속적으로 첨가하여 VIVA Flower (VF20P4, Satorius, USA)로 투석한 후 이를 다시 2배의 100% cold ethanol을 첨가하여 4°C에서 24시간 냉침하여 세포외다당류를 침전시켜 다당류를 회수하였다. 1차 투석이 완료된 세포외다당류는 동결건조하여 조다당류으로 분리하였고, 이를 선발 균주의 세포외 다당류 생산량으로 하고 물성시험에 사용하였다. 또한 p-m10356의 분석을 위하여 세포외 다당류의 성분 및 구조분석을 위한 정제시료는 기존에 분리한 조다당을 정제하였다. 조다당 1 g을 증류수에 녹이고 CPC (cetyl pyridinium chloride)를 0.3%되게 첨가한 후 shaker로 30분간 천천히 혼합한 후 침전시켰다. 이 후 침전된 혼합물은 다시 원심분리기 (Sorvall, USA)로 9,000 x g로 20분간 원심분리하여 상등액은 제거하고 침전물을 다시 10% NaCl에 용해하였다. 이를 다시 2배의 100% cold ethanol을 첨가하여 4°C에서 24시간 냉침하고 다당류를 침전시켜 ethanol을 제거한 후 원심분리하여 세포외다당류를 재 회수한 후 증류수로 녹이고 투석막 (D0655, Sigma, USA)에서 2일간 흐르는 물에서 투석하고 다시 1일간 4°C에서 3차 증류수로 투석한 후 동결건조 하였다. 이 후 정제다당류를 겔 투과 크로마토그래피를 거쳐 정제하였다. Sepadex Sepharose 4B을 컬럼 (1.5 x 75 cm)에 충전하고 0.4M NaCl 완충용액에 시료를 녹여 컬럼에 주입하였다. 동일 완충용액을 사용하여 0.5ml/min의 유속으로 용출하였다. Fraction collector (Eyela, Japan)로 2ml씩 분획하여 분석에 이용하였다.

p-m10356의 형태학적 특성을 관찰하기 위하여 p-m10356을 0.1%가 되도록 증류수

에 녹인 후 동결건조하고, 이를 이온증착기를 이용하여 gold coating한 후 주사전자현미경 (Scanning Electron Microscopy, JSM-5410LV, JEOL, Tokyo, Japan)을 이용하여 15,000 배율에서 미세구조를 관찰하였다.

p-m10356 구성당을 조사하기 위하여 정제된 다당류 50mg을 산 가수분해하여 TLC로 분석하였다. p-m10356을 구성하는 환원당은 모세관 전기영동기 (3DCE, Hewlett Packard, USA)을 이용하여 다음의 조건으로 분석하였다.

1. Water : Distilled water for HPCE (Hewlett-Packard)
2. Capillary Electrophoresis instrument : HP3D CE (Hewlett-Packard) equipped with a diode array detection (DAD) system
3. Electrophoretic conditions : Untreated fused silica column 57 cm (total length) \times 50 μ m i.d, 75 mM morpholine, pH 5.0, 24kV, 20 $^{\circ}$ C
4. Injection : Pressure injection of 5 seconds (50 mbar)
5. Detection : Absorption at 350 nm
6. Polarity : Negative
7. Current : 150 mA

표준당은 TLC에서 Rf치가 일치하는 단당을 기준으로 하여 검량선을 작성하고 단당의 조성 및 함량비를 분석하였다.

분자량 측정은 p-m10356 0.1% 다당류 수용액 1ml을 Sepadex 4B를 이용한 겔 여과 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 표준물질로 텍스트란 (분자량 2 mDa, 500 kDa, 70 kDa : Sigma, USA)과 p-m10356의 용출 시간 비와 log-scale의 분자량과의 관계를 표준곡선으로 분자량을 결정하였다.

물질이 결정체로부터 다른 형태로 변화할 경우 물리적 변화를 일으키는데, 물리적 변화는 열의 증감으로 표현된다. p-m10356의 열분해 특성을 조사하기 위하여 정제 다당류의 열분해 특성을 조사하기 위하여 시차주사열량계 (differential scanning calorimeter)의 경우, p-m10356 5.0mg을 넣은 후 봉합하여 시료를 넣지 않은 대조구와 함께 DSC-4 (Perkin-Elmer, USA)를 이용하여 분당 15 $^{\circ}$ C씩 온도를 올려가면서 25 $^{\circ}$ C에서 250 $^{\circ}$ C까지 다당류의 용점 및 흡열되는 열량을 조사하였다.

p-m10356은 크림색의 섬유상 물질로서 용매에 대한 용해도는 p-m10356 1 mg을 formaldehyde, 10N NaOH, 5N HCl, formic acid, benzene, acetone, DMSO, chloroform, ether, ethanol, methanol 및 증류수 등에 용해하고 불용성 및 용해성 분획을 나누어 조사하였다.

p-m10356의 물성조사를 위하여 물성계수를 조사하였고, 다당류 용액에는 전단속도 (shear rate)의 변화에 대해 점도 (viscosity)의 변화를 보여주는 곡선의 형태는 대수 감소 곡선의 형태를 보이지만 전단응력 (shear stress)을 나타내는 곡선의 형태는 전단속도의 증가에 따라 증가하는 형태의 곡선으로 서로 다른 형태를 보이므로 조건에 대한 물성변화를 조사하였다.

농도에 의한 물성변화는 p-m10356을 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 및 1.0% (w/v) 농도의 용액으로 25°C에서 농도 변화를 주어 전단속도에 따른 전단응력을 조사하였다.

온도에 의한 물성변화는 p-m10356의 1% 다당류 수용액을 이용하여 10, 25, 40, 60°C까지 점진적으로 온도를 올리면서 다당류의 물성을 관찰한 후 다시 25°C로 다당류를 냉각시켜 물성을 조사하였다.

pH에 의한 물성변화는 p-m10356 1.0% 수용액을 pH 2에서 pH 12사이로 각 pH의 대조구별 다당류의 물성변화를 조사하였다.

염 (NaCl, CaCl₂)에 의한 물성변화는 p-m10356 다당류의 1% 용액에 각각의 염을 0.25, 0.5, 1.0, 2.0%의 농도로 처리하여 전단응력의 변화를 비교하였다.

열처리 효과는 고온처리 후에 변화하는 물성을 확인하기 위하여 p-m10356을 60°C, 80°C, 100°C 및 121°C에 각각 처리한 후 25°C로 다시 냉각시켜 변화하는 물성의 특징을 조사하였다.

p-m10356의 사슬- 입체구조의 특성을 관찰하기 위하여 묽은 용액의 고유점도 $[\eta]$ 를 Cannon-Fenske 모세관 점도계를 사용하여 Huggins 방정식 및 Karamer 방정식에 의한 고유점도를 측정하였다.

2. 연구결과

가. 돌연변이주 제조

세포외다당류의 생성이 우수한 *Hahella chejuensis* 96CJ10356에 0.01 M, 0.1 M, 0.2 M, 0.5 M의 EMS를 각각 처리한 결과 156 종류의 mutant를 확보할 수 있었다 (Table 3-21). EMS에 의하여 유도된 변이주 미생물 집락은 Fig. 3-40과 같다. EMS를 처리하여 얻은 색소형성 돌연변이는 흰색에서 진한 적색까지 다양한 색소변화를 보여 주었으며 (Fig. 3-40), 그 중에서 m10356을 분리하였다. 분리된 무색소성 변이주는 5회 이상의 고체배지 계대 후 얻은 무색소 변이주를 액체배양하고 분광광도계(UV-VIS 2401PC, Japan)를 이용하여 적 색소의 생산이 이루어지지 않는 것을 확인하였다. 이상의 결과로부터 *H.chejuensis* 96CJ10356에서 무색소 변이주를 돌연변이원 EMS를 처리하여 유도, 선발하였고, 이 균주를 *H.chejuensis* m10356으로 명명하고, 2003년 4월 30일자로 한국생명공학연구소 내 유전자은행에 기탁하여, 수탁번호 KCTC10324BP를 부여받았다.

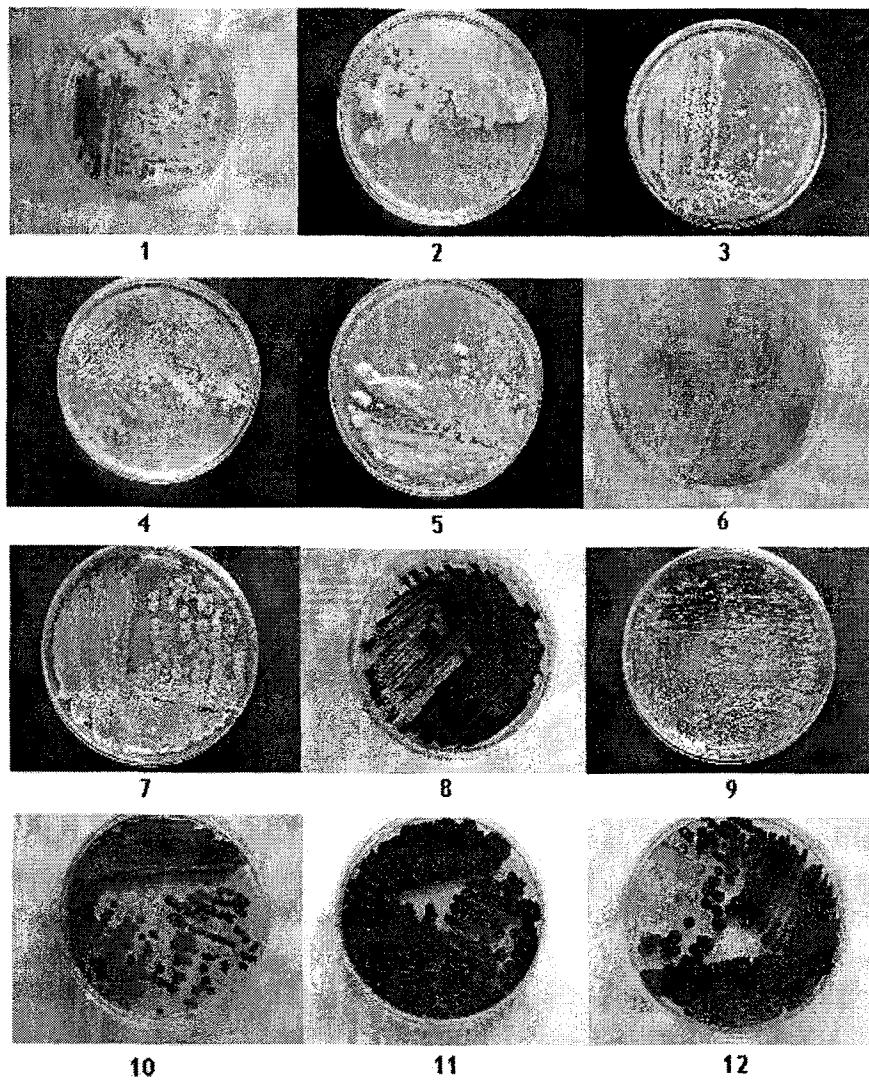


Fig. 3-40. Mutants of exopolysaccharide-producing marine bacteria
Hahella chejuensis.

1. *Hahella chejuensis* wild type; 2-12. mutants of *Hahella chejuensis*

Table 3-21. Mutants list of exopolysaccharide-producing marine bacteria *Hahella chejuensis*.

Number	Description	Number	Description
001	White, mucoid, flat, smooth	035	Red; smooth; shining; umbonate
002	Grey-yellow, mucoid; convex	036	Dark purple; smooth; flat
003	Grey-yellow, mucoid, flat	037	Rough;
004	Grey-yellow, flat,	038	Red; entire; metal shining;flat
005	Similar to 002	039	Maroon; shining; flat
006	Purple-red; mucoid; raised, shining	040	Purple-red; smooth; flat; shining
007	Purple-red; mucoid; convex; metal shining	041	Light purple-red; smooth; flat
008	Purple-red; mucoid; flat; metal shining	042	Purple-red; rough; flat; shining
009	Purple-red; mucoid; flat; metal shining	043	Purple-red; convex; shining
010	Purple-red; metal shining; convex	044	Purple-red; convex
011	Purple-red; mucoid; convex	045	Maroon; flat; mucoid; rough
012	Light Purple-red; mucoid; convex	046	Grey-yellow, flat, smooth
013	Dark Purple-red; mucoid; convex	047	Purple-red; convex
014	Metal shining	048	Purple-red; flat; shining; rough; mucoid
015	Purple-red; flat; metal shining	049	Dark red; flat; rough; mucoid
016	Purple-red; mucoid; convex	050	Purple-red; flat; shining; smooth
017	Grey-yellow, flat,	051	Red; flat; moist
018	Dark Purple-red	052	Dark red; flat; metal shining
019	Purple-red; mucoid; convex	053	Purple-red; flat; metal shining; smooth; mucoid
020	Purple-red; flat; metal shining	054	Grey-yellow; flat; smooth; moist
021	Dark Purple-red	055	Purple-red; flat; smooth; moist
022	Purple-red; flat; shining	056	Purple-red; flat; smooth; moist; metal shining
023	Purple-red; smooth; shining	057	Red; metal shining;flat
024	Grey-yellow, flat, smooth	058	Light yellow; translucent; convex; mucoid
025	Purple-red; convex	059	Purple-red; flat; smooth
026	Grey-yellow, flat, smooth	060	Purple-red; flat; metal shining
027	Dark red; flat; metal shining	061	Light Purple-red; flat; smooth
028	Grey-purple; flat;	062	Dark Purple-red; flat; smooth
029	Purple-red; mucoid; convex	063	Light Purple-red; convex; rough
030	Dark red; flat;	064	Dark purple-red; flat; metal shining
031	Maroon convex	065	Dark purple-red; convex; shining
032	Grey-yellow, flat, smooth	066	Light Purple-red; flat; smooth
033	Grey-yellow, flat, smooth	067	Dark red; flat; rough; shining
034	Grey-yellow, flat, smooth	068	Dark purple-red; convex; mucoid

Table 3-21. Continued

Number	Description	Number	Description
069	Dark purple-red; convex; mucoid; shining	104	Grey-yellow; flat; smooth
070	Dark purple-red; raised; mucoid; shining	105	Grey-yellow; flat; smooth
071	Dark purple-red; convex;	106	Dark red; smooth; shining?
072	Light yellow-frey; flat; smooth; moist	107	Dark red; convex
073	Flat; rough	108	Dark red; flat; smooth
074	Dark purple-red; flat; mucoid; shining	109	Smooth
075	Yellow-grey; flat; rough	110	Purple-red; convex;
076	Light purple-red; flat; rough	111	Dark red; shining; rough
077	Dark purple-red; flat; metal shining	112	Dark red; flat; smooth; shining
078	Dark red; convex; mucoid	113	Dark red; convex
079	Maroon; raised; metal shining	114	Dark red; convex
080	Light purple-red; flat; rough	115	Black red; shining; flat; smooth
081	Dark purple-red; convex; mucoid	116	Dark red; convex
082	Dark purple-red; flat; shining	117	Maroon red; convex
083	Dark red; flat; smooth; metal shining	118	Dark red; flat; rough; shining?
084	Dark purple-red; flat; rough	119	Black red; flat; rough
085	Light purple-red; flat; rough	120	Purple-red; flat; umbonate
086	Yellow-grey; flat; smooth; mucoid; moist	121	Light purple-red; flat; smooth
087	Light purple-red; flat; smooth; mucoid; moist	122	Dark red; convex
088	Maroon; flat; moist; mucoid;	123	Black red; flat; smooth
089	Purple-red; flat; smooth; moist	124	Black red; flat; smooth; moist; mucoid
090	Purple-red; flat; smooth; shining	125	Dark red; mucoid; flat; shining?
091	Purple-red; flat; smooth; moist; mucoid	126	Dark red;
092	Dark purple-red; rough	127	Dark red; convex
093	Dark purple-red; smooth; mucoid; shining	128	Dark red
094	Dark purple-red; mucoid; rough	129	Purple-red; flat; rough
095	Light purple-red; smooth; mucoid; shining	130	Dark red; flat; rough
096	Grey-blue; convex; rough	131	Dark red; flat; rough
097	Grey-blue; flat; smooth	132	Dark red; flat; rough; metal shining
098	Purple-red; flat; metal shining	133	Purple-red; flat; rough
099	Dark purple-red; convex; shining?	134	Purple-red
100	Dark red; flat; rough	135	Purple-red
101	Dark purple-red flat; smooth; metal shining	136	Purple-red
102	Dark red; flat; metal shining	137	Metal shining
103	Similar to 102	138	Dark red

Table 3-21. Continued

Number	Description
139	Grey-brown;
140	Metal shining
141	Flat
142	Dark red; flat; rough
143	Red;
144	Dark red; flat; smooth
145	Grey-yellow; flat
146	Grey-yellow; convex
147	Grey-yellow; flat
148	Grey-yellow; flat
149	Metal shining; flat
150	Metal shining; flat
151	Dark red; flat; rough
152	Grey-yellow; flat
153	Metal shining; flat
154	Metal shining; flat
155	Metal shining; flat
156	Metal shining; flat; smooth

나. 돌연변이주의 다당류 생산 최적조건

다당류의 구조는 배양방식에 따라 변하며, 구조에 따라 물성이 변하기 때문에 다당류의 생산조건 결정이 매우 중요하다. p-m10256의 생산 조건을 조사하기 위하여 배양조건을 온도, pH, 배양시간 및 접종량 등의 물리적 환경요인과 탄소원, 질소원, C/N ratio, 다량원소 및 미량원소의 조건을 조사하는 화학적 요구성에 대하여 조사하였다.

세포외다당류 생산에 요구되는 물리적 요인에서 온도는 25℃, 초발 pH는 7로 고정 (2000)의 조건으로 하였고, 배지양 및 접종량에 대하여 조사한 결과, 초기 접종량에 따른 p-m10356의 생성은 2.5%에서 3.66g/ℓ로 p-m10356의 생성이 가장 양호하였다. 또한 5.0% 접종량의 경우, 균체 생장은 2.61 g/ℓ로 균체 생장율이 가장 높았다. 그러나, 2.5% 접종량의 경우 p-m10356의 생산의 경우 3.66g/ℓ, 균체 생장의 경우 2.56 g/ℓ로 p-m10356의 생산 및 균체 생장이 모두 양호하였다 (Fig. 3-41). 따라서 p-m10356 생산을 위한 배양조건 실험에 있어 다당류의 생산 및 균체 생장이 유지되는 조건에서 생산요인의 변화 유도가 용이할 것으로 추측하여 2.0% 접종량을 p-m10356 생산을 위한 초기 접종량으로 선정하였다. 미생물에 의한 대사산물의 생산에 있어 초기 접종량은 목적산물의 생산성에 중요한 요인이 된다 (Sarkar *et al.*, 1985). 또한 플라스크 배양에 있어 최적의 배지량의 조사에서 배지양에 따른 p-m10356의 생성은 50 ml에서 2.16g/ℓ로 p-m10356의 생성이 가장 양호하였고, 균체 생장은 25 ml에서 2.63 (A660), 건조 세포중량은 3.07 g/ℓ으로 처리구에서 가장 높은 균체 생장이 관찰되었다 (Fig. 3-42). 따라서, 250 ml을 삼각플라스크의 경우, 50 ml 배지량을 p-m10356 생산이 최적 배지 양으로 결정되었다. 따라서 배양용기와 배지량의 비인 working volume은 1/5로 p-m10356 생산이 최적 배지 양으로 결정하였다. 따라서 p-m10356의 250 ml 삼각플라스크에서 최적 p-m10356의 생산을 위한 classical method의 물리적 인자는 Table 3-22와 같다.

p-m10356의 최적생산을 위한 탄소원 조건을 조사하기 위하여 xylose, fructose, glucose, lactose, galactose 및 sucrose를 각각 1.0% (w/v) 농도로 첨가하여 세포성장 및 세포외다당류의 생성을 조사한 결과를 Fig. 3-43에 나타내었다. 탄소원 처리구별 p-m10356의 생성은 xylose 2.16 g/ℓ, fructose 3.65 g/ℓ, glucose 4.28 g/ℓ, lactose 1.79 g/ℓ, galactose 0.6 5g/ℓ, sucrose 7.27 g/ℓ이었으며, 균체 생장 또한 sucrose 4.67 g/ℓ으로 나타났다. 따라서, sucrose를 탄소원으로 선별하였다. 균체의 생육은

glucose와 sucrose에서 양호하였으며, 다당류의 생산량 또한 균체량과 비례하여 생산되는 것으로 생각되며, xylose, galactose, lactose 등에서는 균체량과 다당류 생산량 등이 상대적으로 저조하였다. p-m10356의 생산에 적합한 sucrose의 농도를 조사하기 위하여 sucrose를 각각 1, 2.5, 5, 7.5, 10.0, 20.0% (w/v)의 농도로 첨가하여 세포성장 및 세포외다당류의 생성을 조사한 결과를 Fig. 3-44에 나타내었다. sucrose 처리구별 p-m10356의 생성은 7.5%에서 7.46 g/ℓ로 가장 높았다. 다당류의 생산을 위한 탄소원으로서는 글루코오스와 수크로오스가 가장 흔히 사용되는 다당류인 xanthan gum 및 galactoglucan의 생산에 락토오스를 사용한 초기 연구가 있다. Souw 등 (1979)은 sucrose와 glucose의 농도가 40 g/ℓ일 경우에 xanthan gum의 수율이 높다고 하였으며, 일반적으로 미생물 다당류 생산을 위한 탄소원 최적 농도는 사용 균주에 따라 10~80 g/ℓ 정도로 보고되어 있다 (Williams *et al.*, 1978).

p-m10356의 최적생산을 위한 질소원 조건을 조사하기 위하여 유기질소원으로 yeast extract, pepton, tryptone, malt extract, soytone과 무기질소원인 NH_4NO_3 , NaNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 등을 각각 0.5%씩 첨가하여 세포성장 및 세포외다당류의 생성을 조사한 결과를 Fig. 3-45에 나타내었다. 질소원 처리구별 p-m10356의 생성은 tryptone에서 5.36 g/ℓ로 가장 양호하였으며, 균체 생장은 yeast extract의 경우 2.03 g/ℓ로 가장 높았으며, 특히 malt extract에서도 2.02 g/ℓ로 양호한 균체 성장율을 보였다. 따라서, 0.5% tryptone의 경우 $Y_{p/x} = 5.90$ 으로 p-m10356의 생성이 양호하였다. pH는 tryptone이 전 처리구에 있어 8.1로 초기 pH보다 상승하였다. 따라서 tryptone을 질소원으로 선별하였다. Iwamuro 등 (1983)은 *Porodisculus pendulus* 각각의 균주에서 유기질소원의 첨가에 의해 다당류 생산을 증가시켰으나, 4.0 g/ℓ 이상의 tryptone 첨가 시 다당류 생산이 더 이상 향상되지 않았음을 보고한 바 있다.

p-m10356의 최적생산을 위한 탄소원대 질소원의 비 (C/N ratio) 조건을 조사하기 위하여 탄소원대 질소원의 비를 각각 0.05, 0.1, 0.5의 비율로 첨가하여 세포성장 및 세포외다당류의 생성을 조사한 결과를 Fig. 3-46에 나타내었다. C/N 비는 20에서 p-m10356의 생성은 9.51 g/ℓ로 가장 양호하였으며, 균체 생장은 50에서 5.24 g/ℓ로 가장 높았다. 따라서, C/N 비는 sucrose 7.5%와 tryptone 0.35%인 20의 조건에서 $Y_{p/x} = 2.87$ 로 p-m10356의 생성이 가장 양호하였다. pH는 tryptone은 전 처리구에 있어 5.7로 초기 pH보다 낮아졌다.

Table 3-22. The physical conditions of p-m10356 production

Factors	Conditions
media volume	50 ml
inoculum volume	2.5%
temperature	25 °C
initial pH	0.01 g/ l
flask volume	250 ml

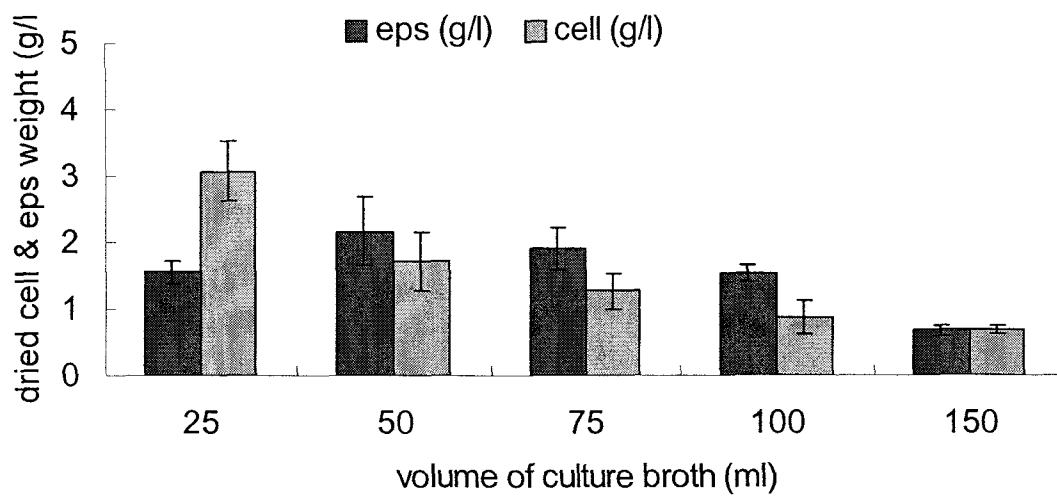


Fig. 3-41. Effect of media volume on the production of p-m10356 and cell growth.

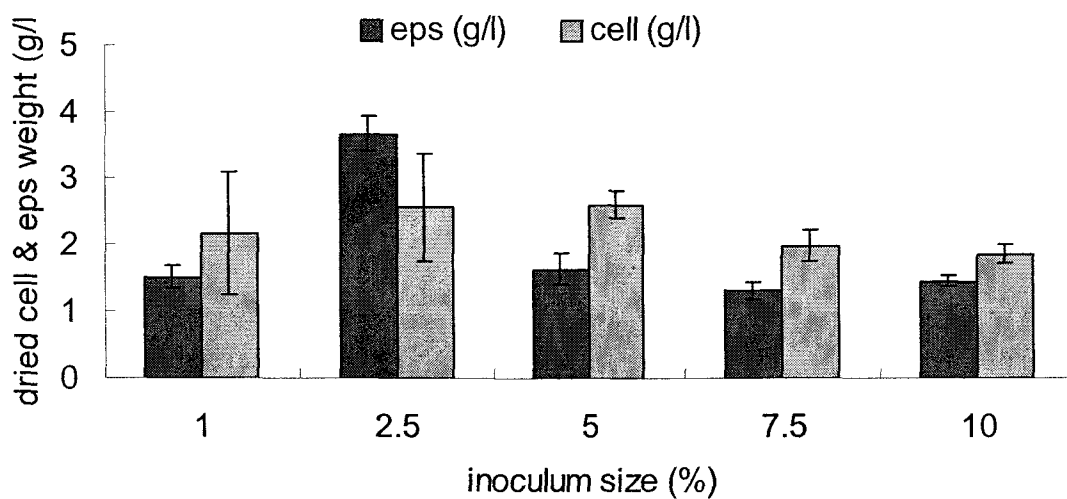


Fig. 3-42. Effect of inoculum size on the production of p-m10356 and cell growth.

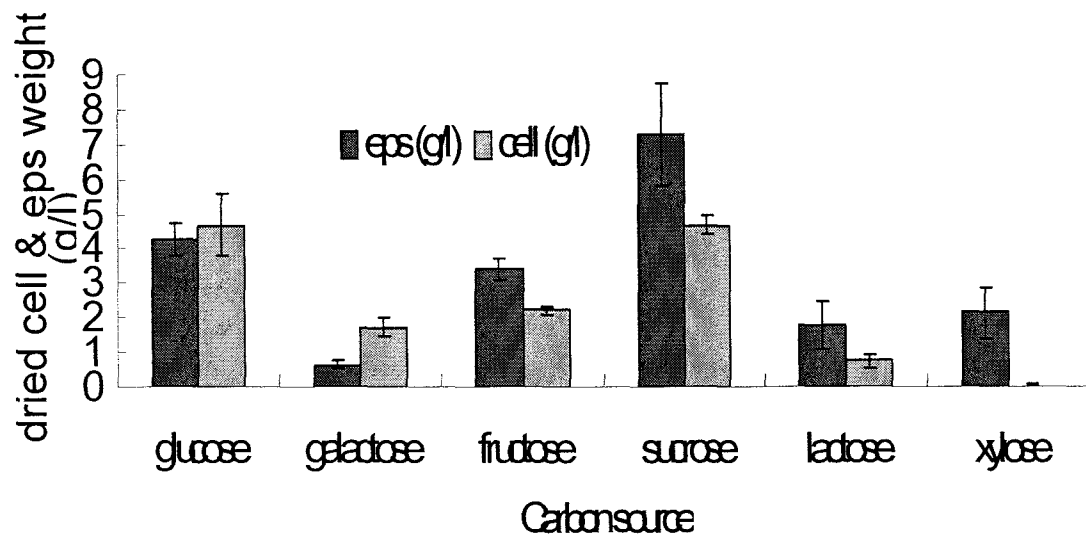


Fig. 3-43. Effect of carbon sources on the production of p-m10356 and cell growth.

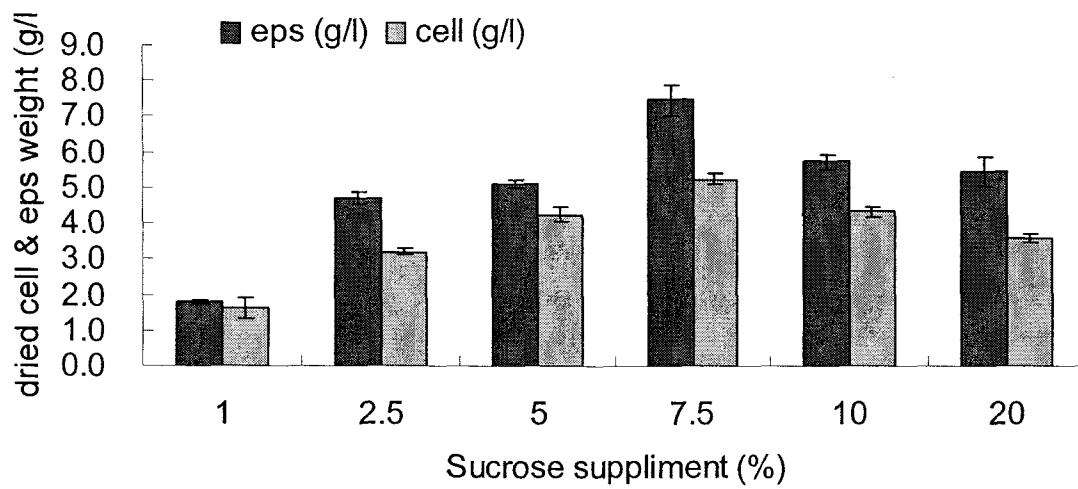


Fig. 3-44. Effect of sucrose concentrations on the production of p-m10356 and cell growth.

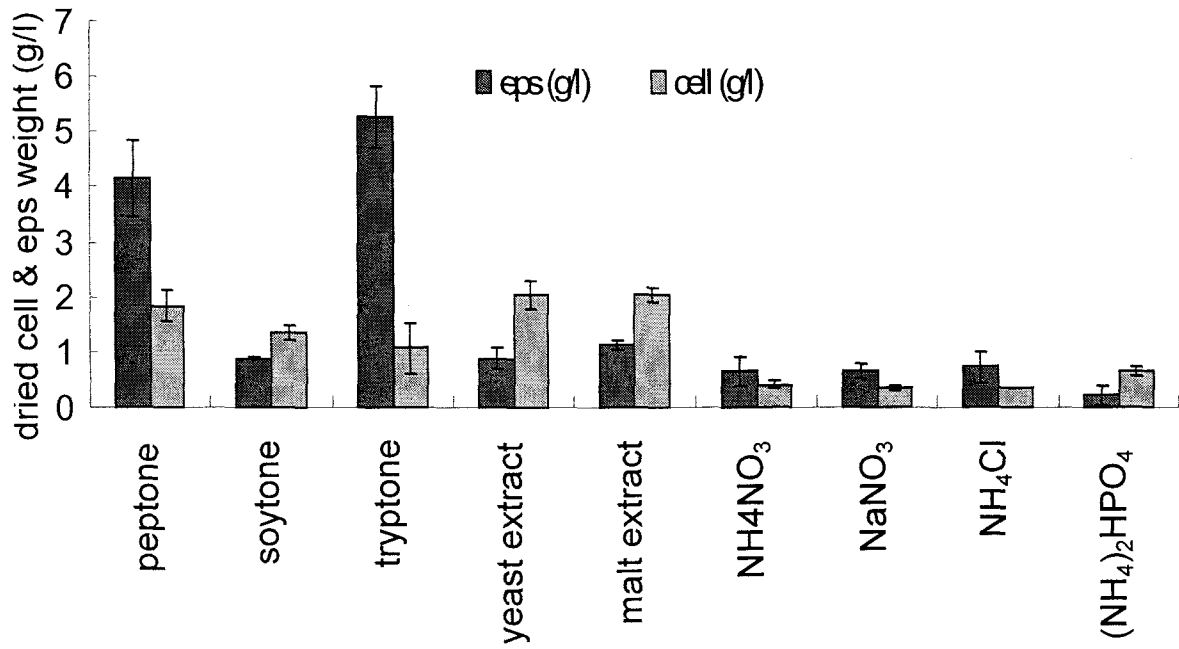


Fig. 3-45. Effect of nitrogen sources on the production of p-m10356 and cell growth.

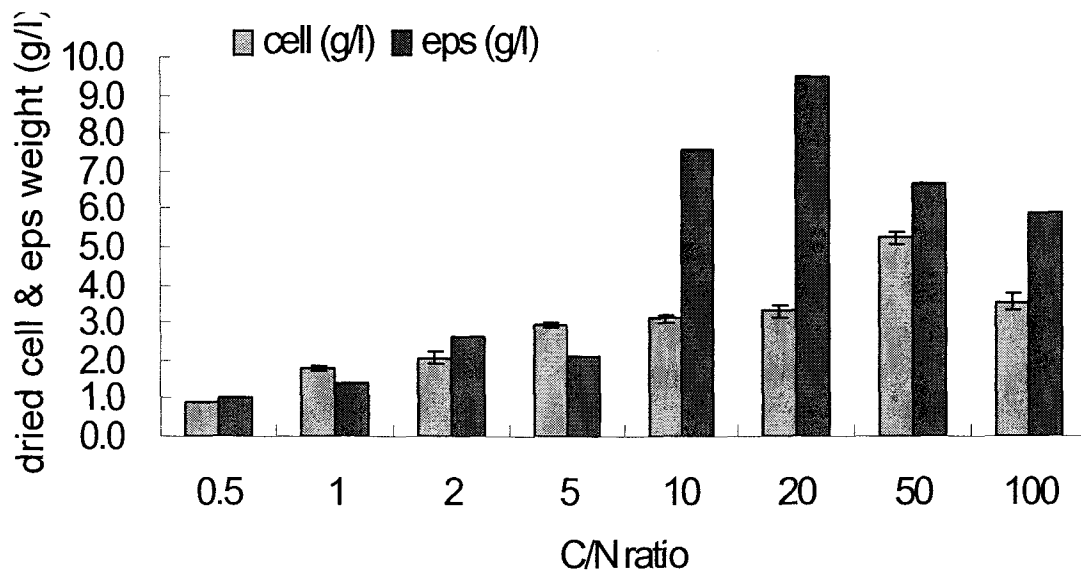


Fig. 3-46. Effect of C/N ratios of the production of p-m10356 and cell growth.

p-m10356의 최적생산을 위한 다량원소 및 미량원소의 조건을 조사하기 위하여 무기인산인 KH_2PO_4 0.083 g 및 K_2HPO_4 0.067 g, 다량원소로서 NaCl 1%, MgSO_4 5%, CaCl_2 0.07%, 미량원소로는 $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.001 g Na_2MoO_4 0.001 g, ZnCl_2 0.001g 등의 처리는 고 등 (2000)의 조건을 이용하였다. 따라서 p-m10356 생산을 위한 최적 조건은 sucrose 7.5%, tryptone 0.35%, KH_2PO_4 0.083 g/ℓ 및 K_2HPO_4 0.067 g/ℓ, NaCl 10%, MgSO_4 는 5%, CaCl_2 는 0.1 %, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g/ℓ, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.001 g/ℓ, Na_2MoO_4 0.001 g/ℓ, ZnCl_2 0.001 g/ℓ 및 증류수를 첨가하여 최종 용량이 1,000 ml이 되도록 하고, pH 7, 온도 25℃, 접종량 2.5%의 양으로 제조한 배지 조성을 본 발명에서는 “M-m10356”이라 명명하였고, 상기 M-m10356을 p-m10356 생산 최적 배지 조건으로 하였다 (Table 3-20).

5ℓ 회분식 배양기를 이용하여 M-m10356 배지에서 24시간 배양된 균주를 3ℓ의 working volume에 2.5% 접종하여 균주를 배양하고 균체의 성장, 다당류 생산, 다당류의 점도변화 및 pH의 변화를 조사하였다. 이때 배양온도는 25℃이었고, 200 rpm에서 통기량은 1.5 vvm으로 설정하였다. 시간 경과에 따른 p-m10356 생산 결과를 Fig. 3-47에 나타내었다. 배양시간이 경과함에 따라 다당류 생산이 증가하는 것을 보였으며, 배양 72시간 후에는 최대치가 유지되었다. 최적조건의 경우에서 배양액 약 19.2g/ℓ의 최대 다당류 생산량이 얻어졌고, 배양 72시간까지 균체 생장이 증가하였으나, 72시간 이후에는 균체 증식이 감소하였다. 이러한 현상은 배양액 내로 분비된 다당류의 점성이 높아짐으로 인해 배양액 자체가 높은 점성을 유지함으로써 산소전달이 원활하게 이루어지지 않았기 때문으로 추측된다. 또한 생산된 p-m10356와 *H.chejuensis* 96CJ10356 wild type의 균주형태 및 다당류의 색소침착을 비교한 결과는 Fig. 3-48와 같다. 따라서 *H.chejuensis* 96CJ10356의 EMS에 의한 돌연변이 유도에 의하여 적색색소에 침적된 *H.chejuensis* 96CJ10356에서 생산되는 EPS-R을 색소침적이 이루어지지 않은 p-m10356으로의 전환이 가능하였다.

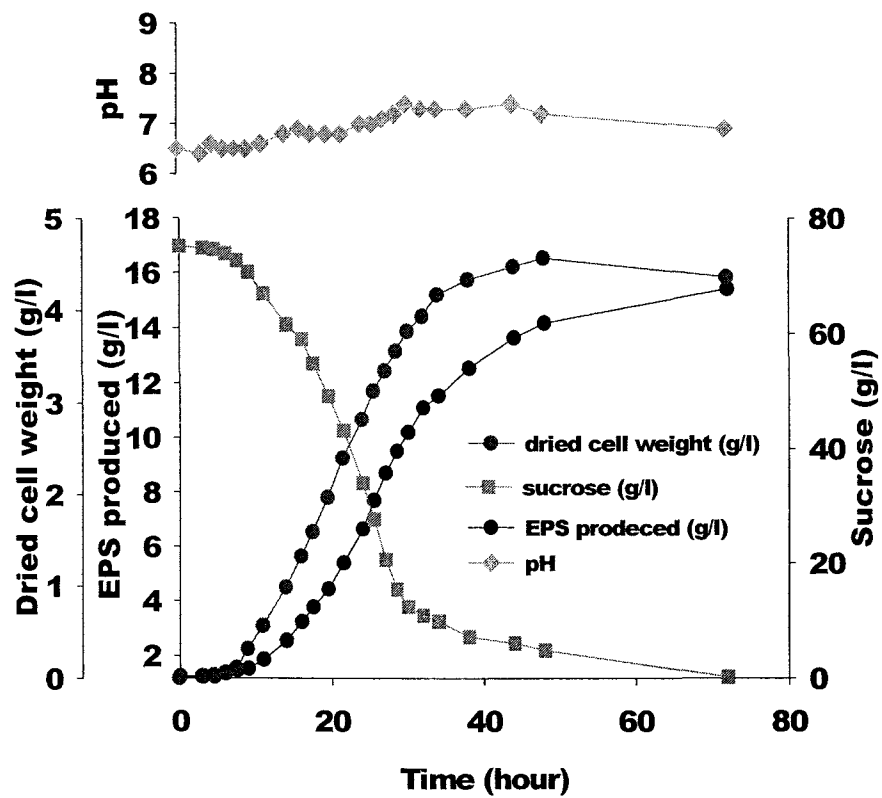


Fig. 3-47. Optimum condition for production of exopolysaccharide p-m10356 produced by white mutant m10356.

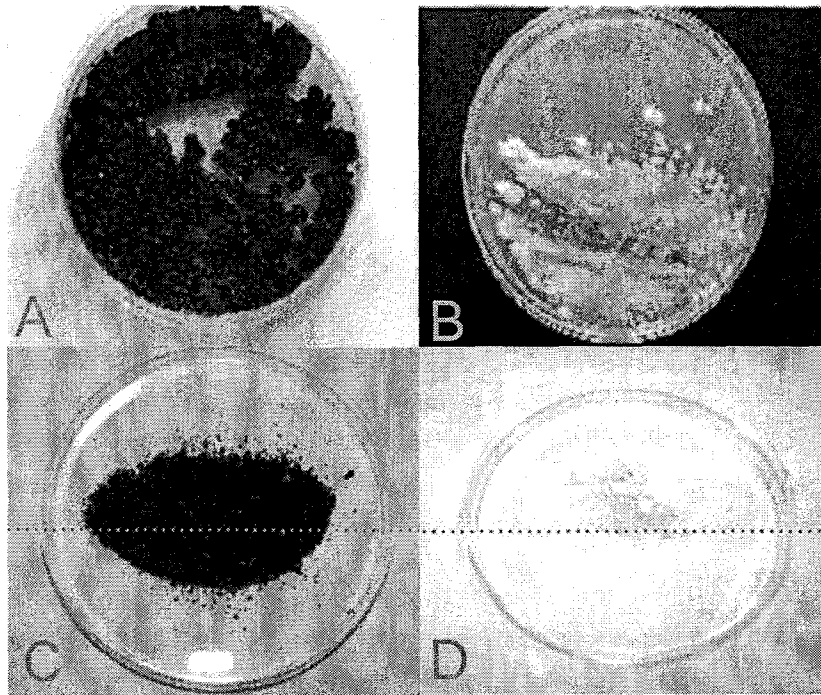


Fig. 3-48. White mutant of *Hahella chejuensis* 96CJ10356

A. wild type *Hahella chejuensis* 96CJ10356, B. white mutant m10356; C exopolysaccharide p-10356 produced by wild type strain. D exopolysaccharide p-m10356 produced by white mutant m10356.

다. 돌연변이주가 생산하는 EPS 특성

유화 안정능 ; p-m10356의 이용성 조사를 위하여 유화 안정능 조사결과를 Table 3-23 및 Fig. 3-49에 나타내었다. 0.5% 수용액 3 ml에 옥수수기름 2 ml을 첨가하여 혼합한 후 O/W (oil-in-water) 유상액을 제조하였다. 일반적으로 유화제로 사용되는 xanthan gum, gellan gum, sodium alginate, arabic gum 및 다당류 p-m10356을 첨가하여 비교하였을 때 xanthan gum은 244시간까지 현탁된 정도를 안정하게 유지되었으며, p-m10356 또한 244시간까지 현탁된 정도가 감소하지만 유지되었다. gellan gum은 12시간까지 현탁되었다가 액층이 분리되었고, sodium alginate 및 arabic gum은 현탁이 일어나지 않았으며, *H.chejuensis* 96CJ10356에서 생산되는 EPS-R 보다 유화안정능이 우수한 것으로 조사되었다. 따라서 다당류 p-m10356은 EPS-R과 마찬가지로 유화 안정제로서의 이용 가능성이 가능할 것으로 사료된다.

p-m10356의 다당류 특성을 조사하기 위하여, 배양액으로부터 생성된 세포외다당류, p-m10356을 분리, 정제한 후 분자량, 단당류 조성, 미세구조, 단백질 함량, 열 분해능, 용해도, 유화안정능 및 물성에 대하여 조사하였다.

EPS형태 ; p-m10356의 형태학적 특성을 관찰하기 위하여 주사전자현미경 (Scanning Electron Microscopy, JSM-5410LV, JEOL, Tokyo, Japan)을 이용하여 수행하였다. p-m10356을 0.1%가 되도록 증류수에 녹인 후 동결건조하고, 이를 이온증착기를 이용하여 gold coating한 후 주사전자현미경을 이용하여 15,000 배율에서 미세구조를 관찰한 결과를 Fig. 3-50에 나타내었다. p-m10356의 미세구조는 구상구조인 것으로 조사되었다

당조성 ; p-m10356 구성당을 조사하기 위하여 정제된 다당류 50mg을 산 가수분해하여 TLC로 분석한 결과는 Fig. 3-51 및 Fig. 3-52에서 관찰된 것과 같이 p-m10356을 구성하는 환원당의 주성분은 글루코오스와 갈락토오스로 나타났으며, 모세관 전기영동기(3DCE, Hewlett Packard, USA) 분석한 결과, 몰 중량 비(molar ratio)는 대략 1 : 1 : 1.1 정도로 3종의 당이 유사한 몰 구성비를 유지하는 것으로 보이며, 보조당으로 갈락투로닉산이 있는 것으로 조사되었다

Table 3-23. Emulsifying stability of p-m10356

Polysaccharides	Emulsification					
	12h	72h	96h	144h	168h	244h
p-m10356	++	+	+	+	+	+
EPS-R	++	++	+	-	-	-
Xanthan	++	++	+	+	+	+
Gellan	+	-	-	-	-	-
S o d i u m alginate	-	-	-	-	-	-
Arabic gum	-	-	-	-	-	-

++, completely emulsified; +, Partially emulsified; - : separated.

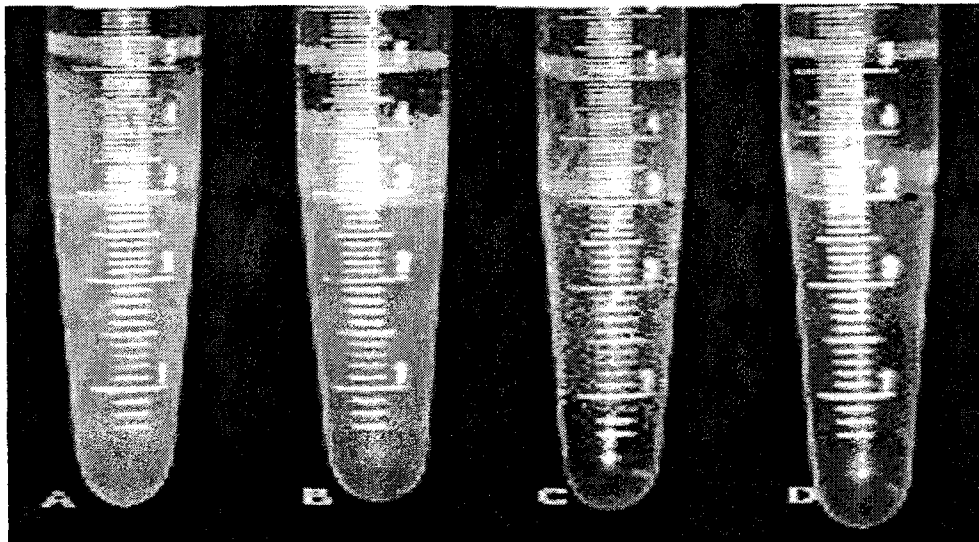


Fig. 3-49. The photograph of emulsifying stability of various polysaccharide and p-m10356

A. p-m10356, B. xanthan gum, C. gellan gum, D. sodium alginate

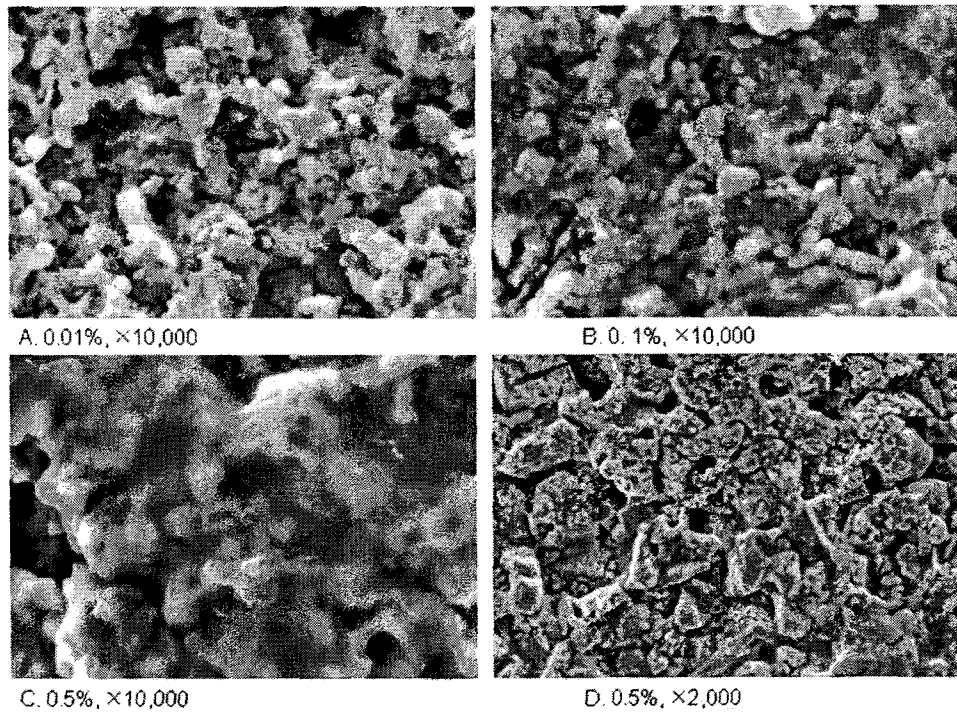


Fig. 3-50. Ultra-microstructure of p-m10356 by Scanning Electron Microscopy.



- 1: Arabinose, Glucuronic acid
- 2: Xylose, Glucose
- 3: p-M10356
- 4: Ribose, Galactose
- 5: Glucosamine
- 6: Galacturonic acid
- 7: Galactosamine

Fig. 3-51. TLC chromatogram of hydrolyzed of p-m10356

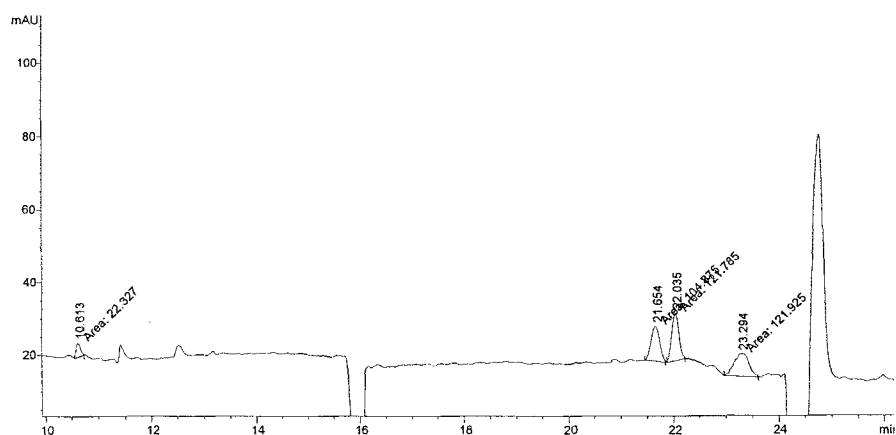


Fig. 3-52. Capillary electrophoresis chromatogram of hydrolyzed of p-m10356 for the monosaccharide analysis.

1. Water : Distilled water for HPCE (Hewlett-Packard)
2. Capillary Electrophoresis instrument : HP3D CE (Hewlett-Packard) equipped with a diode array detection (DAD) system
3. Electrophoretic conditions : Untreated fused silica column 57 cm(total length) \times 50 μm i.d, 75 mM morpholine, pH 5.0, 24kV, 20°C
4. Injection : Pressure injection of 5 seconds (50 mbar)
5. Detection : Absorption at 350 nm
6. Polarity : Negative
7. Current : 150 mA

EPS 분자량 ; p-m10356의 분자량 측정은 p-m10356 0.1% 다당류 수용액 1ml을 Sepadex 4B를 이용한 겔 여과 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 표준물질로 텍스트란 (분자량 2 mDa, 500 kDa, 70 kDa : Sigma, USA)과 p-KG03의 용출 시간 비와 log-scale의 분자량과의 관계를 표준곡선으로 분자량을 결정한 결과를 Fig. 3-53에 나타내었다. 조사한 결과 p-m10356의 분자량은 1.39×10^6 Da으로 조사되었다.

열분해 특성 ; 물질이 결정체로부터 다른 형태로 변화할 경우 물리적 변화를 일으키는데, 물리적 변화는 열의 증감으로 표현된다. p-m10356의 열분해 특성을 조사하기 위하여 시차주사열량계 (differential scanning calorimeter)의 경우, p-m10356 5.0mg을 넣은 후 봉합하여 시료를 넣지 않은 대조구와 함께 DSC-4 (Perkin-Elmer, USA)를 이용하여 분당 15°C 씩 온도를 올려가면서 25°C 에서 250°C 까지 다당류의 용점 및 흡열되는 열량을 조사한 결과 p-m10356의 열분해 온도는 125°C 였다(Fig. 3-54).

용해도 ; p-m10356은 크림색의 섬유상 물질로서 용매에 대한 용해도를 조사한 결과를 Table 3-24에 나타내었다. 포름알데히드(formaldehyde), 10N NaOH, 5N HCl 등에는 용해성이 우수하지만 유기용매인 벤젠, 아세톤, DMSO, 클로로포름, 에테르, 에탄올 및 메탄올 등에는 불용성으로 침전을 형성하였다.

물성계수 ; 물성계수 조사결과 p-m10356는 non-Newtonian fluid로 Power-Low model에 의한 pseudoplastic한 물성을 갖는 것으로 조사되었으며(Fig. 3-55), 유체성으로 p-m10356 1.0%의 균기 지수 (consistency index; K)는 407.6, 유동 지수 (flow behavior index; n)는 0.75였다(Fig. 3-56).

점도 ; 다당류 용액에는 전단속도(shear rate)의 변화에 대해 점도 (viscosity)의 변화를 보여주는 곡선의 형태는 대수 감소 곡선의 형태를 보이지만 전단응력 (shear stress)을 나타내는 곡선의 형태는 전단속도의 증가에 따라 증가하는 형태의 곡선으로 서로 다른 형태를 보인다.

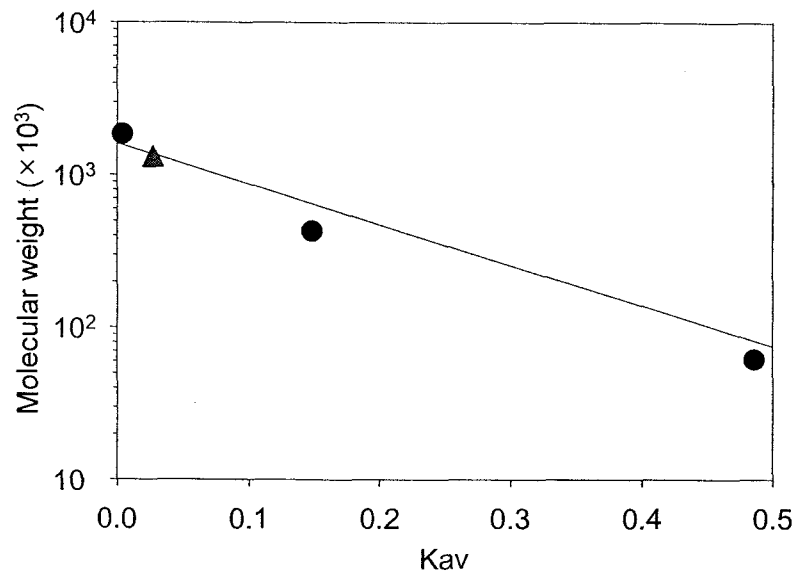


Fig. 3-53. Estimation of molecular weight of p-m10356 using Sephadose 4B gel chromatography.

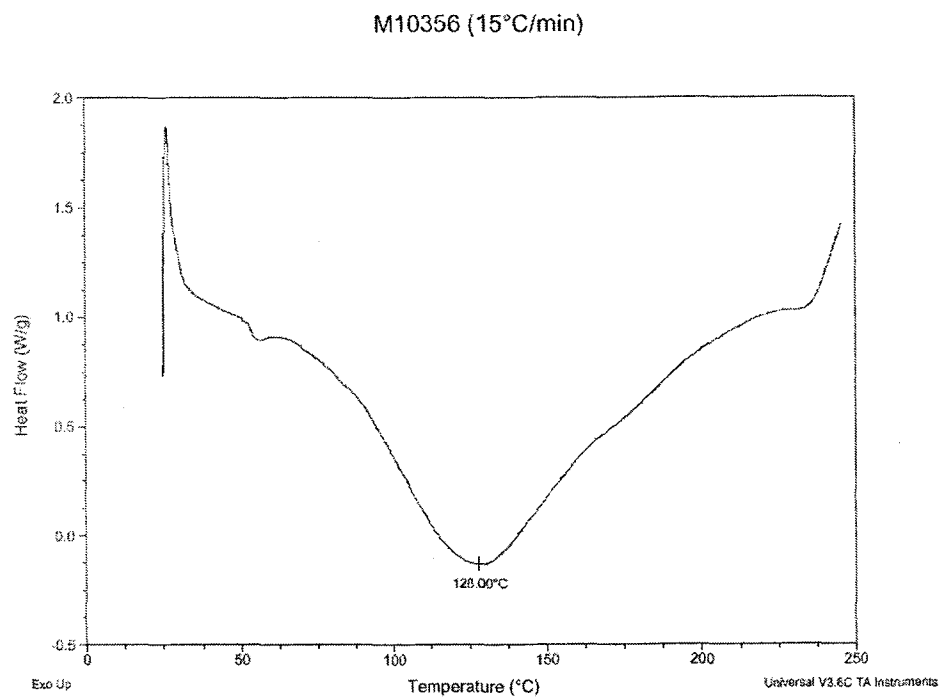


Fig. 3-54. Differential scanning calorimeter thermogram of p-m10356

Table 3-24. Solubility test of p-m10356 in various solvents.

Solvents	Solubility		
	++	+	-
formaldehyde	●		
formic acid		●	
benzene			●
acetone			●
DMSO			●
10N NaOH	●		
5N HCl	●		
chloroform			●
ether			●
ethanol			●
methanol			●
distilled water		●	

++ : very soluble, + : soluble, - : insoluble

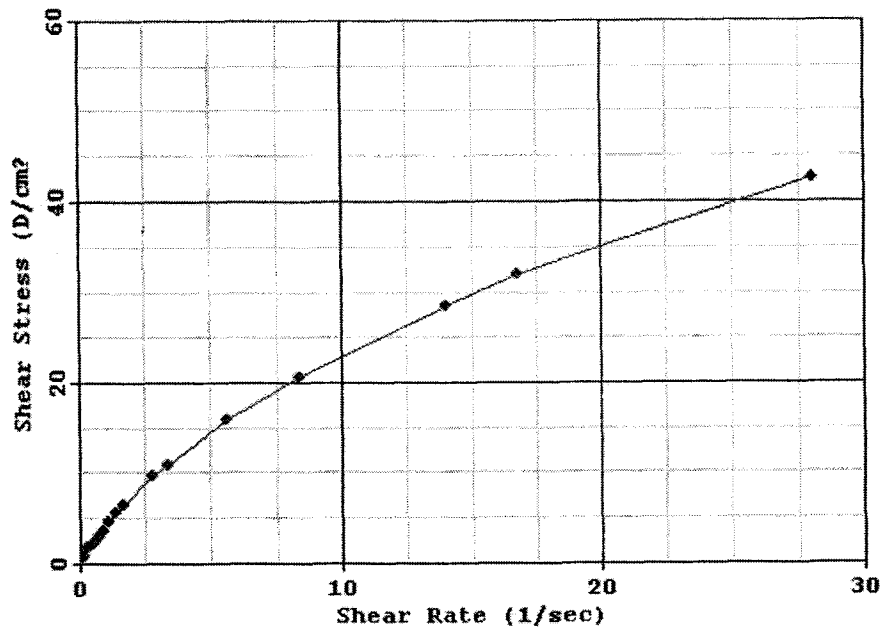


Fig. 3-55. Relationship between shear stress and shear rate of p-m10356 1.0% solution.

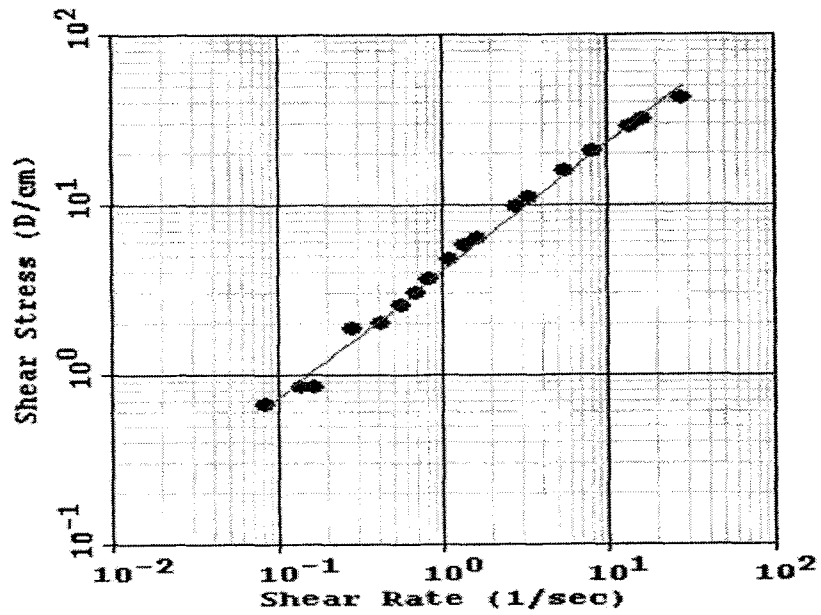


Fig. 3-56. Relationship between shear stress and shear rate of p-m10356 1.0% solution for the consistency index (K) and flow behavior index (η) analysis.

농도에 의한 물성변화는 p-m10356을 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 및 1.0%(w/v) 농도의 용액으로 25℃에서 농도 변화를 주어 전단속도에 따른 전단응력을 측정된 결과는 Fig. 3-57과 같다. 전단속도가 증가함에 따라 전단응력이 증가하였고, 다당류 농도의 증가에 따라 비례적으로 전단응력도 증가하였다. 이러한 결과는 높은 점도로 인하여 다당류 자체를 절단하는데 많은 힘이 요구된다는 것을 보여준다. 이러한 특징은 hyperbolic한 다당류 용액이 pseudoplastic한 성질을 갖는 non-Newtonian 용액일 때 전형적으로 보여지는 특징으로서 p-m10356은 pseudoplastic한 성질을 갖는 non-Newtonian 용액의 특징을 가지고 있는 수용성 gum임을 추측된다.

온도에 의한 물성변화는 p-m10356의 1% 다당류 수용액을 이용하여 10, 25, 40, 60℃까지 점진적으로 온도를 올리면서 다당류의 물성을 관찰한 후 다시 25℃로 다당류를 냉각시켜 물성을 조사한 결과는 Fig. 3-58과 같다. p-m10356은 온도가 올라감에 따라 전단속도에 대한 전단응력이 감소하였는데, 이는 온도증가에 의해 다당류의 점도가 감소함으로서 생긴 결과로 생각된다. 그러나 다시 25℃로 온도를 저하시켰을 때 전단속도에 대한 전단응력이 다시 증가하였는데, 이러한 물성으로 볼 때 p-m10356의 다당류는 가역용액 (reversible fluid)의 특징을 가지고 있는 것으로 보인다.

pH에 의한 물성변화는 p-m10356 1.0% 수용액을 pH 2에서 pH 12사이로 각 pH의 대조구별 다당류의 물성변화를 조사한 결과는 Fig. 3-59과 같다. pH의 변화에 따른 전단응력의 변화는 pH 2부근에서 전단응력이 조금 감소하는 추세를 보였으나 강 알칼리인 pH 12에서의 전단응력이 pH 7에서의 전단응력 보다 높은 것으로 보아 p-m10356의 다당류는 pH 전 범위에 걸쳐 비교적 안정한 물성을 가지는 것으로 보인다. 일반적으로 미생물에 의해 생산된 다당류용액의 대부분은 pH에 의존하여 물성이 변하는 것으로 보고되어 있다 (Heyn *et al.*, 1974; Tako, *et al.*, 1977). 최대의 점도를 보이는 pH 영역을 기준으로 하여 pH가 변함에 따라 이들의 점도 또한 변화하였다. 넓은 범위의 pH에서 안정한 물성을 유지하는 다당류들의 성질을 이용하여 식품이나 다른 산업용으로 이용되어지고 있으므로 p-m10356의 다당류 또한 새로운 용도 개발이 가능하다.

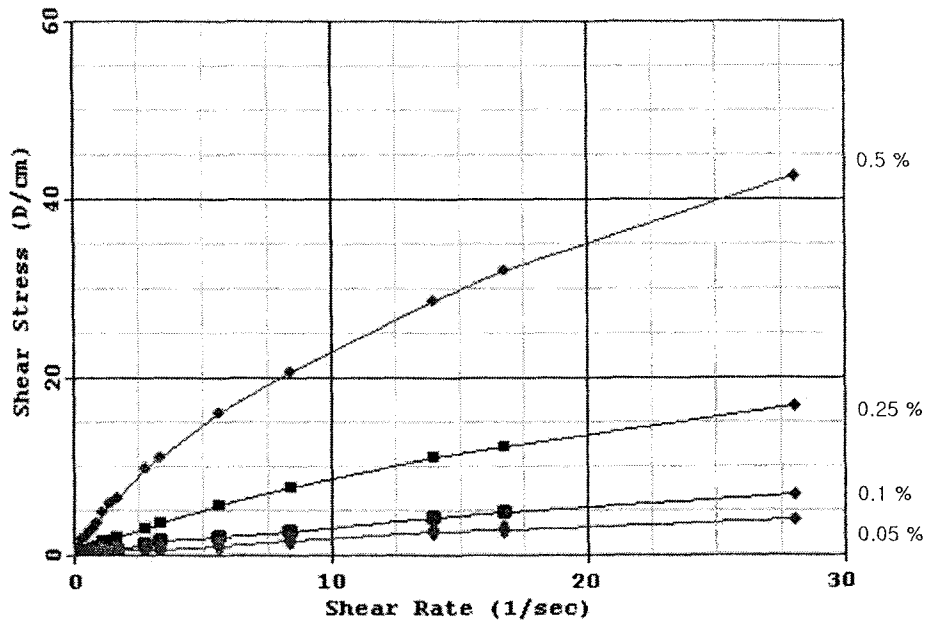


Fig. 3-57. Relationship between shear stress and shear rate of p-m10356 at different concentrations.

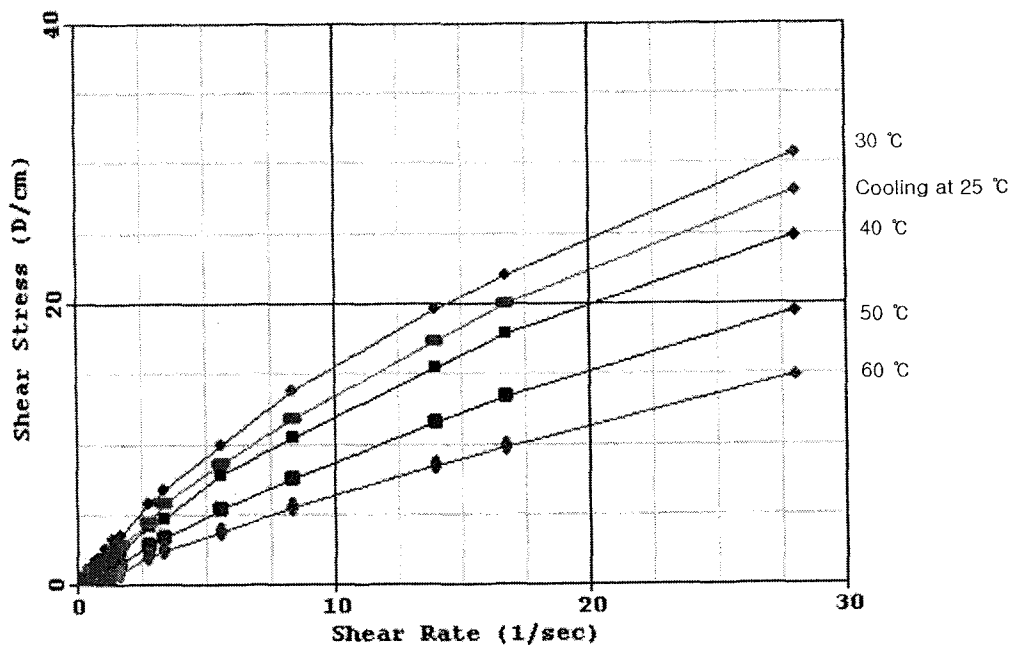


Fig. 3-58. Relationship between shear stress and shear rate of p-m10356 by heat treatment.

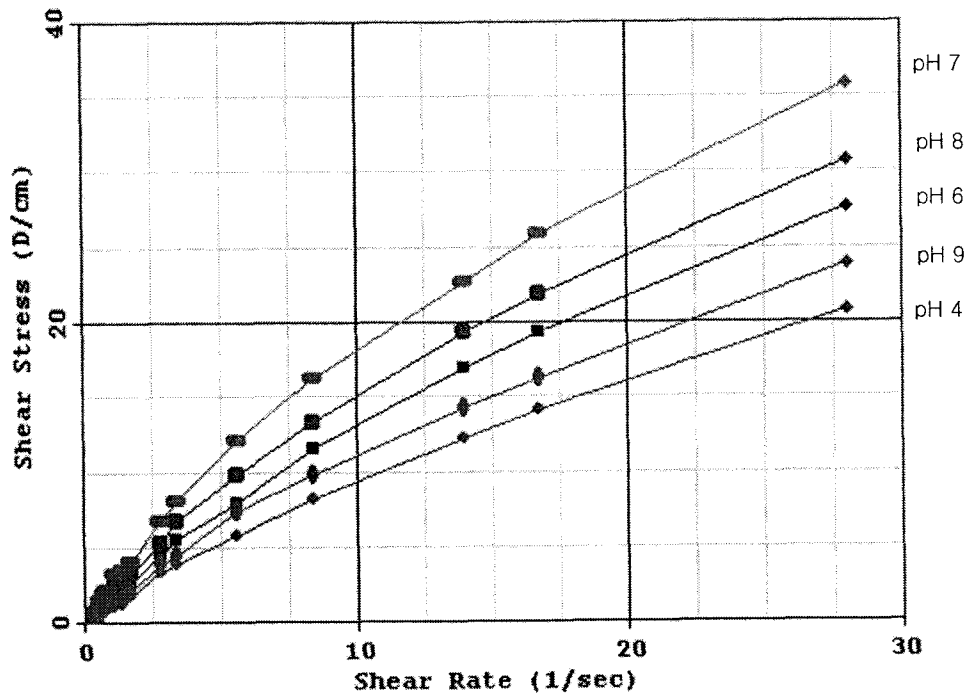


Fig. 3-59. Relationship between shear stress and shear rate of p-m10356 at different pH.

염 (NaCl, CaCl₂)에 의한 물성변화는 p-m10356 다당류의 1% 용액에 각각의 염을 0.25, 0.5, 1.0, 2.0%의 농도로 처리하여 전단응력의 변화를 비교한 결과는 Fig. 3-60 및 Fig. 3-61과 같다. NaCl의 경우, 0.25%에서 5.0%까지의 NaCl을 첨가한 구에서는 NaCl에 안정한 것으로 조사되었다. CaCl₂의 경우, 전 처리 농도에 대하여 전단응력은 일정하여 안정한 것으로 보인다.

열처리 효과에 의한 물성변화의 경우, 온도변화에 의한 물성조사에서 p-m10356은 온도가 증가함에 따라 전단응력이 감소하지만 냉각 후에는 전단응력이 증가하는 가역 용액 (reversible fluid)의 특징이 관찰되었다. 또한 고온처리 후에 변화하는 물성을 확인하기 위하여 p-m10356을 60°C, 80°C, 100°C 및 121°C에 각각 처리한 후 25°C로 다시 냉각시켜 변화하는 물성의 특징을 조사한 결과는 Fig. 3-62과 같다. p-m10356은 열처리에 의한 물성의 변화가 큰 것으로 조사되었다.

p-m10356의 사슬-입체구조의 특성을 관찰하기 위하여 묽은 용액의 고유점도 $[\eta]$ 를 Cannon-Fenske 모세관 점도계를 사용하여 Huggins 방정식 및 Karamer 방정식에 의한 고유점도를 측정된 결과는 Table 3-25 및 Fig. 3-63와 같다. p-m10356의 Huggins 방정식에 의한 고유점도는 68.1 dl/g 및 Karamer 방정식에 의한 고유점도는 58.8 dl/g이었다.

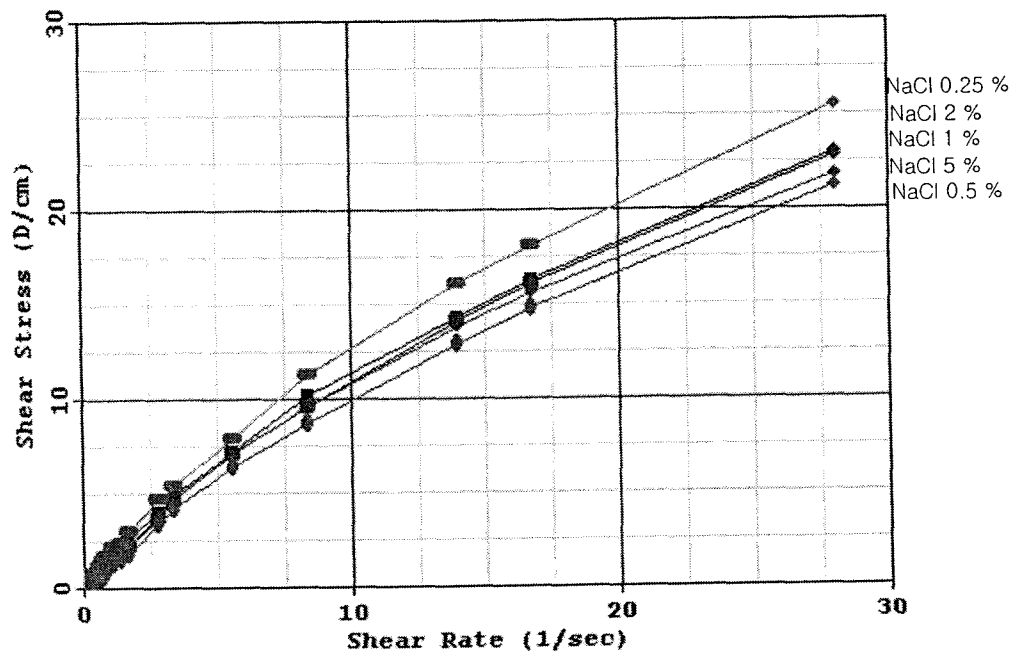


Fig. 3-60. Relationship between shear stress and shear rate of p-m10356 at different concentrations of NaCl.

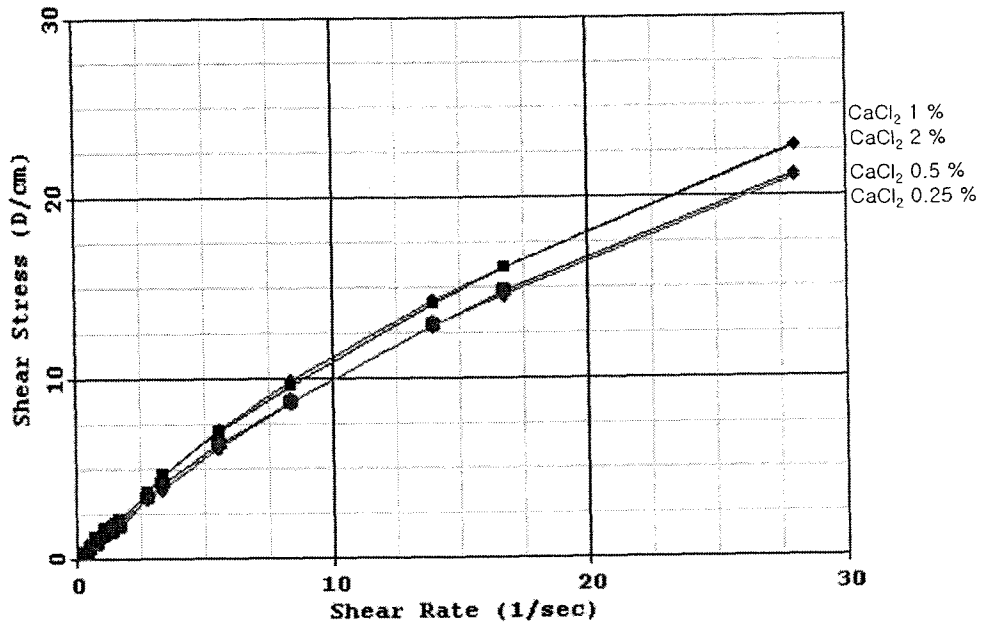


Fig. 3-61. Relationship between shear stress and shear rate of p-m10356 at different concentrations of CaCl₂.

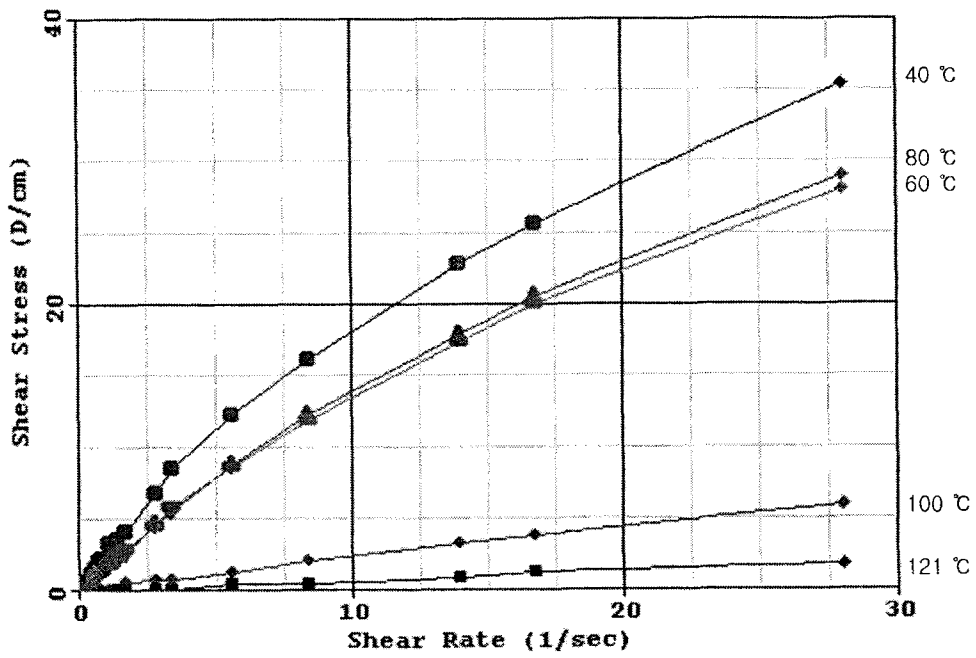


Fig. 3-62. Relationship between shear stress and shear rate of p-m10356 at different temperature.

Table 3-25. Viscosity for the concentration of p-m10356 fluid calculated by several equation at 25°C.

concentration (g/d l)	η (sec)	η_{sp} (-)	η_{red} (d l /g)	η_r (-)	η_{inh} (d l /g)
0.1	407.2	10.9	11.9	109.4	24.8
0.08	309.4	8.1	9.1	100.9	27.6
0.05	182.45	4.3	5.3	87.0	33.5
0.03	115.8	2.4	3.4	79.9	40.8
0.01	59.1	0.7	1.7	73.3	55.0

η (sec.) : solution viscosity, η_{sp} : specific viscosity, η_{red} : reduced viscosity, η_r : relative viscosity, η_{inh} : inherent viscosity, η_o : solvent viscosity(30.73 sec.)

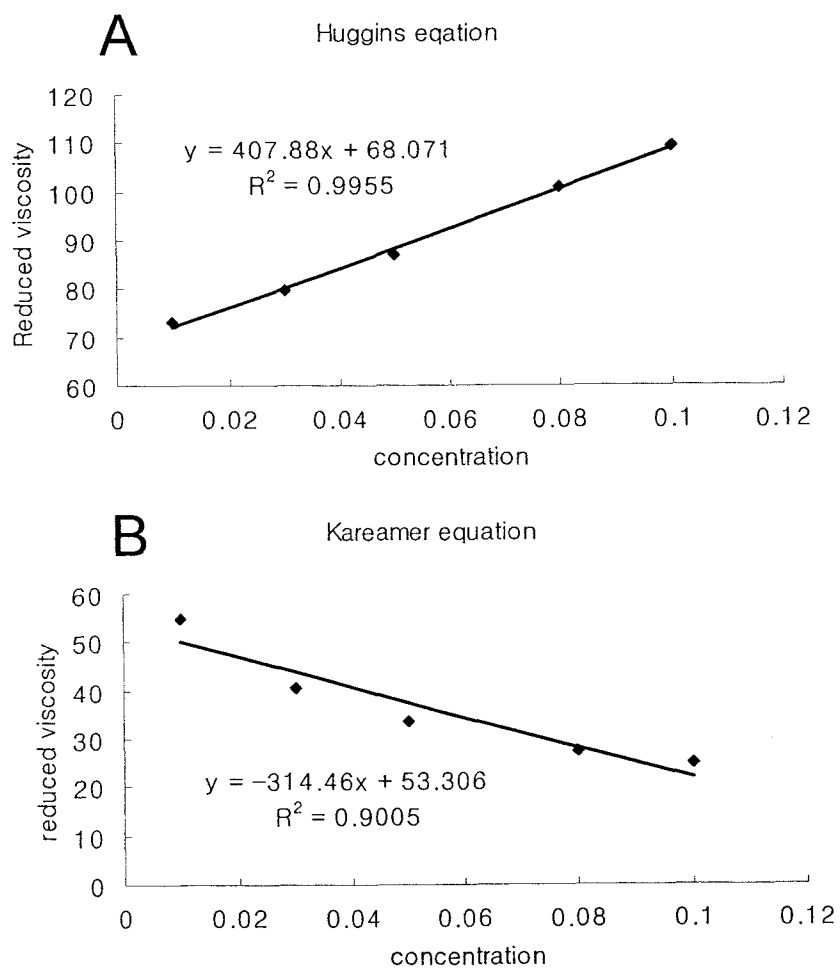


Fig. 3-63. Intrinsic viscosity of p-m10356 fluid calculated by reduced viscosity equation.

제 8 절 살조능 우수 해양미생물 색소 및 활용기술 개발

- *Hahella chejuensis* 적색색소는 0.1 - 0.01 ppm에서 30분 처리시 적조 *Cochlodinium polykrikoides*에 대한 살조효능이 95% 이상임

자연생태계의 식물성 미세조류는 먹이사슬 구조의 1차 생산자로서의 역할을 담당하고 있으며, 소비자와 분해자에게 탄소 및 에너지를 전달한다. 그러나 식물성 미세조류의 과다성장은 수계의 영양물질의 농도를 급격하게 상승시키며, 미생물의 과잉생산에 의하여 수계의 산소농도를 감소케 하여 때로는 혐기성 상태를 유발하여 해양생태계에 여러 영향을 미친다.

최근 우리나라의 해양에서도 규조류 (diatom)나 편모조류 (dinoflagellate)에 의한 적조가 빈번히 발생하여 생태계의 파괴 및 수산양식에 대한 피해가 심각하다. 한국 연근해에서 1980년대 이전이 적조 발생건수는 년 10건 이하였으나, 1985년 이후는 매년 30 - 40건을 상회하고 있어 그 발생빈도가 증가추세에 있으며, 적조유발 원인 조류종의 수도 다양해지고 있다.

특히 남해안의 부영양화 해역을 중심으로 유해, 유독성 적조가 발생하고 일부 미세조류 종에 의하여 발생하는 적조는 양식어업에 있어 매년 큰 피해를 주고 있으며, 매년 8월 이후 발생하는 해양성 편모조류의 이상증식은 우리나라 연안양식에 큰 피해를 주고 있으며, 이를 예측하고 구제하기 위하여 해마다 되풀이 되는 각종 인력 및 물적 자원의 투입에 의한 자원의 피해 또한 막대하다. 따라서 최근의 적조에 대한 연구는 적조의 신속한 탐지 및 확산경로의 예보하거나 이들의 구제 방법을 개발하는데 집중되어 있다 (Park et al., 1998).

최근 우리나라의 근해에서 주로 발생하는 적조생물은 *Heterocapsa*, *Heterosigma*, *Procentrum*, *Gymnodinium*, *Cochlodinium* 등으로 편모조류가 주종을 이루고 있으며, 이들은 유독성 물질을 생산, 분비한다 (국립수산진흥원, 1996). 특히 1982년에 적조를 일으킨 *C. polykrikoides*는 1990년부터 계속적인 적조를 일으켰으며, 1995년 이후로는 10,000 cells/ml 이상의 고밀도 적조로 남해안에서 동남해역까지 대규모로 발생하여 막대한 수산피해를 일으켜 사회, 경제적인 영향을 미쳐 이를 계기로 적조피해를 최소화하기 위한 적조방제 대책연구가 진행되고 있다 (Kim et al. 1996). 따라서 기존의 연구는 유해한 적조생물이 증식을 미생물로 제어하기 위하여 적조생물의 증식 억제세균 및 살조세균에 대한 연구가 진행되고 있다.

세균의 살조기작은 두 가지로 정의되는데, 살조세균이 적조생물의 표면에 부착하여 적조생물을 용조하는 접촉에 의한 기작과 (Imai *et al.*, 1993) 살조세균이 살조물질을 세포외로 분비하여 적조생물의 성장을 억제, 또는 용조하는 기작으로 대부분의 살조세균은 이에 포함된다. 이 경우 항생제 (Kawano *et al.*, 1997), 저분자의 올리고펩티드 (Sawayama *et al.*, 1993), 단백질 (Baker and Herson, 1978) 및 열에 불안정한 세포외 물질 (Mitsutani *et al.*, 1992) 등으로 조류의 감소는 대부분의 살조 세균을 접촉한 후 몇 시간에서 며칠 이내에 나타난다. 이러한 반응시간의 차이는 물질의 활성과 직접적으로 관련되어 있으며, 물질생성의 차이와 유도물질에 따라 다양하다. 살조세균은 적조발생 해역에서 숙주생물에 의존하여 적조가 소멸되는 단계에서 최고농도에 이르는데 (Yoshinaga *et al.*, 1995), 현재 살조능력을 가지고 있는 세균으로 보고된 종은 *Alteromonas*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Saporospira* 및 *Vibrio*로 알려져 있으며, 이들 세균은 적조의 소멸에 직·간접적으로 관여하는 것으로 보고 되어있다 (Lovejoy *et al.*, 1998). 살조세균은 다양한 종의 조류를 살상 또는 용조할 수 있으며, 각 세균마다 종 특이적인 살조범위를 가지고 있으며, 보고된 살조세균 중 *Cytophoga* sp.는 돌말류 (*Bacillariophyceae*), 침편모조류 (*Raphidophyceae*) 및 와편모조류 (*Dinophyceae*)에 대한 다양한 살조능력을 가지고 있음이 보고 되었다 (Imai *et al.*, 1993). 그러나 살조세균의 살조기작 및 살조응용에 대한 연구는 아직 미진한데, 적조생물의 급격한 감소는 세포의 용조 (Imi *et al.*, 1993), 성장억제에 의한 사멸 (Imai *et al.*, 1995) 및 *Alexandrium catanella*에서와 같이 무성생식에서 유성생식으로의 교배단계 저해에 의한 사멸 (Sawayama *et al.*, 1993) 등이 보고 되어있다.

이러한 연구 외에 미생물 유래의 색소를 살조물질로 이용하려는 시도는 보고 되지 않았는데, *Hahella chejuensis* 96CJ10356 균주 (KCTC 2396=IMSNU 11157)는 1996년 11월, 제주도에서 채집된 신속의 해양성 미생물로 그람음성의 운동성 간균이며, 이들은 다량의 세포외다당류 (exopolysaccharide) 및 적색색소 (red pigment)를 생산한다 (Lee *et al.*, 2001). 이 적색색소 (RP10356)는 산성 에탄올 (acidic ethanol)에서 최대흡광도가 535 nm인 지용성 색소로서 *C. polykrikoides*, *Gyrodinium impudicum*, *Heterosigma akashiwo*, *Alexandrium catanella*, *Procentrum micans* 등의 적조원인 편모조류에 대한 살조효과를 실험한 결과, *C. polykrikoides*, *G. impudicum* 및 *H. akashiwo*에서 살조효과를 나타내는 것으로 조사되었다.

따라서 본 실험은 적조 살상효과가 있는 적색색소의 살조효과, 색소생산 및 현장

시료의 살조효과에 대하여 논의 하겠다.

1. 이론적, 실험적 접근방법

H. chejuensis 96CJ10356 균주는 ZoBell 2216e 고체배지에 도달하여 25℃에서 3일간 배양하였고 (Table 3-26), 균주의 액체배양은 ZoBell 2216e 액체배지 10 ml에 접종하여 진탕배양기에서 25℃, 120 rpm으로 2일간 배양하였다 (Fig. 3-64). 살조효과 조사를 위하여 적색색소의 생산은 SZoBell 배지로 그 조성은 Table 3-26에 나타내었다. 96CJ10356 균주를 1ℓ 삼각플라스크에 2.0%로 상기배지에 접종한 후 25℃, 120 rpm으로 3일간 배양한 배양액에서 적색색소를 분리하였다.

살조활성 조사를 위하여 96CJ10356 균주 배양액에서 색소를 추출하기 위한 조건은 Fig. 3-65와 같다. 96CJ10356 균주는 다량의 세포외다당류를 생산하는 미생물로 배양액으로부터 다당류를 제거하고 색소를 분리하기 위하여 배양액 1ℓ에 찬 산성 에탄올 (acidic ethanol)을 1배 양으로 첨가한 후 추출기로 1시간 처리하고 pH를 3으로 조정하고 4℃에서 4시간 방치하여 배양액으로부터 다당류를 제거하였다. 다당류가 제거된 배양액은 원심분리기 (Sovall RC5C, Duppon, USA)를 12,000xg, 30분의 조건으로 원심분리하고 GF/F (Whatmann, φ47 mm, USA)로 여과하여 세포를 제거한 후 조 색소를 분리하였다. 색소의 대량정제는 추출조색소의 대량분리 및 정제를 위한 실리카 크레마토그래피 (Silica gel 60, 0.040 - 0.063 mm, Merk, Germany)로 전개용매로는 클로로포름 (CH₂Cl)으로 2회 정제한 후 분광광도계를 이용하여 정제색소의 정제도를 조사하였다.

RP10356의 TLC (thin-layer chromatography)분석은 산성 에탄올 (pH 3)에 의한 조 추출물에서 RP10356의 정제와 분석조건을 조사하기 위하여 1 μg을 산성 에탄올 1 ml에 녹여 실리카 60F254S TLC 판 (Merck)에 5 μl 점적한 후, 석유에테르-아세톤-메탄올 (5:3:2) 혼합액으로 10cm 전개시켜 분석하였다. RP10356의 흡광형을 조사하기 위한 흡수스펙트럼 분석은 RP10356 1 μg/ml의 산성에탄올 용액을 분광광도계 (Shimadzu, UV-VIS2401PC, Japan)를 이용하여 300 - 700 nm 파장의 범위에서 최대 흡광파장을 조사였다. HPLC (high pressure liquid chromatography)분석은 정

Table 3-26. The compositions of ZoBell2216e and SZoBell media

Compositions	ZoBell2216e	SZoBell
glucose		20 g/ <i>ℓ</i>
peptone	5 g/ <i>ℓ</i>	5 g/ <i>ℓ</i>
yeast extract	1 g/ <i>ℓ</i>	1 g/ <i>ℓ</i>
FePO ₄	0.01 g/ <i>ℓ</i>	0.01 g/ <i>ℓ</i>
aged sea water	750 ml	750 ml
distilled water	250 ml	250 ml
pH	7.2	7.2

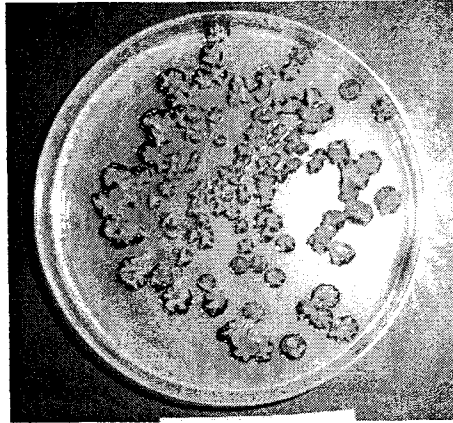


Fig. 3-64. The colony type of *Hahella chejuensis* 96CJ10356

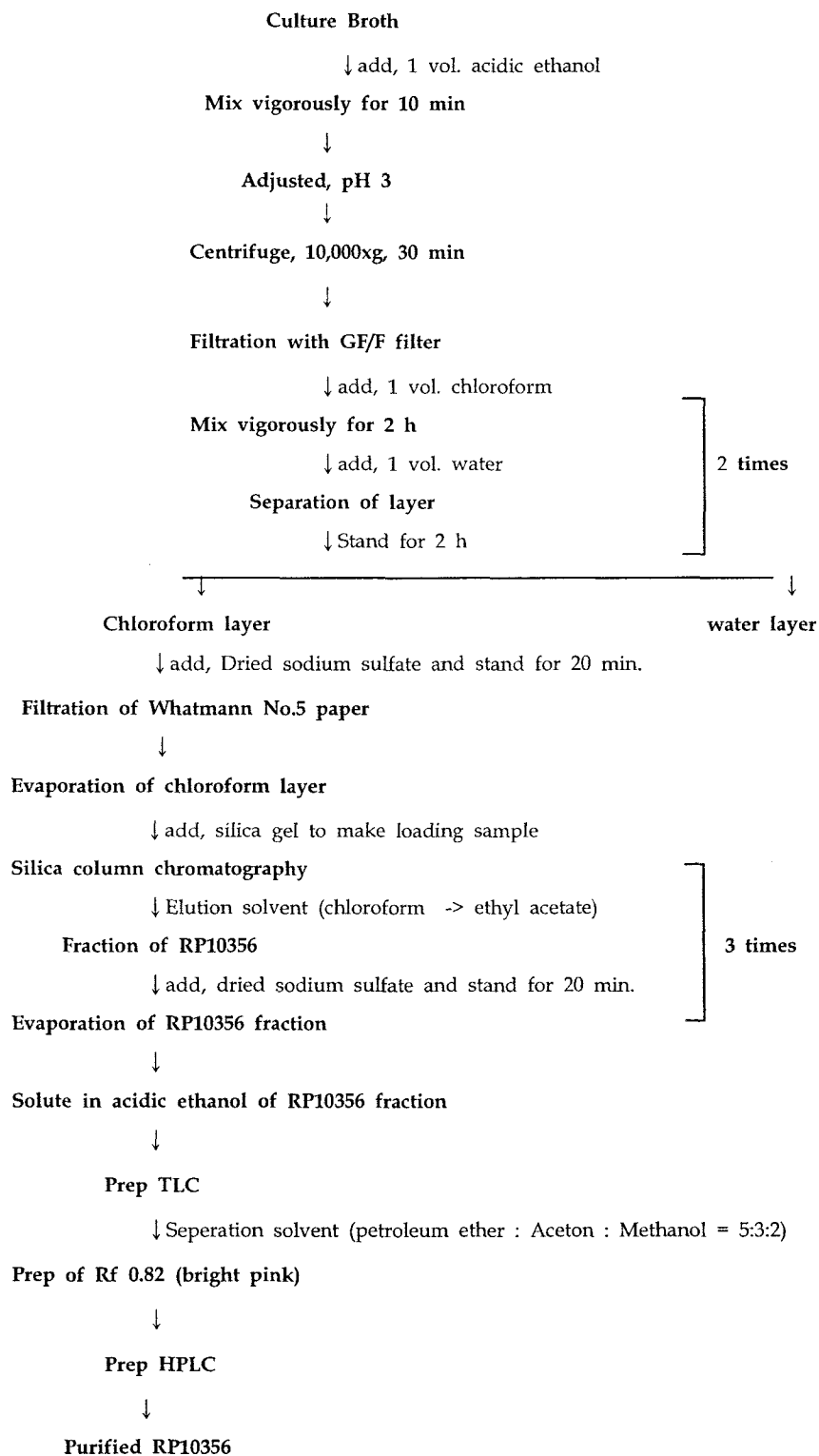


Fig. 3-65. Purification process of RP10356.

제색소를 HP1050 시스템 (Hewlett Packard, USA)를 이용하여 분석하였다. 이 때 사용한 컬럼은 실리카 컬럼 (YMC-Pack SIL, 250 x 4.6 mm, Japan)이며 아세톤-메탄올 (9 : 1)을 용매로 분당 1.0 ml씩 용출시켜 DAD-UV 검출기를 (Hewlett Packard, USA) 이용하여 535nm, 300nm - 800nm의 DAD로 분석하였다.

RP10356의 살조효과의 검색은 다음과 같다. 사용된 미세조류는 부경대 양식학과 및 한국해양연구원 적조연구팀에서 분양 받았고, 이외 미세조류는 본 연구기간 적조발생 지역에서 직접 분리하였다 (Table 3-27). 미세조류의 배양은 f/2 배지를 이용하였고 (Stein, 1973), 그 조성은 Table 3-28에 나타내었다.

조류배양 조건은 온도 22.5℃, 광도 150 $\mu\text{Ein}/\text{m}^2/\text{s}$, 16 시간:8시간 (명:암)의 광주기로 조절된 조류배양기 (Je-il Science, Korea)에서 배양하였다. 살조효과를 측정하기 위한 조류 배양체는 대수 성장단계의 세포를 이용하였다. 조류의 생장은 형광광도계 (Hitachi, F-2000, Japan)를 이용하여 측정하거나 2% Rugol 용액에 고정하여 도립현미경 (Zeiss, Axon-1000, Germany)을 이용하여 계수 하였다. 살조특성 조사를 위하여 분리한 조추출 색소 및 RP10356을 0, 0.1, 1.0, 10, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 1×10^3 cells/ml의 *C. polykrikoides*, *Gyrodinium impudicum*, *Heterosigma akashiwo*, *Alexandrium catenella*, *Procentrum micans* 등의 적조원인 5종의 미세조류 배양액에 첨가하고 30분, 1시간, 2시간, 24시간 경과 후 처리구를 2% Rugol 용액에 고정하여 전도현미경 (Zeiss, Axon100, Germany)을 이용하여 세포용혈이 되지 않은 세포수를 계수하고 초기 접종 세포수에서 용혈된 세포수를 계수하여 살조특성을 조사하였다.

【수학식 1】

$$\text{살조효과 (\%)} = \frac{(\text{초기 세포수} - \text{생존 세포수})}{\text{초기 세포수}} \times 100 (\%)$$

Table 3-27. Tested algicidal activity spectrum of red-tide species

Class	Taxon	Medium	Strain	Source
	<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	f/2	-	BKU ¹
Dinophyceae	<i>Gyrodinium impudicum</i>	f/2	KG03	KORDI ²
	<i>Procentrum micans</i>	f/2	-	KORDI
	<i>Alexandrium catenella</i>	f/2	-	KORDI
Raphidophyceae	<i>Heterosigma akashiwo</i>	f/2	-	KORDI

1. BKU : Bu-Kung University,

2. KORDI : Korea Ocean Reserch & Development Institute.

Table 3-28. The compositions of f/2 media.

1. f/2 media

Compositions	Concentrations
NaNO ₃	0.075 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0.005 g
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	0.030 g
f/2 metal solution	1 ml
f/2 vitamin solution	1 ml
aged sea water	1,000 ml

2. f/2 metal solution

Compositions	Concentrations(g/ ℓ)
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.18
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.022
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.01
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.007
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.01
FeCl ₂ · 6H ₂ O	3.15
Na ₂ -EDTA · 2H ₂ O	4.35

3. f/2 vitamin solution

Compositions	Concentrations
vitamin B12	1 μg
biotin	1 μg
thamine-HCl	200 mg
distilled water	1,000 ml

또한 RP10356을 농도별로 처리 후 시간당 살조효과에 따른 세포형태의 변화의 조사는 세포형태변화의 관찰기준은 성장억제(growth inhibition), 세포의 팽윤(swelling of cell), 세포의 용혈(lysis of cell), 외피의 탈리(edysis of armor)를 기준으로 도립현미경을 이용하여 관찰하였다.

RP10356의 생산배지 조사를 위하여 RP10356의 생산에 요구되는 온도, 초발 pH, 배지양 및 접종량 등의 물리적 요인은 고 등 (2000)의 조건을 이용하였으며 (온도 25°C, 초발 pH 7, 배지량 25 ml, 접종량 2.0%), ZoBell2216e 배지를 기본배지로 하여 당 (glucose, sucrose, fructose, galactose), 질소원 (yeast extract, malt extract, peptone, tryptone, 무기 질소원), C/N비, 다량원소 (MgSO₄, CaCl₂, KH₂PO₄) 등을 조합 처리하여 세포성장 및 RP10356의 생산을 조사하였다. 조사된 생산배지를 이용하여 25°C, 200 rpm 및 0.5 vvm의 조건에서 5일간, 5L 회분식 배양을 하여 1차 생산 조건을 조사하였다. 세균의 성장측정은 배양액을 100 mM 인산완충액 (pH 7)으로 3회 세척한 후 분광광도계 (UV-VIS 2401PC, Japan)를 이용하여 흡광도 (A₆₆₀)를 측정하였고, 또한 동량의 0.2% CPC 처리 후 70°C에서 10분 처리하여 다당류를 제거하고 100 mM 인산완충액 (pH 7)으로 세척한 다음 80°C에서 5시간 건조하여 건조중량 (dried cell weight)을 조사하였다.

RP10356의 현장적용을 위한 *on site* 실험은 2003년 8월, 경상북도 영덕군 강구 및 경상남도 고성군 용포리에서 *C. polykrikoides*에 의한 적조 발생 수역을 대상으로 수행하였다 (Fig. 3-66). 채집된 시료는 500 ml 반응조에 200 ml을 각기 균일하게 분주하고 시료처리에 있어 *C. polykrikoides* 생존환경을 균일하게 유지하기 위하여 0.5 vvm의 air를 공급하여 적조수를 순환교반하고 살조물질의 처리는 안정화되는 1시간 후에 농도별로 처리하였다 (Fig. 3-67). 각 실험구는 RP10356 조 색소를 0.01, 0.05, 0.1 및 0.5 µg/ml의 농도로 처리하고 10, 30, 60 및 120분간 경과 후 처리구를 2% Rugol 용액에 고정하여 전도현미경을 이용하여 세포용혈이 되지 않은 세포 수를 계수하고 초기 접종 세포수에서 용혈된 세포수를 계수하여 살조특성을 조사하였다.

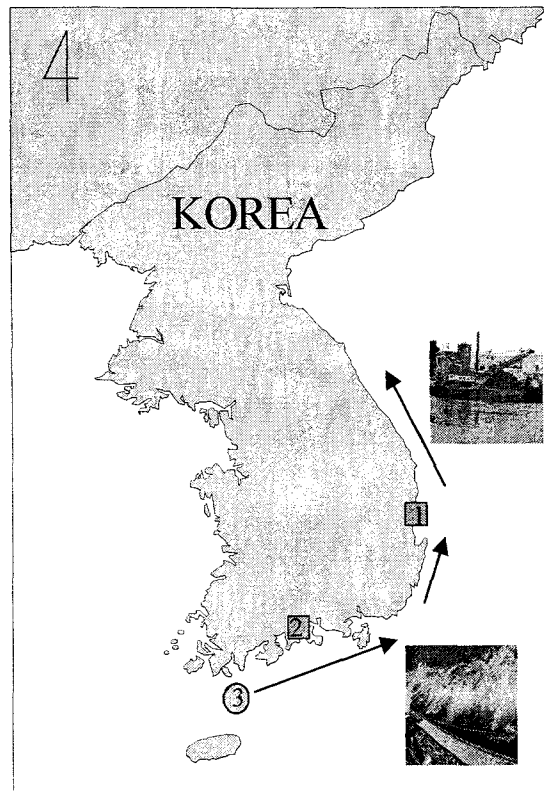


Fig. 3-66. The photograph of red-tides area for the field test of algicidal activity.

1. 경상북도 영덕군 강구, 2. 경상남도 고성군 용포리, 3. *Cochlodinium polykrikoides*의 적조발생 이동경로 (외나로도)

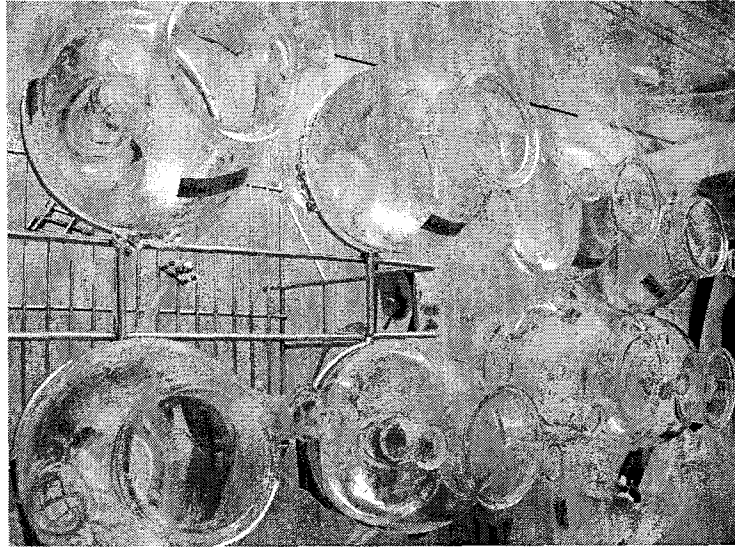


Fig. 3-67. Field Algicidal effect test by red pigment using reaction bottle
in situ. (1. working volumn : 200 ml; 2. air : 0.5 vvm)

2. 연구결과

산성 에탄올 (acid ethanol)에 의하여 추출된 적색 조색소를 이용하여 살조효과를 조사한 결과는 Fig. 3-68와 같다. *Cochlodinium polykricoids*는 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 경우, 30분에 3.8% 이었으며, 24시간 경과 후 72.1%이었으며, 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 30분에 63.8% 이었으며, 24시간 경과 후 98.7%, 최대처리 농도인 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 30분에 91.3%로, 적조피해가 가장 심한 *C. polykricoids*의 경우, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도이상에서 살조효과가 있는 것으로 조사되었고, 특히 조 색소는 저 농도에서 초기 살조능이 우수한 것으로 조사되었다. *Gyrodinium impudicum*의 경우, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 경우, 30분에 1.4% 이었으며, 24시간 경과 후 40.8%이었으며, 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 30분에 28.7% 이었으며, 24시간 경과 후 93.0%, 최대처리 농도인 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 30분에 60.6%로, *C. polykricoides*에 비교하여 다소 살조능력이 감소한 것으로 조사되었다. *Heterosigma akashiwo*의 경우, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 경우, 30분에 6.5% 이었으며, 24시간 경과 후 78.8% 이었으며, 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 30분에 23.8% 이었으며, 24시간 경과 후 96.3%, 최대처리 농도인 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 30분에 46.4%로 조사되었다. 이외 *A. catenella* 및 *P. micans* 등에 대하여는 살조능력이 미약한 것으로 조사되었다. 따라서 96CJ10356 균주의 조 색소는 적조원인 조사대상 5 균주에 대하여 서로 다른 살조효과를 가지고 있었으며, 이 중 *C. polykricoids*에 대하여 살조효과가 매우 높은 것으로 관찰되었다. 적색색소를 농도별로 처리하고 농도별 시간당 살조효과에 따른 세포형태의 변화는 도립현미경을 이용하여 관찰하였다. RP10356에 의한 세포형태변화의 관찰기준은 성장억제 (growth inhibition), 세포의 팽윤 (swelling of cell), 세포의 용혈 (lysis of cell), 외피의 탈리 (edysis of armor)를 기준으로 관찰한 결과는 Fig. 3-69와 같다. 96CJ10356 균주의 조 색소의 경우, 조사대상 균주 중 살조효과를 나타내는 *C. polykricoides*, *Gyrodinium impudicum* 및 *Heterosigma akashiwo*의 형태변화는 세포의 팽윤과 세포의 용혈이 관찰되었다 (Fig. 3-69 1-3). 그러나 살조효과가 크지 않은 *Alexandrium catenella*는 외피의 탈리가 관찰되었으며 (Fig. 3-69 4A-4C), *Procentrum micans*는 형태적 변화의 크지 않았다 (Fig. 3-69 5A-5C). 특히, *A. catenella*는 외피가 살조효과를 감소시키는 것으로 추측된다.

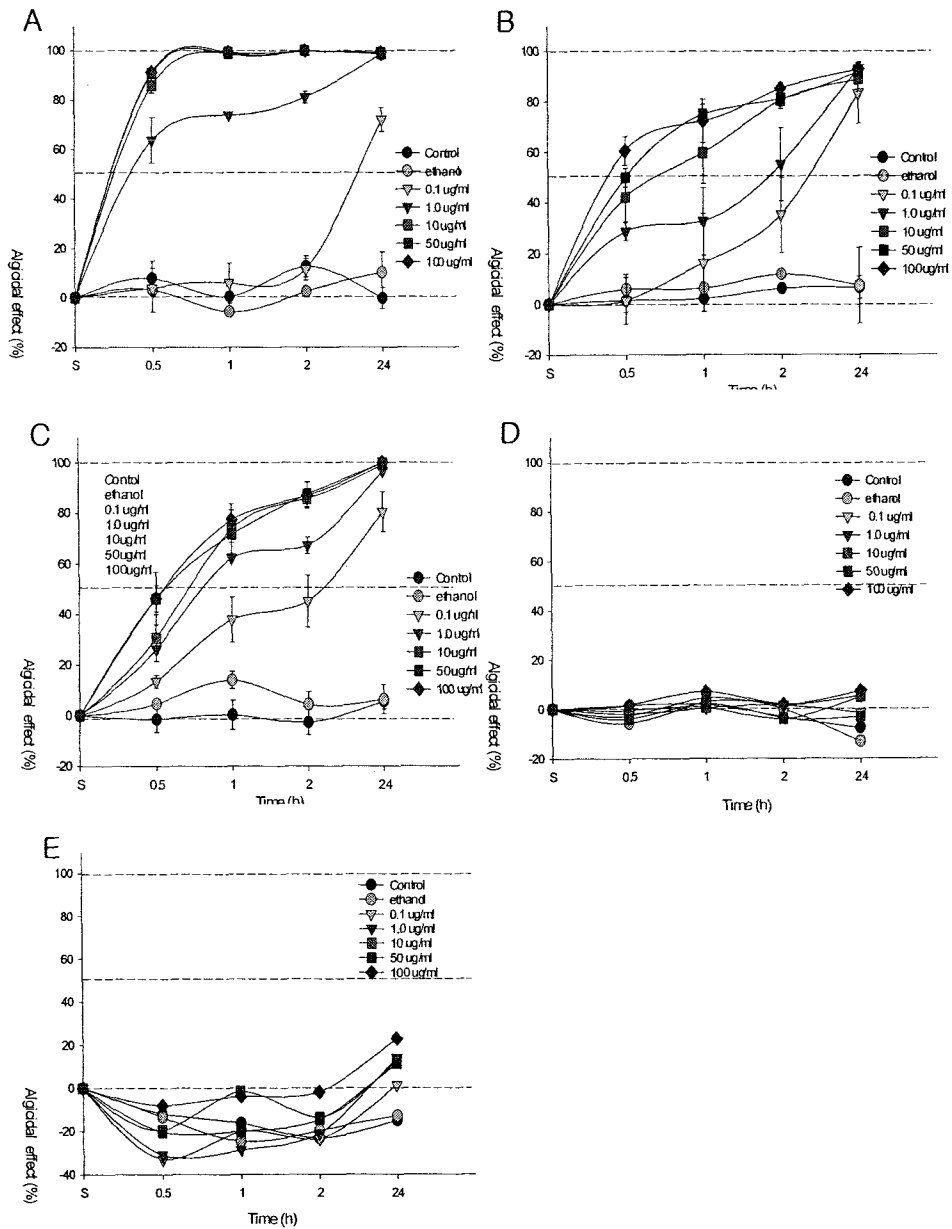


Fig. 3-68. The algicidal effects of red pigment (crude) from *Hahella chejuensis* 96CO10356.

- A. *Cochlodinium polykrikoides*, B. *Gyrodinium impudicum*,
 C. *Heterosigma akashiwo*, D. *Alexandrium catenella*,
 E. *Procentrum micans*

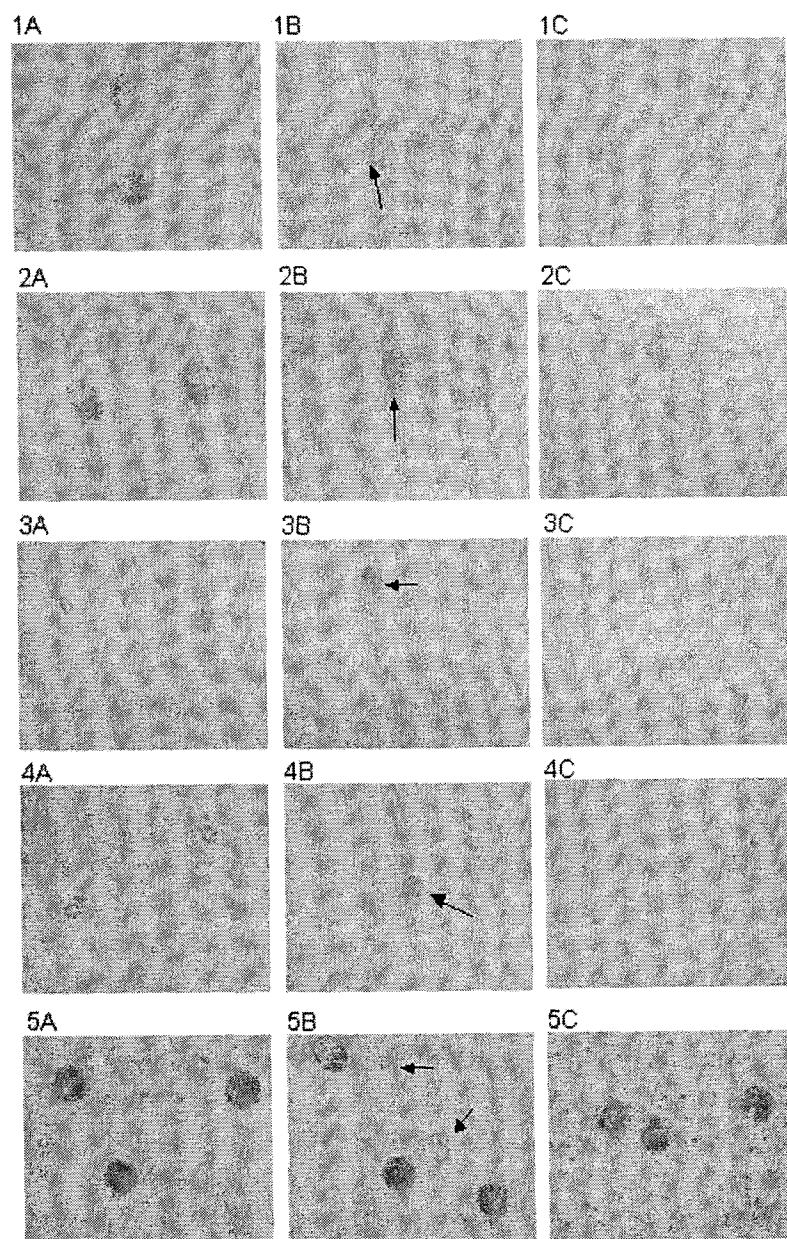


Fig. 3-69. The photography of algicidal effects for the red-tide 5 species by crude red pigment from *Hahella chejuensis* 96CO10356.

1. *Cochlodinium polykrikoides*, 2. *Gyrodinium impudicum*, 3. *Heterosigma akashiwo*, 4. *Alexandrium catenella*, 5. *Procentrum micans*

또한 조 색소에 의한 살조효과를 조사한 결과, 매년 우리나라에 적조피해를 일으키며 적색색소의 살조효과가 가장 우수한 종인 *C. polykricoids*에 대하여 분리된 4개의 분획을 대상으로 살조효과를 비교한 결과, 4개 색소분획 중에 RP10356만이 살조효과를 가지고 있는 것으로 조사되었고, 분리된 RP10356과 조색소의 30분 처리 후 살조효과를 비교한 결과, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 처리 후 30분에 조색소는 3.83%, RP10356은 100%로 증가하였다. 따라서 조 추출액내 존재하는 RP10356에 의한 살조효과인 것으로 조사되었고, RP10356의 살조최저 농도의 실험결과 0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 처리 후 30분에 63.7%, 1시간에 95.3%의 살조효과를 나타내었다(Fig. 3-70). 또한 RP10356의 경우, *C. polykricoides*에서도 Fig. 5A와 동일한 형태적 변이가 관찰되어 살조물질은 조 색소의 RP10356 색소에 의한 것으로 조사되었으며, 특히 RP10356의 살조작용의 과정은 Fig. 3-71로 RP10356의 cark에 의하여 초기 세포가 부풀면서 세포 간 사슬구조가 벌어지면서 사슬구조가 완전히 풀리고 이후 각 세포는 계속적으로 세포가 팽창하는데, 세포표면의 일부분이 심하게 팽창되면서 용혈현상이 일어나는 것으로 관찰되었다.

산성에탄올 조 추출물에서 RP10356의 정제와 분석조건을 조사하기 위하여 1 μg 을 산성에탄올 1 ml에 녹여 실리카 60F254S TLC 판 (Merck)에 5 μl 점적한 후, 석유 에테르-아세톤-메탄올 (5:3:2) 혼합액으로 10cm 전개시켜 분석한 결과를 도 19에 나타내었다. 전개결과, Rf치는 0.98 (밝은 황색), 0.96 (어두운 적색), 0.88 (밝은 적색), 0.59 (청색) 등의 4 fraction의 색소를 얻을 수 있었다 (Fig. 3-72). RP10356의 흡광형을 조사하기 위하여 RP10356 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 산성에탄올용액을 분광광도계(Shimadzu, UV-VIS2401PC, Japan)를 이용하여 400 - 700 nm 파장의 범위에서 최대 흡광파장을 조사한 결과는 Fig. 3-73과 같다. 흡광광도계에 의한 RP10356의 최대흡광도는 535 nm 이었다. 대량정제를 위하여 배양액에서 산성에탄올로 추출한 색소의 대량분리 및 정제를 위하여 실리카 크레마토그래피 (Silica gel 60, 0.040 - 0.063 mm, Merk, Germany) 조건을 조사한 결과, 실리카 크로마토 전개용매를 chloroform으로 조 색소를 분리하여 TLC를 실시한 결과를 Fig. 3-74에 나타내었다. 실리카 크레마토그래피에 의하여 조 색소를 정제한 결과, 각 분획은 4개의 분획으로 나누어졌으며, 각 분획은 TLC 결과와 동일하게 밝은 황색, 어두운 적색, 밝은 적색 및 청색의 순서로 용출되어 이중 밝은 적색인 RP10356을 분리하였다.

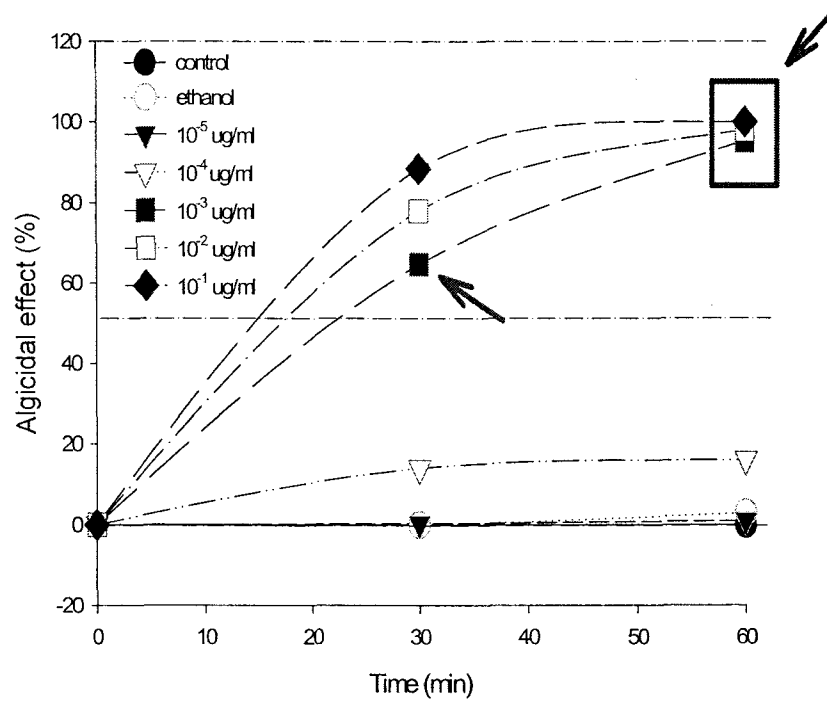


Fig. 3-70. Algicidal effect of RP10356 against *Cochlodinium polykrikoides*.

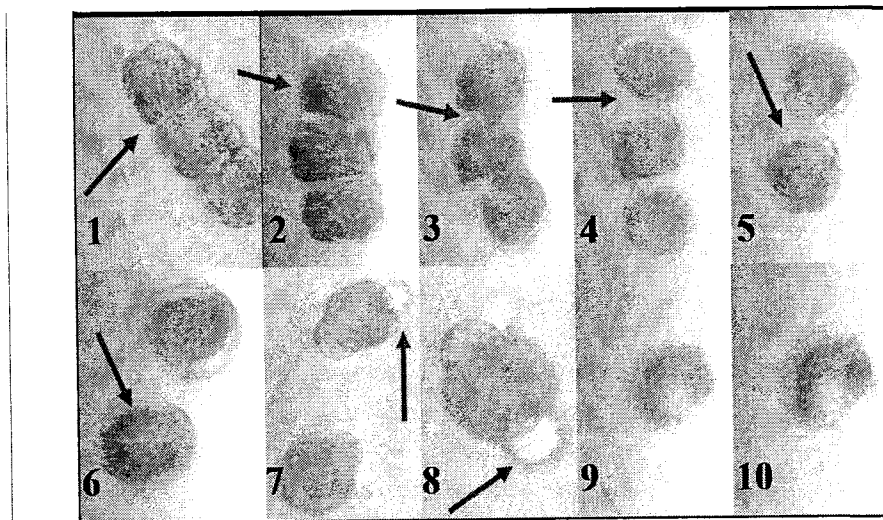


Fig. 3-71. Algicidal process of RP10356 with *Cochlodinium polykrikoides*
 A : 1. Normal cell , 2 - 4. Burst of chain, 5 - 6. Rounded Cell (E - F), 7 -
 8. Expanded Cell, 9- 10. Cell lyses

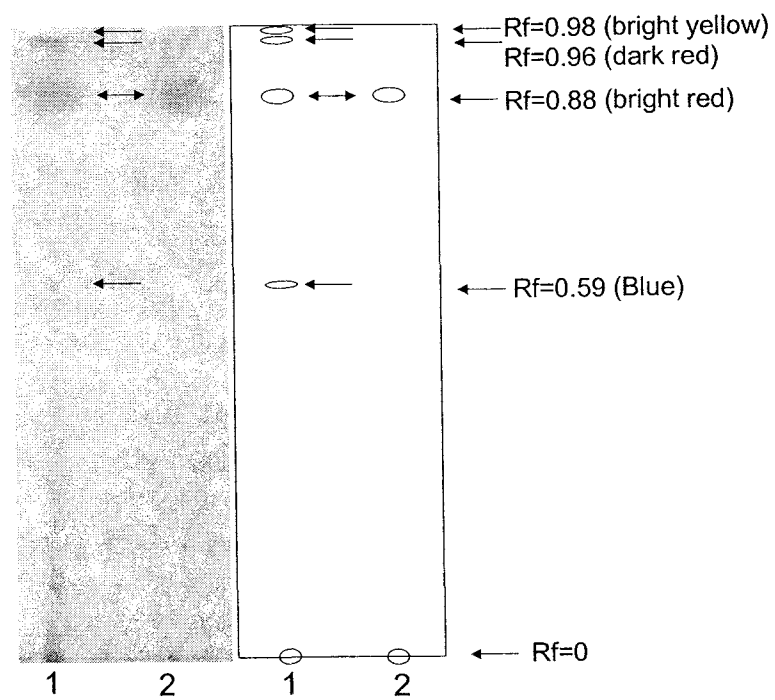


Fig. 3-72. TLC isolation of red pigment from *Hahella chjuensis* 96CO10356

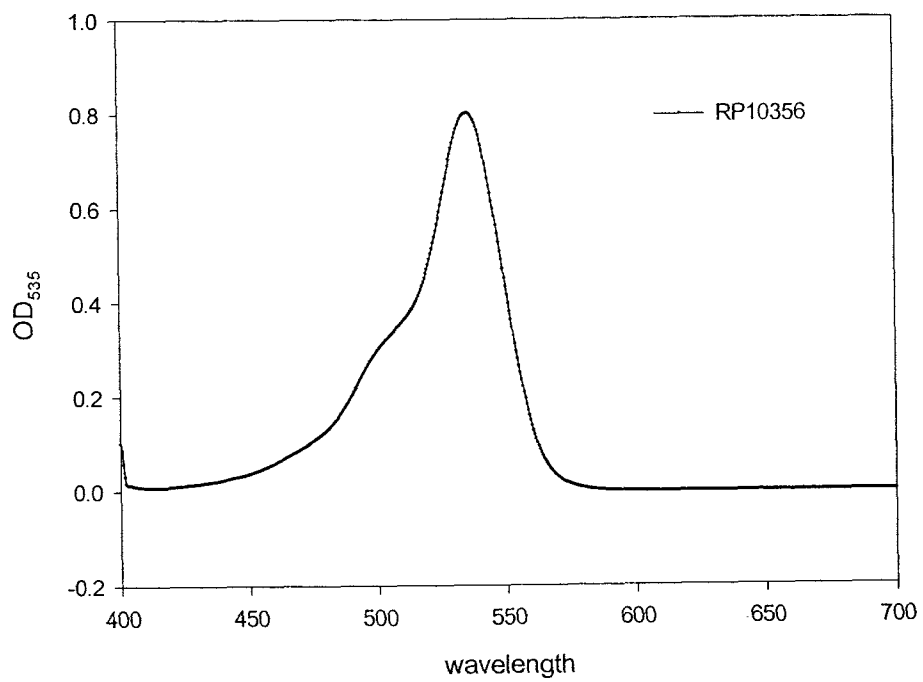


Fig. 3-73. UV spectrum of RP10356

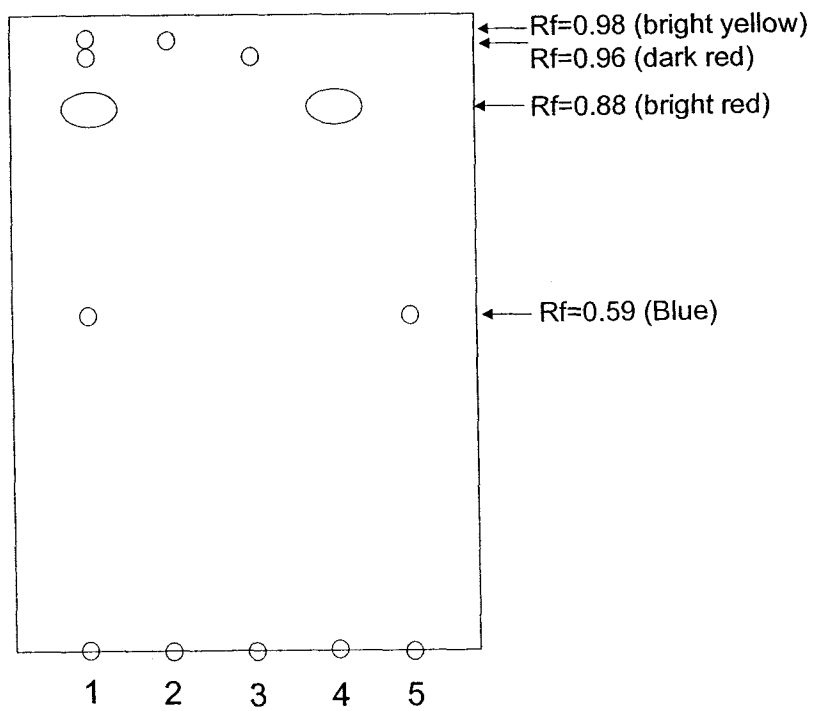


Fig. 3-74. TLC isolation of RP10356 by silica chromatography

정제된 RP10356의 최종 정제를 위하여 HP1050 시스템 (Hewlett Packard, USA)를 이용하여 분석하였다. 이 때 사용한 컬럼은 실리카 컬럼 (YMC-Pack SIL, 250 x 4.6 mm, Japan)이며 아세톤-메탄올 (9 : 1)을 용매로 분당 1.0 ml씩 용출시켜 DAD-UV 검출기를 (Hewlett Packard, USA) 이용하여 535 nm, 300nm - 800nm의 DAD로 분석한 결과를 Fig. 3-75에 나타내었다. RP10356은 상기조건에서 RP10356은 상기 조건에서 머무름 시간(retention time)이 3.52 분이었으며, 300 - 800 nm에서도 단일 피크가 분리되는 것을 확인할 수 있었다.

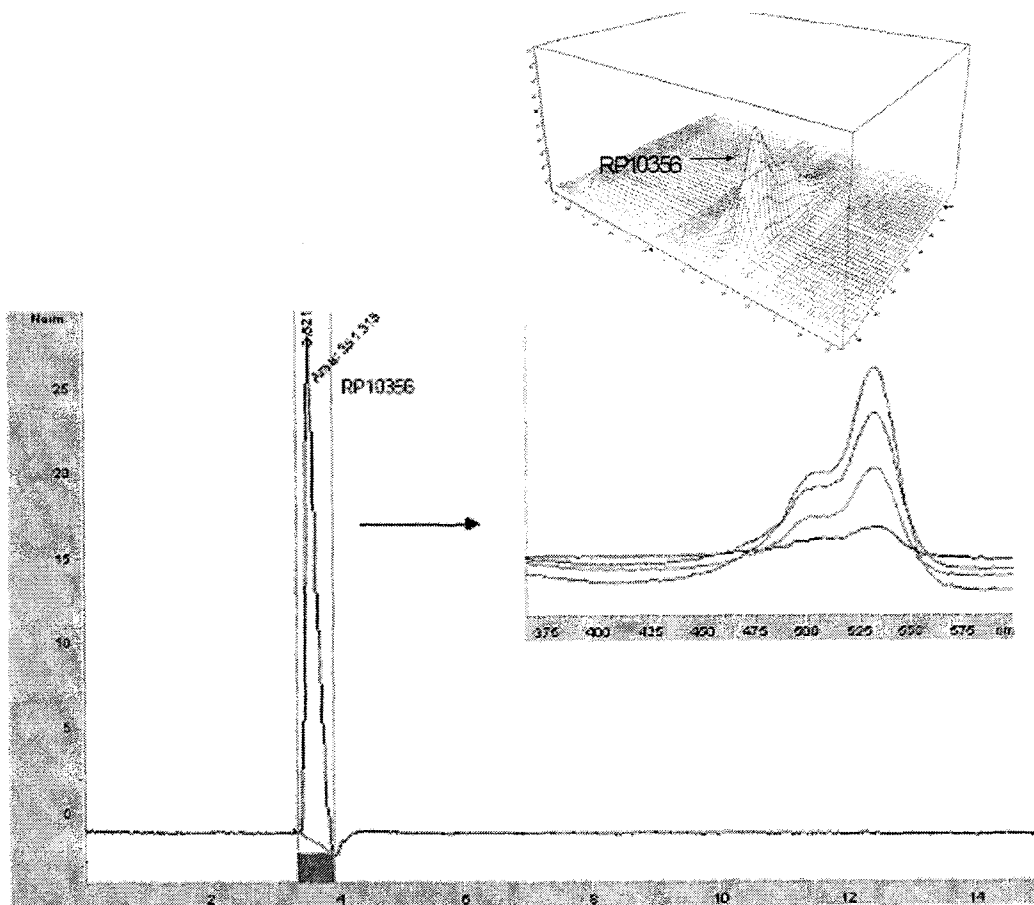


Fig. 3-75. HPLC chromatogram of RP10356 from *Hahella chjuensis* 96CO10356.

현장적용을 위한 *on site* 실험은 2003년 8월에 경북 영덕 강구, 경남 고성 용포리의 적조발생 수역을 대상으로 수행하였다 (Fig. 3-76). 실험의 목적은 현장에서 적조가 발생된 해수를 대상으로 RP10356의 살조효과를 검증하고 *on* 나서 실험의 예비실험으로 적조제어에 있어 적정농도를 검증하기 위한 예비실험으로 시행하였다. 2개의 적조발생 지역의 *C. polykrikoides* 수는 각각 1.5×10^3 cells/ml 및 1.2×10^4 cells/ml로서 적조현상에 있어 발생빈도에 차이가 있었다. 특히 *C. polykrikoides*에 의한 피해는 이들이 직접적으로 피해물질을 합성하는 것이 아니라 이들이 합성, 분비하는 점질성 다당류에 의하여 가두리 어류의 아가미에 집적되고 이로 인한 호흡곤란 등의 작용에 의하여 수산 어류의 폐사를 유도함으로 개체수 밀도는 일방적으로 해수의 점질성 다당류의 농도를 증가시킬 수 있다. 따라서 RP10356은 해수 내 점질성 다당류의 농도를 감소시키는 것이 아니라 *C. polykrikoides*를 용혈시킴으로서 분비 다당류의 합성을 최소화시키기 위함이다. 경북 영덕 강구에서 *C. polykrikoides*, 1.5×10^3 cells/ml의 적조수에 RP10356을 0.005, 0.01, 0.05 및 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 농도 처리하고 10, 30, 60 및 120분의 시간 경과 후 살조효과는 0.005 $\mu\text{g/ml}$ 에서 78.1, 88.7, 96.6 및 98.8%이며, 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 93.2, 96.8, 97.9 및 100%, 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 98.1, 100, 100 및 100, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 모두 100%의 살조효과를 나타내 야외실험에서 의한 RP10356의 살조효과가 기내실험에 의한 RP10356 보다 처리시간에 있어 살조효과가 더 우수한 것으로 관찰되었다 (Fig. 3-77). 또한 경상남도 고성군 용포리의 적조수는 1.2×10^4 cells/ml로 영덕군 강구보다 *C. polykrikoides*의 농도가 높았으며, 이로 인한 해수의 점성이 육안관찰 결과, 더욱 높았다. 용포리 시료는 살조물질의 형태를 RP10356, 조색소, 건조세포로 하여 RP10356은 0.01 및 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 조색소는 0.1 및 1.0 $\mu\text{g/ml}$, 건조세포는 0.01 및 0.1%로 강구시험과 동일하게 처리한 결과, 30분경과 각각 71.5, 88.1, 38.5, 72.8, 94.8 및 97.8%의 살조효과를 나타내었고, 1시간경과 후 각각 98.1%, 99.2%, 84.8%, 96.8%, 97.8 및 99.8%로 조사되었다 (Fig. 3-78). RP10356의 경우, 30분경과에 있어 살조효과는 1.5×10^3 cells/ml의 적조수와 1.2×10^4 cells/ml 적조수의 살조효과 비교에서 30분경과에 있어 살조효과가 73.9% 및 88.1%로 살조효과가 감소하였으나, 1시간 처리구에 있어 100.1 및 99.2%로 거의 유사한 살조효과를 나타내었다. 이는 적조수에 포함되어있는 다당류의 생성이 RP10356의 살조효과를 1시간 범위 내에서는 크게 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 30분 경과에서 살조효과의 감소는 다당류가 RP10356과 *C. polykrikoides*과의 상호작용을 감소시키는 것으로 보이며, 이에 대한 연구는 RP10356의 살조기작에 대한 연구에

의하여 연구되어야 할 것으로 사료된다. 또한 색소를 포함하는 건조 배양세포를 처리한 결과, 0.01%에서 30분 및 1시간에 94.8, 97.8%의 살조효과를 나타내어 추후 현장적용의 재재연구에 이용할 수 있을 것으로 본다.

적조수를 이용한 RP10356의 살조현상을 조사하기 위하여 고성 용포리 적조수 (1.2×10^4 cells/ml)에 0.025 $\mu\text{g/ml}$ 의 RP10356을 처리하고 1시간 경과 후 관찰한 결과, 처리구의 *C. polykrikoides*는 용혈되어 파괴된 세포가 부유하여 비이커와 적조수 사이에 파괴된 세포가 쌓이는 현상이 관찰된 반면, 대조구의 *C. polykrikoides*는 다당류에 포매되어 바닥으로 침강하는 것으로 관찰되었다 (Fig. 3-79). 또한 RP01356에 의한 살조과정이 기내조작과는 다른 현상이 관찰되었는데, 사슬의 파괴되지 않고 바로 연쇄상 세포가 연결된 상태에서 용혈되는 것이 관찰되었다 (Fig. 3-80).

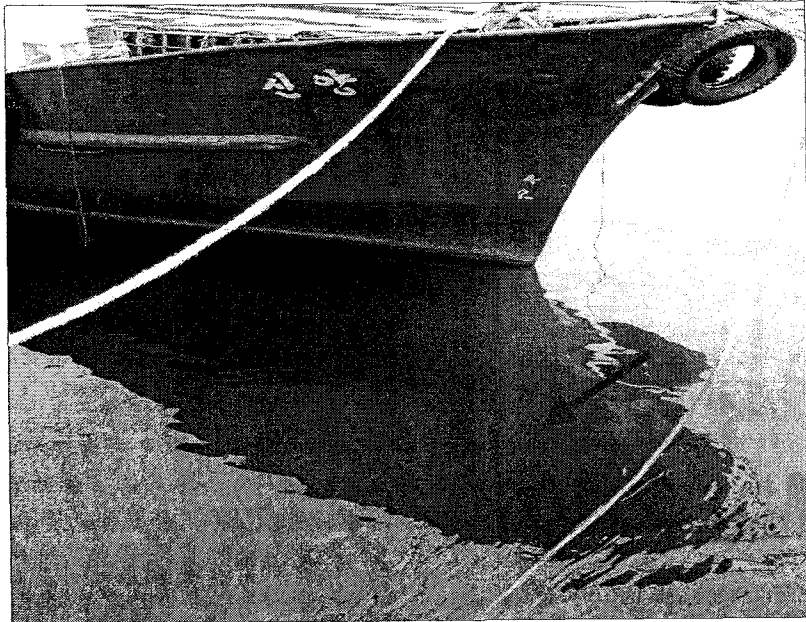


Fig. 3-76. Red-tide Youngpo-Ri Gosung-Gun Kungsangnam-do,
Korea.

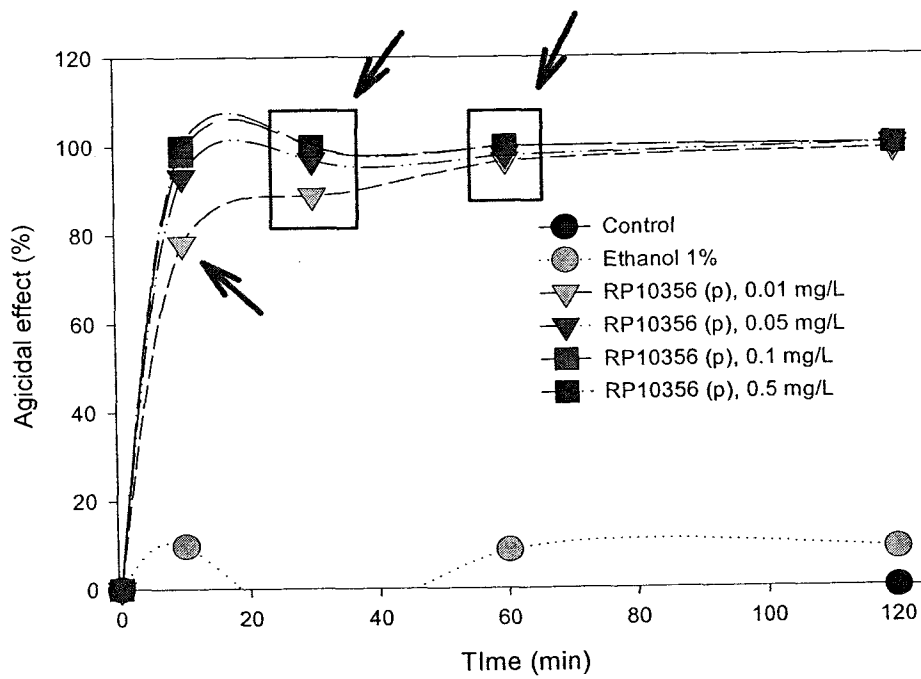


Fig. 3-77. Algicidal effect of RP10356 in the res-tide sea-water by *Cochlodinium polykrikoides* in Gan-gu, Yungduk-Gun Kyungsang buk-do, Korea.

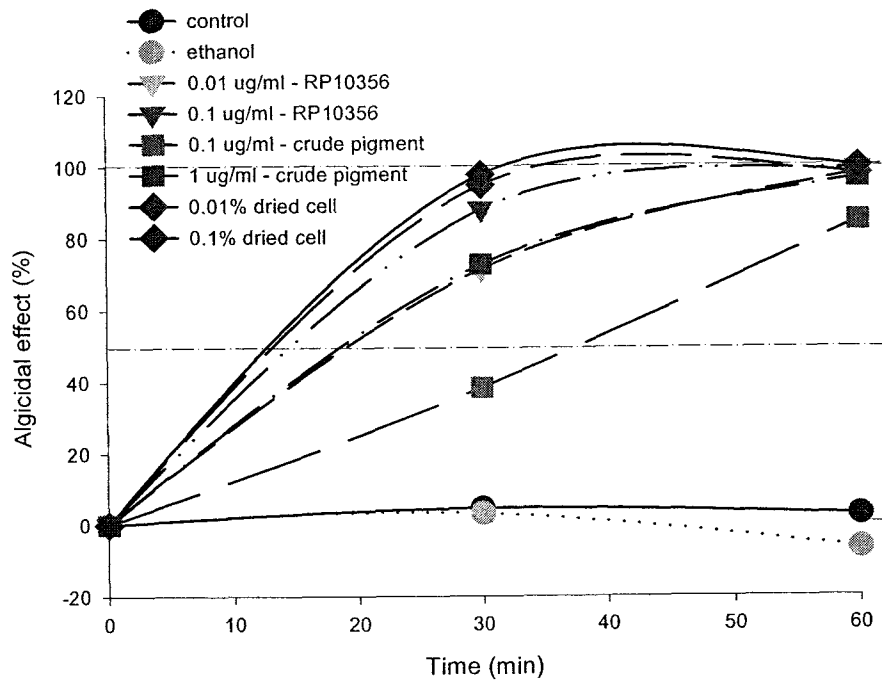


Fig. 3-78. Algicidal effect of red-pigment in the res-tide sea-water by *Cochlodinium polykrikoides* in Youngpo-Ri Gosung-Gun Kungsangnam-do, Korea.

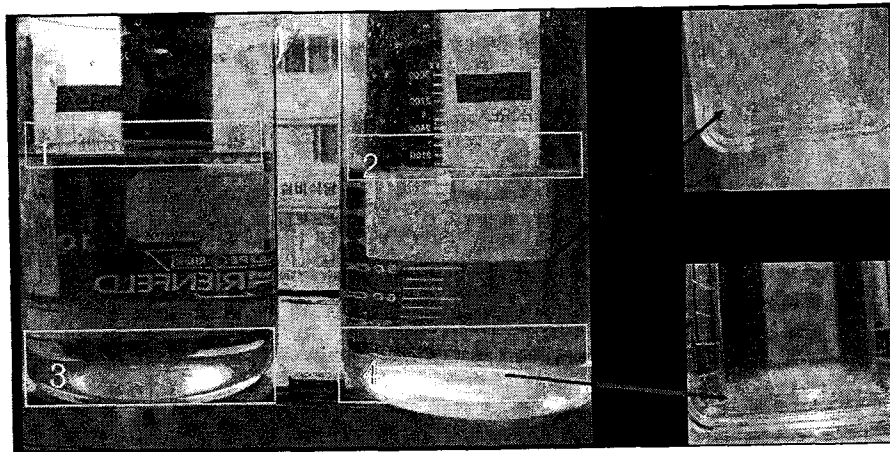


Fig. 3-79. The photography of algicidal pattern of *Cochlodinium polykrikoides* by RP10356

1, 3, RP10356, 0.025 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 2, 4, control

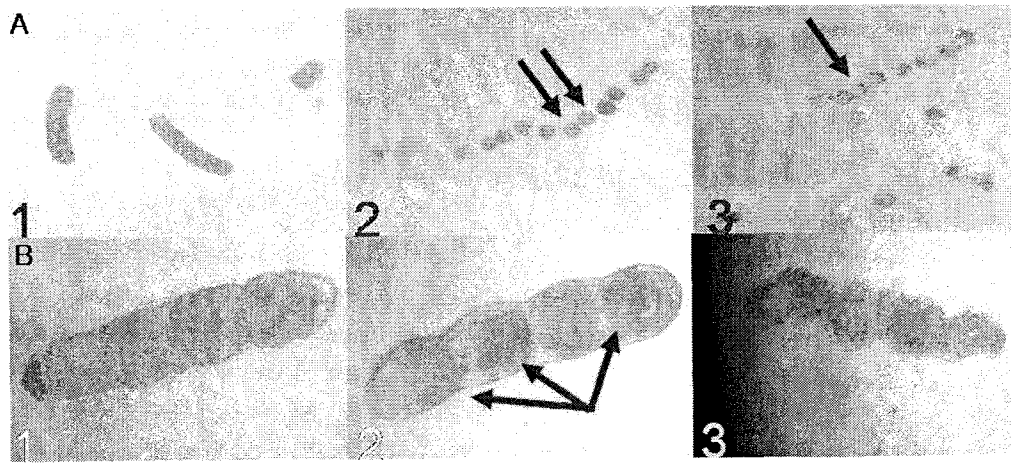


Fig. 3-80. The photography of algicidal types of *Cochlodinium polykrikoides* by RP10356. A. normal cell lyses, B. non-chain burst type.

Hahella chejuensis 96CJ10356을 이용하여 살조물질인 RP10356을 생산하기 위한 최적 생산배지의 조성을 하기의 방법으로 조사하였다. RP10356의 생산에 요구되는 물리적 요인인 온도, 초발 pH, 배지양 및 접종량 등의 물리적 요인은 고 등 (2000)의 조건을 이용하여 25℃, pH 7, 25 ml 및 2.0%로 하였다. 탄소원 처리구별 RP10356의 생성은 글루코오스 3.102 (A539), 수크로오스 1.953 (A539), 프룩토오스 2.824 (A539)로 대조구인 ZoBell 배지에서의 1.864 (A539) 보다 갈락토오스 1.203 (A539)를 제외하고는 양호하였다. 균체 생장은 수크로오스가 1.21 (A660)로 가장 양호하였다. 균체의 생육은 글루코오스와 수크로오스 등에서 양호하였으며, RP-10356의 생산량 또한 균체량과 비례하여 생산되는 것으로 생각되며, 갈락토오스에서는 균체량과 다당류 생산량 등이 상대적으로 저조하였다. 따라서, 글루코오스를 탄소원으로 선별하였다. RP10356의 생산에 적합한 글루코오스의 농도를 조사하기 위하여 글루코오스를 각각 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 중량%(w/v)의 농도로 첨가하고, 96CJ10356 균체를 2.0 중량%가 되도록 접종하여, 120rpm, 25℃의 조건으로 진탕 배양한 후 세포성장 및 RP10356의 생성을 조사한 결과, 과당 처리구별 RP10356의 생성은 5%에서 3.41 (A539)로 가장 양호하였다.

질소원으로 효모 추출물 (yeast extract), 펩톤 (pepton), 트립톤 (tryptone), 맥아 추출물 (malt extract), 쇠고기 추출물 (beef extract), $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4Cl , NH_4NO_3 을 각각 0.2 g/l 씩 첨가하고, 96CJ10356 균주 2.0 중량%가 되도록 접종하여, 진탕 배양기 (120rpm, 30℃)에서 배양한 후 세포성장과 RP10356의 생성을 조사한 결과, 질소원별 RP10356의 생성은 펩톤이 3.70 (A539)으로 모든 처리구 및 대조구 0.019 (A539) 보다 양호하였으며, 균체 생장은 펩톤이 0.713 (A660)으로 양호하였으며, 전 처리구에서 균체 생산이 낮았다. pH는 전 처리구에서 6 - 7로 초기 pH보다 낮아졌다.

탄소원과 질소원의 비율 (C/N ratio)은 ZoBell 배지에서 탄소원으로 5%의 글루코오스 기준으로 펩톤 농도를 C/N 비가 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 10.0으로 첨가하고, 96CJ10356 균주 2.0 중량%가 되도록 접종하여, 진탕 배양기 (120rpm, 30℃)에서 배양한 후 세포성장과 RP10356의 생성을 조사한 결과, 탄소원대 질소원의 비 (C/N ratio)는 C/N, 5에서 3.79 (A539)로 가장 양호한 RP10356의 생성이 이루어졌다.

무기인산으로 KH_2PO_4 및 K_2HPO_4 를 총 0.5, 1, 2, 5, 7, 10 mM 농도로 첨가하고, 96CJ10356 균체를 2.0 중량%가 되도록 접종하여, 120rpm, 25℃의 조건으로 진탕 배양한 후 세포성장 및 RP10356의 생성을 조사한 결과는 다음과 같다. KH_2PO_4 및 K_2HPO_4 의 농도별 처리구에서 10배 희석액의 RP10356 생성은 0.5 mM에서 0.52

(A539)로 가장 양호하였다. 또한 $MgSO_4$ 및 $CaCl_2$ 를 각각 0.5, 1, 5 g/l 농도로 첨가하고, 96CJ10356 균체를 2.0 중량%가 되도록 접종하여, 120 rpm, 25°C의 조건으로 진탕 배양한 후 세포성장 및 RP10356의 생성을 조사한 결과는 다음과 같다. $MgSO_4$ 처리구별 10배 희석액의 RP10356의 생성은 0.5% 이상 처리구에서 0.58 (A539)로 유지되었으며, 균체 생장은 0.6 (A660)으로 유사한 생장이 관찰되었다. 또한 $CaCl_2$ 처리구별 10배 희석액의 RP10356의 생성은 2.0%에서 0.74 (A539)로 가장 양호하였으며, 균체 생장은 0.73 (A660)로 가장 높은 균체 생장이 관찰되었다. 미량원소는 ZoBell 배지 25ml를 기준으로 $FeCl_3$, $CuSO_4$, $MnCl_3$, $ZnSO_4$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, $NaMoO_4$ 를 각각 0.001 g/l 농도로 첨가하고, 96CJ10356 균체를 2.0 중량%가 되도록 접종하여, 120 rpm, 25°C의 조건으로 진탕 배양한 후 세포성장 및 RP10356의 생성을 조사한 결과는 다음과 같다. 각각의 미량원소별 10배 희석액의 RP10356 생성을 539 nm에서 흡광도를 측정하였을 때 $FeCl_3$ 0.02, $CuSO_4$ 0.09, $MnCl_3$ 0.37, $ZnSO_4$ 0.27, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.68, $NaMoO_4$ 0.44로 대조구 0.03보다 $MnCl_3$, $ZnSO_4$, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 및 $NaMoO_4$ 처리구에서 RP10356의 생산이 대조구보다 양호하였으며, 특히 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 가 RP10356의 생산을 촉진하는 것으로 조사되었다.

따라서 RP10356 생산을 위한 최적 조건은 글루코오스 5 중량%, 펩톤 0.1 중량%, KH_2PO_4 0.42 g/l, K_2HPO_4 0.34 g/l, $MgSO_4$ 0.5 g/l, $CaCl_2$ 2.0 g/l, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.001 g/l, $MnCl_3$, 0.001 g/l, $ZnSO_4$, 0.001 g/l, $NaMoO_4$ 0.001 g/l 및 묽은 바닷물을 첨가하여 최종 용량이 1,000 ml가 되도록 하고, pH 7, 온도 25°C, 접종량 2.0 중량%의 양으로 제조한 배지 조성을 본 발명에서는 "M-RP10356"이라 명명하였고, 상기 M-RP10356을 RP10356 생산 최적 배지 조건으로 하였다.

5 l 희분식 배양기를 이용하여 M-11568 배지에서 24시간 배양된 균주를 3 l의 working volume에 2% 접종하여 균주를 배양하고 균체의 성장 및 RP10356 생산 및 pH의 변화를 조사하였다. 이때 배양온도는 25°C이었고, 200 rpm에서 통기량은 1.5 vvm으로 설정하였다. 시간 경과에 따른 RP10356 생산 결과를 다음과 같다. 배양시간이 경과함에 따라 다당류 생산이 증가하는 것을 보였으며, 배양 81시간 후에는 최대치가 유지되었다. 최적조건에서 209 mg/l의 최대 RP10356의 생산량이 얻어졌고, 배양 48시간까지 균체 생장이 증가하였으나, 74시간 이후에는 균체 증식이 감소하였다 (Fig. 3-81). 색소생성은 대표적인 2차대사 산물로 배양조건에 따라 다양한 생산형태가 이루어지므로 추후 RP10356 생산에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다.

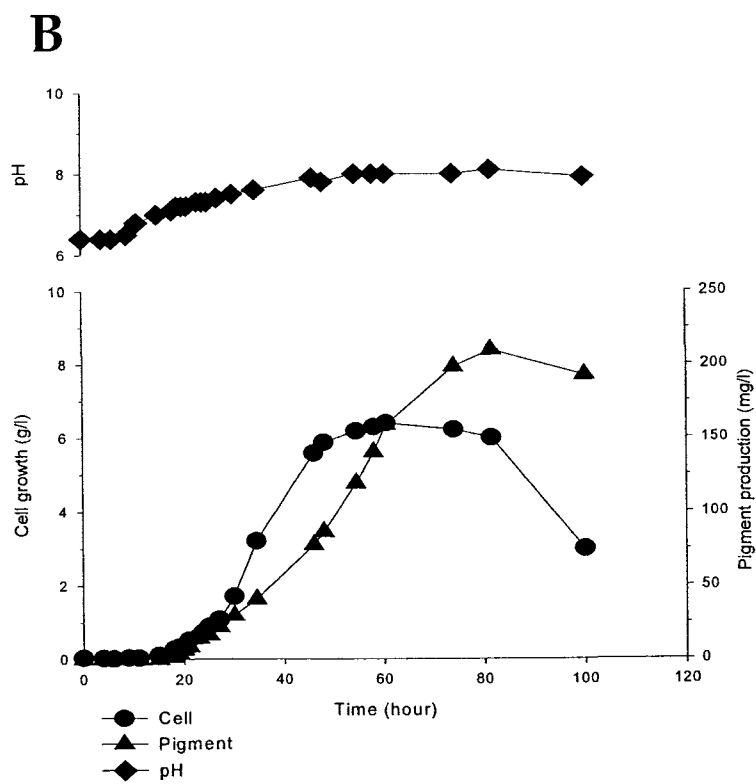
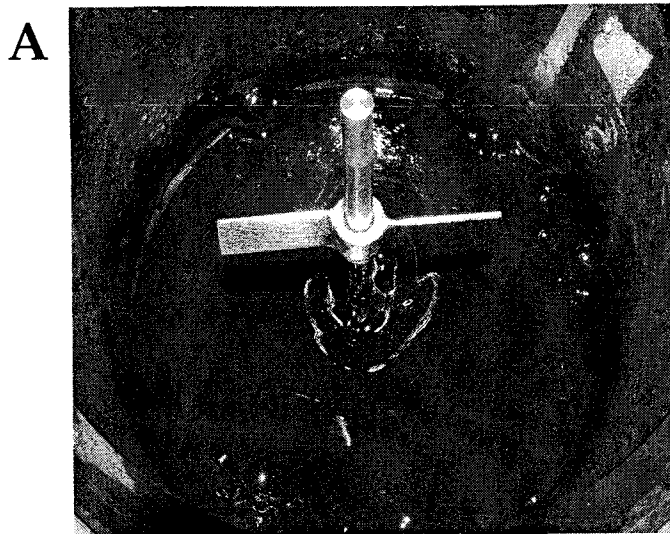


Fig. 3-81. Production of RP10356 using 5L fermenter. A, photograph of culture broth, B. time-course of RP10356 production

제 9 절 세포외물질을 생산하는 해양미생물의 간편한 DNA 추출방법 개발

1. 이론적, 실험적 접근방법

해양미생물은 다당류, 지질, 당단백질, 당지질 등의 다양한 세포외 신물질을 합성함으로써 점차 주목을 받고 있다 (Lee and Ellis 1990, Leppard 1995, Tamaru et al. 1995, Ellis et al. 1997, Horikoshi 1999, Ascencio et al. 2000, Sabra et al. 2001). 이런 세포외 물질은 유화안정제 (stabilizers), 젤화물질 (gelling agents), 접착제 (adhesives), 농축제 (thickening agents), 유화제 (emulsifying agents), 응집제 (flocculants)로 활용된다 (Maier and Soberon-Chavez, 2000). 해양미생물은 세포외물질을 합성하는 유전자의 좋은 공급원이 된다 (Takeyama et al. 1997, Miyamoto et al. 1998, Reynolds et al. 2000, Yernool et al. 2000). 이런 유전자를 분리하기 위해서는 순수한 DNA가 필요하다. 그러나 다당류나 당단백질, 당지질은 DNA 분리를 방해할 수 있다 (Volossiuk et al., 1995). 특히 다당류는 DNA와 함께 침전하여 DNA를 분리한 뒤 제한효소 처리나 라이브리리 구축 등을 방해하기도 한다 (Nair et al., 1999). 따라서 세포외물질을 생산하는 해양미생물에서 단순하고 반복적이며 빠르게 DNA를 추출하는 방법을 개발하였다. 본 연구에서는 사용한 균주는 세포외다당류 (extracellular polysaccharides, EPS)를 합성하는 *Hahella chejuensis* (Ko et al. 2000, Lee et al. 2001)와 탈유화 물질인 지질을 합성하는 *Streptomyces* sp. (Park et al., 2000), *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira* sp., *Gymnodinium sanguineum*, *Cochlodinium polykrikoides* 적조 유발 미세조류를 죽이는 세포외 단백질을 합성하는 *Cytophaga* sp. (Sohn, 2000)이었다.

생물막 형성 미생물을 실내 배양하여 분자생물학적인 연구를 수행하고자 할 때 이런 다당류와 같은 분비물질이 핵산의 분리를 저해하여 연구에 어려움을 겪게 되었다. 일반적인 미생물 DNA purification kit나 토양에서 DNA를 분리하는 상업용 kit를 사용했을 때 세포외다당류 분비 미생물로부터 순도 높은 고분자의 DNA를 추출할 수 없었기 때문에 본 연구실에서는 세포외물질을 생산하는 해양미생물로부터 간편하게 DNA를 추출하는 새로운 방법을 개발하였다. 이 방법으로 추출된 DNA는 PCR, PFGE, 제한효소 처리, genomic DNA blot hybridization, 및 genomic DNA library 구축 등의 분자생물학적인 연구 수행에 적합한 양질의 DNA로 확인되었다.

이 방법은 식물의 DNA 추출 방법을 변형한 것이다 (Junghans and Metzloff 1990). 40 ml 배지에서 균주를 대량 배양한 후 배양액을 3,000 rpm으로 원심분리하여 세포를 회수한 후 막자사발에서 액체 질소에 넣고 세포를 마쇄하였다. 여기에 20 ml DNA lysis solution (0.05 M Tris, pH 7.6, 0.1 M NaCl, 0.05 M EDTA, 2% SDS, 0.2% PVP, 0.1% β -mercapto ethanol)을 넣고 잘 섞어준 뒤 상온에서 30분간 반응시킨 뒤 4,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상등액에 5 ml phenol을 넣고 잘 섞어준 뒤 다시 5 ml chloroform을 넣고 잘 섞어준 후, 4,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 뒤 상등액을 모아 다시 phenol, chloroform처리를 해 주었다. 이렇게 해서 얻은 상등액에 0.6 volume의 isopropanol을 넣고 5분간 상온에서 반응시켜 DNA를 선택적으로 침전시킨 뒤 8,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 DNA를 회수하였다. 회수된 DNA pellet은 70% 에탄올로 씻어준 뒤 공기 중에서 잘 말리고 100 μ l TE buffer 또는 증류수에 녹여 용해 한 후 spectrophotometer (UV-2401PC, Shimadzu)로 정량한 다음 제한 효소반응과 증폭 등의 후속실험에 사용하거나 4°C에서 보관하였다.

추출한 EcoRI, XhoI, HindIII등의 제한효소로 절단된 DNA조각을 10 cm이상의 0.7% Agarose gel에서 25V로 5시간 이상 전기영동한 후 Southern blotting 하였다. Transfer 된 membrane을 UV를 5분간 조사하여 DNA를 membrane에 고정시킨 후 2시간 이상 말린 뒤 42°C로 pre-heating된 hybridization buffer (Gold buffer 20 ml, 0.5 M NaCl 0.58 g, 5% Block reagent 1 g ; ECL)에 넣고 1시간 동안 pre-hybridization한 다음 probe를 넣고 hybridization oven (VS-9500H Vision)에서 밤새 반응시켰다. 사용된 buffer는 버리고 20 ml 5 \times SSC로 washing 한 후, primary washing buffer로 두 번, 2 \times SSC로 두 번 washing한 다음 물기를 살짝 닦아내고 detection reagent에 1분간 반응시킨 후 암실에서 Film (Hyper film ECL, Amersham)에 감광하였다.

이 DNA 추출방법을 이용할 경우, 40 ml 배지에서 균주를 대량 배양한 뒤 배양액을 3,000 rpm으로 원심분리 하여 세포를 회수한 후 막자사발에서 액체 질소에 넣고 세포를 마쇄하였다. 여기에 20 ml의 DNA lysis solution (0.05 M Tris, pH 7.6, 0.1 M NaCl, 0.05 M EDTA, 2% SDS, 0.2% PVP, 0.1% β -mercapto ethanol)을 넣고 잘 섞어준 뒤 상온에서 30분간 반응시켰고 이 용액을 4,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상등액에 5 ml phenol을 넣어 잘 섞어준 뒤 다시 5 ml chloroform을 넣고 잘 섞어준 후, 4,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 뒤 상등액을 모아 다시 phenol, chloroform 처리를 해 주었다. 이렇게 해서 얻은 상등액에 0.6 volume의 Isopropanol을 넣고 5분간

상온에서 반응시켜 DNA를 선택적으로 침전시킨 뒤 8,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 DNA를 회수하였다. 회수된 DNA pellet은 70% 에탄올로 씻어준 뒤 공기 중에서 잘 말리고 100 μ l TE buffer 또는 증류수에 녹여 용해 한 후 spectrophotometer로 정량한 다음 4°C에서 보관하였다.

추출한 DNA의 순도를 확인하기 위하여 각각 EcoRI, XhoI, HindIII 등의 제한효소로 37°C에서 2시간 동안 처리한 뒤 1×TAE 완충용액을 사용하여 0.7% agarose gel에서 50 V로 전기영동 하여 제한효소로 절단된 여부를 확인하였다.

또한 추출된 DNA를 미생물의 16S rDNA에서 매우 보존적인 primer 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1522R (5'AAG GAG GTG ATC CAN CCR CA-3')을 이용하여 PCR 방법으로 16S rDNA 부분을 증폭하였다. 증폭된 DNA 절편은 1% agarose gel에서 100 V로 전기영동 하여 크기를 확인하였다.

추출된 DNA는 EcoRI, XhoI, Sal I, Pst I 등의 제한효소로 절단한 뒤 0.7% agarose gel에서 20 V로 7시간 이상 전기영동 한 후 nitrocellulose membrane으로 전이시켰다. DNA가 전이된 membrane을 UV에 5분간 노출시켜 DNA를 membrane에 고정시킨 뒤 2시간 이상 말리고, herring sperm DNA (200 μ g/ml)를 첨가한 10ml formamide hybridization buffer (KPL)로 1시간 동안 pre-hybridization한 뒤, 이 용액에 probe를 넣고 hybridization oven (VS-9500H Vision)에서 밤새 반응시켰다. 사용된 buffer는 버리고 membrane을 washing 용액으로 씻어낸 다음, 암실에서 DNA detector hybridization kit (KPL)를 이용하여 Film (Medical X-ray film blue, AGFA)에 감광하였다.

2. 연구결과

이 방법으로 A260 / A280 ratio가 1.7 ~ 2.0인 양질의 DNA를 반복하여 분리할 수 있었다 (Fig. 3-82). 분리한 DNA의 평균 수율이 *Hahella chejuensis* 의 경우 1.86 mg/g (wt), *Streptomyces* sp.의 경우 1.18 mg/g (wt), *Cytophaga* sp의 경우 0.46 mg/g (wt) 이었다. 이 방법으로 분리한 DNA는 PFGE로 전기영동 했을 때 분자량 70 kb에 이를 정도로 큰 크기였다 (Fig. 3-83). 또한 이 DNA로 16S rDNA를 PCR 증폭을 하였을 경우 예상된 크기의 band가 나왔으며, 제한효소 처리한 뒤 genomic DNA blot hybridization을 수행 경우에도 명확한 band가 나와서 후속실험을 하기에 충분한 양질의 DNA인 것으로 확인되었다 (Figs 3-84, 85). 이 DNA로 Genomic DNA library도 구

축하였으며, 다른 해양미생물인 *Alteromonas* sp., *Bacillus subtilis*, *Candidatus camponotii*, *Cellulomonas* sp., *Vibrio* sp., *Xanthobacter autotrophicus*, *Oscillatoria* sp. 등에서도 DNA를 추출한 바 있다 (data not shown).

이 방법은 분리 과정을 최소화하여 방법이 단순하며 시간이 적게 소요되어 모든 과정을 3시간 이내에 수행할 수 있다. 또한 액체질소에서 세포를 마쇄하여 핵산의 저분자화를 최소화하며 (Volossiouk et al., 1995), 세포내외 nuclease의 활성을 억제시킨다 (Rauhut and Klug, 1999). Guanidine isothiocyanate나 sonication, bead-beating 또는 lysozyme 처리 등의 강한 방법을 사용하지 않기 때문에 DNA fragmentation를 최소화 하였다 (Krsek and Wellington, 1999; Niemi et al., 2001). 뿐만아니라 CTAB, guanidine isothiocyanate, proteinase K 등의 고가 시약을 사용하지 않기 때문에 비용이 저렴하다.

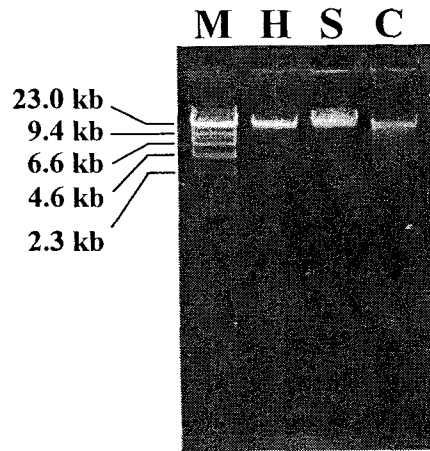


Fig. 3-82. Total DNA extracted from *Hahella chejuensis* (H), the *Streptomyces* sp. (S), and the *Cytophaga* sp. (C) on a 0.7% agarose gel. M, *Hind*III digested Lamda DNA size marker (in kb).

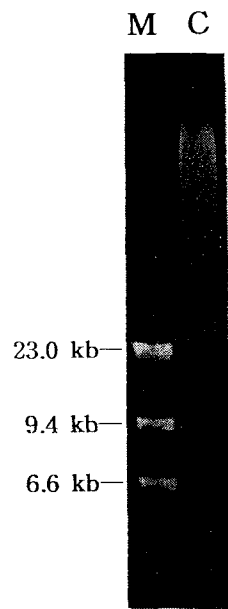


Fig. 3-83. PFGE analysis of DNA from the *Cytophaga* sp. (C). M, *Hind*III digested Lambda DNA size marker (in kb).

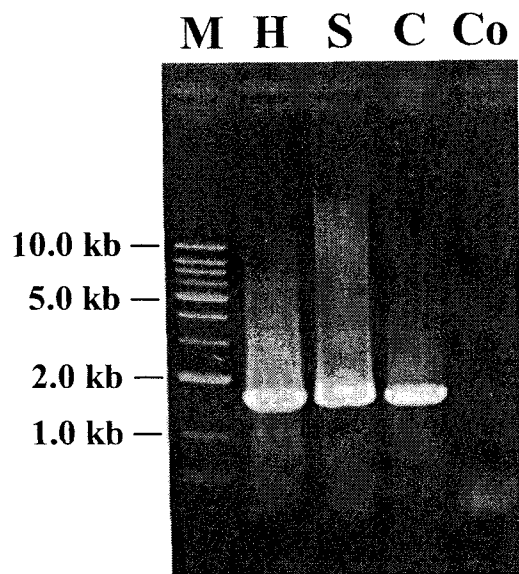


Fig. 3-84. PCR amplification of the 16S rDNA fragments from the extracted DNA as the template. Ethidium bromide-stained PCR products were readily detected following electrophoresis of the samples on a 1.0% agarose gel. A partial (1.5-kb) 16S rDNA fragment was amplified from *Hahella chejuensis* (H), the *Streptomyces* sp. (S), and the *Cytophaga* sp. (C). The control reaction did not contain template DNA (Co).

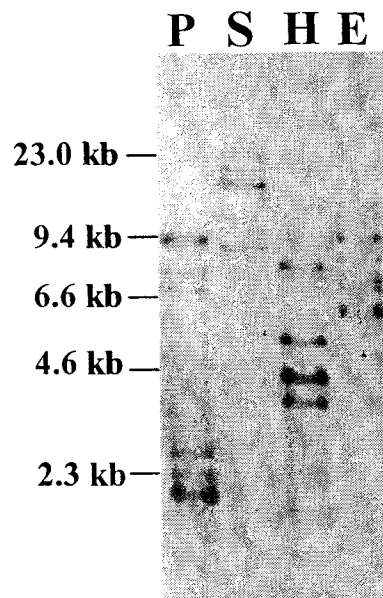


Fig. 3-85. Genomic Southern blot hybridization of *Hahella chejuensis* using the 16S rDNA probe. *H.chejuensis* DNA was digested with *Pst*I (P), *Sal*I (S), *Hind*III (H), and *Eco*RI (E). *Hind*III digested Lamda DNA size marker (in kb) was used for the ladder.

제 10 절 모델 해양미생물 *Hahella chejuensis*의 genomic DNA library 구축

본 연구에서는 제주 마라도 해안에서 분리한 신속 세균이며 외국 연구진에 의해 연구가 진행된 적이 없으므로 새로운 유전자를 발견할 가능성이 높은 *Hahella chejuensis*를 모델로 활용하여 genomic DNA library를 구축하고 유용유전자 탐색기반을 확립하고자 하였다.

1. 이론적, 실험적 접근방법

*Hahella chejuensis*의 genomic DNA library 제작은 ZAP Express predigested vector kit (Stratagene, U.S)을 이용하여 실시하였다 (Fig. 3-86). Host cell로써 XL1-Blue MRF' cell을 사용하였다. LB-tetracycline agar 배지에 배양하여 형성된 단일 colony를 0.2% maltose-10 mM MgSO₄ 가 포함된 LB배지에 접종하였다. 37°C에서 5시간 동안 배양한 뒤 원심분리 하여 얻은 pellet을 멸균된 10 mM MgSO₄ 용액에 OD₆₀₀=0.5 되도록 희석하여 실험 전까지 4°C에 보관하였다.

*H.chejuensis*의 genomic DNA를 EcoRI으로 partial digestion 시킨 후 0.7% agarose gel에서 전기영동하고 10 kb 이상의 DNA 절편을 수거하여 DNA ligation에 사용하였다. 이때 -70°C 에 보관되어 있는 packaging extract와 준비된 ligation DNA를 기포가 생기지 않도록 섞은 뒤, 22°C에서 1시간 30분 동안 반응시켰다. 반응 후, SM buffer와 chloroform을 첨가하고 spin down을 하여 phage가 포함된 상등액만을 새로운 tube로 옮겨 다음 실험 전까지 4°C에서 보관하였다.

Packaging ligation product를 농도별로 희석된 packaged reaction 1 μ l와 XL1-Blue MRF' cell 200 μ l를 섞은 뒤 37°C에서 15분간 반응시켰다. 그 다음 NZY top agar 2-3 ml, 0.5 M IPTG 15 μ l, 250 mg/ml X-gal 50 μ l를 잘 섞어서 NZY agar plate에 부은 후 배양하였다. Plaques는 6-8시간 경과 후 나타났으며 overnight 후, color 구별이 가능했다. 이 library를 이용하여 amplify library를 제작하였다. 결정된 희석배수의 packaged reaction 100 μ l와 host cells 600 μ l를 잘 섞은 뒤 37°C, 15분 반응시키고 NZY top agar 6.5 ml과 섞어서 spreading 하였다. 6-8 시간 후 plate에 8-10 ml의 SM buffer를 넣고 4°C에서 plaques를 잘 현탁시킨 뒤 회수하였다.

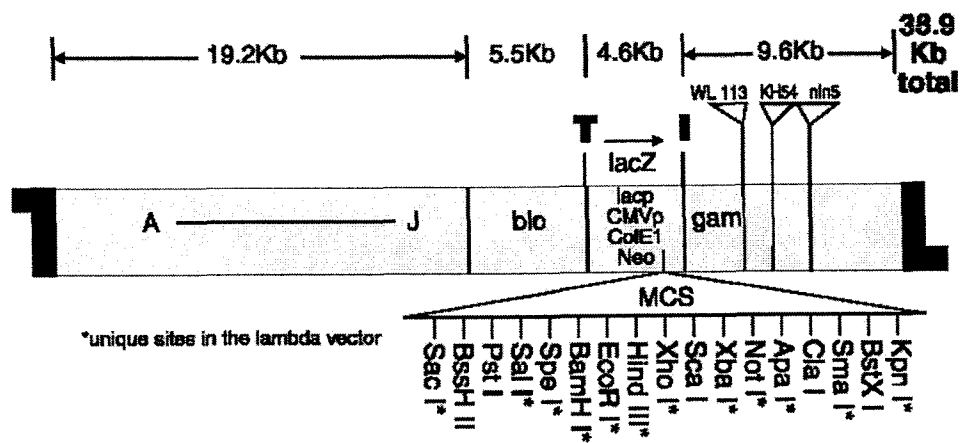


Fig. 3-86. Map of the ZAP Express vector

2. 연구결과

Genomic DNA library의 경우 평균 크기 10 kb의 DNA 절편을 ZAP Express vector (Stratagene)에 삽입하여 1.8×10^3 Mb 크기의 library를 구축하였다. 이때 흰색의 recombinant plaques는 파란색의 background plaques의 380배 정도이므로 효율이 좋은 library로 확인되었다. 본 library는 차후에 다당류 대사관련 효소의 유전자를 분리하는 연구에 활용하고자 한다.

제 11 절 세포외 다당류 생산 관련 유전자 분리

세포외 다당류를 합성하며 본 연구의 모델 미생물인 *Hahella chejuensis*에서 세포외 다당류 생산 관련 유전자를 분리하였다. 이 유전자들은 기존에 세포외 다당류 합성 유전자들과 상동성을 보였으며 cluster를 형성하고 있어 *Hahella chejuensis*의 세포외 다당류 합성 유전자 군으로 추정되었다.

1. 이론적, 실험적 접근방법

프런티어사업단에 의해 수행된 *Hahella chejuensis*의 유전체 분석 결과를 토대로 Primer를 제작한 뒤 PCR로 증폭한 뒤 pGEM-T Easy vector에 삽입하였다 (Fig. 3-87, 88, 89).

2. 연구결과

전체 42 kb인 유전자 cluster를 세 개의 벡터에 삽입한 뒤 각각 pGEM-T Easy/EPS 1, pGEM-T Easy/EPS 2, pGEM-T Easy/EPS 3로 명명하였다. pGEM-T Easy/EPS 1는 38부터 44까지의 유전자를 포함하고 있고 (Fig. 3-90, 91, 92, 93, 94, 95) pGEM-T Easy/EPS 2는 45, 46, 48 (Fig. 3-96, 97, 98), pGEM-T Easy/EPS 3는 50, 51, 52 유전자를 포함하고 있다 (Fig. 3-99, 100, 101), 모두 12개의 유전자를 클로닝하였으며 이중 9 개가 세포외 다당류 합성에 관여하는 유전자로 추정되었다 (Table 3-29).

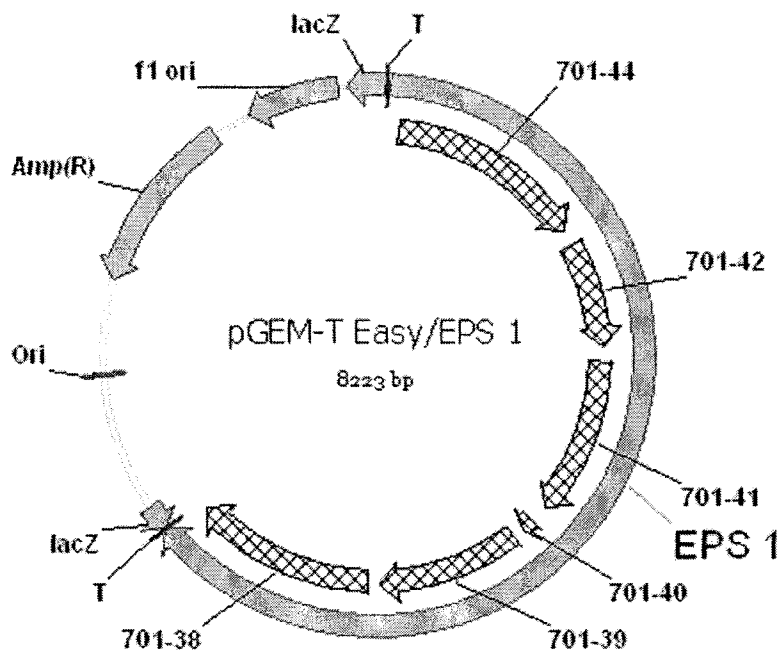


Fig. 3-87. Map of pGEM-T Easy/EPS 1.

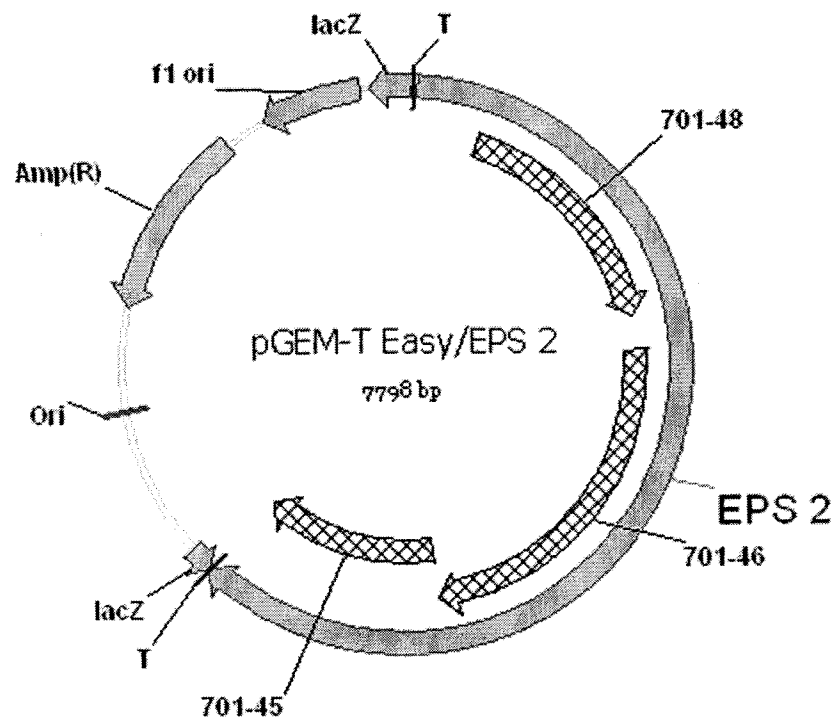


Fig. 3-88. Map of pGEM-T Easy/EPS 2.

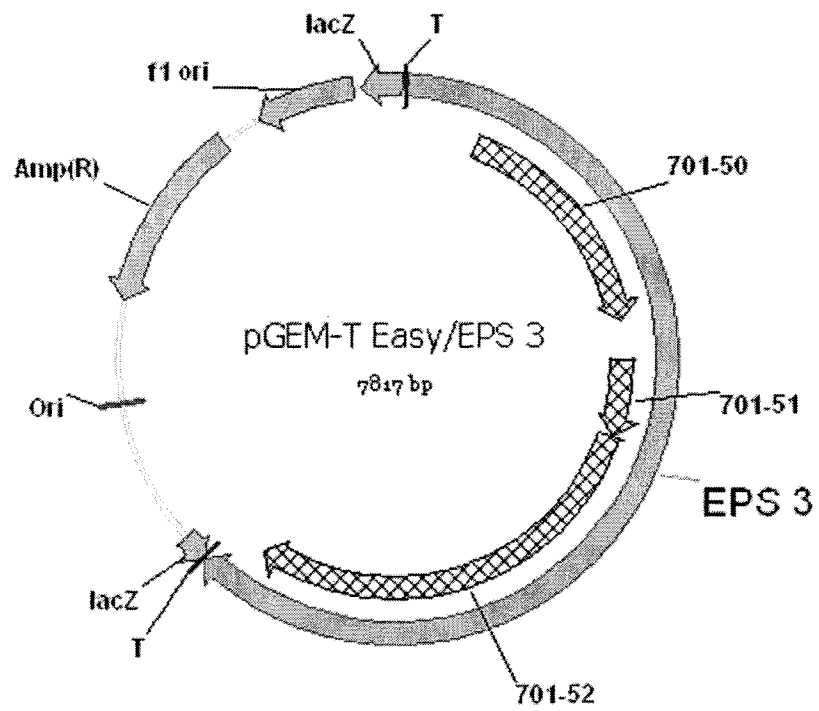


Fig. 3-89. Map of pGEM-T Easy/eps3.

Table 3-29. Exopolysaccharide-producing genes cloned in this study.

ID	The closest gene name (Species)	Lenth (amino acid)	Identity (%)
HC030701_38	Exopolysaccharide biosynthesis protein (<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>)	339	32.0
HC030701_39	Glycosyltransferase (<i>Thermobifida fusca</i>)	325	27.9
HC030701_40	Hypothetical protein	45	
HC030701_41	Glycosyltransferase (<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>)	343	32.6
HC030701_42	Hypothetical protein	224	
HC030701_44	Lipid A core - O-antigen ligase (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	413	32.8
HC030701_45	Glycosyltransferase (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	374	50.4
HC030701_46	Glycosyltransferase (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	620	37.3
HC030701_48	UDP-glucose 6-dehydrogenase (<i>Azotobacter vinelandii</i>)	426	72.1
HC030701_50	Hypothetical protein	428	
HC030701_51	Polysaccharide export-related protein (<i>Vibrio cholerae</i>)	142	50.7
HC030701_52	Exopolysaccharide biosynthesis protein (<i>Vibrio cholerae</i>)	762	35.7

```

1  ATG GAG CCG CAT CAG ACA TCG CTT CAA GAA GGC TGG CGT AGC GCC GGG CCA GCA AGC AGC
   M E P H Q T S L Q E G W R S A G P A S S
61  GGA GAG CAA GTA ATG GGA CAC ATC ATG GAG TCA ACC GGA ATC AAT TCA ATG CAA CCC AAC
   G E Q V M G H I M E S T G I N S M Q P N
121 CGG GCG CGC TGG CGC GAG CTG AAG GAA CAG TTG CTG CTA ACC TTC AGT CCC AAA TTG CGT
   R A R W R E L K E Q L L L T F S P K L R
181 GGT AAA AAA GTC GTC TAT CTG GAT TAT CCG CTG CAC TTG AAT CTG GGC GAC CTG CTG ATC
   G K K V V Y L D Y P L H L N L G D L L I
241 TAC AAA GGC ACG CTG ACA CTG CTT GAG GAG CTA GGC GCG CAA GTG GAA ATG AGC TTC TCC
   Y K G T L T L L E E L G A Q V E M S F S
301 ACC AGC AAC GCA GAC CGT TTC TTC CGC ACG CAC ATT CCG GAG GAT TGG GTG CTG TTG TTA
   T S N A D R F F R T R I P E D W V L L L
361 CAT GGC GGG GGC AAT TTC GGC GAT ATC TAC AGC ATT CAT CAG GCG CTG CGG GAA AAA GTA
   H G G G N F G D I Y S I H Q A L R E K V
421 ATA AAG CAC TTC CCC AAC AAT CCT ATC CTC ATC ATG CCG CAG TCT GTG CAC TTT AAT GAG
   I K H F P N N P I L I M P Q S V H F N E
481 CCG GAG ACG TTC CTG CAA AAC TGC TCC CTG TAC CCG GAG CAC AAG AAC CTC AAG ATG TAT
   P E T F L Q N C S L Y R E H K N L K M Y
541 GTG CGC GAC CAG GAG TCT TTT AAC TTC ATG TCG CAG GCA TTG ACG CCG GAA CAA CTG CTT
   V R D Q E S F N F M S Q A L T P E Q L L
601 ATG GCT CCG GAT ATG GCC ACC ATG CTG ATC GAT GAA TGG ACC TGG CCG CAA CAA ATG CCC
   M A P D M A T M L I D E W T W P Q Q M P
661 GAG CGC ACC CTG ATG TTC CGT CGC AAA GAC TGC GAA TCC GTA TCC GGG GCC GAC GCG GTG
   E R T L M F R R K D C E S V S G A D A V
721 GAG GAC GCC TTC GAC TGG AAC TCC CTG TAC ACG TCC ATG GAC ATG AAA AAG TTT CGC CTC
   E D A F D W N S L Y T S M D M K K F R L
781 TTC AAC CGC GTG TCA GGA TTG GAA CGC AAG CAC GAT ATC AAT CTG TTC ACT TCA CCG CTG
   F N R V S G L E R K H D I N L F T S P L
841 TGG GTG CGC TTC AGC AAT GCG CTG ATC AAT AGA GCG GTG AAC TTC TAT CAG AAT TAC GGA
   W V R F S N A L I N R A V N F Y Q N Y G
901 CAG GTC GAT ACG GAT CGT CTG CAT GGC GCG ATA CTG GCT CTG CTC TTG GGC AAG TCC GTG
   Q V D T D R L H G A I L A L L L G K S V
961 CTT TTA TCA GAT AAC TGT TAC AAC AAA ATC GAC CGC TAT ATG CGT TGT TGG CTG GTG TAA
   L L S D N C Y N K I D R Y M R C W L V *

```

Fig. 3-90. Nucleotide and deduced amino acid sequences of HC030701_38.

Putative open reading frame (ORF) is shown below the nucleotide sequence in one letter symbol of amino acids. Nucleotide numbers are on the left side and the amino acid numbers are on the right side. Putative termination codon is marked by asterisks (*).


```

1  GTG GAC ATA ACC ATA CTA TCC TGG GAT CGG CTG GAA GAC ACC AAA GCC GCG ATC GCC AGC
   V D I T I L S W D R L E D T K A A I A S
61  GCA CTG ACG CAA ACC GGC GTG GAG CTA CGC GTA ATC GTT GTG GAT CAG GGT TCC AAG CCT
   A L T Q T G V E L R V I V V D Q G S K P
121 GAG AGC CTG AAT CAA CTG CGC GCA TTC TGC CGC CAA TAT CCG AAC GTG GAT CTG GTT TGC
   E S L N Q L R A F C R Q Y P N V D L V C
181 AAC GTT AAC AAC CTG GGC GTT CCC GGC GGG CGC AAC CAG GCC GCT TTT CAG GGT AAC GGC
   N V N N L G V P G G R N Q A A F Q G N G
241 GAC TAT ATC GTC GCA TTG GAC AAC GAC GCG GAG TTC ATC GAC GAG CGC CAA ATC GCC AAT
   D Y I V A L D N D A E F I D E R Q I A N
301 GCC GTG GAA ATC ATG GAG CGA GAG ATC CTC GCC GCC ATC GGC TTC CGC ATT TTG CGC
   A V E I M E R Q R D L A A I G F R I L R
361 TTT GGC ACA CGT TGC GAA GAC CTG AGC AGC TGG AGC TAT ACG CAG AAC GCC CAT GAA TGG
   F G T R C E D L S S W S Y T Q N A H E W
421 GGC GAA AAG CCT TTC TAC ACA ACG CAT TTC GTC GGC GCC GGC CAT ATG ATT CGC CGC AGC
   G E K P F Y T T H F V G A G H M I R R S
481 GTC TTC GAT CAG GTG AAC GGC TAT GAC GAT TCG CTG TTC TTC CTG CAG GAA GAG GCG GAG
   V F D Q V N G Y D D S L F F L Q E E A E
541 CTG TCA CGC AAG CTG ATC AAC TGC GGC TAC AAA ATC CGC TAT TCG CCA GAA GTG GTG ATC
   L S R K L I N C G Y K I R Y S P E V V I
601 GGC CAC AAA GTC GCA GCG GAG CGA CGG GTC AAT TGG AAC GGA CCG CGC TGG CGC TTT CAT
   G H K V A A E R R V N W N G P R W R F H
661 GTA CGC AAC CGT TTC TAT ATG GAC GTT AAA TTC AGA ACG CCT TTC GCC TCT TTG TGC CTG
   V R N R F Y M D V K F R T P F A S L C L
721 GGC ACA ATG CTC ACC TTG TAC AAA GGC TTC CGC GCC GGA CTG ATT CTT GAC TCC ACC ATC
   G T M L T L Y K G F R A G L I L D S T I
781 GGG TTC ATG CAG GGG CTA GGC ATG CTT CCA CAG GCC ATC GCC TCC TGG AAG TTG CCC GGC
   G F M Q G L G M L P Q A I A S W K L P G
841 GTC GCC TCT ACG CCG GCT TCC AAA GCC TAC ATC GCC TCC TGT TCT CAG AAC AAA GGC GTT
   V A S T P A S K A Y I A S C S Q N K G V
901 TCT CGA TGG AGC CGC ATC AGA CAT CGC TTC AAG AAG GCT GGC GTA GCG CCG GGC CAG CAA
   S R W S R I R H R F K K A G V A P G Q Q
961 GCA GCG GAG AGC AAG TAA
   A A E S K *

```

Fig. 3-91. Nucleotide and deduced amino acid sequences of HC030701_39.

Putative open reading frame (ORF) is shown below the nucleotide sequence in one letter symbol of amino acids. Nucleotide numbers are on the left side and the amino acid numbers are on the right side. Putative termination codon is marked by asterisks (*).

```

1  TTG AAC GTG GAG ATG ACG CAT CGA AGC CAA CAA AAG CAA ATC AGC GTA GAG AAA CCT GAT
   L  N  V  E  M  T  H  R  S  Q  Q  K  Q  I  S  V  E  K  P  D
61  ATA CGG AAT GCC TGC AAA AAG GCC TTT CCG CTT AAA CAT TTT AGA CAA CCT CAC ACC ATG
   I  R  N  A  C  K  K  A  F  P  L  K  H  F  R  Q  P  H  T  M
121 GAG CTG GGC GAC TTA TGA
    E  L  G  D  L  *

```

Fig. 3-92. Nucleotide and deduced amino acid sequences of HC030701_40.

Putative open reading frame (ORF) is shown below the nucleotide sequence in one letter symbol of amino acids. Nucleotide numbers are on the left side and the amino acid numbers are on the right side. Putative termination codon is marked by asterisks (*).

```

1  GTG ACA ACA GCA AAC TCC GAC ATG ACC GCA GAA GCG CCA TTA GTC TCC GTT ATC ATG CCC
   V T T A N S D M T A E A P L V S V I M P
61  GTC TAT AAC CGG GAG AAA ACG GTT GCC CAG GCG ATA GAG AGC GTG CTG GCG CAA ACC TTC
   V Y N R E K T V A Q A I E S V L A Q T F
121 GCC GAC TTT GAA TTA ATA GTG GTC GAC GAC GGT TCT ACA GAC CGC TCG GCG GAA ATC GTC
   A D F E L I V V D D G S T D R S A E I V
181 AAC GGG TTT ACG CAA GAT GCG CGC GTG CGC TAC CGC CTG CAG GAA AAT TCC GGC CGG CCT
   N G F T Q D A R V R Y R L Q E N S G R P
241 TCC CTC GCC CGC AAC AGC GGC CTG AAA TTG GCG CGT GGA CAG TGG GTG GCG TTT CTC GAT
   S L A R N S G L K L A R G Q W V A F L D
301 TCC GAT GAC CGC TGG ACG CCG GCC AAA TTG GAG CGA CAA ATT GCA TTA TTG GAG CAA TGC
   S D D R W T P A K L E R Q I A L L E Q C
361 GCG GCG CAA GGC GTC AGC CTG GAC CTG GTG ATC AGC GAC TAT GAG GTC ATG GAA AAT GAC
   A A Q G V S L D L V I S D Y E V M E N D
421 GTC CTG AAG CAT CCG TCC TTC TTC AAA GCC TAT AAC GTT AAC CAG CGC TTG GCG GCG GCT
   V L K H P S F F K A Y N V N Q R L A A A
481 GTC GAG CAC ACT TTT CCA GAC GGC TGG ACT TAT CGC CAG CGT CCA TTC CTG CAA GCG CTC
   V E H T F P D G W T Y R Q R P F L Q A L
541 TAT GGC CTG GGT TTC GCC GCC ACC CAG GCG GTG CTG GTG CGC AGA TCG CTA TTG GAG CGG
   Y G L G F A A T Q A V L V R R S L L E R
601 GTC GGC GGC TTT GAT AGC GAG CTA GTG TTC GCC GAA GAC AAC GAC CTT TGG ATG ACC ATC
   V G G F D S E L V F A E D N D L W M T I
661 TCC GAG CAA GGC CGC GTT GGC TGC TCC AAA GGC ATC GCC TAC ACC TAC GTG CAT CAT GGC
   S E Q G R V G C S K G I A Y T Y V H H G
721 GAC AAT ATC ACC AGT GTT AAG TCA GAC CGG TTT TAC ACC GAC ACC ATC AAC GTG CTG TTC
   D N I T S V K S D R F Y T D T I N V L F
781 AAG CAT CTG GCC ACC GCC AGG AAG TTA GGG GTG CCG ATG GAG CCC CTG AAA GAA AGA TAC
   K H L A T A R K L G V P M E P L K E R Y
841 GCC AAC TAC TAC TTA TCG CTG TGC CGC AAC AGA CTG CGC GAG CAG CGC TGG AAA GAG GCG
   A N Y Y L S L C R N R L R E Q R W K E A
901 GCT TCG GCC TTT TAC AGC GGC TTG CCA GGG CTG ACC AGT AAA CGC AAC TGG AAA ATG ACC
   A S A F Y S G L P G L T S K R N W K M T
961 GCG CGC ATT GGA GTC ACT GCA CTG CAA AGT TTG ACG ACG AAA CGC GGG CGG CGG GCG GCG
   A R I G V T A L Q S L T T K R G R R A A
1021 CAG CTG AGT TGA
      Q L S *

```

Fig. 3-93. Nucleotide and deduced amino acid sequences of HC030701_41.

Putative open reading frame (ORF) is shown below the nucleotide sequence in one letter symbol of amino acids. Nucleotide numbers are on the left side and the amino acid numbers are on the right side. Putative termination codon is marked by asterisks (*).

```

1  ATG GTC TCA CAT GAA TTC AAA TGC ATT TTT ATC CAT ATC CCC AAA TGC GCC GGC ACC AGC
   M  V  S  H  E  F  K  C  I  F  I  H  I  P  K  C  A  G  T  S
61  ATT GAA AGC GCT TTG GGA CAT CTT GAC GGA TAC CAG GGA CGC AAT GGC CAG GAC CAC AGA
   I  E  S  A  L  G  H  L  D  G  Y  Q  G  R  N  G  Q  D  H  R
121 TCA ATC AGG CTG ATG GCG AAG CCG CGA CTT AGT CTG CGC GCG CTC ACA TCC AAA GCG CGC
   S  I  R  L  M  A  K  P  R  L  S  L  R  A  L  T  S  K  A  R
181 CTG CTG GAC ATC GCG CGC AGC GTG AGG CAC CAG CGC CGC AGC GAC ATG AAC CCA AAA AAC
   L  L  D  I  A  R  S  V  R  H  Q  R  R  S  D  M  N  P  K  N
241 AAA ATC ACC GTT TCC GAC GAG CAG TAT AAA AAC TAC TTT AAG TTC ACC TTC GTT CGA AAC
   K  I  T  V  S  D  E  Q  Y  K  N  Y  F  K  F  T  F  V  R  N
301 CCC TGG GCG CGG GCT TAC TCC ATG TAC AAG AAC GTC ATT CGC GAC GAA GCC CAT AAA CGC
   P  W  A  R  A  Y  S  M  Y  K  N  V  I  R  D  E  A  H  K  R
361 ACT TTC GGC ATT GAA GGC GAC ATG TCT TTC AAA GAC TTC ATG CAC GCC TTC GCC GGA AAA
   T  F  G  I  E  G  D  M  S  F  K  D  F  M  H  A  F  A  G  K
421 GGC ATG CTG CGC CCA CAA ACC TAT TGG ATC AAG GAC GAC AAC GGC GAC ATC TCC CTC GAC
   G  M  L  R  P  Q  T  Y  W  I  K  D  D  N  G  D  I  S  L  D
481 TAC GTC GGC CGC TTT GAA AAC CTG GAA GCG GAT TTC AAG GAA GCC TGT CAG CGC ATG GGC
   Y  V  G  R  F  E  N  L  E  A  D  F  K  E  A  C  Q  R  M  G
541 GCT CAA CAC ATT GAG CTA CCT CAC AAA ATC AAG GGC GAC GGG GAA GAT TAT CGA CAG TAT
   A  Q  H  I  E  L  P  H  K  I  K  G  D  G  E  D  Y  R  Q  Y
601 TAC GAC GAG GAA ACC AGA CAG TTG GTG AGT CGG ATA TAC AAG GAC GAG ATC GAT TAC TTT
   Y  D  E  E  T  R  Q  L  V  S  R  I  Y  K  D  E  I  D  Y  F
661 GGC TAC ACG TTT TAA
   G  Y  T  F  *

```

Fig. 3-94. Nucleotide and deduced amino acid sequences of HC030701_42.

Putative open reading frame (ORF) is shown below the nucleotide sequence in one letter symbol of amino acids. Nucleotide numbers are on the left side and the amino acid numbers are on the right side. Putative termination codon is marked by asterisks (*).

```

1  ATG TCG TTC CTG ACC GGA CTG GTG TCT GGA GGC GGC AGA AGC GGC CAT GGC GGT GCG GAA
   M  S  F  L  T  G  L  V  S  G  G  G  R  S  G  H  G  G  A  E
61  ATG ATC GCA GAG TCC GCC AGC GGC AAC ATG GTG CGC CAG CTG GTG GGT CTC AGC ATA CTG
   M  I  A  E  S  A  S  G  N  M  V  R  Q  L  V  G  L  S  I  L
121 GGC ATA GGC GGT TAT TTC GTG CTG CAT TTG CGC GAC CGC TCC CTG GGC ACC TTC GTG TCC
   A  I  G  G  Y  F  V  L  H  L  R  D  R  S  L  G  T  F  V  S
181 CGT CAT ATT TAC TGG CTG ATA TTG CTC GGC TAT ATC GTG CTG TCG ATT CTA TGG TCG GTT
   R  H  I  Y  W  L  I  L  L  G  Y  I  V  L  S  I  L  W  S  V
241 GAA CCC GGC GTA TCA GTG CGC CGC ATC ATC AGC CTT ATG ATC GTC TTT GTG GCG GCG CTG
   E  P  G  V  S  V  R  R  I  I  S  L  M  I  V  F  V  A  A  L
301 GCG CTG TTG CAG GAG TAC ACA CCG GAA TAC CTG CTC AGC CTC ATC GCG AGA ATT CTG GGC
   A  L  L  Q  E  Y  T  P  E  Y  L  L  S  L  I  A  R  I  L  G
361 TGC GCC GCC ATC GCC GGG TTG ATA TAC GCG GTG ATT TCT CCC CAA AAC GGC TTT ATT CAA
   C  A  A  I  A  G  L  I  Y  A  V  I  S  P  Q  N  G  F  I  Q
421 GGC GGA CTG CGG GAA GGC GCG CTG GGC ATC TTC AGC GAC AAA AAC GCA GGC GCC CGT
   G  G  L  R  E  G  A  L  L  G  I  F  S  D  K  N  A  G  A  R
481 TGC TAC GTC TAC GCC CTC ATG ACC TTC TAC GGC CTG CGT ATG TAT GAG AGC AGA CAG GAC
   C  Y  V  Y  A  L  M  T  F  Y  G  L  R  M  Y  E  S  R  Q  D
541 AAA ATT TTA ATC GGC GGC CTG GTG GCG GCG ATT ATT CTG AGT AAT TCA GCC ACC GCG CTG
   K  I  L  I  G  G  L  V  A  A  I  I  L  S  N  S  A  T  A  L
601 GCC ATG GTG TTT GGG GGC ATG GGC CTG ACC ACC ATC TTC AAC GGC AGC CGG GTG ATC GGT
   A  M  V  F  G  G  M  G  L  T  T  I  F  N  G  S  R  V  I  G
661 AAC TCC CAG AAG ACA TTT AAC CGT CTT ATC GTG GTG ACG ATG GGC CTG TTG ATT GGC GCC
   N  S  Q  K  T  F  N  R  L  I  V  V  T  M  G  L  L  I  G  A
721 GTA CTG GCT AAC TAC TTC TAT GAA TTG ATT CTA CTG TCT CTG GGA CGC GAT CCA TCG CTG
   V  L  A  N  Y  F  Y  E  L  I  L  L  S  L  G  R  D  P  S  L
781 ACC AAC CGC ACC ATC ATC TGG GAG CTA TTA GGA CCC AGT CTG GAT GAC CGC CCC ACT CTC
   T  N  R  T  I  I  W  E  L  L  G  P  S  L  D  D  R  P  T  L
841 GGC TAC GGA TAC GGC GCA TTC TGG GCC AGC GTC TAT GTA GAG TCG TTC GTC AAA GTC TGG
   G  Y  G  Y  G  A  F  W  A  S  V  Y  V  E  S  F  V  K  V  W
901 GGG TTC ATC GGC AAC GCA CAT AGC GGA TAT GTT GAG ACG CGC CTC AAC GGC GGT TAC GTC
   G  F  I  G  N  A  H  S  G  Y  V  E  T  R  L  N  G  G  Y  V
961 GGG CTG GTC ATT TTG ATC GCC ACC TTC GTG ATG TCT TTC TGG CGC ATC GCC CGC GCT TTC
   G  L  V  I  L  I  A  T  F  V  M  S  F  W  R  I  A  R  A  F
1021 ACC TTC CAC CCT GAG TCA TCC GTG TTC GCA TTA ATG GCG AGC ATT CTG CTG ATT CAG GCG
   T  F  H  P  E  S  S  V  F  A  L  M  A  S  I  L  L  I  Q  A
1081 GCG GTT AAC TAT ATC GGT TTC ATC ATC CCG AAC CAC GTG AGC TTC GAC ATG TTT ATG TTC
   A  V  N  Y  I  G  F  I  I  P  N  H  V  S  F  D  M  F  M  F
1141 TCG ATC ATT GTC GTC GTG GCG GGC AAG TAT GGG CTT TCG CGA GAA CTC TCG CCC ACT CCG
   S  I  I  V  V  V  A  G  K  Y  G  L  S  R  E  L  S  P  T  P
1201 CTG TAC GAA GTG CAG CCG GAC CCA GCG GAG GCG CGC GCA TGA
   L  Y  E  V  Q  P  D  P  A  E  A  R  A  *

```

Fig. 3-95. Nucleotide and deduced amino acid sequences of HC030701_44.

Putative open reading frame (ORF) is shown below the nucleotide sequence in one letter symbol of amino acids. Nucleotide numbers are on the left side and the amino acid numbers are on the right side. Putative termination codon is marked by asterisks (*).

```

1  ATG AAG ACC CAA AGC GTA GCC ATC GTC CTG CAT GAT CTA AGG GGC GGC GGC GCT GAA AAA
   M  K  T  Q  S  V  A  I  V  L  H  D  L  R  G  G  G  A  E  K
61  ATG ATG GTG CGG CTC GCC AAT GCT CTG GCG GAG CAG AAT ACG GCC GTA ACC ATG GTT CTA
   M  M  V  R  L  A  N  A  L  A  E  Q  N  T  A  V  T  M  V  L
121 CTG ACC GAG GGC GGC GTC AAC AAG GCG GAG CTG TCC TCA GCA GTG AAG CTG GTG GAG CTC
   L  T  E  G  G  V  N  K  A  E  L  S  S  A  V  K  L  V  E  L
181 GGC TCC CCG CGC ACC CTG AGC TCC GTG CCC AGG CTG GCG GCC TAC CTG CGC GAG GCT CAG
   G  S  P  R  T  L  S  S  V  P  R  L  A  A  Y  L  R  E  A  Q
241 CCA GAT AGA ATT CTA TCC GCG TTG ACC CAC GTC AAC GTG GCG GCC GCT CTC GCC TGC GCC
   P  D  R  I  L  S  A  L  T  H  V  N  V  A  A  A  L  A  C  A
301 ATG ACA GGC ATG TTG CGC CGT CTG GTG GTG AGC GAG CGC AAC ACC TAC TCA CTG GAT AAA
   M  T  G  M  L  R  R  L  V  V  S  E  R  N  T  Y  S  L  D  K
361 AAG GTC AAC ACT GGT GCG GTG ATG AAA TTC ACC TAC TGG CTG GCG CCC AGG ATT TAT CGC
   K  V  N  T  G  A  V  M  K  F  T  Y  W  L  A  P  R  I  Y  R
421 CGT CTG CCG AAC CCT GTC ATC GCA GTC TCC GGA GGC GTC GCC CGC GAC TTG GTT GAG ACA
   R  L  P  N  P  V  I  A  V  S  G  G  V  A  R  D  L  V  E  T
481 GAG TCT CTG CGC CCC AAG GAC ATT GTC GTC GCA CCC AAC CCG GTA TTG ACC GCC AAA GTA
   E  S  L  R  P  K  D  I  V  V  A  P  N  P  V  L  T  A  K  V
541 CTT ACA ATG ATG GAT GAG CCC GCC AGT CAC CCA TGG TTA CAA GAC CCG GCT ACA CGT GTG
   L  T  M  M  D  E  P  A  S  H  P  W  L  Q  D  P  A  T  R  V
601 GTG GTC GCG GTT GGA CGA CTC AGC CAT CAA AAA GGA TTC GAC ACG CTT ATC CGC GCC TTC
   V  V  A  V  G  R  L  S  H  Q  K  G  F  D  T  L  I  R  A  F
661 GCA CAG GTT GCG GAC ATA CCG AAC CTG AGA CTG GTC ATA TTC GGT GAA GGT GAG TTA CGC
   A  Q  V  A  D  I  P  N  L  R  L  V  I  F  G  E  G  E  L  R
721 GAA GAG TTG AGC GCG CTT GTC AGC CAG CTG CAA TTG ACG GAA AGA GTC GAT CTG CCC GGT
   E  E  L  S  A  L  V  S  Q  L  Q  L  T  E  R  V  D  L  P  G
781 TAC GCC GCC AAC CCT TTG GCT GAG ATG AAA GCG GCG GAC CTG TTT GTA CTG TCT TCG CGG
   Y  A  A  N  P  L  A  E  M  K  A  A  D  L  F  V  L  S  S  R
841 TTT GAA GGA AGC CCT AAC GTC CTG GTG GAA GCC ATG GCT ACA GGC GTT CCT GTC CTG GCG
   F  E  G  S  P  N  V  L  V  E  A  M  A  T  G  V  P  V  L  A
901 ACC AAT TGC CCT TCC GGG CCG GAT GAA ATT CTG GAC CAG GGA CGC TTG GCG CCA CTG GTG
   T  N  C  P  S  G  P  D  E  I  L  D  Q  G  R  L  A  P  L  V
961 CCA GTG GAT AAC GTC AAC GCC ATG GCG CAG GCG TTA CGC CAA TGC ATG GAG CAA CCC AGC
   P  V  D  N  V  N  A  M  A  Q  A  L  R  Q  C  M  E  Q  P  S
1021 GAC AAC GCT GAA TTG AAA AAT CCG GCT GAT CGC TAT CGC GAC GCC CTA TCC GCT CAA GCC
   D  N  A  E  L  K  N  R  A  D  R  Y  R  D  A  L  S  A  Q  A
1081 TAC AGT CCG GTA TTA AAC GGT TCT GTC ACT GTC TGG GGG CGC TGA
   Y  S  A  V  L  N  G  S  V  T  V  W  G  R  *

```

Fig. 3-96. Nucleotide and deduced amino acid sequences of HC030701_45.

Putative open reading frame (ORF) is shown below the nucleotide sequence in one letter symbol of amino acids. Nucleotide numbers are on the left side and the amino acid numbers are on the right side. Putative termination codon is marked by asterisks (*).

```

1  ATG CTT AAC GAA GCC ACA ACC ACC AAC GTC GGC GGA ATC AAG ACC AGT TGT CTC GAC CGC
M  L  N  E  A  T  T  T  N  V  G  G  I  K  T  S  C  L  D  R
61  AAA CAG CTC GCG TTG CTG GTG GGG GAA ATC TGC CAA AAC TAT ACT CCG GAC CAG TCG GCG
K  Q  L  A  L  L  V  G  E  I  C  Q  N  Y  T  P  D  Q  S  A
121  TTT TTG ATT TTC TCC TCT AAT GGG CAG GCG ATC TCA TTG GCG GGC TCA GAT CCC GCC TAC
F  L  I  F  S  S  N  G  Q  A  I  S  L  A  G  S  D  P  A  Y
181  CTT GAA CTG ATG AAT AAC GTC GAT CTG GTG CAC GCG GAC GGA CAA AGC GTA GTG ACT TTG
L  E  L  M  N  N  V  D  L  V  H  A  D  G  Q  S  V  V  T  L
241  TCG CGC TGG TTC TCA GAG CGA CCT ATC GCT GAG CGC TCG GCC ACC ACT GAC ATG ATT CAC
S  R  W  F  S  E  R  P  I  A  E  R  S  A  T  T  D  M  I  H
301  GAC ATC CCC GTT CAC TAC GCC CCA ACT CTG AAA CAT TTC TTT TTG GGC GGC CTG AAG GAC
D  I  P  V  H  Y  A  P  T  L  K  H  F  F  L  G  G  L  K  D
361  GTT GTG GAG CAG GCG GCG AAA ATC TAC AGC GAT ACT TAC GCC AAT GCA GAA ATC GTG GGC
V  V  E  Q  A  A  K  I  Y  S  D  T  Y  A  N  A  E  I  V  G
421  GTA CGC GAC GGA TAT TTT TCG GCG GCG GAT GAG TTG AAC ATC GTG GAG GAA ATC AAC CAG
V  R  D  G  Y  F  S  A  A  D  E  L  N  I  V  E  E  I  N  Q
481  TCC GGC GCA GAC GTA CTT TGG GTA GGT CTG GGC AAA CCC AAA GAA CAG GAA TTC TGC ATC
S  G  A  D  V  L  W  V  G  L  G  K  P  K  E  Q  E  F  C  I
541  CGC CAC AAA GAC AAG TTG AAA GTG CCG GTG GTG ATC AGC TGC GGC GGC TGC TAC AAC TTT
R  H  K  D  K  L  K  V  P  V  V  I  S  C  G  G  C  Y  N  F
601  TTA ACC GGA CAC TAT AAA AGA GCG CCG GAA TGG GTG CAG AAC AAC GGT CTG GAA TGG GTG
L  T  G  H  Y  K  R  A  P  E  W  V  Q  N  N  G  L  E  W  V
661  CAC CGC ATG GTC CTC AAT CCA CGC AAA CTG TTC TGG CGT TAC TTG ATC ACT AAT CCT CAT
H  R  M  V  L  N  P  R  K  L  F  W  R  Y  L  I  T  N  P  H
721  ACG ATT TAT CTG GCC TAT AAA AAC CGC TAC CGC GGC GAC AGA GAT ACG GAA AGC AAG AAA
T  I  Y  L  A  Y  K  N  R  Y  R  G  D  R  D  T  E  S  K  K
781  GTG CTG TTT CTG CTG AAG ACG TTC TCC AAA GGC GGT GGC GTG GAA CGT GTA TCC GCG AAT
V  L  F  L  L  K  T  F  S  K  G  G  G  V  E  R  V  S  A  N
841  CTG GCC ACC AGT TTG AAA GCG CAG GGA TAC GAT CCC GAG TTT TAT GTG TTC TTT TCC AAA
L  A  T  S  L  K  A  Q  G  Y  D  P  E  F  Y  V  F  F  S  K
901  GAA GAG GAC ATC AGT CAA TTG CGC CAG GAC TGG CCG GTT ACT TTG GTT GAG CCA AGC CGT
E  E  D  I  S  Q  L  R  Q  D  W  P  V  T  L  V  E  P  S  R
961  AAG AGC CCA CTT AAA CTT ATC AGT GAG TTT TTG AGA TTG CGC CGT CAT GTG AAG AAC AAT
K  S  P  L  K  L  I  S  E  F  L  R  L  R  R  H  V  K  N  N
1021  CGT ATT GGC GTC GTC ATC TCA TCA AAA GAG ACA GCC AAC CTG ATC AGC CTG GTC TCC CTC
R  I  G  V  V  I  S  S  K  E  T  A  N  L  I  S  L  V  S  L
1081  ATG TTT TTG CCG GGG GTC ATG AAG TTG TTC ACC CGT CAC TGC GCT TTT GAC GTC TCA GAC
M  F  L  P  G  V  M  K  L  F  T  R  H  C  A  F  D  V  S  D
1141  CAA AAG CTG GCC CCG CGT AGC ATC AAA GCG CTG TAT GGC ATG TAC GCG CTG ACC CGC ACC
Q  K  L  A  P  R  S  I  K  A  L  Y  G  M  Y  A  L  T  R  T
1201  CGC ATC GTT ACG GTC TCT GAA GAT CTT GCG CAC CAA ATC AAG GCG TTC CTG CCC TAT AAC
R  I  V  T  V  S  E  D  L  A  H  Q  I  K  A  F  L  P  Y  N
1261  CGT AAC AAG GTC GTA GCG CCG GCC AAC CCG ATT ATT GAT GAA CGC ATC TTC ACT CTG GCG
R  N  K  V  V  A  R  A  N  P  I  I  D  E  R  I  F  T  L  A
1321  CAA GAG TCC GCG CCG ATT CAG GGC GAC TAT CTC TGC GCA GTG GGC AGA CTG TGT GAG CAG
Q  E  S  A  P  I  Q  G  D  Y  L  C  A  V  G  R  L  C  E  Q
1381  AAA GGC TTC GAC TTG CTG TTG GAC GCG TAC AAA CAG GCG CTG ACG CTA CAG CCT GCG CTG
K  G  F  D  L  L  L  D  A  Y  K  Q  A  L  T  L  Q  P  A  L
1441  CCA AAG CTG GTT ATC GTA GGA GAC GGC GAT GAT CGC GCC GCG TTG GAG AAA CAA GCC GCC
P  K  L  V  I  V  G  D  G  D  D  R  A  A  L  E  K  Q  A  A
1501  GAC CTC GGC TTG ACT GAC AAA GTG ATT TTC TAT GGC TTC ACT CCC AAT CCG TAC GCG ATC
D  L  G  L  T  D  K  V  I  F  Y  G  F  T  P  N  P  Y  A  I
1561  ATC AAG CAC GCC AGA CTC TTT GTC ATG TCC TCC CGC CAT GAA GGC TTG CCG ACT GCG TTG
I  K  H  A  R  L  F  V  M  S  S  R  H  E  G  L  P  T  A  L
1621  GTG GAA GCC ATC GCC CTT GGC GTG CCA GTG GTT TCC AGC GAC TGC GAA ACG GGT CCT CGT
V  E  A  I  A  L  G  V  P  V  V  S  S  D  C  E  T  G  P  R
1681  GAA TTG CTG GAC AAC GGC CGT TAC GGC GGA CTG GCG CCG AAC CAG AAC CCA GCC GCA TTG
E  L  L  D  N  G  R  Y  G  G  L  A  P  N  Q  N  P  A  A  L
1741  GCG CAG GCC ATT GTC GAC AAC CTG ACG ACC CCC ATC GCG CCA GAG GCG GAA GCG GTG AGC
A  Q  A  I  V  D  N  L  T  T  P  I  A  P  E  A  E  A  V  S
1801  AAA TAC CGT TAC GCC GAC GCC GGC GAT TAC ATC AAG CTG TTC GGA GAG CGG ATG GCA
K  Y  R  Y  A  D  A  A  D  A  Y  I  K  L  F  G  E  R  M  A
1861  TGA
*
```

Fig. 3-97. Nucleotide and deduced amino acid sequences of HC030701_46.

Putative open reading frame (ORF) is shown below the nucleotide sequence in one letter symbol of amino acids. Nucleotide numbers are on the left side and the amino acid numbers are on the right side. Putative termination codon is marked by asterisks (*).

```

1  TTG AAA GTA ACA GTA TTT GGA ATC GGT TAT GTA GGC CTT GTT CAG GCG GCC GTA CTT GCC
   L  K  V  T  V  F  G  I  G  Y  V  G  L  V  Q  A  A  V  L  A
61  GAT GTC GGA CAC GAT GTA ATG TGC GTC GAT GTC GAT GAG GCG AAA GTC GAG AGC CTG AAG
   D  V  G  H  D  V  M  C  V  D  V  D  E  A  K  V  E  S  L  K
121 AAG GGG ATC ATT CCA ATT TAC GAA CCC GGC CTG ACG CCT ATT GTA GAA GCT AAC TTT GAA
   K  G  I  I  P  I  Y  E  P  G  L  T  P  I  V  E  A  N  F  E
181 TCG GGC CGG CTC AAG TTT ACG ACT GAC GCC AAG CTG GGC GTC GAG CAT GCT GAA ATT CAG
   S  G  R  L  K  F  T  T  D  A  K  L  G  V  E  H  A  E  I  Q
241 TTC ATC GCC GTA GGC ACG CCT CCG GAT GAA GAC GGC TCC GCC GAC CTT AAG TAC GTG CTG
   F  I  A  V  G  T  P  P  D  E  D  G  S  A  D  L  K  Y  V  L
301 GGC GTC GCC GCG ACT ATC GCC AGT TAC ATG ACT GCG CCA AAG CTG GTC ATC AAC AAG AGC
   G  V  A  A  T  I  A  S  Y  M  T  A  P  K  L  V  I  N  K  S
361 ACC GTT CCT GTC GGC ACT GCG GAC AAA GTG CCG GCC GCC ATC GCC GCA AAA TTA AGC GAG
   T  V  P  V  G  T  A  D  K  V  R  A  A  I  A  A  K  L  S  E
421 CGC GGC GAA AGC ATC GAT TTT GAC GTC GCC TCC AAC CCA GAG TTC CTG AAA GAA GGC GCG
   R  G  E  S  I  D  F  D  V  A  S  N  P  E  F  L  K  E  G  A
481 GCG GTC ACC GAT TGT ATG AAA CCT GAC CGT ATC GTT GTT GGC TCC GAA AAC CCG GCC TCC
   A  V  T  D  C  M  K  P  D  R  I  V  V  G  S  E  N  P  A  S
541 GTA GAA AAG CTG CGT GAA CTC TAC GCG CCG TTT AAT CGC AAT CAC GAC CGT ATG ATT GTT
   V  E  K  L  R  E  L  Y  A  P  F  N  R  N  H  D  R  M  I  V
601 ATG GAC GTA CGC TCA GCG GAA CTG ACA AAA TAC GCC GCC AAC TGC ATG CTG GCG ACG AAA
   M  D  V  R  S  A  E  L  T  K  Y  A  A  N  C  M  L  A  T  K
661 ATC AGC TTC ATG AAT GAA ATC GCC AAC CTG GCG GAG AAG CTC GGT GCG GAT ATT GAG AAC
   I  S  F  M  N  E  I  A  N  L  A  E  K  L  G  A  D  I  E  N
721 GTA CGC AAG GGC ATC GGC TCC GAC CCA CGT ATC GGC TAC CAC TTC ATC TAT CCC GGC TGT
   V  R  K  G  I  G  S  D  P  R  I  G  Y  H  F  I  Y  P  G  C
781 GGA TAC GGC GGT TCC TGC TTC CCG AAA GAC GTG CAA GCA ATG GTT CGC GCT GCA GAC AGC
   G  Y  G  G  S  C  F  P  K  D  V  Q  A  M  V  R  A  A  D  S
841 ATT GAT TTC GAC GCG CAA TTG CTG AAG GCG GTG GAG TCG GTT AAC TAT CGC CAG AAA GAA
   I  D  F  D  A  Q  L  L  K  A  V  E  S  V  N  Y  R  Q  K  E
901 ACG TTG TTC AAA AAA GTC AGC GCT TAT TTT GAC CAC AAA CTG GAA GGC AAA ACC ATC GCG
   T  L  F  K  K  V  S  A  Y  F  D  H  K  L  E  G  K  T  I  A
961 TTG TGG GGA TTG TCC TTC AAG CCC AAT ACC GAC GAT ATG CGT GAA GCT TCC AGT CGC GTG
   L  W  G  L  S  F  K  P  N  T  D  D  M  R  E  A  S  S  R  V
1021 TTG ATG GAA GCT TTG TGG CGC GTC CGC GCG AAA GTC CGC GCA TAT GAC CCG GAA GCC ATG
   L  M  E  A  L  W  R  V  R  A  K  V  R  A  Y  D  P  E  A  M
1081 GAA GAA ACC CAG CGT ATT TAC GGC GCC CCG GAC GAC CTG TCG CTG GTC GGC ACC AAA GAG
   E  E  T  Q  R  I  Y  G  A  R  D  D  L  S  L  V  G  T  K  E
1141 TCC GCA CTG CAC GAC GCC GAC GCG CTG GTT ATC TGT ACG GAA TGG AAG TCT TTC CGC GCG
   S  A  L  H  D  A  D  A  L  V  I  C  T  E  W  K  S  F  R  A
1201 GCG GAT TTT GCA ATG ATC AAG CAA ACA TTG CGA ACC CCG GTG ATT TCC ACG GTA GAA ATT
   A  D  F  A  M  I  K  Q  T  L  R  T  P  V  I  S  T  V  E  I
1261 TAT ACG ATC CTG AAG CTG TGA
      Y  T  I  L  K  L  *

```

Fig. 3-98. Nucleotide and deduced amino acid sequences of HC030701_48.

Putative open reading frame (ORF) is shown below the nucleotide sequence in one letter symbol of amino acids. Nucleotide numbers are on the left side and the amino acid numbers are on the right side. Putative termination codon is marked by asterisks (*).


```

1  ATG ACA GTT GGC GGT AGT ACC AAA TCT AAA CTT CTT TTT AAC TTT AAC AAG CAT ATT AAA
   M  T  V  G  G  S  T  K  S  K  L  L  F  N  F  N  K  H  I  K
61  AAA ACA ATC CGC GGC CAT CGC GGT GAG CTT CGT ATT TTG GCT GCA TGC GTC GCC GCT TTG
   K  T  I  R  G  H  R  G  E  L  R  I  L  A  A  C  V  A  A  L
121 GGC GGC TCT TCA GCG TGG GCG GCT GCG GAA CCC TTT TCT TTC TCC GCC GGG CCG GTC AAT
   G  G  S  S  A  W  A  A  A  E  P  F  S  F  S  A  G  P  V  N
181 GTT TAC CCT CAG GTG AAA GTC GAG GAA AAA TAT AAC GAC AAT ATC TAC TTG CAG AAA GAT
   V  Y  P  Q  V  K  V  E  E  K  Y  N  D  N  I  Y  L  Q  K  D
241 GAC AAG AAA GAG TCG TTT GTC ACC ATC GTT TCC ACC GGC GTG ACT TTG GAA GCG CTG AAG
   D  K  K  E  S  F  V  T  I  V  S  T  G  V  T  L  E  A  L  K
301 GGC GAT GAC AGT TAT TAT CTG GGA TAC AAG CTG AGT TCG GGA AGC TAC GCC AGC GCC CAT
   G  D  D  S  Y  Y  L  G  Y  K  L  S  S  G  S  Y  A  S  A  H
361 ACT GAC GAC TAT ATC GAT CAC TTC GTC AAC GGT AAG GCG TTC TGG ACG CTG AAT CAC CGC
   T  D  D  Y  I  D  H  F  V  N  G  K  A  F  W  T  L  N  H  R
421 AAC ACG CTG GAG CTG CTT GGC CGC TTT GAG GCA GGG CAT GAG GAT CGC GGC ACC GGC ATC
   N  T  L  E  L  L  G  R  F  E  A  G  H  E  D  R  G  T  G  I
481 AAG CAG GGT CCG GAT GTT GCG CCG CTG GAG GAT CTC ATT GAG TAC GAT CGC TCC GCC GCC
   K  Q  G  P  D  V  A  P  L  E  D  L  I  E  Y  D  R  S  A  A
541 GCG TTA ACC TAC ACT TTC GGT TCC AAG ACC TCC GAT GGG CGC CTG ACG CTA AAG CTG GGT
   A  L  T  Y  T  F  G  S  K  T  S  D  G  R  L  T  L  K  L  G
601 GGC GCG CAG ACT GAG TAC ACC AAT CAA CGT GAC GAG ACC CGT CTG CGT GAT CGT CGC ACT
   G  A  Q  T  E  Y  T  N  Q  R  D  E  T  R  L  R  D  R  R  T
661 CTC GAA ACC GGC GTC GGC TTT TAC TGG CCG GTG GGG AAC AAG ACC GGT CTG GTG TTG GAT
   L  E  T  G  V  G  F  Y  W  R  V  G  N  K  T  G  L  V  L  D
721 GTG TCG CCG ACG CAC ACG GAT TAC ATG AAT GAC CCG TCT CCT TCG GAC GGC GCC GGC GGC
   V  S  R  T  H  T  D  Y  M  N  D  P  S  P  S  D  G  A  G  G
781 AGT AAA GAC AGT GAC TAT TAC AAG TTC CTC GCC GGG ATT TCA TGG GCG GCG ACG GAC ATT
   S  K  D  S  D  Y  Y  K  F  L  A  G  I  S  W  A  A  T  D  I
841 ACC AAG GCC ACC TTT AAA GTT GGT CGC GCG GAA AAG CGT TTT GAC GAC GAG AGC CGC GAA
   T  K  A  T  F  K  V  G  R  A  E  K  R  F  D  D  E  S  R  E
901 GAT TTT TCC GGC GCC AGC TGG GAA ACT ATT GTC GAC TGG GCT TTG AAG CCC TAT TCC AAG
   D  F  S  G  A  S  W  E  T  I  V  D  W  A  L  K  P  Y  S  K
961 CTG CGT TTT ACG GTA GAA CGC AGC GCT GAG GAA TCC TAC GGA AGA GGC GAC TTC ATC GAT
   L  R  F  T  V  E  R  S  A  E  E  S  Y  G  R  G  D  F  I  D
1021 GCG AAG CAA GTA GGC GCT TCC TGG ACG CAC AAC TGG AAC GAT CGG ATT ACG AGC AAG GTC
   A  K  Q  V  G  A  S  W  T  H  N  W  N  D  R  I  T  S  K  V
1081 GGA TAC AAC TGG ACC CGC GAT GTG TAC GAA AAT GAC CCG GAG TCT CGT AAG GAC GAT ACG
   G  Y  N  W  T  R  D  V  Y  E  N  D  P  E  S  R  K  D  D  T
1141 TCC GAA GCG ACG CTG GCG TTG GAT TAC GCA TTC AGG GAA TGG TTG AAC GTC GGC GCG TCA
   S  E  A  T  L  A  L  D  Y  A  F  R  E  W  L  N  V  G  A  S
1201 TGG AAC TTT AAA GAC CGT GAT TCA ACA TTG GAC AGC TAT TCG CAT ACA CGC AAT CTG GCG
   W  N  F  K  D  R  D  S  T  L  D  S  Y  S  H  T  R  N  L  A
1261 ACC ATA TAT GTT AAT GCA GGG TTT TAA
      T  I  Y  V  N  A  G  F  *

```

Fig. 3-99. Nucleotide and deduced amino acid sequences of HC030701_50.

Putative open reading frame (ORF) is shown below the nucleotide sequence in one letter symbol of amino acids. Nucleotide numbers are on the left side and the amino acid numbers are on the right side. Putative termination codon is marked by asterisks (*).

```

1  GTG CGT GTT CAA GTG TAT GGC GAA AGC GAC CTG ACG CTG GAG GCG CCG CTC ACC GAT GCA
   V R V Q V Y G E S D L T L E A R L T D A
61  GGC ACG GTC TCG TAT CCC TTT CTG GGG GAG ATT AAA GTG CTT GGT TTG ACG GTG AGC CCG
   G T V S Y P F L G E I K V L G L T V S R
121 TTG CAG GAG CTG ATT GCG AAT GGT TTG AGG GAC GGG TAT TTG GTC GAC CCC AAA GTC AGC
   L Q E L I A N G L R D G Y L V D P K V S
181 GTC ACT ATA TTG GAA TAC AGG AAG TTT TTT ATT AAT GGC GAA GTA AAG AAT CCG GGC GGT
   V T I L E Y R K F F I N G E V K N P G G
241 TTT TCC TAT CAG CCT GGC TTG ACC GTG CGT AAG GCT GCG TCA TTA GCT GGC GGT TTC ACC
   F S Y Q P G L T V R K A A S L A G G F T
301 AAC CGC GCA AAC AAG AAC AAG ATT TTT ATC ATT TCC GAA AAC GAT CCG AAT CAA ACC CAG
   N R A N K N K I F I I S E N D P N Q T Q
361 CGT CCT GCG GAC CAG AGC ACT CGC ATA CAT CCA GGG GAC ATT ATT ATT GTG GAA GAG AGT
   R P A D Q S T R I H P G D I I I V E E S
421 TTC TTT TAA
   F F *

```

Fig. 3-100. Nucleotide and deduced amino acid sequences of HC030701_51.

Putative open reading frame (ORF) is shown below the nucleotide sequence in one letter symbol of amino acids. Nucleotide numbers are on the left side and the amino acid numbers are on the right side. Putative termination codon is marked by asterisks (*).

1	ATG GAT AAC TTA AGA TCA ACG CCG CCG CGA CAT CTG GCG GAC ACG CCC GGC GAC AAA GAG	20
	M D N L R S T P P R H L A D T P G D K E	
61	ATC ATC GAT CTT CGA CGT TAT TGG AAC GCT ATT CTT GAA TAC AAG TGG GGC ATC GTG TTT	40
	I I D L R R Y W N A I L E Y K W G I V F	
121	TTG GTC TTG CTG GCG GGA GGC CTC GGC TAT GTG GCG CTG AAG TAC ATC AAA CCG ATG TAT	60
	L V L L A G G L G Y V A L K Y I K P M Y	
181	CAG GCG ACC ACC ACC GTG TTG ATT GAA AAC AAC CAG CCC AAA GTT ATC AAT ATT CAG GAT	80
	Q A T T T V L I E N N Q P K V I N I Q D	
241	GTT TAT GGC CTG AAC AGC AAC AAT CAG GAA TAT CTG CAA ACC CAA TAC GAG ATT CTG CGT	100
	V Y G L N S N N Q E Y L Q T Q Y E I L R	
301	TCC CGC AGT CTG GCT GAA GAA GTG GTG ACG CCG CTG GAG TTG GTC AAT ATG CCT GAG TTT	120
	S R S L A E E V V T R L E L V N M P E F	
361	GAT CCA TTC CGC CAA AAG GCC TTC AAC TGG AAA GAA TGG GTT CCG CTG GAG CAG ATT GAG	140
	D P F R Q K A F N W K E W V P L E Q I E	
421	TCT GTG TGG CCG TTT GAG CCG GAG ATG CTC GAT TTC CTG CGT ATC AAT AAA AAG CCG CTT	160
	S V W P F E P E M L D F L R I N K P L	
481	TCT GAA AAG GCT AAG TTT GAA GCG GTA GGC ATC TTT ATG TCG CGG TTG ACG ATT GAT	180
	S E K A K F E A V V G I F M S R L T I D	
541	CCG GTG CGC AAC ACG CAA TTG GTT AAA GTT CGC TTT GAC GCC AGA CCG AAA CTG GCG	200
	P V R N T Q L V K V R F D A R D P K L A	
601	GCG CTG ATC TCC AAC GCC ACG GCG ACG CAG TTT ATA GAA AGC CAT CTG GCG GCG AAA ATG	220
	A L I S N A T A T Q F I E S H L A A K M	
661	GCG CTG ACA GAG AAG GCC ACC ATG TGG CTG GGA GAG AGC GAA GGG CTG CGT GAA AAA	240
	A L T E K A T M W L G E S L E G L R E K	
721	CTG CGT GAA TCA GAG AAG CGC CTG CAG GAA TTC CGC GAA GCG GAG AAG CTG GTG GAT GTC	260
	L R E S E K R L Q E F R E A E K L V D V	
781	AAA GGG GTT AAA ACC CTG AAT GCG GAA GAG CTG TCC AAG CTG ACC GAG CGT AAT GTG GAA	280
	K G V K T L N A E E L S K L T E R N V E	
841	GCG CGC CGC GTG CGT ATG GAA GCC GCC AAC GTA TAT CAG CAG ATG ACG ATC TTT GGC GAA	300
	A R R V R M E A A N V Y Q Q M T I F G E	
901	ACG CCG CCC CCT GAA TAT CTG TTG GAG CTG CCG GCG ATT CTG GAA AAC CCG CTG GTG GCR	320
	T P P P E Y L L E L P A I L E N P L V R	
961	TCT CTG AAG GAG AGG CAG GAC GAT GCG CAG CGT AAA GTG GAT GAA TTG AGC AAA CGT TAC	340
	S L K E R Q D A Q R K V D E L S K R Y	
1021	GGT GAG AAG CAT CCT AAA ATG ATT TCT GCG ATG GCG GAG CTG AAG TCC ATC AAG TCA GAG	360
	G E K H P K M I S A M A E L K S I K S E	
1081	TTG GAA ACG CAG TTG CAG CGC GCC GCA AGG GGG ATT GAG TCC GCC TAC AAG ATT TCT GTG	380
	L E T Q L Q R A A R G I E S A Y K I S V	
1141	GAG AAT GAG CGT TCC ATC GCC AGA CAG CTT GAC CAG GCG AAG AAT AGT TTG CAG GGC GTA	400
	E N E R S I A R Q L D Q A K N S L Q G V	
1201	AAC AGG AAG GAA TTC CAG TTG CGT GAG CTG GAA AGA GAG GTT GAG ACC AAC CGT AAG CTT	420
	N R K E F Q L R E L E R E V E T N R K L	
1261	TAT GAC CTG TTT ATG TCC CGC GCC AAA GAG ACG CAT GAA GCG ACG GGG TTG CAA GCG GCG	440
	Y D L F M S R A K E T H E A T G L Q A A	
1321	CAT GCG CGT ATC ATC GAT TCT GCG ATT CCT GGG GGT TCA CCC TAC AAG CCA AAT AAA AGA	460
	H A R I I D S A I P G G S P Y K P N K R	
1381	ATG ATT TTC CTG ATG TTG ATC ATG GCT GGC TTT GGG TTG GGT ATC GTG CGC GCT TTC ATC	480
	M I F L M L I M A G F G L G I V R A F I	
1441	CGC GAC GCA CTG GAT AAC ACT ATT CGC AGC ACG GCT GAT ATT GAG GAA AAA TTC CGT TTG	500
	R D A L D N T I R S T A D I E E K F R L	
1501	CCT GTG CTT GGT CTG CTC CCG CTA GTG AAA AGC AAG AAA TCA AAG GCG GCT TTT GAA GGC	520
	P V L G L L P L V K S K K S K A A F E G	

Fig. 3-101. Nucleotide and deduced amino acid sequences of HC030701_52.

Putative open reading frame (ORF) is shown below the nucleotide sequence in one letter symbol of amino acids. Nucleotide numbers are on the left side and the amino acid numbers are on the right side. Putative termination codon is marked by asterisks (*).

```

1561 TTC CTG TCC TCA ATG CAT AGC CAC TTT GCG GAG TCC ATT CGC AGT CTG CGC ACC AGC TTG
    F L S S M H S H F A E S I R S L R T S L 540
1621 ATA CTG TCA CGG GTG GAT CAG CCC TAT AAA GTT ATT CTG GTG ACT TCC ACC GTT CCG GGA
    I L S R V D Q P Y K V I L V T S T V P G 560
1681 GAA GGT AAA ACC ACA GTA GCG TTG AAC CTG GCG GAA GCG TTG GGG CAG ACT GAA AAA GTG
    E G K T T V A L N L A E A L G Q T E K V 580
1741 CTG TTG ATA GAC GGC GAT ATG CGT CGC TCT ATG CTG GCC AAG TCG ATT GGG CTG CCG CTG
    L L I D G D M R R S M L A K S I G L P L 600
1801 GAT ACT CCG GGA TTG TCG GAT CTG GTC GCC GGT ACG GCG GAA GTG GAG CAC TGC CTG CAC
    D T P G L S D L V A G T A E V E H C L H 620
1861 CGT CTC AAT GGC ACT AAG GCC AGC GTA CTG ACG GCG GGA ACT CAG CCC AGC AAT CCG TTG
    R L N G T K A S V L T A G T Q P S N P L 640
1921 GAG ATG ATT TCC AGT AAC CGT TTT CAC CTG GTG TTG GCG GTG CTG AAG AAG CGC TAT GAT
    E M I S S N R F H L V L A V L K K R Y D 660
1981 CGC ATC ATT ATT GAC TCT GGG CCC ACC CAG GCG GTG AGT GAT TCG TTG GTG TTA TCC TCT
    R I I I D S G P T Q A V S D S L V L S S 680
2041 TAT TCC GAT GCG GTG GTG TAC ATC ATC AAA TCG GAA GAT ACG CCA GCG CCG CTG ATT CAG
    Y S D A V V Y I I K S E D T P A P L I Q 700
2101 AAA GGC ATC AAA CGT CTG CGC GAA GTT AAC GCC AAT CTT GTG GGA GCG GTG CTG AAC CAG
    K G I K R L R E V N A N L V G A V L N Q 720
2161 ATA GAT GTG GCG AAG CGT AAG AAT CAG CAT GAA TAT ATT CAT TAC TCT TCC TAC AAC ACC
    I D V A K R K N Q H E Y I H Y S S Y N T 740
2221 TAT CCG CTC AAA GAG AGC GGC GTT ACT GCA GCG AAA ACC AAA CGC CGG GTT GAG CCA ACC
    Y P L K E S G V T A A K T K R R V E P T 760
2281 GGA GTG TAG
    G V *

```

Fig. 3-101. Continued

제 12 절 생물막내 배양불가 미생물 유전체 BAC 라이브러리 구축 (50Mb)

해양생물막으로부터 DNA 추출 방법 및 BAC library 조제방법을 확립하였으며 경남 거제시 장목만 (한국해양연구원 남해연구소)에서 인공기저인 아크릴판에 7일 동안 형성된 해양 생물막을 대상으로 크기가 20 kb 이상의 DNA를 분리하였고 포스미드 (fosmid) 벡터내에 삽입하여 대장균 (*E. coli*) 숙주에 포스미드 라이브러리를 구축하여 생물막 형성과 관련된 배양불가 미생물의 유전자원 50 Mb을 확보하였다 (Fig. 3-102, 103)

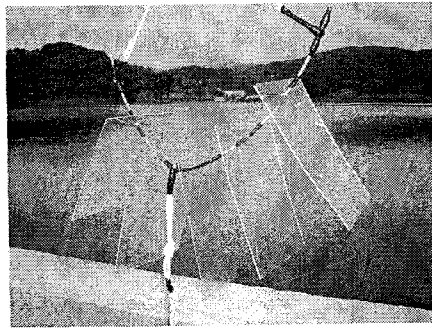


Fig. 3-102. Photograph of an acrylic plates setting as artificial substrata for marine biofilm formation.

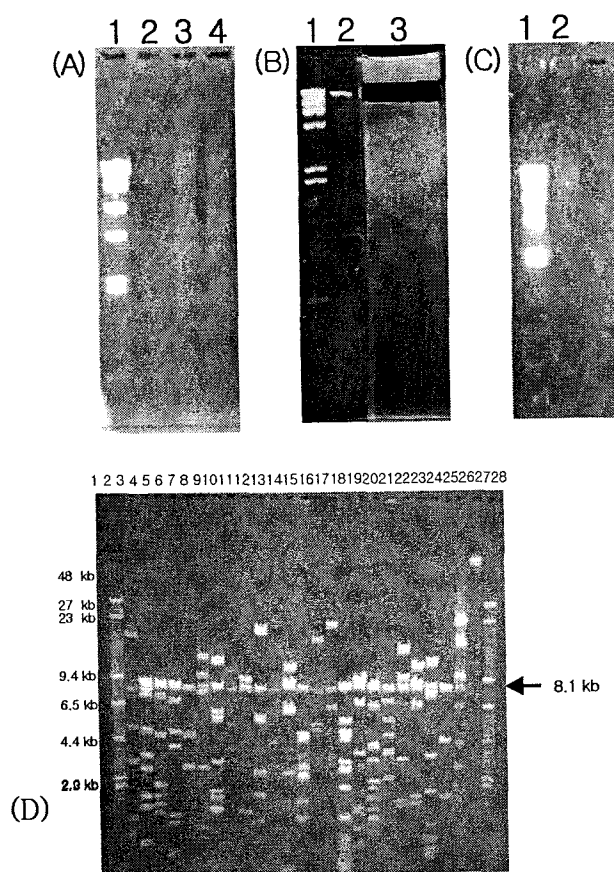


Fig. 3-103. DNA extraction and construction of fosmid library from marine biofilm. Extraction of biofilm DNA by grinding (A), size selection of end-repaired DNA on 1% LMP agarose (B), elution of end-repaired DNA (C), and restriction treatment of plasmids (D).

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구목표 및 연구내용

제 2 절 연구목표 및 평가착안점에 입각한
연구개발목표의 달성도

제 3 절 연구개발성과 현황

제 4 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

여 백

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구목표 및 연구내용

1. 최종목표

해양환경의 생물막내에 서식하는 미생물 유전자원을 확보하고, 이들의 생체기능과 유전정보 분석에 기초한 유용성 검색 및 활용기술의 개발

해양미생물 다양성 확보	생체기능 분석	연구대상 유용유전자	최종결과물
<ul style="list-style-type: none"> • 대상해양시료: 해안, 조류 및 패류 양식장 등에서 형성된 생물막 • 다양성 분석: 종조성, 신종 확보 	<ul style="list-style-type: none"> • 부착능 • 세포외다당류 생성능 • 매트릭스분석 	<ul style="list-style-type: none"> • 대상 해양미생물: <i>Hahella chejuensis</i>, 배양불가 미생물 유전체 • 유전자: 세포외다당류 생합성, 고분자물질 분해 효소 	<ul style="list-style-type: none"> • 해양미생물 1,500주 확보 • 유전자원 분리·확보: 배양가능 미생물 3종 및 배양불가 미생물 유전자원 • 유용물질생산 미생물 50주 • 생물막 조절 조건 규명 • 유용유전자 10종 발굴 • 유용물질생산용 형질전환 미생물 3종 이상 개발 • 특허 5건 이상 출원, SCI논문 20편 이상 투고

2. 단계별/연차별 연구목표 및 연구내용

가. 단계별 연구목표

구 분	연구개발 목표
1단계 (2년후)	<p>해양미생물 유전자원의 확보 및 기능분석</p> <ul style="list-style-type: none"> • 해양생물막을 대상으로 배양가능한 해양미생물 분리보전 • 배양가능 미생물의 유용성 검색 및 유전자원의 확보 • 배양불가 미생물 유전자원의 분리확보
2단계 (5년후)	<p>유용성 검색 기법 개발 및 유용자원화</p> <ul style="list-style-type: none"> • 생물막환경내 미생물의 활용기술개발 • 해양미생물 유전자원의 산업적 이용기술의 모델로 세포외다당류 생합성 및 고분자물질분해효소 관련 유전자 탐색기술 개발 • 분리확보된 유전자원을 대상으로 유용유전자 분리 및 활용

나. 연차별 연구개발 목표

구 분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2001년)	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 배양가능 균주 분리 · 보전 · 선별 ◦ 모델 해양미생물의 유전자원 확보 	<ul style="list-style-type: none"> • 생물막 관련 미생물 분리 · 보전 • 생물막내 종조성분석(T-RFLP법) • <i>Hahella</i>의 genomic DNA library구축 • 배양불가 미생물의 유전물질 분리 · 추출 기법 개발 • PFGE를 이용한 고분자량 유전체 확보
2차년도 (2002년)	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 생물막내 미생물의 생체기능분석 ◦ 배양가능 해양미생물 유전자 특성분석 ◦ 배양불가 미생물 유전체 확보 	<ul style="list-style-type: none"> • 군집 구조분석:분자계통학적 방법 • 분리미생물의 유용성 검색(세포외다당류 생성, 부착능 등) • 배양가능 미생물의 genomic DNA library 구축 (3종) • 배양불가 유전체 BAC library 구축
3차년도 (2003년)	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 생물막 부착환경 규명 ◦ 해양유래 유용유전자의 탐색기법 개발 	<ul style="list-style-type: none"> • 매트릭스성분분석 • 다당류 유용성 탐색 • 세포외 다당류 합성 관련 유전자 cluster의 염기서열 결정 • 고분자물질 분해효소 관련 유전자 탐색 및 선별

제 2 절 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표 달성도

연 도	세부연구목표	평가의 착안점	달성내용
1 차 년 도	배양가능 균주 분리, 보전, 선별	생물막 관련 균 주 확보 여부	<ul style="list-style-type: none"> • 아크릴 표면, 유리표면 및 전국 연안의 자연 생물막 으로부터 총 2,132주의 미생물 분리 및 보존하여 당 초 목표인 1,500 균주 초과 달성 • 부분 염기서열로 동정한 결과 약 삼분의 일이 신종 가능
	모델 해양미생물의 유전자원확보	모델 해양미생물 <i>Hahella</i> 의 gene DNA library 구 축 여부	<ul style="list-style-type: none"> • 평균 크기 10 kb의 DNA 절편을 ZAP Express vector (Stratagene)에 삽입하여 1.8 X 10³ Mb 크기의 genomic DNA library를 구축하고 • 간편하게 고품질의 DNA를 추출하는 방법을 개발하여 해양미생물 유전체 연구를 위한 핵심기술 개발
2 차 년 도	생물막내 미생물의 생체기능분석	생물막내 미생물 생체기능분석여 부	<ul style="list-style-type: none"> • 표면부착능, 세포표면 소수성 우수, 세포외다당류 생성능, 우수균주 선별 • <i>Hahella chejuensis</i> 무색소 변이주 개발로 세포외다당류 생산 돌연변이주 제조 • <i>Hahella chejuensis</i> 적색색소의 우수한 살조능이 발견되어 친환경적 적조제어제로 개발할 가능성 큼
	배양가능 해양미생물 유전자 특성분석	3종의 genomic DNA library 구 축 여부	<ul style="list-style-type: none"> • 해양미생물 <i>Bacillus</i> sp. <i>Brevibacterium</i> sp. <i>Cytophaga</i> sp. <i>Erythrobacter</i> sp. <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 등 5종 대상
	배양불가 미생물 유전체 확보	BAC library 구 축여부	<ul style="list-style-type: none"> • 인공기저(아크릴판)를 이용하여 해양에서 형성된 생물막 시료로부터 크기가 20 kb 이상되는 DNA를 추출하고 fosmid 벡터에 ligation 및 packaging시켜 <i>E. coli</i>를 이용하여 배양불가 미생물의 메타게놈 라이브러리 구축

연도	세부연구목표	평가의 착안점	달성내용
3 차 년 도	생물막 부착환경 규명	바이오필름 매트릭스 분석, 천이과정 규명 및 해양생물막 표준균주 후보 도출	<ul style="list-style-type: none"> • 세균 특성을 기준으로 선발한 4 균주의 생물막 생성 과정 연구 결과 초기 부착과정에 표면부착능 보다 세포표면 소수성이 우선적으로 작용함을 확인 • 장목만에서 시간진행에 따른 초기 생물막내 미생물 천이과정 규명 • 세균 특성을 기준으로 해양생물막 후보균주 선발
	유용 유전자원의 탐색기법 개발	세포외다당류 생합성, 고분자물질 분해효소 탐색방법 구축	<ul style="list-style-type: none"> • 세포외다당류 생합성유전자 cluster 구조 제시 • 고분자물질 분해효소 탐색방법 확립 • DNA library 해독 • 분리미생물 유용성 확보 <ul style="list-style-type: none"> -색소의 적조살상능력 평가 -다당류 p-m10356의 이용성 확대조사
총 합	해양미생물 유전자원 확보 및 기능분석	해양미생물 1,500 주, 배양가능미생물 3종 및 배양불가 유전자 확보	<ul style="list-style-type: none"> • 해양미생물 2,100 주, 배양가능 미생물 6종의 DNA library, 배양불가 메타게놈 library 구축으로 당초 목표를 달성하였음 • 생물막 형성 미생물다양성 분석 및 유용성 균주 1차 선별
	유용성 검색 기법 개발 및 유용자원화	생물막 매트릭스 분석 및 유용성 탐색기법 확립	<ul style="list-style-type: none"> • 초기생물막 종분석 및 부착요소 1차 규명 및 표준균주 후보 도출 • EPS 생산 관련 유전자 cloning • EPS 및 색소 유용성 탐색기법 확립 및 유용성 확보
	학술발표실적	2단계 종료시 특허 5건, SCI 20편 투고	<ul style="list-style-type: none"> • 국내특허출원 2건, 국제 PCT 출원 1건 • SCI 논문 9편 게재, 국내 논문 3편 게재 SCI 논문 4편 투고

제 3 절 연구개발성과 현황

구분	기술이전		기술료수입		특허출원			특허등록			논문게재			학술발표		
	건수	건수	금액 (억원)	국내	국외	계	국내	국외	계	국내	국외	계	국내	국외	계	
1차 년도 (01)										2		2	2	3	5	
2차 년도 (02)				2		2				3	5	8	8	1	9	
3차 년도 (03)					1	1				1	1	2(4)	7	4	11	
총계				2	1	3				6	6	12 (4편 투고)	17	8	25	

1. 특허출원/등록

국명	특허제목	출원자	출원번호	출원년,월	등록 번호	등록 년,월
대한 민국	하렐라 제주엔시스 96CJ10356 균주가 생산하는 적색색소의 살조효과 및 이 로부터 RP10356을 생산하는 방법	한국해양 연구원	10-2003- 0029526	2003. 5. 9		
대한 민국	세포외다당류를 분비하는 무색소 하 렐라 제주엔시스 96CJ10356 변이주 m10356 및 이로부터 세포외다당류를 생산하는 방법	한국해양 연구원	10-2003- 0029537	2003. 5. 9.		
대한 민국	하렐라 제주엔시스 유래의 살조효과 를 가지는 적색색소 관련 PCT출원	한국해양 연구원	PCT/KR20 04/001072	2004. 5. 10		

2. 논문게제/투고

논문제목	저자	학술지명	제출일	발행년도 권호	발행기관 (국명)	SCI여부 (O,X)
Morphological diversity of marine microorganisms on different isolation media	박신혜, 권개경 이득수, 이홍금	Journal of Microbiology	2002. 4.1	2002 40:161-165	한국미생물학회 (한국)	O
해양생물 유전자은행 구축 및 운영체계	이홍금	지식정보인프라	2002. 4.5	2002 10:70-75	KISTI (한국)	X
Isolation and identification of biofilm-forming marine bacteria on glass surface emerged on the seawater in DaeHo Dike, western side of Korea	권개경, 이현상 정성영, 임정환 이정현, 이홍금	Journal of Microbiology	2002. 7.15	2002 40:260-266	한국미생물학회 (한국)	O
A simple method for DNA extraction from marine bacteria that produce extracellular materials	이유경, 김효원 Liu C, 이홍금	Journal of Microbiological Methods	2002. 7.11	2003 52:245-250	Elsevier (네델란드)	O
Optimal conditions for the production of sulfated polysaccharide by marine microalga <i>Gyrodinium impudicum</i> strain KG03	임정환, 김성진 안세훈, 이홍금	Biomolecular Engineering	2002. 12.31	2003 인쇄중	Elsevier (네델란드)	O
해양환경의 황산염 환원을 조절요인 및 유기물 분해에 있어 황산염 환원의 중요성	현정호, 이홍금 권개경	한국해양학회지 「바다」	2003. 4.21	2003 8:210-224	한국해양학회 (한국)	X
Culture and Identification of bacteria from marine biofilms	이유경, 권개경 조경희, 김효원 박재현, 이홍금	Journal of Microbiology	2003. 11.30	2003 14,183-188	한국미생물학회 (한국)	O
Antiviral effects of sulfated exopolysaccharide from marine microalga <i>Gyrodinium impudicum</i> strain KG03	임정환, 김성진 안세훈, 이종교 이기태, 이홍금	Marine Biotechnology	2003. 9.29	2004 6,17-25	Springer Verlag (독일)	O
21세기 전략산업인 해양생물산업의 추진방향	임정환, 김성진 안세훈, 이종교 이기태, 이홍금	양식21	2003.08. 01	2003 2003,78-83	전남도청(대한민국)	X
Diversity of symbiotic archaeal communities in marine sponges from Korea	이은영, 이홍금 이유경, 심정자 이정현	Biomolecular Engineering	2003.07. 01	1003 20,299-304	Elsevier (네델란드)	O
Isolation and identification of bacteria from marine biofilms	이유경, 권개경 조경희, 박재현 이홍금	Key Engineering materials (2004)	2004.07	2004 인쇄중	BIEN	O
Changes of biofilm - forming bacterial community on acrylic surface emerged in seawater	권개경, 박재현 이유경, 이홍금	Marine Biotechnology	2004	2004 인쇄중	Springer Verlag (독일)	O
Simultaneous progress of community structure and bacterial activity during the early phase of biofilm formation on acrylic surface in seawater	권개경, 박재현 이은영, 이정현 이홍금	Aquatic Microbial Ecology	2003. 2.21	투고	Springer Verlag (독일)	O
Rheological properties of emulsifier EPS-R produced by marine bacterium <i>Hahella chejuensis</i>	임정환, 김성진 안세훈, 이현상 박규진, 이홍금	Carbohydrate Polymer	2003. 5.	투고	Elsevier (네델란드)	O
Effect of nutrient components on the production of exopolysaccharide by marine bacterium <i>Hahella chejuensis</i>	임정환, 박신혜 이현상, 박규진 이홍금	J. of General and Applied Microbiology	2003. 5.	투고	Microbial. Res. Found (일본)	O
Physicochemical and Rheological Properties of Novel Emulsifier, p-11568 Produced by Marine Bacterium <i>Altrermonas</i> sp. strain 00SS11568	임정환, 김성진 안세훈, 이홍금	Carbohydrate Polymer	2004.5	투고	Elsevier (네델란드)	O

3. 학술발표

학술발표제목	발표자	발표장소 (국명)	일시
The properties of exopolysaccharide p-CY36 produced by marine cyanobacterium <i>Chroococcus</i> sp. 00SS-CY36	임정환, 김성진, 안세훈, 이유경, 이홍금	EU Project Workshop Analysis of Single Cells in the Marine Phytoplankton (독일)	2002.04.19
Bacterial number and extracellular enzyme activities of biofilm on acrylic surface in sea water	권개경, 박재현, 이홍금	제 4차 아시아-태평양 해양생물공학회 (미국)	2002.04.23
Biofilm-forming bacteria on glasses exposed in sea water	권개경, 임정환, 이정현, 이홍금	제 4차 아시아-태평양 해양생물공학회 (미국)	2002.04.23
Number and metabolic activity of biofilm-forming bacteria on acrylic surface in sea water	권개경, 박재현, 이홍금	Int. Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms (GIM) (한국)	2002.07.01
Chitinase-producing marine bacteria from Cheju Island	이유경, 조경희, 손재학 이홍금	Int. Symposium on the GIM (대한민국)	2002.07.01
Biofilm formation by bacteria on acrylic surface in seawater	권개경, 박재현, 이은영 이정현, 이홍금	2002 한국미생물학회 추계학술대회 (대한민국)	2002.10.22
Sustainable use of marine microorganisms	이유경, 이정현, 권개경, 이홍금	2002 한국미생물학회 추계학술대회 (대한민국)	2002.10.22
Optimal conditions for the production of a sulfated polysaccharide by the marine microalgae <i>Gyrodinium impudicum</i> KG03	임정환, 김성진, 안세훈 이홍금	Marine Biotechnology: Basics and Applications (스페인)	2003.02.25
Diversity of culturable bacteria from early phase of biofilm formation	권개경, 이유경, 박재현 김효원, 이홍금	2003 한국미생물학회 춘계학술대회 (대한민국)	2003.05.02
Seasonal progress of biofilm-forming bacteria on acrylic surface in seawater	권개경, 이유경, 박재현 조경희, 이홍금	2003 한국미생물·생명공학회 (대한민국)	2003.06.26
Novel exopolysaccharide from marine biofilm-forming microorganism	임정환, 김성진, 박규진 이현상, 안세훈, 이홍금	2003 한국미생물·생명공학회 (대한민국)	2003.06.26
Culturable Bacteria Isolated from Natural Marine Biofilms	이유경, 권개경, 조경희 김효원, 박재현, 이홍금	2003 한국미생물·생명공학회 (대한민국)	2003.06.26
<i>Hahella chejuensis</i> pigments killing red-tide microalgae	임정환, 김성진, 박규진 이현상, 안세훈, 이홍금	2003 한국미생물·생명공학회 (대한민국)	2003.06.26
Exopolysaccharide from colorless mutant of <i>Hahella chejuensis</i> strain 96CJ10356	임정환, 김성진, 박규진 이현상, 안세훈, 이유경 R. Yin, 이홍금	2003 한국미생물·생명공학회 (대한민국)	2003.06.26
Changes of Biofilm-Forming Bacterial Community Composition on Acrylic Surface Emerged in Seawater	권개경, 박재현, 이유경, 이홍금	Marine Biotechnology Conference (일본)	2003.09.23
Algicidal effect of Red Pigment from the Marine Bacterium <i>Hahella chejuensis</i> strain 96CJ10356 on Red-tide Microalgae	임정환, 김성진, 박규진, 안세훈, 이현상, 이홍금	Marine Biotechnology Conference (일본)	2003.09.25
A novel sulfated polysaccharide derived from the marine microalgae <i>Gyrodinium impudicum</i> strain KG03 with immunostimulating activity in vitro	임정환, 김성진, 박규진, 안세훈, 이현상, 표석능, 이홍금	Marine Biotechnology Conference (일본)	2003.09.25

Interaction of biofilm-forming bacteria during the early phase of biofilm formation	박재현, 권개경, 안태영, 이홍금	2003 한국미생물학회 연합회 추계학술대회 (대한민국)	2003.10.25
Draft genome sequence of <i>Hahella chejuensis</i> KCTC 2396, an extracellular polysaccharide-producing, algicidal marine bacterium	정해영, 최상행, 이유경, 이홍금 외 x인	2003 한국미생물학회 연합회 추계학술대회 (대한민국)	2003.10.25
Diversity of marine bacteria isolated from early phase of biofilm formation	권개경, 이유경, 김효원, 조경희, 박재현, 이홍금	2003 ASM Biofilm Conference (캐나다)	2003.11.05
Microbial diversity of marine biofilm	이유경, 권개경, 이홍금	International Women's conference on BIEN-Technology (대한민국)	2003.11.15
Novel emulsifier from marine microorganism	임정환, 김성진, 박규진, 안세훈, 이홍금	International Women's conference on BIEN-Technology (대한민국)	2003.11.15
Culture and identification of bacteria from marine biofilms	이유경, 권개경, 조경희, 박재현, 이홍금	International Symposium for Marine Biodiversity & Conservation Ecology (대한민국)	2004.02.19
Isolation of Actinomycetes Associated with Marine Sponge <i>Hymeniacidon perleve</i>	H. Zhang, 이유경, W. Zhang, 이홍금	International Meeting of the Microbiological Society of Korea (대한민국)	2004.05.13
Mutagenesis of <i>Hahella chejuensis</i> 96CJ10356 using EMS & Characterization of the Exopolysaccharide Produced by a Mutant Strain	이유경, 임정환, 이미란, 조현희, R. Yin, 이홍금	International Meeting of the Microbiological Society of Korea (대한민국)	2004.05.13

4 절 관련분야의 기술발전의 기여도

총체적으로 2년간의 연구수행결과로 국내 해양환경의 생물막내에 서식하는 미생물과 유전자원을 확보하였으며, 이들의 생체기능과 유전정보 분석에 의한 유용성 발굴을 위한 단계별 본 연구사업의 목적을 달성하였다.

해양생물막의 균주중 비배양 및 보고되지 않은 종이 대거 동정됨에 따라 국내 연안의 생물막에서도 신종이 발견될 가능성이 아주 높으며 이는 국내 연안의 신종 해양 미생물 다양성의 확보가 시급함을 시사한다. 또한 동서남해역에서의 생물막에서 공통적으로 출현하는 미생물이 대량 발견되지 않음에 따라 우리나라 연안의 다양한 환경에 따른 방오 효능 표준균주가 필요할 것으로 예상된다. 생물막에서의 미생물 천이, 우점종 규명, 부착조절에 대한 기초연구는 국내외 방오물질 개발, 패류 및 해조류 양식 관련자에게 기초 자료로 활용될 수 있다. 국내 해양생물막 형성 미생물에 대한 연구 및 시험방법이 아직도 일반화되지 않은 해양미생물 유전자를 대상으로 시행착오를 거쳐 다양한 기초기술이 축적되었다고 사료된다. 2002년 프론티어사업으로 시작된 미생물 유전체 활용기술 개발사업에 “해양 특수환경 미생물 다양성 및 메타게놈 자원확보 및 탐색” 과제가 포함되어 있는 등 해양미생물 자원확보를 위한 관심과 노력이 증가하는 추세이나 아직 국내에는 해양생물막은 중점 연구대상에서 제외되어 있어 해양생물막에 중점을 두고 있는 본 과제는 프론티어사업 등과 차별성을 지니고 있다. 분리확보된 미생물은 국내 학계 및 산업계의 관련 연구자에게 유용물질 탐색, 방오효능 평가, 유전체 연구 등을 위해 제공되며, 2단계에서는 정밀 생체기능 연구를 통하여 고부가가치 물질 생산용 미생물 개발에 활용될 예정이다. 해양미생물 다양성의 지속적 이용을 위한 핵심기술 개발을 추진하여 국내 생물다양성 보전과 이용기술의 발전에 기여하며 특히 해양생물막의 생태학적 부분 및 유전자원 이용기술 부분에서는 세계적 수준의 우수 연구집단으로서의 발전할 것이다. 연구개발뿐만 아니라 해양미생물 다양성 연구 관련 부분에서 다음과 같은 공공기능 수행 실적은 관련분야의 정보제공 등 산·학·연 협력거점으로서의 역할을 수행하였다.

분야	공공기능수행실적
<ul style="list-style-type: none"> • 홈페이지 운영 	<ul style="list-style-type: none"> • http://mamidi.kordi.re.kr 운영 • 발표논문, 총설 등을 PDF 파일로 제공 • 연구분야관련 정보제공: 연구사업 내용, 관련 연구현황 등 • 생물막: 생물다양성, 미생물은행, 학회 등의 주요 web site 연결
<ul style="list-style-type: none"> • 기술지도 및 성과 활용 등 	<ul style="list-style-type: none"> • 학생지도: 박사 1명, 석사 3명 • 21C 미생물 프론티어사업단에게 미생물 계층염기분석을 위한 1차대상 미생물로 본 연구진이 분리한 <i>Hahella chejuensis</i>가 선정되어 제공
<ul style="list-style-type: none"> • 첨단기술정보의 제공, 연구기기 공동 활용 	<ul style="list-style-type: none"> • '생명공학육성기본계획의 수정방안 수립에 관한 기획연구'의 생명공학 정책기획단으로 참여 • 산자부 생물산업의 표준화 관련 해양미생물분야 정보제공 및 자문 • 기고 및 발표를 통한 해양미생물에 대한 정보 제공 <ul style="list-style-type: none"> - 바이오진 해양미생물 다양성에 대한 기고 - 한림심포지움 '생물다양성의 정보화' 해양미생물자원 분야 - 기타
<ul style="list-style-type: none"> • 국내외 연구기관과의 협력정도 	<ul style="list-style-type: none"> • 프론티어 미생물유전체활용기술개발사업단 1단계 연구개발사업 선정평가 위원 및 사업단 운영위원 • 중국 과학원 대련 물리화학연구소 해양생명공학연구센터의 Meifang Jin, Wei Zhang 교수와 해양생명공학공동연구 교류 • 중국 청도 FIO의 Rue Chelin을 한·중청년과학자 교류사업으로 초빙 • 중국 과학원 Institute of Plasma Physics의 Yin Ruochun 박사를 APEC 지원 Post doctor로 유용유전자 연구에 활용
<ul style="list-style-type: none"> • workshop, seminar 및 단기강좌를 통한 기술협업, 기술교류 등 실질적 자문활동 등 	<ul style="list-style-type: none"> • APEC에서 지원하고 중국 청도 해양대학에서 개최된 'International Training Course on Marine Pharmacology, Chemical Products of Seaweeds & cultural Technology of Seaweeds'에 참석하여 해양미생물의 이용현황에 대한 정보 및 기술 교류 • AWI에서 개최된 EU Project Workshop 'Analysis of Single Cells in the Marine Phytoplankton' 참석- 해양미세조류 분리 배양에 대한 기술 교류 • 국립암센터 '생명과학최고연구자 과정' 1기, 2기, 3기에서 '해양미생물'에 대한 강의 • 한국미생물·생명공학회 2003년 춘계 학술대회와 joint symposium을 통한 해양생물막 미생물 다양성 정보 제공 • 타연구팀에게 균주 제공 • 해양수산부 천연방오제 개발 연구사업 평가

여 백

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 연구개발결과의 대표적 성공사례

제 2 절 활용계획

여 백

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 연구개발결과의 대표적 성공사례

분 야	사 례
해양미생물자원 확보	1. 해양미생물 다양성 확보 (생물막 구성 미생물 중심)
해양생물막 형성 기작	2. 생물막 형성 미생물 군집의 시간별 특성 변화 3. 생물막 형성 미생물 군집의 다양성 변화
미생물 다양성 조사	4. 생물막 생성 초기에 다양한 신종 미생물 출현 5. 성숙된 생물막은 다양한 신종 미생물의 보고 6. 해양생물막 표준균주 후보 도출
해양미생물 이용	7. 해양생물막으로부터 부착능이 우수하거나 세포외다당류 를 생산하는 미생물 다량 확보 8. <i>Hahella chejuensis</i> 무색소 변이주 m10356를 이용한 세포 외다당류 생산 9. <i>Hahella chejuensis</i> 로부터 살조능이 우수한 적색색소 발견 및 적조살상능력 현장검증
해양미생물 유전자 분리·추출기술	10. 세포외물질을 생산하는 해양미생물의 간편한 DNA 추출 방법 개발 11. 배양불가 유전체 BAC library 구축 12. 세포외다당류 생산 관련 유전자 분리

제 2 절 활용계획

국내 연안 생물막에서 분리한 세균 및 남조세균 총 2,132균주는 국내 학계 및 산업계의 관련 연구자에게 유용물질 탐색, 방오효능 평가, 유전체 연구 등을 위해 제공될 수 있다. 생물막에서의 미생물 천이, 우점종 규명, 부착조절에 대한 기초연구는 방오물질 개발, 패류 및 해조류 양식 관련 기술개발의 기반으로 활용하고자 한다.

분리한 생물막 미생물 중 부분염기서열 분석을 통하여 속 수준의 동정 결과, 약 삼분의 일 정도가 배양이 되지 않았던 종이나 보고가 안 되었던 종으로 판명됨에 따라 연안 해양생물막에서 여러 종의 신종 미생물을 차후 정밀 동정하여 국제 미생물 분류 학회에 보고하고자 한다.

생물막에서 분리된 미생물 중 국내 연안에서 공통적으로 출현하는 미생물이 현재 발견되지 않았다. 이는 해양 환경적으로 각 특성이 다른 우리나라 동서남해 연안별로 미생물 분포가 다르며 해역별로 방오효능 기준이 될 미생물 표준균주를 도출할 필요성이 있음을 시사하고 있다. 분리된 균주는 중복성 여부를 판단한 후 분자분류학적 동정을 통하여 연안 생물막에 공통적으로 출현하는 미생물의 도출을 위하여 활용할 계획이다.

분리 미생물 중 세포외다당류 생성, 세포표면 소수성, 부착능 등이 우수한 균주는 2단계에 정밀 생체기능 연구를 통하여 고부가가치 물질 생산용 미생물 개발에 활용할 예정이다. *Hahella chejuensis* 균주에서 분리된 적색색소는 살조능이 우수함으로 친환경적 적조제어제로 개발하고 색소생산 관련 유전자 연구를 통하여 색소 대량생산을 위한 형질전환 미생물 개발에 활용할 예정이다.

21C 미생물 프론티어사업단에게 미생물 게놈염기분석을 위한 1차 대상 미생물로 본 연구진이 제주마라도에서 분리하여 국내 해양미생물로서는 최초로 국제 미생물분류 학회에 보고하였던 신속의 *Hahella chejuensis*가 선정되었다. *Hahella chejuensis*는 국내 미생물 유전체 대상 미생물 중 해양미생물로서는 최초로 유전체 분석이 수행된 균주로 염기서열 정보는 국내외 기능성 유전체 연구 등에 활용될 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 제 1 절 APEC 2001 해양생물훈련과정
- 제 2 절 AWI 워크샵
- 제 3 절 아시아태평양 해양생물공학회 (APMBC 2002)
- 제 4 절 Marine Biotechnology : Basics and
Applications 학회 (MBBA 2003)
- 제 5 절 KOSEN 자료분석
- 제 6 절 ASM Conference on Biofilm

여 백

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 APEC 2001 해양생물훈련과정

2001년 10월 9일부터 23일까지 중국 청도해양대학에서 'Marine Pharmacology, Chemical Products of Seaweeds and Cultural Technology of Seaweeds'라는 제목으로 개최된 APEC 2001 해양생물훈련과정에 이유경 박사가 참석하였다. 해양생물분야는 관련된 생물이 다양하므로 매년 생물의 종류에 따라 다른 주제를 다루는데 올해는 '해조류의 기능성 의약품 개발과 화학물질 생산 및 양식에 관한 연구동향과 기술개발 현황'을 주제로 다루었다.

본 훈련과정을 통해 12개의 강의를 듣고 2개의 제약공장과 1개의 해조류 가공 공장을 견학하였으며, 중국의 해조류 양식과 해조류를 이용한 약품, 화장품, 식품 산업에 관한 최신 정보를 수집할 수 있었다. 또한 참가자 연구 발표 시간이 있어서 한국, 중국, 대만, 필리핀, 태국, 인도네시아, 말레이시아, 베트남, 캄보디아, 러시아, 멕시코, 페루, 북한 등 총 13개 나라에서 참가한 33명(APEC 참가자 21명, UNESCO 참가자 12명)의 발표를 통해 각국의 현재 해조류 양식과 이용 현황을 파악할 수 있었다.

강의 내용은 주로 중국의 연구 현황에 관한 것으로 중국의 해양생물 연구는 매우 활발하였다. 이미 1960년대부터 "Drugs from the Sea"란 제목으로 심포지엄을 개최한 이래 해조류, 미세조류, 미생물, 곰팡이, 해면, 산호, 연체동물, 극피동물 등에서 약 10,000종 이상의 새로운 화합물을 분리해 왔다. 그중에서 0.1 - 0.2% 이상이 구조적으로 독특하고 중요한 생화학적 특성을 나타내었으며 중국에서만 해양천연물에 관한 약 300개의 특허가 1969-1999년 사이에 출원되어 있다. 이중에는 항종양, 항AIDS, 항동맥경화, 항뇌국소빈혈, 항균효과를 나타내는 화학물질이 선별되어 신약개발의 lead 화합물로 이용되고 있어 종양, 심장질환, 바이러스 감염, 면역결핍, 신경부진질환 등의 치료제가 개발되고 있는 중이다.

이와같은 해양생물 중에서 해조류는 광합성을 하며 비교적 체제가 미분화된 해양생

물로서 녹조류, 갈조류, 홍조류와 같은 대형조류와 황갈조류, 쌍편모조류, 규조류 등의 미세조류가 여기에 속한다. 해조류 유래 유용물질로는 카라기난, 한천, 알긴산과 같은 다당류가 잘 알려져 있고 이밖에도 각종 미네랄과 비타민, 활성지질, 식이섬유, 질소화합물, 2차 대사산물 등이 주목받고 있다. 특히 활성물질인 kainic acid, fucoidan, laminine, domoic acid, phenolic acid 및 iodotyrosine 등은 인체에 대하여 특수한 약리 효과를 보여 의약품으로서의 이용 가치가 높아 천연물 화학연구의 관심대상이 되고 있다. 현재 해조류 이용 현황을 살펴보면 다음과 같다.

1. 해조다당류

중국은 현재 알긴산, 한천, 카라기난 등의 다당류를 수출하고 있다. 알긴산의 세계 생산량은 연간 약 27,000-30,000톤이며, 이중 중국이 9,000-10,000톤을 생산한다. 한천의 세계 연간 생산량은 8,000-10,000톤이며 중국은 500톤을 생산한다. 카라기난의 세계 연간 생산량은 16,000톤이며 중국은 1,600-2,000톤을 생산한다.

2. 해조 식품

대부분의 해조류는 육상동물과 다른 특수성분, 영양성분을 함유하고 있다. 통계에 의하면 식용가능한 품종은 전 세계적으로 수백종이 있으나 해조류 식품산업과 식용해조류는 주로 일본, 한국, 대만, 중국 및 동남아시아에 널리 분포하고 있다. 그러나 최근 해조류의 특이한 맛과 영양 가치로 인해 유럽, 북아메리카, 북유럽으로 퍼져 건강식품, green 식품, 저열량 및 저지방식품으로 이용이 증가하고 있는 추세이다. 최근에는 체중 감소, 혈압저하 및 위장보호를 위한 기능성 식품으로 차, 음료, 알코올, 두부, 사탕, 빵, 면 및 사라다 등이 개발되어 이용되고 있다.

3. 의약품

해조류는 고지혈 및 콜레스테롤을 감소시키며 지방간을 치유할 수 있고 지방형성을 분해하거나 저해하여 체중을 감소시킬 수 있다고 알려져 있다. 현재 해조류에서 효과적인 생리활성물질을 추출하고 이러한 성분을 이용하여 건강보호 및 기능성 약품을 개발하고 있는데, 현재 잘 알려진 것으로 갈조류의 요오드 제품, 후코이단, 황산나트륨 에스테르 제품, 알긴산 유도체 제품, 홍조 다당류 제품, 불포화지방산 제품, 항생제 등

이 있다. 중국에서 해조류가 의약용으로 사용되는 것은 오랜 역사를 가지고 있어서 해안지방에서는 많은 질병을 치료하기 위하여 민간요법으로 해조류를 사용해 왔다. 그러나 생리활성물질 조사가 최근에 진행되어 다당류, 질소화합물, 할로겐 terpenoid, 페놀 화합물과 같은 생리활성물질들이 보고되고 있었다. 이들의 주요 약리효과로는 hyperpiesia, hyperglycemia, hyperlipoidemia, sterol 감소, anti-bacteria 및 anti-virus, anti-tumor 등이 있다.

4. 동물사료 첨가제

해조류는 요오드, 미네랄, 비타민 및 호르몬이 풍부하기 때문에 동물사료 영양첨가제로서 기본사료와 함께 혼합하여 사용할 수 있다. 현재 전 세계적으로 해조류 분말 생산량은 50,000톤으로서 그 중 노르웨이가 20,000톤을 차지하고 있어 세계 최대사료 생산국가이다. 노르웨이는 해조사료 이용 및 연구에 대하여 오랜 역사를 가지고 있으며, 오랜 기간 대규모 사료실험을 수행하였다. 그 결과 사료로서의 해조류는 동물성장 및 개발을 촉진할 수 있으며, 체내의 기생충 및 바이러스를 치유하고, 육제품, 계란제품, 우유제품의 품질을 촉진할 수 있다고 보고하였다.

5. 해조비료

해조류는 질소와 인의 함량은 작지만, 칼륨이 상당히 풍부하다. 또한 빠르게 성장하는 대형 갈조류는 시토키닌과 같은 성장호르몬 및 다른 활성물질을 가지고 있다. 북아프리카, 영국 및 노르웨이 국가에서는 이런 대형 갈조류에서 활성물질을 추출, 농축하여 고부가 성장촉진 비료를 제조하고 있다. 이러한 해조 농축물은 곡식, 과일, 채소, 꽃 및 곡물의 성장을 촉진하고 품질을 향상시키는데 매우 좋은 효과를 가지고 있다. 또한 가뭄에 견디고, 식물질병 및 해충에 대한 저항성을 높여주는 특이한 효과를 가지고 있다.

이밖에도 김, 미역, 다시마, 우뚝가사리, 꼬시래기 등 이용가치가 높은 해조류의 양식 기술에 대한 강의가 있었다. 한편 이와같은 강의 이외에도 연구소와 공장 견학을 통해 중국의 해조류 이용 산업의 현재를 엿볼 수 있었다. 청도 제2제약공장이나 화해 제약공장은 청도해양대학에서 직접 운영하거나 기술투자를 하고 있는 기업이었는데, 해양 생물유래 의약품을 10여 가지 이상 판매하고 있었다. 또한 청도해양대학 해양생

물학과의 Liu교수가 기술지원하여 설립된 화장품회사 Seabeau에서는 피부세포 재생에 효과가 있는 키틴이 첨가된 해양생물화장품을 판매하고 있었다. 세계적인 거래망을 가지고 있는 명월해조공장에서는 다양한 해조 다당류와 요오드, 만니톨 등을 정제하여 미국과 유럽 그리고 우리나라에 수출하고 있었다.

유익한 강의와 견학 학습으로 많은 것을 배울 수 있었지만 주최측에 대해 아쉬운 부분도 없지는 않았다. 우선 양식 분야의 강사가 모두 70세 이상의 노장들이어서 80년대의 시간이 꽤 경과한 데이터를 보여주어 약간은 답답했다. 물론 이들이 김이나 우뚝가사리, 미역 등의 양식 연구의 개척자라는 점에서 의의가 있다고 하겠으나 이미 양식 기술이 충분히 발달한 우리나라의 실정에서는 해조 양식에 관여하는 젊은 연구자들의 최근 연구 동향을 살필 기회를 얻지 못한 것이 안타까웠다. 또한 강사가 모두 중국인이고 초청된 학자들은 거의 동아시아 출신이었던 것도 아쉬웠다. APEC 국가 중에서 선진국에 속하는 미국, 일본, 호주 등에서는 학자들을 초청하지 않아 아시아권에서 주도권을 잡기 위한 중국의 견제책이 아닌가 짐작해 보기도 했는데, 아무튼 양식과 가공면에서 가장 앞서있는 일본, 해조류의 이용에 관한 연구가 활발한 호주 등지에서 강사가 초빙되었다면 훨씬 다양하고 깊이 있는 과정이 되지 않았을까 하는 아쉬움이 남았다. 개인적으로는 청도해양연구소를 방문하여 해조류 형질전환 연구분야에서 세계적으로 가장 앞서있는 Qin Song박사를 만나 최신 연구 동향 파악하고 앞으로 공동연구를 수행하기 위한 기반을 마련한 것이 가장 큰 수확이라고 할 수 있다. 그리고 Duan 박사 연구실을 방문해 해조 양식에 관한 병리학적인 연구와 품질개량 연구의 정보를 얻었다.

제 2 절 AWI 워크샵

이유경 박사는 2002년 4월 14일부터 23일까지 독일 Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research (AWI)에서 개최된 EU 워크샵에 참석하였다. 이번 워크샵은 EU AIMS (Automatic Identification for Microbial Systems)와 EU PICODIV (Monitoring Biodiversity of Picophytoplakton in Marine Waters)의 지원을 받아 개최되었으며 주제는 'Analysis of Single Cells in the Marine Phytoplankton'이었다. 워크

샵 기간동안 미세 조류의 신속한 동정법 개발을 위해 사용되는 flow cytometry, artificial neural network, 그리고 molecular probe 기법의 기본 원리와 응용 방법을 배웠고 매일 병행된 실습 시간을 통해 직접 실험 방법을 익힐 수 있었다.

1. Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research (AWI)

이번 워크샵을 개최했던 알프레드 베게너 연구소는 극 지방과 해양 탐사를 위한 독일 국립 연구소로 간단하게 AWI (아비)라고 부른다. AWI는 '대륙이동설'을 주창한 지구물리학자인 알프레드 베게너(Alfred L. Wegener, 1880-1930)를 기념하여 이름지어졌는데, 알프레드 베게너는 20대의 젊은 나이에 극지방 대기순환을 연구하러 그린란드 탐험에 참여한 것과 1930년 그린란드 탐험 도중 세상을 떠난 극지 연구가로도 유명하다.

이 연구소는 주로 대양-빙하-대기 시스템이 전 세계 기후에 미치는 영향을 연구하고 있으며, 극지와 열대 해양 생태계를 집중적으로 연구하고 있기도 하다. 남극 월동 기지인 'Neumayer'와 북극 연구기지인 'Koldewey'를 보유하고 있고, 우리 세종기지가 있는 King George섬에 위치한 아르헨티나 'Jubany' 연구소에 'Dallmann' 연구실을 운영하고 있다. 또한 Postdam에 위치한 연구분소, List/Sylt에 위치한 Wadden Sea Station, Helgoland Biological Institute (BAH)가 동일 재단에 의해 운영되고 있다. AWI는 극지 연구선인 'Polastern'과 북극해, 대서양, 지중해 등의 바다를 누비는 'Heincke', 'Mya', 'Uthoern' 등의 연구선을 통해 전 세계 해양과 극지에서 광범위한 연구자료를 수집하고 있다.

AWI 부속 표본관인 'Friedrich-Hustedt- Arbeitsplatz fur Diatomeenkunde'는 세계 최대의 규조류 표본관으로 분류학자인 Dr Friedrich Hustedt (1886-1968)이 평생 수집한 표본을 기증받아 설립되어, 현재 세계 곳곳에서 수집된 60000점 이상의 현미경 표본과 20000점 이상의 규조 시료, 4000권 이상의 도서와 2000종 이상의 신종 type species 표본을 소장하고 있었다.

2. 워크샵 개요

이번 워크샵을 통해 21명의 강사로부터 강의를 듣고 실험 실습을 하며 해양 미세 조류의 동정과 생태학적 연구 기술을 습득하였다. 또한 참가자 연구 발표 시간을 통해

영국, 프랑스, 독일, 스위스, 네덜란드, 미국, 이스라엘 등의 미세 조류 연구 현황을 파악하고, 본인도 미생물 연구실에서 수행하고 있는 미세 조류의 다당류 연구 결과를 발표하였다. 본 워크샵을 통해 미세 조류를 빠른 시간 내에 정량적으로 측정할 수 있는 flow cytometry와, 현미경과 컴퓨터를 결합하여 현장 시료를 거의 실시간에 동정할 수 있는 artificial neural network (ANN) 기법, 그리고 *in situ* hybridization을 이용하여 현장 시료를 빠른 시간 안에 동정할 수 있는 molecular probe 기술을 습득한 것이 큰 성과라고 할 수 있다. 또한 미국과 유럽의 미세 조류 학자들을 만나 우리 해양연구원을 적극적으로 소개하고 최신 연구 동향 파악하며 앞으로 공동연구를 수행하기 위한 기반을 마련한 것도 큰 수확이라고 할 수 있다.

3. Flow cytometry

Flow cytometry는 세포 또는 미세 입자를 유체의 흐름을 따라 일정한 속도로 흐르게 하면서 빛(레이저 광선)을 투사하여 시료의 형광물질에 부딪혀 굴절되는 광량을 측정하도록 제작된 기기이다. 여러 형광물질을 동시에 사용하여 검색함으로써 다양한 물리적 특성을 한번에 측정할 수 있으며, 세포의 크기나 형광량의 세기와 같은 정량적인 측정도 가능하다. Flow cytometry는 본래 면역학 및 세포생물학 분야 등에서 매우 광범위하게 이용되고 있는데, 최근 미세 조류의 분류에 이 방법을 적용하고 있다. 미세 조류는 엽록소, 피코빌린, 카로티노이드 등 자체 형광물질을 함유하고 있어서 형광 염색이라는 전처리 과정 없이 해수 시료를 곧장 분석할 수 있다. 이번 워크샵을 통해 flow cytometry가 지금까지 세포 크기와 형광물질 조성을 근거로 생태학적인 군집구조 분석에 어떻게 효과적으로 이용되어 왔는지 배울 수 있었다. 또한 항해하고 있는 배의 하단에 장착해서 거의 실시간으로 해양 미세 조류의 조성을 분석하여 해양 생태계 변화와 적조 예측에 활용할 수 있는 *in situ* flow cytometry에 관한 정보를 얻을 수 있었다.

Flow cytometry에 광학 현미경을 접목하여 분류학적인 종 동정을 시도하는 연구와 flow cytometry를 통해 분리한 미세 조류 세포 하나로부터 PCR을 이용하여 16S rDNA를 증폭한 연구는 매우 흥미로웠다. 머지않아 flow cytometry기법에 계통분류학적 연구를 통합하여 생태학적인 군집 분석에서 한 걸음 더 나아가 종 다양성의 정량 및 정성적인 분석이 가능하게 될 것이라고 조심스럽게 예측해 본다.

4. Artificial neural network (ANN)

ANN은 input data가 갖는 정보를 해석하여 clustering 하는 컴퓨터 알고리즘의 일종으로, 비슷한 유형의 형태를 판별하는데 이용되는 수리화적인 방법이다. ANN은 본래 지문 인식이나 홍채 인식과 같은 자동인식 시스템에서 사용되어 왔는데, 이 알고리즘을 미세 조류의 형태적 분류에 응용하여 신속한 동정법을 개발하고 있었다. 이 방법을 실제로 적용하려면 분류하려는 생물의 형태학적인 특징에 관한 데이터 베이스를 미리 구축해야 하는데, 이미 적조 생물인 *Gymnodinium mikimotoi*와 *Alexandrium tamarense*, 갯벌과 같은 해양 퇴적토의 주요 구성원인 Coccolithophorids 등을 자동으로 분석할 수 있는 수준에 와 있었다. ANN을 이용한 수리분류학은 앞으로 가장 빠르고 강력한 종분류 방법으로 자리잡을 것이다. 그러나 실제 활용을 위해서는 유럽의 연구진들처럼 분류학자와 컴퓨터 프로그래머가 한 팀을 이룬 학제간 협동연구가 필요할 것으로 보인다.

5. Molecular probe

Molecular probe는 주로 특정 분류군을 구분할 수 있는 rDNA oligonucleotide를 탐침(probe)으로 FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)를 수행하여 현장 시료를 구성하는 미세조류를 빠른 시간내에 동정하는 방법이다. 이 방법은 분류학에서 사용해 오던 계통분류학적 방법 (Phylogenetic Taxonomy)에 세포생물학과 분자생물학을 접목시킨 실험기법이다. 이번 워크샵에서는 미세 조류의 다양한 분류군에서 사용할 수 있는 rDNA 탐침과 rDNA 전체 염기서열 중에서 탐침에 적당한 부위에 관한 정보를 얻을 수 있었다. 뿐만 아니라 특정 분류군에서만 발현되는 단백질의 항체를 이용한 FISH에 관한 정보도 얻을 수 있었다. Molecular probe에서 개발된 분류군 특이적인 probe를 이용하여 앞으로 해수로부터 몇 시간 이내에 미세 조류의 검침이 가능한 DNA chip이 개발될 것으로 기대된다.

머지 않아 크루즈용 선박에 설치된 in situ flow cytometry에 광학 현미경을 접목하여 거의 실시간으로 형태학적인 데이터를 수집한 뒤 ANN 기법으로 몇 분 내에 형태학적으로 미세 조류를 자동 분류하며, 선상 연구실에서는 DNA chip으로 관심 있는 미세 조류를 간편하게 검출하게 될 것으로 기대된다. 해양 미세 조류의 자동 분류와 종 다양성의 실시간 모니터링은 해양 오염과 적조로 매년 몸살을 앓고 있는 우리나라

에서도 시급히 개발해야 할 신기술이라고 하겠다.

제 3 절 아시아태평양 해양생물공학회 (APMBC 2002)

미국 하와이 (호놀룰루)에서 2002. 4. 21 - 4. 29 동안 관련발표와 워크샵에 이홍금 박사와 권개경 연구원이 참여하였다.

학회기간동안 미국 일본 동경대의 Haruko Takeyama 교수와 만나 일본에서의 생물막 연구 현황에 대한 정보를 획득하였다. 이탈리아의 Paola Pedroni 박사로부터 심해 열수에서 분리한 미생물 중 세포외 다당류를 생산하는 미생물에 대한 다양한 연구 정보를 입수하였으며 공동연구와 상호정보교환에 대하여 협동을 모색하기로 하였다. CalBioMarine Technologies 회사의 Dominik Medola 박사와 함께 해양공생미생물 다양성 분석 및 응용에 관하여 토의하였으며 공생미생물 분리방법 등에 대하여 여러 정보를 획득하였다. MarBeC program에 참여하고 있는 진언선 박사로부터 MarBeC program에서의 microalgae 대량배양 및 대사조절 연구현황을 소개받았으며 차후 진 박사가 해양연구원을 방문하여 미세조류나 색소생성에 관련 유전자연구에 대한 세미나를 발표하기로 하였다.

아시아-태평양 해양생물공학회가 주최하여 하와이 대학에서 개최되는 제 4차 아시아-태평양 해양생물공학회의(APMBC)는 아시아-태평양 해역의 국가들에서 연구되어지는 해양생물공학분야 중 양식, 환경생물공학, 해조류공학, 해양천연물, 극한생물, 미생물 생태 및 생리 등의 분야에서 최근 결과 및 연구동향 자료를 얻을 수 있는 국제회의이다. APMBC 2002 학회는 본래 2001년 개최예정이었으나 911테러로 인하여 미국 출입이 통제됨에 따라 개최시기가 약 반년 연기되었다. 그 결과 당초 예정보다 참석 및 발표자가 크게 줄어들었으며 다른 학회에 비해 비교적 차분한 분위기에서 진행되었으나 Diversa 등이 수행하고 있는 연구현황 (배양이 어려웠던 미생물에 대한 집적배양의 기술 개발이나 미생물유전체 연구현황) 등 첨단 생명공학 관련 정보를 입수하였다. 이번 학회에서는 미세조류를 중심으로 한 연구결과가 주로 발표되었으며 부분적으로 유전, 생태 등의 연구결과가 발표되었다. '해양미생물 다양성 확보 및 유전자원 이용 기술 연구' 과제의 결과 발표 및 자료 수집을 위해 본 학술회의에 참석하고 하였으나

일정이 연기되고 참가가 일부가 참석하지 않았지만 포스터 발표 내용상의 연구 수준은 부분적으로 우리나라가 앞서가고 있다는 느낌도 들었다. 차후 연구자들의 자신감 고취를 위하여 국제학회에 젊은 연구자들을 자주 파견하여 연구동향을 파악하고 발표하게 하면 좋은 효과를 거둘 것으로 생각된다. 차기 APMBC 학술회의는 2003년도에 일본에서 IMBC와 함께 개최될 예정이다. APMBC 단독으로 하는 것 보다 규모도 크고 범위도 넓으며 더 앞선 연구결과들이 발표될 것으로 기대된다

제 4 절 Marine Biotechnology : Basics and Applications 학회 (MBBA 2003)

스페인 안달루시아 (마타라스카나스)에서 2003. 2. 23 - 3. 2 동안 관련발표와 워크샵(Industrial session, brain storm)에 이홍금 박사가 참여하였다.

독일 칼스루에 대학의 P. Fleck 박사, 에어랑겐-뉘른베르크 대학의 T. Koenig 박사를 만나 미세조류 대량배양 및 세포외다당류 대량생산법에 대한 상호 경험을 교환하였다. 메릴랜드 대학의 R. Hill, CalBioMarine Technologies 회사의 Dominik Medola 대표이사, 마이츠 대학의 W. Mueller 교수, 중국과학원 대련 물리화학연구소의 W. Zhang 교수와 함께 해양공생미생물 다양성 분석 및 응용에 관하여 토의하였으며 공생미생물 분리방법 등에 대하여 여러 정보를 획득하였다. W. Zhang 교수는 금년 7월 중국과학원 대련 물리화학연구소에서 개최되는 해양생명공학심포지움에 연사로 초청할 것을 제의하였으며 해양미생물다양성 분석과 관련하여 4월 중 이유경 박사의 중국초청과 중국 대학원생의 한국해양연구원 방문 등 두 연구팀간의 구체적인 공동연구를 시작하기로 합의하였다. 독일 함부르크-하브르크 대학의 G. Antranikian교수에게 극지 미생물 다양성확보를 위한 시료의 운반, 처리 및 다양성 분석방법과 저온성 효소 탐색에 대한 정보를 획득하였다. 최대 해양미세조류은행을 담당하는 호주 CSIRO의 S. Blackburn 박사와 함께 와편모 미세조류에 대한 연구 중 특신연구를 제외한 타 연구분야의 동향과 전망에 대한 정보를 획득하였다. 지난해 한·호 국제협력으로 제안한 S. Blackburn 박사의 초청건이 선정되지 않았지만 한국해양연구원에서는 지속적으로 추진하기로 하였다.

지난해 설립된 SAMS(The Scottish Association for Marine Science)에 속하며 지난해 설립된 ECMB(European Center of Marine biotechnology)의 연구개발 담당 J. Oliver 박사와 함께 ECMB와 KORDI의 MOU를 추진하기의 합의하였다. ECMB측에서는 현지 lab도 제공할 의향을 갖고 있으며 기관장의 승인을 득하여 올 9월 일본에서 개최되는 국제 해양생명공학회 전후에 MOU 체결을 추진하기로 하였다.

본 회의는 유럽 및 타 국가들에서 연구되어지는 해양생물공학 분야 중 탐색, 생물 공정, 상품 마케팅, 유용 해양 생물 배양 등의 분야에서 최근결과 및 연구동향자료를 얻을 수 있는 국제회의로 '해양미생물 분리 및 활용연구' 분야의 결과발표 및 자료 수집하였다. 이번 학회에서는 미세조류와 해면/해면공생미생물을 중심으로 한 연구결과가 주로 발표되었으며 부분적으로 유전, 생태 등의 연구결과가 발표되었다. 12개의 소그룹으로 나누어 brain storm한 결과 외국 academic 그룹도 도출한 유용물질의 상용화를 위해서는 산업체와의 긴밀한 정보유통이 가장 시급하다고 제안되었다. 그런 의미에서 academic group과 company를 연결해주는 ECMB(European Center of Marine biotechnology)와의 MOU를 추진하여 KORDI의 특허출원한 연구결과물의 상용화를 적극 추진하였으면 한다.

발표된 우리의 현재 연구수준은 부분적으로 우리나라가 앞서가고 있다는 느낌도 들었지만 다음 학회 발표때는 추월당하지 않을까하는 불안감이 많이 들었다. 이를 극복하기 위해서는 지속적으로 집중적인 연구가 진행되어야하며 또한 연구자들의 자신감 고취를 위하여 국제학회에 젊은 연구자들을 자주 파견하여 연구동향을 파악하고 발표하게 하면 좋은 효과를 거둘 것으로 생각된다. 본 학회를 개최한 네덜란드의 Wiffels 교수를 비롯하여 많은 참여자가 2003년 9월 일본 Chiba에서 개최되는 MBC2003에 참석할 예정이다. KORDI에서도 MBC2003에 많은 연구자가 참석하여 활발한 정보교류가 이루어질 수 있을 것으로 기대된다.

제 5 절 KOSEN 자료분석 - 21세기의 해양 생명공학

- Marine Biotechnology in the Twenty-first Century Problems, Promise, and Products Committee on Marine Biotechnology, NRC -

1. 들어가며

지구 표면적의 70%를 덮고 있는 바다는 육지보다 훨씬 큰 규모의 서식처를 제공하고 있다. 우리는 기껏 고층 건물 정도로 대기권을 이용할 수 있지만, 해양 생물은 일반적으로 수심 200 m까지, 어떤 경우는 1,000 m 이하까지도 활용할 수 있다. 바다에 살고 있는 생물도 육지보다 다양하다. 현재까지 알려진 생물의 종수는 육상생물이 해양생물보다 많지만, 분류학상 상위단계에 있는 과(Family)와 목(Order)의 숫자는 해양생물이 더 많다. 바다에서 밝혀지고 있는 신종의 수는 계속 증가하고 있으며, 그 다양성의 세계는 지금도 활짝 열려있다. 넓은 면적만큼 다양한 생물과 천연물을 품고 있는 바다. 21세기를 살아갈 우리에게 해양생물은 어떻게 활용될 수 있을까?

2. 해양 생물에서 무엇을 얻는가?

미래의 신약 - 신물질(New Bioproduct)

바다는 300,000 종류 이상의 동식물이 서식하는 곳이다. 이중 극히 일부 해양생물에서 이미 12,000종류 이상의 새로운 화학물질이 추출되었으며, 신약 후보 물질들이 개발되고 있다 (표 1-3). 해양 생물이 생산하는 독성 물질은 의약품에 활용되는데, 예를들면 해면에서 분리된 항바이러스제 acyclovir와 AZT, 항암제 Ara-C, 해양 균류에서 추출된 항생제인 cephalosporin등이 있다. 카리브해에 서식하는 연질 산호 *Pseudopterogorgia elisabethae*에서 추출한 해열제 pseudopterosin도 피부보호제로 사용 허가를 받았다. 해양 산호에서 유래한 hydroxyapatite도 사람의 골절 재생이나 치료에 사용하도록 FDA에서 허가를 받았다.

비용 문제로 사람의 손길이 거의 미치지 못한 심해저나 극지를 비롯하여 다양한 해양환경에 대한 탐사가 계속된다면 훨씬 더 많은 신물질을 찾을 수 있을 것이다. 심해저에 서식하는 생물들의 유전체가 분석되고 있는데, 이 결과에서 의약품, 열 저항성 및 압력 저항성 효소가 생산될 것으로 기대되고 있다. 특히 불과 1%도 안되는 생물만이 알려진 해양 미생물은 신물질이 발견될 가능성이 가장 높은 생물자원이다. 해양 신물질을 이용하기 위해서는 생태계를 파괴하거나 자원을 고갈시키지 않고 신물질을 공급하는 방법도 개발해야 한다. 해양자원을 지속적으로 이용하기 위해서는 신물질을 화학적으로 합성하거나, 원천 생물을 배양(양식)하거나, 신물질 생합성에 관련된 유전자를 클로닝하여 다른 생물에서 생산할 수 있다.

표 1. 상용화된 해양 천연물의 예

천연물	응용	공급처
의약품		
Ara-A (acyclovir)	Antiviral drug (herpes infections)	Marine sponge, <i>Cryptotethya cryta</i>
Ara-C (cytosar-U, cytarabine)	Anticancer drug (leukemia and non-Hodgkin's lymphoma)	Marine sponge, <i>Cryptotethya cryta</i>
분자 표지		
Okadaic acid	Phosphatase inhibitor	Dinoflagellate
Manoalide	Phospholipase A2 inhibitor	Marine sponge, <i>Luffariella variabilis</i>
Aequorin	Bioluminescent calcium indicator	Bioluminescent jellyfish, <i>Aequora victoria</i>
Green fluorescent protein (GFP)	Reporter gene	Bioluminescent jellyfish, <i>Aequora victoria</i>
효소		
Vent and Deep Vent DNA polymerase (New England BioLabs)	Polymerase chain reaction enzyme	Deep-sea hydrothermal vent bacterium
영양 보충제		
Formulaid (Martek Biosciences)	Fatty acids used as additive in infant formula nutritional supplement <i>Pigment</i>	Marine microalga
색소		
Phycoerythrin	Conjugated antibodies used in ELISAs and flow cytometry	Red algae
화장품 첨가제		
Resilience (Este Lauder)	"Marine extract" additive	Caribbean gorgonian, <i>Pseudopterogorgia elisabethae</i>

SOURCE: Adapted from Pomponi (1999).

표 2. 개발 허가를 받은 해양 유래 항암제

Marine Source	Drug	Organism	Current Status
Sponge	Discodermolide	<i>Discodermia dissoluta</i>	To enter Phase I trials in 2002; licensed to Novartis
	Isohomo-halichondrin B	<i>Lissodendoryx</i> sp.	Licensed to PharmaMar S.A.; in advanced preclinical trials
	Bengamide	<i>Jaspis</i> sp.	Synthetic derivative licensed to Novartis; in clinical trials
	Hemiasterlins A & B	<i>Cymbastella</i> sp.	Derivatives to enter clinical trials in 2002; licensed to Wyeth-Ayerst
	Girolline	<i>Pseudaxinyssa cantharella</i>	Licensed to Rhone Poulenc
Bryozoan	Bryostatin 1	<i>Bugula neritina</i>	In Phase I/II clinical trials in U.S./ Europe; U.S. National Cancer Institute (NCI) sponsored trials
Sea hare	Dolastatin 10	<i>Dolabella auricularia</i>	Phase I clinical trials in U.S.; NCI sponsored trials
Tunicate	Ecteinascidin 743	<i>Ecteinascidia turbinata</i>	Licensed to PharmaMar S.A.; in Phase III clinical trials in Europe and in U.S.
	Aplidine	<i>Aplidium albicans</i>	In Phase II clinical trials; licensed to PharmaMar S.A.
	Isogranulatimide	<i>Didemnum granulatum</i>	Licensed to Kinetik, Canada
Gastropod	Kahalalide F	<i>Elysia rubefescens</i>	In Phase I clinical trials; licensed to PharmaMar S.A.
Actinomycete	Thiocoraline	<i>Micromonospora marina</i>	Licensed to PharmaMar S.A.; in advanced preclinical trials

SOURCE: Data from David J. Newman, National Cancer Institute, Natural Products Branch, Frederick, Md.

표 3. 효능이 알려진 미개발 해양 천연물

Marine Source	Compounds	Potential Uses	Reference
Sponge <i>Trachycladus</i>	Onnamide F atode worm	Antifungal, antinem	Vuong et al., 2001
Sponge <i>Aka</i>	Kynureninase inhibitors Serotonin sulfate	Neuroprotectants for use in AIDS-dementia and stroke	Feng et al., 2000
Cyanobacterium <i>Lyngbya</i>	Hermitamides A, B	Anticancer	Tan et al., 2000
Sponge	Axisonitrile-3	AntiTuberculosis	Knig et al., 2000
Sea whip <i>Pseudopterogorgia</i>	Pseudopteroxazole	AntiTuberculosis	Rodriguez et al., 1999
Sponge <i>Ircinia</i>	Cheilanthane sesterterpenoids	Kinase inhibitors, multiple uses	Buchanan et al., 2001
Fungus <i>Acremonium</i>	Oxepinamide	Antiinflammatory	Belofsky et al., 2000
Fungus <i>Acremonium</i>	Fumiquinazoline	Antifungal	Belofsky et al., 2000
Natural source	Polycyclic acridines	Drug resistant lung cancer	Stanslas et al., 2000
Hydroid	Tridentatol A	Antioxidant inhibits LDL lipid peroxidation (superior to vitamin E)	Johnson et al., 1999
Ascidian	Lamellarin alpha 20-sulfate	AntiHIV virus	Reddy et al., 1999
Microorganisms	Cyclic depsipeptide Sansalvemide A	AntiPox virus (MCV)	Hwang et al., 1999
Natural source	Makaluvamines	Anticancer	Matsumoto et al., 1999
Crinoid	Gymnochrome D	Antidengue virus	Laille et al., 1998
Fungus <i>Phoma</i>	Phomactins	Antagonist of platelet activating factor	Sugano et al., 1996
Sponge <i>Cymbastella</i>	Diterpenes and others	Antimalarial	Wright et al., 1996
Xetospongia, <i>Agelas</i>	Xetospongine B, sceptrine, age	Cystic fibrosis, impotence, Alzheimer's, cancer	Vassas et al., 1996

거대 생체물질(macro-biomaterial)

해양 생물은 고분자 물질인 거대 생체물질을 합성한다. 이 거대 생체물질은 유기물, 세라믹, 다당류로 구성된 폴리머의 이질적인 집합체이다. 이들은 어떻게 의학분야에서 활용될 수 있을까?

교란이 심한 조간대에 서식하는 따개비나 홍합 같은 해양 동물은 젖은 상태의 미끄러운바위 같은 고체 표면에 부착하여 살아간다. 이때 부착을 위해 사용하는 접착성 물질인 'polyphenolic protein'은 건조하거나 젖은 상태의 자연기질이나 인공기질 어느 표면이나 잘 붙는다. 뼈나 피부 같은 살아있는 조직도 붙일 수 있으며, 단백질이기 때문에 사람 몸 속에서 자연적으로 분해되어 외과 수술용 접착제로 사용될 수 있다. BioPolymesr사는 홍합의 접착성 단백질(MAP, mussel adhesive protein)을 의학과 산업용으로 이용할 수 있는 접착제로 상품화하였다.

또한 바다 게나 갑각류에서 추출한 키틴과 키토산은 냉동 식품의 유화제, 농업에서 항균(antifungal)제, 의학 분야에서 봉합사와 습포제(poultice)로 이용되고 있다. 이들은 독성이 거의 없으며, 거대물질과 결합할

수 있다. 따라서 DNA와 결합하면 나노 수준에서 유전자의 운반이 가능해진다. 또한 항생제에서 항암제까지 약물을 운반하는데도 활용될 수 있다. 이와 같이 해양성 생체물질은 생물학에 활용될 높은 잠재력을 안고 있다. 앞으로 이들을 이용하여 약물 수송체와 같은 고가의 생물 의약품을 제조하는 일도 전망이 밝다.

인간 질병 연구의 모델

해양에 살고 있는 어류와 무척추 동물은 인간 질병 연구의 모델 생물로 활용될 수 있다. 해양 생물은 연구하고자 하는 화학 물질이 들어있는 물에 온 몸이 노출되기 때문에 그 효과를 직접 확인할 수 있다. 또한 어류와 무척추 동물은 변온성이기 때문에, 화학물질에 노출되는 것에 대한 온도의 영향을 연구할 수 있다. 무엇보다 해양 생물은 자손을 많이 낳고, 체외수정을 하며, 세대가 짧고 배양이 쉽고, 포유류를 유지하는 것보다 적은 비용이 든다. 따라서 해양 생물은 훨씬 효과적인 비용으로 연구를 수행하는 모델 생물이 될 수 있다.

해양 생명공학을 위한 유전체학과 단백질체학의 응용 유전체학

유전체학은 어떤 생물의 유전체의 염기서열을 결정하고 유전자 부위를 찾아내며 그 안에 담긴 정보를 해석하는 것을 말한다. 미생물은 유전체의 크기가 작아 일찍부터 염기서열 분석이 시도되었다. 생물정보학을 이용하여 분석된 염기서열에서 물질대사 경로를 밝히고, 생리 기작을 이해하기 위한 기본적인 정보를 얻고 있다. 예를 들어 환경 변화에 표지종(indicator species)이 반응하는 기작이나, 유용물질의 생산을 유발하는 자극, 유전자 치료의 타겟이 되는 새로운 유전자의 발견 등을 유전체 정보에서 얻을 수 있다. 병원성 세균에 대한 백신을 개발하는데 필요한 의학적인 문제를 해결하는데도 유전체 정보가 활용될 수 있다. 또한 해수 표면에 풍부하지만 배양은 되지 않던 해양 미생물의 광합성 기작과 일차 생산성과 같은 생태학적인 정보도 얻을 수 있다. 산호, 해면, 관벌레와 같은 많은 해양 생물에는 많은 양의 다양한 공생 미생물이 살고 있다. 이들의 유전체 분석은 숙주와 공생체의 관계를 이해할 뿐만 아니라, 공생 관계를 통해 합성되는 신약이나 새로운 대사물질을 발견하는데 도움이 될 것이다.

미생물 유전체 분석은 1994년 시작된 이후, 미국 에너지성(Department of Energy, DOE)의 미생물 유전체 프로그램(Microbial Genome Program)이 기폭제가 되어 급격하게 증가하고 있다. 염기서열 정보로부터 새로운 유전자나 물질대사를 포함하여 광범위한 분야에서 새로운 발견을 할 수 있었다. 또한 아직까지도 기능이 알려지지 않은 유전자가 상당히 많이 남아있다.

유전체 분석 대상 미생물 중에는 극한 미생물이 많다. 즉 낮은 pH나 끓는점 이상의 온도, 200기압 이상의 압력, 치사 농도의 독성 금속, 강한 조사량의 방사능, 고염분 등 상상할 수 있는 최악의 환경에서 서식하는 미생물이 선발되어 왔다.

DOE는 유전체에서 생명현상을 이해하기 위해 다음 단계의 연구를 아래와 계획하고 있다. (1) 단백질 복합체를 이해할수록 의약품의 타겟과 세포 기능을 차단하는 지점의 숫자가 증가할 것이다. (2) 조절 네트워크를 보다 더 이해한다면 세포의 기능을 조절하는데 도움을 받을 수 있을 것이다. (3) 기능적인 다양성을 탐색하면 미생물이 다양한 환경에 적응하고 다양한 기질을 이용하는 메커니즘을 더 잘 이해할 수 있을 것이다. (4) In silico의 모델 세포를 이용하게 되면 세포의 구조와 기능을 이해할 수 있는 가설을 더 많이 테스트할 수 있을 것이다.

유전정보로부터 세포의 기능을 이해하기 위해서는 복잡한 생물학적인 시스템이 그들의 부분의 단순한 합 이상이라는 것을 인식하고 새롭게 "재구성"하는 접근이 필요할 것이다. 단순한 미생물 세포로 시작하여 복잡한다세포성 생물을 이해하는 것은 생물학

의 모든 분야에서 거대한 도전이 될 것이다.

해양 미생물과 유전체학

많은 생리활성 물질이 해양 미생물에서 유래하지만, 대부분의 해양 미생물은 배양이 되지 않는다. 이런 문제를 해결하기 위하여 해양 환경 샘플에서 전체 DNA를 추출하여 염기서열 분석을 시도한다(생태학적 유전체학). 분석된 염기서열을 기초로 특정 유전자를 클로닝한 뒤 발현시키면, 배양되지 않은 미생물에서 유래한 생리활성 물질을 발견할 수 있다. 이 방법은 배양되지 않는 토양세균에서 항생제용 단백질을 발견하는데 성공적으로 활용된 바 있다.

DNA Microarray

Microarray 기술은 유전체 수준에서 어떤 생물이 특정한 변화에 어떻게 반응하는지를 연구하는 초고속 분석하는 기술이다. DNA microarray는, 수천~수만 개의 단백질을 암호화하는 DNA 조각을 유리 슬라이드나 나일론 막과 같은 고정된 구조물위에 배열한 뒤 형광물질로 표지된 핵산과 혼성화 반응을 시켜 유전자의 발현 양상을 비교하는 방법이다. 예를 들어 오염물질에 노출되거나, 생리활성 물질을 투여하거나, 온도를 변화하는 등 환경 스트레스를 받기 전과 후의 유전자 발현 양상의 차이를 DNA microarray로 비교할 수 있다. 따라서 이 방법은 환경 모니터링, 생물정화, 신약 개발의 강력한 도구로 활용할 수 있다. 또한 유전체가 완전히 밝혀진 생물을 기준으로 다른 생물과의 유전체 수준의 차이를 비교하는데도 DNA microarray가 활용될 수 있다. 이런 비교는 각각의 환경에서 유래한 서로 다른 개체나 품종을 구분하는데 응용될 수도 있다. 병원성 미생물을 연구하는 학자들은 이런 비교 방법을 병원균의 병원성 유발부위(pathogenicity islands)를 찾는 데 이용할 수 있다. 마찬가지로 DNA microarray 방법은 해양 생물에서 생리활성 물질을 합성하는데 관여하는 유전자를 신속하게 찾는 데 이용할 수 있을 것이다.

단백질체학

단백질체학은 어떤 생물의 유전체에 의해 발현되는 단백질의 특징을 총체적으로 연구하는 분야이다. 이를 통해 단백질의 기능을 밝힐 수 있다. 신물질을 찾기 위해서는 단백질의 변형(modification)을 이해하는 것이 더욱 중요해지고 있다. 유전체학, 단백질

체학에 고전적인 미생물 배양을 덧붙인다면 환경 변화에 대한 미생물의 적응, 새로운 대사물질이나 병원성 물질의 식별, 환경의 생물정화 등을 이해하는데 필요한 중요한 정보를 얻을 수 있을 것이다.

3. 마치며

우리 앞에는 새로운 도전과 기회가 있다. 우리를 둘러싸고 있는 바다에서 새로운 의약품과 신물질, 유용한 유전자와 생물 자원을 건져 올릴 수도 있고 이들을 그대로 바다에 수장시킬 수도 있다. 세계가 해양 생물의 가능성을 개발하고자 도전하고 있다. 우리는 과연 해양 자원의 수혜국으로 남을 것인가? 바다는 우리의 미래다.

제 6 절 미국미생물학회 생물막 특별학회 (ASM Biofilm Conference)

캐나다 (빅토리아)에서 2003. 11. 1 - 11. 6 사이에 진행된 학회에 권개경 연구원이 참여하였다. 위 학회는 미국미생물학회의 정기학회 외에 별도로 개최되는 비정기 학회로서 생물막 관련 연구내용만으로 구성되는 특수학회에 해당된다. 컨퍼런스에는 약 600여명 정도가 참석하여 생물막에 관련된 연구의 중요성을 반증하였다. 참석자의 연구분야도 매우 다양하였는데 의학, 치의학, 안과 등 의료관련 분야를 중심으로 하여 하수처리과정에서의 생물막 형성 및 조절, 식품생산공정 관리, 생태계에서의 생물막 분석 및 제어기술 등 생물막과 관련된 대부분의 연구분야에서 관련 학자들이 참석하였다. 기조 강연으로는 미국 몬타나 주립대학 biofilm technology center의 Bill Costerton 박사가 biofilm의 특성에 관한 내용을 발표하였으며 이후 총 71건의 초청강연 및 구두발표와 300여건의 poster발표가 있었다. 이번 conference는 다양한 분야의 참석자들이 폭넓은 분야에서 지식을 습득할 수 있도록 단일 session으로 진행되었으며 현안문제를 중심으로 evening session을 진행하는 한편 실험 능력의 고양을 위해 실험기구의 exhibition과 Confocal Microscope 사용과 관련된 workshop을 별도로 구성하였다. 학회에서는 발표 내용을 '생물막의 구조와 기능', '생물막의 특성', '생물막 미생물의 생리적 조절', '고등생물과 미생물의 상호작용', '환경문제', '병원성미생물에 의한 생물막 형성' 등으로 나누어 진행하였다. 본 conference에서 확인할 수 있

있던 경향으로는 Confocal Microscope와 fluorescence-tagged cell (GFP 유전자가 삽입된)을 이용한 biofilm 생성 및 조절을 눈으로 관찰하는 방법이 고도로 발달하고 있음과 DNA microarray 방법을 활용해 유전정보 발현과정과 차이의 해석 등 고도의 장비와 막대한 비용을 들인 연구가 진행되고 있음을 보여주었다. Confocal microscope의 경우 어느 정도 유전정보가 확인된 종을 대상으로 한 생물막 연구과정에는 없어서는 안 될 분석방법으로 자리잡은 상황이었으며 다양한 영상분석기법이 개발되어 이용되고 있었다. GFP가 삽입된 cell을 이용해 생물막 생성과정에서의 형태변화, 균주의 이동상황, 생사여부 등 다양한 내용을 분석하기 위한 프로그램의 소개가 있었다. 다른 한편으로 의학분야에서 관심있는 일부 종의 경우 유전자정보 분석이 완료된 상태에서 생물막 생성에 따른 총체적인 유전자 발현의 변화를 microarray 기법을 이용해 분석하고 있었으며, 돌연변이 유발을 통한 특정 유전자의 생물막 생성에의 역할 등이 광범위하게 연구되고 있었다. Evening session을 통해서는 SAGE (Serial Analysis of Gene Expression), MPSS (Massive Parallel Signature Sequencing) 등 첨단 유전자발현 분석법을 소개받을 수 있었으며 생물막의 제어문제가 현실적으로 쉽지 않음을 보여주는 많은 사례들을 만날 수 있었다. 또한 해양생물막 제어 연구는 선진외국에서도 아직 초기단계에 있으므로 효율적인 투자가 이루어질 경우 국내에서의 연구도 경쟁력을 지닐 수 있음이 확인되었다.

제 7 장 참 고 문 헌

여 백

제 7 장 참 고 문 헌

- 김학균 · 이삼근 · 안경호 · 윤성화. 1996. 한국연안의 유독성 *Cochlodinium* 적조 발생과 변천. 제 2회 연구발표 및 귀국보고, 국립수산진흥원. 23-24.
- 박영태 · 박지빈 · 정성윤 · 송병철 · 임월애 · 김창훈 · 이원재. 1998. 적조생물 살조세균 탐색 I. 유해 적조생물 *Cochlodinium polykrikoides* 살조세균 *Micrococcus* sp. LG-1의 분리와 살조특성. J. Korean Fish. Soc. 31, 767-773.
- 한국해양연구소. 1999. 제한절편말단분석법 (T-RFLP)을 이용한 해양퇴적물의 세균군집 분석. 한국해양연구소보고서 BSPE 98731-00-1186-3.
- Allison, D.G., C. SanJose, A. Jaspe, and P. Gilbert. 1998. Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescence* biofilms. *FEMS Microbial. Ecol.* 167, 179-184.
- Ascencio, F., T.R. Hirst, and T. Wadstrom. 2000. Production and secretion of collagen-binding proteins from *Aeromonas veronii*. *J. Appl. Microbiol.* 89, 607-616.
- Baker, K.H., and D.S. Herson. 1978. Interaction between the diatom *Thalassiosira pseudomonanna* and an associated *Pseudomonad* in a mariculture system. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 791-796.
- Bass, C., P. Sander, and H. Lappin-Scott. 1998. Study of biofilm of sulfidogen from North Sea oil production facilities using continuous- Flow apparatus. *Geomicrobiology Journal* 15, 101-120.
- Beech, I.B., J. Smith, A.A. Steele, I. Penegar, and S.A. Campbell. 2001. The use of atomic force microscopy for studying interactions of bacterial biofilms with surfaces. *Colloids and Surfaces B :Biointerfaces* 23, 231-247.
- Beech, I.B., and C. Gaylarde. 1991. Microbial polysaccharides and corrosion. *International Biodeterioration.* 27, 95-107.
- Beveridge, J.J., S.A. Makin, J.L. Kadurugamuwa, and Z. Lee. 1997. Interactions between biofilms and the environments. *FEMS Microbiol Rev.* 20, 291-303.
- Boyd, A., and A.M. Charkrabarty. 1995. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: role of the alginate exopolysaccharide. *J. Ind. Microbiol.* 15, 162-168.
- Brennan, N.M., A.C. Ward, T.P. Beresford, P.F. Fox, M. Goodfellow, and T.M. Cogan. 2002. Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 820-830.
- Brown, M.R.W., and P. Gilbert. 1993. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 875-975.
- Brzostowicz, P.C., M.S. Blasko, and P.E. Rouviere. 2002. Identification of two gene

- clusters involved in cyclohexanone oxidation in *Brevibacterium epidermidis* strain HCU. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 781-789.
- Cammarota, M.C., and G.L. Sant'Anna Jr. 1998. Metabolic blocking of exopolysaccharides synthesis: effects on microbial adhesion and biofilm accumulation. *Biotechnol. Lett.* 20, 1-4.
- Carels, M., and D. Shepherd. 1977. The effect of different nitrogen sources on pigment production and sporulation of *Monascus* species in submerged shaken culture. *Can. J. Microbiol.* 23, 1360-1372.
- Charaklis, W.G., and P.A. Wilderer. 1989. Glossary. p.369-371 In: Charaklis W.G. and P.A. Wilderer (eds.) Structure and function of biofilms. Wiley, Chichester.
- Choi, D.H., J.H. Shim, and B.C. Cho. 1996. Bacterial colonizations of glass and acrylic surfaces immersed in coastal seawater. *The Yellow Sea* 2, 51-57.
- Chun, J. 1995. Computer-assisted classification and identification of actinomycetes. Ph.D. Thesis, University of Newcastle, Newcastle upon Tyne, UK.
- Cooksey, K.E., and B. Wigglesworth-Cooksey. 1995. Adhesion of bacteria and diatoms to surfaces in the sea: a review. *Aq. Microb. Ecol.* 9, 87-96.
- Costerton, J.W., G.G. Geesey, and K.J. Cheng. 1978. How bacteria stick. *Sci. Am.*, 238, 86-95.
- Costerton, J.W., K.J. Cheng, G.G. Geesey, T.I. Ladd, J.C. Nickel, M. Dasgupta, and T.J. Marrie. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* 41, 435-464.
- Costerton, J.W., Z. Lewandowski, D.E. Caldwell, D.R. Korber, and H.M. Lappin-Scott. 1995. Microbial biofilms. *Ann. Rev. Microbiol.* 49, 711-745.
- Dalton, H.M., and P.E. March. 1998. Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 252-255.
- Dang, H., and C.R. Lovell. 2000. Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 467-475.
- Davey, M.E., and G.A. O'Toole. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Molecular. Biol. Rev.* 64, 847-867.
- Dawson, M.P., B.A. Humphery, and K.C. Marshall. 1981. Adhesion, a tactic in the survival strategy of a marine vibrio during starvation. *Curr. Microbiol.* 6, 195-198.
- De Kievit, T.R., R. Gillis, S. Marx, C. Brown, and B.H. Iglewski. 2001. Quorum-Sensing Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Their Role and Expression Patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1865-1873.

- Decho, A.W. 2000. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Cont. Shelf Res.* 20, 1257-1273.
- Delong, E.F. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 5685-5689.
- Denyer, S.P., S.P. Gorman, and M. Sussman. 1993. Microbial biofilms: formation and control. Blackwell Scientific Publications.
- Djordjevic, D., H. Wiedmann, and L.A. McLandsborough. 2002. Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2950-2958.
- Ellis, A.E., A. do Vale, T.J. Bowden, K. Thompson, and T.S. Hastings. 1997. *In vivo* production of A-protein, lipopolysaccharide, iron-regulated outer membrane proteins and 70-kDa serine protease by *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *FEMS Microbiol. Lett.* 149, 157-163.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (Phylogeny inference package), version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA, USA.
- Flemming, H.C. 1996. The forces that keep biofilms together. p.311-316 *In* Sand W. (ed.) Biodeterioration and biodegradation, Dechema Monographs 133. VCH, Weinheim.
- Flemming, H.C., and J. Wingender. 2001. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part I: Structural and ecological aspects. *Water Sci. Technol.* 43, 1-8.
- Furuki, M., and M. Kobayashi. 1991. Interaction between *Chattonella* and bacteria and prevention of this red tide. *Marine Pollution Bull.* 23, 189-193.
- Geesey, G.G. 1982. Microbial exopolymers. ecological and economic considerations. *ASM News* 48, 9-14.
- Geesey, G.G., and D.C. White. 1990. Determination of bacterial growth and activity at solid-liquid interfaces. *Ann. Rev. Microbiol.* 44, 579-602.
- Geoffrey, W.H., P.D. Stephen, J.O. Cedric, and J.I. Lamia. 2001. Reduction in exopolysaccharide viscosity as an aid to bacteriophage penetration through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2746-2753.
- Gilbert, P., J. Das, and I. Foley. 1997. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv. Dent. Res.* 11, 160-167.
- Giovannoni, S.J. 1991. The polymerase chain reaction, p.177-201 *In* E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons, New York.
- González, J.M., R. Sim, R. Massana, J.S. Covert, E.O. Casamayor, C. Pedós-Ali, and M.A. Moran. 2000. Bacterial community structure associated with a

- dimethylsulfonio propionate-producing north Atlantic algal bloom. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4237-4246.
- Helke, D.M., E.B. Sommer, and A.C.L. Wong. 1993. Attachment of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* to stainless steel and buna-n rubber in the presence of milk and individual milk components. *J. Food Prot.* 56, 479-484.
- Heydorn, A., B. Ersbøll, J. Kato, M. Hentzer, M.R. Parsek, T. Tolker-Nielsen, M. Givskov, and S. Molin. 2002. Statistical Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development: Impact of Mutations in Genes Involved in Twitching Motility, Cell-to-Cell Signaling, and Stationary-Phase Sigma Factor Expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2008-2017.
- Hoppe, H.G. 1993. Chapter 48 pp 423-431 In (Kemp P.F., B.F. Sherr, E.B. Sherr and J.J. Cole eds.) Handbook of methods in Aquatic Microbial Ecology. Lewis Pub. Boca Raton, Florida, USA.
- Horikoshi, K. 1999. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 735-750.
- Imai, I., Y. Ishida, and Y. Hata. 1993. Killing of marine phytoplankton by a gliding bacterium *Cytophaga* sp. isolated from the costal sea of Japan. *Mar. Biol.* 116, 527-532.
- Imai, I., Y. Ishida, K. Sakaguchi, and Y. Hata. 1995. Algicidal marine bacteria isolated from Northern Hiroshima Bay, Japan. *Fisheries Science.* 61, 628-636.
- Junghans, H., and M. Metzloff. 1990. A simple and rapid method for the preparation of total plant DNA. *Biotechniques.* 8, 176.
- Kawano, Y., Y. Nagawa, H. Nakanishi, H. Nakajima, M. Matsuo, and T. Higashihara. 1997. Production of thiotropocin by a marine bacterium, *Caulobacter* sp. and its antimicrobial activities. *J. Mar. Biotechnol.* 5, 225-229.
- Ko, S.H., H.S. Lee, S.H. Park, and H.K. Lee. 2000. Optimal conditions for the production of exopolysaccharide by marine microorganism *Hahella chejuensis*. *Biotech. Bioproc. Engineer.* 5, 181-185.
- Krsek, M., and E.M.H. Wellington. 1999. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. *J. Microbiol. Methods.* 39, 1-16.
- Lawrence, J.R., D.R. Korber, B.D. Hoyle, J.W. Costerton, and D.E. Caldwell. 1991. Optical sectioning of microbial biofilms. *J. Bacteriol.* 173, 6558-6567.
- Lee, H.S., K.K. Kwon, J.H. Lee, and H.K. Lee. 1999. Optimal protocol for enumeration of attached bacteria on glass slides. *J. Microbiol.* 37, 263-266.
- Lee, E.Y., H.K. Lee, Y.K. Lee, C.J. Sim, and J.H. Lee. 2003. Diversity of symbiotic archaeal communities in marine sponges from Korea. *Biomolecular Engineering* 20,

299-304.

- Lee, H.K., J.S. Chun, E.Y. Moon, S.H. Ko, D.S. Lee, H.S. Lee, and K.S. Bea. 2001. *Hahella chejuensis* gen. nov., sp. nov., an extracellular-polysaccharide-producing marine bacterium. *Syst. evol. Microbiol.* 51, 661-666.
- Lee, J.H., H.H. Shin, H.K. Lee, K.K. Kwon, and S.J. Kim. 1998. Efficient removal of humic substances in preparing DNA extract from marine sediments (In Korean). *Kor. J. Microbiol.* 34, 132-136.
- Lee, K.K., and A.E. Ellis. 1990. Glycerophospholipid: cholesterol acyltransferase complexed with lipopolysaccharide (LPS) is a major lethal exotoxin and cytolysin of *Aeromonas salmonicida*: LPS stabilizes and enhances toxicity of the enzyme. *J. Bacteriol.* 172, 5382-5393.
- Leonard, N., J.P. Blancheton, and J.P. Guiraud. 2000. Population of heterotrophic bacteria in an experimental recirculating aquaculture system. *Aquacult. Eng.* 22, 109-120.
- Leppard, G.G. 1995. The characterization of algal and microbial mucilages and their aggregates in aquatic ecosystems. *Sci. Total Environ.* 165, 103-131.
- Leriche, V., P. Sibilleand, and B. Carpentier. 2000. Use of an Enzyme-Linked Lectinsorbent Assay To Monitor the Shift in Polysaccharide Composition in Bacterial Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1851-1856.
- Little, B.J. 1984. Succession in microfouling, p.63-67 In J.D. Costlow and R.C. Tipper (eds.), *Marine biodeterioration: an interdisciplinary study*. US Naval Institute Press.
- Liu, W.T., T.L. Marsh, H. Cheng, and L.J. Forney. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4516-4522.
- Loo, C.Y., D.A. Corliss, and N. Ganeshkumar. 2000. *Streptococcus gordonii* biofilm formation: Identification of genes that code for biofilm phenotypes. *J. Bacteriol.* 182, 1374-1382.
- Lovejoy, C., J.P. Bowman, and G.M. Hallegraeff. 1998. Algicidal effect a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate(Class Proteobacteria, Gamma subdivision) on harmful algal bloom species of the general *Chattonella*, *Gymnodinium*, and *Herterosigam*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2806-2813.
- Lüdemann, H., I. Arth, and W. Liesack. 2000. Spatial changes in the bacterial community structure along a vertical oxygen gradient in flooded paddy soil cores. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 754-762.
- Maier, R.M., and G. Soberon-Chavez. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids:

- biosynthesis and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 625-633.
- Marshall, K.C. 1988. Adhesion and growth of bacteria at surfaces in oligotrophic habitats. *Can. J. Microbiol.* 34, 503-506.
- Marshall, K.C. 1992. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. *ASM News.* 58, 202-207.
- Marshall, K.C., R. Stout, and R. Mitchell. 1971. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *J. Gen. Microbiol.* 68, 337-348.
- Melo, L.F. 1992. Biofilms-science and technology. Kluwer Academic Publishers.
- Mireles II, J.R., A. Toguchi, and R.M. Harshey. 2001. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *J. Bacteriol.* 183, 5848-5854.
- Mitsutani, A., K. Takesue, M. Kirita, and Y. Ishida. 1992. Lysis of *Skeletonema costatum* by *Cytoplaga* sp. isolated from the costal water of the Ariake sea. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 58, 2159-2169.
- Miyamoto, K., H. Tsujibo, Y. Hikita, K. Tanaka, S. Miyamoto, M. Hishimoto, C. Imada, K. Kamei, S. Hara, and Y. Inamori. 1998. Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding a serine proteinase inhibitor named marinostatin from a marine bacterium, *Alteromonas* sp. strain B-10-31. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 2446-2449.
- Moesender, M.M., J.M. Arrieta, G. Muyzer, C. Winter, and G.J. Herndl. 1999. Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3518-3525.
- Moeseneder, M.M., C. Winter, J.M. Arrieta, and G.J. Herndl. 2001. Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) screening of a marine archaeal clone library to determine the different phylotypes. *J. Microbiol. Methods.* 44, 159-172.
- Moyer, C.L., J.M. Tiedje, F.C. Dobbs, and D.M. Karl. 1996. A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: Efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2501-2507.
- Nair, S., R. Karim, M.J. Cardosa, G. Ismail, and T. Pang. 1999. Convenient and versatile DNA extraction using agarose plugs for ribotyping of problematic bacterial species. *J. Microbiol. Methods.* 38, 63-67.
- Nakagawa, Y., and K. Yamasato. 1993. Phylogenetic diversity of the genus *Cytophaga* revealed by 16S rRNA sequencing and menaquinone analysis *J. Gen. Microbiol.* 139, 1155-1161.

- Niemi, M.R., I. Heiskanen, K. Wallenius, and K. Lindstrom. 2001. Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *J. Microbiol. Methods.* 45, 155-165.
- Park, S.H., J.H. Lee, S.H. Ko, D.S. Lee, and H.K. Lee. 2000. Demulsification of oil-in-water emulsions by aerial spores of a *Streptomyces* sp. *Biotechnol. Lett.* 22, 1389-1395.
- Radwan, S.S., H.A. Al-Aawadi, and M. Khanafer. 2001. Effects of lipids on n-alkane attenuation in media supporting oil-utilizing microorganisms from the oily Arabian Gulf coasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 198, 99-103.
- Rauhut, R., and Klug, G. 1999. mRNA degradation in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 353-370.
- Reynolds, W.S., J.A. Schwarz, and V.M. Weis. 2000. Symbiosis-enhanced gene expression in cnidarian-algal associations: cloning and characterization of a cDNA, sym32, encoding a possible cell adhesion protein. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 126, 33-44.
- Romanenko, L.A., N.V. Zhukova, M. Rhode, A.M. Lysenko, V. Mikhailov, and E. Stackebrandt. 2003. *Pseudoalteromonas agarivorans* sp. nov., a novel marine agarolytic bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 125-131.
- Rosenberg, M., D. Gutnick, and E. Rosenberg. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 9, 29-33.
- Sabra, W., A.P. Zeng, and W.D. Deckwer. 2001. Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 315-325.
- Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Sambrook, J., and D.W. Russell. 2001. *Molecular Cloning*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sawayama, S., Y. Sako, and Y. Ishida. 1993. New inhibitor for mating reaction of *Alexandrium catenella* produced by marine *Alteromonas* sp. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 59, 291-294.
- Sohn, J.H. 2000. A study on the identification and characterization of marine algicidal bacterium, *Cytophaga* sp. OT-1. Ph.D. Thesis, Dankook University, Seoul. 171 pp.
- Sommer, P., C. Martin-Rouas, and E. Mettler. 1999. Influence of the adherent population level on biofilm population, structure and resistance to chlorination. *Food Microbiol.* 16, 503-515.
- Staneck, J.L., and G.D. Roberts. 1974. Simplified approach to identification of aerobic

- actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl. Microbiol.* 119, 226-231.
- Stickler, D. 1999. Biofilms. *Curr. Opinion. Microbiol.* 2, 270-275.
- Sutherland, I.W. 1999. Biofilm exopolysaccharide. p.73-92 In Wigender J., T.R. Neu and H.C. Flemming (eds.) *Microbial Extracellular Polymeric Substances*. Springer, New York.
- Suzuki, M., Y. Nakagawa, S. Harayama, and S. Yamamoto. 2001. Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine Cytophaga-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amylolyticum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1639-1652.
- Tabe, Y., A. Nakamura, and J. Igari. 2001. Glycopeptide susceptibility profiles of nosocomial multiresistant *Staphylococcus haemolyticus* isolates. *J. Infect. Chemother.* 7, 142-147.
- Takeyama, H., D. Takeda, K. Yazawa, A. Yamada, and T. Matsunaga. 1997. Expression of the eicosapentaenoic acid synthesis gene cluster from *Shewanella* sp. in a transgenic marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. *Microbiology.* 143, 2725-2731.
- Tamaru, Y., T. Araki, H. Amagoi, H. Mori, and T. Morishita. 1995. Purification and characterization of an extracellular beta-1,4-mannanase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain MA-138. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4454-4458.
- Thompson, F.L., C.C. Thompson, Y. Li, B. Gomez-Gil, J. Vandenberghe, B. Hoste, and J. Swings. 2003. *Vibrio kanaloae* sp. nov., *Vibrio pomeroyi* sp. nov. and *Vibrio chagasii* sp. nov., from sea water and marine mammals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 753-759.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D.G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research.* 24, 4876-4882.
- Tolker-Nielsen, T., and S. Molin. 2000. Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microb. Ecol.* 40, 75-84.
- Tsubokura, A., H. Yoneda, and H. Mizuta. 1999. *Paracoccus carotinifaciens* sp. nov., a new aerobic gram-negative astaxanthin-producing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 277-282.
- van Loosdrecht, M.C.M., J. Lyklema, W. Norde, G. Schraa, and A.J.B. Zehnder. 1987. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *AEM.* 53, 1893-1897.
- Venkateswaran, K., M. Kempf, F. Chen, M. Satomi, W. Nicholson, and R. Kern.

2003. *Bacillus nealsonii* sp. nov., isolated from a spacecraft-assembly facility, whose spores are gamma-radiation resistant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 165-172.
- Volossiouk, T., E.J. Robb, and R.N. Nazar. 1995. Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3972-3976.
- West, P.A., P.R. Brayton, T.N. Bryant, and R.R. Colwell. 1986. Numerical taxonomy of vibrios isolated from aquatic environments. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 36, 531-543.
- Wimpenny, J. 2000. An overview of biofilms as functional communities, p.1-24 In D. Allison, P. Gilbert, H. Lappin-Scott, and M. Wilson (ed.), *Community structure and co-operation in biofilms*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Wingender, J., M. Strathmann, A. Rode, A. Leis, and H.C. Flemming. 2001. Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods Enzymol.* 336, 302-314.
- Wolfaardt, G.M., J.R. Lawrence, R.D. Robarts, and D.E. Caldwell. 1998. *In situ* characterization of biofilm exopolymers involved in the accumulation of chlorinated organics. *Microb. Ecol.* 35, 213-223.
- Wong, H.C., Y.C. Lin, and P.E. Koehler. 1981. Regulation of growth and pigmentation of *Monascus purpureus* by carbon and nitrogen concentration. *Mycologia.* 73, 649-654.
- Yernool, D.A., J.K. McCarthy, D.E. Eveleigh, and J.D. Bok. 2000. Cloning and characterization of the glucooligosaccharide catabolic pathway beta-glucan glucohydrolase and cellobiose phosphorylase in the marine hyperthermophile *Thermotoga neapolitana*. *J. Bacteriol.* 182, 5172-5179.
- Yoshinaga, I., T. Kawai, Y. Ishida, T. Takeuchi, and Y. Ishida. 1995. Distribution and fluctuation of bacteria inhibiting the growth of a marine red tide phytoplankton *Gymnodinium mikimotoi* in Tanabe Bay. Wakayama Pref., Japan. *Fish. Sci.* 61, 780-786.
- Ziemke, F., M.G. Hofle, J. Lalucat, and R. Rossello-Mora. 1998. Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 179-186.
- Zita, A., and M.E. Hermansson. 1997. Determination of bacterial cell surface hydrophobicity of single cells in cultures and in wastewater *in situ*. *FEMS Microbiol. Lett.* 152, 299-306.

여 백

특정연구개발사업 연구결과 활용계획서

사업명	중사업명	국가지정연구실사업		
	세부사업명			
과제명		해양미생물 다양성 확보 및 유전자원 이용기술		
연구기관	한국해양연구원	연구책임자	이홍금	
총연구기간		2001년 7 월 11 일 ~ 2004 년 7 월 10 일 (36개월)		
총 연구비 (단위 : 천원)	정부출연금	민간부담금	합계	
	1,306,412		1,306,412	
기술분야		해양 (633)		
참여기업				
공동연구기관				
위탁연구기관				
연구결과활용 (해당항목에(√)표시)	1. 기업화 ()	2. 기술이전()	3. 후속연구추진(√)	4. 타사업에 활용()
	5. 선행 및 기초연구()	6. 기타목적활용(교육연구)()	7. 활용중단(미활용)()	8. 기타()
<p>특정연구개발사업 처리규정 제 31조(연구개발결과의 보고) 제 2항에 의거 연구결과 활용계획서를 제출합니다.</p> <p>첨부 : 1. 연구결과 활용계획서 1부. 2. 기술요약서 1부</p> <p style="text-align: right;">2004 년 6 월 17 일</p> <p style="text-align: right;">연구책임자 : 이홍금 (인) 연구기관장 : 변상경 (직인)</p> <p style="text-align: center;">과학기술부장관 귀하</p>				

여 백

[첨부1]

연구결과 활용계획서

1. 연구목표 및 내용

최종목표는 해양환경의 생물막내에 서식하는 미생물 유전자원을 확보하고, 이들의 생체기능과 유전정보 분석에 기초한 유용성 검색 및 활용기술의 개발이다. 1단계 목표는 해양미생물 유전자원의 확보 및 기능분석으로서 연구내용은 해양생물막을 대상으로 배양가능한 해양미생물 분리보전, 배양가능 미생물의 유용성 검색 및 유전자원의 확보, 배양불가 미생물 유전자원의 분리 및 확보를, 2단계 1차년도(3차년도)에는 생물막 부착 환경 분석과 유용유전자 탐색방법 구축을 목표로 한다.

2. 연구수행결과 현황(연구종료시점까지)

가. 특허(실용신안) 등 자료목록

발명명칭	특허공고번호 출원(등록)번호	공고일자 출원(등록)일자	발명자 (출원인)	출원국	비고
세포외다당류를 분비하는 무색소 하헬라 제주엔시스 96CJ10356 변이주 m10356 및 이로부터 세포외다당류를 생산하는 방법	10-2003-0029537	2003. 5. 9	한국 해양연구원 (이홍금, 임정한, 이유경, 이현상, 김성진)	대한 민국	
하헬라 제주엔시스 96CJ10356 균주가 생산하는 적색색소의 살조효과 및 이로부터 RP10356을 생산하는 방법	10-2003-0029526	2003. 5. 9	한국 해양연구원 (이홍금, 임정한, 김성진, 안세훈, 박규진, 이현상)	대한 민국	
Red pigment originated from <i>Hahella chejuensis</i> , having algacidal effect	PCT/KR2004/001072	2004. 5.10	한국 해양연구원 (이홍금, 임정한, 김성진, 안세훈, 박규진, 이현상)		

나. 프로그램 등록목록

해당사항 없음.

다. 노하우 내역

해당사항 없음.

라. 발생품 및 시작품 내역

해당사항 없음.

마. 논문게재 및 발표 실적

○ 논문게재 실적

학술지명	제목	게재연 월일	발행년 도권호	발행 기관	발행기 관(국명)	SCI여 부 (O,X)
Journal of Microbiology	Morphological diversity of marine microorganisms on different isolation media	2002.6.1	2002 40,161-165	한국미생물학회	한국미생물학회 (한국)	O
지식정보인프라	해양생물 유전자은행 구축 및 운영체계	2002.10.1	2002 10,70-75	KISTI	KISTI (한국)	X
Journal of Microbiology	Isolation and identification of biofilm-forming marine bacteria on glass surface emerged on the seawater in DaeHo Dike, western side of Korea	2002.12.1	2002 40,260-266	한국미생물학회	한국미생물학회 (한국)	O
Journal of Microbiological Methods	A simple method for DNA extraction from marine bacteria that produce extracellular materials	2003.1.1	2003 52,45-250	Elsevier	Elsevier (네델란드)	O
Biomolecular Engineering	Optimal conditions for the production of sulfated polysaccharide by marine microalga <i>Gyrodinium impudicum</i> strain KG03	2003.8.1	2003 20,273-280	Elsevier	Elsevier (네델란드)	O
한국해양학회지 「바다」	해양환경의 황산염 환원을 조절요인 및 유기물 분해에 있어 황산염 환원의 중요성	2003.8.1	2003 8,210-224	한국해양학회	한국해양학회 (한국)	X
Journal of Microbiology	Culturable Bacteria Isolated from Natural Marine Biofilms	2003.5.17	2003 14,183-188	한국미생물학회 (한국)	한국미생물학회 (한국)	O
Marine Biotechnology	Antiviral effects of sulfated exopolysaccharide from marine microalga <i>Gyrodinium impudicum</i> strain KG03	2003.09.29	2004 6,17-25	Springer-Verlag	Springer-Verlag (독일)	O
양식21	21세기 전략산업인 해양생물산업의 추진방향	2003.08.01	2003 2003,78-83	전남도청	전남도청 (대한민국)	X
Biomolecular Engineering	Diversity of symbiotic archaeal communities in marine sponges from Korea	2003.07.01	1003 20,299-304	Elsevier	Elsevier (네델란드)	O
Key Engineering materials (2004)	Isolation and identification of bacteria from marine biofilms	2004 인쇄중	인쇄중	BIEN		O

Marine Biotechnology	Changes of biofilm - forming bacterial community on acrylic surface emerged in seawater	2004 인쇄중	인쇄중	Springer-Verlag	Springer Verlag (독일)	○
Aquatic Microbial Ecology	Simultaneous progress of community structure and bacterial activity during the early phase of biofilm formation on acrylic surface in seawater	2003.2	투고	Springer Verlag (독일)	Springer Verlag (독일)	○
Carbohydrate Polymer	Rheological properties of emulsifier EPS-R produced by marine bacterium <i>Hahella chejuensis</i>	2003.5.	투고	Elsevier (네델란드)	Elsevier (네델란드)	○
Journal of General and Applied Microbiology	Effect of nutrient components on the production of exopolysaccharide by marine bacterium <i>Hahella chejuensis</i>	2003.5.	투고	Microbial. Res. Found (일본)	Microbial. Res. Found (일본)	○
Carbohydrate Polyme	Physicochemical and Rheological Properties of Novel Emulsifier, p-11568 Produced by Marine Bacterium <i>Altrermonas</i> sp. strain 00SS11568	2004.5	투고	Elsevier	Elsevier (네델란드)	○
계 : 게재 12건 (SCI 9건) 투고 4건						

○ 학술회의 발표 실적

학술회의 명칭	제목	게재연월일	발행기관	국명
EU Project Workshop Analysis of Single Cells in the Marine Phytoplankton	The properties of exopolysaccharide p-CY36 produced bt marine cyanobacterium <i>Chroococcus</i> sp. 00SS-CY36	2002.04.19	AWI	독일
제 4차 APMBC	Bacterial number and extracellular enzyme activities of biofilm on acrylic surface in sea water	2002.04.23	아시아-태평양 해양생물공학회	미국
제 4차 APMBC	Biofilm-forming bacteria on glasses exposed in sea water	2002.04.23	아시아-태평양 해양생물공학회	미국
Int. Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms	Number and metabolic activity of biofilm-forming bacteria on acrylic surface in sea water	2002.07.01	GIM	대한민국
Int. Symposium on the GIM	Chitinase-producing marine bacteria from Cheju Island	2002.07.01	GIM	대한민국
2002 한국미생물학회 추계학술대회	Biofilm formation by bacteria on acrylic surface in seawater	2002.10.22	한국미생물학회	대한민국
2002 한국미생물학회 추계학술대회	Sustainable use of marine microorganisms	2002.10.22	한국미생물학회	대한민국
Marine Biotechnology:Basics and Applications	Optimal conditions fro the production of a sulfated polysaccharide by the marine microalage <i>Gyrodinium impudicum</i> KG03	2003.02.25	유럽 해양생물공학회	스페인

2003 한국미생물학회 춘계학술대회	Diversity of culturable bacteria from early phase of biofilm formation	2003.05.02	한국미생물학회	대한민국
2003 한국미생물·생명공학회 춘계학술대회	Seasonal progress of biofilm-forming bacteria on acrylic surface in seawater	2003.06.26	한국미생물·생명공학회	대한민국
2003 한국미생물·생명공학회 춘계학술대회	Novel exopolysaccharide from marine biofilm-forming microorganism	2003.06.26	한국미생물·생명공학회	대한민국
2003 한국미생물·생명공학회 춘계학술대회	Culturable Bacteria Isolated from Natural Marine Biofilms	2003.06.26	한국미생물·생명공학회	대한민국
2003 한국미생물·생명공학회 춘계학술대회	<i>Hahella chejuensis</i> pigments killing red-tide microalgae	2003.06.26	한국미생물·생명공학회	대한민국
2003 한국미생물·생명공학회 춘계학술대회	Exopolysaccharide from colorless mutant of <i>Hahella chejuensis</i> strain 96CJ10356	2003.06.26	한국미생물·생명공학회	대한민국
Marine Biotechnology Conference	Changes of Biofilm-Forming Bacterial Community Composition on Acrylic Surface Emerged in Seawater	2003.09.23	국제 해양생물공학회	일본
Marine Biotechnology Conference	Algicidal effect of Red Pigment from the Marine Bacterium <i>Hahella chejuensis</i> strain 96CJ10356 on Red-tide Microalgae	2003.09.25	국제 해양생물공학회	일본
Marine Biotechnology Conference	A novel sulfated polysaccharide derived from the marine microalgae <i>Gyrodinium impudicum</i> strain KG03 with immunostimulating activity in vitro	2003.09.25	국제 해양생물공학회	일본
2003 한국미생물학회 연합회 추계학술대회	Interaction of biofilm-forming bacteria during the early phase of biofilm formation	2003.10.25	한국미생물학 회 연합회	대한민국
2003 한국미생물학회 연합회 추계학술대회	Draft genome sequence of <i>Hahella chejuensis</i> KCTC 2396, an extracellular polysaccharide-producing, algicidal marine bacterium	2003.10.25	한국미생물학 회 연합회	대한민국
2003 ASM Biofilm Conference	Diversity of marine bacteria isolated from early phase of biofilm formation	2003.11.05	ASM	캐나다
International Women's conference on BIEN-Technology	Microbial diversity of marine biofilm	2003.11.15	BIEN	대한민국
International Women's conference on BIEN-Technology	Novel emulsifier from marine microorganism	2003.11.15	BIEN	대한민국
International Symposium for Marine Biodiversity & Conservation Ecology	Culture and identification of bacteria from marine biofilms	2004.02.19	충남대	대한민국
International Meeting of the Microbiological Society of Korea	Isolation of Actinomycetes Associated with Marine Sponge <i>Hymeniacidon perleve</i>	2004.05.13	한국미생물학회	대한민국
International Meeting of the Microbiological Society of Korea	Mutagenesis of <i>Hahella chejuensis</i> 96CJ10356 using EMS & Characterization of the Exopolysaccharide Produced by a Mutant Strain	2004.05.13	한국미생물학회	대한민국
계 : 25건				

3. 연구성과

기술이전이나 기업화 완료 실적은 없음.

4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

가. 당해연도 활용계획

국내 연안 생물막에서 분리한 세균 중 삼면의 해안에서 공통으로 출현하는 좋은 방오효능 평가를 위한 표준균주로 활용할 수 있음. 이를 위하여 분리한 균주의 염기서열분석에 따른 동정을 지속적으로 수행함. 분리 미생물 중 세포외다당류 생성, 세포표면 소수성, 부착능, 한천 분해능 등이 우수한 균주는 2단계에 정밀 생체기능 연구를 통하여 고부가가치 물질 생산용 미생물 개발에 활용함.

나. 활용방법

*Hahella chejuensis*에서 제조된 무색소 변이주가 생산하는 세포외다당류는 유화안정제로 개발이 가능함. *Hahella chejuensis* 균주에서 분리된 적색색소는 살조능이 우수하므로 친환경적 적조제어제로 개발하고 색소생산 관련 유전자 연구를 통하여 색소 대량 생산을 위한 형질전환 미생물 개발에 활용함.

다. 차년도이후 활용계획

세포외다당류의 생성이 우수한 *Hahella chejuensis*에서 무색소 변이주를 제조하였는데 이는 돌연변이주가 생산하는 세포외다당류는 적색소의 침적이 있는 *Hahella chejuensis*가 생산된 EPS-R과 달리 무색의 다당체로 유화안정능이 244시간까지 유화안정능이 유지되었고 최적 생산조건에서 최대 19.2 g/ℓ 이 생산되었다. 차후 고부가가치 유화안정제로 개발하기 위하여 고부가가치 응용성 검색과 최대생산량 증가 연구가 수행되어야한다.

*Hahella chejuensis*가 생산하는 적색색소는 *Cochlodinium polykrikoides*, *Gyrodinium impudicum* and *Heterosigma akashiwo* 등의 적조원인 종에 살조효과를 가지고 있으며,

현장적용 예비실험결과, 적조형성 지역의 적조수에서 살조효과가 확인됨에 따라 독성 검사를 거쳐 현장적용실험을 가지며, RP10356의 화학적 특성, 구조분석 및 살조제재화 연구가 수행되어야한다.

5. 기대효과

해당물질의 사업 및 시장규모 조사가 미비한 상태임.

6. 문제점 및 건의사항

(연구성과의 제고를 위한 제도·규정 및 연구관리 등의 개선점을 기재)

내부인건비의 상승 및 호봉승급에 따른 외부인건비의 상승으로 연구원의 연봉 조정에 영향을 받지 않기 위해서는 연구비의 증액이 요구됨.

[첨부2]

기술 요약서 (I)

■ 기술의 명칭

세포의 다당류를 분비하는 무색소 하헬라 제주엔시스 96CJ10356 변이주(m10356) 및 이로부터 세포외다당류를 생산하는 방법

■ 기술을 도출한 과제현황

과제관리번호	M1-01-4-00-0001			
과제명	해양미생물 다양성 확보 및 유전자원 이용기술			
사업명	국가지정연구실 사업			
세부사업명				
연구기관	한국해양연구원	기관유형	출연(연)	
참여기관(기업)				
총연구기간	2001.7.11- 2004.7.10			
총연구비	정부(1,036,412)천원 민간()천원 합계(1,036,412)천원			
연구책임자 1	성명	이홍금	주민번호	
	근무기관 부서	한국해양연구원 극지연구소	E-mail	hklee@kordi.re.kr
	직위/직급	책임연구원	전화번호	031-400-6241
연구책임자 2	성명	이유경	주민번호	
	근무기관 부서	한국해양연구원 극지연구소	E-mail	leeyk@kordi.re.kr
	직위/직급	선임연구원	전화번호	031-400-6248
실무연락책임자	성명	이진용	소속/부서	기획부 연구개발팀
	직위/직급	선임행정원	E-mail	jinlee@kordi.re.kr
	전화번호	031-400-6082	FAX	031-400-6069
	주소	(425 - 172) 경기도 안산시 상록구 사2동 1270 한국해양연구원 기획부 연구개발팀		

■ 기술의 주요내용

[기술의 개요]

본 발명에 의해 생산된 세포외다당류는 주당으로 그루코오스 및 갈락토오스, 갈락토사민의 몰당 비(molar ratio)가 1 : 1 : 1.1이고 보조당으로 갈락투로닉산이 존재하는 이종다당류(heteropolysaccharide)로서, 분자량은 1.39×10^3 Da이며, 유화안정성이 우수하여 고점성으로 다양한 산업분야에서 이용할 수 있음

[용도 · 이용분야]

본 발명의 96CJ10356 변이주 M10356(KCTC10469BP)은 무색소-점질성 다당류를 분비하는 해양성 미생물로 이들이 분비하는 세포외다당류인 p-m10356을 신기능성의 바이오플라머로 이용할 수 있었으며, 유화안정성이 우수하며, 미백효과가 있어 산업소재로도 이용이 가능함.

유화제로 식품첨가물로 사업화가능.

■ 기술의 분류

[기술코드] 633 (3 Digit) (KISTEP 홈페이지 기술요약서용 기술분류표 참조)

[기술분야] (1개만 선택(✓로 표시)하여 주십시오)

- | | | | | |
|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------|----------------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> 정보산업 | <input type="checkbox"/> 기계설비 | <input type="checkbox"/> 소재 | <input type="checkbox"/> 정밀화학·공정 | <input type="checkbox"/> 생명과학 |
| <input type="checkbox"/> 원자력 | <input type="checkbox"/> 자원 | <input type="checkbox"/> 에너지 | <input type="checkbox"/> 항공·우주 | <input checked="" type="checkbox"/> 해양 |
| <input type="checkbox"/> 교통 | <input type="checkbox"/> 보건·의료 | <input type="checkbox"/> 환경 | <input type="checkbox"/> 기초·원천 | <input type="checkbox"/> 기타 |

[기술의 활용유형] (1개만 선택(✓로 표시)하여 주십시오)

- 신제품개발
 신공정개발
 기존제품개선
 기존공정개선
 기 타 ()

[기술의 용도] (복수 선택(✓로 표시)가능합니다)

- | | | | |
|---------------------------------|---------------------------------|---|--------------------------------|
| <input type="checkbox"/> 기계설비 | <input type="checkbox"/> 부품소자 | <input checked="" type="checkbox"/> 원료재료 | <input type="checkbox"/> 소프트웨어 |
| <input type="checkbox"/> 가공처리기술 | <input type="checkbox"/> 자동화기술 | <input type="checkbox"/> 불량률 감소 등 현장애로기술 | |
| <input type="checkbox"/> 제품설계기술 | <input type="checkbox"/> 공정설계기술 | <input type="checkbox"/> 기 타 () | |

[기술의 수명주기] (1개씩 선택(√호 표시)하여 주십시오)

	① 기술개념 정립기 : 기술의 잠재적 가능성만 있는 단계
	② 기술실험기 : 기술개발에 성공했으나 아직 실용성, 경제성 등이 확실치 않은 단계
	③ 기술적용 시작기: 최초의 기술개발국에서만 활용되고 있는 단계
	④ 기술적용 성장기: 기술개발국 및 일부 선진국에서 활용되고 있는 단계
	⑤ 기술적용 성숙기: 선진국사이에서 활발한 기술이전이 일어나며, 기술의 표준화가 되어가는 단계
	⑥ 기술적용 쇠퇴기: 선진국에서 개도국으로 기술이전이 활발하게 일어나고, 선진국에서는 기술의 가치가 저하되나, 개도국에서는 아직 시장의 가치가 높은 기술

[기술발전 과정상의 기술수준] (1개씩 선택(√호 표시)하여 주십시오)

	① 외국기술의 모방단계 : 이미 외국에서 개발된 기술의 복제, reverse Eng.
	② 외국기술의 소화·흡수단계 : 국내시장구조나 특성에 적합하게 적응시킴
	③ 외국기술의 개선·개량단계 : 성능이나 기능을 개선시킴
	④ 신기술의 혁신·발명단계 : 국내 최초로 개발

- 본 기술과 관련하여 추가로 확보되었거나 개발중인 기술
해당사항 없음.

기술 요약서 (II)

■ 기술의 명칭

하젤라 제주엔시스 96CJ10356균주(KCTC2396)가 생산하는 적색색소(RP10356)의 살조효과 및 이로부터 RP10356을 생산하는 방법

■ 기술을 도출한 과제현황

과제관리번호	M1-01-4-00-0001			
과제명	해양미생물 다양성 확보 및 유전자원 이용기술			
사업명	국가지정연구실 사업			
세부사업명				
연구기관	한국해양연구원	기관유형	출연(연)	
참여기관(기업)				
총연구기간	2001.7.11- 2004.7.10			
총연구비	정부(1,036,412)천원 민간()천원 합계(1,036,412)천원			
연구책임자 1	성명	이홍금	주민번호	
	근무기관 부서	한국해양연구원 극지연구소	E-mail	hklee@kordi.re.kr
	직위/직급	책임연구원	전화번호	031-400-6241
연구책임자 2	성명	임정한	주민번호	
	근무기관 부서	한국해양연구원 극지연구소	E-mail	jhyim@kordi.re.kr
	직위/직급	연수연구원	전화번호	031-400-6290
실무연락책임자	성명	이진용	소속/부서	기획부 연구개발팀
	직위/직급	선임행정원	E-mail	jinlee@kordi.re.kr
	전화번호	031-400-6082	FAX	031-400-6069
	주소	(425 - 172) 경기도 안산시 상록구 사2동 1270 한국해양연구원 기획부 연구개발팀		

[기술의 수명주기] (1개씩 선택(√호 표시)하여 주십시오)

①	기술개념 정립기 : 기술의 잠재적 가능성만 있는 단계
②	기술실험기 : 기술개발에 성공했으나 아직 실용성, 경제성 등이 확실치 않은 단계
③	기술적용 시작기: 최초의 기술개발국에서만 활용되고 있는 단계
④	기술적용 성장기: 기술개발국 및 일부 선진국에서 활용되고 있는단계
⑤	기술적용 성숙기: 선진국사이에서 활발한 기술이전이 일어나며, 기술의 표준화가 되어가는 단계
⑥	기술적용 쇠퇴기: 선진국에서 개도국으로 기술이전이 활발하게 일어나고, 선진국에서는 기술의 가치가 저하되나, 개도국에서는 아직 시장의 가치가 높은 기술

[기술발전 과정상의 기술수준] (1개씩 선택(√호 표시)하여 주십시오)

①	외국기술의 모방단계 : 이미 외국에서 개발된 기술의 복제, reverse Eng.
②	외국기술의 소화·흡수단계 : 국내시장구조나 특성에 적합하게 적용시킴
③	외국기술의 개선·개량단계 : 성능이나 기능을 개선시킴
④	신기술의 혁신·발명단계 : 국내 최초로 개발

- 본 기술과 관련하여 추가로 확보되었거나 개발 중인 기술
해당사항 없음.