

BSPN 99386-00-1268-3

생명현상 및 기능연구사업
Studies on Life Phenomena & Function Research

해양생물의 보존 및 응용기술개발 연구

Development of Preservation and
Biotechnological Application Technologies
of Marine Organisms

한국해양연구소

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “해양생물의 보전 및 응용기술개발 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2000 . 9 . 30

협동연구기관명 : 한국해양연구소

협동연구책임자 : 이 홍 금

연 구 원 : 이정현, 제종길, 김상진

: 권개경, 박신혜, 고성환

: 이현상, 정성영, 이득수

: 신현희, 윤희정

요 약 문

I. 제 목

해양생물의 보전 및 응용기술개발 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최종목표: 국내 서식하는 유용해양생물자원의 탐색, 생리활성 검색, 유용물질의 규명 및 유용생물자원을 지속적으로 활용할 수 있도록 현지내·외 보존기술과 배양방법의 구축을 목표로 한다.

생물다양성(Biodiversity)은 생명의 원천일 뿐 아니라 국가간의 자원으로 국민의 삶의 질을 향상시키는 원동력이 된다. 생물 다양성의 손실과 지구환경의 위협을 느껴 1992년에 브라질의 리우정상회담을 개최하여 "의제 21(Agenda21)"을 채택하게 되었다. 이의 주요내용 및 실천계획중의 하나가 국가 관할권내 해양생물자원의 지속적 이용 및 보존분야이지만 대한민국 관할권내 연근해 해양생물자원의 지속적 이용과 보존을 위한 현 국가정책은 매우 미진한 수준이며, 이러한 결과로 연안의 해양생물자원은 점차 고갈되고 있으며 다각적으로 이용할 수 있는 방안이 모색되어지지 않고 있다.

해양생물자원을 보전한다는 관점에서 실험실 내에서의 유용유전자의 확보, 자연서식지에서의 보전기술은 생물다양성보전 및 그 이용과 직접 연계되어있다.

유용물질이나 기능의 주요 원천인 해양생물의 양식 및 공생미생물의 배양을 비롯하여 유전적 개량방법의 개발을 위해서도 국내외 해양생물의 분포, 동정 및 나아가 유전자원의 확보가 필요하다. 선진국에서도 이 분야의 연구경험은 초기 단계이므로 우리나라에서도 집중적으로 유용해양생물의 보전 및 이용기술 분야에 투자하여 연구를 수행한다면 단기간내에 선진국과 같은 수준에 도달할 수 있을 것이다. 우리의 해양자원이 침식당하기전 다양한 기능성의 소재들을 우리의 해양생물자원으로부터 개발하여야만 국가경쟁력 증강에 기여할 수 있을 것이다.

해양생물로부터 다양한 기능성 물질들을 개발하기 위해서는 우선 유용유전자원의 확보 및 보전, 유용성평가에 따른 개발대상 생체물질이나 생체기능에 대한 연구, 산업적 이용이 가능하기 위한 대량생산기술에 대한 연구가 필요하다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

1. 생물자원의 분포 및 생산량조사

- 해양동물:해면, 산호, 연체동물의 분포 및 생물량 조사, 분류, 동정

2. 유용유전자 분리 및 보전

- 해양미생물 분리배지 조사
- 해양미생물 보존방법 조사

3. 해양미생물 유용성 연구

- Topoisomerase I 저해효능 방선균연구
- *Streptomyces* sp. 8321의 탈유화능 연구
- 해양미생물유래 다당류 연구

- 유용효소 생산 연구

IV. 연구개발결과

1. 생물자원의 분포 및 생산량조사

제주도 서귀포 해역의 문섬, 숲섬, 범섬을 중심으로 3차례 SKUBA 탐사를 통하여 수직분포 우점종의 산호류 분포를 조사하였다. 1차 40개 시료중 산호류 31종, 2차 29개 시료중 산호류 23종, 3차 해면 6종, 이끼벌레 2종을 분류, 동정하였으며 시료를 -70°C 에서 보존하였다.

2. 유용해양미생물 분리 및 보전

해양 세균 800주와 방선균 17주를 분리하여 -70°C 에서 보전 중이다. 해양 미생물 분리용 배지 및 분리된 콜로니 다양성을 조사하였으며 총세균수 대비 산호, 해면, 퇴적물, 해수 시료에서의 미생물 분리가능율을 비교한 결과, 해양생물에서 분리한 미생물의 경우에 해수에서보다 분리율이 훨씬 낮은 결과를 나타냈으며 해양생물체에 서식하는 미생물을 위한 새로운 분리 배지개발이 필요하였다.

3. Topoisomerase I 저해효능 방선균연구

세포독성 및 Topoisomerase I 저해 방선균 3균주 중 1차로 선별된 해면유래 방선균 8908의 topo I 저해활성분획의 분리정제를 완료하였으며 해면에서 분리된 방선균 8889, 8922를 대량배양하였다.

4. 탈유화제 생산 미생물 연구

극지해양에서 *Streptomyces* sp. AA8321 분리하였으며 탈유화능을 측정함

결과 포자의 소수성에 기인함을 유추하였다. 포자첨가후 1분 이내에 oil-in-water 유상액에서 탈유화가 일어났으며 이는 기존의 생물탈유화제 보다 우수하였다. *Streptomyces* sp. AA8321의 포자의 대량생산을 위하여 submerged spore 생성이 가능한 조건을 구축하였으나 탈유화능이 유지되지 않았다.

5. 다당류 생산 미생물 연구

제주해역에서 다당류 EPS-R 생산 미생물을 분리 및 동정한 결과 *Hahella chejuensis* gen. nov, sp. nov로 동정되었다. 이 균주가 생산하는 다당류인 EPS-R의 분자량은 2.2×10^6 Da이며 당 조성은 glucose, galactose가 주된 당이며 ribose 및 xylose도 소수 당으로 포함하고 있었다. EPS-R은 xanthan gum, gellan gum보다 유화안정능이 우수함을 보였다. 세포외 다당류 생산 신규 해양미생물의 다당류 생산을 위하여 최적 배양배지인 STN 배지 확립하였으며 다당류 생산을 위한 최적 배양조건 확립으로 5 l 발효조에서 생산수율 60%로 12 g/l 까지 생산이 가능하였다.

6. 유용효소 생산 미생물 연구

lipase 생산균주의 1차 탐색 결과 92주를 분리하였으며, chitinase 생산균주 탐색 및 선별 결과 분리균주 *Vibrio* sp.는 N-acetylchitotetraose를 합성하는 chitinase 생산하는 미생물로 밝혀졌다.

본 연구는 해양 유용 생물 자원을 활용하기 위하여 제주해역에 서식하는 저서 생물과 해양 생물 공생 미생물을 분리·보존하고 해양 미생물의 지속적 냉동 보존을 위한 조사를 행하였다. 또한 유용 해양 생물자원으로 topoisomerase I 저해물질, 탈유화제, 다당류 및 유용효소를 생산하는 미생물을 확보하였고, 해양 미생물에서 분리된 각 물질들의 특성과 이용성 조사와 더불어 대량생산 조

건도 조사하였다. 이는 국내 서식하는 유용해양생물자원의 탐색, 생리활성 검색, 유용물질의 규명 및 유용생물자원을 지속적으로 활용할 수 있도록 현지내·외 보존기술과 배양방법의 구축을 최종목표로 하는 본 연구사업의 목적을 달성하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

분리보존중인 800여 해양미생물 균주는 산업적 유용성 검색에 활용할 수 있다.

새로운 생물종이나 생체기능을 발견하기 위해서는 아직 국내에서 연구가 많이 수행되지 않았던 해양미생물을 포함한 해양생물의 생체 및 기능 현상에 대한 연구가 중점연구개발사업의 다음단계에서도 지속되어야 한다. 특히 극한환경 방선균을 대상으로 소수성(hydrophobicity)과 같은 세포기능조절의 분자생물학적 기전 및 산업적 이용연구나 유용효소 생산에 관련된 유전자 연구 등은 다음 단계에서도 지속적으로 연구수행될 계획이다. *Streptomyces* sp. AA8321 포자의 소수성에 대한 연구의 경우 *Streptomyces* sp. AA8321 포자의 세포구조 및 성분 연구를 통하여 hydrophobicity를 유발하는 원인을 규명하고, 또한 극지환경에 대한 적응기작의 일례로 cold shock과 소수성물질의 생산과의 상관관계 가능성 규명이 필요하다. 생물탈유화제로서 immobilization, membrane attachment 가능성 여부 및 유기용매의 회수공정, 기존 유수분리장치의 개선 또는 대체 방안에 이 용여부 등 산업적 활용가능성을 연구하고자 한다.

Summary

I. Title

Development of Preservation and Biotechnological Application
Technologies of Marine Organism

II. Objectives and Significance

Ultimate Object: This research have set final goal at search for useful marine organisms in Korea, investigation of physiological activity of useful biomaterials, development of *in situ* and *ex situ* conservation technique, and construction of culture method.

Biodiversity is essential to maintain the life and national resources. Many countries realized that the loss of biodiveristy and destruction of earth environment could threaten the future of human being. Therefore, under UN leadings, world adopted "Agenda 21" of the Rio agreements. One of the main themes of Agenda 21, Section II conservation and management of resources for development was "Protection of the oceans, all kinds of seas, including enclosed and semi-enclosed seas, and coastal areas and the protection, rational use and development of their living resources". It needs practical plans for sustainable use and conservation of marine environment and biological resources. The national policy of Korea, however, is not enough to

cover marine biodiversity. As a result, our marine biological resources have been severely decreased without any effective developmental policy.

Preservation of various marine organisms, isolation of useful genes from them, and conservation of biodiversity in natural habitat are closely related each other. Therefore, it is necessary to investigate the distribution of marine organism, to isolate and identify them, and to preserve culturable and useful organism in laboratory. Developed countries had recently started these researches, concentrative investment in conservation of useful marine biological resources and to development of application technique make us to catch up with those developed countries in short period. Before we lose our marine resources, we need to develop new materials and useful metabolites from marine biological resources.

To develop various and useful materials and metabolites from marine organisms, it is necessary to isolate and preserve useful genetic resources, to investigate the availability and function of those new materials and metabolites, and to construct mass culture system for the industrial application.

III. Contents and Scope

1. Investigation of distribution and productivity of marine biological resources
 - Marine animal: identification, classification, and investigation of biomass of sponges, corals and invertebrates
2. Isolation and preservation of useful marine microorganisms

- Construction of culture media for isolating marine microorganisms
- Development of preservation technique for marine microorganisms

3. Research on availability of marine microorganisms

- Investigation of actinomycete with topoisomerase I inhibitory activity
- Investigation of de-emulsification activity of *Streptomyces* sp. 8321
- Investigation of extracellular polysaccharides from marine microorganisms
- Investigation of useful enzyme production

IV. Results

1. Investigation of distribution and productivity of marine biological resources

We collected dominant corals three times from Seokwipo region of Cheju-Island, Mun-sum, Sup-sum and Beom-sum by SKUBA. We have identified and classified 31 coral species out of 40 samples from the first collection, 23 coral species out of 29 samples from the second collection, and 6 coral species and 2 bryozoa species from the third collection. All samples were preserved at -70°C .

2. Isolation and preservation of useful marine microorganisms

We isolated 800 strains of marine bacteria and 17 strains of actinomycetes, which have been conserved at -70°C . We have checked

various media to isolate and cultivate those marine microbes, and investigated the diversity of the isolated colonies. Isolation rate of the marine microbes from seawater was much higher than that from marine organisms such as sponges and coral. It is necessary to develop new media to isolate those microbes from marine organisms.

3. Investigation of marine actinomycete showing topoisomerase I inhibitory activity

We isolated three strains of actinomycetes which inhibited cell toxicity and topoisomerase I activity. Among them, mass culture of actinomycetes strains 8889 and 8922 isolated from sponges was performed for fractionation of topoisomerase I inhibitors.

4. Investigation of marine microorganisms showing de-emulsification activity

We isolated *Streptomyces* sp. AA8321 from Antarctica coastal region, which showed de-emulsification activity. Oil-in-water emulsion was de-emulsified within 1 min after addition of spore suspension, which was better than previous reported bio-de-emulsifier. We also constructed the culture conditions for mass culture and for submerged spore production of *Streptomyces* sp. AA8321 spores, but the de-emulsification activity was not sustained.

5. Investigation of marine microorganisms producing extracellular polysaccharide

We isolated a new marine microbe producing polysaccharide, named as ESP-R from Cheju-Island, and identified the species as *Hahella chejuensis* gen. nov, sp. nov. The molecular weight of ESP-R was 2.2×10^6 Da. Glucose and galactose were major components of the polysaccharide, and ribose and xylose were minor components. ESP-R showed better emulsifying stability than xanthan gum and gellan gum. We developed optimal media, STN to cultivate the new marine microbe and found optimal conditions to produce ESP-R. At this media and optimal conditions, we could get 12 g/l of ESP-R in 5 l fermenter with production rate of 60%.

6. Investigation of marine microorganisms producing useful enzymes

We screened 92 strains producing lipase. A chitinase-producing strain, *Vibrio* sp. was also isolated, chitinase of which was revealed involved in N-acetylchitotetraose synthesis.

In this research, we collected marine organisms and marine symbiotic microbes inhabited in Cheju-island, and kept them at -70°C for long term conservation. We also isolated useful marine microbes producing topoisomerase I inhibitor, de-emulsifier, polysaccharide or useful enzymes. We characterized those biomaterials, checked application possibilities, and found culture condition for the mass cultivation. This research achieved the object to search useful marine organisms in Korea, to investigate physiological activity of useful biomaterials, to develop *in situ* and *ex situ* conservation

technique, and to construct culture method.

V. Application of this research

The isolated 800 strains of marine microbes can be used to screen useful biomaterials and industrial applications. In Korea, screening for isolation of new species or new biomaterials from marine organisms is not so active till now. It is necessary to continue this research on marine organisms including marine microbes. Especially, it has to be continued on next step to investigate hydrophobicity, regulation of cellular metabolism, genes synthesizing useful enzymes, and other industrial applications of actinomycetes which inhabits extreme environmental conditions. The biological mechanisms of hydrophobicity have to be revealed through further studies on structure and component of *Streptomyces* sp. AA8321 spores. It has to be elucidated the relationship of cold shock and hydrophobic materials to understand adaptation of the organisms to extreme arctic environment, recovery of organic solvent, immobilization, membrane attachment, recovery of organic solvent, and improvement of oil-water separator for industrial application of biological de-emulsifier.

C O N T E N T S

Summary

Contents

List of figures

List of tables

Chapter 1. Introduction

Chapter 2. State of the art reports

Section 1. Politics and funding policies in developed countries

Section 2. Bioactive substances derived from marine organisms

Section 3. Marine organisms for screening target

Section 4. Mass production of bioactive substances

Section 5. Preservation of marine organisms

Section 6. Use of marine organisms in Korea

Chapter 3. Details of research

Section 1. Distribution and productivity of marine biological resources

1. Materials and methods

2. Scope of research

3. Results

Section 2. Isolation and preservation of useful marine microorganisms

1. Materials and methods

A. Media

B. Cryopreservation test

C. Isolation of associated bacteria and preservation

2. Scope of research

3. Results

A. Isolation of marine bacteria

(1) Comparison of total bacterial number and isolated bacterial

numbers

(2) Morphologically diverse colonies on isolating agar plates

(3) Selection of media for subculture

B. Recovery of marine bacteria after cryopreservation

C. Isolation and preservation of associated bacteria

Section 3. Marine actinomycete showing topoisomerase I inhibitory activity

1. Materials and methods

A. Isolation and cultivation of actinomycete

B. Cytotoxicity test

C. Identification of the selected strains

D. Purification of DNA topoisomerase I inhibitor

E. DNA topoisomerase I assay

2. Scope of research

3. Results

A. Selection of strains

B. Identification of the selected strains

C. Fractionation and purification

Section 4. De-emulsification by *Streptomyces* sp. AA8321

1. Materials and methods

A. Isolation and identification of de-emulsifying actinomycete

B. Preparation of spore solution

C. Detection of de-emulsifying activity

D. Detection of hydrophobicity of spore surfaces

2. Scope of research

3. Results

A. Isolation and identification of de-emulsifying actinomycete

B. Comparison of de-emulsification abilities toward emulsions of high viscosity hydrocarbons and those with low viscosity

C. Relationship between de-emulsifying activity and hydrophobicity

of spore surfaces

- D. De-emulsifying activity with various emulsifiers
- E. Comparison with other de-emulsifiers
- F. Culture conditions for the formation of submerged spores

Section 5. Exopolysaccharides production by marine microorganisms

1. Materials and methods

- A. Isolation of exopolysaccharide producing microorganisms
- B. Partial purification of exopolysaccharide
- C. Phylogenetical classification and identification exopolysaccharide producing bacteria
- D. Cultural conditions for the production of EPS-R
- E. Effects of aeration rates on the production of EPS-R.
- F. Flocculation and viscosity test
- G. Determination of molecular weight and monomeric components of EPS-R
- H. Solubility and stability test

2. Scope of research

3. Results

- A. Isolation and identification of exopolysaccharide producing microorganisms
- B. Optimal media for the production of EPS-R
- C. Effects of aeration rates on the production of EPS-R.
- D. Flocculation and viscosity of EPS-R
- E. Molecular weight and monomeric components of EPS-R
- F. Comparison of emulsion stability of EPS-R with other commercial polysaccharides

Section 6. Enzymes produced by marine microorganisms

1. Materials and methods

- A. Isolation of lipase-producing strains
- B. Isolation and identification of chitinase-producing strains

- C. Measurement of chitinase activity
- D. Production and purification of chitinase
- E. Characterization of chitinase
- 2. Scope of research
- 3. Results
 - A. Isolation of lipase-producing strains
 - B. Isolation and identification of chitinase-producing strains
 - C. Production and purification of chitinase
 - D. Characteristics of chitinase produced by strain 11027

Chapter 4. Achievement and contribution external

Section 1. Objective and scope of research

Section 2. Propulsive results

Section 3. Representative accomplishments

- 1. Demulsification of emulsions by isolated *Streptomyces* sp., AA8321
- 2. Isolation of new exopolysaccharide-producing bacterium and determination of optimal culture condition for the production of the exopolysaccharide
- 3. Basic research for the isolation and preservation of marine microorganisms
- 4. Others

Section 4. Contribution external

Chapter 5. Application of this research

Chapter 6. References

목 차

요약문

목 차

그림목차

표목차

제1장. 서론

제2장. 국내외 기술 개발 현황

- 제1절. 선진국의 해양생물공학분야의 동향
- 제2절. 해양생물로부터 개발된 생리활성물질
- 제3절. 탐색대상 해양생물
- 제4절. 생리활성물질 대량생산 기술
- 제5절. 연구대상 해양생물의 보전
- 제6절. 국내 해양생물자원의 활용 현황

제3장. 연구개발 수행 내용 및 결과

제1절. 생물자원의 분포 및 생산량 조사

- 1. 이론적 실험적 접근방법
- 2. 연구내용
- 3. 연구결과

제2절. 해양미생물 분리 및 보존

- 1. 이론적 실험적 접근방법
 - 가. 배지 조사
 - 나. 냉동 보존방법 조사
 - 다. 공생 미생물의 분리 보존
- 2. 연구내용
- 3. 연구결과
 - 가. 해양미생물 분리 기술
 - (1) 배지종류에 따른 미생물의 분리율

(2) 분리 배지에 따른 미생물의 형태학적 다양성 조사

(1) 계대용 배지 조사

나. 냉동보존방법의 조사

다. 공생 미생물의 분리 보존

제3절. Topoisomerase I 저해 방선균연구

1. 이론적 실험적 접근방법

가. 방선균의 분리 및 활성균주의 배양

나. 세포독성능 검사

다. 선별균주의 동정

라. DNA topoisomerase I 저해제의 분리

마. DNA topoisomerase I 활성측정

2. 연구내용

3. 연구결과

가. 균주선별

나. 균주동정

다. 분리 및 정제

제4절. *Streptomyces* sp. AA8321의 탈유화능 연구

1. 이론적 실험적 접근방법

가. 탈유화능 소유 방선균 분리 및 동정

나. 포자용액 제조

다. 유상액 제조 및 탈유화능 측정

라. 포자표면의 소수성 측정

2. 연구내용

3. 연구결과

가. 탈유화능 방선균 분리 및 동정

나. 유기상 종류에 따른 탈유화능

다. 포자표면의 소수성과 탈유화능

라. 유화제 종류 및 농도에 따른 탈유화능

마. 탈유화능의 비교

바. 생물탈유화제 대량생산을 위한 조건 조사(submerged culture)

제5절. 해양미생물유래 다당류 연구

1. 이론적 실험적 접근방법

가. 다당류 생성 미생물의 분리

나. 다당류의 분리

다. 다당류 생성 미생물의 분류계통학적 분류 및 동정

라. 다당류 생산조건

마. 다당류 생성에 대한 통기량의 영향

바. 다당류의 응집활성 및 겔보기 점도

사. 다당류의 분자량 및 성분분석

아. 다당류의 용해성 및 유화안정성

2. 연구내용

3. 연구결과

가. 다당류 생성 미생물의 분리 및 동정

나. 다당류 생산 최적배지

다. 다당류 생성에 대한 통기량의 영향

라. EPS-R의 응집활성 및 겔보기 점도

마. 다당류의 분자량 및 성분분석

바. 다당류 EPS-R의 용해성 및 유화안정성

제6절. 유용 효소 생산 연구

1. 이론적 실험적 접근방법

가. Lipase 생산균주 선별

나. Chitinase 생산균주의 분리 및 동정

다. Chitinase 활성 측정방법

라. Chitinase 생산 및 정제

마. Chitinase 특성

2. 연구내용

3. 연구결과

가. Lipase 생산 세균

나. Chitinase 생산균주의 분리 및 동정

라. Chitinase 생산 및 정제

마. Chitinase 특성

제4장. 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제1절. 연구별 연구목표 및 연구내용

제2절. 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도

제3절. 대표적 성공사례

1. 탈유화능이 우수한 미생물의 분리 및 탈유화 특성조사
2. 세포외 다당류 생산균주의 분리 배양 및 산업적 이용
3. 미생물의 분리 및 보전기술의 개발을 통한 현지의보전기술의 기반마련
4. 기타 계획하지 않은 연구성과

제4절. 관련분야의 기술발전에의 기여도

제5장. 연구개발결과의 활용계획

제6장. 참고문헌

List of figures

- Fig. 3-1-1. Map showing sampling areas.
- Fig. 3-1-2. Map showing Munsom.
- Fig. 3-1-3. Vertical distribution of corals in the sampling sites.
- Fig. 3-2-1. Distribution of bacteria in marine sources collected in June 1998.
- Fig. 3-2-2. Recovery of marine bacteria after preservation at -70°C .
- Fig. 3-3-1. Inhibition of topoisomerase I by fractions of *Streptomyces* sp. 8908.
- Fig. 3-4-1. Changes in spore concentration and demulsification ability toward kerogen-Triton X-100 (2:1) emulsion.
- Fig. 3-5-1. Neighbor-joining tree based on nearly complete 16S rDNA sequences showing relationships between strain 96CJ10356 and members of the gamma *Proteobacteria*.
- Fig. 3-5-2. The photography of exopolysaccharide producing *Hahella chejuensis*.
- Fig. 3-5-3. Effects of aeration rate on the production of EPS-R.
- Fig. 3-5-4. Comparison of dried cell weight(g/l), dried EPS-R weight(g/l) and production rate of EPS-R obtained from different aeration rates.
- Fig. 3-5-5. Time course of EPS-R production by strain 96CJ10356.
- Fig. 3-5-6. The apparent viscosity of the culture broth of strain 96CJ10356 by different aeration rates.
- Fig. 3-5-7. Estimation of molecular weight of the EPS-R by gel filtration with ephadex G-200 column (15 x 600 mm).
- Fig. 3-5-8. Thin layer chromatogram of hydrolysate of EPS-R.
- Fig. 3-5-9. High performance liquid chromatogram of the hydrolysate of EPS-R.
- Fig. 3-6-1. SDS-PAGE of the purified chitinase I from the strain 11027.
- Fig. 3-6-2. Effect of pH on the activity of chitinase I from the strain 11027.
- Fig. 3-6-3. Effect of temperature on the activity chitinase I from the strain 11027.

List of tables

- Table 2-1. Pharmaceutical and agricultural opportunities from marine products.
- Table 3-1-1. List of 97CJ samples.
- Table 3-1-2. List of 98CJ samples.
- Table 3-1-3. List of 9809CJ samples.
- Table 3-1-4. Species list of Porifera reported by previous work.
- Table 3-1-5. Species list of Cnidaria (Anthozoa) reported by previous work.
- Table 3-1-6 Corals and other material obtained in November 1997.
- Table 3-1-7 Corals and other material obtained in January 1997.
- Table 3-2-1. Components of media for isolating marine microorganisms
- Table 3-2-2. Distribution of bacteria in seawater and corals in January 1998.
- Table 3-2-3. Diversity of isolates based on colony morphology.
- Table 3-2-4. Duplication of isolates among the isolation media.
- Table 3-2-5. Bacterial strains used for preservation test.
- Table 3-3-1. Anticancer activities of associated actinomycetes strains isolated from sponges.
- Table 3-4-1. Demulsification activity($t_{1/2}$) and $t_{1/2}$ of these emulsions when mixed with spore solution of Ssurface hydrophobicity of spore solution with different culture age.
- Table 3-4-2. Composition of emulsions used to test biodemulsification and $t_{1/2}$ of these emulsions when mixed with spore solution of strain AA8321.
- Table 3-4-3. Comparison of de-emulsifiers.
- Table 3-4-4. Spore formation and de-emulsifying activity of *Streptomyces* sp. AA8321 by submerged culture.
- Table 3-5-1. Effects of carbon sources on the production of EPS-R by strain 96CJ10356.
- Table 3-5-2. Effects of C/N ratiocarbon sources on the production of EPS-R by strain 96CJ10356.

Table 3-5-3. Effects of salt concentration on the production of EPS-R by strain 96CJ10356.

Table 3-5-4. Composition of STN medium optimal for the production of EPS-R by strain 96CJ10356.

Table 3-5-5. Emulsion (O/W) formation test of EPS-R and some other commercial polysaccharides with corn oil.

Table 3-6-1. Components of culture medium for the isolation of chitinase producing microorganisms.

Table 3-6-2. Purification of chitinase I from the strain 11027.

Table 3-6-3. Effect of metal ions on the activity of chitinase I from the strain 11027.

제 1 장 서 론

본 연구사업은 국내 서식하는 유용해양생물자원의 탐색, 생리활성 검색, 유용물질의 규명 및 유용생물자원을 지속적으로 활용할 수 있도록 현지내·외 보존기술과 배양방법의 구축을 목표로 한다.

생물다양성(Biodiversity)은 생명의 원천일 뿐 아니라 국가간의 자원으로 국민의 삶의 질을 향상시키는 원동력이 된다. 세계는 생물 다양성의 손실과 지구환경의 위협을 느껴 1992년에 브라질의 리우정상회담을 개최하여 "의제 21(Agenda21)"을 채택하게 되었다. 이의 주요내용 및 실천계획중의 하나가 국가관할권내 해양생물자원의 지속적 이용 및 보존분야이지만 대한민국 관할권내 연근해 해양생물자원의 지속적 이용과 보존을 위한 현 국가정책은 매우 미진한 수준이며, 이러한 결과로 연안의 해양생물자원은 점차 고갈되고 있으며 다각적으로 이용할 수 있는 방안이 모색되어지지 않고 있다.

지구상에 존재하는 생물중 80% 이상이 해양에 서식하고 있으나 지금까지 생명공학의 연구동향은 주로 육상 생태계에 존재하는 생물을 대상으로 하여 왔다. 해양생물로부터는 1% 미만의 생물종만이 연구되었음에도 불구하고 육상 생물들의 것과는 구조적으로 다른 신물질들이 속속 발견되고 있다. 해양 생물의 생체 및 기능에 대한 연구가 세계 각지에서 활발하게 연구된 것은 그 역사가 길지 않다. 짧은 연구기간에도 불구하고 선진국의 집중적인 투자 및 연구개발결과 미생물을 비롯하여 해조류와 무척추동물에서 현재까지 해양생물에서 모두 9,000 여종의 신규 생체활성물질이 발견되었으며 또한 다양한 다당류나 고분자물질 등 신소재가 발견되고 산업화되므로 가히 `바다는 미래의 의약품, 신소재 원료의 보고` 라고 주장할 수 있게 되었다.

일본의 경우에는 여러 종류의 해양생물로부터 유용한 산업적 소재와 신규

생리활성물질을 분리획득하였으며 많은 신소재들을 개발하고 있는데 이는 다른 국가가 관심을 비교적 적게 갖는 분야에도 중점을 두고 꾸준히 연구해 온 결과라고 본다. 선진국에서는 해양생물유래 신물질개발에 대한 이미 산업화 단계에 진입하여 미국의 NIH 산하의 NCI (National Cancer Institute), 러시아의 PIBOC (Pacific Institute of Bioorganic Chemistry), 호주의 AIMS (Australian Institute of Marine Sciences) 등 국가 연구기관의 주도하에 신물질의 추출에서 신의약품, 농수산용품, 신소재의 개발에 이르는 전과정에 걸쳐 산학연 협동연구가 수행되고 있으며 특히 Roche, Wellcome, CIBA-Geigy 등의 제약회사들이 적극적으로 참여하고 있다. 항암제 개발분야의 경우 균체명계류에서 분리된 cyclic peptide 류인 didmenin B, 명계류에서 분리된 ecteinascidin, sea hare에서 분리된 dolastatin, 이끼벌레류에서 발견된 bryostatin 1, 및 해면에서 분리된 halichondrin B 등이 항암제로 개발되었다. 소염제로는 manoalide, 항생제로는 isatamycin, aplasmomycin 등이 개발되어 상용화할 수 있게 되었다(Dullea, 1994; Zilinskas et al., 1995).

우리나라는 광물자원을 비롯하여 모든 자원을 넉넉하게 갖고 있지는 못하기 때문에 최대한의 자원활용을 위해서 국내 연근해의 해양생물자원의 활용이 범국가적으로 적극적으로 모색되어야 한다. 최근에는 종다양성 문제로 각 국가마다 자국의 생물자원을 보호하려는 움직임도 강하여졌으므로 우리의 해양자원이 침식당하기전 다양한 기능성의 소재들을 우리의 해양자원으로부터 개발하여야 국가경쟁력 증강에 기여할 수 있을 것이다. 지구상 생물은 해양이 전체의 약 80%를 차지하고 있다. 요즈음 인근 국가에서 유엔해양법의 비준을 계기로 200해리 배타적 경제수역선포에서 해양의 영유권 문제가 야기되는 것을 보더라도 해양연구의 중요성은 국제적 관심사가 되었다. 더욱이 한국은 동해, 서해, 남해 모두 각기 다른 특이한 해양환경을 가진 해양국가일 뿐 아니라 육상부존 자원이 절대적으로 부족한 실정에서 해양 자원의 개발은 매우 중요한 과제이다. 삼면이 바

다에 면한 우리나라 근해에서도 다양한 해양생물이 서식하고 있음에도 불구하고 국내의 유용물질 특히 생리활성물질 개발연구는 육상식물 및 미생물에 국한되어 있어 해양자원에 대한 연구는 상대적으로 미약한 상태이다. 최근 국내의 관련 산,학계에서 점차로 이 분야의 연구가 활성화되어 가고 있으며 해양생물로부터 생리활성물질개발 연구에 대한 연구가 몇 년 전부터 시작되었으나, 아직 검색대상이 되고 있는 해양생물의 지속가능한 이용을 위한 보전에 대한 연구는 전무한 편이다. 해양생물의 경우 조류, 무척추동물, 미생물 등은 신물질 탐색 대상으로 각광을 받고 있으며 무척추동물의 경우 특히 해면동물은 다양한 생리활성물질의 제공자로 주목을 받고 있다. 이외에도 산호를 포함한 강장동물, 원색동물, 연체동물, 이끼벌레 등이 새로운 탐색대상생물로 주목을 받고 있다. 또한 해면을 비롯한 해양생물에서 발견된 여러가지 생리활성물질의 원래의 생산자가 공생미생물임이 밝혀짐에 따라 화학합성으로 생산이 곤란한 물질을 대량생산하기 위하여 해양생물 공생미생물이 주요 탐색대상으로 주목받고 있다. 유용물질의 주요 원천인 해양생물의 양식 및 공생미생물의 배양을 비롯하여 유전적 개량방법의 개발을 위해서도 국내외 해양생물의 분포, 동정 및 나아가 유전자원의 확보가 필요하다. 선진국에서도 이 분야의 연구경험은 일천하므로 우리나라에서도 집중적으로 유용해양생물의 보전 및 이용기술 분야에 투자하여 연구를 수행한다면 단기간 내에 선진국과 같은 수준에 도달하여 해양생물로부터 지속적으로 유용물질을 창출할 수 있을 것이다.

해양생물자원은 광물자원이나 수자원과 달리 스스로 회복하는 자율갱생성의 특성을 가지고 있으므로 관리여하에 따라 영속적인 국가재산으로 보존하기가 유리한 자원이다. 그러므로 관할 수역내 해양생물자원이 UN 해양법 협약에 따라 보존, 관리되도록 조치하여야 하며 해양생물자원의 잠재생산력을 추정하고 생물다양성 차원에서 멸종위기종, 희귀종 지정 및 보존대책 수립과 아울러 가입과정의 메카니즘을 규명하고 미기록 자원의 계속 탐색 등의 조치가 강구되어야 한다.

해양생물자원을 보전한다는 관점에서 실험실 내에서의 유용유전자의 확보, 자연 서식지에서의 보전기술은 생물다양성보전 및 그 이용과 직접 연계되어 있다. 유용물질이나 기능의 주요 원천인 해양생물의 양식 및 공생미생물의 배양을 비롯하여 유전적 개량방법의 개발을 위해서도 국내외 해양생물의 분포, 동정 및 나아가 유전자원의 확보가 필요하다. 선진국에서도 이 분야의 연구경험은 초기단계이므로 우리나라에서도 집중적으로 유용해양생물의 보전 및 이용기술 분야에 투자하여 연구를 수행한다면 단기간내에 선진국과 같은 수준에 도달할 수 있을 것이다. 우리의 해양자원이 침식당하기전 다양한 기능성의 소재들을 우리의 해양생물자원으로부터 개발하여야만 국가경쟁력 증강에 기여할 수 있을 것이다. 아울러 해양 및 해양생물자원보호에 필요한 지역국가간의 협력사업에 적극적으로 참여하고 유엔해양법협약 발효로 인한 새로운 해양질서의 형성에 적절히 대응하기 위해 정책에 있어 국제적 변화에 신속하고 효과적으로 대처하는 방안이 될 것이다. 해양생물로부터 다양한 기능성 물질들을 개발하기 위하여는 우선 유용유전자원의 확보 및 보전, 유용성평가에 따른 개발대상 생체물질이나 생체기능에 대한 연구, 산업적 이용이 가능하기 위한 대량생산기술에 대한 연구가 필요하다.

제 2 장 국내의 기술개발 현황

제 1 절 선진국의 해양생물공학분야의 동향

미국의 경우 60년대 초 해양개발 10개년 계획 등을 통하여 해양개발이 추진되어왔으며 1966년 정부의 National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) 산하에 National Sea Grant College Program을 시작하여 29개 주 또는 지역 program과 연계발전시켰다. 해양생물이용분야에서 세계적으로 명성이 있는 대표적인 연구소로는 UCSB(University of California, Santa Barbara)의 해양과학연구소 내의 Marine Biotechnology Center, Woods Hole 해양연구소, Maryland 대학의 Biotechnology Center, Oregon 주립대학의 Oregon Fishery 연구소 등으로 국가주도의 연구과제를 수행하고 있다. Scripps 해양연구소도 해양천연물에 대한 연구가 활발한 연구소로 해양미생물을 포함한 해양생물로부터 항진균제, 항암제, 항소염제 등의 생리활성물질의 탐색 및 새로운 구조의 신물질을 찾는 연구가 활발히 이루어지고 있다. NCI에서는 1988년부터 해양생물 및 해양미생물을 대거분리하여 생리활성물질 탐색작업을 시작하였다. Hawaii Biotechnology Group에서는 명게로부터 항암 및 항바이러스 효과를 지닌 디렘닌 B의 개발연구를 수행하였다. 산학연 및 민간벤처기업은 카리브해 연안 등 주변 해역뿐만 아니라 인도, 칠레, 태국 등의 개발도상국가와 공동연구를 통하여 전세계의 해양생물자원에 대한 탐색을 시도하여 왔다. 생리활성물질의 대량생산을 위하여 해면의 세포배양방법, 이끼벌레의 현지 대량배양방법 등에 대한 연구가 성공적으로 수행되었으나 아직 산업화하기는 일천한 상황이다 (Zilinskas et al., 1995).

일본은 해양생물공학에 일찌기 관심을 쏟은 국가로 해양생물공학 연구에 대

한 본격적인 투자는 1980년대 들어 시작하였다(김, 1992). 정부의 생물공학관계 총 예산 717억 엔 중 해양생물 분야에 투자가 명시된 것 만 약 14억 엔으로 전체 예산의 5%에 이른다. 주요 연구개발 내용은 해양 유용물질의 이용기술 개발에 있으며 연구개발 지원 시스템의 정립을 위한 연구와 지구환경보전을 위한 연구도 중요한 과제로 수행하고 있다. 통산성(MITI)에서는 “해양생물로부터 고기능 정밀화학제품의 연구개발(NEDO)”이라는 과제를 대형 과학기술 중 하나로 선정하여 88년부터 7년 간 150억엔을 투자하기로 하고 이에 관련하여 해양생물의 산업적 이용에 관한 연구센터(MOC)로 Shimizu와 Kamaishi에 총 공사비 60억엔을 들여 두개의 연구소를 1990년에 건립하여 타 연구진도 이 시설을 이용할 수 있도록 하였다. 과학기술청 산하 1971년에 설립된 JAMSTEC(일본 해양과학기술센터)에서는 유인 잠수정으로는 수심 2,000 m 또는 6,500 m까지 각각 잠수할 수 있는 SHINKAI 2000과 세계 최고의 SHINKAI 6500을 보유하고 있으며 심해미생물의 일반적인 특성, 내압기작, 특징적인 유전자 및 단백질을 중심으로 이해하고자 하는데 목적을 갖고 장기적인 안목으로 심해생물 환경의 기초적이고 선구적인 연구를 추진하고 있다. 특히 과학기술청과 통산성에서는 기초기술의 연구개발을 목표로 대단위투자와 오랜 기간이 필요하며 위험부담도 큰 사업으로 개척적인 면과 기술파급효과가 큰 기술을 대상으로 협동연구개발을 원칙으로 하고 있다. 연구개발의 주안점은 해양생물의 채취, 분리, 배양 및 보존의 기술과 해양생물의 증식개량 기술 등의 해양생물이용에 관한 기초기술, 해양생물의 이용에 대한 시스템의 정립과 해양생물공학을 지원하는 시스템의 준비 등 해양생물공학의 체계적 이용에 관한 연구, 유용물질의 선별 및 추출 정제기술 등 유용물질 생산에 관한 기초기술분야이다. 민간 연구개발 조직으로 중 대표적인 Bioindustry Development Center(BIDEC)는 화학, 의약, 식품, 기계, 전기장치, 건축, 에너지 등 관계분야 300 여개 회사와 15,000 여 명의 대학내 연구원으로 구성되어 있으며 인적자원 개발, 조사계획, 세미나와 심포지움 개최, 전시회, 소식지 및 학술지의 발간 등이 주된 활동 내역이다. 생물공학 기술을 최대한 이용하

여 해양자원을 활발하게 연구 개발함으로써 21세기를 향하여 세계 인류에 공헌한다는 명분하에 1988년 24개의 민간회사가 주축이 되어 해양생물공학 연구소 (Marine Biotechnology Institute Co., Ltd, MBI)를 설립하였다. MBI는 생물공학을 이용한 해양자원의 연구개발을 주 임무로 하며 1988년 9개년 계획으로 "Fine Chemicals from Marine Organisms" 프로그램을 시작하였다. MBI는 일본의 태평양 연안지역 냉수대에 위치하는 Kamaishi와 온수대에 위치하는 Shimizu 지역에 설치된 MITI산하의 두 개의 MOC 시설을 이용하여 기반기술분야, 유용물질분야, 지구환경 및 오염분야에 대한 연구를 해양생물공학회에 속해 있는 과학자들의 자문을 받아 하고 있다 (Zilinskas et al., 1995).

제 2 절 해양생물로부터 개발된 생리활성물질

짧은 연구기간에도 불구하고 선진국의 집중적인 투자 및 연구개발결과 최근 까지 해양생물에서 모두 9,000 여종의 신규 생체활성물질이 발견되었는데 이중 60 여 물질이 특허를 획득하였고 상당수가 의약품으로 개발중이다. 1990년도 부터는 육상생물보다 해양생물로부터 발견되는 생체활성물질 숫자가 우위를 차지하여 가히 `바다는 미래의 의약품원료의 보고` 라고 주장할 수 있게 되었다. 세균을 비롯하여 해조류나 해양동물에서 많은 종류의 생리활성물질이 얻어지고 있으며 최근에는 현대의 흑사병이라하는 AIDS치료제의 개발가능성도 보이고 있다. 해양생물의 대사물질은 항암, 항바이러스등의 생리활성물질의 탐색대상으로 집중적인 관심을 받고 있을 뿐만 아니라 소염작용이 우수한 물질도 개발되고 있다 (Dullea, 1994; Pomponi, 1999).

항암활성을 가진 해양성 biopolymer들로 sulfated polysaccharides, sphyrnastatins, strongylostatin 1, 2, lytechinastatin, palystatin이 있다 (Schmitz

et al., 1993). Lemnolol은 soft coral *Lemnalia tenuis* 유래이며 보고된 최초의 해양성 sesquiterpenoid이며 murine peritoneal exudate cells(PEC) 존재하에서 macrophage를 활성화시켜 tumor cells에 대한 선택적인 독성을 가진다. Stypodione은 Caribbean brown seaweed *Stypodium zonale* 유래의 red crystalline diterpenoid ortho-quinone으로 해양환경의 foraging을 막기위한 화학적 방어기작 연구에 의해 발견되었다. Ichthyotoxic하며 sea urchin eggs 분열의 강력한 저해제이다. Clavulones, Punaglandines, Chlorovulones은 모두 octacoral 유래의 marine prostaglandine이다. Claviridine-a는 일본 soft coral *Clavularia viridis* 유래이며 매우 강한 세포독성을 가지며, eicosanoids(punaglandins)은 Hawaiian octacoral *Telesto riisei* 유래이다. Bryostatins의 경우 Pettit 그룹은 토양절족동물에서 antineoplastic compounds를 발견한 후 1968년 해양생물로부터 항종양물질탐색을 위해 지리학적으로 체계적인 탐색을 시작했다. 특히 이끼벌레류(Bryozoa, Ectoprocta, Polyzoa)의 alcohol extract에서 유망한 항종양성물질을 탐색하였다. Bryozoan의 추출물의 경우 유도체는 지역적 및 생물유래적 특성을 가진다. Bryostatin 1 만 NCI에 의해 preclinical test를 받고 있다. Dolastatins의 경우 이미 2,000년 전 인도양의 sea hare(연체동물의 일종)의 *Dolabella*속의 독성에 대해서 보고되었으며 Pettit그룹에 의해 1976년 *Polabella auriculavia*에서 분리한 cyclic peptide계열의 polastatin에서 항종양 효과가 발견되었다. Didemnin은 원색동물 *Trididemnum sp.* 에서 발견되었는데 항바이러스성 특성 뿐만 아니라 많은 생화학적 작용의 활성 modulator이다. 이는 다양한 human neoplastic cell type, 즉 ovarian, breast, renal carcinoma, mesothelioma, sarcoma에 대해서 활성을 보이며 1984년 phase 1 clinical trials에 들어간 첫 해양천연물이다. 해면동물 *Luffariella variabilis*에서 발견된 manoalide나 강장동물에서 발견된 pseudopterosins은 이미 물질특허를 획득하였다. 신의약품의 개발과 더불어 해양생물의 추출물은 생리학, 병리학, 면역학 등 생체내에서 일어나는 여러기작을 규명하는 분야에도 이용되고 있다. 주로

강력한 독성을 가진 물질들이 이 목적으로 이용되고 있는데 이는 이러한 독소들이 생체내의 필수적인 효소나 신경세포에 매우 선택적으로 결합하거나 이온통로를 봉쇄 또는 변경하기 때문이다. 신경독인 tetrodotoxin과 saxitoxin은 이온통로를 봉쇄하는 특성때문에 Na^+ 와 K^+ 통로의 연구에 이용된다. 플랑크톤의 대사물질인 brevetoxin과 강장동물의 palytoxin은 Na^+ 의 통로를 독특한 방식으로 변화시키므로 신경세포의 연구에 이용되고 있다. Manoalide는 독성물질은 아니지만 화농의 기작과 Ca^{++} 통로에 관한 연구에 사용되고 있다.

일본 미생물화학연구소의 Okami 박사는 수년전부터 많은 해양미생물을 분리하여 신생리활성물질을 확인했다. 그는 Sagami만에서 *Streptomyces griseus* 종을 분리하여 미생물로부터 boron을 중심원소로 갖고 있는 ionophore인 aplasmomycin을 발견했다. 또한 새로운 해양방선균종인 *S. tenjimariensis*을 분리하였고 이 균주로부터 새로운 aminoglycoside 항생제인 istamycin을 발견했다.

미국 Scripps연구소의 Fenical은 *Alteromonas* sp.의 대사산물인 isatin(2,3-indolinedione)을 발견하였는데 이 물질은 진균에 의한 갑각류 embryo의 감염을 저지한다고 밝혀졌다. Meseguer와 Rodoriguez-Valera는 *Halobacterium mediterranei* ATCC 33500으로부터 bacteriocin을 생산정제하여 많은 실험을 거쳐 이 물질의 특성을 규명하였다. 이 연구는 extreme halophilic bacteria로부터 유용한 의약품물질을 얻을 수 있는 가능성을 마련해 줬다. 해양세균인 *Flarobacterium uliginosum*에서 marinactan이라는 다당류가 분리되었는데 이 물질은 항암효과뿐만 아니라 면역체계를 강화시킨다고 밝혀졌다. Imada 그룹은 *Alteromonas* sp.에서 단백질효소 저해제인 marinostatin과 monastatin을 발견하였는데 monastatin은 glycoprotein의 일종으로 어병을 유발하는 *Aeromonas hydrophila*와 *Vibrio anguillarum*의 protease에 대한 저해작용이 우수하다고 밝혀졌다.

Table 2-1. Pharmaceutical and agricultural opportunities from marine natural products

CLASS	PRODUCT	LAUNCH IN U.S.	FUNCTION
ANTITUMOR	DIDEMIN B	2000	BREAST, OVARY, ETAL.
	ARA-C	1999	LEUKEMIA
	HALICHONDRIN-B	2000	MELANOMA, LEUKEMIA
	DOLSTATIN 10-15	2002	LUNG, OVARY
	BRYOSTATIN 1	2002	INHIBITS PKC TUMOR PROMOTION
	CURICIN A	2001	PSORIASIS, COLON, BREAST
	ALTEMICIDIN	2004	LEUKEMIA
	ECTEINISCIDIN	2004	MELANOMA, LEUKEMIA
ANTIMICROBIAL	SQUALAMINE	2000	GRAM POSITIVE ANTIBACTERIAL
	ISTAMYCINS A&G	2001	ANTIBACTERIAL AND ANTIMALARIAL
	APLASMOMYCINS	2002	ANTIBACTERIAL AND ANTIMALARIAL
	GAMBIERIC ACID	2003	ANTIFUNGAL
	SPONGIADIOL	2002	ANTIVIRAL
	DYSININ/DYSIN	2000	ANTHELMINTIC
ANTI-INFLAMMATORY	MANOALIDE	2000	BROAD ANTI-INFLAMMATORY PSORIASIS, ANTI-FUNGAL
	PSEUDOPTEROSIN	2001	BROAD ANTI-INFLAMMATORY
OTHER	ANTICHOLINESTERASE COMPOUNDS		INSECTICIDES
	MACROALGAL ORGANOHALIDE		INSECTICIDE
	CYTKININS		GROWTH STIMULANT/HERBICIDE

(Dullea, 1994)

제 3 절 탐색대상 해양생물

외국의 경우 연구대상 지역은 연구진이 위치한 지역에서 가까운 해안이 주로 선정되었다. 60년대 말에서 70년대 후반에 이르는 기간 동안 가장 집중적으로 연구된 지역으로는 미국의 남부 California와 Hawaii Islands, Australia의 동부 해안, 남부 Italy, Ryukyu Islands를 포함한 일본의 연안 등이고 Israel의 Red Sea 연안, Caribbean Sea의 제 군도, Spain의 Canary Islands 근해에 서식하는 해양 생물도 자주 연구되었다. 새로이 Fiji, Vanuatu, Philippine 등 남부와 서부 태평양의 섬들이 주요 연구 대상지역으로 추가 되었으며, 인도양의 Aldabra Island, India의 서부 해안등도 연구되고 있다.

신물질에 대한 연구진의 확장과 전문인간의 유기적인 연구체계의 발달과 함께 연구대상 생물의 선정 및 채집방법도 초기의 무작위 채집에서 벗어나 생태학적인 측면에서 중요하거나 특이한 생활 형태를 취하는 생물들을 주로 채집하게 되었고 시험적으로 소량 채집한 생물에서 분리한 유기물질의 생리활성도를 측정하여 그 결과 우수한 생물만을 다량으로 채집하여 집중적으로 연구하여 뛰어난 결과를 얻는 예도 많아 졌다. 지난 20 여년간 가장 많이 연구가 되었던 해면은 종류가 매우 다양하고 추출되는 천연물의 구조 또한 거의 모든 형태의 2차 대사 물질을 망라하고 있으므로 상당기간은 연구가 계속될 것이며 원색동물 이끼벌레도 주목을 받고 있는 생물이다. 연체동물은 다당류를 생산하여 신소재나 수산물 증식을 위한 유도물질로 개발될 가능성이 큰 연구대상 생물이다. 또한 많은 해양생물에서 발견된 천연물이 공생미생물에 의해 생산됨이 밝혀짐에 따라 이들 해양생물과 공생미생물과의 상호작용에 대한 연구와 공생미생물을 대상으로 한 생리활성물질 탐색이 활기를 띠게 되었다.

해양동물의 대사물질에 대한 연구는 해양 천연물 연구의 초기부터 큰 비중을 차지하여 현재까지 밝혀진 해양천연물의 약 60%가 해양동물에서 추출되었으

며 강력한 생리활성물질의 추출 가능성이 해양식물에 비하여 상대적으로 높다고 인정되어 해양동물이 해양천연물 연구에서 차지하는 비중은 날이 갈수록 높아지고 있다. 해양천연물 연구는 해양동물중 크게 6 종류에 집중되어 있다. 그들은 sponges, coelentrates, bryozoans, mollusks, tunicates 및 echinoderms이다. 이들 중 sponges와 coelentrates가 신물질의 중요한 원천으로 오랜 기간 주목을 받고 있다 (Ireland, 1993; Pomponi, 1988).

해면동물(sponges, Phylum Porifera)은 다세포 동물 중 가장 원시적인 생물로 열대에서 한대까지 전세계의 거의 모든 해역에 분포하고 있으며 종류 및 서식 환경의 다양함과 채집의 용이함으로 인하여 해양천연물 연구의 초기부터 많은 주목을 끌어 왔다. 그 결과 현재까지 해면에서 추출된 천연물은 전체 해양천연물의 거의 30%를 차지하고 있으며 이는 단일 생물문으로서는 최대이다. 여러 종류의 해면에서 매우 다양한 탄소 골격의 형태로 추출되었으나 특히 Dictyoceratida와 Dendroceratida의 두 목에서 집중적으로 추출되었다. 그러나 *Axinella*, *Acanthella* 및 *Hymeniacydon*등 다른 목에 속하는 해면으로부터 isocyanide, isothiocyanates, formides 등 nitrogen part가 terpene에 결합된 특이한 형태의 물질들이 다수 발견되었다. Verongida 목으로 부터는 다양한 형태의 alkaloids 즉 nitrogen을 포함한 물질들이 추출되었다. 강장동물(coelentrates, phylum Cnidaria)은 해양천연물연구에 있어서 해면동물에 버금가는 중요성을 가지고 있으며 현재까지 구조가 결정된 해양 천연물중 약 25%가 이들로 부터 추출되었다. 강장동물문에 속하는 세 개의 강중 Hydrozoa(hydroids)와 Scyphozoa(jelly fishes)에서는 2차 대사물질이 아주 드물게 발견되고 Anthozoa 강에 속하는 동물 특히 Alcyonacea(soft corals)와 Gorgonacea(gorgonians, sea whips and sea fans)목의 동물로 부터 천연물이 집중적으로(85% 이상) 추출되었고 Zoanthida(zoanthid)목을 제외한 나머지 목으로 부터는 단지 몇 개의 속으로 부터 흥미 있는 천연물이 소수 추출되었을 뿐이다. 이끼벌레류(bryozoans, phylum Bryozoa)는 현재 지구상에 4,000이상의 종이 생존하고 있어 현생동물의

문중 주된 종류중의 하나이다. 이 종류의 동물이 단단한 기질의 표면에 얇게 늘어 붙어 군체를 형성하고 있기 때문에 화학적인 성분을 조사할 만큼 충분한 시료의 채취에 어려움이 많아 이들의 천연물에 대한 연구는 별로 활발하지 못하였다. 최근에는 강력한 생리활성도를 가진 macrocyclic lactone인 bryostatins 등 중요한 물질들이 계속 발견되어 이 종류의 생물에 대한 천연물 화학적 관심이 증가하고 있다. 연체동물(mollusks, phylum Mollusca)은 현존하는 해양생물 중 그 종류가 가장 다양하여 10만개 이상의 종을 갖고 있으며 Gastropoda 강 그 중 특히 Opisthobranchia와 Plumonata 아강이 천연물 연구의 대상이 되어왔다. 이들은 먹이의 대사물질을 체내에 축적하여 자신의 화학적 방어에 이용하고 있다. Opisthobranch *Navanax inermis*로 부터 alarm pheromones인 navenones이 추출되었는데 이들은 해양 동물에서 발견된 유일한 pheromones이다. 또한 sea hare *Dolabella auricularia*에서는 지금까지 발견된 항암제 중 가장 강력한 dolastatins가 추출되었다. Ivory shell *Babylonia japonica*에서 추출된 surugatoxins은 bacteria의 대사물질로 추측되고 있다. 원색동물(tunicates, phylum Chordata, class Ascidiacea)은 독립 혹은 군체를 이루어 단단한 물체에 부착하여 사는 생물이다. 원색 동물에서 추출된 대사 물질은 해양천연물 중 양적인 면에서 그리 중요한 위치를 차지하지는 않으나 항암 혹은 기타의 강력한 생리 활성도를 가진 물질들이 계속적으로 발견되어 최근에는 천연물 화학 연구에 있어서 해양동물 중 가장 주목을 받는 생물중의 하나이다. 강력한 생리활성도로 인하여 의약품으로서의 개발가능성이 크거나 이미 개발중인 물질들로는 *Trididemnum*속에서 추출된 didemmins, *Eudistoma olivaceum*에서 추출된 eudistomins 등이 대표적인 예이다. 극피동물(echinoderms, phylum Echinodermata)의 대사물질에 대한 연구는 불가사리(Stellerioidea강, Asteroidea 아강)와 해삼류(Holothuroidea 아강)에 집중되어 왔다. 발견된 대부분의 생리활성물질들은 강한 수용성 saponins인데 최근 강력한 항암제이고 화학 생태학적 측면에서 중요성이 큰 isoquinoline계 천연물인 imbricatine이 불가사리 *Dermasterias imbricata*에서 발견되어 주목을 받고

있으며 생태학적 자료에 기초를 둔 해양천연물화학 연구가 성공한 대표적인 예로 인정받고 있다 (Munro et al., 1999).

해양식물에서 천연물 연구는 초기부터 carotenoids가 주목을 받아왔다. 해양식물의 carotenoids 중 잘 알려진 예를 들면 남조류의 특징적인 물질인 myxoxanthophyll, dinoflagellates에만 존재하는 peridinin과 dinoxanthin, diatom에서 주로 추출되는 diatoxanthin 및 yellow algae에서 다량으로 존재하는 fucoxanthin 등이다. Carotenoids등 모든 해양식물에 존재하는 색소성분을 제외한 고유한 2차 대사물질은 terpenoids, terpene part를 포함하는 mixed biosynthetic products, polyketides가 주로 발견되는 물질들이다. 남조류 (blue-green algae, Cyanophyta)는 세균의 일종이나 해양에서 대형의 algal mats를 형성하고 있으므로 편의상 식물로 분류를 하는데 강력한 생리활성도를 갖고 있는 toxin을 생산한다. 종류별로는 아미노산을 기원으로 하는 alkaloids나, terpenoids 혹은 지방산이 아미노산과 결합된 mixed biosynthetic products가 다수를 차지하고 있다. 특히 잘 알려진 예로서는 lyngbyatoxin, aplysa- and oscillatoxins, malyngamides, pukeleimides 등을 들 수 있다. 식물 플랑크톤 (phytoplankton) 중 dinoflagellates는 적조(red-tide) 현상을 일으켜 막대한 생태학적, 환경학적 피해를 전세계에 걸쳐 일으켰고 또한 이들이 생성하는 물질이 대부분 강력한 PSP(paralytic shellfish poisoning)이나 DSP(diarrhetic shellfish poisoning)을 일으켜 많은 수의 인명 피해를 가져 왔다. 해양식물 플랑크톤에서 추출된 천연물은 현재까지 그 수가 많지 않으나 saxitoxins 등의 amino acid에 근원을 둔 물질, brevetoxins 등의 polycyclic ethers, okadaic acids 등의 polyketals, amphidinolides 등의 macrolides, GB4 등의 phosphorous를 갖고 있는 물질 등이 발견되었다. 녹조류(green algae, Chlorophyta)에 대한 연구는 20 여개의 목 중 열대해역에 널리 분포하는 석회조(calcareous algae = caulerpales)에만 연구가 집중되었는데 그 이유는 이들 석회조가 열대해역의 생태계에 매우 중

요한 위치를 차지하고 있고 이들과 초식성 동물(herbivore)들과의 화학생태학적 연관관계가 일찌기부터 생태학자들 간에 큰 주목을 끌어 왔기 때문이다. 석회조에서 추출된 천연물들은 linear 혹은 cyclic 탄소 골격을 갖고 있는 sesqui- 혹은 diterpenoids가 거의 대부분을 차지하고 있으며 석회조의 화학적 방어(chemical defense)에 이용됨이 알려져 있다. Caulerpales 목에 속하지 않는 녹조류에 대한 연구는 매우 희소하나 cyclocymopols(*Cymopolia barbata*) 및 avrainvilleols (*Avrainvillea* spp.) 등의 구조를 살펴 보면 다른 목의 녹조류로 부터는 caulerpales 목과 전혀 다른 천연물이 추출될 가능성을 보여 준다. 갈조류(brown algae, Phaeophyta)는 열대에서 한대까지 전세계의 대부분의 해역에 걸쳐 널리 분포하고 있다. 갈조류에 대한 연구는 Fucales와 Dictyotales 목에 집중되어 있다. 갈조류의 천연물은 *Sargassm* 등 Fucales 목의 갈조류에서 매우 다양으로 추출되는 phloroglucinol 계열의 phlorotannins, Fucales 목에 속하는 갈조류에서 많이 발견되는 linear 혹은 매우 간단한 monocyclic sesquiterpenoids, Dictyotales 목에 속하는 해초에서 주로 발견되는 polycyclic terpenoids, *Zonaria*, *Styopodium*, *Cystoseira* 등에서 특히 많이 발견된 hydro-quinones 혹은 quinones과 diterpene parts가 결합된 mixed biosynthetic products을 대표로 꼽을 수 있다. 홍조류(red algae, Rhodophyta)는 해양식물중 연구가 가장 집중된 종류로 Bonnemaisoniaceae, Plocamiaceae, Rhodomelaceae의 3개 과에 속하는 해초들이 특히 연구가 많이 되었으며 특히 Rhodomelaceae에 속하는 *Laurencia* 속으로 부터 수 백개의 신물질이 발견되어 전 해양생물 중 단일 속으로는 압도적인 천연물의 보고로 알려져 있다. Terpenoids중 *Plocamium*에서는 monoterpenoids, 그리고 *Sphaerococcus*에서는 diterpenoids가 주로 추출된다. *Laurencia*에서는 sesqui-, di-, 및 triterpenoids가 모두 추출되고 있다. 지방산에서 기원한 물질들은 *Bonnemaisonia*, *Laurencia* 및 *Liagora* 등에서 주로 추출된다. *Asparagopsis*에서는 다양한 휘발성의 소형 halogen화 물질들이 다양으로 추출되었다. 이상의 탄소 골격의 구조적인 특성보다 더욱 중요한 홍조류의 천연물

의 특징은 거의 대부분의 이들 천연물이 halogen을 갖고 있다는 점이다. 또한 halogen을 보유하고 있지 않은 물질의 경우에도 대부분 유사 구조의 halogen화 화합물과 함께 추출되고 있으며 그들의 생합성적 상관관계 및 효소체계도 밝혀져 있다. Sea hare는 Opisthobranchia 아강의 Anaspidae 혹은 Aplysiomorpha 목에 속하는 초식성 연체 동물이다. Sea hare에서 추출된 천연물은 대부분이 해양식물의 대사물질이며 나머지는 식물의 대사물질이 sea hare의 소화선에서 변형된 유도체들로 sea hare에서 분리된 천연물로부터 이들이 해양 식물 중 홍조류 *Laurencia*와 갈조류 *Dictyota*를 선택적으로 포식함이 밝혀졌다. 또한 홍조류 *Plocamium*과 남조류 *Lyngbya*의 대사물질도 sea hare에서 추출된 예가 있다.

해양미생물은 생리활성물질의 새로운 제공자로 관심을 받고 있다. 해양미생물은 화학적으로 다양하며 생물학적으로 중요한 이차 대사산물을 생산하는데, 그 중 몇몇은 제약개발의 선도물질이나 생물과학의 기초연구를 위한 도구로 사용될 수 있다고 기대된다 (Bernan et al., 1997; Fenical & Jensen, 1994; Imamura et al., 1997; Newman et al., 1989; Sponga et al., 1999). 또한 해면, 강장동물, 연체동물 등의 해양무척추동물에서 분리된 생리활성물질 중 일부는 실제로는 세균, 진균류, blue green algae, 조류, 편모조류 등의 공생미생물에 의해 생산된다고 보고되었다. 대형 해양생물에 함유된 생리활성물질을 산업적으로 개발하는데 있어서의 최대의 장애가 신물질의 대량확보의 어려움에 있으므로 이 문제점을 해결하는 수단으로서 대형생물을 다량채집하는 대신 해당생물과 공생관계를 맺고있는 미생물을 배양하여 생리활성물질을 대량 추출하려는데 주목적을 갖고 있다. 이 접근방법은 육상생물과는 달리 해양생물 특히 저서군체 동물은 다수가 미생물과 밀접한 공생관계를 유지하며 그 결과 이들로부터 분리된 천연물도 생합성적 생산주체가 미생물로 추측되는 예가 매우 많다는 점에 이론적 근거를 두고 있다 (Kobayashi & Ishibashi, 1993). 해면은 많은 경우에 다량의 착생 생물 (epiphytes)이나 microalgae, bacteria 등을 체내에 다량으로 보유하고 있으므로

(*Aplysina cavernicola*의 경우는 조직 부피의 38%가 bacteria) 추출된 물질이 해면의 고유한 대사물질인지 공생하는 미생물 혹은 미세조류의 대사 물질인가의 구분이 어렵다. 최근에는 해면에서 추출한 몇 종류의 이차대사산물이 해면에서 분리한 미생물의 배양액에서도 분리되었다. 버뮤다해에서 채집된 해면 *Tedania ignis*로부터 밝은 오렌지 빛깔을 띤 그람 양성균인 *Micrococcus*가 Cardellina 그룹에 의해 분리되었는데 이 세균의 배양액에서 분리된 세 종류의 diketopiperazines가 이전에 *Tedania ignis*의 추출액에서 분리된 것과 같은 물질임이 밝혀졌다. Elyakov 그룹은 동사모아해에서 채집한 *Dysidea* sp.로부터 분리된 *Vibrio* sp.가 brominated diphenyl ethers를 생합성한다고 밝혔는데, 이는 이전에 *Dysidea* sp.의 추출물에서 발견된 물질이었다. Kobayashi 그룹은 일본 해면 *Halichondria okadai*에서 *Alteromonas*를 분리하였는데 이 세균의 균체에서 macrocyclic lactam계열의 물질 alteramide A를 분리하였다. 이 물질은 세포독성을 나타내는 물질로 육상 *Streptomyces* sp.가 생성하는 항생제 ikarugamycin이나 카리브해에서 채취된 해면 *Discodermia dissoluta*에서 분리한 항진균효과와 세포독성능을 나타낸 물질 discodermide과 그 생합성경로가 유전적으로 연관되었다고 볼 수 있다. 아울러 Alteramide A가 해면에서 분리된 세균에서 분리되었다는 사실로 미루어 discodermide도 그 유래가 미생물에 기인한다고 추정된다. 해면 이외의 공생미생물로부터 분리된 생리활성물질들을 보면 열대지역에 서식하는 산호 *Pacifigorgia* 표면에서 분리한 방선균 *Streptomyces* sp.(strain PG-19)가 생산하는 octalactin A, octalactin B를 들 수 있다. Fenical 그룹에서 발견한 이 물질들은 육상세균에서는 분리된 적이 없는 특이한 saturated eight-membered lactone function 그룹을 갖고 있는데 lactone ring은 solid 상태에서 cis lactone의 boat-chair 구조를 갖고 있다. Octalactin A는 강한 항암효과를 나타낸다. Fenical 그룹은 또한 새우 *Palaemon macrodactylus*의 embryo로부터 세균 *Alteromonas* sp.를 분리배양하여 2,3-indolinedione 즉 isatin 이란 물질을 분리하였다. 이 물질은 *P. macrodactylus*에 질병을 일으키는 lower

fungus인 *Lagenidium callinectes*에 대하여 탁월한 항진균 효과를 갖고 있으나 숙주인 *P. macrodactylus*에 대해서는 무해함이 밝혀졌다. 이외에도 독소로는 연체동물 *Babylonia japonica*의 소화선에서 분리된 Coryneform 세균으로부터 surugatoxins가 분리되었으며, Palytoxin은 Zoanthid *Palythoa toxica*에서 분리된 가장 치명적인 비단백질성 marine toxin으로 *P. tuberculosa*, *P. mammilosa*와 같은 다른 종에서도 발견되는데 이 독소는 공생세균에 의해 생산되기 때문에 계절적으로 그 농도가 변화된다고 보고되었다. 또한 유명한 DSP toxin인 okadaic acid도 해면 *Halichondria okadai* 에서 처음 추출되었으나 실제로는 dinoflagellate *Prorocentrum lima*의 대사 물질임이 규명되었다. 이들 이외에도 다른 해양 생물에서 추출된 천연물중 본래 dinoflagellates에 의하여 생성된 것이 먹이 사슬에 의하여 고등 해양 생물의 체내에 축적된 것으로 유추되는 예가 적지 않다. Scallop *Patinopecten yessoensis*에서 추출된 pectenotoxins은 그 구조가 okadaic acids와 유사하고 중독 증세도 동일하여(PSP), dinoflagellate의 대사 물질로 추측된다. 또한 오랜 연구의 대상이었던 ciguatoxin도 moray eel *Gymnothorax javanicus*에서 추출되어 구조가 최근 규명되었는데 dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus*의 대사물질이라는 간접적인 증거가 밝혀졌다 (이, 1995).

제 4 절 생리활성물질 대량생산 기술

생리활성물질의 발견에 따른 대량 생산 기술은 분리 정제 기술과 함께 그 경제성 및 실용성에 가장 커다란 영향을 미친다. 대개의 생리활성물질은 그 함유량이 미미하여 수톤의 시료로부터 불과 수 mg 수준의 최종 정제 물질이 얻어지는 경우가 허다하다. 이를 해결할 수 있는 방법으로 Fermentation 등으로 biomass를 증대시킬 수 있는 미생물에서 생리활성 물질을 얻고자하는 시도가 최근에 이루어지고 있고 거대생물에서도 그 생존조건 등에 대한 생리학적 연구로

인공배양이 가능하게 하려는 연구도 병행되고 있다. 궁극적으로는 생리활성 물질의 생산에 관여하는 효소들을 유전자 조작에 의해 세균 등에서 발현시키고자 하는 연구가 진행중이나 일반적으로 생리활성 물질의 복잡한 구조를 감안할 때 이의 합성에는 매우 여러 종류의 효소체계가 개입되어 있으므로 전체적인 system을 모두 cloning한다는 것은 매우 어려운 일로 가까운 시일 내에 기대하기는 어려운 일이다. 이에 따라 기본적인 탄소 골격을 밝힌 후 이를 화학적으로 합성한 후 이를 전구체로 사용하여 적당한 유도체로 전환하여 생리활성도를 증대시키려는 시도도 이루어지고 있다. 이를 위하여 효소나 생체 자체를 이용한 소위 Bioconversion이 새로운 공업화 방법으로 대두되고 있다. 거대생물의 경우 복잡한 먹이사슬과 공생 및 기생관계가 얽혀 있어 그 생리활성 물질의 실질적인 생산 주체에 대한 연구가 선결되어야 한다. 실제로 공생상태의 미생물이나 먹이로 섭취된 대상에서 생산된 물질이 거대생물에 의해 생산된 것으로 오인된 경우도 나타나고 있어 먹이사슬 및 공생관계 등에 대한 생태학적 연구가 뒷받침되어야 할 것이다. 선진국에서는 앞에서 보고한 바와 같이 기존에 해양생물에서 발견된 물질도 그 공생미생물을 분리배양하여 추출해 냄으로써 유용물질의 대량생산이 용이하게 하도록 시도하고 있다. 이러한 해양생물과 공생미생물과의 상호관계에 대한 연구의 축적은 생태학적으로 접근방법을 이용하여 물질생산 가능한 공생미생물을 타겟으로 한 생리활성물질탐색기술의 개발을 촉진시키고 있다. 미국의 Moore와 Shimizu 및 Nakanishi, 일본의 Yasumoto그룹 등에서는 cyanobacteria와 dinoflagellates의 대량 배양에 성공하여 그 동안 현장 채집 혹은 소량 배양에 의존하던 이들 생물의 천연물을 대량으로 추출하게 되었다.

가까운 장래에 가시화 될 가능성이 더욱 큰 천연물의 대량 생산방식은 양식이다. 응용하고자하는 천연물을 생산하는 해양생물을 대량으로 양식하여 천연물을 추출하는 것은 비용이 비교적 저렴하고 단기간에 양식방법의 개발이 가능할 것으로 생각되는 해양 생물이 적지 않아 많은 관심을 모으고 있다. 대량양식의

대상생물로는 갈조류에 속하는 해초들과, 원색동물, 극피동물, 연체동물 등의 해양동물들이다. 최근 미국 Hawaii대의 Bruening 그룹에서 항암제를 다수 생산하는 원색동물의 양식을 시도한 것은 천연물의 추출을 목표로 한 해양 생물의 양식이 가까운 시일내에 시도될 것임을 의미한다. 현재로서는 시료를 채취한 현장의 보존이 매우 유력한 대안으로 제시되고 있으나 급격한 산업화와 인간 활동에 의한 오염의 가속으로 크게 위협받고 있다. 또한 많은 해양생물에서 발견된 천연물이 공생미생물에 의해 생산됨이 밝혀짐에 따라 이들 해양생물과 공생미생물과의 상호작용에 대한 연구와 공생미생물을 대상으로 한 생리활성물질 탐색이 활기를 띠게 될 것이다(Munro et al., 1999; Pomponi, 1999).

제 5 절 연구대상 해양생물의 보전

해양생물 보전기관으로 Culture collection의 관련 정보 및 보유균주 등에 관한 정보를 관리하는 기관인 WDC(World Data Center)에 공식적으로 등록된 culture collection이 1994년 말까지 484개소이다 (배, 1995). 국제공인 기탁기관(IDA, International Depositary Authority)은 19개소이나 선진 각국에서는 IDA 못지 않은 우수한 균주기탁기관을 보유하고 있다. 해양생물을 수집하고 관련된 연구를 수행한다고 보고된 은행은 이중 22개소이다. 이들 절반정도가 대학의 관련학과 내에 위치하고 있으며 조류를 대상으로하는 5개의 은행을 제외하고는 해양미생물을 포함하는 다양한 미생물을 수집하고 있다. 해양미생물을 수집하는 기관은 대부분 해양에 접하고 있는 국가에 발달되었으며 대학의 관련학과나 해양관련 연구소내에 위치하고 있다. 대부분의 유전자은행은 보존, 분양, 분류에 관한 연구 외에 분류 및 동정업무를 서비스하는데 공식적으로 해양세균을 동정하는 기관은 미국 메릴랜드대학내의 WCUM(Working Collection, University of Maryland)이다. 영국의 균주기탁기관은 여러 관청의 각 연구소에 부속되어 설

립되어 있으며 전문분야별로 구분되어 네트워크를 이룬다. PPCCE(Portsmouth Polytechnic Culture Collection of Marine Fungi)는 곰팡이를 동정하며, CCAP(Culture Collection of Algae and Protozoa)에서는 조류를 수집하고 있다. NCMB(National Collection of Marine Bacteria)에서는 해양미생물을 전문적으로 취급하고 있다. 일본은 1944년 IFO(Institute for Fermentation)의 발족을 시작으로 각 학교, 기업별로 보존기관이 설립되어 약 20여개의 보존기관이 있다. 일본 미생물주 보존연맹(JFCC, Japan Federation for Culture Collection)이 결성되어 정보교류를 하고 있으며 데이터의 온라인화를 시도하였다. 이러한 기관에서는 이들 미세조류나 미생물을 대상으로 유용물질을 탐색하고 있다.

제 6 절 국내 해양생물자원의 활용 현황

국내의 경우 저서생물 및 해양미생물의 분리 및 동정, 유효물질의 분리, 해양미생물의 다량 배양 등의 분야에 있어서 국내의 기술수준은 선진국에 비해 많이 뒤떨어져 있다. 천해 해양생물의 채집에는 기술적으로 큰 어려움이 없으나 심해 해양미생물의 채집에는 잠수정이나 기타 시료 채집기가 필요하다. 해양미생물의 분리 및 동정분야에 있어서는 분류체계가 육상 미생물만큼 정립되어 있지 않고 이 분야에 관여하는 전문가가 많지 않아 채집된 해양미생물의 정확한 분류 및 동정에 조금은 어려움이 있을 것으로 보인다. 국내에서는 한국해양연구소에서 그동안 분리한 해양방선균과 다른 생태계에서 분리한 방선균을 수류분류학적방법으로 분류한 연구를 수행하여 해양미생물의 분류 및 동정에 관한 연구가 축적되어 있으며, 해면 등의 해양저서동물과 조류에 공생하는 미생물을 지속적으로 분리 보존하고 그의 특성 및 신물질 개발을 위해 활용하고 있다. 해양 미생물의 다량 배양에는 육상 미생물과 같은 시설만 있으면 충분하나 해양 미생물의 최적 배양조건, 생리활성물질 생산을 위한 최적조건 등의 know-how가 축적

되어있지 않아 시간을 두고 시행착오에 의해 기술을 축적해야 할 것이다. 해면의 경우 국내 연안 지역을 대상으로 산발적으로 채집, 동정을 하고 있으며 신물질 개발을 위하여 유효성분을 추출하여 여러 기관에서 생리활성 검색을 수행하고 있으나 국내 종다양성 보전을 위하여 보다 체계적인 수집 및 분류학적 연구가 필요하다. 현재 해양생물은행이 설립되어 있지 않아 각 연구기관에서 분리한 균주들을 산발적으로 보존하고 있어 타 기관에서의 활용을 위한 시스템의 구축이 되어있지 않다.

해양식물에서는 의약용으로는 구충제로서 해인초 *Digenia simplex*로 부터 α -L-Kanic Acid가 단리되어 구충제로 사용된다. Kelp Industry의 생산품으로 대표적으로 alginates를 들 수 있는데 이는 갈조류의 세포벽에 존재하며 D-mannuroic Acid의 약 80개 정도의 1,4- β 결합형 다당체로 Ca, Mg염으로 존재하며 세포벽 20%를 함유한다. 상품화된 것은 propyleneglycol alginate(PGA)로 개발되었고 식료품, 의약품의 안정제, 제리, 유화제, 피혁, 섬유원료가공 등에 사용되며 라미나리아(*Laminaria cloustoui*), 미역(*Undaria pinnatifida*)을 기원으로 한다. Carageenans은 홍조식물을 기원으로 하며 D-galactose 1,4- α , 1,3- β 의 sulfur ester다당체이다. Agar는 우뚝가사리(*Gelidium amansii*)를 기원 식물로 하며 agarose-(glalactose polymer)와 agarpectin (glaetos와 uronic acid unit가 연결된 salphonated polysaccharide)로 세포배양, 완화제로서 사용된다.

해양동물은 민간요법으로 해삼, 굴의 패각, 대구의 부레가 사용되었고, 대구의 간으로부터 간유가, 고래와 다랑어로부터 인슐린을 얻고 있고 그외 다양한 민간요법이 알려져 있다. 복어에서는 Tetrodotoxin이 있어 해양동물의 독으로는 으뜸이다. 이와 같이 해양동물에서는 식량 및 민간 요법 등으로 인류복지를 위해 기여하고 있다. 그러나 생리활성 물질을 찾아 의약품 등으로 응용하는 연구는 외국에 비해 적은 편이다. 식량외의 미이용 동물 자원을 보면 해면동물 같이 활성물질이 풍부하다고 알려져 있는 것이 125종, 자포동물이 162종, 극여동물이

107종이다.

해양미생물 분야의 연구는 전 세계적으로 많지 않은 형편이고 국내에는 적조현상을 일으키는 플랑크톤류, 각 지역의 해양미생물과 식물 플랑크톤의 상호관계, 각 해안지역의 플랑크톤의 계절변화 등이 연구되고 있다. 방선균은 육상의 토양에 풍부하게 존재하고 상업적 부가가치가 높은 생리활성 물질의 공급과 새로운 생리활성 물질의 공급원으로 검토되고 있다. 그러나 육상미생물 중에 방선균에 대한 연구는 실로 많으나 해양미생물에 대한 연구는 많지 않다. 새로운 항생물질에 대한 육상방선균의 연구는 무수히 많고 최근에는 해양 미생물의 방선균으로부터 항생물질도 조금씩 등장하고 있다. 해양미생물이 육상과 종은 같으나 생육환경이 다르므로 이들로부터 나온 대사산물은 구조가 특이하고 활성도 다양하여 보건건강에 지대한 희망을 걸게 한다. 그러나 국내에서는 여러가지 열악한 환경에 의해서 연구가 미진한 형편이어서 이들에 대한 연구가 매우 절실하다. 해양연구소에서는 그동안 연구수행 결과물로 해양동물, 심해퇴적층, 해수 등에서 분리된 미생물 약 8,000주를 생리활성성물질탐색에 활용하였으며 현재보존 중이다.

국내 해양생물공학의 근본적인 문제점은 연구비의 지원도 부족할 뿐만 아니라 유용해양생물 자체에 대한 기초연구마저 거의 이루어지지 않았으며 그 결과 해양생물 분포나 생리현상 등에 대한 자료도 거의 없다는 점이다. 한국해양연구소, 부경대학교, 수산진흥원과 대학 등에서 산발적으로 해양생물에 대한 연구 및 이용연구를 위해 생물자원을 수집하고 해양미생물의 경우 일부 보존되고 있으나, 해양식물과 동물의 표본만 보존되어 있는 상태이며 공인된 해양생물의 기탁기관은 없다. 이와같이 공식적인 culture collection이 전무하기 때문에 각 연구기관에서 분리한 균주들을 산발적으로 보존하고 있어 타기관에서의 활용을 위한 시스템의 구축이 되어있지 않다. 해양저서생물 및 미생물의 분리 및 동정, 유효물질의 분리, 해양미생물의 대량배양 등의 분야에 있어서 국내의 기술수준은 선진국

에 비해 많이 뒤떨어져 있다. 천해 해양 생물의 채집에는 기술적으로 큰 어려움이 없으나 심해 해양미생물의 채집에는 잠수정이나 기타 시료 채집기가 필요한데 한국해양연구소에서 이러한 장비들을 보유하고 있으므로 별 문제는 없을 것이다. 해양미생물의 분리 및 동정분야에 있어서는 분류체계가 육상미생물만큼 정립되어 있지 않고 이 분야에 전문가가 많지 않아 채집된 해양미생물의 정확한 분류 및 동정 기술에 어려움이 있다. 가장 많이 탐색대상이 되고 있는 해면의 경우 국내 연안 지역을 대상으로 산발적으로 채집, 동정을 하고 있으며 신물질 개발을 위하여 천연물을 분리 정제 구조분석하고 있으나 국내 종의 보전과 지속적인 이용을 위해서는 선정된 후보생물에 대한 체계적인 생태학적 연구와 생활사 연구 등 생리학적 연구가 필요하다.

본 연구팀은 한국근해, 남극, 태평양 심해저, 팔라우, 오호츠크해 등지에서 분리한 방선균, 공생미생물, 세균 및 국내 거문도와 제주도에 서식하는 저서생물을 대상으로 생리활성물질 탐색을 하여왔다. 해양세균으로는 해수, 해양퇴적층, 어류와 저서동물의 내장, 남극시료 등에서 분리한 세균 3,000주와 해양방선균, 극지방선균을 포함한 방선균 5,000주를 확보하여 보존하였다. 해면은 1994년 10월 거문도해역에서 10개의 시료를 채취하였는데 *Jaspis* sp., *Poecillastra* sp., *Poecillastra cribrum*, *Spirastella panis*, *Cliona celata*, *Petrosia* sp., *Suberitis* sp., *Spirastella* sp. 등이 동정되었다. *Poecillastra* sp.와 *Jaspis* sp.의 공생체 해면에서 세포독성이 강한 PTX2를 분리정제하였다. 1995년 7월 거문도해역 대삼부도 및 동도에서 채취한 해면은 *Cliona celata*, *Spirastella* sp., *Jaspis* sp., *Poecillastra* sp., *Suberitis* sp., *Callyspongia confoederata*, *Poecillastra cribrum*, *Petrosia* sp., *Fibulia* sp., *Myxilla setoensis*, *Jaspis wondoensis*, *Raspailia hirsuta*, *Phakellia elegans*, *Caminus awahimensis*, *Stelletta* sp., *Spirastella abata* 등으로 분류되었다. 1995년 10월 제주도해역의 형제섬, 홀에미섬, 문섬 등에서는 *Discordermia calyx*, *Petrosia* sp., *Penares incrus*, *Haliclona* sp.,

Callyspongia sp., *Spirastella abata*, *Spirastella insignis*, *Tedania oligostyla* (*Hymeniacion* sp.), *Tethya amamensis* (*T. auratum*), *Poecillastra wondoensis*, *Suberitis* sp., *Erylus bahamensis*, *Siliquariaspongia japonica*, *Sigmatadacia* sp., *Asteropus* sp., *Discodermia* sp. (*Theonella* sp.), *Jodia* sp., *Cliona celata*, *Suberites* sp., *Theonella swinhoei*, *Amphilectus fucorum*, *Lissodendoryx isodictyalis*, *Tethya* sp. 등이 확인되었으며 세포독성에 대한 활성을 조사하였다. 해면공생방선균 중 항암물질 생산 균주를 20종 이상 확보하였으며 그 중 2 균주는 topoisomerase I 저해효과가 있는 고도 불포화지방산 유도체를 생산함으로 밝혀졌다. 또한 자료검색을 위한 data base 구축을 위해 해양미생물의 대사물질, 항바이러스성 해양유래 생리활성물질 및 해양생물유래 생리활성물질 중 세포독성능이 강하며 항암효과가 있는 대표적인 물질 200 여가지에 대하여 생물의 종류, 물질의 구조상의 특징 및 생리활성도에 따라 분류하였고 해면유래 및 공생미생물이 생산하는 항암물질에 대한 자료가 정리되어 있다.

해양생물유래의 새로운 유용물질에 관한 연구는 최첨단 연구시설 및 긴밀한 협동연구가 요구되기 때문에 아직까지도 미국, 일본 및 유럽 등의 선진국에서 독점하고 있는 상태이다. 해양을 대상으로 국내에서의 유용물질 탐색의 역사는 육상을 대상으로 시작한 타 연구기관의 역사에 비해 일천하므로 관련 기반 기술 및 연구시설, 정보 등 아직 구축단계로 보기 때문에 국가의 장기적인 지원 및 관심이 요구된다. 또한 해양유래생리활성 물질의 대량생산 단계에 들어가면 자원 확보의 문제점에 봉착하게 되는데 최근에는 양식(aquaculture), 배양(fermentation), 유전공학적인 방법 및 화학합성 등의 방법으로 이의 해결을 활발히 시도하고 있다. 활성성분의 임상시험을 위해서는 몇백킬로그램의 해양동물체가 요구된다. 해면을 비롯한 해양저서동물의 경우 생리활성성분의 주체가 주로 공생미생물인 경우가 대부분이므로 공생미생물을 분리 배양하여 대량생산하는 방법이 확립되면 일반 항생제 생산의 경우와 마찬가지로 대량배양에 의한 공급

이 가능할 것이다. 공생미생물에 의해 생산되지 않는 해양생물 고유의 경우 대량 생산을 위해 세포배양이나 현지내의 대량생산 방법의 확립이 절실히 요구된다. 현장내에서 전문가가 보전할 수 있는 시스템을 구축하는 방법이 효과가 있으나 이를 위해서는 그 생활사 연구와 생리, 생태 연구등 기반연구가 선행되어야 한다.

지금까지 대부분 천연물의 연구를 위하여 대상 해양생물이 대량채집되어 왔으나 채집시 대상생물 서식지의 군락분석, 현존량 분석 등 기본적인 생태연구가 동시에 수행되어오지 못하였다. 또한 해양생물에 대한 보존 체계가 구축되어 있지 않아서 신물질을 검색할 수 있는 data base system이 미비하며 타 연구진들의 활용이 어려웠다. 심해미생물, 극한환경미생물(남극기지포함) 수집시 현 연구비의 역부족으로 조사선을 이용하여 현장에서 체계적으로 균주를 분리하기가 어려웠다. 따라서 새로운 해양미생물 균주의 확보를 위한 기반기술분야의 연구지원이 절실히 요구된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 생물자원의 분포 및 생산량 조사

3차례에 걸쳐서 제주도 서귀포 해역의 문섬, 숲섬, 범섬 부근에서 SKUBA를 통해 산호, 퇴적층, 해수를 중심으로 시료를 채집하고 해양동물 10여종의 분포조사, 생산량 조사, 분류, 동정 및 하였다.

1. 이론적, 실험적 접근방법

1997. 11. 13 - 16, 1998. 1. 20 - 23 및 1998년 9. 9 - 11 세차례에 걸쳐 제주도 문섬 주변에서 산호의 분포 및 생산량 조사를 시행하였다. 조사시에는 SCUBA 다이빙 장비와 방형구, 수중카메라를 이용하였다. 표본과 연구재료의 채취시에는 산호 종류 및 수심별로 미생물의 기착 특이성이 있는가를 보기 위해 표본을 채취하는 때 수심마다 수심계로 수심을 확인하였다. 채취되는 표본 또는 시료(산호, 물, 퇴적물 등)를 번호가 기록된 비닐봉투에 분리하여 채취하였다. 수중에서 채취된 표본과 재료는 현장에서 번호를 확인하고 카메라로 촬영하였다.

미생물 분리용 시료를 매 산호 표본과 연구재료 마다 소량을 취하여 냉동시키고, 나머지는 10% 중성포르말린 해수용액으로 고정하였다. 고정된 표본을 실험실로 옮겨 온 후 80% 알콜용액으로 보존한 후 분류군을 동정하였다.

조사지에 서식하는 산호류와 차기 조사시에 대상 생물군이 될 해면동물의 기록된 종을 박 등 (1994)과 송과 원(1992)의 자료를 통해 목록을 작성하였다.

2. 연구내용

- 해양동물 분포 및 생산량조사

- 분류, 동정
- 시료 보존

3. 연구결과

1997. 11. 13 - 16, 1998. 1. 20 - 23 및 1998년 9. 9 - 11 세차례에 걸쳐 제주도 문섬 주변에서 산호의 분포 및 생산량조사를 시행하였다(Fig. 3-1-1, 3-1-2).

SKUBA를 통하여 1차의 조사에서는 문섬의 새끼섬(A) 주변을 대상으로 수심 2 - 3 m, 5 m, 10 m, 15 m, 20 m, 25 m, 31 m 에서 수지맨드라미류, 곤봉맨드라미류, 해송, 돌산호 등 30종의 표본을 채집하였다(Table 3-1-1). 2차의 조사에서는 서귀포와 문섬사이의 꽃동네(새섬, B)와 새끼섬(C), 문섬의 한개창(D)을 중심으로 표본을 채취하였다. 꽃동네 25 m, 20 m 깊이에서 채집하였으며, 문섬 새끼섬 뒤편에서는 10 m, 12 m, 16 m, 문섬 한개창에서는 18 m, 25 m, 40 m, 48 m 깊이에서 곤봉맨드라미, 해송류, 해양류, 돌산호류, 수지맨드라미류 등 총 100 여개의 표본을 채취하였다(Table 3-1-2). 3차의 조사에서는 제주도 숲섬 해역에서 시료를 채취하여 산호 3종, 해면 6종과 이끼벌레 2종을 분리하였다(Table 3-1-3). 모든 산호 표본과 연구재료마다 소량을 취하여 20% 글리세롤 용액에 넣어 -70℃에서 냉동 보존하고, 10% 중성포르말린 해수용액으로 고정한 시료는 표본을 실험실로 옮겨 온 후 80% 알콜용액으로 동정에 사용하였으며 표본실에 보존하였다.

지금까지 문섬일대에서 기록된 해면동물과 산호류는 각각 18종과 43종으로 모두 61종이다 (Table 3-1-4, 3-1-5). 세 번의 조사에서 채취된 산호류는 총 4개 분류군이었으며 대부분이 해계두류(Order Alcyonacea)와 해양류(Order Gorfonacea)였으며, 그밖에 두 분류군의 돌산호류(Order Scleractinia)와 두 종류

의 각산호류(Order Antipatharia)가 포함되었다(Table 3-1-6, 3-1-7). .

산호류의 수직분포는 크게 세 층으로 나누어지는데 수심 5 m 까지 거품돌산호(*Alveopora japonica*), 15 m 까지는 수지맨드라미(*Dendronephtya* spp.) 그리고 수심 10 m부터 35 m까지는 분홍바다맨드라미(*Alcyonium gracillimum*)가 우점하였다. 그러나 수직벽인 곳은 거품돌산호가 나타나지 않았으며 수지맨드라미류나 분홍바다맨드라미가 보다 얕은 수심에서 나타났다. 그리고 분홍바다맨드라미가 서식하는 층에서는 해양류, 돌산호류, 각산호류가 함께 군락을 형성하였다. 거품돌산호는 햇빛을 직접 받을 수 있는 평상의 암반에서 주로 서식하므로 빛의 투과가 상대적으로 약한 곳에서는 서식하지 않았다. 수지맨드라미류가 서식하는 층은 주로 해조류의 서식층와도 중복되며, 분홍바다맨드라미가 분포하기 시작하는 층은 해조류의 서식밀도가 급격히 줄어들어 이를 세 산호분포층은 서로 중복되지만 역전되는 분포양상은 발견하지 않았다. 모든 산호 표본들은 암반을 기질로 하여 고착하여 서식하고 있었지만, 수심 35 m가 넘는 한개창의 회초리산호는 자갈 및 돌맹이로 구성된 바닥기질의 퇴적물 속(약 10 cm 깊이)에 서식하였다 (Fig. 3-1-3).

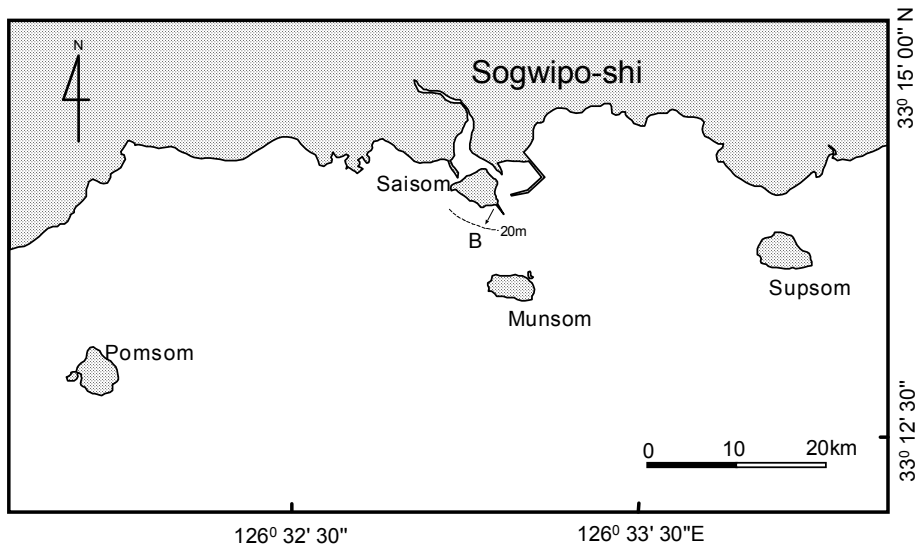


Fig. 3-1-1. Map showing sampling areas.
(The arrow indicates sampling track and direction.)

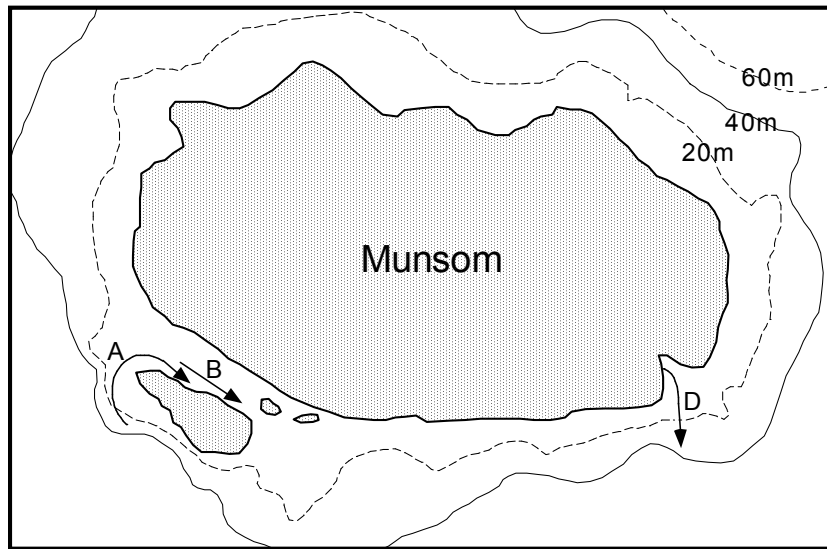


Fig. 3-1-2. Map showing Munsom.
(The arrows indicate sampling track and direction.)

Table 3-1-1. List of 97CJ samples.

시료번호	새끼섬 깊이 (m)	시료종류
97CJ-1	31	해수
97CJ-2	31	해면 + 기타 (hydrozon, bryozon)
97CJ-3	31	산호 (수지곤봉맨드라미류 + 해면)
97CJ-4	31	곤봉맨드라미류
97CJ-5	25	해면 + 고등류
97CJ-6	25	산호 + 거미불가사리
97CJ-7	25	
97CJ-8	20	산호
97CJ-9	20	산호
97CJ-10	20	게류 + 해면
97CJ-11	20	산호 (갈색)
97CJ-12	20	산호 + 거미불가사리
97CJ-13	15	13 아래 여러가지
97CJ-14	15	해면 + 게류 + 고등류
97CJ-15	15	13 아래 여러가지
97CJ-16	15	14 부착 얇은 해면
97CJ-20	10	
97CJ-21	10	bottom sample
97CJ-22	5	
97CJ-23	5	bottom sample
97CJ-24	5	bottom sample (해조류 포함)
97CJ-25	5	산호
97CJ-26	5	산호 (검은색)
97CJ-27	5	bottom sample
97CJ-28	5	히드라
97CJ-29	5	산호불이 히드라
97CJ-30	5	빨간색
97CJ-31	5	돌산호 (물속뿌리 산호)
97CJ-32	5	퇴적물; water + sediment (흙, 조개 껍질)
97CJ-33	5	
97CJ-34	5	빨간색 + 실고기
97CJ-35	5	
97CJ-36	10	
97CJ-37	10	분홍색
97CJ-38	10	산호 (소나무)
97CJ-39	10	산호
97CJ-40	10	
97CJ-41	2 - 3	
97CJ-42	2 - 3	

Table 3-1-2. List of 98CJ samples.

시료번호	시료채집장소	시료종류
98CJ-3	꽃동네 18 - 20 m	해양류
98CJ-9	꽃동네 18 - 20 m	해양류
98CJ-11	문섬 12 m	해송
98CJ-12	문섬 12 m	해양류
98CJ-14	문섬 16 m	돌산호
98CJ-24	문섬 10 m	해수
98CJ-25	꽃동네 12 m	해수
98CJ-26	문섬 16 m	해수
98CJ-31	꽃동네 25 m	해양류
98CJ-32	꽃동네 25 m	해양류
98CJ-36	문섬 해변	말미잘
98CJ-41	문섬 10 m	수지맨드라미
98CJ-42	문섬 10 m	해송
98CJ-43	문섬 10 m	해양류
98CJ-44	문섬 10 m	곤봉 바위 맨드라미
98CJ-45	문섬 10 m	돌산호 (주황)
98CJ-46	문섬 10 m	해양류
98CJ-47	문섬 10 m	해양류
98CJ-48	문섬 10 m	수지맨드라미
98CJ-49	문섬 10 m	돌산호 (갈색)
98CJ-50	문섬 10 m	수지맨드라미
98CJ-51	한개창 30 m	해양류
98CJ-68	한개창 30 m	해수
98CJ-70	한개창 20 m	해수
98CJ-104	한개창 18 m	수지맨드라미
98CJ-105	한개창 15 m	수지맨드라미
98CJ-107	한개창 15 m	수지맨드라미
98CJ-108	한개창 15 m	해양류

Table 3-1-3. List of 9809CJ samples.

시료번호	시료채집장소	시료종류
9809CJ-1	숲섬 23 m	퇴적물
9809CJ-2	숲섬 18 m	퇴적물
9809CJ-3	숲섬	Bryozoa
9809CJ-5	숲섬 23 m	굴껍데기 부착 Bryozoa
9809CJ-6	숲섬 20 m	호박해면
9809CJ-7	숲섬 23 m	굴껍데기 부착 해면
9809CJ-8	숲섬 23 m	돌산호
9809CJ-9	숲섬 18 m	녹조류
9809CJ-10	숲섬 18 m	굴껍데기
9809CJ-11	숲섬 26 m	해수
9809CJ-12	숲섬 26 m	퇴적물
9809CJ-13	숲섬 26 m	호박해면
9809CJ-14	숲섬 26 m	연산호
9809CJ-15	숲섬 5 m	굴껍데기
9809CJ-16	숲섬 8 m	산호
9809CJ-17	숲섬 18 m	노란색 해면
9809CJ-18	숲섬 26 m	예쁜이 보라 해면
9809CJ-19	숲섬 10 m	해수

Table 3-1-4. Species list of Porifera reported by previous works.

<p>Phylum Porifera 해면동물門 Class Hexactinellida(Hyalospongiae) 육방성해면綱 Subclass Hexasterophora 육방성해면亞綱 Order Hexasterophora 육방해면目 Family Aphrocallistidae 바다예쁜이해면科 <i>Aphrocallistes jejuensis</i> Shim & Kim, 1988 바다예쁜이해면 Class Demospongia 보통해면綱 Subclass Ceractinomorpha 일축해면亞綱 Order Keratosa 각질해면目 Family Spongiidae 각질해면科 <i>Spongia</i> sp. Order Halichondrina 해변해면目 Family Halichondriidae 해변해면科 <i>Halichondria okadai</i> (Kadota, 1922) 검정해변해면 <i>Halichondria oshoro</i> (Tanita, 1961) 황록해변해면 Family Hymeniacionidae 주황해변해면科 <i>Hymeniacidon sinapium</i> De Laubenfels, 1930 주황해변해면 Order Poecilosclerida 다골해면目 Family Myxillidae 끈적해면科 <i>Myxilla setoensis</i> Tanita, 1961 넓적끈적해면 <i>Myxilla incrustans</i> (Johnston, 1942) 껍질끈적해면 Family Ophlitaspongiidae 마늘뼈해면科 <i>Ophlitaspongia noto</i> Tanita, 1963 마늘뼈해면 Order Haplosclerida 단골해면目 Family Haliclonidae 보라해면科 <i>Haliclona perlucida</i> (Griessinger, 1971) 진주보라해면 <i>Haliclona permollis</i> (Bowerbank, 1866) 보라해면 Family Adociidae 아도시해면科 <i>Strongylophora corticata</i> Wilson, 1925 불뚱해면 Family Callyspongiidae 예쁜이해면科 <i>Callyspongia elongata</i> (Ridley & Dendy, 1886) 길쭉예쁜이해면 <i>Callyspongia confoederata</i> (Ridley, 1884) 보라예쁜이해면 Subclass Tetractinomorpha 사축해면亞綱 Order Choristida 코리스티다해면目 Family Geodiidae <i>Erylus nobilis</i> Thiele, 1900 유명꼭지해면 Family Pachastrellidae <i>Pachastrella</i> sp. Order Lithistida 리티스티다해면目 Family Kaliapsidae 돌해면科 <i>Discodermia calyx</i> Döderlein, 1883 컵가죽해면 <i>Discodermia kiensis</i> Hoshino, 1977 키가죽해면 Order Hardromerida 경해면目 Family Spirastrellidae 나선별해면科 <i>Spirastrella panis</i> Thiele, 1898 나선별해면</p>

(박 등, 1994; 송과 원, 1992)

Table 3-1-5. Species list of Cnidaria (Anthozoa) reported by previous works.

<p>Phylum Cnidaria 자포동물門 Class Anthozoa 산호충綱 Subclass Octocorallia 팔방산호亞綱 Order Stolonifera 근생目 Family Clavulariidae <i>Clavularia</i> sp.</p> <p>Order Alcyonacea 해계두目 Family Alcyoniidae 바다맨드라미科 <i>Alcyonium gracillimum</i> Kükenthal, 1906 분홍바다맨드라미 <i>Bellonella</i> sp. Family Nephtheidae 곤봉바다맨드라미科 <i>Dendronephtya gigantea</i> (Verrill, 1864) 큰수지맨드라미 <i>Dendronephtya puetteri</i> Kükenthal, 1905 자색수지맨드라미 <i>Dendronephtya alba</i> Utinomi, 1952 흰수지맨드라미 <i>Dendronephtya palaoensis</i> Utinomi, 1952 옛수지맨드라미 <i>Dendronephtya spinulosa</i> (Gray, 1862) 가시수지맨드라미</p> <p>Order Gorgonacea 해양目 Suborder Scleraxonia 골축亞目 Family Melithaeidae 빨산호科 <i>Acabaria bicolor</i> (Nutting, 1908) 양색바늘산호 <i>Acabaria tenuis</i> Kükenthal, 1908 가는바늘산호 <i>Acabaria formosa</i> Nutting, 1911 포모사바늘산호 Family Parisididae 균형산호科 <i>Parisid minor</i> Wright & Studer, 1889 작은균형산호</p> <p>Suborder Holaxonia 전축亞目 Family Acanthogorgiidae 가시산호科 <i>Acanthogorgia gracillima</i> Kükenthal, 1909 가는가시산호 <i>Acanthogorgia spissa</i> Kükenthal, 1909 숲가시산호 <i>Acanthogorgia grandiflora</i> Kükenthal & Gorzawsky, 1908 큰민가시산호 Family Paramuriceidae 측뿔족산호科 <i>Bebryce</i> sp. <i>Bebryce indica</i> Thomson, 1905 인도바보산호 <i>Bebryce brocki</i> Anrivillius, 1931 브로크바보산호 <i>Calicogorgia granulosa</i> Kükenthal & Gorzawsky, 1908 둥근껍산호 <i>Plexauroidea rigida</i> Kükenthal, 1908 곧은맷시산호 Family Plexauridae 총산호科 <i>Anthoplexaura dimorpha</i> Kükenthal, 1908 꽃총산호 <i>Euplexaura anastomosans</i> Brundin, 1896 유착진총산호 <i>Euplexaura crassa</i> (Kükenthal, 1908) 둔한진총산호 Family Ellisellidae 회초리산호科 <i>Verrucella umbraculum</i> (Ellis & Solander, 1787) 흑가시산호 Family Primnoidae 풀릴산호科 <i>Plumarrella spinosa</i> Kinoshita, 1907 깃산호 <i>Plumarrella adhaerans</i> Nutting, 1912 착생깃산호</p>

(박 등. 1994; 송과 원, 1992)

Table 3-1-5. Continued.

<p>Subclass Hexacorallia 육방산호亞綱 Order Actiniaria 해변말미잘目 Suborder Nynantheae 니난트亞目 Family Actiniidae 해변말미잘科 <i>Actinia equina</i> Linne, 1767 해변말미잘 <i>Anthopleura japonica</i> Verrill, 1899 갈색꽃해변말미잘 <i>Anthopleura midori</i> Uchida & Muramatsu, 1958 풀색꽃해변말미잘 Family Haliplanellidae 줄말미잘科 <i>Haliplanella lucia</i> (Verrill, 1898) 담홍줄말미잘</p> <p>Order Corallimorpharia 산호부치말미잘目 Family Corallimorphidae <i>Corynactis</i> sp.</p> <p>Order Scleractinia 돌산호目 Suborder Astrocoeniina 숲돌산호亞目 Family Thamnasteriidae 덩어리산호科 <i>Psammocora profundacella</i> Gardiner, 1898 그물코돌산호</p> <p>Suborder Fungiina 버섯돌산호亞目 Family Poritidae 구멍돌산호科 <i>Alveopora japonica</i> Eguchi, 1968 거품돌산호</p> <p>Suborder Faviina 별집돌산호亞目 Family Rhizangiidae 근생돌산호科 <i>Culicia japonica</i> Yabe & Eguchi, 1936 흑돌산호</p> <p>Suborder Caryophyllina 정향돌산호亞目 Family Caryophyllidae 정향돌산호科 <i>Stephanocyathus (Odontocyathus) spiniger</i> (Marenzeller, 1888) 긴다리돌산호 <i>Desmophyllum insignis</i> (Duncan, 1876) 나팔꽃돌산호 Family Flabellidae 부채돌산호科 <i>Flabellum distinctum</i> M. Edw. & H., 1848 부채돌산호</p> <p>Suborder Dendrophyllina 나무돌산호亞目 Family Dendrophylliidae 나무돌산호科 <i>Balanophyllia</i> sp. <i>Dendrophyllia</i> sp. 1 <i>Dendrophyllia</i> sp. 2 <i>Tubastraea aurea</i> (Quoy & Gaimard, 1833) 금빛나팔돌산호</p> <p>Subclass Ceriantipatharia Order Antipatharia 각산호目 Family Antipathidae 해송科 <i>Antipathes japonica</i> Brook, 1889 해송 <i>Antipathes lata</i> Silberfeld, 1909 긴가지해송</p>

Table 3-1-6. Corals and other material obtained in November 1997.

Site	Depth(m)	Sample No.	Remark (Identification)
A	31	97J-1	<i>Alcyonium gracillium</i>
		97J-2	Sponge associate with bryozoans and hydrozoans
		97J-3	<i>A. gracillium</i> and sponge
		97J-4	<i>Dendronephtya</i> sp. 1
	25	97J-5	<i>A. gracillium</i>
		97J-6	<i>Acanthogorgia</i> sp.
		97J-7	<i>A. gracillium</i>
	20	97J-8	Plexauridae unid.
		97J-9	<i>Dendronephtya</i> sp. 2
		97J-10	<i>A. gracillium</i>
		97J-11	Melithaeidae unid.
		97J-12	<i>Antipathes lata</i>
	15	97J-13	<i>Antipathes lata</i>
		97J-14	<i>Dendronephtya</i> sp. 3
		97J-15	Attached materials of 97J-13
		97J-16	Sponge
	10	97J-20	Plexauridae unid.
		97J-21	Bottom materials
		97J-36	<i>Acanthogorgia</i> sp. 2
		97J-37	<i>A. gracillium</i>
		97J-38	<i>Antipathes lata</i>
		97J-39	Plexauridae unid. 3
	5	97J-40	<i>A. gracillium</i>
		97J-24	Bottom materials and algae
		97J-22	<i>Euplexaura</i> sp.
		97J-23	Bottom materials
		97J-25	<i>Dendronephtya</i> sp. 3
		97J-26	<i>Solanderia</i> sp.
		97J-27	Bottom materials
		97J-28	Agariciidae unid.
		97J-29	<i>Solanderia secunda</i>
		97J-30	Plexauridae unid. 2
		97J-31	<i>Dendrophyllia</i> sp.
		97J-32	Bottom materials (sediment, shell frgments)
		97J-33	<i>Dendronephtya</i> sp. 3
		97J-34	<i>Acanthogorgia</i> sp. 2
		97J-35	<i>Acanthogorgia</i> sp.
	2-3	97J-41	<i>Dendronephtya</i> sp. 3
		97J-42	<i>Dendronephtya</i> sp. 2

Table 3-1-7. Corals and other material obtained in January 1998.

Site	Depth(m)	Sample No.	Remark (Identification)
B	25	98CJ-31	<i>Euplexaura</i> sp. 2
		98CJ-32	Plexauridae unid.
	20	98CJ-3	<i>Anthoplexaura</i> sp.
		98CJ-9	<i>Euplexaura</i> sp. 2
	12	98CJ-25	Water
C	16	98CJ-26	Water
		98CJ-14	Aganciidae unid.
	12	98CJ-11	<i>Antipathes</i> sp.
		98CJ-12	Plexauridae unid. 2
	10	98CJ-24	Water
		98CJ-45	<i>Dendrophylla</i> sp.
		98CJ-49	<i>Dendrophylla</i> sp. 2
		98CJ-43	<i>Acanthogorgia</i> sp.
		98CJ-46	Plexauridae unid.
		98CJ-47	Plexauridae unid.
		98CJ-42	<i>Antipathes lata</i>
		98CJ-44	<i>Alcyonium gracillium</i>
		98CJ-41	<i>Dendronephtya</i> sp. 3
		98CJ-48	<i>Dendronephtya</i> sp. 3
98CJ-50	<i>Dendronephtya</i> sp. 3		
0	98CJ-36		
D	15	98CJ-105	<i>Dendronephtya</i> sp. 3
		98CJ-107	<i>Dendronephtya</i> sp. 3
	18	98CJ-104	<i>Dendronephtya</i> sp. 3
	20	98CJ-70	Water
		98CJ-108	Plexauridae unid. 3
	30	98CJ-68	Water
		98CJ-51	Plexauridae unid. 3
40	98CJ-61	<i>Ellisella</i> sp.	

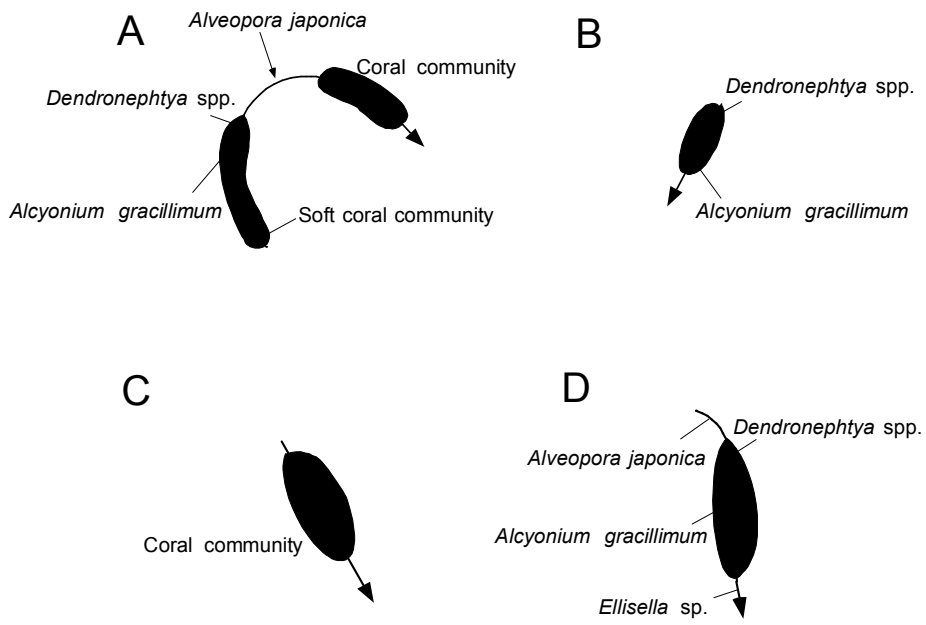


Fig. 3-1-3. Vertical distribution of corals in the sampling sites.

제 2 절 해양미생물 분리 및 보존

1. 이론적, 실험적 접근방법

해양환경은 특이한 생태계를 이루며 많은 생물체들로부터 신물질과 유용 물질 등 다양한 생리활성물질을 생산하는 중요한 원천으로 인식되었다. 또한 오랜 기간 육상생물로부터 이루어진 천연물의 개발이 점차적으로 고갈되어 감으로써 해양환경에서 다양한 물질을 찾기 위해 많은 노력과 연구가 진행되고 있다. 미생물로부터 새로운 생리활성물질을 탐색하기 위해서는 다양한 미생물의 분리가 요구된다. 그러나 자연환경으로부터 배양 가능한 미생물은 직접 관찰하여 측정 한 미생물과 비교 시 0.1-1%에 해당하는 낮은 회복율을 보인다(Staley & Konopka, 1985; Naomi et al., 1996). 이러한 결과는 배양을 통해 미생물의 군집을 정확하게 나타낼 수 없다는 한계성을 드러내지만 배양가능한 미생물로부터 미생물의 순수배양을 통해 성공적인 생리활성물질을 탐색 할 수 있으며 순수 배양된 미생물의 특성을 조사하여 유용한 정보를 얻음으로써 미생물의 생리적, 유전적 이해를 발전시킨다는 점에서 미생물의 배양은 중요하다(David et al., 1998). 해양세균은 두가지 형태로 나뉘어 있는데 그 하나는 낮은 농도의 영양물질이 존재 시 성장을 위해 적응해나가는 oligotrophic 세균과 세포가 정지상태로 존재하다가 영양 성분이 높은 농도로 바뀔 때 빠르게 적응해 가는 즉 성장을 위해 높은 농도의 영양물질을 필요로 하는 copiotrophic 세균으로 나뉠 수 있다. 또한 해양세균은 매우 긴 doubling time을 가지며 특히 oligotrophic 상태에서 성장 시 세균의 크기가 작고 둥근 형태를 보여준다. 그러나 과도한 기질을 다시 공급해주면 정상적인 크기로 성장 할 수 있다(Stephan et al., 1995). 이와 같이 해양환경에서 다양한 미생물을 분리하기 위해서는 특이한 배지성분을 포함한 선택배지의 선정, 적절한 배양조건, 배양기간의 선택 그리고 육안 또는 현미경 하에서 효율적인 균 선별이 고려되어야한다(박 등, 1998a, b). 자연환경에서 다수의 미생물을 분리하

기 위해서는 여러 종류의 균 분리배지를 사용하여야 하며 일반적으로 유용물질을 탐색 시 미생물은 중복되지 않고 다양한 균주가 분리되어야 한다(김 등, 1994). 따라서 본 연구는 해양으로부터 유용자원확보를 위한 기초조사를 위해 형태학적 방법을 이용하여 어떤 배지에서 다양한 미생물이 분리되는지를 조사하였고 또한 분리된 균주를 비교함으로써 중복되어 분리되는 빈도를 조사하였다.

가. 배지 조사

해양 미생물을 분리하기 위한 배지를 조사하기 위하여 ZoBell (ZB), 1/10 희석된 ZoBell (DZ), glucose가 첨가된 ZoBell (SZ), 다시마배지(ADF)를 사용하였으며, 고형물로 agar와 gum의 차이를 조사하기 위하여 각각의 배지에 agar 대신 gellan gum을 고형물로 사용하였다(Table 3-2-1).

해수 및 퇴적물은 미리 멸균된 9 ml 해수에 시료 1 ml을 넣어 교반 한 후 $10^{-1} \sim 10^{-4}$ 으로 희석하여 희석액 0.1 ml 씩을 미생물 분리 배지에 도말하였으며 해양생물체 즉 해면, 산호는 일정량을 조각낸 뒤 0.1 g (wet weight)/ml이 되도록 정량을 한 후 막자사발을 이용하여 분쇄된 추출액 1 ml을 멸균해수 9 ml에 넣어 교반한 다음 순차적으로 $10^{-2} \sim 10^{-6}$ 으로 희석하여 희석액 0.1 ml씩을 미생물 분리 배지에 도말하여 실온에서 3주간 배양하였다. 이때 각 배지 상에 나타난 미생물의 집락 수(colony forming unit, CFU)를 측정하였으며, 총 세균수는 DAPI 방법(Fry, 1988)으로 측정하였다.

미생물 분리배지에서 3주 동안 배양 후 나타난 미생물을 SZ agar 배지 상에 옮기고 이들을 다시 25°C에서 1주일 배양한 후 육안 및 광학 현미경을 이용하여 형태학적 특징(size, color, opacity, texture, form, elevation, margin, surface)을 상호 비교하여 서로 다른 미생물을 분리하였다.

계대용 배지를 조사하기 위하여 6종의 배지에서 무작위로 70 균주를 분리한 후 각각 SZ 배지와 ZoBell 배지에 계대접종하였다. 25°C에서 4일 배양 후 미생

물의 성장상태를 관찰하였다. 분리용 배지에 따른 미생물 다양성 조사를 하기 위하여 각각의 배지(Table 3-2-1)로부터 분리된 미생물을 ZoBell 배지를 변형한 SZ 배지에 계대배양하였다. 콜로니의 8가지 특성(size, color, opacity, texture, form, elevation, margin, surface)을 관찰하여 중복된 종류는 제외시킨 후 각각의 배지에서 분리된 콜로니 종류수를 계측하였다.

나. 냉동 보존 방법 조사

호염성 및 내염성 해양미생물 8 균주에 대한 희석수(증류수, 인공해수) 및 냉동보존제(DMSO, glycerol)의 효과를 1년간의 보존기간에 걸쳐 조사하였다. 사전 조사로 선발된 호염성 및 내염성 해양 미생물 12 균주를 (Table 3-2-2) ZoBell 배지에서 배양하여 10^{10} cells/ml 로 증류수 및 인공해수에 현탁하여 냉동 보존제와 혼합하여 -70°C 에서 냉동보존하며 보존 기간에 따른 균주의 회수율을 확인하였다. 각 기간마다 냉동 보존된 균주를 37°C water bath에서 30초간 해동한 후 희석수와 같은 종류의 희석액으로 연속희석하여 ZoBell 배지에 접종하였다. 25°C 배양기에서 3일간 배양하여 자란 콜로니의 수를 계수하여 CFU/ml을 조사하였다.

다. 공생 미생물의 분리 보존

1998. 9. 9 - 11 제주도 숲섬 부근에서 산호 및 해면 등 다양한 해양생물체 (Table 3-1-2)를 SKUBA를 통하여 채집하였다. 분리용 배지는 diluted ZoBell agar (DZ), ZoBell agar (ZB), super ZoBell agar (SZ), Bennett's agar (B), starch casein agar (SCA) , chitin agar (CH)를 사용하였다. 순수 분리를 위한 계대배양배지로 세균은 SZ agar를 이용하였다. 순수분리된 균주는 eppendorf tube에 20%의 글리세롤 용액 1 ml과 혼합한 후 -70°C 의 초저온 냉동고에 보존

하였다.

2. 연구내용

가. 해양미생물 분리기술

- (1) 배지종류에 따른 미생물의 분리율
- (2) 분리용 배지에 따른 미생물 다양성 조사
- (3) 계대용 배지 조사

나. 냉동 보존 방법 조사

다. 공생 미생물의 분리 보존

3. 연구결과

가. 해양미생물 분리 기술

(1) 배지종류에 따른 미생물의 분리율

미생물 분리 배지로서 10배 희석한 ZoBell agar 배지(DZ), ZoBell agar 배지(ZB), 변형된 ZoBell agar 배지(SZ)를 사용하여 희석평판법을 이용하여 미생물들의 집락 수(colony forming unit, CFU)를 조사하였다. 산호, 해면, 퇴적물, 해수 시료를 약제 사발등을 이용하여 분쇄한 후 현장에서 DZA, DZG, SZA, SZG, ADFA, ADFG 등 6종류의 배지에 희석 도말하여 상온에서 3주간 배양하여 성장한 colony 중 형태가 다른 colony를 선택하여 분리하였으며 각각의 colony forming unit (CFU)를 측정하였다. 분리된 세균은 SZA에 계대배양한 후 형태가 다른 colony를 최종적으로 분리하였다. 총 세균수의 측정을 위하여 분쇄된 시료를 Lugol's iodine 용액으로 고정하여 4'-6'-diamino-2-phenylindole (DAPI) 용액으로 염색하여 형광현미경으로 관찰 계수하였다.

해수로부터 분리된 세균의 비율이 다른 해양시료로부터 분리된 세균의 비율

에 비해 더 높았다. 해수의 경우 총세균수의 1~2% 정도의 CFU가 측정된 것에 반해 산호와 해면의 경우 0.01~0.001%, 퇴적물의 경우 0.01~0.0001%의 CFU가 측정되었다 (Table 3-2-2, Fig. 3-2-1).

98년 1월에 채집된 산호 시료에서 볼 수 있듯이 생물량에 따른 총세균수가 비슷하였다. 산호에서 분리한 ZoBell 배지에서 배양가능한 세균수와 총세균수의 비율은 산호의 종류에 따라 다르다고 사료된다(Table 3-2-2). ADF 배지에서 배양된 세균의 수가 DZ 또는 SZ 배지에서 배양된 세균수보다 적었으며, DZ 및 SZ 배지에서 배양된 세균의 수는 (CFU) 큰 차이가 없었다. 게다가 고형물로 사용된 agar와 gellan gum에 따른 배양 세균수도 큰 차이가 없었다. 22 m 깊이의 퇴적물에서 분리된 세균의 수는 16 m 깊이에 비해 적었지만, 배양 가능한 세균의 수는 더 많았다. 이것은 퇴적물의 종류 및 특성에 (예를 들면 22 m 퇴적물의 영양 상태 때문에 세균이 실험에 사용된 분리배지에서 더 빠른 속도로 성장 할 수 있었다) 따른 것이라 생각된다.

1차 시료의 경우 기존의 해면을 대상으로 조사한 미생물 개체수와 비교하여 약 100분의 1에서 1000분의 1정도로 미생물 분포가 낮은 편이었다. 2차 채집에서 얻은 시료로부터 6종의 배지에서 형성된 colony수를 계수한 결과는 표 3-2-4와 같다. 6종의 분리용 배지에 따른 colony 계수 결과 1/10 희석된 ZoBell(DZA) 배지와 SZG 배지가 많은 수의 미생물이 분리되었으며 고형물인 agar나 gum을 사용하는데 있어서는 큰 차이가 나지 않았다. 총균수와 배지에서 분리된 배양가능한 균주수를 비교한 결과 해수로부터 총균수의 1/100 정도 분리가 가능하나 해면이나 산호로부터 총균수의 1/10000 이하의 균주가 분리 가능하였다. 즉 ZoBell 배지 및 조사한 배지 성분의 경우 해수에 서식하는 미생물의 배양에 적합하나 해양생물과 연관된 미생물의 경우에는 특이한 배지 뿐만 아니라 여러 가지 다양한 배양방법이 개발의 필요하다.

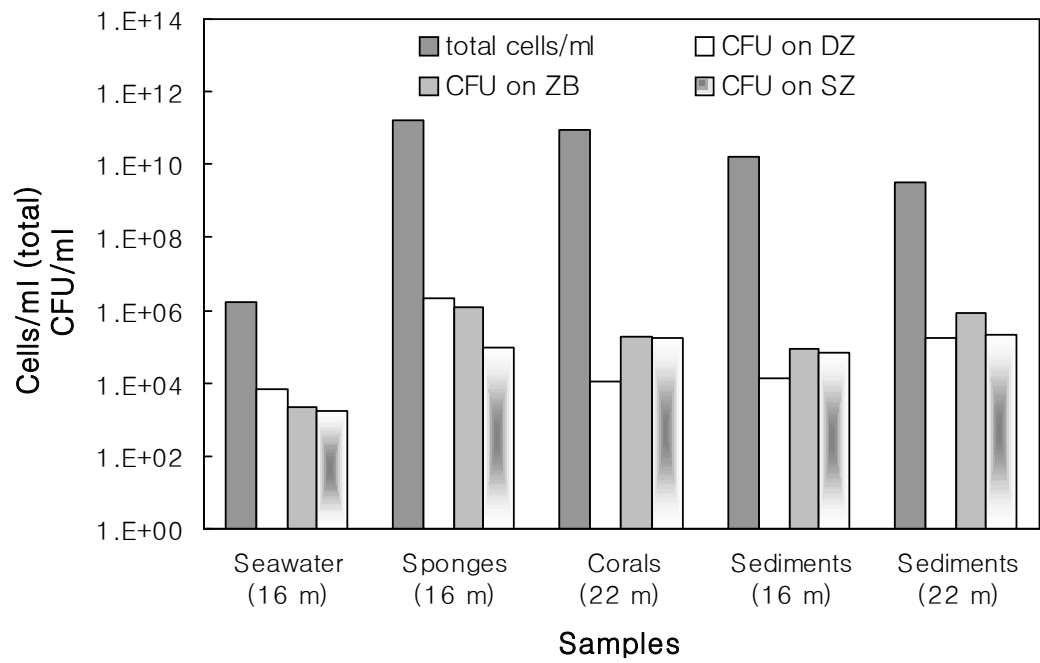


Fig. 3-2-1. Distribution of bacteria in marine sources collected in June 1998.

The bacterial number was calculated as total bacterial cells and colonies on the isolation media, DZ, ZB and SZ.

Table 3-2-2. Distribution of bacteria in seawater and corals in January 1998.
The bacterial number was calculated as total bacterial cells and colonies on the isolation media, DZ, ZB and SZ.

Samples	Cells/ml (total)	CFU/ml					
		DZ	DZG ^a	SZ	SZG ^a	ADF	ADFG ^a
Seawater	2.0x10 ⁶	3.2x10 ⁴	3.3x10 ⁴	1.5x10 ⁴	4.2x10 ⁴	3.0x10 ³	3.0x10 ³
<i>Antipathes</i>	2.4x10 ⁸	3.5x10 ³	5.5x10 ³	3.0x10 ³	7.0x10 ³	4.0x10 ³	1.0x10 ²
<i>Alcyonium</i>	2.4x10 ⁸	4.5x10 ³	3.0x10 ³	1.0x10 ³	2.5x10 ³	1.0x10 ³	3.0x10 ³
<i>Plexaurida</i>	4.7x10 ⁸	2.5x10 ⁴	1.9x10 ⁴	6.0x10 ³	1.1x10 ⁴	8.0x10 ³	7.0x10 ³
<i>Dendronephthya</i>	5.0x10 ⁸	5.0x10 ³	2.0x10 ³	8.0x10 ³	5.0x10 ³	1.0x10 ²	1.0x10 ²
<i>Dendrophylla</i>	N.D. ^b	5.5x10 ⁴	4.3x10 ⁴	4.7x10 ⁴	4.0x10 ⁴	9.0x10 ³	1.0x10 ³

^a media containing gellan gum instead of agar

^b not detected

(2) 분리 배지에 따른 미생물의 형태학적 다양성 조사

분리용 고체배지에서 선별된 형태학적으로 다른 단일 colony를 SZ agar 배지 상에 옮기고 일정기간 배양한 후 순수분리된 미생물에 대해 8가지 형태학적 특성 즉 크기, 색깔, 투명도, 표면특성, 형태, 입면도, 가장자리 모양, 겉모양(size, color, opacity, texture, form, elevation, margin, surface)을 이용하여 분류함으로써 어떤 배지에서 다양한 미생물을 분리할 수 있는가를 조사하였다.

98년 1월 시료에서 분리한 세균중 퇴적물과 산호에서 각각 74 균주와 61 균주가 분리되었다. 6월 시료에서 분리한 세균중 해수시료로부터 23균주가 분리되었으며, 퇴적물로부터 85 균주가 분리되었다. 또한 해면과 산호로부터 각각 15 균주와 25 균주가 분리되었다 (Table 3-2-3).

그 결과 퇴적물 시료에서는 ZB 고체 배지에서 가장 많은 균락 수를 보였으며 또한 형태학적으로 서로 다른 colony가 분리되었다. 해수시료에서는 해수의 oligotroph한 성질을 나타내듯이 상대적으로 배지 성분이 희석된 DZ agar 배지에서 SZ 배지에서보다 높은 CFU값을 보였으며 다양한 미생물도 분리되었다. CFU 및 분리된 세균수를 볼 때 시료의 유기물 양과 배지의 영양분 사이에는 정확한 상관관계를 찾을 수 없었다. 해양 생물체인 산호시료인 경우 DZ agar 배지와는 상대적으로 유기물원이 많은 SZ agar 배지에서 다양한 미생물이 분리되었다, 그러나 해면시료인 경우 산호시료와 비교시 DZ agar 배지에서 높은 CFU값을 보인 것은 시료에 존재하는 미생물의 우점종 때문이며 그 결과 평판 배지 상에서도 다양한 미생물이 분리되지 않았다. 6월에 채집한 산호의 경우 영양분이 많이 포함된 ZB 및 SZ 배지에서 더 많은 세균을 분리한 반면, 1월에 채집한 산호와 해면의 경우 SZ에서 보다 DZ에서 더 많은 수의 세균이 분리되었다.

분리 세균의 중복성을 확인하기 위하여 각 분리 배지간에 형태학적으로 동일한 균주가 중복하여 분리되는 빈도를 조사하였다. 분리 배지로부터 분리된 미

생물을 SZ agar 배지에서 순수 배양 한 후 미생물을 8가지의 형태학적 특징을 이용하여 서로 상이한 미생물을 분리 한 결과 DZ agar 배지에서는 47균주, ZB agar 배지에서는 49균주를 그리고 SZ agar 배지에서는 44균주를 분리하였다.

DZ agar 배지 상에서 분리된 균주와 ZB agar 배지 및 SZ agar 배지 상에서 분리된 균주와 비교 시 12.7% 및 19.1%가 중복되어 분리되었고, ZB agar 배지 상에서 분리된 균주와 DZ agar 배지 및 SZ agar 배지 상에서 분리된 균주와는 12.2% 및 10.2%가 중복되었으며, SZ agar 배지 상에서 분리된 균주와 DZ agar 배지 및 ZB agar 배지 상에서 분리된 균주와는 20.4% 및 11.3%가 중복되어 분리되었다. 또한 3가지 배지 중 2종류의 배지를 동시에 사용하여 미생물을 분리하면 배지 상호 간에 중복되어 분리되는 미생물은 평균 14.3%였으며, 3종류를 동시에 사용하였을 때는 전체 분리된 미생물의 32.9%가 상호 중복하여 분리되었다(Table 3-2-4). 이같은 중복된 균주의 분리는 토양으로부터 다양한 분리 배지를 사용한 경우에서도 관찰되었다 (Kim et al., 1994).

이와 같이 여러 종류의 분리배지를 사용하면 많은 종의 미생물이 분리되고 서로 상이한 미생물의 수가 증가하겠지만 상대적으로 중복되어 분리되는 미생물 수도 증가할 것이다. 또한 콜로니의 다양성을 분석한 결과 해양으로부터 미생물을 분리하기 위한 배지는 각각의 미생물의 종에 따라 다르다는 결과를 얻을 수 있다. 그러므로 해양환경으로부터 다양한 미생물을 분리하기 위해서는 목적으로 하는 해양시료의 대상에 따라 적합한 배지의 종류를 개발하고 현장에서 분리용 접종시 몇가지의 배지를 사용하여야 가장 다양한 미생물을 분리할 수 있을 것인지를 고려하여야 한다.

Table 3-2-3. Diversity of isolates based on colony morphology.

Samples (depth)	Isolation media	Isolates on isolation medium	Colonies grown after transfer on SZ	Morphologically different isolates after transfer on SZ
Seawater (10 m) ^a	DZ	7	7	5
	DZG ^c	13	13	9
	SZ	12	12	10
	SZG ^c	12	9	7
	ADF	6	5	4
	ADFG ^c	4	4	3
Seawater (10 m) ^a	DZ	9	9	6
	DZG ^c	8	7	6
	SZ	5	5	4
	SZG ^c	13	13	11
	ADF	8	6	6
	ADFG ^c	4	3	3
Seawater (16 m) ^b	DZ	20	19	10
	ZB	20	17	9
	SZ	16	16	4
Coral 1 (10 m) ^a	DZ	39	33	28
	DZG ^c	20	12	9
	SZ	15	14	12
	SZG ^c	13	5	4
	ADF	10	6	4
	ADFG ^c	8	6	4
Coral (22 m) ^b	DZ	12	8	7
	ZB	15	10	9
	SZ	13	11	9
Sponge (16 m) ^b	DZ	11	7	6
	ZB	4	8	3
	SZ	4	3	3
Sediments (16 m) ^b	DZ	14	12	9
	ZB	26	18	15
	SZ	12	10	10
Sediments (22 m) ^b	DZ	24	22	15
	ZB	31	25	18
	SZ	36	31	18

^a Samples were collected in January 1998.

^b Samples were collected in June 1998.

^c Media containing gellan gum instead of agar.

Table 3-2-4. Duplication of isolates among the isolation media.

Samples	Isolates on DZ				Isolates on ZB				Isolates on SZ			
	total	ZB ^a	SZ ^a	ZB/SZ ^b	total	DZ ^c	SZ ^c	DZ/SZ ^d	total	DZ ^e	ZB ^e	DZ/ZB ^f
Seawater	10	2	3	1	9	2	3	1	4	3	3	1
Sediments (16 m)	9	3	0	0	15	3	0	0	10	0	0	0
Sediments (22 m)	15	0	5	0	18	0	2	0	18	5	2	1
Sponge	6	1	0	0	6	1	0	0	3	0	0	0
Coral	7	0	1	0	9	0	0	0	9	1	0	0
Total	47	6	9	1	49	6	5	1	44	9	5	1

Samples collected in June 1998 were examined.

^a number of isolates which exhibit with colonies on ZB and SZ, respectively

^b number of colonies which morphology is same as colonies on both ZB and SZ

^c number of morphologically same colonies with colonies on DZ and SZ, respectively

^d number of colonies which morphology is same as colonies on both DZ and SZ

^e number of isolates which show same colony morphology on DZ and ZB, respectively

^f number of isolates which exhibit same colony morphology both on DZ and on ZB

(3) 계대용 배지 조사

6종의 분리배지 중에서 다른 배지보다 1/10 희석된 ZoBell (DZ) 배지에서 많은 수의 균락을 형성하였으나 다시 DZ 배지에 계대배양하였을 때 미생물의 성장이 빈약하거나 성장을 하지않는 미생물이 관찰되었다. 그러므로 다양한 분리배지로부터 분리된 균주를 계대하기위한 배지를 선정하기위해 6종의 배지에서 무작위로 70 균주를 분리한 후 각각 SZ 배지와 ZoBell 배지에 접종하였다. 25℃에서 4일 배양 후 미생물의 성장상태를 관찰하였다. 그 결과 SZ 배지는 67 균주(95%), ZoBell 배지는 61 균주(87%)로서 SZ 배지에서 더 많은 미생물이 성장하였기 때문에 계대배양 배지로서 SZ 배지를 선정하였다.

나. 냉동보존방법의 조사

호염성 및 내염성 해양미생물 균주에 대한 희석수 및 냉동보존제의 효과를 1년간의 보전기간에 걸쳐 조사하였다. 호염성 및 내염성 해양미생물 12 균주를 (Table 3-2-5) ZoBell 배지에서 배양하여 10^{10} cells/ml 로 증류수 및 인공해수에 현탁하여 냉동보존제인 DMSO 또는 glycerol와 혼합하여 -70℃에서 냉동 보존하며 보전 기간에 따른 균주의 회수율을 확인하였다. 각 기간마다 냉동 보전된 균주를 37℃ water bath에서 30초간 해동한 후 희석수와 같은 종류의 희석액으로 연속희석하여 ZoBell 배지에 접종하였다. 25℃ 배양기에서 3일간 배양하여 자란 콜로니의 수를 계수하여 CFU/ml을 조사하였다.

Halophile bacteria의 경우에는 suspension solution으로 aged sea water를 사용할 때 회복율이 더 높았으나, 시험된 균주에 따라 장기간 냉동보전 가능한 기간이 각기 다르게 조사되었다. 그러나 cryoprotective agent로 사용된 glycerol 과 DMSO 간의 차이는 없는 것으로 나타났다 (Fig. 3-2-2).

Table 3-2-5. Bacterial strains used for preservation test.

Strain stock No.	halophile/ halotolerant	Suspended with distilled water		Suspended with aged sea water	
		control(cells/ml)	stock(cells/ml)	control(cells/ml)	stock(cells/ml)
10583	halotolerant	1.8×10^{10}	9.0×10^9	1.6×10^{10}	8.0×10^9
10669	halophile	3.1×10^{10}	1.6×10^{10}	4.2×10^{10}	2.1×10^{10}
10625	halotolerant	6.1×10^{10}	3.1×10^{10}	4.7×10^{10}	2.4×10^{10}
10670	halophile	2.2×10^{10}	1.1×10^{10}	3.8×10^{10}	1.6×10^{10}
10635	halotolerant	1.1×10^{10}	5.5×10^9	1.1×10^{10}	5.7×10^9
10577	halotolerant	2.2×10^{10}	1.1×10^{10}	2.5×10^{10}	1.3×10^{10}
10356	halophile	1.1×10^{10}	5.5×10^9	1.1×10^{10}	5.5×10^9
10684	halophile	7.3×10^{10}	3.7×10^{10}	5.2×10^{10}	2.6×10^{10}
10597	halotolerant	1.7×10^{10}	8.5×10^9	1.1×10^{10}	5.5×10^9
10683	halophile	3.4×10^{10}	1.7×10^{10}	3.1×10^{10}	1.6×10^{10}
10653	halotolerant	2.3×10^{10}	1.2×10^{10}	1.4×10^{10}	7.0×10^9
10582	halotolerant	1.0×10^{10}	5.0×10^9	1.0×10^{10}	5.0×10^9

control: before deep freezing.

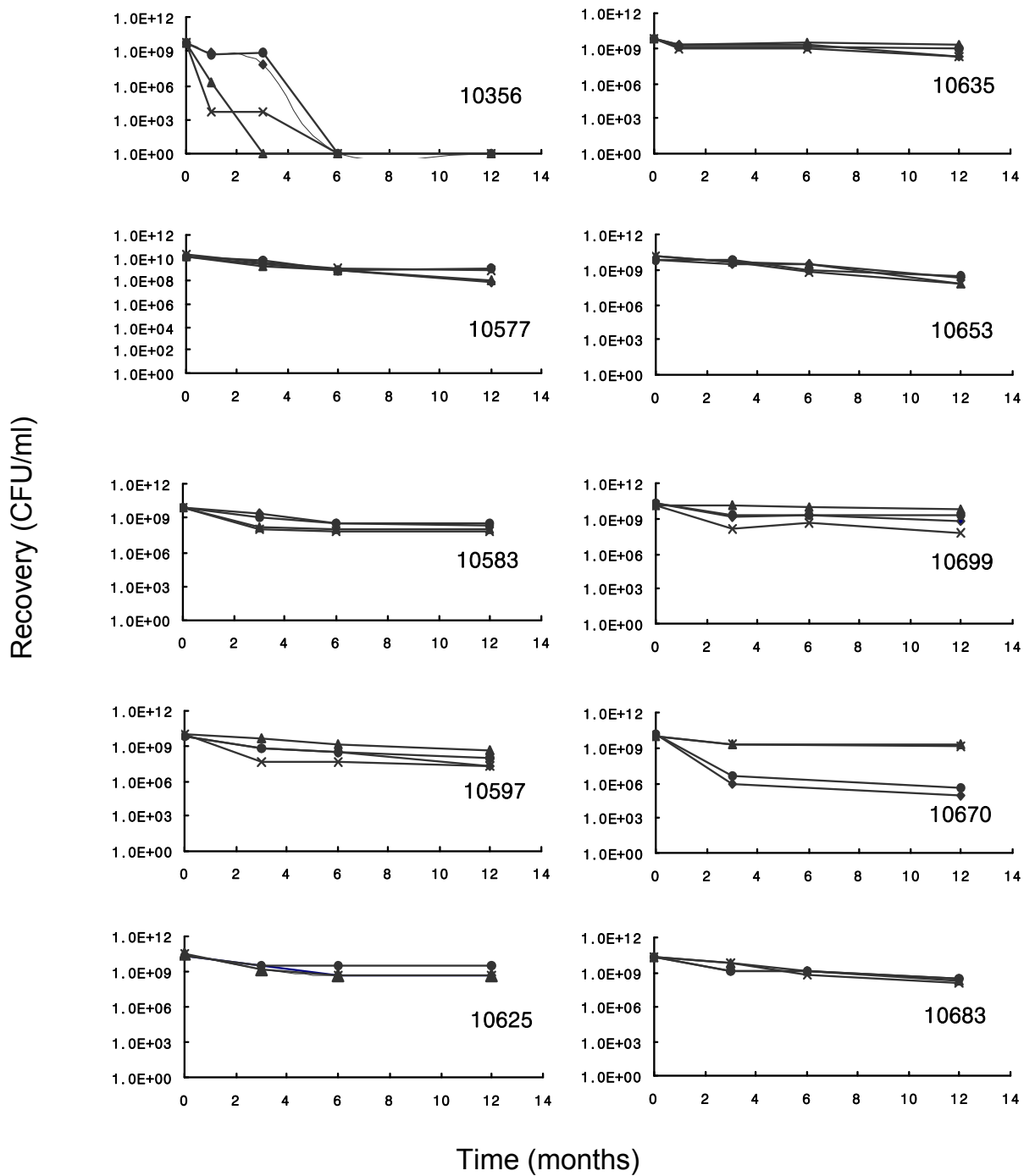


Fig. 3-2-2. Recovery of marine bacteria after preservation at -70°C .

▲, suspended in distilled water and stored with DMSO; ×, suspended in distilled water and stored with glycerol; ◆, suspended in artificial sea water and stored with DMSO; ●, suspended in artificial sea water and stored with glycerol.

다. 공생미생물의 분리 보전

제주도 숲섬 부근에서 산호 및 해면 등 다양한 해양생물체를 SKUBA를 통하여 채집하였다(Table 3-1-2). 분리용 배지는 diluted ZoBell agar (DZ), ZoBell agar (ZB), super ZoBell agar (SZ), Bennett's agar (B), starch casein agar (SCA), chitin agar (CH)를 사용하였다. 순수 분리를 위한 계대배양배지로 세균은 SZ agar를 이용하였다. 현재 1차 시료로부터 순수분리된 균주는 세균 226 균주 및 방선균 6주, 2차 시료로부터 순수분리된 세균 470 균주 및 3차 시료로부터 순수분리된 세균 100 균주이다. 순수분리된 균주는 eppendorf tube에 20%의 글리세롤 용액 1 ml과 혼합한 후 -70°C 의 초저온 냉동고에 보전하였다.

제 3 절 Topoisomerase I 저해 방선균연구

해면 *Poecillastra cribrun*에서 분리한 방선균 *Streptomyces* sp. strain 8908의 topoisomerase I 저해효과를 조사하고, 활성분획을 silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography와 HPLC으로 분리하였다.

1. 이론적, 실험적 접근방법

DNA topoisomerase는 원핵생물 및 진핵생물에 모두 존재하는 생체내 필수적인 효소로서 DNA replication, RNA transcription, recombination, chromosome segregation 등의 세포내 작용 시 일어나는 DNA의 위상적인 문제를 해결하는 효소이다 (Wang, 1985; D'Arpa & Liu, 1989; Liu, 1989). DNA topoisomerase는 생물에 있어서 두가지 형태인 DNA topoisomerase I과 DNA topoisomerase II가 존재한다. Topoisomerase I은 두가닥 DNA중 한가닥에 nick를 형성하며 이 사이로 다른 DNA가닥이 통과한 후 재조합됨으로써 DNA의 supercoiling이 제거된 relaxed form을 형성한다. Topoisomerase II는 DNA 두가닥에 nick를 형성하고 이 nick를 통하여 각각의 상보적인 DNA가닥이 통과 및 재결합 함으로서 DNA의 topology변환을 유도한다 (Liu, 1989). 이러한 생체내 기능을 갖고 있는 topoisomerase는 암치료제 개발에서 중요한 target으로 사용되고 있으며 저해하는 물질이 합성 또는 천연물에서 개발되어 항균제 및 항암제 등의 의약품으로 사용되고 있거나 연구되고 있다 (Dunn, 1994; Schneider et al., 1990). 지금까지 개발된 항암제의 대부분 (m-AMSA, teniposide, etoposide, genistein, saintopin, doxorubicin 등)은 topoisomerase II 저해제 (Yamachita et al., 1990a, b)이며 topoisomerase I저해제로서는 식물유래의 comptohecine과 그 유도체가 보고되고 있으나 독성이 강하여 많은 부작용을 나타낸다 (Giovanella et al.,

1989; Hertzberg et al., 1989). 따라서 본 연구소에서는 다양한 해양생물체의 추출물에서 topoisomerase I 저해물질을 생성하는 방선균을 탐색하였으며 그 과정에서 강한 세포독성능을 가지며 topoisomerase I 저해물질을 생성하는 방선균주 8908을 분리하였다. 분리균주는 형태학적, 화학적 방법에 따라 균동정을 하였으며 topoisomerase I 저해물질을 분리정제하여 topoisomerase I의 저해활성을 조사하였다.

가. 방선균의 분리 및 활성균주의 배양

거문도의 대삼부도 뒷편과 동도부근에서 산호 및 해면 등 다양한 해양생물체를 SKUBA를 통하여 채집한 후 ZoBell agar, starch-casein agar, Bransfield agar 그리고 iron agar를 사용하여 방선균을 분리하였으며 순수 분리를 위한 계대 배양배지로 SZ agar를 이용하였다.

방선균 분리주 8908의 배양배지로는 변형된 Zobell 배지(SZ 배지:glucose 20 g, bacto peptone 5 g, yeast extract 1 g, ferric phosphate 0.1 g)을 aged sea water가 75% 포함된 1 L의 증류수에 녹인후 pH를 7.4로 조정하여 사용하였다. 전배양을 위해서는 ISP4 배지에서 7일 배양된 균체를 이용하여 제조된 spore solution을 이용하였다. 본배양을 위해서 1 ml의 spore solution을 100 ml의 baffled flask에 접종하여 3일 동안 배양한 배양액을 3 L의 배지에 접종한 후 30°C에서 1.0 vvm의 air와 250 rpm에서 4일간 배양하였다.

나. 세포독성능 검사

세포배양을 위해서 실험에 사용된 세포인 DLD-1, P388D₁은 10% FBS(Fetal Bovine Serum)와 kanamycin 20 µg/ml이 들어 있는 RPMI 1640 배양액을 사용하여 25 cm² flask에 넣어 37°C, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였다. 시료의 암세

포 독성능을 측정하기 위해 96 well plate에 대수기에 도달한 P388D₁ cell (2×10^4 cells/ml)과 DLD-1 cell (4×10^4 cells/ml)을 10 μ l씩 접종하고 각각의 균주로부터 조제된 시료를 2 μ l씩 취하여 최종 volume이 200 μ l가 되게 한 후 37°C, 5% CO₂ 항온기에 5일간 배양하였다. 배양이 끝난 후에 증류수에 녹인 MTT용액(1.1 mg/ml)을 50 μ l씩 각각의 well에 넣어주고 나서 최적반응 4시간동안 37°C의 CO₂ 항온기에 더 배양시켰다. 그후 상등액을 버리고 150 μ l의 dimethyl sulfoxide를 넣고 5분동안 흔들어 formazon crystal을 잘 용해시킨 뒤 발색정도를 관찰하였다. 아무것도 처리하지 않고 세포만 넣어서 배양한 well에서는 진한 보라색이 나타나며 세포가 모두 죽은 well에서는 투명에 가까운 옅은 보라색이 나타나는 것으로 세포독성능을 판정하였다 (Carmichael et al., 1987).

다. 선별균주의 동정

선별된 균주의 동정을 위해 ISP 4 배지에서 20°C, 9일간 배양한 후 colony 형태를 관찰하였다. 포자의 관찰을 위해서는 8% glutaraldehyde 용액으로 1일간 예비고정한 후 포자형성이 잘된 부위를 채취하여 1일간 건조하고 Bio-Rad E5550 SEM coating system을 사용하여 gold coating 한 후 주사 전자현미경 (Phillips model 515)상에서 관찰하였다. 세포벽의 peptidoglycan에 존재하는 diaminopimelic acid(DAP)와 전균체가수분해액의 당 분석을 위한 시료의 준비는 Staneck등(1974)의 방법을 사용하였으며 TLC를 이용한 분석방법은 Schaal(1985)에 의한 방법을 이용하였다.

라. DNA topoisomeras I 저해제의 분리

4일 동안 배양한 배양액 3 liter를 원심분리하여 균체와 상등액을 분리한 후 배양액 상등액을 pH 2.0으로 조정하였다. n-butanol를 5 L 첨가 한 후 수층을

감압농축한 후 동결건조하였으며 건조된 시료에 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}(2:1)$ 를 사용하여 추출 한 후 재농축하였다. Topoisomerase I 저해효과를 보이는 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}(2:1)$ 추출물에 대하여 성분분석을 하고자 stepwise silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography를 사용하여 활성분획을 분리한 후 C-18 reversed-phase prep. HPLC column[YMC pack ODS-A, 10 μm , 10 \times 250 mm, UV detector; 254 nm, flow rate: 1.5 ml/min, solvent system:MeOH-H₂O(5:95) in 1% AcOH]를 이용하여 0.3 mg의 활성물질을 분리하였다.

마. DNA topoisomerase I 활성측정

Topoisomerase I 의 기질로 사용될 DNA는 *E. coli*로부터 LB broth (tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g, pH 7.2, D.W. 1000 ml) 50 ml에 균주를 접종하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 O.D(540 nm)값이 0.6이 되도록 전배양을 한 후 LB broth 500 ml에 옮겨 3시간 이상 배양하여 O.D값이 0.4이상이 됐을때 chloramphenicol (34 mg/ml) 2.5 ml을 첨가하여 12시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난후 배양액을 6,000 rpm으로 원심분리하여 cell을 회수한 후 JET star plasmid kit (GENOMED Inc.)를 이용하여 plasmid pBR322 DNA를 분리하여 사용하였다. DNA topoisomerase I은 HeLa S₃ cell를 1 $\times 10^4$ cells/ml 농도로 DMEM 배지(Gibco)에서 접종한 후 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 항온기에서 5일동안 배양한 세포를 사용하였다. 세포를 균질화하여 2 M NaCl를 첨가하여 핵단백질을 추출한 후 PEG6000를 첨가하여 DNA를 제거하였다. 원심분리하여 얻은 상층액을 Bio-Rex 70 colum을 이용하여 DNA relaxation assay를 위한 조효소로 사용하였다 (Yoshikazu et al., 1990). DNA topoisomerase I 활성측정은 기질로 사용되는 supercoiling상태의 plasmid pBR322 DNA가 relaxed form 및 niked form으로 전환되면 negative, topoisomerase I 효소가 저해를 받아 supercoiled form으

로 남으면 positive로 판정하였다.

반응혼합액은 4×stock solution[100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.06 mg/ml of BSA, 400 mM KCl, 40 mM MgCl₂, 2 mM Dithiothreitol, 1 mM EDTA (pH 8.0)] 5 μl, pBR 322 supercoiled DNA (100 μg/ml) 2 μl, enzyme solution purified from HeLa S₃ cell line (1 unit) 2 μl, 시료 2 μl, 증류수 11 μl를 포함한다. 반응혼합액을 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후 5×stop solution (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanole FF, 25% sucrose, 5% SDS) 4 μl를 첨가 한 후 0.9% agarose gel에서 전기영동하여 DNA topology를 관찰하였다.

2. 연구내용

가. Topoisomerase I 저해효능 균주의 선별

나. 균주동정

다. 생리활성물질의 추출 및 분리

3. 연구결과

가. 균주선별

해양시료로부터 분리하여 보전하고 있는 방선균 104 균주를 SZ 배지에서 30°C에서 7일간 150 rpm으로 진탕배양을 한 후 8000 rpm에서 원심분리하여 균체는 methanol로 추출하고 배양액은 ethylacetate 층과 수층으로 분리하였다. 각각의 시료에 대한 세포독성능 분석과 DNA relaxation assay를 수행한 결과 강한 세포독성능을 가지며 topoisomerase I 저해활성을 갖는 방선균 균주 8908를 선별

하였다(Table 3-3-1).

나. 균주동정

Strain 8908의 형태학적 특성을 보기 위해 ISP 2 고체배지에서 배양한 결과 기질균사는 yellow-brown색을 나타내고 그 위로 grey색의 기중균사를 형성하였다. 기중균사는 flexibilis 형태를 보였으며 기질균사의 단편화는 발견되지 않았다. 기중균사는 약 20개의 포자가 사슬을 형성하고 있으며 포자의 표면은 주사전자 현미경으로 관찰한 결과 특이적인 돌출물을 갖고있지 않는 smooth형태였다. 또한 세포벽 분석 결과 diaminopimelic acid (DAP) 이성질체는 LL-type이었으며 아미노산은 glycine, glutamic acid, alanine이 검출되는 chemotype I에 해당되었다. 당으로는 galactose가 검출되었다. 따라서 strain 8908은 형태학적 그리고 화학분류학적 실험결과들에 의하여 *Streptomyces* sp.로 동정하였다 (Lechevalier, 1989; Lechevalier at al., 1981)

Table 3-3-1. Anticancer activities of associated actinomycetes strains isolated from sponges.

Actinomy- cetes strain number	Strain type	Sponge origin	Topoisome- rase I inhibitory fraction	MTT assay			
				MeOH extract of mycelium		EtAc extract of culture broth	
				p388	DLD- 1	p388	DLD -1
8889	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Suberites.sp</i>	broth & mycelium	0.2*	0.09	0.2	0.13
8908	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Poeillastra</i> <i>cribrum</i>	broth	0.12	0.07	0.08	0.17
8922	<i>Streptomyces</i> sp.	<i>Spongiidae</i>	mycelium	0.2	0.09	0.3	0.18

* Numbers refer to ED₅₀($\mu\text{g}/\text{ml}$).

(An extract was considered as active if the ED₅₀ was <20 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

다. 분리 및 정제

균주 8908을 SZ 배지 (glucose 20 g, bacto peptone 5 g, yeast extract 1 g, ferric phosphate 0.1 g, aged sea water 75%, pH를 7.4)에 4일간 배양한 배양액 3 liter를 원심분리하여 균체와 상등액을 분리한 후 배양액 상등액을 pH 2.0으로 조정하였다. n-butanol를 5 L 첨가하여 추출한 후 n-butanol층을 감압농축기를 이용하여 농축하였다. n-butanol를 제거하기 위해 농축된 여액에 MeOH를 넣어 재농축하였다. Topoisomerase I 저해효과를 보이는 n-butanol 추출물(5.84 g)에 대하여 성분분석을 하고자 C-18 reversed-phase vacuum flash column을 이용하였다. 용출용매로는 MeOH:H₂O(4:1→9:1), 100% MeOH, EtOAc, CH₂Cl₂, 100% MeOH를 사용하여 총 6개의 분획을 얻었으며 각각의 분획에 대한 topoisomerase I 저해효과를 조사하였다. 그 결과 분획 2와 분획 3에서 각각 100 µg/ml의 농도에서 topoisomerase I 저해활성이 관찰되었다. 활성분획 2(40.8 mg)는 C-18 reversed-phase prep. HPLC column[YMC pack ODS-A, 10 µm, 10×250 mm, R.I. detector, flow rate: 2 ml/min, solvent system:MeOH-H₂O(4:1)]를 이용하여 7개의 분획을 얻어 topoisomerase I 저해효과를 조사한결과 분획 2-1과 분획 2-2에서 각각 100 µg/ml의 농도에서 topoisomerase I 저해활성이 관찰되었다. 활성분획 3(32.7 mg)은 C-18 reversed-phase prep. HPLC column[YMC pack ODS-A, 10 µm, 10×250 mm, R.I. detector, flow rate: 2.5 ml/min, solvent system:MeOH-H₂O(14:1)]를 이용하여 6개의 분획을 얻어 topoisomerase I 저해효과를 조사한 결과, 분획 3-1에서 topoisomerase I 저해활성이 관찰되었다. 분획 3-1은 다시 MeOH soluble(F3-1-1)과 MeOH insoluble(F3-1-2)한 두개의 분획을 얻었으며 topoisomerase I 저해효과를 조사한 결과 F3-1-1분획(0.7mg)에서 topoisomerase I 저해활성이 관찰되었다 (Fig. 3-3-1). 활성분획 3-1-1은 구조분석이 진행중이며, 활성분획 2-1과 2-2는 2차 HPLC를 이용하여 물질분리가 진행중이다.

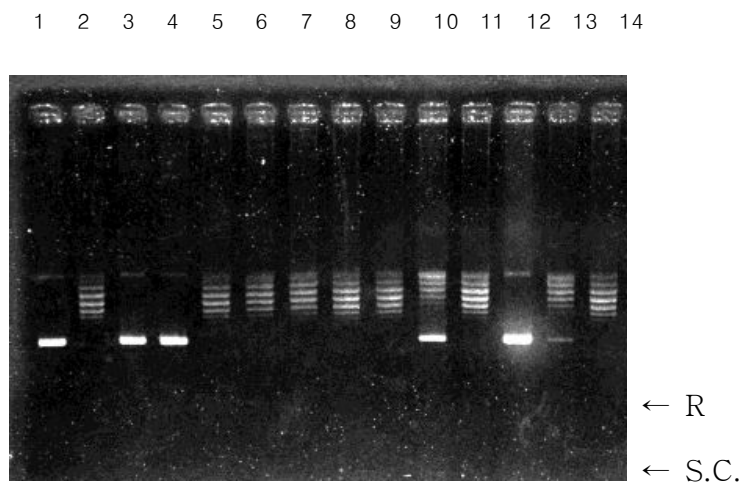


Fig. 3-3-1. Inhibition of topoisomerase I by fractions of *Streptomyces* sp. 8908.

Fractionates were added at concentration of 0.1 mg/ml, respectively.
 1, pBR322(0.3µg/ml); 2, pBR322 + topoisomerase I; 3, F2-1; 4, F2-2; 5, F2-3;
 6, F2-4; 7, F2-5; 8, F2-6; 9, F2-7; 10, F3-1-1; 11, F3-1-2; 12, pBR322 +
 topoisomerase I + camptothecin(0.2 mg/ml); 13, pBR322 + topoisomerase I +
 MeOH; 14, pBR322 + topoisomerase I + Acetone
 R, relaxed form DNA; S.C., supercoiled form DNA.

제 4 절 *Streptomyces* sp. 8321의 탈유화능 연구

탈유화능이 우수한 방선균을 분리하여 그의 탈유화능을 조사하고 배지조성에 따른 submerged culture를 이용하여 포자생성 여부와 액체배양으로부터 얻은 포자에 대한 탈유화능을 조사하였다.

1. 이론적, 실험적 접근방법

기름-물 유상액(emulsion)은 해양에서 유출된 유류의 회수과정, 유조차 전복사고 등 유류에 의해 오염된 토양을 복원하기 위한 토양세척과정, 석유공장내 혹은 정비공장 등에서 나오는 종말폐수에서 만들어질 수 있다. 이와 같이 형성된 유상액은 유류의 회수나 세척 혹은 분리과정에서 장애요인으로 작용할 뿐만 아니라 유상액을 그대로 방출할 경우 환경을 재 오염시키는 역할을 하므로 이의 처리가 유류오염의 정화에 있어 매우 중요하다고 할 수 있다.

기름-물 유상액의 처리대책으로 현재 생물학적 유류분해방법 및 유수분리장치가 이용되고 있다. 생물학적 처리방법은 기름을 분해하여 유류농도를 낮추는 것으로 물리적·화학적 처리방법에 비해 보다 완전한 유류제거효과는 있으나 처리시간이 길뿐만 아니라 자원 재활용 측면에서도 최선의 방법은 아니다. 그러므로 유상액을 기름과 물로 재 분리하여 분리된 기름을 회수하는 탈유화 방법은 비용면이나 자원 재활용면에서 매우 긍정적이라 할 수 있다. 그러나, 현재 합성 탈유화제를 사용하고 있는 유수분리 장치는 점성이 높은 물질(Bunker C, 폐윤활유 등)이 포함된 경우 별 효과가 없을 뿐만 아니라 처리 후 2차 오염문제가 발생할 소지가 있다 (Lee et al., 1998). 따라서 생물 탈유화제의 경우는 환경친화적이고 개발 여하에 따라 경제적으로도 경쟁력이 있을 것으로 기대된다.

생물 탈유화제 연구는 1980년대 초 캐나다의 Cairns 등(1982)이 주로 tar sand에 함유된 석유를 회수하기 위하여 시작하였고, 현재까지 보고된 탈유화능 소유 미생물은 O/W (Oil-in-Water) emulsion에 대한 탈유화능이 우수하다는 *Nocardia amarae*(Cairns et al., 1982)와 W/O (Water-in-Oil) emulsion에 대한 탈유화능이 있다는 *Corynebacterium petrophilum* (Stewart & Cairns, 1983) 등 2종만이 보고되었다. 또한 Gray 등(1984)은 *Nocardia*에 의한 O/W emulsion의 탈유화능이 배양기간에 따라 증가하였으며 이때 *Nocardia*의 세포표면 소수성도 증가하였다고 보고하면서, 이와 같이 탈유화능을 갖는 미생물은 그들의 성장기에 따라 최적의 탈유화능을 갖는 시기가 있으며 이는 세포표면의 소수성과 관련이 있을 것이라 보고하였다.

본 연구에서는 탈유화능이 존재하는 새로운 균주탐색을 위해 비교적 소수성이 높은 방선균을 대상으로 탈유화능 소유 균주를 분리하고 그의 탈유화 특성을 조사하였다.

가. 탈유화능 소유 방선균 분리 및 동정

해양 및 남극에서 채취된 시료를 ISP 4-ASW 고체배지에 (Difco ISP 4 + Aged Sea Water) 도말하여 20℃에서 배양하여 방선균으로 판단되는 콜로니를 다시 ISP 4-ASW 고체배지에 도말하여 순수분리하였다. 이와 같이 분리된 방선균의 탈유화능 조사를 위해 ISP 4-ASW 고체배지에서 8일간 배양한 후, 콜로니 한 백금니를 kerosene과 0.2% Triton X-100이 2:1로 혼합되어 제조된 표준 유상액 3 ml에 접종하여 1분간 강하게 교반하여 정치시킨 다음 탈유화가 일어나는 방선균을 선별하였다.

선별된 탈유화능 소유 방선균의 동정을 위해 ISP 4-ASW 배지에서 20℃, 9일간 배양한 후 콜로니 형태를 관찰하였다. 포자의 관찰을 위해서는 8% glutaraldehyde 용액으로 1일간 예비 고정한 후 포자형성이 잘된 부위를 채취하

여 1일간 건조하고 Bio-Rad E5550 SEM coating system을 사용하여 gold coating한 후 주사 전자현미경(Phillips model 515)상에서 관찰하였다.

화학 분류학적 특성으로 세포벽의 peptidoglycan에 존재하는 diaminopimelic acid (DAP)와 전 균체의 가수분해액에 대한 당 분석을 하였다. 이를 위한 시료의 준비는 Staneck과 Roberts(1974)의 방법을 사용하였으며 TLC를 이용한 분석 방법은 Schaal(19859)에 의한 방법을 이용하였다. DAP 분석을 위해 cap tube에 건조균체 약 0.35 g을 넣고 6 N HCl 2 ml을 넣은 다음 밀봉하여 100°C에서 18시간 동안 반응시킨 후 Whatman No.1 paper로 여과하였다. 여과액을 vacuum evaporator로 80°C에서 감압 건조한 후 0.5 ml의 증류수에 녹인 다음 cellulose F TLC plate (Merck 5565)에 점적하였다. 전개용매는 methanol-pyridine-10 N HCl-water (80:10:12.5:17.5)를 사용하였으며 발색은 0.2% ninhydrin 용액을 분무하여 100°C에서 2분간 가열하였다. DAP의 판정은 표준시료와의 전개거리를 비교하여 나타내었다.

전 균체의 당 분석을 위해 cap tube에 건조균체 약 0.35 g을 넣고 2 ml의 2 N H₂SO₄를 넣은 다음 밀봉하고 100°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 이를 원심분리관에 옮긴 다음 포화된 barium hydroxide 용액을 이용하여 pH가 5.0-5.5가 되도록 조정하였다. 5,000×g에서 5분간 원심분리하여 침전물을 버린 후 상등액은 vacuum evaporator로 80°C에서 감압건조하였다. 여기에 0.5 ml의 증류수를 넣어 녹인 다음 cellulose F_{254S} HPTLC plate (Merck 15036)에 점적하였다. 전개방법은 먼저 n-butanol-water-acetic acid (60:20:20)용액으로 6 cm 정도 전개한 후 건조시키고, ethylacetate-pyridine-water-acetic acid (100:35:25:5)용액으로 12 cm 정도 전개한 후 건조한 다음 다시 2번째 전개용매로 2회 반복하여 전개하였다. 당 발색은 aniline-phthalate시약(aniline 2 ml, phthalic acid 3.3 g, water saturated butanol 100 ml)을 분무한 후 건조하고 100°C에서 5분간 가열하였다. 당의 판정은 각각 1% 용액으로 만든 표준당과의 전개거리와 발색된 색을 비교하여 나타내었다.

탈유화 방선균 8321의 분자생물학적 분류를 위해 ZoBell 배지에서 배양한 후 균체를 회수한 후 Wizard genomic DNA kit (Promega, Madison,WI)를 사용하여 genomic DNA를 추출한 후 PCR방법으로 16S rDNA 부분을 증폭하여 정제한 후 BigDye terminator cycle sequencing kit (PE Applied Biosystems)와 automatic DNA sequencer (Applied Biosystems model 377)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기 서열을 Ribosomal Database Project와 GeneBank nucleotide database와 비교하여 분류하였다.

나. 포자용액 제조

ISP 4-ASW 고체배지에서 20℃, 8일간 배양후 colonies를 회수하여 증류수에 현탁한 다음, 4,000×g에서 10분간 원심분리하여 침전물을 다시 동량의 증류수로 현탁하였다. 현탁액을 sonicator (Branson 8210, USA)를 이용하여 120 watt, 10분간 sonication한 후 cotton wool로 여과하여 균사체를 제거하였다. 균사체가 제거된 용액을 4,000×g에서 10분간 원심분리하여 동량의 증류수로 재 현탁하여 포자용액으로 이용하였다. 제조된 포자용액을 ISP 4-ASW 고체배지에 도말하거나 현미경 상에서 포자수를 측정하였다.

다. 유상액 제조 및 탈유화능 측정

표준 유상액은 kerosene과 0.2% Triton X-100 용액을 2:1로 혼합하여 유화가 일어나지 않을 때까지 교반기(IKA MS1, Works Inc., USA)를 이용하여 최고속도로 혼합하여 제조하였으며, 탈유화능 측정은 유상액이 깨지는 반응은 1차 반응이라는 가정 하에 유상액에 일정부피(0.2 ml)의 포자용액을 첨가하여 교반기에서 최고속도로 1분간 교반한 후 유상액의 부피가 절반으로 줄어드는 시간 (half-life [$t_{1/2}$])으로 결정하였다(Cairns et al., 1984).

포자용액 농도에 따른 표준 유상액의 탈유화 측정은 표준 유상액 3 ml에 포자용액 0.2 ml을 혼합하여 1분간 강하게 교반 후 1분간 정치시켜 남은 유상액의 부피비율로 측정하였다.

유기상 종류에 따른 탈유화능 측정을 위해 유기상 2 ml에 0.2% Triton X-100 용액 1 ml을 혼합하여 유상액을 제조한 후 이 유상액에 0.2 ml의 포자용액을 첨가하여 1분간 강하게 교반한 다음 정치시간에 따라 남아있는 유상액의 부피비율을 측정하였다. 저점도 유기상으로 n-hexane, n-dodecane, n-hexadecane, cyclohexane은 Sigma 제품을 사용하였으며 kerosene, diesel, gasoline은 인근 주유소에서 구입하여 이용하였다. 또한 고점도 유기상으로 liquid paraffine oil (Sigma) 및 soybean oil을 본 실험에 이용하였으며, 점도를 낮추기 위해 이들 고점도 유기상을 kerosene으로 희석하여 이용하였다.

유화제 종류에 따른 탈유화능 측정을 위해 kerosene 2 ml에 실험목적에 따라 희석된 유화제 용액 1 ml을 혼합하여 유상액을 제조하였고, 이 유상액에 0.2 ml의 포자용액을 첨가하여 1분간 강하게 교반 후 정치시간에 따른 남아있는 유상액의 부피비율을 측정하였다. 유화제로는 Corexit 7664, 8667, 9550 (Exxon, USA), Finasol OSR 2, 12, 51, 52 (Italy), BP 700, 1100, 1100X, 1583 (BP, United Kingdom), Triton X-100, Tween 80 (Sigma, USA) 및 Seagreen을 사용하였다.

Water-in-oil (W/O) 또는 oil-in-water (O/W)의 유상액 형태는 친수성인 crystal violet와 친유성인 oil red O (Sigma) 염료가 분산되는 형태에 따라 구분하였다 (Lee et al., 1998).

라. 포자표면의 소수성측정

포자표면의 소수성과 탈유화능과의 상관관계를 측정하기 위해 소수성 측정은 Rosenberg 등(1980)이 기술한 BATH (Bacterial Adherence To Hydrocarbon)

방법을 변형하여 이용하였다.

ISP 4-ASW 고체배지에서 배양기간에 따라 제조된 포자용액을 원심분리 (4,000×g, 10 min)하고 50 mM potassium phosphate buffer로 2회 세척한 후 600 nm에서 흡광도가 1.0이 되도록 완충용액으로 현탁시켰다. 현탁액 2 ml에 kerosene 0.2 ml을 첨가한 후 1분간 강하게 vortexing하여 20분간 정치 후 aqueous phase만을 조심스럽게 취하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 초기치와 비교하여 %로 나타내었다.

$$\text{Hydrophobicity(\%)} = [1 - (\text{후기흡광도}/\text{초기흡광도})] \times 100$$

2. 연구내용

가. 탈유화능 방선균 분리 및 동정

나. 탈유화능 측정 및 비교

다. 탈유화능의 원인이 되는 포자표면 특성 조사

라 생물탈유화제 대량생산을 위한 조건 조사 (submerged culture)

3. 연구결과

가 탈유화능 방선균 분리 및 동정

해양 및 남극시료로부터 분리된 50종의 방선균을 대상으로 Kerosene-0.2% Triton X-100 (2:1) emulsion의 탈유화능을 실험한 결과 탈유화능이 우수한

strain AA8321 균주를 선별하였다. 이 균주의 균사체와 포자의 탈유화능을 측정
한 결과, 이 균주의 탈유화능은 포자에 기인하였다.

이 균주의 형태학적 특성을 보기 위해 ISP 4-ASW 고체배지에서 배양한 결
과 콜로니는 pulvinate형이며 기질균사(substrate mycelia)는 brown색을 나타내
고 그 위로 ivory색의 기중균사(aerial mycelia)를 형성하였다. 기중균사는
rectiflexibilis 형태를 보였으며 기질균사의 fragmentation은 발견되지 않았다.
기중균사는 약 20개 정도의 포자가 사슬을 형성하고 있으며 포자의 표면은 주사
전자현미경으로 관찰한 결과 특이적인 돌출물을 갖고있지 않는 smooth 형태였
다. Strain 8321 균주는 세포벽 분석 결과 LL-DAP 을 갖고 있으며 전 균체 가
수분해액의 분석에서 당으로는 glucose와 ribose를 갖고 있는 것으로 나타났으며,
세포벽 특성에 따른 분류방법 (Goodfellow & Minnikin, 1985; Lechevalier, 1989;
Lechvalier & Lechevalier, 1981)에 의해 strain AA8321은 I형의 세포벽을 갖는
방선균으로 분류되었다.

탈유화 방선균 AA8321의 분자생물학적 분류를 위해 genomic DNA를 추출
한 후 PCR방법으로 16S rDNA 부분을 증폭하여 정제한 후 염기서열을 결정한
후 Ribosomal Database Project와 GeneBank nucleotide database와 비교하여
분류하였다. Strain AA8321은 형태학적, 화학분류학적, 분자생물학적 실험결과들
에 의하여 *Streptomyces* sp.로 동정하였다.

나. 유기상 종류에 따른 탈유화능

ISP 4-ASW 고체배지에서 8일간 배양된 *Streptomyces* sp. AA8321 균주의
포자용액을 제조한 뒤 포자농도에 따른 kerosene-0.2% Triton X-100 (2:1)의 표
준 유상액에 대한 탈유화능을 실험한 결과 Fig. 3-4-1에서 보는바와 같이
 1.0×10^7 spores/ml에서부터 탈유화가 시작되어 포자농도에 비례하여 탈유화능이
증가되는 것을 관찰하였으며, 1분간 정치 시 95%이상 탈유화가 일어난 농도는

1.1×10^8 spores/ml로 나타나 이 농도의 포자용액을 탈유화 실험에 이용하였다.

유기상 종류에 따른 *Streptomyces* sp. AA8321 포자용액의 탈유화능을 보기 위하여 2 ml의 유기상에 0.2% Triton X-100 1 ml을 첨가하여 유상액을 제조한 다음 포자용액 0.2 ml을 첨가한 후 1분간 교반하여 정치시간에 따라 남아있는 유상액의 비율을 측정하였다. 저점성인 단일 탄화수소 중에서는 n-hexadecane이, 복합 탄화수소에서는 kerosene 및 diesel 등 탄소수가 많은 유기상에서 탈유화가 1분 이내로 나타나 탄소수가 적은 유기상인 n-hexane, n-dodecane 및 gasoline에 비해 탈유화가 빨리 일어났다. 이는 탄소수가 많은 유기상의 유화상태에서 기름구의 크기를 현미경상으로 관찰한 결과 탄소수가 적은 것보다 비교적 크게 형성되어 있는 것으로 미루어 탄소수가 높은 유기상의 유화상태가 불안정하기 때문일 것으로 사료된다. 또한 유상액이 깨지는 반응이 1차 반응이라는 조건하에서 볼 때 (Cairns et al., 1982) 기름구의 크기가 작게 형성이 되어있으면 상대적으로 동일부피의 유상액 내에서 기름구의 수가 증가됨으로써 탈유화 반응시간이 길어지게 된다고 추정된다.

한편 고점성 유기상으로 이용된 liquid paraffin oil 및 soybean oil의 경우 저점성 유기상에 비해 탈유화능이 매우 낮아 24시간 후에도 20-30%만이 탈유화가 일어났다. 이는 유상액의 점도가 높음으로 인해 유상액과 포자간의 충분한 반응이 일어나지 않았기 때문으로 사료되는데, 실제로 반응시간을 증가시키거나 온도를 증가시킴으로써 탈유화 속도를 증가시킬 수가 있었다. 또한 이들 고점성 유기상을 kerosene으로 희석한 결과 희석비율에 따라 비례하여 탈유화 속도가 증가됨을 관찰하였다. 이들 고점성 유기상을 kerosene으로 2배 이상 희석한 후에는 10분 이내에 완전 탈유화가 일어남이 관찰되었는데 이는 탈유화에 있어 유기상의 물리적 상태인 점도가 탈유화 조건에 큰 영향을 미침을 알 수 있었다.

결론적으로 유기상 종류에 따른 탈유화능 조사에서 저점성인 단일 탄화수소

중에서는 n-hexadecane이, 복합 탄화수소에서는 kerosene 및 diesel유의 탈유화가 1분 이내로 나타나 탄소수가 적은 유기상에 비해 빨리 일어났고, 고점성 유기상으로 이용된 liquid paraffin oil 및 soybean oil의 경우 저점성 유기상에 비해 탈유화능이 매우 낮아 24시간 후에도 20-30%만이 탈유화가 일어났다.

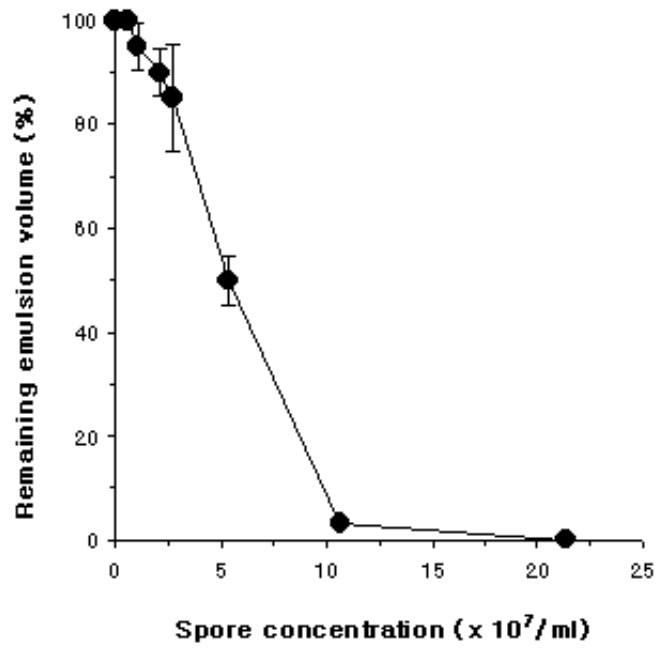


Fig. 3-4-1. Changes in spore concentration and demulsification ability toward kerogen-Triton X-100 (2:1) emulsion.

다. 포자표면의 소수성과 탈유화능

포자표면의 소수성과 탈유화능과의 상관관계를 조사하기 위해 ISP 4-ASW 고체배지에서 *Streptomyces* sp. AA8321 균주를 배양시간에 따라 포자표면의 소수성과 탈유화능을 측정하였다. Table 3-4-1에서 보는바와 같이 포자가 형성되기 시작하는 4일째에는 소수성이 BATH 방법으로 약 20% 정도였고 이때 표준 유상액의 탈유화 속도 $t_{1/2}$ 은 약 10시간 정도였다. 그러나 배양시간에 따라 소수성이 증가되면서 탈유화 속도도 증가되어 배양 7일째에 소수성이 약 67%에 도달하였고 $t_{1/2}$ 도 20초 이내로 나타났다. 그 이후의 배양에서는 소수성은 약간 증가하였으나 탈유화 속도는 더 이상 증가하지 않았다.

이와 같이 세포표면의 소수성이 증가함에 따라 탈유화능이 증가한다는 것은 세포의 표면과 유상액 또는 기름구의 표면이 반응한다는 것을 의미한다. Cairns 등(1982)도 유상액이 깨지는 반응을 1차 반응이라 가정한 것은 세포의 표면이 탈유화에 관여하기 때문이고, 이는 세포표면의 소수성이 배양기간에 따라 증가되었고 이에 비례하여 탈유화능이 증가됨으로써 설명이 가능하였다. 또한 Cairns 등(1982)은 세포표면의 소수성을 증가시키기 위해 hydrophobic polymer로 poly- β -hydroxybutyric acid를 coating한 결과 탈유화능이 향상되었다고 보고하였다.

Bennett's agar plate에서 2주 이상 배양된 포자를 회수하여 포자용액을 만들어 sonication 처리한 후 표준 유상액에 대한 탈유화능 존재 여부를 관찰한 결과 탈유화능이 상실됨을 관찰하였다. 한편 포자용액을 121°C에서 15분 동안 autoclave한 결과에서는 탈유화능이 유지되었다. 이때 autoclave된 포자용액을 광학 현미경상에서 관찰한 결과 포자형태가 유지되고 있었으나 이 용액을 agar plate에 도말한 결과에서는 재성장이 일어나지 않아 포자는 모두 사멸되었음을

확인하였다. 이상의 결과로부터 *Streptomyces* sp. AA8321에 의한 탈유화능은 방선균의 세포질 성분이나 다른 특정물질과는 무관한 것으로 추정되며 탈유화능은 포자표면의 구조적 특성에 기인한 것으로 사료된다.

Table 3-4-1. Demulsification activity($t_{1/2}$) and cell surface hydrophobicity of spore solution with different culture age*.

Culture age (day)	$t_{1/2}$ in the presence of spore	Hydrophobicity (%)
4	10 hrs	20.4±0.5
5	1 hrs	47.2±1.4
6	25 min	59.7±2.1
7	20 sec	66.5±1.1
8	20 sec	70.1±0.8
10	20 sec	70.8±2.3
15	20 sec	72.4±1.2

* spore concentration was 1.1×10^8 spores/ml.

라. 유화제 종류 및 농도에 따른 탈유화능

유화제 종류 및 농도에 따른 *Streptomyces* sp. AA8321의 탈유화능을 보기 위하여 2 ml의 kerosene에 유화제 1 ml을 첨가하여 유상액을 제조한 다음 ISP 4-ASW 고체배지에서 8일간 배양한 *Streptomyces* sp. 8321 포자 용액을 첨가한 후 1분간 교반하여 정지시간에 따라 남아있는 유상액의 비율을 측정하였다.

Table 3-4-2에서 보는바와 같이 Seagreen과 kerosene으로 이루어진 유상액은 water-in-oil (W/O) 유상액 이였고, 나머지 유상액은 모두 oil-in-water (O/W) 유상액 이였다. 이들 O/W 유상액은 대부분 $t_{1/2}$ 이 5초 미만으로 반응이 즉시 일어남을 관찰하였고, 1분 이내에 완전 탈유화가 일어났다. Corexit 7664, 8667, Triton X-100 및 Tween 80으로 이루어진 O/W 유상액은 이들 유화제의 농도가 증가함에 따라 탈유화 속도가 감소하는 것을 관찰하였다. 그러나 Seagreen으로 이루어진 W/O 유상액의 경우 $t_{1/2}$ 이 5% seagreen에서 4시간이었고, 10%에서는 24시간으로 나타났다.

이와 같이 유화제 농도 증가 및 저점성 유기상 중 탄소수가 적은 것의 탈유화 속도가 감소하는 것은 유상액 내의 기름구 크기와 관계된 것으로, 유상액 내의 기름구 크기가 감소하게 되면 동일 부피내에 많은 기름구를 형성하게 되고, 이에 따라 포자표면과 반응하는 표면적이 커져 탈유화 반응시간이 길어진 것으로 사료된다.

또한 이 균주의 탈유화능은 W/O 유상액 보다는 O/W 유상액에 효과적임을 보여주었고, 많은 경우 기름-물 유상액이 O/W 형태임을 감안할 때 *Streptomyces* sp. 8321의 생물 탈유화제가 폭넓은 분야에 이용될 수 있는 가능성을 지녔다고 사료된다.

Table 3-4-2. Composition of emulsions used to test biodemulsification and $t_{1/2}$ of these emulsions when mixed with spore solution of strain AA8321.

Emulsifiers (1ml)		Solvent (2ml)	Type	$t_{1/2}$ in presence of spore
Corexit 7664	0.2%	Kerosene	O/W	17 sec
	0.5%	Kerosene	O/W	42 sec
8667	0.2%	Kerosene	O/W	10 sec
	0.5%	Kerosene	O/W	25 sec
9550	0.2%	Kerosene	O/W	< 5 sec
	0.5%	Kerosene	O/W	< 5 sec
Finasol OSR2	0.2%	Kerosene	O/W	< 5 sec
	0.5%	Kerosene	O/W	< 5 sec
12	0.2%	Kerosene	O/W	< 5 sec
	0.5%	Kerosene	O/W	< 5 sec
51	0.2%	Kerosene	O/W	< 5 sec
	0.5%	Kerosene	O/W	< 5 sec
52	0.2%	Kerosene	O/W	< 5 sec
	0.5%	Kerosene	O/W	< 5 sec
BP 700	0.2%	Kerosene	O/W	< 5 sec
	0.5%	Kerosene	O/W	< 5 sec
1100	0.2%	Kerosene	O/W	< 5 sec
	0.5%	Kerosene	O/W	< 5 sec
1100X	0.2%	Kerosene	O/W	< 5 sec
	0.5%	Kerosene	O/W	< 5 sec
1583	0.2%	Kerosene	O/W	< 5 sec
	0.5%	Kerosene	O/W	< 5 sec
Seagreen	5.0%	Kerosene	W/O	4 hrs
	10.0%	Kerosene	W/O	24 hrs
Triton X-100	0.2%	Kerosene	O/W	20 sec
	0.5%	Kerosene	O/W	10 min
Tween 80	0.2%	Kerosene	O/W	< 5 sec
	0.5%	Kerosene	O/W	6 min

마. 탈유화능의 비교

해양에서 분리한 방선균 AA8321균주를 해수가 첨가된 ISP 고체 배지에서 8일간 배양하여 얻은 포자를 1.1×10^8 spores/ml로 유상액에 첨가하여 탈유화능을 조사한 결과, n-hexadecane과 kerosene 및 diesel유의 탈유화가 1분 이내로 나타났으며, 0.2% Triton X-100/Kerosene (1:2) 유상액에 대한 탈유화 속도 ($t_{1/2}$)는 20초 이내였다. 탈유화능이 높다고 알려진 *Nocardia amarae*의 탈유화능 및 합성탈유화제인 N-7733 (Nalco, USA)의 탈유화능과 비교하여, 해양 방선균으로부터 생산되는 포자의 탈유화능이 높음을 알 수 있었다 (Table 3-4-3).

Table 3-4-3. Comparison of de-emulsifiers.

De-emulsifier	emulsion	$t_{\frac{1}{2}}$
· <i>Streptomyces</i> sp. AA8321 spore (1.1×10^8 spores /ml)	T/K (1:2)	20 sec.
	T80/K (1:2)	< 5 sec.
	T/C16 (1:2)	< 1 sec.
· <i>Nocardia amarae</i> (concentrated cells from 1 ml culture broth)	P/C16 (1:1)	2.5 min.
	P/K (1:1)	20 sec.
·N-7733 10%	P/C16 (1:1)	< 2 min.

T, 0.2% Triton X-100; T80, 0.2% Tween 80; P, Pluronic L 90;
C16, n-hexadecane

바. 생물탈유화제 대량생산을 위한 조건 조사 (submerged culture)

생물탈유화제 대량생산을 위한 조건을 확립하기 위해 배지조성에 따른 submerged culture를 이용하여 포자생성여부를 광학현미경으로 관찰한 결과 Table 3-4-4에서 보는 바와 같이 hexadecane, YED 및 MM 배지에서 모두 7일 배양 후 포자가 형성되는 것을 관찰하였다. 특히 YED-10 배지에서 24시간 배양 후 MM 배지에 10%(v/v) 재 접종한 경우 배양 3일차에서부터 포자가 형성되었고 7일 후에는 배양액내에 mycelia는 관찰되지 않아 mycelia 모두가 포자형성을 한 것으로 추정되었다. 이는 submerged culture에서 포자를 형성하는 방선균이 극히 제한적임을 감안할 때 매우 고무적인 결과로 사료된다.

그러나 submerged culture에서 형성된 포자를 가지고 표준 유상액의 탈유화능을 조사한 결과 탈유화능이 존재하지 않았으며, 4주 이상을 배양 한 후에도 탈유화능은 관찰되지 않았다. 이는 액체배양에 의한 형성된 포자와 고체배지에서 형성된 포자의 표면구조 차이에 기인한 것으로 추정된다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 *Streptomyces* sp. AA8321에 의한 탈유화능은 포자표면의 구조적 특성에 기인한 것으로 사료되며, 이를 확인하기 위해서 전자현미경적 연구를 계획 중에 있다. 또한 생물탈유화제의 이용성 조사를 위해 유기용매 회수공정에서 응용방안, 기존 유수분리장치의 개선혹은 대체 방안을 모색 중에 있다. 한편 탈유화능 소유 포자를 대량생산하기 위한 방안으로 더욱 다양한 배지성분과 배양조건을 탐색하는 연구를 수행해야 할 것이다.

Table 3-4-4. Spore formation and de-emulsifying activity of *Streptomyces* sp. AA8321 by submerged culture

media (components of media)	submerged spore formation		de-emulsifying activity
	after 3 d	after 7 d	
Hexadecan medium (Hexadecan;4g/L, Yeast Extract;1g/L, pH;7.0)	-	+	-
YED-1 medium (Glucose;1g/L, Yeast Extract;1g/L, pH;7.0)	-	+	-
YED-10 medium (Glucose;10g/L, Yeast Extract;10g/L, pH;7.0)	-	++	-
MM medium (K ₂ HPO ₄ ;7g, KH ₂ PO ₄ ;2g, (NH ₄) ₂ SO ₄ ;1g, Glucose;1g, Sodium citrate;0.5g, MgSO ₄ .7H ₂ O;0.1g, pH;7.0)	++	+++	-

제 5 절 해양미생물유래 다당류 연구

세포외 다당류를 생성하는 미생물을 분리, 동정하였으며 탄소원, 질소원, 염류 및 금속이온 첨가에 따른 다당류 생산을 위한 최적 배양조건을 규명하였고 생성된 세포외다당류의 점도, 응집활성, 용해성, 유화안정성, 분자량을 측정하였으며 구성하고 있는 당성분을 분석하였다.

1. 이론적, 실험적 접근방법

미생물에 의해 세포외로 분비되는 다당류(extracellular polysaccharide, EPS)는 세균을 다른 생물체로부터 보호하거나 항체에 대한 방어역할, 주위 환경의 독성물질을 중화시키거나 금속이온과의 착화합물을 형성하며, 건조한 환경에서 세포내의 수분이 증발하는 것을 막는 등 세균 생존과 관련된 여러 가지 기능을 수행하기도 한다 (Sutherland, 1977; Sutherland, 1983).

이러한 미생물성 EPS는 조건에 따라 겔 형성능, 유화안정능, 표면장력의 조절능, 물흡수능, 점착능, 윤활능 및 필름형성능 등의 광범위한 기능성을 갖고있어, 식품산업에서는 샐러드 소스, 치즈, 달걀 대용품, 푸딩, 음료, 분말스프 제조 등에 이용되며 식품분야 외에도 연마제, 접착제, 분무제, 세라믹제, 화장품, 잉크, 페인트 및 종이제조 등의 각종산업에 이용되고 있다 (Fu and Tseng, 1990; 김 등, 1990; Irene et al., 1990; Marra, 1990; Martins et al., 1990; Low et al., 1998). 또한 중금속 흡착능(Norberg and Persson, 1984), 항중양활성 (Oda et al., 1983) 및 항궤양능 (Nagaoka et al., 1994)을 갖는 EPS가 보고되어, 신 바이오 소재로서 산업적 잠재력이 크다.

이러한 미생물 유래의 다당류는 산업적 이용의 높은 잠재력과 함께, 배양조건 및 생산조건을 개선하여 생산성을 높일 수 있으며, 단기간에 발효조를 이용한

연속배양에 의해 대량생산이 가능하고 생산된 다당류의 분리, 회수가 용이하다는 장점을 갖고 있어 주목받고 있다.

한편, 해양 유래 미생물에서의 다당류 생산은 *Zoogloea* sp.가 생산하는 zooglan (Ikeda et al., 1982) 및 *Pseudomonas* sp. (Worawattanamateekul and Okutani, 1992; Matsuda and Worawattanamateekul, 1993), *Vibrio fischeri* (Rodrigues and Bhosle, 1991), *Cyanothece* sp. (Philippis et al., 1993), *Altermonas macleodii* (Raguens et al., 1996) 등에 의한 EPS가 보고되었고, 한국 연안으로부터 다당류를 생성하는 해양세균에 대한 보고는 *Zoogloea* sp.(KCCM 10036) (장재혁 등, 1998) 정도로 그 수가 많지 않다.

따라서, 본 연구에서는 제주도 및 마라도 해안에서 다당류를 생산하는 새로운 균주를 분리하고, 배양 조건과 생성된 다당류의 특성을 조사하였다.

가. 다당류 생성 미생물의 분리

사전조사에 의해 선정된 제주도 및 마라도의 조간대 지역에서 채취한 시료를 생리식염수로 희석하여 ZoBell 고체배지(peptone 5 g, yeast extract 1g, FePO₄ 0.01 g, agar 15 g, 증류수 250 ml, 숙성해수 750 ml)에 도말하여 상온에서 배양 후 형성된 콜로니로부터 점성을 갖는 균주를 분리하였다. 분리된 균주는 해수가 첨가된 YMG 액체배지(glucose 10 g, peptone 5 g, yeast extract 3 g, malt extract 3 g, 증류수 500 ml, 숙성해수 500 ml)에 각각 1 백금니씩 접종하여 25℃에서 7일간 120 rpm으로 진탕배양한 후 배양액을 원심분리하여 얻은 상등액에 2배의 ethanol을 첨가한 다음 침전되는 다당류를 회수하여 건조기에서 건조된 다당류의 회수율이 높은 균주를 최종적으로 선별하였다. 선별된 균주의 특징 분석은 Holt (1984)의 방법을 따랐다.

나. 다당류의 분리

분리균주로부터 생산된 다당류의 분리는 배양액을 2배의 증류수를 가하여 잘 현탁한 다음 원심분리(11,000×g, 30분)하였다. 다시 상등액에 2배의 methanol과 chloroform을 가하여 색소를 포함한 지용성 물질을 제거한 후 상등액에 2배의 ethanol을 가하여 다당류를 침전시킨 후 동일 알콜로 2번 세척하여 동결건조한 것을 crude exopolysaccharide로 사용하였다.

다당류 생성 미생물 96CJ10356의 경우 ZoBell 배지를 이용하여 5일간 배양하여 100 ml의 배양액에 100 ml의 증류수 (DW) 및 0.1 g의 건조된 diatomaceous earth를 (Sigma, St. Louis) 첨가하여 잘 섞은 후 원심분리 하였다 (10,000 ×g, 20 min and 4℃). 침전물은 DW로 세척하여 80℃에서 3일간 건조한 후 균체량으로 측정되었다. 상등액에 2배의 methanol과 chloroform를 첨가하여 강하게 섞은 후 아랫부분의 chloroform 층은 분별 깔때기를 이용하여 제거하였다. 남은 혼합물에 동량의 ethanol을 가하여 4℃에서 하루 동안 방치한 후, 20분간 4℃에서 10,000×g로 원심분리하였다. 침전물은 80℃에서 3일간 건조한 후 EPS-R의 생산량으로 측정되었다.

다. 다당류 생성 미생물의 분류계통학적 분류 및 동정

다당류 생성 미생물의 분류 및 동정을 위하여 현미경을 이용한 미생물의 형태 관찰, 다양한 기질의 이용능력 및 16s rDNA 염기서열을 결정하여 기존의 data base와 비교하였다.

다당류 생성 미생물을 기본배지에서 (BM; trypton 10 g, Sucrose 20 g, MgSO₄ 4 g, CaCl₂ 7 g, KH₂PO₄ 0.07 g, K₂HPO₄ 0.08 g, FeCl₃ 5 mg, MnCl₂ 1 mg, Na₂MoO₄ 1 mg, ZnCl₂ 1 mg, NaCl 10 g, distilled water 1 liter) 3일간 배양한 후, differential interference microscope (Nikon)과 Phillips models SEM

515 scanning and CM 20 transmission electron microscopes를 이용하여 미생물의 형태를 관찰하였다. pH 7로 조정된 2% phosphotungstic acid로 Robinson 등 (1987)의 방법에 따라 negative staining을 수행하였다. 0.3% 과산화수소를 사용하여 catalase 생성여부를 확인하였으며 Kovacs (1956)의 방법에 따라 oxidase 생성여부를 조사하였다. 기본배지에서 5 ~ 50℃의 온도로 성장온도 범위를 조사하였다. API 20E와 20NE strips(bioMerieux)을 사용하여 생화학 시험을 수행하였으며, 기본배지를 바탕으로 유일 탄소원의 이용능을 조사하였다. Acid production 시험에서 bromothymol blue를 0.05 g/l로 첨가해 주었다. DNA 염기 조성 분석을 위하여 Chun과 Goodfellow (1995)의 방법에 따라 DNA를 준비하였으며, G+C 함량은 Mandel과 Marmur의 thermal denaturation 방법 (1968)에 따라 조사하였다. 16s rDNA 분석은 Chun과 Goodfellow (1995)의 방법을 따라 염기 서열을 결정한 후 Ribosomal Database Project (Maidak et al., 1997)과 Genebank databases와 비교하여 phylogenetic tree를 결정하였다.

라. 다당류 생산 조건

다당류 생산을 위한 최적 배양조건은 해수가 첨가된 YMG 배지를 이용하여 25℃에서 5일 동안 120 rpm에서 진탕배양하는 것을 기본으로하여 검토하였다. 각 항목의 최적조건 선정은 건조 균체량(105℃, 3시간 건조)에 대한 다당류의 생산비율이 상대적으로 높은 것을 택하였다.

EPS-R의 생성에 대한 영양원의 영향을 조사하기 위하여 탄소원, 질소원, NaCl, MgSO₄, CaCl₂, 및 인산염을 각각 조사하였다. YMG medium을 기본 배지로 하여 96CJ10356를 7일간 25℃에서 120 rpm으로 진탕 배양하였다. 탄소원과 질소원이 EPS-R의 생산에 주는 영향을 조사하기 위하여 YMG 배지의 탄소원과 질소원 대신 각각 2, 0.5%로 첨가하였으며, glucose, galactose, fructose, maltose,

sucrose, lactose, 및 starch를 탄소원으로 사용하였으며, 질소원으로 peptone, yeast extract, malt extract, tryptone, soytone, casein, NH_4NO_3 , NaNO_3 , NH_4Cl , 및 $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ 를 사용하였다. NaCl 은 0 ~ 200 g/l로 첨가하였으며, MgSO_4 와 CaCl_2 는 0 ~ 20 g/l로 첨가하여 무기염류의 영향을 조사하였다. 또한 phosphate의 EPS-R 생산에 대한 영향을 조사하기 위하여 1 ~ 50 mM로 배지에 첨가하였다.

마. 다당류 생성에 대한 통기량의 영향

다당류의 대량생산을 위한 조건중의 하나로 5-liter 발효조에서 통기량의 영향을 조사하였다. 25°C, 300 rpm의 조건으로 통기량을 달리하여 배양하였으며, 생산된 다당류의 양은 80°C에서 3일간 건조한 건조중량으로 결정하였다.

통기량이 EPS-R의 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 5-liter jar fermentor에서 working volume 3 liter로 실험하였으며, 통기량은 각각 0.17, 0.5, 1.0, 그리고 1.5 vvm으로 조정하였다. 실험에 STN 배지를 사용하였으며, 25°C, 300 rpm의 조건으로 배양하였다.

바. 다당류의 응집활성 및 겔보기 점도

다당류의 겔보기 점도를 측정하기 위하여 시간별로 배양액을 회수하여 점도계를 사용하였다. 배양액의 겔보기 점도를 측정하기 위하여 Viscostar-R을 (J. P. SELECTA, Spain) 사용하였으며, R2 spindle을 사용하여 1, 2, 5, 10, 20, 30, 50 그리고 60 rpm의 속도로 측정하였으며 #2, #3, #4, #5 spindle을 사용하였다.

응집 활성을 측정하기 위하여, 균체가 제거된 0.1 ml의 배양액에 0.5% 활성탄 10 ml 및 0.01% CaCl_2 0.1 ml을 가하고 vortexer를 (IKA MS1, Works Inc.) 이용하여 잘 혼합한 후 10분간 방치하였다. 1 ml의 상등액을 취하여 550 nm에서 (UV-2401PC, Shimadzu, Japan) 흡광도를 측정한 후 Nakamura *et al.* 의 (1976)

방법에 따라 다음과 같이 응집 활성을 계산하였다.

$$\text{Flocculation activity (U/ml)} = (A - B)/A \times 100 \times \text{dilution rate}$$

A: absorbance of reference sample

B: absorbance of reaction mixture

사. 다당류의 분자량 및 성분분석

EPS-R의 분자량 측정을 위하여 dextran을 (분자량 2 mDa, 500 kDa, 70 kDa; Sigma) 표준당으로 이용하여 gel filtration 방법으로 측정하였다. Sephadex G-200 (Pharmacia) column에 (15×600 mm) 시료를 점적한 후 0.4 M의 NaCl로 용출시켜 얻은 분획의 당을 anthrone-sulfuric acid 방법으로 (Daniels *et al.* 1994) 정량하였다.

EPS-R의 당 조성 분석을 위한 시료의 준비는 Staneck과 Robert(1974)의 방법을 사용하였으며 TLC를 (thin layer chromatography) 이용한 분석방법은 Schaal(1985)에 의한 방법을 이용하였다.

가수분해된 EPS-R을 얻기 위하여 50 mg의 EPS-R을 2 ml의 2 N H₂SO₄에 녹여 100°C에서 2시간 동안 가열처리하고 Ba(OH)₂로 중화시킨 후 원심 분리하였으며 (17,212×g, 10 min), 상등액을 0.25 μm membrane filter로 여과 하여 감압 농축하였다. 가수분해 산물은 TLC분석을 위해 증류수 0.4 ml에 녹여 cellulose F_{254S} TLC 판에 (Merck) 점적한 후, n-butanol-water-acetic acid (60:20:20) 용액으로 6 cm 까지 전개시킨 후, ethylacetate-pyridine-water-acetic acid (100:35:25:5) 용액으로 12 cm 까지 2회 전개하였다. 당의 발색은

aniline-phthalate 시약을 (aniline 2 ml, phthalic acid 3.3 g, water saturated butanol 100 ml) 분무한 후 건조하고 100°C에서 5분간 가열하였다. 산으로 가수분해한 EPS-R의 liquid chromatography는 Spectra SYSTEM P-2000를 (Thermo Separation Products Inc., U.S.A) 사용하여 분석하였으며, YMC-Pack NH₂ column을 (YMC Co., Japan, 4.6×250 mm) 사용하여 30°C에서 water-acetonitrile을 (15:85) 용매로 1.5 ml/min의 속도로 용출시켜 refractive index detector를 (HP 1047A, Hewlett Packard, Germany) 이용하여 표준당과 비교하여 EPS-R이 함유하는 단당류를 분리 확인하였다.

아. 다당류의 용해성 및 유화안정성

다당류의 용해성을 조사하기 위하여 다양한 용매를 사용하여 용해 정도를 확인하였다. 물, acetic acid, acetone, ethanol, methanol, formaldehyde, benzene, chloroform, ethylether, 5 N NaOH 및 5 N HCl 등에 0.3% (w/v) EPS-R을 첨가한 후 상온에서 20분간 교반하였다.

유화안정성을 조사하기 위하여 유상액과 다당류를 혼합하여 유상액의 분리 정도를 경시적으로 확인하였으며, 기존의 유화안정제와 비교하였다. 다당류 EPS-R의 유화 안정성을 조사하기 위해 옥수수 기름 4 ml에 0.5% (w/v) EPS-R 용액 6 ml을 첨가한 후 교반기(IKA MS1, Works Inc., USA)를 이용하여 최고속도로 혼합하여 O/W (oil-in-water) 유상액을 제조하였다. 유화 안정성은 정치시간에 따른 유상액의 분리정도로 측정하였다.

2. 연구내용

가. 다당류 생성 미생물의 분리 및 동정

나. 다당류 생산 최적 배양조건

- 최적 배지
- 다당류 생성에 대한 통기량의 영향

다. 다당류의 특성

- 다당류의 응집활성 및 걸보기 점도
- 다당류의 분자량 및 성분분석
- 다당류의 용해성 및 유화안정성

3. 연구결과

가. 다당류 생성 미생물의 분리 및 동정

다당류를 생성하는 해양성 미생물을 분리하기 위해 제주도 및 마라도의 조간대 지역에서 채취한 시료를 ZoBell 고체배지에 도말하여 점성을 갖는 콜로니를 일차적으로 분리하였다. 그 결과 총 119 균주를 분리하였으며, 그중 해수가 첨가된 YMG배지에서 다당류의 생성이 우수한 96CJ10356 균주를 선발하였다.

96CJ10356 균주는 그람음성, 간균으로 크기는 1~5 μm 로, 편모를 가지고 있어 운동성이 있는 세균으로 배양일수에 따라 크기가 1~2 mm인 granule을 형성하였다. 콜로니 색깔은 배양일수에 따라 연황색에서 빨간색으로 변하였고, 외형적으로는 초기 광택의 원형콜로니에서 점액성의 화산모양으로 콜로니형태가 변하였다. 특히 콜로니가 한천배지 상에서 쉽게 분리되지 않을 정도로 접착성이 강하였다.

또한 분리균주는 oxidase와 catalase를 생성하였으며, lactose, starch 및 casein을 이용하였다. 또한 호기성 및 혐기성 조건에서 모두 성장이 좋으며, 성

장 온도 범위는 20 ~ 45℃이며, esculine과 gelatin을 가수분해할 수 있으며, DNA의 G+C 몰비는 55%였다. NaCl이 첨가되지 않은 배지에서 성장을 못하였으며 농도가 5% 이상에서도 성장이 되지 않았다. 또한 Mg⁺⁺ 및 Ca⁺⁺을 필수적으로 요구하여 96CJ10356 균주는 해양성 미생물임을 확인할 수 있었다.

다당류 생성 미생물의 거의 완전한 16S rDNA 염기서열(1,422 bp)을 결정하여 Genebank와 ribosomal database project (Maidak et al., 1997)의 database와 비교 분석하여 *Proteobacteria*의 gamma subclass로 확인되었으며, 새로운 속, 종의 미생물로 확인되어 *Hahella chejuensis*로 명명하였다 (Fig. 3-5-1).

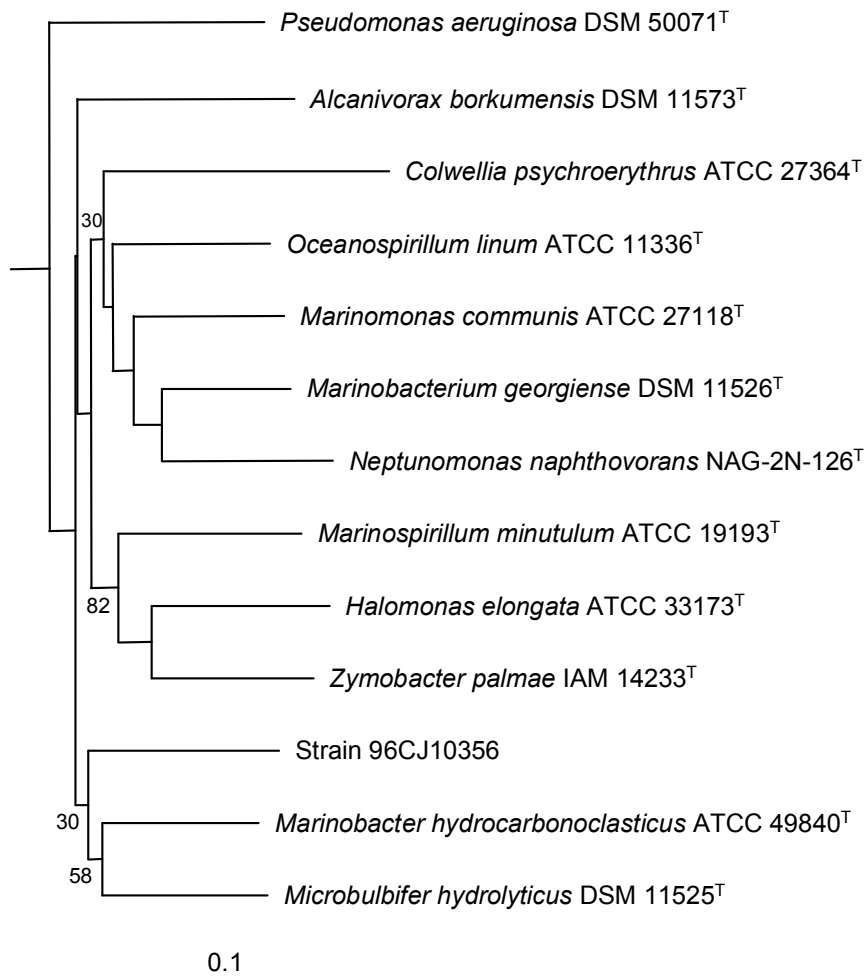


Fig. 3-5-1. Neighbor-joining tree based on nearly complete 16S rDNA sequences showing relationships between strain 96CJ10356 and members of the gamma *Proteobacteria*.

The percent numbers at the nodes indicate the levels of bootstrap support for the branch point based on neighbor-joining analyses of 1,000 resampled data sets. *Rhizobium leguminosarum* (accession number D14513) was used as an outgroup. The scale bar indicates 10 nucleotide substitutions per 100 nucleotide positions.

나. 다당류 생산 최적배지

탄소원은 미생물성 다당류의 생산과 물성에 큰 영향을 미치므로 glucose를 비롯하여 galactose, maltose, sucrose, fructose, lactose, potato starch 등 7종의 탄소원을 20 g/l를 첨가하여 실험한 결과, sucrose에서 약 8.23 g/l의 다당류 (EPS-R)를 생성하여 가장 높은 수득율($Y_{p/s}=0.41$)을 보였다 (Table 3-5-1).

질소원은 미생물의 성장과 다당류 생산을 위한 효소의 생합성에 아주 중요한 인자이므로 NH_4NO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, NaNO_3 등의 무기 질소원과 peptone, yeast extract, casein, tryptone, soytone, malt extract 등의 유기 질소원을 5 g/l로 첨가하여 실험한 결과, 무기 질소원보다 유기 질소원의 생산성이 상대적으로 월등히 높았으며, 그 중 tryptone이 가장 높은 수득율($Y_{p/s}=0.41$)로 8.24 g/l의 다당류를 생성하였다.

탄소원과 질소원의 비율(C/N ratio)을 조사하기 위하여 2% sucrose에 tryptone을 각 농도 별로 첨가하여 실험한 결과, Table 3-5-2에서 보는 바와 같이 최적 C/N ratio는 2로 나타났다. 미생물성 다당류를 생산하는데 C/N ratio는 10-40 정도 요구된다는 결과(Fu and Tseng, 1990)와는 약간 다른 경향을 나타냈으나, *Xanthomonas* sp. (Berkely et al., 1985)와 *Azotodbaactor* sp.(Sutherland and Ellwood, 1979) 균주 등은 탄소원이 제한되었을 때 다당류의 생산이 많았다는 보고와는 비슷한 경향을 나타내는 것으로 미루어, 균주와 생산되는 다당류의 특성에 따라 다당류 생산을 위한 C/N ratio는 상이하다는 것을 알 수 있었다.

96CJ10356 균주가 해양성 미생물임을 고려, NaCl 영향을 조사하기 위해 해수가 첨가되지 않은 YMG배지에 NaCl을 0-10 % (w/v)으로 첨가하여 다당류 생성을 측정한 결과, 이 균주는 성장에 반드시 NaCl을 요구하는 halophile로, 1%

(w/v) NaCl 첨가에서 약 4.3 g/l의 다당류를 생성 가장 높은 수율을 보였다 (Table 3-5-3). 그러나 이 균주는 고염 농도에서는 성장하지 못하여 강호염성은 아닌 것으로 나타났다. 또한, 다당류 생산에 영향을 미치는 염류와 금속이온을 조사한 결과 MgSO₄ 및 CaCl₂의 최적농도는 각각 4 g/l 및 0.7 g/l로 나타났으며, FeCl₃, MnCl₂, Na₂MoO₄ 및 ZnCl₂는 큰 영향을 미치지 않았다. 미생물 증식시 RNA 합성, 세포벽의 구조 및 역할에 영향을 주어 다당류 생합성에 관여하는 칼륨이온과 인산에 대한 영향을 조사하기 위하여 KH₂PO₄와 K₂HPO₄를 혼합한 완충용액(pH 7.0)을 첨가하였다. 다당류 생성에 있어 문제점으로 배지의 점도가 증가하여 교반이 어려워지므로 발효조내의 pH를 고르게 조절하기 힘들게 된다. 따라서, 보다 오랫동안 초기 pH를 유지하기 위한 목적으로 인산염 완충용액을 사용하였다. 그 결과 최적농도는 1 mM이었다. 또한, 초기 pH에 대한 영향을 검토하기 위해 pH 3~11 범위에서 실험을 수행하였고, 이때 1 mM의 인산염 완충용액의 pH도 조사범위의 pH와 동일하게 조절하였다. 그 결과 pH 7.0에서 다당류 생성이 상대적으로 높았다.

최적 배양온도를 실험한 결과, 20~40℃의 범위 중 20~25℃에서 다당류의 생산성이 가장 높았으며, 특히 30℃ 이상에서는 다당류 생성보다 적색 색소 생성이 우수하였다. 이상의 결과들로부터 균주 96CJ10356을 이용한 다당류 생산시 최적배지 조성은 Table 3-5-4와 같으며 STN 배지로 명명하였다.

Table. 3-5-1. Effects of carbon sources on the production of EPS-R by strain 96CJ10356.

Carbons	Glucose	Fructose	Sucrose	Maltose	Galactose	Lactose	Starch
EPS (g/l)	4.97	5.03	8.22	5.06	2.84	2.36	4.56

Table 3-5-2. Effect of C/N ratio on the production of EPS-R by strain 96CJ10356. The bacterium was cultured in YMG medium (pH 7.0) containing 2% sucrose as carbon source at 25°C with rotation of 120 rpm for 7 days.

Tryptone conc. (g/l)	C/N ratio	EPS-R (g/l)	DCW ¹ (g/l)	Productivity ²	Final pH
20.0	1	6.48	3.36	1.92	6.80
10.0	2	8.87	1.95	4.54	6.50
5.0	4	8.24	4.33	1.90	6.70
2.0	10	8.18	8.40	0.97	6.45
1.0	20	3.36	3.92	0.86	6.38
0.5	40	2.48	3.44	0.72	6.32
0.2	100	2.01	3.14	0.64	6.27
0.1	200	0.35	2.82	0.12	6.38

¹Dry cell weight, ²Productivity = (EPS-R)/DCW

Table. 3-5-3. Effects of salt concentration on the production of EPS-R by strain 96CJ10356.

NaCl (%)	0	1	3	5	10	20	35
Growth	-	+	+	+	-	-	-
EPS (g/l)	-	4.27	2.31	2.61	-	-	-

Table 3-5-4. Composition of STN medium optimal for the production of EPS-R by strain 96CJ10356.

Component	Concentration (g/l)
Sucrose	20
tryptone	10
NaCl	10
MgSO ₄	5
CaCl ₂	1
KH ₂ PO ₄	0.07
K ₂ HPO ₄	0.08
FeCl ₃	0.005
MnCl ₂	0.001
Na ₂ MoO ₄	0.001
ZnCl ₂	0.001

다. 다당류 생성에 대한 통기량의 영향

5-liter jar fermentor에서 통기량에 따른 EPS-R의 생산을 조사하기 위하여 3 liter의 STN 배지에 각각 0.17, 0.5, 1.0 및 1.5 vvm의 통기량으로 공기를 공급하여 주었다. 배양 시간이 증가하면서 균주 96CJ10356인 *H. chejuensis*의 형태는 간균에서 양끝이 둥글고 약간 짧게 변하면서, EPS-R의 생산이 증가하여 세포외 다당류와 균체에 의한 복합체가 (extracellular polysaccharide-cell bridge) 형성되는 것을 주사 전자 현미경으로 관찰하였다 (Fig. 3-5-2).

세포외 다당류 EPS-R을 생산하는 해양성 세균 *H. chejuensis*를 5-liter jar fermentor를 이용하여 3 liter의 STN 배지(Table 3-5-4)에서 배양하였다. 통기량이 증가함에 따라 균체의 성장이 증가하였으며, 1.5 vvm의 통기량을 공급하였을 때, 최대 8.31 g/l의 균체량을 나타내었다. 균체량이 증가함에 따라 EPS-R의 생산도 증가하여 1.0 및 1.5 vvm의 통기량으로 공기를 공급하였을 때, 약 12 g/l의 EPS-R이 생성되었다 (Fig. 3-5-3). 또한 통기량의 증가에 따라 EPS-R의 생산 속도가 (production rate, g EPS-R/l/day) 증가하였다. 통기량이 0.17 vvm 이었을 때, 약 9.2 g/l의 EPS-R이 생성되었으며, 이때의 EPS-R의 생산 속도는 2.16 g/l/d이었다. 반면, 1.5 vvm의 통기량으로 배양하였을 때, 4.07 g/l/d의 생산속도로 약 12.0 g/l의 EPS-R을 생산하였다 (Figure 3-5-4). 1.5 vvm의 통기량으로 배양 했을 때, 생산수율은 ($Y_{P/S}$) 0.6 이었으며, 이는 sucrose를 이용하여 EPS를 생산하는 다른 미생물의 경우에 비하여 생산수율이 2~3배 더 높았다. EPS를 생산하는 *Azotobacter vinelandii* MTCC 2460을 10 g/l의 sucrose가 포함된 배지에서 배양하였을 때의 생산수율은 0.3 이었으며 (Vermani *et al.*, 1995), *Lactobacillus* sp. LB180을 100 g/l의 sucrose가 포함된 배지에서 배양하였을 때, 20 g/l의 EPS를 생산되었으며, 생산 수율은 0.2 였다 (van Geel-Schutten *et al.*, 1998).

1.5 vvm의 통기량 공급 시 배양 72시간 후에 배양액의 겔보기 점도가 매우 높아 배양 용기 안으로 공기 공급이 원활하게 이루어지지 않아 1.5 vvm의 통기량 실험구에서는 72시간에서 실험을 멈추었다. 그러나 1.5 vvm의 통기량으로 공기를 공급하였을 때 생산된 EPS-R의 양은 1.0 vvm의 통기량 공급으로 96시간 배양에서 얻은 EPS-R의 양과 비슷하였다. 이것은 1.0 vvm 실험구의 경우보다 1.5 vvm 실험구에서 균체 성장이 더 활발했으며 이에 따른 생산 속도의 증가 때문이라 사료된다.

산소 공급의 증가로 균체 성장과 EPS-R의 생산이 증가하였으며 또한 EPS-R의 생산 속도도 증가하였다. 이 사실로 해양성 세균 *H. chejuensis*가 생산하는 EPS-R은 산소의 공급으로 더 활발히 진행됨을 알 수 있다. 다른 연구 결과와 비교할 때, *Aureobasidium pullulans*을 각각 280과 340 rpm으로 배양했을 때, 각각 67.5와 101 g/l의 세포의 다당류, pullulan을 생산하였다. *A. pullulan*은 성장 등에 산소를 필수적으로 요구하는 호기성 미생물이기 때문에 산소공급의 증가가 균체 성장 및 세포의 다당류 생성이 증가하였다 (Moscovici *et al.*, 1996). 또한 Yang and Liau는 (1998) *Ganoderma lucidum* CCRC 36123가 생산하는 세포의 다당류가 통기량의 증가로 촉진되는 것을 확인하였다. 반면, Seo 등에 (1997) 따르면 통성 혐기성 세균인 *Lactobacillus yensenii*의 성장 및 생물 응집체 기능을 갖는 세포의 다당류의 생산이 jar fermentor에서 shear rate의 증가에 따라 감소하는 것을 관찰하였다.

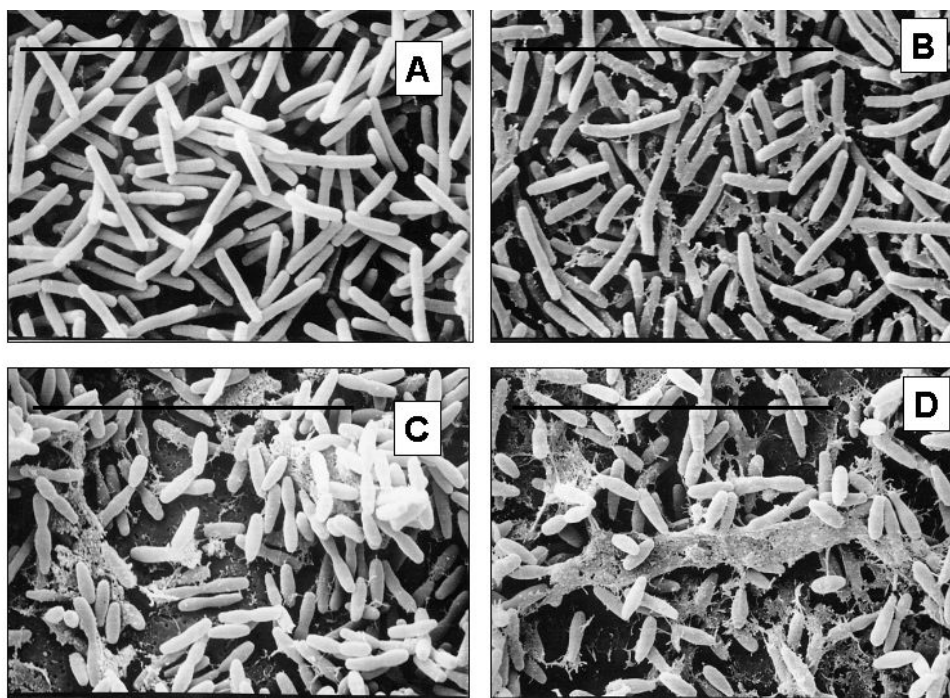


Fig. 3-5-2. The photography of exopolysaccharide producing *Hahella chejuensis*

H. chejuensis was cultured in a 5-liter jar fermentor with 3 liters of STN medium at 25°C, 300 rpm, and 1.5 vvm). Scanning electron microscopy, $\times 5,000$. A, 10 h; B, 16 h; C, 41 h; D, 69 h. The scale bar represents 10 μm .

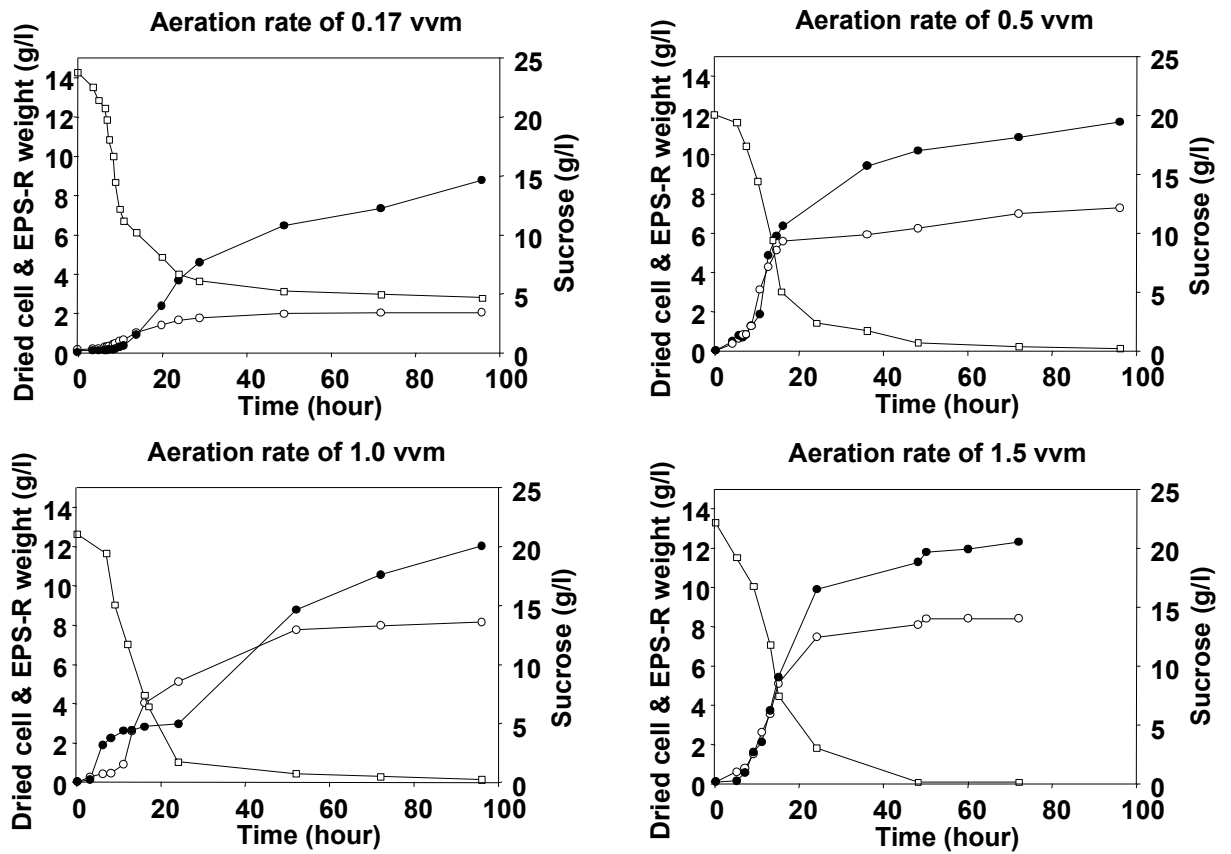


Fig. 3-5-3. Effects of aeration rate on the production of EPS-R

H. chejuensis was cultured in 5-liter jar fermentor with 3 liters of STN medium at 25°C and 300 rpm. A, 0.17; B, 0.5; C, 1.0; D, 1.5 vvm ○ Dry cell weight (g/l), ● Dry EPS-R weight (g/l), □ Sucrose (g/l)

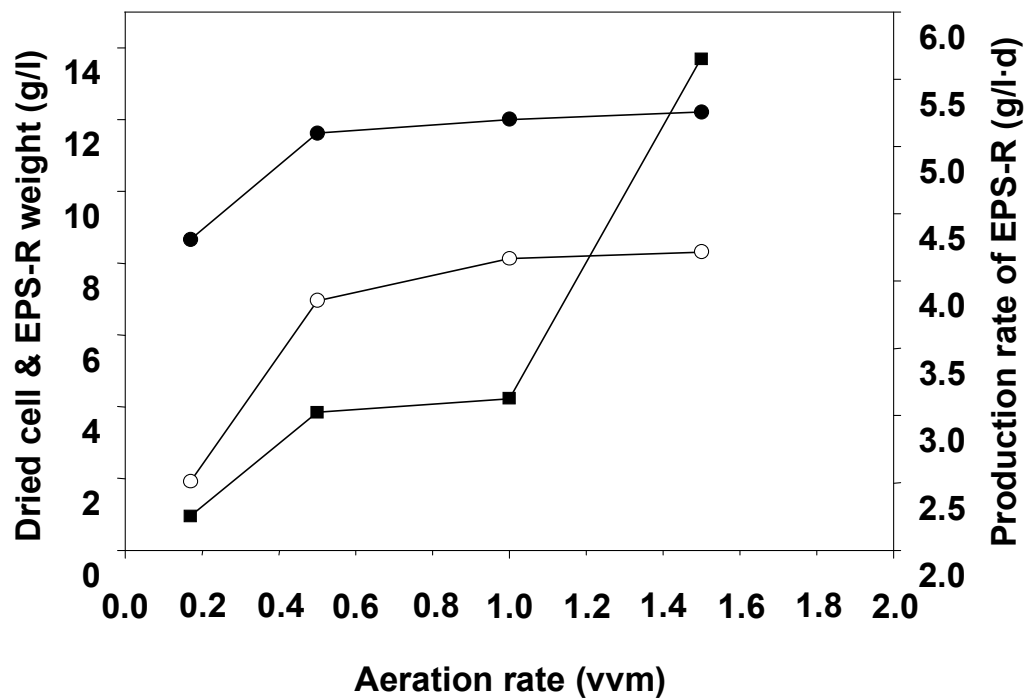


Fig. 3-5-4. Comparison of dried cell weight (g/l), dried EPS-R weight (g/l) and production rate of EPS-R obtained from different aeration rates.

The production rate increased as increasing of aeration rate. ○, Dried cell weight (g/l); ●, Dried EPS-R weight (g/l); ■ Production rate of EPS-R (g EPS-R/l/d).

라. EPS-R의 응집활성 및 겔보기 점도

확정된 최적배지를 사용하여 3 L 발효조에서 초기 pH를 7.0으로 조정하고 25°C, 0.1 vvm, 300 rpm으로 진탕배양한 결과, 다당류 EPS-R의 생산은 배양시간 경과에 따라 생산량이 증가되었으며 120시간 후에는 최고치가 유지되었고 약 9.23 g/l의 최대 생산량을 나타내었다 (Fig. 3-5-5). 또한 균체량은 배양 24시간 후 약 2 g/l 정도로 일정하게 유지되었고, 배양액의 점도는 균체 성장 및 EPS-R의 생산과 더불어 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 120시간 배양액에서 415 cp 정도의 겔보기 점도를 나타내었다. 배양시간에 따른 생성된 다당류 EPS-R의 응집활성을 조사하기 위해 0.5% Kaolin에 1% CaCl₂ 0.1 ml과 배양 상등액 0.1 ml을 섞고 10분 후 상등액의 흡광도를 측정하여 응집활성을 환산한 결과, EPS-R의 생산과 더불어 응집활성이 증가하였고 120시간 배양 후 약 1400 U/ml 정도의 매우 높은 응집활성을 나타내어 (Fig. 3-5-5), 응집활성제로서의 가능성도 보여 주었다.

배양액의 겔보기 점도가 통기량의 증가에 따라 점차 증가하였으며, 이것은 다당류 생성량이 증가하였다는 것을 간접적으로 확인할 수 있게 해준다 (Fig. 3-5-6). 해양성 세균 *H. chejuensis*를 각각 0.17, 0.5, 및 1.0 vvm의 통기량 조건으로 96시간 동안 배양하였을 때, 배양액의 겔보기 점도를 1 rpm의 속도로 측정 한 결과, 각각 2,000 cP, 4,800 cP, 9,800 cP로 측정되었다. 또한 1.5 vvm의 통기 조건으로 72 시간동안 배양하였을 때, 배양액의 겔보기 점도는 10,000 cP였다. 이것은 세포의 다당류 BS-1을 생산하는 *Klebsiella* sp.를 flask에서 진탕 배양하면서 통기량을 증가시킨 결과, 배양액의 겔보기 점도 및 세포의 다당류 BS-1의 생산이 증가한 Kawaguchi 등의 (1992) 결과와 같은 경향을 보이고 있다.

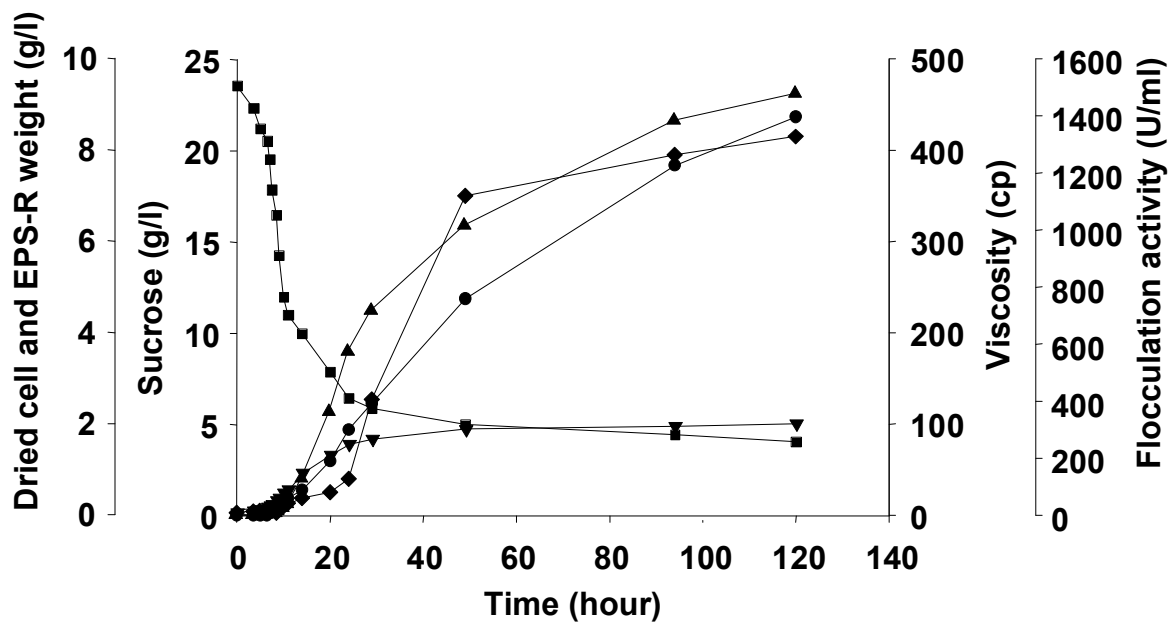


Fig. 3-5-5. Time course of EPS-R production by strain 96CJ10356.

-▼-, Dry cell weight; -▲-, EPS-R; -◆-, Viscosity; -●-, Flocculation Activity; -■-, Sucrose; DCW, dry cell weight.

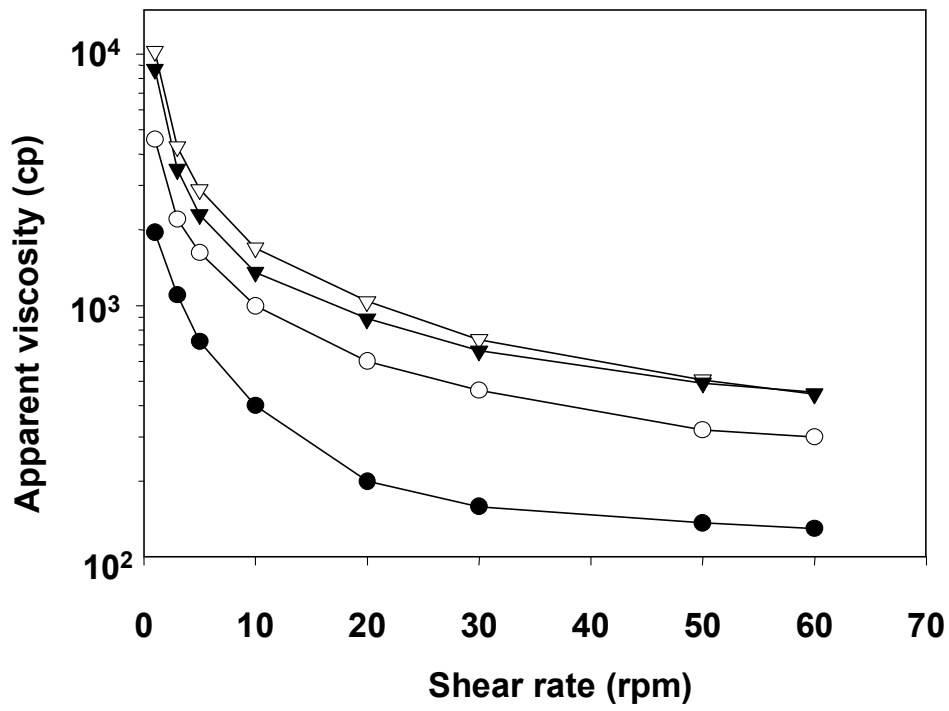


Fig. 3-5-6. The apparent viscosity of the culture broth of strain 96CJ10356 by different aeration rates.

● 0.17 vvm, ○ 0.5 vvm, ▽ 1.0 vvm, ▼ 1.5 vvm.

마. 다당류의 분자량 및 성분분석

0.1% EPS-R 용액 1 ml을 Sephadex G-200을 이용한 gel filtration column chromatography를 행한 결과 (Fig. 3-5-7), EPS-R의 분자량은 2.2×10^6 dalton으로 *Xanthomonas* sp. (손 등, 1995)와 *Streptococcus thermophilus* SFi39 및 SFi12 (Lemoine et al., 1997)로부터 생산되는 세포외 다당류와 유사한 크기를 보였다.

그러나, 산으로 가수분해 한 EPS-R을 TLC와 liquid chromatography방법으로 표준시료와 비교분석한 결과, 분자량이 유사한 위의 세 EPS와는 상이한 당구성 성분을 보였다. *Xanthomonas* sp.의 EPS는 glucose와 glucosamine이 주성분 (손 등, 1995)을 이루고, *Streptococcus thermophilus* SFi39는 glucose와 galactose (1:1), SFi12는 galactose, rhamnose와 glucose (3:2:1)가 주성분인 EPS를 생성한다 (Lemoine et al., 1997). Fig. 3-5-8과 3-5-9에서 보는바와 같이 EPS-R을 구성하는 환원당의 주성분은 glucose와 galactose로 나타났으며, 구성비는 대략 1:6.8로서 galactose가 상대적으로 많이 존재하였고 오탄당인 미량의 xylose와 ribose가 검출되었다. *Streptococcus thermophilus*도 galactose가 주성분인 EPS를 생성하지만 그 구성당의 조성(galactose/ rhamnose/fucose, 5:2:1; Low et al., 1998)은 EPS-R의 것과는 상당한 차이를 보였다.

또한, 96CJ10356 균주가 생성하는 EPS-R의 당성분은 보고된 해양 세균 *Cyanothese* sp. (Philippis et al., 1993)의 EPS (glucuronic acid/galacturonic acid/galactose/glucose/mannose/xylose/fucose, 1:2:2.4:6.8:4.8:2.9:1.6)와 *Spirulina platensis* (Filali et al., 1993)의 EPS (xylose/galactose/glucose, 1.3:2.7/2)와도 유사하지 않은 특유한 다당류로 사료된다.

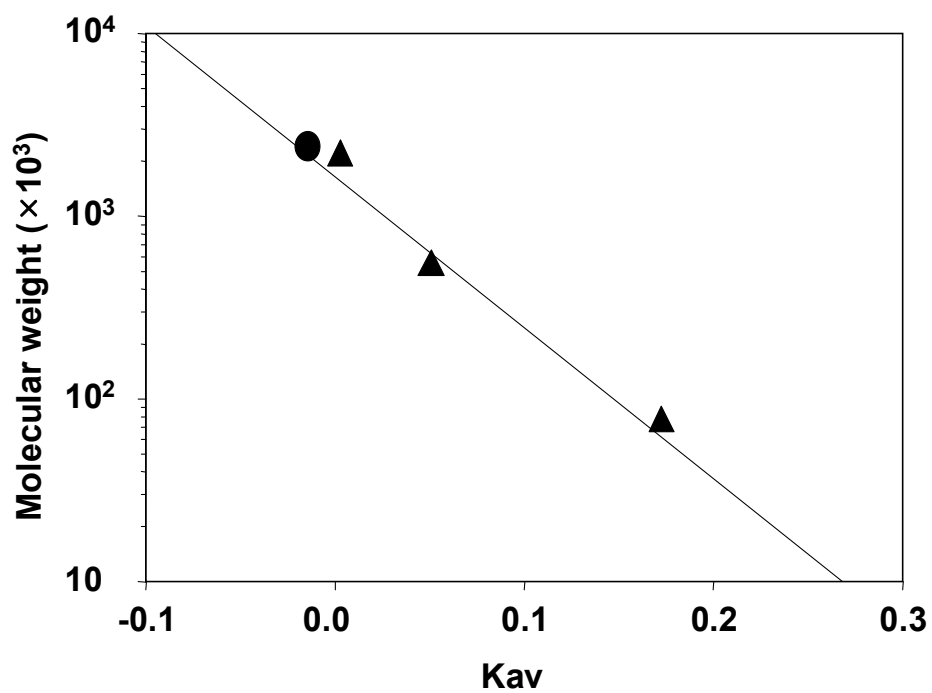
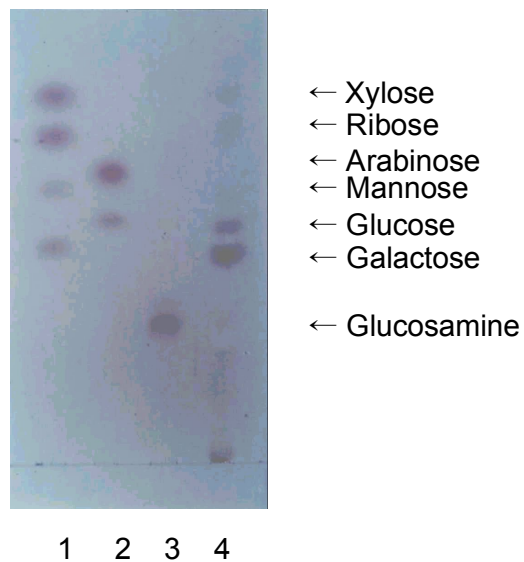


Fig. 3-5-7. Estimation of molecular weight of EPS-R by gel filtration with ephadex G-200 column (15 x 600 mm). ▲, molecular weight marker, blue dextran (2 mDa) and dextrans (500 kDa and 70 kDa); ●, EPS-R; $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$: V_o , void volume (elution volume of blue dextran): V_t , bed volume: V_e , elution volume.



Lane 1, 2 and 3, standard sugars
 Lane 4, hydrolysed EPS-R.

Fig. 3-5-8. Thin layer chromatogram of the hydrolysate of EPS-R.

Chromatography was carried out on cellulose F_{254s} in the solvent system n-butanol/water/acetic acid (60/20/20) and ethylacetate/pyridine/water/acetic acid (100/35/25/5), and the spots are detected with aniline-phthalate reagent. lane 1, 2 and 3, standard sugars ; lane 4, hydrolysed EPS-R.

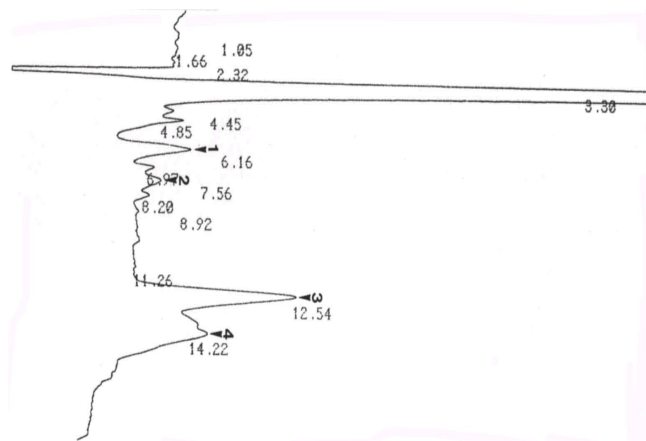


Fig. 3-5-9. High performance liquid chromatogram of the hydrolysate of EPS-R.

1: Xylose, 2: Ribose, 3: Glucose, 4: Galactose: Elution solution, water/ acetonitril (15/85); Flow rate, 1.5 ml/min.

바. 다당류 EPS-R의 용해성 및 유화 안정성

96CJ10356 균주가 생산하는 다당류의 용매에 대한 용해성을 조사해 본 결과 물, acetic acid, formaldehyde, 5 N NaOH, 5 N HCl 등에는 용해성이 우수하였지만 benzene, acetone, chloroform, ethylether, ethanol 및 methanol 등의 유기용매에는 불용성 침전을 형성하였다.

다당류 EPS-R의 분산효과를 조사하고자 corn oil 4 ml에 증류수 6 ml을 첨가한 후 다당류를 0.5% (w/v) 되게 조절하여 O/W 유상액을 형성시킨 후 경시적으로 조사한 결과 Table 3-5-5에서 보는 바와 같이 다른 다당류에 비하여 EPS-R은 96시간 경과 후 부분적으로 액층이 분리되었으나 240시간 이후에도 유상액이 50% 이상 남아있었다. 반면 xanthan gum은 72시간 경과 후 부분적으로 액층이 분리되기 시작하여 168시간에서는 유상액이 완전히 분리되었다. 그외 gellan gum, sodium alginate 및 arabic gum의 경우 12시간 경과 후 유상액이 완전히 분리되어 매우 약한 유화 안정성을 보였다 (Table 3-5-5). 따라서 다당류 EPS-R은 유화안정제로서 응용가능성이 높다고 사료된다.

Table 3-5-5. Emulsion (O/W) formation test of EPS-R and some other commercial polysaccharides with corn oil.

Polysaccharides	Emulsion stability (hrs)					
	12	72	96	144	168	240
EPS-R	++	++	++	+	+	+
Xanthan gum	++	++	+	+	-	-
Gellan gum	+	-	-	-	-	-
Sodium alginate	-	-	-	-	-	-
Arabic gum	-	-	-	-	-	-

++ : Complete emulsion, + : Partially separated emulsion, - : Complete separated

제 6 절 유용효소 생산 연구

RTA(Rhodamine-triglyceride-agarose assay)를 이용한 lipase 생산균주의 대량분리 및 CM-chitin-RBV (Remazol-brilliant violet stained CM-chitin)과 p-nitrophenyl β -D-N-acetylglucosamine을 기질로 한 신속한 chitinase 활성측정을 위한 흡광도 측정법을 구축하고 분리된 chitinase의 분자량, 최적 온도와 pH, 금속이온의 영향을 조사하였다.

1. 이론적, 실험적 접근방법

가. Lipase 생산균주 선별

Tribytyrin 0.2%가 첨가된 LB배지(Tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g, water 1 L)에서 균주를 순수분리하였다. Lipase 생성이 활발한 균주를 분리하기 위하여 Rhodamine-triglyceride-agarose assay(Jette & Ziomek, 1994)을 구축하였다.

나. Chitinase 생산균주의 분리 및 동정

Chitinase를 생산하는 균주를 분리하기 위하여 해면, 산호, 해수, 퇴적물등의 시료를 10~1000배 희석하여 Chitin을 탄소원으로 하는 최소배지(Table 3-6-1)에 접종한 후 실온에서 2주간 배양하여 투명대가 형성되는 균주를 chitinase 생성세균으로 선택하였다. 선택된 28균주중 투명대의 크기가 큰 균주를 선별하여 실험을 진행하였다. 분리균주의 동정을 위하여 다양한 기질의 이용능력 및 16s rDNA 염기서열을 결정한 후 Ribosomal Database Project (Maidak et al., 1997) 과 Genbank databases와 비교하여 phylogenetic tree를 결정하였다.

Table 3-6-1. Components of culture medium for the isolation of chitinase-producing microorganisms.

colloidal chitin	12.0 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.0 g
KH_2PO_4	0.7 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.001 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.001 g
agar	15.0 g
distilled water	500 ml
aged sea water	500 ml
pH	7.0

다. Chitinase 활성 측정 방법

Chitinase 활성은 *p*-nitrophenyl β -D-N-acetylglucosaminide (PNG)로부터 *p*-nitrophenol이 분리되어 나오는 것을 측정하는 Robert와 Selitrennikoff (1988)의 방법을 변형시켜 측정하였다. 100 μ l의 효소 용액을 100 μ l의 10 mM PNG (Sigma) 및 300 μ l의 0.1 M citrate-phosphate (pH 6.0) 완충용액과 반응시키고 37°C에서 방치한 후 500 μ l의 1 M Na₂CO₃ 으로 반응을 정지시켰다. *p*-nitrophenol의 양은 405 nm에서 측정하였다. Chitinase 1 unit는 한시간에 1 μ mol의 *p*-nitrophenol을 생산하는 효소의 양으로 정의하였다.

CM-chitin-RBV(remazol-brilliant violet stained CM-chitin)을 기질로 사용할 경우 550 nm에서 측정하였다 (Inglis & Peberdy, 1997).

라. Chitinase의 생산 및 정제

Chitinase 생산 균주중 chitin을 탄소원으로 하는 최소배지에서 투명대가 가장 큰 98CJ11027에 의한 chitinase를 얻기 위하여 agar를 제외한 chitinase 생성 세균을 분리배지 (Table 3-6-1)를 사용하여 30°C에서 3일간 배양한 후 140 rpm으로 진탕배양하였다.

배양 후 5,000 × g, 4°C에서 20 분간 원심분리하여 균체를 제거한 후, 균체가 제거된 배양액에 ammonium sulfate (30%, v/v)를 첨가한 후 원심분리(16,000 × g, 30 min, 4°C)하여 형성된 침전을 3 ml의 0.1 M citrate-phosphate puffer (pH 6.0)에 현탁시켰다. 현탁액을 Sephadex G-25 컬럼(Pharmarcia, Uppsala, Sweden; 1×6 cm)을 이용하여 용출시켜 불순물을 제거한 후 30 mM Tris-HCl (pH 9.0)로 평형된 Q-Sepharose 컬럼 (Pharmarcia; 1.6×13 cm)을 이용하여 KCl을 0~1M의 농도구배로 4 ml/min의 속도로 흘려주어 용출시켜 단백질을 회수하였다. Chitinase 활성이 있는 fraction을 200 μ l의 25 mM Tris-HCl(pH 7.0)에 녹

여 25 mM Tris-HCl(pH 7.0)으로 평형된 Sephadex G-200 컬럼(Pharmarcia; 1.5 ×60 cm)을 이용하여 25 mM Tris-HCl(pH 7.0)으로 0.2 ml/min의 속도로 용출시켜 chitinase를 얻었다.

마. Chitinase의 특성

정제된 chitinase의 활성에 대한 pH의 영향을 조사하기 위하여 pH 4.5에서 10.0의 범위에서 chitinase의 활성을 조사하였다. pH 4.5 ~ 6.5의 범위에서는 0.1 M citrate-phosphate 완충용액을 사용하였으며, pH 6.5 ~ 8.5 및 pH 8.5 ~ 10.0의 범위에서는 각각 0.1 M phosphate 완충용액, 0.1 M glycine-NaOH 완충용액을 사용하였다.

Chitinase 활성에 대한 온도의 영향을 조사하기 위하여 20 ~ 50°C의 범위에서 실험하였다. 정제된 효소를 0.1 M citrate-phosphate 완충용액(pH 6.0)과 혼합하여 조사 온도에서 5분간 배양한 후 PNG를 첨가하여 반응을 시작하였다. pH 및 온도에 대한 chitinase의 활성은 전술한 chitinase 활성 측정법을 이용하였다.

Chitinase 활성에 대한 무기 이온의 영향을 조사하기 위하여 0.1 M imidazole-HCl을 사용하였다. 정제된 chitinase를 1 mM 또는 5 mM 무기 이온과 함께 실온에서 30 분간 배양한 후 chitinase 활성 측정방법으로 남아있는 chitinase의 활성을 측정하였다.

정제된 chitinase의 분자량을 측정하기 위하여 Laemmli (1970)에 따라 10% gel을 사용하여 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis을 수행하였다. Sephadex G-200 컬럼을 통해 얻은 시료를 동결건조하여 농축한 후 gel에서 20 mA로 전개시켰다. 전개시킨 gel은 Rabilloud 등 (1988)의 방법에 따

라 0.2% silver nitrate로 염색하여 chitinase의 분자량을 확인하였다.

2. 연구내용

가. Lipase 생산균주 선별

나. Chitinase 생산균주의 분리 및 chitinase의 특성

3. 연구결과

가. Lipase 생산 세균

Tributylin을 첨가한 LB배지를 사용한 결과 1998년 1월에 채취한 수지맨드 라미에서에 87개의 균주와 해수에서 5개의 균주가 선별되었다. 구축된 ELISA plate를 사용하는 RTA assay (Rhodamine-triglyceride-agarose plate assay)방법은 2차 활성균주의 선별 및 대량탐색에 활용될 수 있다.

나. Chitinase 생산균주의 분리 및 동정

형광물질을 이용한 fluorospectrometer를 이용한 대량검색을 위하여 CM-chitin-RBV (reazol brilliant violet stained CM-chitin)을 기질로 이용하여 해양미생물을 대상으로 스크리닝하였다. 대량의 시료를 대상으로 chitinase 활성 측정 방법의 구축을 위한 실험조사결과 CM-chitin-RBV는 정제된 chitinase의 활성을 측정하는데 이용할 수 있었으나 배양액을 효소액으로 사용할 경우 chitinase의 활성을 측정할 수 없었다. 반면, p-nitrophenyl β -D-N-acetylglu-

cosamine을 기질로 사용해서는 배양액 중의 chitinase의 활성을 96 well microtitre plate로도 측정할 수 있었다. 이상의 결과로 chitinase 생산 균주의 선별 및 chitinase 활성 측정을 위해 기질로 p-nitrophenyl β -D-N-acetylglucosamine을 사용하였다.

제주도 해역에서 채취한 시료로부터, chitin이 포함된 최소배지에서 투명대를 형성하는 균주를 분리하였다. Chitinase 생산 균주 중 투명대를 크게 형성하는 균주 11027, 11030, 11034를 선별하였다.

다당류 생성 미생물의 거의 완전한 16S rDNA 염기서열 (1,422 bp)을 결정하여 Genebank와 ribosomal database project (Maidak et al., 1997)의 database와 비교 분석한 결과 균주 11027은 *Vibrio* sp.로 확인되었다.

다. Chitinase의 생산 및 정제

선별된 균주를 chitin을 탄소원으로 하는 최소배지에 30℃에서 배양한 결과, 세 균주 모두 배양 6일째와 9일째에 chitinase 생산이 높았으며, 배양액 중 chitinase의 활성은 p-nitrophenyl β -D-N-acetylglucosamine을 기질로 하여 2~3 U/ml 이었다(37℃에서 측정). 균주 11027을 chitin 최소배지 1L에 30℃에서 6일간 배양한 후 배양 상등액으로부터 여러 chitinase 중 chitinase I을 27%의 수율과 16배의 specific activity로 정제하였다(Table 3-6-2).

라. Chitinase의 특성

Chitinase I의 분자량을 gel filtration 방법으로 91kDa, SDS-전기영동으로

98 kDa 이었고, 단일 폴리펩타이드로 구성되었다 (Fig. 3-6-1).

정제된 chitinase에 대한 pH의 영향을 0.1 M의 acetate-phosphate buffer (pH 4.5 - 6.5), phosphate buffer (pH 6.5 - 8.5)와 glycine-NaOH buffer를 이용하여 37°C에서 조사하였다. Chitinase I은 p-nitrophenyl- β -D-N-acetylglucosamine을 기질로 pH 6.0에서 가장 높은 활성을 나타냈다 (Fig. 3-6-2). Chitinase I의 최적온도는 25-55°C 범위에서 0.1 M의 acetate-phosphate buffer (pH 6.0)에서 p-nitrophenyl- β -D-N-acetylglucosamine을 기질로 조사하였다. 이때 chitinase I은 45°C에서 최대활성을 나타내었다 (Fig. 3-6-3).

Chitinase I에 대한 여러 금속이온의 효과를 10 mM 농도로 조사하였다. Ni⁺과 Cu⁺⁺에 의해 chitinase I는 상당한 저해를 받았고, Co⁺⁺에 의해 약간의 저해를 받았지만, Na⁺ 존재시에는 chitinase I의 활성이 증가하였다 (Table 3-6-3).

해양 미생물 11027에서 생산 분리한 chitinase I의 생화학적 특성 및 Na⁺의 효과로 볼 때, chitinase I은 새로운 chitinase임을 알 수 있었다.

Table 3-6-2. Purification of chitinase I from the strain 11027.

Purification step	Activity		Protein total(mg)	Purification fold	Yield (%)
	total(U)	specific (U/mg)			
crude	65	13	89.6	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	76	5.9	12.9	45	117
Q-Sephasrose	46	20.0	2.3	15.4	71
Sephadex G-200	17	20.9	0.8	16.1	27

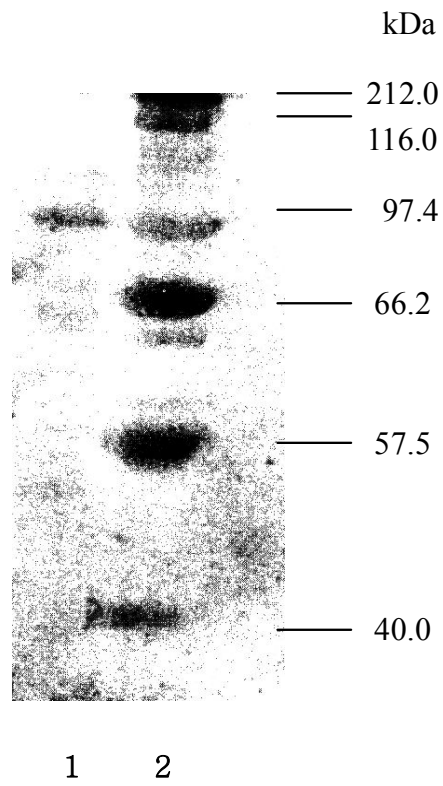


Fig. 3-6-1. SDS-PAGE of the purified chitinase I from the strain 11027.

Chitinase purified by gel filtration was resolved on 10% SDS-PAGE gel and stained with silver nitrate.

Lane 1, chitinase I; lane 2, molecular-weight standards.

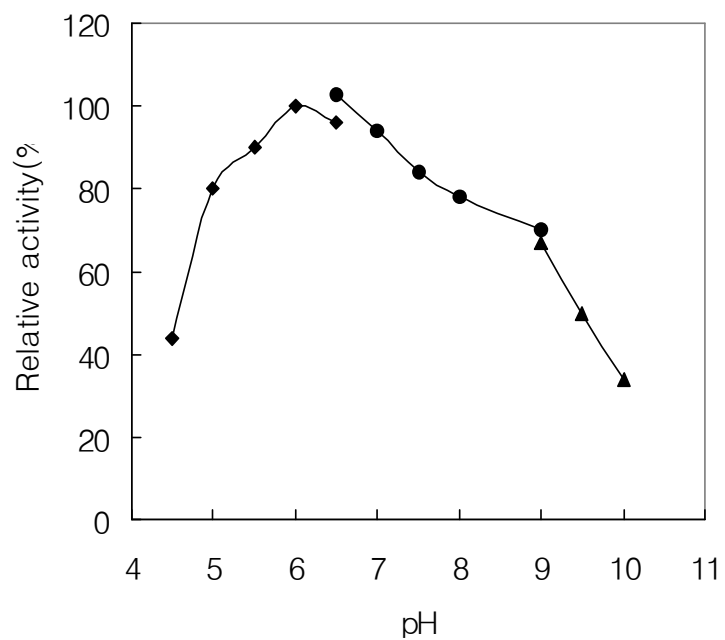


Fig. 3-6-2. Effect of pH on the activity of chitinase I from the strain 11027.

◆, citrate-phosphate buffer; ●, phosphate buffer;

▲, glycine NaOH buffer

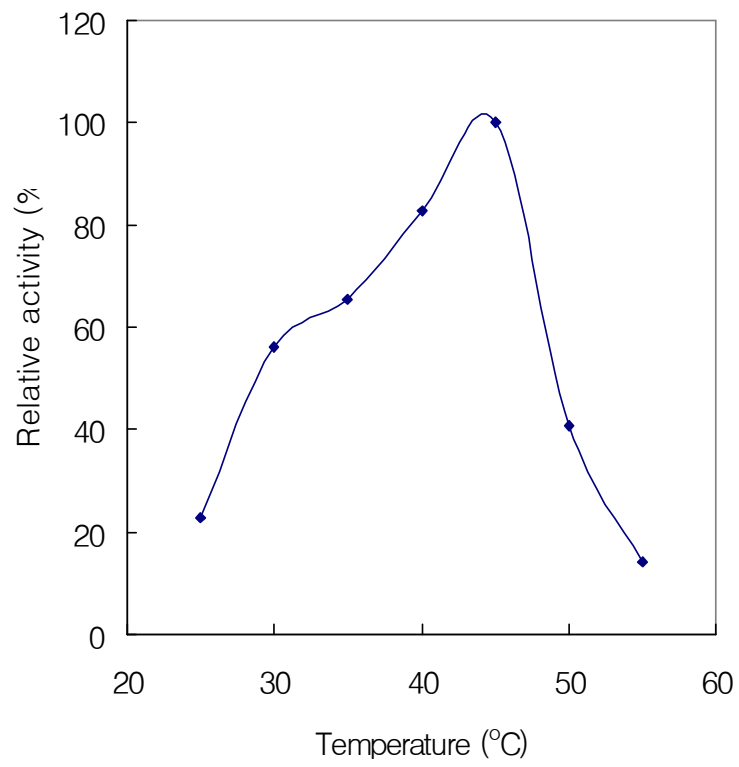


Figure 3-6-3. Effect of temperature on the activity of chitinase I from the strain 11027.

Table 3-6-3. Effect of metal ions on the activity of chitinase I activity from the strain 11027.

Compound	Rest activity (%)
KCl	96
KNO ₃	117
NaCl	134
NaNO ₃	150
(NH ₄) ₂ SO ₄	126
NH ₄ Cl	106
CaCl ₂	90
CaSO ₄	83
NiCl	64
ZnSO ₄	90
CuSO ₄	71
MnCl ₂	111
MgCl ₂	116
CoNO ₃	80
FeSO ₄	89
EDTA	96
none	100

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1 절 연구별 연구목표 및 연구내용

구 분	연구 목표	연구 내용
1차년도 (‘97)	<ul style="list-style-type: none"> ◦생물자원의 분포 및 생산량조사 ◦유용물질 성분연구 ◦유용유전자 보전 	<ul style="list-style-type: none"> ▷ 문헌 및 자료 수집 ▷ 해양동물:해면, 산호, 연체동물 <ul style="list-style-type: none"> ·분포 및 생산량 조사 ·분류, 동정 ▷ 선별된 공생미생물에서 항암기능물질 분리, 구조규명 ▷ 공생미생물 분리, 보전 ▷ 확보된 해양동물시료 냉동보존
2차년도 (‘98)	<ul style="list-style-type: none"> ◦유용생물자원의 생산성연구 ◦유용물질 성분연구 	<ul style="list-style-type: none"> ▷ 해양동물 10 여종 <ul style="list-style-type: none"> ·종, 개체, 군집 생태계조사 ·분류, 동정 ▷ 해양미생물분리 및 보전 <ul style="list-style-type: none"> ·세균 및 방선균 분리 배지 조사 ·보존방법 조사 ▷ 항암물질 1종이상 구조규명 <ul style="list-style-type: none"> ·topoisomerase I 저해물질 ▷ 탈유화제 <ul style="list-style-type: none"> ·기존 합성 탈유화제와의 성능 비교 ·생물탈유화제의 이용성 조사 ▷ 다당류 <ul style="list-style-type: none"> ·물성조사 ·이용성조사 ▷ 유용효소 검색
3차년도 (‘99)	<ul style="list-style-type: none"> ◦유용생물자원의 생산성연구 ◦유용물질 연구 	<ul style="list-style-type: none"> ▷ 해양 미생물의 냉동보존방법 연구 <ul style="list-style-type: none"> ·초저온냉동보전시 적합한 보존제 및 해수 사용 필요성 여부 확인 ▷ topoisomerase I 저해물질 특성확인 ▷ 탈유화제 <ul style="list-style-type: none"> ·포자표면구조에 의한 탈유화능 원인규명 ▷ 다당류 <ul style="list-style-type: none"> ·다당류 성분규명 및 최적생산조건 도출 ▷ 유용효소 ; chitinase <ul style="list-style-type: none"> ·chitinase 특성규명 ·chitinase 생산물특성규명

제 2 절 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도

세부연구개발목표 (연구계획서상에 기술된 연구목표)	달성내용	달성도 (%)
생물자원의 분포 및 생산량조사	<ul style="list-style-type: none"> ▷ 제주도 서귀포 해역의 문섬, 숲섬, 범섬을 중심으로 3차례 SKUBA 탐사 ▷ 조사지의 기록종 자료조사 및 목록작성-(해면 18종, 산호류 43종) ▷ 분포조사: 수직분포 우점종의 산호류 ▷ 1차 40개 시료 산호류 31종, 2차 29개 시료 산호류 23종, 3차 해면 6종, 이끼벌레 2종 분류, 동정 및 -70℃보존 	100
유용유전자 분리 및 보전/ 해양 미생물	<ul style="list-style-type: none"> ▷ 해양 세균 800주 방선균 17주 분리 및 -70℃ 보전 ▷ 해양미생물 분리용 배지 및 분리된 콜로니 다양성조사 ▷ 총세균수 대비 산호, 해면, 퇴적물, 해수 시료에서의 미생물 분리가능성을 비교- 새로운 분리배지개발 필요 	100
유용생물자원의 생산성연구	<ul style="list-style-type: none"> ▷ 탈유화능 있는 해양방선균 포자의 대량생산을 위한 submerged spore 생성조건 구축 ▷ 세포외 다당류 생산 신규 해양미생물의 다당류 생산 최적배양배지인 STN 배지 확립 ▷ 다당류 생산을 위한 최적 배양조건 확립으로 5 l 발효조에서 생산수율 60%로 12 g/l 까지 생산 	100
유용물질 성분연구	<ul style="list-style-type: none"> ▷ 항암기능물질연구 <ul style="list-style-type: none"> ·세포독성 및 Topoisomerase I 저해 방선균 3균주 선별 ·해면분리 방선균 8908 topo I 활성분획 분리정제 완료 ·해면 분리 방선균 8889, 8922 대량배양 ▷ 탈유화제 <ul style="list-style-type: none"> ·극지해양에서 <i>Streptomyces</i> sp. AA8321 분리 ·탈유화능 측정;포자의 소수성에 기인, 1분 이내에 탈유화. 기존의 생물탈유화제보다 우수 ▷ 다당류 <ul style="list-style-type: none"> ·제주해역에서 다당류 EPS-R 생산 미생물분리, 동정 ·<i>Hahella chejuensis</i> gen. nov, sp. nov로 동정 ·다당류 EPS-R의 분자량 2.2×10^6 Da ·당 조성은 glucose, galactose, ribose, 및 xylose ·EPS-R은 xanthan gum, gellan gum보다 유화안정능우수 ▷ 유용효소 <ul style="list-style-type: none"> ·lipase 생산균주 1차 탐색 92주 분리 ·chitinase 생산균주 탐색 및 선별 ·분리균주 <i>Vibrio</i> sp.는 N-acetylchitotetraose를 합성하는 chitinase 생산 	100

제 3 절 대표적 성공사례

1. 탈유화능이 우수한 미생물의 분리 및 탈유화 특성조사

탈유화능이 우수한 남극해양방선균 *Streptomyces* sp. AA8321의 분리하였다. 기존의 탈유화 미생물인 *Nocardia amarae* 및 합성 탈유화제 N-7733의 탈유화능을 비교하여 이 방선균에서 생성된 포자의 탈유화능이 탁월함을 보였으며 탈유화능은 포자표면의 소수성에 기인하는 것으로 추정된다. 이 방선균은 액체 배양시 submerged spore를 형성하기도 하는데 이는 포자의 대량 생산 가능성을 제시하기도 한다.

·국내 특허출원 : 탈유화능을 갖는 스트렙토마이세스 sp. AA8321 균주 및 이를 이용하여 유화액으로부터 유류를 분리하는 방법 (1998-39990)

2. 세포외 다당류 생산 균주의 분리·배양 및 산업적 이용

제주도에서 바이오폴리머의 일종인 세포외다당류를 생산하는 새로운 속의 미생물 분리하였다. *Hahella chejuensis* gen. nov. sp. nov. 는 성장에 소금을 절대적으로 필요로하는 해양성 미생물로 새로운 형의 생체고분자로 추정되는 다당류 EPS-R을 생산한다. EPS-R은 xanthan gum이나 gellan gum 보다 유화안정능이 높으며 배양조건의 개선을 통하여 12 g/l까지 생산이 가능하며, 응집활성제, 유화안정제, 분산제로서 이용가능성이 있으며 타용도로도 응용개발이 가능하다.

·국내 특허출원 : 에어로모나스속 96CJ10356 균주 및 이로부터 엑소폴리사카라이드를 생산하는 방법 (10-1999-0029933)

3. 미생물의 분리 및 보전기술의 개발을 통하여 현지의 보전기술의 기반 마련

산호, 해면, 해양퇴적물, 해수로부터 해양미생물 800여 균주 분리 보존하였다. 대량의 균주를 보존하는 방법으로 초저온 냉동고 사용시 현탁액(인공해수나 증류수)이나 냉동보존제(DMSO나 glycerol) 간의 차이는 적으나 균에 따른 회복 지수의 변이가 컸다. 해양동물로부터 분리가능한 세균수는 총세균수의 만분의 1 정도의 결과가 나왔는데, 이는 육상토양시료의 분리율의 백분의 1 정도이다. 따라서 분리방법의 개발에 따라 다양한 신규 해양미생물을 찾을 가능성이 높으며 이는 새로운 유전자원의 확보를 위해 필수적이다.

4. 기타 계획하지 않은 연구성과

Streptomyces sp. AA8321은 streptomyces 속으로는 최초로 발견된 경우이다. (탈유화능 소유 미생물은 지금까지 2종만 보고되었음).

제 4 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

미생물의 확보, 분리방법, 보전방법 연구, 유용성평가에 의하여 산업적 활용가능성이 높은 미생물의 배양방법 연구등의 결과를 얻음으로써 국내 서식하는 유용해양생물자원의 탐색, 생리활성 검색, 유용물질을 규명하고, 유용생물자원을 지속적으로 활용할 수 있도록 현지내외 보존기술, 배양방법의 구축을 최종목표로 하는 본 연구사업의 목적을 달성하였으며, 새로운 생물종이나 생체기능을 발견하기 위해서는 아직 국내에서 연구가 많이 수행되지 않았던 해양미생물을 포함한 해양생물의 생체 및 기능 현상에 대한 연구가 필요함을 증명하였다.

새롭게 발견된 미생물들로부터 유용성 평가에 따라 환경친화적인 생물탈유화제나 유용 세포외 다당류등 신기능의 바이오폴리머를 개발할 가능성이 높다. 제주도해역에서 신규 해양성 미생물인 *Hahella chejuensis* gen. nov. sp. nov. 발견하였고 유용 바이오폴리머 개발의 가능성을 보여주었다. 극지 해양방선균 *Streptomyces* sp. AA8321는 환경친화적인 생물학적 탈유화제로서 개발에 활용된다. 극지환경에 대한 적응기작으로서의 소수성 세포외물질의 생산 가능성에 대한 생명현상 규명의 새로운 생물학적 대상으로서 활용이 가능하다. 제주도해역에서 신규 해양성 미생물인 *Hahella chejuensis* gen. nov. sp. nov. 발견하여 국제 미생물 분류 진화학회에 보고하였다. 국내에서 분리한 새로운 종의 미생물들이 이 학회지에 종종 보고되었으나 해양미생물로서 새로운 속의 미생물이 보고되기는 이 세균이 처음이다. 이 세균은 새로운 속일 뿐만 아니라 새로운 다당류를 생산하는 것으로 밝혀졌다. 본 연구를 통하여 왜 생물다양성의 보전 및 미생물유전자원의 확보가 생명공학소재개발에 필수적인가를 여실히 증명해주었으며 앞으로 이 신규 바이오폴리머의 고부가가치의 산업적 응용성을 개발함으로써 새로운 생명공학 제품의 창출에 기여할 수 있을 것이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

분리보전중인 800여 해양미생물 균주는 산업적 유용성 검색에 활용한다. 유용효소 등 유용물질 생산 미생물을 집중 탐구하여 새로운 분류학적 특성 뿐만 아니라 새로운 기능과 유전자를 함유하고 있는 미생물을 선별하여 산업적 이용이 가능하도록 한다. 새로운 생물종이나 생체기능을 발견하기 위해서는 아직 국내에서 연구가 많이 수행되지 않았던 해양미생물을 포함한 해양생물의 생체 및 기능 현상에 대한 연구가 중점연구개발사업의 다음단계에서도 지속되어야 한다. 특히 극지 해양방선균 *Streptomyces* sp. AA8321의 소수성(hydrophobicity)과 같은 세포기능조절의 분자생물학적 기전 및 산업적 이용연구는 극지환경에 대한 적응기작으로서의 소수성 세포외물질의 생산 가능성에 대한 생명현상 규명의 새로운 대상 생물로 활용하며 환경친화적인 생물학적 탈유화제로서 개발에 활용하며.한다. *Hahella chejuensis*이 생산하는 세포외 다당류같은 생체고분자물질의 구조, 기능 및 산업적 이용기술 등은 지속적으로 연구수행되어야 한다.

1. *Streptomyces* sp. AA8321 포자의 소수성에 대한 연구 및 이용

Streptomyces sp. AA8321 포자의 세포구조 및 성분연구를 통하여 hydrophobicity를 유발하는 원인을 규명한다. 또한 극지환경에 대한 적응기작의 일례로 cold shock과 소수성물질의 생산과의 상관관계 가능성 규명한다. 생물탈유화제로서 immobilization, membrane attachment 가능성 여부 및 유기용매의 회수공정, 기존 유수분리장치의 개선 또는 대체 방안에 이용여부 등 산업적 활용 가능성을 연구한다.

2. 신기능성 바이오폴리머의 개발

*Hahella chejuensis*이 생산하는 EPS-R은 응집활성제, 유화안정제, 분산제인 바이오폴리머로서 이용가능성이 있다. 분자구조, 리올로지, 환경의존성 등에 대한 특성분석 및 식품첨가제, 생리활성물질, 산업용소재로서의 이용가능성을 조사 연구함으로써 새로운 생명공학 제품의 창출에 활용한다.

3. 신규 미생물 *Hahella chejuensis*의 생리적 특성 규명

Hahella chejuensis 및 해양에서 biofilm을 형성하는 미생물이 생산하는 세포외 다당류의 특성규명을 통하여 타 미생물 또는 미세조류 등의 중형부착생물에 대한 인지물질로서의 기능을 규명한다. 이를 통하여 biofilm 생성 및 저해 기작 이해를 통한 biofilm 생성 조절 기술의 환경학적, 산업적 활용도 모색한다.

제 6 장 참고문헌

- 김배형, 유영제, 이기영, 윤종선. 1990. *Xanthomonas campestris* 에 의한 *xanthan gum* 생산에 관한 연구, 한국생물공학회지 5: 25-36.
- 김상진. 1992. 일본 해양생물공학 분야 최신동향. 미생물과 산업 18: 9-12.
- 박동진, 이상화, 김창진. 1998a. 계절에 따른 토양중 미생물의 밀도 변화. 한국미생물학회지. 34: 144-147.
- 박동진, 이상화, 박상호, 김창진. 1998b. 계절에 따른 토양 방선균의 속 다양성 분포. 한국미생물학회지. 34: 149-153.
- 박홍식 등. 1994. 서귀포 문섬, 밤섬, 숲섬 일대의 해양무척추동물. '93 자연생태계지역 정밀조사보고서. pp81-136.
- 배경숙. 1995. 해양미생물 보존의 현황과 미래. 생물화공 9:40-44.
- 손봉수, 박석규, 강신권, 이상원, 성낙계. 1995. *Xanthomonas sp.* EPS-1이 생산하는 다당류의 리올로지 특성. 산업미생물학회지 23, 269-274.
- 송준임, 원혜정. 1992. 제주도의 해산 자포동물, 대형동물, 피낭동물. 제주도지역의 조간대 및 아조간대의 생물상 조사보고서. pp.117-148.
- 이홍금 1995. 해양생물의 공생미생물로부터 생리활성물질의 탐색. 생물화공 9:25-30.
- 장재혁, 배승권, 김봉조, 하순득, 공재열. 1998. 해양세균 *Zoogloea sp.*로부터 유용 다당류의 생산에 미치는 발효조건에의 영향. 한국생물공학회지 13: 303-307.
- Berkely, C.L., D.P. Kelly, K.J. Seal, and D.J. Best. 1985. Biotechnology: Principles and Application. Blackwell Scientific Pub., Oxford. p. 187.
- Bernan, V.S., M. Greenstein, and W.M. Maiese. 1997. Marine microorganisms as a source of new natural products. *Adv. Appl. Microbiol.* 43:57-90.

- Cairns, W.L., D.G. Cooper, J.E. Zajic, J.M. Wood, and N. Kosaric. 1982. Characterization of *Nocardia amarae* as a potent biological coalescing agent of water-oil emulsion. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:362-366.
- Cairns, W.L., R. Rumble, and N. Kosaric. 1984. Chemical species contributing to the de-emulsifying ability of bacterial cell surface. *Biotechnol. Oils Fats Ind.* 11:223-239.
- Carmichael, J., W.G. Degraff, A.F. Gazdar and J.B. Mitchell. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay, assessment of radiosensitivity. *Cancer Res.* 47:936-942.
- Chun, J. and M. Goodfellow. 1995. A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rDNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:240-245.
- D'Arpa, P. and L.F. Liu. 1989. Topoisomerase-targeting antitumor drugs. *Biochem. Biophys. Acta.* 989:163-177.
- Daniels, L., R.S. Hanson, and J.A. Phillips. 1994. Chemical analysis. In Gerhardt, P., R.G.E. Murray, W.A. Wood, and N.R. Krieg(eds.), *Methods for General and Molecular Bacteriology*. American Society for Microbiology. p 518.
- David, M. W., J.F. Michael, C.N. Stephen, and M.B. Mary. 1998. A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1353-1370.
- Dullea, M. 1994. *New Developments in Marine Biotechnology*. Business Communications Company, Inc. C-184B.
- Dunn, C.D.R. 1994. *Scripts 1994 review of cancer chemotherapy*. chap. 4. New hopes in cancer chemotherapy. PJB Publications Ltd. pp. 129-209.
- Fenical, W. and Jensen, P.R.. 1994. Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: ecological perspectives. *Annu. Rev.*

Microbiol. 48:559-584.

- Filali, M., J-F. Cornet, T. Fontaine, B. Fournet, and G. Dubertret. 1993. Production, isolation and preliminary characterization of the exopolysaccharide of the cyanobacterium *Spirulina platensis*, *Biotechnol. Lett.* 15:567-572.
- Fry, J.C. 1988. Determination of biomass. In B. Austin(ed.), Methods in aquatic bacteriology. John Willey and Sons, Chichester. pp. 27-72.
- Fu, J.F. and Y.H. Tseng. 1990. Construction of Jactose utilizing *Xanthomonas campestris* and production of xanthan gum from whey. *Appl. Environ. Microbial.* 56:919-923.
- Giovanella, B.C., J.S. Stehlin, M. E. Wall, M. C. Wani, A.W. Nicholas, L.F. Liu, R. Silber and M. potmesil. 1989. DNA Topoisomerase I-targeted chemotherapy of human colon cancer in xenografts. *Science.* 246:1046-1048.
- Goodfellow, M., and D.E. Minnikin. 1985. Chemical method in bacterial systematics. Academic Press. London. pp.131-143.
- Gray, N.C., A.L. Stewart, W.L. Cairns, and N. Kosaric. 1984. Bacteria-induced de-emulsification of oil-in-water petroleum emulsion. *Biotech. Lett.* 6:419-424.
- Hertzberg, R.P., M.J. Caranfa, K.G. Holden, D.R. Jakas, G. Gallagher, M.R. Mattern, S.M. Mong, J.O. Bartus, R.K. Johnson and W.D. Kingsbury. 1989. Modification of the hydroxyl lactone ring of camptothecin: inhibition of mammalian topoisomerase I and biological activity. *J. Med. Chem.* 32:715-720.
- Holt, J. G. (ed.). 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams & Wilkins. Baltimore/London.

- Inglis, P.W. and J.F. Peberdy. 1997. Production and purification of a chitinase from *Ewingella americana*, a recently described pathogen of the mushroom, *Agaricus bisporus*. *FEMS Microbiology Letters* 157:189-194.
- Ikeda, F., H. Shuto, T. Fukui, and K. Tomita. 1982. An Extracellular Polysaccharide Produced by *Zoogloea ramigera* 115. *Eur. J. Biochem.* 123:437-445.
- Imamura, N., M. Nishijima., T. Takadera, and K. Adach. 1997. New anticancer antibiotics pelagiomicins, produced by a new marine bacterium *Pelagibacter variabilis*. *J. Antibiot.* 50:8-12.
- Ireland C. M., B.R. Copp, M.P. Foster, L.A. McDonald, D.C. Radisky, and J. C. Swersey. 1993. Biomedical potential of marine natural products. In: Attaway, D.H. and O.R. Zaborsky (eds.), *Marine Biotechnology vol. I. pharmaceutical and bioactive natural products*. New York: Plenum Press. pp. 1-44.
- Irene, B.M., P.E. Jansson, and B. Lindberg. 1990. Structural studied of the capsular polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae* type 7A. *Carbohydrate Research.* 198:67-77
- Jette, J.-F. and E. Ziomek. 1994. Determination of lipase activity by a rhodamine-triglyceride-agarose assay. *Analytical Biochemistry* 219: 256-260.
- Kim, C.-J., K.-H. Lee, A. Shimazu, and I.-D. Yoo. 1994. Reisolation Frequency of soil Actinomycetes on multiple isolation media (Korean). *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22:329-331.
- Kobayashi, J. and M. Ishibashi. 1993. Bioactive metabolites of symbiotic marine microorganisms. *Chem. Rev.* 93:1753-1969.

- Kovacs, N. (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature* 178:703.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lechevalier, H. A. 1989. A practical guide to generic identification of Actinomycetes. In Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology. vol 4. S.J. Williams, M. E. Sharpe, J. G. Holt (eds.), Williams and Wilkins Press, Baltimore. pp. 2344-2347.
- Lechevalier, H.A., and M.P. Lechevalier. 1981. Introduction to the order Actinomycetales. In Prokaryotes. Chap. 142. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York. pp.1915-1922.
- Lee, K.Y., J.J. Lee, D.W. Kim, K. Na, and J.C. Lee. 1998. De-emulsification of petroleum emulsion using *Nocardia amarae*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 13:209-213.
- Lemoine, J., F. Chirat, J. M. Wieruszski, G. Strecker, N. Favre, and J. R. Neeser. 1997. Structural characterization of the exocellular polysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* SFi39 and SFi12. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3512-3518.
- Liu, L.F. 1989. DNA Topoisomerase poisons as antitumor drug. *Annu. Rev. Biochem.* 58:351-375.
- Low, D., J.A. Ahlgren, D. Horne, D.J. McMahon, C. J. Oberg, and J. R. Broadbent. 1998. Role of *Streptococcus thermophilus* MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2147-2151.
- Maidak, B.L., G.J. Olsen, N. Larsen, R. Overbeek, M.J. McCaughey, and C.R. Woese. 1997. The RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids*

Res. 25:109–111.

- Mandel, M. and J. Marmur. 1968. Use of ultraviolet absorbance temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA. *Meth Enzymol* 12B:195–206.
- Marra, M. 1990. Structural characterisation of the exocellular polysaccharides from *Cyanospira capsulata*. *Carbohydrate Research*. 197:338–344.
- Martins, L.O., L.C. Brito and S.C. Isabel. 1990. Roles of Mn^{2+} and Ca^{2+} on alginate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 12:794–799.
- Moscovici, M., C. Ionescu, C. Oniscu, O. Fotea, P. Protopopescu, and L.D. Hanganu. 1996. Improved exopolysaccharide production in fed-batch fermentation of *Aureobasidium pullulans*, with increased impeller speed. *Biotech. Lett.* 18:787–790.
- Munro, M.H.G., J.W. Blunt, E.J. Dumdei, S.J.H. Hickford, R.E. Lill, S. Li, C.N. Battershill, and A.R. Duckworth. 1999. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *J. Biotech.* 70: 15–25.
- Nagaoka, M., S. Hashimoto, T. Tokokura, and Y. Mori. 1994. Anti-ulcer effects of lactic acid bacteria and their cell-wall polysaccharides. *Biol. Pharm. Bull.* 17:1012–1017.
- Nakamura, J., S. Miyashiro and Y. Hirose. 1976. Screening, isolation and some properties of microbial cell flocculants. *Agr. Biol. Chem.* 40:377–383.
- Naoni, W.R., A.R. Fred, and S. Erko. 1996. A study of the bacterial flora associated with *Holothuria arta*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 203:11–26.
- Newman, D. J., P. R. Jensen, J. J. Clement, and C. Acebal. 1989. Novel activities from marine derived microorganisms. In A.L. Demain, G.A.

- Somkuti, J.C. Hunter-Cevera, and H.W. Rossmore (eds.), Novel microbial products for medicine and agriculture, Elsevier. pp. 239-251.
- Noberg, A.G. and H. Persson. 1984. Accumulation of heavy-metal ions by *Zoogloea ramigera*. *Biotech. Bioeng.* 115:239-246.
- Oda, M., H. Hasegawa, S. Komatsu, M. Kambe, and F. Tsuchiya. 1983. Anti-tumor polysaccharide from *Lactobacillus* sp.. *Agri. Biol. Chem.* 47:1623-1625.
- Philippis, R., M.C. Margheri, E. Pelosi, and S. Ventura. 1993. Exopolysaccharide production by a unicellular cyanobacterium isolated from a hypersaline habitat. *J. Appl. Phycol.* 5:387-394.
- Pomponi, S. A. 1988. Maximizing the potential of marine organism collection for both Organisms. In D. G. Fautin (ed.), Biomedical Importance of Marine Organisms. California Academy of Sciences, San Francisco. pp. 7-12.
- Pomponi, S. A. 1999. The bioprocess-technological potential of the sea. *J. Biotech.* 70:5-13.
- Rabilloud, T., Carpentier, G., and Tarroux, P. 1988. Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis* 9:288-291.
- Ragueneas, G., P. Pignet, G. Gauthier, A. Peres, R. Christen, H. Rougeaux, G. Barbier, and J. Guezennec. 1996. Description of a new polymer-secreting bacterium from a deep-sea hydrothermal vent, *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis*, and preliminary characterization of the polymer. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:67-73.
- Robinson, D.G., U. Ehlers, R. Herken, B. Herrmann, F. Mayer, and F.W. Schrmann. 1987. Methods of preparation for electron microscopy - an

- introduction for the biomedical sciences. Berlin: Springer-Verlag.
- Rodrigues, C. and N.B. Bhosle. 1991. Exopolysaccharide production by *Vibrio fischeri*, a fouling marine bacterium. *Biofouling* 4:301-308.
- Rosenberg, M., M. Gutnick, and E. Rosenberg. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 9:29-33.
- Schaal, K.P. 1985. Identification of clinically significant actinomycetes and related bacteria using chemical techniques. In Goodfellow, M. and D. E. Minnikin (eds.), *Chemical Methods in Bacterial Systematics*. Academic Press, New York. pp. 359-381.
- Schmitz, F.J., B.F. Bowden, and S.I. Toch. 1993. Antitumor and cytotoxic compounds from marine organisms. In D.H. Attaway and O.R. Zaborsky (eds.), *Marine Biotechnology vol. I. pharmaceutical and bioactive natural products*. New York:Plenum Press. pp. 197-308.
- Schneider, E., Y.H. Hsling and L.F. Liu. 1990. DNA Topoisomerase as anticancer drug targets. *Adv. Pharmacol.* 21:149-183.
- Seo H.-C., Choi Y.-M., Cho H. Y., and Yang H.-C. 1997. Polysaccharide bioflocculant produced by *Lactobacillus jensenii* YW-33 and its production condition. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25:328-334.
- Sponga, F., L. Cavaletti, A. Lazzarini, A. Borghi, I. Ciciliato, D. Losi, and F. Marinelli. 1999. Biodiversity and potentials of marine-derived microorganisms. *J. Biotech.* 70:65-69.
- Staley, J.T. and A. Konopka. 1985. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* 39:321-346.
- Staneck, J.I., and G.D. Roberts. 1974. Simplified approach to identification of

- aerobic Actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl. Microbiol.* 119:226-231.
- Stephen, J.G., Ythomas, D.M. and Katharine, G.F. 1995. Microbial diversity in oceanic systems; rRNA approaches to the study of unculturable microbes. *Mol. Ecol. Aquat. Microbes.* 38:217-248.
- Stewart, A.L., and W.L. Cairns. 1983. Bacteria-induced de-emulsification of water-in-oil petroleum emulsion. *Biotech. Lett.* 5:725-730.
- Sutherland, I.W. 1977. Microbial exopolysaccharide synthesis, In P.A. Sandford and A. Laskin (eds.), Extracellular microbial polysaccharides. ACS, Washington, D.C. pp. 40-57.
- Sutherland, I.W. 1983. Extracellular polysaccharides, In Biotechnology, vol 3. Verlag Chemie, Weinheim, Germany. pp. 533-574.
- Sutherland, J.W. and D.C. Ellwood. 1979. Microbial Technology Current State. Future Prospects. U.S.A. p. 107.
- van Geel-Schutten G. H., Flesch F., ten Brink B., Smith M. R., and Dijkhuizen L. 1998. Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amount of exopolysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50:697-703.
- Vermani M.V., Kelkar S.M., and M.Y. Kamat. 1995. Production and optimization of certain growth parameters for an exopolysaccharide from *Azotobacter vinelandii* MTCC 2460 isolated from a plant rhizosphere. *J. Ferment. Bioeng.* 80:599-602.
- Wang, J.C. 1985. DNA Topoisomerase. *Ann. Rev. Biochem.* 54:665-695.
- Worawattanamateekul, W. and K. Okutani. 1992. Isolation and characterization of a sulfated polysaccharide produced by a marine bacterium. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58:1729-1933.

- Yamashita, Y., Y. Saitoh, K. Ando, K. Takahashi, H. Ohno, and H. Nakano. 1990. Saintopin, a new antitumor antibiotic with topoisomerase II dependent DNA cleavage activity, from *Paecilomyces*. *J. Antibiotics*. 43:1344.
- Yamashita, Y., S. Kawada, and H. Nakano. 1990. Induction of mammalian topoisomerase II dependent DNA cleavage by nonintercalative flavonoids, genistein and orobol. *Biochem. Pharmacol.* 39:737.
- Yang F.-C. and Liao C.-B. 1998. The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in submerged cultures. *Process. Biochemistry*. 33:547-553.
- Yoshikazu, Sugimoto, Satomi, Tsukahara, Tomoko. oh-hara., Toshiyuki. Iseo and Takashi.Tsuruo. 1990. Decreased expression of DNA topoisomerase I in camptothecin-resistant tumor cell line as determined by a monoclonal antibody. *J. Cancer Research*. 50:6925-6930.
- Zilinskas, R.A., R.R. Colwell, D.W. Lipton, and R.T. Hill. 1995. The Global Challenge of Marine Biotechnology: A Status Report on the United States, Japan, Australia and Norway. a Maryland Sea Grant Publication, college Park, Maryland.

주 의

1. 이 보고서는 과학기술부에서 시행한 특정연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 과학기술부에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.