

2021.12.31.

고분해능 질량분석법을 활용한
해양 플랑크톤 기원
용존 유기물 분자단위 연구

www.kiost.ac.kr

Molecular level characterization of dissolved organic matter derived
from marine plankton using high resolution mass spectrometry

제 출 문

한국해양과학기술원장 귀하

본 보고서를 “고분해능 질량분석법을 활용한 해양 플랑크톤 기원 용존 유기물 분자단위 연구”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021. 12. 31

총괄연구책임자 : 김 동 휘

참 여 연 구 원 : 임 운 혁

“ : 백 승 호

“ : 안 준 건

보고서 초록

과제고유 번호	PE9996B	해당단계 연구기간	2021.06.14 - 2021.12.31	단계 구분	
연구사업명	중사업명	주요사업(미래선도사업)			
	세부사업명	신진연구자 지원			
연구과제명	대과제명				
	세부과제명	고분해능 질량분석법을 활용한 해양 플랑크톤 기원 용존 유기물 분자단위 연구			
연구책임자	김동휘	해당단계 참여연구원수	총 : 4 명 내부: 4 명 외부: 명	해당단계 연구비	정부: 50,000 천원 기업: 천원 계 : 50,000 천원
		총연구기간 참여연구원수	총 : 4 명 내부: 4 명 외부: 명	총 연구비	정부: 50,000 천원 기업: 천원 계 : 50,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국해양과학기술원 /위해성분석연구센터		참여기업명		
국제공동연구					
위탁연구					
요약				보고서 면수	44
<p>○ 메조코즘 활용 해양 생태계 기원 용존 유기물 생성</p> <ul style="list-style-type: none"> - 영양염 농도 조절을 통한 해양 플랑크톤 군집변화를 유도하였고, 대조군과 영양염 첨가군에서 시기별 및 영양염 농도별 식물 플랑크톤 군집 천이가 다르게 나타남을 확인함 <p>○ 고분해능 질량분석법 활용 용존 유기물 분자 단위 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> - 해양 용존 유기물 추출을 위한 전처리법 개발을 통해 기존 분석법 대비 1.7배 더 많은 물질 검출 - 황을 포함하는 화합물(O_xS_y)의 경우 상층액 시료에서 기존 분석법 대비 2배 이상 높은 감도로 분석됨 - 초고분해능 질량분석법을 통한 용존 유기물 화학조성 변화를 분자단위에서 파악함 - 영양염 첨가 실험군의 용존 유기물에서 질소 화합물 및 올리고 펩타이드 성분의 생성을 확인함 - 초고분해능 질량데이터 기반 다양한 시각화 방법을 활용하여 플랑크톤 군집변화에 따른 용존 유기물 조성 변화를 파악함 - 식물 플랑크톤 번성 시기에 N₁O_x 화학종의 증가가 특징적으로 타나났고, protein-like, carbohydrate-like 영역에서 물질 생성 확인됨 - 식물 플랑크톤 감소 이후 S₁O_x 화학종의 증가와 protein-like, carbohydrate-like 영역의 감소가 확인됨 					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	해양 용존 유기물, 해양 플랑크톤, 해양 탄소순환, 해양-대기 상호작용, 고분해능 질량분석법, 메조코즘			
	영 어	Marine Dissolved Organic Matter, Marine Plankton, Oceanic Carbon Cycle, Ocean-Atmosphere Interaction, High Resolution Mass Spectrometry, Mesocosm			

요 약 문

I. 제 목

고분해능 질량분석법을 활용한 해양 플랑크톤 기원 용존 유기물 분자단위 연구

II. 연구개발의 목적

○ 고분해능 질량분석기와 폐쇄 생태계를 활용한 해양 플랑크톤 기원 용존 유기물의 화학적 특성 규명

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 연구기간

○ 2021년 6월 14일 - 2021년 12월 31일

2. 연구개발의 내용

- 메조코즘 활용 해양 생태계 기원 용존 유기물 생성
 - 계절적 특성을 반영한 플랑크톤 배양환경 구축
 - 지리적, 계절적 특성을 반영한 우점종 군집 배양
- 고분해능 질량분석법 활용 용존 유기물 분자단위 연구
 - 해양 용존 유기물 추출법 및 정제법 개발
 - 해양 플랑크톤 기원 용존 유기물 질량 프로파일링
 - 군집변화에 따른 용존 유기물 화학조성 정밀 비교 분석

IV. 연구개발결과

- 메조코즘 활용 해양 생태계 기원 용존 유기물 생성
 - 거제 장목만 해수를 활용하여 1톤 규모의 메조코즘 6기 설치
 - 대조군, 저영양염 실험군, 고영양염 실험군으로 나누어 영양염 농도 조절

- 식물 플랑크톤 총 생물량은 대조군의 경우 초기 1.6×10^3 cells/mL로 최대 생물량을 보이고 지속 감소, LN 실험군은 4일 차에 1.1×10^4 cells/mL, HN 실험군은 6일 차에 2.2×10^4 cells/mL로 총 생물량이 최대치로 관찰
- 실험 초기 대조군과 모든 실험군에서 규조류 *Leptocylindrus* spp.가 90% 이상으로 우점
- 대조군에서 4일 차 *Leptocylindrus* spp.는 76%의 비율로 최우점종, 영양염 첨가 실험군에서는 규조류 *Chaetoceros* spp.가 평균 78%로 최우점하여 우점종 천이 확인
- 실험 6일 차에 LN 실험군에서 *Chaetoceros* spp.의 비율이 90%까지 증가, HN 실험군에서는 *Chaetoceros* spp.가 72%, *Pseudo-nitzschia* spp.가 17%의 비율로 증가
- 실험 15일 차에 LN 실험군과 HN실험군에서 부착성 규조류인 *Cylindrotheca closterium*이 72%와 56%로 높은 비율을 보임

○ 고분해능 질량분석법 활용 용존 유기물 분자단위 연구

- 금속 양이온을 활용한 고체상 추출법을 활용하여 기존 분석법 대비 1.7 배 가량 더 많은 용존 유기물 성분 검출
- 황을 포함하는 화합물(O_xS_y)의 경우 상층액 시료에서 기존 분석법 대비 2배 이상 높은 감도로 분석되었으며, 기존 분석법에서 검출이 어려웠던 황이 2개 이상 포함된 용존 유기물의 분석도 이루어짐.
- 초고분해능 질량분석법을 통한 용존 유기물 화학조성 변화를 분자단위에서 파악함
- 영양염 첨가 실험군의 용존 유기물에서 질소 화합물 및 올리고 펩타이드 성분의 생성을 확인함
- 식물 플랑크톤 번성 시기에 N_1O_x 화학종의 검출이 특징적으로 타나났고, protein-like, carbohydrate-like 영역의 증가가 확인됨
- 식물 플랑크톤 감소 이후 S_1O_x 화학종의 증가와 protein-like, carbohydrate-like 영역의 감소가 확인됨

V. 연구개발결과의 활용계획

- 해양-대기 상호작용 및 해양 탄소 순환 이해를 위한 기초자료로 활용
- 해양 플랑크톤 기원 유기물 D/B 구축을 통한 신규 화합물 발굴에 활용

S U M M A R Y 및 KEYWORDS

(영 문 요약 문)

I. Title

Molecular level characterization of dissolved organic matter derived from marine plankton using high resolution mass spectrometry

II. Purpose of the study

- Chemical characterization of dissolved organic matter derived from marine plankton utilizing high resolution mass spectrometry and mesocosm study

III. Contents and scope of the study

1. Period of the study

- June 14, 2021 - December 31, 2021

2. Contents of the study

- Formation of dissolved organic matter derived from marine ecosystem using mesocosm experiment
 - Establishment of culture conditions for growth of marine plankton reflecting seasonal characteristics
 - Cultivation of dominant plankton community incorporating regional and seasonal characteristics
- Molecular level characterization of dissolved organic matter using high resolution mass spectrometry
 - Method development for extraction and purification of marine dissolved organic matter
 - Mass profiling of dissolved organic matter produced by marine plankton
 - Molecular level characterization of chemical composition of dissolved organic matter in relation to plankton community structure

IV. Results of the study

- Formation of dissolved organic matter derived from marine ecosystem using mesocosm experiment
 - Six units of mesocosms were installed and filled with approximately 1000L of coastal seawater from Jangmok bay, South Korea
 - Two units of mesocosms with no added nutrients served as controls and the remaining four enclosures had two experimental groups with different nutrient levels: low nutrients (N:P:Si = 32:2:32 μ M) and high nutrient (N:P:Si = 96:6:96 μ M)
 - Temporal trends in phytoplankton population density varied between experimental groups. The highest population was recorded in day 1 for the control group (1.6×10^3 cells/mL), whereas the LN and HN groups reached maximum population on day 4 (1.1×10^4 cells/mL) and day 6 (2.2×10^4 cells/mL), respectively.
 - In the early phase of mesocosm experiment, *Leptocylindrus* spp. was the most dominant genus (> 90%) in all study groups.
 - In the control group, *Leptocylindrus* spp. was still dominant over 76% after day 5, whereas *Chaetoceros* spp. was the most dominant genus in LN and HN groups
 - On the 6th day of the experiment, the phytoplankton population in LN group mainly consisted of *Chaetoceros* spp. (90%), whereas the HN group had *Chaetoceros* spp. (72%) as the most dominant group followed by *Pseudo-nitzschia* spp. (17%)
 - On the 15th day of the experiment, *Cylindrotheca closterium* was the most abundant species both in LN group (72%) and HN group (56%).

- Molecular level characterization of dissolved organic matter using high resolution mass spectrometry
 - With solid phase extraction utilizing the metal cation, it was possible to identify 1.7 times greater number of chemical compounds compared to the traditional method
 - The group of sulfur containing compounds(OxSy) was sensitively detected more than twice in supernatant samples compared to the existing method, moreover, chemical compounds containing two or more sulfur, which were difficult to identify in universal method, were also

analyzed

- Formation of nitrogen-containing compounds and oligopeptides was identified in nutrient addition groups
- During the phytoplankton bloom period, N_1O_x chemical classes were abundantly detected, and formation of protein-like, carbohydrate-like compounds was observed in Van Krevelen diagram
- After phytoplankton decline, the relative abundance of S_1O_x chemical classes were increased, whereas compounds in protein-like, carbohydrate-like regions were decreased

V. Application plans of the results

- This result can be used as baseline data for better understanding of air-sea interaction and oceanic carbon cycle
- Establishing of D/B for organic matter originated from marine plankton have great potential to be utilized in discovering new natural compounds

(KEYWORDS : 해양 용존 유기물, 해양 플랑크톤, 해양 탄소순환, 해양-대기 상호작용, 고분해능 질량분석법, 메조코즘, Marine Dissolved Organic Matter, Marine Plankton, Oceanic Carbon Cycle, Ocean-Atmosphere Interaction, High Resolution Mass Spectrometry, Mesocosm)

C O N T E N T S

Summary	3
Contents	9
List of Figures	10
Chapter I Introduction	12
Section 1 Objectives of the study	12
Section 2 Contents and scopes of the study	14
Chapter II Current research status	15
Section 1 Domestic research trends	15
Section 2 International research trends	17
Chapter III Results of the study	20
Section 1 Formation of dissolved organic matter derived from marine ecosystem using mesocosm	20
Section 2 Molecular level characterization of dissolved organic matter using high resolution mass spectrometry	24
Chapter IV Achievements of objectives and contributions	39
Section 1 Achievements of objectives	39
Section 2 Contributions	40
Chapter V Application plans of the study results	41
Chapter VI References	42

목 차

요 약 문	3
목 차	9
그림목차	10
제 1장 서론	11
제 1절 연구개발의 목적 및 필요성	11
제 2절 연구개발의 내용 및 범위	13
제 2장 국내외 기술개발 현황	14
제 1절 국내 연구 동향	14
제 2절 국외 연구 동향	16
제 3장 연구개발 수행 내용 및 결과	19
제 1절 메조코즘 활용 해양 생태계 기원 용존 유기물 생성	19
제 2절 고분해능 질량분석법 활용 용존 유기물 분자단위 연구	23
제 4장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도	38
제 1절 연구개발 목표 대비 달성도	38
제 2절 연구개발 대외 기여도	39
제 5장 연구개발결과의 활용 계획	40
제 6장 참고문헌	41

그 립 목 차

그림 2-1-1. 형광 EEM-PARAFAC을 이용한 용존 유기물 연구	15
그림 2-1-2. 방사성탄소동위원소를 활용한 용존 유기물 연구	15
그림 2-1-3. 초고분해능 질량분석법과 ambient ionization을 활용한 용존 유기물 분석	16
그림 2-2-1. 해양 탄소순환 관련 국외 연구 사례	17
그림 2-2-2. HPLC-HRMS를 활용한 용존 유기물 연구	18
그림 3-1-1. 야외 메조코즘 설치 사진	19
그림 3-1-2. 수환경요인 및 엽록소 a 농도의 시계열 변화	20
그림 3-1-3. 식물플랑크톤 분류군별 구성비의 시계열 변화	21
그림 3-1-4. 우점 식물플랑크톤의 구성비의 시계열 변화	22
그림 3-2-1. 용존 유기물 전처리 과정	24
그림 3-2-2. 용존 유기물의 고체상 추출 모식도	24
그림 3-2-3. 초고분해능 질량분석기(FT-ICR MS)와 데이터 처리 모식도	26
그림 3-2-4. 용존 유기물 전처리법 비교 결과	27
그림 3-2-5. 용존 유기물 전처리법 차이에 의한 주요 화학종 분포 변화	28
그림 3-2-6. 용존 유기물 전처리법 차이에 의한 개별 화학종 분포 변화	29
그림 3-2-7. 해양 용존 유기물 초고분해능 질량스펙트럼의 확장 스펙트럼	30
그림 3-2-8. 초고분해능 질량분석법을 통해 확인된 용존 유기물(침전물 시료)화학종 분포 변화	32
그림 3-2-9. 용존 유기물 침전물 시료의 Van Krevelen diagram	33
그림 3-2-10. 해양 플랑크톤 군집 변화에 따른 용존 유기물(침전물 시료) 구성 주요 화학종 분포 변화	34
그림 3-2-11. 초고분해능 질량분석법을 통해 확인된 용존 유기물(상층액 시료) 화학종 분포 변화	35
그림 3-2-12. 용존 유기물 상층액 시료의 Van Krevelen diagram	36
그림 3-2-13. 해양 플랑크톤 군집 변화에 따른 용존 유기물(상층액 시료) 구성 주요 화학종 분포 변화	37

제 1장 서론

제 1절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

해양 용존 유기물(Dissolved Organic Matter, DOM)은 대륙과 해양을 합친 생 바이오매스(living biomass) 총량만큼의 많은 탄소를 보유하고 있으며, 대기 중 이산화탄소와 비슷한 양의 탄소를 보유하고 있는 해양 탄소의 주요 저장고이다. 해양 용존 유기물은 탄수화물, 펩타이드, 지질, 유기산 등이 주성분으로 이루어진 다양한 유기물의 혼합물로 해양 생물 기원 대사물질 및 분해산물과 육상으로부터 유입된 유기물질 등으로 구성된다. 해양 용존 유기물 연구의 필요성은 해양 생태계 및 생지화학 순환 이해를 위해서 뿐만 아니라 최근 기후 변동에 대한 역할이 알려지며 그 중요성이 더욱 커지고 있다.

해양 용존 유기물은 해양-대기 상호작용 및 다양한 대기 중 산화 과정을 통해 해양 에어로졸을 형성하게 된다. 해양에서 생성된 sea spray aerosol(SSA)은 지구 대기에 존재하는 에어로졸의 40 - 60%를 차지하는 가장 큰 에어로졸 소스이다.(Cochran et al. 2017) 1980년대 말 제안된 CLAW 가설에 따르면, 해양 식물 플랑크톤에서 방출된 DMS는 대기 중 산화 반응을 통해 황산염으로 변하며 이들은 구름응결핵(cloud condensation nuclei, CCN)을 만드는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 해양 플랑크톤 대량 번식이 일어나는 시기에 해양 에어로졸에 대한 생물 기원 유기물질의 기여는 63%에 달하는 것으로 보고된 바 있다.(O'Dowd et al., 2004) 그러므로 해양의 기후 조절자로서의 역할 및 영향을 파악하기 위해서는 해양 용존 유기물의 특성을 규명하는 연구가 필수적이다.

하지만 CLAW 가설 이후 오랜 연구에도 불구하고 해양 생태계가 해양 에어로졸의 화학 조성 및 CCN으로서의 역할에 미치는 영향에 대해서는 여전히 많은 의문이 남아있다. 이는 해양 생태계 기원 용존 유기물질들에 대한 정확한 화학적 정보의 부재와 복잡한 해양 환경에서 변하는 해양 생물들의 군집구조와 생물 활동도에 기인한다.

이러한 한계를 극복하기 위해 본 연구에서는 1) 인공생태계를 활용하여 통제된 조건에서 해양 플랑크톤 배양을 통한 용존 유기물 생성 및 2) 초고분해능 질량분석법을 활용하여 분자수준에서 해양 플랑크톤 기원 용존 유기물의 화학적 특성 규명 연구를 진행하고자 한다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

- 해양 탄소 순환 및 해양-대기 상호작용을 통한 기후 조절자로서 해양 및 해양 생태계의 역할에 대한 과학적 규명과 이를 활용한 미래대응이 필요
- 해양의 기후조절 기작 규명을 위해 분자수준에서 용존 유기물의 특성 파악 필요
 - 용존 유기물 연구는 용존 유기물을 구성하는 물질들의 광학적 특성을 이용한 형광분석법이 많이 활용되고 있으나 이는 유기물을 구성하는 개별 화합물들의 정보를 파악하는 것에 한계가 있음
 - 고분해능 질량분석법은 높은 분해능과 질량 정확도로 복잡한 유기물을 구성하는 물질의 정확한 분자정보를 제공하여 그 물질의 화학조성을 파악하는데 있어 현존하는 가장 강력한 분석기법으로 이를 활용한 해양 용존 유기물 연구가 필요함

나. 경제·산업적 측면

- 해양 조류 기원 유기물의 질량 D/B 구축을 통해 신규 독성물질 규명 또는 유용 천연물질 개발에 따른 해양산업의 부가가치 창출에 기여
- 메조코즘을 활용한 해양 생태계 연구는 미래 해양 환경 변화 예측을 통해 후속 연구 발굴 및 수행에 기여

다. 사회·문화적 측면

- 기후변화와 관련된 해양의 역할에 대한 과학적 이해 증진
- 해양과기원 기관 고유미션 및 국가적 아젠다 달성에 기여함으로써 해양과학 분야의 국가 위상 제고

제 2절 연구개발의 내용 및 범위

1. 연구개발의 최종목표

- 해양 플랑크톤 기원 용존 유기물의 화학적 특성 규명
 - 메조코즘 활용 해양 플랑크톤 기원 용존 유기물 생성
 - 초고분해능 질량분석법 활용 용존 유기물 분자단위 연구

2. 연구개발의 내용 및 범위

세부 연구목표	연구내용 및 범위
메조코즘 활용 해양 생태계 기원 용존 유기물 생성	계절적 특성을 반영한 플랑크톤 배양환경 구축
	지리적, 계절적 특성을 반영한 우점종 군집 배양
고분해능 질량분석법 활용 용존 유기물 분자단위 연구	해양 용존 유기물 추출법 및 정제법 개발
	해양 플랑크톤 기원 유기물 질량 프로파일링
	군집변화에 따른 용존 유기물 화학조성 정밀 비교

제 2장 국내외 기술개발 현황

제 1절 국내 연구 동향

- 용존 유기물에 대한 국내 연구는 하천, 연안, 대양, 극지방 등 다양한 환경에서 용존 유기물의 특성이 연구되었으나, 대부분 용존 유기물의 광학적 특성을 이용한 연구가 주를 이루어 왔다.
 - 형광분광광도계 및 안정동위원소 분석을 활용하여 낙동강 유역의 휴믹상 FDOM과 단백질상 FDOM의 계절적 변화를 조사하였고, 강수량과 생물 생산성에 따른 FDOM 생성과 주변 연안으로의 공급에 대한 중요성을 보고하였다.(Lee et al., 2018)
 - 시화호에서 FDOM을 추적자로 활용하여 계절에 따른 유기물 기원(생물기원, 난분해성, 퇴적물)을 보고하였으며(Han et al., 2021), 시화호 주변 연안환경을 구체화하여 각각의 유기물 함량과 생물 분해성 등의 특성을 규명하였다.(Lee et al., 2017)
 - 제주도 내 육상양식장 밀집 지역 주변 연안 해수에서 용존 유기탄소농도를 측정하였고, CDOM(colored dissolved organic matter)을 추적자로 이용하여 용존 유기물질의 기원과 특성을 파악하였다. 양식장 외각 표층해수에서 높은 농도의 용존 유기탄소, 용존 유기질소 및 용존 유기인의 낮은 C:M 비 값과 높은 BIX 값을 바탕으로 생물 활동에 의한 용존 유기물의 생성을 확인하였다.(Kim et al., 2017)
 - 북동태평양 해역에서 탄소량 측정법과 형광기법을 활용하여 용존 유기물의 기원과 분포 특성을 파악하였다. 수심에 따른 용존 유기물 분포는 생물 활동이 활발한 유광층에서 높고 수심이 증가할수록 감소하여 이후 일정 농도를 유지하는 양상을 보였다. 용존 유기물 성분 중 protein-like 물질은 생물활동과 밀접한 연관성을 보였으며 미생물에 의해 빠르게 소비되는 특징을 보였다. 용존 유기물 성분 중 humic-like 물질은 주로 protein-like 물질의 미생물 분해를 통해 생성되며 심층에서 우점하는 것으로 보고하였다.(Son et al., 2007)
 - 다양한 환경조건에서 플라스틱으로부터 용출된 용존 유기물(Microplastic derived dissolved organic matter, MP-DOM)을 특성화하고, MP-DOM의 다양한 환경 거동을 일반적인 NOM과 비교하였다. 형광 EEM-PARAFAC을 이용하여 다양한 플라스틱으로부터 방출되는 MP-DOM의 형광 특성을 조사하였으며, UV 조건에 따른 MP-DOM의 미네랄 흡착 거동 등을 평가하였다.(Lee et al., 2021)

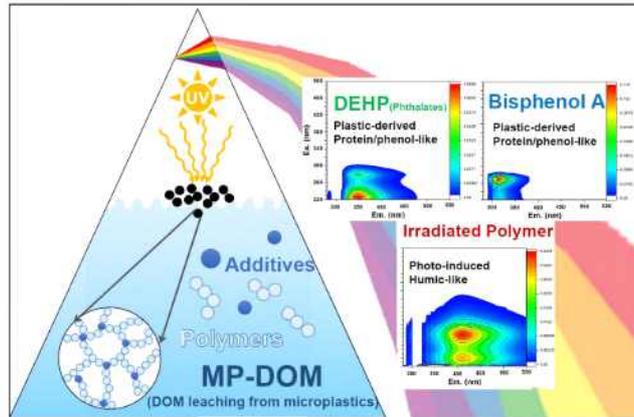


그림 2-1-1. 형광 EEM-PARAFAC을 이용한 용존 유기물 연구

- 탄소 안정동위원소는 용존유기물의 기원과 탄소순환을 이해하는데 유용한 분석법으로 안정동위원소 질량분석기를 이용하여 유기물 전체 또는 특정 유기화합물에서도 탄소 안정동위원소 분석이 이루어지고 있다.
- 시화호 해수에서 발생하는 용존 유기물(DOM)의 기원을 규명하기 위하여 용존 유기탄소의 탄소 안정동위원소비와 DOM의 광학적 특성을 조사하였다. DOC- $\delta^{13}\text{C}$ 값에 근거하여 DOC의 기원을 갯벌 해양퇴적물 유래, 생물학적 생산 등의 해양 기원, 육상 기원으로 구분하였으며, 이러한 생·지화학적 도구 조합이 DOM의 기원과 특성을 연구할 강력한 추적자가 될 수 있음을 강조하였다.(Han et al., 2021)

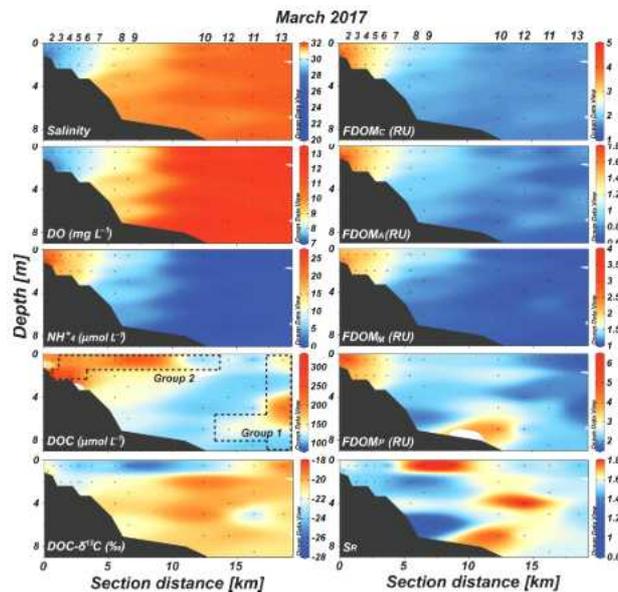


그림 2-1-2. 탄소 안정동위원소를 활용한 용존 유기물 연구

- 고분해능 질량분석법의 발전과 함께 환경에 존재하는 복잡한 유기물의 특성을 분자 단위에서 밝히고자 하는 연구가 세계적으로 주목을 받으며, 기후변화 및 탄소 순환과 관련하여 해양 용존 유기물의 분자 단위 규명 연구 필요성 또한 높아지고 있다.
- 초고분해능 질량분석기(Orbitrap MS)와 최근 많은 분야에서 응용되고 있는 ambient ionization을 활용하여 용존 유기물을 분자단위에서 분석하였다. 기존 용존 유기물 분석에 활용되지 않았던 새로운 이온화 방식인 paper spray ionization과 paper spray chemical ionization 방식을 도입하여 기존 이온화 방식보다 다양한 극성을 갖는 더 많은 물질이 검출되었다. 또한 염분에 대한 저항성이 높은 이온화 방식 특성으로 전처리 없이 빠르게 시료 분석 가능했으며, 이는 해양 용존 유기물의 분석에 큰 장점으로 작용할 수 있음을 보고하였다.(Kim et al., 2018)

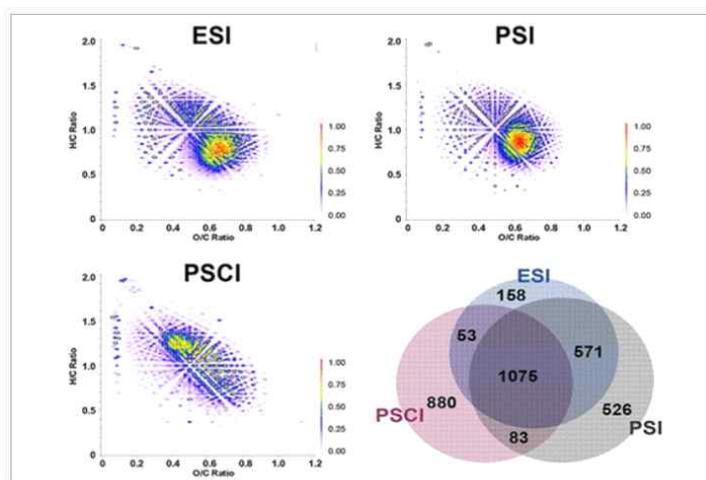


그림 2-1-3. 초고분해능 질량분석법과 ambient ionization을 활용한 용존 유기물 분석

제 2절 국외 연구 동향

- 해양 탄소 순환과 해양의 능동적 기후 조절과 같은 지구 시스템의 주요 구성 요소로서 해양의 역할을 이해하기 위해 최근 해양 용존 유기물에 대한 연구 필요성이 높아지고 있다. 이에 따라 해양 용존 유기물의 특성을 밝히기 위한 다양한 연구가 진행되고 있다.(Siegel et al., 2016)

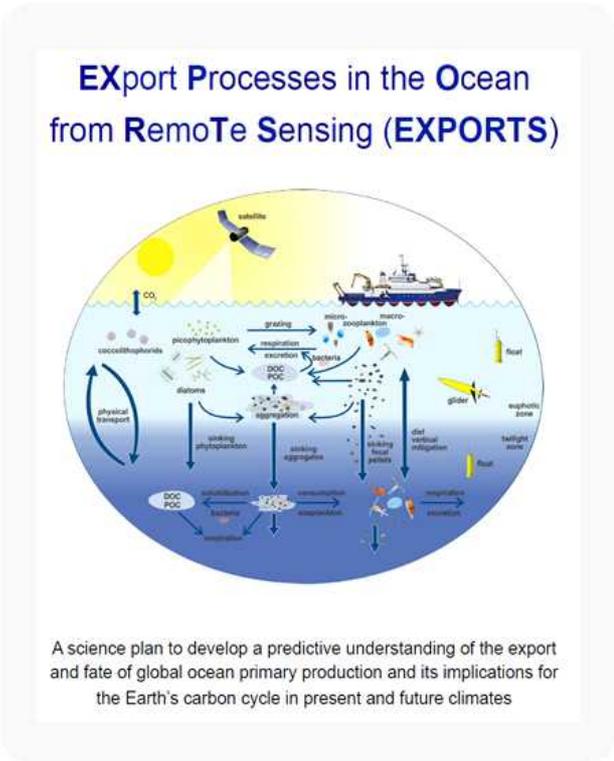
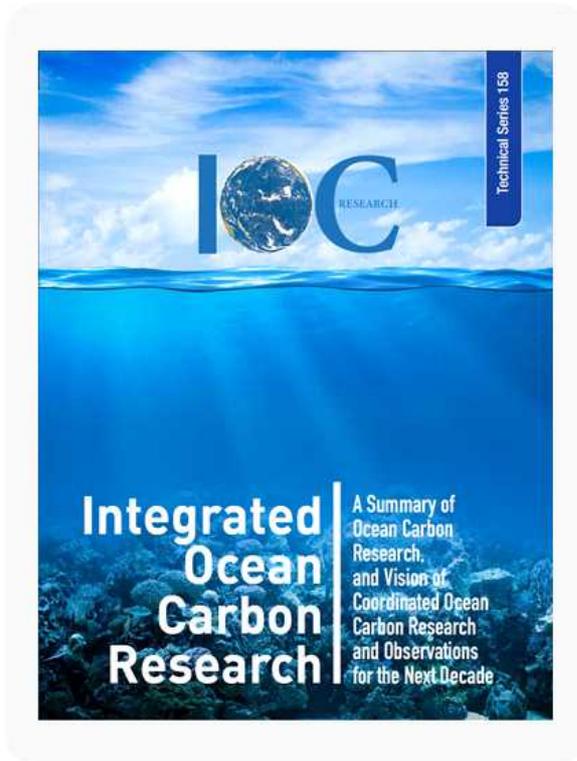


그림 2-2-1. 해양 탄소순환 관련 국외 연구 사례

- 최근 용존 유기물의 특성 규명 연구는 용존 유기물을 구성하는 물질들의 화학조성 및 구조특성을 분자수준에서 밝히기 위해 고분해능 질량분석법, 고분해능 핵자기공명분광학 등 다양한 최신 분석기법을 접목한 분석이 이루어지고 있다.
- 확산 열수분출구에서 채취된 열수를 분광광도법과 초고분해능 질량분석법을 활용하여 용존 유기물의 특성을 파악하였고, 열수 및 해수에서 약 3000개의 화학물질을 확인하였다. 미생물 군집을 활용한 생분해 실험 및 초고분해능 질량분석법과 CDOM 분석결과에 따르면, SPE-DOM의 일부(17%)가 생물학적으로 이용 가능하였으며, 비방향족 화학물이 우선적으로 분해되어 방향족 화합물과 낮은 분자량을 갖는 물질, O/C 비가 낮은 DOM이 남는 것으로 보고하였다.(Rossel et al., 2015)
- 남극해와 동대서양의 34개의 해양 용존 유기물 시료를 초고분해능 질량분석기와 가속 질량분석기를 활용하여 분자조성 및 탄소 연대 측정하였고, 이를 바탕으로 DOC의 분해율을 모델링하였다.(Lechtenfeld et al., 2014)
- 초고분해능 질량분석법과 핵자기공명분광법을 활용하여 조류 대발생 이후 용존 유기물의 특성 변화를 분자 수준에서 파악하였다. 용존 유기물을 구성하는 물질들의 계절적 변화는 비생물적 과정에 의한 화학적 변형보다 생물 대사에 의한 영향이 주도적인 것으로 확인되었으며, 이 두 가지 분석기법을 결합한 연구가 용존 유기물과 같이 극도로 복잡한 환경 혼합물의 분석에 매우 강력한 툴이 될 수 있음을 강조하였다.(Zhang

et al., 2014)

- 초고분해능 질량분석법이 용존 유기물과 같은 복잡한 환경 유기물 분석에 매우 유용하게 활용되고 있지만, 대부분 시린지를 이용한 직접 주입 방식으로 시료가 도입되고 있다. 이러한 방식은 dynamic range limitation과 같은 한계가 있어 최근 액체 크로마토그래피를 접목한 LC-HRMS 분석이 강력한 대안으로 떠오르고 있다. Patriarca et al.은 초고분해능 질량분석기에 고성능 액체 크로마토그래피를 접목한 HPLC-ESI-HRMS 시스템을 활용하여 용존 유기물을 분석하였다. 분리분석을 통해 신호대 잡음비 및 감도가 더 높아짐에 따라 기존 분석법 대비 22% 더 많은 물질의 검출이 가능해졌음을 보고하였다.(Patriarca et al., 2018)

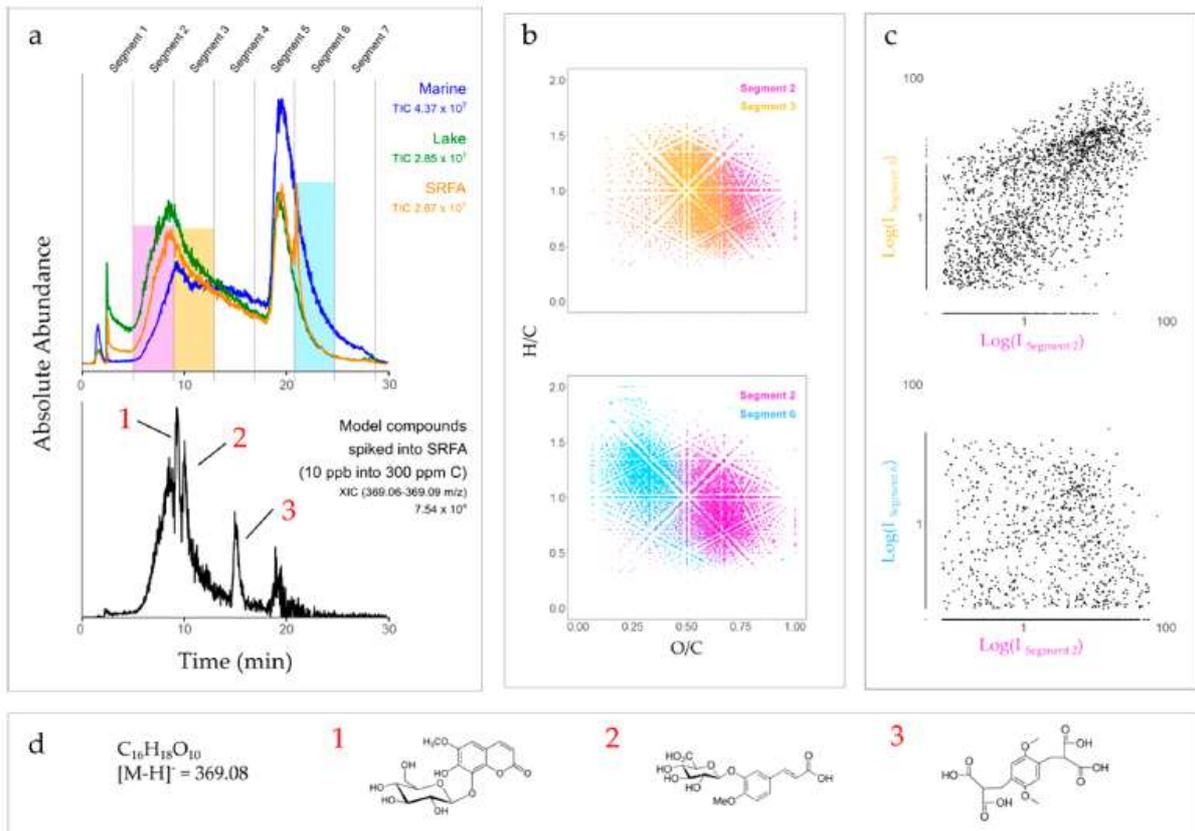


그림 2-2-2. HPLC-HRMS를 활용한 용존 유기물 분석

제 3장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1절 메조코즘 활용 해양 생태계 기원 용존 유기물 생성

1. 계절적 특성을 반영한 플랑크톤 배양 환경 구축

- 계절적 특성을 반영한 해양 생태계 기원 용존 유기물 생성을 위해 2021년 8월 거제 장목만 해수를 활용하여 메조코즘 실험을 진행하였다.(그림 3-1-1)
 - 플랑크톤 군집 변화를 유도하기 위해 2개의 반복구로 대조군(C), 저영양염(Low nutrient; LN) 실험군, 고영양염(High nutrient; HN) 실험군의 총 6개의 1톤 규모의 메조코즘을 설치하였다.
 - 실험구간 영양염 조건은 대조군은 현장 해수만으로 구성되어 배경농도로 사용되고, LN실험군은 N:P:Si의 농도가 32:2:32 μM 로, HN실험군은 96:6:96 μM 으로 설정하였다.



그림 3-1-1. 야외 메조코즘 설치 사진

- 수환경요인(수온, 염분, pH, 용존산소;DO)은 YSI EXO2 sonde(Yellow Springs Instruments, Ohio, USA)를 이용하여 측정하였다.(그림 3-1-2)
 - 실험 기간 동안 평균 수온은 28.8°C로 시간 변화에 따라 30.5°C에서 26.6°C로 감소하였다.
 - 실험 4일 차까지 평균 염분은 30.4 ‰였으며, 이후 강우의 영향으로 28.7 ‰까지 감소하였다.
 - 대조군에서 pH는 초기 9.02±0.03에서 15일 차 8.64까지 지속적인 감소추세를 보였다. 반면, 영양염 첨가 실험군인 LN 실험군과 HN 실험군에서는 4일 차까지 감소하였으나, 이후 5일 차에 급격히 증가하여 최댓값(LN 실험군: 9.2, HN 실험군: 9.5)을 보였고, 이

- 후 15일 차까지 감소하는 경향을 보였다.
- 모든 실험군에서 용존산소(DO)의 농도는 초기 평균 7.1 mgL^{-1} 에서 4일 차까지 지속적으로 감소하였다. 4일 차 용존산소의 농도는 대조군($5.4 \pm 0.03 \text{ mgL}^{-1}$), LN 실험군($4.3 \pm 1.4 \text{ mgL}^{-1}$), HN 실험군($2.2 \pm 0.2 \text{ mgL}^{-1}$)의 순서로 나타났다. 5일 차 영양염 첨가 실험군에서 용존산소의 농도는 급격히 증가하여 LN 실험군은 $12.5 \pm 1.3 \text{ mgL}^{-1}$, HN 실험군은 $19.2 \pm 1.8 \text{ mgL}^{-1}$ 로 최대 농도가 측정되었다. 이후 모든 실험구에서 실험종료까지 감소하는 경향을 보였다.
 - 대조군의 엽록소 a 농도는 실험 기간 동안 $1 \text{ } \mu\text{gL}^{-1}$ 전후로 변환 반면, 영양염 첨가 실험군의 엽록소 a 농도는 초기 $1 \text{ } \mu\text{gL}^{-1}$ 에서 점차 증가하여, LN 실험군과 HN 실험군은 4일 차와 6일 차에 각각 $9.4 \pm 2.6 \text{ } \mu\text{gL}^{-1}$, $32.5 \pm 1.6 \text{ } \mu\text{gL}^{-1}$ 으로 최댓값이 나타났다. 5일 차 엽록소 a 농도값은 얻지 못했으나, 5일차에 나타난 용존산소와 pH의 최댓값을 고려했을 때 6일차에 비해 다소 높았을 것으로 판단된다. 6일차 이후 두 영양염 첨가 실험군에서도 엽록소 a의 농도는 감소하는 경향이 나타났다.

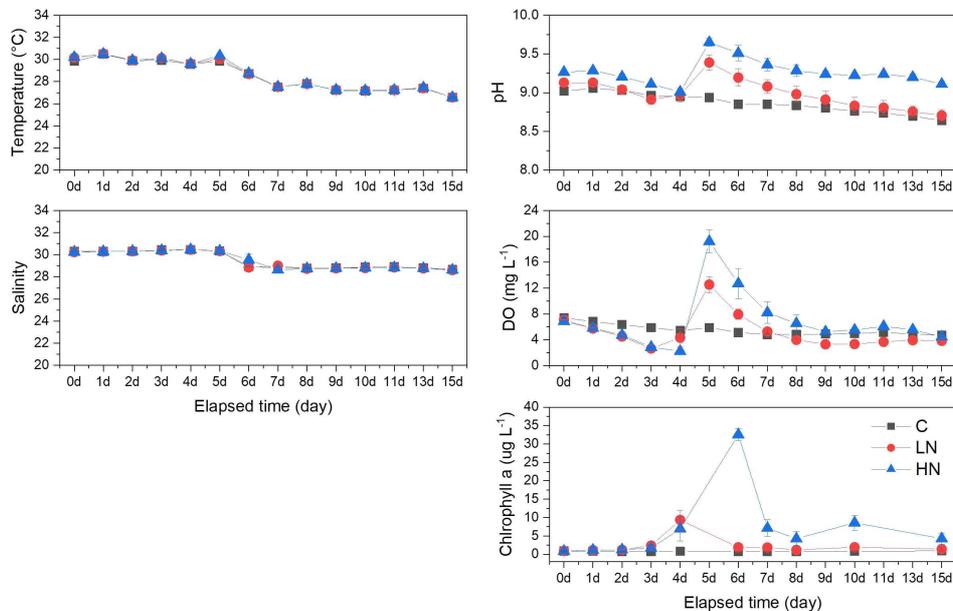


그림 3-1-2. 수환경요인 및 엽록소 a 농도의 시계열 변화

2. 지리적, 계절적 특성을 반영한 우점종 군집 배양

- 초기 규조류가 98% 이상으로 우점하였고, 실험 4일 차 영양염 첨가 실험군인 LN과 HN 실험군은 99%이상 규조류가 우점하였으나, 대조군은 83%로 감소하며 차이를 보였다.(그림 3-1-3)

- 대조군은 시간 경과에 따라 규조류의 비율이 15일 차 7%까지 감소하였고, 와편모조류와 Others의 비율이 증가하였다.
- 두 영양염 첨가 실험군 중 LN 실험군의 규조류 비율은 6일 차 97%, 10일 차 89%, 15일 차 60%로, HN 실험군의 시간에 따른 규조류 비율(6일 차: 99.9%, 10일 차: 99.8%, 15일 차: 84.6%)에 비해 빠르게 감소하는 경향을 보였다.
- 이러한 결과는 영양염 첨가량에 따라 규조류의 우점도 및 식물플랑크톤 천이가 발생함을 시사한다.
- 영양염 첨가 실험군에서의 식물플랑크톤의 최대 총 생물량은 엽록소 a의 변동 경향과 유사하게 나타났다.(LN 실험군: 4일 차 1.1×10^4 cells mL⁻¹, HN 실험군: 6일 차 2.2×10^4 cells mL⁻¹)

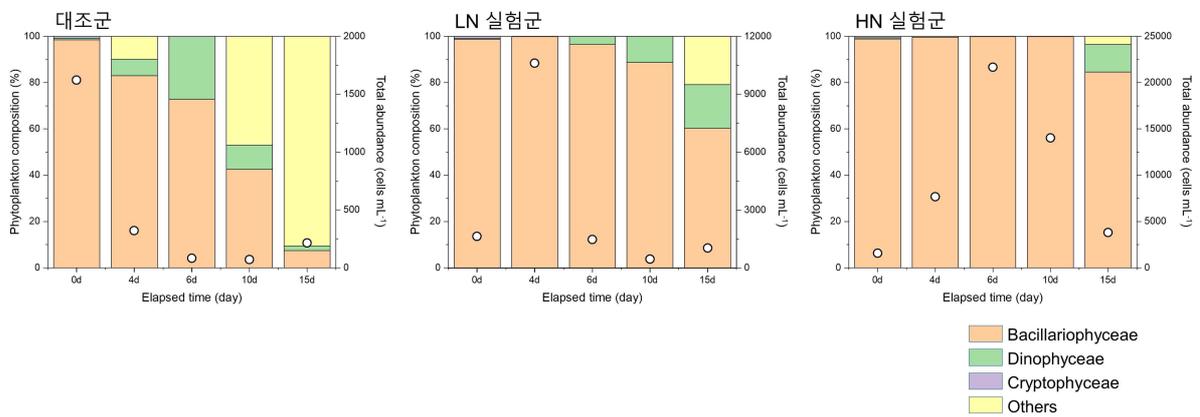


그림 3-1-3. 식물플랑크톤 분류군별 구성비의 시계열 변화

- 실험 초기 규조류 *Leptocylindrus* spp.가 90%이상으로 극우점하였고, 대조군에서 4일 차 *Leptocylindrus* spp.는 76%의 비율로 최 우점종이었으나, 영양염 첨가 실험군에서는 4일차에 10% 이하로 크게 감소하였다.(그림 3-1-4)
- 영양염 첨가 실험군에서는 4일 차 규조류 *Chaetoceros* spp.가 평균 78%로 최우점하여, 우점종의 천이가 확인되었다.
- 실험 6일 차에 LN 실험군에서는 *Chaetoceros* spp.의 비율이 90%까지 증가하였으나, HN 실험군에서는 *Chaetoceros* spp.가 72%, *Pseudo-nitzschia* spp.가 17%의 비율로 증가하여, 영양염 농도별 식물플랑크톤 군집의 천이가 다르게 나타남을 확인하였다.
- 이후 실험 10일과 15일 차에는 부착성 규조류인 *Cylindrotheca closterium*이 LN 실험군과 HN실험군에서 최대 72%와 56%로 높은 비율을 보였다.

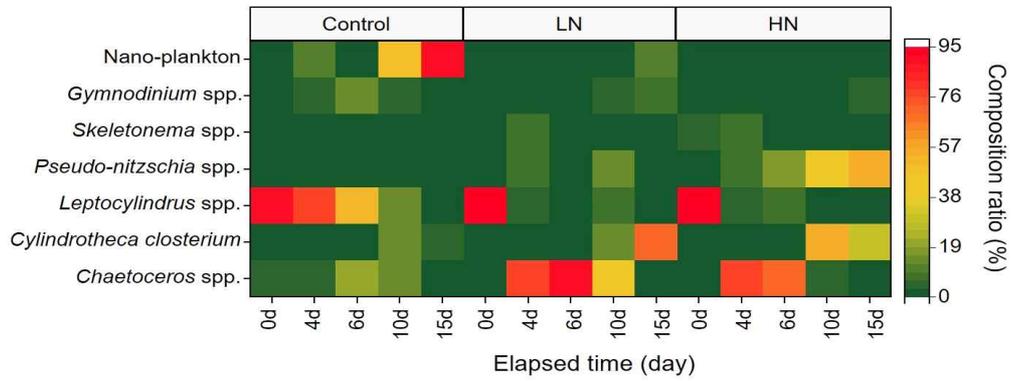


그림 3-1-4. 우점 식물플랑크톤의 구성비의 시계열 변화

제 2절 고분해능 질량분석법 활용 용존 유기물 분자단위 연구

1. 해양 용존 유기물 추출법 및 정제법 개발

- 질량분석기를 활용한 용존 유기물의 분석에는 우선 해수에 존재하는 용존 유기물의 정제 및 추출과정이 필요하다. 이는 용존 유기물의 검출 능력을 높이고, 해수에 존재하는 염에 의한 adductive ion(예, $[M+Na]^+$, $[M+Cl]^-$) 형성과 같은 matrix effect를 줄이기 위함이다.
- 현재 용존 유기물의 추출에는 해수에 강산을 첨가하여 용존 유기물의 추출 효율을 높이고 고체상 추출법(solid-phase extraction, SPE)을 활용하여 정제 및 추출을 진행하는 방식이 가장 많이 활용되고 있다.(Dittmar et al., 2008) Dittmar에 의해 개발된 방식은 매우 간편하지만 용존 유기물의 추출 효율이 상대적으로 낮은 문제점이 있다.
- 본 연구에서는 이러한 문제점을 보완하기 위해 SPE 단계 이전에 금속 양이온을 첨가하여 일부 용존 유기물 성분의 응집을 유도하였고, 상층액과 침전물을 별도로 분리하여 분석을 진행하였다. 금속 양이온을 이용한 침전 유도는 정수 시스템에 활용되는 방식 중 하나로 철 이온(Fe^{3+})이 많이 사용된다.
- 전처리법은 다음과 같다. 우선 0.7 μ m GFF 필터를 사용하여 해수에 존재하는 입자상 물질을 제거하였다. 입자가 제거된 해수에 1mM이 되도록 Ferric acid를 첨가한 후, 응집이 충분히 일어나도록 1시간가량 약하게 교반한 후 방치하였다. 금속 양이온에 의한 응집으로 황토색의 침전물이 형성되었으며 0.7 μ m GFF 필터를 사용하여 상층액과 침전물을 분리하였다. pH에 의한 용존 유기물 추출 효율 차이를 줄이기 위해 분리된 상층액에 염산을 첨가하여 pH를 2로 조절한 후 SPE를 진행하였다. 침전물은 다시 200mL의 증류수와 염산을 첨가(pH=2)하여 용해시킨 후 SPE를 진행하였다.(그림 3-2-1) 추출법에 따른 차이를 확인하기 위해 Dittmar가 제안한 전처리법도 함께 수행하였으며 전처리법은 다음과 같다. 입자가 제거(0.7 μ m GFF 필터)된 해수 1L에 pH 2가 되도록 염산(HCl)을 넣어주고 SPE를 진행하였다.

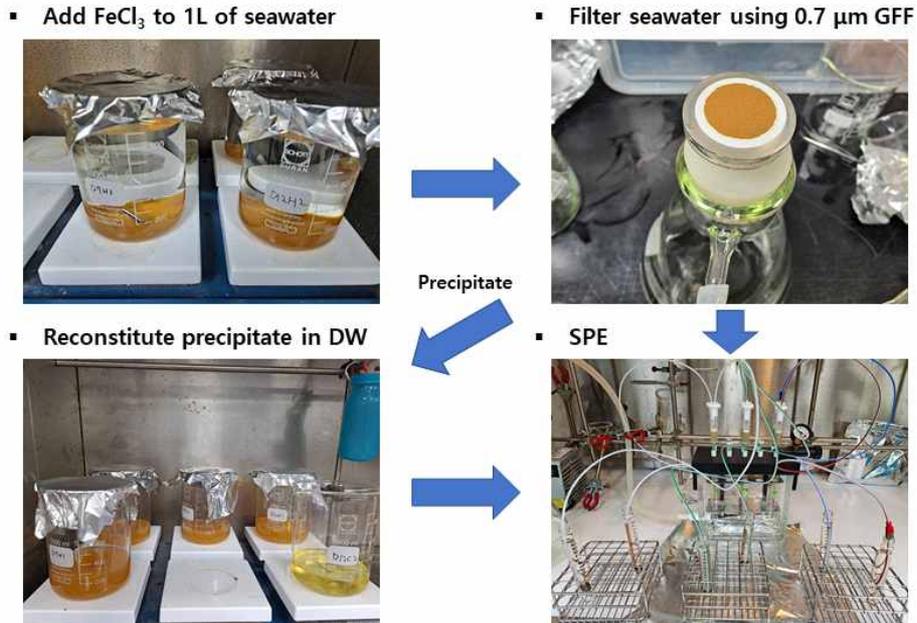


그림 3-2-1. 용존 유기물 전처리 과정

- 용존 유기물의 추출에는 PPL 카트리지(Bond Elut PPL, 500mg, 6mL)가 사용되었으며 추출 과정은 다음과 같다. 각 카트리지에 20mL의 메탄올과 100mL의 증류수(HCl, pH=2)를 흘려주어 흡착제를 충분히 워싱한 이후 전처리 된 해수 시료 1L를 약 5 mL/min의 속도로 흘려주어 용존 유기물을 흡착시켰다. 이후 다시 100mL의 증류수(HCl, pH=2)를 흘려 염분을 제거하였고, 용존 유기물의 용출에는 15mL의 메탄올이 사용되었다. 용존 유기물 추출액은 질소 농축기를 활용해 최종 1mL로 농축 후 질량분석을 진행하였다.(그림 3-2-2)

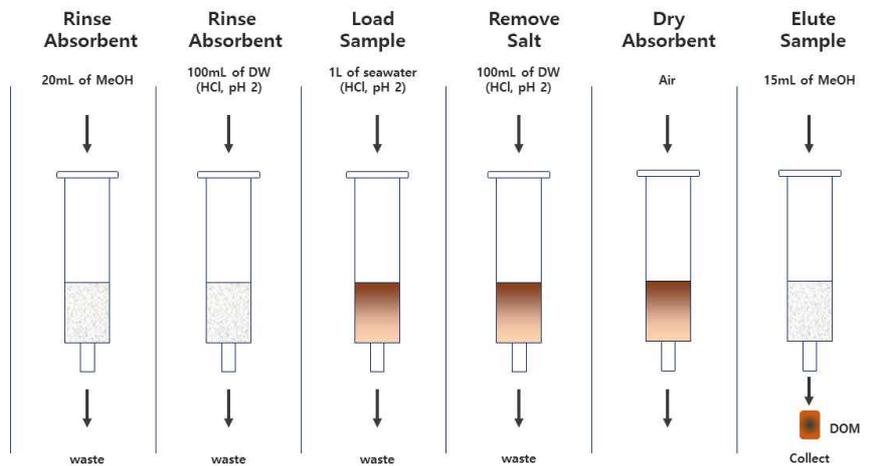


그림 3-2-2. 용존 유기물의 고체상 추출 모식도

- 이후 내용부터 시료 명명의 편의를 위해 금속 양이온 첨가 이후 응집/침전된 용존 유기물을 침전물 시료, 금속 양이온 첨가에 따라 생성된 침전물을 제외한 용존 유기물을 상층액 시료라고 정의하였다.

2. 고분해능 질량분석기를 이용한 해양 플랑크톤 기원 유기물 질량 프로파일링

○ 해양 플랑크톤 기원 용존 유기물 분자단위 연구

- 용존 유기물의 분석에는 국가연구시설장비 공동활용 서비스를 통해 경북대학교 질량 분석융복합연구소에 구축된 초고분해능 질량분석기인 Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometer(FT-ICR MS)(Bruker Daltonik, Germany)가 활용되었다.
- 분석은 negative electro spray ionization(ESI) 조건에서 진행되었고 m/z 150-2000의 범위에서 300번 스캔하였다. 질량스펙트럼은 Quadrupolar detection(QPD) mode에서 4MW transient size로 측정되었고 얻어진 질량스펙트럼의 분해능은 m/z 400에서 약 500,000으로 측정 되었다.
- 얻어진 질량 스펙트럼은 내부 표준물질로 넣어준 sodium trifluoroacetate를 사용하여 1차 calibration하였고, International Humic Substances Society(IHSS)의 humic acid 분석결과를 기준으로 자체 제작된 peak list로 2차 calibration하여 질량 정확도가 0.1ppm 이하가 되도록 하였다.

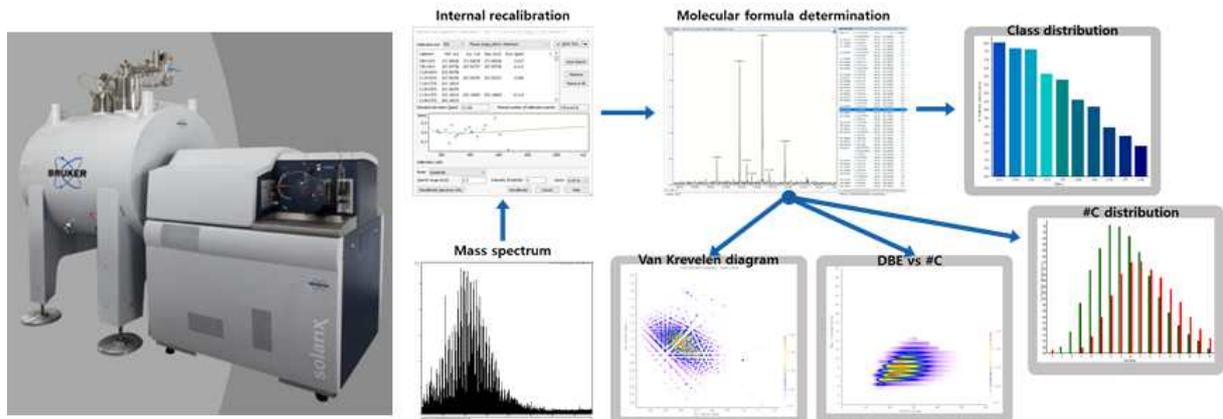


그림 3-2-3. 초고분해능 질량분석기(FT-ICR MS)와 데이터 처리 모식도

- 해양 용존 유기물의 초고분해능 질량분석 데이터는 아래와 같은 조건에서 0.5ppm error 이하의 질량 정확도로 화합물의 동정이 이루어졌다.(식 1)

$$\begin{aligned}
 & CcHhNnOoSs && \text{(식 1)} \\
 & c, h : \text{unlimited,} \\
 & 0 \leq n \leq 5, \\
 & 0 \leq o \leq 20, \\
 & 0 \leq s \leq 5
 \end{aligned}$$

- 초고분해능 질량분석 결과 기존 Dittmar에 의한 전처리 시료(D6H)는 총 4159개의 화합물이 검출되었으며, 그 중 2411개 용존 유기물의 화학조성이 확인되었다.(그림 3-2-4) 검출된 화합물 대비 분자식이 확인된 유기물의 비가 낮은 이유는 SPE를 진행했음에도 불구하고 일부 남은 염에 의한 adductive ion 형성에 따른 영향으로 확인되었다.
- 금속 양이온을 이용한 전처리 시료 분석결과 침전물 시료(D6Hp)에서는 2948개의 화합물이 검출되었으며 그 중 2033개의 용존 유기물이 확인되었다. 침전물의 경우 검출된 화합물 중 대다수 물질의 화학조성이 밝혀졌는데, 이는 침전물에 존재하는 염의 양이 적고 다시 증류수에 용해되는 과정에서 염의 농도가 낮아졌기 때문으로 판단된다.
- 상층액 시료(D6Hs)에서는 총 5323개의 화합물이 검출되었으며, 그 중 3118개의 용존 유기물의 화학식이 확인되었다.
- 침전물과 상층액 결과에서 공통 검출된 물질을 제외하고 총 4129개의 용존 유기물이 확인이 되어 Dittmar에 의한 전처리법 대비 약 1.7배 더 많은 용존 유기물이 분석되었다.

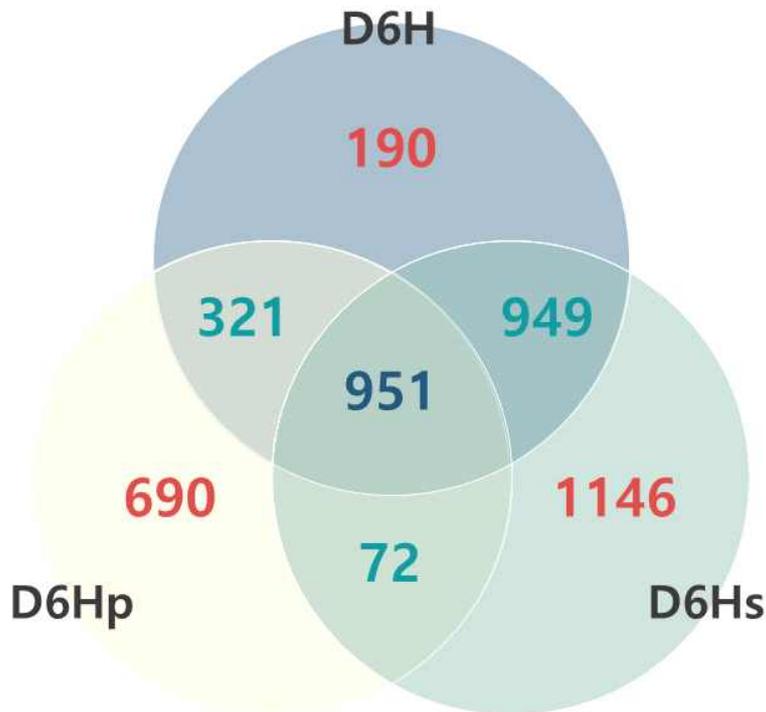


그림 3-2-4. 용존 유기물 전처리법 비교 결과

- 초고분해능 질량분석법을 통해 확인된 용존 유기물 구성 성분들의 주요 화학종 분포를 비교한 결과 기존 분석법 대비 침전물에서는 분자구조 내에 더 많은 산소를 포함하는 화합물, 즉 상대적으로 극성이 높은 화합물의 검출이 잘 이루어졌으며, 상층액에

서는 산소가 더 적은, 상대적으로 극성이 낮은 화합물의 검출이 더 많이 이루어졌다.
(그림 3-2-5)

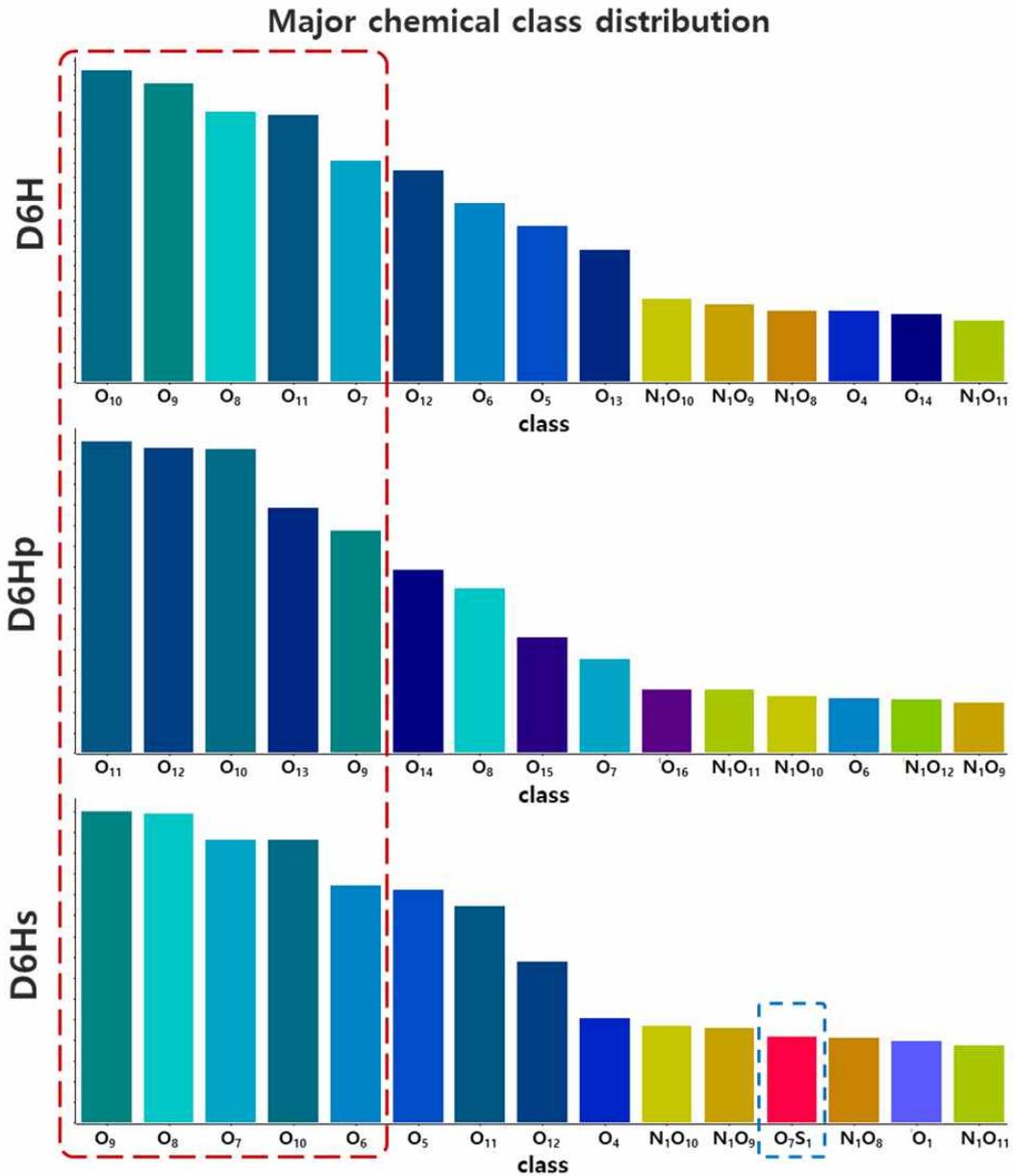


그림 3-2-5. 용존 유기물 전처리법 차이에 의한 주요 화학종 분포 변화

- 특히 상층액(D6Hs)에서 기존 분석법 대비 황을 포함하는 성분(O_xS₁)의 검출이 더 잘 이루어짐을 확인하였다.
- 개별 화학종들의 분포 변화를 확인한 결과, 질소를 하나 포함하는 화합물(N₁O_x)은 기존 분석법(D6H) 대비 침전물(D6Hp)에서는 더 많은 양이 검출되었고, 상층액(D6Hs)에

서는 적게 검출되었다.(그림 3-2-6. b)

- 황을 포함하는 화합물(O_xS_y , $y>1$)은 상층액에서 기존 분석법 대비 2배 이상 높은 감도로 분석이 되었으며, 특히 기존 분석법에서 검출이 잘되지 않았던 황을 2개 이상 포함하는 용존 유기물의 분석도 이루어졌다.(그림 3-2-6. d)
- 금속 양이온 첨가에 의해 용존 유기물 성분 중 산소를 상대적으로 더 많이 포함하는 화학종들의 응집(coagulation)이 주요하게 이루어졌고, 이에 따른 분리분석 효과로 상층액에서 기존에 분석이 어려웠던 화합물들의 검출이 가능해진 것으로 판단된다.

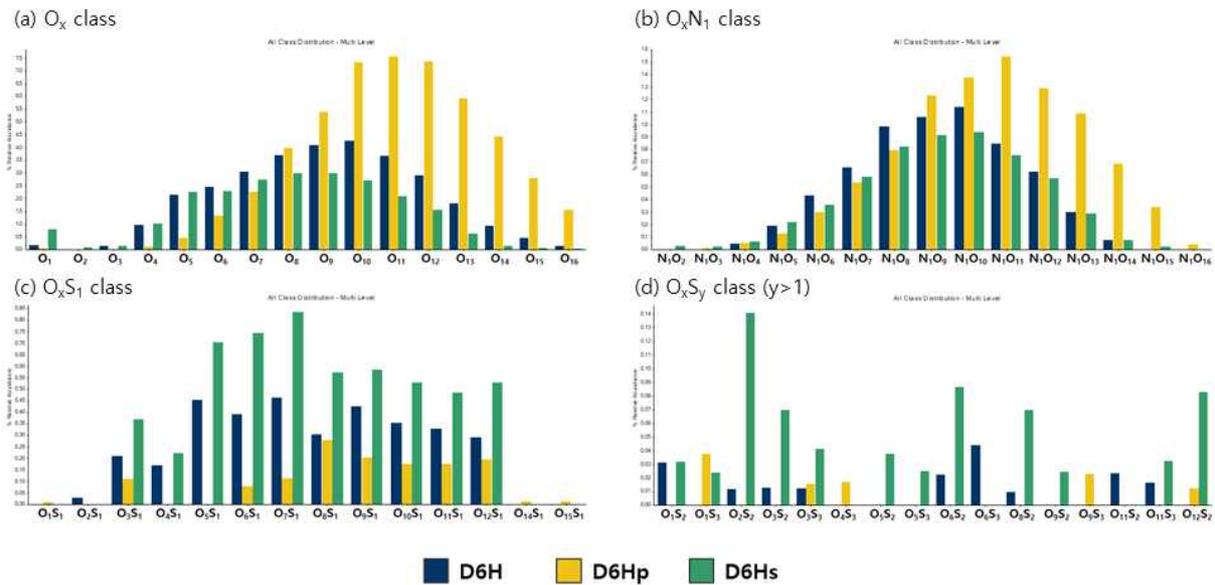


그림 3-2-6. 용존 유기물 전처리법 차이에 의한 개별 화학종 분포 변화

- 상층액 시료 중 6일차 대조군(D6Cs)과 실험군(D6Ls, D6Hs)의 초고분해능 질량스펙트럼을 확대하여 개별 peak 변화를 파악해보았을 때, 영양염 첨가 실험군의 경우 용존 유기물에서 질소 화합물의 생성을 확인할 수 있었다.(그림 3-2-7. a) 특히 저영양염 시료(D6Ls) 대비 고영양염 시료(D6Hs)에서 그 변화가 더욱 뚜렷하게 나타나 고영양염 조건에서 해수에 존재하는 생물 대사에 의해 생성된 용존 유기물의 존재를 확인하였다.
- 6일차 및 12일차 대조군(D6Cs, D12Cs)과 고영양염 실험군(D6Hs, D12Hs)의 확장 스펙트럼(m/z 358) 분석 결과, 고영양염 조건에서만 m/z 358.1984에서 강한 peak가 관찰이 되었다. 이 peak는 분자식이 $C_{16}H_{28}O_6N_3$ 인 물질로 Aspartyl-leucyl-leucine으로 이루어진 올리고 펩타이드와 동일한 분자식으로 확인되었다.(그림 3-2-7. b)

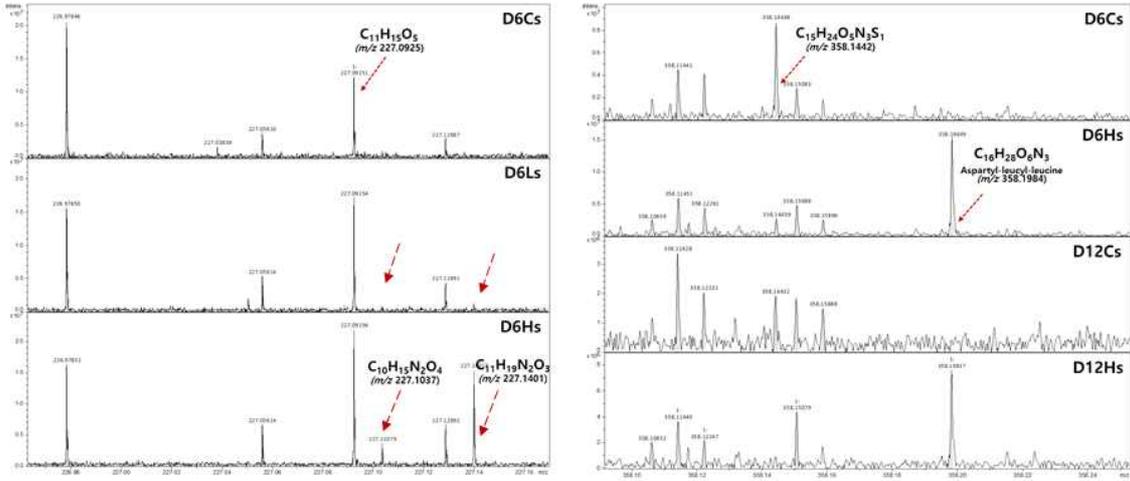


그림 3-2-7. 해양 용존 유기물 초고분해능 질량스펙트럼의 확장 스펙트럼

3. 플랑크톤 배양 조건 및 군집 변화 별 용존 유기물질 화학조성 정밀 비교 분석

앞서 영양염 첨가 유무 및 첨가된 농도 차이에 의한 해양 플랑크톤의 생물량 변화와 천이를 확인하였으며 본 섹션에서는 이에 따른 용존 유기물의 화학조성 세부 변화를 비교 분석하였다. 질량분석데이터 해석은 검출된 이온들의 절대량(absolute abundance)을 비교하는 방식과 상대적인 양(relative abundance)을 비교 평가하는 방식 모두 활용될 수 있으며, 본 연구에서는 상대적 양을 비교한 결과를 보고하였다.

○ 용존 유기물 화학조성 변화 - 침전물 시료

- 침전물 시료에서 O_x 화학종들의 상대적인 분포는 영양염 첨가 유무에 따른 큰 변화를 보이지 않았다. 하지만 6일차 결과와 비교 시 12일차 시료에서 산소를 11개 이상 갖는 O_x 화학종의 상대적 증가가 관찰되었으며 특히 산소 원자가 더 많아질수록 그 변화가 잘 관찰되었다.(그림 3-2-8. a)
- 침전물 시료에서 N_1O_x 화학종의 상대적 분포는 O_x 화학종과 유사한 경향을 나타냈으며, 특히 영양염 첨가군의 12일차 시료에서 그 변화가 뚜렷하나 나타났다. 반면 영양염을 첨가하지 않은 12일차 시료(D12Cp)에서 N_1O_x ($x \geq 11$) 화학종의 감소가 뚜렷하게 관찰되었으며 이는 이 물질들의 분해에 따른 결과로 판단된다. 영양염 첨가에 의해 발생된 생물량 차이와 pH 등 일부 환경적 요인을 제외하고 광조건 및 온도 등 다른 외부 환경요인은 동일한 점을 고려했을 때, 영양염 첨가군 시료 대비 대조군 시료에서 감소폭이 크게 나타난 것은 환경적 요인에 의한 분해보다 박테리아에 의한 분해와 같은 생물학적 요인이 크게 작용한 것으로 해석된다. 영양염 첨가군에서는 12일차 시료에서 N_1O_x 화학종이 상대적으로 증가한 결과를 보여 생물대사에 의한 용존 유기물의 생성을 확인할 수 있다.(그림 3-2-8. b)
- N_xO_y ($x > 1$) 화학종의 분포 변화는 좀 더 극적인 변화를 보여주었다. 고영양염 첨가군 6일차 시료(D6Hp)에서 N_3O_6 , N_3O_7 , N_3O_8 화학종의 뚜렷한 증가가 관찰되었으며 N_2O_5 , N_2O_6 , N_2O_7 , N_2O_8 화학종의 증가도 확인되었다. 특히 N_3O_6 화학종은 앞서 확장 스펙트럼 분석결과에서 관찰된 올리고 펩타이드 성분($C_{16}H_{28}O_6N_3$, Aspartyl-leucyl-leucine)과 동일한 화학종으로 플랑크톤 대사에 의해 생성된 용존 유기물의 화학적 특성을 잘 파악할 수 있었다. 대조군과 저영양염 실험군 12일차 시료는 6일차 시료 대비 상대적인 양이 전반적으로 감소한 반면, 고영양염 실험군(D12Hp)은 N_2O_8 , N_2O_9 , N_2O_{10} , N_2O_{11} 와 같은 특정 화학종의 증가가 특징적으로 나타났다. 이러한 화학종 분포 변화는 이 물질들의 생성과 직접적으로 연관되는 생물군집 변화에 의한 영향으로 평가된다.(그림 3-2-8. c)
- O_xS_1 화학종의 분포는 고영양염 6일차 시료와 대조군 12일차 시료에서 극적인 변화가 나타났다. 고영양염 첨가군 6일차 시료(D6Hp)에서 O_8S_1 , O_9S_1 , $O_{10}S_1$ 화학종이 대조군

(D6Cp)과 저영양염 실험군(D6Lp) 대비 많은 양이 검출 되었다. 대조군 12일차 시료(D12Cp)에서는 6일차 시료(D6Cp)대비 O_5S_1 , O_6S_1 , O_7S_1 , O_8S_1 화학종의 증가가 주요하게 나타났으며, 12일차 대조군 해수 내 환경을 고려했을 때 용존산소가 낮은 조건에서 박테리아에 의한 유기물 분해가 이 화학종의 증가와 연관 있을 것으로 판단된다.(그림 3-2-8. d)

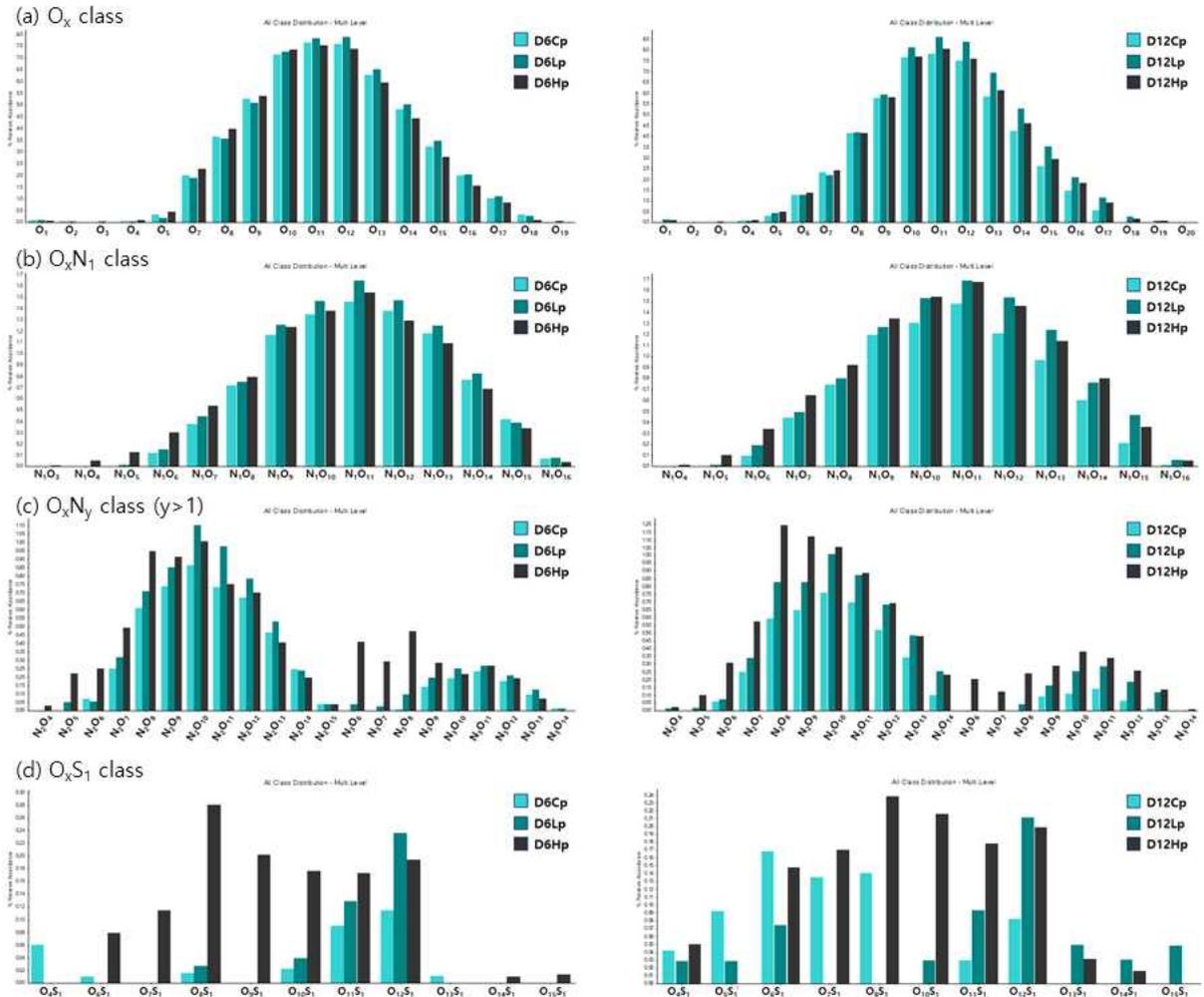


그림 3-2-8. 초고분해능 질량분석법을 통해 확인된 용존 유기물(침전물 시료)화학종 분포 변화

- 유기물로부터 얻어진 초고분해능 질량분석 데이터를 시각적으로 분석하는 방법 중 하나인 van Krevelen diagram을 활용하여 산소를 포함하는 용존 유기물 성분 ($CcHhNnOoSs$, $1 \leq o \leq 20$)의 기원과 특성에 대해 분석하였다.(그림 3-2-9)
- 침전물 시료는 van Krevelen diagram 상에서 Tannin-like 및 Lignin-like 영역에 나타났으며, 이는 일반적인 용존 유기물의 특성에 해당한다. 6일차 시료에서 영양염 첨가가 높을 수록 상대적으로 단백질 영역과 탄수화물 영역에 더 많은 물질이 나타나는

것을 확인할 수 있다. 특히 고영양염 첨가군에서 O/C ratio 0.2-0.3, H/C ratio 1.3-1.5 사이에서 특징적인 변화가 나타났는데, 이 영역은 S, O를 포함하는 물질과 S, N, O를 포함하는 물질들로 확인되었다. 분자정보에 기반하여 후보물질을 확인한 결과 식물성 스테로이드인 petuniasterone A(m/z 557.2942, $C_{32}H_{46}O_6S$), hydroxy petuniasterone A (m/z 573.2891, $C_{32}H_{46}O_7S$) 등이 대표적으로 확인되었다.

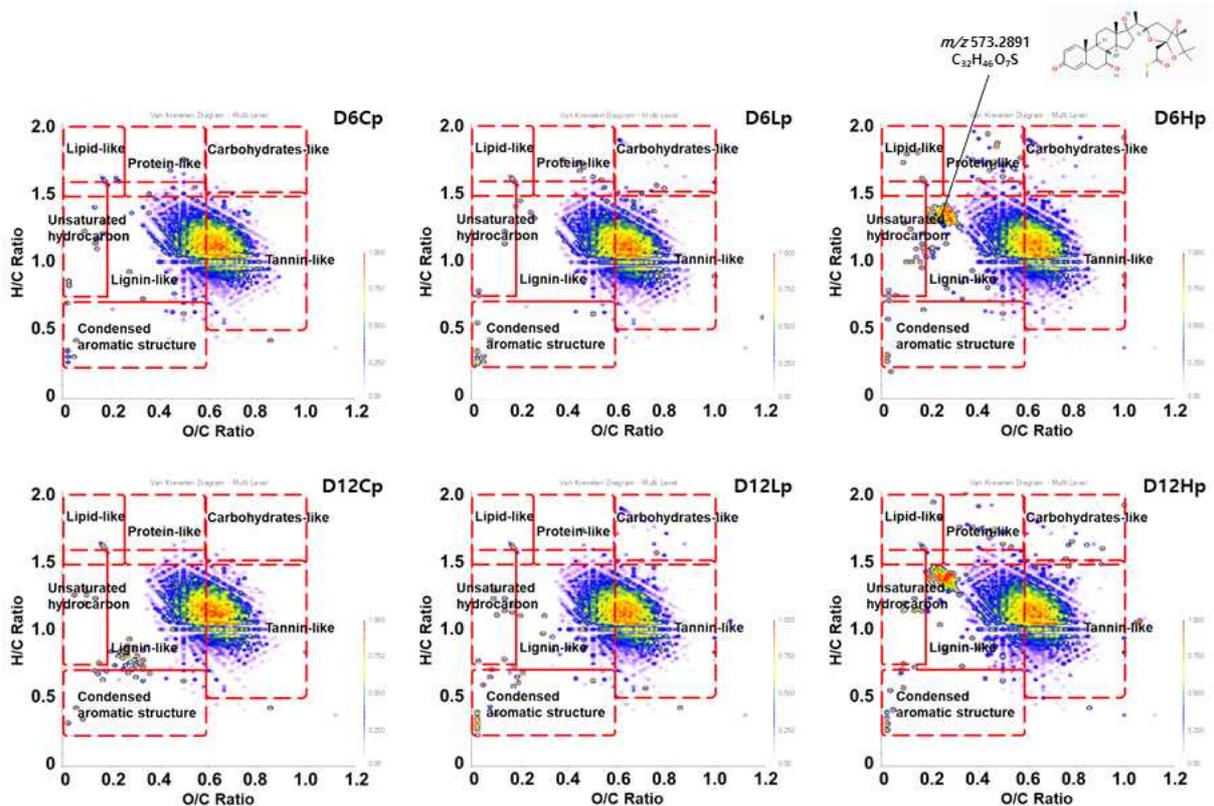


그림 3-2-9. 용존 유기물 침전물 시료의 van Krevelen diagram

- 주요 화학종 분포를 통해 침전물 시료에서 상위 15개 화학종의 변화를 파악해 보았다.(그림 3-2-10) 침전물 시료에서 상위 10개 화학종은 O_x 화학종($7 \leq x \leq 16$)이었으며, 다음으로 N_1O_x 화학종($9 \leq x \leq 12$)이 확인되었다. 침전물 시료에서 영양염 첨가 유무 또는 첨가량에 따른 변화는 주요 화학종 분포에서 크게 나타나지 않았다. 하지만 영양염 조건이 동일한 6일차 시료와 12일차 시료의 O_{13} vs O_9 , O_{14} vs O_8 화학종 분포를 비교 시, 영양염의 농도가 낮을수록 변화가 크게 나타났는데 이는 산소를 많이 포함하는 O_x 화학종의 분해에 따른 결과로 판단된다.

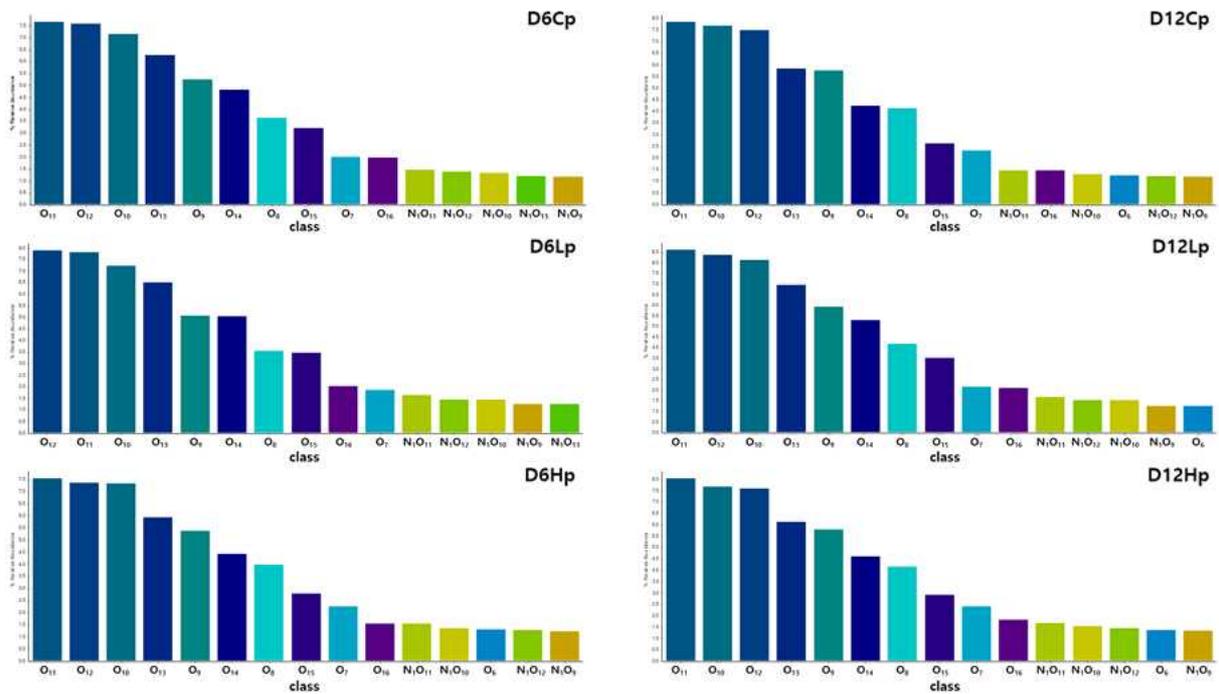


그림 3-2-10. 해양 플랑크톤 군집 변화에 따른 용존 유기물(침전물 시료) 구성 주요 화학종 분포 변화

○ 용존 유기물의 화학조성 변화 - 상층액 시료

- 상층액 시료는 침전물 시료에 비해 용존 유기물의 화학조성 변화가 더 뚜렷하게 나타났다. 6일차 시료와 12일차 시료의 O_x 화학종을 비교 시, 영양염 첨가군에서 O_5 화학종의 증가가 특징적으로 나타났다.(그림 3-2-11. a) O_5 화학종에서 가장 많은 양 검출된 이온은 $C_{15}H_{11}O_5^-$ (m/z 271.06119)로 negative ESI에서 deprotonation된 것을 고려했을 때, $C_{15}H_{12}O_5$ 에 해당한다. 이 분자식을 갖는 물질 중 대표적인 물질로는 플라보노이드 성분인 나린제닌(naringenin)이 있다. 또한 분자량 $C_{11}H_{12}O_5$ 를 갖는 물질도 많이 검출되었으며, 이 분자식을 갖는 대표적인 물질로는 페닐프로파노이드 계열의 시나핀산(sinapic acid)이 있다.
- 상층액 시료에서 N_1O_x 화학종의 상대적 분포는 침전물 시료와 유사하지만 더 큰 변화 양상을 보여주었다. 영양염을 첨가하지 않은 12일차 시료(D12Cs)에서 N_1O_x ($x \geq 11$) 화학종의 감소가 뚜렷하게 관찰되었으며, 영양염 첨가군에서는 12일차 시료에서 N_1O_x 화학종이 크게 증가한 결과를 보였다.(그림 3-2-11. b)
- N_xO_y ($x > 1$) 화학종의 분포 변화는 영양염 첨가군 시료에서 N_2O_5 , N_2O_6 , N_2O_7 , N_2O_8 화학종의 증가가 잘 나타났다. 6일차 시료의 주요 화학종인 N_2O_8 화학종에서 가장 많이 검출된 물질은 $C_{17}H_{20}N_2O_8$, $C_{16}H_{20}N_2O_8$ 등이 있다. 6일차 시료에서는 침전물 시료와 동일하게 고영양염 첨가군 6일차 시료에서 N_3O_6 화학종의 관찰도 특징적으로 나타났다. 12일차 시료에서 저영양염 첨가군 대비 고영양염 첨가군에서 N_xO_y 화학종의 증가

가 크게 나타났으며 그중에서도 N_2O_7 화학종의 증가가 가장 높게 나타났다.(그림 3-2-11. c)

- O_xS_1 화학종은 상층액 시료에서 침전물 시료대비 3배 정도 높은 비율로 검출되었다. 다른 주요 화학종들의 결과와는 다르게 영양염을 첨가하지 않은 대조군에서도 O_xS_1 화학종이 높게 나타났으며, 12일차 시료의 $O_xS_1(x \leq 3)$ 화학종에서 특히 높게 검출되었다. 12일차 대조군의 해수 환경과 생물군집 특성을 고려하였을 때, 이 물질들은 박테리아에 의한 용존 무기물의 분해 산물로 해석된다.(그림 3-2-11. d)

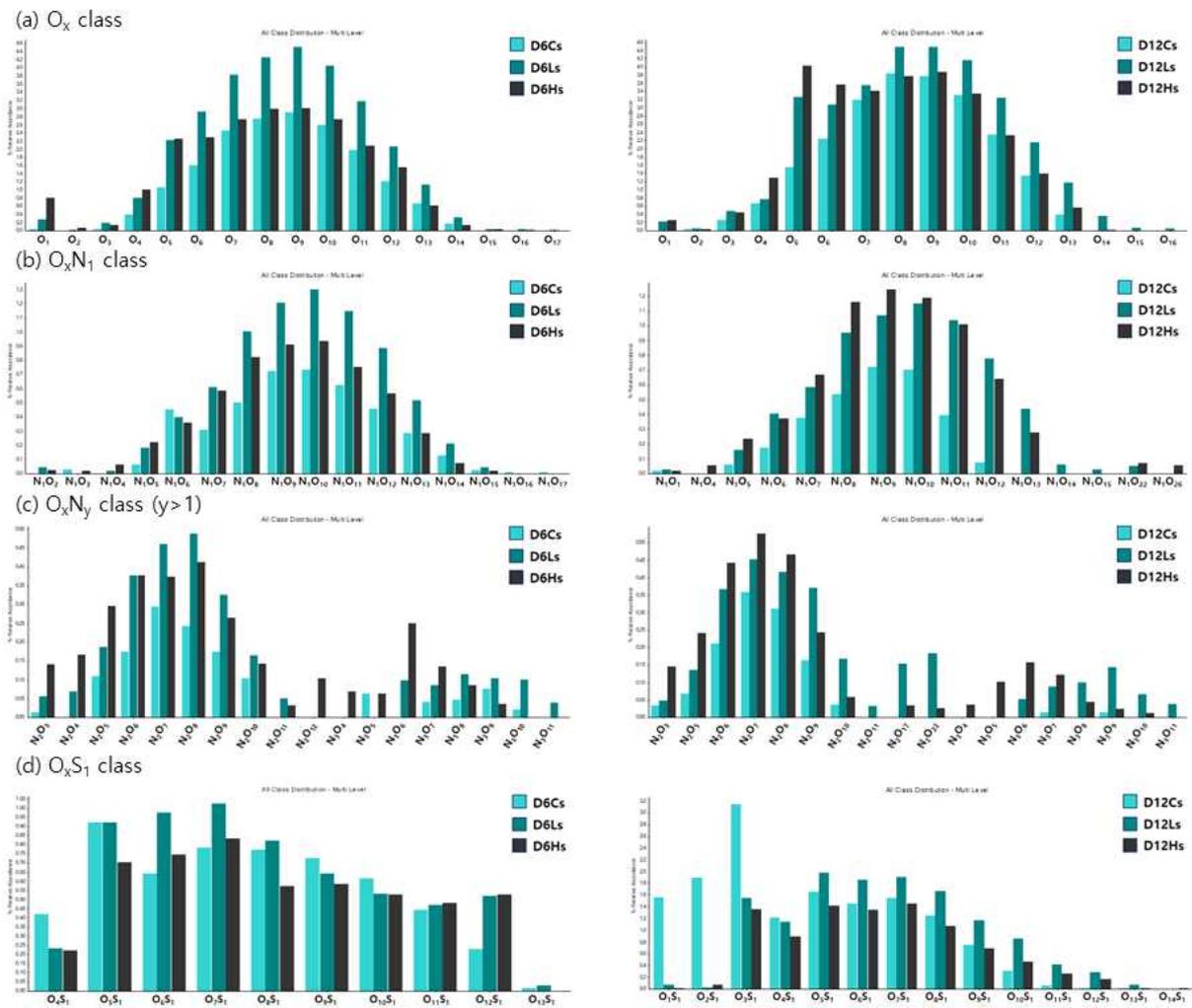


그림 3-2-11. 초고분해능 질량분석법을 통해 확인된 용존 유기물(상층액 시료) 화학종 분포 변화

- 상층액 시료는 van Krevelen diagram 상에서 침전물 시료 대비 더 넓은 영역에 분포된 다양한 기원 특성을 보여주었다.(그림 3-2-12) 대체적으로 Tannin-like 성분이 상대적으로 적고 Lignin-like 영역이 주요하게 나타났으며, protein-like,

carbohydrate-like, unsaturated hydrocarbon-like 영역에서도 많은 물질들이 확인되었다. 특히 영양염의 농도가 높을수록 용존 유기물 성분 중 해양 생물 대사에 의한 단백질과 탄수화물 성분의 증가가 특징적으로 나타났다. 6일차 시료와 12일차 시료의 protein-like, carbohydrate-like 영역을 비교 시, 12일차 시료에서는 이 영역의 물질들이 많이 감소한 것을 확인할 수 있으며 플랑크톤 군집변화 및 생물량 변화에 따른 결과로 해석된다. 그리고 12일차 대조군 시료(D12Cs)에서 H/C ratio 1.0 이하, O/C ratio 0.2 이하 영역에서 물질들이 확인되었는데, 이 영역은 불포화도가 높은 불포화 탄화수소 또는 밀집된 형태의 방향족 탄화수소와 관련있다.

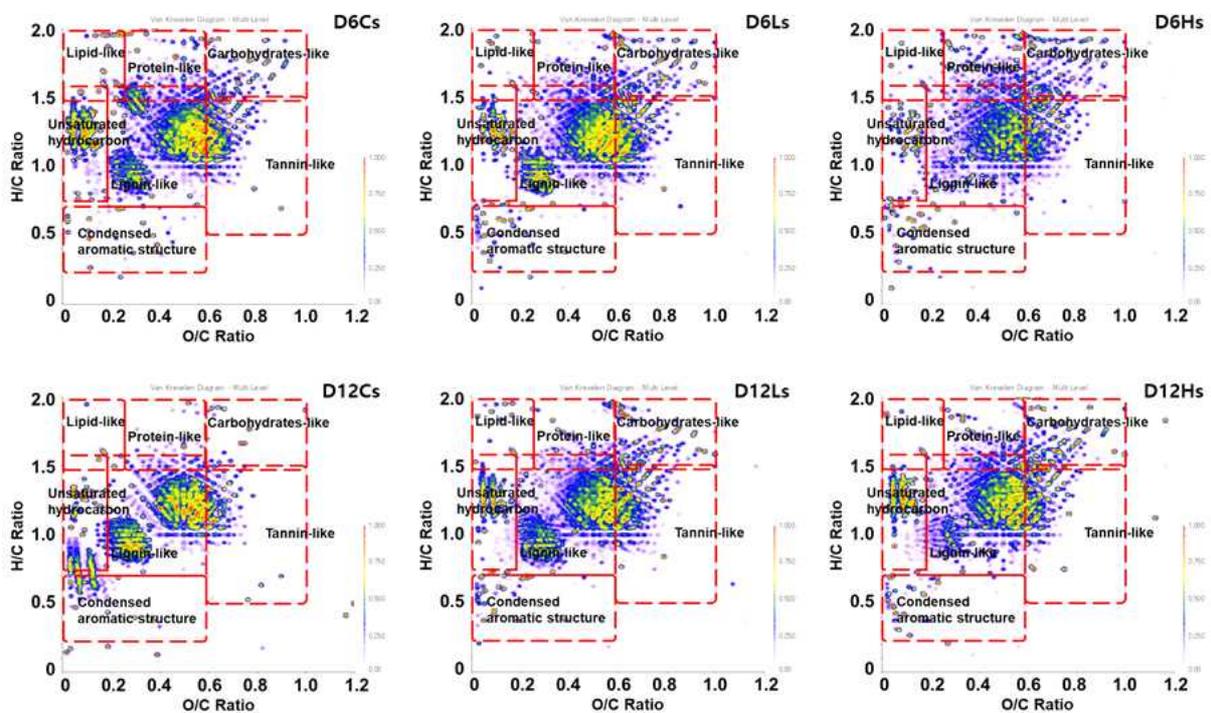


그림 3-2-12. 용존 유기물 상층액 시료의 van Krevelen diagram

- 주요 화학종 분포를 통해 상층액 시료에서 상위 15개 화학종의 변화를 파악해 보았다. (그림 3-2-13) 상층액 시료의 경우 분자 구조 내 산소를 5-12개를 갖는 O_x 화합물이 가장 많이 검출이 되었고, 그 뒤로는 O_1S_x 화학종과 N_1O_x 화학종이 높게 검출되었다. 대조군 시료에서는 특히 O_1S_x 화학종의 증가가 뚜렷하게 나타나 플랑크톤 군집변화에 따른 용존 유기물의 특성변화를 잘 확인할 수 있었다. 또한 영양염 첨가군 시료에서 플랑크톤 생물량이 높은 6일차 시료에서는 N_1O_x 화학종이 O_1S_x 화학종보다 주요하게 검출되었으나, 플랑크톤 생물량이 낮은 12일차 시료에서는 O_1S_x 화학종이 N_1O_x 화학종보다 더 높게 검출되었다. 12일차 고영양염 첨가군(D12Hs)은 다른 군과 다르게 O_5 화학종의 뚜렷한 증가가 관찰되었다. O_5 화학종을 구성하는 주요한 성분으로 $C_{15}H_{12}O_5$,

$C_{14}H_{20}O_5$, $C_{11}H_{12}O_5$, $C_{20}H_{32}O_5$ 등의 유기물이 확인되었다.

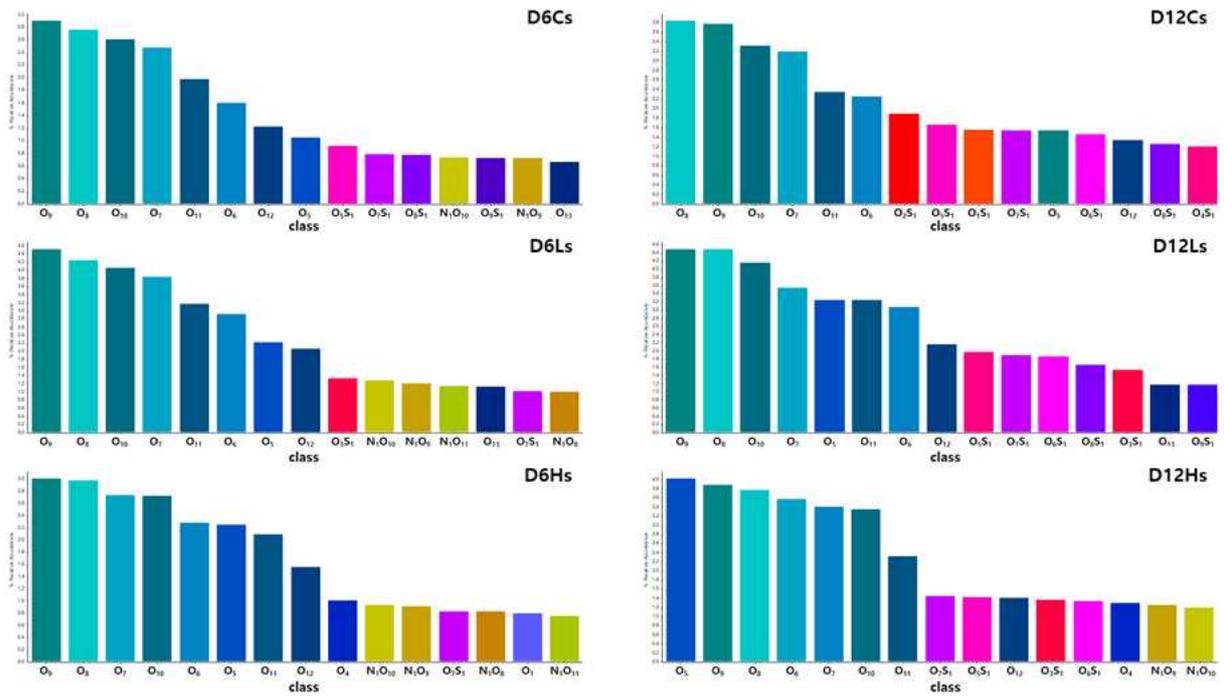


그림 3-2-13. 해양 플랑크톤 군집 변화에 따른 용존 유기물(상층액 시료) 구성 주요 화학종 분포 변화

제 4장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도

제 1절 연구개발 목표 대비 달성도

표 4-1-1. 연구개발 목표 대비 달성도

목표 대비 달성율(%)					
구분	연차별 달성내용				계획대비 연구실적 달성율(B) (%)
	성과목표	연구내용	가중 치 (A)	달성실적	
2021.06 .14 - 2021.12 .31	1. 메조코즘 활 용 해양 생태계 기원 용존 유기 물 생성	1-1. 계절적 특성을 반영한 플랑크톤 배양 환경 구축	0.4	실제 환경과 유사한 인공 중형생태계인 메조코즘 구축 - 메조코즘 6기 설 치	100
		1-2. 지리적, 계절적 특성을 반영한 우점종 군집 배양		현장 해수를 활용한 실험 환경 구축을 통해 지리 적, 계절적 특성 반영 - 수환경(수온, 염분, pH, DO), 엽록소 a, 식물 플 랑크톤 종조성 분석 완료	
	2. 고분해능 질 량분석법 활용 용존 유기물 분 자단위 연구	2-1. 해양 용존 유기물 추 출법 및 정제법 개발	0.6	Solid-Phase Extraction 을 활용한 용존 유기물 추출 및 정제법 구축	100
		2-2. 고분해능 질량분석기 를 이용한 해양 플랑크톤 기원 유기물 질량 프로파일 링		초고분해능 질량분석기를 활용한 용존 유기물 질량 프로파일링 완료 - 용존 유기물 > 1000 종	
2-3. 플랑크톤 배양 조건 및 군집 변화 별 용존 유기 물질 화학조성 정밀 비교 분석		영양염 농도에 따른 플랑 크톤 군집 변화 및 군집 변화에 따른 화학조성 변 화 특성 파악			
계			1.0		100

제 2절 연구개발 대외 기여도

계절적·지역적 특징을 반영한 해양 플랑크톤 기원 용존 유기물의 분자 단위 연구는 국내에서 많은 연구가 진행되지 않은 바, 연구 목표에 근거하여 플랑크톤 기원 용존 유기물 생성, 용존 유기물 추출법 확립, 용존 유기물 질량 프로파일링, 플랑크톤 군집변화에 따른 용존 유기물 화학조성의 정밀 비교 분석이 이루어졌다.

- 인공 생태계를 활용하여 계절적 특성을 반영한 해양 플랑크톤 기원 용존 유기물을 생성하였고, 이를 초고분해능 질량분석법을 활용하여 분자수준에서 특성분석을 진행
- 영양염 농도에 변화를 주어 해양 플랑크톤 우점종의 천이를 유도하였고, 이에 따른 용존 유기물의 화학조성 변화를 확인
- 초고분해능 질량분석법을 통해 해양 용존 유기물을 분자단위에서 분석하여, 해양 용존 유기물을 구성하는 개별 화학물질들에 대한 데이터 베이스를 구축
- 고분해능 질량 데이터 기반 다양한 시각화 방법을 활용하여 화학조성 변화 및 기원에 대한 평가가 이루어짐
- 해양 생물 기원 용존 유기물은 해양으로 흡수, 침강, 격리되는 해양 탄소 순환에 있어 중요한 역할을 하며, 본 연구는 해양-대기 상호작용 및 생물 탄소 펌프 평가의 불확실성을 낮추고 해양 탄소 순환에 대한 이해를 넓히는데 기여할 것으로 기대됨

제 5장 연구개발결과의 활용 계획

1. 기술적 측면

- 해양 용존 유기물 화학조성 상세 규명을 통한 해양 유기물질 순환 메커니즘 이해
 - 기후변화, 해양-대기 상호작용, 유기물 플럭스 등 모델링 연구에 필요한 화학 데이터 제공
 - 해양 용존 유기물의 정성·정량적 확인을 통해 유기물의 순환 및 기후 변화 예측 모델 정확도 향상에 기여
- 해양 생태기반 기후변화 및 탄소중립 연구 수행을 뒷받침 할 수 있는 선도적 분석 기술력 확보
 - 고분해능 질량분석법 및 폐쇄생태계 활용 해양 용존 유기물의 기후변화 조절 잠재성 평가
- 해양-대기 상호작용의 이해를 위한 기초자료로 활용
 - 해양 플랑크톤에 의해 생성되는 유기물의 화학적 특성 규명을 통해 primary sea spray aerosol 생성에 대한 개별 화합물의 기여 파악
 - 이차생성 에어로졸로의 생성 반응 메커니즘 규명을 위한 고분해능 질량데이터에 기반 분자정보 제공

2. 경제·산업적 측면

- 해양 플랑크톤 기원 유기물 D/B 구축을 통한 신규 화합물 발굴에 활용
 - 해양 미생물기원 유용 천연물 개발과 독성 또는 항염증 등 생리활성을 갖는 신규 화합물 개발에 따른 부가가치 창출
- 출연연 신규 연구과제 또는 신규 국가 연구개발 과제로 개발
 - 국제적 현안 해결을 위한 연구개발이 요구되나 현재 국가 연구개발 사업으로 수행중인 사업이 없는 바, 위원회의 신규 사업 또는 국가 연구개발 과제로 개발

제 6장 참고문헌

1. O'Dowd, C. D., Facchini, M. C., Cavalli, F., Ceburnis, D., Mircea, M., Decesari, S., Fuzzi, S., Yoon, Y. J., Putaud, J.-P. 2004. Biogenically driven organic contribution to marine aerosol. *Nature*, 431, 676-680.
2. Charlson, R. J., Lovelock, J. E., Andreae, M. O., Warren, S. G. 1987. Oceanic phytoplankton, atmospheric sulphur, cloud albedo and climate. *Nature*, 326, 655-661.
3. Cochran, R. E., Ryder, O. S., Grassian, V. H., Prather, K. A. 2017. Sea Spray Aerosol: The Chemical Link between the Oceans, Atmosphere, and Climate. *Accounts of Chemical Research*, 50, 599-604.
4. Lee, S.-A., Kim, G. 2018. Sources, fluxes, and behaviors of fluorescent dissolved organic matter (FDOM) in the Nakdong River Estuary, Korea. *Biogeosciences*, 15, 1115-1122.
5. Han, H., Hwang, J., Kim, G. 2021. Characterizing the origins of dissolved organic carbon in coastal seawater using stable carbon isotope and light absorption characteristics. *Biogeosciences*, 18, 1793-1801.
6. Lee, Y., Hong, S., Kim, M.-S., Kim, D., Choi, B.-H., Hur, J., Khim, J. S., Shin, K.-H. 2017. Identification of sources and seasonal variability of organic matter in Lake Sihwa and surrounding inland creeks, South Korea. *Chemosphere*, 177, 109-119.
7. 김정현, 김태훈 2017. 2015년 하계 제주 행원리 일대 양식장 주변 해수 중 용존유기물 분포와 기원. *Ocean and Polar Research*, 39, 35-43.
8. 손주원, 손승규, 주세종, 김경홍, 김웅서, 박용철 2007. 북동태평양에서 형광 기법을 이용한 용존유기물의 기원 및 분포. *Ocean and Polar Research*, 29, 87-99.
9. Yun Kyung, L. Physicochemical characteristics of microplastic-derived dissolved organic matter and its environmental behaviors. 세종대학교 대학원, 서울, 2021.
10. Kim, D., Lee, J., Kim, B., Kim, S. 2018. Optimization and Application of Paper-Based Spray Ionization Mass Spectrometry for Analysis of Natural Organic Matter. *Analytical Chemistry*, 90, 12027-12034.
11. Kim, D., Kim, S., Son, S., Jung, M.-J., Kim, S. 2019. Application of Online Liquid Chromatography 7 T FT-ICR Mass Spectrometer Equipped with Quadrupolar Detection for Analysis of Natural Organic Matter. *Analytical Chemistry*, 91, 7690-7697.
12. Kim, S., Kramer, R. W., Hatcher, P. G. 2003. Graphical method for analysis of ultrahigh-resolution broadband mass spectra of natural organic matter, the van

- Krevelen diagram. *Analytical Chemistry*, 75, 5336–5344.
13. Lechtenfeld, O. J., Kattner, G., Flerus, R., McCallister, S. L., Schmitt-Kopplin, P., Koch, B. P. 2014. Molecular transformation and degradation of refractory dissolved organic matter in the Atlantic and Southern Ocean. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 126, 321–337.
 14. Zhang, F., Harir, M., Moritz, F., Zhang, J., Witting, M., Wu, Y., Schmitt-Kopplin, P., Fekete, A., Gaspar, A., Hertkorn, N. 2014. Molecular and structural characterization of dissolved organic matter during and post cyanobacterial bloom in Taihu by combination of NMR spectroscopy and FTICR mass spectrometry. *Water Research*, 57, 280–294.
 15. Rossel, P. E., Stubbins, A., Hach, P., Dittmar, T. 2015. Bioavailability and molecular composition of dissolved organic matter from a diffuse hydrothermal system. *Marine Chemistry*, 177, 257–266.
 16. Green, N. W., Perdue, E. M., Aiken, G. R., Butler, K. D., Chen, H., Dittmar, T., Niggemann, J., Stubbins, A. 2014. An intercomparison of three methods for the large-scale isolation of oceanic dissolved organic matter. *Marine Chemistry*, 161, 14–19.
 17. Li, Y., Harir, M., Uhl, J., Kanawati, B., Lucio, M., Smirnov, K. S., Koch, B. P., Schmitt-Kopplin, P., Hertkorn, N. 2017. How representative are dissolved organic matter (DOM) extracts? A comprehensive study of sorbent selectivity for DOM isolation. *Water Research*, 116, 316–323.
 18. Pan, Q., Zhuo, X., He, C., Zhang, Y., Shi, Q. 2020. Validation and Evaluation of High-Resolution Orbitrap Mass Spectrometry on Molecular Characterization of Dissolved Organic Matter. *ACS Omega*, 5, 5372–5379.
 19. Dittmar, T., Koch, B., Hertkorn, N., Kattner, G. 2008. A simple and efficient method for the solid-phase extraction of dissolved organic matter (SPE-DOM) from seawater. *Limnology and Oceanography: Methods*, 6, 230–235.
 20. Swenson, M. M., Oyler, A. R., Minor, E. C. 2014. Rapid solid phase extraction of dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography: Methods*, 12, 713–728.
 21. Li, L., Fang, Z., He, C., Shi, Q. 2019. Separation and characterization of marine dissolved organic matter (DOM) by combination of Fe(OH)₃ co-precipitation and solid phase extraction followed by ESI FT-ICR MS. *Anal Bioanal Chem*, 411, 2201–2208.
 22. Moody, C. S. 2020. A comparison of methods for the extraction of dissolved organic matter from freshwaters. *Water Research*, 184, 116114.
 23. Lechtenfeld, O. J., Hertkorn, N., Shen, Y., Witt, M., Benner, R. 2015. Marine

- sequestration of carbon in bacterial metabolites. *Nat Commun*, 6, 6711.
24. Siegel, D. A., Buesseler, K. O., Behrenfeld, M. J., Benitez-Nelson, C. R., Boss, E., Brzezinski, M. A., Burd, A., Carlson, C. A., D'Asaro, E. A., Doney, S. C., Perry, M. J., Stanley, R. H. R. Steinberg, D. K. 2016. Prediction of the Export and Fate of Global Ocean Net Primary Production: The EXPORTS Science Plan. *Frontiers in Marine Science*, 3,
 25. Patriarca, C., Bergquist, J., Sjöberg, P. J. R., Tranvik, L. Hawkes, J. A. 2018. Online HPLC-ESI-HRMS Method for the Analysis and Comparison of Different Dissolved Organic Matter Samples. *Environmental Science & Technology*, 52, 2091-2099.

주 의

1. 이 보고서는 한국해양과학기술원에서 수행한 주요사업의 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 한국해양과학기술원에서 수행한 주요사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.

고분해능 질량분석법을 활용한
해양 플랑크톤 기원
용존 유기물 분자단위 연구

Molecular level characterization of dissolved organic matter derived from
marine plankton using high resolution mass spectrometry



- 주 의 -

1. 이 보고서는 한국해양과학기술원에서 수행한 주요사업의 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 한국해양과학기술원에서 수행한 주요사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.