

2019.11.08.

해양바이오 기반 청정 기능성·산업소재 대량생산 기술 개발1

www.kiost.ac.kr

Development of technology for mass production of
useful marine bioproducts 1

제 출 문

한국해양과학기술원장 귀하

본 보고서를 “해양바이오 기반 청정 기능성·산업소재 대량생산 기술 개발” 과제의 1차년도 보고서로 제출합니다.

2019. 11. 08

총괄연구책임자 : 권개경

참 여 연 구 원 : 강성균, 이현숙, 김윤재, 임형순, 임재규, 이종민, 이정현, 이성목, 박기정, 염승식, 강도형, 오철홍, 허수진, 김동성, 박용주, 명정구, 김민석, 최희정, 오승용, 노충환, 황선완, 이영욱, 정승원, 장풍국, 이택건, 강형구, 박흥식, 이대원, 김윤칠, 이형곤, 권수재, 김연아, 남지영, 노유림, 박미정 안영준, 양성현, 양정안, 양지인, 김재영, 이경원, 이성혁, 정해창, 채철기, 양현성, 김은아, 허성표, 신아영, 김준성, 조은영, 김태호, 박아름이, 이원규, 유용균, 이연지, 엄태양, 정윤식, 강예희, 강윤혁, 문송, 예보람, 장석일, 정일형, 박금옥, 윤보배, 박진우, 정유경, 김지영, 김태환, 김혁진, 박서윤, 강준수, 강민경, 김강은, 김가람, 조혜경, 강나래, 김요한, 황청희, 하성희, 유지현, 정예은, 이영득, Teddy Namirimu, Mohammad Nazrul Islam, Hettiarachchi Sachithra Amarin, Svini Dileepa Marasinghe

한국해양과학기술원 주요사업 연차 보고서

과제구분	<input checked="" type="checkbox"/> 기관목적사업 <input type="checkbox"/> 미래선도사업 <input type="checkbox"/> 연구인프라운영사업		
대과제명	해양전략자원 개발		
(세부)과제명	해양바이오 기반 청정 기능성·산업소재 대량생산 기술 개발	연구책임자	권개경
중점연구영역(분야)			<input type="checkbox"/> 해당안됨
연구성격	연구단계	<input type="checkbox"/> 기초 <input checked="" type="checkbox"/> 응용 <input type="checkbox"/> 개발 <input type="checkbox"/> 기획 <input type="checkbox"/> 기타 :	
	기술성격	<input type="checkbox"/> Seed연구 <input checked="" type="checkbox"/> 원천기술 <input type="checkbox"/> 산업계 현안기술 <input type="checkbox"/> 첨단 추격기술	
연구책임자	권개경	부서	해양생명공학연구센터 전화번호 051-664-3371
참여인원	총 88명 (내부 : 29명, 외부 : 59명)		
총 연구기간	2019. 01. 01 - 2022. 12. 31 (당해연도 : 2019. 01. 01 - 2019. 12. 31)		
연구비 (단위 : 천원)	총사업비(직접비) : 7,580백만원		당해연도 사업비(직접비) : 1,834백만원
위탁연구	과제명	위탁연구비	위탁연구기관 연구책임자
	1. 어류의 면역증강 및 창상 치유효과를 위한 미세조류 기반 펙틴 나노 입자(PNPs)의 개발 연구	30,000천원	충남대 Mahanama De Zoysa
	2. 해양생물 유래 펙틴을 함유한 피부 상처 치료용 바이오메디컬 소재 개발 연구	30,000천원	부경대 정원교
한국해양과학기술원 관계규정과 제반지시사항을 준수하며 본 연구사업의 1차년도 보고서를 제출합니다.			
2019년 11 월 08일 연구책임자 : 권개경 인			
<h2 style="margin: 0;">한국해양과학기술원장 귀하</h2>			

요 약 문

I 제 목

해양바이오 기반 청정 기능성·산업소재 대량생산 기술 개발

II 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발 목표

- 해양·극한 생물자원을 활용한 산업소재 대량생산 플랫폼 구축 및 활용
 - 비광합성 해양·극한 미생물 기반 가스전환 플랫폼 구축 및 활용기술 개발
 - 농축 고염분수 활용 기능성 해양생물원료 대량생산 및 산업소재 개발
 - 수층별 서식범위에 따른 복합생물자원생산 및 이를 이용한 레저/관광 자원화 기반기술개발

2. 연구개발 필요성

- 해양생명공학기술의 실용화 기반 구축: 원재료 대량 생산기술 확립 필요
- 新기후협약 체제 대응을 위해 해양·극한미생물의 탄소대사연구/활용기술 필요
- 염지하수(용암해수)의 먹는 물 산업 활용에 따른 부산물(농축 고염분수, 70%)의 산업적 재활용 필요성
- 고부가가치 해양무척추동물 파일럿 생산 기술 필요성
- 핵심기술
 - ✓ 해양·극한 생물자원 배양 기술: 혐기성균주, 고염 적응균주 배양과 성장특성 분석 관련 기술
 - ✓ 오믹스 분석 기술: 균주 특성 이해에 필요한 유전체, 전사체, 대사체, 생물정보 등 분석기술
 - ✓ 균주 개량 기술: 선정된 균주의 성능 개선을 위한 적응진화, 대사공학, 유전체 편집 등
 - ✓ 유용 성분 발굴 기술: 기능성 성분의 추출, 분석, 평가 (독성 포함)에 관련된 제반 기술
 - ✓ 생물반응기 기술: 고농도 세포배양기술 (가스전환의 경우 최종 OD 10K 달성을 위한 기술, 고염 적응 생물의 경우 3톤 규모 반응기 운영 기술)
 - ✓ 가스발효 기술: 미생물을 이용하여 일산화탄소, 이산화탄소, 메탄, 합성가스과 같은 탄소원 역할을 하는 가스기질을 이용하는 생물반응기를 운전하여 이들 가스를 유용한 산물로 전환
 - ✓ 수층 공간 특성, 먹이생물 분석 기술 및 어장 시설 설계, 관리기술

1. 산업적 활용 가능한 해양·극한 환경 유래 해양생물자원 확보 및 특성 규명
 - 우수균주 확보: 가스전환 균주, 유기산 활용 균주, 고염 적응 균주 등
 - 균주 특성분석: 최적배양조건 확립, 오믹스해석, 대사산물/대사경로 분석 등
 - 우수 균주 대사특성 이해를 통한 성능 개량 : 적응 진화, 대사경로 편집 등
 - 고염 적응 생물자원의 유용 성분 연구
 - 추출물/가공물 제작, 기능성 평가를 통한 유효성분 발굴, 작용 기전 연구
 - 세포독성 평가, 동물모델을 이용한 단기/장기 독성 평가 등
 - 물리·생물학적 모니터링을 통한 수층별 미세조류 자원량 파악 및 분리
2. 해양생물자원의 기능 심층 분석을 통한 대량생산 공정 구축
 - 모델균주를 이용한 가스전환 기술 고도화 : 고농도 배양 기술 확립
 - 고염성 생물의 대량생산 조건 : 배양시스템 제작, 시스템별 배양특성 분석
 - 고염성 해양생물원료의 성분 안정화 대량생산 공정 확립 : 생산시설 스케일업, batch별 성분변화 분석, 지표성분 설정/분석을 통한 원재료 표준화공정 확립 등
 - 해수 가공 미네랄 생산 및 이를 활용한 해양 미세조류 대량 배양기술 확립
 - 미세조류를 먹이생물로 한 해양무척추동물 양식 기술 확립
3. 산업적 소재 생산 및 활용 플랫폼 기반 기술 구축
 - 가스전환 해양·극한미생물 플랫폼 확립 및 활용
 - 균주, gas fermentation기술, 소재 생산 연동 시스템 확립
 - 산물 다변화, 혼합영양조건, 유기산 전환기술 등
 - 고염생물의 기능성 물질 실용화 기반 구축
 - 유효성분 함량 증진 기술, 유효성분 최적 추출 공정 개발 및 기준시험법
 - 유해물질에 대한 규격/시험방법 관련 자료, 안전성 자료, 기능성 자료 등
 - 해양무척추동물 생산력 평가 : 병원체 검출 기술, 무척추동물 대량생산을 위한 자원관리, 시설 유지/관리 시스템 확립
4. 수층공간이용 냉수성생물자원 생산 기술 개발
 - 양식자원 위해 환경 및 먹이생물 모니터링
 - 부착생물 저감방안 연구
 - 양식자원 복합단지 조성기술 개발
 - 해양공원 모델개발

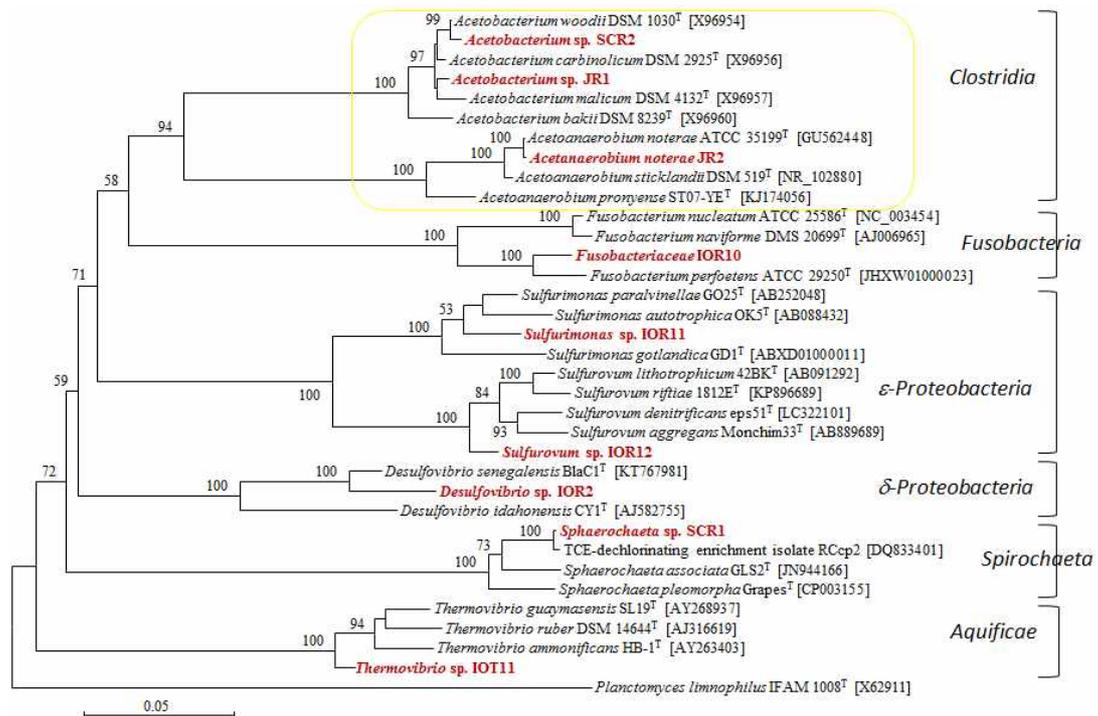
□ 정성적 연구성과

1. 유용 생명자원 확보 및 특성 분석

○ 신규 화학무기독립영양 해양미생물자원 확보

- 대양 및 연안 등 다양한 해양환경으로부터 10주의 신규 화학무기독립영양 미생물자원 확보
- Sulfur oxidizing bacteria (SOB) 3주, sulfate-reducing bacteria (SRB) 1주, acetogen 3주, methanogen 2주, *Sphaerochaeta* 1주 등을 포함하며 계통분류학적으로 다양한 그룹에 위치함.

시료	균주번호	최근연종		배지 종류	비고
		종명	유사도(%)		
인도양	IOR2	<i>Desulfovibrio senegalensis</i>	96.7	H ₂ /CO ₂	중온성, 화학무기독립영양, SRB
인도양	IOR11	<i>Sulfurimonas parvalvinellae</i>	97.1	H ₂ /CO ₂	중온성, 화학무기독립영양, SOB
인도양	IOR12	<i>Sulfurovum</i> sp.	-	N ₂ /CO ₂	중온성, 화학무기독립영양, SOB
인도양	IOT11	<i>Thermovibrio</i> sp.	-	H ₂ /CO ₂	고온성, 화학무기독립영양, SOB
갈대습지	SCR2	<i>Acetobacterium woodii</i>	99.5	H ₂ /CO ₂	중온성, 화학무기독립영양, Acetogen
해조류	JR1	<i>Acetoanaerobium noterae</i>	99.7	H ₂ /CO ₂	중온성, 화학무기독립영양, Acetogen
해조류	JR2	<i>Acetobacterium carbinolicum</i>	-	H ₂ /CO ₂	중온성, 화학무기독립영양, Acetogen
갈대습지	SCR3	<i>Methanoculleus thermophilus</i> (<i>Symbiobacterium streiconchae</i>)	98.5 (99.6)	H ₂ /CO ₂	고온성, 화학무기독립영양, Methanogen
해조류	YS1	<i>Methanogenium organophilum</i> (<i>Clostridia bacterium</i> TQ)	96.5 (88.2)	H ₂ /CO ₂	중온성, 화학무기독립영양, Methanogen
갈대습지	SCR1	<i>Sphaerochaeta associata</i>	96.2	H ₂ /CO ₂	중온성, 화학무기독립영양



○ 고염 성장 미생물 분리

- 고염농축수, 젓갈류(오징어/낙지/꽃뚜기 젓갈), 김치 및 제주연안에서 수집한 생물시료, 제주 암반 (지하 110m 해수층) 등으로부터 58종의 고염 성장 미생물 분리 및 분자동정

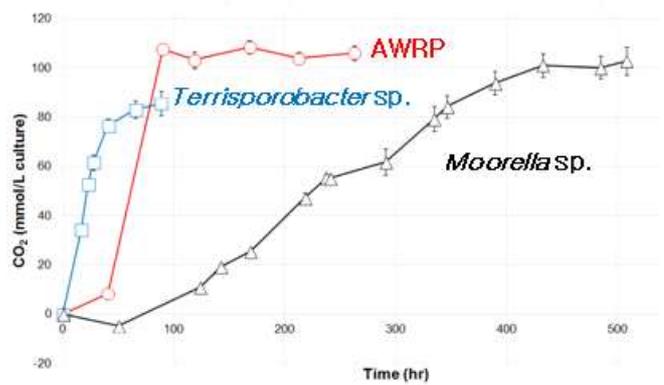
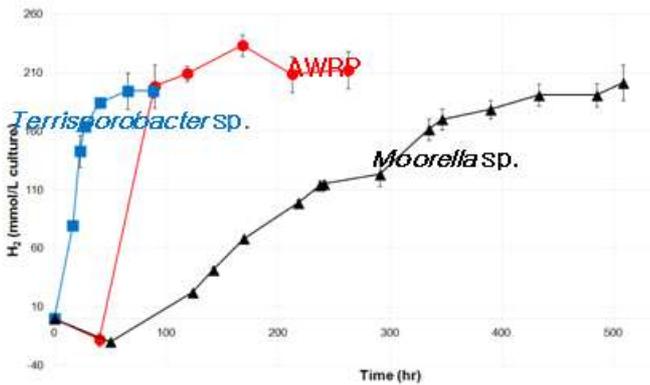
시료	균주 번호	최근연종		성장 배지
		종명	유사도 (%)	
고염농축수	C1	<i>Alteromonas marina</i> SW-47(T)	99.31	GY-CSW, MA
고염농축수	C2	<i>Alteromonas oceani</i> S35(T)	96.77	GY-CSW, MA
고염농축수	C3	<i>Alteromonas australica</i> H 17(T)	100	GY-CSW, MA
고염농축수	C4	<i>Epibacterium mobile</i> DSM 23403(T)	99.78	GY-CSW, MA
고염농축수	C6	<i>Halomonas stevensii</i> S18214(T)	100	GY-CSW, MA
김치	K1-1	<i>Sporosarcina aquimarina</i> SW28(T)	98.86	GY-CSW, MA
김치	K1-2	<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b(T)	100	GY-CSW, MA
김치	K1-5	<i>Gracilibacillus marinus</i> HB09003(T)	99.86	GY-CSW, MA
김치	K1-6	<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i> subsp. <i>oncorhynchi</i> R-2(T)	99.92	GY-CSW, MA
김치	K1-7	<i>Bacillus safensis</i> FO-36b(T)	100	GY-CSW, MA
김치	K1-8	<i>Sporosarcina aquimarina</i> SW28(T)	98.64	GY-CSW, MA
김치	K2-1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> KCTC 13429(T)	100	GY-CSW, MA
김치	K2-2	<i>Bacillus gibsonii</i> DSM 8722(T)	99.92	GY-CSW, MA
오징어젓갈	J2	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> ATCC 15305(T)	100	GY-CSW, MA
낙지젓갈	J3	<i>Brevibacterium casei</i> NCDO 2048(T)	99.18	GY-CSW, MA
낙지젓갈	J5	<i>Brachybacterium squillarum</i> M-6-3(T)	99.93	GY-CSW, MA
꽃뚜기젓갈	J6	<i>Bacillus clausii</i> DSM 8716(T)	99.93	GY-CSW, MA
꽃뚜기젓갈	J7	<i>Bacillus zhangzhouensis</i> DW5-4(T)	99.93	GY-CSW, MA
꽃뚜기젓갈	J8	<i>Staphylococcus edaphicus</i> P5085(T)	100	GY-CSW, MA
꽃뚜기젓갈	J9	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i> LMG 19861(T)	99.79	GY-CSW, MA
제주암반	89-1	<i>Pseudomonas chengduensis</i> MBR(T)	99.93	GY-CSW, MA
제주암반	89-3	<i>Pseudomonas toyotomiensis</i> HT-3(T)	99.93	GY-CSW, MA
제주암반	89-4	<i>Bacillus aquimaris</i> TF-12(T)	99.19	GY-CSW, MA
제주암반	100-1	<i>Bacillus oceanisediminis</i> H2(T)	99.64	GY-CSW, MA
제주암반	100-2	<i>Bacillus proteolyticus</i> TD42(T)	99.93	GY-CSW, MA
제주암반	100-3	<i>Pseudomonas oleovorans</i> subsp. <i>oleovorans</i> DSM1045(T)	97.81	GY-CSW, MA
제주암반	110-1	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>albirubida</i> NBRC 13392(T)	99.86	GY-CSW, MA
제주암반	110-2	<i>Arthrobacter crystallopoietes</i> DSM20117(T)	99.72	GY-CSW, MA
제주암반	110-4	<i>Bacillus marisflavi</i> JCM 11544(T)	99.86	GY-CSW, MA
제주암반	110-5	<i>Bacillus endophyticus</i> 2DT(T)	100	GY-CSW, MA
제주암반	110-6	<i>Streptomyces badius</i> NRRL B-2567(T)	99.93	GY-CSW, MA
제주암반	120-1	<i>Chryseomicrobium aureum</i> BUT-2(T)	99.59	GY-CSW, MA
제주암반	120-2	<i>Chryseomicrobium amylolyticum</i> JC16(T)	99.92	GY-CSW, MA
제주암반	120-3	<i>Microbacterium oleivorans</i> NBRC103075(T)	99.15	GY-CSW, MA
제주암반	120-4	<i>Alishewanella agri</i> BL06(T)	99.1	GY-CSW, MA
제주암반	1301-1	<i>Paracoccus aestuarii</i> DSM19484(T)	98.99	GY-CSW, MA
제주암반	1301-2	<i>Acinetobacter junii</i> CIP 64.5(T)	99.66	GY-CSW, MA
제주암반	1301-4	<i>Pseudomonas mendocina</i> NBRC 14162(T)	99.79	GY-CSW, MA
제주암반	1302-2	<i>Bacillus firmus</i> NBRC 15306(T)	99.5	GY-CSW, MA
제주암반	1302-3	<i>Acinetobacter junii</i> CIP 64.5(T)	99.59	GY-CSW, MA
해조류	SS1a	<i>Marinobacter algicola</i> DG893(T)	99.86	GY-CSW, MA
해조류	SS1b	<i>Marinobacter adhaerens</i> HP15(T)	98.36	GY-CSW, MA
해조류	SS1d	<i>Microbulbifer elongatus</i> DSM 6810(T)	99.52	GY-CSW, MA
고등	SS2c	<i>Halomonas litopenaei</i> SYSUZJ2214(T)	99.79	GY-CSW, MA
해조류	SS7a	<i>Marinobacter sediminum</i> R65(T)	99.66	GY-CSW, MA
해조류	SS7b	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> ATCC 49840(T)	99.86	GY-CSW, MA

해면	SS8a	<i>Halomonas litopenaei</i> SYSUZJ2214(T)	99.68	GY-CSW, MA
해면	SS8b	<i>Saccharospirillum impatiens</i> EL-105(T)	99.17	GY-CSW, MA
성게	SS9a	<i>Marinobacter shengliensis</i> SL013A34A2 (T)	99.04	GY-CSW, MA
성게	SS9b	<i>Alteromonas marina</i> SW-47(T)	98.55	GY-CSW, MA
해면 자갈	SS10a	<i>Marinobacter sediminum</i> R65(T)	99.45	GY-CSW, MA
해수	S6516(green)	<i>Pseudoalteromonas rubra</i> ATCC 29570(T)	99.86	PY-CSW, MA
해수	S7366(red)	<i>Pseudoalteromonas rubra</i> ATCC 29570(T)	99.65	PY-CSW, MA
해수	S7706(green)	<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i> DSM 6061(T)	99.18	PY-CSW, MA
해면	S1156(purple)	<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i> DSM 6061(T)	99.93	PY-CSW, MA
해수	S1131	<i>Pseudoalteromonas xiamenensis</i> Y2(T)	100	PY-CSW, MA
해파리	S985	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i> IAM12932(T)	100	PY-CSW, MA
해수	S5871	<i>Fictibacillus phosphorivorans</i> Ca7T(T)	100	PY-CSW, MA

※ MA: marine agar

○ 화학무기독립영양미생물 3종의 가스전환 특성 비교

- 고온성 세균인 *Moorella thermoacetica* CLWD1, *Terrisporobacter mayombi* HAWD5와 중온성 세균인 *Clostridium* sp. AWRP의 가스전환속도 비교
- 가스전환 속도와 산물의 양을 비교하여 AWRP strain을 모델 미생물로 선정

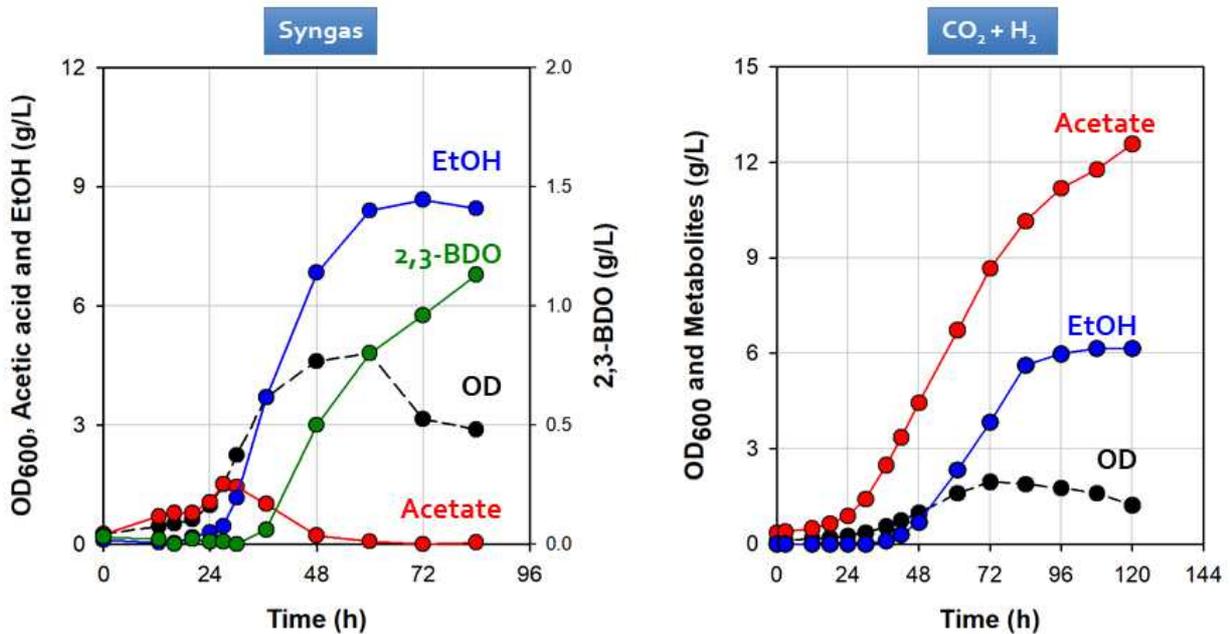


	<i>Moorella</i> sp. CLWD1	<i>Terrisporobacter</i> sp. HAWD5	<i>Clostridium</i> sp. AWRP
Culture time (h)	507.5	111.5	212.8
OD _{600nm}	0.48 ± 0.02	0.65 ± 0.05	Cell lysis
Acetate (g/L)	3.58 ± 0.08	3.54 ± 0.09	3.36 ± 0.15
Ethanol (g/L)	-	-	0.11 ± 0.04
2,3-Butanediol (g/L)	0.15 ± 0.01	-	0
pH	4.91 ± 0.02	5.14 ± 0.02	3.51 ± 0.04
Culture volume	40 mL/160 mL	20 mL/160 mL	10 mL/160 mL
YE concentration	2 g/L	2 g/L	0.5 g/L

2. 비광합성 해양·극한 미생물 기반 가스전환 플랫폼 구축 및 활용기술 개발

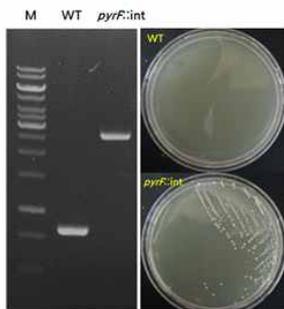
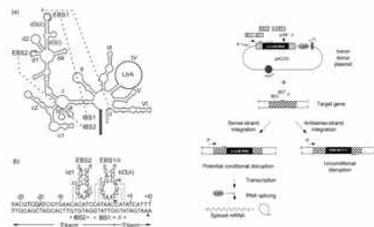
○ 화학무기독립영양 미생물을 활용한 가스전환 기술 개발

- 해양과기원 분리/보유 균주인 *Clostridium* sp. AWRP의 배지 개선을 통해 가스전환/산물 생산 개선
- 가스전환 반응기 운전 조건(가스공급, ORP 모니터링, 교반 등) 개선을 통해 최대 균체량 OD₆₀₀ ~ 5.0 수준으로 확보

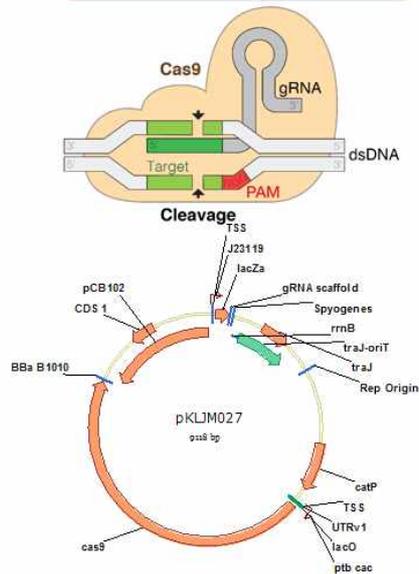


- 일산화탄소로부터 약 9 g/L의 에탄올(*Clostridium* sp. AWRP 이용), 이산화탄소로부터 약 20 g/L의 아세트산(*Acetobacterium woodii* 이용) 생산
- 향후 균주 개량을 위한 유전자 조작 toolbox 구축 및 개량 균주 1주 제작

Group II Intron 기반 유전자 결손



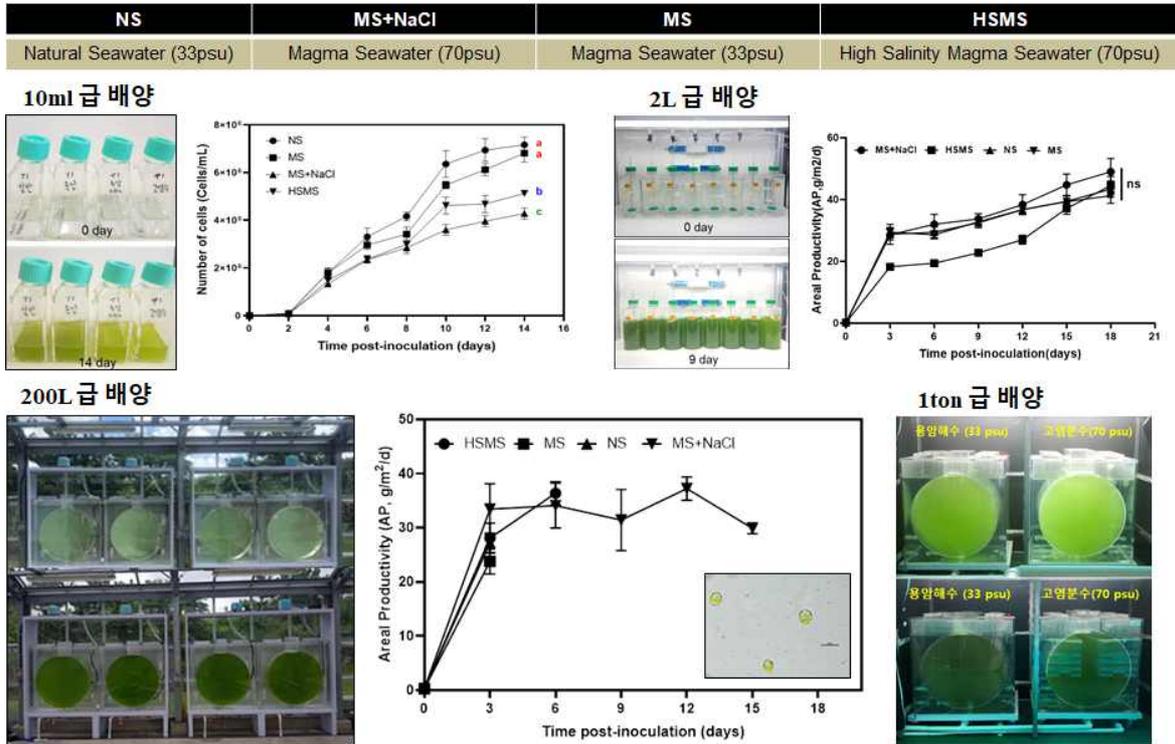
CRISPR/Cas9 유전체 편집



3. 농축 고염분수 활용 기능성 해양생물원료 대량생산 및 산업소재 개발

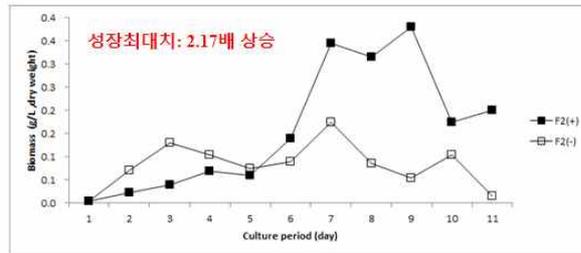
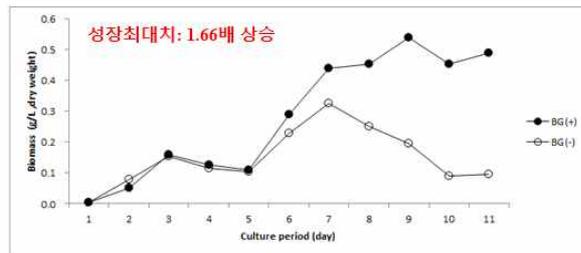
○ 고염 조건하에 미세조류 배양 연구 (10ml, 2L, 1ton 급 배양)

- 고염분수를 활용한 미세조류 3종 (*Tetraselmis sp.*, *Dunaliella salina*, *Spirulina maxima*)의 배양 연구
- 고염분수에서 *Tetraselmis sp.*와 *Dunaliella salina*의 각각 44.5g/m²/d, 46.3g/m²/d 생산성 달성



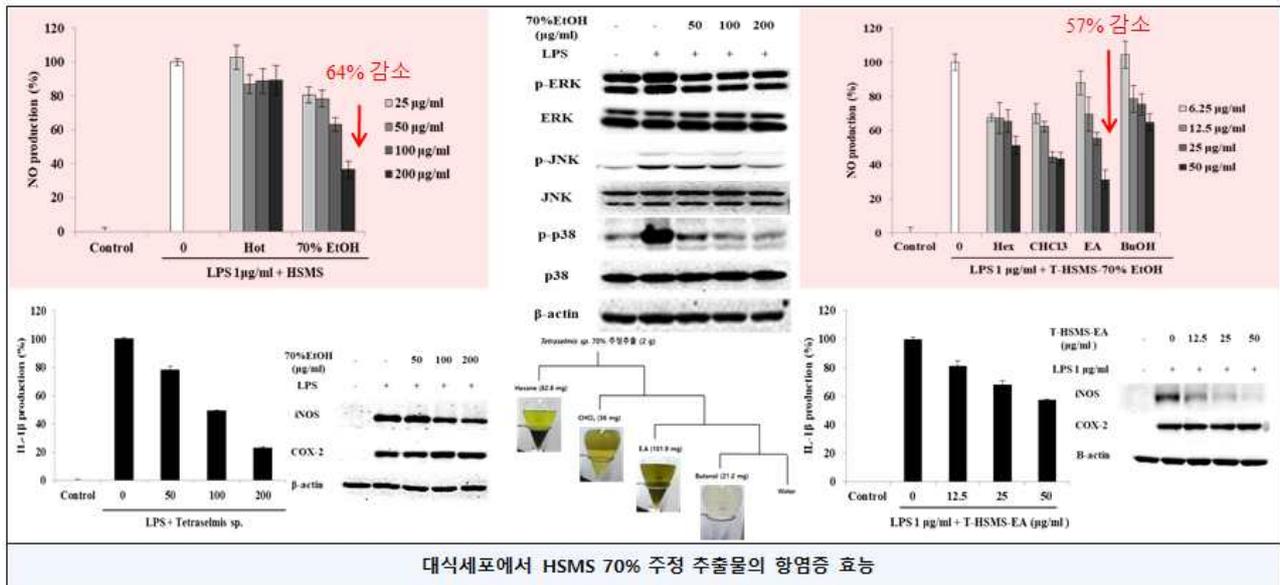
- 미세조류-미생물 하이브리드 배양: 미세조류 배양액 내 탄소원으로 미생물이 바이오에탄올 생산시 생산되는 이산화탄소를 공급한 실험군의 미세조류 최대성장치가 1.66배 및 2.17배 더 높게 나타남.

미세조류	<i>Dunaliella salina</i>	미생물	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
BG(+)	BG11 배양액(탄소원제거) + 미생물 이산화탄소	F2(+)	F/2 배양액(탄소원제거) + 미생물 이산화탄소
BG(-)	BG11 배양액	F2(-)	F/2 배양액

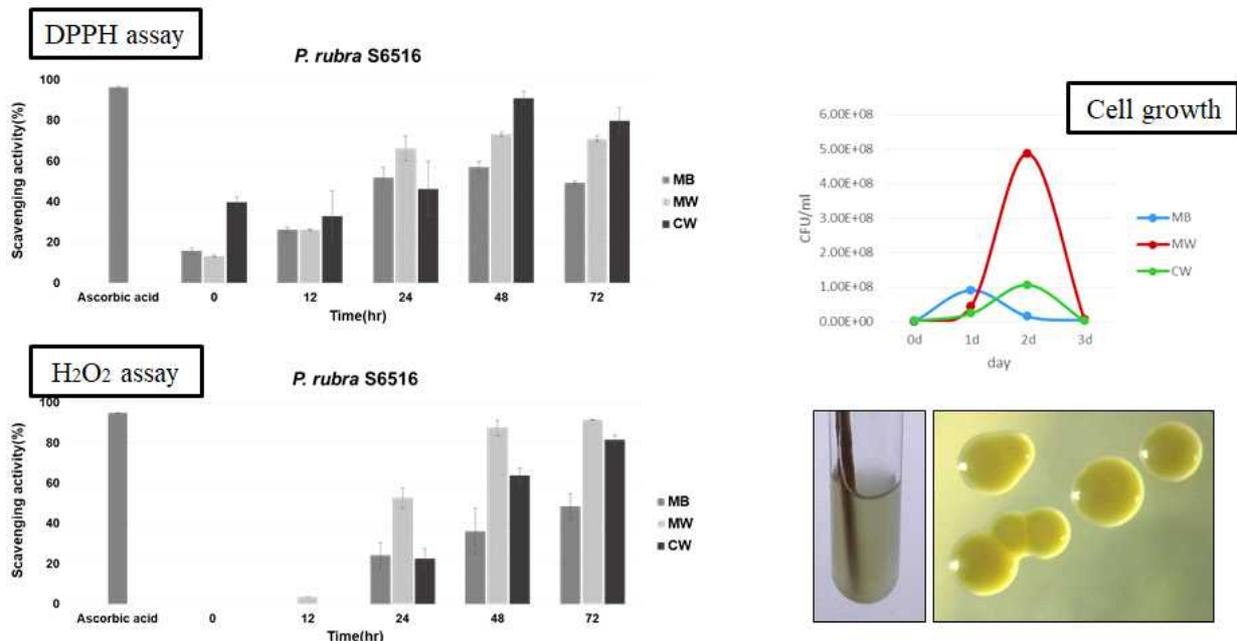


○ 고염 배양 해양생물의 기능성 탐색

- 고염에서 배양된 *Tetraselmis* sp.의 열수추출물에서 항산화 활성이 농도의존적으로 높게 나타남
- 고염에서 배양된 *Tetraselmis* sp.의 70% 주정추출물에서 유방암 억제 53%(200ug/ml), 64%의 NO생성 억제(200ug/ml) 효능을 나타냈으며 MAPKs의 인산화를 통해 iNOS, 염증성 cytokines를 감소시켜 항염증 효능을 나타냄
- 고염에서 배양된 *Tetraselmis* sp.의 ethyl acetate 추출물에서 57%의 NO생성 억제(50ug/ml) 효능과 MAPKs의 인산화를 통해 iNOS, 염증성 cytokines를 감소시켜 항염증 효능을 나타냄을 확인



- 고염 성장 미생물 중 7종에 대해 배양상등액의 항산화 활성(DPPH, H₂O₂ assay)을 탐색하였고 활성이 우수한 3종(S6516, S7366, S1131)에 대해 배양시간에 따른 활성을 확인

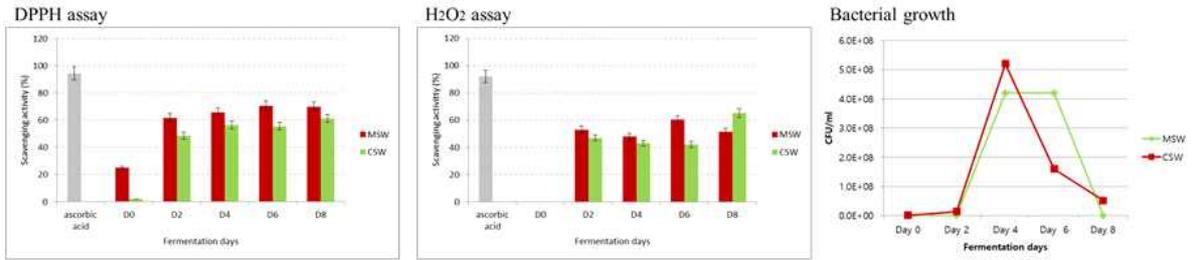


○ 고염 발효 해양생물의 기능성 탐색

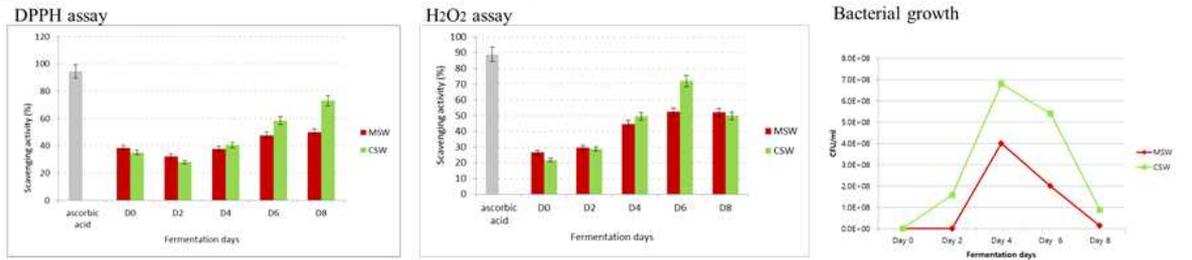
- 해조류 2종 (*Ishige okamurae*, *Ecklonia cava*) 및 미세조류 1종 (*Spirulina maxima*)을 고염분수를 이용해 발효시킨 결과 *I. okamurae* 및 *S. maxima*는 미생물 발효에 의해 항산화 활성이 증가하였고, *E. cava*의 경우는 발효와 상관없이 항산화 활성이 높게 나타났음.

발효균주	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> K2-1 (isolated from Kimchi)
MSW	1% biomass, 1% sucrose in magma seawater (33 psu)
CSW	1% biomass, 1% sucrose in high salinity magma seawater (70psu)

***Ishige okamurae*(패) 발효 상등액의 항산화 활성**

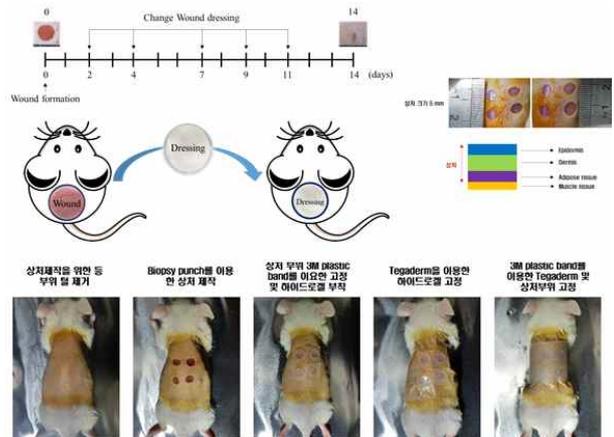
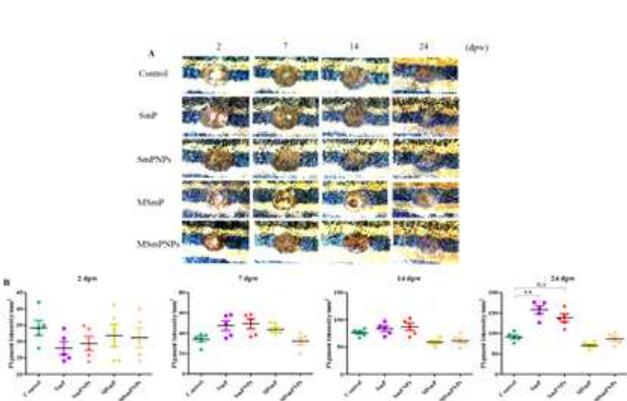


***Spirulina maxima* 발효 상등액의 항산화 활성**



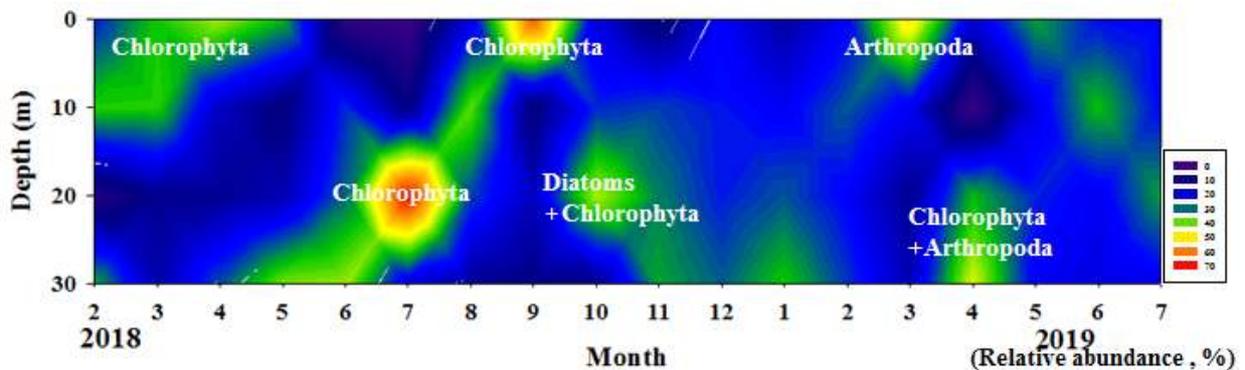
○ 미세조류 유래 펙틴의 동물실험

- 지브라피쉬를 이용한 펙틴의 창상치유 효과 확인
- 펙틴을 이용한 하이드로겔 제작 및 쥐의 창상치유 효과 확인

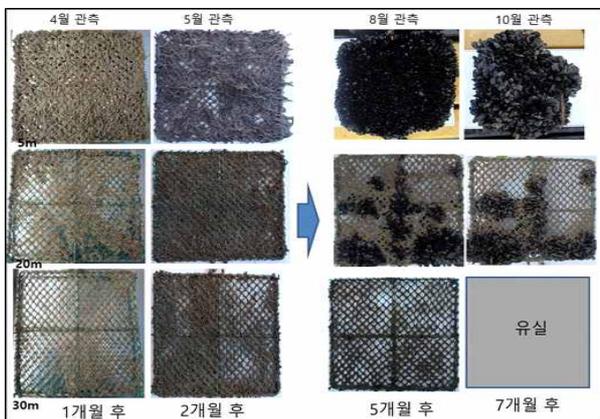


4. 수층공간이용 복합생물 자원개발

- 양식자원 위해성인자 환경모니터링 병원체목록 조사
 - 2018년 이래 지속적으로 양식장 주변 해수와 양식생물의 바이러스 감염 조사 중
 - 2018년에 비해 2019년에 phage가 더 높은 비율로 출현함
 - 주변 해수와 가리비를 비교 한 결과 가리비의 위 내용물에서 Virus비율이 더 높은 비율을 차지 함. 이러한 결과로 볼 때 지속적인 해역위생안전 모니터링이 필요 함.
- 해역 수층별 수질환경 조사
 - 수심 -30m 이하에서 7~9월 냉수성생물이 연중 서식할 수 있는 수온약층이 뚜렷하게 형성되는 것과 수심 -35m 이하에서 빈산소 수괴가 형성됨을 밝힘.
- 수층공간에 따른 양식자원생물의 먹이생물 분포
 - 주요 먹이생물은 녹조류는 *Bathycoccus prasinos*(22.4%), *Micromonas pusilla*(6.9%), *Micromonas* sp.(1.3%), 규조류는 *Coscinodiscophyceae* (2.7%) 임.
 - 계절별로는 겨울철에는 수심에 관계없이 녹조류가 높은 분포를 보인 반면, 여름철에는 20m 이하에서 규조류 및 녹조류가 높은 빈도로 출현하여, 효율적인 양식자원의 개발을 위해서 정확한 수층공간을 활용해야 한다고 판단됨.



- 양식어장 부착(위협) 생물 저감방안
 - 양식어장 대상생물의 성장, 작업, 상품성, 경영비용에 직접적인 영향을 주는 양식위협생물 제어방안을 찾기 위하여 부착생물 모니터링을 수행함.
- 양식.자원 복합단지 조성 및 비즈니스 해양공원 모델개발
 - 상기 조사내용을 종합판정하여 환경에 따른 어장 조성 및 수층공간이용 비단가리비를 성공적으로 생산함



□ 정량적 연구성과

구분		가중치 (%)	과제 설정 목표(건)		세부 가중치 (%)	달성(건)	달성도(%)
과학적 성과	논문	60	mrnIF 81점 이상	1	20	4	400
			mrnIF 61~80	1	20	2	200
			mrnIF 41~60	4	30	2	50
			mrnIF 40점 이하	5	30	7	140
			KCI			2	
			소계	11	100	15	100
기술적 성과	특허	30	국제특허 출원				
			국제특허 등록				
			국제특허 추가등록				
			국내특허 출원	6	100	6(2건 출원 진행 중)	100(67)
			국내특허 등록				
경제적 성과	기술료	0	기술이전	-		1	
사회적,인프라.	홍보활동	5	연구과제 홍보	1	100	5	100
	대외활동	5	기획, 평가, 세미나 등	1	100	6	100
계	-	100%			-		

V

연구개발결과의 활용계획

- 비광합성 탄소고정 및 탄소대사 능 해양유래 우수 균주 확보로 응용기술 개발에 필요한 원천자원 및 기술 제공
- 대사공학 또는 합성생물학 기술을 이용하여 재조합 균주 및 유용물질 생산 시스템에 응용
- 유용물질 생산 산업용 균주를 확보하여 국내 해양바이오기술 선진화
- C1가스, 해양바이오매스로부터 유용물질생산 기술 개발에 적용
- 농축 고염분수 기반 유용 해양생물자원의 안정적 대량생산을 통한 산업화 기반 마련
- 연안, 근해 해양생물자원증대 및 자원조성 기술 사업에 활용

- 목 차 -

제1장 연구개발과제의 개요	1
제1절. 연구개발의 목표 및 내용	1
1. 연구개발의 목표 및 최근 동향	1
2. 연차별 연구개발의 목표 및 내용	6
제2장 연구개발 수행 내용 및 결과	9
제1절. 계획대비 연구수행의 적절성	9
1. 연구수행의 적절성	9
제2절. 연구개발 수행 내용 및 결과	11
1. 신규 미생물자원 확보	11
2. 개량균주	24
3. 가스전환 고농도 배양기술	26
4. 미세조류 생산성	34
5. 수층공간 먹이생물 분포도	95
6. 양식환경 관리 및 해중공원 모델 개발	108
제3절. 대표 성과	134
제3장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도	136
제1절. 연구개발 수행 적정성	136
제2절. 연구개발 목표 달성도	139
제3절. 대외 기여도	141
제4절. 연구성과의 의의	146
제4장 연구개발결과의 활용계획	148
1. 향후 연구 방향	148
2. 성과 활용 계획	149
제5장 참고문헌	150

제1장

연구개발 과제의 개요

제1절 연구의 목적 및 내용

1. 연구개발의 목표 및 최근 연구동향

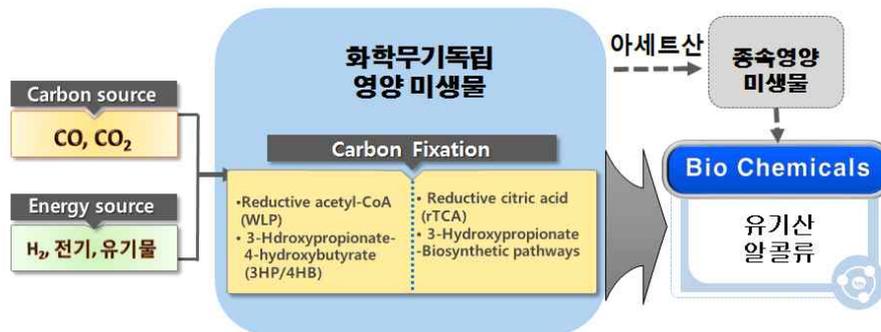
가. 최종목표

□ 최종목표

- 해양극한 생물자원을 활용한 산업소재 대량생산 플랫폼 구축 및 활용
- 비광합성 해양극한 미생물 기반 가스전환 플랫폼 구축 및 활용기술 개발

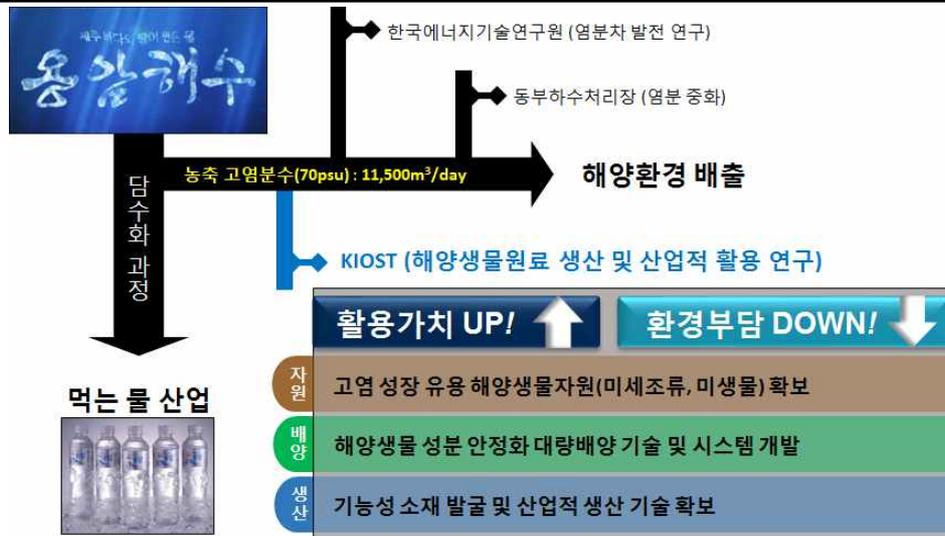
1. 기 확보 CO₂/CO 고정 화학무기독립영양 미생물 활용(2세부, 3세부)

- Autotrophic acetogen (CO₂/CO 이용)
- *Thermococcus onnurineus* (CO 이용)

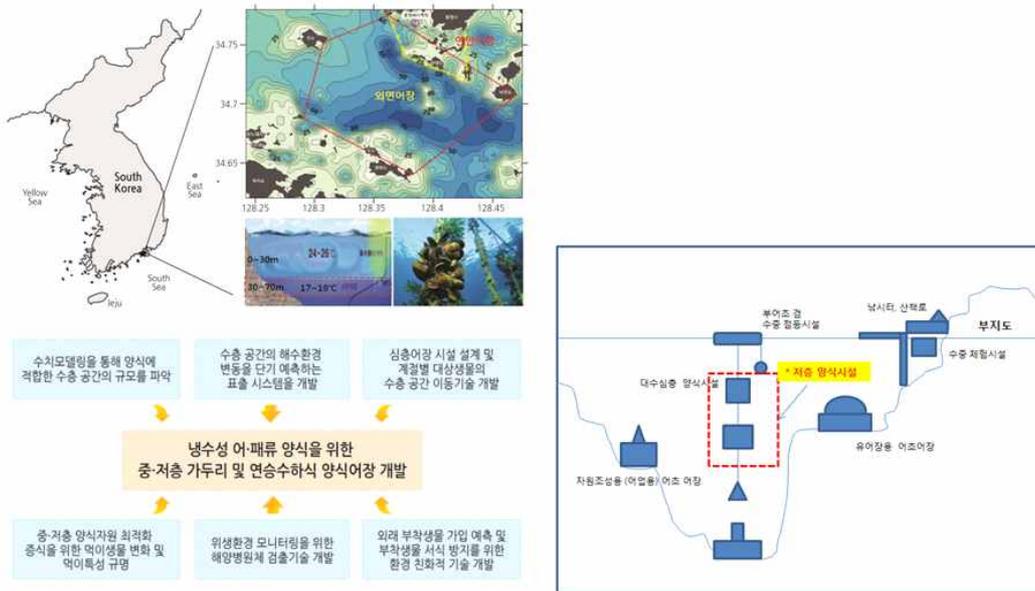


2. 신규 CO₂/CO 고정 화학무기독립영양 미생물 확보(1세부)

- 농축 고염분수 활용 기능성 해양생물원료 대량생산 및 산업소재 개발



- 수층별 서식범위에 따른 복합생물자원생산, 이를 이용한 레저/관광자원화 기술개발



□ 최근 연구동향

○ 해양유래 화학무기자가영양(chemolithoautotroph) 미생물

- ✓ 해양환경에서 보고된 중온성 화학무기자가영양 미생물의 경우, 대부분 γ -Proteobacteria 또는 ϵ -Proteobacteria에 포함되며 symbiont로 많이 알려져 있음. 2007년에는 호기성 Fe(II)을 에너지원으로 사용하는 화학무기자가영양 미생물인 *Mariprofundus ferroxydans* 균주가 보고되어 새로운 ζ -Pproteobacteria 그룹을 형성함(Nakagawa & Takai, *FEMS Microbiol Ecol* 2008).
- ✓ 해양 열수구 환경 주변에서는 *Aquificales*, *Desulfurococcales*, *Desulfurobacterium* group,

Nautilales, *Thermodesulfobacterales*, *Archaeoglobales* 목에 포함되는 다양한 고온성/초고온성 화학무기자가영양 미생물이 보고됨(Nakagawa & Takai, *FEMS Microbiol Ecol* 2008).

- ✓ 화학합성 공생미생물 (chemosynthetic symbionts)들이 주로 극한 환경 해양생물과 공생관계를 이루고 있으며, 약 7 문(phyla)에 해당하는 것으로 확인되었으며, 일부 해양생물에서 화학무기자가영양 미생물이 확인됨(Dubilier et al., *Nat Rev Microbiol* 2008).

○ 가스전환기술 연구동향

- ✓ 광합성생물을 활용한 탄소전환기술에 더하여 최근 비광합성 독립영양미생물을 발굴하고 이들을 이용한 탄소전환 (발효), 개량 연구가 급격하게 증가
- ✓ 빠른 탄소고정능을 가지고 있는 *Acetobacterium woodii* 등의 경우 이산화탄소와 수소를 이용한 높은 수준의 아세트산 생산성(최대 35~43 g/L, 단위부피당: 0.18~0.24 g/L/h) 보고
- ✓ 성장과 숙신산 생산에 CO₂가 필요한 미생물인 *Actinobacillus succinogenes*를 이용하여 다양한 바이오매스 가수분해물 또는 농업 폐기물을 이용하여 숙신산 생산 (Yu et al., 2013; Li et al., 2011)
- ✓ Lanzatech, 독일 Evonik 케미칼 등이 산업 폐가스이용 소재 생산 사례보고
- ✓ *Ralstonia eutropha* 이용 수소와 이산화탄소로부터 바이오플라스틱 polyhydroxyalkanoate (PHA), 디젤급의 메틸케톤 생산 (Yu et al., 2013; Müller et al., 2013). 광전기 장치 개발로 이소부탄올, 메틸부탄올 생산 (Li et al., 2012). 미생물 전기촉매작용 통합 시스템으로 생성된 수소를 이용하여 polyhydroxybutyrate, 부탄올, 파네센 (farnescene), 긴사슬 알켄 생산 (Hawkins et al., 2013)
- ✓ *Clostridium* 종 이용하여 CO₂로부터 아세트산, 메탄을 생산. 유전자 조작된 *Clostridium* 종 (*C. ljungdahlii*) 이용하여 합성가스로부터 부탄올 생산 (Ampelli et al., 2015). 독일 Evonik 케미칼회사는 아세트산 생성균 이용하여 산업 폐가스로부터 아세톤을 생산
- ✓ 극한 환경에서 성장하는 고세균을 이용한 탄소 전환 연구로는 메탄 생성균에 의한 메탄 생산, 호염성균에 의한 PHA (polyhydroxyalkanoate) 생산이 있음
- ✓ 수소-산화 세균들이 이산화탄소 고정시 수소를 필요로 하는 것에 반해, 다른 전자공여체 (sulfide, thiosulfate, nitrite)를 이용하는 미생물군집 연구가 수행됨 (Hu et al., 2009)
- ✓ 미국 DOE에서는 non-photosynthetic microorganisms을 플랫폼으로 C1 compound(CO₂, HCO₃⁻, HCOOH) 및 다양한 energy source를 이용한 바이오연료를 생산하는 연구 진행
- ✓ 미국을 중심으로 한 선진국들은 CO₂의 생물학적 자원화에 관한 성공적인 기초연구를 활용하여 2000년대 중반이후 벤처기업의 창업이 활발하게 진행되고 있음

○ 자가영양 플랫폼 균주의 활용연구

- ✓ 자가영양 플랫폼 균주로서의 활용연구는 1) heterotroph => autotroph으로 engineering 하는 연구, 2) autotroph과 heterotroph의 hybrid system, 3) 다양한 에너지를 전기장치로 제공하는 hybrid system로 나눌 수 있음(Claassens et al., *Naure*. 2016. 14, 692-706). 하지만, 해양환경 유래의 화학무기자가영양 플랫폼 균주는 전무함.

○ 고염성 해양생물자원 대량배양/활용 기술

- ✓ 해양미세조류인 듀나리엘라(*Dunaliella* sp.)는 고염 스트레스에 의해 지질(lipid)의 생산량이 70%이상 증가함을 보고
- ✓ 미세조류 및 해조류가 고염 환경 조건에 노출되었을 때 산화스트레스가 유발되고 이로 인해 항산화 물질이 증가 (*Dunaliella tertiolecta*, *Cladophora glomerata*, *Enteromorpha ahlnneriana*, *Ulva prolifera* 등)
- ✓ 호염균인 *Naloterrigena hispanica*, *Natronococcus occultus*에서는 혈액응고, 항균, 항곰팡이, 항바이러스, 항암 효능을 갖는 diketopiperazines라는 물질을 생산
- ✓ 일본, 호주의 경우 고염 미세조류를 대량생산하여 먹이생물/기능성 소재로서 상업생산 중임

○ 수층공간이용 복합생물자원 개발

- ✓ OECD 수산위원회에서는 환경변화에 대응한 생태계 기반 어업관리를 권고하고, 수산 선진국에서는 먹이생물, 체장변화 등 생태조사를 강화하고 있음. 특히 노르웨이, 유럽, 미국 등은 수산생물 가이드라인에 따라 자원조사의 빈도와 범위를 지속적으로 확대하고 있음. 표층식/중층식 어장시설 중 가장 우수하다고 평가받고 있는 제품인 폴라씨클 가두리(Polarcirkel cage, AKVA Co.)는 현재 유럽에서 가장 많이 사용되고 있음
- ✓ 국내와 같이 수층공간을 다각화하여 어·패류를 양성하는 사례는 없음
- ✓ 유럽에서는 양식 강국인 노르웨이·스웨덴·영국 등의 북유럽 국가와 지중해 연안국이 활발하게 표·중층 외해양식어업을 추진하고 있음. 특히, 유럽연합 차원에서 외해양식기술연구그룹(Offshore Aquaculture Technology Platform)을 결성하여 외해양식과 관련된 연구 수행 중

○ 자원생물을 이용한 비즈니스형 해양공원모델 개발

- ✓ 해중공원 역사는 1950년경 미국의 카리브해와 오스트레일리아의 그레이트 배리어 리프의 초호(礁湖)에 있는 여러 섬에 국립공원 또는 국가 보존지를 설정한 것이 시작임
- ✓ 세계에 지정되어 운영 중인 해중공원들은 다양한 환경 조건을 가지고 있지만 그 공원을 활용하는 생태관광이나 일반 관광업에 사용되는 인프라 시설로서 가장 대중적인 것은 바닥이 유리로 된 배(glass boat)이며, 그 밖에 해중 전망탑, 스노클이나 아쿠아링에 의한 해중 유영 등이 있으며 그 외 수족관, 낚시터, 요트장, 해수욕장 등을 들 수 있음
- ✓ 최근, 기존 생태보호 개념의 해양공원과는 다른 수중조각공원이 2006년 그레나다에 세워졌고 그 후 멕시코, 바하마제도, 그란카나리아제도(스페인령)에 세워짐

(2) 연구원의 비전 및 기능, 중기전략계획 등과의 연계성

해양과기원 임무 및 경영목표 등과의 연계성

○ 해양자원의 관리·이용·개발에 관한 연구는 한국해양과학기술원의 발전 전략(2012-2020)에 따

른 주요기능이며 해양생물·유전자원은 대표적인 해양 자원임

- 해양생물자원 이용기술은 해양과기원의 기본 이념, 비전 및 미션과 연계하여 선정한 12대 중점 연구 분야이며 이에 따른 전략 연구과제로 ‘차세대 해양생물 유전체 해독 및 활용 연구’, ‘해양 원시 단백질 3차 구조 규명을 통한 진화의 분자기작 규명’ 등의 연구과제가 선정되었음
- 본 연구과제는 해양생물의 유전체 해독을 기반으로 해양모델생물개발과 유전자 신기능 및 구조 연구를 주 연구 내용으로 하고 있기 때문에 해양과기원이 지향하는 이념, 중점 연구 분야, 연구 전략과 일치하며 기술원의 고유 기능에 충실하면서 기술원 발전에 기여할 것임
- 해양자원의 발굴과 활용에 중점을 두는 한국해양과학기술연구원의 발전취지와 직접적으로 연계 될 수 있는 연구가 필요
 - 해양생명공학연구센터를 중심으로, 다양한 해양환경으로부터 극한생물자원을 확보하여 ‘해양 극한자원뱅크’를 운영하여 자원의 활용과 가치를 극대화하기 위해 노력하고, 특히 오믹스 연구와 대량의 생물학 정보 분석 컴퓨팅기술을 확보하여 다양한 유용한 해양극한생물자원의 유전체연구를 통해 극한생명현상을 이해하고, 이를 바탕으로 유용한 바이오신소재 발굴, 바이오수소, 에너지연구에 노력해옴
 - 본 연구는 해양생물 자원의 유용한 가치를 확보하고, 전세계적으로 진행되고 있는 오믹스활용 연구를 통해 바이오산업의 원천,응용기술을 개발하여 국가의 국격을 높이고, 미래산업 창출이라는 가치에 부합
- 해양과기원 연구성과계획서 성과목표와의 부합성
 - ‘한국해양과학기술원 2018-2022 연구성과계획서’에 제시된 전략목표 ‘해양바이오·전략광물자원 개발 및 미개척 대양 신자원 탐사’ 하의 성과목표 ‘해양생물·유전자원 활용기술 개발’의 주요 분야

2. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

가. 정성적 목표

(단위 : 천원)

구분	연차별 성과목표 및 연구내용		
	성과목표	연구내용	연구비 (직접비)
1차년도	1. 해양극한 생명자원 확보	1-1. 해양·극한 환경 시료 확보/미생물 다양성 분석	510,000
		1-2. 해양·극한 환경 시료로부터 생명자원 확보 및 특성 분석	
	2. 가스발효 OD>3.0달성	2-1. 모델 균주 기반 gas fermentation 기술개발	452,000
	3. 고염 해양생물자원 기초 기능성 연구	3-1. 유용 해양생물 추출물/가공물 제작 및 기초 기능성 평가	630,000
		4.1 병원체 검출기술, 먹이생물 및 부착생물 분포	242,000
4.2 심층 어장 설계/유지/관리/생산 및 대상품종 선정			
4.3 복합해양공원 모델 연구			
계			1,834,000
2차년도	1. 해양극한 생명자원 확보	1-1. 해양·극한 환경 시료로부터 생명자원 확보	342,000
		1-2. 우수 균주 선별 및 특성 분석	
	2. 가스발효 OD>5.0달성	2-1. 모델 균주 기반 gas fermentation기술 고도화	452,000
	3. 고염분수 활용 대량 배양 기술 및 기능성 물질 합량 증진 기술 확립	3-1. 고염 해양생물원료 대량생산 필요조건 연구	830,000
		3-2. 고염 해양생물자원 추출/가공물의 유효성분 발굴	
4. 냉수층 공간을 이용 위생안전 어·패류 복합양식 해양생물자원개발	4.1 병원체 모니터링, 먹이생물 및 부착생물 특성	262,000	
	4.2 심층 어장 시설 구축 및 대상품종 양성기술		
	4.3 복합해양공원 모델 연구		
계			1,886,000
3차년도	1. 해양극한 생명자원 확보	1-1. 해양·극한 환경 유래 생명·유전자원 확보-특성분석	296,000
		1-2. 우수 균주 선정 및 특성분석	
	2. 가스발효 OD>10 달성	2-1. 해양미생물이용 gas fermentation기술 최적화	502,000
	3. 고염분수 배양 해양생물 원료의 성분 안정화 대량 생산 공정 확립	3-1. 고염 해양생물자원 추출/가공물의 유효성분 규명	840,000
		3-2. 해양생물원료성분 안정화 생산 프로토콜 구축	
4. 냉수층 공간을 이용 위생안전 어·패류 복합양식 해양생물자원개발	4.1 병원체 진단기술, 먹이생물 및 부착생물 특성	272,000	
	4.2 계절별 대상생물의 수층공간 이용기술		
	4.3 복합해양공원 모델 연구		
계			1,910,000
4차년도	1. 해양극한 생명자원 확보	1-1. 개량 균주특성분석	270,000
	2. CI가스전환 acetate생산 성 6 g/L/d < 달성	2-1. 플랫폼 확립, 소재생산 활용 및 산물 다양화	550,000
	3. 고염분수 배양 해양생물 원료로부터 기능성 물질 생산/추출 공정 확립	3-1. 고염분수 배양 해양생물원료의 성분 안정화 대량 생산 공정 확립 (±20% 이내)	850,000
		3-2. 고염분수 배양 해양생물 원료 및 유효성분의 안전 성 및 안정성 평가	
	4. 수층공간 이용 위생안전 어·패류 해양생물자원개발 및 이를 이용한 비즈니스 형 해중공원 모델 개발	4.1 병원체 모니터링, 먹이-양식생물 먹이특성 분석	280,000
4.2 부착생물 제어, 양식생물 양성기술 매뉴얼			
4.3 복합 해중공원 모델 연구			
계			1,950,000
합 계			7,580,000

나. 정량적 목표

- 2019년

구분		가중치 (%)	과제 설정목표(건) (a)		연구성과계획서상 성과목표(건)* (b)	세부 가중치 (%)	설정도(%) (a/b)
과학적 성과	논문	60	mrnIF 81점 이상	1		20%	
			mrnIF 61~80	1		20%	
			mrnIF 41~60	4		30%	
			mrnIF 40점 이하	5		30%	
			KCI/SCOPUS				
			소계	11	8	100%	11/8 = 137.5
	저서		국제저서				
			국내저서				
			국제편저				
			역서 등				
소계							
기술적 성과	특허	30	국제특허 출원				
			국제특허 등록				
			국제특허 추가등록				
			국내특허 출원	6	4	100%	150
			국내특허 등록				
경제적 성과	기술료		기술이전 성과				
사회적,인프라 ..	홍보활동	5	대중강연/인터뷰	1		100%	
	세미나 개최		외부협력 세미나 개최				
	정책제안		지역현안 정책제안				
	과학체험프로그램						
	대외활동	5	학술발표	1		100%	
계	-	100%				-	

다. 총 연구기간 로드맵(4개년)

○ 연구기간 로드맵

해양바이오 기반 청정 기능성 산업소재 대량생산 기술 개발	연구목표	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도
	<ul style="list-style-type: none"> 해양·극한 생물자원을 활용한 산업소재 대량생산 플랫폼 구축 및 활용 	<ul style="list-style-type: none"> 산업적 활용 가능한 해양·극한 환경 유래 해양 생물자원 확보 및 특성 규명 	<ul style="list-style-type: none"> 해양생물자원의 기능 심층분석을 통한 대량 생산 공정 구축 	<ul style="list-style-type: none"> 산업적 소재 생산 및 활용 플랫폼 기반 기술 구축 	<ul style="list-style-type: none"> 해양바이오 기반 청정 기능성·산업소재 대량 생산 기술 구현
	연구내용	연구내용	연구내용	연구내용	연구내용
	<ol style="list-style-type: none"> 비광합성 해양·극한 미생물 기반 가스전환 플랫폼 구축 및 활용 기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> -해양·극한 생명자원 확보 -가스발효 생산성 개선 	<ul style="list-style-type: none"> 가스 전환/유기산 전환 우수 균주 확보 모텔균주 기반 배양 기술 개선 	<ul style="list-style-type: none"> 가스 전환/유기산 전환 우수 균주 확보 가스대사경로 분석 개량균주 확보 모텔균주 기반 고효율 배양 기술 	<ul style="list-style-type: none"> 가스대사경로 분석 개량균주 확보 해양미생물 이용 가스발효 기술 최적화 	<ul style="list-style-type: none"> 개량균주 특성 분석 바이오소재 생산 플랫폼 개발
	<ol style="list-style-type: none"> 농축 고염분수 활용 기능성 해양생물원료 대량생산 및 산업소재 개발 <ul style="list-style-type: none"> -고염성 해양생물자원 확보 -대량생산체계 구축 -기능성 소재 확보 	<ul style="list-style-type: none"> 고염성을 확보 유용 해양생물 추출물/가공물 제작 및 기능성 평가 미세조류 펙틴 기능성 평가 미세조류 생산성 향상 	<ul style="list-style-type: none"> 고염생물의 배양조건 확립 고염생물 추출물 유효성분 발굴 미세조류-미생물 하이브리드 대량배양시스템 설계 펙틴 기능성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 고염분수 배양 해양생물원료의 성분 안정화 대량생산 공정 확립 추출물 상류 안정화 프로토타입 기능성 물질 안전성 제시 	<ul style="list-style-type: none"> 기능성 물질 생산/추출 공정 확립 기능성 물질 안전성 검증 등 (실험)
	<ol style="list-style-type: none"> 수증공간이용 복합생물 자원개발 <ul style="list-style-type: none"> -어장시설 기법 및 관리기술 개발 -비즈니스해양공원 모델개발 	<ul style="list-style-type: none"> 물리·생물학적 모니터링을 통한 수증별 미세조류 자원 영향 파악 및 분포도 작성 	<ul style="list-style-type: none"> 어장환경 모니터링 및 생물양성 비즈니스해양공원 모델 작성 및 시뮬레이션 	<ul style="list-style-type: none"> 미세조류 기반 무척추동물 상식 기술 확립 비즈니스해양공원 실험역 파일럿 조성 실험조사 	<ul style="list-style-type: none"> 해양 무척추동물 생산력 평가 비즈니스해양공원 모델 완성
		해양생물 자원 확보 및 특성분석	대량생산 공정 구축	산업적 소재 생산 및 플랫폼 확립	

제2장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 계획대비 연구 수행의 적절성

1. 연구수행의 적절성

가. 연구개발 추진체계 및 수행방법

□ 연구개발 추진체계



□ 연구개발 수행방법

○ 해양·극한 생물자원 확보

- 알려진 자가영양배지, 고염 배지와 적용 가능한 새로운 아이디어를 가미하여 온도/pH, NaCl, 유기물, yeast extract, 전자공여체, 전자수용체 등의 조건을 혼합하여 29종류의 화학무기독립 영양 배지를 준비
- 다양한 시료 (열수구 퇴적토, 심해생물 내장, 해수, 갈대습지, 해면, 해조류, 어류내장 등)를 확보하고 25, 55, 80도에서 농후배양
- 온도/pH 등의 조건에 따라 한천배지와 phytigel 배지를 고체배양에 사용하여 단일 균주 분리

○ 가스전환 개량균주 개발

- 기존 알려진 방법론(mobile group II intron) 및 CRISPR/Cas9 도입

○ 모델균주 (기확보 균주)를 이용한 가스 발효 기술 개발

- 배양조건 탐색, 가스발효 기술 개발 확립
- 가스전환 균주의 배지 조성(염, 희귀원소 농도)에 따른 성장 조건 분석
- 가스 전환 균주의 온도, pH, 배지조성 등 미생물 성장조건 효과 분석
- 회분식 배양에서의 반응기 운전 조건 탐색
- 미세조류-미생물 하이브리드 배양 시스템
 - 미생물이 생산하는 이산화탄소를 효율적으로 미세조류 배양시 활용할 수 있도록 연구설계
 - 미생물은 포도당을 에탄올로 전환시킬 수 있는 효모를 활용하고 이산화탄소와 에탄올을 효율적으로 생산할 수 있는 시스템 및 배양방법을 자체 고안하여 적용
 - 미세조류는 고염에서 성장 가능하고 기능성 물질을 함유하고 있는 *Dunaliella* 종을 선택하여 사용하고 미생물에서 생산되는 이산화탄소가 효율적으로 전달될 수 있는 미세조류 배양 시스템 설계
- 고염분수가 적용된 해양생물의 기능성 탐색
 - 농축 고염분수에서 생산된 해양생물의 추출물 제작 및 활성 스크리닝
 - 농축 고염분수를 활용하여 해양생물 mass를 미생물 발효 및 활성 스크리닝
 - 농축 고염분수를 활용하여 해양미생물을 배양하고 배양액이 갖는 활성 스크리닝
- 양식자원 위해 환경 및 먹이생물 모니터링(통영)
 - 3개 정점에서 5개 수심별로 월별 PCR/NGS 병행한 병원체, 해양환경 및 먹이생물모니터링
 - 월별 현미경을 통한 개체수 및 종조성, 분포도 분석
- 양식어장 부착생물 저감방안(통영)
 - 연구교습어장에서의 월별 양식장 및 구조물, 부착판에 서식하는 부착생물 현황 조사 및 소재별 제어기술 검증
 - 월별 양식 생물에 위협 영향을 주는 부착생물의 가입 시기, 환경 특성에 따른 가입 양상 조사
- 양식자원 복합단지 조성 및 비즈니스 해양공원모델 개발(통영)
 - 중·저층 어장 설계 및 시설 기술적용 시설
 - 냉수성 어·패류 양식 대상생물 선정 선행연구 및 매월 비단가리비 양식성장 모니터링
 - 양식생산 시설과 연계한 해양공간의 복합활용을 위한 비즈니스 공원 모델 개발 국내외 사례 수집

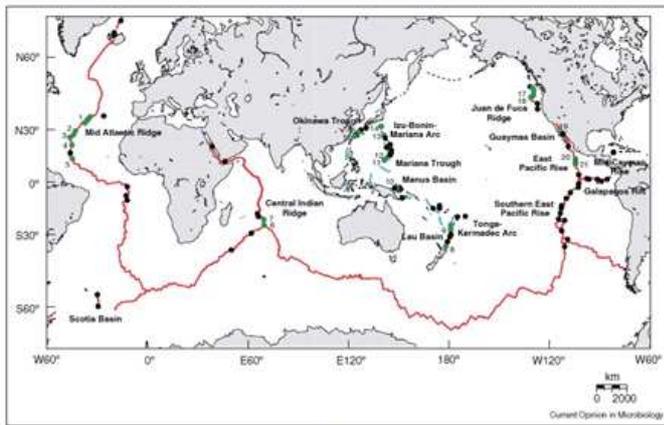
제2절 연구개발 수행 내용 및 결과

1. 신규 생물 자원 확보

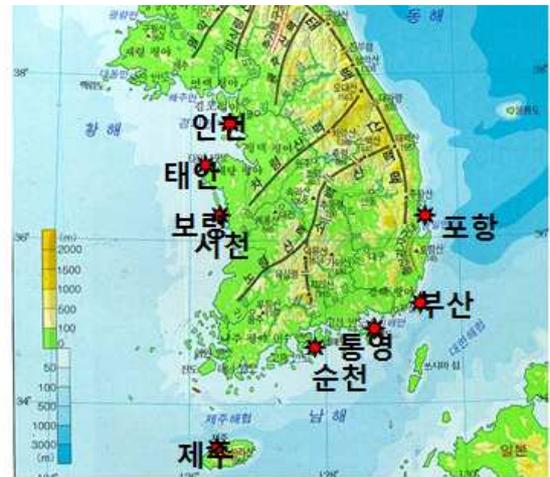
가. 신규미생물 자원 확보

○ 화학무기독립영양 미생물 자원 확보

- 2019년 상반기에는 국외(인도양, 태평양), 국내연안(순천만, 영도, 통영, 여수 등) 등 다양한 해양환경으로부터 퇴적토, 해수, 생체 시료를 채취함(그림 1-1-1, 그림 1-1-2).



<대양 심해 및 열수구>



<국내 연안>

그림1-1-1. 국내의 시료채취 지역



그림1-1-2. 국내의 해양환경으로부터 시료 채취

- 상기 시료를 대상으로 24 종류의 중 특이적 화학무기독립영양 배지를 제작하고 1,300 여개의 농후배양을 수행함(그림 1-1-3).



그림1-1-3. 시료처리 및 화학무기독립영양 미생물의 농후배양

- 2019년 하반기에는 순천만(갈대습지), 을숙도(갈대습지)에서 깊이별 퇴적토 시료를 대상으로 *Acetobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Thermoanaerobacter* 특이적인 4개의 배지를 사용하여 25도 또는 55도에서 48 ea 시료에 대하여 농후배양함. 이 중, 12/48 ea를 확인하였으며, 대부분이 *Eubacterium* 배지에서 관찰됨(그림 1-1-4).



그림1-1-4. 순천만 및 을숙도 시료채취

- 현재까지, 농후배양을 통하여 sulfur oxidizing bacteria (SOB) 3주, sulfate-reducing bacteria (SRB) 1주, acetogen 3주, methanogen 2주, *Sphaerochaeta* 1주 등 다양한 화학무기독립영양 미생물을 확보함(표 1-1-1).

표1-1-1. 확보한 화학무기독립영양 미생물 리스트

시료	균주 번호	최근연종 종명	유사도(%)	배지 종류	비고
인도양	IOR2	<i>Desulfovibrio senegalensis</i>	96.7	H2/CO2	중온성, 화학무기독립영양, SRB
인도양	IOR11	<i>Sulfurimonas paralvinellae</i>	97.1	H2/CO2	중온성, 화학무기독립영양, SOB
인도양	IOR12	<i>Sulfurovum</i> sp.	-	N2/CO2	중온성, 화학무기독립영양, SOB
인도양	IOT11	<i>Thermovibrio</i> sp.	-	H2/CO2	고온성, 화학무기독립영양, SOB
갈대습지	SCR2	<i>Acetobacterium woodii</i>	99.5	H2/CO2	중온성, 화학무기독립영양, Acetogen
해조류	JR1	<i>Acetoanaerobium oterae</i>	99.7	H2/CO2	중온성, 화학무기독립영양, Acetogen
해조류	JR2	<i>Acetobacterium carbinolicum</i>		H2/CO2	중온성, 화학무기독립영양, Acetogen
갈대습지	SCR3	<i>Methanoculleus thermophilus</i> (<i>Symbiobacterium streiconchae</i>)	98.5 (99.6)	H2/CO2	고온성, 화학무기독립영양, Methanogen
해조류	YS1	<i>Methanogenium organophilum</i> (<i>Clostridia bacterium</i> TQ)	96.5 (88.2)	H2/CO2	중온성, 화학무기독립영양, Methanogen
갈대습지	SCR1	<i>Spharochaeta associata</i>	96.2	H2/CO2	중온성, 화학무기독립영양

○ 고염분수 성장 미생물 자원 확보

- 미생물 분리를 위한 배지 제작

배지명	조성
GY-CSW	0.1% glucose, 0.1% yeast extract, 1.5% agar in concentrated seawater (70‰)
PY-CSW	0.5% peptone, 0.1% yeast extract, 1.5% agar in concentrated seawater (70‰)

- 고염 성장 미생물 탐색을 위한 샘플링: 샘플은 농축고염분수, 젓갈류(오징어, 낙지, 꼴뚜기 젓갈), 김치 및 제주연안에서 수집한 생물시료, 제주 암반 (지하 110m 해수층) 등을 확보하여 고염 배양배지에 도말하고 미생물을 순수분리 하였음
- 미생물의 동정: 16S ribosomal RNA 서열의 유사도 분석을 통해 미생물 확인(58종)(표 1-1-2)

표1-1-2. 분리된 고염분수 성장 미생물 리스트

시료	균주번호	최근연종		성장 배지
		종명	유사도 (%)	
고염농축수	C1	<i>Alteromonas marina</i> SW-47(T)	99.31	GY-CSW, MA
고염농축수	C2	<i>Alteromonas oceani</i> S35(T)	96.77	GY-CSW, MA
고염농축수	C3	<i>Alteromonas australica</i> H 17(T)	100	GY-CSW, MA
고염농축수	C4	<i>Epibacterium mobile</i> DSM 23403(T)	99.78	GY-CSW, MA
고염농축수	C6	<i>Halomonas stevensii</i> S18214(T)	100	GY-CSW, MA
김치	K1-1	<i>Sporosarcina aquimarina</i> SW28(T)	98.86	GY-CSW, MA
김치	K1-2	<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b(T)	100	GY-CSW, MA
김치	K1-5	<i>Gracilibacillus marinus</i> HB09003(T)	99.86	GY-CSW, MA
김치	K1-6	<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i> subsp. <i>oncorhynchi</i> R-2(T)	99.92	GY-CSW, MA
김치	K1-7	<i>Bacillus safensis</i> FO-36b(T)	100	GY-CSW, MA
김치	K1-8	<i>Sporosarcina aquimarina</i> SW28(T)	98.64	GY-CSW, MA

김치	K2-1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> KCTC 13429(T)	100	GY-CSW, MA
김치	K2-2	<i>Bacillus gibsonii</i> DSM 8722(T)	99.92	GY-CSW, MA
오징어젓갈	J2	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> ATCC 15305(T)	100	GY-CSW, MA
낙지젓갈	J3	<i>Brevibacterium casei</i> NCDO 2048(T)	99.18	GY-CSW, MA
낙지젓갈	J5	<i>Brachybacterium squillarum</i> M-6-3(T)	99.93	GY-CSW, MA
꿀뚜기젓갈	J6	<i>Bacillus clausii</i> DSM 8716(T)	99.93	GY-CSW, MA
꿀뚜기젓갈	J7	<i>Bacillus zhangzhouensis</i> DW5-4(T)	99.93	GY-CSW, MA
꿀뚜기젓갈	J8	<i>Staphylococcus edaphicus</i> P5085(T)	100	GY-CSW, MA
꿀뚜기젓갈	J9	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i> LMG 19861(T)	99.79	GY-CSW, MA
제주암반	89-1	<i>Pseudomonas chengduensis</i> MBR(T)	99.93	GY-CSW, MA
제주암반	89-3	<i>Pseudomonas toyotomiensis</i> HT-3(T)	99.93	GY-CSW, MA
제주암반	89-4	<i>Bacillus aquimaris</i> TF-12(T)	99.19	GY-CSW, MA
제주암반	100-1	<i>Bacillus oceanisediminis</i> H2(T)	99.64	GY-CSW, MA
제주암반	100-2	<i>Bacillus proteolyticus</i> TD42(T)	99.93	GY-CSW, MA
제주암반	100-3	<i>Pseudomonas oleovorans</i> subsp. <i>oleovorans</i> DSM1045(T)	97.81	GY-CSW, MA
제주암반	110-1	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>albirubida</i> NBRC 13392(T)	99.86	GY-CSW, MA
제주암반	110-2	<i>Arthrobacter crystallopoietes</i> DSM20117(T)	99.72	GY-CSW, MA
제주암반	110-4	<i>Bacillus marisflavi</i> JCM 11544(T)	99.86	GY-CSW, MA
제주암반	110-5	<i>Bacillus endophyticus</i> 2DT(T)	100	GY-CSW, MA
제주암반	110-6	<i>Streptomyces badius</i> NRRL B-2567(T)	99.93	GY-CSW, MA
제주암반	120-1	<i>Chryseomicrobium aureum</i> BUT-2(T)	99.59	GY-CSW, MA
제주암반	120-2	<i>Chryseomicrobium amylolyticum</i> JC16(T)	99.92	GY-CSW, MA
제주암반	120-3	<i>Microbacterium oleivorans</i> NBRC103075(T)	99.15	GY-CSW, MA
제주암반	120-4	<i>Alishewanella agri</i> BL06(T)	99.1	GY-CSW, MA
제주암반	1301-1	<i>Paracoccus aestuarii</i> DSM19484(T)	98.99	GY-CSW, MA
제주암반	1301-2	<i>Acinetobacter junii</i> CIP 64.5(T)	99.66	GY-CSW, MA
제주암반	1301-4	<i>Pseudomonas mendocina</i> NBRC 14162(T)	99.79	GY-CSW, MA
제주암반	1302-2	<i>Bacillus firmus</i> NBRC 15306(T)	99.5	GY-CSW, MA
제주암반	1302-3	<i>Acinetobacter junii</i> CIP 64.5(T)	99.59	GY-CSW, MA
해조류	SS1a	<i>Marinobacter algicola</i> DG893(T)	99.86	GY-CSW, MA
해조류	SS1b	<i>Marinobacter adhaerens</i> HP15(T)	98.36	GY-CSW, MA
해조류	SS1d	<i>Microbulbifer elongatus</i> DSM 6810(T)	99.52	GY-CSW, MA
고등	SS2c	<i>Halomonas litopenaei</i> SYSUZJ2214(T)	99.79	GY-CSW, MA
해조류	SS7a	<i>Marinobacter sediminum</i> R65(T)	99.66	GY-CSW, MA
해조류	SS7b	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> ATCC 49840(T)	99.86	GY-CSW, MA
해면	SS8a	<i>Halomonas litopenaei</i> SYSUZJ2214(T)	99.68	GY-CSW, MA
해면	SS8b	<i>Saccharospirillum impatiens</i> EL-105(T)	99.17	GY-CSW, MA
성계	SS9a	<i>Marinobacter shengliensis</i> SL013A34A2 (T)	99.04	GY-CSW, MA
성계	SS9b	<i>Alteromonas marina</i> SW-47(T)	98.55	GY-CSW, MA
해변 자갈	SS10a	<i>Marinobacter sediminum</i> R65(T)	99.45	GY-CSW, MA
해수	S6516(green)	<i>Pseudoalteromonas rubra</i> ATCC 29570(T)	99.86	PY-CSW, MA
해수	S7366(red)	<i>Pseudoalteromonas rubra</i> ATCC 29570(T)	99.65	PY-CSW, MA
해수	S7706(green)	<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i> DSM 6061(T)	99.18	PY-CSW, MA
해면	S1156(purple)	<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i> DSM 6061(T)	99.93	PY-CSW, MA
해수	S1131	<i>Pseudoalteromonas xiamenensis</i> Y2(T)	100	PY-CSW, MA
해파리	S985	<i>Pseudoalteromonas piscicida</i> IAM12932(T)	100	PY-CSW, MA
해수	S5871	<i>Fictibacillus phosphorivorans</i> Ca7T(T)	100	PY-CSW, MA

※ MA: marine agar

나. 신규 생물자원 특성분석

○ 확보한 신규 화학무기독립영양 미생물의 계통분류학적 분석

- 확보한 8주 미생물의 계통분류학적 분석을 통하여 확보된 화학무기독립영양 미생물이 다양한 그룹에 위치함을 확인함(그림 1-2-1).

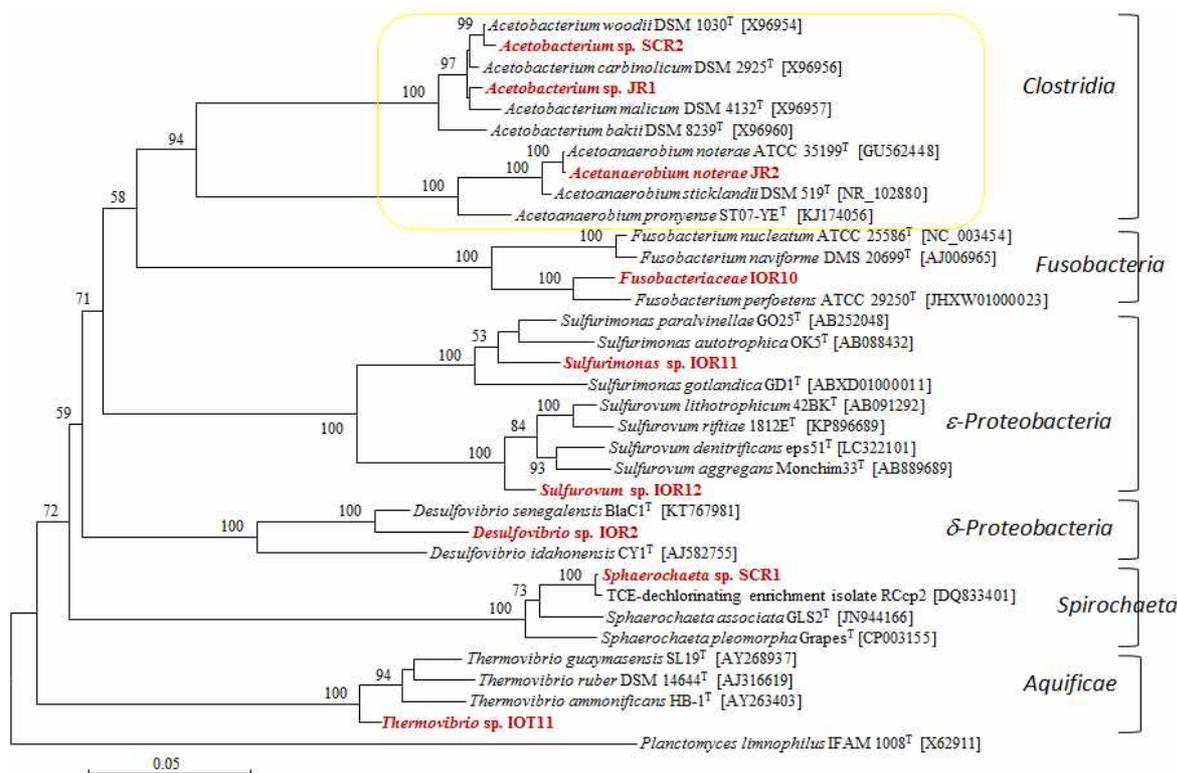


그림1-2-1. 확보한 화학무기독립영양 미생물의 계통분류학적 분석

○ 신규 화학무기독립영양 미생물 IOR2 균주의 미생물의 특성분석

- IOR2 균주는 rod 형태이며, 16S rRNA 분석결과 신속에 해당함을 확인함(그림 1-2-2).
- IOR2 균주 및 *Desulfovibrio senegalensis*의 형태학적, 생리학적 분석을 비교한 결과 기질이용성에서 차이점을 나타냄(표 1-2-1).

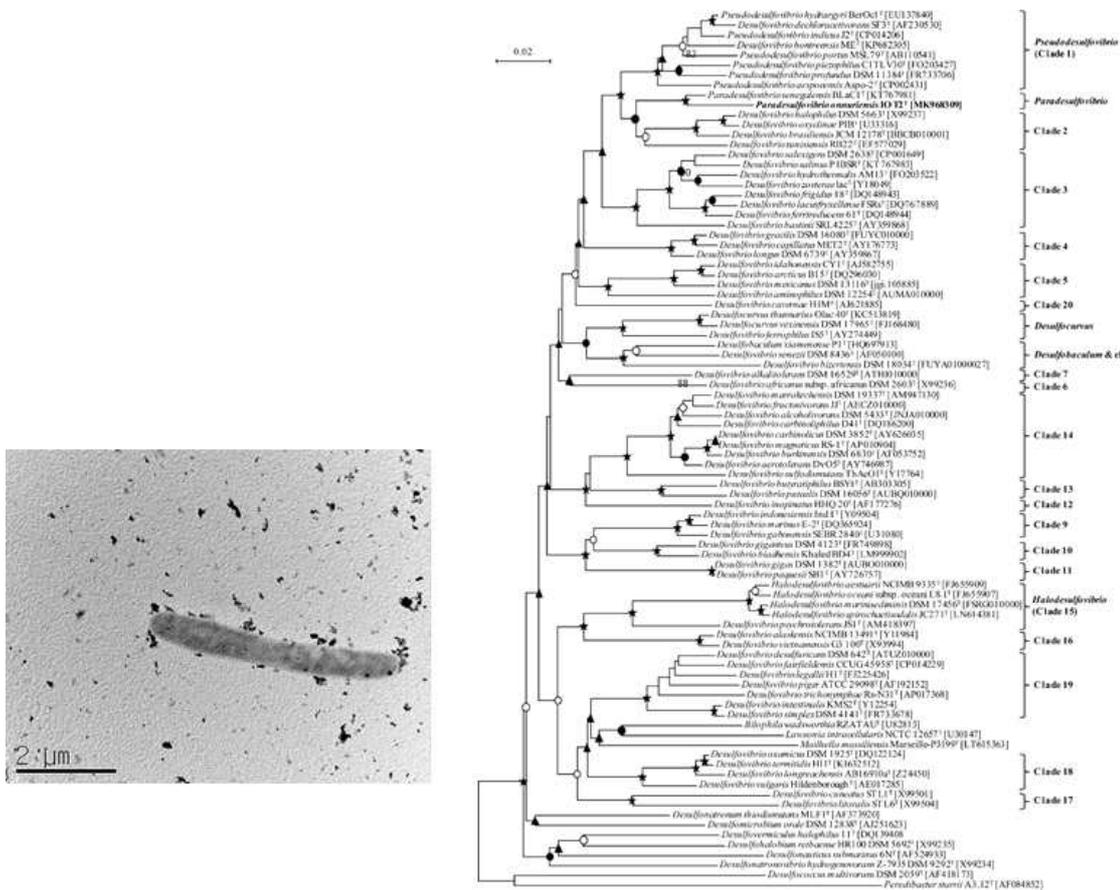


그림1-2-2. IOR2의 TEM 사진 및 16S rRNA 기반 계통분류학적 분석

표1-2-1. IOR2 균주 및 *Desulfovibrio senegalensis*의 형태학적, 생리학적, 생화학적 특성 비교

Characteristics	1	2
Cell shape	Rod	Rod [†]
Cell size (μm)	0.5 × 2-5	0.5 × 2-4
Isolation source	Deep-sea sediment	Marine sediment
Growth range of		
Temperature (optimum) (°C)	23-42 (37)	15-40 (40) [†]
pH (optimum)	5.0-8.0 (7.0)	6.3-8.5 (7.5) [†]
NaCl (optimum) (% w/v)	0.5-6.5 (3.0)	0.5-6.5 (3.0) [†]
Electron donors (with sulfate)		
Glycerol	+	-
Substrate utilization		
Glutamic acid, l-leuine-β-naphthylamide, l-tyrosine-β-naphthylamide	-	+
l-Arginine, d-mannose, potassium nitrate, l-pyroglutamic acid-β-naphthylamide	+	-
Enzyme activities		
Acid-phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, N-acetyl-β-glucosaminidase	+	-
Major fatty acid (> 5%)	C _{16:0} , i-C _{15:0} , a-C _{15:0} , i-C _{17:0} , SF9 (C _{16:0} methyl/i-C _{17:1} ω9c)	i-C _{15:0} , a-C _{15:0} , i-C _{16:0} , i-C _{17:0} , a-C _{17:0} , a-C _{17:1} ω9c, SF9
DNA G+C (mol%)	60.5	60.5

- IOR2 균주 및 *Desulfovibrio senegalensis*의 fatty acid 비교한 결과 fatty acid composition에서 유사점을 나타냈지만 차지하는 비율에서는 차이점을 나타냄
- 또한, 기 보고된 family *Desulfovibrionaceae* 내 8개 genus 그룹과 형태학적, 생리학적 분석을 비교한 결과, IOR2와 *D. senegalensis*가 새로운 속에 포함됨을 알 수 있었음(표 1-2-2).

표1-2-2. IOR2와 *D. senegalensis* 및 family *Desulfovibrionaceae* 내 8개 genus 그룹과 형태학적, 생리학적 분석을 비교 분석

Characteristics	1	2	3	4	5	6
Morphology						
Rod, vibroid, or both	R	V	V	R	B	B
Flagellum	-	-	SP	SP	nd	SP/LO
Optimum growth at; temperature (°C)	37-40	25-35	37-40	35-40	20-37	35-37
pH	7.0-7.5	6.0-7.5	6.9-7.1	7.0	7.0-8.0	7.0-7.5
NaCl (% w/v)	3.0	0.7-8.0	0.2	0.5	1.5-3.5	2.0-3.0
Aerobic growth	-	-	-	-	-	v
Chemolithoautotrophic growth	+	v	-	-	-	v
Electron donors						
H ₂	+	+	v	+	+	v
Lactate	+	+	+	+	+	+
Malate	-	v	-	+	+	v
Fumarate	-	v	-	+	+	v
Formate	v	v	+	-	+	v
Acetate	v	-	-	+	v	-
Pyruvate	+	+	+	+	+	+
Succinate	-	v	-	+	+	v
Propionate	-	-	-	-	-	-
Ethanol	-	v	-	-	v	+
Methanol	-	-	-	-	-	-
Butanol	-	-	-	nd	-	v
Glycerol	v	-	-	-	v	v
Electron acceptors						
Sulfate	+	+	+	+	+	+
Thiosulfate	+	+	+	-	+	+
Sulfite	+	+	+	+	v	+
Nitrite	-	-	-	-	-	-
Nitrate	-	v	-	-	-	v
Fumarate	-	v	nd	+	v	+
Elemental sulfur	-	v	-	-	-	v
Major fatty acids (> 10%)						
Saturated	i-C _{15:0} , a-C _{15:0} , i-C _{17:0}	i-C _{15:0} , i-C _{17:0}	C _{16:0} , i-C _{15:0} , a-C _{15:0} , 0	C _{16:0} , i-C _{15:0}	i-C _{15:0} , i-C _{17:0}	C _{16:0} , i-C _{15:0} , i-C _{14:0} 3OH
Unsaturated	-	-	-	i-C _{17:1} ω9c	i-C _{17:1} ω9c	-
Summed feature	SF9*	SF9*	-	-	-	-
DNA G+C (mol%)	60.5	50.0-63.5	67.2-70.0	64.5	45.1-47.1	47.5-64.0
Isolation Sources	Deep-sea or marine sediments	Various marine environments	Subsurface aquifer, wastewater digester	Mangrove sediments	Marine environments	Animals, waste digester

- IOR2 균주 및 *Desulfovibrio senegalensis*의 comparative genome 분석을 통하여 sulfate-reducing 경로 및 CO2 고정화 경로를 확인할 수 있었음(표 1-2-3).

표1-2-3. IOR2 균주 및 *Desulfovibrio senegalensis*의 comparative genome 분석

Characteristic	IOR2 ^T	BLaC1 ^T
Sequencing method	PacBio_20K	Illumina MiSeq
Method coverage	147.08	803.67
Assembler	PacBio SMRT Analysis 2.3.0	SPAdes 3.13.0
Contig number	1	16
Genome size (Mb)	3.89	3.37
N50 (bps)	3,886,744	436,221
Protein-coding genes	3,566	3,093
Ribosomal RNA	12	5
Transfer RNA	63	52
G+C ratio (mol%)	60.5	58.1

- IOR2 균주 및 기 보고된 family *Desulfovibrionaceae* 내 *Desulfovibrio* 균주의 genome 기반 계통 분류학적 분석을 수행한 결과, 16S rDNA 기반한 결과와 크게 다르지 않음을 확인함(그림 1-2-3).

○ 신규 화학무기독립영양 미생물 SCR2 균주의 특성분석

- *Acetobacterium* sp. SCR2 균주는 WLP 경로를 포함하는 acetogen으로 성장온도 범위는 15-36도였으며, 30도에서 최적 성장온도를 나타냄.
- 또한, SCR2 균주는 1% NaCl 농도에서 최적 성장을 나타냄. 기 보고된 육상 유래의 *Acetobacterium*는 NaCl이 없는 조건에서 최적 성장을 하는 특성과 구별됨.
- 현재, SCR2 균주의 유전체 해독 및 분석을 진행 중.

○ 신규 화학무기독립영양 미생물 JR1 균주의 특성분석

- *Acetoanaerobium* sp. JR1 균주는 WLP 경로를 포함하는 acetogen으로 성장온도 범위는 10-46도였으며, 37도에서 최적 성장온도를 나타냄.
- 또한, JR1 균주는 1.5% NaCl 농도에서 최적 성장을 나타냄. 기 보고된 육상 유래의 *Acetoanaerobium*은 NaCl이 없는 조건에서 최적 성장을 하는 특성과 구별됨.
- 현재, JR1 균주의 유전체 해독 및 분석을 진행 중.

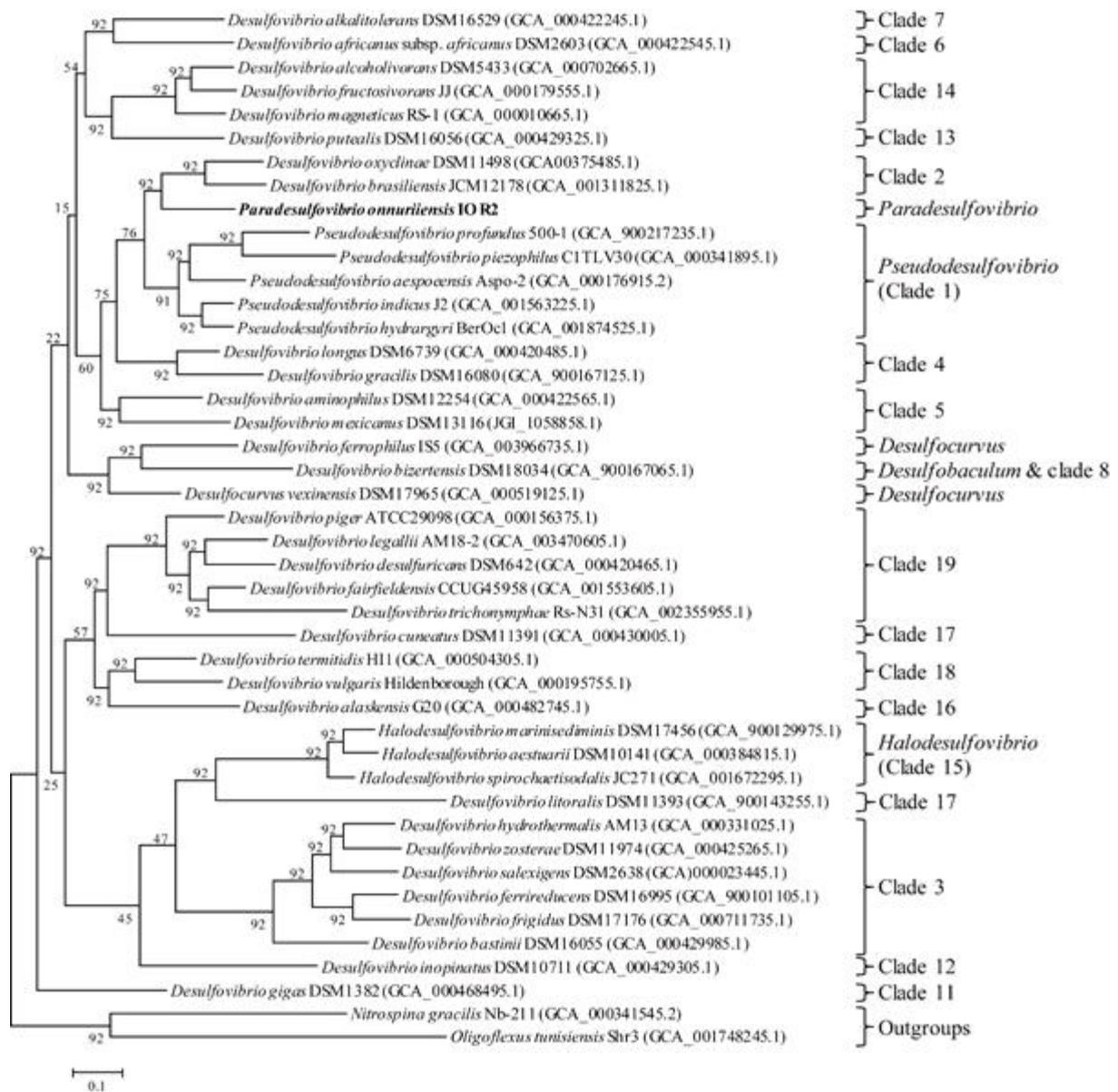


그림1-2-3. IOR2의 genome 기반 계통분류학적 분석

○ 신규 고염성장 미생물 100-3 균주의 특성분석

- 100-3 균주는 계통유전학적 분석 결과 *Pseudomonas* 속 그룹에 속하는 신종 미생물임을 확인하였음(그림 1-2-4).

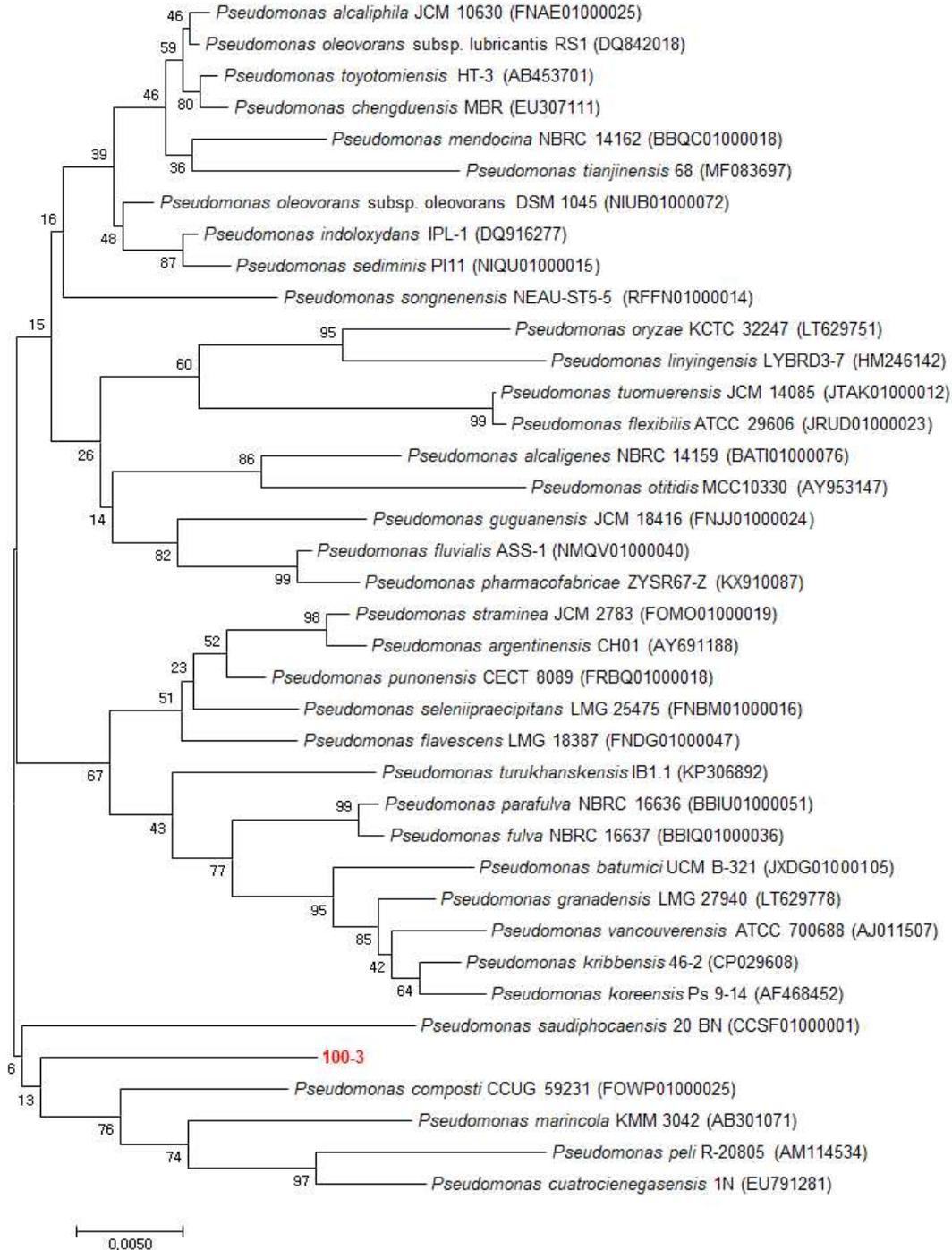


그림1-2-4. 100-3의 16S rRNA 기반 계통분류학적 분석

○ 신규 고염성장 미생물 K1-8 균주의 특성분석

- K1-8 균주는 계통유전학적 분석 결과 *Sporosarcina* 속 그룹에 속하는 신종 미생물임을 확인하였음(그림 1-2-5).

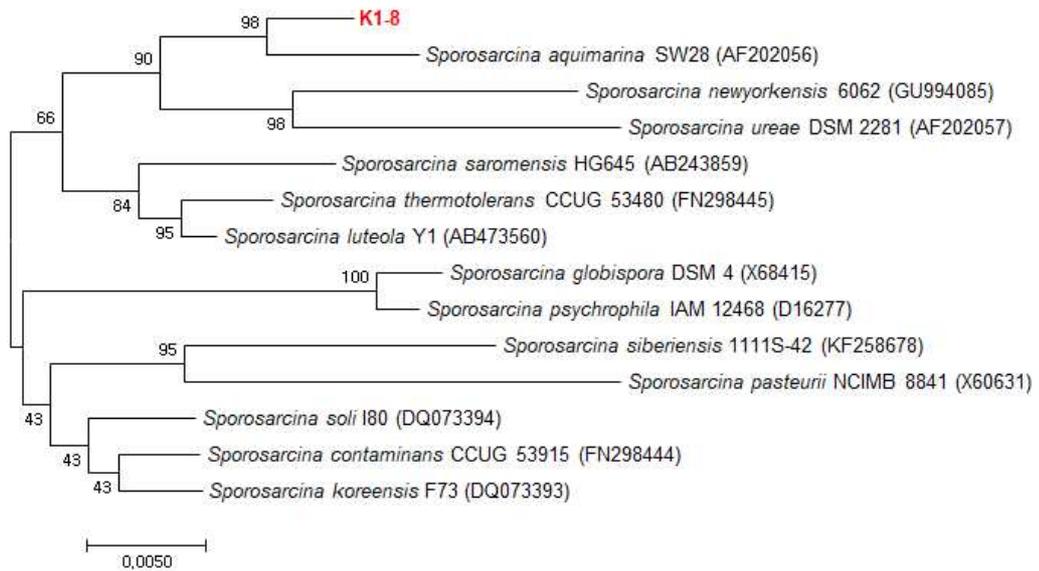


그림1-2-5. K1-8의 16S rRNA 기반 계통분류학적 분석

○ 신규 고염성장 미생물 ss1b 균주의 특성분석

- ss1b 균주는 계통유전학적 분석 결과 *Marinobacter* 속 그룹에 속하는 신종 미생물임을 확인하였음(그림 1-2-6).

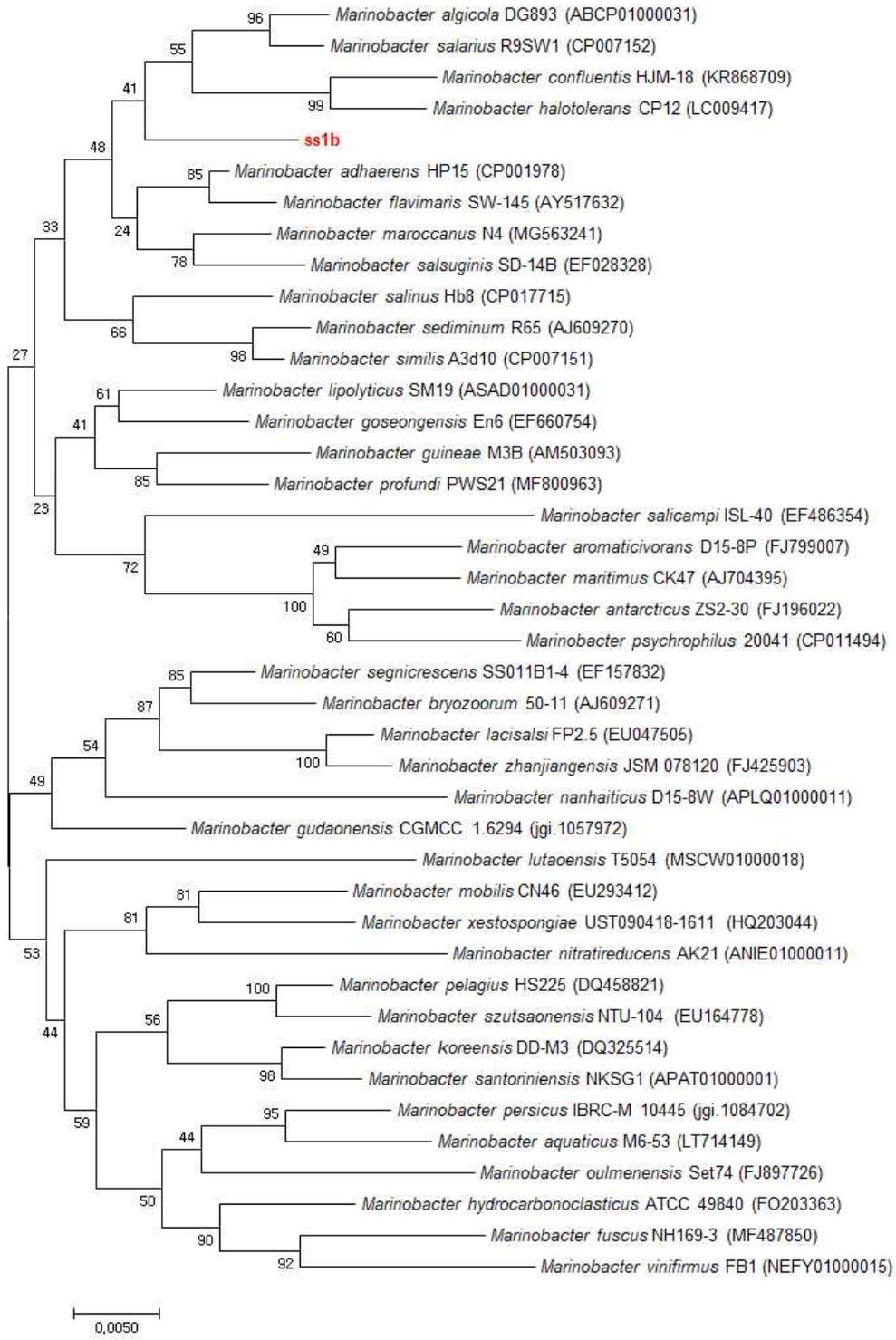


그림1-2-6. ss1b의 16S rRNA 기반 계통분류학적 분석

○ 신규 고염성장 미생물 ss9b 및 C2 균주의 특성분석

- ss1b 및 C2 균주는 계통유전학적 분석 결과 *Alteromonas* 속 그룹에 속하는 신종 미생물임을 확인하였음(그림 1-2-7).
- ss1b와 C2는 유전학적 거리가 많이 떨어져 있어 각기 다른 신종에 속하는 것을 확인(그림 1-2-7)

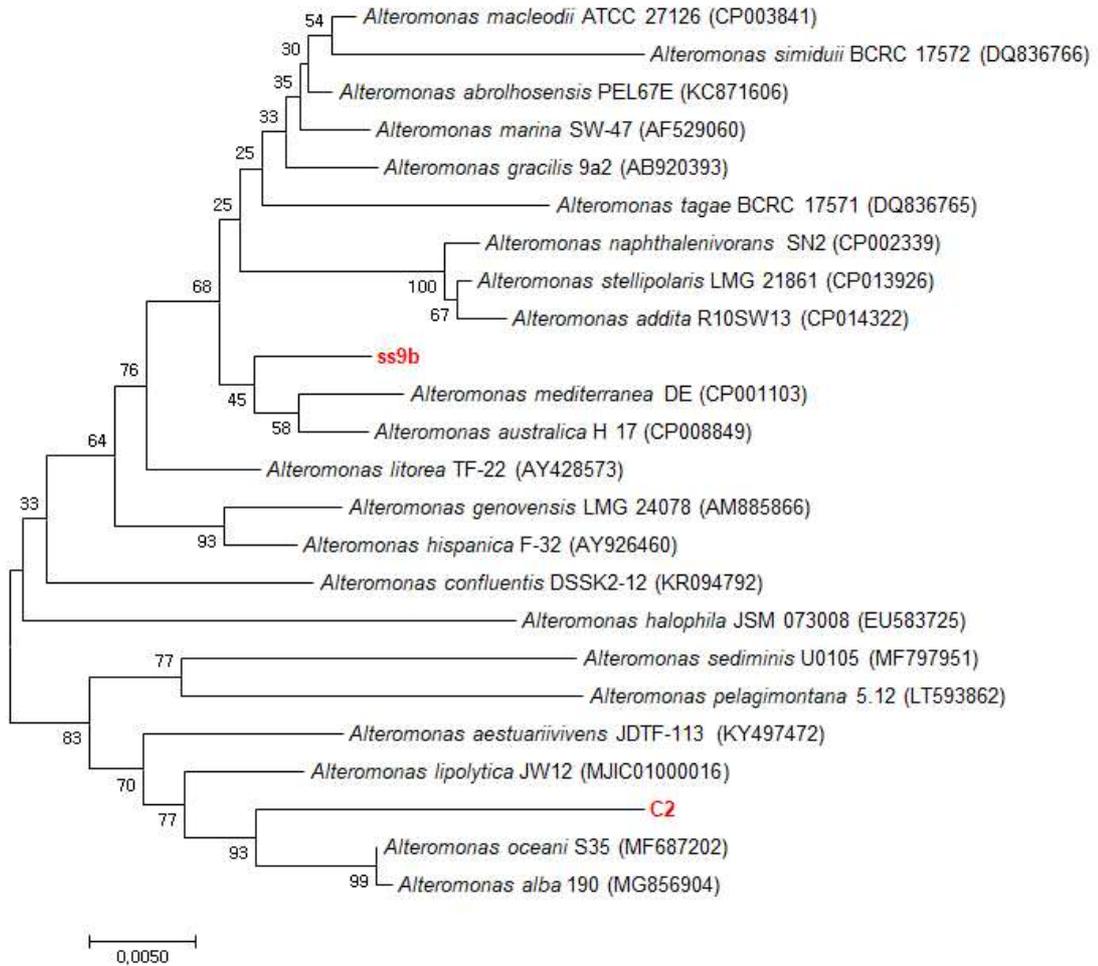


그림1-2-7. ss9b 및 C2의 16S rRNA 기반 계통분류학적 분석

2. 개량균주

가. 개량균주 확보

- Mobile group II intron을 이용한 내생포자 형성능이 제거된 개량 균주 제작
 - 본 연구팀이 신규 분리한 비광합성 탄소고정 미생물인 *Clostridium* sp. AWRP의 생산성 향상을 위해 sporulation의 global regulator인 *spo0A* 유전자가 결손된 균주를 제작하였음.
 - *Clostridium* 균주의 경우 고전적으로 사용되는 상동 재조합의 빈도가 매우 낮은 것으로 알려져 있어, 간편하게 유전자 결손이 가능한 mobile group II intron 방법으로 유전자 결손을 시도하였음.
 - 유전자 결손에 사용되는 shuttle plasmid인 pMTL007 플라스미드에 AWRP 균주의 *spo0A* 유전자를 targeting하도록 intron 서열을 변형하였음. pMTL007의 경우 intron이 genome에 삽입되면서 erythromycin 내성 유전자가 활성화되는 형태로 mutant의 선별이 용이함(아래 그림 2-1-1).

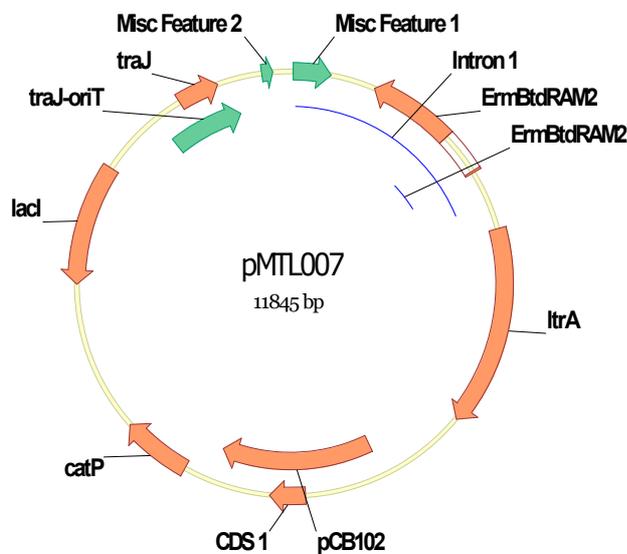


그림2-1-1. pMTL007 플라스미드의 모식도

- 제작된 plasmid를 AWRP 균주에 대장균과의 접합(conjugation)을 통하여 형질 전환하였으며, 이를 위해 접합에 사용되는 대장균 균주인 S17-1에 먼저 형질전환 후 이를 AWRP 균주와 접합을 시도하였음.
- 형질전환된 균주는 접합에 사용된 대장균과 분리 후 erythromycin 내성을 통해 intron이 삽입된 변이주를 탐색하였음.
- erythromycin 내성 colony를 대상으로 colony PCR을 실시한 결과, *spo0A* 유전자 내부에 intron이 삽입되어 아래 그림과 같이 size가 증가한 것을 확인함.

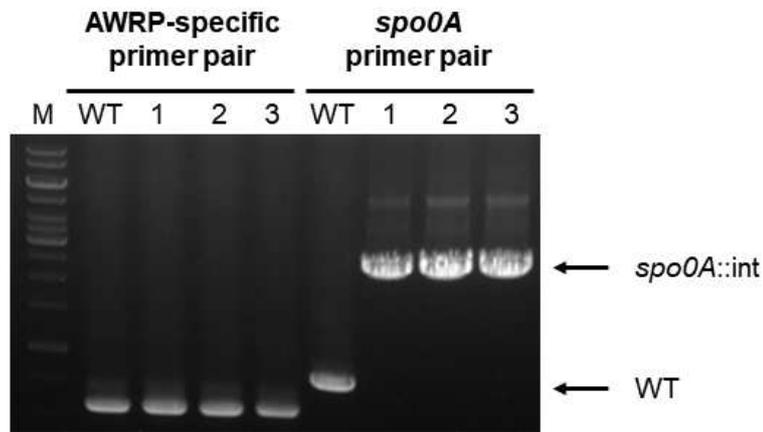


그림2-1-2. *Clostridium* sp. AWRP에서의 *spo0A* 유전자 결손 확인

- Syngas 조건(50% CO, 30% N₂, 10% CO₂, 10% H₂)에서 serum bottle 배양을 통해 야생형 균주와 비교한 결과, CO 전환율이 야생형 대비 향상된 것을 확인하였음(아래 그림2-1-3)

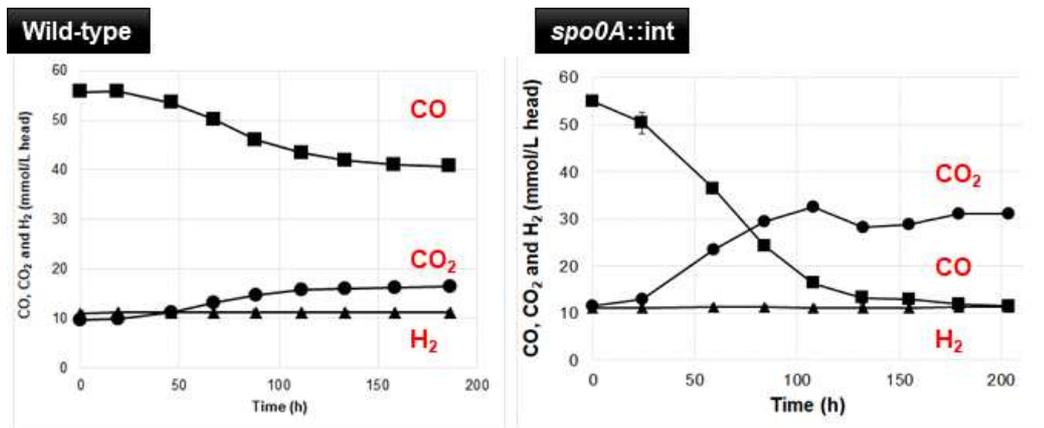


그림2-1-3. *Clostridium* sp. AWRP 야생형(좌)과 *spo0A* 결손주(우)의 가스 전환 프로파일

- 본 연구를 통해 Mobile group II intron 방법을 활용하여 Firmicutes에 속하는 비광합성 탄소고정 미생물의 유전자 조작이 가능함을 확인하였으며, 향후 개량균주 추가 제작 및 기 제작된 균주의 성능평가 실시 예정임.

3. 가스전환 고농도 배양기술

가. 가스전환 성장

○ 비광합성 탄소고정 미생물 *Clostridium* sp. AWRP의 유전체 분석

- *Clostridium* sp. AWRP는 2015년 해양과기원이 안산 갈대습지에서 분리한 균주로 고분압의 CO 조건에서 생장이 가능한 특징을 가지고 있음.
- AWRP 균주는 Wood-Ljungdahl 경로를 가진 아세트젠(acetogen)으로서, CO 이외에도 CO₂ + H₂를 기질로 사용하여 생장이 가능하며, 아세트산 외에 에탄올, 2,3-부탄디올을 생산하므로 활용 가능성이 높음.
- 16S rRNA 유전자 기반 계통학적 분석 결과, *C. ljungdahlii*, *C. autoethanogenum* 등 특히 균주들과 같은 group에 속해 있는 것으로 확인(그림3-1-1)

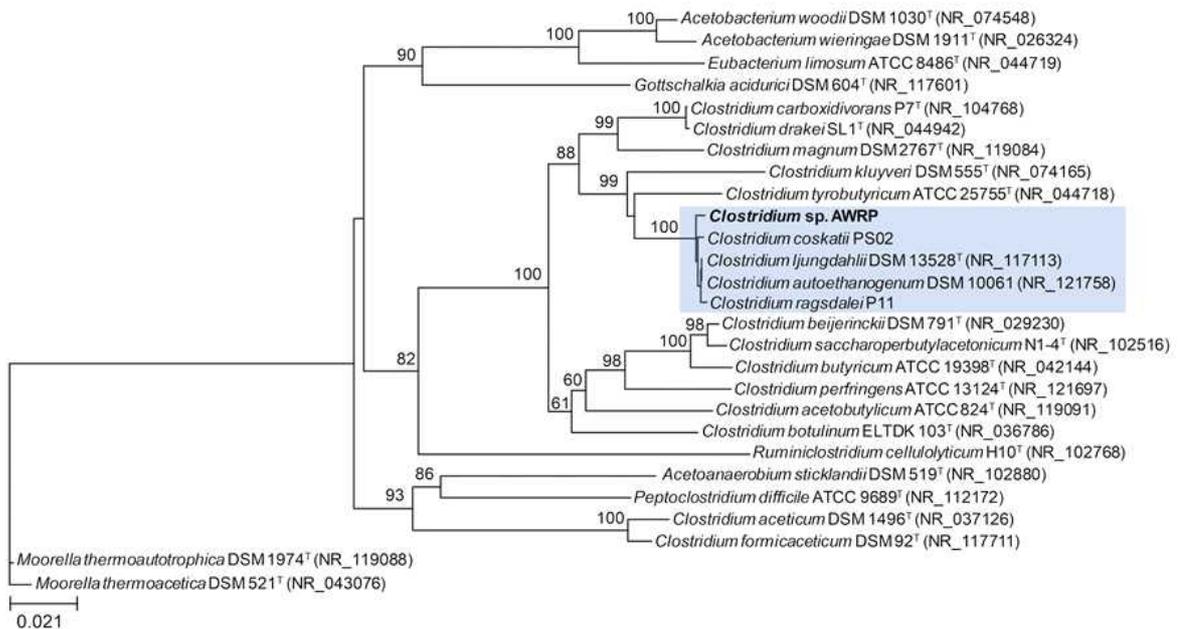


그림3-1-1. 16s rRNA 기반 AWRP 균주의 계통학적 위치

- 기존 해독된 AWRP 균주의 게놈 서열의 오류를 수정하고 이를 기반으로 근연종과의 orthologous 유전자 분석을 실시하였음(그림 3-1-2).

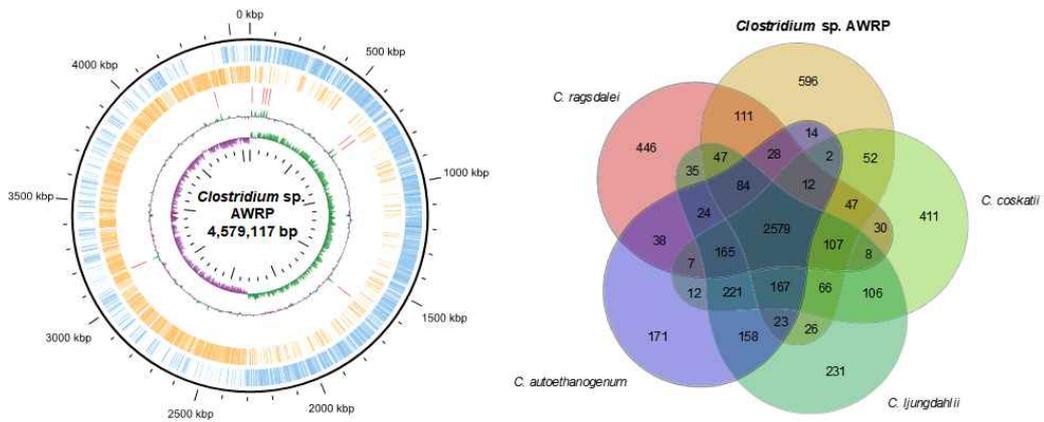


그림3-1-2. *Clostridium* sp. AWRP의 최종 유전체 지도(좌) 및 근연종과의 유전자 orthology 분석 (우)

- AWRP 균주의 경우, 다른 균주에는 없는 유전자의 개수가 596개로 group 내 근연종 중 가장 많이 보유하고 있는 것으로 확인됨.
- 따라서, AWRP 균주가 신종으로 분류될 수 있는지 확인을 위해 genome average nucleotide identity(gANI) 분석을 실시하였음(표 3-1-1).

표3-1-1. AWRP 균주와 근연종의 gANI 분석 결과

ANI value ^a (%)	Query				
	<i>C. ljungdahlii</i>	<i>C. autoethanogenum</i>	<i>C. coskatii</i>	<i>C. ragsdalei</i>	AWRP
Subject					
<i>C. ljungdahlii</i>	-	99.3 (89.9)	98.3 (84.5)	95.9 (66.8)	95.1 (75.8)
<i>C. autoethanogenum</i>	-	-	98.1 (79.9)	95.9 (66.0)	95.2 (72.3)
<i>C. coskatii</i>	-	-	-	95.8 (65.6)	95.1 (74.7)
<i>C. ragsdalei</i>	-	-	-	-	95.5 (52.1)
AWRP	-	-	-	-	-

%ANI (%alignment fraction)

- 분석 결과, AWRP 균주는 다른 근연종과의 gANI 수치가 95%대로 신종 분류 기준인 96.5% 이하로 확인되었으며, alignment fraction도 50-70%대로 높지 않음을 확인하였음.
- 또한, 계놈 정보를 기반으로 하여 AWRP 균주의 핵심 대사 경로와 해당 유전자를 정리하였음(그림 3-1-3). 이는 향후 대사공학 기반 균주 개발/omics 연구에 활용할 예정임.

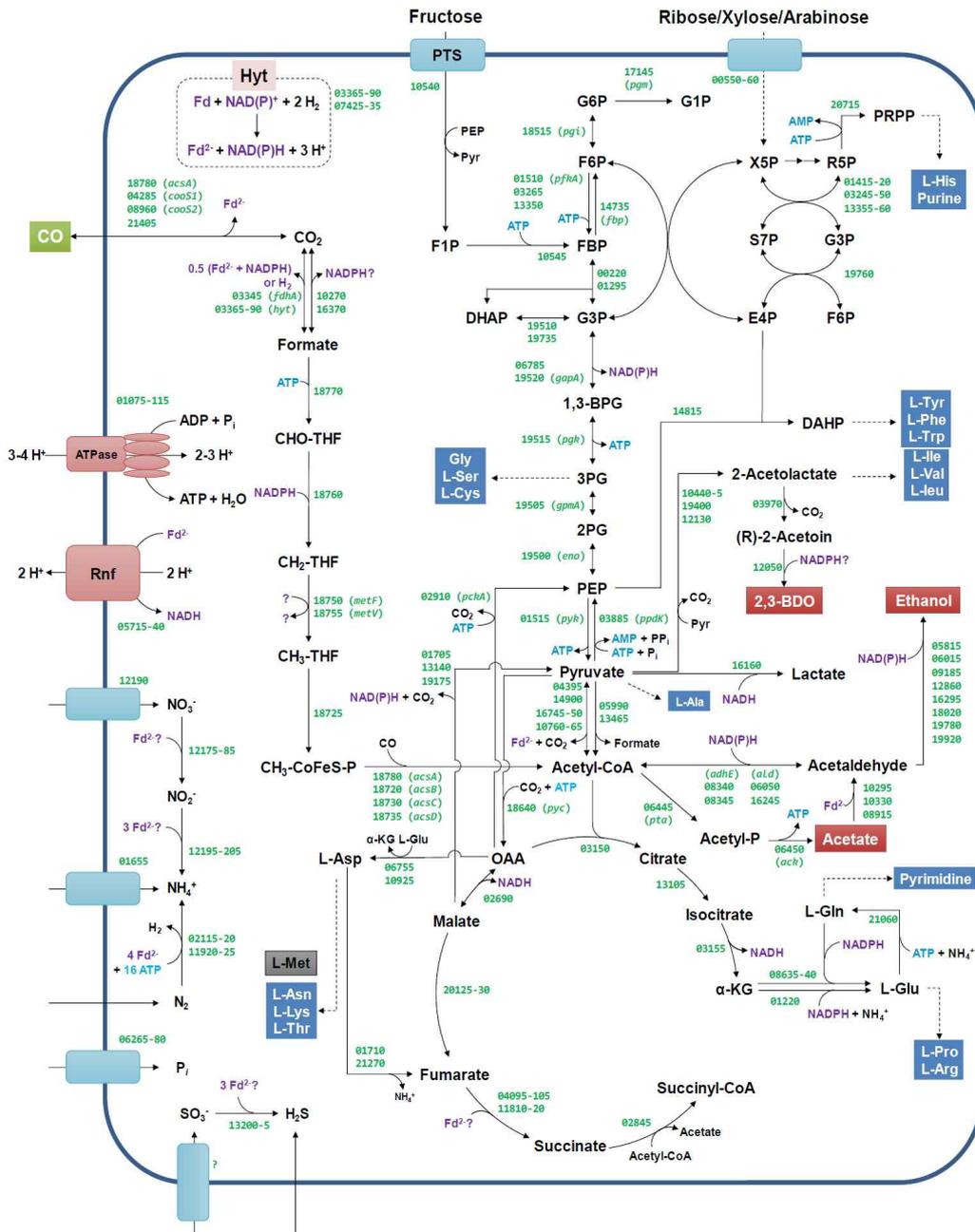


그림3-1-3. *Clostridium* sp. AWRP의 중심 대사 경로

○ *Clostridium* sp. AWRP의 일산화탄소 효율 향상을 위한 배양 조건 개선

- *Clostridium* sp. AWRP는 신규분리 균주로 이 균주를 활용하기 위해서 최적 배양 조건을 찾는 것이 매우 중요함.
- 균주 분리 당시 사용된 AM 배지 외에도 위해 문헌/특허 조사를 통해 3종(AMv2, PETC, RM) 배지를 활용하여 가스전환을 통한 산물 생산을 비교하였음(그림 3-1-4).

- 배양은 125-mL serum bottle에 10 mL의 배지를 첨가한 후, 2.5 bar의 혼합 가스(50% CO, 30% N₂, 10% CO₂, 10% H₂)를 충전하고 37°C, 180 RPM으로 교반하였음.
- 또한, 근연종 중 분류학적 공인 균주인 *C. ljungdahlii*를 같은 조건에서 배양하여 균주의 특성 차이를 비교하였음.

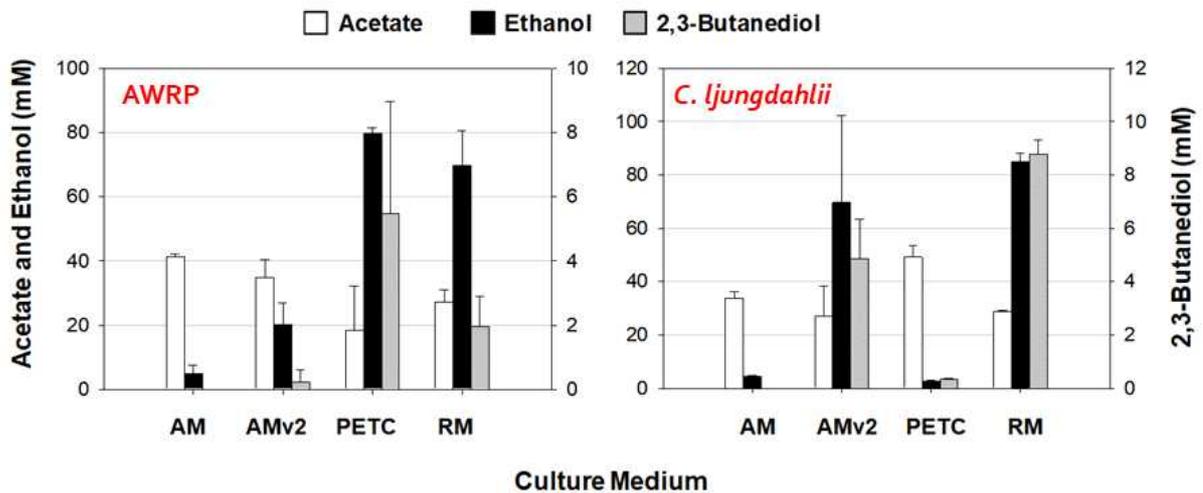


그림3-1-4. 다양한 배지에서 *Clostridium* sp. AWRP(좌)와 *C. ljungdahlii* DSM 13528^T(우)의 산물 생산 패턴

- AWRP 균주의 경우 PETC, RM 배지에서 높은 CO 전환율과 에탄올 생산량을 기록하였으며, 이는 serum bottle 수준의 회분식 배양에서는 기존 모델 균주와 동등 또는 상회하는 수치임.
- *C. ljungdahlii*의 경우 전체적으로 AWRP 균주 대비 2,3-부탄디올 생산량이 높으나, 이 균주의 분리 당시 배지인 PETC에서는 에탄올 생산이 5 mM 이하로 매우 낮았음.
- 에탄올 생산성은 다소 떨어지지만 CO 전환이 월등히 빠른 RM 배지를 이용하여 추가적으로 산물 생산 및 가스 전환에 영향을 주는 인자를 탐색하였음(그림 3-1-5).
- 전통적으로 배지에 많이 첨가되는 2가 이온인 Ca²⁺와 Cu²⁺는 AWRP 균주에 영향이 없는 것으로 판단되었음.
- 유전체 상으로 auxotroph인 methionine을 첨가시 2,3-부탄디올의 생산량이 증가하는 것으로 확인되었으며, 이는 보편적으로 사용되는 질소원인 yeast extract를 첨가시에는 나타나지 않음.
- 반응기에서 syngas를 공급하여 배양한 결과는 아래 그림 (그림 3-1-6)과 같음.

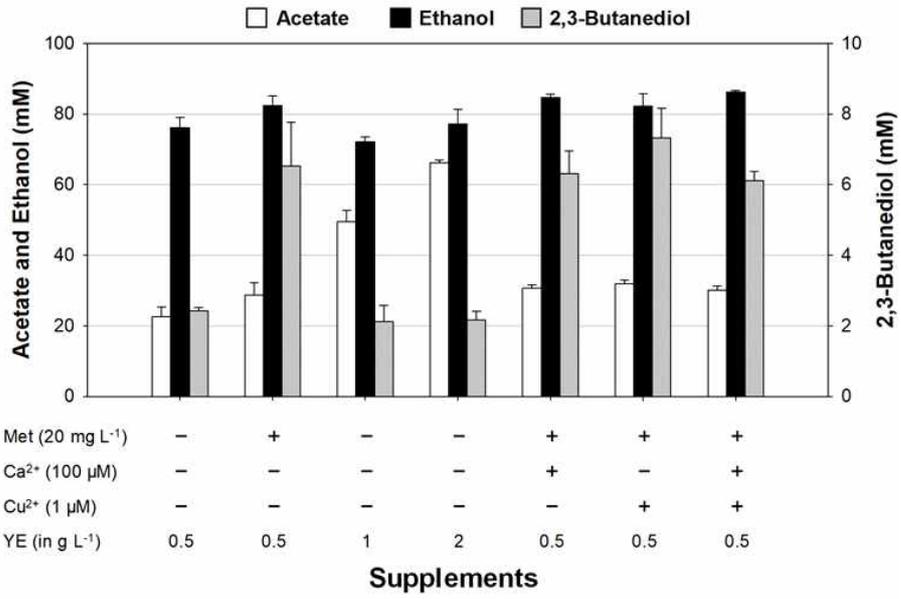


그림3-1-5. RM 배지의 첨가물에 의한 *Clostridium* sp. AWRP의 산물 생산 패턴 변화

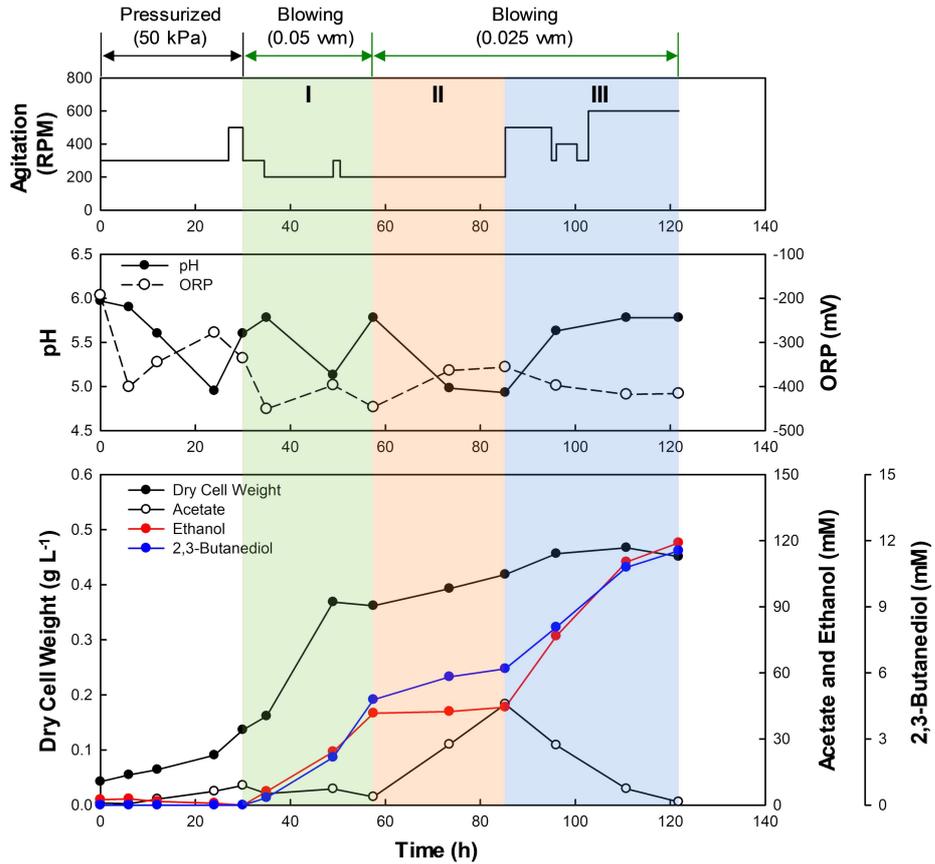


그림3-1-6. 반응기 수준(1.6L)에서 *Clostridium* sp. AWRP의 가스전환 배양 프로파일

- 문헌상에서 알려진 모델 균주의 회분식 배양에서는 대부분 배양 시간이 200시간을 상회하나, AWRP 균주의 경우 120시간만에 약 5 g/L(120 mM)의 에탄올을 생산하는 것을 확인하였음.
- 또한, CO 공급이 원활할 경우 아세트산보다 에탄올 생산이 우세한 것으로 나타났으며(물농도 비 1:70), 이는 세계 최고 수준임.

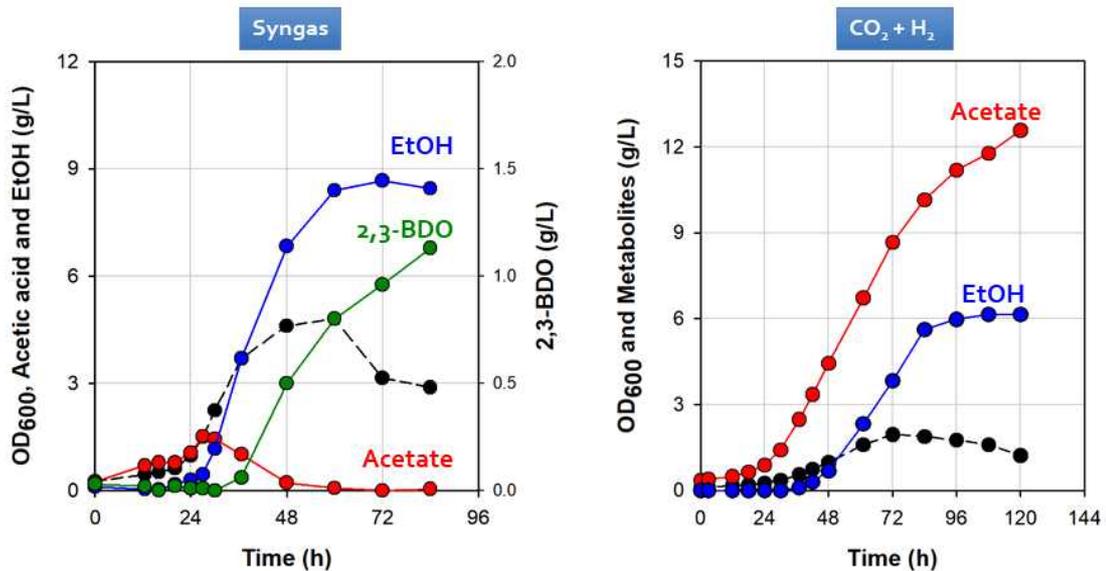


그림3-1-7. Yeast extract 증량(2 g/L) 조건에서 *Clostridium* sp. AWRP의 가스 전환 배양 결과. (좌) Syngas (우) CO₂ + H₂

- 초기 생장을 원활하게 하기 위해 2 g/L의 yeast extract를 첨가 후 배양한 결과, CO를 주 기질로 이용시 높은 균체량(OD₆₀₀ ~ 5)을 기록하여 성과 목표를 달성하였음(위 그림3-1-7)
- 동일 배지에서 CO₂ + H₂ 이용시에는 에탄올보다는 아세트산 생산이 우세한 것으로 확인되었으며, 균체량은 CO 이용시보다 다소 낮음을 확인. 이는 상대적으로 낮은 성장 속도 때문에 교반시 발생하는 shear stress의 영향이 크게 나타난 것으로 보여짐.
- 배양 조건 변화를 통해 산물 생산/가스 전환이 개선될 수 있음을 확인하였으며, 추후 통계적 방법을 통하여 체계적으로 배지 최적화를 실시할 예정임.

○ 모델 균주/분리 균주의 가스전환 효율 비교

- 당해 연도에서 우수 가스전환 미생물을 선별하기 위하여 분리균주 3주 및 모델 균주 1주를 대상으로 serum bottle 수준에서의 배양 평가를 실시하였음.
- 균주별 최적 성장 조건이 다르므로 근연종에 대한 문헌 조사를 통하여 성장 조건을 결정한 후 배양을 실시함. 기질 가스로는 20% CO₂ + 80% H₂의 혼합 가스를 이용하였음.

- 아세트산 생산성의 경우, 모델 균주인 *A. woodii* DSM 1030 균주가 가장 높은 것으로 나타났으며, 고온성 균주인 *Moorella* sp. CLWD1이 생산성 측면에서 가장 나쁜 것으로 확인됨(아래 표3-1-2 및 그림3-1-8).
- 그 외에 CLWD1 균주와 AWRP 균주는 아세트산 외에도 각각 2,3-부탄디올과 에탄올 생산능을 가지고 있음을 확인하였음.

표3-1-2. 모델 균주 및 분리균주의 성능 평가 결과(serum bottle 수준)

	<i>Moorella</i> sp. CLWD1	<i>Terrisporobacter</i> sp. HAWD5	<i>Clostridium</i> sp. AWRP	<i>Acetobacterium woodii</i> DSM 1030
Culture time (h)	508	112	213 (118)	88
Final OD600nm	0.48 ± 0.02	0.65 ± 0.05	N.D.	N.D.
Acetate (g/L)	3.58 ± 0.08	3.54 ± 0.09	3.36 ± 0.15	8.81 ± 0.09
Ethanol (g/L)	0	0	0.11 ± 0.04	0
2,3-Butanediol (g/L)	0.15 ± 0.01	0	0	0
Final pH	4.91	5.14	3.51	7.45
Culture volume	40 mL/160 mL	20 mL/160 mL	10 mL/160 mL	10 mL/160 mL
YE concentration	2 g/L	2 g/L	0.5 g/L	0.5 g/L

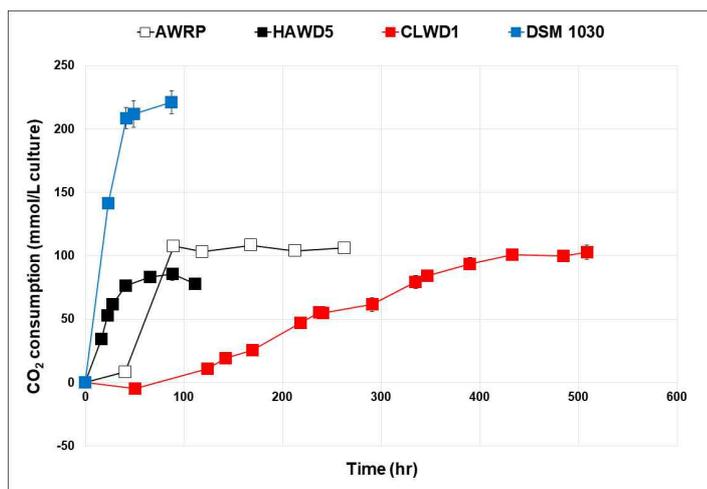


그림3-1-8. 비광합성 탄소고정 미생물 4주의 CO₂ 전환 프로파일

- *Terrisporobacter* 균주의 경우 아세트산 생산성은 *Clostridium* sp. AWRP보다 높게 나타났으나, 반응기에서 agitation을 실시하는 경우 shear stress로 인하여 생장이 저해된다는 보고가 있어 최종 반응기 성능평가에서는 제외하였음.
- 분리 균주인 *Clostridium* sp. AWRP와 모델 균주인 *A. woodii* DSM 1030에 대하여 반응기 평가를 진행하였음.

- 아세트산 생산으로 인한 배지의 산성화를 방지하기 위해 각 균주의 최적 성장 조건을 고려하여 AWRP 균주의 경우 pH를 5로 유지하였음. DSM 1030 균주는 pH를 7로 유지하였음.
- 두 균주 모두 CO₂/H₂ 혼합 가스를 0.05 vvm으로 microsparger를 통해 투입하였으며, 초기 교반은 500 RPM으로 실시하되, 지수 성장기에서 비생장률이 감소하는 시점에 900 RPM으로 증가시켜 가스 전달을 증가시켜 주었음.

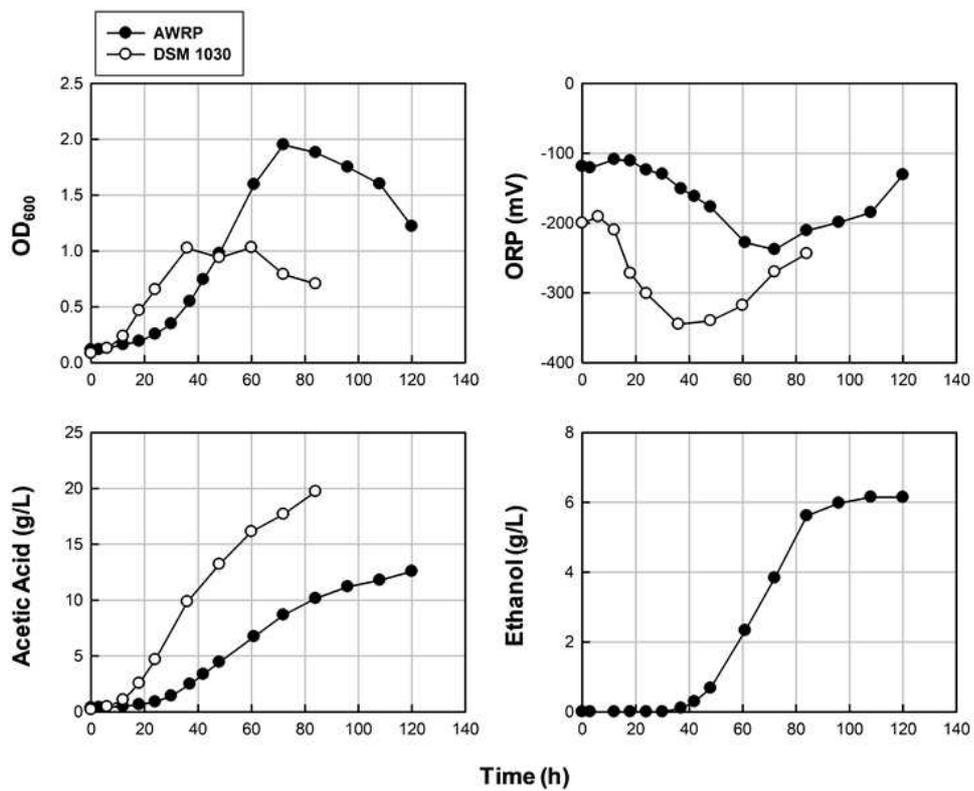


그림3-1-9. 가스전환 효율 평가를 위한 반응기(위) 및 균주 2주에 대한 이산화탄소 전환 효율 평가(아래)

- 반응기 배양 결과, AWRP 균주의 경우 아세트산 최종 생산 농도와 생산성이 각각 12 g/L, 2.4 g/L/day로 나타났으며, DSM 1030 균주의 경우 19 g/L, 5.4 g/L/day로 나타나 아세트산 생산성이 더 우수한 것으로 확인되었음.
- *Clostridium* sp. AWRP 균주의 경우 아세트산 외에도 에탄올이 6 g/L가 생산되었으며, 대사공학적 균주 개량/공정 개량을 통하여 이산화탄소의 에탄올 전환에 활용 가능할 것으로 보임.
- *Moorella* sp. CLWD1의 경우, 낮은 성장 속도로 인하여 교반시 성장하지 못 하였음.

4. 미세조류 생산성

가. 고염분수 활용 미세조류 배양 연구

- 고염분수 활용 미세조류 배양 연구 (*Tetraselmis* sp. Lab scale 20 mL)
 - 고염분수에서 적응 가능한 *Tetraselmis* sp. KCTC 12432BP 균주를 선택하여, 배양액에 따른 원료의 생체량 비교 연구를 진행함
 - 미세조류 배양 조건은 자연해수(NS), 용암해수(MS), 용암해수+NaCl(MS+NaCl), 고염분수(HSMS) 실험구에 f*1.5 배양액을 조성하여 배양연구를 진행함(그림 4-1-1)
 - 20 mL T-flask에 10 mL의 배양 배지, 50 μ l의 균주를 접종하여 14일 동안 배양 연구를 진행함
 - 실내온도는 27 $^{\circ}$ C 를 유지 하였고, 조도는 75 \pm 5 μ mol/m²/s 에서 12:12 / L:D 간격으로 조사함
 - 미세조류 배양은 14일 동안 진행하였으며, 2일 간격으로 100 μ l 씩 취하여 유세포분석기를 이용하여 세포 수를 측정함
 - 유세포분석기의 Fluorophore는 Chlorophyll a,b, Exciting Laser의 파장은 488 nm, Major Emission Wavelength는 640 nm 이상, C6 Detector (filter)는 FL3 (670LP)를 사용함(그림 4-1-2)



그림 4-1-1. *Tetraselmis* sp. 배양

- 배양 14일째, NS 실험구 7,165,500±328,900 cells/mL, MS 실험구, 6,813,500±372,300 cells/mL, MS+NaCl 실험구 4,283,200±233,400 cells/mL, HSMS 실험구 5,129,100±122,000 cells/mL 의 셀 수를 나타냄(그림 4-1-3)
- 동일한 고염 조건(65 psu) 실험구 가운데 HSMS에서 MS+NaCl 보다 높은 세포 수를 기록함

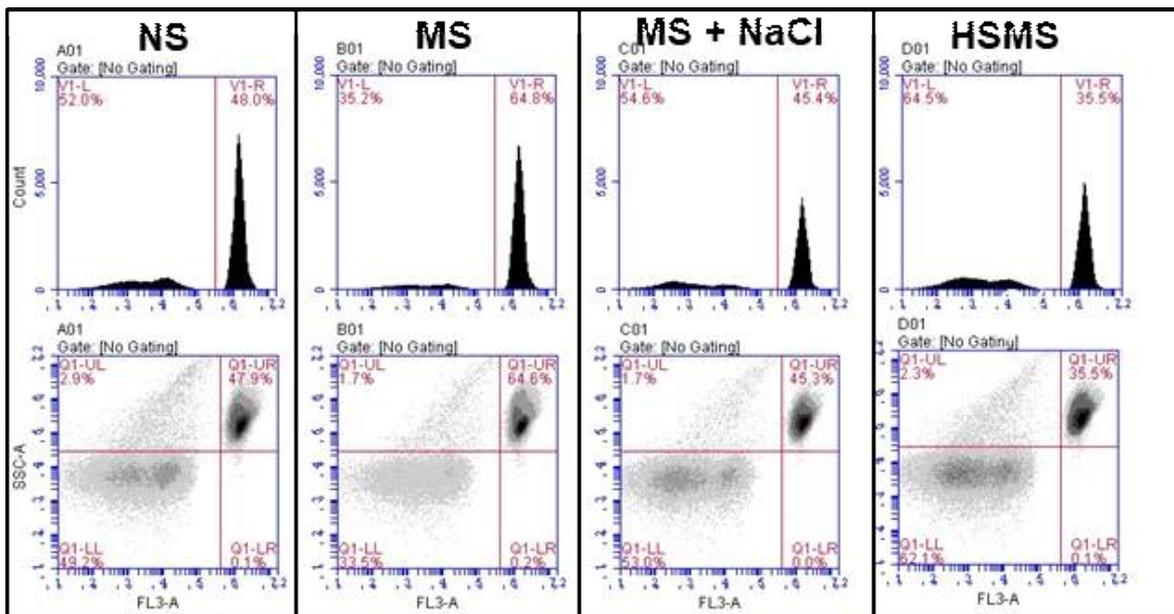


그림 4-1-2. *Tetraselmis* sp. 세포 양상(배양 14일)

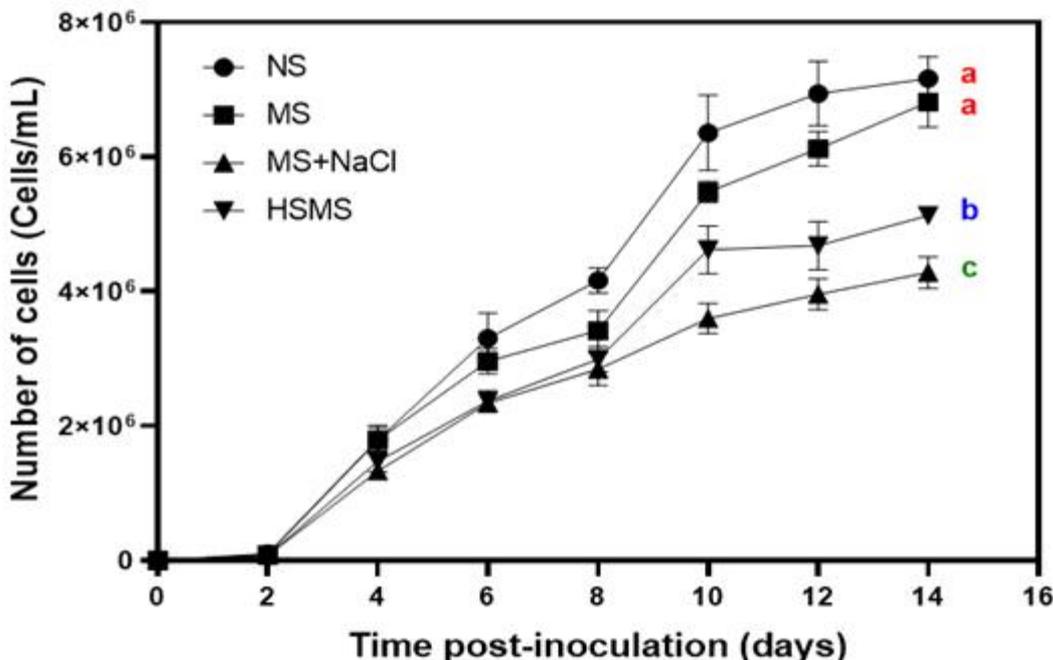


그림 4-1-3. *Tetraselmis* sp. 생체량 변화

- 그림 4-1-4와 같이 현미경을 이용하여 고염의 조건에서 셀 상태 및 오염 유무를 확인함
- 배양기간 동안 동물플랑크톤 및 침입 오염원은 관찰되지 않음(그림 4-1-4)

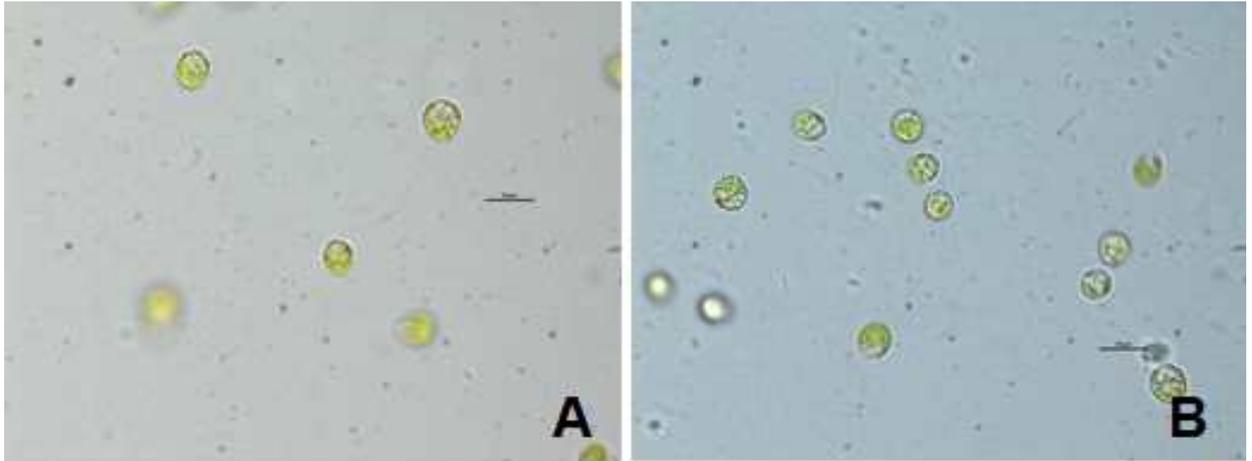


그림 4-1-4. *Tetraselmis* sp. 세포(A; HSMS 실험구, B; MS+NaCl 실험구)

○ 고염분수 활용 미세조류 배양 연구 (*Tetraselmis* sp. Lab scale 2L)

- 고염분수에서 적응 가능한 *Tetraselmis* sp. KCTC 12432BP 균주를 선택하여, 배양액에 따른 원료의 생체량 비교 연구를 진행함
- 미세조류 배양 조건은 자연해수(NS), 용암해수(MS), 용암해수+NaCl(MS+NaCl), 고염분수(HSMS) 실험구에 f*1.5 배양액을 조성하여 배양연구를 진행함(그림 4-1-5)



그림 4-1-5. *Tetraselmis* sp 배양

- 본 배양 연구는 회분식 배양 방법을 이용하여 2L 배지에 세포 5ml (0.0054g/L, DW) 접종하여 생체량 변화 양상을 관찰 함
- 조도는 LI-250A light meter(LI-COR, USA)를 이용하여 측정 하였으며, $160.9 \pm 0.5 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 을 유지함

- 배양기간 동안 실내 온도는 $29\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 를 유지하여 배양 연구를 진행함
- 바이오매스 측정은 배양액 20mL을 진공펌프를 이용하여 GF/C 여과지에 필터링 하여(3반복), 드라이오븐(60°C)에서 24시간동안 건조 시킨 후 무게를 측정하여 생체량 변화를 관찰함

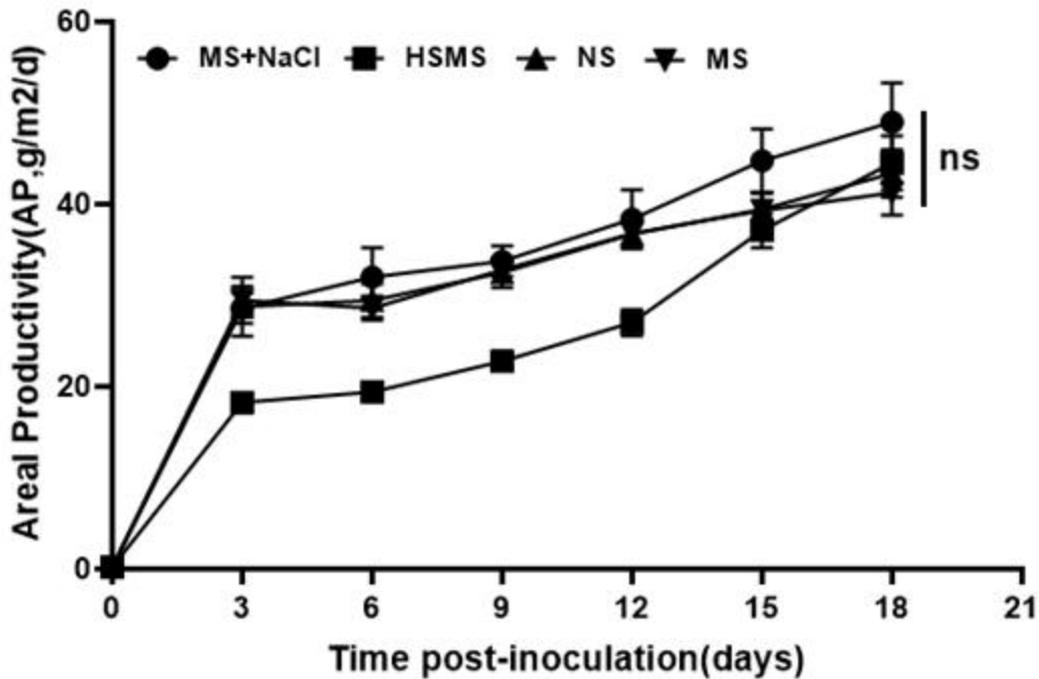


그림 4-1-6. 일일생산성 변화(*Tetraselmis* sp.)

- 그림 4-1-6과 같이 고염분수 배양액 적용 실험구(HSMS)에서 연구목표인 $40 \text{ g/m}^2/\text{d}$ 를 상회하여 일일 생산성 $44.5\pm 2.9 \text{ g/m}^2/\text{d}$ 달성(그림 4-1-6)

○ 고염분수 활용 미세조류 배양 연구 (*Tetraselmis* sp. Scale-up 250L)

- 고염분수에서 적응 가능한 *Tetraselmis* sp. KCTC 12432BP 균주를 선택하여, 배양액에 따른 원료 생체량의 비교 연구를 진행함
- 미세조류 배양 조건은 자연해수(NS), 용암해수(MS), 용암해수+NaCl(MS+NaCl), 고염분수(HSMS) 실험구에 f*1.5 배양액을 조성하여 배양연구를 진행함(그림 4-1-7)
- 그림 4-1-8과 같이 본 연구팀에서 자체 개발한 모듈화 Bioreactor를 이용하여 회분식 조건으로 배양 연구를 진행함

- 배양기간 동안 수질변화를 측정 하였으며, 수온 $29.2\pm 0.3^{\circ}\text{C}$, pH 8.7- pH 9.1 의 변화를 나타냄
- 바이오매스 측정은 배양액 20mL을 진공펌프를 이용하여 GF/C 여과지에 필터링 하여(3반복), 드라이오븐(60°C)에서 24시간동안 건조 시킨 후 무게를 측정하여 생체량 변화를 관찰함



그림 4-1-7. Bioreactor를 이용한 *Tetraselmis sp.* 배양

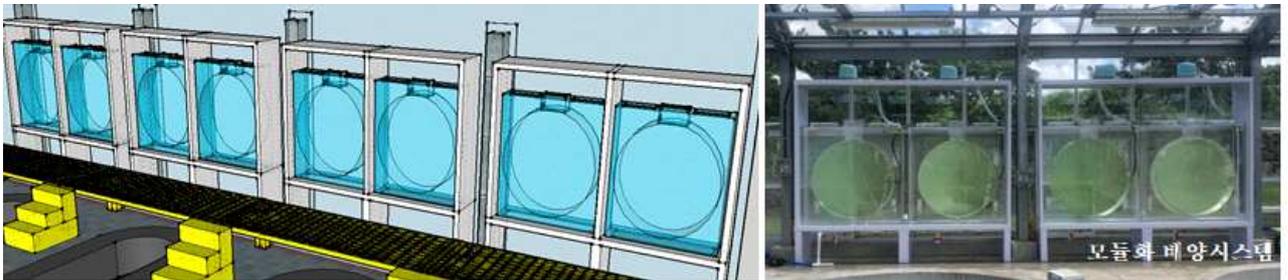


그림 4-1-8. 모듈화 Bioreactor

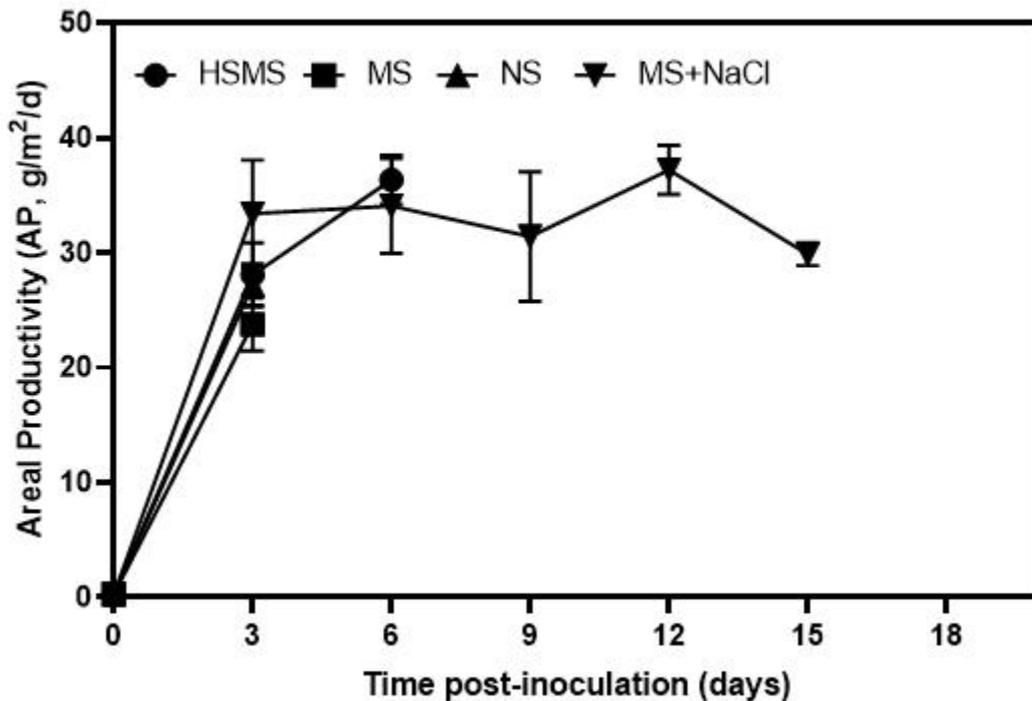


그림 4-1-9. 일일생산성 변화(*Tetraselmis sp.*)

- 그림 4-1-9와 같이 *Tetraselmis sp.* Scale-up 배양 연구는 배양초기 모든 실험구에서 유의한 생체량 증가 패턴을 보였으나, 배양 6일 이후 섬모충류 오염으로 인해 배양을 중단하고 원료 수확을 진행함
- 섬모충류 오염 방지를 위해 외부 유입 차단, 배양액 필터 및 멸균 진행 예정
- *Tetraselmis sp.* Scale-up 배양을 통해 *Tetraselmis sp.* 원료를 확보함
- HSMS 실험구: 18.2g, MS+NaCl 실험구: 16.1g, MS 실험구: 6.4g, NS 실험구: 3.8g
- 확보한 미세조류 원료는 기능성물질 탐색 연구를 위해 활용함

○ 고염분수 활용 미세조류 배양 연구 (*Dunaliella salina* Lab scale 10mL)

- 고염분수에서 적응 가능한 *Dunaliella salina* LIMS-PS-1511 균주를 선택하여, 배양액에 따른 원료 생체량의 비교 연구를 진행함



그림 4-1-10. *Dunaliella salina* 배양

- 미세조류 배양 조건은 자연해수(NS), 용암해수(MS), 용암해수+NaCl(MS+NaCl), 고염분수(HSMS) 실험구에 f*1.5 배양액을 조성하여 배양연구를 진행함(그림 4-1-10)
- 20 mL T-flask에 10 mL의 배양 배지, 50 μ L의 균주를 접종함
- 실내온도는 27°C 를 유지 하였고, 조도는 75 \pm 5 μ mol/m²/s, 12:12 / L:D 간격으로 조사
- 미세조류 배양은 14일 동안 진행되었으며, 2일 간격으로 100 μ L씩 취하여 유세포분석기를 이용하여 세포 수를 측정함
- 유세포분석기의 Fluorophore은 Chlorophyll a,b, Exciting Laser의 파장은 488 nm, Major Emission Wavelength는 640 nm 이상, C6 Detector (filter)는 FL3 (670LP)를 사용함(그림 4-1-11)

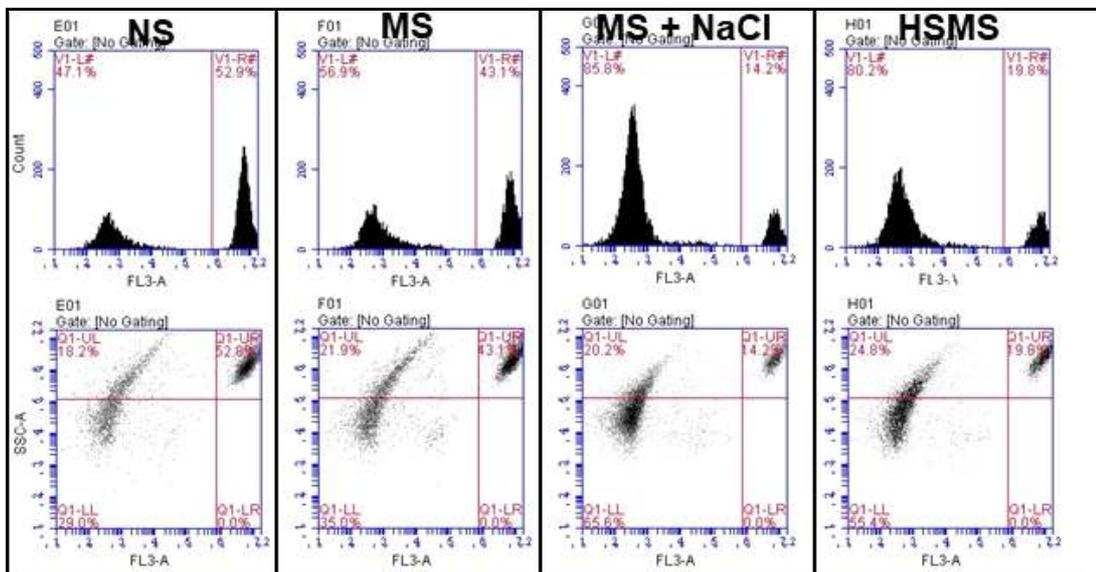


그림 4-1-11. *Dunaliella salina* 세포 양상(배양 14일)

- 그림 4-1-12와 같이 배양 14일후, 자연해수(NS)에서 $329,900 \pm 44,700$ cells/mL, 용암해수(MS)에서 $276,300 \pm 54,700$ cells/mL, 용암해수+NaCl (MS+NaCl)에서 $144,200 \pm 17,200$ cells/mL, 고염분수 (HSMS) 조건에서 $155,100 \pm 25,800$ cells/mL 셀 수를 나타냄
- 본 실험에서 *Dunaliella salina*의 바이오매스 증가 양상은 HSMS 실험구가 MS+NaCl 실험구 보다 높은 세포 수를 나타내는 것을 관찰함(그림 4-1-12)

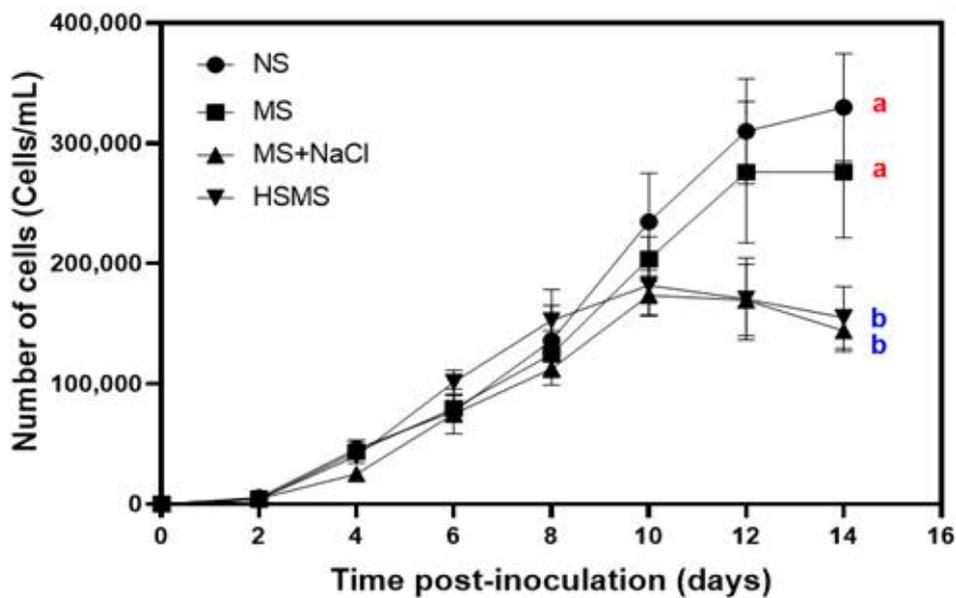


그림 4-1-12. *Dunaliella salina* 생체량 변화

- 그림 4-1-13과 같이 현미경을 이용하여 고염의 조건에서 셀 상태 및 오염 유무를 확인하였으며 배양기간 동안 동물플랑크톤 및 외부 오염원은 관찰되지 않음(그림 4-1-13)

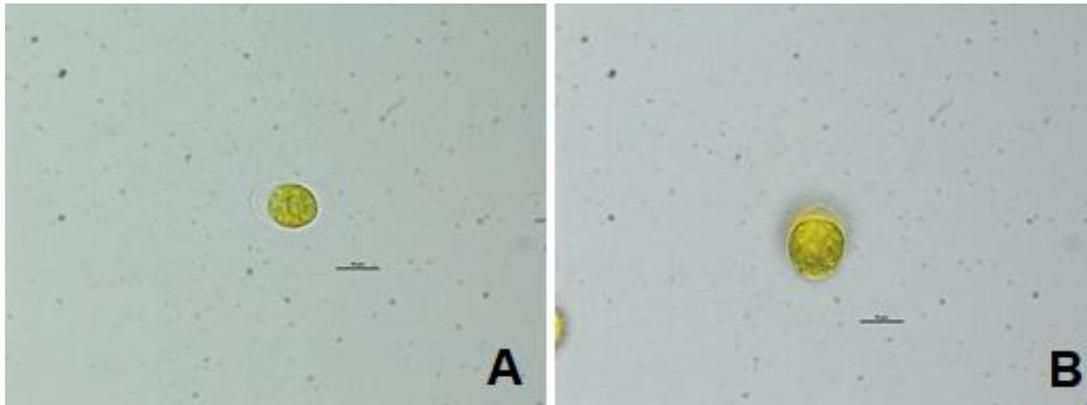


그림 4-1-13. *Dunaliella salina* 세포(A; HSMS 실험구, B; MS+NaCl 실험구)

○ 고염분수 활용 미세조류 배양 연구 (*Dunaliella salina* Lab scale 2L)

- 고염분수에서 적응 가능한 *Dunaliella salina* LIMS-PS-1511 균주를 선택하여, 배양액에 따른 원료 생체량의 비교 연구를 진행함
- 미세조류 배양 조건은 자연해수(NS), 용암해수(MS), 용암해수+NaCl(MS+NaCl), 고염분수(HSMS) 실험구에 f*1.5 배양액을 조성하여 배양연구를 진행함(그림 4-1-14)



그림 4-1-14. *Dunaliella salina* 배양

- 본 배양 연구는 회분식 배양 방법을 이용하여 2L 배지에 세포 5ml (0.0048g/L, DW) 접종하여 생체량 변화 양상을 관찰 함
- 조도는 LI-250A light meter(LI-COR, USA)를 이용하여 측정 하였으며, $160.9 \pm 0.5 \mu\text{mol/m}^2 \cdot \text{s}$ 을 유지하였으며 배양기간 동안 실내 온도는 $29 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 를 유지함
- 바이오매스 측정은 배양액 20mL을 진공펌프를 이용하여 GF/C 여과지에 필터링 하여(3반복), 드라이오븐(60°C)에서 24시간동안 건조 시킨 후 무게를 측정하여 생체량 변화를 관찰함

- 고염분수 배양액 적용 실험구(HSMS)에서 연구목표인 40 g/m²/d를 상회하는 일일 생산성 46.3±5.5 g/m²/d 달성(그림 4-1-15)

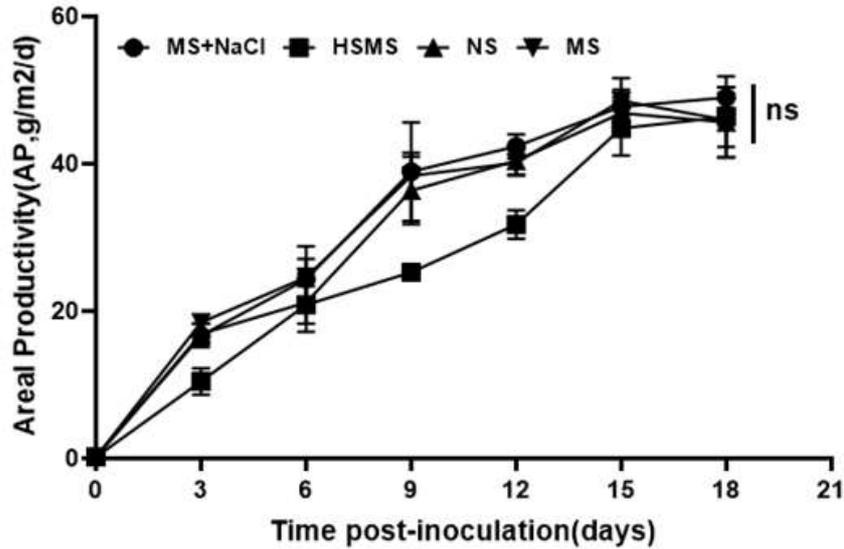


그림 4-1-15. 일일생산성 변화(*Dunaliella salina*)

○ 고염분수 활용 미세조류 배양 연구 (*Dunaliella salina* Scale-up 1 Ton)

- 고염분수에서 적응 가능한 *Dunaliella salina* LIMS-PS-1511 균주를 선택하여, 배양액에 따른 원료 생체량의 비교 연구를 진행함
- 미세조류 배양 조건은 용암해수(MS), 용암해수+NaCl(MS+NaCl), 고염분수(HSMS) 실험구에 f*1.5 배양액을 조성하여 배양연구를 진행함
- 본 연구팀에서 자체 개발한 Bioreactor를 이용하여 회분식 조건으로 배양 연구를 진행함(그림 4-1-16-A, B)

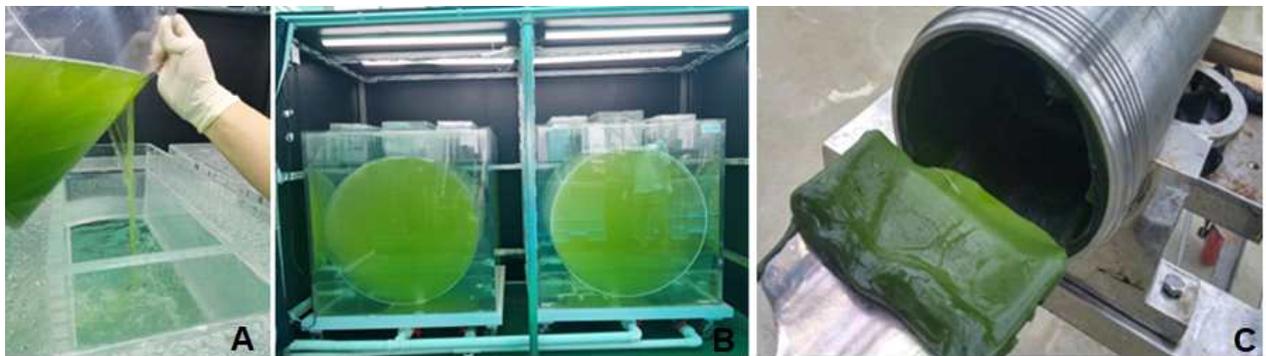


그림 4-1-16. 고염분수 활용 미세조류 배양 및 원료 수확(A; seed 접종, B; 배양, C; 원료수확)

- 배양기간 동안 수온은 $29.1 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$, pH 는 8.7-9.0을 나타냄
- 바이오매스 측정은 배양액 20mL을 진공펌프를 이용하여 GF/C 여과지에 필터링 하여(3반복), 드라이오븐(60°C)에서 24시간동안 건조 시킨 후 무게를 측정하여 생체량 변화를 관찰함
- 미세조류 Scale-up 배양을 통해 *Dunaliella salina* 원료를 확보함(그림 4-1-16-C)
- *Dunaliella salina* Scale-up 배양 연구는 배양 9일 이후 HSMS 실험구에서 섬모충류 오염이 관찰 되어 배양을 중단 하여 원료 수확을 진행함(그림 4-1-17, 4-1-18)



그림 4-1-17. 섬모충류 오염

- HSMS 실험구: 96.86g, MS+NaCl 실험구: 57.85g, MS 실험구: 51.49g
- 확보한 미세조류 원료는 기능성물질 탐색 연구를 위해 활용함

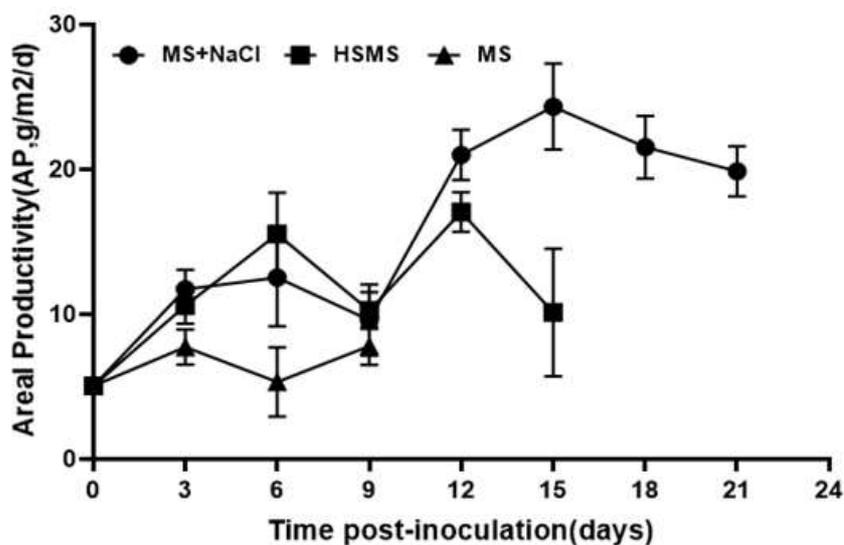


그림 4-1-18. 일일생산성 변화(*Dunaliella salina*)

○ 고염분수 활용 미세조류 배양 연구 (*Spirulina maxima*)

- *Spirulina maxima* 의 염분 농도별 생체량 변화 양상을 비교하기 위해 *Spirulina medium* 배양액 기반으로 고염분수(HSMS)를 공급하여 염분 농도별 세포 상태 및 생체량 변화를 확인함
- 2L 배양액 플라스크에 seed 5ml(0.0150g/L, DW) 접종하여 40일간 배양연구를 진행함
- 조도는 LI-250A light meter(LI-COR, USA)를 이용하여 측정 하였으며, 평균 $152.9 \pm 0.5 \mu \text{mol/m}^2/\text{s}$ 조도를 나타내었으며 실내 온도는 $29^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 를 유지하며 배양연구를 진행함
- 바이오매스 측정은 배양액 20mL을 진공펌프를 이용하여 GF/C 여과지에 필터링 하여(3반복), 드라이오븐(60°C)에서 24시간동안 건조 시킨 후 무게를 측정하여 생체량 변화를 관찰함

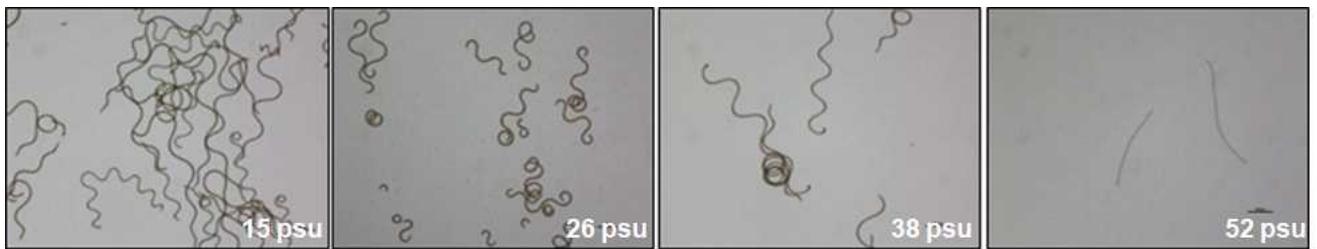


그림 4-1-19. 염분 농도별 현미경 관찰(*Spirulina maxima*)

- 고염조건(>52 psu)에서 *Spirulina maxima* 세포가 나선형에서 직선형으로 변화함 (그림 4-1-19)
- 염분 농도 증가 실험에서 24 psu까지는 생체량이 증가 하는 양상을 나타내었으나 30 psu 이후 부터는 생체량이 하락 하는 패턴을 나타냄(그림 4-1-20)
- 염분 농도에 따른 *Spirulina maxima*의 기능성 물질 변화를 탐색하기 위해 Scale-up 배양 연구 진행 예정

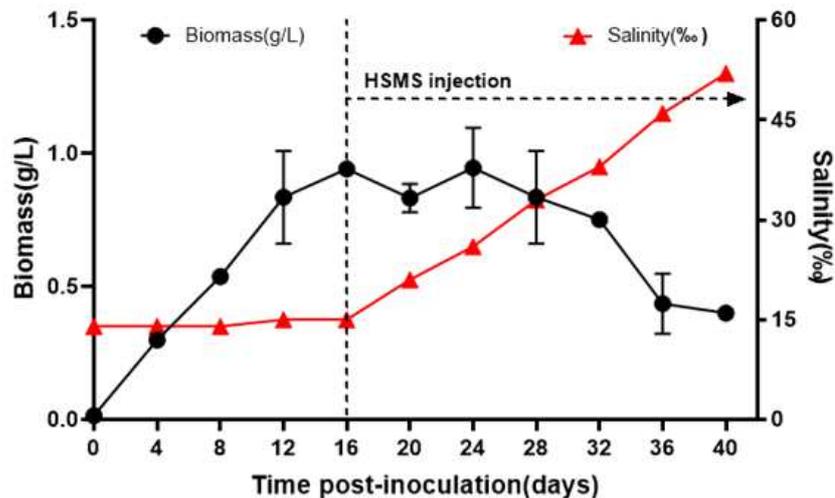


그림 4-1-20. 염분 변화별 *Spirulina maxima* 생체량 변화 양상

나. 미세조류-미생물 하이브리드 배양 컨셉 연구

○ 미세조류-미생물 하이브리드 배양 컨셉

- 미생물이 에탄올 발효시 생산되는 이산화탄소를 활용하여 이를 미세조류 배양시스템에 공급함으로써 미세조류의 배양 단가를 줄이고 생산성을 높임과 동시에 미세조류와 미생물을 둘 다 산업적으로 활용 가능하도록 디자인

○ 바이오에탄올을 생산하는 미생물 배양 방법 확립

- 바이오에탄올 생산을 최적화 하고 이산화탄소를 효율적으로 미세조류 배양조 내로 투입하고자 아래와 같이 초기 미생물(*Saccharomyces cerevisiae*) 배양 방식을 적용해 실험을 진행한 결과 이산화탄소 공급은 모든 실험구에서 용이하였으나 그림 4-2-1의 A의 경우 미생물의 소모없이 fed-batch가 용이하지 않았고 B의 경우는 대류현상에 의해 위 아래 층이 혼합되는 현상이 나타났음. 고밀도 미생물을 고정화 담체로 만든 C의 경우는 미생물 소모없이 fed-batch가 용이해 당화액의 교체가 원활하기 이루어졌고 실온 약 25°C에서 10%의 포도당 용액을 2일 안에 대부분 에탄올로 전환시키며 이산화탄소가 원활하게 발생됨.

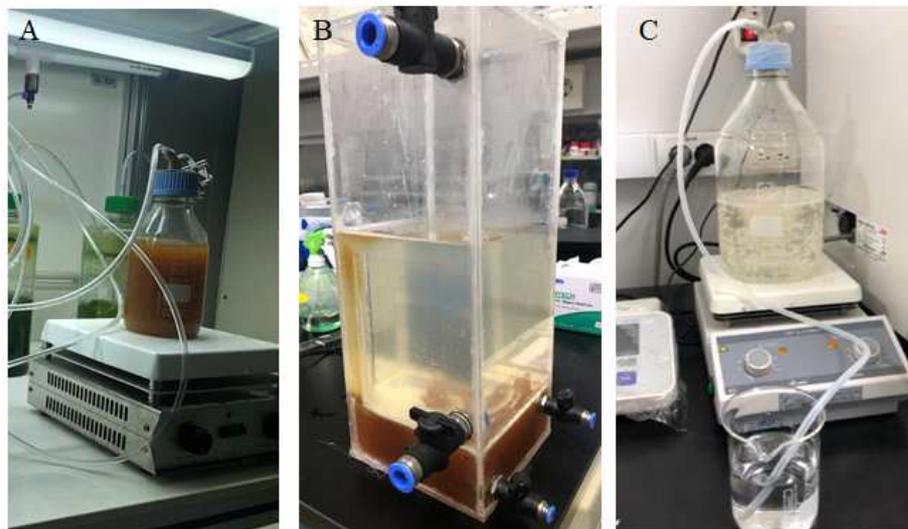


그림 4-2-1. 초기 바이오에탄올 생산 미생물 배양 컨셉

○ 고정화 미생물 담체 제작

- 이산화탄소 발생을 위한 에탄올 발효에 용이한 fed-batch 발효를 위하여 *Saccharomyces cerevisiae*를 대상으로 하여 calcium alginate 고정화 담체를 제작하였음. 5 mL의 *S. cerevisiae*를 2L의 potato dextrose broth (PDB)에 접종 후 25°C에서 48시간 동안 진탕 배양 하고, 이를 3500 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리하여 상등액을 제거함. 60 g의 효모 pellet을 1% glucose, 1% yeast extract, 0.5% peptone, 0.5% malt extract가 첨가된 용액 300 mL에 재부유 시킴. 이를 300 mL의 3% alginate 용액과 1:1 비율로 잘 섞어준 후 이를 정량 펌프를 이용하여 0.05 M의 calcium chloride 용액에 떨어뜨려서 calcium alginate bead를 제작하였다. 제작된 calcium alginate bead는 4°C의 0.05 M calcium chloride 용액에서 24시간 동안 안정화를 거치고 실험에 사용.



그림 4-2-2. 효모 고정화 담체 (Yeast Calcium alginate bead) 제작 과정

○ 미세조류 배양시스템 제작 및 배양

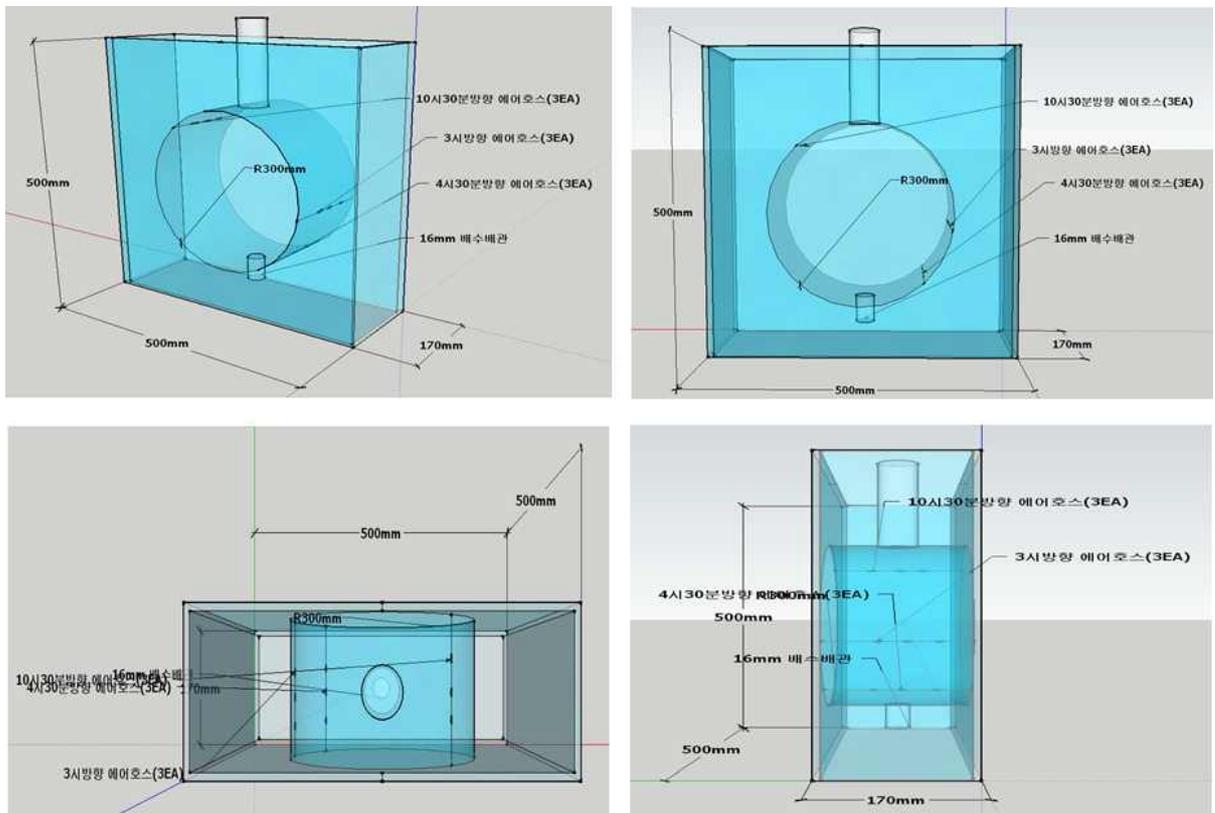


그림 4-2-3. 자체제작한 미세조류 배양기 도면

- 자체 개발된 10 L의 미세조류 배양조를 활용하여 *Dunaliella salina*의 배양에 사용. 총 4개의 바이오리액터를 활용하여 실험을 진행하였으며, 2개의 배양기에 10 L의 BG11배지를 첨가하였고, 나머지 2개의 배양기에 10 L의 F2 배지를 각각 채워주었음. 효모의 이산화탄소가 공급될 배지에는 탄소원을 제거하고 효모 배양조의 gas line을 산소가 주입되는 반대 방향으로 연결시켰음.

- *Dunaliella salina* seed를 각각의 미세조류 배양조에 접종하고 25°C에서 배양 하였으며, LED lamp를 이용하여 충분한 빛을 공급.

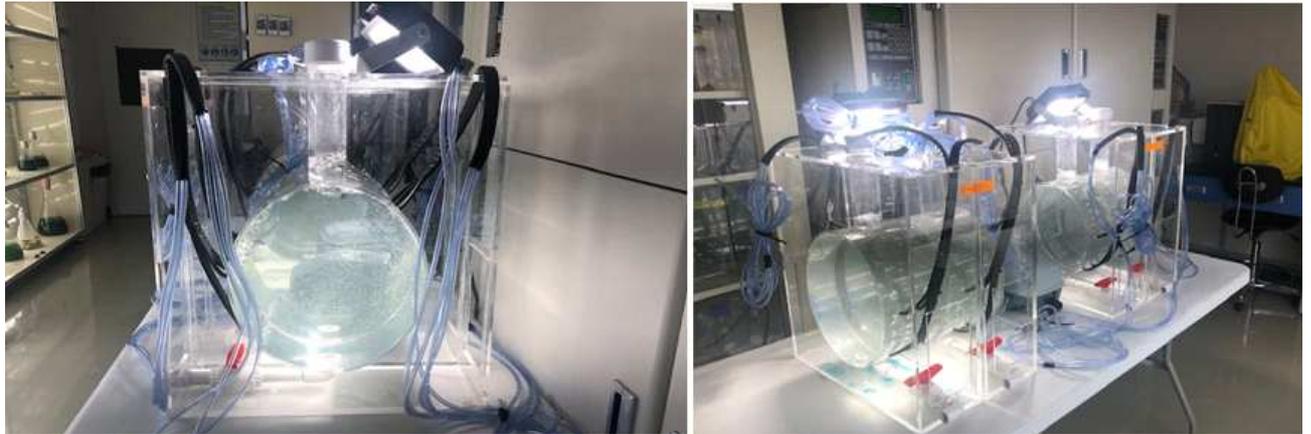


그림 4-2-4. 미세조류 배양 수조 및 배양 사진

○ 미세조류-미생물 하이브리드 배양 및 성장률 분석

- 멸균된 10%의 glucose 용액에 자체 제작된 calcium alginate 고정화 담체 200 g을 첨가하고, 25°C, 20 rpm으로 발효. 배지별로 1개의 배양기에 자체 제작한 고정화 효모 비드를 활용한 발효 조로부터 생성되는 이산화탄소를 공급.



그림 4-2-5. 미세조류-미생물 하이브리드 배양

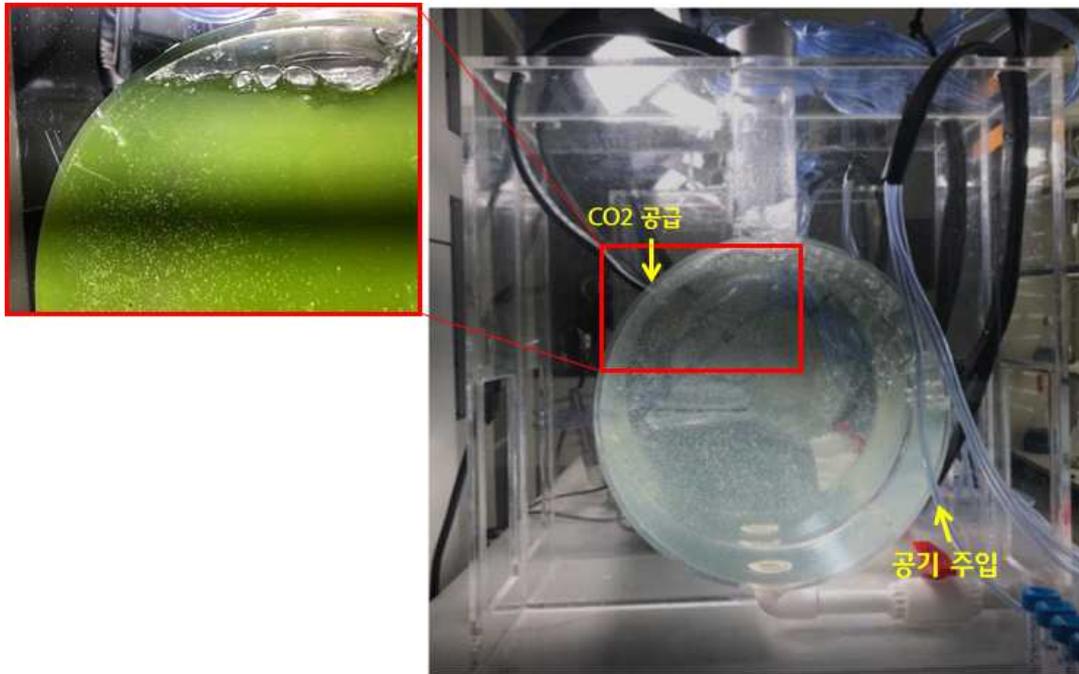


그림 4-2-6. 미생물 발효에 의한 이산화 탄소 공급 및 산소 주입

- 초기 0.0046 g/L의 *Dunaliella*를 접종하고 10일간 biomass를 측정. 배양 후 6일째부터 아래 그림 5-2-6과 같이 각 실험군간의 색이 눈에 띄는 차이를 보임.
- BG11배지와 F2 배지에서 모두 발효를 통한 이산화탄소를 공급해 준 실험군이 그렇지 않은 실험군에 비하여 눈에 띄게 진한 녹색을 나타냄.

배양 6일차

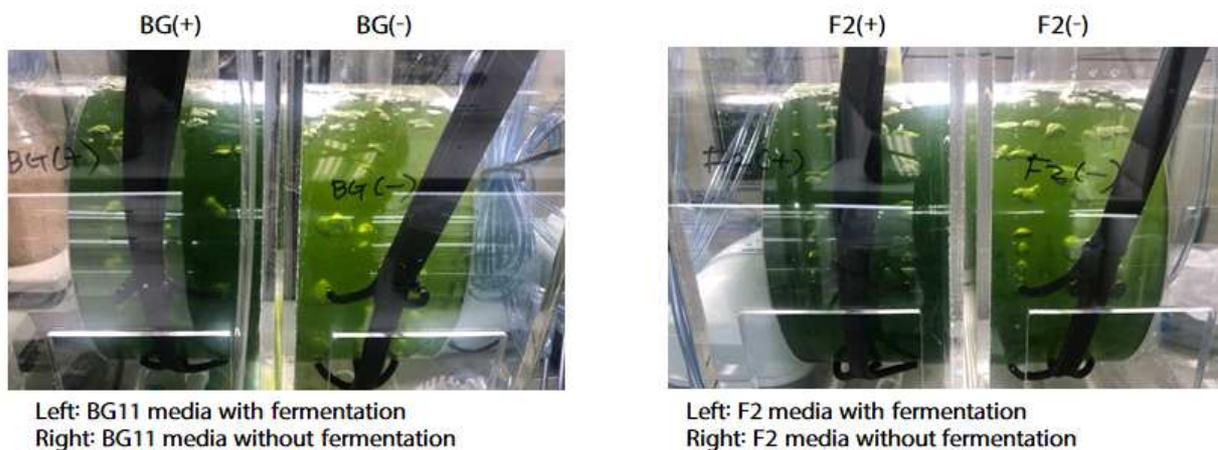


그림 4-2-7. 미세조류 배양액 내로 미생물 이산화탄소 주입 유무에 따른 배양 6일차 성장 사진

- 발효를 통하여 carbon dioxide를 공급한 실험군이 carbon dioxide를 공급해 주지 않은 실험군에 비하여 눈에 띄게 바이오매스가 증가하는 결과를 나타냄.

- 배양 9일차에 가장 높은 biomass를 나타내었으며, BG11 배지에서 배양하면서 이산화탄소를 공급해준 실험군에서 0.54 g/L로 나타났으며, 이산화탄소를 공급하지 않고 BG11 배지에서 배양한 실험군의 biomass는 7일차에 0.32 g/L로 나타남.
- F2 배지에 발효를 통한 이산화탄소를 공급해준 실험군에서는 배양 9일차에 0.38 g/L의 바이오매스를 나타내었으며, 이산화탄소를 공급하지 않은 F2 배지에서는 배양 7일차에 0.17 g/L로 매우 낮은 바이오매스를 나타냄.

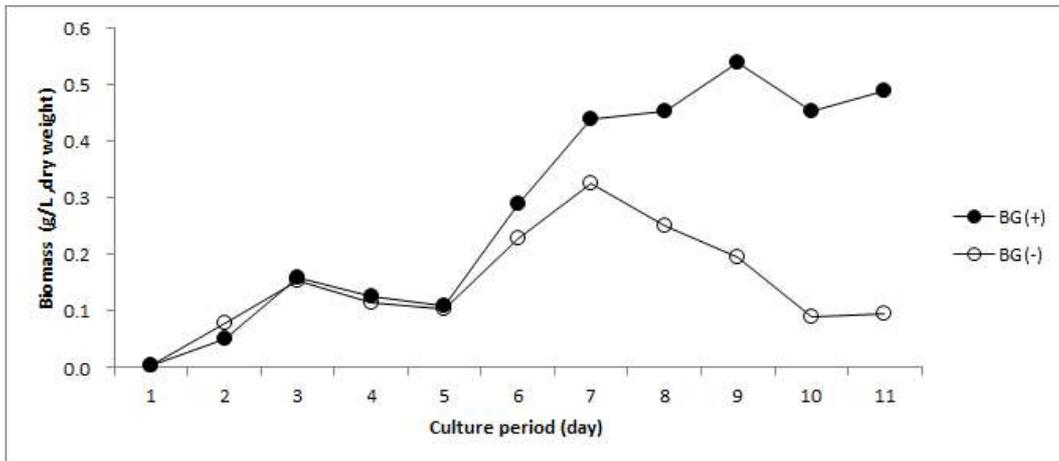


그림 4-2-8. *Dunaniella* 성장곡선. BG: BG11배지에 배양한 *Dunaniella* (+): 발효를 통한 CO₂ 공급 실험군, (-): 발효를 통한 CO₂ 공급 없는 실험군

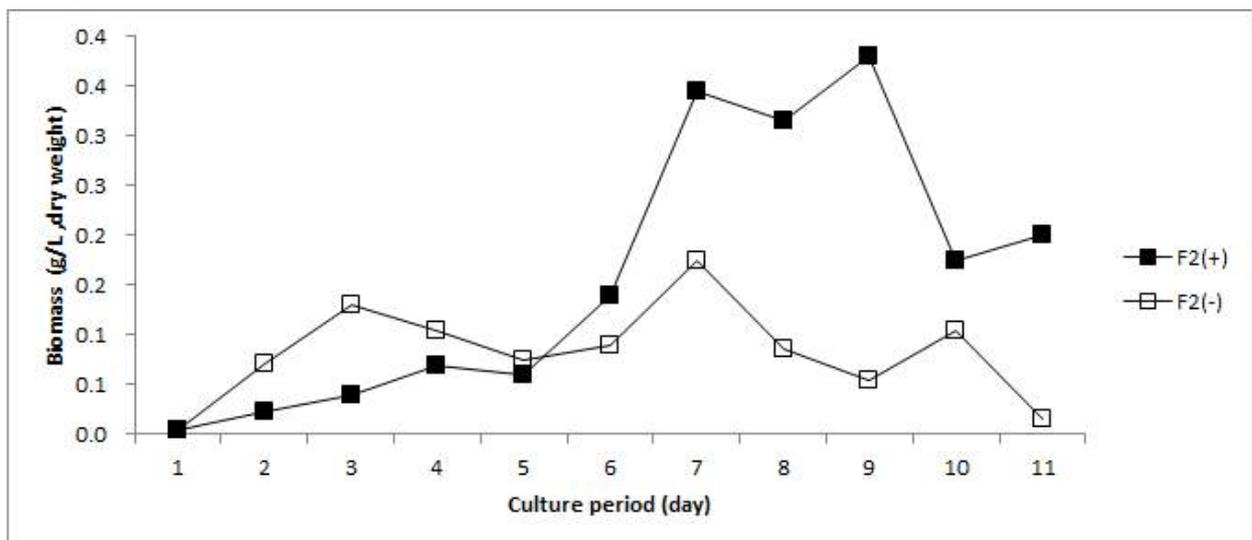


그림 4-2-9. *Dunaniella* 성장곡선. F2: F2배지에서 배양한 *Dunaniella*, (+): 발효를 통한 CO₂ 공급 실험군, (-): 발효를 통한 CO₂ 공급 없는 실험군

다. 고염분수 배양 미세조류의 기능성 추출물

○ 배양조건에 따른 *Tetraselmis sp.*의 추출물 제조 및 일반성분 분석

- *Tetraselmis sp.*를 일반해수(NS), 용암해수(MS), 용암해수+NaCl(MS-NaCl), 고염분수(HSMS)에 배양하여 기능성을 비교분석함.
- *Tetraselmis sp.*의 4개의 건조물을 열수추출(Hot water), 70%주정추출(70%EtOH)법을 활용하여 추출물을 제조함.

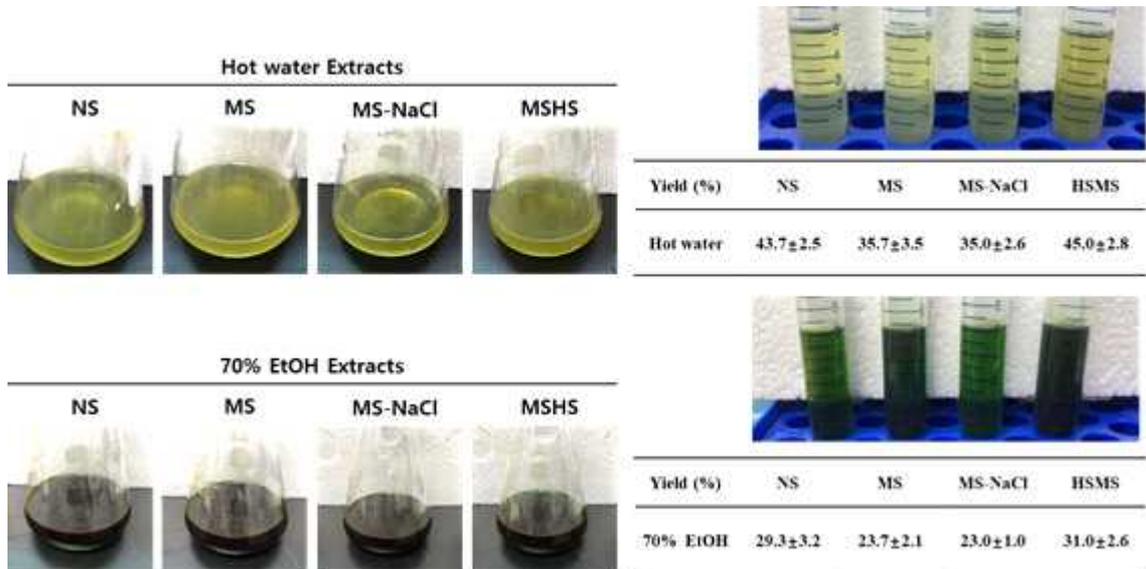


그림 4-3-1. 배양조건에 따른 *Tetraselmis sp.*의 열수/주정 추출물 및 수율

- 열수추출을 활용하였을 때 NS 43.7%, MS 35.7%, MS-NaCl 35.0%, HSMS 45.0%로 고염분수(HSMS)에 배양한 *Tetraselmis sp.*의 수율이 가장 높게 나타남.
- 70%주정추출을 활용하였을 때 NS 29.3%, MS 23.7%, MS-NaCl 23.0%, HSMS 31.0%로 고염분수(HSMS) *Tetraselmis sp.*의 수율이 가장 높게 나타남.
- 열수 추출을 하였을 때 수율이 35~45%로 높게 나타났으며, HSMS에서 배양한 *Tetraselmis sp.*의 수율이 열수, 70%주정 추출물에서 높은 수율을 나타내는 것을 확인할 수 있었음.
- HSMS에서 배양한 *Tetraselmis sp.*의 일반성분을 측정한 결과 단백질이 39.6%로 가장 많은 함량을 나타내었으며, 회분 22.8%, 지질 18.6%, 탄수화물 12.9%, 수분 6.1%의 함량을 나타내는 것을 확인할 수 있었음.

표 4-3-1. HSMS에 배양한 *Tetraselmis sp.*의 일반성분

(단위: %)				
Carbohydrate	Protein	Lipid	Ash	Moisture
12.93 ± 0.00	39.63 ± 0.26	18.56 ± 0.60	22.76 ± 0.21	6.12 ± 0.77

○ 배양조건에 따른 *Tetraselmis* sp.의 항산화 활성 탐색

- NS, MS, MS-NaCl, HSMS에 배양한 *Tetraselmis* sp.추출물의 정상세포(Vero cells)에서 세포 독성 및 Hydrogen peroxide 또는 AAPH로 유도한 산화적 스트레스 보호 효과를 MTT assay를 통해 측정하였음.

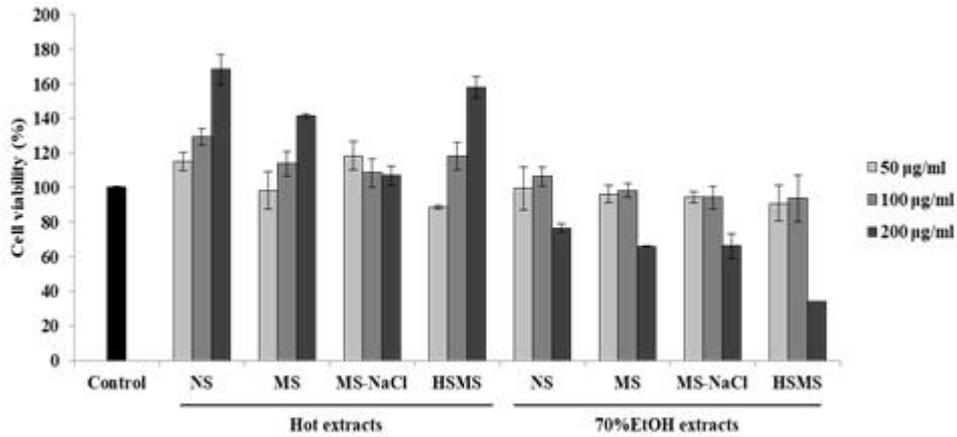


그림 4-3-2. 정상세포에서 추출물의 세포독성 평가

- 독성측정 결과 일부 고농도에서 독성이 확인되었으나, 그 이하에서는 독성이 확인되지 않았음.

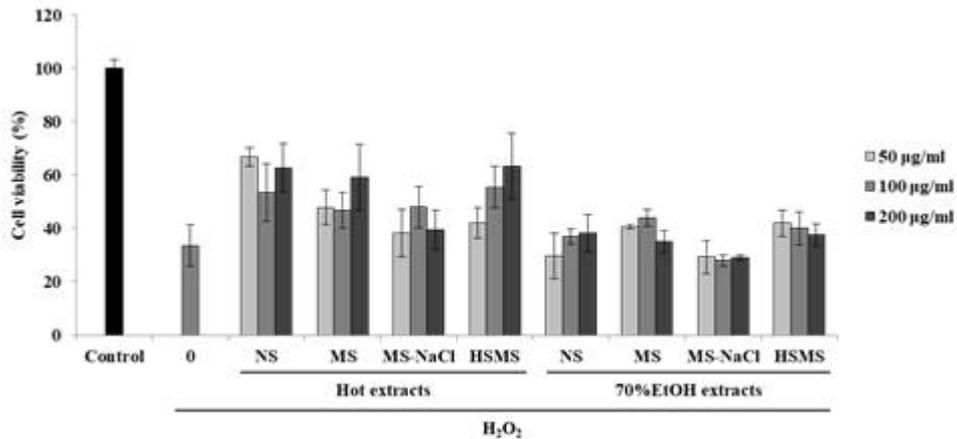


그림 4-3-3. 정상세포에서 Hydrogen peroxide로 유도된 산화적 스트레스에 대한 세포 생존율

- Hydrogen peroxide로 산화적 스트레스를 유도하였을 때 세포 생존율이 감소하였으나 추출물과 함께 처리 하였을 때 세포 생존율이 증가하는 것을 확인할 수 있었음. 특히 열수 추출물에서 세포 생존율이 증가하여 산화적 스트레스에 대한 보호 효능을 확인되었으며, HSMS에서 배양한 *Tetraselmis* sp. 열수 추출물에서 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가하여 우수한 항산화 효능을 확인하였음.

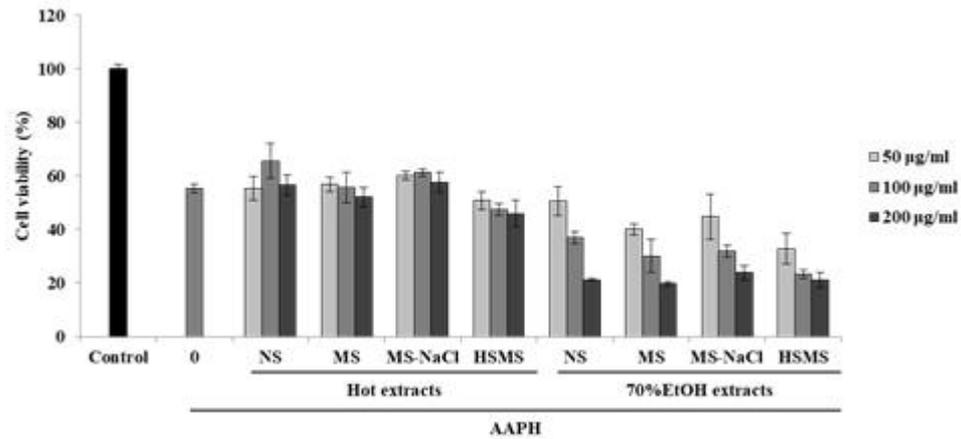


그림 4-3-4. 정상세포에서 AAPH로 유도된 산화적 스트레스에 대한 세포 생존율

- AAPH로 산화적 스트레스를 유도하였을 때 세포 생존율이 감소하였으나 열수 추출물과 함께 처리 하였을 때 세포 생존율이 미미하게 증가하는 것을 확인 할 수 있었음. 70% 주정추출물에서도 세포 생존율이 감소하여 세포보호 효능이 없는 것을 확인하였음.
- 배양조건에 따른 항산화 활성 측정 결과 HSMS에서 배양한 *Tetraselmis* sp. 열수 추출물에서 우수한 항산화 효능을 확인하였음.

○ 배양조건에 따른 *Tetraselmis* sp.의 항장 활성 탐색

- NS, MS, MS-NaCl, HSMS에 배양한 *Tetraselmis* sp.추출물의 Tyrosinase 억제 활성을 통해 미백 활성을 측정하였음.

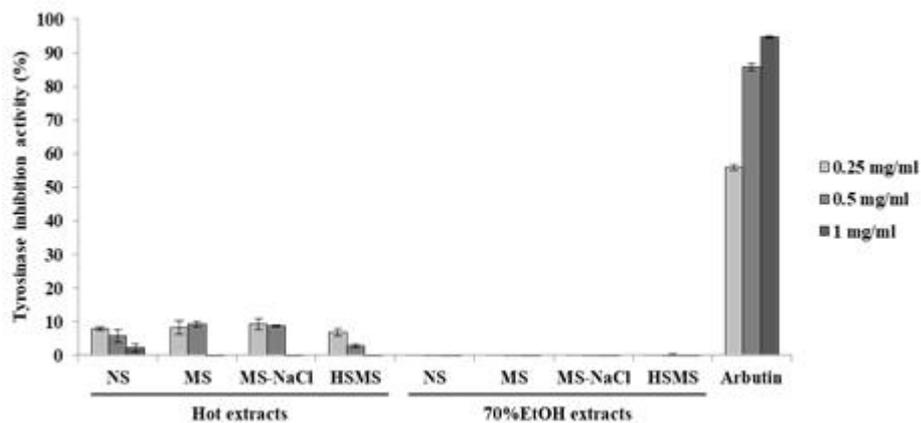


그림 4-3-5. Tyrosinase 억제 활성

- 열수 추출물에서 10%미만의 억제 활성이 측정되었으나 70% 주정추출물에서는 확인할 수 없었음. 대조군과 비교하였을 때 *Tetraselmis* sp.추출물에서는 미백 활성이 확인되지 않았음.

- NS, MS, MS-NaCl, HSMS에 배양한 *Tetraselmis sp.*추출물의 Elastase 억제 활성을 통해 항주름 활성을 측정하였음.

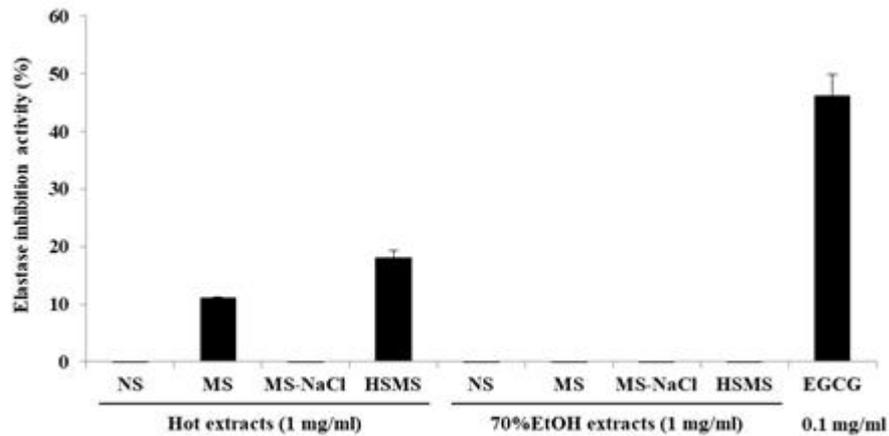


그림 4-3-6. Elastase 억제 활성

- 열수 추출물에서 특이적으로 MS에서 약 10%, HSMS에서 약 20% 억제 활성이 측정되었으며, 70% 주정추출물에서는 억제 활성이 확인되지 않았음. 대조군과 비교하였을 때 *Tetraselmis sp.*추출물에서는 항주름 활성이 확인되지 않았음.
- NS, MS, MS-NaCl, HSMS에 배양한 *Tetraselmis sp.*추출물의 Hyaluronidase 억제 활성을 통해 보습 활성을 측정하였음.

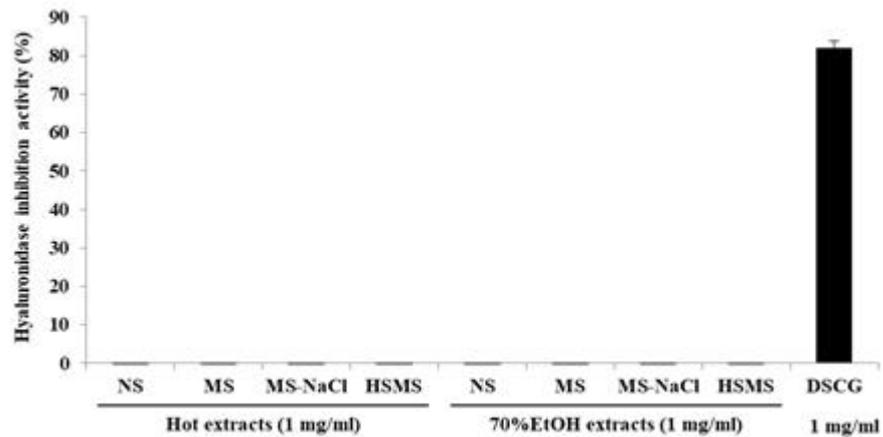


그림 4-3-7. Hyaluronidase 억제 활성

- 대조군과 비교하였을 때 *Tetraselmis sp.*추출물에서는 보습 활성이 확인되지 않았음.
- 배양조건에 따른 항장 활성 측정 결과 *Tetraselmis sp.*추출물에서는 항장 활성이 확인되지 않았음.

○ 배양조건에 따른 *Tetraselmis* sp.의 간보호 활성 탐색

- NS, MS, MS-NaCl, HSMS에 배양한 *Tetraselmis* sp.추출물의 HepG2세포에서 세포독성 평가 및 Hydrogen peroxide로 유도한 산화적 스트레스 보호효과를 MTT assay를 통해 측정하였으며, FFA로 유도한 지방생성량을 Oil-red-O 염색을 통해 측정하였음.

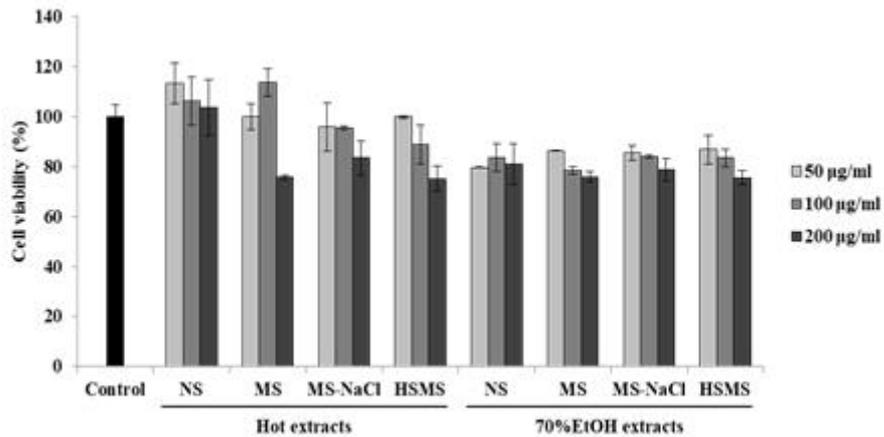


그림 4-3-8. 간세포에서 추출물의 세포독성 평가

- 독성을 측정한 결과 100 µg/ml이하에서는 독성이 확인되지 않았으며, 고농도에서 미미한 80% 이하의 세포생존율을 보여 100 µg/ml이하의 농도에서 활성을 측정하였음.

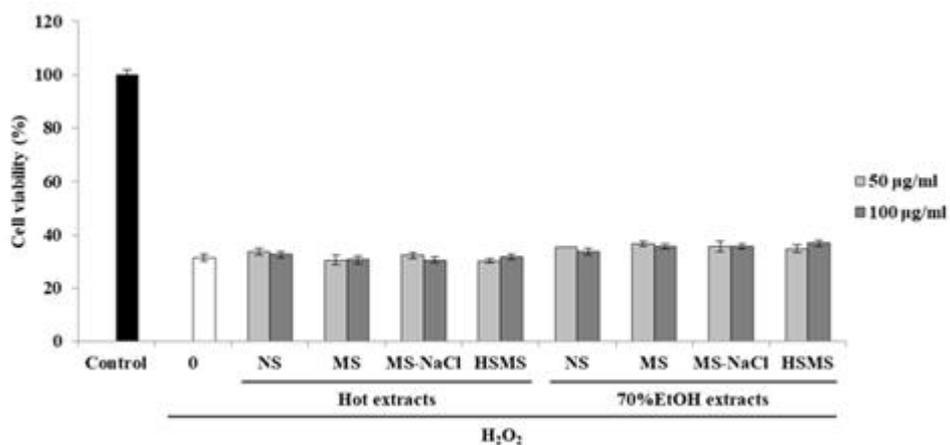


그림 4-3-9. 간세포에서 Hydrogen peroxide로 유도된 산화적 스트레스에 대한 세포 생존율

- Hydrogen peroxide로 산화적 스트레스를 유도하였을 때 세포 생존율이 감소하였으며, 추출물과 함께 처리 하였을 때 세포 생존율이 증가하는 경향을 확인할 수 없어 간세포에서 항산화 활성은 확인되지 않았음.

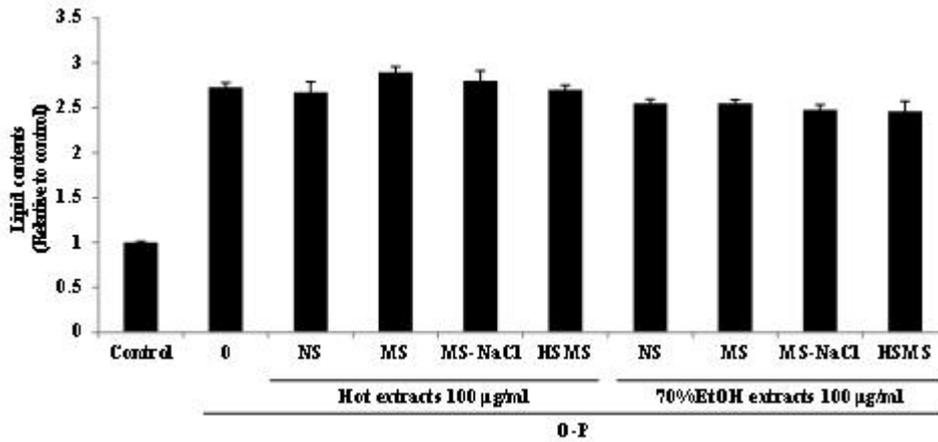


그림 4-3-10. 간세포에서 FFA로 유도된 지방간 수준

- FFA로 간세포에서 지방을 유도하였을 때 간지방이 증가하였으며, 추출물과 함께 처리 하였을 때 간지방 감소경향이 확인되지 않아 간지방 억제 활성은 확인되지 않았음.
- 배양조건에 따른 간보호 활성 측정 결과 *Tetraselmis* sp.추출물에서는 간보호 활성이 확인되지 않았음.

○ 배양조건에 따른 *Tetraselmis* sp.의 해당노 활성 탐색

- NS, MS, MS-NaCl, HSMS에 배양한 *Tetraselmis* sp.추출물의 α -glucosidase 억제활성을 통해 해당노 활성을 측정하였음.

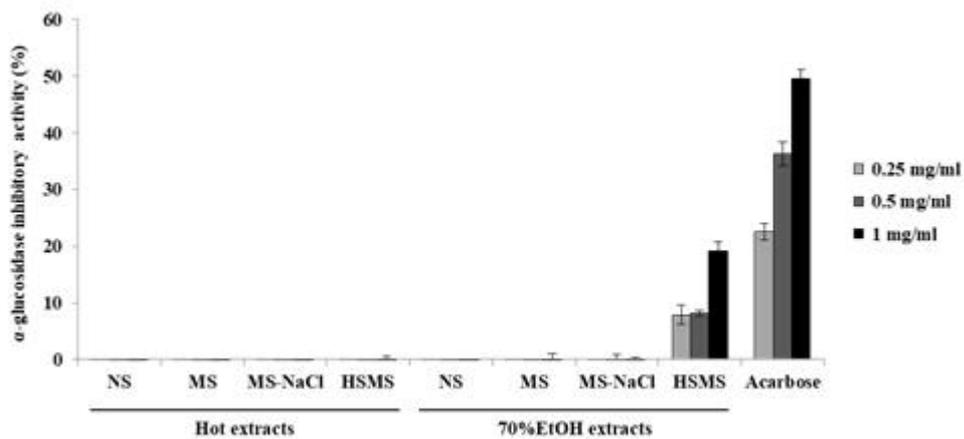


그림4-3-11. α -glucosidase 억제 활성

- HSMS에서 배양한 *Tetraselmis* sp. 70% 주정추출물에서 특이적으로 α -glucosidase 억제활성을 확인할 수 있었으며, 대조군으로 사용한 Acarbose의 저농도와 비슷한 활성을 확인하였음.

○ 배양조건에 따른 *Tetraselmis* sp.의 항암(유방암, 대장암, 폐암) 활성 탐색

- NS, MS, MS-NaCl, HSMS에 배양한 *Tetraselmis* sp.추출물의 유방암(SKBR3, HCC1419, HCC38 cells), 대장암(CT26 cells), 폐암(A549, H1299 cells) 세포에서 독성을 MTT assay를 통해 항암 활성을 측정하였음.

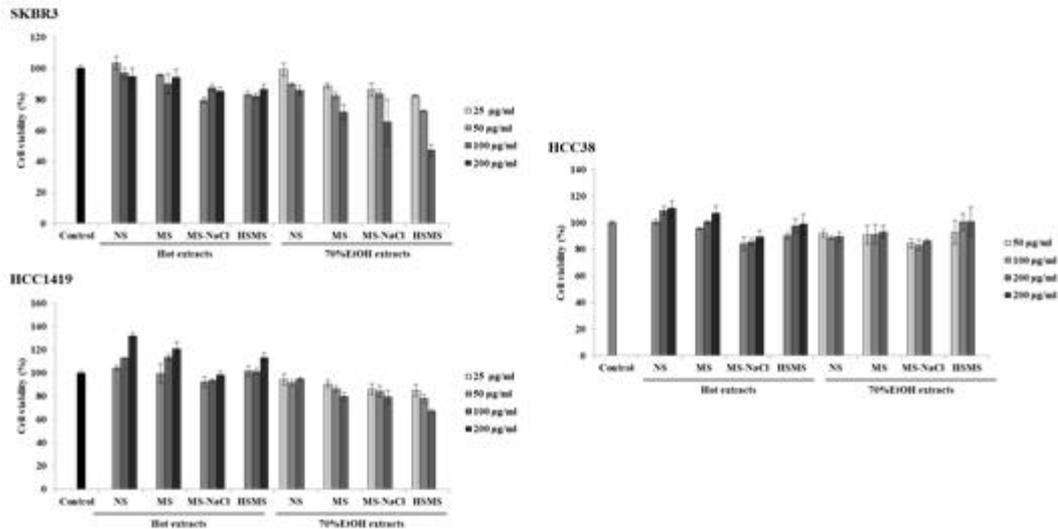


그림 4-3-12. 유방암세포에서의 세포 독성

- 정상세포에서 독성이 없는 농도에서 실험을 진행하였음. HSMS에서 배양한 *Tetraselmis* sp. 70% 주정추출물에서 SKBR3, HCC1419세포에 독성을 보이는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 SKBR3 세포에서 항암활성을 확인할 수 있었음.

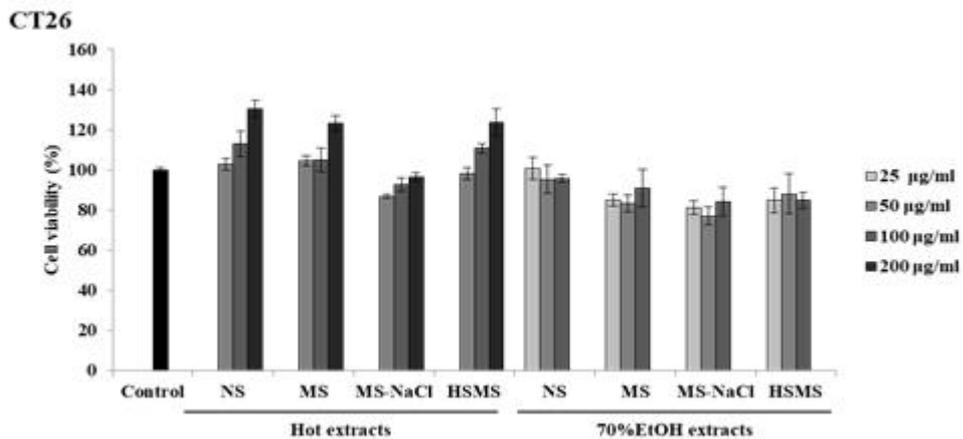


그림 4-3-13. 대장암세포에서의 세포 독성

- 정상세포에서 독성이 없는 농도에서 실험을 진행하였음. CT26세포에서 추출물의 세포 독성을 확인한 결과 대장암 억제 활성은 확인되지 않았음.

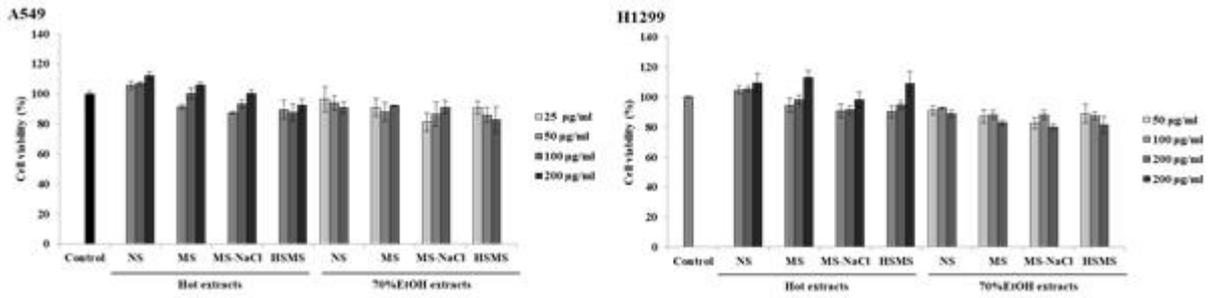


그림 4-3-14. 폐암세포에서의 세포 독성

- 정상세포에서 독성이 없는 농도에서 실험을 진행하였음. A549, H1229세포에서 추출물의 세포 독성을 확인한 결과 폐암 억제 활성은 확인되지 않았음.
- 배양조건에 따른 항암 활성 측정 결과 HSMS에서 배양한 *Tetraselmis* sp. 70% 주정추출물에서 지방암 억제 활성을 확인할 수 있었음.

○ 배양조건에 따른 *Tetraselmis* sp.의 항염증 활성 탐색

- HSMS에 배양한 *Tetraselmis* sp.추출물을 대식세포 (RAW264.7 cells)에 처리하고 LPS로 염증을 유도하여 NO 생성량을 Griess assay를 통해, 세포생존율을 MTT assay를 통해 항염증 활성을 측정하였음.

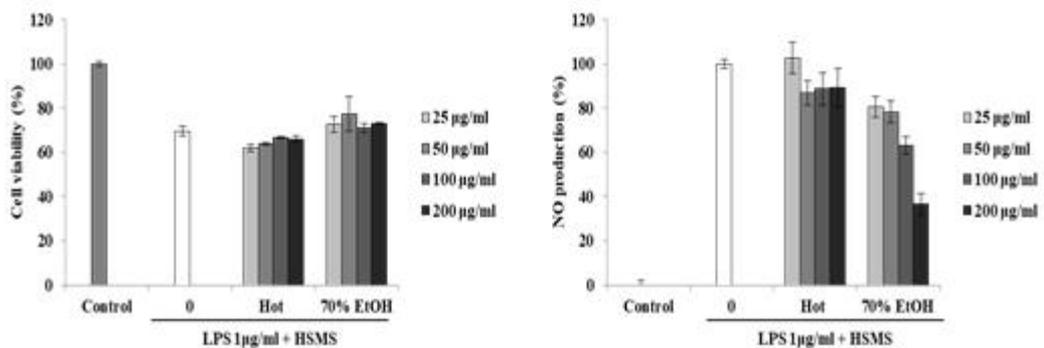


그림 4-3-15. 대식세포에서의 세포 생존율 및 NO 생성량

- 열수, 70%주정 추출물에서 독성이 확인되지 않았으며, 70% 주정추출물에서 우수한 NO 소거 능력이 확인되어 항염증 활성을 확인할 수 있었음.
- 70% 주정추출물의 염증성 cytokines의 생성량을 ELISA assay를 통해 측정하였음.

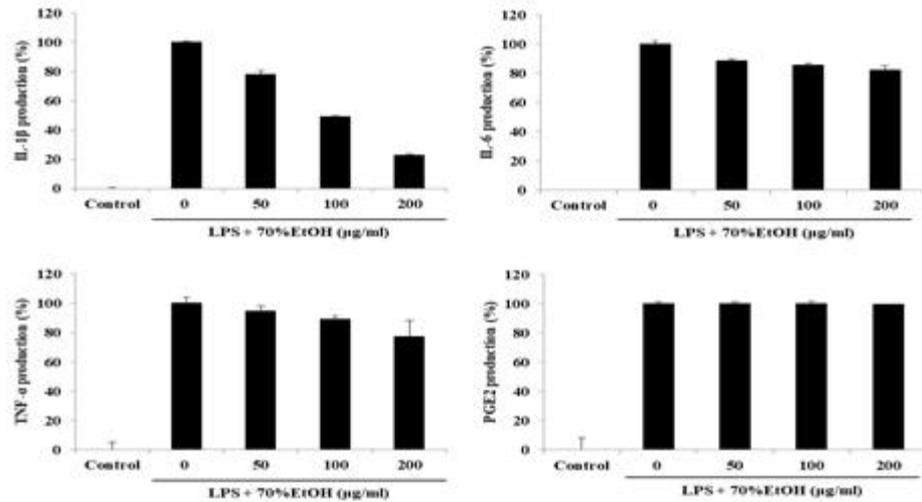


그림 4-3-16. 대식세포에서의 염증성 cytokines 생성량

- 70%주정 추출물의 염증성 cytokine인 IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE2 생성량을 측정한 결과 고농도에서 미미하게 TNF- α 생성량을 감소시켰으며, 우수한 IL-1 β 생성량을 감소시키는 것을 확인할 수 있었음.
- *Tetraselmis sp.* 70% 주정추출물의 iNOS, COX-2단백질 발현을 western blot을 통해 측정하였음.
- 70%주정 추출물의 iNOS, COX-2 단백질 발현 확인결과 iNOS 발현을 감소시키는 것을 확인할 수 있었음.
- 70%주정 추출물의 MAPKs와 관련된 ERK, JNK, p38 단백질 발현 확인한 결과 LPS로 유도된 JNK, p38의 인산화를 감소시키는 것을 확인할 수 있었음.

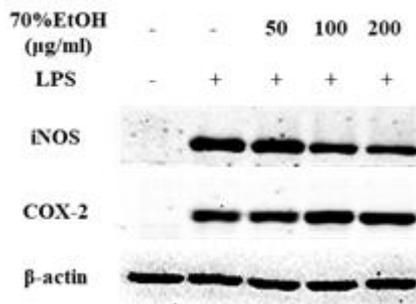


그림 4-3-17. 대식세포에서의 iNOS, COX-2 발현

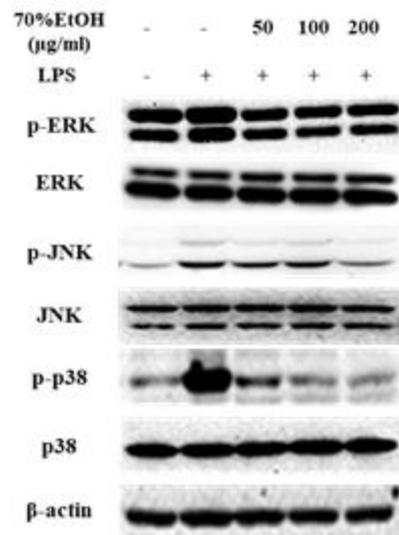


그림 4-3-18. 대식세포에서의 MAPKs(p-ERK, p-JNK, p-p38) 발현

- HSMS에 배양한 *Tetraselmis* sp.의 70% 주정 추출물은 JNK, p38의 인산화를 통해 iNOS, 염증성 cytokine을 감소시켜 항염증 효능을 나타내는 것을 확인 할 수 있었음.

○ HSMS에서 배양한 *Tetraselmis* sp.의 유용성분 탐색

- 항염증 활성을 나타내는 HSMS에 배양한 *Tetraselmis* sp. 70%주정 추출물의 유용성분 탐색을 위하여 분획물을 제조함

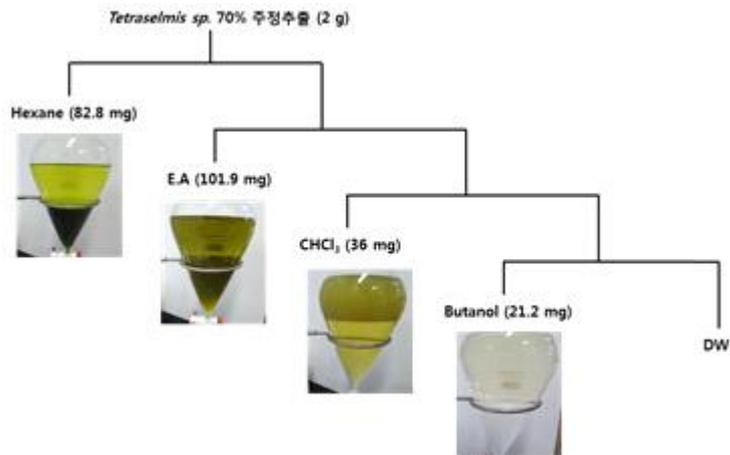


그림 4-3-19. HSMS에 배양한 *Tetraselmis* sp.의 분획 모식도

- HSMS에 배양한 *Tetraselmis* sp. 분말 2 g을 70%주정 추출 뒤 분획한 결과 Hexane 82.2 mg, Ethyl acetate(E.A) 101.9 mg, Chloroform(CHCl₃) 36 mg, Buthanol 21.2 mg을 획득 할 수 있었음.

○ HSMS에서 배양한 *Tetraselmis* sp. 70%주정 추출물 분획물의 항염증 활성 탐색

- 분획물을 대식세포 (RAW264.7 cells)에 처리하고 LPS로 염증을 유도하여 NO 생성량을 Griess assay를 통해, 세포생존율을 MTT assay를 통해 항염증 활성을 측정하였음.

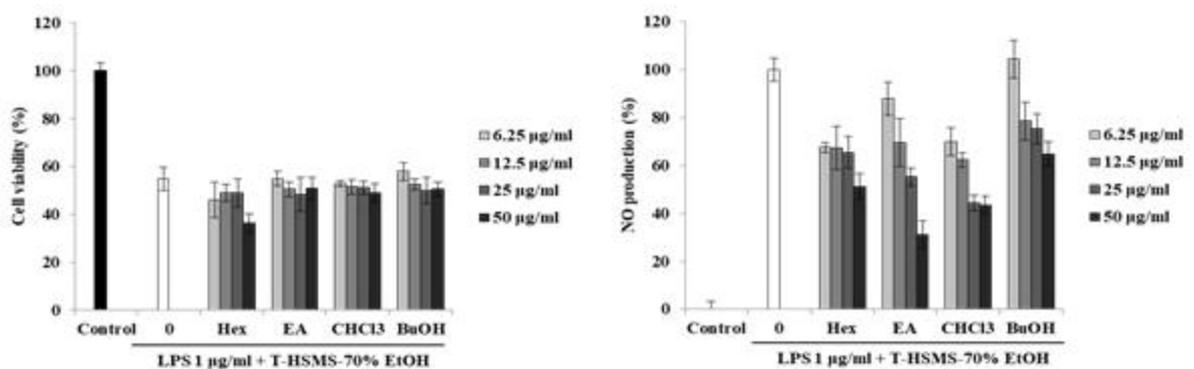


그림 4-3-20. 대식세포에서의 세포 생존율 및 NO 생성량

- Hex분획물 고농도에서 독성이 확인되었으며, 다른 분획물에서는 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지 독성이 확인되지 않았음.
- 모든 분획물에서 LPS에 증가된 NO 생성량을 감소시키는 것을 확인할 수 있었으며, Hex, CHCl_3 , BuOH분획물에서는 40%이하의 NO 소거능을 보였음. 특히 EA 분획물에서 우수한 NO 소거능을 확인할 수 있었음.
- HSMS에 배양한 *Tetraselmis* sp. 70%주정 추출물 EA 분획물의 염증성 cytokines의 생성량을 ELISA assay를 통해 측정하였음.

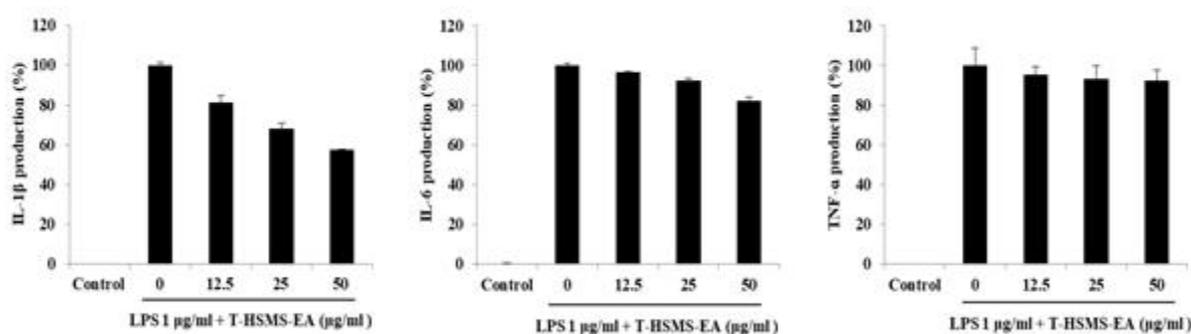


그림 4-3-21. 대식세포에서의 염증성 Cytokines 생성량

- EA 분획물은 염증성 cytokine인 IL-1 β , IL-6을 감소 시켰으며, 특히 IL-1 β 생성량을 우수하게 감소시키는 것을 확인할 수 있었음. 이는 HSMS에 배양한 *Tetraselmis* sp. 70%주정 추출물과 같은 경향을 보이는 것을 확인할 수 있었음.
- HSMS에 배양한 *Tetraselmis* sp. 70%주정 추출물 EA 분획물의 iNOS, COX-2단백질 발현을 western blot을 통해 측정하였음.

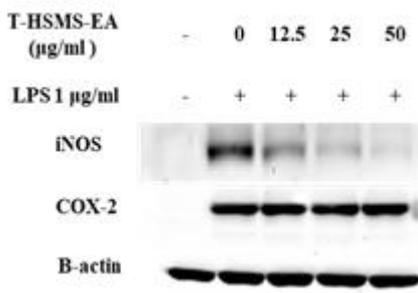


그림 4-3-22. 대식세포에서의 iNOS, COX-2 발현

- EA 분획물의 iNOS, COX-2 단백질 발현 확인결과 iNOS 발현을 감소시키는 것을 확인할 수

있었으며, 이는 HSMS에 배양한 *Tetraselmis* sp. 70%주정 추출물과 같은 경향을 보이는 것을 확인 할 수 있었음.

라. 고염분수를 활용한 미생물 배양액의 기능성 탐색

○ 해양미생물 배양액의 DPPH assay를 위한 방법 확립

- 항산화 활성을 탐색하는 방법 중 가장 많이 이용되는 DPPH assay법을 해양미생물의 배양액에 적용하여 테스트하였을 때 응집되는 현상이 발생되어 활성을 측정하는데 문제점을 나타냄. 이에 고염분의 시료에서도 DPPH를 적용할 수 있도록 접근방법을 모색함.
- 수용성 물질의 항산화 테스트를 위해 메탄올에 혼합하여 제작되는 DPPH 용액의 문제점을 파악하기 위해 다양한 배지성분을 메탄올 및 메탄올이 포함된 DPPH 용액에 혼합하였을 때 나타나는 문제점을 확인한 결과 육상미생물을 배양하는 배지에서는 응집현상이 나타나지 않았지만 고농도의 염이 포함된 해양미생물을 배양하는 배지에서는 응집되는 현상이 나타남. 이는 메탄올과 염이 반응하여 생기는 현상으로 판단됨.
- 이를 해결하기 위해 메탄올을 물과 혼합하여 농도별로 제작하고 다양한 배지성분과의 반응을 확인하였고 메탄올 농도가 70% 이하에서는 고농도 염 하에서도 응집현상이 일어나지 않는 것을 확인.
- 이에, 해양미생물 배양액의 항산화 활성을 확인하는데 70% 이하의 메탄올에 DPPH 시약을 용해시키는 것이 적절한 것으로 판단됨.

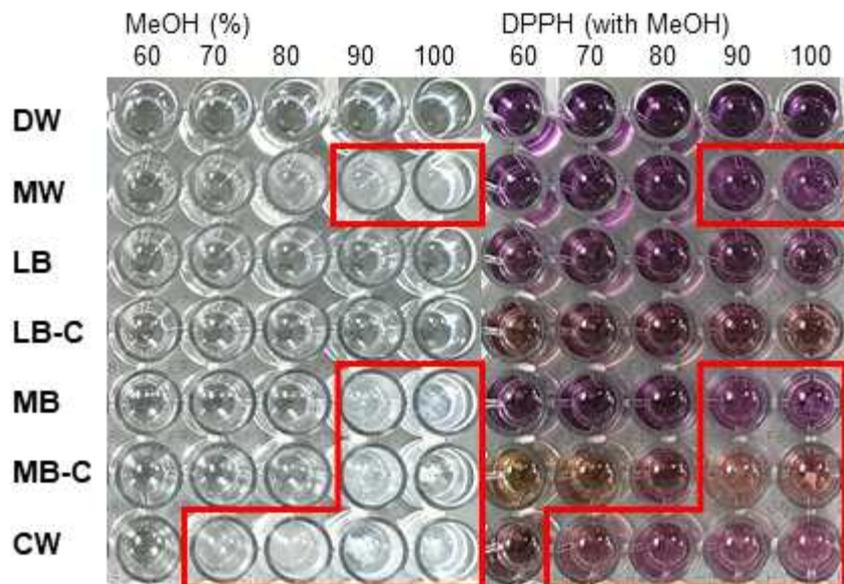


그림 4-4-1. MeOH 농도에 따른 응집현상 (MW: magma seawater(32 psu), LB: LB broth, LB-C: cultured medium(*P. rubra* S6516) in LB, MB: Marine broth, MB-C: cultured medium(*P. rubra* S6516) in MB, CW: concentrated sea water(63 psu))

- 항산화 활성이 잘 알려진 수용성 물질인 L-ascorbic acid와 butylated hydroxytoluene (BHT)를 대상으로 메탄올 농도별 DPPH 용액을 제조하고 각 물질의 농도별로 항산화 활성을 확인한 결과 DPPH 용액의 메탄올 농도는 항산화 활성을 측정하는데 문제가 없음을 확인함

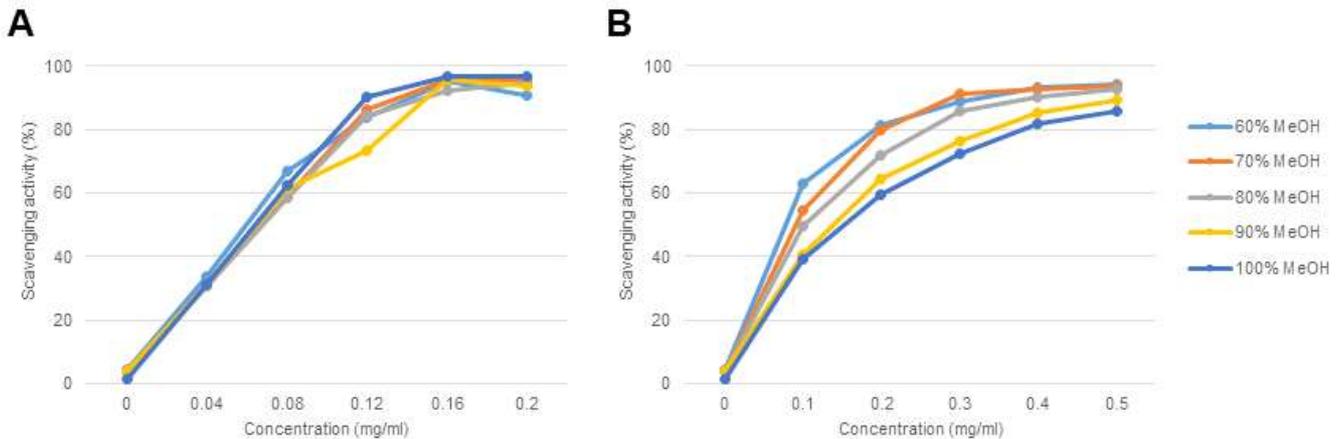


그림 4-4-2. MeOH 농도 별 Scavenging activity (A; L-ascorbic acid, B; BHT)

- 이 결과를 바탕으로 배양액의 항산화 활성을 평가하기 위해서 DPPH solution의 용매로 60~70% MeOH를 사용하여 실험을 진행함

○ 고염 성장 해양미생물 배양액의 항산화 활성 탐색

- 고염분수(CW)와 용암해수(MW)를 활용하여 Marine broth(Difco™ Marine broth 2216) 와 유사하게 peptone(0.5%)과 yeast extract(0.1%)를 첨가하여 배지를 제작함
- 앞서 분리된 고염 성장가능 균주 중 일부(S6516, S7366, S7706, S1131, S985, S5871, C12)를 위의 각각의 배지 25ml에 30°C 에서 2일간 배양 후 배양 상등액을 항산화 활성 측정에 활용
- 항산화 활성 측정은 DPPH assay 및 Hydrogen peroxide scavenging assay를 수행함
- DPPH assay 결과, 배지에 따라서 미생물 배양액의 항산화 활성이 차이가 났으며 특히 S6516, S7366, S1131이 일반배지에 비해 고염분수 활용 배지에서 60% 이상의 높은 항산화 활성을 가지는 것으로 나타남 (그림 4-4-3)
- Hydrogen peroxide scavenging assay 결과, DPPH 결과와 마찬가지로 S6516, S7366, S1131이 일반배지에 비해 고염분수 활용 배지에서 60% 이상의 높은 항산화 활성을 가지는 것으로 나타남 (그림 4-4-4)

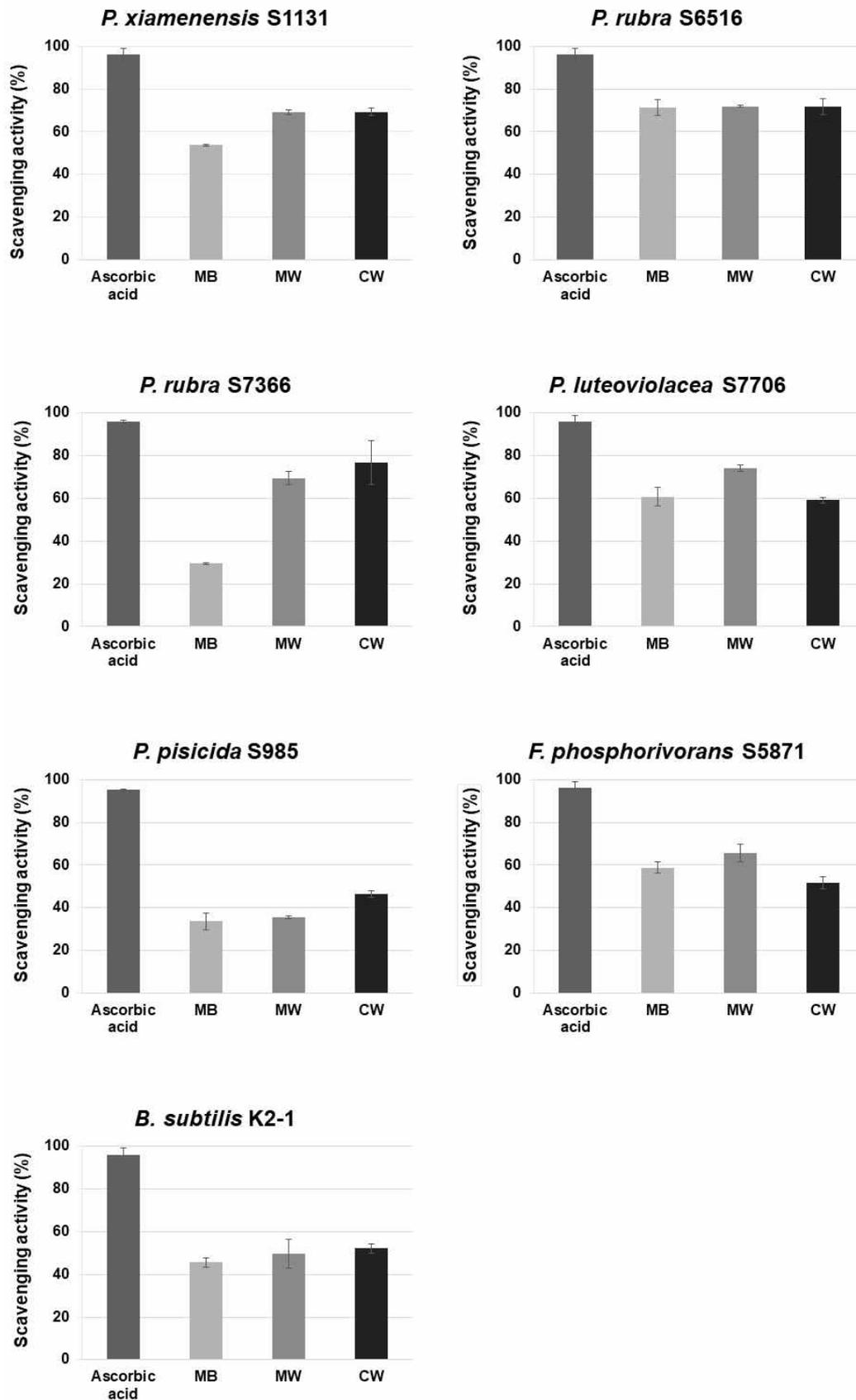


그림 4-4-3. DPPH scavenging assay를 통한 배지별 미생물 배양액의 항산화 활성 변화

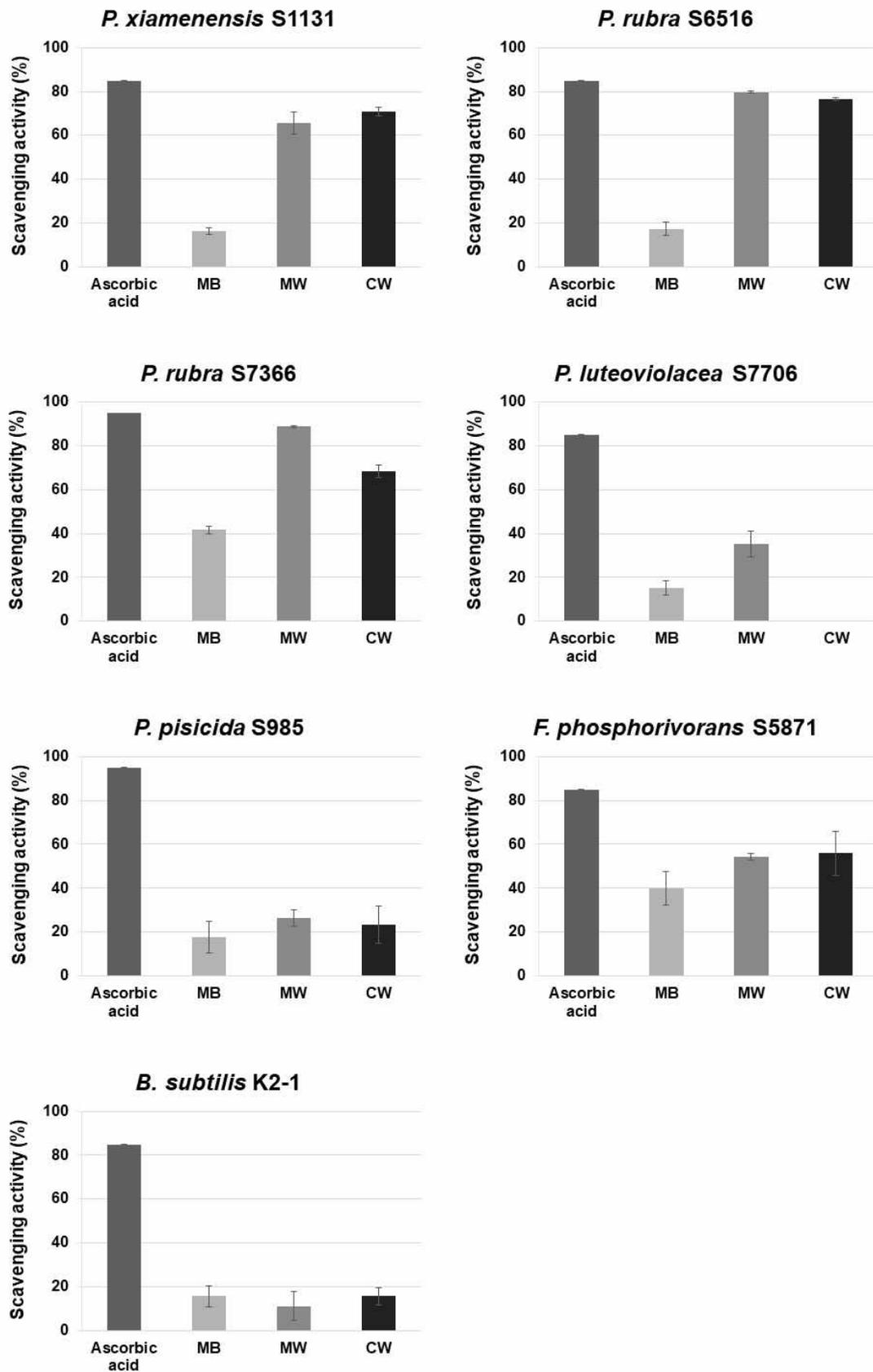


그림 4-4-4. Hydrogen peroxide scavenging assay를 통한 배지별 미생물 배양액의 항산화 활성 변화

- 고염분수 활용배지를 활용하여 높은 항산화 물질을 생산, 활용 할 수 있는 미생물로서 S6516, S7366, S1131를 1차적으로 선정하여 배양시간 별 배양액의 항산화 활성과 대량생산 조건에 대해 실험을 진행함
- 배양 상등액의 활성이 우수했던 3종을 고염분수 활용 배지(CW)와 용암해수 활용 배지(MW), Marine broth(MB)에 접종 후 30°C 에서 180rpm으로 배양하고 0, 12, 24, 48, 72 시간째에 샘플링 하여 상등액의 항산화 활성을 측정함

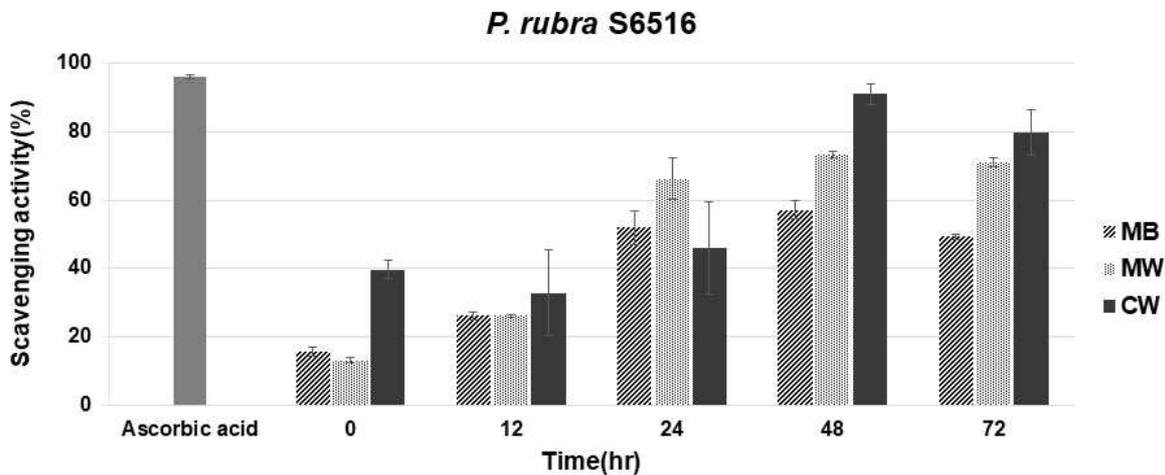


그림 4-4-5. DPPH scavenging assay를 통한 시간 별 *P. rubra* S6516의 항산화 활성

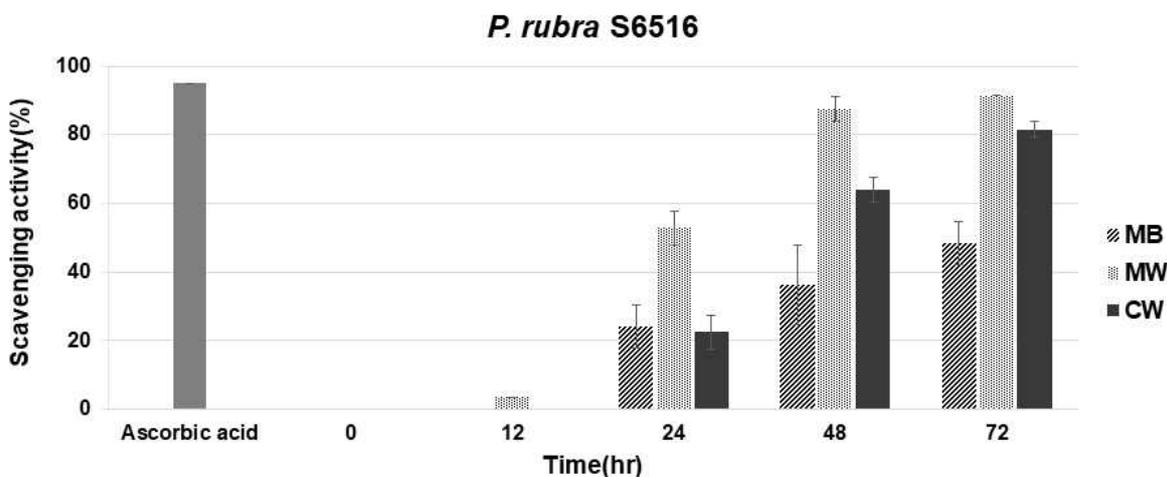


그림 4-4-6. Hydrogen peroxide scavenging assay를 통한 시간 별 *P. rubra* S6516의 항산화 활성

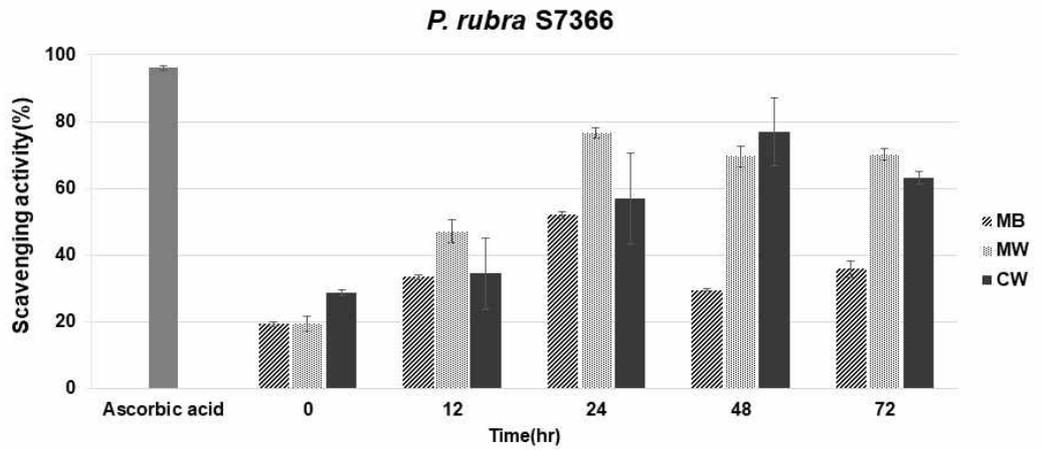


그림 4-4-7. DPPH scavenging assay를 통한 시간 별 *P. rubra* S7366의 항산화 활성

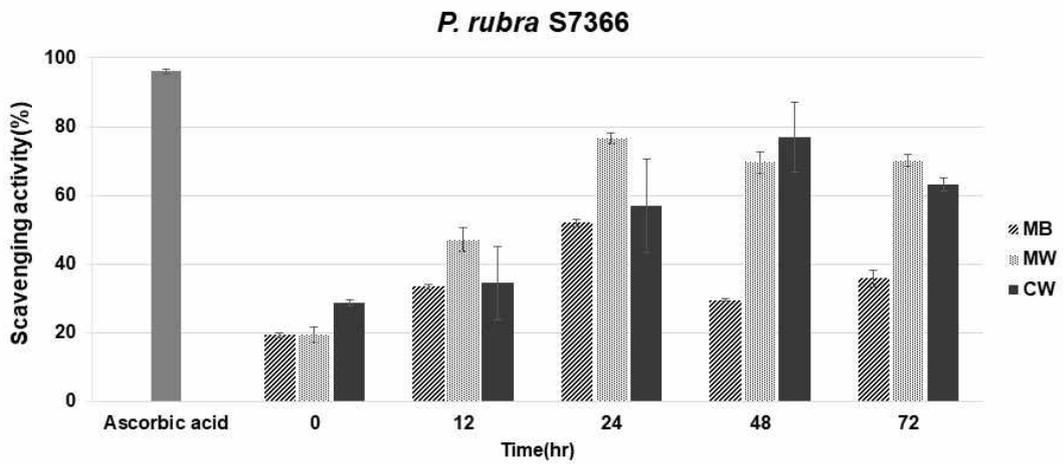


그림 4-4-8. Hydrogen peroxide scavenging assay를 통한 시간 별 *P. rubra* S7366의 항산화 활성

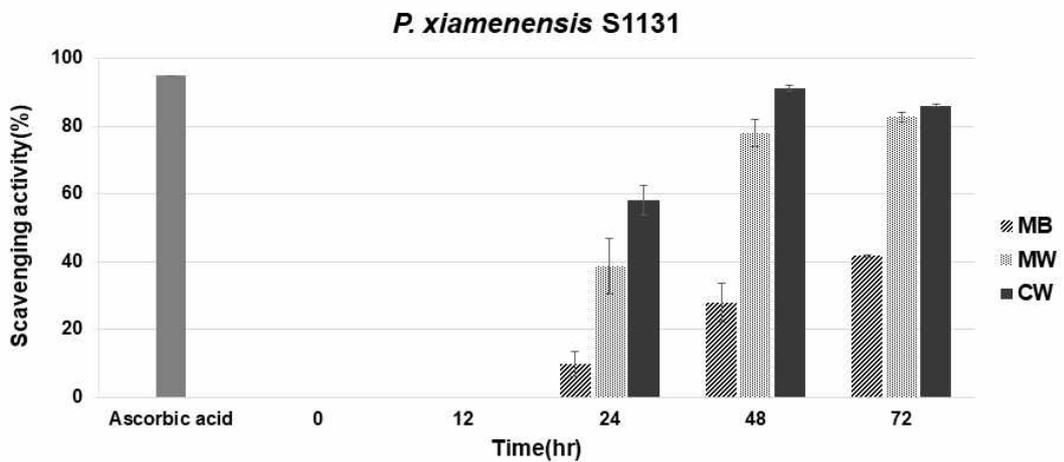


그림 4-4-9. DPPH scavenging assay를 통한 시간 별 *P. xiamenensis* S1131의 항산화 활성

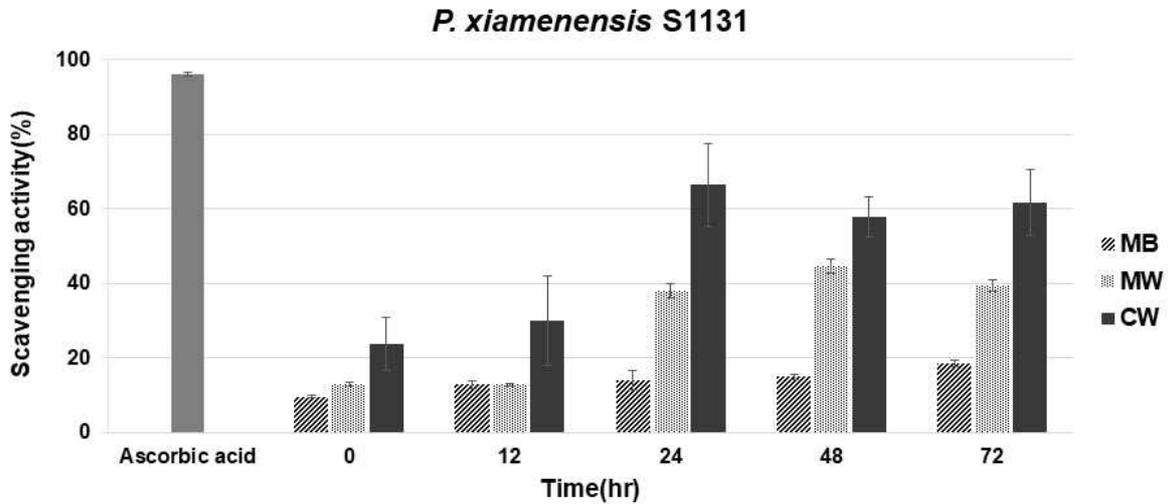


그림 4-4-10. Hydrogen peroxide scavenging assay를 통한 시간 별 *P. xiamenensis* S1131의 항산화 활성

○ 고염분수 활용 미생물 배양액의 항균 효능 탐색

- 인체에 각종 피부질환을 유발하는 *Candida albicans*를 대상으로 고염 배양 미생물의 항균활성 확인
- BHI broth에 24시간 배양한 *Candida albicans*를 marine agar와 BHI agar가 1:1로 혼합된 배지에 도말
- *P. piscicida* S1131, *P. rubra* S6516 (green), *P. rubra* S7366 (red) 균주를 concentrated seawater broth (CW)에 배양하여 2 ul를 *Candida albicans*가 도말된 agar plate에 접종하고 24시간 배양하여 항균활성 확인



그림 4-4-11. *P. piscicida* S1131, *P. rubra* S6516 (green), *P. rubra* S7366 (red)의 *Candida albicans*에 대한 항균활성 측정

- *P. rubra* S6516 균주가 *Candida albicans*에 대해 높은 항균활성을 나타냄.

마. 고염분수를 활용한 조류(해조류, 미세조류) 발효 및 기능성 탐색

○ 고염분수를 이용한 미생물 발효물의 항산화 활성 탐색

- 고염분수(CSW)와 용암해수(MSW)에 각각 1% sucrose를 첨가하고 동결건조된 해양 조류(*Ishige okamurae*, *Spirullina maxima* and *Ecklonia cava*) 3종을 각각 1%가 되도록 첨가 후 김치에서 분리한 *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*를 접종하여 8일간 발효를 진행하였음 (30°C, 180rpm)
- 발효액을 2일에 한 번씩 채취하여 원심분리 한 후 상등액을 가지고 DPPH assay 및 ABTS assay, Hydrogen peroxide(H₂O₂) assay를 통해 항산화 활성을 측정함

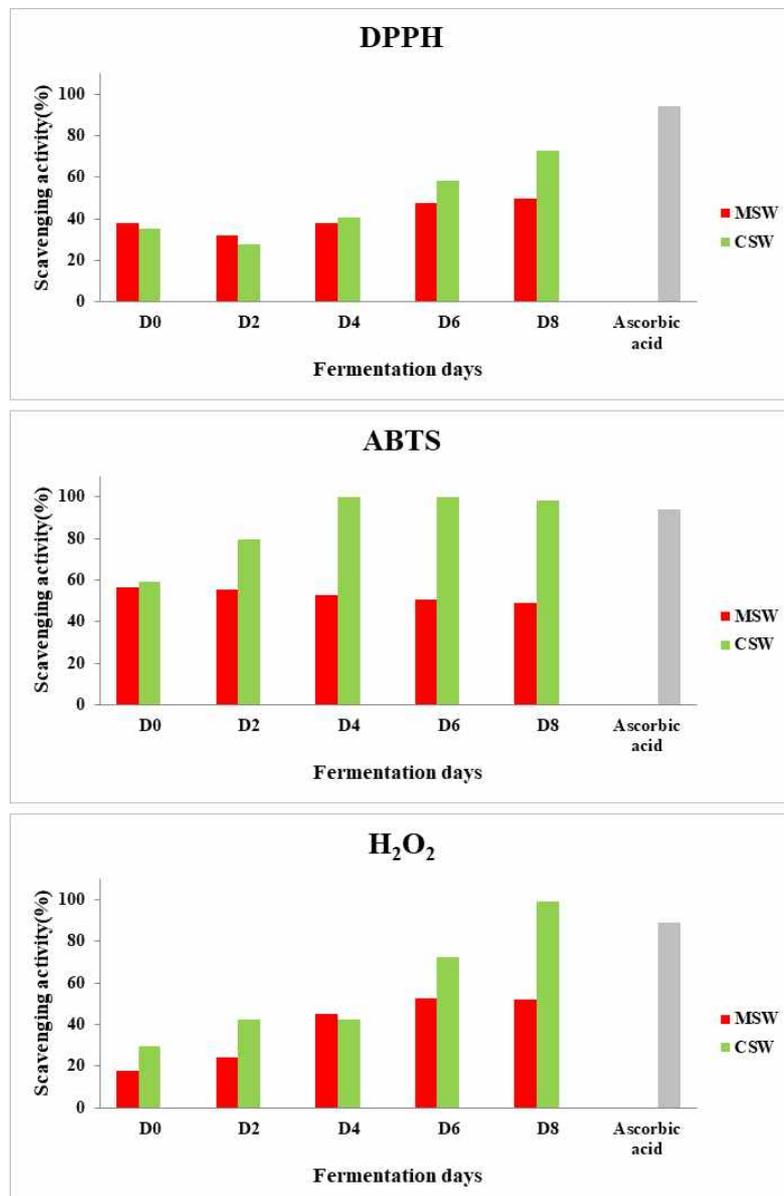


그림 4-5-1. *Spirullina maxima* 발효 상등액의 항산화 활성

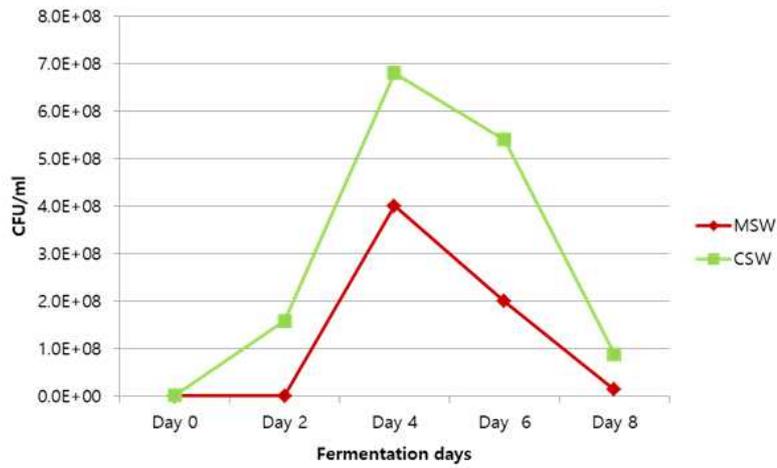


그림 4-5-2. *Spirulina maxima* 발효시 배양기간별 미생물 개체수

- *Spirulina maxima* 발효 상등액의 경우, 용암해수 배지(MSW)에 비해 고염분수 배지(CSW)에서 배양 했을 때 높은 항산화 활성을 나타냈음

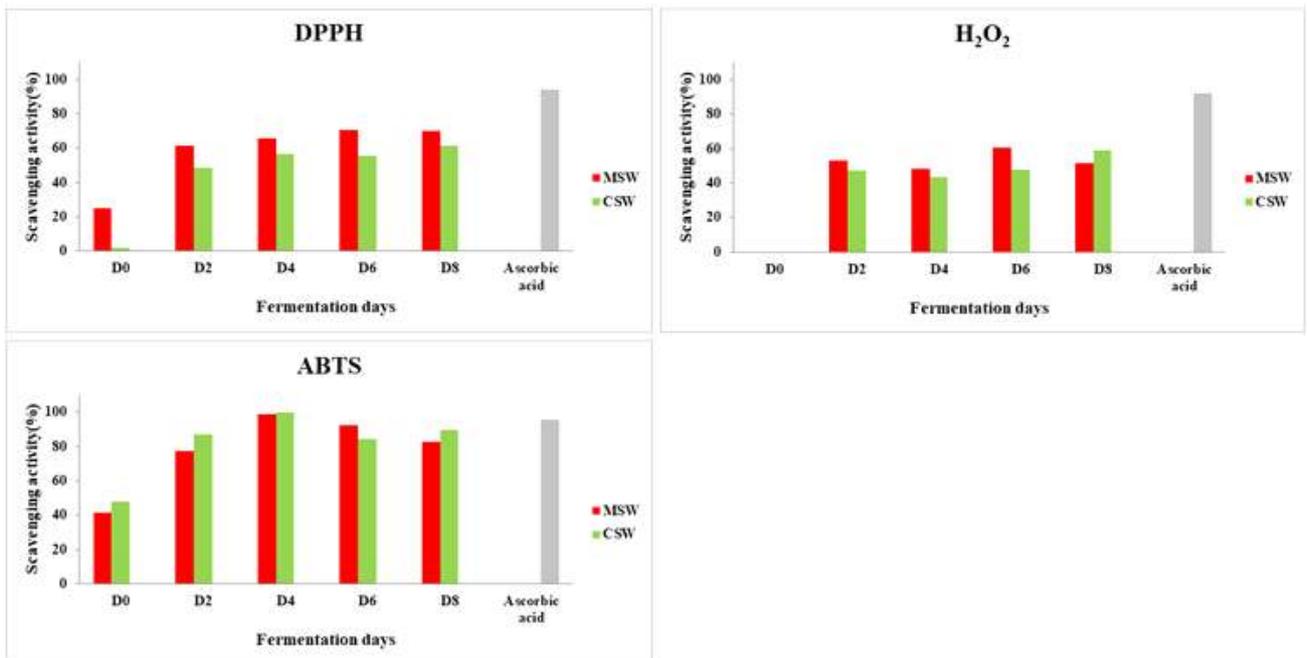


그림 4-5-3. *Ishige okamuraa* 발효 상등액의 항산화 활성

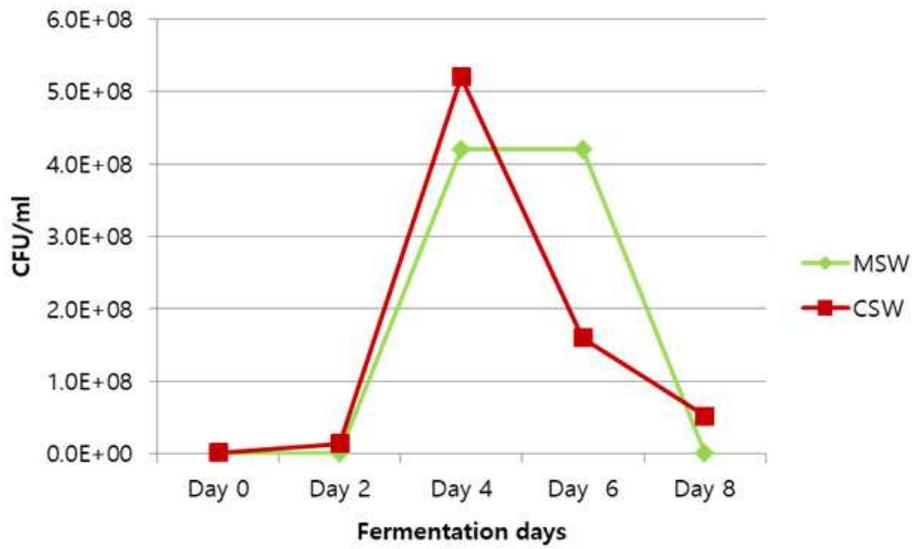


그림 4-5-4. *Ishige okamurae* 발효시 배양기간별 미생물 개체수

- *Ishige okamurae* 발효 상등액의 경우 발효과정을 통해 항산화 활성은 증가하였으나 용암해수 배지와 고염분수 배지에서 큰 차이를 보이지 않았음

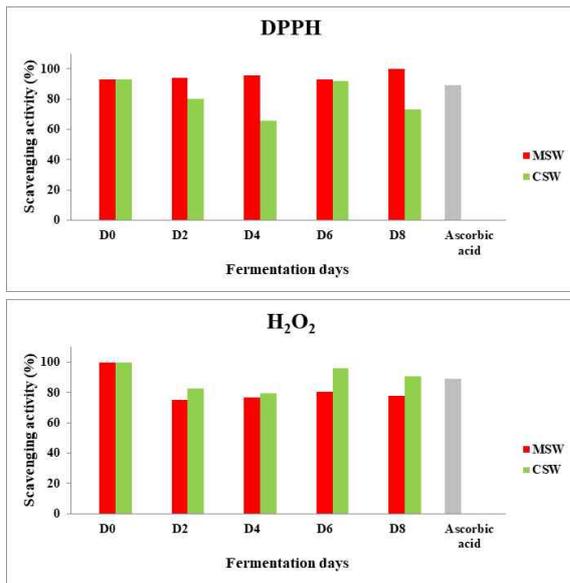


그림 4-5-5. *Ecklonia cava* 발효 상등액의 항산화 활성

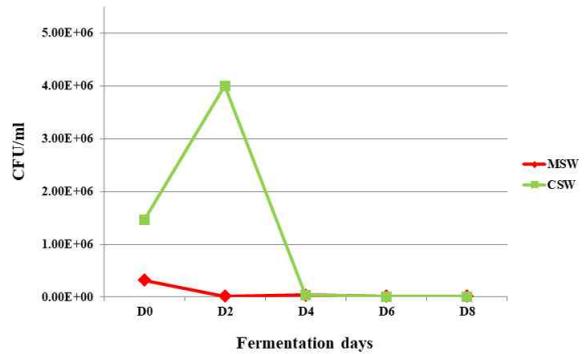


그림 4-5-6. *Ecklonia cava* 발효시 배양기간별 미생물 개체수

○ 고염분수를 이용한 미생물 발효 배양액의 추출과 추출물의 효능 탐색

- 고염분수(CSW)와 용암해수(MSW)를 활용한 미생물 발효 배양액을 Ethyl alcohol(EtOH) 추출과 Ethyl acetate(EA) 추출을 하여 추출물을 제작하였으며 DPPH assay 및 ABTS assay, Hydrogen peroxide(H₂O₂) assay를 통해 추출물의 항산화 활성을 측정함

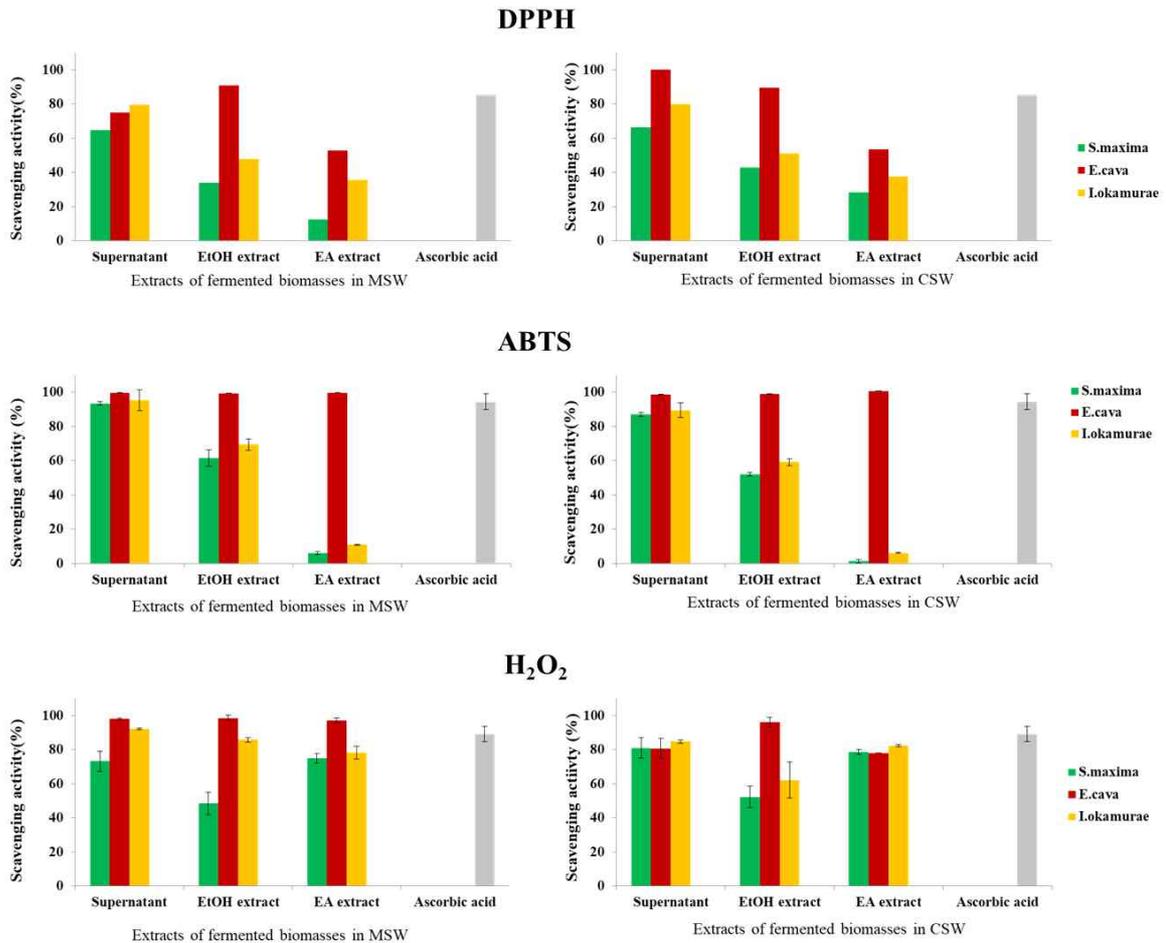


그림 4-5-5. 미생물 발효 배양액의 추출물별 항산화 활성

- *S. maxima*의 경우 DPPH 및 ABTS 항산화 활성 측정시 EtOH 및 EA 추출물 보다 발효상등액의 활성이 높았고 H₂O₂ 저감 활성 측정시 발효상등액과 EA추출물이 높은 활성을 나타냈음. 용암해수를 사용한 발효와 고염분수를 사용한 발효상등액 및 추출물은 유사한 활성을 나타냄.
- *I. okamurae* 또한 DPPH 및 ABTS 항산화 활성 측정시 추출물보다 발효상등액이 높은 활성을 나타냈으며 H₂O₂ 저감 활성은 전반적으로 높게 나타남. 용암해수를 사용한 발효와 고염분수를 사용한 발효상등액 및 추출물은 유사한 활성을 나타냄.
- *E. cava* 발효상등액 및 추출물은 발효와 상관없이 높게 나타남으로써 항산화 활성 물질이 바로 물에 녹아나오는 것으로 사료됨.

바. 지브라피쉬를 이용한 펙틴의 창상치유 효과

○ SmP, SmPNPs, MSmP, MsmPNPs의 창상치유 효과

- 창상치유효과는 wounding 후 2, 7, 10, 14, 24일 후에 clear wound margins을 측정하여 분석하였음. Wound healing percentage(WHP)는 wounding 후 7, 10, 14, 24시간 후에 2 day post wounding (dpw)의 창상크기와 비교하여 계산하여 나타내었음. SmP와 SmPNPs 처리구 모두에서 대조구에 비하여 빠르게 창상의 크기가 작아지는 결과를 나타내었음(그림 4-6-1A).

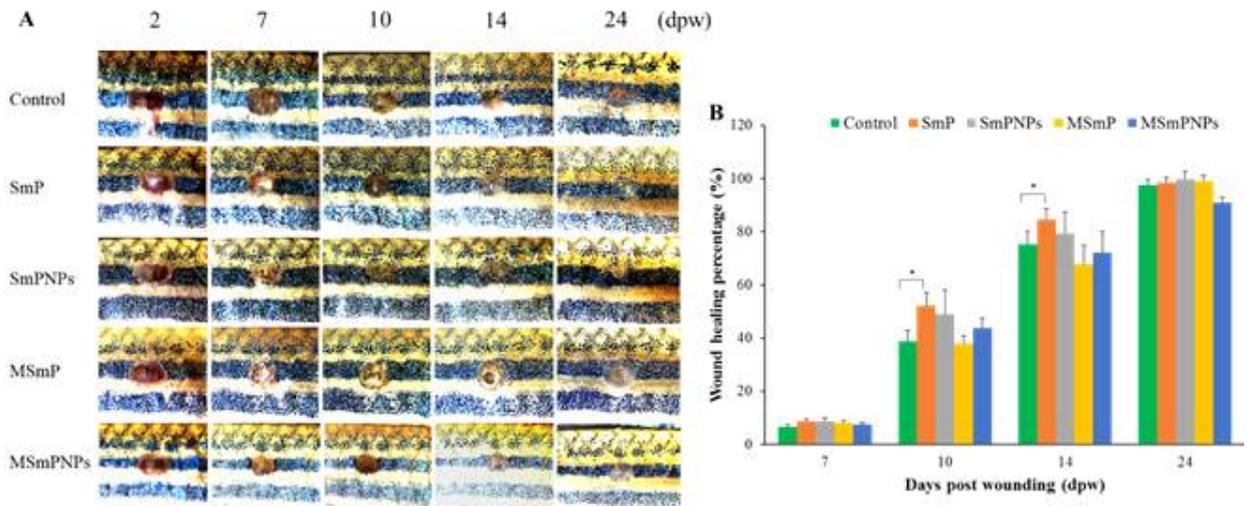


그림 4-6-1. SmP, SmPNPs, MSmP, MsmPNPs의 창상치유효과. (A) 창상치유과정을 나타낸 그림 (B) 7, 10, 14, 24 days per wounding (dpw)의 Wound healing percentage (WHP), WHP는 2 dpw 시의 창상의 크기에 기초하여 계산함. 오차막대는 표준편차를 나타내며 ± S.D. (n=8).

- SmP와 SmPNPs를 처리한 어류에서는 상처유도 24일 후에는, 육안으로 창상을 발견할 수 없을 정도로 치유가 된 것을 확인 할 수 있었음. MSmP는 대조군과 비교하여 창상치유에 negative 영향을 미치는 것을 확인하였으며, 24 dpw에서도 clear wound margin을 보여주었음. MSmPNP는 대조군과 비교하여 대조군과 비교하여 비슷하거나 낮은 치유 능력을 보여주었으며, 24일이 지난 후에도 눈으로 관찰 할 수 있을 정도의 창상 흔적을 관찰할 수 있었음.
- 24일의 치유기간 동안 모든 실험군에서 창상의 크기는 점차 감소하는 경향을 나타내었고, 시간이 지남에 따라 WHP가 증가하는 것으로 나타남(그림 4-6-1B). 10과 14 dpw에서는 SmP처리 구에서 52.2 와 84.7%의 WHP로 가장 높은 치유효과를 나타냄. SmPNP 처리군에서는 48.9 와 79.3%의 WHP를 나타내었고, 이러한 결과는 10과 14 dpw에서 modified된 SmP와 SmPNPs 보다 높은 상창치유효과를 가지고 있음을 보여주었음.

○ SmP, SmPNPs, MSmP, MSmPNPs의 창상치유율(wound healing rate, WHR)

- Wound healing rate (WHR)은 wound margin이 명확하게 정의된 창상유도 2일째부터 총 일 수를 나눈 치유영역을 기준으로 계산함. SmP, SmPNPs, MSmP의 WHR은 대조군과 비교하였을 때 모든 time point에서 높은 wound healing rate을 보임. 스피룰리나 펙틴 중에서 SmP는 창상 유도 10일과 14일째에 0.19, 0.22 mm²/day로 대조군(0.12와 0.18 mm²/day)보다 높은 WHR을 나타냄. MSmP와 MSmPNPs가 SmP와 SmPNPs보다 낮은 WHR을 가지고 있음을 알 수 있었음.

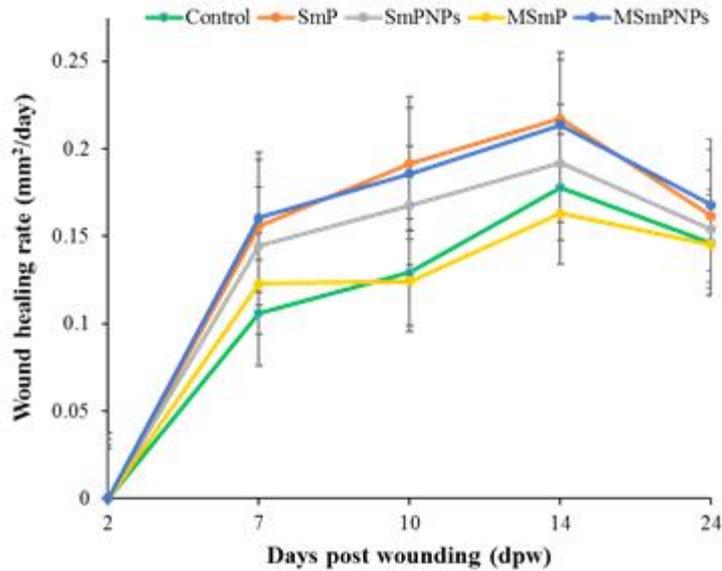


그림 4-6-2. SmP, SmPNPs, MSmP, MSmPNPs의 Wound healing rates.

○ Effect of pectin treatment on pigment restoration during the wound healing

- 창상 유도 2일째에, 상처표면은 전체적으로 또는 부분적으로 무정형삼출물(amorphous exudate)에 의하여 덮였음(그림 4-6-3A). SmP와 SmPNPs가 처리된 창상부위는 wound 가장자리에서부터 중앙으로 빠른 색소이동을 보였으며, 7 dpw에서부터 수축이 나타남. SmP, SmPNPs와 대조군에서 색소의 평균 강도는 158, 138, 91 per mm²를 각각 나타냄(그림 4-6-3B). 24 dpw에 모든 실험군 중에서 SmP가 유의적으로 높은 색소 복원을 보임. 또한, SmP와 SmPNPs 모두 새로 형성된 상피로 덮이는 결과를 확인함.
- 반면, MSmP 색소 강도는 71 per mm²였고, 상처부위의 축소가 지연되는 결과를 나타냄. 또한 눈으로 관찰할 수 있는 상처부위의 크기가 24 dpw 이후에도 남아있었으며, MSmPNPs 처리군의 색소 강도는 88 per mm²였고, 대조군에 비하여 미세하게 낮은 결과를 나타냄.

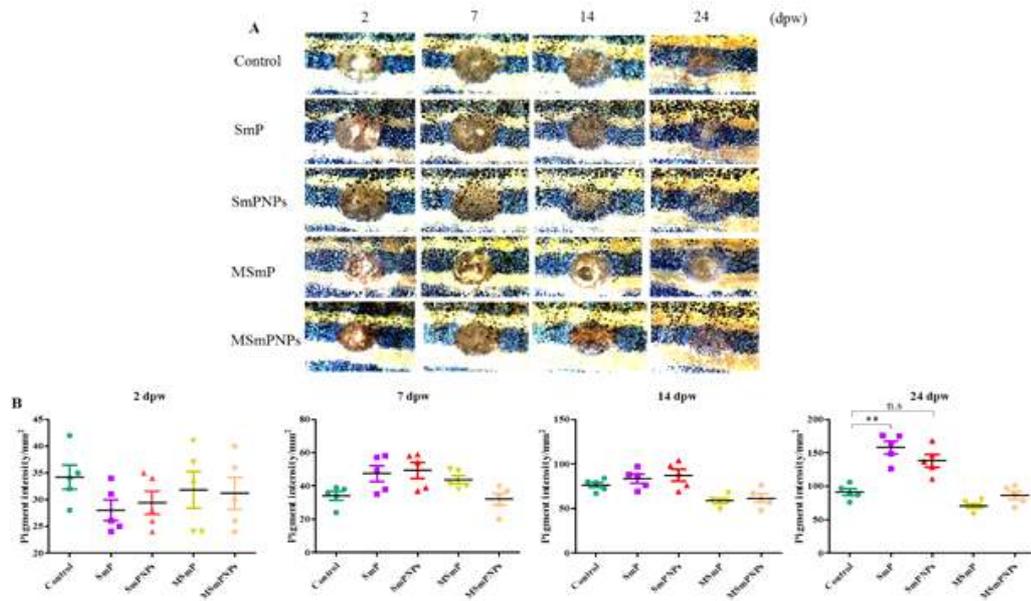


그림 4-6-3. 상처치유과정동안의 색소 복원. (A) 상처부위에서의 색소 이동 (B) 색소발달의 정량적 분석 (intensity per unit area, ***p < 0.01, n=5).

- SmP, SmPNPs, MSmP, MSmPNPs 처리군의 근육조직에서의 상처치유과정동안의 조직학적 관찰
 - 헤마톡실린 & 이오신 (H&E) 염색 섹션은 dpw 2일과 7 일 후의 상처가 없는 그룹 피부층의 일반적인 구조를 각각 보여주고 있음(그림 7-1-4). Zebrafish의 피부는 겹쳐지는 비늘로 구성되어 있으며, 각각은 얇은 진피 섬유아세포와 다층 표피로 감싸져 있음. 대조군에서 비늘을 포함하는 모든 표피 세포는 2 dpw에서 손실되었고 얇은 표피 층 및 과립화 조직 형성으로 7dpw에서 회복되었음. 대조군은 7일 후에 상처 치유가 관찰되었으나, SmP, SmPNPs, MSmP, MSmPNPs 처리군에서는 대조군에 비하여 2일, 7일 후에 빠른 상처치유를 나타내었음
 - 창상유도 후 2일째 SmP, SmPNPs, MSmP, MSmPNPs 처리군의 조직의 well forming granulation 이 관찰됨. 추가적으로 상처는 상처유도 7일 후에 다중 세포층의 새로운 표피를 갖는 SmP, SmPNP, MSmP, MSmPNPs처리군에서 완전히 상피화되었지만, 대조군의 상처표면에서는 얇은 상피층이 관찰됨.

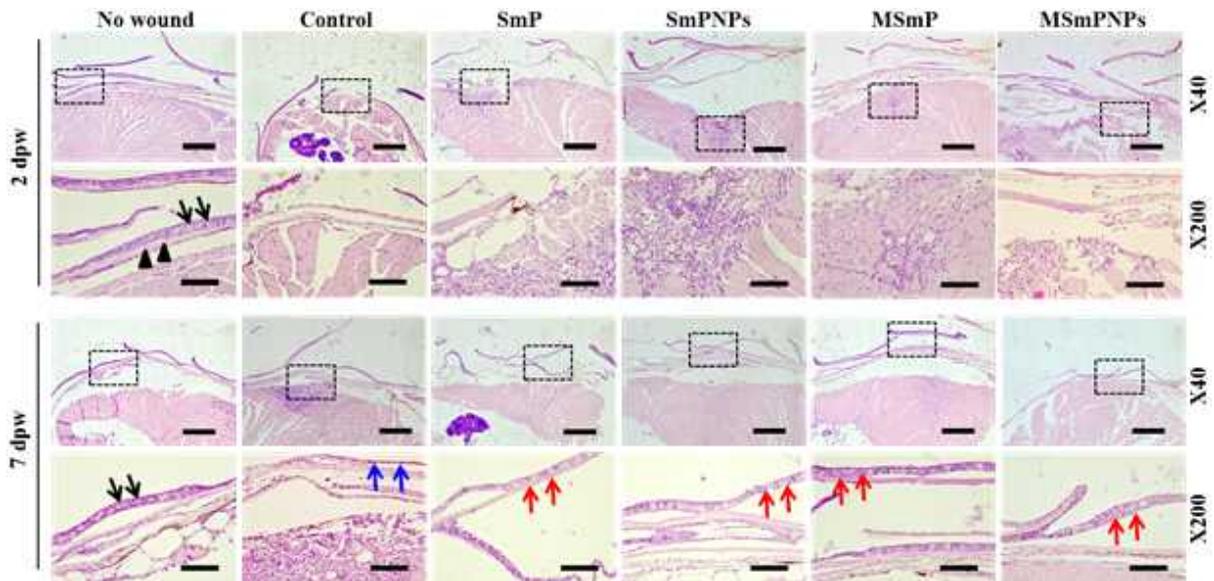


그림 4-6-4. Hematoxylin and eosin (H&E) staining of transverse sections through the wound. No wound group showed normal epidermis (black arrows), dermis and scale (arrowheads). In control group, a thin layer of neopithelium (blue arrows) was observed on the surface of the wound at 7 dpw, but the wound was completely re-epithelialized in SmP, SmPNPs, MSmP or MSmPNPs treated group with a neopithelium of multiple cell layer (red arrows). Scale bar X40 = 500 μ m, X200 = 100 μ m.

○ 껍질치리에 따른 창상치유 관련 유전자들의 발현

- 창상유도 후 1, 2, 7, 14, 24시간 후의 근육과 신장(면역반응 조직) 조직에서의 창상치유와 관련된 유전자의 상대적인 mRNA 발현을 확인함(그림 4-6-5, 4-6-6). 창상치유 (*Tgf β 1*, *timp2b*, *mmp9* and *mmp13*), anti/pro-inflammatory (*tnf- α* , *il-1 β* and *il-10*), antioxidant (*sod-1* and *cat*), chemokines (*cxcl18b*, *ccl34a.4* and *ccl34b.4*)과 관련된 총 12개의 유전자를 선별하고 이들의 조직에 따른 발현을 관찰함.

- 근육조직에서의 발현 변화

· ***Tgf β 1*의 mRNA 발현 변화:** 창상유도 2일 후에 SmP를 처리한 zebrafish 근육조직에서 대조군에 비하여 가장 높은 *Tgf β 1* (10.3-fold)의 발현이 유도되는 것을 관찰할 수 있었음. 창상유도 1일 후에는 대조군에 비하여 SmP(2.1배), SmPNPs(1.8배), MSmPNPs(2.6배)에서 조금 높은 발현을 나타내는 것을 확인 할 수 있었음.

· ***timp2b*의 mRNA 발현 변화:** 모든 창상유도 그룹에서 *timp2b* mRNA 발현은 단계적으로 증가하는 경향을 나타내었고, 창상유도 7일차에 창상유도 대조군(7.4배)에 비하여 SmP(13.4배)를 처리한 그룹에서 가장 높은 발현량이 발견되었음. 창상유도 후 1, 2, 7일 후 치유 기간 동안, SmP를 처리한 그룹은 다른 세가지 껍질을 처리한 그룹과 창상유도 대조군에 비하여 가장 높은 *timp2b* mRNA의 발현을 나타내었음.

- mmp9와 mmp13의 발현변화: mmp9 and mmp13은 창상유도 1, 2일 후에서만 그룹간에 상당한 수준으로 다르게 발현됨. SmP를 처리한 zebrafish는 창상유도 1일 후에 상처 대조군 및 다른 펙틴처리군과 비교하여 mmp9(10배), mmp13(9.8배) 둘 다 가장 높은 발현증가를 나타냄. 또한 mmp9은 창상유도 1일 후에 상처대조군(2.9배)dp 비하여 SmPNP(5배)에서 약간의 발현 증가를 보였음. mmp9 mRNA발현은 SmPNP(10배), 상처유도 대조군 (7.7배) 보다 MSmP(14배)에서 가장 높았음. mmp13 mRNA발현의 증가는 창상유도 2일후에 SmP에서 유지되었고, 다른 펙틴 처리 및 상처유도 대조군(13.8배)와 비교하여 가장 높은 발현(201배)이 관찰 됨.
- 염증관련 유전자(*tnf- α* , *il-1 β* , *il-10*)의 mRNA발현 : SmP, SmPNPs, MSmPNPs를 처리한 그룹에서 염증 사이토카인 유전자들은 다양한 유전자발현 패턴을 보였음. 창상유도 1일차에 창상유도 대조군과 비교했을 때, MSmPNPs(34.5배), SmP(20배), SmPNPs(18.7배)를 처리한 그룹에서 *tnf- α* 만이 높은 발현량을 나타내었음. 창상유도 2, 7, 14일 후에는 창상유도 대조군에서만 높은 발현이 관찰되었다. 창상유도 1일차에는 SmP(3.1배)를 처리한 그룹에서 가장 높은 *il-1 β* mRNA 발현이 관찰되었고, 창상유도 대조군 (0.5배)은 매우 낮은 발현량을 보였음. 이와 비슷하게 창상유도 1일 후에 모든 펙틴처리 실험군에 비하여 창상유도 대조군에서 *il-10*의 낮은 발현량을 보였음. 그러나 창상유도 2, 7, 14 일차에는 창상유도 대조군의 *il-1 β* 와 *il-10* 유전자 모두 비교적 높은 발현량을 나타냄.
- 항산화 효소(*sod-1*, *cat*)의 발현 변화: 펙틴을 처리한 실험구와 건트롤에서 단지 창상 유도 2일차에서만 항산화관련 유전자인 *sod-1*와 *cat* 모두 높은 mRNA 발현을 보였음. 특히, MSmP를 처리한 zebrafish에서는 창상유도대조군과 비교했을 때 두 개의 유전자 모두 16배의 발현이 증가하였고, 이와 비슷하게, SmPNPs를 처리한 실험구에서도 창상유도 2일차에 창상유도 대조군과 비교했을 때 두 개의 유전자 모두 14배의 발현 증가를 나타냄.
- 케모카인 관련 유전자(*cxcl18b*, *ccl34a.4*, *ccl34b.4*)의 발현 변화: 창상 유도 후 2일째 SmP를 처리한 zebrafish에서의 케모카인 유전자 *cxcl18b*와 *ccl34a.4*의 유전자발현은 증가하였으며 *cxcl18b*의 유전자 발현은 창상 유도 후 7일째에 대조군(4.9배)와 다른 실험구에 비하여 높은 6.3배 발현량 증가로 가장 높은 유전자 발현 증가를 보였음. *ccl34a.4*의 발현은 모든 창상유도 그룹에서 창상유도 후 2일째까지 점차 증가하였고, MSmPNPs에서 7.4배 증가로 가장 높은 발현증가를 나타내었음. 또한 SmPNPs를 처리한 그룹에서 창상유도 1일과 2일째에 *ccl34b.4*의 가장 높은 발현 증가를 관찰할 수 있었음.

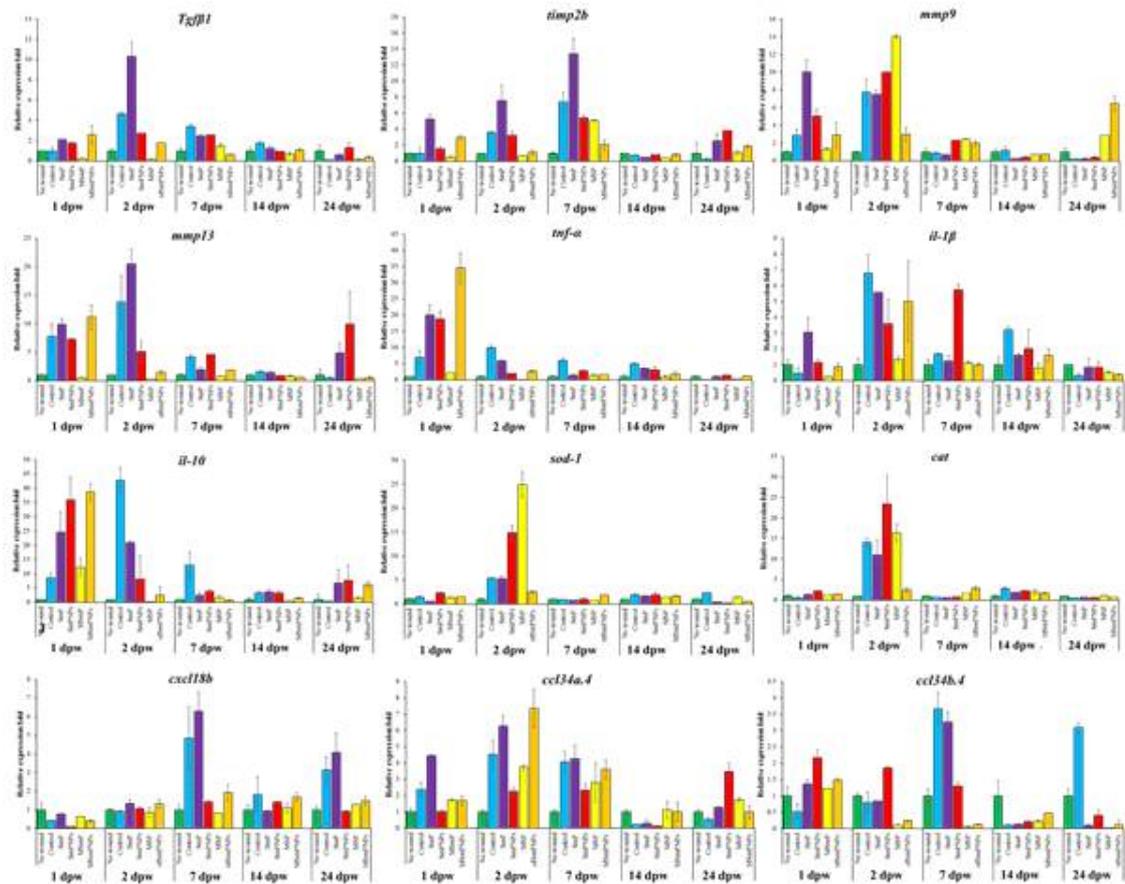


그림 4-6-5. Transcriptional expression of wound healing related genes in muscle tissue.

- 신장 조직에서의 발현 변화

- *tgfβ1*의 발현 변화: *Tgfβ1*의 mRNA 발현 수준은 SmP와 SmPNPs를 처리한 그룹에서 창상 유도 1, 2, 7일 째에 2배 이상 증가하였으나, 창상이 치료되는 기간 동안 창상유도 2일째를 제외하고 모든 기간 동안 대조군에 비하여 낮은 수준의 *Tgfβ1* mRNA 발현이 발견됨
- *timp2b* 유전자의 mRNA 발현변화: 근육조직에서와 같이 SmP를 처리한 그룹에서 신장조직에서의 *timp2b* 유전자는 4.3배 발현이 증가한 창상유도 대조군에 비하여 18.3배로 증가로 더 많은 발현량의 변화를 나타내었고, 다른 팩틴 처리구들역시 창상유도 후 7일 째까지 발현이 증가하였음.
- *mmp9* and *mmp13*의 mRNA 발현 변화: *mmp9* and *mmp13*의 발현 수준은 창상유도 후 1일째에만 증가하였고, 모든그룹에서 실험 종료시까지 기본적인 발현 수준을 유지함. SmP를 처리한 그룹에서는 창상유도 1일째에 *mmp9* (8.25배)와 *mmp13* (10.9배) 모두 높은 발현 증가를 나타냄.

- Inflammatory genes (*tnf- α* , *il-1 β* and *il-10*)의 mRNA 발현 변화: 창상유도 1일째에 대조구에 비하여 4가지의 처리 그룹에서 창상치유기간 동안 *tnf- α* , *il-1 β* , *il-10* 유전자 모두 높은 발현량을 나타냄. *tnf- α* 는 MSmP를 처리했을 때 32.6배의 발현증가를 나타내었으며, 다른 모든 펙틴 처리구에서도 창상유도 대조구(3.9)에 비하여 12배 이상의 높은 발현을 보였음. 뿐만 아니라, 창상유도 후 1일 째에 SmPNPs(3.6배), SmP(2.9배)를 처리한 그룹에서의 *il-1 β* 의 발현 또한 증가하였음. 3.2배의 발현증가를 나타낸 창상유도 대조구에 비하여 SmP를 처리한 그룹에서 *il-10*의 발현이 높게 나타남.
- antioxidant enzymes (*sod-1* and *cat*)의 발현 변화: 비록, 창상유도 후 1일차에 대조구(1.4배)에 비하여 SmPNPs(2.1배)를 처리한 zebrafish의 신장조직에서 *sod-1*의 mRNA의 발현 증가 하는 경향을 보이고, SmPNPs와 SmP를 처리한 그룹 모두에서 창상유도 1일차에 *cat*유전자의 발현이 이배 이상 증가하였으나, 항산화 관련 유전자 *sod-1*과 *cat*는 펙틴을 처리한 그룹과 대조구 모두의 신장조직에서 발현의 유의적인 차이는 관찰되지 않음.

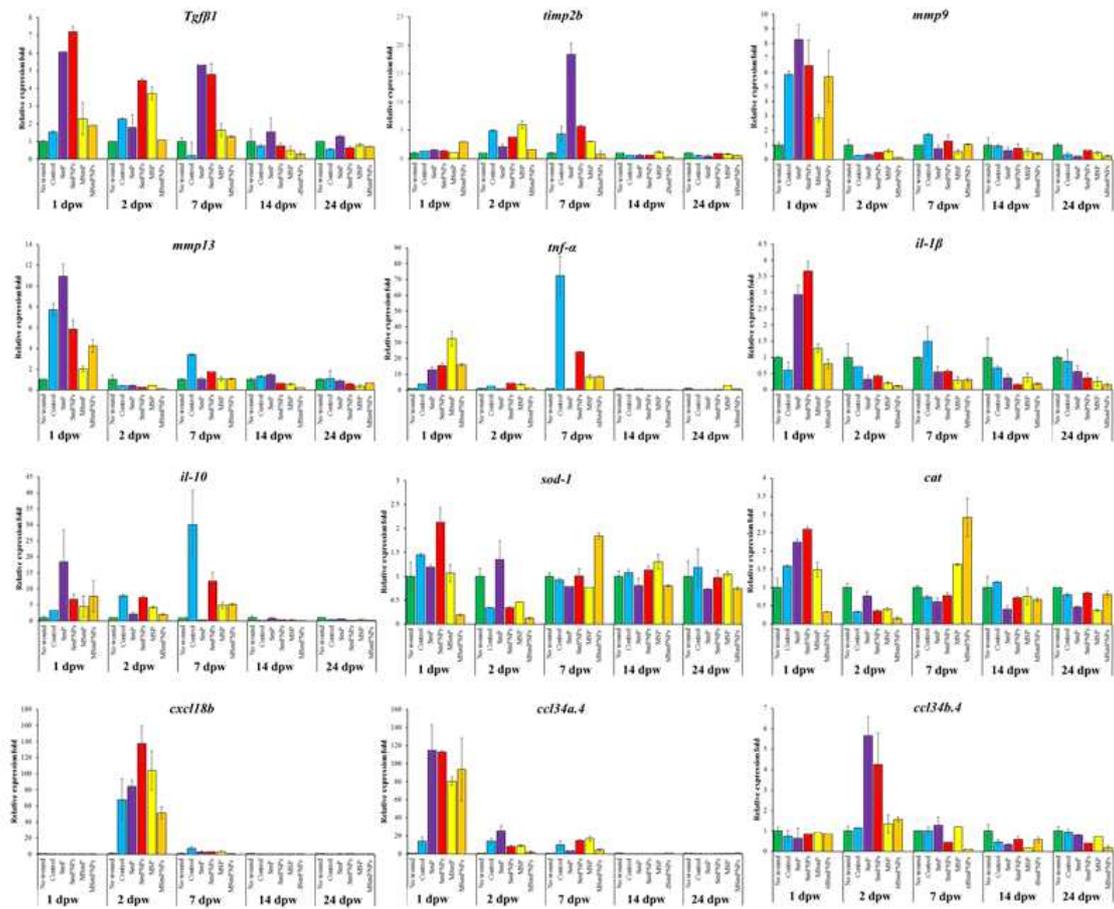


그림 4-6-6. 신장조직에서의 창상치유 관련 유전자의 유전자 발현

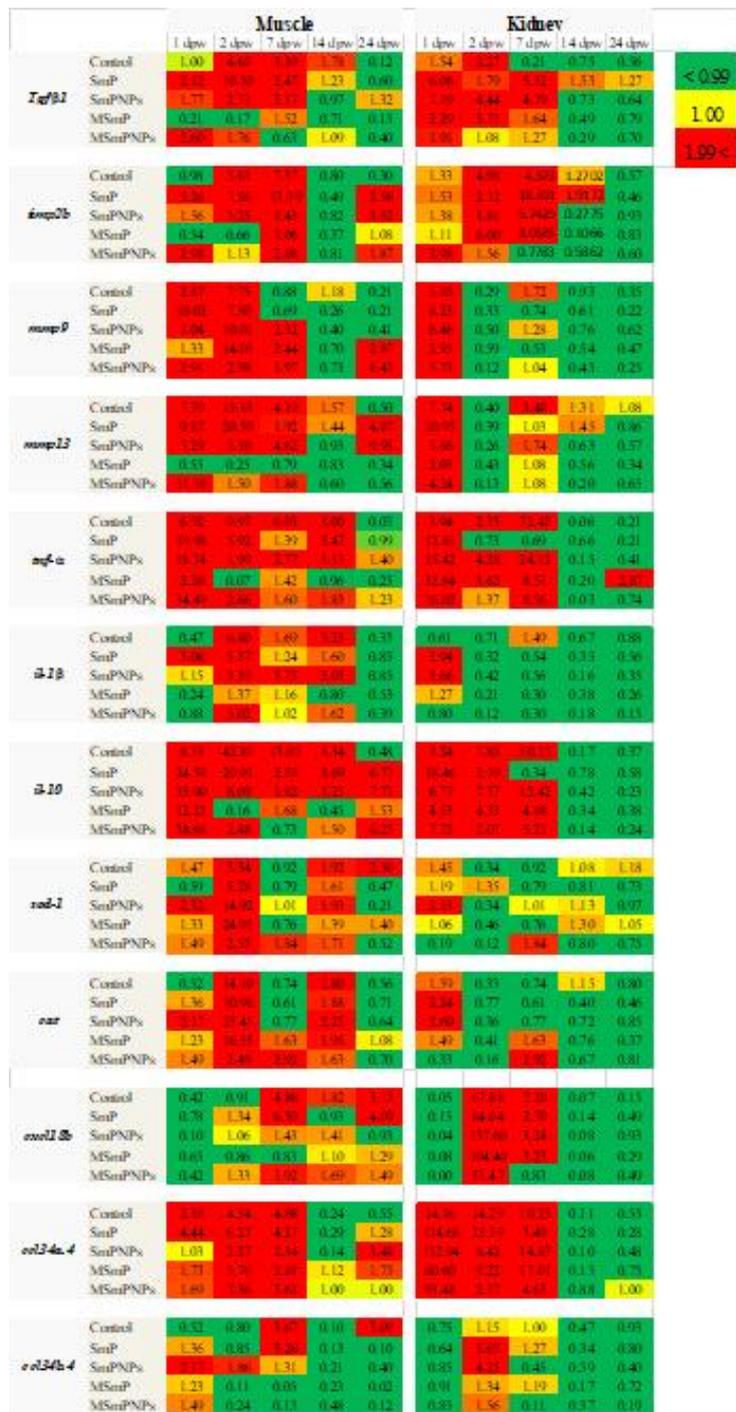


그림 4-6-7. 다양한 펙틴처리에 따른 근육과 신장조직에서의 유전자 발현 heat map

○ 지브라피쉬 치어에서 꼬리지느러미 재생에 SmP가 미치는 영향

- 지느러미 재생에 미치는 SmP의 효과를 확인하기 위하여 지느러미를 절단한 치어를 SmP(25, 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도)로 노출시키고 2일과 3일 후에 재생된 범위를 측정함(그림 4-6-8A). 대조구와 SmP(25, 50 $\mu\text{g/mL}$)에 노출시킨 치어에서의 평균적인 재생 범위는 4.0, 4.9, 5.1 mm²으로 확인할 수 있었음. SmP 50 $\mu\text{g/mL}$ 에 노출시킨 치어는 대조구와 비교했을 때 2일과 3일 후에 유의

적으로 높은 지느러미 재생효과를 보였음(그림 4-6-8B).

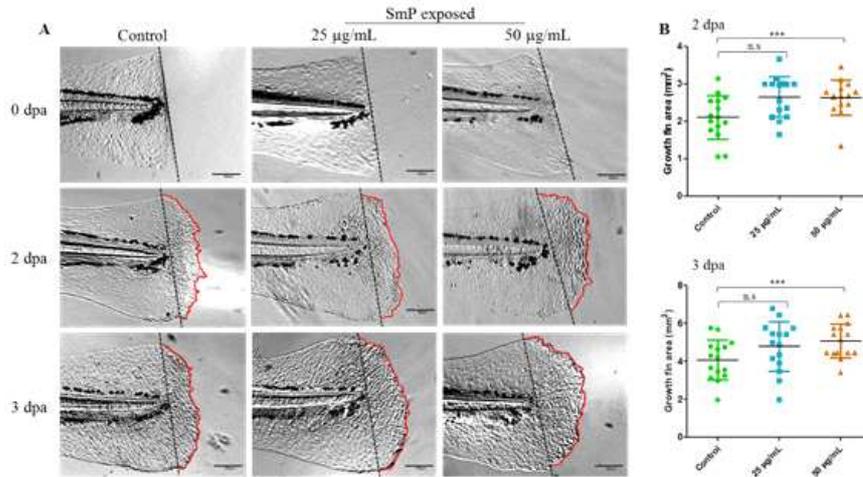


그림 4-6-8. 대조구와 SmP에 노출시킨 꼬리지느러미의 재생효과 (A) 각각의 SmP에 노출된 치어와 대조구의 꼬리지느러미 재생 이미지(B) 꼬리지느러미 재생 범위의 정량적 분석 (** $p < 0.001$, $n=15$).

○ SmP의 in-vitro wound healing 효과

- 상처 단층의 가장자리의 면적을 측정하고 6, 12, 18 시간에 열린 상처 범위(%)으로 표시함(그림 4-6-9A). 예상한 바와 같이, 25와 50 $\mu\text{g/mL}$ 로 SmP를 처리한 열린 상처 부위의 면적은 대조군보다 좁았으며, 18시간 처리후 대조군과 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리한 실험구에서 각각 42, 34, 14%의 열린상처 범위를 나타내었음(그림. 4-6-9B). 추가적으로 SmP처리 후 16, 12, 18시간 후에 처리한 농도에 따라 상처부위가 현저히 감소함을 확인할 수 있었음.

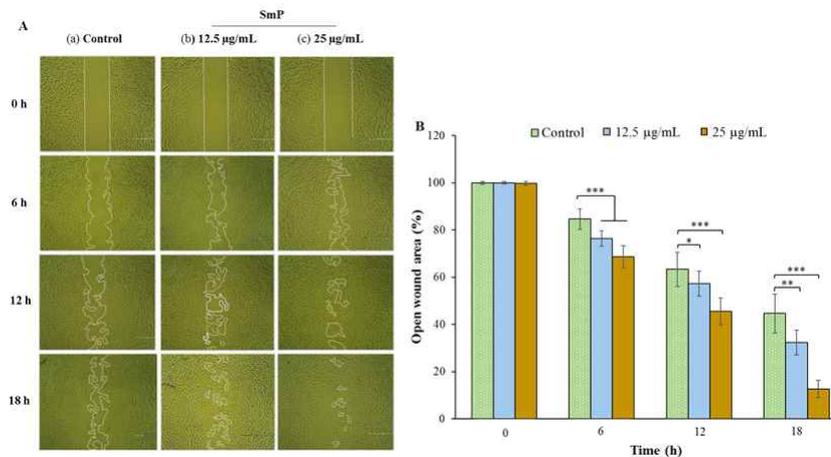


그림 4-6-9. 인간 피부 섬유 아세포에서의 SmP의 처리에 따른 in-vitro wound healing 효과 (A) wound margin은 SmP처리 후 0, 6, 12, 18시간에 측정하였다. (B) open wound area%는 0시간제의 초기 gap 크기와 비교하여 세포 이동시 남아있는 open wound를 나타내며, 각각의 open wound area %는 mean \pm SD로 나타내었다. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$, $R=3$).

○ 결론

- MSmP와 MsmPNPs가 예상과 달리 WHP와 WHR에서 유의적인 창상치료 효과를 보이지 않았지만 SmP와 SmPNP의 국소 상처부위에 대한 적용은 WHP와 WHR을 통하여 피부상처치유의 조절에 긍정적인 영향을 미치는 것을 확인 할 수 있었으며, SmP와 SmPNPs의 처리에 의하여 색소 복원력이 향상되는 것을 확인함. 조직학적 분석결과 펙틴을 처리한 그룹에서 상피층의 재생을 증진시키는 것을 입증함.
- SmP처리된 지브라피쉬는 상처치유과정의 초기단계에서 근육 및 신장 조직 모두에서 상처치유 관련 유전자인 $Tgf\beta 1$, $timp2b$, $mmp9$, $mmp13$ 의 mRNA가 발현의 활성화되는 결과를 확인 할 수 있었음. In-vitro wound healing과 in-vivo 치어 꼬리지느러미 재생 실험은 SmP와 스피룰리나 펙틴의 잠재적 창상치유 소재로의 가능성을 보여주고 있으며, 이는 천연 창상치료제와 피부재생 소재로서 상용화 가능성을 보여주고 있음.

사. 쥐를 이용한 펙틴의 창상치유 효과

○ 개선된 펙틴 융합 바이오 소재의 비임상 모델에서의 피부 조직 재생 효능비교 검토

- 해양 펙틴 융합 최적 배합비 결정을 위한 5% 폴리비닐알콜(PVA)과 시판되는 5% Citrus 펙틴을 이용한 배합(10:0, 9:1, 7:3, 5:5)에 따른 하이드로겔 제작(그림 4-7-1) - (10 PVA:0 pectin PV10PE0, 9 PVA/1 pectin PV9PE1, 7 PVA/3 pectin PV7PE3, 5 PVA/5 pectin PV5PE5)

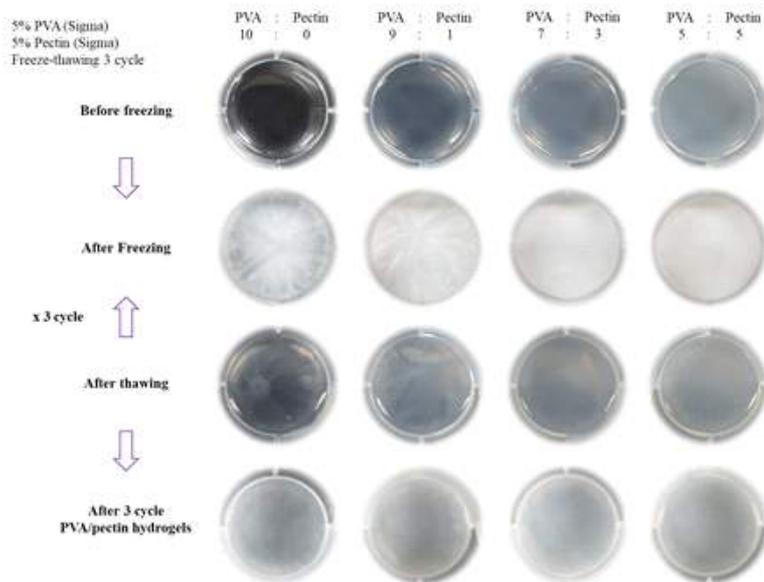


그림 4-7-1. 폴리비닐알콜 및 펙틴을 이용한 하이드로겔 제작 사진

- 여러 배합비에 의해 제작된 폴리비닐알콜/펙틴 하이드로겔의 FT-IR을 통한 고유 peak 분석을 통해 폴리비닐알콜과 펙틴이 잘 혼합되어 있음을 확인함(그림 4-7-2)

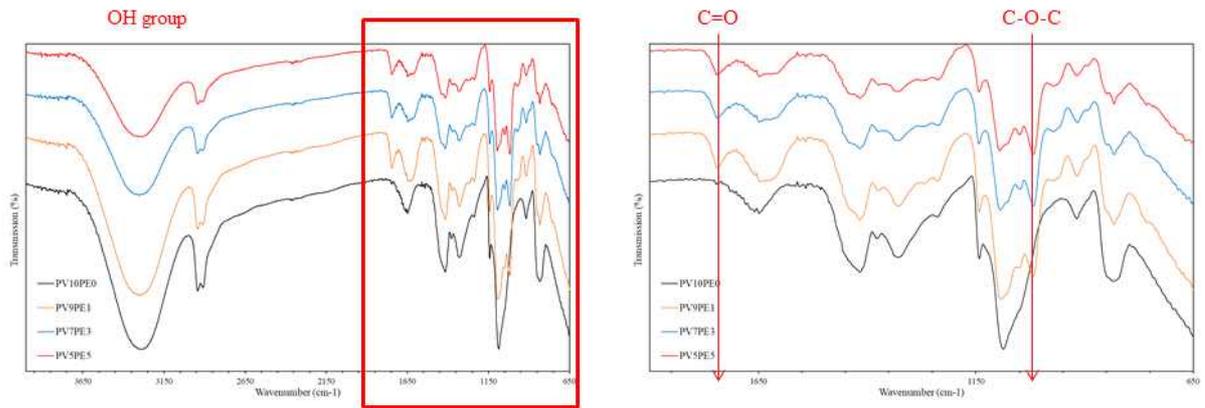


그림 4-7-2. 제작된 하이드로겔의 FT-IR 분석 결과

- 여러 배합비에 의해 제작된 폴리비닐알콜/펙틴 하이드로겔의 Rheometer를 통한 하이드로겔의 강도변화를 확인함(그림 4-7-3)
- G' 값에 의한 겔 강도를 확인한 결과 폴리비닐알콜과 펙틴을 9:1로 혼합하여 제작한 하이드로겔이 다른 하이드로겔과 비교하여 가장 높은 강도를 가지는 것을 확인함

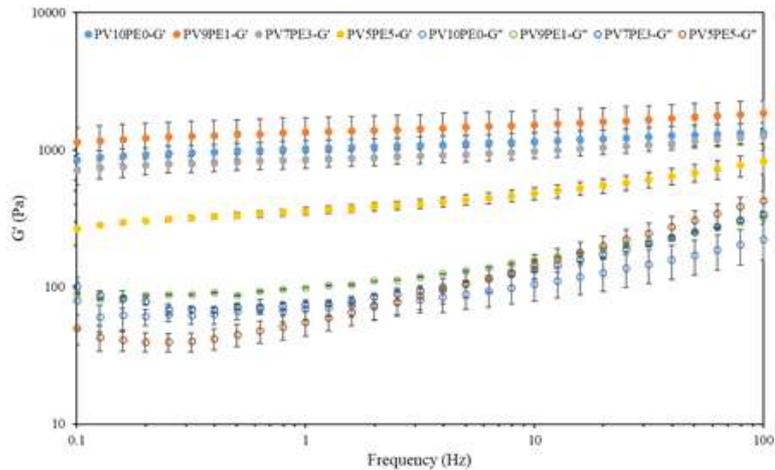


그림 4-7-3. 제작된 하이드로겔의 Rheometer 분석 결과

- 제작된 폴리비닐알콜/펙틴 하이드로겔의 내부 표면에 대한 분석을 SEM을 통해 확인함(그림 4-7-4)
- 제작된 폴리비닐알콜/펙틴 하이드로겔의 내부 표면을 관찰한 결과 펙틴의 함유가 증가할수록 내부 기공이 잘 생성되어 있는 것을 확인함
- 다공구조의 존재는 하이드로겔 내부로 삼출물을 흡수할 수 있게 해주고, 창상면에 습윤환경을 제공할 수 있도록 해주는 중요한 특성중의 하나임

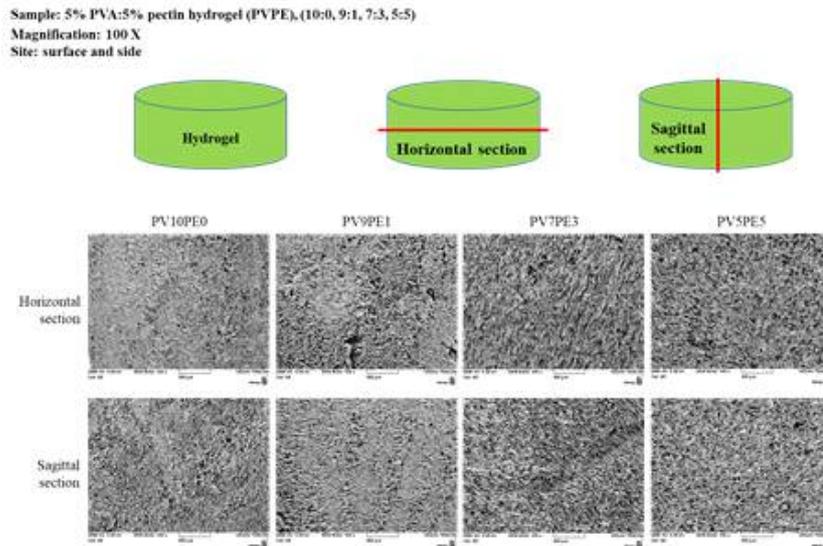


그림 4-7-4. SEM을 통한 제작된 하이드로겔의 내부 표면 확인

- 제작된 폴리비닐알콜/펙틴 하이드로겔의 Gel fraction을 측정함(그림 4-7-5)
- Gel fraction 확인 결과, 증류수 조건에서 3일 동안 Gel fraction이 펙틴의 함량이 높을수록 낮아지는 것을 확인할 수 있었음
- 제작된 폴리비닐알콜/펙틴 하이드로겔에서 폴리비닐알콜 사이의 가교결합 및 폴리비닐알콜과 펙틴 사이의 가교결합에서 제외된 펙틴이 수용액안에서 풀어져서 낮아지는 것으로 판단됨

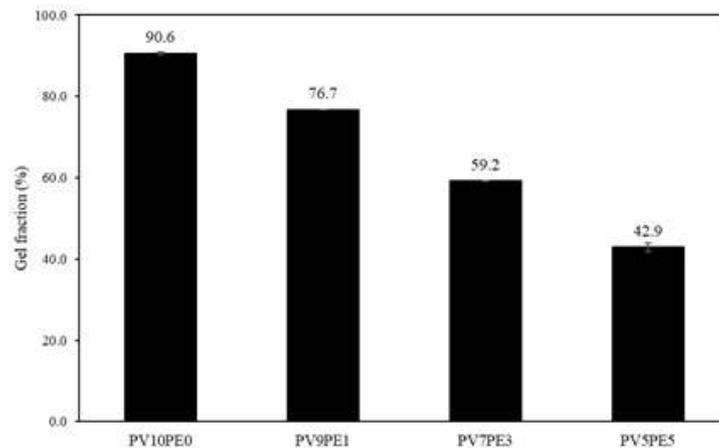


그림 4-7-5. 제작된 하이드로겔의 Gel fraction 결과

- 제작된 폴리비닐알콜/펙틴 하이드로겔의 삼출물 흡수정도를 알아보기 위해 수분흡수율을 측정함(그림 4-7-6)
- 증류수 조건에서 실험한 결과, 펙틴이 함량되어 있을수록 상대적으로 폴리비닐알콜로만 이루어진 하이드로겔보다 수분 흡수율이 높은 것을 확인할 수 있었음

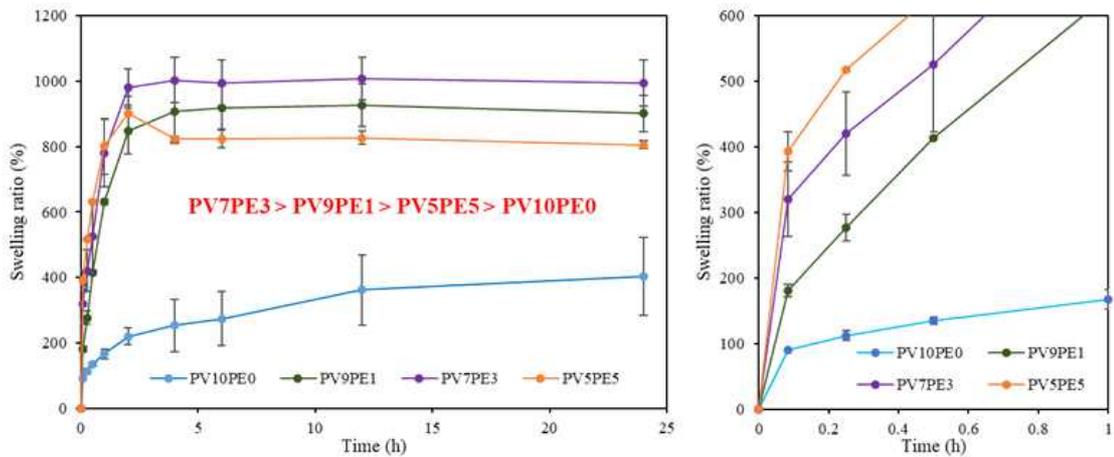


그림 4-7-6. 제작된 하이드로겔의 수분흡수율 측정 결과

- 이는 폴리비닐알콜보다 친수성이 높은 펙틴에 의해 폴리비닐알콜만으로 이루어진 하이드로겔보다 수분흡수율이 높은 것으로 판단됨
- 또한, 초반에는 펙틴 함유가 많을수록 펙틴에 의해 수분흡수율이 높아지는 것을 확인할 수 있었으나, 겔화율에 의해 시간이 지남에 따라 다량의 펙틴 함유는 오히려 수분흡수율이 떨어지는 것을 확인할 수 있었음
- 제작된 폴리비닐알콜/펙틴 하이드로겔의 세포 내 독성을 평가하기 위해, indirect 및 direct 세포독성을 실시함(그림 4-7-7, 4-7-8)
- Indirect 세포독성 실험결과 1일 및 3일 동안 하이드로겔로부터 추출한 추출물을 1일 및 3일 동안 피부세포(NHDF-neo)와 각질세포(HaCaT)에 1일 및 3일 동안 처리하여 배양한 결과 모두 70%이상의 세포생존율을 보임을 확인하였음

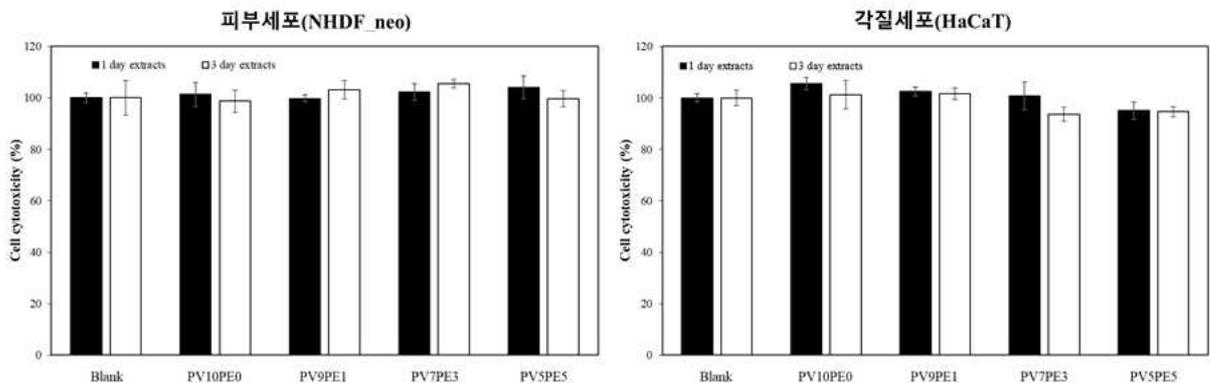


그림 4-7-7. 제작된 하이드로겔의 Indirect 세포독성실험 결과

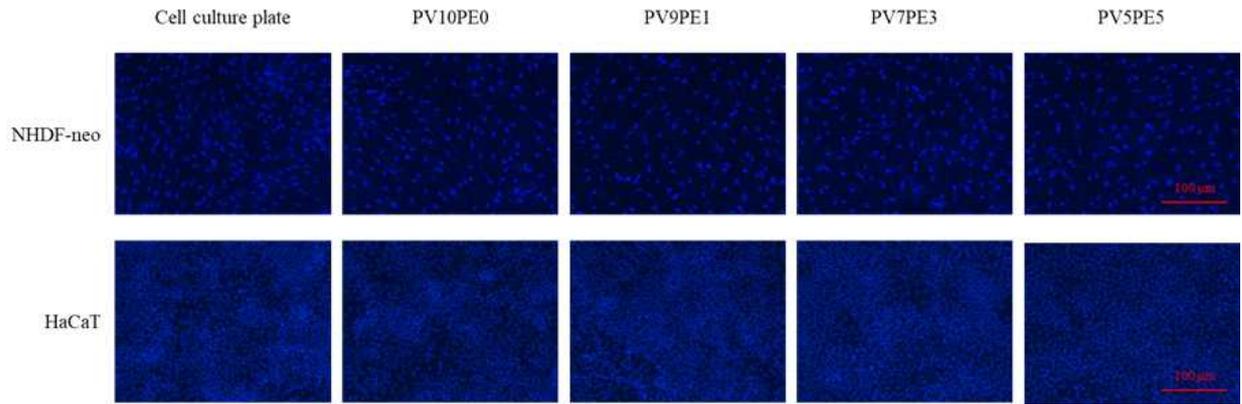


그림 4-7-8. 제작된 하이드로겔의 Direct 세포독성실험 결과

- ISO1993-5에 따르면 무처리군 대비 70%이상의 세포생존율을 보이면 세포독성이 없다고 판단
- Direct 세포독성 실험결과 3일 동안 피부세포 및 각질세포에 하이드로겔을 올린다음 세포독성을 평가한 결과, 대조군과 비교하여 세포들이 잘 살아있음을 Hoechst33342 핵염색법을 통해 확인하였음
- Indirect 및 Direct 세포독성실험 결과를 통해 해당 폴리비닐알콜/펙틴 하이드로겔의 세포독성이 없다는 것을 확인함
- 앞선 폴리비닐알콜과 펙틴의 배합비에 따른 이화학적 특성 연구를 통해 폴리비닐알콜과 펙틴이 9:1의 비율로 혼합하여 하이드로겔을 제작하였을 경우 가장 창상피복재료의 활용이 높을 것으로 사료되어, 해양 용합 펙틴을 폴리비닐알콜과 9:1로 혼합하여 제작함(그림 4-7-9) - (10 PVA:0 Citrus pectin PV10PE0, 9 PVA/1 sigma pectin PV9SP1, 9 PVA/1 NOW pectin PV9NP1, 9 PVA/1 KIOST pectin PV9MP1)
- 제작된 폴리비닐알콜과 해양 펙틴 용합 하이드로겔 외 시판제품 펙틴 용합 하이드로겔의 Rheometer를 통한 하이드로겔의 강도변화를 확인함(그림 4-7-10)
- G' 값에 의한 겔 강도를 확인한 결과 폴리비닐알콜과 Citrus 펙틴을 9:1로 혼합하여 제작한 하이드로겔이 가장 높은 강도를 가지는 것을 확인함
- 폴리비닐알콜만으로 이루어진 하이드로겔 다음으로 해양 펙틴 용합 하이드로겔과 NOW사 제품 펙틴 하이드로겔의 강도가 거의 비슷한 것을 확인함
- 일반적으로 겔의 강도는 고분자 함유량, 고분자의 분자량 등에 영향을 받으며, NOW사 및 KIOST 펙틴의 경우 Sigma사 제품보다 저분자로 인해 상대적으로 Citrus 펙틴이 함유된 하이드로겔과 비교하여 강도가 약해진 것으로 사료됨

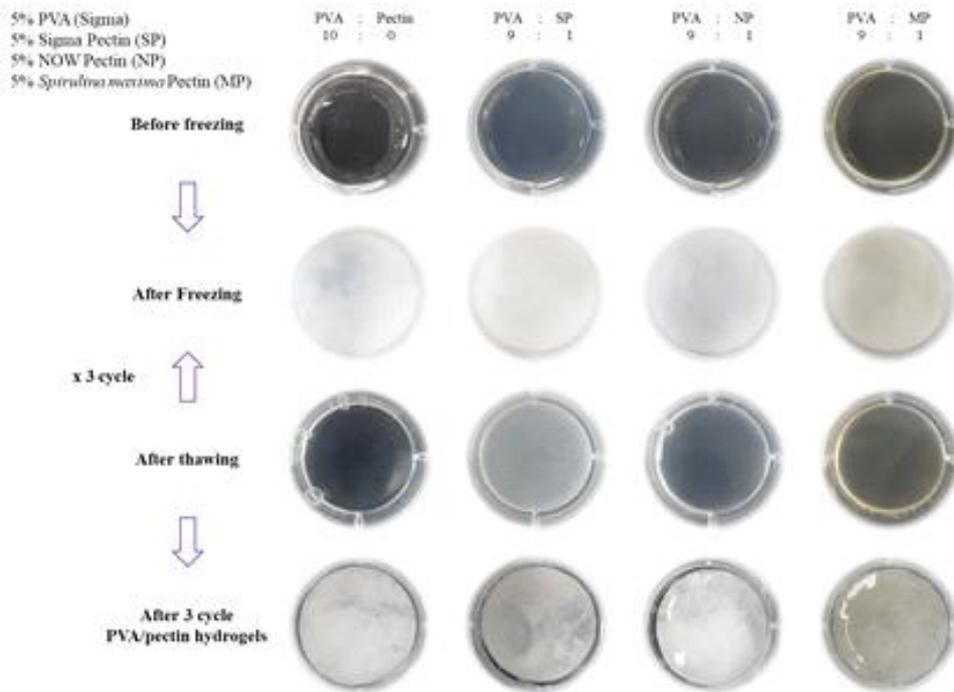


그림 4-7-9. 폴리비닐알콜과 해양 펙틴 포함 2개의 시판되는 펙틴을 이용한 하이드로겔 제작

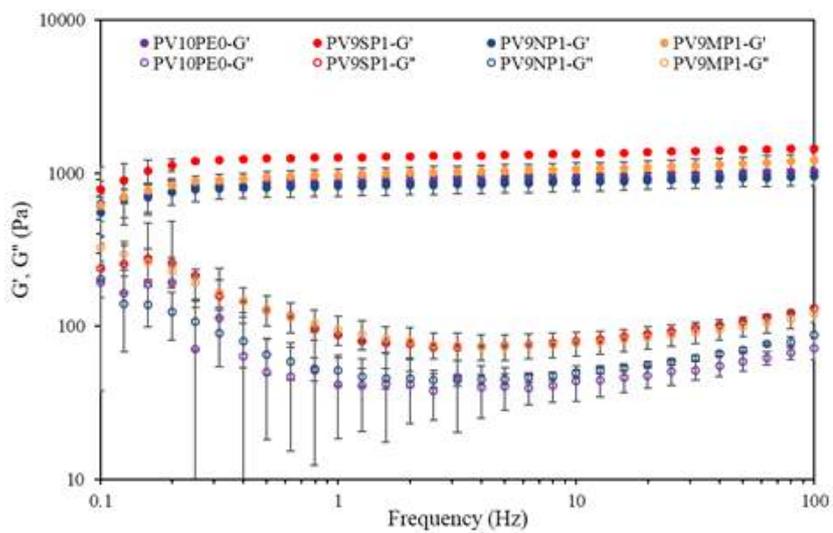


그림 4-7-10. 제작된 하이드로겔의 Rheometer 분석 결과

- 제작된 폴리비닐알콜과 해양 펙틴 융합 하이드로겔 외 시판제품 펙틴이 함유된 하이드로겔의 Gel fraction을 측정함
- Gel fraction 확인 결과, 모든 하이드로겔에서 약 80%의 높은 Gel fraction을 보이는 것을 확인하였고, 이는 1일 및 3일 동안 침지시킨 하이드로겔 모두에서 비슷한 결과를 나오는 것을 확인할 수 있었음(그림 4-7-11)
- 폴리비닐알콜과 Citrus 펙틴의 비율을 통해 최적의 배합비를 결정하는 실험에서 겔화율을 측정했을 때 9:1의 비율이 다른 비율보다 높은 겔화율을 보이는 것을 확인하였으며, 이러한 비율을 저분자 펙틴인 NOW 펙틴과 해양 펙틴을 혼합하였을때도 높은 겔화율을 보이는 것을 확인할 수 있었음

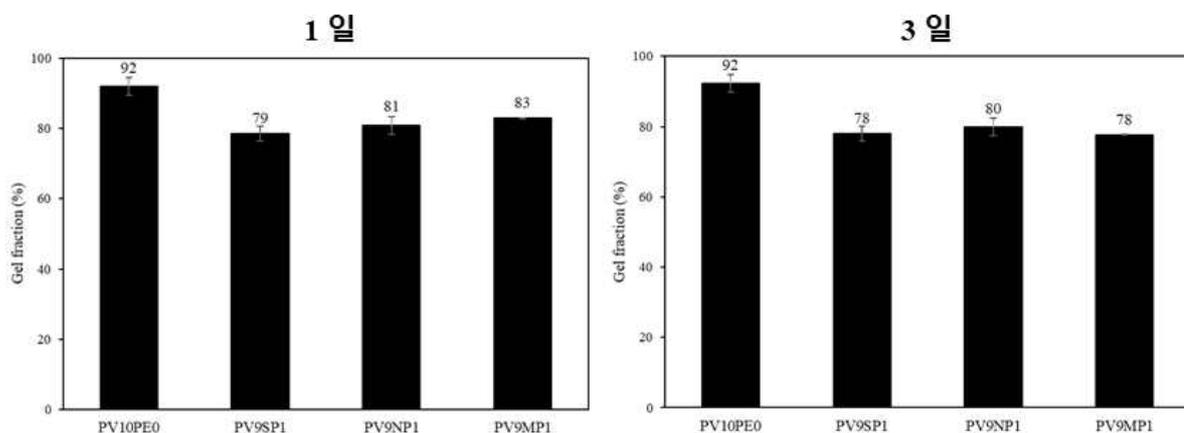


그림 4-7-11. 제작된 하이드로겔의 Gel fraction 결과

- 제작된 폴리비닐알콜과 해양 펙틴 융합 하이드로겔 외 시판제품 펙틴 융합 하이드로겔의 삼출물 흡수정도를 알아보기 위해 수분흡수율을 측정함
- 증류수 조건에서 실험한 결과, 모든 Citrus 펙틴과 해양 펙틴이 함유된 하이드로겔에서 높은 수분흡수율을 보이는 것을 확인하였으며, NOW 펙틴이 함유된 하이드로겔은 상대적으로 낮은 수분흡수율을 보였으나, 폴리비닐알콜로만 이루어진 하이드로겔 보다는 높은 수분흡수율을 보이는 것을 확인할 수 있었음(그림 4-7-12)
- 특히, 해양 펙틴 융합 하이드로겔의 수분흡수율이 다른 하이드로겔보다 높은 걸 확인할 수 있었으며, 이는 알지네이트와 해양 펙틴과는 상반된 결과를 보여주었으며, 이러한 결과는 알지네이트와 해양 펙틴의 경우 이온의 유무, 알지네이트 및 폴리비닐알콜과 해양 펙틴의 분자적 상호작용 등 추가적인 연구를 통한 확인이 필요할 것으로 사료됨

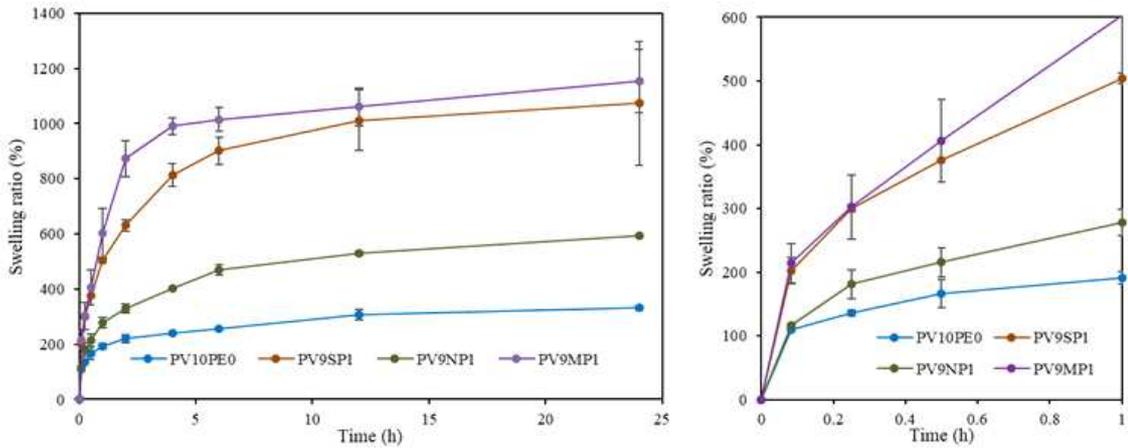


그림 4-7-12. 제작된 하이드로겔의 수분흡수율 측정 결과

- 최적의 배합비를 통해 제작된 해양 펙틴 융합 폴리비닐알콜 하이드로겔의 세포 내 독성평가를 실시하기 위해, 피부세포(NHDF-neo)와 각질세포(HaCaT)에서 Indirect 세포독성평가를 실시함
- Indirect 세포독성 실험결과 1일 및 3일동안 하이드로겔로부터 추출한 추출물을 1일 동안 피부세포(NHDF-neo)와 각질세포(HaCaT)에 처리하여 배양한 결과 무처리군과 비교하여 세포 생존률이 비슷한 것을 확인할 수 있었으며, 따라서 해당 폴리비닐알콜과 해양 펙틴 융합 하이드로겔은 세포독성이 없음을 확인함(그림 4-7-13)

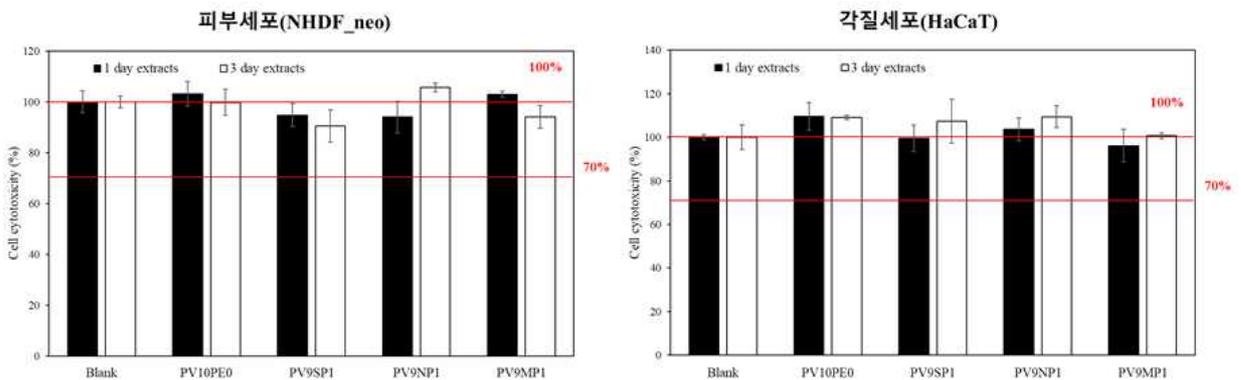


그림 4-7-13. 제작된 하이드로겔의 Indirect 세포독성실험 결과

- 8주차 마우스의 등 부분의 털을 제거한 후, 요오드링크를 사용하여 표피를 소독하고, 바이옵시 펀치(biopsy punch; 5 mm)를 이용하여 4개의 창상을 만들고 제작한 폴리비닐알콜과 해양 펙틴 융합 하이드로겔을 부착하여 창상회복 면적 측정을 통해 상처회복 정도를 시판되는 펙틴 융합 하이드로겔 및 Epiderm과 비교하여 확인함(그림 4-7-14)

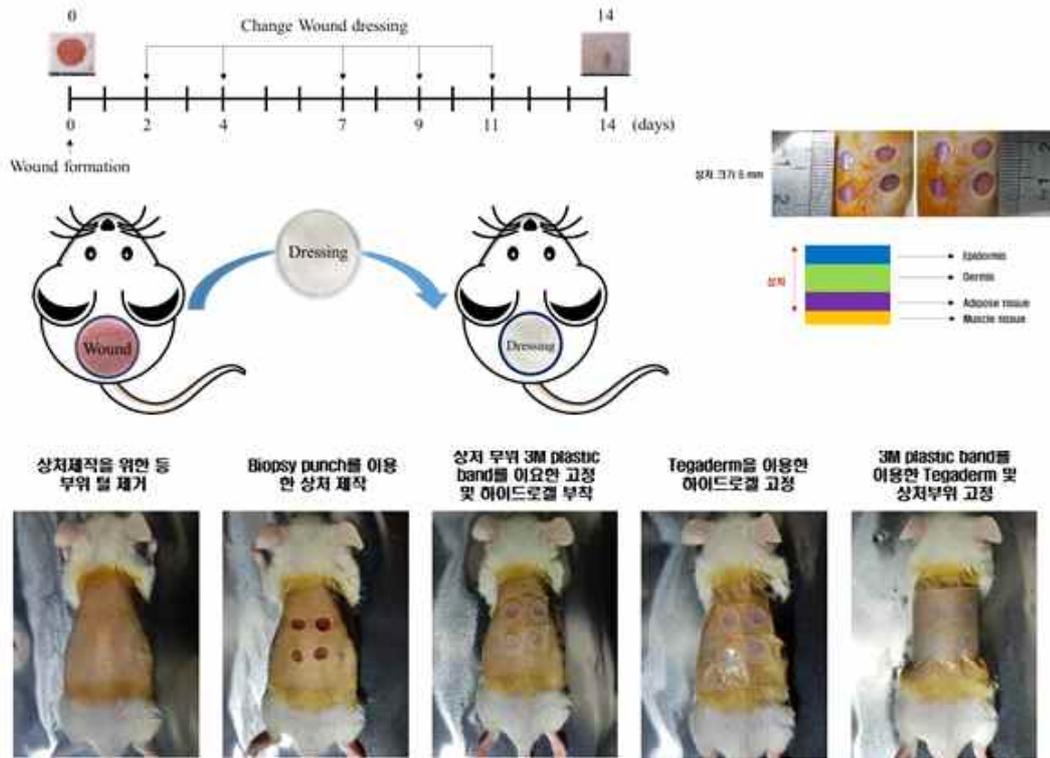


그림 4-7-14. 제작된 하이드로겔의 비임상 모델 효능평가 실험 과정

- 제작된 하이드로겔 부착 후 날짜별로 창상회복 면적을 확인한 결과, 무처리군과 비교하여, Epiderm 포함 제작된 모든 하이드로겔이 창상회복 효과가 있는 것을 확인하였음(그림 4-7-15)
- 특히 폴리비닐알콜과 해양 펙틴이 융합된 하이드로겔이 다른 그룹과 비교하여 2, 4 및 7일차에서 가장 좋은 창상회복 효과를 보이는 것으로 확인되었음
- 그 다음으로는 Epiderm과 폴리비닐알콜로만 제작된 하이드로겔이 좋은 창상회복 효과를 보이는 것을 확인하였으며, 그 뒤로는 Sigma사 및 NOW사 펙틴이 함유된 하이드로겔이 좋은 효과를 보이는 것을 확인할 수 있었음

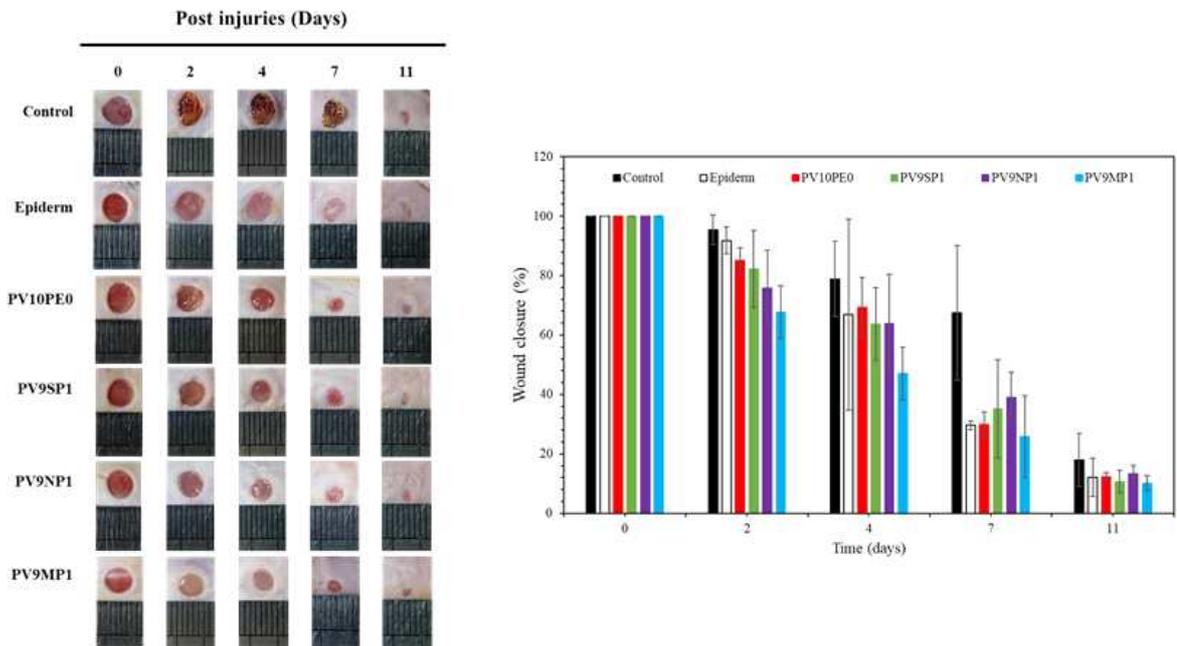


그림 4-7-15. 제작된 하이드로겔과 시판되는 Epiderm제품과의 비교를 통한 창상 치유 면적 결과

- 임상 모델에서 무처리군과 Epiderm 및 제작된 하이드로겔들을 창상 부위에 부착 한 후 21일 뒤에 해당 창상 조직들을 회수하고, H&E 조직 염색을 통하여 피부 조직 재생 결과를 normal skin (blank)와 비교 확인함(그림 4-7-16)
- 조직 염색 결과 창상을 유도하지 않은 일반 피부는 Epidermis (E)의 형성과 Hair follicles (HF)의 형성이 Dermis (D)안에 잘 형성되어 있는 것을 확인할 수 있었으며, 무처리군의 경우에는 Dermis (D) 안에 Hair follicles (HF)의 형성이 잘 안되어 있는 것을 볼 수 있었음
- 폴리비닐알콜과 해양 펙틴 융합 하이드로겔의 경우 다른 처리군들과 비교하여 Dermis (D)안에 Hair follicles (HF)의 형성이 잘 되어있고, 일반 피부와 가장 유사한 조직 형태를 보이는 것을 확인할 수 있었음
- 비임상 모델을 통한 상처치유 효능 및 조직 염색 결과 폴리비닐알콜과 해양 펙틴이 융합한 하이드로겔이 가장 우수한 상처 치유 효능을 보이는 것으로 확인됨

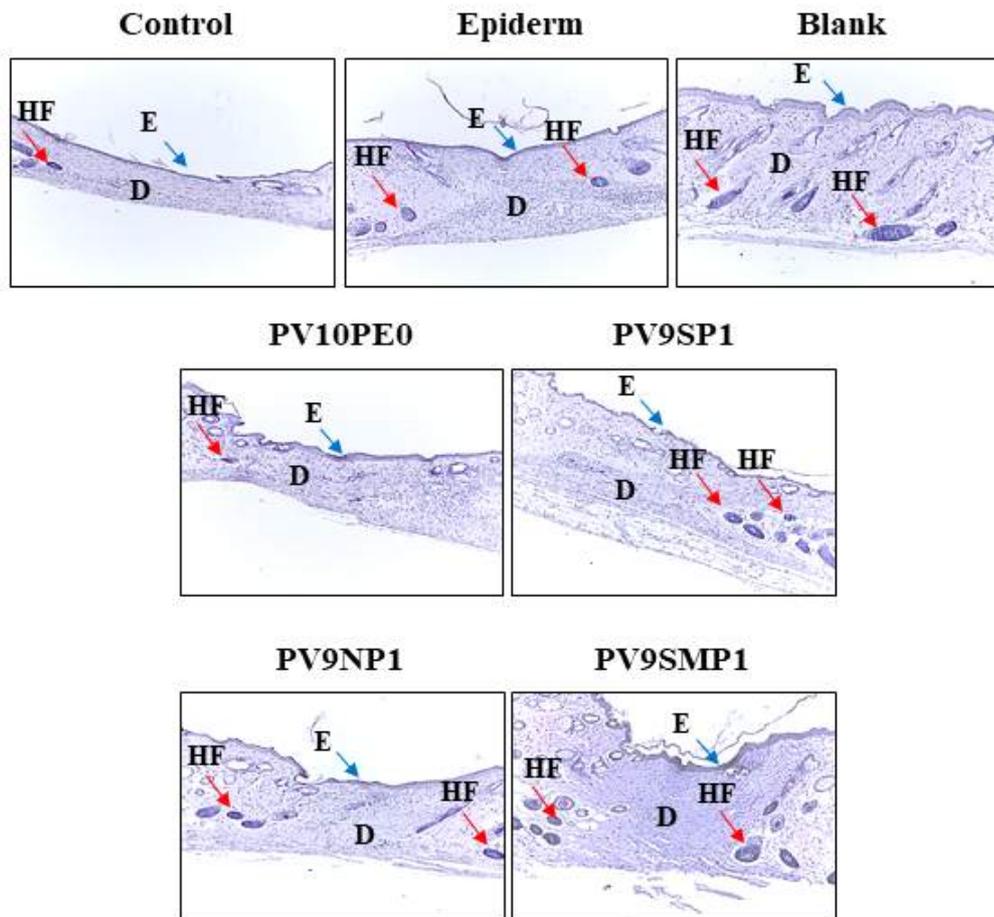


그림 4-7-16. 비임상 모델 창상 치유 21일 후 H&E 조직 염색 결과

○ 선별된 폴리비닐알콜과 해양 펙틴 융합 하이드로겔 시작품 제작

- 해양 펙틴 융합 바이오메디컬 시작품 제작을 위해 2차년도에 제작한 알지네이트와 해양 펙틴 융합 바이오메디컬 소재와 폴리비닐알콜과 해양 펙틴 융합 바이오메디컬 소재의 비임상 모델 피부상처 치료 효능을 비교함(그림 4-7-17)
- 비임상 모델 피부상처 치료 효능 비교 검토 결과 알지네이트 기반 해양 펙틴 융합 바이오메디컬 소재보다 폴리비닐알콜 기반 해양 펙틴 융합 바이오메디컬 소재가 우수한 피부 상처 치료 효능을 보이는 것을 확인함
- 또한, 알지네이트 및 폴리비닐알콜 기반 해양 펙틴 융합 바이오메디컬 소재의 주요 특성들을 비교한 결과 비록 알지네이트 기반 해양 펙틴 융합 바이오메디컬 소재가 높은 수분 흡수율과 기계적 강도를 보였지만, 폴리비닐알콜 기반 해양 펙틴 융합 바이오메디컬 소재의 피부 상처 치유 효능이 우수한 점과 알지네이트 기반 해양 펙틴 융합 바이오메디컬의 비임상 모델 내 피부 상처에 바이오메디컬 소재가 들러붙는 현상들을 고려하여 폴리비닐알콜 기반 해양 펙틴

융합 바이오메디컬 소재를 선별함(그림 4-7-18)

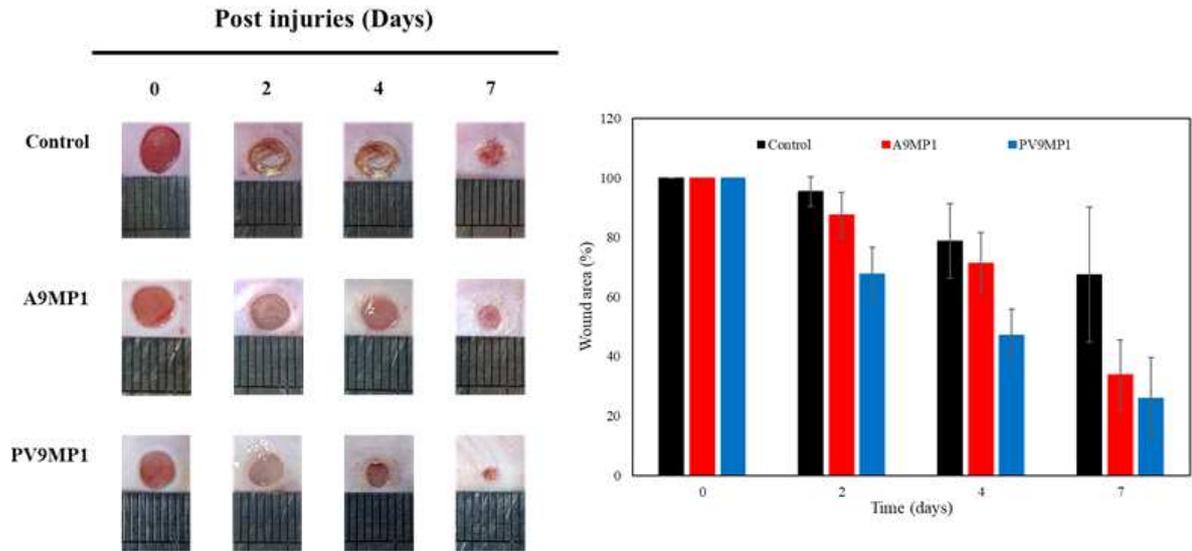


그림 4-7-17. 비임상 모델 효능평가 실험 과정

Foam type	Hydrogel type		Alginate	Alginate/ <i>Spirulina</i> pectin (A9MP1)
 Alginate/ <i>Spirulina</i> pectin foam dressing	 Alginate/ <i>Spirulina</i> pectin hydrogel dressing	겔화율 [% 3일]	85±0.7	83±0.3
		Foam 형태 기계적 강도 [kPa] 하이드로겔 강도 [Pa]	463±44 8940±74	669±179 8022±255
		수분흡수율 [% 24시간]	5978±193	5136±38
		피부상처 치유 효능 [% 2, 4, 7 days]	90±3, 95±4, 43±11	88±8, 71±10, 34±12
 PVA/ <i>Spirulina</i> pectin hydrogel dressing			PVA	PVA/ <i>Spirulina</i> pectin (PV9MP1)
		겔화율 [% 3일]	92±0.3	78±3.8
		하이드로겔 강도 [Pa]	882±48	1001±17
		수분흡수율 [% 24시간]	332±7	1153±115
		피부상처 치유 효능 [% 2, 4, 7 days]	85±4, 69±10, 30±4	68±9, 47±9, 26±14

그림 4-7-18. 알지네이트 및 폴리비닐알콜과 해양 펙틴 융합 바이오메디컬 소재 주요 특성 비교

- 비임상 효능 비교 검토를 통해 선정된 폴리비닐알콜 기반 해양 펙틴 융합 바이오메디컬 소재를 선별하여 시작품을 제작함(그림 4-7-19)
- 폴리비닐알콜 기반 해양 펙틴 융합 바이오메디컬 소재 제작 공정도는 스피룰리나 배양을 통해 펙틴을 추출하여 동결건조를 진행하는 단계와 폴리비닐알콜 (PVA)를 제작하여 동결건조된 펙틴을 이용한 용액을 제조하여 혼합한 후 동결-해동 과정을 통해 바이오메디컬 소재를 제작하여 최종 멸균 및 포장을 거치는 단계가 있음

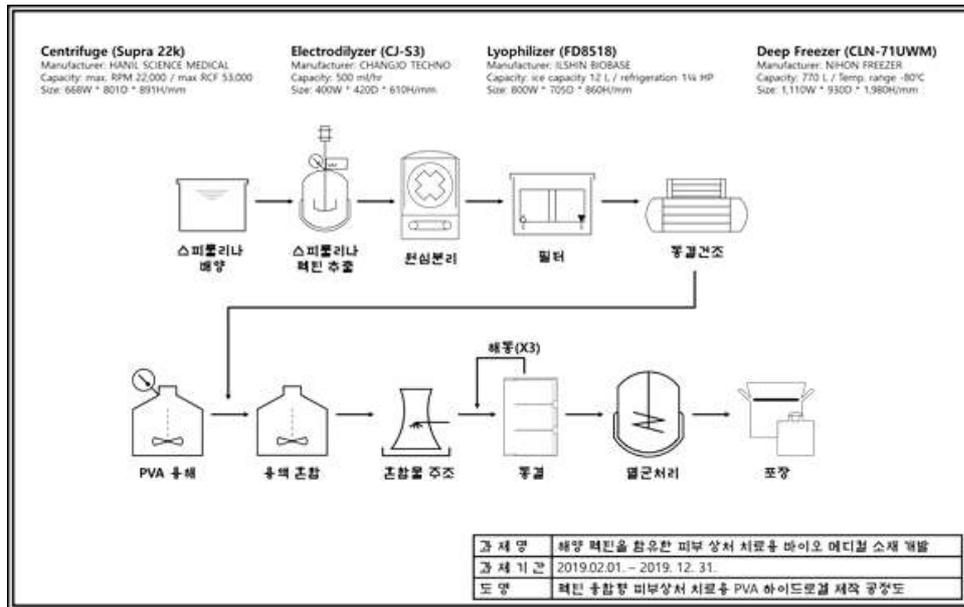


그림 4-7-19. 폴리비닐알콜 기반 해양 펙틴 용합 바이오메디컬 소재 시작품 제작

- 폴리비닐알콜 기반 해양 펙틴 용합 바이오메디컬 소재의 제작단가를 설정함(그림 7-2-20)
- Disc 3.9 inch (10 cm) 기준으로 1,000개를 제작하였을 때의 가격은 2,507,692원의 제작비용이 들어갔으며, 이를 1개 기준으로 설정하였을 시 약 2,508원의 제작단가가 나올것으로 예상됨

Disc (3.9", 10 cm)	1,000개 기준		PVA:해양 펙틴 비율 9:1
품목	단가	사용금액	비고
해양 펙틴, 1 kg	₩ 7,180,000	₩ 359,000	5% 1,000 m /l 50 g 사용
PVA, 1 kg	₩ 324,000	₩ 145,800	5% 9,000 ml / 450 g 사용
증류수, 18 L	₩ 14,000	₩ 7,778	10,000 ml
100 mm Petridish, 500/BOX	₩ 95,000	₩ 190,000	1,000 ea
기타소모품	₩ 50,000	₩ 50,000	킴와이프스, 라텍스 장갑 등
포장재	₩ 335	₩ 335,000	1,000 ea 기준
말근	₩ 550,000	₩ 550,000	Chamber 단위 55 만원
인건비	₩ 823,150	₩ 823,150	6일기준 연구원 및 연구보조원
장비및시설유지보수	₩ 46,964	₩ 46,964	초저온냉동고 및 교반기
합계		₩ 2,507,692	
해양 펙틴 용합 바이오메디컬 소재 개당 가격		₩ 2,508	



펙틴 미첨가 하이드로겔



펙틴 함유 하이드로겔

그림 4-7-20. 해양 펙틴 용합 폴리비닐알콜 바이오메디컬 소재 제작단가

- 제작된 폴리비닐알콜과 해양 펙틴 용합 바이오메디컬 소재 안전성 평가 확인
- 제작된 폴리비닐알콜과 해양 펙틴 용합 바이오메디컬 소재의 피부감작성 유무를 확인하기 위해 ISO10993-10 규정에 따라 피부감작성 시험을 실시함

- 마우스 등 부분을 제모하여 무처리군 (Blank), 폴리비닐알콜로 하이드로겔과 폴리비닐알콜과 해양 펙틴 융합 바이오메디컬 소재를 이용한 비교 실험을 진행함
- 피부 감작성 시험을 통해 피부에 나타나는 분리성 또는 반성 홍반 ~ 심한 홍반과 부풀어 오름 정도에 따라 ISO10993-10 규정에 제시되어 있는 점수표를 이용하여 실험한 결과 모든 동물에서 눈에 띄는 변화가 없음을 확인할 수 있었음(그림 7-2-21)

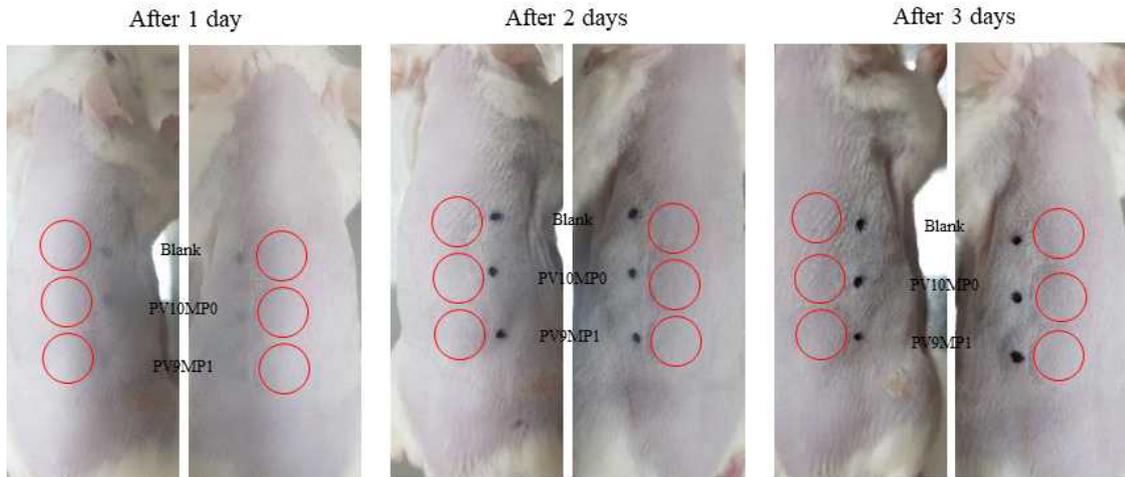


그림 4-7-21. 폴리비닐알콜과 해양 펙틴 융합 바이오메디컬 소재 피부감작성 시험 결과

- 제작된 폴리비닐알콜과 해양 펙틴 융합 바이오메디컬 소재의 피내반응 유무를 확인하기 위해 ISO10993-10 규정에 따라 피내반응 시험을 실시함
- 마우스 등 부분을 제모하여 각 부위에 PBS (Blank), 폴리비닐알콜 하이드로겔 추출 용액과 폴리비닐알콜과 해양 펙틴 융합 바이오메디컬 소재 추출물을 이용하여 비교 실험을 진행함
- 홍반 및 가피의 형성 유무와 부종의 형성 정도를 ISO10993-10 규정에 제시되어 있는 점수표를 활용하여 실험한 결과 모든 동물에서 홍반 및 가피의 형성이나 부종의 형성이 관찰되지 않을 것을 확인할 수 있었음(그림 4-7-22)

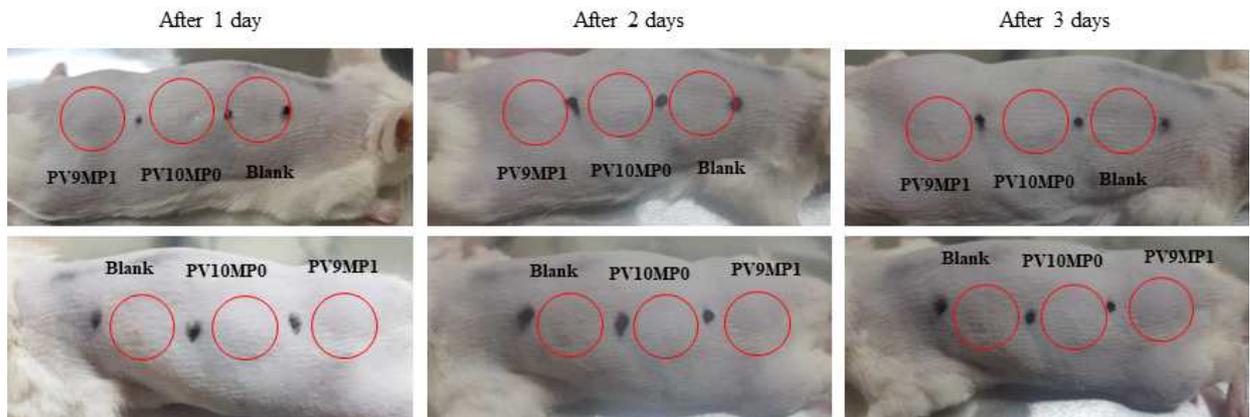


그림 4-7-22. 폴리비닐알콜과 해양 펙틴 융합 바이오메디컬 소재 피내반응 시험 결과

5. 수층공간 먹이생물 분포도

가. 수층공간 먹이생물 분포도

○ 해역 수층별 수질환경 조사

- 수층공간 활용을 위한 통영 남부 해상과학기지 주변 원형가두리 및 만지도와 외부지도 인근 3개 지점에서 2019년 1월-10월까지 수심 -45 ~ 60m 수층별 수온, 염분, 용존산소 등을 측정 분석함

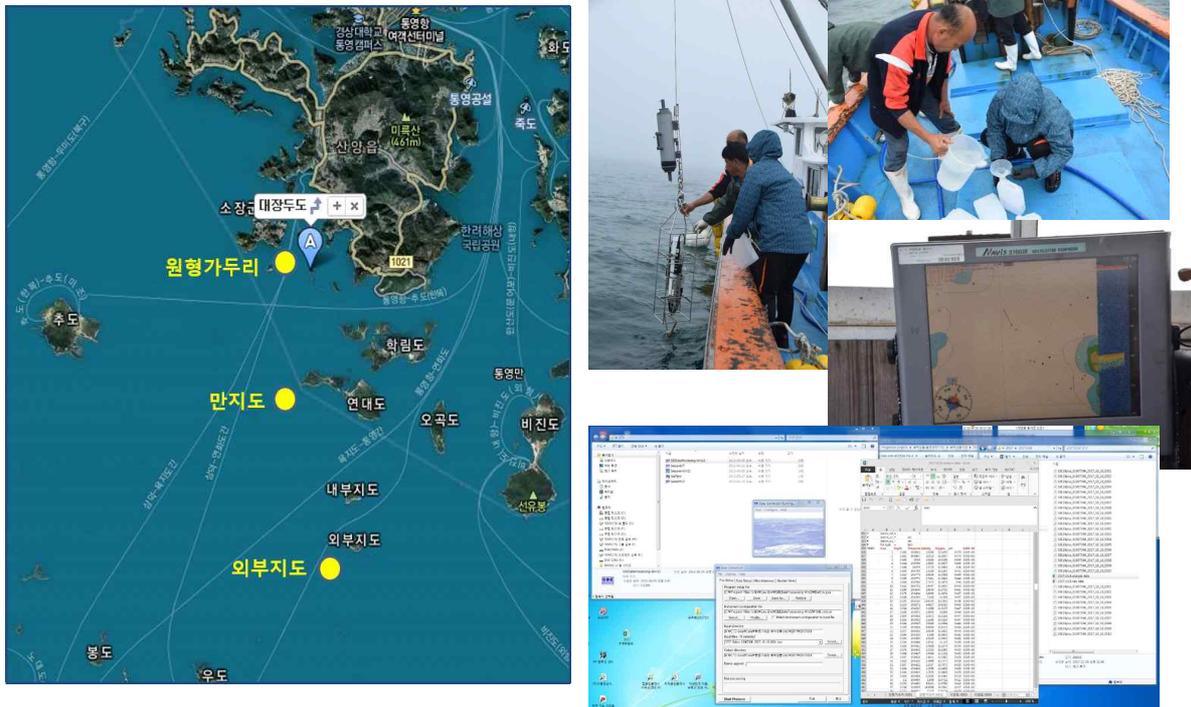


그림 5-1-1. 수층공간 활용을 위한 수질환경 조사 정점 및 분석

● 원형가두리

- 수온: 겨울철과 봄철인 1월-4월 동안 15 °C 이하로 낮은 수온을 보임, 5월부터 표층수온이 상승하여 8월에 표층-16m까지는 25°C를 유지하였으나, 수심 16-35m 사이에 급격한 수온하강으로 수온약층이 형성됨.

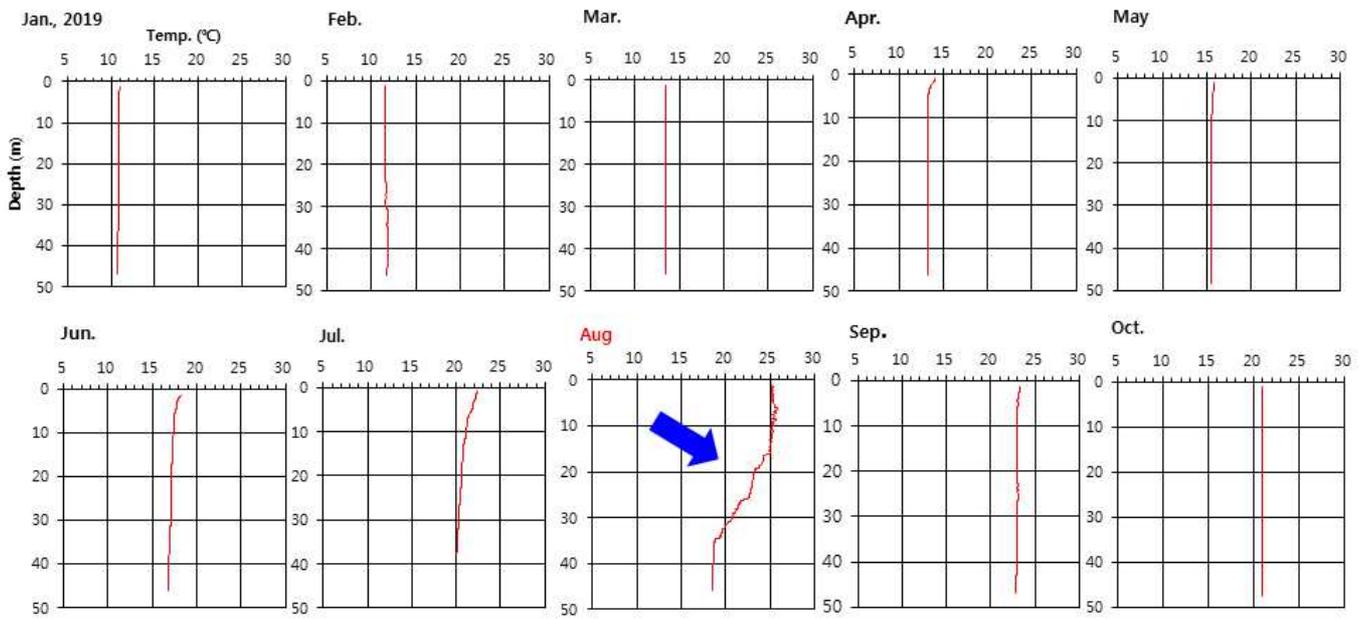


그림 5-1-2. 원형가두리 주변 수층의 시·공간적 수온 변화

- 염분: 겨울에서 초여름인 6월까지 34.0 psu 전후의 염분을 유지하였으나, 7월부터 표층 염분이 감소하면서 10월까지 32.0 psu 전후를 유지함. 특히 8월의 경우 수심 35m까지 수층별 낮은 염분 변화를 보임.

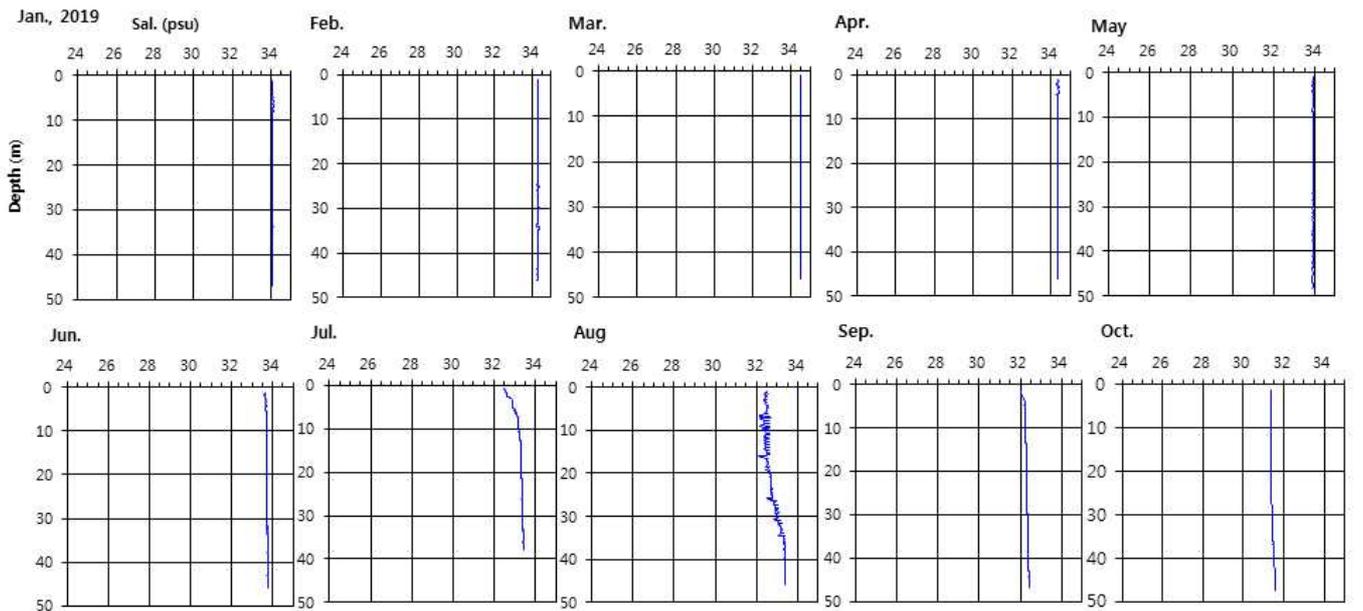


그림 5-1-3. 원형가두리 주변 수층의 시·공간적 염분 변화

- 용존산소: 1월-3월까지 9.0 mg/L 전후의 값을 보였으나, 4월부터 6 mg/L 이하로 감소하였음. 특히 8월은 수심 18 m 아래서 4 mg/L 이하로 매우 낮은 용존산소 농도를 보임.

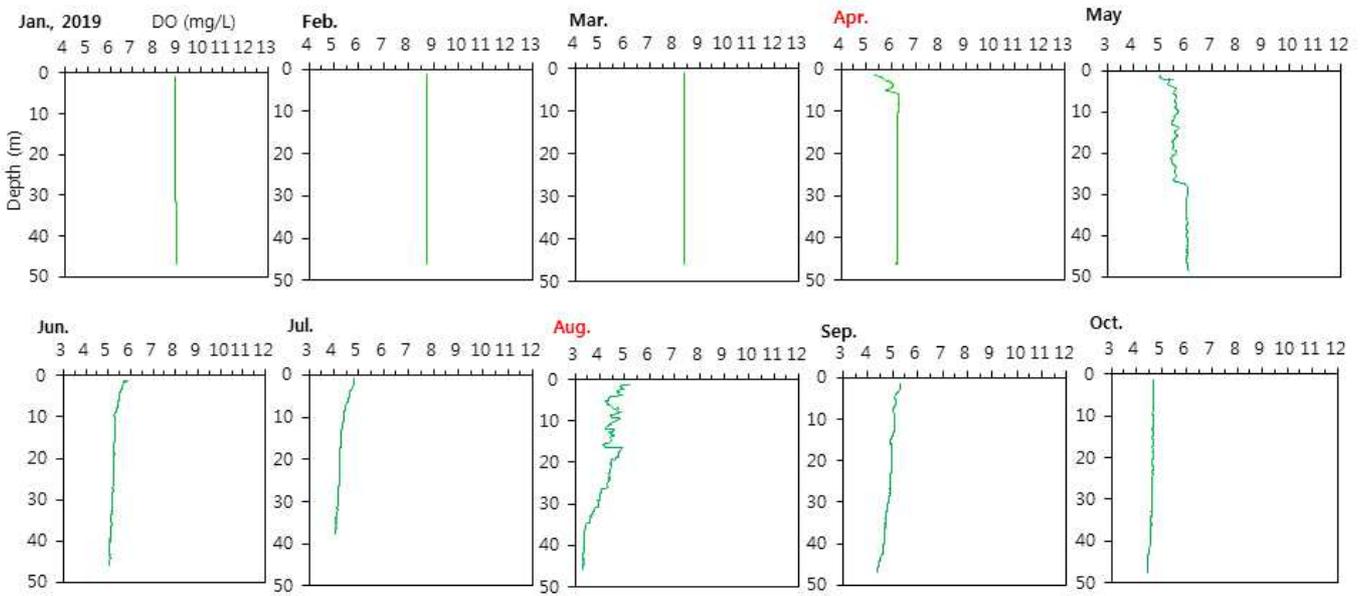


그림 5-1-4. 원형가두리 주변 수층의 시·공간적 용존산소 변화

● 만지도

- 수온: 1월-3월은 11-13.5℃의 수온을 보였으나, 4월부터 증가하여 5월과 6월은 표층수온이 18-19℃, 8월은 수심 16m까지 25℃였으나 16-40m에서 수온약층이 형성됨

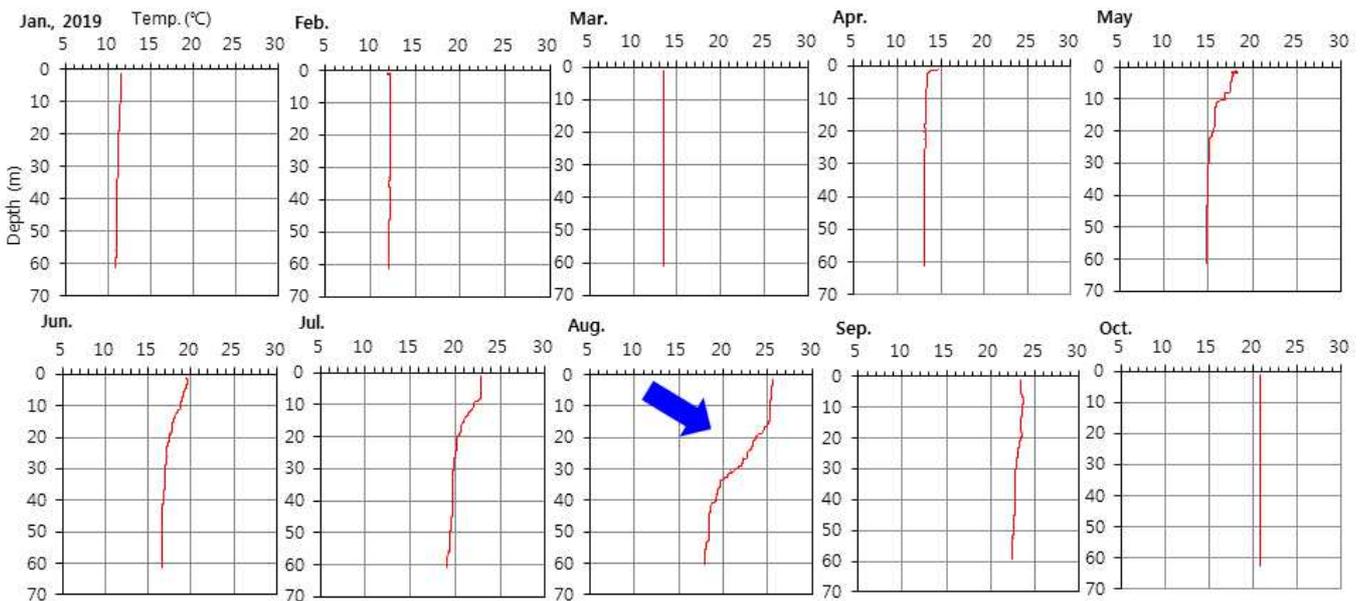


그림 5-1-5. 만지도 주변 수층의 시·공간적 수온 변화

- 염분: 2019년 1월-4월까지 34.0 psu를 유지하였으나, 5월부터 그 이하로 감소하여 8월은 17-43m 사이에서 염분약층 형성하였음. 또한 9월과 10월에도 저층은 낮은 염분을 나타냄.

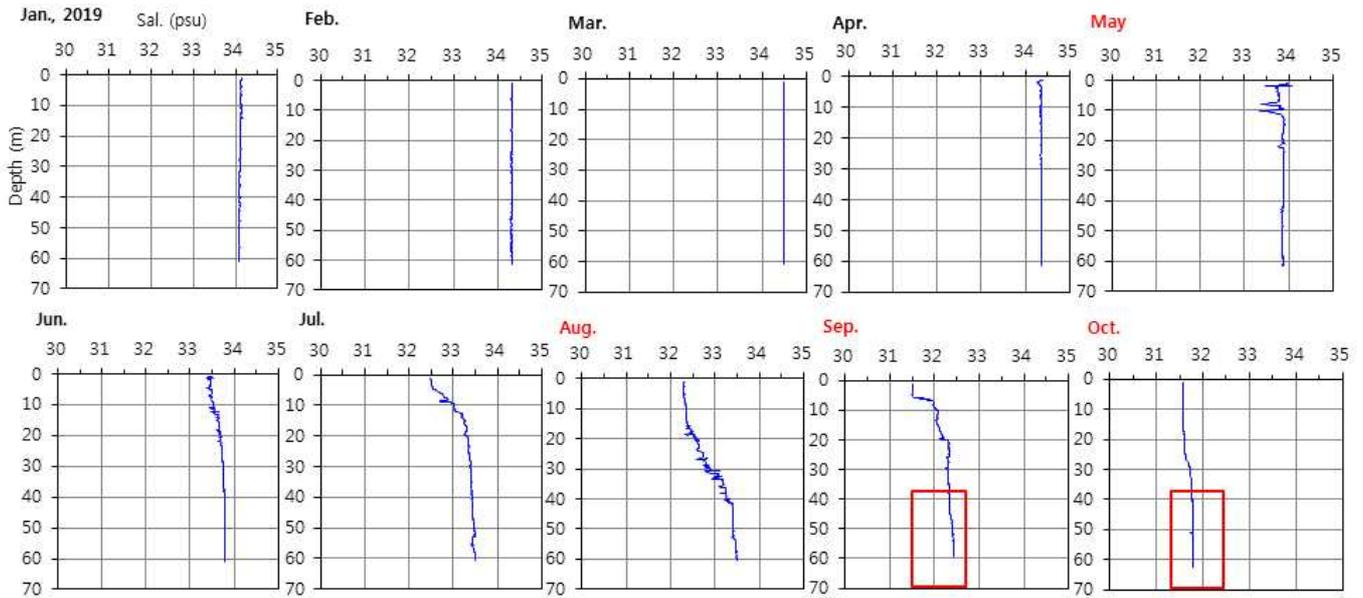


그림 5-1-6. 만지도 주변 수층의 시·공간적 염분 변화

- 용존산소: 1-3월 동안은 8.5 mg/L 전후의 값을 유지하였으나, 4월부터 감소하여 7월에 5-18m 사이에 약층 현상을 보이고, 8월에 수심이 더욱 깊어져 12-42m 사이에 급격한 용존산소 변화를 보임.

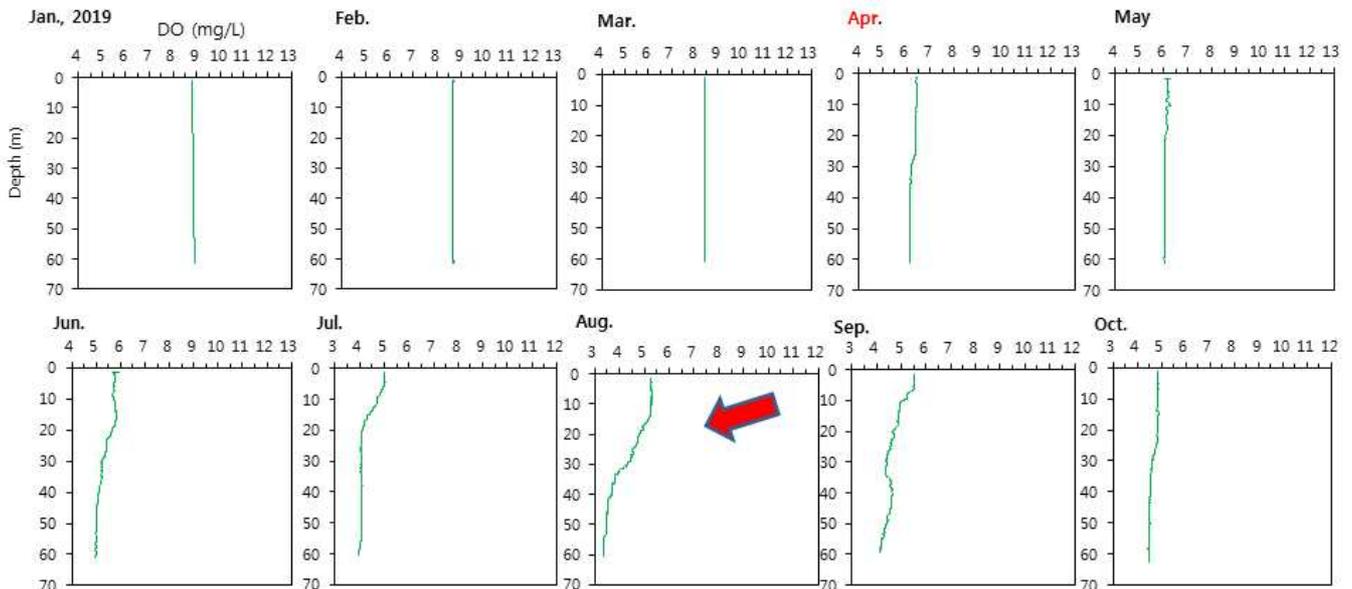


그림 5-1-7. 만지도 주변 수층의 시·공간적 용존산소 변화

• 외부지도

- 수온: 외측의 외부지도 주변 수온은 1-4월에 11-13℃를 보이고, 5월부터 표층수온이 증가하면서 8월에 수심 15-40m에서 수온약층이 형성됨. 9월부터는 표층수온이 감소하면서 수층별 수온 안정화가 진행됨.

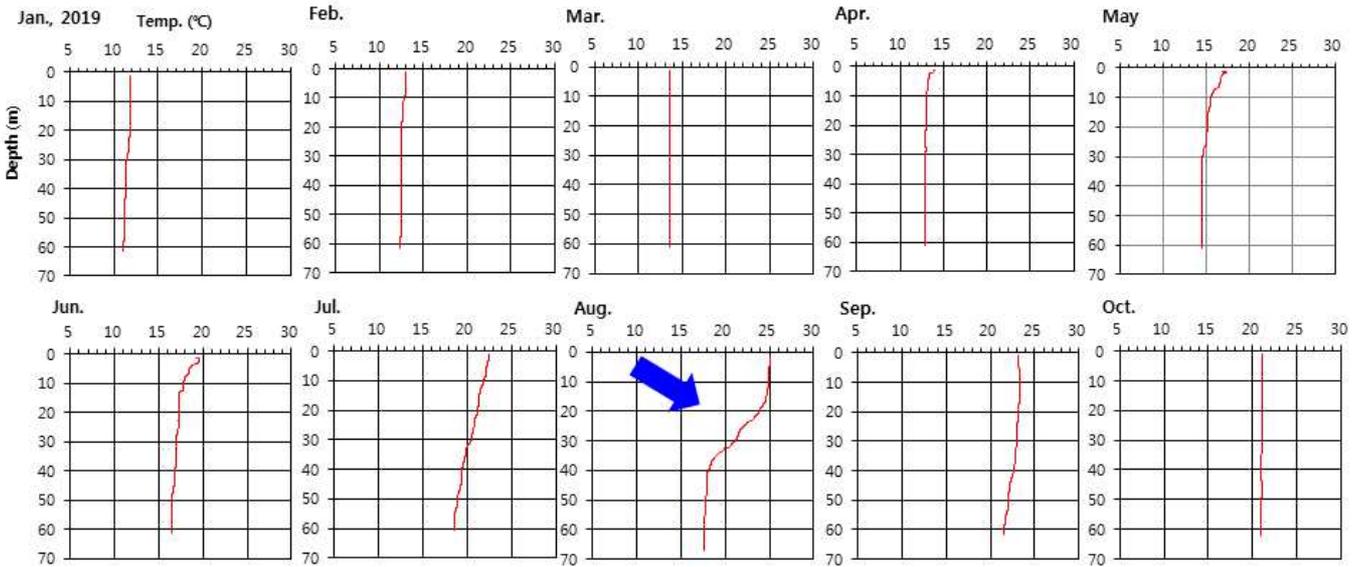


그림 5-1-8. 외부지도 주변 수층의 시·공간적 수온 변화

- 염분: 1-4월에 34.0 psu 이상을 유지하였으나, 5월부터 표층염분이 감소하면서 8월에는 수심 17-40m 사이에 염분약층이 형성됨. 또한 9월과 10월에도 표층염분은 더욱 낮아지는 경향을 보임.

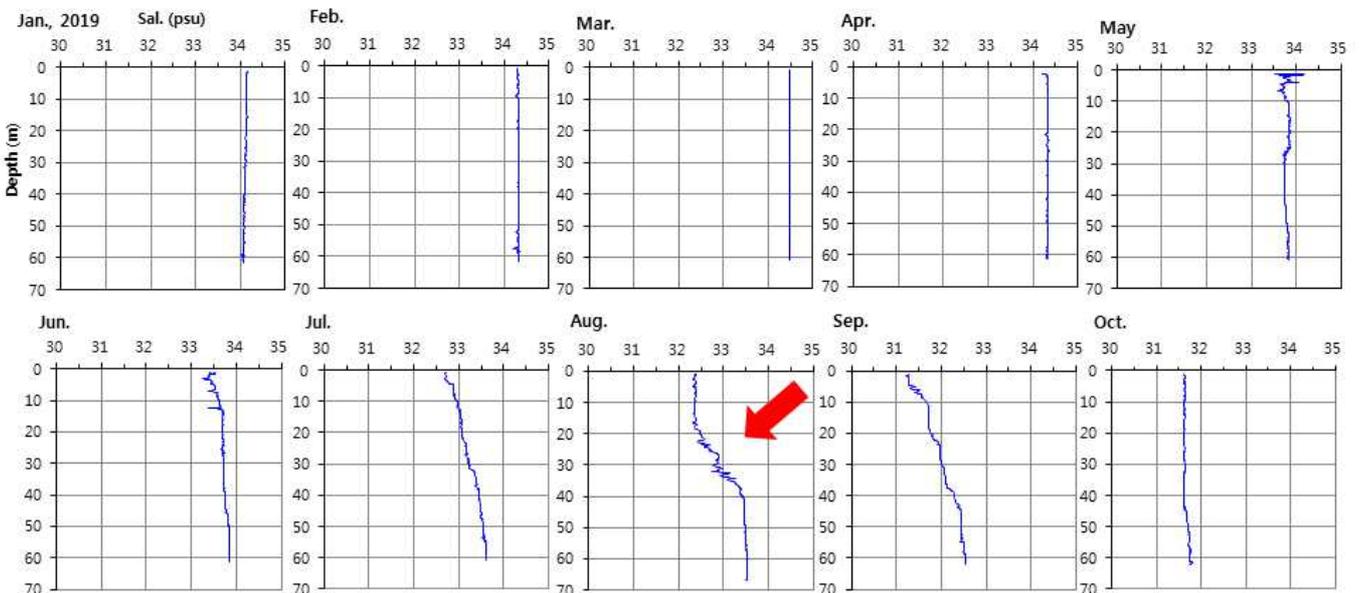


그림 5-1-9. 외부지도 주변 수층의 시·공간적 염분 변화

- 용존산소: 1-3월에 8.5 mg/L 전후의 농도를 보였으나, 4월부터 급격한 감소로 6.0 mg/L 전후의 값을 나타냈음. 이후 8월에 수심 15-40m에서 급격한 감소를 보였으며, 9월까지 유지되었음. 10월에도 낮은 용존산소는 회복되지 못하고 있음.

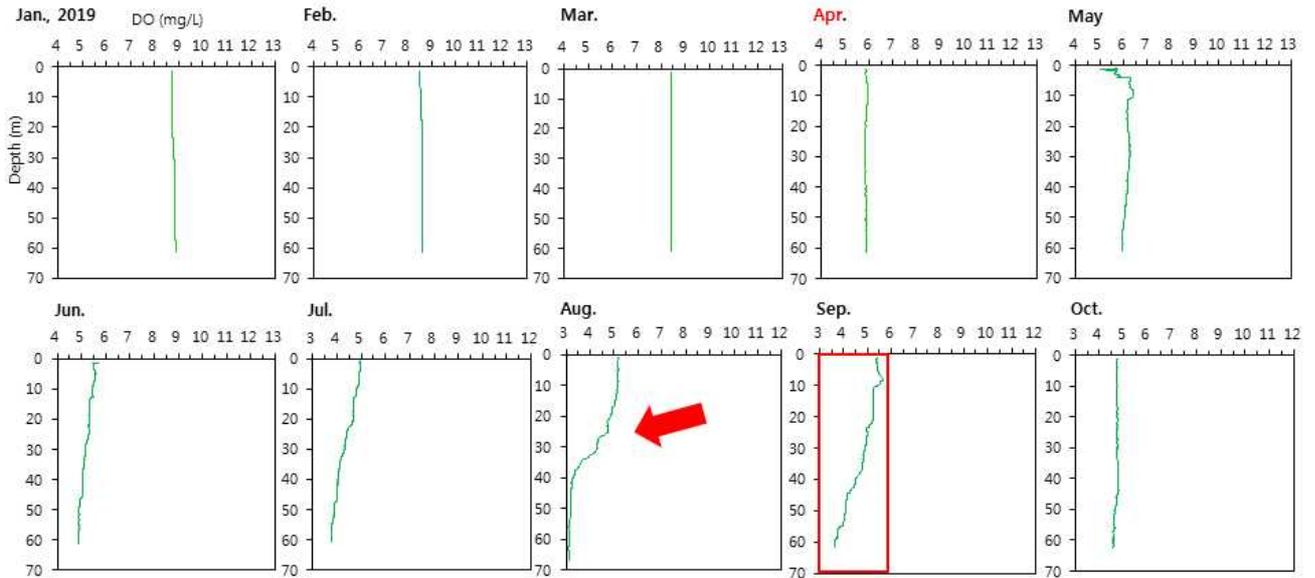
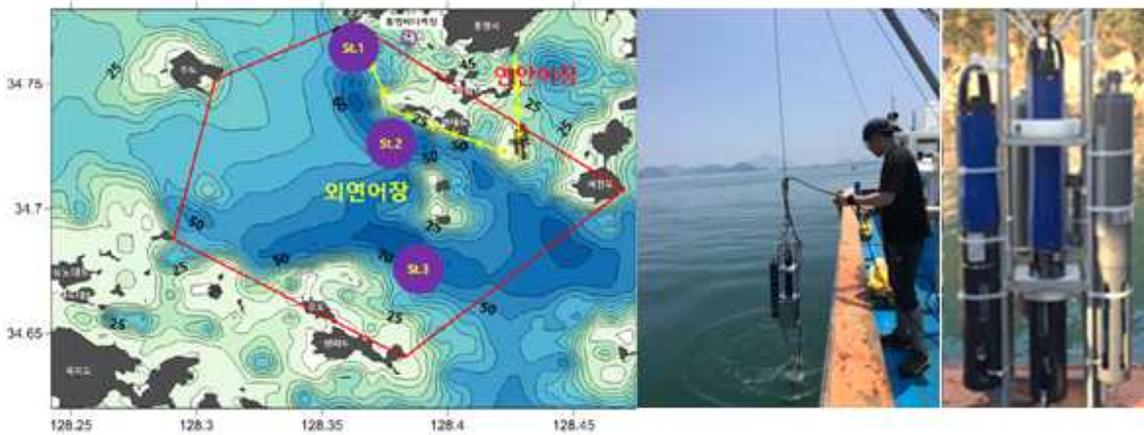


그림 5-1-10. 외부지지도 주변 수층의 시·공간적 용존산소 변화

- ▶ 종합 결론 : 3개 해역에서 수층공간별 환경 조사결과는 다음과 같다
 - 수 온: 1월 ~ 4월 까지 전 수층이 15°C 이하로 같은 양상을 보이고 있으며, 5월부터 표층부터 수온이 상승하여 6월부터 수온약층이 형성되어 8월 ~ 9월에 -20m 이하에서 수온약층이 뚜렷하게 형성 됨.
 - 염 분: 염분은 1월 ~ 6월까지 34 Psu를 나타내고 있었으며 7월부터 저염분이 진행되었으며 특히 8,9,10 월에는 뚜렷하게 수층별로 저염분 상태를 유지 하였다.
 - 용존산소(DO): 용존산소는 1월 ~ 6월까지 안정적인 양상을 보이고 있었으며 7월부터 수층별로 용존량이 감소하기 시작하여 8월 -35m 이하에서는 생물학적 위험 수위인 3.5ml/l 까지 도달 빈산소 양상을 나타내고 있다.

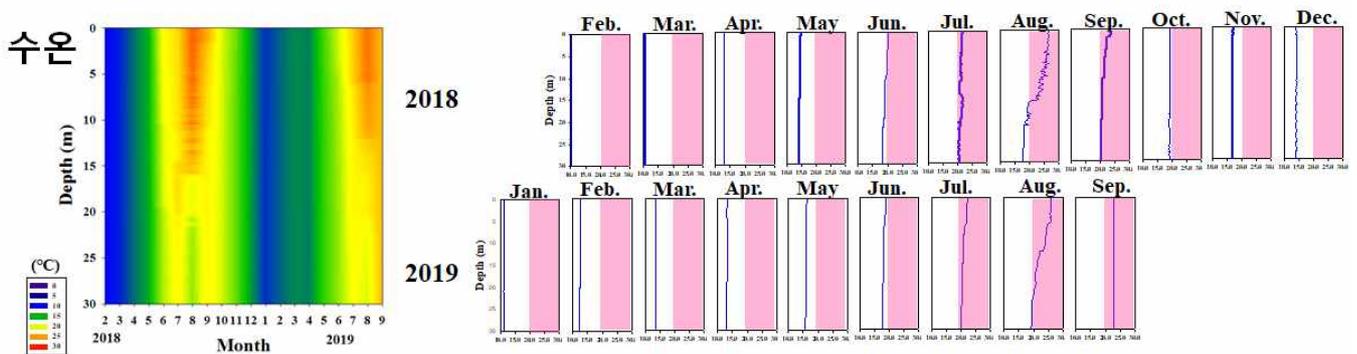
○ 수심별 해양 환경 관측을 통한 냉수성 양식 생물의 적정 서식지 파악

- 해양 환경 관측(수온, 염분, 용존산소, 영양염류): 2018년 2월~2019년 9월까지 고정 조사정점 (정점 1, 그림 5-1-11)에서 수심별 (0m, 10m, 20m, 30m)로 해양 환경 관측을 수행함 (그림 5-1-11).



[그림 5-1-11] 해양 환경 관측 정점 및 조사 장비

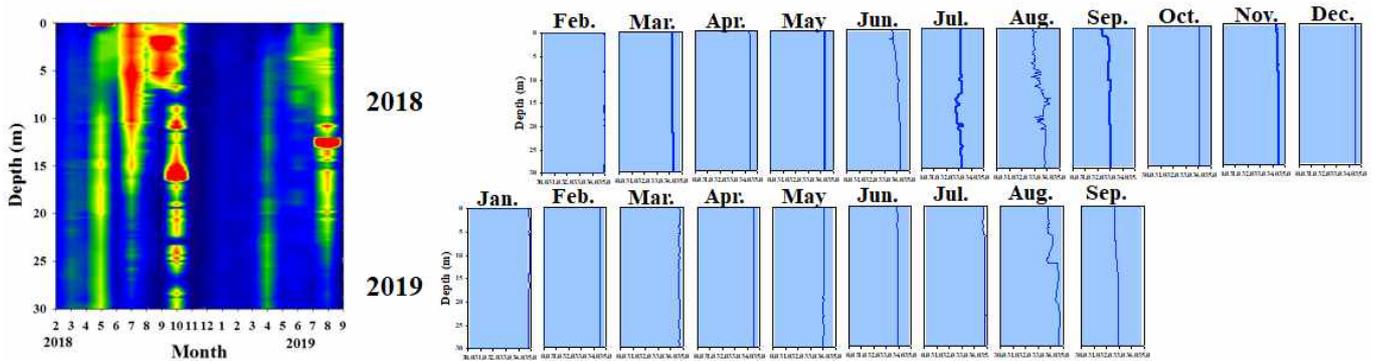
- 월별 수심에 대한 평균 수온은 2018년~2019년 조사 기간중 2월에 가장 낮았고 점차적으로 증가하여 8월에 가장 높았으며, 9월에 다시 감소하는 계절적인 변화를 보임. 수심별 수온의 변화는 8월을 제외하고 표층에서 30m 수심까지의 큰 차이를 보이지 않음. 가리비와 같은 부착성 패류는 서식장소의 수온이 대사 작용과 먹이 섭취 등에 직접적인 영향을 미친다고 보고되어 있음(Newell and Kofoed, 1977). 2월부터 5월까지의 수온은 10~16°C로 수심에 따른 변화는 크게 없으며, 동해안 참가리비의 봄 성장기의 수온(3월~5월, 8~13°C)과 유사함(Park et al., 2001). 2018년 8월에는 표층에서 26.52°C로 가장 높았고, 29.4m에서 17.82°C로 8.7°C의 수온차이를 보였음. 2019년 8월은 2018년과 같이 표층에서 25.95 °C, 30m에서 19.19°C로 6.76°C의 수온차를 보였음. 15~16m 수심에서 수온이 급격히 낮아지는 수온약층이 나타남 (그림 5-1-12). 수층별 수온양상을 볼 때 여름철 고수온기 가리비류의 대량폐사 원인의 하나인 수온 22°C 이하가 수심 -30m이하에 안정적으로 유지되므로 냉수성 패류의 양성조건으로 알맞은 것 같다.



[그림 5-1-12] 수온의 시공간적 분포 및 월별 수직 분포

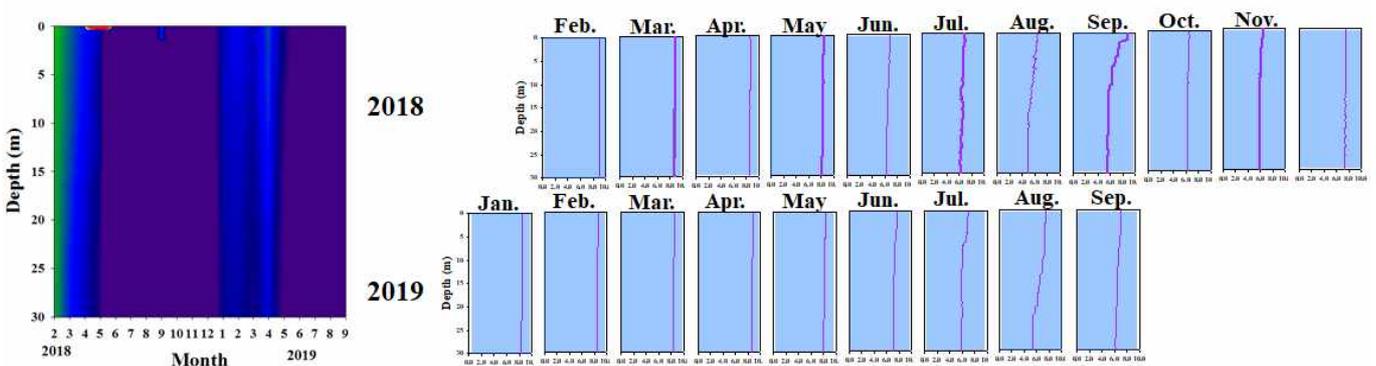
- 정점 1에서 월별 수심에 대한 평균 염분은 2018년 2월에 가장 높았고, 2019년 9월에 가장 낮았으며, 4월에 다소 증가하였으나 시간에 따라 감소하는 양상을 보였음. 2018년에 비해 2019

년에 평균 염분이 높았다. 정점 1에서 수심별 염분의 변화는 2018년 2월부터 5월과 2019년 1월부터 6월까지 표층에서 30m 수심까지 큰 차이를 보이지 않았으나 6월부터 9월까지는 표층에 비해 저층에서 더 낮은 염분 값을 보임. 참가리비 1년생의 개체는 22.5 에서 폐사가 일어나고, 32.4~33.7에서 섬모의 운동성이 최적이라 알려져 있음(Maru et al., 1985). 따라서 연구 기간 동안 본 해역에서 염분은 비단가리비, 참가리비가 성장하기에 적절하다고 판단됨 (그림 5-1-13).



[그림 5-1-13] 염분의 시공간적 분포 및 월별 수직 분포

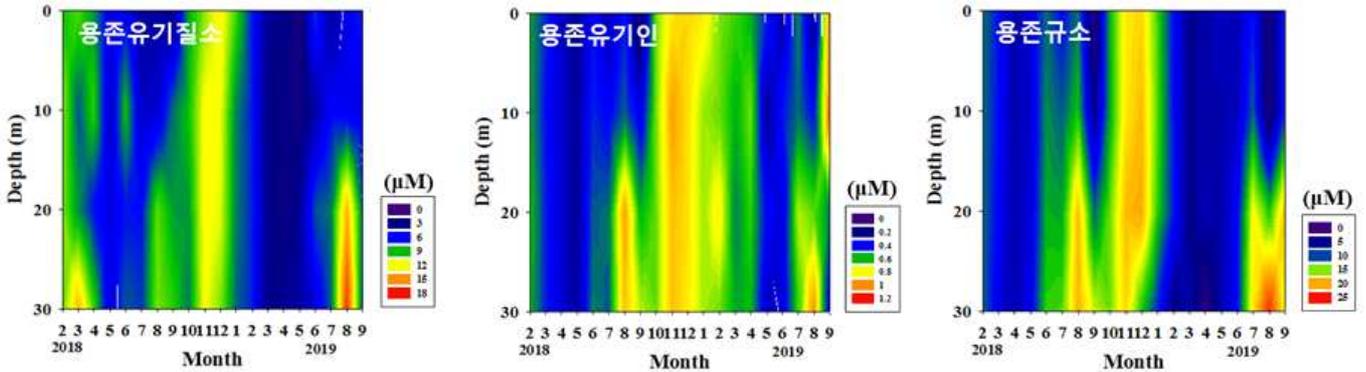
- 정점 1에서 월별 수심에 대한 평균 용존산소는 대체적으로 겨울철에 높았으며 2018년 2월에 가장 높았다. 점차적으로 감소하여 8월에 가장 낮음. 정점 2와 3에서 수심에 대한 평균 용존산소는 정점 1과 유사한 변화를 보임. 수심별 용존산소의 변화는 2018년 2월부터 5월, 2019년 1월부터 5월까지의 표층에서 30m 수심까지 큰 차이를 보이지 않았으나 6월부터 9월까지는 표층에서 높고 수심이 깊어질수록 감소하는 양상을 보임 (그림 5-1-14).



[그림 5-1-14] 용존산소의 시공간적 분포 및 월별 수직 분포

- 영양염류는 용존무기질소, 용존무기인, 용존규소에 대해 정점 1에서 수심별 표층, 10m(2019년 5m), 20m, 30m 로 분석을 실시함. 2018년 2월부터 2019년 9월까지 분석 결과, 월별 수심에 대한 평균 농도는 용존무기질소는 2019년 5월에 가장 낮고 2018년 11월에 가장 높았음. 용존무

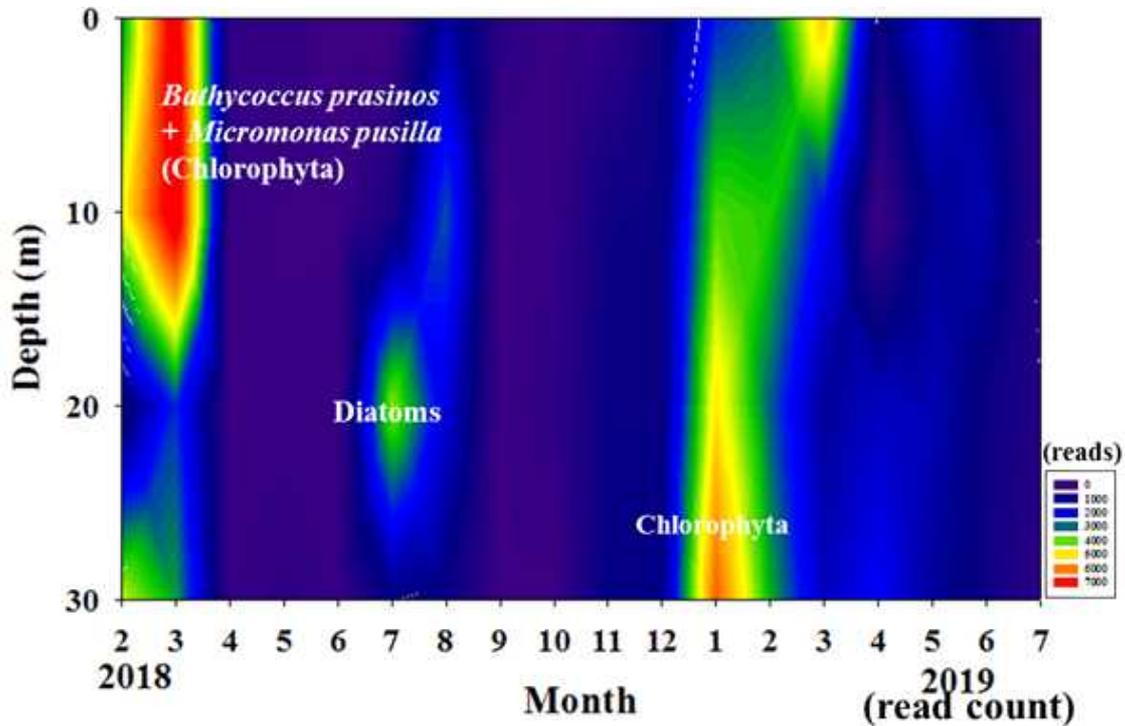
기인은 2018년 5월에 가장 낮고 2018년 11월에 가장 높음. 용존규소는 2019년 3월에 가장 낮고 2018년 12월에 가장 높았음. 수심별 용존무기질소 농도의 변화는 전반적으로 수심이 깊어질수록 농도가 증가하는 경향을 보이며, 특히 7월부터 9월에 뚜렷한 증가패턴을 보임. 용존무기기와 용존규소는 2018년과 2019년 모두 2월부터 6월까지는 수심에 따른 농도의 차이를 크게 보이지 않았으나, 용존무기질소와 마찬가지로 7월부터 9월에 수심에 따라 증가하는 변화를 보임(그림 5-1-15)



[그림 5-1-15] 용존무기질소, 용존무기인, 용존규소의 월별 및 수직 분포

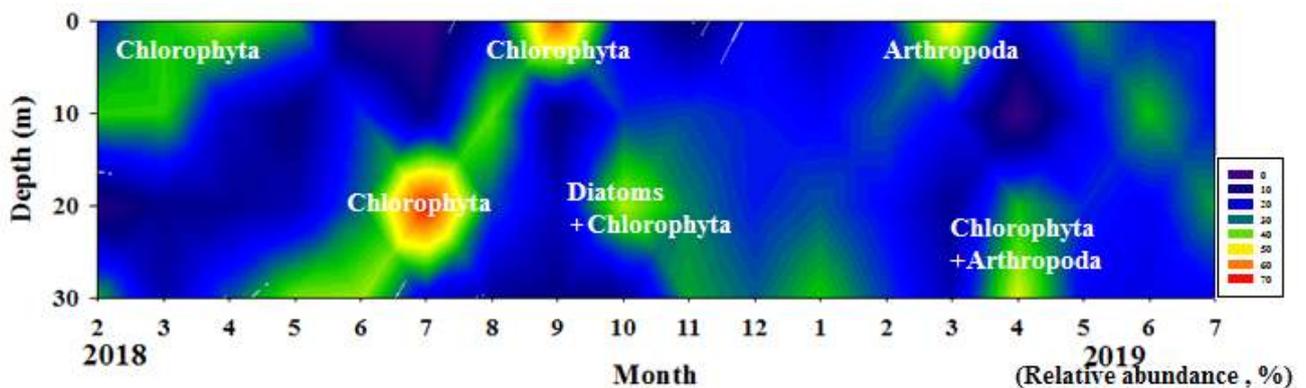
○ 수심별 먹이 생물의 분포

- 수심별 먹이생물 분포: 2018년 2월~2019년 7월까지 월별 수심별 수층내 먹이생물 분포 변화를 파악함.
- 가리비 먹이원에 대한 조사를 위해 가리비 양식어장인 정점 1에서 해수 내 먹이생물에 대한 조사를 실시함. 2018년 2월부터 2019년 7월까지 수심 표층, 10m(2019년 5m), 20m, 30m 해수를 채수하여 해수 내 생물의 gDNA를 추출함. 추출된 gDNA는 CO1 DNA marker를 이용하여 차세대염기서열(NGS) 분석을 실시함.
- 조사기간 동안의 전체 샘플의 NGS 분석 결과, 녹조류가 69%, 규조류가 6%, 절지동물 13%, 척삭동물 5%, 그 외 식물플랑크톤 25%가 나타남 (그림 5-1-16).



[그림 5-1-16] 해수와 가리비 위내용물에서 출현한 먹이생물 그룹 변동 (%)

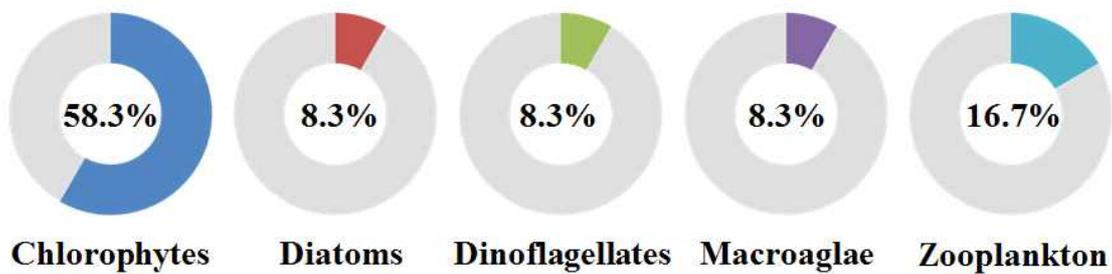
- 1% 이상의 비율을 보인 먹이생물 중 녹조류는 *Bathycoccus prasinos*(22.4%), *Micromonas pusilla*(6.9%), *Micromonas* sp.(1.3%), 규조류는 *Coscinodiscophyceae* (2.7%) 임. 계절별로는 겨울철에는 수심에 관계없이 녹조류가 높은 분포를 보인 반면, 여름철에는 20m 이하에서 규조류 및 녹조류가 높은 빈도로 출현하여, 효율적인 양식자원의 개발을 위해서 정확한 수층공간을 활용해야 한다고 판단됨 (그림 5-1-17). 해수 내 식물플랑크톤에 대해 현미경과 NGS 분석 결과를 비교하였을 때, 현미경에서는 주요 우점종 모두 규조류가 출현하는 등 규조류가 가장 높은 비율을 보였으나 NGS 분석 결과 녹조류가 가장 높은 비율을 차지함. 이는 분석 방법의 차이에 의한 결과로써, 현미경은 녹조류와 같이 작은 크기의 식물플랑크톤을 검정하기에 어려움이 있으나 NGS는 유전자를 이용하므로 생물의 크기에 대한 제한이 없어, 현미경 분석에 대한 한계점을 보완할 수 있다고 생각됨.



[그림 5-1-17] 가리비 양식장(정점 1) 해수에서 출현한 먹이생물 그룹 변동 (relative abundance)

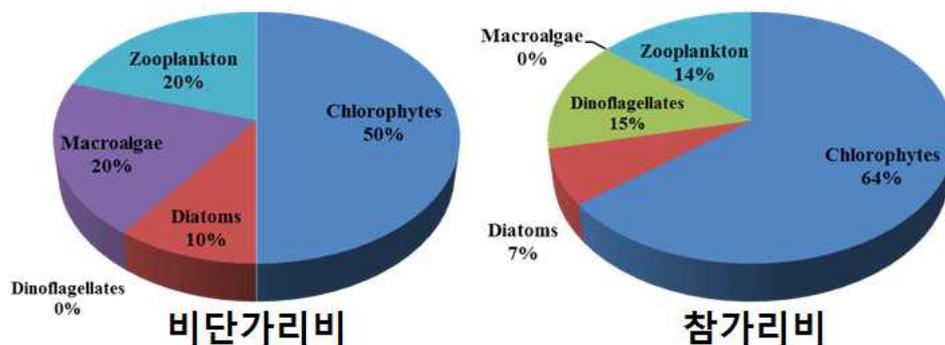
○ 가리비 위 내용물 내 먹이생물 조사

- 가리비 먹이원 파악을 위해 양식어장의 가리비의 위 내용물 조사를 메타제노믹스 방법으로 실시함.
- 가리비 위 내용물 적출: 비단가리비는 2018년 2월부터 8월까지 평균 각장 및 각폭의 10개를 선별함. 참가리비는 2018년 2월부터 4월까지 평균 각장 및 각폭의 10개체를 선별함. 선별된 가리비는 즉시 조직을 절개하여 위를 적출한 후 gDNA를 추출함. 추출된 gDNA는 위 내용물 내 먹이생물 분석을 위하여 차세대염기서열(Next Generation Sequencing, NGS) 분석을 실시함.
- 2018년에는 표층에서 배양중인 가리비 위내용물 샘플을 분석한 결과, 녹조류가 58.3%, 규조류가 8.3%, 와편모조류가 8.3%, 해조류가 8.3%, 동물플랑크톤이 16.7% 나타남 (그림 5-1-18).



[그림 5-1-18] 가리비 위 내용물에서 출현한 먹이생물 그룹별 비율

- 녹조류는 *Bathycoccus prasinus*와 *Micromonas pusila*, 규조류는 *Gomphonema* sp., 와편모조류는 *Heterocapsa* sp., 해조류는 홍조류인 *Palisada* sp.와 *Galazaura* sp., 동물플랑크톤은 다모류인 *Conus longurionis*, *Eunice* sp. 가 출현함 (그림 9). 비단가리비의 위내용물 분석 결과 녹조류가 50%, 규조류가 10%, 해조류가 20%, 동물플랑크톤이 20%를 차지하였음. 참가리비의 위내용물 분석 결과 녹조류가 64%, 규조류가 7%, 와편모조류가 15%, 동물플랑크톤이 14%를 차지하였음. 비단가리비의 위내용물은 참가리비의 것에 비해 녹조류의 비율이 낮고 동물플랑크톤 비율이 2개 정도 높게 나타남. 또한 해조류는 비단가리비에서만 출현한 반면, 와편모조류는 참가리비에서만 출현하는 특징을 보임.

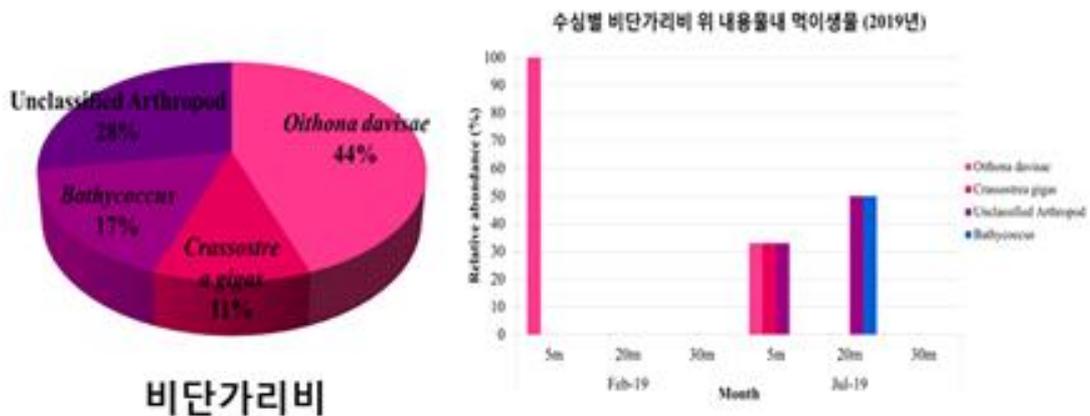


[그림 5-1-19] 비단가리비와 참가리비 위 내용물 내 먹이생물 비율

- 2019년에는 수심별 비단가리비의 먹이생물을 파악하기 위하여 2019년 2월과 7월의 각장 및 각쪽의 유사한 30개체를 선별함. 선별된 비단가리비는 즉시 조직을 절개하여 위를 적출한 후 유전자 분석을 위하여 gDNA를 추출함. 추출된 gDNA는 위 내용물 내 먹이생물 분석을 위하여 차세대염기서열(Next generation Sequencing, NGS) 분석을 실시함. 가리비 위내용물 샘플을 분석한 결과, *Oithona davisae*(동물플랑크톤)가 33.3%, *Cressostrea (Magallana) gigas*(이매패류)가 16.7%, Unclassified *arthropod*(절지동물)가 33.3%, *Bathycoccus*(녹조류)가 16.7% 나타남. 2019년 2월에는 20m와 30m에서 먹이생물이 검출이 되지 않았으나, 검출이 된 표층에서는 동물플랑크톤 *Oithona davisae*가 출현하였고, 7월에는 표층과 20m에서 먹이생물 *Oithona davisae*, *Cressostrea (Magallana) gigas*, Unclassified Arthropod가 검출되었음 (그림 5-1-20, 5-1-21).



[그림 5-1-20] 가리비 위 내용물에서 출현한 먹이생물 그룹별 비율



[그림 5-1-21] 비단가리비 위 내용물 내 먹이생물 비율

○ 동물성 먹이생물 월별조사

- 연안 어장 고정정점에서 2019년 1월부터 10월까지 월별 현장조사 수행함
- 동물플랑크톤 종조성, 개체수, 우점종 파악
- 주요 동물성 먹이생물인 요각류 개체수 월변화(평균 2,050 개체/m³, 6월에 가장 높았음)
- 중형동물플랑크톤 대분류군의 조성을 월변화(요각류가 62-94%로서 우점; 요각류가 중요한 동물성 먹이생물로 파악됨)

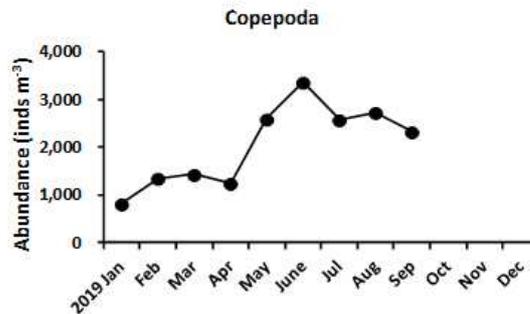


그림 5-1-22. 통영 연안 고정 정점의 요각류 개체수 월변화

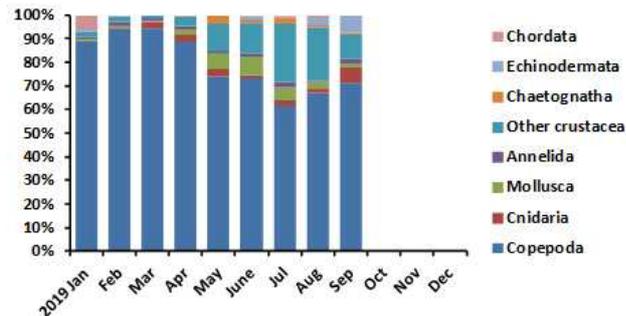


그림 5-1-23. 통영 연안 고정 정점의 동물플랑크톤 대분류군 조성을 월변화

6. 양식환경 관리 및 해중공원 모델 개발

가. 양식자원위해 환경 모니터링 병원체 목록

○ 수층공간 시료채취

- 2019년 시료의 해양바이러스 분포 및 다양성 변화를 분석하기 위하여 2019년 1-7월까지 해수 및 가리비를 NGS 분석하였으며 이를 2018년 시료와 비교하였음

표6-1-1. 2018 및 2019년 NGS 분석 시료 목록

2018	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	비고
비단가리비 (마리)	-	-	30	30	21	30	30	30	-	-	-	-	
주변해수 (L)	-	-	90(0,15, 30 m)	90(0,15, 30 m)	90(0,15, 30 m)	90(0,15, 30 m)	120(0,10, 20,30 m)	120(0,10, 20,30 m)	120(0,10, 20,30 m)	120(0,10, 20,30 m)	180(0,10, 20,30 m)	180(0,10, 20,30 m)	
2019	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	비고
비단가리비 (마리)	-	126(5,2 0,30 m)	-	126(5,2 0,30 m)	-	-	75(5,20,3 0 m)	-	-	-	-	-	
주변해수 (L)	135(5,2 0,30 m)	135(5,20, 30 m)	-	-	-	-	-						



그림 6-1-1. 가리비 시료

○ 해수 및 가리비 NGS 분석

- 가리비 내용물에서 보다 해수에서 높은 비율의 바이러스가 출현하였으며, 최대 0.288%의 바이러스가 매치됨 (표 6-1-2)
- 바이러스 중 진핵생물을 감염시키는 virus의 비율을 분석하였음.
- 2018년과 2019년을 비교하였을 때, 2019년에 phage가 더 높은 비율로 출현함 (그림 6-1-2)
- 가리비의 위 내용물에서 Virus 비율이 더 높은 비율을 차지함
- 2018년에는 가리비보다 해수에서 고른 virus family의 분포를 보임 (그림 6-1-3)
- 해수에서는 Pandoraviridae와 Poxviridae가 우점하였으나, 가리비에서는 Herpesviridae가 최대 68.71%로 높은 비율로 출현함.

표6-1-2. NGS 분석을 통해 얻은 total sequence read 값 중 virus DB에 매치된 read의 퍼센트

			Total reads	Total viruses	% of viral				Total reads	Total viruses	% of viral
2018	비단 가리비	FS-3	16297565.3	11386.67	0.070%	비단 가리비	FS-2	22401264.8	8112.333	0.036%	
		FS-4	17549473.3	16066	0.092%		FS-4	25352476	13159.56	0.052%	
		FS-5	19657094.7	18397.33	0.094%		FS-7	31940810.8	22563	0.071%	
		FS-6	23249813.3	20768.67	0.089%		-----				
		FS-7	20529087.3	18060.67	0.088%		주변해수	SW-1	6381627.333	7139.667	0.112%
		FS-8	34545633.3	30461.33	0.088%			SW-2	6057478	1274	0.021%
	주변해수	SW-3	15867335	23634.33	0.149%	SW-3		11319816	29686	0.262%	
		SW-4	16314461	17769	0.109%	SW-4		13730506.22	39523.56	0.288%	
		SW-5	17063104.67	30682.33	0.180%	SW-5		16594426	12638.33	0.076%	
		SW-6	18652046.67	25670.33	0.138%	SW-6		29251474.22	68175.78	0.233%	
		SW-7	19192117.5	10529.25	0.055%	SW-7	28082284.89	26306.22	0.094%		
		SW-8	18930373.25	22356.75	0.118%						
SW-9	30117339.75	27500.5	0.091%								
SW-10	20075728	34604	0.172%								
SW-11	22310282.67	41201.33	0.185%								
SW-12	16185689.67	33772.67	0.209%								

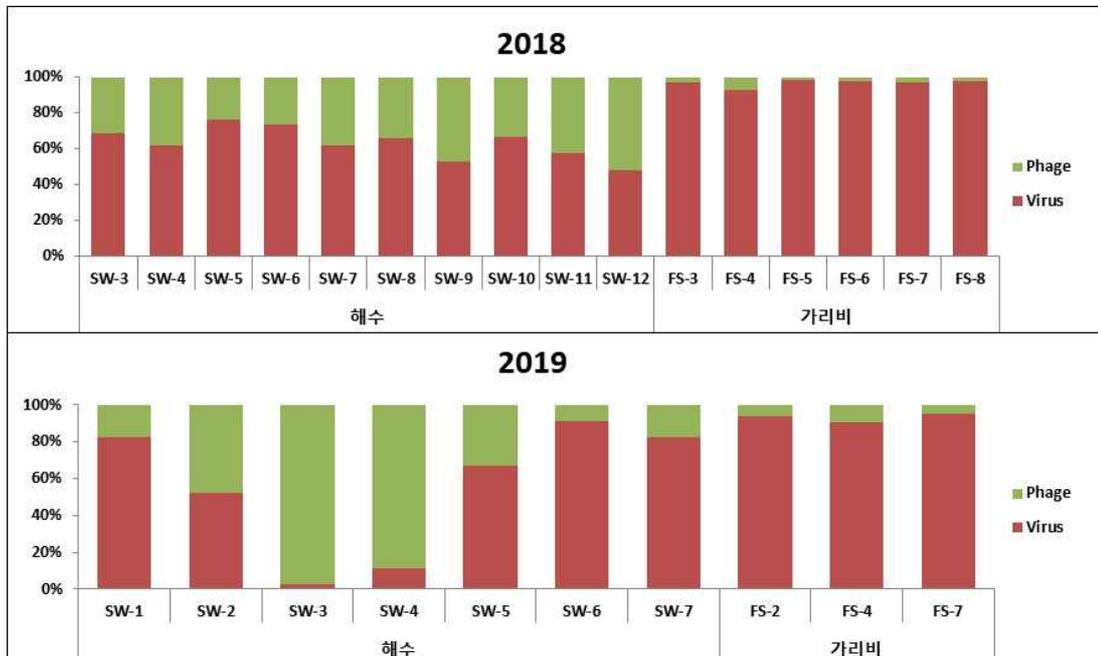


그림 6-1-2. 해수 및 가리비의 감염성 바이러스 비율

- Phycodnaviridae는 12월 해수에서 71.29%로 차지하였으며, 그로 인해 host인 algae 비율이 높아짐. 가리비의 위 내용물에는 Vertebrate의 감염성 바이러스가 우점하였으며, 특히 fish와 human을 감염시킨 바이러스가 최대 24.16%으로 높은 비율을 차지하였음.
- 2019년 해수 및 가리비 위 내용물에서 감염성 바이러스와 그 숙주를 분석 한 결과, 18년도와 동일하게 가리비에서는 Herpesviridae가 우점하며, 해수에서는 Phycodnaviridae, Poxviridae가 우점하였음.

- 특히 가리비에서 18년도보다 Alloherpesviridae와 poxviridae의 비율이 높게 나타났음. 19년도보다 human을 감염시키는 virus 종이 감소함을 볼 수 있으나, 그 외의 fish와 척추동물을 감염시키는 바이러스가 더 증가함을 확인함.

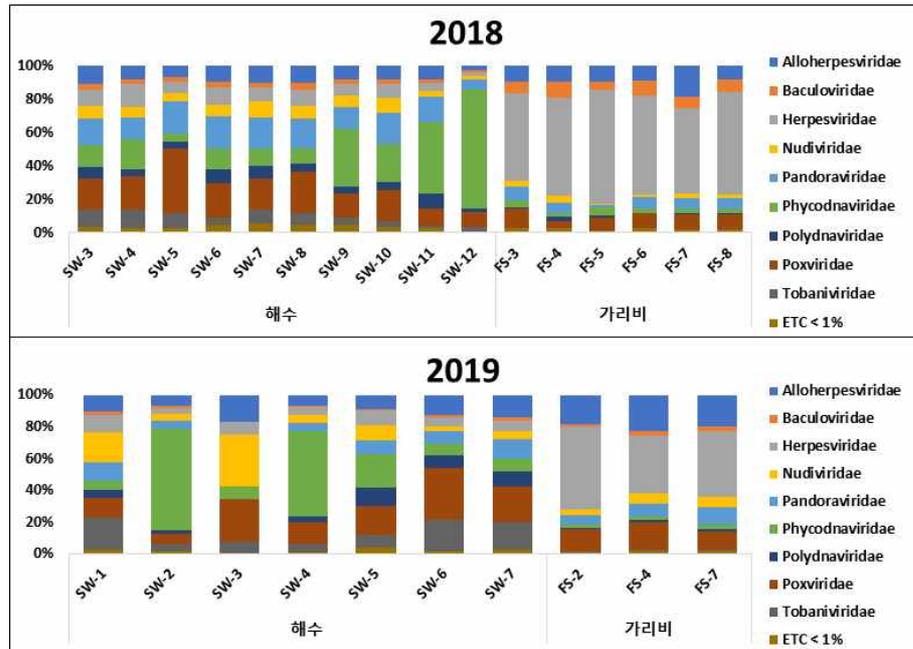


그림6-1-3. 2018-2019년 감염성 해양바이러스 분포

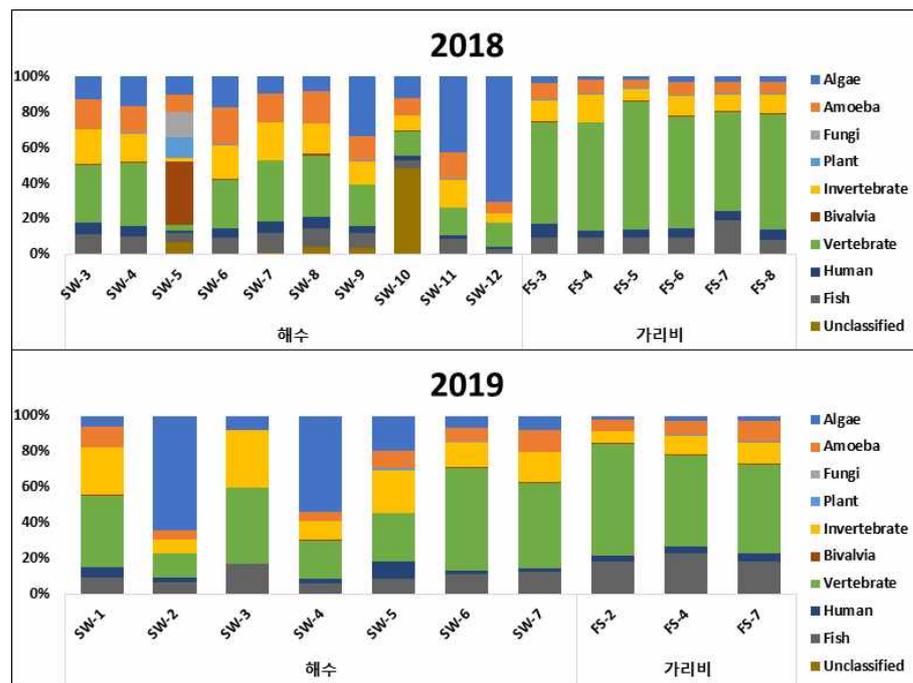


그림 6-1-4. 2018-2019년 감염성 해양바이러스 숙주 분포

○ 감염성 해양바이러스 목록 작성

- 해수와 가리비에서 출현한 Bivalvia, Human, Fish 감염 바이러스 종목록. 총 41개의 종이 검출되었고, 그 중 해수에서 36종, 가리비에서 21종, 해수와 가리비에서 중복으로 16종이 검출되었음.
- 그 중 Cyprinid herpesvirus 3, Cowpox virus, Human betaherpesvirus 6A가 높은 비율로 나타남.
- Cyprinid herpesvirus 3은 fish를 감염시키는 Alloherpesviridae이며, Cowpox virus와 Human betaherpesvirus 6A는 각각 poxviridae, herpesviridae에 속하는 human을 감염시키는 바이러스임.
- 세 바이러스 모두 해수와 가리비에서 모두 나타났음.

Infectious virus	Host	Sample
Abalone herpesvirus Victoria/AUS/2009	Bivalve	Seawater, Scallop
Anguillid herpesvirus 1	Fish	Seawater
Avon-Heathcote Estuary associated circular virus 17	Bivalve	Seawater
Avon-Heathcote Estuary associated circular virus 28	Bivalve	Seawater
Cercopithecine alphaherpesvirus 2	Human	Seawater
Cowpox virus	Human	Seawater, Scallop
Cyprinid herpesvirus 1	Fish	Seawater, Scallop
Cyprinid herpesvirus 2	Fish	Seawater, Scallop
Cyprinid herpesvirus 3	Fish	Seawater, Scallop
Eel picornavirus 1	Fish	Seawater
Elephant endotheliotropic herpesvirus 4	Fish	Seawater
Elephantid betaherpesvirus 1	Fish	Seawater
Encephalomyocarditis virus	Human	Scallop
Gemycircularvirus C1c	Human	Seawater, Scallop
Gemycircularvirus SL1	Human	Scallop
Hepatitis C virus subtype 1a	Human	Seawater, Scallop
Hepatitis C virus subtype 2a	Human	Seawater, Scallop
Human adenovirus 1	Human	Seawater, Scallop
Human adenovirus 5	Human	Seawater
Human associated gemyvongvirus 1	Human	Seawater
Human betaherpesvirus 6A	Human	Seawater, Scallop
Human betaherpesvirus 6B	Human	Seawater, Scallop
Human betaherpesvirus 7	Human	Seawater, Scallop
Human endogenous retrovirus K113	Human	Seawater
Human gammaherpesvirus 8	Human	Seawater
Human herpesvirus 3 strain Dumas	Human	Seawater, Scallop
Human papillomavirus type 10	Human	Seawater
Human papillomavirus type 71	Human	Seawater, Scallop
Ictalurid herpesvirus 1	Fish	Seawater, Scallop
Ictalurid herpesvirus 2	Fish	Seawater
Lymphocystis disease virus - isolate China	Human	Seawater
Molluscum contagiosum virus subtype 1	Human	Seawater
Monkeypox virus Zaire-96-I-16	Human	Seawater, Scallop
Papiine alphaherpesvirus 2	Human	Seawater
Piscine myocarditis-like virus	Fish	Seawater
Pleurotus ostreatus virus 1	Bivalve	Scallop
Punta Toro virus	Human	Scallop
Ranavirus maximus	Fish	Seawater
Rhynchobatus djiddensis adomavirus 1	Fish	Seawater
Torque teno midi virus 1	Human	Scallop
Yaba -like disease virus	Human	Seawater

나. 양식어장 부착생물 저감방안

○ 부착생물가입 양상 분석

- 연중 부착생물 현황 조사

수심별 부착생물 가입양상에서 초기에 히드라류와 곡형동물이 대량 가입하였으나 5m 수심에서는 5월 이후 지중해담치 가입으로 생물조성이 변경됨. 이러한 양상은 수심에 따라 차이를 보임. 20m 수심에서는 프레임 중심으로 지중해담치가 소량 가입되어 히드라와 공간경쟁 양상을 보임. 하지만 30m 수심에서는 지중해담치 가입이 진행되지 않아서, 곡형동물 중심 군집 형성됨. 생물상이 가장 빈약하게 나타남

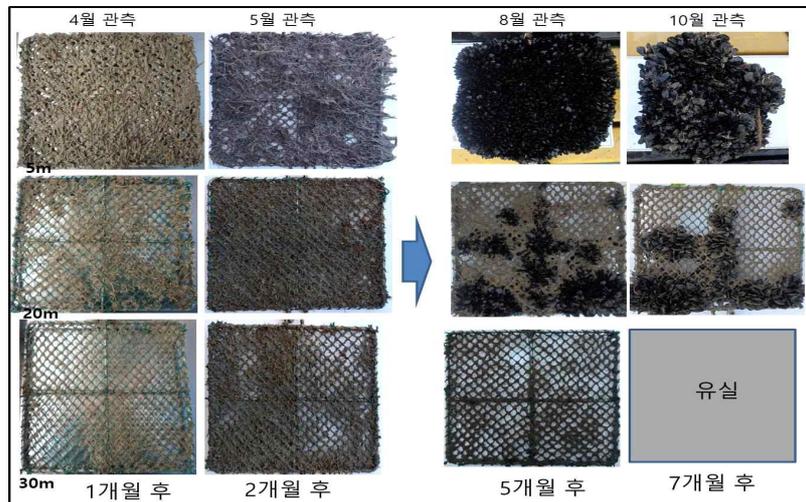


그림 6-2-1. 연중 수심별 부착관 시설에 따른 생물상 변동

- 계절별 부착생물의 서식 양상

3월 투입된 부착기질에서는 전 수심에 걸쳐 히드라와 곡형동물이 서식하였으며, 5m 수심에서 곡형동물이 이탈된 공간에 크기가 5mm 이내 지중해 담치 유생이 가입됨. 5월에 투입된 부착기질에서는 3월보다는 부착생물의 가입이 저조하고 대신에 바다대벌레루가 높은 밀도로 서식함. 7월에 투입된 부착기질은 5m 수심에서만 곡형동물과 말미잘이 가입되었으며, 수심이 깊어질수록 생물 가입양상이 저조함

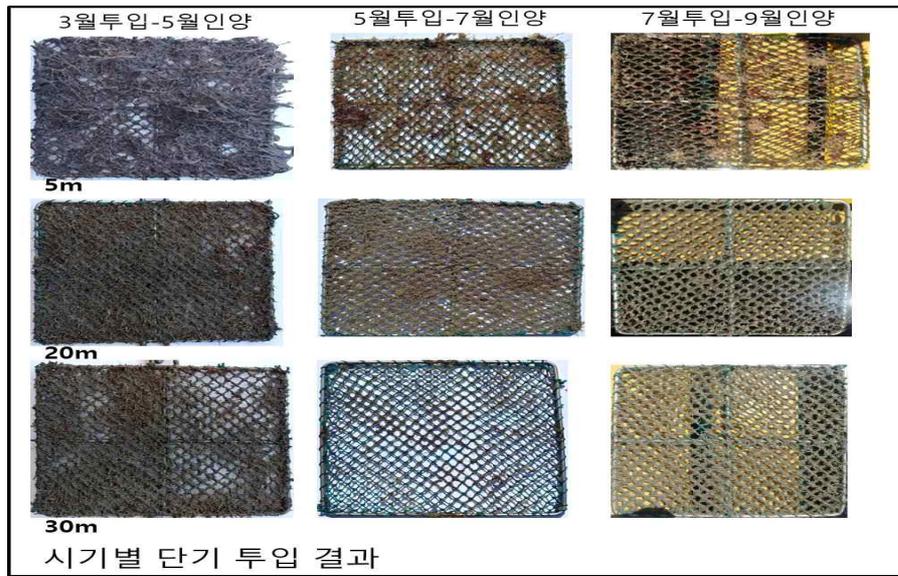


그림 6-2-2. 계절별 3개월간 설치된 부착판 서식생물 비교

- 공간에 따른 차이점 비교

시설물은 조류 속도가 원활한 수로 지역과 상대적으로 약한 지역에서의 부착양상을 비교한 결과 조류상태가 원활한 해역에서 곡형동물과 바다대벌레의 가입이 원활한 것으로 나타남.

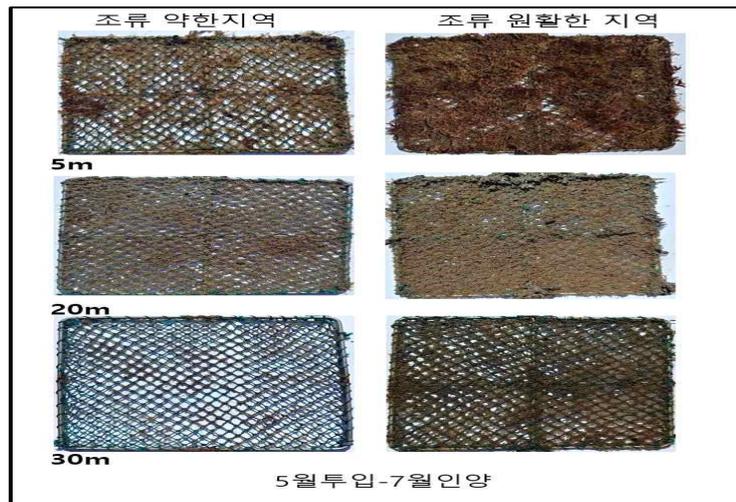


그림 6-2-3 조류 조건에 따른 부착양상 비교

다. 양식·자원 복합단지 조성 및 비즈니스 해양공원모델 개발

○ 양식·자원 복합단지 조성

- 양식·자원 복합단지 어장조성 및 환경조건

- 양식·자원 복합단지 조성을 위하여 2018년 조성된 통영기지의 연구교습어장에 4ha의 수층공간이동형 연승수하식 양식어장을 조성하여 냉수성 양식자원생물을 양성 할 수 있는 공간을 조성함.
- 대상어장의 수심은 최고 -50m, 최저 -30m 이며, 연중수온은 10 ~ 28℃ 를 나타냄. 수층공간 수온분포는 환경조사 결과 표층에서 - 30m 까지는 연중 10 ~ 28℃ 를 나타냈고, -30m이하에서는 21℃ 이하를 나타내고 있어 수온약층이 형성되는 것을 알 수 있었으며 특히 여름철 7~8월 수온약층이 뚜렷하게 나타냄. 또한 여름철 냉수대와 빈산소 수괴를 통하여 양식생물 폐사에 영향을 많이 주는 요인 중 하나인 용존산량은 7 ~8월 - 30m 이하에서 급격히 감소하여 -35m 이하에서는 생물생존의 한계치 용존산소(3.5ml/l)가 분포하므로, 냉수성 양식생물의 수층공간이동 시설 및 생산방법은 수심 - 5m ~ - 35m 층을 이용 냉수성 어패류 양식가능 수심으로 판정함.

- 대상생물 선정

- 수층공간이용 대상생물 선정은 연중 수온이 24℃ 이하, 용존산소 3.5ml/l 이상에서 생존 및 양식가능생물을 대상으로 선정 하였으며 일부 생물은 수온이 20℃ 이하에서 생존이 가능한 생물을 대상으로 선정하고, 소비량 및 고부가가치 생물을 대상으로 선정함.
- 대상생물은 어류인 경우 무지개 송어를 선정하였으며, 무척추동물은 비단가리비, 참가리비, 우렁쟁이를 선정함.
- 1차년도 과제에서는 무지개송어, 참가리비, 우렁쟁이의 경우 선행연구를 하였으며 비단가리비를 주 대상생물로 양성함.

- 대상 생물 선행연구 양성

- 무지개송어 3배체: 무지개송어 3배체를 2018년 11월 충북제천에서 평균 150g 크기의 무지개송어 3배체 1,500마리를 입식 방양하여 양성함. 무지개송어의 해수순치는 경남자원연구소 협조하에 Ø5m 원형수조 1개에 수용하여 7일간 순치하였으며 순치중 염분 농도를 일별로 상승시켜 7일 후 가두리에 방양함. 순치중 폐사량은 40%를 나타냄. 가두리사육은 6m*6m*6m 그물에 600마리를 수용 양성하였으며, 12월에서 익년 6월 까지 양성 사료는 주로 MP사료를 공급하였고 매월 성장률을 측정함. 6월 까지 성장률을 보면 최대 1.5 kg 까지 성장하였으며, 작은 개체는 1.1kg, 평균 1.35kg을 나타냄. 6월 10일경 수온상승으로 수층공간 수심 -40m에 이동 양성하였으나 9월 고수온(20℃ 이상) 및 빈산소 관계로 전량 폐사하는 결과를 가져와 남해안에서는 완전양식이 불가하다는 결론을 나타냄.

- 참가리비: 남해안에서의 수층공간을 이용한 참가리비 양성을 위하여 2018년 12월 연승수하식 양식어장에 시험적으로 2만마리를 채룡망에 수용하여 양성함. 양성수심은 겨울철 -5m, 여름철 -25m에 양성하였으며 월별로 계측 및 폐사량을 점검함. 초기 평균 3.66g인 참가리비는 월하시기인 7월 중순 32.8g크기로 성장하였으며 그 이후 고수온 관계로 대수심 - 30m에 양성중이며 11월 현재 현장수온이 20.7℃이므로 확인이 불가하며, 봄철 양성중의 참가리비는 52%의 폐사율을 보임. 2020년에는 참가리비 양성에 집중적인 연구가 필요함.
- 우렁쟁이(멍게): 기후변화로 인한 고수온으로 남해안에서 양식에 어려움을 겪고 있는 멍게를 2018년 11월 통영기지에 입식하여 수층공간이용 선행연구를 시행함. 초기 씨줄감기는 민간인 업체로부터 구입하여 양성하였으며, 양성은 수심 -15m, 수심-25m 수층에 각각 분리하여 양성한 결과 수심 -15m에 양성한 멍게는 2019년 5월 전량 폐사하였으며, 수심 -25m에 양성한 멍게는 전량 생존하는 결과를 나타냄. 3차년도에 세부적인 연구가 필요하겠지만 이는 각 수층의 수온 및 환경이 다르기 때문으로 판단되며, 수온과 먹이생물의 분포와 관련이 있는 것으로 생각됨.



그림 6-3-1. 무지개 송어(3배체)



그림 6-3-2. 참가리비 치패와 양성패



그림 6-3-3. 우렁쟁이 양성(멍게)

- 비단가리비 양식

- 2019년 1차년도 중점연구를 위하여 수층공간이용 비단가리비 양식을 시도함

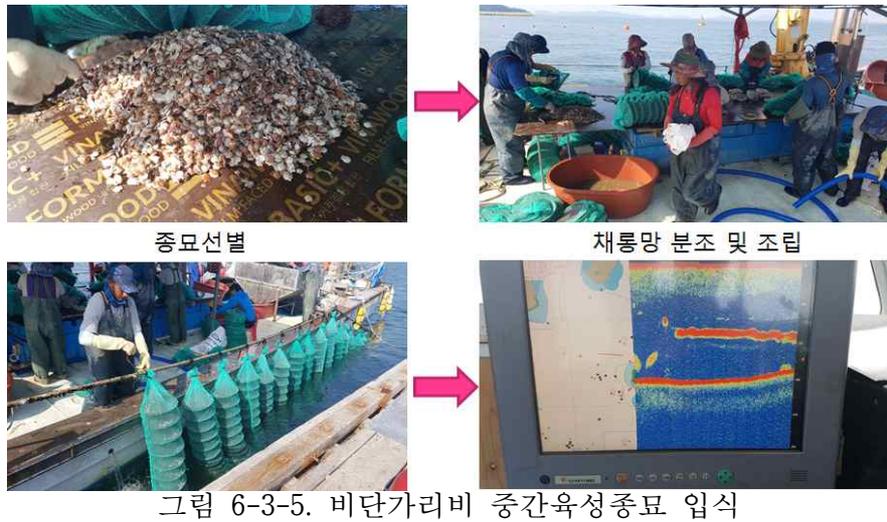
· 비단가리비는 사새목 큰집가리비과 연체동물로서, 조간대 아래 수심 10 m 부근 자갈밭에서 서식하며 부채 모양의 원판형으로 대부분 암갈색, 흰색, 자색 등 다른 색상도 많음.

- 가리비류(scallop)는 세계적인 웰빙(well-being) 선호 식품으로 산업적 측면에서 굴 다음으로 중요한 패류임.
- 비단가리비는 우리나라 전역(특히 서해안과 서남해 연안)에 분포하며, 중국 북부와 남부 일부, 일본의 남부에 분포함.
- 패류양식은 어류나 갑각류 양식과는 달리 사료를 주지 않는 자연의 1차 생산을 이용하는 환경 친화적 양식의 범주에 속함. 따라서 생물경제의 관점에서 이대패류의 양식은 동물성단백질 생산에 있어 가장 경제적이고 합리적인 방법의 하나임.
- 우리나라에는 13종 내외의 가리비류가 서식하고 있으며, 우리나라에서 양식 가능한 종은 약 7종에 이르며, 그 중 한해성 종인 참가리비(*Patinopecten yessoensis*)는 동해안(강원연안)에서 양식되고 있으나, 기후변화에 의한 지속적인 폐사와 저성장으로 생산량이 증가되지 않고 있음.



그림 6-3-4. 우리나라에서 양식 가능한 가리비류

- 비단가리비는 중간육성 과정을 거치지 않고 바로 양성용 채롱에 수용 할 경우 치패가 너무 작기 때문에 수용하기가 힘들고 작업량 또한 많아져 비용부담이 가중 되며 양성기간이 2년 이상으로 길어져 경쟁력의 저하를 가져 올 수도 있음. 또한, 종묘 크기가 2~3 mm 내외이기 때문에 양성망에 수용하기가 힘들 뿐만 아니라 고수온, 부니, 저산소에 저항력이 약함.
- 따라서 통영기지에서 2018년 6월 경남수산자원연구소로부터 종묘생산을 하여 분양받아 중간육성한 비단가리비 평균 각고 3.8cm급, 중량 8g, 2만 마리를 2018년 12월 중순 현장에서 분리 수용 일정기간 안정화를 거친 후 채롱망에 선별 수용하여 해상가두리 양식어장에 수용하여 양성하였으며 2019년 1월부터 매월 채롱망을 인양하여 성장률을 계측함.



- 수층공간이용 성장률을 조사한 결과 아래표와 그래프 같은 성장률을 보였으며 7개월간 조사한결과 폐사율은 45%를 나타냄. 양성기간중 채롱망가리비의 부착생물피해 등을 고려하여 주기적으로 수층이동 및 청소를 하였으며 어장관리 및 유지/관리는 정기적인 점검을 통하여 관리함.



그림 6-3-6. 비단가리비 부착생물 피해(유령멍게, 진주담치)

표6-3-1. 2019, 수층공간이용 비단가리비 성장(평균)을 조사

월	각 장(mm)	각 고(mm)	각 폭(mm)	중 량(g)
Jan	42.26	37.46	10.94	8.83
Feb	47.71	42.59	12.01	12.7
Mar	52.06	47.82	13.74	18.83
Apr	57.37	53.30	15.40	24.26
May	62.78	59.33	17.24	33.2
Jun	66.38	63.22	18.70	40.00
Jul	67.74	64.39	19.54	43.96

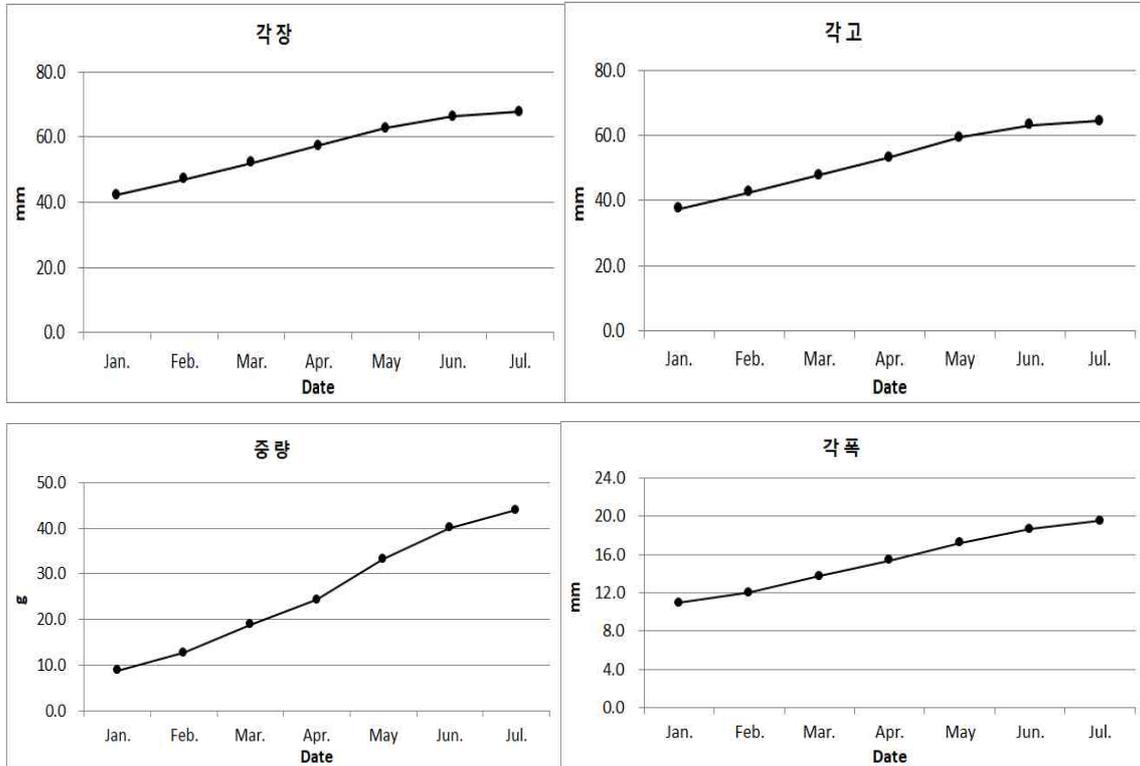


그림 6-3-7. 2019년 1월 ~ 7월 비단가리비 성장곡선

- 수확: 비단가리비 양식의 수확은 종묘에서 양성 수확기까지는 보통 18개월(해만가리비 8개월 이상) 이상 소요됨. 통영기지 시험어장은 외해지역으로서 비단가리비양식에 좋은 환경조건으로(겨울철 수온 10.5℃ 이상) 인하여 6월부터는 상품규격 평균 40~50 g으로 상품규격이 되므로 2019년 7월을 끝으로 수확을 하여 연구부산물 처리함. 연구부산물은 총 420kg이 생산 되었으며 가격은 6,000원/kg 으로 형성되어 2,520,000원의 연구부산물 처리 비용으로 귀속 하였음.



그림 6-3-8 . 비단가리비 수확(2019)

- 결 론: 비단가리비 양식은 3월 이후의 수온이 빠르게 상승하므로 앞으로 비단가리비 양성을 하고자 할 때는 남해안에서 중간육성을 거친 비단가리비 종묘 3~4 cm 급을 11월 달에 수하하여 수온이 상승하는 익년 6월부터 판매하는 것이 가장 타당할 것으로 판단됨.

어장환경은 수시로 모니터링하여 냉수성어패류의 고수온 빈산소 영향으로부터 피해영향을 줄여야 하며 또한 대상생물의 사육밀도 조절을 통한 성장관리가 중요함. 또한, 유속 및 풍파의 영향에 대한 시설물 관리에 체계적인 관리가 필요하며, 특히 부착생물에 의한 피해대책이 강구되어야 할 것임. 3~5월의 진주담치 유생에 의한 피해대책강구, 5~6월의 유령멍게 및 7~8월의 따개비류의 부착에 의한 성장,작업환경, 상품성 저하 대책을 수립 할 필요가 있으며, 이를 극복하지 못하는 경우는 비단가리비 양식의 성공에 대한 성패가 좌우 될 것으로 판단됨.

○ 비즈니스 해양공원 모델개발

- 생물달력

- 해중공원을 양식장들이 있는 통영시 연안에서 시험 건설한다는 가정 하에 경남 통영시 연안의 수산자원 생물의 월별 출현을 월별(계절별)로 정리함. 최근 연안의 전통어업은 어업인들의 고령화와 어촌의 기능저하로 일부 소형어선들을 이용한 자망, 통발과 같은 연안어업과 정치성 구획어업을 유지해 오고 있음.
- 남해안은 계절별 해양환경 특성의 변화와 함께 수산자원은 계절에 따라 산란, 성육, 월하, 월동 다양한 생리, 생태적인 욕구에 따라 매년 주요 어종들의 회유나 출현 양상은 반복되고 있음.
- 특히, 우리나라 최초의 시범바다목장사업이 이루어졌던 통영바다목장해역은 통영시 산양면 서부 연안일대 20km² 내에서 보호수면, 수산자원 관리수면으로 지정되어서 잘 관리되어 오고 있어 이 해역에서는 다양하고 풍부한 수산어종들의 출현, 이동과 수산 자원량의 유지, 증가를 관찰할 수 있음.
- 이러한 수산자원의 이동, 정착 등의 동태를 생물달력으로 만들어 기록해 두고 해당 해역에서의 양식을 포함하는 비즈니스형 해중목장을 건설하는 기초자료를 쌓아가는 것이 양식 산업 외에 낚시, 다이빙, 레포츠, 생태관광 등 다양한 활동을 기획할 수 있을 것임.
- 재료 및 방법: 통영시 연안의 주요 수산생물달력 제작을 위한 어종 조사는 매 분기별, 또는 비주기별로 통영 통영연안에서의 잠수조사, 유조(뜯말) 아래의 생물조사와 통영시 수산시장(서호시장, 중앙시장)에서 유통되는 연안 수산자원의 종류를 조사하면서 자료를 얻어 정리함.
- 결과 및 고찰: 현재 약 100여종이 달하는 통영시 연안의 주요 수산생물의 월별, 계절별 출현 현황을 정리하면 다음과 그림과 같음.

표6-1-2. 통영 인근해역 수산어종(성어)의 월별 출현 (2018년자료 보완)

월	어 종	비고
1	볼락, 불볼락, 조피볼락, 감성돔, 아귀, 쥐노래미, 노래미, 솜뱅이, 청어, 학공치, 꼼치, 문치가자미	
2	볼락(산란), 불볼락, 조피볼락, 감성돔, 문치가자미	문치가자미 산란(2,3월)
3	문치가자미, 볼락, 감성돔, 불볼락	
4	문치가자미, 볼락, 참돔, 조피볼락, 감성돔	감성돔 산란기
5	참돔, 볼락, 봉장어, 감성돔	참돔 산란기
6	봉장어, 농어, 볼락	
7	양태, 농어, 멸치, 봉장어, 갯장어, 농어, 전갱이, 고등어, 전어, 갈치	멸치는 4-6월 금어기
8	양태, 봉장어, 넙치, 멸치, 말쥐치, 쥐치, 전갱이, 고등어, 갈치	전갱이, 고등어는 6-11월이 성기
9	갈치, 넙치, 삼치, 방어, 학공치, 참돔, 멸치, 전갱이, 고등어, 전어	
10	전어, 넙치, 삼치, 감성돔, 방어, 학공치, 참돔, 전갱이, 고등어, 전어, 농어	
11	삼치, 쥐노래미, 농어, 방어, 전어, 전갱이, 고등어, 전어, 학공치	
12	꼼치, 방어, 대구, 쥐노래미, 학공치	꼼치, 쥐노래미 산란기

어종	/월	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	remark	
성 어	참돔														
	감성돔														
	전갱이														
	고등어														
	꼼치													산란기포함	
	문치가자미														
	볼락														
	방어,부시리														난류성 회유어
	갯방어														
	농어														
	조피볼락														
	불볼락														
	성대														
	갈치														
	멸치														
	학공치														
	양태														
	뱅에돔														
봉장어															
자 치 어 *	쥐노래미													변태전(정색기)	
	노래미													"	
	볼락													>5.5cm	
	말쥐치														
	그물코쥐치														
	쥐치														
	돌돔														
	방어														
노랑썩뱅이															

* 떠다니는 모자반(유조)에서 채집한 표본(2018-2019년)

그림6-3-9. 통영해역에 출현하는 주요 수산어종(성어, 자치어)의 월별 출현 양상(2018년 자료 보강 중).

- 통영 해역은 년중 수온이 계절에 따라 10-28℃ 범위에서 변하고 있음. 볼락, 쥐노래미, 노래미, 망상어, 인상어 등과 같은 광온성 어종들은 년중 연안에 서식하고 있음. 하지만, 겨울철 저수온을 견디기 힘든 방어, 부시리, 잭방어 같은 종들은 늦은 가을에 연안을 떠나 난류를 따라 다니다 이듬해에 다시 연안으로 돌아오기도 함. 또, 일부 어종들은 연안에 머물고 있으면서도 일반 어구에 잡히지 않기 때문에 어시장에서는 만날 수 없는 종들도 있음. 따라서 수산생물달력을 만들 때 문헌이나 어시장 조사 결과를 바탕으로 종별로 정리할 때 정확한 출현 시기를 나타내기 어려움이 있는 종들도 많음(표 1, 그림 2). 예를 들어 농어는 겨울이면 내만으로 들어가서 산란을 하고 2월이면 만 외곽 연안 해역으로 이동하며 멸치는 년중 서식하지만 저수온기엔 조업이 활발하지 않으며 4월부터 6월까지의 금어기를 지나면 7월부터 활발한 조업이 이루어지는 종임. 우리나라 연안에 자원량이 많은 갈치도 어린 갈치들이 7, 8월월부터 출현하여 외곽해역으로 이동해 나갈 늦가을까지는 연안에서 꾸준히 관찰됨.

한편, 이 해역에서 어린 시기(자치어기)를 보내는 어종들은 봄철에 해수면에 떠다니는 모자반류(유조) 아래에서 다양한 종들이 채집됨.

- 생태지도

- 생태지도는 연안생태 건강성을 유지하고 환경변화에 수산자원의 관리 방향을 제시할 목적으로 면적 개념의 생물분포도를 작성하는 것임.
- 재료 및 방법: 해양공원 후보지로 생각되는 통영시 연안의 정점을 선정해서 서식처의 특성 과 어류, 무척추동물, 해조군의 수직 분포특성을 과학 잠수를 통해 조사하여 그 자료를 바탕으로 해양 생물종 분포를 면적 개념으로 자료를 축적함. 잠수조사는 수중사진기, 수중 메모판 등을 활용하여 수중 서식처의 특성을 그림과 메트로 기록함. 수집과 된료를 바탕으로 실험실에서 밑그림과 시사진, 영상 자료를 종합하여 주 생물종의 수직, 수평 분포도를 그림. 이와같은 작업으로 밑그림이 상세하게 그려지면 전문 화가의 작업을 거쳐 완성됨.

2019년도에는 통영바다목장 해역의 섬(대장두도)에서 실험과 조사가 이루어지고 있어 양식시설을 포함한 연안 암반, 사패질 바닥층의 생태조사가 진행됨.

- 결과 및 고찰; 서식처와 양식시설의 기초 그림을 그려서 주요 해양생물들의 분포 현황을 조소해 오고 있음. 2019년도에는 기초 밑그림을 완성할 예정이며 2020년에 그림 생태지도 작성 완료를 목표로 자료를 축적해 오고 있음. 대장두도 동남쪽 연안의 수중 생태조사 분석방법은 그림과 같음.

측정항목 [분석항목]	분석방법	기기명
생태지도 작성	• 잠수와 어구조사를 통한 생태 특성 조사 • 생태 영상자료 획득	수중사진기, 수중비디오, 수중채집틀망, 어구 및 조구, 싸이드스캔소너
주요 생물종 생태조사	• 잠수를 통한 종 구성 확인 및 목시 계측, 타 해역과 출현종수, 자원량 비교	수중사진기, 계측자, 현미경



그림 6-3-10. 통영시 대장두도 연안의 생태지도 밑그림.

- 비즈니스형 해중공원 모델 개발

- 해중공원(海中公園)은 영어권에서 ‘submarine park’, ‘an undersea park’라 부름. 일정한 해역을 정하고 그곳에 서식하고 있는 동식물을 보존함과 동시에 그 자원과 경관을 보존하면서 일련의 체험형식의 활동 즉, 생태관광을 활성화시키는 곳이 ‘바다의 공원’ 즉, 해양공원(해중공원)임.
- 세계의 해중공원은 1950년경 미국의 카리브해와 오스트레일리아의 그레이트 배리어 리프(GBR)의 산호초에 있는 여러 섬을 국립공원이나 국가 보존지로 설정한 것이 시작임. 이후 1962년 미국 시애틀에서 개최된 제1회 세계국립공원의 결의가 있었고 그 후 세계 연안국들은 권고에 따라 자국의 연안과 해양 영토를 보호하기 위한 해양공원을 지정하기 시작함.
- 우리나라에서도 1968년 ‘한려해상국립공원’을 시작으로 그 후 습지와 연안의 해양보호구역(MPA)들이 지정되기 시작하여 지금은 약 26개의 해양보호구역을 갖게 됨.
- 이번 경상남도 통영시 연안에서 개발하려는 ‘비즈니스형 해중공원(Marine park)’은 생태계나 희귀 해양생물 군집을 보호, 보존하는 해양보호구역(MPA)과는 달리 일정 해역에서 양식을 통한 수산생물자원 양식을 포함하면서 그 양식시설도 적극적으로 활용하면서 생태 보전과 생태 관광을 함께 병행하는 복합 기능을 가진 연안 해역 개발 방식이라 할 수 있음.
- 또, 해수공간으로 보면 표층과 중, 저층의 환경 특성을 고려하여 다양한 수층 공간을 활용한 양식과 해양관광 산업분야의 개발을 촉진하면서 연안의 수층을 다양하게 이용하려는 것이 목적이기도 함. 즉, 통영시 연안에서 수심 50-60m인 저층수를 활용한 냉수성 생물 양식 가능성을 찾는것도 이러한 다양한 해양 수층을 이용한 새로운 양식기술 개발을 목표로 진행되고 있음. 이와 동시에 표층의 비단가리비 양식장, 가두리 양식장의 시설물을 떠 있는 인공어초 기능을 부여함으로써 해양관광, 체험 분야의 장르로 활용 코저하는 시도 역시 해양공원으로써의 또 다른 기능을 부여하는 계기가 될 것임.
- 최근 폭발적으로 늘어나는 유어, 해양레저 인구를 건강안 연안 환경에서의 레저 활동을 정착시키고 차세대의 해양환경 교육을 위한 연안 공간의 기능을 살리는 것은 ‘복합 해중공원모델’ 개발의 궁극적인 목표이기도 함.

- 이번사업에서는 현재까지 국내외에 건립된 해양 공원, 해중 공원의 현황을 살펴보고 각각이 갖고 있는 특성과 향후 ‘한국형 해중공원’의 모델을 개발하는 것이 최종 목표임.
- 재료 및 방법: ‘해중공원’ 모델 개발을 위해서 우리 나라서 현재 추진 중인 해중공원 성격과 인프라 시설 등을 소개하고 일본의 해중공원 중 1930년대로 오래전에 발굴되어 현재까지 국립공원으로 지정되어 관리되어 오고 있는 니이가타현의 사도섬 센가꾸 해중공원의 현지 답사(2018년)와 미국 로스엔젤레스 연안의 카롤레나섬의 해중공원(2019년)의 답사를 통한 해외사례를 정리해 둬. 향후, 우리나라에서의 수산물 생산성을 고려한 비즈니스형 해중 공원의 모델에는 연안 생태특성, 수산, 관광 생물자원의 현황과 증식, 보존 가능여부, 양식 시설을 수산자원 조성 시설로서의 활용과 같은 보다 복합적인 개념을 포함시키기 위한 국내외 자료들을 정리함.
- 결과 및 고찰: 우리나라에서 일정 연안 해역을 그 환경특성에 맞게 가장 효율적으로 수산, 관광, 체험 등의 개념을 접목해서 개발 관리하려는 시도는 1998년부터 시작된 ‘시범바다목장 사업’이 시작이라 할 수 있음. 최초 바다목장 모델을 개발할 당시 이미 동해안과 제주도는 단순한 수산자원 증식에 따른 어어형 바다목장의 차원을 넘어서 해양 관광형, 체험형 등의 수산자원을 활용한 1,3차 산업의 복합적인 기능을 고려한 바다목장 모델을 기반으로 사업이 추진됨. 즉, 동,서, 남해, 제주도 연안의 환경특성을 고려하여 어업형, 관광형, 체험형 등으로 모델을 해역별로 구분하여 개발하고 시범바다목장 사업을 정부 주도 사업으로 추진하였음. 사업이 종료된 후에는 지자체와 지역 어민들이 관리해 나간다는 계획이었음. 현재는 통영바다목장사업의 경우는 1998년부터 2007년 6월까지 9년간의 연구 사업을 마치고 2007년 이후에는 지자체와 지역 어민들이 자체적으로 관리해 오고 있음.

또, 최근 2014년부터 3년간 전북 부안고창지역 연안에서 추진되었던 ‘서남해 해상풍력 단지내의 양식자원복합단지’ 모델도 신 재생에너지 산업과 연안의 수산업이 공존할 수 있도록 개발한 ‘한국형 비즈니스 해중공원 모델’의 큰 범위에 속한다고 할 수 있음.

가. 국내 현황

우리나라의 첫 ‘해중공원’은 강원도 강릉 앞바다에 2013년부터 2018년까지 인공어초를 설치하면서 수중에 다이버들이 관광을 할 수 있도록 만들고 있음. 강릉시의 해중공원 건설사업 개요는 다음과 같음.

1) 강릉시 해중공원

- 장 소: 강릉시 안현동 사근진 해변(레저전용 zone), 수심 25~26m
- 사업명: ‘강릉시 해중공원 레저전용ZONE 조성사업’
- 규 모: 국내 최대의 수중공원 (축구장 160개 면적)
- 시 설: 전망대, 접안시설, 인공어초(폐선박 어초), 인공 수중 조형물(피겨스케이팅모양 조형물 포함)
- 사업비: 총 80억원: 국비 40억, 도비 12억원, 시비 28억원
- 목 적: 해양레포츠 인구 증가에 따른 스킨스쿠버 전용공간 조성



그림 6-3-11. 사진> 해중공원 전망대(선박형)(출처: [네이버 지식백과] 해중공원 [海中公園]).

2) 경주시 해중공원

경주시는 월성원자력발전소에서 배출되는 냉각수(온배수)를 이용하여 2011년부터 5년 동안 레저공원을 조성함. 장소는 양북면 봉길리 연안이었으며 총 사업비는 50억원임.

동해형 시범바다목장 모델이었던 관광형 바다목장을 만든 것임. 테마형 기능을 가진 인공어초를 수중에 설치하고 수산자원을 증식시켜서 바다속에서 여러 가지의 레저활동과 체험을 할 수 있도록 한 바다목장 사업임.



그림 6-3-12. 사진> 경주시 관광형 연안바다목장 조감도.

(출처: <http://www.dailydgnews.com/news/article.html?no=4668>)

3) 부산시

부산 기장 앞바다에도 자연과 해양문화가 공존하는 해중공원을 기획하고 있음. 이곳에는 해양 환경과 자원, 첨단 과학기술, 영상문화 콘텐츠가 결합된 빛·물·꿈을 주제로 한 체험형 해중공원이 들어설 예정임.

나. 국외 현황

외국에서의 해중공원 역사는 1930년대 일본 니이가타현, 1950년경 미국의 카리브해와 오스트레일리아의 그레이트 배리어 리프의 초호(礁湖)에 있는 여러 섬에 국립공원 또는 국가 보존지를 설정한 것이 시작으로 볼 수 있음. 현재 세계에 지정되어 운영 중인 해중공원들은 다양한 환경 조건을 가지고 있지만 그 공원을 활용하는 생태관광이나 일반 관광업에 사용되는 인프라 시설로서 가장 대중적인 것은 바닥이 유리로 된 배(glass boat)이며, 그 밖에 해중 전망탑, 스노클이나 아쿠아링에 의한 해중 수영 등이 있으며 그 외 수족관, 낚시터, 요트장, 해수욕장 등을 들 수 있음.

2,000년 대에 들어와서는 ‘수중조각공원’ 이 새로운 형식의海中공원으로 등장함. 최초의 수중조각공원은 2006년 그레나다에 세워졌고 그 후 멕시코, 바하마제도, 그란카나리아제도(스페인령)에도 세워졌음.

1) 일본

일본에는 현재 전국 28개소에海中공원이 지정되어 있으며 이 중 10대海中공원도 선정해 놓고 운영 중에 있음. 대표적인海中공원 오키나와에 있는 부세나海中공원(ブセナ海中公園)을 비롯하여 가고시마현, 고지현의海中공원 등 전국 골고루 흩어져 있음.

가) 센가꾸海中공원

일본 서해안 중부에 위치한 니이가타현 사도섬에는 센가꾸海中공원(1930년대부터의 역사가 깊은 곳) 외에 북소포의 흑돔마을, 그 외 남쪽 끝의 오기항 마을의 다라이배 체험마을 등이 있는 곳임.

일본의 사도섬은 혼슈우의 중부에 위치한 니이가타현에 소속된 섬으로 니이가타시에서는 약 70km 서쪽으로 떨어진 곳에 위치한 섬임. 국제적으로 보호종(새)인 따오기로도 유명하지만 오래전 금광이 있었고 지금은 7만명이 살고 있는 유인도임. 대마 난류의 영향을 받는 환경 특성상 우리나라 울릉도난 독도와도 유사한 해양 생물종들이 서식하거나 계절에 따라 출현하는 곳이기도 함.

센가꾸만海中공원(尖閣灣 海中公園)은 소화 7년(1932년), 노르웨이 최고의 피요르드경치를 가졌다는 하루당젤만의 경치에 버금간다고 평가하여 ‘尖閣灣’으로 명명하였고, 그 후 1934년 명승지, 1950년 국립공원으로 지정되어 지금까지 관리되어 오고 있음. 사도섬에는海中공원이 두 군데 있는데 사도섬 북쪽 연안에 있는데 ‘센가꾸만’과 그 보다 북쪽에 위치한 ‘대야귀 연안’임.海中공원에는 바닥이 유리로 되어 배에 앉아서 연안 전경과 수중을 볼 수 있는 ‘그라스보트’가 운행하고 있었으며 입장료를 받고 있음. 또, 선박타는 곳의 연안에는 먹이를 주면서 길들인 감성돔(30-40cm 급) 백여 마리가 수심 3-6m 수심층에 항상 있고 그 외 자리돔, 놀래기류, 복어 등이 함께 먹이에 길들여져 있었음. 이로서 사도섬에는 먹이로 길든 자연 상태에서의 관찰할 수 있는 관광체험 대상 어종은 북소포 마을의 흑돔과 이곳 감성돔의이었음. 즉, 이 두 종은 자연 상태에서 ‘家魚化’ 되어 있음.

이海中공원내에는 수족관과 박물관이 있는데 방문객들에게 자유로이 개방된 곳이었고 그 규모는 1층, 수족관, 2층 박물관으로 작은 편임. 수조에는 불락, 불불락, 까치상어, 방어, 참돔, 쭈기미, 쥐노래미, 노래미, 성게, 넙치, 아홉동가리, 붉바리, 갑오징어, 소라 등이 전시되어 있음. 근육을 투명하게 만들어 골격만 붉게 염색한 작은 표본병, 닥터피쉬 어항 등이 있음. 2층 박물관에는 간단한 오래전 사용되는 어구와 건조 표본 등 이 지역의 어촌마을의 생활용품 등이 전시되어 있음.



그림 6-3-13. 센가꾸만해중공원 (일본 니이가타현). 입구 간판(좌)과 그라스보터 선착장이 보이는 풍경(우)

나) 오키나와의 부세나 해중공원

열대바다를 끼고 있는 오키나와에는 수중전망대, 글라스보트, 해수욕장과 리조트 등 다양한 해양레저를 종합적으로 즐길 수 있는 부세나 해중공원이 있음.



그림 6-3-14. <사진> 오키나와의 해중공원(해중전망탑(좌), 해수욕장(우)).

그 외 일본은 4000m 해저에 해저 도시를 만들겠다는 곳도 있음. 일본 1위의 건설사인 시미즈 건설은 2016년 10월 ‘오션 스파이럴(Ocean Spiral)’ 프로젝트를 발표함. 2030년에서 2050년 사이에 75층 높이의 해저 건축물을 지어 입주민을 받게한다는 계획임. 우주비행사 훈련을 위하여 해저에 훈련시설을 지어서 사용하는 것이 고작이었지만 앞으로는 보다 더 나이도가 높고 규모가 큰 해저 생활형 건축물까지 등장할 것으로 보임(출처: <http://news.joins.com/article/21281354>).

2) 미주, 유럽

가) 미국 카탈리나섬 해양공원

2019년 5월 미국 로스엔젤레스시에서 약 1시간 배를 타고 태평양으로 나가면 휴양지로 잘 알려진 카탈리나섬이 있음. 카탈리나섬의 선박이 드나드는 항구에는 요트와 낚시배, 레저관광선이 정박하고 있고 수산업을 하는 어선은 보이지 않음. 롱비치 항구에서도 약 한시간정도 서쪽으로 운항하면 카탈리나섬에 도착할 수 있는 곳임.

카탈리나섬은 해양레저, 관광 등 전형적인 휴양지의 모습을 갖추고 있으며 다양한 해양레저 활동을 할 수 있는 곳으로 유명한데 섬에서는 골프장용 카터(렌탈가능)를 사용하여 공기 오염을 방지하려는 노력을 보여왔지만 최근에는 일부 일반 차량들도 운행하고 있음.

이 섬의 주변에는 수십군데의 다이빙 포인트가 개발되어 소개되고 있지만, 가장 항구마을에 가깝게 접근할 수 있는 곳은 항구 동편에 위치한 카지노 건물로 지었던 건물 앞 ‘카지노포인트’ 임. 이곳에서는 일정해역을 줄과 브이로 구획을 지어서 다이빙 포인트의 수중생태를 어업이나 일반 선박운항으로부터 보호하고 있음. 수심 7m와 30m 위치에 브이를 고정시켜서 다이버들의 하강줄과 안전 상승줄을 표하여 활용하고 있음. 대부분의 해외 다이빙 포인트에서는 버디(짝)이나 현지 가이드 없이는 잠수를 불허하는 곳이 많지만 이 포인트에서는 잠수 라이센스와 간단한 확인서를 작성하면 자신이 필요한 장비만 빌려서 자유롭게 혼자서도 다이빙이 가능한 곳임. 즉, 외곽 라이표식과 하강출 등 안전 표시, 입출수 지점의 계단과 안전 난간 등 다이빙을 위한 안전시설을 잘 설치, 관리하고 있으면서 관광객들이 자유롭게 스킨, 스쿠버다이빙을 즐길 수 있도록 해 두도 있음.

여기서는 미구 서부해안에 유명한 대형 갈조류인 모자반숲(kelp forest)의 생태와 관리에 대한 것을 볼 수 있음. 스쿠버다이빙과 스킨다이빙으로 현지에서의 조사를 진행한 결과, 연안의 다이빙 편이시설과 함께 수중 생태도 잘 보호되어 건강한 생태를 유지하고 있음을 알 수 있음. 입수지점의 방파제처럼 쌓여진 석축 앞에서 수심 약 10m까지 발달한 kelp 숲에서는 미터급 대형 돛류와 북미흑돔, 노랑점벙에돔, 벤자리류 등 다양한 어종들을 관찰할 수 있었고 어업이 이루어지지 않는 곳에서 볼 수 있는 해양생물들이 사람을 두려워 하거나 피하지 않는 사실을 확인할 수 있음. 그 외 해삼, 성게, 해조류 등 다양한 생물종들이 켈프 숲에 서식하고 있음. 낚시나 창질이 허용되지 않는 곳이어서 어류들도 사람과 친숙하게 지내고 있었으며 이렇게 철저히 보호 관리된 해역의 생태 특성은 우리나라 통영바다목장의 보호수면 내에서의 해양생물들의 행동 등을 볼 수 있음. 또, 일본 사도섬의 북소포 마을 연안이나, 호주 캐언즈의 수상 해양공원과도 유사하게 철저히 생태 위주로 관리되어온 해양공원임. 어선이 통제되고 사냥이 통제된 곳이라 서식하는 생물들이 사람과 친숙하였으며 전장이 1 m에 이르는 대형 돛류가 어슬렁거리는 해역이어서 평일임에도 불구하고 다양한 나라에서 온 관광객들이 그곳에서 다이빙이나 스킨다이빙을 즐기고 있음. 즉, 해중공원은 여러 가지 시설들을 만드는 것 보다 철저히 보호된 꾸준한 관리가 더 중요함을 보여 주는 곳임.



그림 6-3-15. <사진> 카탈리나섬 해양공원. 항구외쪽의 카지노 건물앞 카지노포인트(좌상), 연안의 무성한 해조류들(우상), 대형모자반류인 kelp숲(좌하), 사람을 따라다니는 대형 캘리포니아흑돔류(우하).

나) 그레나다의 수중조각공원

2006년 5월 그레나다 연안에 세계 최초의 수중조각공원이 개관함. 몰리네어만의 약 800평방미터 해역에 65개 이상의 조각상 설치함. 이러한 수중조각공원은 몰리네어베이의 스노클링 관광 산업을 부흥시키는 결과를 가져옴.

멕시코 칸쿤 수중미술관 MUSA, 2009: 'Underwater musium(MUSA, 'Museo Subacuatico de Arte') '으로 불리우는 멕시코 칸쿤과 이슬라 무하레스 사이의 수중에 약 400여점의 작품을 전시하고 있음. 이 수중박물관은 영국의 조각가, Jason deCaires Taylor가 2009년부터 현재까지도 계속해서 작품을 추가하고 있는 '최초의 수중박물관' 으로 알려져 있음(MUSA는 'Museo Subacuatico de Arte'의 줄임말로 수중 미술 박물관이라는 뜻).



그림 6-3-16. 멕시코 칸쿤의 수중미술관.

(출처: <https://blog.naver.com/uidesignmage/221146811097>)

다. 비즈니스형 해중공원 모델

다양한 수층 공간을 활용하여 통영 연안에서 냉수성 해양생물자원의 양식을 시도하는 것이 주목적인 이 과제외 또 하나의 목적은 중간 수층을 활용한 양식 시설을 포함한 해수면과 깊은 저

층 해저면의 전 공간을 활용한 ‘생산성 있는 해중공원’ 즉, 비즈니스형 해중공원(Marine park)의 모델을 개발하고 나아가 실 현장에서의 생산과 해양레저, 자원조성 등 기능을 함께 살려서 연안 바다공간의 최대 활용을 이끌어 내는 것임.

통영 인근 연안은 지금까지의 전통적인 방식의 양식업과 수산업은 물론 바다목장 사업을 통한 자원증식의 우리나라 대표적인 모델을 현재 관리운영하고 있는 곳이고 최근 급격히 증가한 해양 유어, 체험관광객의 수요를 충족시키기 위해서는 해상 경관과 해중 생태관광이 함께 발달, 정착되어야 할 지역이기 때문임.

우리나라는 앞의 서구 유럽, 미국, 일본의 해중공원보다는 더 복잡한 기능을 요구 받고 있기 때문이기도 함.

2018년(1차년도)와 2019년 사업을 진행하면서 양식실험이 이루어지고 있는 통영시 산양면 일대의 연안을 대상으로 해중공원 모델 5개(한국형 해양공원 모델 I-V)를 제안하게 됨.

최초 통영바다목장 해역 내에서 중층 시설을 활용한 가리비 생산실험과 병행해서 개발한 개념도는 그림 4, 5에서 보는 바와 같음.

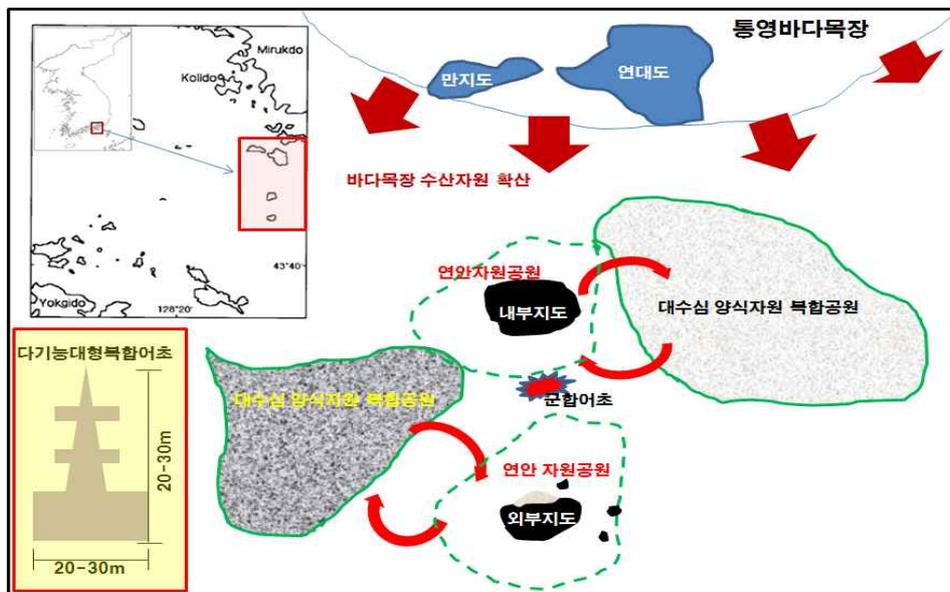


그림 6-3-17. 통영 해중공원 개념도(평면도).

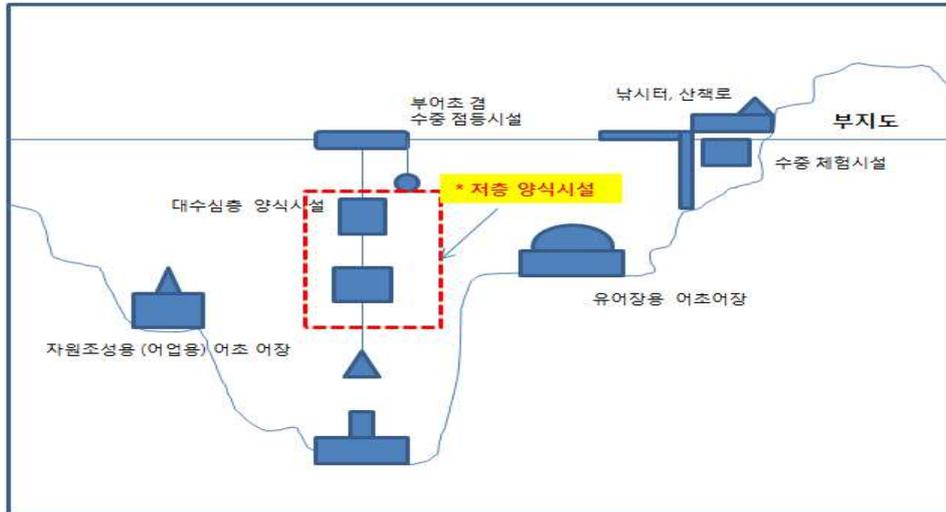
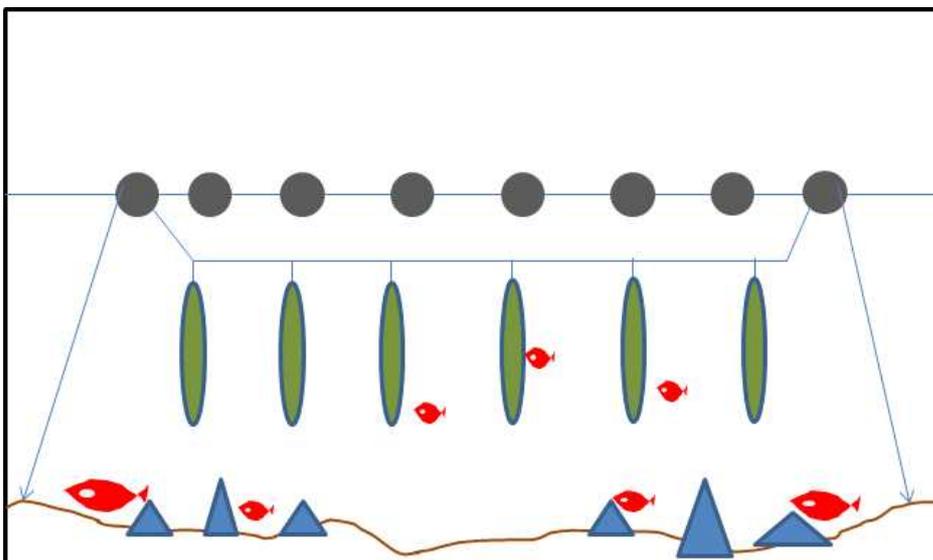


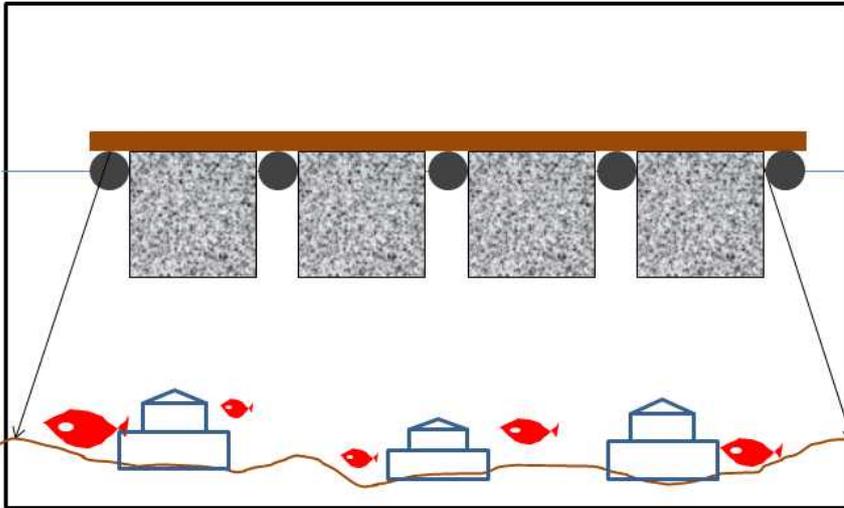
그림 6-3-18. 통영해중공원 수층별 시설 개념도.

그림 4,5에서 보듯이 통영바다목장에서 증식되어 확산되는 수산자원의 광역 관리 해역으로서의 역할과 수중공간의 양식시설을 포함한 다양한 기능의 시설을 우선 개념도에 삽입해 두고, 1) 연안 해양생물다양성 보존, 2) 수중경관 보존, 3) 양식 생산성과 해양레저 산업의 활성화를 꾀하면서 동시에 생태관광과 접목된 교육 기능까지 가진 ‘한국형 비즈니스형 해양공위’의 모델의 기초 개념도라 생각함.

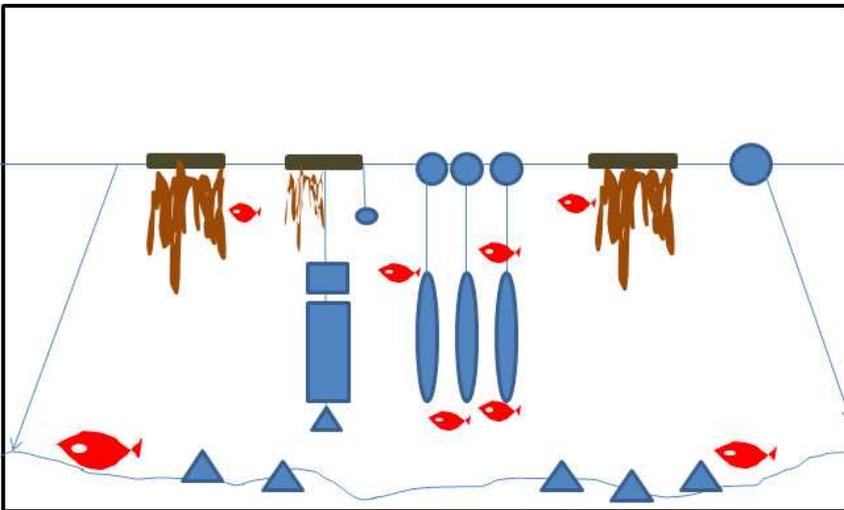
1) 비즈니스형 해중공원 모델 - I



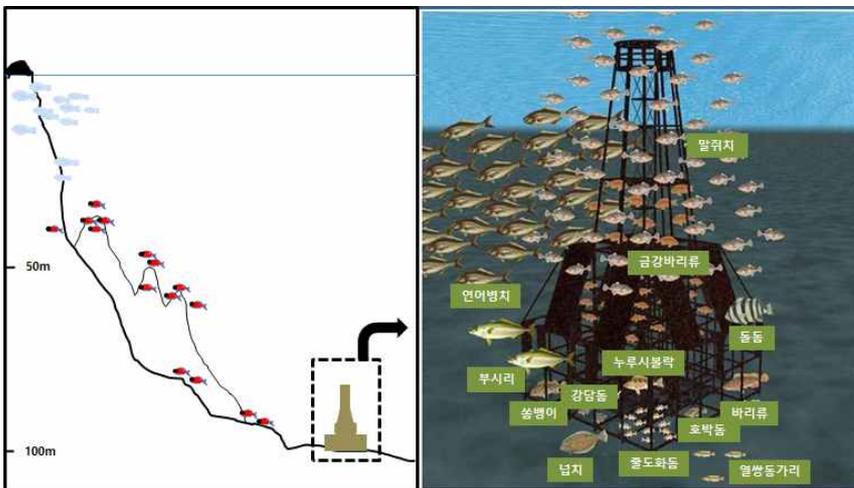
2) 비즈니스형 해중공원 모델 - II



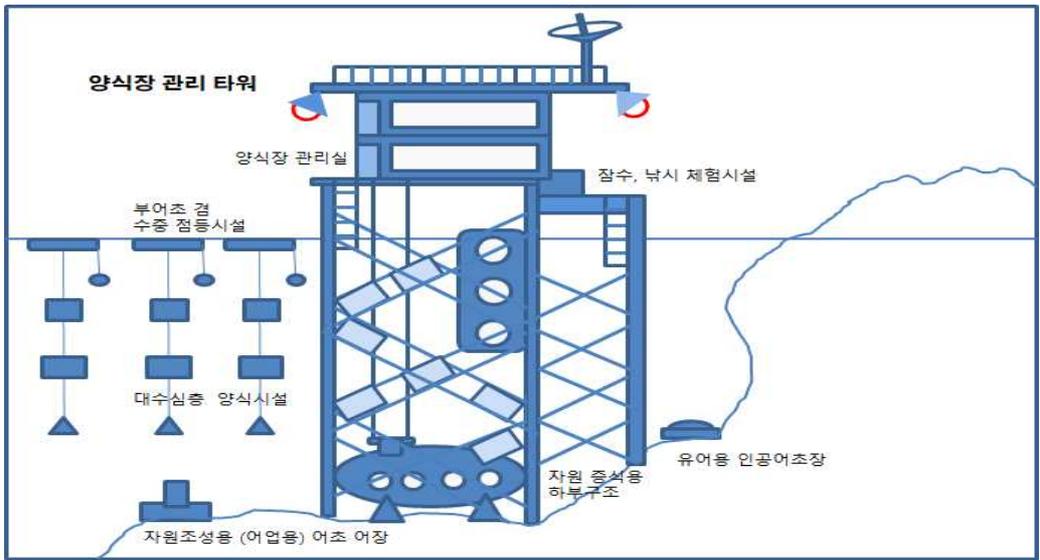
3) 비즈니스형 해중공원 모델 - III



4) 비즈니스형 해중공원 모델 - IV



5) 비즈니스형 해중공원 모델 - V



• 체험시설 제작: 해양수산부의 해양공간의 통합관리와 계획적인 이용체계 구축(국정과제 84-5) 과 관련된 지역협의회 활동과 향후 추진 방안을 감안한다면 이 모델의 초안은 해양공간의 복합적인 활용에 대한 좋은 모델이 되리라 생각됨. 즉, 항만, 어장, 보호구역 등 단일 목적으로 우리나라 연안 해양공간 관리를 정리하기에는 좁은 해역에서의 복합적인 기능과 역할을 요구받고 있는 시대이기 때문임.

보다 많은 세계적인 해중공원 사례 분석과 대상 해역에서 9년간 연구 용역사업으로 추진된 통영바다목장 사업 결과물인 불락류의 자원조성 기술, 참돔, 감성돔을 대상으로 포함하는 유어용 인공어초 개발의 과정을 융합한다면, 심층 양식과 자원조성, 나아가 해양레저산업, 체험, 교육 기능을 가진 해양공원, 또는 해중공원(Marine park)의 모델을 실 해역에 적용할 수 있을 것으로 판단됨.

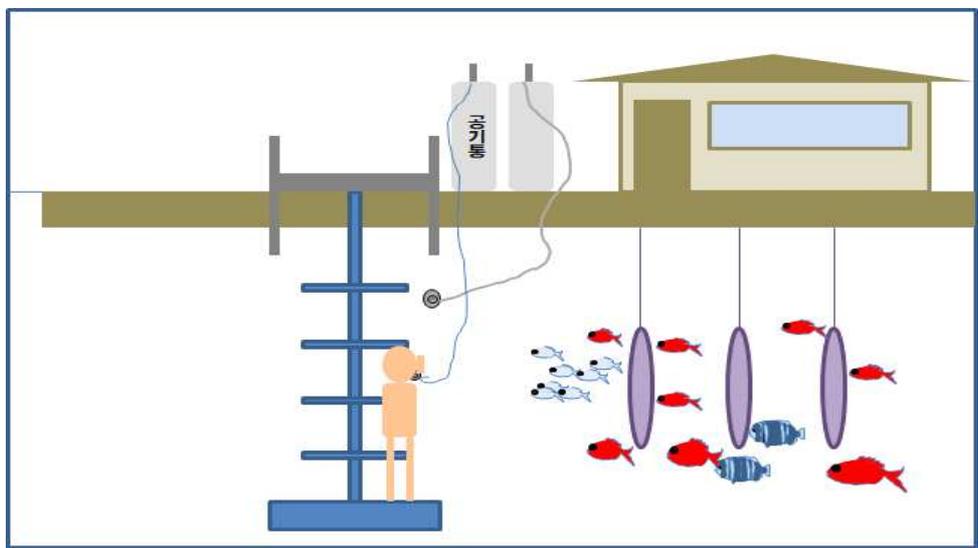
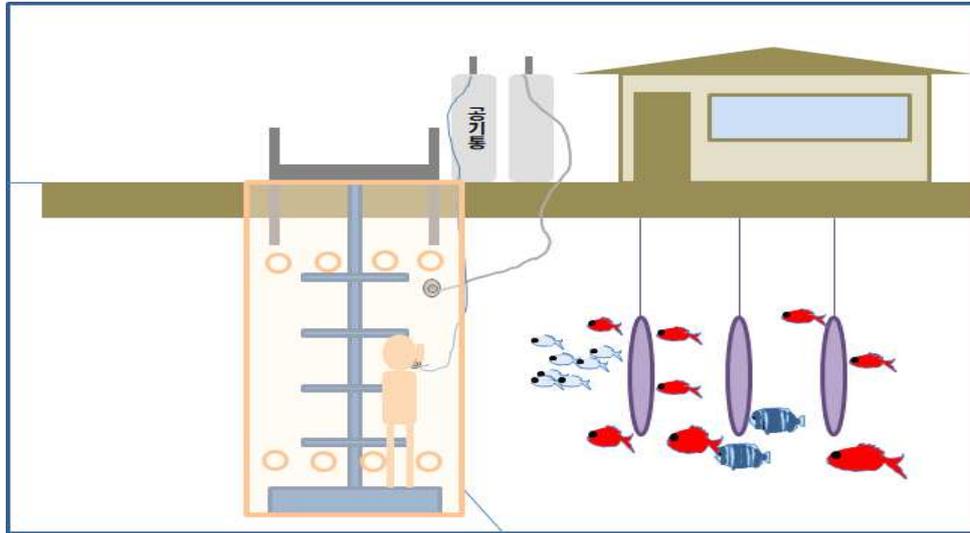
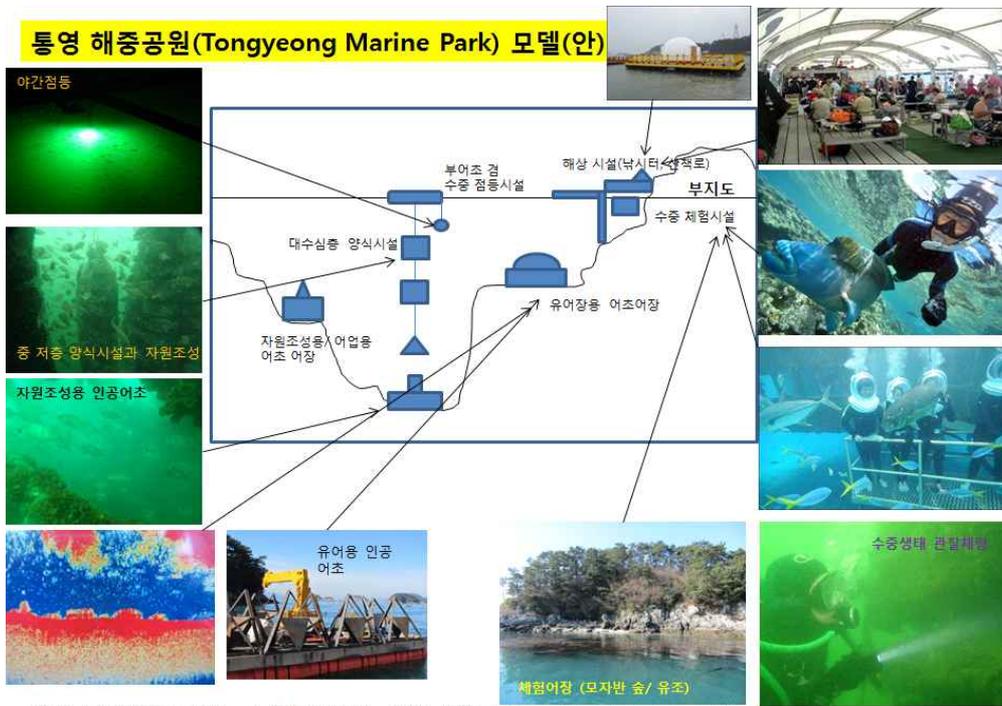


그림 6-3-19. 통영 해중공원 체험시설 -1.



수중 전망 아크릴(유리)박스

그림 6-3-20. 통영 해중공원 체험시설 -II.

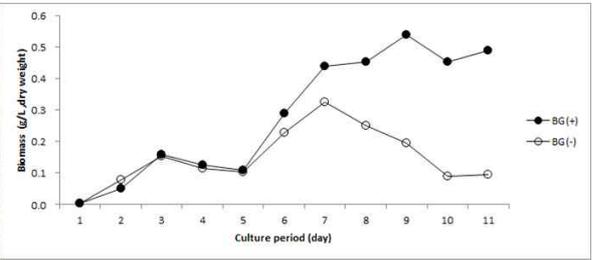


연안 생물다양성 보존+ 수중경관 보존+ 양식,자원. 레저복합단지(비즈니스모델)
- 연안 생태 및 생물다양성 보존/ 생태관광, 교육/ 표층,대수심 양식

그림 6-3-21. 수층공간 및 양식어장을 이용한 해중공원 (안)

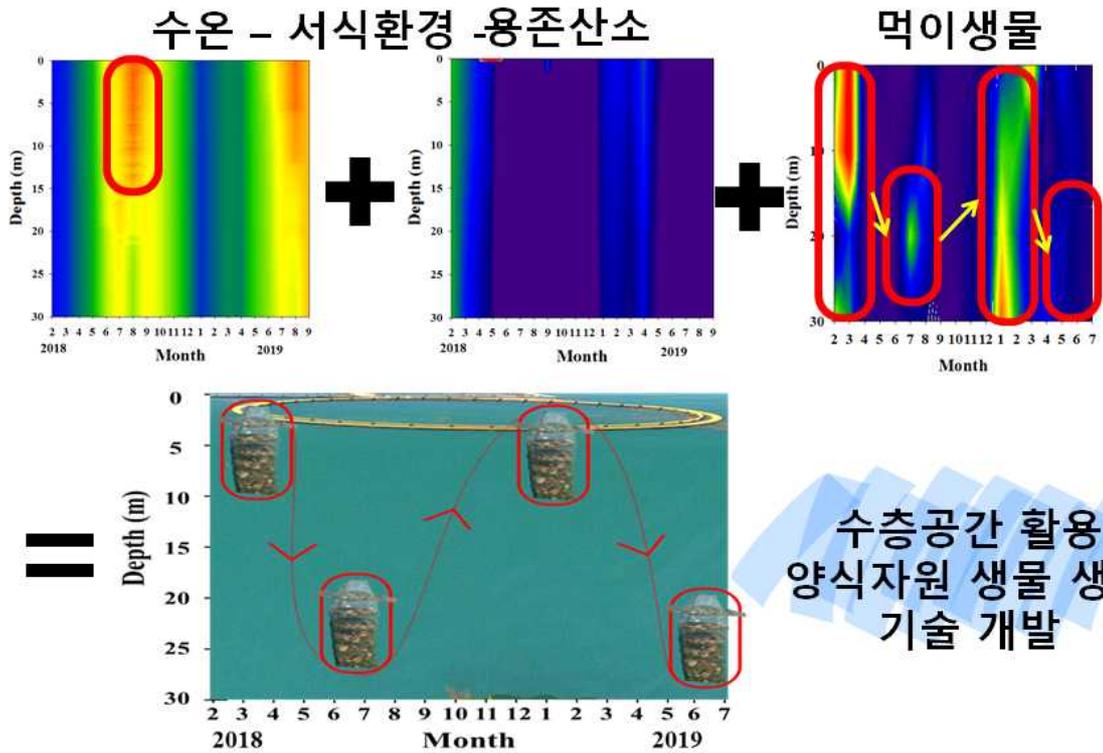
제3절 대표 성과

우수성과 -1.	고수율 에탄올 생산 가스전환 균주 발굴
성과 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ CO/CO₂를 에탄올로 전환 가능한 신규 미생물 <i>Clostridium</i> sp. AWRP 분리 <ul style="list-style-type: none"> - 강한 일산화탄소 내성을 지닌 신규 분리 미생물 <i>Clostridium</i> sp. AWRP의 유전체를 해독하고 근연종과 비교분석하여 신종으로 분류될 수 있는 기준임을 확인 - 다양한 조건에서 신규 분리 균주의 배양 특성을 분석하여 가스전환 속도 및 에탄올 생산성이 향상된 배양 조건을 확립 - 반응기 이용 가스전환 평가에서 기존 근연종 대비 에탄올 생산성이 동등 또는 그 이상의 수준임을 확인 - 연구 결과는 생물공학 분야의 유명 학술지인 <i>Biotechnology for Biofuels</i>(mrnIF: 89.44)에 게재되었음
성과의 우수성	<ul style="list-style-type: none"> ○ 가스전환 공정 개발을 위한 플랫폼 균주 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 일산화탄소가 포함된 부생가스를 활용하여 고효율 에탄올 생산 가능 (에탄올/아세트산 선택도 > 70으로 세계 최고 수준) - 수소, 전기 등의 에너지를 통해 이산화탄소를 아세트산/에탄올로 전환 가능 - 가스전환 속도 및 생산성 측면에서도 기존 균주와 동등 또는 그 이상의 수준 - 단순한 신규 미생물의 분리/해독에서 벗어나 대사공학적 균주 개량을 위한 유전자 조작 방법도 확립 - 향후 후속 연구를 통해 균주 개량 및 향후 더욱 우수한 가스전환 균주 발굴에 활용이 가능할 것으로 기대됨
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="text-align: center;"> <p>이산화탄소 및 부생가스</p> <p>CO₂ + H₂</p> <p>CO</p> <p>CO₂ + e⁻</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p><i>Clostridium</i> sp. AWRP</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>C2 - C4 화합물</p> <p>아세트산</p> <p>에탄올</p> <p>2,3-부탄디올</p> </div> </div>	
증빙자료	<ul style="list-style-type: none"> ○ Lee, J., Lee, J.W., Chae, C.G. <i>et al.</i> Domestication of the novel alcohologenic acetogen <i>Clostridium</i> sp. AWRP: from isolation to characterization for syngas fermentation. <i>Biotechnol Biofuels</i> 12, 228 (2019) doi:10.1186/s13068-019-1570-0

우수성과 -2.	해양미세조류를 효율적으로 배양하기 위한 하이브리드 배양 원천기술 개발																																				
성과 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 미세조류-미생물 하이브리드 배양 컨셉 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 효모가 포도당을 바이오에탄올로 전환(포도당 1분자→에탄올 2분자+이산화탄소 2분자)시킬 때 생산되는 부산물인 이산화탄소를 미세조류 배양시스템에 연결하여 공급함으로써 배양배지의 원료단가를 낮추고 미세조류의 성장성을 높일 수 있는 기술 - 기능성 물질을 추출하기 위한 미세조류를 배양하고 이와 더불어 에탄올을 생산할 수 있는 미생물을 배양함으로써 양쪽 모두 산업적으로 활용할 수 있도록 구현 ○ 미세조류-미생물 하이브리드 배양 시스템 설계 <ul style="list-style-type: none"> - 미세조류 배양조: 자체 기술력을 활용해 에너지 소모 없이 공기 주입만으로 배양액을 순환시킬 수 있는 구조를 설계하고 미생물로부터 생산되는 이산화탄소가 물의 압력을 버티고 원활히 공급될 수 있는 위치를 선정하여 시스템을 설계함 - 미생물 배양: 미생물의 배양조는 일반적인 방법을 사용하지만 배양방식을 알지네이트 구슬형 담체 안으로 고농도의 미생물을 혼합하여 에탄올의 지속적인 생산을 위한 fed-batch가 용이하도록 설계. ○ 미세조류-미생물 하이브리드 배양 기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 동일 미세조류를 배양액에 탄소원을 제거하여 미생물의 이산화탄소를 공급한 실험군과 배양액 자체에 탄소원이 함유된 대조군과 비교시 최대 성장이 1.66배 및 2.17배 증가 																																				
성과의 우수성	<ul style="list-style-type: none"> ○ 세계 유일의 미세조류-미생물 하이브리드 배양 원천기술 확립 <ul style="list-style-type: none"> - 바이오에탄올 생산의 효율성을 높인 미생물 배양법 - 바이오에탄올 생산시 발생하는 이산화탄소를 미세조류 배양액에 공급하여 고부가가치 미세조류의 성장을 크게 향상시키고 배지의 원료 단가를 절감시킬 수 있음 																																				
<div style="display: flex; align-items: center;">    </div> <table border="1" style="margin-top: 10px; width: 100%; border-collapse: collapse;"> <caption>Biomass (g/L dry weight) vs Culture period (day)</caption> <thead> <tr> <th>Culture period (day)</th> <th>BG(+)</th> <th>BG(-)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>0.00</td><td>0.00</td></tr> <tr><td>2</td><td>0.08</td><td>0.05</td></tr> <tr><td>3</td><td>0.15</td><td>0.12</td></tr> <tr><td>4</td><td>0.12</td><td>0.10</td></tr> <tr><td>5</td><td>0.10</td><td>0.08</td></tr> <tr><td>6</td><td>0.28</td><td>0.22</td></tr> <tr><td>7</td><td>0.45</td><td>0.32</td></tr> <tr><td>8</td><td>0.48</td><td>0.25</td></tr> <tr><td>9</td><td>0.52</td><td>0.18</td></tr> <tr><td>10</td><td>0.45</td><td>0.10</td></tr> <tr><td>11</td><td>0.48</td><td>0.10</td></tr> </tbody> </table>		Culture period (day)	BG(+)	BG(-)	1	0.00	0.00	2	0.08	0.05	3	0.15	0.12	4	0.12	0.10	5	0.10	0.08	6	0.28	0.22	7	0.45	0.32	8	0.48	0.25	9	0.52	0.18	10	0.45	0.10	11	0.48	0.10
Culture period (day)	BG(+)	BG(-)																																			
1	0.00	0.00																																			
2	0.08	0.05																																			
3	0.15	0.12																																			
4	0.12	0.10																																			
5	0.10	0.08																																			
6	0.28	0.22																																			
7	0.45	0.32																																			
8	0.48	0.25																																			
9	0.52	0.18																																			
10	0.45	0.10																																			
11	0.48	0.10																																			
증빙자료	<ul style="list-style-type: none"> ○ 최근 데이터로써 상위 20% 이내 국제논문 투고 및 특허 출원 예정 																																				

우수성과 - 3.	수심별 양식자원의 먹이생물 분포도 작성
성과 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 수심별 양식자원의 먹이생물 분포도 작성 - 2018년 2월부터 2019년 7월까지 수심에 따른 월별 먹이생물 분포도 작성 - 유전자부위 중 CO1 barcode의 차세대염기서열 분석법을 이용한 먹이생물 분포도 작성 - 현미경으로 분석이 어려운 미세조류 및 다양한 생물군의 수심별 분포도 작성
성과의 우수성	<ul style="list-style-type: none"> ○ 양식자원의 먹이생물은 규조류만 섭식할 것으로 판단하였으나, 실질적으로 non-filter feeder의 경우 다양한 먹이생물을 섭식하는 것으로 판단됨. ○ 저수온기에는 전 수층에서 다양한 먹이생물이 서식하고 있으나, 고수온기에는 표층보다 수심이 깊은 곳에서 먹이생물의 서식이 높아 냉수성 양식자원 (가리비 등)의 경우 계절별로 서식수심의 변경이 필요함을 과학적으로 증명함

○ 양식자원 먹이생물 모니터링 (먹이생물)



증빙자료	○ 기 타
------	-------

[위탁과제 목표달성 및 본과제 활용 여부]

(1) 위탁연구과제 목록

위탁과제명	연구참여자		연구기간		당해연도 연구비(백만원)	비고	
	연구책임자	참여연구원(명)	총기간	당해년도			
1	부경대학교	정원교	4	1	2019	30	
2	충남대학교	마하나마 디조이사	4	1	2019	30	

(2) 위탁과제 목표달성도 및 본과제에 대한 기여 내용

위탁과제명	당해연도 목표	목표달성도 (%)	본과제 목표달성에 대한 기여 및 활용 내용
1	해양생물 유래 펙틴을 함유한 피부 상처 치료용 바이오메디컬 소재 개발 연구	90%	<ul style="list-style-type: none"> 비임상 모델 적용 효능 비교 검토 해양 유래 펙틴 융합 바이오메디컬 소재 선별 및 상처 치료용 시작품 제작 해양 유래 펙틴 융합 바이오메디컬 소재 안전성 평가 <p>○ 본과제의 성과목표 7을 달성하기 위해 필요한 연구로써 미세조류로부터 분리한 펙틴을 활용하여 피부상처 치료용 하이드로겔을 제작하고 이를 쥐에 적용하여 상처 치유효과를 확인하였고 현재 안전성 평가 진행 중.</p>
2	어류의 면역증강 및 창상치유효과를 위한 미세조류 기반 펙틴 나노 입자 개발 연구	100%	<ul style="list-style-type: none"> 스피룰리나 펙틴 및 변형된 펙틴의 제브라피쉬에 대한 상처치유효과 분석 펙틴이 처리된 제브라피쉬의 조직학적 분석 펙틴 처리에 따른 면역관련 유전자들의 발현분석 <p>○ 본과제의 성과목표 7을 달성하기 위해 필요한 연구로써 미세조류로부터 분리한 펙틴과 나노입자로 제작한 펙틴을 제브라피쉬에 적용하여 상처치유효과 및 면역관련 인자들을 분석함으로써 100% 수행함.</p>

제2절 연구개발 목표달성도

가. 연구목표의 정상 추진 및 성과 우수성

[총괄 1(연차별 목표 대비 달성도)]

총연구기간내 연차별 목표 대비 달성율(%)					
구분	연차별 달성내용				연차별 계획대비 연구실적 달성율(B) (%)
	성과목표	연구내용	가중치 (A)	달성실적	
1년차	1. 신규 생물자원	1-1. 신규 미생물자원 확보 10종	0.4	미생물 자원 확보 68종	100
		1-2. 신규 생물자원 특성분석 10종		생물자원 특성분석 13종	
	2. 개량균주	2-1. 개량균주 확보 1종	0.1	개량균주 1종 확보	100
	3. 가스전환 고농도 배양기술	3-1. 가스전환 성장 OD 3.0<	0.1	OD ~ 5.0 수준	100
				4. 미세조류 생산성	4.1. 일일생산성 40g/m ² /d 이상
	5. 수증공간 먹이 생물 분포도	5.1. 수증공간 먹이생물 분포도 분석 1건	0.05	계절별 수증공간 먹이생물 분포 양상 1건	100
	6. 병원체 목록	6.1. 병원체 목록 1건	0.05	병원체 목록 1건	100
계			1.0		100
2년차	1.	1-1.			
		1-2.			
	...	2-1.			
		2-2.			
계			1.0		
3년차	1.	1-1.			
		1-2.			
	...	2-1.			
		2-2.			
계			1.0		

주) 1. 연도별 계 : 예시) $(0.6(A) \times 90(B)) + (0.4 \times 95) = 92\%$

2. (연차별 계획대비 연구실적 달성율은 최고 100%를 초과할 수 없음)

[총괄 2(연구성과계획서상 정성적 성과목표 대비 달성도)]

항목	가중치 (%)	본 과제 설정목표	연구성과계획서상 성과목표	부합 여부	수행여부
신규 미생물자원 확보		10종	10종	부합	수행
신규 생물자원 특성 분석		10종	-	초과	수행
개량균주 확보		1종 (성과계획서)	-	미달 (연차이월)	수행
가스전환 고농도 배양기술		OD 3.0<	OD 3.0<	동등	수행
미세조류 생산성		일일생산성 40g/m ² /d 이상 (성과계획서)	일일생산성 40g/m ² /d 이상	동등	수행
고염분수 배양 해양생물의 기능성을 나타내는 추출물		10건	10건	동등	수행
미세조류 유래 펙틴의 동물실험		1건 (성과계획서)	1건	동등	수행
수층공간 먹이생물 분포도		1건	1건	동등	수행
병원체 목록		1건	1건	동등	수행
계	100%				

제3절 대외 기여도

1. 연구논문

번호	논문명	저자명 (KICST 저자만 표기)	게재일	학술지명	학술지 구분	ISSN	mrnIF	저자구분
1	Novel pectin isolated from <i>Spirulina maxima</i> enhances the disease resistance and immune responses in zebrafish against <i>Edwardsiella piscicida</i> and <i>Aeromonas hydrophila</i>	오철홍, 이경아	2019.10.01	Fish Shellfish Immun	SCI	1050-4648	98.57	교신저자
2	Biohydrogen production of obligate anaerobic archaeon <i>Thermococcus onnurineus</i> NA1 under oxic conditions via overexpression of frhAGB-encoding hydrogenase genes	이성혁, 강성균, 이현숙	2019.02.08	Biotechnol Biofuels	SCI(E)	1754-6834	89.44	제1저자
3	Domestication of a novel alcohologenic Acetogen <i>Clostridium</i> sp. AWRP: From isolation to characterization for syngas fermentation	이종민, 채철기, 권수재, 김윤재, 이현숙	2019.09.23	Biotechnol Biofuels	SCI(E)	1754-6834	89.44	제1저자
4	Characterization of an acetyl xylan esterase from the marine bacterium <i>Ochrovirga pacifica</i> and its synergism with xylanase on beechwood xylan	Sachithra Amarin Hettiarachchi, 조은영, 엄태양, 강윤혁, 오철홍	2019.08.01	Microb Cell Fact	SCI(E)	1475-2859	83.23	제1저자
5	A simple biosynthetic pathway for 2,3-butanediol production in <i>Thermococcus onnurineus</i> NA1	이규비, 김윤재, 임재규, 강성균, 이현숙	2019.04.30	Appl Microbiol Biotechnol	SCI	0175-7598	75.16	제1저자
6	Anti-melanogenesis activity of <i>Ecklonia cava</i> extract cultured in tanks with magma seawater of Jeju Island	김은아, 허수진	2019.06.28	Algae	SCI(E)	1226-2617	66.36	공동저자
7	Indole-6-carboxaldehyde isolated from <i>Sargassum thunbergii</i> inhibits the expression and secretion of matrix metalloproteinase 9	Tae-Hee Kim	2019.11.01	Int J Mol Med	SCI(E)	1107-3756	52.59	공동저자
8	Embryonic development and hatchability of red-spotted grouper (<i>Epinephelus akaara</i>) ♀ × giant grouper (<i>E. lanceolatus</i>) ♂ hybrid at three incubation temperatures	노충환	2019.09.30	Aquac Res	SCI(E)	1355-557 X	43.14	제1저자
9	Development of growth-promoting substances for diatoms (<i>Navicula</i> sp.)	김준성, 김은아, 양현성, 허수진	2019.06.21	Aquacult Int	SCI(E)	0967-6120	39.22	제1저자
10	A rapid and sensitive enzymatic assay for 2,3-butanediol	이규비, 김윤재, 임재규, 강성균, 이현숙	2019.04.30	3 Biotech	SCI(E)	2190-572 X	31.06	제1저자
11	Optimum feeding frequency for juvenile short barbeled velvetfin <i>Hapalogenys nigripinnis</i> reared in floating sea cages	오승용, 박진우	2019.02.25	Fisheries Sci	SCI	0919-9268	29.41	제1저자
12	<i>Roseithermus sacchariphilus</i> gen. nov., sp. nov. and proposal of <i>Salisaetaceae</i> fam. nov., representing new family in the order <i>Rhodothermales</i>	박미정, 양성현, 권개경	2019.04.05	Int J Syst Evol Microbiol	SCI	1466-5026	29.55	제1저자

번호	논문명	저자명 (KICST 저자만 표기)	게재일	학술지명	학술지 구분	ISSN	mrnIF	저자구분
13	<i>Anaerosachariphilus polymeriproducens</i> gen. nov. sp. nov., an anaerobic bacterium isolated from a salt field	김원덕, 박미정, 양성현, 권개경	2019.07.03	Int J Syst Evol Microbiol	SCI	1466-5026	29.55	제1저자
14	FGF11 is involved in 3T3-L1 preadipocyte differentiation by modulating the expression of PPARgamma regulators	이경원, 안영준, 임형순	2019.03.30 1	FEBS Open Bio	SCI(E)	2211-5463	24.24	제1저자
15	Formulation of a low-cost medium for improved cost-effectiveness of hydrogen production by <i>Thermococcus onnurineus</i> NA1	이성목, 이종민, 이성혁, 김재영, 이현숙, 강성균	2019.10.30	Biotechnol Bioprocess Eng	SCI(E)	1225--887	17.39	제1저자
16	Embryonic development of fertilized eggs of convict grouper (<i>Hyporthodus septemfasciatus</i>) ♀ × giant grouper (<i>E. lanceolatus</i>) ♂	노충환	2019.03.31	한국어류학회	KCI	1225-8598	-	제1저자
17	Changes in planktonic bivalve larvae of <i>Tegillarca granosa</i> and <i>Anadara kagoshimensis</i> in the Boseong coastal waters of South Korea	김현정, 강준수, 정승원, 박용주	2019.10.07	한국환경생물학회지	KCI	1226-9999	-	제1저자

2. 저서

해당 없음

3. 학술발표

번호	논문명	저자명 (KICST 저자만 표기)	발표일	학술대회명	구분	국내/외	저자구분
1	Beneficial Effects Of Ishophloroglucin A From <i>Ishige okamurae</i> On Obesity In Leptin Deficient Obese Mice	강나래	2019.05.01	23rd International Seaweed Symposium	초록(Abs)	국내	제1저자
2	<i>Stichopus japonicus</i> Suppresses Inflammatory and Cancer Progression by Promoting ROS-Mediated Inhibition of MAPK Signaling.	김준성	2019.05.01	23rd International Seaweed Symposium	초록(Abs)	국내	제1저자
3	Direct Electron Transfer between the frhAGB-Encoding Hydrogenase and Thioredoxin Reductase in a Non-Methanogenic Archaeon <i>Thermococcus onnurineus</i> NA1	정해창	2019.09.03	Thermophiles 2019, 15th international congress on Thermophiles	초록(Abs)	국제	제1저자
4	Biological process effective in co-production of biohydrogen and α-amylase by the conversion of carbon monoxide	이성혁	2019.09.03	Thermophiles 2019, 15th international congress on Thermophiles	초록(Abs)	국제	제1저자
5	Application of Clostridial Species for the Production of Alcohols and Carboxylic Acids	이종민	2019.06.24	46th Annual Meeting & International Symposium	초록(Abs)	국내	제1저자
6	Effects of environmental factors and halophyte distribution on	이형곤	2019.08.19	한국습지학회 2019 국제학술발표회	초록(Abs)	국내	제1저자

번호	논문명	저자명 (KICST 저자만 표기)	발표일	학술대회명	구분	국내/외	저자구분
	spatiotemporal variability of dominant mollusc species (<i>Glauconome chinensis</i> <i>Assiminea lutea</i>) in the Donggeom salt marsh, Korea						
7	Species composition and distribution of hull-fouling macrozoobenthos differs among research vessel navigation areas	이형곤	2019.04.24	2019 International Harmful Organisms Symposium	초록(Abs)	국내	제1저자
8	RAPID SCREENING OF ANTI-BACTERIAL COMPOUNDS AGAINST HUMAN SKIN MICROBE BY COLONY PICKING METHOD	엄태양	2019.07.12	New Approaches and Concepts in Microbiology	초록(Abs)	국제	제1저자
9	Large quantities secretion to culture medium with epidermal growth factor and trigger factor fused protein in <i>Escherichia coli</i>	강윤혁	2019.07.11	New Approaches and Concepts in Microbiology	초록(Abs)	국제	제1저자
10	Saringosterol acetate Inhibits Liver Cancer Progression via PI3K/Akt/mTOR Signaling in A Zebrafish Xenograft model	김은아	2019.04.30	International Seaweed Symposium	초록(Abs)	국내	제1저자
11	Anti-inflammatory effects of Apo-9'-fucosanthinone possesses anti-inflammatory effects via inhibition of MAPKs and NF- κ B signaling in LPS-activated RAW264.7 macrophages and zebrafish embryos	허수진	2019.05.09	한국수산과학회 춘계학술대회	초록(Abs)	국내	제1저자
12	A marine algal polyphenol inhibits high-glucose induced oxidative stress in zebrafish embryos	김은아	2019.05.09	한국수산과학회 춘계학술대회	초록(Abs)	국내	제1저자
13	Tuberatolide B Protects LPS-stimulated Inflammatory Response in RAW264.7 cells and Zebrafish Model through Inhibiting MAPKs and NF- κ B Signalings	김은아	2019.05.30	International Seaweed Symposium	초록(Abs)	국내	제1저자
14	Protective effect of Bis (3-bromo-4,5-dihydroxybenzyl) ether against LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 macrophages through ROS-mediated ERK signaling pathway	허수진	2019.06.25	Pharmaceutics and Drug Delivery Systems	초록(Abs)	국제	제1저자
15	Anti-cancer effect of Tuberatolide B in MDA-MB-231 cells through induction of ROS and inhibition of STAT3 pathway	박아름이	2019.06.25	Pharmaceutics and Drug Delivery Systems	초록(Abs)	국제	제1저자
16	Biohydrogen Production of Obligate Anaerobic Archaeon <i>Thermococcus onnurineus</i> NA1 under Oxic Conditions via Overexpression of frhAGB-encoding Hydrogenase Genes	이성혁	2019.06.24	한국미생물생명공학회	초록(Abs)	국내	제1저자
17	차세대염기서열 분석을 통한 보성 연안 해역에서 이매패류 유생 출현 양상	김현정	2019.05.16	한국해양학회	초록(Abs)	국내	제1저자

번호	논문명	저자명 (KICST 저자만 표기)	발표일	학술대회명	구분	국내/외	저자구분
18	Effect of inorganic micronutrients on growth of <i>Arthrospira</i> (<i>Spirulina</i>) <i>maxima</i>	이원규	2019.04.28	23rd International Seaweed Symposium	초록(Abs)	국내	제1저자
19	<i>Altibacter aquimarinus</i> sp. nov., a Marine Bacterium Isolated from Magma Seawater from Jeju Island, Republic of Korea	양성현	2019.04.18	한국미생물학회	초록(Abs)	국내	제1저자
20	<i>Parashewanella tropica</i> sp. nov., a Novel Bacterium Isolated from a Marine Sponge from Chuuk lagoon, Federated States of Micronesia	Teddy Namirimu	2019.04.18	한국미생물학회	초록(Abs)	국내	제1저자
21	The Bacterial Community Structures at Deep Sedimentary Biosphere of South Pacific Gyre	박미정	2019.04.17	한국미생물학회	초록(Abs)	국내	제1저자
22	Direct Electron Transfer between the frhAGB-Encoding Hydrogenase and Thioredoxin Reductase in a Non-Methanogenic Archaeon <i>Thermococcus onnurineus</i> NA1	정해창	2019.04.19	한국미생물학회	초록(Abs)	국내	제1저자
23	Microbial Diversity in the Onnuri Vent field of Mid Indian Ocean Ridge and Their Identification	김윤재	2019.04.18	한국미생물학회	초록(Abs)	국내	제1저자

4. 산업재산권 (특허/SW/신기술 등)

번호	특허명(SW명)	등록국가	출원번호	출원일	등록번호	등록일
1	플러스공간 인공어도초 및 이를이용한 배치기술	대한민국	10-2019-0032382	2019.03.21	-	-
2	일산화탄소로부터 선택적 에탄올 생산을 위한 미생물의 배양 방법	대한민국	10-2019-0109686	2019.09.04	-	-
3	초고온고세균 배양여액 재활용 기술	대한민국	10-2019-0113636	2019.09.16	-	-
4	대장균에서 배양액으로 배출되는 수용성 상피세포성장인자-trigger factor 융합단백질 및 이의 생산 방법	대한민국	10-2019-0142493	2019.11.08		
5	상피세포성장인자와 폴리아르기닌의 융합 단백질의 수용성 발현 및 과잉생산 방법	대한민국	10-2019-0142497	2019.11.08		
6	개체패류양성기	대한민국				

5. 기술료 수입

6. 기타(대외 및 홍보활동)

번호	활동명	유형	활동/시행일	계약 체결일
1	제주해양수산연구원 연구자문	대외(자문)	2019.05.01	2019.05.01
2	한국연구재단 기반생명 분야 2019년 중견연구 후속지원과제 평가	대외(평가)	2019.05.10	2019.05.10
3	제주테크노파크 '2019년 제주 해양수산 창업투자 지원센터 운영사업' 수혜기업 선정평가	대외(평가)	2019.05.17	2019.05.17
4	제주테크노파크 생물종다양성연구소 초청강연	대외(강연)	2019.07.25	2019.07.25
5	제주테크노파크 '2019년 제주 해양수산기업 해외수출지원' 선정평가	대외(평가)	2019.09.02	2019.09.02
6	제주테크노파크 생물종다양성연구소 '제주 미생물 산업화 지원센터 중장기 발전계획 수립 용역사업' 평가	대외(평가)	2019.10.01	2019.10.01
7	학부생 대상 세미나 초청강연	대외(강연)	2019.05.10	2019.05.10
8	학생 석사학위논문 심사	대외(평가)	2019.05.17	2019.05.17
9	해양수산생명자원의 확보 관리 및 이용 등에 관한 법률 조사 자문	대외(자문)	2019.08.20~09.06	2019.08.20
10	한국생명과학회 정기총회 해양극한미생물 및 바이오수소기술에 대한 초청강연	대외(강연)	2019.08.13-14	2019.08.13
11	2019 해양강좌 강연	대외(강연)	2019.09.25	2019.09.25
12	한국효소공학연구회 동계심포지엄 초청강연	대외(강연)	2019.01.24	2019.01.24
13	(사)한국해양정책학회 특별세미나 초청강연	대외(강연)	2019.06.14	2019.06.14
14	해양신산업 발전방안 모색을 위한 자문	대외(자문)	2019.07.28	2019.07.28
15	해양바이오포럼 해양바이오관련 정책과제 발굴 및 지원방안 마련을 위한 초청강연	대외(강연)	2019.10.29	2019.10.29
16	환동해산업연구원의 요청으로 초청강연	대외(강연)	2019.08.01	2019.08.01
17	미생물 대사모델 세미나 초청강연	대외(강연)	2019.05.29	2019.05.29
18	2019 한국미생물생명공학회 초청강연	대외(강연)	2019.06.24	2019.06.24
19	포항공대 에너지 인력양성사업의 초청강연으로 과제의 연구성과발표	대외(강연)	2019.07.24	2019.07.24
20	스마트양식어장 부표를 이용한 해양복합발전 시스템개발 세미나 개최	세미나	2019.04.26	2019.04.26
21	부경대 해양학과 학생 대상 연구현황소개 및 견학	홍보(대중강연)	2019.09.25	2019.09.25
22	신성여자고등학교 학생 대상 연구현황소개 및 진로특강	홍보(대중강연)	2019.08.02	2019.08.02
23	부산에너지과학고등학교 학생 대상 연구현황소개	홍보(대중강연)	2019.02.14	2019.02.14
24	영남대, 대구대학생 대상 연구현황강연 및 시설견학	홍보(대중강연)	2019.10.29	2019.10.29
25	보도자료 초안작성	홍보(보도)	2019.11.04	2019.11.04

제4절 연구성과의 의의

구분	주요 내용
자체 종합 평가 의견	<ul style="list-style-type: none"> □ 우수한 정량 성과 달성 <ul style="list-style-type: none"> - 전체 17편의 논문 중 mrnIF 상위 20% 이상의 논문 4편, 상위 40%이상 2편 등 다수의 우수 논문을 발표함 □ 세계 최고수준에 근접한 기술 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 모델생물을 이용한 가스발효기술의 경우 회분식 배양을 통하여 고농도의 아세트산 생산성 달성 (20 g/L) - 새로운 개념의 생물반응기 개발 등을 통하여 우수한 미세조류 생산성 달성 - 선행 과제의 성과를 계승하여 펙틴의 가공 및 비임상 단계에서 우수한 결과 확보 □ 현장 애로기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 수층 공간을 입체적으로 활용하여 다양한 수산자원의 양식이 가능함을 확인 - 양식 위해요인의 모니터링을 통해 양식 효율성 제고 가능성 확인
1차년 (2019년) 성과 및 의의	<ul style="list-style-type: none"> □ 우수한 신규 생물자원 확보에 성공 <ul style="list-style-type: none"> - 연안 습지, 해저열수구 등으로부터 신규한 자가영양미생물 확보에 성공. - 고염환경 적응 미세조류와 다양한 고염미생물을 확보하였으며 미세조류의 생산성, 미생물의 발효 결과 등을 볼 때 향후 활용 가능성이 높은 것으로 판단됨 □ 세계 최고수준의 회분식 가스전환 배양기술 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 현재 가스전환 미생물 연구에서는 낮은 균체량으로 인하여 MCRB(membrane cell recycling bioreactor) 형태로 운용하는데, 이는 scale-up에서 문제가 될 수 있음 - 1차년도 연구를 통해 MCRB 적용 없이 회분식 배양만으로 OD 3.0 이상 달성 가능함을 확인하였음 - 특히 일부 가스 전환 미생물의 경우 낮은 균체량에도(OD ~ 1.0) 불구하고 높은 아세트산 농도(20 g/L)를 기록하여, 회분식 배양에서는 세계 최고 수준에 도달하였음 - 향후 연구를 통해 균체량 개선시 아세트산 및 생산성도 더욱 개선될 것으로 기대됨 □ 고염분수 활용 미세조류의 고농도 배양기술 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 제주의 용암해수는 현재 먹는물 산업에 적용되어 현재 하루 1천톤에서 2020년부터 하루 약 1만톤 정도 생산될 예정으로 담수화 과정에서

구분	주요 내용
	<p>생산되는 고염분수가 바다로 배출되어 환경문제를 야기할 수 있으나 고염분수를 활용하여 해양생물을 배양하게 되면 환경 영향 저감 효과 및 배양단가를 낮출 수 있음</p> <ul style="list-style-type: none"> - 본 연구에서는 고염분수를 활용해 미세조류 2종에 대한 일일 생산성 40g/m²/d을 달성함으로써 미세조류의 생산성을 확보하고 이로부터 다양한 기능성 추출물들을 확보하였음 - 또한 미생물로부터 생산되는 이산화탄소를 미세조류 배양에 활용함으로써 더 높은 바이오매스를 확보할 수 있는 계기를 만들었음 <p>□ 고염분수 활용 해양생물로부터 기능성 물질 확보</p> <ul style="list-style-type: none"> - 고염분수를 다양하게 활용하기 위해 미세조류 배양, 미생물 배양, 발효물 제작 등에 활용하였으며 이로부터 우수한 기능성들을 확보하였음 <p>□ 남해에서도 수층공간을 활용하여 냉수성 수산물을 생산할 수 있음을 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> - 수층공간을 이용하여 양식생물을 대량생산 할 수 있는 해역 환경조건 파악 - 수층별 먹이생물 분포를 파악 및 병원체 목록 작성 - 수층별 부착생물의 부착양상 파악, 제어 방안기술 조건 확립 - 수층별 환경 및 먹이생물 분포, 부착생물양상 조건을 적용한 비단가리 시험 생산 성공

제4장 연구개발결과의 활용계획

1. 향후 연구 방향

본 과제는 2017년부터 시작된 3개 과제의 융합 형태로 진행 중이며 선행 과제의 성과를 이어받아 1년차 과제가 수행되었다. 이후 1차년도 확보된 자원과 배양체들을 이용하여 2차년도부터는 본격적인 기술 개발을 추진하는 한편 우수 생명자원의 지속적인 확보를 추진할 계획이다.

가. 해양극한 생명자원 지속 확보

- 국내외 환경시료 확보: 심해 해수, 심해 퇴적물, 생체 시료, 염전 등의 고염환경 등
- 다양성 분석: 환경 DNA 추출, 16S rRNA 유전자 증폭, 대량서열 분석, 군집 분석
- 농후배양을 통한 화학자가영양(chmelithoautotrophic)/아세트산 이용(acetotrophic) 미생물 분리, 분자동정

나. 가스발효 OD>5.0달성

- 가스전환-활용 균주 (화학무기자가영양/아세트산 이용) 특성분석 및 선별
 - 확보 미생물 자원의 특성분석 : 대사산물, 영양조건, 배양조건 등
 - CO₂ 고정능/아세트산 전환능 분석 (serum vial 수준), 오믹스 기반 대사경로 및 특이 유전자 기능 분석
- 모델균주(기확보 균주)를 이용한 가스발효 기술 고도화 : 배양조건 탐색, 가스발효 기술 고도화를 통한 고농도 배양 기술 확립
 - 온도, pH, 배지조성 등 미생물 생장조건 최적화 및 가스전환 parameter 분석
 - 적응진화/대사공학 기반 가스발효 균주 개량
 - 가스 fermentation 연속배양 확립 및 반응기 운전 파라미터 영향 분석

다. 고염분수 활용 대량 배양 기술 및 기능성 물질 함량 증진 기술 확립

- 고염 해양생물원료 대량생산 필요조건 연구
 - 고염 활용 해양생물원료로부터 기능성 추가 탐색
 - 배양 시스템 제작, 시스템별 배양특성 분석을 통한 바이오매스 대량생산 필요조건 연구
 - 고염 활용 미세조류-미생물 하이브리드 배양 테스트 및 대량배양 시스템 설계
 - 배양액 내 미생물 다양성 분석 및 고염분수 적용에 따른 전사체/단백질체 변화 분석
- 고염 적응 해양생물자원의 효능 스크리닝 및 유효성분 설정

- 고염 적응 해양생물의 다양한 추출물 및 기초영양성분 분석
- 고염 적응 해양생물의 추출물의 다양한 효능 스크리닝
- 기능성 향상을 위한 미생물/효소 활용 고염 적응 해양생물의 최적 가공물 제조 및 효능 분석
- 최적 가공물 제조를 위한 재조합 효소 개발
- 유효성분 발굴을 위한 물질 분리

라. 냉수층 공간을 이용 위생안전 어·패류 복합양식해양생물자원개발

- 냉수층 공간을 이용 위생안전 어·패류 복합양식해양생물자원개발
 - PCR/NGS 기반 해양병원체 검출기술 확립 및 모니터링 실시
 - 차세대염기서열 분석을 통한 양식자원의 먹이특성 규명
 - 대상종에 영향을 주는 부착생물 가입 분석 및 환경요인과의 상관관계 해석
 - 어장관리 ICT, 자동화시스템 장비적용 방안 기술개발
 - 양식 생산성 향상을 위한 중, 저층 양식 시설을 활용한 자원증식 기술개발 연구

2. 성과 활용 계획

- 신규 비광합성 해양·극한 미생물은 국가 자산으로서 다양한 기초·응용 연구개발에 활용
- 물질대사공학 또는 합성생물학 기술을 이용한 균주 내 유용물질 생산 시스템에 응용할 수 있는 원천균주와 유전자원 제공
- 탄소대사, 탄소고정 기작의 연구 영역 확대
- 원천기술을 이용 가스전환을 통한 바이오소재 생산기술 개발에의 활용
- 발전소 및 제철소에서 생산되는 부생가스에 생물학적 가스발효기술을 활용
- 농축 고염분수 기반 유용 해양생물자원의 안정적 생산 및 식약처 가이드라인에 맞는 연구들을 통해 신규 기능성을 인증 받는데 활용
- 미세조류-미생물 하이브리드 배양시스템을 다양한 목적의 미세조류 배양에 활용 가능
- 버려지는 고염 수자원을 생물배양에 재활용 할 수 있는 기반 마련
- 외연어장의 기초생산력 변동 파악하여 수산자원 생산력 증진 자료 활용
- 연근해 해양생물자원증대 및 자원조성기술 사업에 활용
- 남해안 다도해해역에서의 양식산업 활성화 및 해양생물 자원증대를 통한 건전한 레저활동 정착 및 교육에 활용

- Abubackar HN, Veiga MC, Kennes C. 2015. Carbon monoxide fermentation to ethanol by *Clostridium autoethanogenum* in a bioreactor with no accumulation of acetic acid. *Bioresour Technol.* 186:122 - 7.
- Aklujkar M, Leang C, Shrestha PM, Shrestha M, Lovley DR. 2017. Transcriptomic profiles of *Clostridium ljungdahlii* during lithotrophic growth with syngas or H₂ and CO₂ compared to organotrophic growth with fructose. *Sci Rep.* 7:13135.
- Angel HRC, Leonardo IC, Juan MMB. 2018. Immunostimulation and trained immunity in marine fish larvae. *Fish Shellfish Immunol.* 80, 15-21.
- Bengelsdorf FR, Beck MH, Erz C, Hoffmeister S, Karl MM, Riegler P, et al. 2018. Bacterial anaerobic synthesis gas (Syngas) and CO₂ + H₂ fermentation. *Adv Appl Microbiol.* 103:143 - 221.
- Bengelsdorf FR, Poehlein A, Linder S, Erz C, Hummel T, Hoffmeister S, et al. 2016. Industrial acetogenic biocatalysts: a comparative metabolic and genomic analysis. *Front Microbiol.* 7:1036.
- Bertsch J, Müller V. 2015. CO metabolism in the acetogen *Acetobacterium woodii*. *Appl Environ Microbiol.* 81:5949 - 56.
- Biegel E, Schmidt S, González JM, Müller V. 2011. Biochemistry, evolution and physiological function of the Rnf complex, a novel ion-motive electron transport complex in prokaryotes. *Cell Mol Life Sci.* 68:613 - 34.
- Bricknell I, Dalmo RA. 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish Shellfish Immunol.* 19, 457-472.
- Brouns F, Theuwissen E, Adam A, Bell M, Berger A, Mensink RP. 2012. Cholesterol-lowering properties of different pectin types in mildly hyper-cholesterolemic men and women. *Eur. J. Clin. Nutr.* 66, 591-599.
- Buján N, Toranzo AE, Magariños B. 2018. *Edwardsiella piscicida*: a significant bacterial pathogen of cultured fish. *Dis. Aquat. Org.* 131, 59-71
- Castro R, Jouneau L, Tacchi L, Macqueen DJ, Alzaid A, et al. 2015. Disparate developmental patterns of immune responses to bacterial and viral infections in fish. *Sci. Rep.* 5, 1-12.
- Chin CS, Alexander DH, Marks P, Klammer AA, Drake J, Heiner C, et al. 2013. Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nat Methods.* 10:563 - 9.
- Chittasupho C, Jaturanpinyo M, Mangmool S. 2013. Pectin nanoparticle enhances cytotoxicity of methotrexate against HepG2 cells. *Drug Deliv.* 20, 1-9.
- Chun J, Oren A, Ventosa A, Christensen H, Arahal DR, da Costa MS, et al. 2018. Proposed minimal

- standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 68:461 - 6.
- Chung WSF, Meijerink M, Zeuner B, Holck J, Louis P, Meyer AS, et al. 2017. Prebiotic potential of pectin and pectic oligosaccharides to promote anti-inflammatory commensal bacteria in the human colon. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 93, 43-57.
- Corona AH, Nieves I, Meckes M, Chamorro G, Barron BL. 2002. Antiviral activity of *Spirulina maxima* against herpes simplex virus type 2. *Antivir. Res.*, 56, 279-285.
- Crane BR, Getzoff ED. 1996. The relationship between structure and function for the sulfite reductases. *Curr Opin Struct Biol.* 6:744 - 56.
- Daniell J, Köpke M, Simpson SD. 2012. Commercial biomass syngas fermentation. *Energies.* 5:5372 - 417.
- De la Paz JF, Beiza N, Paredes-Zúñiga S, Hoare MS. 2017. Triazole fungicides inhibit zebrafish hatching by blocking the secretory function of hatching gland cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 18,1-16.
- Doan HV, Hoseinifar SH, Elumalai P, Tongsiri S, et al. 2018. Effects of orange peels derived pectin on innate immune response, disease resistance and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured under indoor biofloc system. *Fish Shellfish Immunol.*, 80, 56-62.
- Drake HL, Daniel SL, Matthies C, Küsel K. 1994. Acetogenesis, acetogenic bacteria, and the acetyl-CoA pathway: past and current perspectives. In: Drake HL, editor. *Acetogenesis*. New York: Chapman and Hall; p. 3 - 60.
- Houde ED. 1997. Patterns and trends in larval-stage growth and mortality of teleost fish. *J. Fish Biol.*, 51, 52-83.
- Emerson DF, Stephanopoulos G. 2019. Limitations in converting waste gases to fuels and chemicals. *Curr Opin Biotechnol.* 59:39 - 45.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 39:783 - 91.
- Felsenstein J. 1989. PHYLIP—phylogeny interference package. *Cladistics.* 5:164 - 6.
- Friedman ND, Temkin E, Carmeli Y. 2016. The negative impact of antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Infect.*, 22, 416-422.
- Gao J, Atiyeh HK, Phillips JR, Wilkins MR, Huhnke RL. 2013. Development of low cost medium for ethanol production from syngas by *Clostridium ragsdalei*. *Bioresour Technol.* 147:508 - 15.
- Ghaeni M, Roomiani L. 2016. Review for application and medicine effects of *Spirulina*, *Spirulina platensis* microalgae. *JOAAT*, 3, 114-117.
- Gumbo JR, Nesamvuni CN. 2017. A Review: *Spirulina* a source of bioactive compounds and nutrition. *J. Chem. Pharm. Sci.*, 10, 1317-1325.

- Guo Y, Xu JL, Zhang Y, Xu HJ, Yuan ZH, Li D. 2010. Medium optimization for ethanol production with *Clostridium autoethanogenum* with carbon monoxide as sole carbon source. *Bioresour Technol.* 101:8784 - 9.
- Hoffmeister S, Gerdom M, Bengelsdorf FR, Linder S, Fluchter S, Ozturk H, et al. Acetone production with metabolically engineered strains of *Acetobacterium woodii*. *Metab Eng.* 2016;36:37 - 47.
- Huerta-Cepas J, Serra F, Bork P. 2016. ETE 3: reconstruction, analysis, and visualization of phylogenomic data. *Mol Biol Evol.* 33:1635 - 8.
- Huhnke R, Lewis R, Tanner RS. 2008. Isolation and characterization of novel clostridial species. US patent application 2008/0057554 A1.
- Ismailia MMS, El-Ayouty YM, Piercey-Normorea M. 2016. Role of pH on antioxidants production by *Spirulina (Arthrospira) platensis*. *Braz. J. Microbiol.*, 47, 298-304.
- Jiao Q, Li L, Mu Q, Zhang. Q 2014. Immunomodulation of nanoparticles in nanomedicine applications. *BioMed Res. Int.*, 2014, 1-19.
- Kim MS, Bae SS, Kim YJ, Kim TW, Lim JK, Lee SH, et al. 2013. CO-dependent H₂ production by genetically engineered *Thermococcus onnurineus* NA1. *Appl Environ Microbiol.* 79:2048 - 53.
- Kim TW, Bae SS, Lee JW, Lee SM, Lee JH, Lee HS, et al. 2016. A biological process effective for the conversion of CO-containing industrial waste gas to acetate. *Bioresour Technol.* 211:792 - 6.
- Kishino H, Hasegawa M. 1989. Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in hominoidea. *J Mol Evol.* 29:170 - 9.
- Köpke M, Held C, Hujer S, Liesegang H, Wiezer A, Wollherr A, et al. 2010. *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107:13087 - 92.
- Köpke M, Mihalcea C, Liew FM, Tizard JH, Ali MS, Conolly JJ, et al. 2011. 2,3-Butanediol production by acetogenic bacteria, an alternative route to chemical synthesis, using industrial waste gas. *Appl Environ Microbiol.* 77:5467 - 75.
- Kundiayana DK, Huhnke RL, Wilkins MR. 2010. Syngas fermentation in a 100-L pilot scale fermentor: design and process considerations. *J Biosci Bioeng.* 109:492 - 8.
- Lackmann C, Santos MM, Rainieri S, Barranco A, Hollert H, Spirhanzlova P. et al. 2018. Novel procedures for whole organism detection and quantification of fluorescence as a measurement for oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. *Chemosphere*, 197, 200-209.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 23:2947 - 8.
- Lechner M, Findeiss S, Steiner L, Marz M, Stadler PF, Prohaska SJ. 2011. Proteinortho: detection of

- (co-)orthologs in large-scale analysis. *BMC Bioinform.* 12:124.
- Lee J, Jang YS, Choi SJ, Im JA, Song H, Cho JH, et al. 2012. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for isopropanol - butanol- - ethanol fermentation. *Appl Environ Microbiol.* 78:1416 - 23.
- Lee SY, Kim HU, Chae TU, Cho JS, Kim JW, Shin JH, et al. 2019. A comprehensive metabolic map for production of bio-based chemicals. *Nat Catal.* 2:18 - 33.
- Lee SY, Park JH, Jang SH, Nielsen LK, Kim J, Jung KS. 2008. Fermentative butanol production by clostridia. *Biotechnol Bioeng.* 101:209 - 28.
- Liew F, Henstra AM, Köpke M, Winzer K, Simpson SD, Minton NP. 2017. Metabolic engineering of *Clostridium autoethanogenum* for selective alcohol production. *Metab Eng.* 40:104 - 14.
- Liew F, Henstra AM, Winzer K, Köpke M, Simpson SD, Minton NP. 2016. Insights into CO₂ fixation pathway of *Clostridium autoethanogenum* by targeted mutagenesis. *Mbio.* 7:e00427-16.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCT method. *Methods*, 25, 402-408.
- Markov PA, Popov SV, Nikitina IR, Ovodova RG, Ovodov YS. 2011. Anti-inflammatory activity of pectins and their galacturonan backbone. *Russ. J. Bioorganic Chem.*, 37, 817-821.
- Martin ME, Richter H, Saha S, Angenent LT. 2016. Traits of selected *Clostridium* strains for syngas fermentation to ethanol. *Biotechnol Bioeng.* 113:531 - 9.
- Meier T, Ferguson SA, Cook GM, Dimroth P, Vonck J. 2006. Structural investigations of the membrane-embedded rotor ring of the F-ATPase from *Clostridium paradoxum*. *J Bacteriol.* 188:7759 - 64.
- Minzanova ST, Mironov VF, Arkhipova DM, Khabibullina AV, et al. 2018. Biological activity and pharmacological application of pectic Polysaccharides: a Review. *Polymers*, 10, 1-10.
- Misra CK, Das BK, Mukherjee SC, Pattnaik P. 2006. Effect of long term administration of dietary β -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. *Aquaculture*, 255, 82-94.
- Mock J, Zheng YN, Mueller AP, Ly S, Tran L, Segovia S, et al. 2015. Energy conservation associated with ethanol formation from H₂ and CO₂ in *Clostridium autoethanogenum* involving electron bifurcation. *J Bacteriol.* 197:2965 - 80.
- Norman ROJ, Millat T, Winzer K, Minton NP, Hodgman C. 2018. Progress towards platform chemical production using *Clostridium autoethanogenum*. *Biochem Soc Trans.* 46:523 - 35.
- Paulsen SM, Lunde H, Engstad RE, Robertsen B. 2003. In vivo effects of beta-glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *ish Shellfish Immunol.*, 14, 39-54.
- Phillips JR, Klasson KT, Clausen EC, Gaddy JL. 1993. Biological production of ethanol from coal

- synthesis gas—medium development studies. *Appl Biochem Biotechnol.* 39:559 - 71.
- Popov SV, Ovodov YS. 2013. Polypotency of the immunomodulatory effect of pectins. *Biochemistry (Mosc.)*, 78, 823-835.
- Ragsdale SW, Pierce E. 2008. Acetogenesis and the Wood - Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *BBA Proteins Proteomics.* 1784:1873 - 98.
- Rajagopalan S, Datar RP, Lewis RS. 2002. Formation of ethanol from carbon monoxide via a new microbial catalyst. *Biomass Bioenergy.* 23:487 - 93.
- Rasul MG, Majumdar BC. 2017. Abuse of antibiotics in aquaculture and its effects on human, aquatic animal and environment. *Saudi J. Life Sci.*, 2, 81-88.
- Ringo E, Birkbeck TH, Munro PO, Vadstein O, Hjelmeland K. 1996. The effect of early exposure to *Vibrio pelagius* on the aerobic bacterial flora of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) larvae. *J. Appl. Microbiol.*, 81, 207-211.
- Okunsebor SA, Ofojekwu PC, Kakwi DG, Audu BS. 2015. Effect of temperature on fertilization, hatching and survival rates of *Heterobranchus bidorsalis* eggs and hatchlings. *Br. J. Appl. Sci. Technol.*, 7, 372-376.
- Sahoo L, Parhi J, Debnath C, Prasad KP. 2017. Effect of feeding Lipopolysaccharide as an immunostimulant on immune response and immune gene expression of *Labeo bata*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 188, 48-58.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4:406 - 25.
- Saxena J, Tanner RS. 2011. Effect of trace metals on ethanol production from synthesis gas by the ethanogenic acetogen, *Clostridium ragsdalei*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 38:513 - 21.
- Schiel-Bengelsdorf B, Montoya J, Linder S, Dürre P. 2013. Butanol fermentation. *Environ Technol.* 34:1691 - 710.
- Schuchmann K, Müller V. 2014. Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 12:809 - 21.
- Schut GJ, Adams MW. 2009. The iron-hydrogenase of *Thermotoga maritima* utilizes ferredoxin and NADH synergistically: a new perspective on anaerobic hydrogen production. *J Bacteriol* 191:4451 - 7.
- Shin J, Song Y, Jeong Y, Cho BK. 2016. Analysis of the core genome and pan-genome of autotrophic acetogenic bacteria. *Front Microbiol.* 7:1531.
- Shivji MS, Rogers SO, Stanhope MJ. 1992. Rapid isolation of high-molecular-weight DNA from marine macroalgae. *Mar Ecol Prog Ser.* 84:197 - 203.
- Smirnov VV, Golovchenko VV, Vityazev FV, et al. 2017. The Antioxidant properties of pectin fractions

- isolated from vegetables using a simulated gastric fluid. *J. Chem.*, 2017, 1-10.
- Srivastava P, Malviya R. 2011. Source of pectin, extraction and its applications in pharmaceutical industry. *Indian J. Nat. Prod. Resour.*, 2, 10-18.
- Ueki T, Nevin KP, Woodard TL, Lovley DR. 2014. Converting carbon dioxide to butyrate with an engineered strain of *Clostridium ljungdahlii*. *Mbio.* 5:e01636-14.
- Ukpong MN, Atiyeh HK, De Lorme MJM, Liu K, Zhu XG, Tanner RS, et al. 2012. Physiological response of *Clostridium carboxidivorans* during conversion of synthesis gas to solvents in a gas-fed bioreactor. *Biotechnol Bioeng.* 109:2720 - 8.
- Usharani G, Srinivasan G, Sivasakthi S, Saranraj P. 2015. Antimicrobial activity of *Spirulina platensis* solvent extracts against pathogenic bacteria and fungi. *Adv. Biol. Res.*, 9, 292-298.
- Valgepea K, Lemgruber RDP, Abdalla T, Binos S, Takemori N, Takemori A, et al. 2018. H₂ drives metabolic rearrangements in gas-fermenting *Clostridium autoethanogenum*. *Biotechnol Biofuels.* 11:55.
- Valgepea K, Lemgruber RDP, Meaghan K, Palfreyman RW, Abdalla T, Heijstra BD, et al. 2017. Maintenance of ATP homeostasis triggers metabolic shifts in gas-fermenting acetogens. *Cell Syst.* 4:505 - 15.
- Varghese NJ, Mukherjee S, Ivanova N, Konstantinidis KT, Mavrommatis K, Kyrpides NC, et al. 2015. Microbial species delineation using whole genome sequences. *Nucleic Acids Res.* 43:6761 - 71.
- Vidal EV, López FR, Teles M, MacKenzie S. 2016. The response of fish to immunostimulant diets *Fish Shellfish Immunol.* 56, 34-69.
- Wan N, Sathish A, You L, Tang YJ, Wen ZY. 2017. Deciphering *Clostridium* metabolism and its responses to bioreactor mass transfer during syngas fermentation. *Sci Rep.* 7:10090.
- Wang SN, Huang HY, Kahnt J, Mueller AP, Köpke M, Thauer RK. 2013. NADP-specific electron-bifurcating [FeFe]-hydrogenase in a functional complex with formate dehydrogenase in *Clostridium autoethanogenum* grown on CO. *J Bacteriol.* 195:4373 - 86.
- Wang S, Li P, Lu SM, Ling ZQ. 2016. Chemoprevention of low-molecular-weight citrus pectin (LCP) in gastrointestinal cancer cells. *Int. J. Biol. Sci.*, 12, 746-756.
- Wolin EA, Wolin MJ, Wolfe RS. 1963. Formation of methane by bacterial extracts. *J Biol Chem.* 238:2882 - 6.
- Wu Q, Liu L, Miron A, Klímová B, Wan D, Kuca K. 2016. The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of *Spirulina*: an overview. *Arch. Toxicol.* 90, 1817-1840.
- Xia H, Ying T, Fenghui L, Yushuang L, Pinhong Y, Wenbin W et al. 2017. The effect of *Aeromonas hydrophila* infection on the non-specific immunity of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Cent. Eur. J. Immunol.*, 42, 239-243
- Xu HJ, Liang CY, Yuan ZH, Xu JL, Hua Q, Guo Y. 2017. A study of CO/syngas bioconversion by

Clostridium autoethanogenum with a flexible gas-cultivation system. *Enzyme Microb Technol.* 101:24-9.

Yamagami. K. 1996. Studies on the hatching enzyme (choriolysin) and its substrate, egg envelope, constructed of the precursors (choriogenins) in *Oryzias latipes*: a sequel to the information in 1991/1992. *Zool. Sci.*, 3, 331-340.

Zhu X, Zhu L, Duan Z, Ruiqi Q, Li L, Lang Y. 2008. Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. *J. Environ. Sci. Heal. A.* 43, 278-284.



- 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 안 됩니다.