

2020.11.06.

해양바이오 기반 청정
기능성·산업소재
대량생산 기술 개발2

www.kiost.ac.kr

Development of technology for mass production of
useful marine bioproducts 2

제 출 문

한국해양과학기술원장 귀하

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

2020. 11. 06

총괄연구책임자 : 권개경

참 여 연 구 원 : 강성균, 이현숙, 김윤재, 임형순, 임재규, 이종민, 이정현, 이성목, 이성혁, 안영준, 박기정, 염승식, 강도형, 오철홍, 허수진, 허성표, 최운용, 김동성, 박용주, 명정구, 김민석, 최희정, 오승용, 노충환, 황선완, 이영욱, 정승원, 박준상, 이택건, 강형구, 박흥식, 이대원, 김윤철, 이형곤, 권수재, 권해준, 남지영, 노유림, 박미정, 박영준, 양성현, 양정안, 양지인, 유지현, 이경원, 이선민, ○정예은, 정해창, 하성희, 양현성, 김은아, 강나래, 신아영, 김준성, 조은영, 김태호, 박아름이, 이원규, 유용균, 이연지, 안소연, 엄태양, 정윤식, 강예희, 강윤혁, 현지연, 장석일, 정일형, 박금옥, 윤보배, 박진우, 정유경, 김지영, 김혁진, 박서윤, 김현정, 강준수, 강민경, 김강은, 김가람, 조혜경, 황지원, 황청희, 이영득, Teddy Namirimu, 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 : 2020. 01. 01 - 2020. 12. 31)		
연구비 (단위 : 천원)	총사업비(직접비) : 7,024백만원		당해연도 사업비(직접비) : 1,730백만원
위탁연구	과제명	위탁연구비	위탁연구기관
	1. 고염 배양 해양생물자원의 지브라피쉬 모델 적용을 통한 건강도 평가	30,000천원	충남대
	2. 고염 해양생물자원 유래 세포 및 조직 재생 효능 유효물질 발굴	30,000천원	부경대
한국해양과학기술원 관계규정과 제반지시사항을 준수하며 본 연구사업을 성실히 수행하고자 연차실적계획서를 제출합니다.			
2020년 11월 06일 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 10⁸ 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

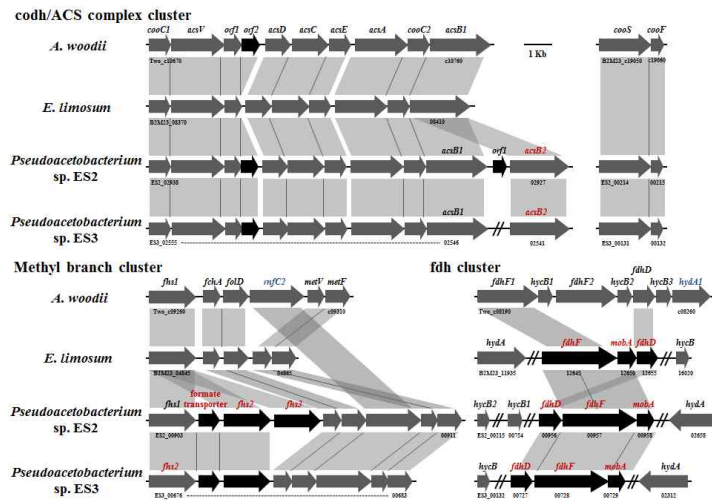
1. 가스전환 해양·극한미생물 활용기술 개발

○ 신규 해양미생물자원 확보; 10종 (12주)

- 국내연안 해양환경으로부터 신규 화학무기독립영양 미생물자원 3 (5주) 확보
- 국내연안 해양환경으로부터 신규 혐기성 미생물자원 7종 확보

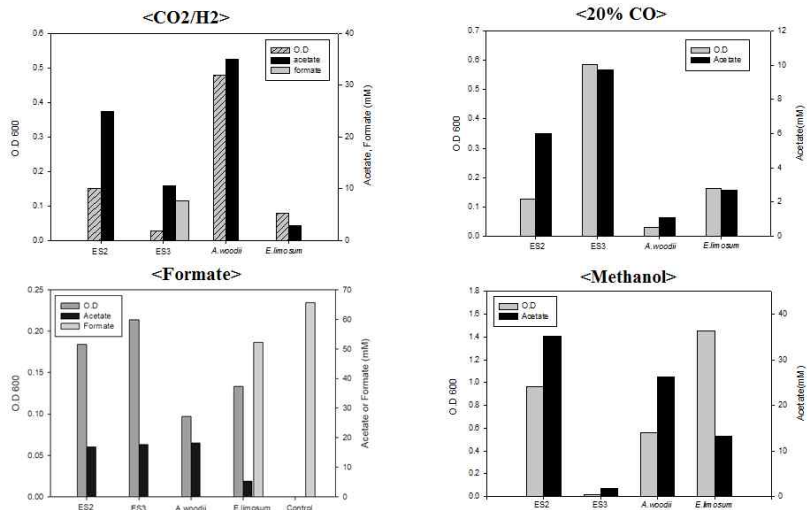
○ 신규 해양미생물자원 유전체 분석; 2종(4주)

- 확보한 신규 화학무기독립영양 미생물자원 2종(4주)에 대하여 유전체 분석 후 *Acetobacterium* sp. ES2와 ES3에 대하여 표준균주 *A. woodii*와 *E. limosum*과 심도있는 비교유전체 분석

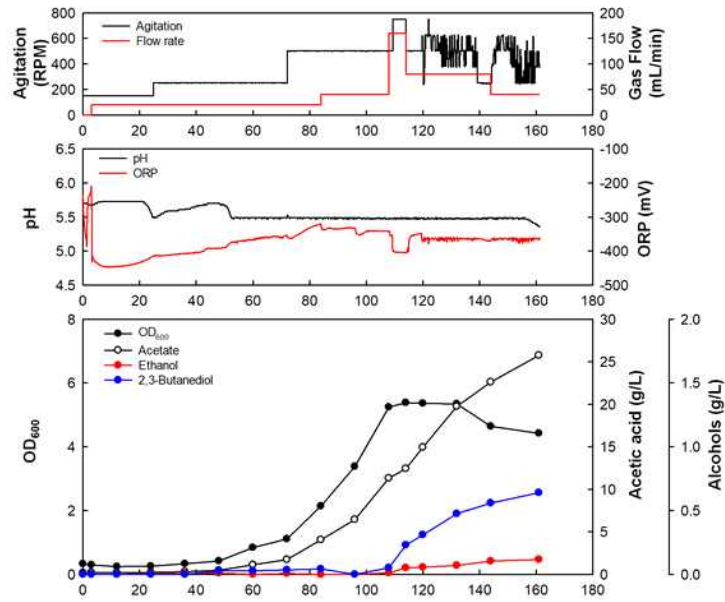


○ 신규 해양미생물자원 생리적 특성 분석; 4종

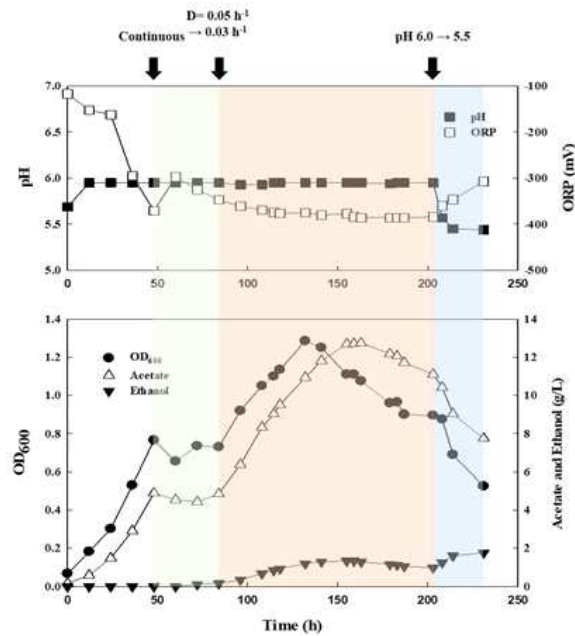
- *Acetobacterium* sp. ES2와 ES3에 대하여 최적 생육 조건 탐색 및 다양한 C1 compounds(CO₂/H₂, CO, formate, methanol) 대사능 분석



○ 모델균주 *Clostridium* sp. AWRP를 활용하여 가스발효시 OD600=5.4 달성



○ 모델균주 *Clostridium* sp. AWRP를 활용하여 가스전환 연속배양시 아세트산 생산성 약 8 g/L/d 도달



2. 고염분수 활용 기능성 해양생물원료 대량생산 및 산업소재 개발

○ 고염분수 활용 미세조류 대량배양 연구 (200L 및 10ton급 배양)

- 고염분수를 활용한 미세조류 2종(*Tetraselmis* sp., *Dunaliella salina*)에 대한 배양 연구 수행
- 고염분수에서 *Tetraselmis* sp.의 단위면적당 생산성 47.2g/m²/d 달성
- 고염분수에서 *Dunaliella salina*의 단위면적당 생산성 48g/m²/d 달성



- 미세조류-미생물 하이브리드 배양: 효모담체로부터 생산되는 이산화탄소를 이용해 미세조류의 성장성을 향상시킴. 이를 기반으로 하이브리드 대량배양 시스템 설계

○ 고염배양 해양생물 추출물 및 가공물 제조/효능평가

- *Dunaliella salina* 및 *Tetraselmis* sp.의 일반성분, 유용성분 및 영양성분 분석
- *Dunaliella salina* 추출물 제조 및 효능평가: 항산화, 간보호, 항염증 활성을 나타냄
- *Tetraselmis* sp. 추출물 제조 및 효능평가: 항산화, 항염증 활성을 나타냄
- 해양생물 가공물 제조: 해양생물종 7종(미세조류 2종, 해조류 3종, 해양미생물 3종)을 바이오매스로 사용하여 김치 유래 *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*을 이용해 3일간 발효 진행

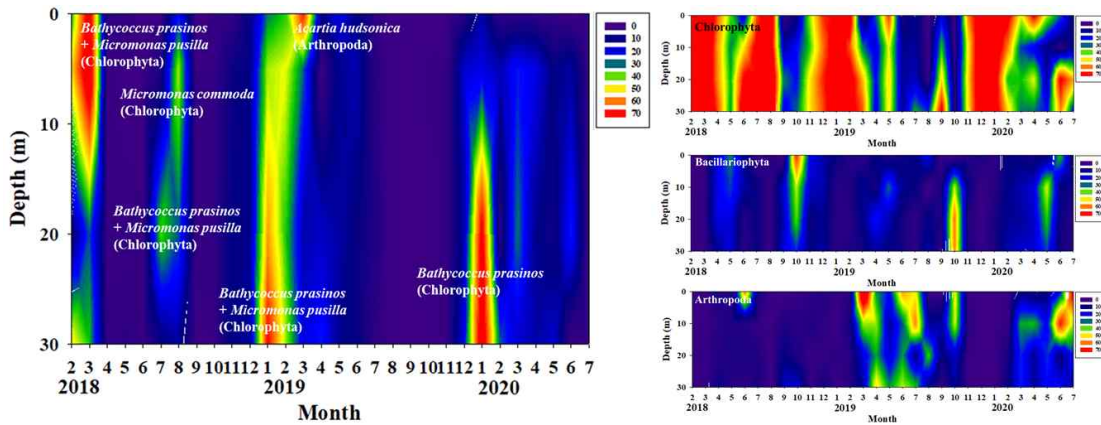


- *Dunaliella salina* 가공물의 효능 평가: 항암활성을 나타냄
- *Tetraselmis* sp. 가공물의 효능 평가: 항산화, 항암활성을 나타냄
- 구멍갈파래 가공물의 효능 평가: 항산화, 항암, 콜라겐 합성, 보습 활성을 나타냄
- 감태 가공물의 효능 평가: 항산화, 항염증, 항당뇨, 항암, 보습 활성을 나타냄
- *Bacillus aquimaris* S2947 가공물의 효능 평가: 항암 활성을 나타냄
- *Zunongwangia atlantica* S6003 가공물의 효능 평가: 항암 활성을 나타냄
- 항균물질 생산 해양미생물 18균주(16종) 탐색 (colony picking method) 및 14균주에 대한 추출물 제조
- 인체 병원성 미생물 9종에 대한 항균 효과 확인

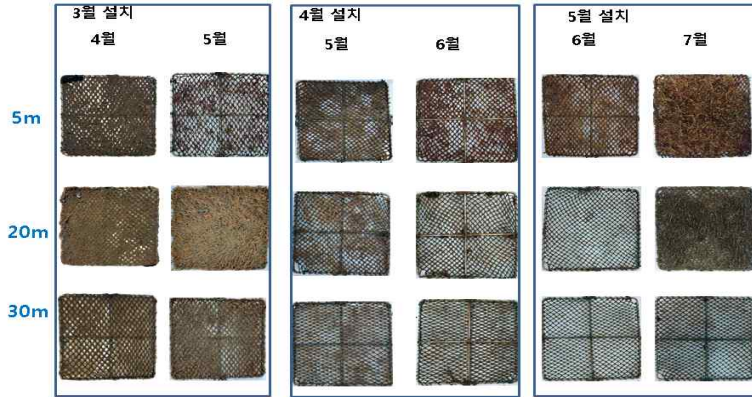
- 미세조류 유래 펙틴의 프리바이오틱 효과 분석
 - 펙틴 섭취시 위의 장내 미생물 군집변화 분석: 유해균 감소, 유익균 증가
 - 면역관련 유전자 발현패턴 변화 분석
 - 조직학적 분석

3. 수층공간이용 복합생물 자원개발

- 양식자원 위해성인자 환경모니터링 병원체목록 조사
 - 2018-2020년 해양 바이러스를 분석한 결과 21개과가 출현하였으며, 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
 - 3년간 수층공간 양식어장 환경조사 결과 냉수성 생물은 여름철 수심 15-20m가 적합한 것으로 나타남
- 수층공간에 따른 양식자원생물의 먹이생물 분포
 - 주요 먹이생물은 녹조류는 *Bathycoccus prasinos*, *Micromonas pusilla*, *Micromonas sp.*, 규조류는 *Coscinodiscophyceae*였으며 계절별로는 겨울철에는 수심에 관계없이 녹조류가 높은 분포를 보인 반면, 여름철에는 20m 이하에서 규조류 및 녹조류가 높은 빈도로 출현



- 양식어장 부착(위협) 생물 저감방안
 - 양식어장 대상생물의 성장, 작업, 상품성, 경영비용에 직접적인 영향을 주는 양식위협생물 제어 방안을 찾음으로서 대상해역에서의 양식가능,불가능 판정기준을 수심별로 판정 할 수 있는 기준을 마련함.



2020년 월별 수심별 조사 생물가입 양상

- 부착생물 저감방안으로서는 수심 20m 이하를 활용하는 것을 제시함
- 양식.자원 복합단지 조성 및 비즈니스 해양공원 모델개발
 - 해양환경 및 먹이생물, 부착생물을 기반으로하는 조사내용을 종합고찰하여 패류양성실험 결과 비단가리비의 경우 연안보다는 외해, 표층보다는 중층에서 빠른 성장을 보임



외해 양식비단가리비 성장

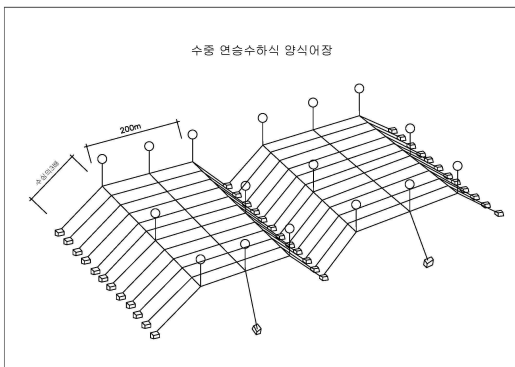
연안 양식비단가리비 성장

- 남해안에서의 참조기 가두리양식산업화 가능성확보(서해안 월동폐사관계로 양식불가)

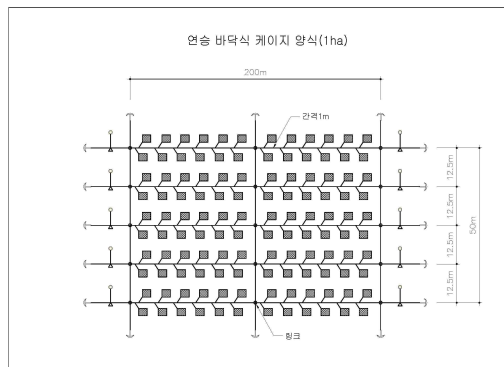


통영양성중인 참조기

- 국내 수층공간 양식어장 복합단지 어장설계도서 작성



수층공간이용 연승식 양식어장



바닥식 케이지 양식어장

□ 정량적 연구성과

구분		가중치 (%)	과제 설정 목표(건)		세부 가중치 (%)	달성(건)	달성도(%)
과학적 성과	논문	60	mrnIF 81점 이상	2	20	4	200
			mrnIF 61~80	3	30	5	167
			mrnIF 41~60	5	25	5	100
			mrnIF 40점 이하	5	20	1	20
			KCI	2	5	4	200
			소계	17	100	19	100
기술적 성과	특허	30	국제특허 출원	2	20	5	200
			국제특허 등록				
			국제특허 추가등록				
			국내특허 출원	7	50	8	100
			국내특허 등록	4	30	4	100
경제적 성과	기술료	0	기술이전	1	100	1	100
사회적,인프라..	홍보활동	5	연구과제 홍보	1	100	2	100
	대외활동	5	기획, 평가, 세미나 등	2	100	2	100
계	-	100%			-		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. 가스전환기술 고도화	26
3. 미세조류 생산성	44
4. 고염배양 해양생물 추출물 및 가공물 제조/효능평가	61
5. 냉수층 공간을 이용한 위생안전 어·패류 복합양식 해양생물자원 개발	103
제3절. 대표 성과	144
제3장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도	148
제1절. 연구개발 수행 적정성	148
제2절. 연구개발 목표 달성도	150
제3절. 대외 기여도	152
제4절. 연구성과의 의의	156
제4장 연구개발결과의 활용계획	158
1. 향후 연구 방향	158
2. 성과 활용 계획	159
제5장 참고문헌	160

제1장

연구개발 과제의 개요

제1절 연구의 목적 및 내용

1. 연구개발의 목표 및 최근 연구동향

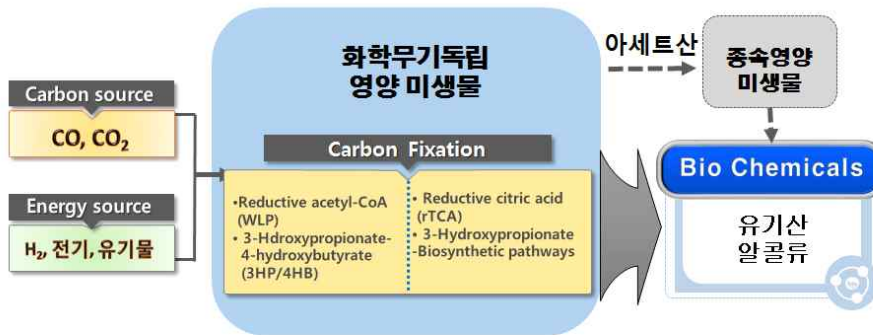
가. 최종목표

□ 최종목표

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

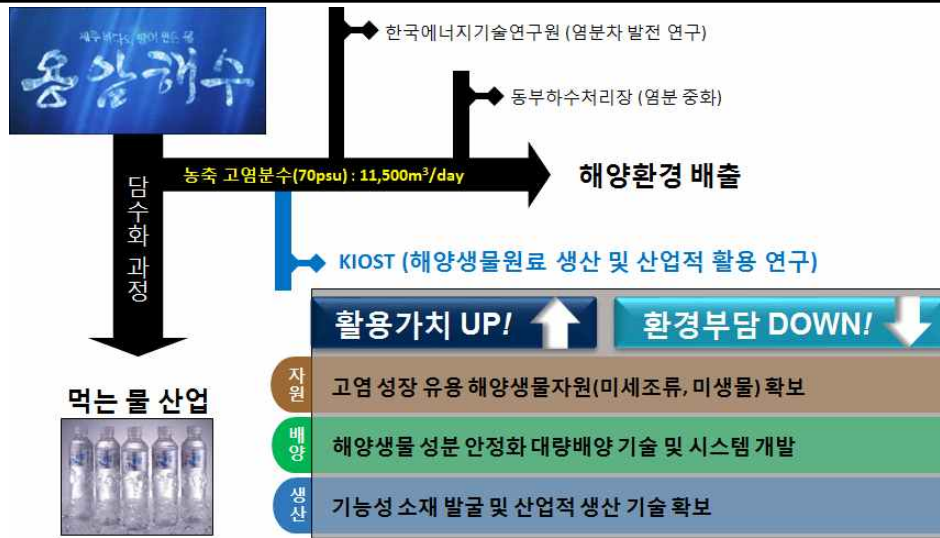
1. 기 확보 CO₂/CO 고정 화학무기독립영양 미생물 활용(2세대, 3세대)

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

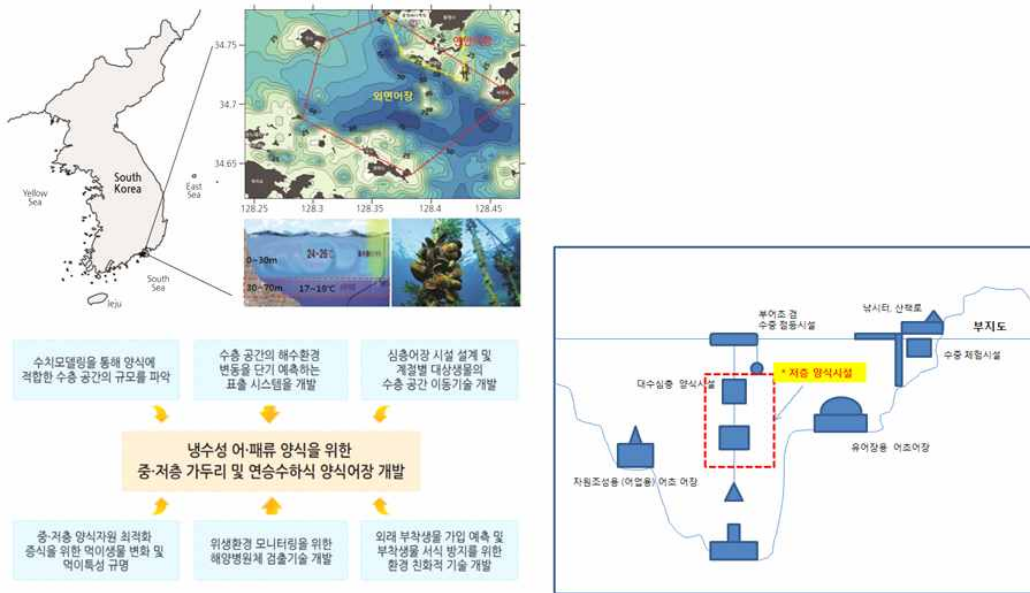


2. 신규 CO₂/CO 고정 화학무기독립영양 미생물 확보(1세대)

- 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 외해양식기술연구 그룹(Offshore Aquaculture Technology Platform)을 결성하여 외해양식 관련 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

나. 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 연계될 수 있는 연구가 필요
 - 해양생명공학연구센터를 중심으로, 다양한 해양환경으로부터 극한생물자원을 확보하여 ‘해양극한자원뱅크’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	320,000
		1-2. 우수 균주 선별 및 특성 분석	
	2. 가스발효 OD>5.0달성	2-1. 모델 균주 기반 gas fermentation 기술 고도화	430,000
	3. 고염분수 활용 대량 배양 기술 및 기능성 물질 합량 증진 기술 확립	3-1. 고염 해양생물원료 대량생산 필요조건 연구	750,000
		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	230,000	
	4.2 심층 어장 시설 구축 및 대상품종 양성기술		
	4.3 복합해양공원 모델 연구		
계			1,730,000
3차년도	1. 해양극한 생명자원 확보	1-1. 해양·극한 환경 유래 생명·유전자원 확보-특성분석	220,000
		1-2. 우수 균주 선정 및 특성분석	
	2. 가스발효 OD>10 달성	2-1. 해양미생물이용 gas fermentation 기술 최적화	500,000
	3. 고염분수 배양 해양생물 원료의 성분 안정화 대량 생산 공정 확립	3-1. 고염 해양생물자원 추출/가공물의 유효성분 규명	780,000
		3-2. 해양생물원료성분 안정화 생산 프로토콜 구축	
4. 냉수층 공간을 이용 위생안전 어·패류 복합양식 해양생물자원개발	4.1 병원체 진단기술, 먹이생물 및 부착생물 특성	230,000	
	4.2 계절별 대상생물의 수층공간 이용기술		
	4.3 복합해양공원 모델 연구		
계			1,730,000
4차년도	1. 해양극한 생명자원 확보	1-1. 개량 균주 특성분석	140,000
	2. C1가스전환 acetate 생산 성 6 g/L/d < 달성	2-1. 플랫폼 확립, 소재생산 활용 및 산물 다양화	580,000
	3. 고염분수 배양 해양생물 원료로부터 기능성 물질 생산/추출 공정 확립	3-1. 고염분수 배양 해양생물원료의 성분 안정화 대량 생산 공정 확립 (±20% 이내)	780,000
		3-2. 고염분수 배양 해양생물 원료 및 유효성분의 안전성 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	230,000
4.2 부착생물 제어, 양식생물 양성기술 매뉴얼			
4.3 복합 해중공원 모델 연구			
계			1,730,000
합 계			7,024,000

나. 정량적 목표

- 2020년

구분		가중치 (%)	과제 설정목표(건) (a)		연구성과계획서상 성과목표(건)* (b)	세부 가중치 (%)	설정도(%) (a/b)
과학적 성과	논문	60	mrnIF 81점 이상	2		20%	
			mrnIF 61~80	3		20%	
			mrnIF 41~60	5		30%	
			mrnIF 40점 이하	5		30%	
			KCI/SCOPUS	2			
			소계	17	10	100%	$15/10 = 150$
	저서		국제저서				
			국내저서	1			
			국제편저				
			역서 등				
소계							
기술적 성과	특허	30	국제특허 출원	2			
			국제특허 등록				
			국제특허 추가등록				
			국내특허 출원	7	3	100%	233
			국내특허 등록	4	1	100%	400
경제적 성과	기술료		기술이전 성과	1			
사회적,인프라 ..	홍보활동	5	대중강연/인터뷰	1		100%	
	세미나 개최		외부협력 세미나 개최				
	정책제안		지역현안 정책제안				
	과학체험프로그램						
	대외활동	5	기획, 평가, 세미나 등	2		100%	
계	-	100%				-	

※ 반드시 과제계획서에 제출하였던 금년도 성과목표를 기재 (접수후 일괄 검증함)

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 농축 고염분수 활용 기능성 해양생물원료 대량생산 및 산업소재 개발 <ul style="list-style-type: none"> -고염성 해양생물자원 확보 -대량생산체계 구축 -기능성 소재 확보 수층공간이용 복합생물 자원개발 <ul style="list-style-type: none"> -어장시설 기법 및 관리기술 개발 -비즈니스해양공원 모델개발 	<ul style="list-style-type: none"> 가스 전환/유기산 전환 우수 균주 확보 모델 균주 기반 배양기술 개선 	<ul style="list-style-type: none"> 가스 전환/유기산 전환 우수 균주 확보 가스대사경로 분석 개량균주 확보 모델 균주 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 통합공정 개발
	<ol style="list-style-type: none"> 고염성을 확보 <ul style="list-style-type: none"> ·유용 해양생물 추출물/가공물 제작 및 기능성 평가 ·미세조류 펙틴 기능평가 ·미세조류 생산성 향상 물리·생물학적 모니터링을 통한 수층별 미세조류 자원 영향 파악 및 분포도 작성 	<ul style="list-style-type: none"> 고염생물의 배양조건 확립 고염생물 추출물 유효성분 발굴 미세조류-미생물 하이브리드 대량배양시스템 설계 펙틴 기능평가 	<ul style="list-style-type: none"> 고염생물의 배양조건 확립 고염생물 추출물 유효성분 발굴 미세조류-미생물 하이브리드 대량배양시스템 설계 펙틴 기능평가 	<ul style="list-style-type: none"> 고염분수 배양 해양생물원료의성분 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 (일일)
<ol style="list-style-type: none"> 수층공간이용 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 수층별 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 연구개발 수행 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, 유기물, 전자수용체 등의 조건을 혼합하여 다양한 조건 설정 후 농후 배양 실시
- 다양한 시료 (해수, 갯벌, 생물체, 염장 식품, 고염 농축수, 염전 등)를 동일 조건에서 3회 정도 재배양을 실시함으로써 대상 미생물 농도를 최대한 높이는 방법 적용
- 온도/pH 등의 조건에 따라 한천배지와 phytigel 배지를 교체배양에 사용하여 단일 균주 분리

○ 비광합성미생물의 특성 분석 및 유전자 조작기술 확립

- 생리·생화학적 조건은 기 확립된 방법 사용
- 유전체 해독 및 정보 분석을 통해 대사경로를 파악하고 필요한 조작 방향 설정
- 확립된 유전자 조작기술 또는 CRISPR 등 신규기술의 적용 등을 연계하여 유전체 조작기술 개발

- 해양극한 미생물 gas fermentation기술 확립
 - 연구팀에 확립된 gas fermentation 기술을 최적화하여 효과적인 기술 확립
 - 온도, pH, 염도, 기질 등 배지조건 최적화와 가스공급 parameter 최적화 방법 시도
 - 대사경로 편집, 적응진화 등의 방법을 적용하여 gas fermentation에 적합한 균주 개량 추진
- 미세조류-미생물 하이브리드 배양 시스템
 - 농축 고염분수에서 성장 가능하고 기능성 물질을 생산하는 미세조류 및 미생물 분리
 - 미생물이 생산하는 가스를 이용하는 미세조류의 배양 시스템 설계 및 적용가능성 검토
- 미세조류 기능성 물질 생산
 - 농축 고염분수에서 생산된 미세조류의 추출물 제작 및 활성 스크리닝
 - 미세조류로부터 분리된 물질의 기능성 향상을 위해 해양미생물 처리를 통한 가공
- 미세조류 성분 안정화 대량생산
 - 물성이 일정한 농축 고염분수를 사용함으로써 배양시 성분변화 최소화 (성분 분석 통한 확인)
 - 다양한 outdoor 배양 시스템 확립을 통한 산업적 생산 가능성 모색
- 양식자원 위해 환경 및 먹이생물 모니터링
 - 수산자원 양식어장에서 월별/수심별로 집중적인 모니터링을 수행하며 PCR/NGS 병행한 병원체 및 생물모니터링
 - PCR 기반 프라이머 제작을 통한 특정 바이러스 검출 기법 개발
 - 차세대 염기서열을 기반 분석을 통한 먹이생물 특성 분석
- 양식어장 부착생물 저감방안
 - 주변 해역의 양식장 및 구조물, 부착관에 서식하는 부착생물 현황 조사 및 제어기술 검증
 - 부착생물의 가입 시기, 환경 특성에 따른 가입 정보 등이 포함된 매뉴얼 제작
- 양식자원 복합단지 조성 및 비즈니스 해양공원모델 개발
 - 중·저층 어장 설계 및 시설 기술, 대상품종의 양성기술 개발
 - 양식생산 시설과 연계한 해양공간의 복합활용을 위한 비즈니스 공원 모델 개발
 - 양식물 위협생물 관리방안 및 대책 연구
 - 품종별 양식적지 판정 도서 및 수층 공간을 이용한 냉수성 어·패류 어장관리 연구

제2절 연구개발 수행 내용 및 결과

1. 신규 생물자원 확보

가. 신규미생물 자원 확보

○ 혐기성 및 화학무기독립영양 미생물 자원 확보

- 2019년 하반기 순천만(갈대습지), 을숙도(갈대습지)에서 깊이별 퇴적토 및 여수(해조류) 시료로부터 추가적으로 신규 혐기성 및 화학무기독립영양 미생물 자원을 확보함.
- 확보된 화학무기독립영양 미생물은 3종(5주)으로 모두 *Acetobacterium* 속에 포함됨. 16S rRNA gene 상동성 분석에 따르면, 3 strains(YS1, ES1, ES2)은 신종으로 예측되었으며, ES1 및 ES2는 신속으로 예측됨. ES3 및 ES4는 ES1과 동일한 종으로 판단됨.
- Phytigel 고체배지로부터 분리된 혐기성 미생물은 6종(SCR006-010, ES6)으로 16S rRNA gene 유사성이 모두 97% 정도로 분리된 모든 미생물이 신종으로 예측됨.

<표 1-1-1. 2020년도 신규 혐기성 및 화학무기독립영양 미생물 자원 확보 리스트>

샘플링 년도	시료	No.	균주 name	온도(섭씨)	배지	최근연종	유사도	비고	
1	2019	여수	YS001	<i>Acetobacterium</i> sp. YS1	25°C	135	<i>Acetobacterium bakii</i>	97.23%	autotroph
2	2019	을숙도	ES001	<i>Acetobacterium</i> sp. ES1	25°C	PETC	<i>Acetobacterium fimetariums</i>	96.93%	
3	2019	을숙도	ES002	<i>Acetobacterium</i> sp. ES2	25°C	135	<i>Acetobacterium fimetariums</i>	96.61%	
4	2019	을숙도	ES003	<i>Acetobacterium</i> sp. ES3	25°C	711a	<i>Acetobacterium fimetariums</i>	96.58%	
5	2019	을숙도	ES004	<i>Acetobacterium</i> sp. ES4	25°C	711a	<i>Acetobacterium fimetariums</i>	97.04%	
6	2019	을숙도	ES005	<i>Alkalibacter</i> sp. ES5	25°C	135	<i>Alkalibacter saccharofermentans</i>	96.86%	anaerobe
7	2019	순천만	SCR006	<i>Proteinclasticum</i> sp. SCR6	25°C	135	<i>Proteinclasticum ruminis</i>	97.63%	
8	2019	순천만	SCR007	<i>Youngiibacter</i> sp. SCR7	25°C	135	<i>Youngiibacter multivorans</i>	95.12%	
9	2019	순천만	SCR008	<i>Tissierella</i> sp. SCR8	25°C	135	<i>Tissierella creatininistrain</i>	94.43%	
10	2019	을숙도	ES006	<i>Paludibacter</i> sp. ES6	25°C	711a	<i>Paludibacter propionicigenes</i>	91.36%	
11	2019	순천만	SCR009	<i>Bacteroides</i> sp. SCR9	25°C	711a	<i>Bacteroides ihuaestrain</i>	97.25%	
12	2019	순천만	SCR010	<i>Maribellus</i> sp. SCR10	25°C	711a	<i>Maribellus luteus</i>	97.69%	

- 2020년 7월에는 신규 acetogen을 확보하고자 순천만(갈대습지), 남해(갯벌), 마산(퇴적토) 및 을숙도(갈대습지)에서 깊이별 퇴적토 시료를 채취하고 acetogen 특이적인 5 종류의 배지를 사용하여 25도 또는 55도에서 95 ea 시료에 대하여 농후배양을 진행함.



나. 신규 생물자원 특성분석

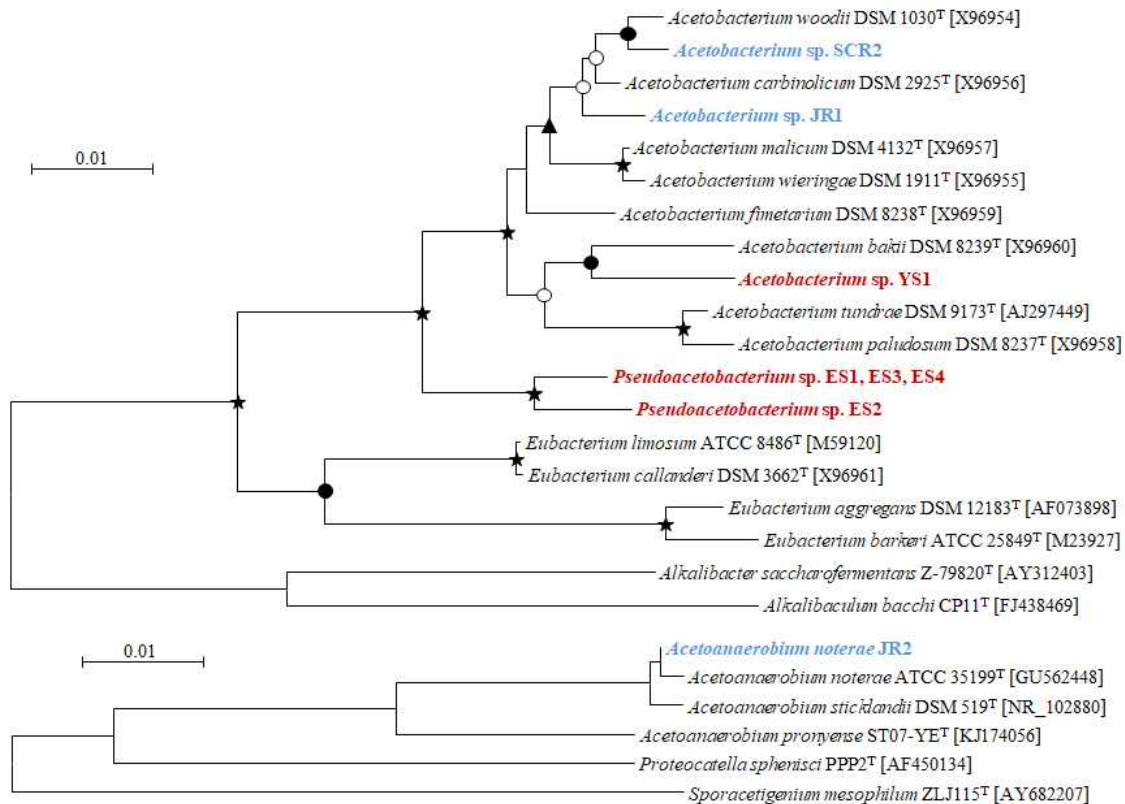
○ 확보한 신규 화학무기독립영양 acetogen 미생물의 계통분류학적 분석

- 2019-2020년 확보한 화학무기독립영양 acetogen 미생물은 총 6종(8주)로 7주는 *Acetobacterium* 속, 1주는 *Acetoanaerobium* 속에 포함됨. 그 중 3종(YS1, ES2, ES3)은 16S rRNA gene의 유사성이 97% 이하로 신종으로 예측됨.

<표 1-1-2. 2019-2020년도 확보한 화학무기독립영양 acetogen 리스트>

시료	균주번호	최근연종		배지 종류	비고
		종명	유사도 (%)		
갈대습지(순천만)	SCR2	<i>Acetobacterium woodii</i>	99.5	H2/CO2	
해조류(중리)	JR2	<i>Acetobacterium carbonolicum</i>	99.0	H2/CO2	
해조류(여수)	YS1	<i>Acetobacterium bakii</i>	97.3	H2/CO2	신종 예측
갈대습지(을숙도)	ES1	<i>Acetobacterium fimetarium</i>	96.9	H2/CO2	신속 예측
갈대습지(을숙도)	ES2	<i>Acetobacterium fimetarium</i>	97.0	H2/CO2	신속 예측
갈대습지(을숙도)	ES3	<i>Acetobacterium fimetarium</i>	97.0	H2/CO2	ES1과 동일종 판단
갈대습지(을숙도)	ES4	<i>Acetobacterium fimetarium</i>	97.0	H2/CO2	ES1과 동일종 판단
해조류(영도)	JR1	<i>Acetoanaerobium noterae</i>	99.7	H2/CO2	

- 계통분류학적 분석을 통하여 ES2와 ES3는 *Acetobacterium*과 *Eubacterium* 속 사이에 위치하는 신속으로 예측되었으며, 서로 상동성이 97% 이하로 각각은 신종으로 예측됨.



<그림 1-1-1. 확보한 화학무기독립영양 acetogen의 계통분류학적 분석>

○ 확보한 신규 화학무기독립영양 acetogen 미생물의 최적 생육 조건 탐색

- SCR2의 최적생육조건은 30도 생육온도, 0.5% NaCl 농도를 나타냄. ES2 및 ES3의 최적생육조건은 각각 35도와 32도 생육온도, 0.5%와 2.5% NaCl 농도, 그리고 7.8과 6.8의 최적 pH를 나타냄. JR2의 최적생육조건은 37도 생육온도, 0.5% NaCl 농도를 나타냄.

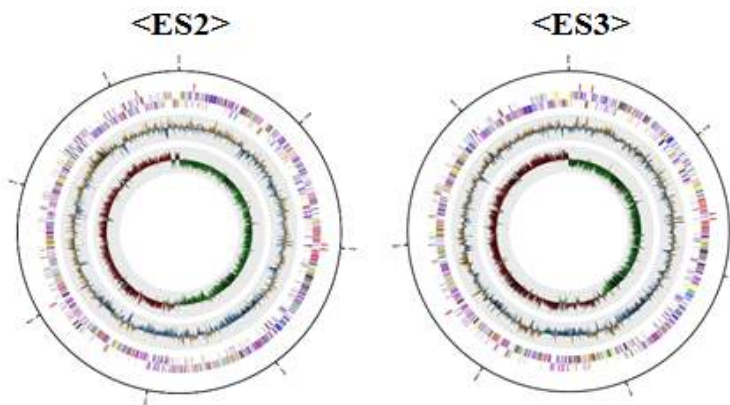
<표 1-1-3. 확보한 화학무기독립영양 acetogen의 최적 생육 조건>

Strain (최근연종)	최적온도	최적 NaCl	최적 pH	Genome 분석
SCR2 (<i>A. woodii</i>)	30°C (15~36°C)	0.5% (0~4.5%)		진행 중
JR1 (<i>A. carbinolicum</i>)				진행 중
YS1 (<i>A. bakii</i>)				
ES1 (<i>A. fimetarium</i>)				Draft
ES2 (<i>A. fimetarium</i>)	35°C (25~40°C)	0.5% (0~4.5%)	7.8 (5.5~8.8)	Complete
ES3 (<i>A. fimetarium</i>)	32°C (22~42°C)	2.5% (0~5.0%)	6.8 (5.5~8.8)	Complete
ES4 (<i>A. fimetarium</i>)				Draft
JR2 (<i>An. noterae</i>)	37°C (10~46°C)	0.5% (0~5.0%)		

○ 확보한 ES2 및 ES3의 비교유전체 분석

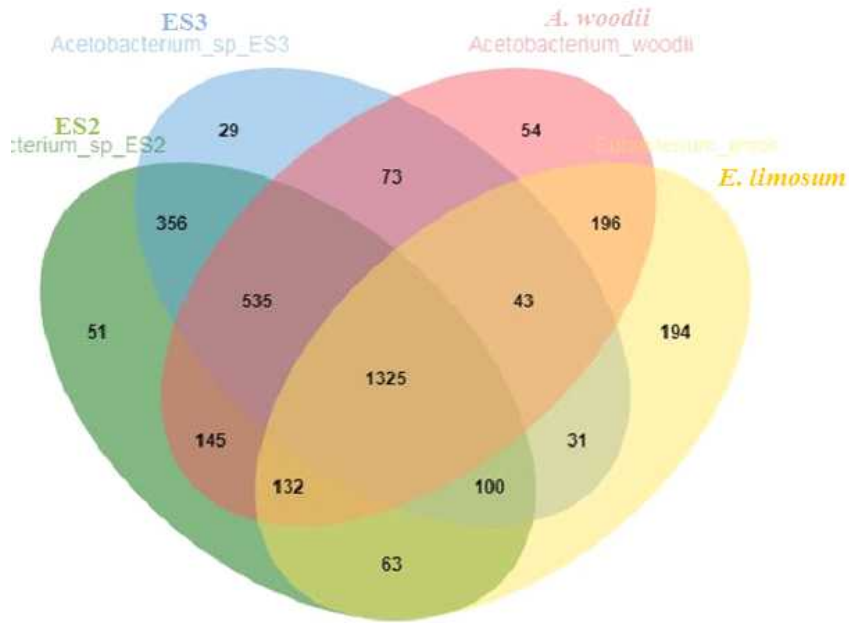
- ES2 및 ES3의 게놈 사이즈는 *A. woodii*(4.04 Mb)와 *E. limosum*(4.42 Mb) 보다 상대적으로 작은 각각 3.46 Mb와 3.39 Mb 사이즈를 나타냄. 또한, ES2의 protein-coding genes 수는 게놈 사이즈 대비하여 *A. woodii* 보다 많은 수를 가짐.

Characteristic	ES2	ES3	<i>Acetobacterium woodii</i>	<i>Eubacterium limosum</i>
Sequencing method	PacBio_20K	PacBio_20K	Unknown	PacBio
Method coverage	87.9	245.5	Unknown	200.0
Assembler	PacBio SMRT 2.3.0	PacBio SMRT 2.3.0	Unknown	PacBio SMRT 2.3.0
Contig number	1	1	1	1
Genome size (Mb)	3.76	3.39	4.04	4.42
N50 (kpbs)	3,763	3,392	4,044	4,422
Protein-coding genes	3,619	3,046	3,564	4,067
Ribosomal RNA	16	16	16	16
Transfer RNA	56	59	60	61
ncRNAs	ND	ND	4	7
Pseudogenes	ND	ND	60	50
G+C ratio (mol%)	40.7	39.6	39.3	47.2



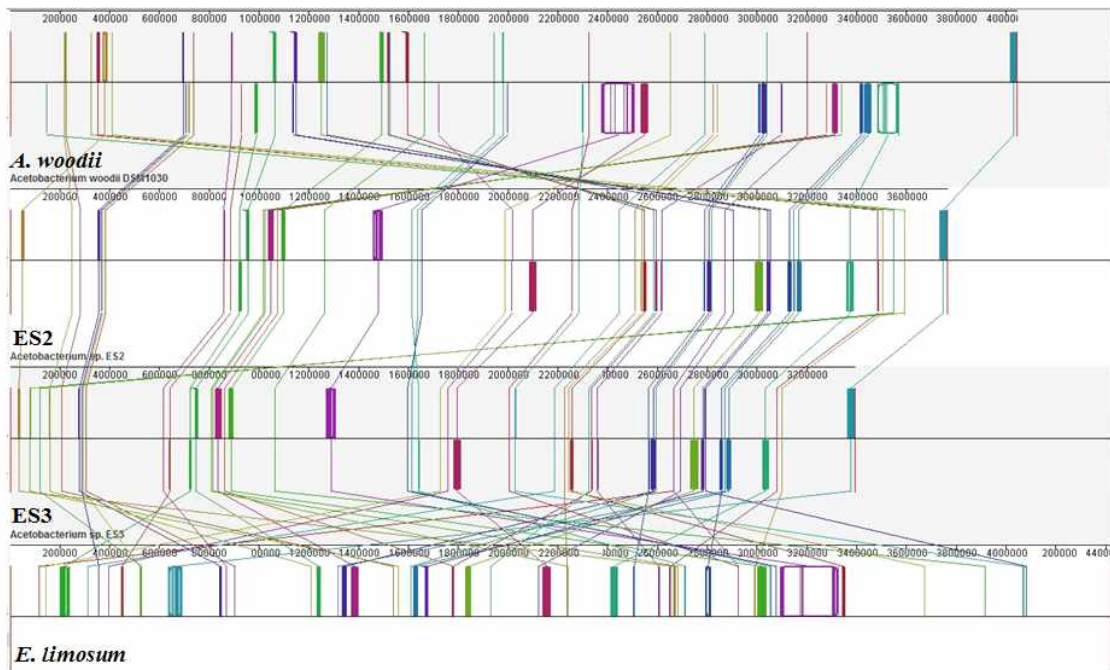
<그림 1-1-2. ES2, ES3, *A. woodii* 및 *E. limosum* 유전체 특성>

- ES2, ES3, *A. woodii* 및 *E. limosum*의 shared and unique gene의 분석결과 ES2와 ES3의 unique gene 수는 각각 51개, 29개였으며, ES2는 ES3와 shared gene 수가 356개로 가장 높았으며, 이는 가장 가까운 유연관계임을 나타냄.



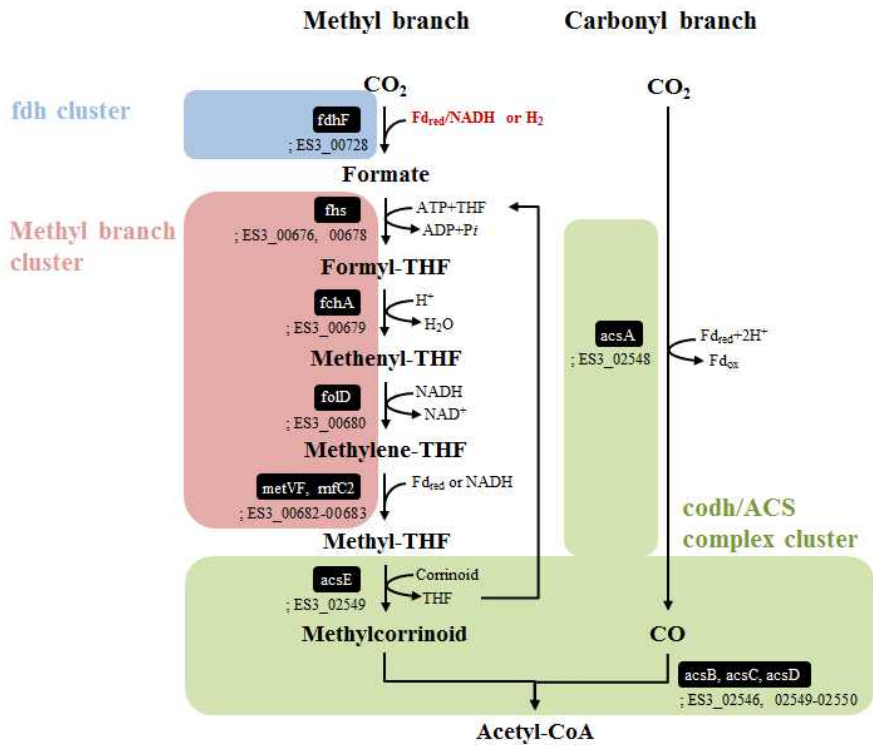
<그림 1-1-3. ES2, ES3, *A. woodii* 및 *E. limosum*의 shared and unique gene 분석>

- ES2, ES3, *A. woodii* 및 *E. limosum*의 synteny 분석결과, ES2와 ES3의 전체적인 genome arrangement는 *E. limosum*보다는 *A. woodii*와 유사함을 알수 있었으며, 이는 진화적으로 가장 가까운 관계임을 나타냄. 또한, ES2와 ES3는 genome arrangement가 가장 유사함을 나타냄.



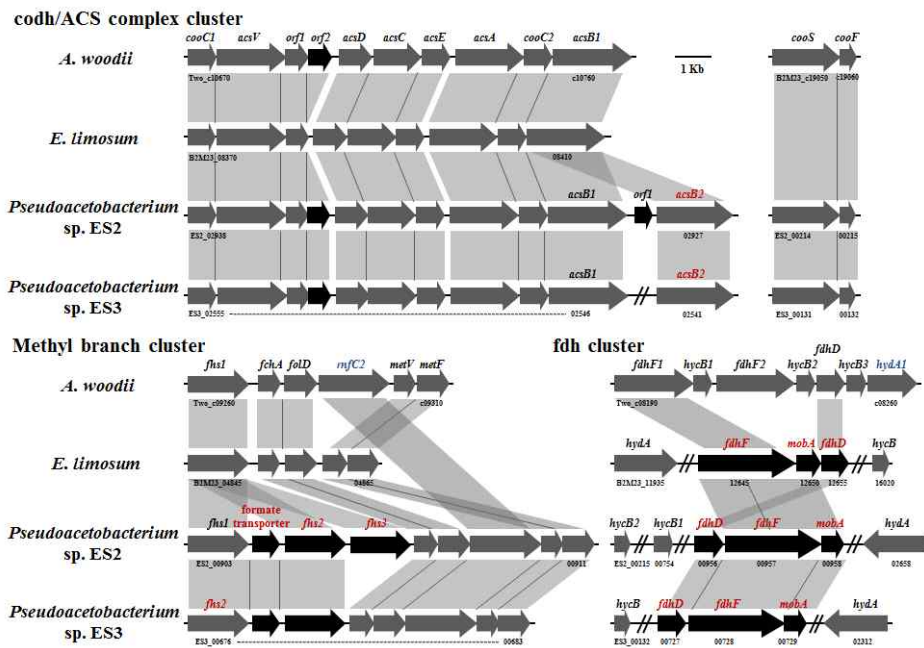
<그림 1-1-4. ES2, ES3, *A. woodii* 및 *E. limosum*의 synteny 분석>

- ES2 및 ES3의 Wood-Ljungdahl pathway(WLP)는 모두 conserved 되어 있었으며, 크게 3개의 cluster(fdh, methyl branch 그리고 codh/ACS complex)로 구성되어 있음을 확인함.



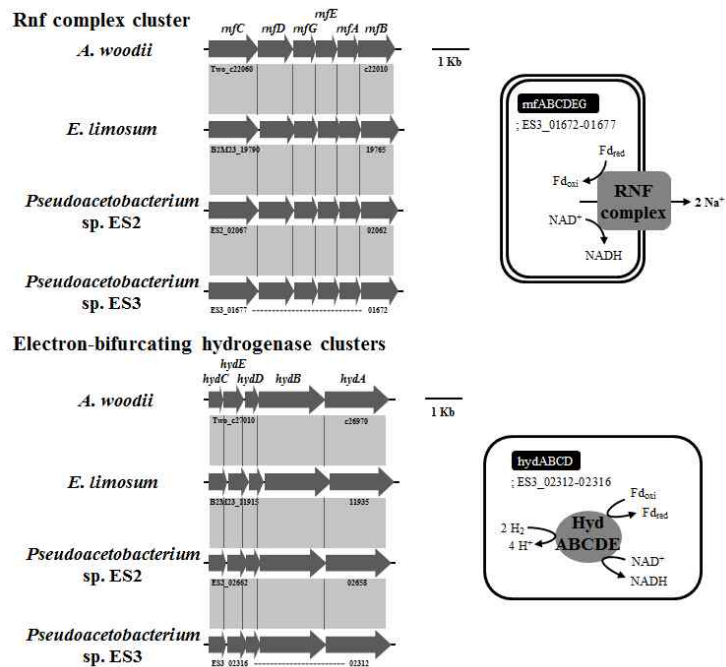
<그림 1-1-5. ES2 및 ES3의 Wood-Ljungdahl pathway>

- ES2, ES3, *A. woodii* 그리고 *E. limosum*의 WLP를 비교 분석함.
 - Codh/ACS complex cluster의 경우, ES2와 ES3는 *A. woodii*와 *E. limosum*과 달리 acetyl-CoA synthetase gene인 *acsB*이 추가적으로 1 copy씩 가지고 있었음. 또한, *E. limosum*을 제외한 나머지 3종은 monofunctional codh gene인 *cooS*을 추가적으로 1 copy씩 가지고 있었음.
 - Methyl branch cluster의 경우, ES2와 ES3는 *A. woodii*와 *E. limosum*과 달리 formate tetrahydrofolate ligase gene인 *fhs*가 각각 2 그리고 1 copy씩 추가적으로 가지고 있었음. 또한, 특이하게도 ES2와 ES3는 cluster내에 예측되는 formate transporter gene을 포함하고 있었음.
 - Fdh cluster의 경우, *A. woodii*는 formate dehydrogenase(*fdhF*)가 hydrogenase subunits들과 집합체를 형성함. 반면에 ES2, ES3 그리고 *E. limosum*은 *A. woodii*와 달리 hydrogenase subunits들이 결여되어 있었으며, formate dyhydrogenase가 *mobA*와 *fdhD* 모듈 형태로 구성됨.



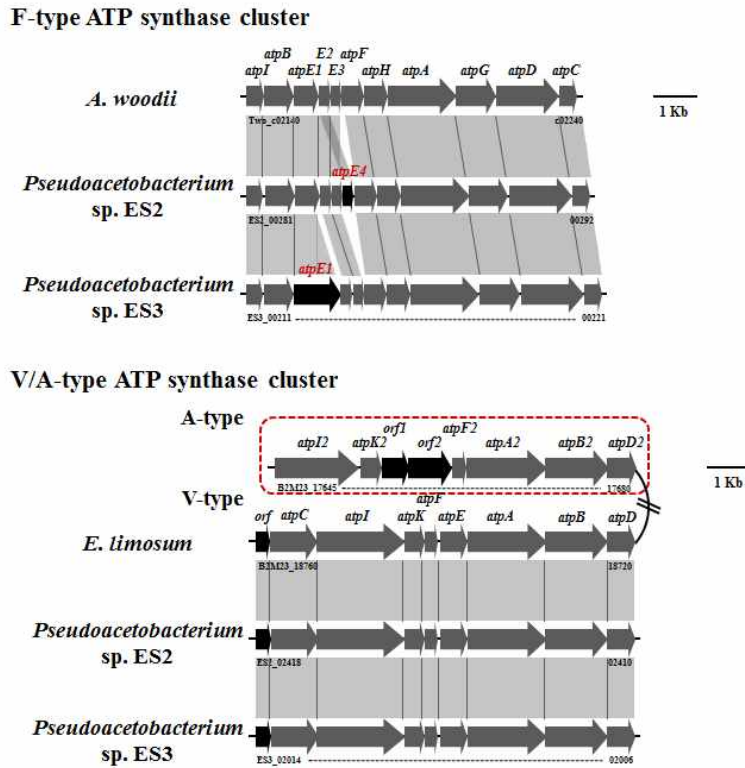
<그림 1-1-6. ES2, ES3, *A. woodii* 및 *E. limosum*의 WLP 비교 분석>

- ES2, ES3, *A. woodii* 그리고 *E. limosum*의 energy conservation에 관여하는 RNF complex와 electron-bifurcating hydrogenase complex가 4종 모두에서 conserved 되어 있었으며, 큰 차이를 나타내지 않음.



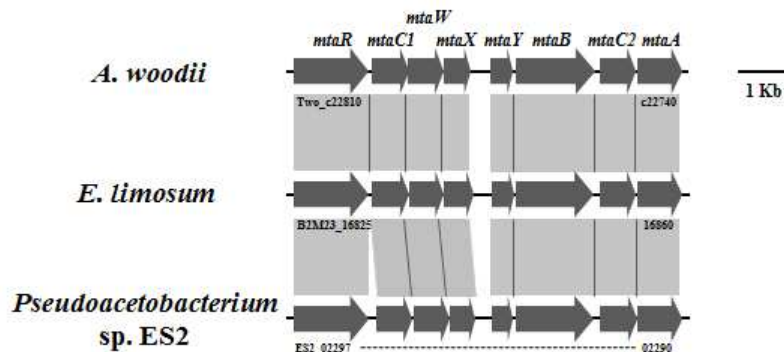
<그림 1-1-7. ES2, ES3, *A. woodii* 및 *E. limosum*의 RNF complex 및 electron-bifurcating hydrogenase complex cluster의 비교 분석>

- ES2, ES3, 그리고 *A. woodii*의 경우, F-type ATP synthase를 보유하고 있는 반면에 *E. limosum*은 A-type ATP synthase를 보유함. 또한, 특이하게도 4종 모두 추가적으로 V-type ATP synthase cluster를 보유하는 것으로 분석됨.



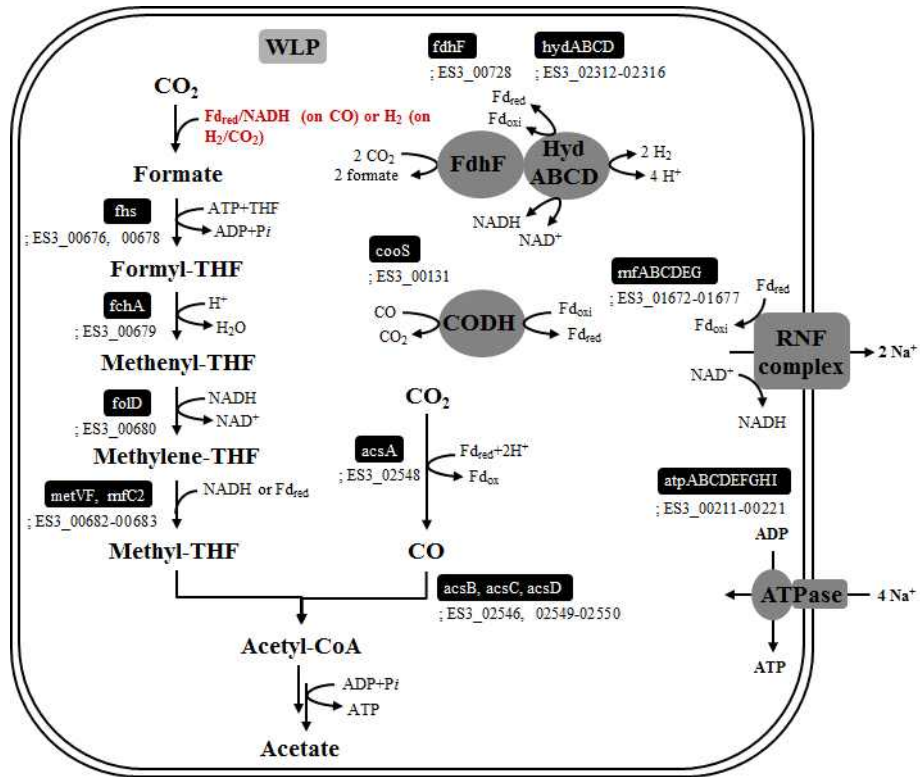
<그림 1-1-8. ES2, ES3, *A. woodii* 및 *E. limosum*의 ATP synthase cluster 비교 분석>

- ES2의 경우, *A. woodii*와 *E. limosum*과 같이 methanol 대사에 관련된 유전자군이 operon 형태로 잘 conserved 되어 있음을 확인함.



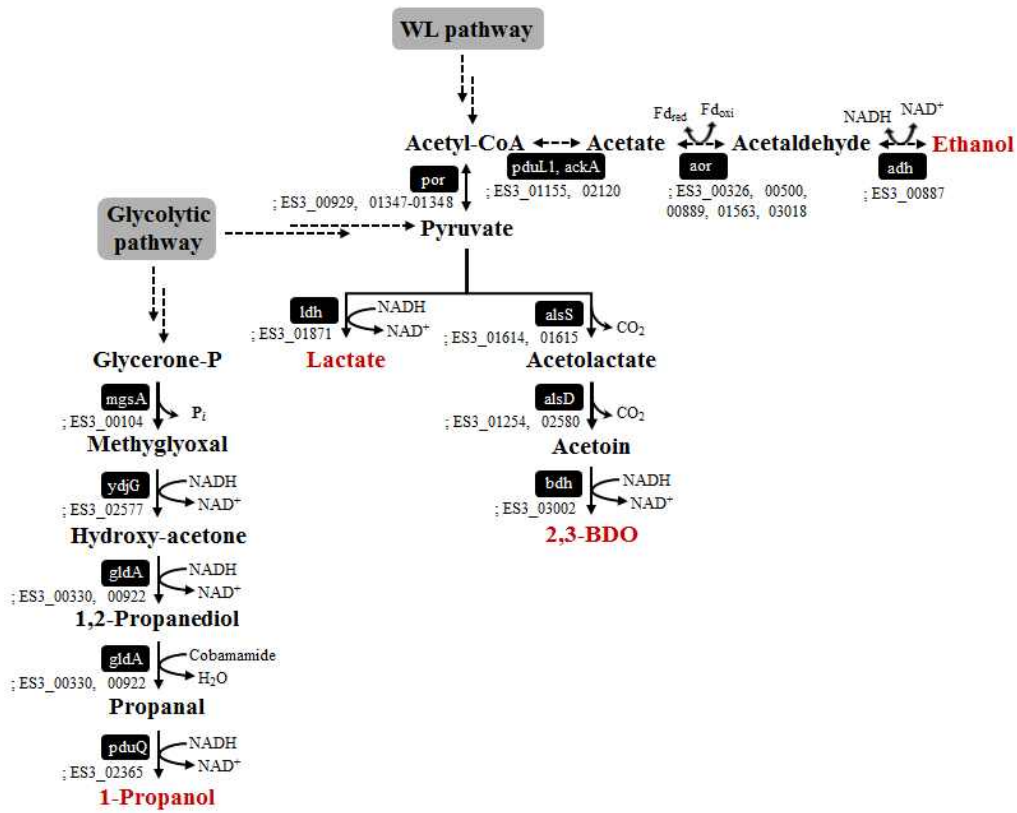
<그림 1-1-9. ES2, *A. woodii* 및 *E. limosum*의 methanol 대사관련 mta operon 비교 분석>

- ES2와 ES3의 전체적인 예측되는 energy conservation 시스템은 아래 그림과 같음. 가장 큰 차이점은 WL pathway의 methyl branch 첫 단계인 CO₂를 reduction 하는 fdh cluster가 기존의 *A. woodii* HDCR(hydrogen-dependent CO₂ reductase)과 차이성을 나타내며, 이는 CO₂ reduction에 관여하는 electron donor에서도 차이성을 나타낼 것으로 예측됨.



<그림 1-1-10. ES2와 ES3의 예측되는 energy conservation system>

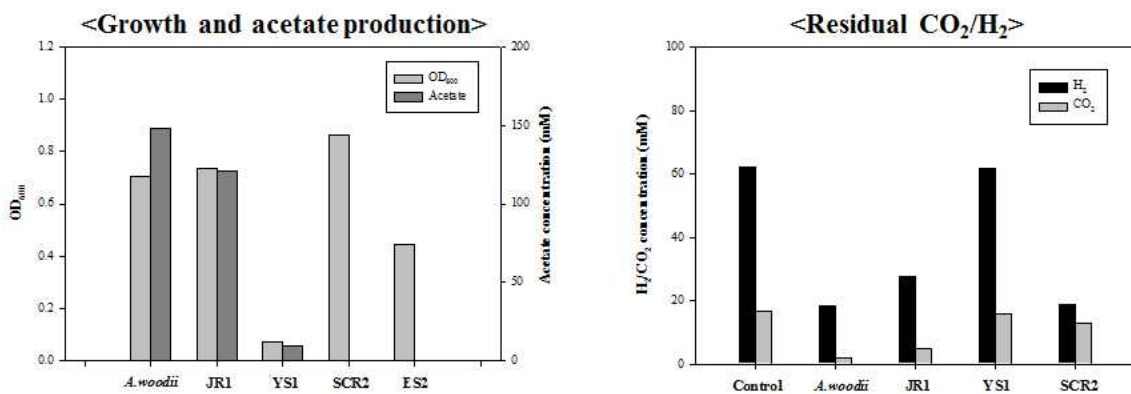
- ES2와 ES3의 예측되는 대사산물은 아래 그림과 같음. Autotrophic 조건에서 *aor-adh*에 의한 에탄올 생산, *ldh*에 의한 lactate 생산, *alsS-alsD-bdh*에 의한 2,3-BDO 생산 가능성이 예측됨. 또한, heterotrophic 조건에서 1-propanol 생산 가능성이 예측됨.



<그림 1-1-11. ES2와 ES3의 예측되는 대사산물 분석>

○ 확보한 acetogen들의 생리적 특성 분석

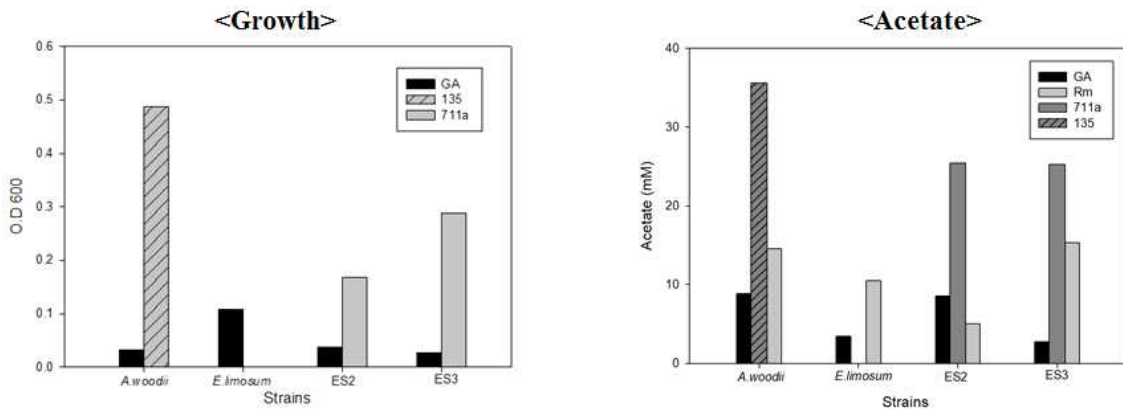
- ES2, YS1, JR1, SCR2 및 표준균주 *A. woodii*에 대하여 yeast extract 0.1 g/l 농도에서 3회 계대 배양 후 성장 및 대사산물을 분석함. SCR2 및 JR1의 경우 표준균주 *A. woodii*와 유사한 성장 능력 및 acetate 생산성을 나타냄. 또한, SCR2 및 JR1은 yeast extract가 없는 조건에서도 성장을 확인함.



<그림 1-1-12. ES2, YS1, JR1, SCR2 및 표준균주 *A. woodii*의 0.1 g/l YE 조건에서 성장 및 대사산물 분석>

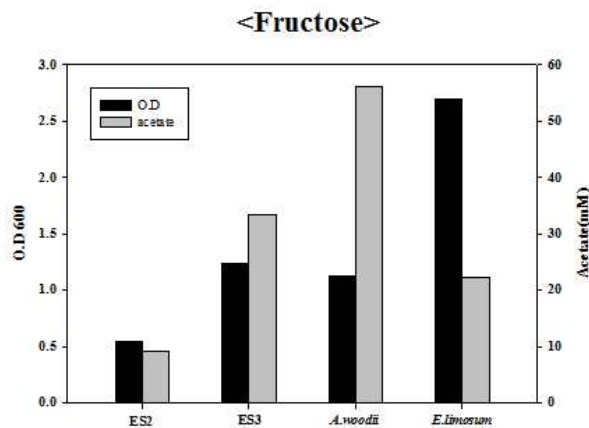
○ 확보한 ES2 및 ES3의 생리적 특성 분석

- ES2, ES3, *A. woodii* 및 *E. limosum*의 최적 배지 탐색을 위해 3종류(GA, DSM 135 및 DSM 711a)의 acetogen 배지를 사용함. ES2와 ES3는 DSM 711a 배지에서 가장 좋은 성장 및 acetate 생산성을 나타냄.



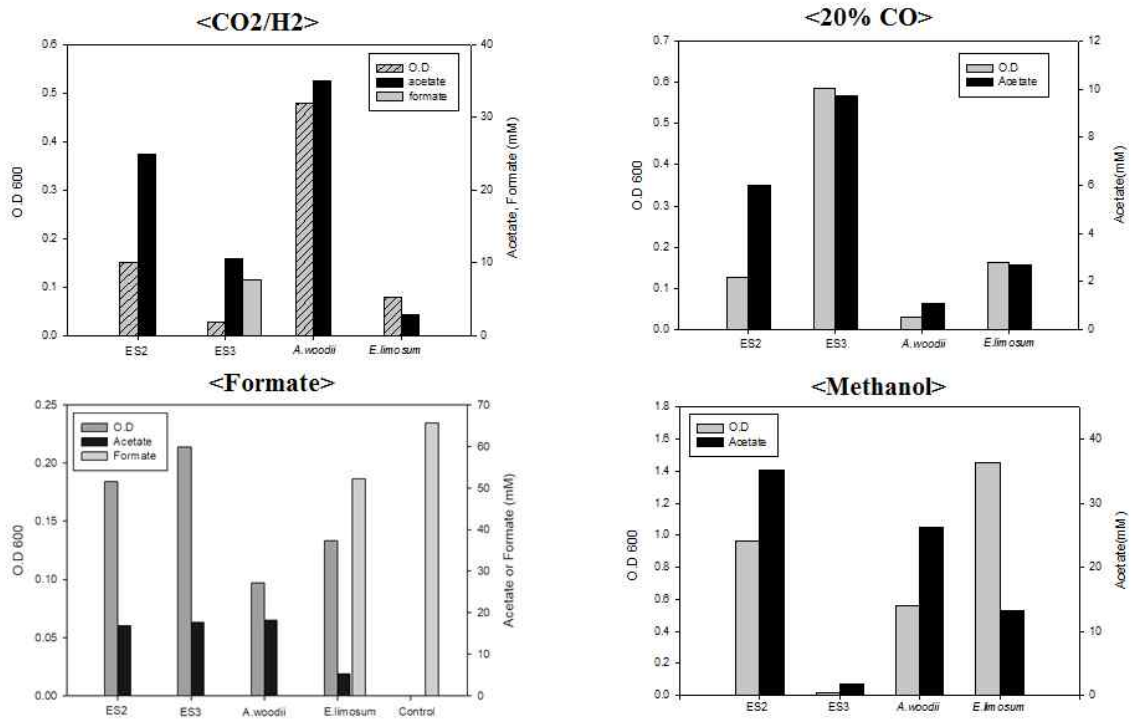
<그림 1-1-13. ES2, ES3, *A. woodii* 및 *E. limosum*의 최적 배지 탐색>

- Heterotrophic growth condition에서 ES2, ES3, *A. woodii* 및 *E. limosum* 성장 및 acetate 생산능을 비교분석한 결과, 성장은 *E. limosum*이 acetate 생산성을 *A. woodii*가 가장 우수하였으며, ES2는 가장 낮은 성장 및 acetate 생산성을 나타냄.



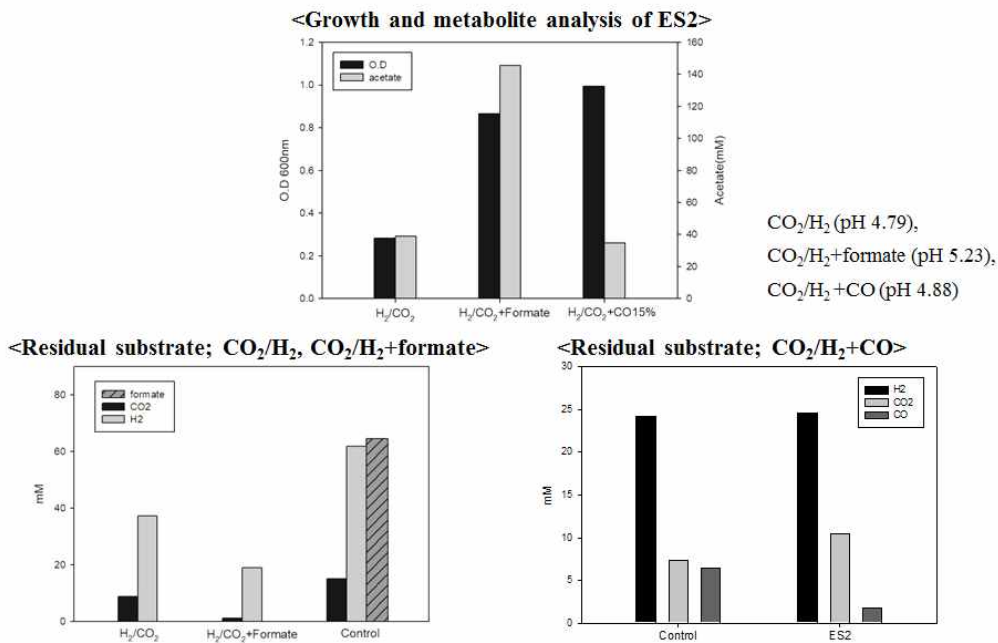
<그림 1-1-14. Heterotrophic 조건에서 ES2, ES3, *A. woodii* 및 *E. limosum*의 성장 및 acetate 생산성>

- 다양한 C1 compounds(CO₂, CO, formate 그리고 methanol)에서 ES2, ES3, *A. woodii* 및 *E. limosum* 성장 및 acetate 생산성을 비교분석한 결과, ES2는 CO₂, CO, formate 그리고 methanol에서 성장 및 acetate를 생산하였으며, ES3는 CO₂, CO 그리고 formate에서 성장 및 acetate를 생산함을 확인함.



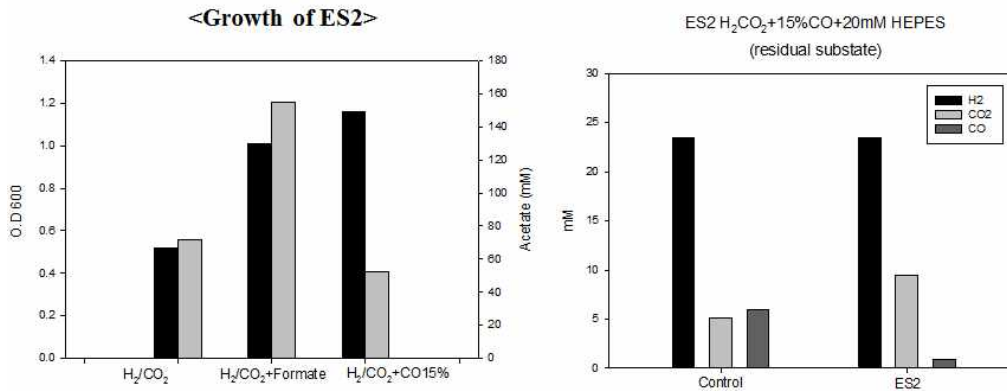
<그림 1-1-15. 다양한 C1 기질에서 ES2, ES3, *A. woodii* 및 *E. limosum*의 성장 및 acetate 생산성>

- 다양한 C1 compounds 조합(CO₂/H₂, CO₂/H₂+CO 그리고 CO₂/H₂+formate)에서 ES2의 성장 및 acetate 생산성을 분석한 결과, CO₂/H₂+formate에서 가장 우수한 성장 및 acetate를 생산성(140 mM)을 나타냄. 성장 완료 후 pH는 CO₂/H₂+formate 조건을 제외하고 5 이하로 나타남.



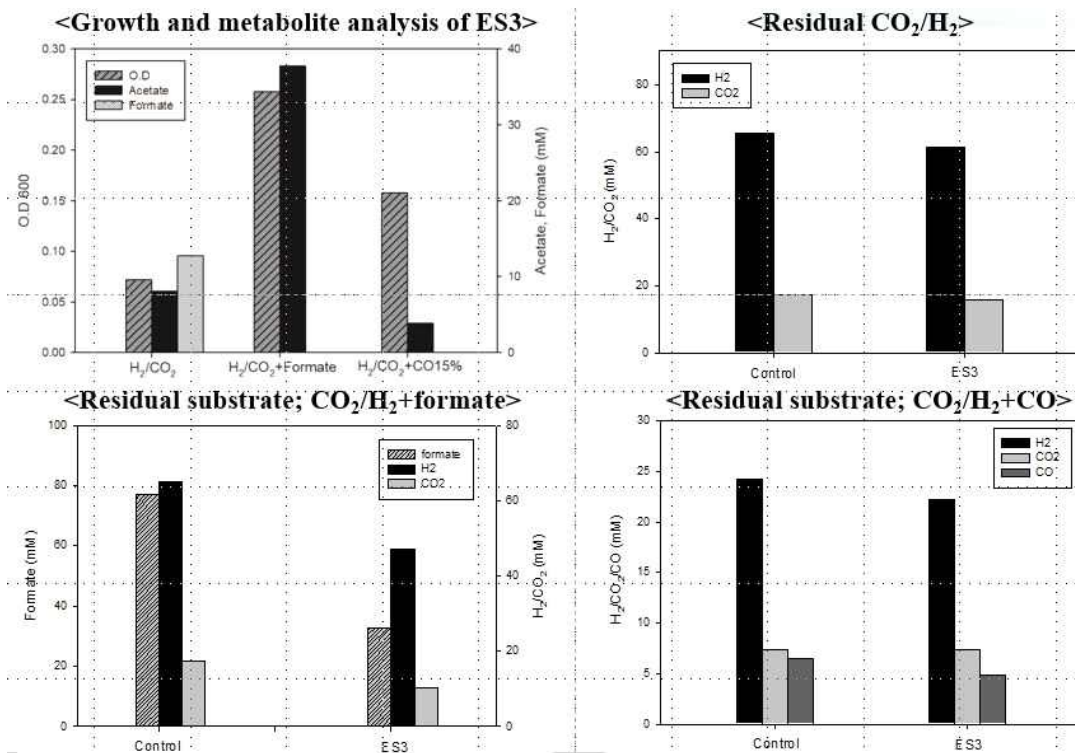
<그림 1-1-16. 다양한 C1 기질 조합(CO₂/H₂, CO₂/H₂+CO 그리고 CO₂/H₂+formate)에서 ES2의 성장 및 acetate 생산성>

- 20 mM HEPES buffer를 첨가한 다양한 C1 compounds 조합(CO_2/H_2 , $\text{CO}_2/\text{H}_2+\text{CO}$ 그리고 $\text{CO}_2/\text{H}_2+\text{formate}$)에서 ES2의 성장 및 acetate 생산성을 분석한 결과, CO_2/H_2 조건에서 buffering 을 하지 않은 조건보다 기질소모가 높은 것으로 나타남.



<그림 1-1-17. 20 mM HEPES buffer를 첨가한 다양한 C1 compounds 조합(CO_2/H_2 , $\text{CO}_2/\text{H}_2+\text{CO}$ 그리고 $\text{CO}_2/\text{H}_2+\text{formate}$)에서 ES2의 성장 및 acetate 생산성>

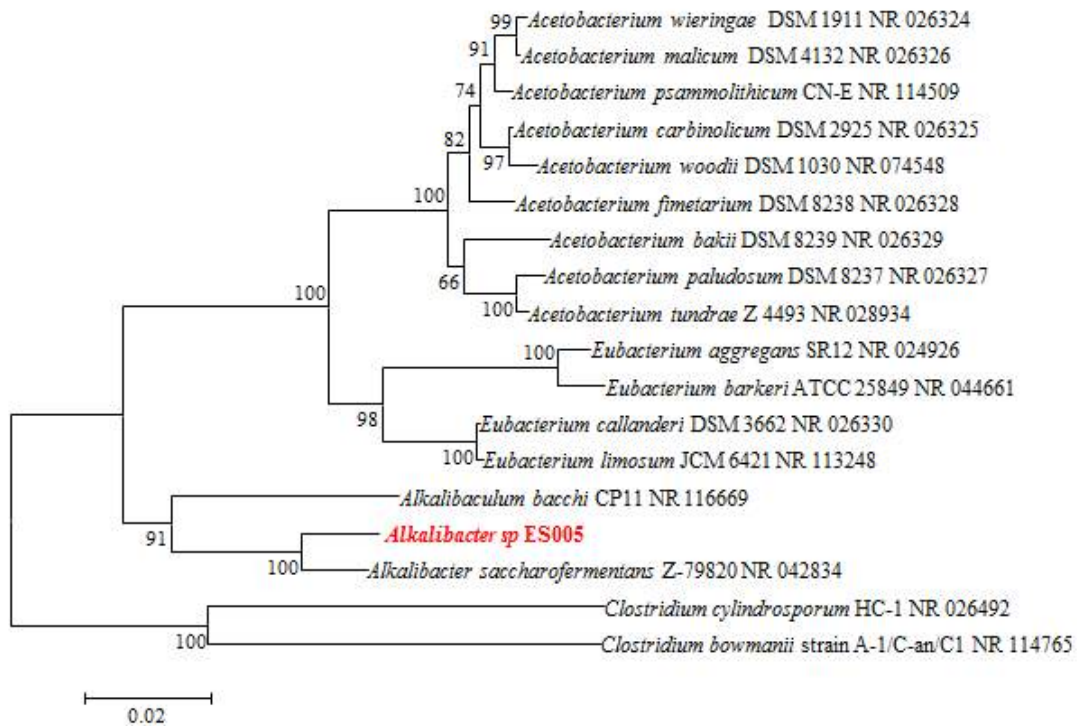
- 다양한 C1 compounds 조합(CO_2/H_2 , $\text{CO}_2/\text{H}_2+\text{CO}$ 그리고 $\text{CO}_2/\text{H}_2+\text{formate}$)에서 ES3의 성장 및 acetate 생산성을 분석한 결과, $\text{CO}_2/\text{H}_2+\text{formate}$ 에서 가장 우수한 성장 및 acetate를 생산성 나타냄. 상대적으로 ES2에 비교하여 모든 기질에서 성장이나 acetate 생산성이 낮음을 확인함.



<그림 1-1-18. 다양한 C1 compounds 조합(CO_2/H_2 , $\text{CO}_2/\text{H}_2+\text{CO}$ 그리고 $\text{CO}_2/\text{H}_2+\text{formate}$)에서 ES3의 성장 및 acetate 생산성>

○ *Alkalibacter* sp. ES005 균주 특성분석

- ES005 strain은 계통분류학적으로 기 보고된 *Alkalibacter saccharofermentans* 종과 함께 그룹화 되었으며, 97.5%의 상동성을 나타냄.



<그림 1-1-19. *Alkalibacter* sp. ES005 strain의 계통분류학적 분석>

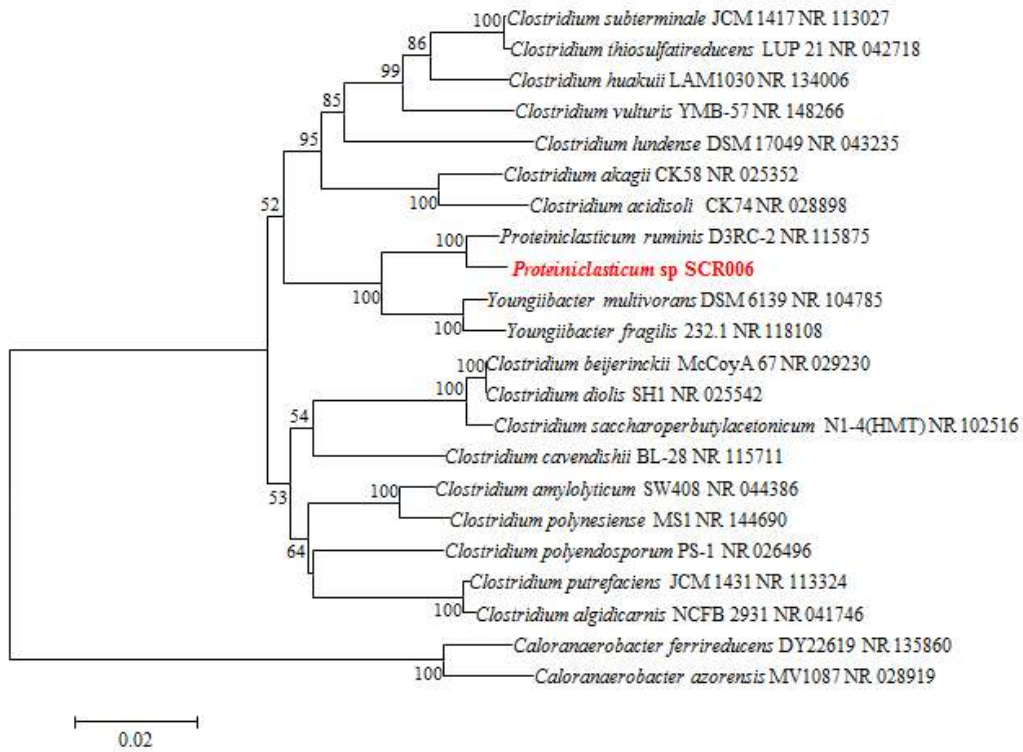
- ES005 strain은 33-37도, pH 6.5-7.0, NaCl 1-2%에서 최적생육 조건을 나타냄. 또한, Gram test, catalase activity, oxidase activity에 대하여 음성을 나타냄.

<표 1-1-3. *Alkalibacter* sp. ES005 strain의 생리적 특성 비교 분석>

Characteristic	<i>Alkalibacter</i> sp ES005	<i>A. saccharofermentans</i> DSMZ14828*
Temperature (°C)	8-41 (33-37)	6-50(35)
pH	6-9(6.5-7)	7.2-10.2(9)
Salt (%)	0-8(1-2%)	0-10(0-4)
Gram test	Negative	Positive
Catalase	Negative	Negative
Oxidase	Negative	Negative

○ *Proteiniclasticum* sp. SCR006 균주 특성분석

- SCR006 strain은 계통분류학적으로 기 보고된 *Proteiniclasticum ruminis* 종과 함께 그룹화 되었으며, 98.3%의 상동성을 나타냄.



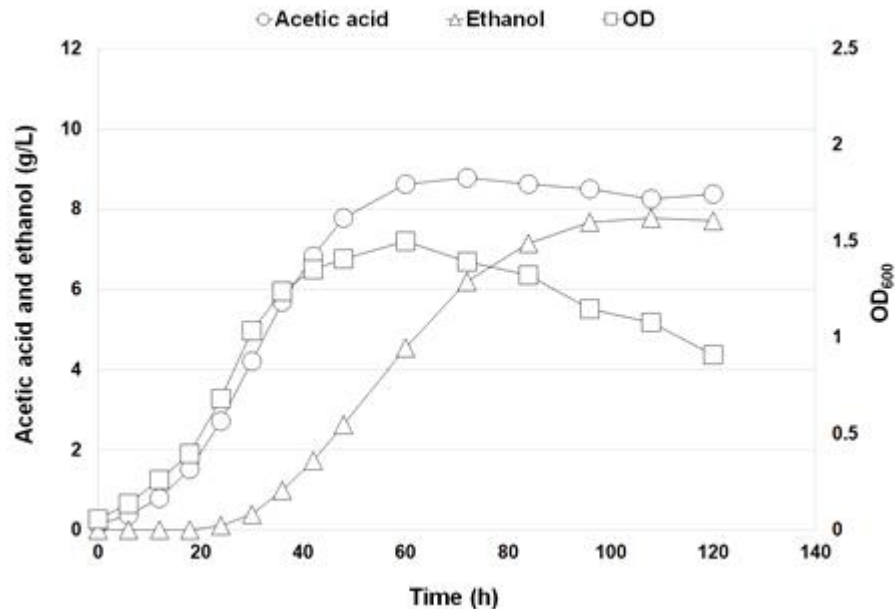
<그림 1-1-20. *Proteiniclasticum* sp. SCR006 strain의 계통분류학적 분석>

2. 가스전환기술 고도화

가. 적응진화/대사공학 기반 개량균주 제작

○ 적응진화를 통한 아세트산 내성 균주 분리 및 특성 분석

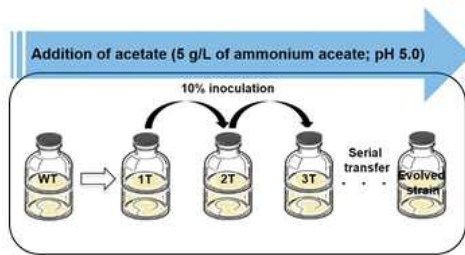
- *Clostridium* sp. AWRP는 2015년 안산 갈대습지에서 자체 분리한 균주로 고분압의 CO 조건에서 생장이 가능한 특징을 가지고 있음.
- 또한 AWRP 균주는 CO₂와 H₂도 기질로 사용이 가능하며, 유사 균주에 비해 동등 내지 높은 전환 속도를 가지고 있어, 본 연구 과제에서의 모델 생물로 활용하고 있음.
- 본 연구에서는 AWRP 균주를 아세트산이 첨가된 배지에서 반복 계대 배양을 수행하여 아세트산 내성이 증가한 균주를 분리하고, 변이주의 특성 분석을 수행하였음.
- 먼저 배양기를 이용하여 CO₂와 H₂ (1:4) 공급 조건에서 *Clostridium* sp. AWRP를 1.6L 배지에서 기본 특성을 확인하였음. 배양 배지로는 CO 및 syngas 배양 조건에 사용되는 RM 배지에 yeast extract를 2 g/L로 첨가하여 사용하였음.
- 반응기 배양 온도는 37° C로 제어하였으며, 배지의 pH는 7.5 N 암모니아수의 공급을 통해 pH 5.0으로 유지하였음. 기질 가스는 효율적인 전달을 위해 microsparger를 통해 80 mL/min의 유량으로 공급하였고, 배양 중 교반 속도는 500 RPM으로 유지하였음.
- 약 120시간의 배양이 진행되었을 때, 기질의 소모가 더 이상 일어나지 않았으며, 에탄올, 아세트산 농도가 모두 8 g/L 수준으로 확인되었음(그림 2-1-1).



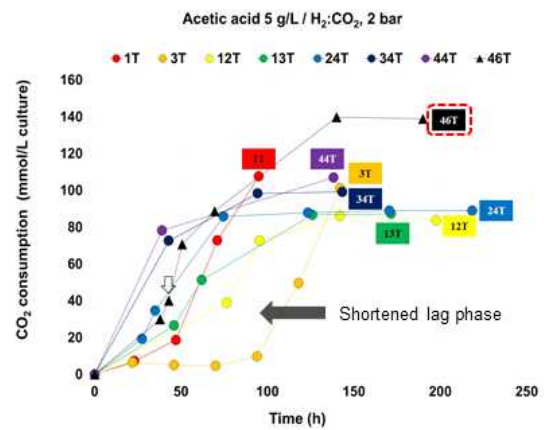
<그림 2-1-1. CO₂ + H₂ 조건에서 *Clostridium* sp. AWRP의 성장 곡선 및 대사 산물>

- 유기산의 누적으로 인해 AWRP 균주의 가스 소모가 저해되는 것으로 판단하여 적응 진화 실험을 통해 아세트산 내성이 향상된 균주 분리를 시도하였음.
- 반응기에서의 pH 제어 조건과 유사한 조건을 조성하기 위해 Ammonium acetate를 pH 5로 조정 후 5 g/L의 농도로 배지에 첨가하고 serum bottle에서 배양하면서 반복적인 계대를 수행하였음(그림 2-1-2).

1. Serial transfer under acetate conditions



2. GC measurement & transfer



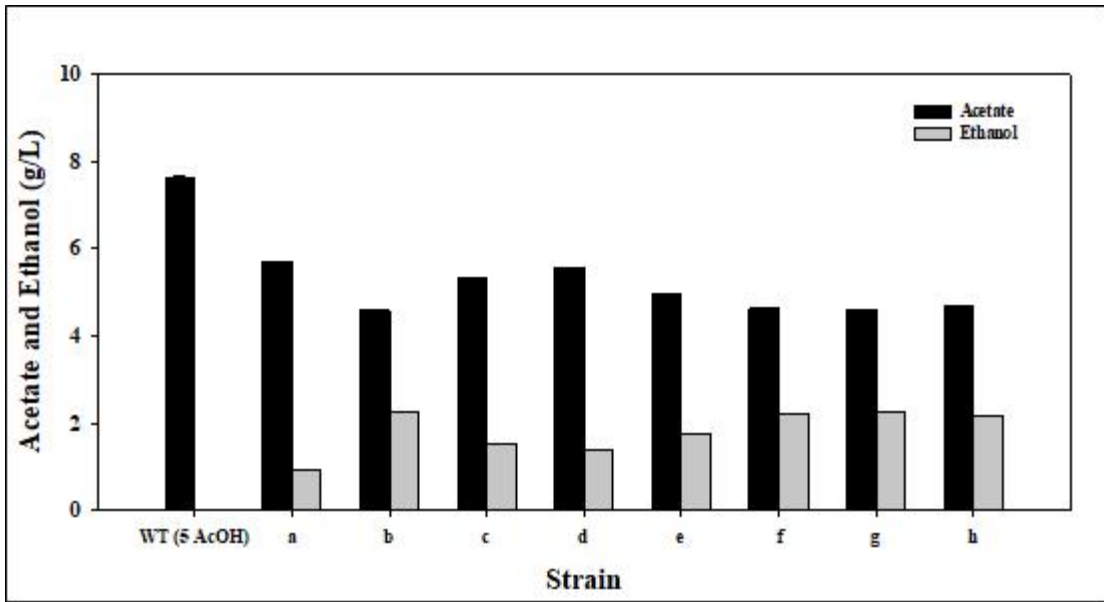
3. Isolation & Culture



RM (YE 0.5 g L⁻¹ + 5 g/L Ammonium acetate)
Substrate: 20% CO₂ and 80% H₂, 100 kPa

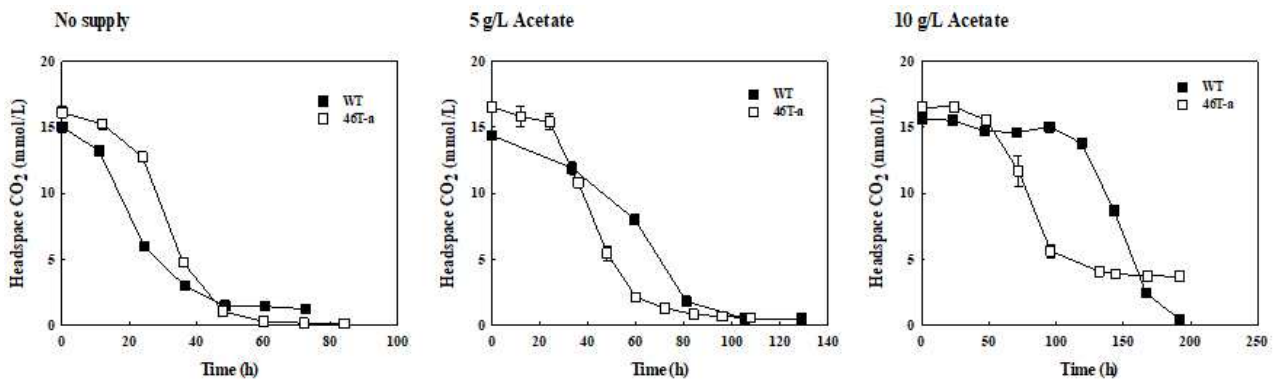
<그림 2-1-2. Clostridium sp. AWRP의 적응 진화를 통한 아세트산 내성 균주 분리 과정>

- 계대 배양을 수행하면서 Gas chromatography로 CO₂와 H₂의 소모 양상을 관찰한 결과, 30T 이후로 배양 지연이 단축되면서 가스 소모 속도가 빨라지는 것을 확인하였으며, 46T 배양에서 고체 배지를 이용해 단일 콜로니의 형태로 배양하여, 8개의 colony를 선택해 배양하였음(그림 2-1-3). 아세트산 5 g/L가 첨가된 배지에서 야생형은 에탄올이 생성되지 않았으나 변이주 8개의 콜로니는 모두 에탄올을 생성하는 것이 확인됨.



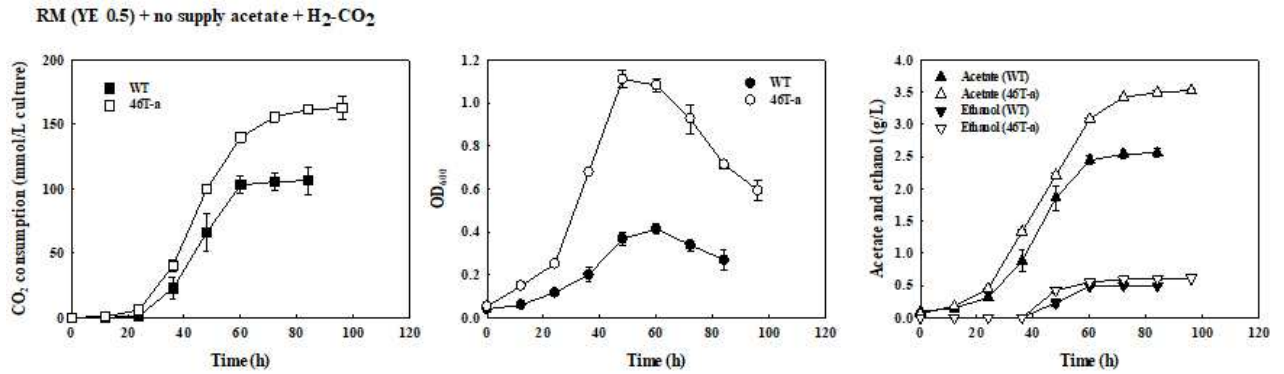
<그림 2-1-3. 5 g/L 아세트산 첨가 배지에서 *Clostridium* sp. AWRP 야생형과 아세트산 내성 변이주의 대사 산물 분석>

- 46T 배양에서 콜로니간 편차는 유의하지 않아 8개의 콜로니 중 a 콜로니(이하 46T-a)를 변이주로서 향후 실험에 사용하였음.
- 아세트산 농도에 따른 내성 정도를 확인하기 위해 0, 5, 10 g/L의 아세트산 첨가 조건에서 46T-a와 야생형 균주의 배양을 진행하였음(그림 2-1-4). 야생형의 경우 10 g/L 아세트산 첨가 조건에서 약 120시간의 지연기 이후 가스 소모가 시작되었으나 46T-a의 경우는 약 60시간 이후 가스 소모가 시작되어, 야생형 대비 아세트산 내성이 증가하였음을 확인함.



<그림 2-1-4. 아세트산 농도에 따른 야생형 *Clostridium* sp. AWRP와 46T-a 변이주의 가스 소모 비교>

- 1-L serum bottle을 통해, 아세트산 무첨가 배지에서 야생형과 배양 특성을 비교한 결과, 아세트산 무첨가 조건에서도 46T-a 균주가 야생형 대비 성장 및 대사 산물 생산량이 증가함을 확인하였음 (그림 2-1-5).



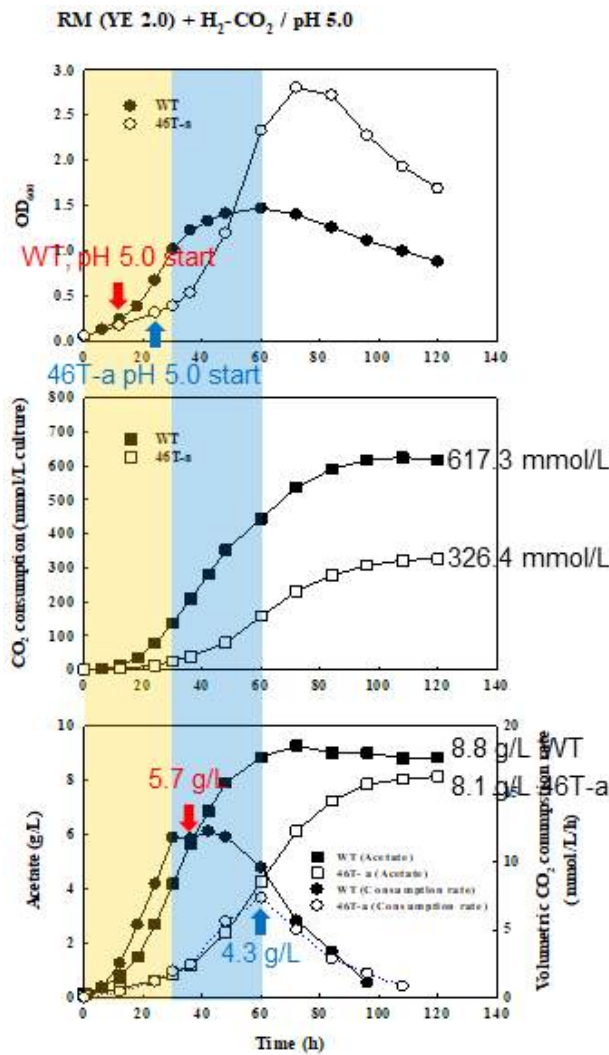
<그림 2-1-5. 아세트산 무첨가 배지에서 *Clostridium* sp. AWRP와 46T-a 변이주의 성장 및 산물 생산 비교>

- 이러한 형질의 변화와 관련된 계놈상의 변화를 확인하기 위해 HiSeq system을 이용해 46T-a의 계놈 서열을 분석한 결과, 총 4개의 유전자에서 변이가 확인되었음.
- 이 중 3개는 탄소 고정 경로에서 개미산 생성에 관여하는 formate dehydrogenase와 복합체를 이루는 수소화 효소(hydrogenase)의 subunit으로 확인되었으며, *dnaK*는 단백질 접힘을 돕는 chaperone으로서 스트레스 내성과 관련이 있음이 알려져 있음. 따라서, 이러한 변이들이 46T-a에서의 아세트산 내성 증가에 기여하였을 것으로 추측되며, 정확한 기전 및 효과에 대해서는 추가 연구가 필요할 것으로 판단됨.

<표 2-1-1. 46T-a에서 확인된 유전자 변이>

Locus tag	Definition	Mutation	Amino acid change
DMR38_03370	NADH-quinone oxidoreductase subunit F (NuoF)	G1261T	V421F
DMR38_03375	2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain-containing protein	C422T	T141I
DMR38_03380	4Fe-4S dicluster domain-containing protein	C365T	T122I
DMR38_03800	molecular chaperone DnaK	G67T	D23Y

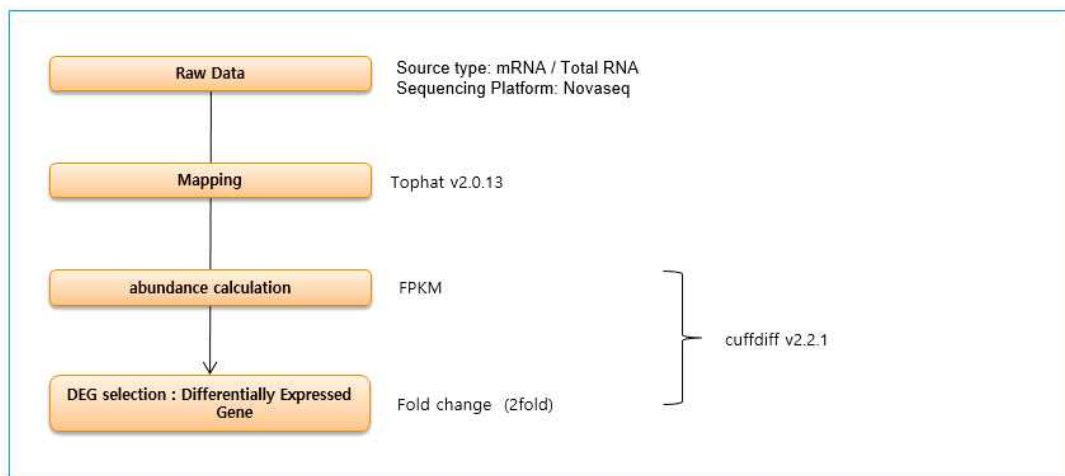
- 또한, 전사체 수준에서 46T-a 균주의 변화를 확인하기 위해 야생형 균주와 동시에 배양기 실험을 수행하여 비교하였음. 배양은 이전 야생형 균주 배양과 동일 조건으로 pH 5.0, 37° C에서 진행하였으며, 가스 공급은 CO₂ + H₂ (1:4) 혼합 가스를 80 mL/min의 유량으로 공급하고 500 RPM으로 교반하였음.
- Serum bottle 실험과는 달리 배양기 조건에서는 아세트산 농도와 생산성이 큰 차이를 보이지 않았으나, 야생형 균주 대비 동일 조건에서 세포 농도는 약 2배 증가하였음을 확인하였음(그림 2-1-6).



<그림 2-1-6. 1.6 L 배양기에서 야생형 *Clostridium* sp. AWRP와 변이주 46T-a의 배양 곡선>

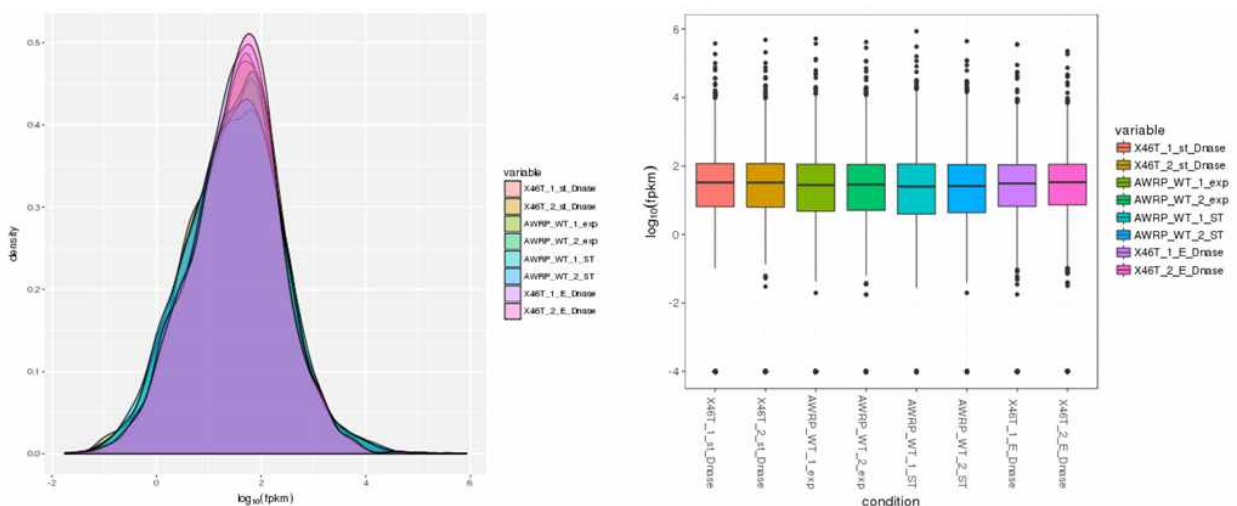
- 세포 농도가 증가한 요인을 분석하기 위해 전사체 수준에서 46T-a 균주의 변화를 확인하기 위해 야생형 균주와 동시에 배양기 실험을 수행하여 비교하였음. 각 균주는 2반복 배양 실험을 통해 exponential phase/stationary phase에서 각각 전체 RNA를 추출하였음.

- RNA 추출시 전사체의 안정화를 위해 균체에 RNAProtect(Qiagen) 전처리를 진행하였으며, 원활한 균체 파쇄를 위해 lysozyme 처리 후 최종적으로 TRIzol을 이용해 양질의 total RNA를 정제하였음.
- 추출된 Total RNA는 DNase 처리 후 Agilent Bioanalyzer를 이용해 quality를 확인하였으며, rRNA 제거 후 Illumina Novaseq 시스템을 이용해 발현량을 분석하였음. 차등 발현 유전자 (DEG) 분석을 위해 raw read를 Tophat을 이용해 게놈에 mapping 후 Cuffdiff 2.2.1을 이용하여 FPKM 및 DEG 분석을 진행하였음(그림 2-1-7).



<그림 2-1-7. DEG 분석 과정 요약 모식도>

- Cufflink 분석 후 각 유전자의 FPKM 분포를 각각 density plot과 box plot으로 분석하여 DEG 분석이 가능한 양질의 수준으로 library construction이 되었음을 확인하였음(그림 2-1-8).



<그림 2-1-8. Clostridium sp. AWRP 야생형 및 46T-a 개량 변이주의 Transcriptome Mapping quality>

분석. (좌) 각 샘플의 유전자 FPKM 분포 (우) Box Plot 분석

- DEG 분석(FPKM 변화 2배 이상, p -value < 0.05, FDR < 0.1 기준) 결과, 총 4028개의 단백질 코딩 유전자 중 대수 성장기에서는 총 821개, 정지기에서는 총 994개의 유전자가 발현량에 유의한 수준의 차이가 있음을 확인하였음. 이 중 가장 변화량이 큰 20개의 유전자를 아래 표에 나열하였음.

<표 2-1-2. 지수 성장기에서 *Clostridium* sp. AWRP의 야생형 균주와 46T-a 변이주의 DEG 분석 결과>

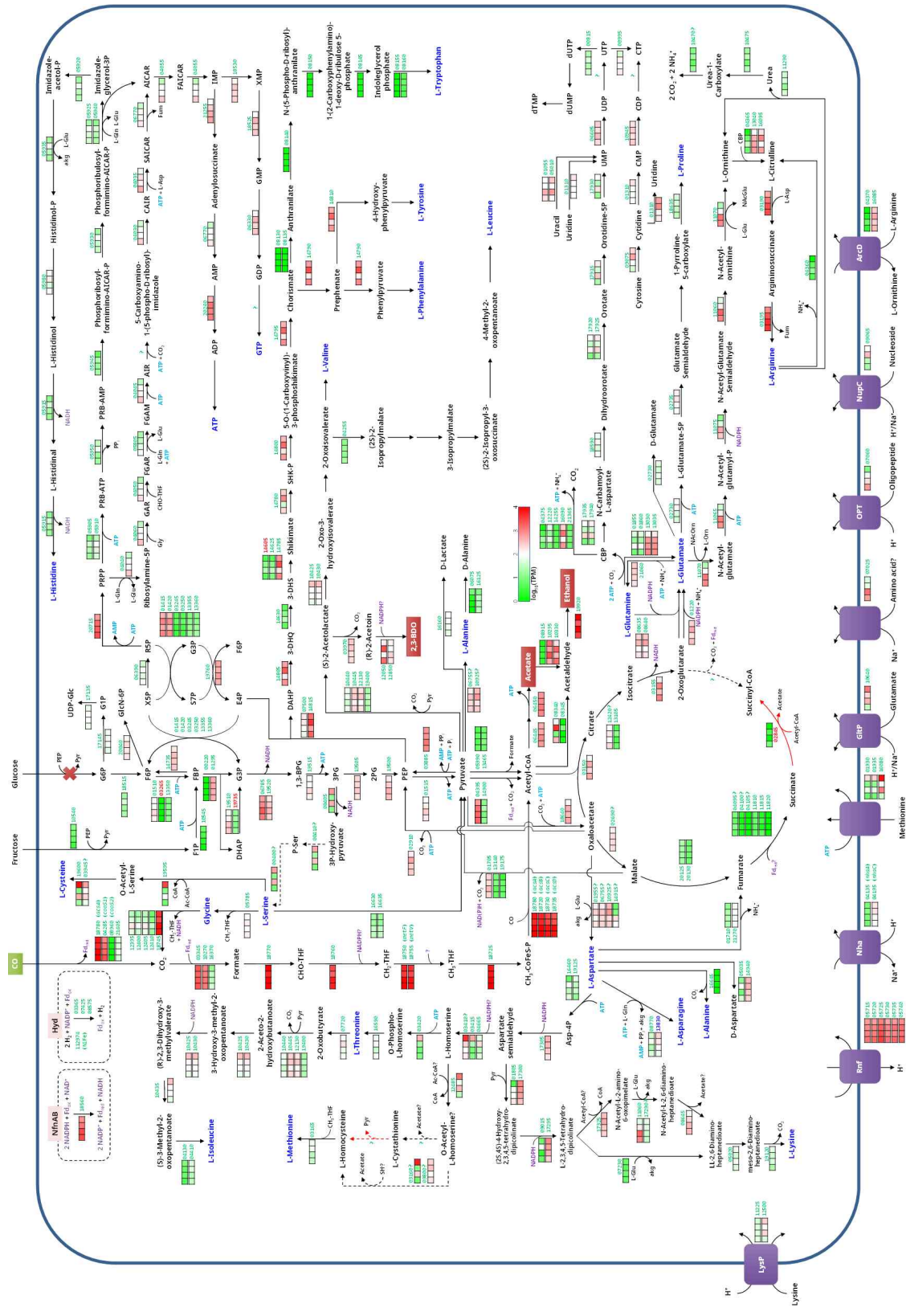
gene_id	log ₂ (46T-a/WT)	Definition
DMR38_17345	7.372734949	DUF4364 family protein
DMR38_17875	7.003012098	CPBP family intramembrane metalloprotease
DMR38_10785	6.236567601	Lrp/AsnC family transcriptional regulator
DMR38_06990	6.212532379	hypothetical protein
DMR38_08390	5.856362613	hypothetical protein
DMR38_19350	5.80027296	PadR family transcriptional regulator
DMR38_18095	5.684068149	bacteriohemerythrin
DMR38_11630	5.26025306	hypothetical protein
DMR38_05485	5.259541836	type II secretion system F family protein
DMR38_19455	5.156610796	hypothetical protein
DMR38_11060	-3.065124942	aspartate aminotransferase family protein
DMR38_11070	-3.289851711	bifunctional glutamate N-acetyltransferase/amino-acid acetyltransferase ArgJ
DMR38_02005	-3.395400938	amino acid permease
DMR38_02010	-3.487930255	amino acid permease
DMR38_12610	-3.501056719	hydantoinase/oxoprolinase family protein
DMR38_12620	-3.548352605	cytosine permease
DMR38_07060	-3.691973016	oligopeptide transporter, OPT family
DMR38_07025	-3.826201573	sodium:solute symporter
DMR38_12625	-4.263094946	carbon-nitrogen hydrolase
DMR38_12615	-4.446347511	DUF917 family protein

<표 2-1-3. 정지기에서 *Clostridium* sp. AWRP 야생형 균주와 46T-a의 DEG 분석 결과>

gene_id	log ₂ (46T-a/WT)	Definition
DMR38_08565	9.584289621	MerR family transcriptional regulator
DMR38_10895	8.1858446	RNA chaperone Hfq
DMR38_18095	8.016825592	bacteriohemerythrin
DMR38_11630	7.744655625	hypothetical protein
DMR38_12515	7.485469219	L-aspartate oxidase
DMR38_12505	7.32051833	hypothetical protein
DMR38_01400	7.177979889	hypothetical protein

DMR38_06990	7.084443858	hypothetical protein
DMR38_12520	7.053767416	quinolinate synthase NadA
DMR38_10845	6.913392802	MFS transporter
DMR38_11385	-4.386576682	bifunctional diaminohydroxyphosphoribosylaminopyrimidine deaminase/5-amino-6-(5-phosphoribosylamino)uracil reductase RibD
DMR38_12930	-4.412376277	amino acid ABC transporter substrate-binding protein
DMR38_11380	-4.475073239	riboflavin synthase
DMR38_01805	-4.577065488	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase
DMR38_04365	-4.890749923	ornithine carbamoyltransferase
DMR38_07025	-4.958374365	sodium:solute symporter
DMR38_11065	-4.988769425	acetylglutamate kinase
DMR38_11060	-5.094091359	aspartate aminotransferase family protein
DMR38_11075	-5.351864114	N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase
DMR38_11070	-5.504108445	bifunctional glutamate N-acetyltransferase/amino-acid acetyltransferase ArgJ

- 기존 Type strain의 연구 결과에서 예측되는 것과는 달리 46T-a 변이주에서는 아미노산 /oligopeptide 수송체 및 생합성 관련 유전자들이 downregulation되는 경향을 보인 반면, nucleoside 수송체 및 salvage 생합성 경로 유전자들은 upregulation되는 경향을 보였음.
- 이는 가스 전환 미생물 성장에 있어서 주요한 제한 인자가 nucleotide 생합성과 관련이 있음을 시사하며, 향후 연구를 통해 추가적인 분석과 함께 균주 개량/배지 개선에 적용할 수 있을 것으로 기대함.
- 또한, 유전체상의 변이는 단 4개였으나, 전사체상에서는 상당히 많은 변화가 있음이 확인되었으며, 이는 향후 CO₂ 전환 미생물의 연속 배양에서 균주 성능 및 안정성 변화와 관련하여 체계적인 분석이 필요함을 시사함.
- DEG 분석과 더불어 전사체의 변화를 세포 대사와 연관지어 해석하기 위하여 Novaseq 분석 raw data를 Kallisto를 이용하여 모든 단백질 코딩 유전자의 Transcript per million reads(TPM)을 분석하였음. 분석된 TPM 수치는 *Clostridium* sp. AWRP의 전체 대사 경로에 mapping하여 아래 그림과 같이 나타내었음.



<그림 2-1-9. Clostridium sp. AWRP 야생형 및 46T-a 변이주의 전사체 기반 대사 경로 분석 결과>

- Mapping 결과, 46T-a 균주에서는 전반적으로 탄소고정 경로인 Wood-Ljungdahl 경로 관련 유전자의 발현이 평균적으로 2~30% 정도 감소한 것으로 확인되었으며, 그 외에 세포의 building block 생합성과 연관된 gluconeogenesis 경로 유전자도 소폭 감소한 것으로 확인되었음.
- 이는 yeast extract와 같은 유기 질소원을 첨가하여 적응 진화시 ATP의 소모가 높은 nucleotide의 *de novo* 생합성은 억제하면서 수송체 유전자의 upregulation을 통해 성장 속도 및 균체 밀도를 높이려는 방향으로 진화함을 시사함.
- *Clostridium* sp. AWRP의 경우 auxotrophy가 있는 것으로 확인되었으나, 어떠한 영양소의 생합성이 불가능한지는 methionine 외에는 확인되지 않았음. 추가 연구를 통해 제한 영양소가 파악된다면 복합 유기 질소원을 배제하여 가스 전환 효율이 더 증가하는 방향으로 적응진화를 유도할 수 있을 것으로 판단됨.
- 또한, 본 연구를 통해 확인된 전사체 profile은 향후 유전자 조작 toolbox의 fine-tuning 및 다양화에 활용하여 균주 개발 기간을 더욱 단축시킬 수 있을 것으로 기대함.

○ 가스 전환 미생물 유전자 조작 균주 제작

- 1차년도 구축한 유전자 조작 toolbox를 활용하여 2차년도까지 결손주 6주, 에탄올 생합성 유전자 과발현 균주 2주를 제작하였으며, 균주의 목록은 아래 표에 요약하였음.

<표 2-1-4. *Clostridium* sp. AWRP의 단일 유전자 결손주>

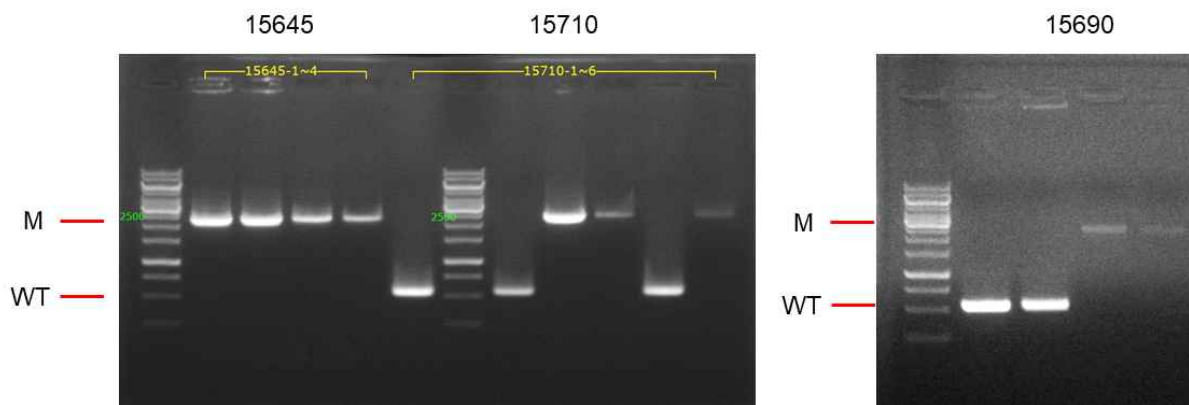
Target Gene	Definition	비고
DMR38_05640	sporulation transcription factor Spo0A	Sporulation 억제
DMR38_12410	glycine cleavage system aminomethyltransferase GcvT	Glycine synthase role 확인
DMR38_18565	redox-sensing transcriptional repressor Rex	Metabolite profile 변화 여부 확인
DMR38_15645	LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein	Active prophage cluster
DMR38_15690	capsid protein	
DMR38_15710	PBSX family phage terminase large subunit	

<표 2-1-5. *Clostridium* sp. AWRP의 과발현 균주>

Target Gene	Definition	비고
DMR38_08915	aldehyde ferredoxin oxidoreductase	Ethanol production
DMR38_10295	aldehyde ferredoxin oxidoreductase	

○ Phage 유전자 결손주 제작

- 앞선 *Clostridium* sp. AWRP의 전사체 분석 결과에서 prophage로 추정되는 cluster 중 1개는 유전자가 활발하게 발현되고 있는 것으로 확인되었음.
- Phage의 증식은 장기 배양시 활성화로 인해 전환 효율을 떨어뜨리거나 세포 사멸로 인한 재배양을 일으킬 수 있어, bacteriophage 형성에 핵심적인 유전자 3종 peptidoglycan-binding protein(DMR38_15645), capsid(DMR38_15690), terminase(DMR38_15710)의 결손주를 제작하였음.

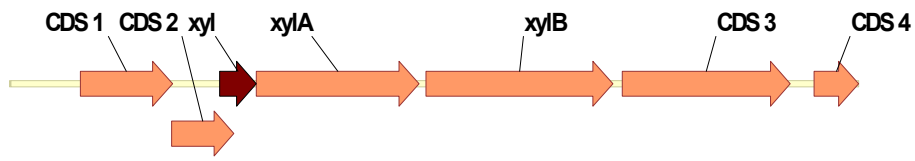


<그림 2-1-10. *Clostridium* sp. AWRP Prophage cluster의 단일 유전자 결손주 3주 제작 결과>

- 제작된 균주들은 향후 최적화된 배양 조건 확립 후 탄소원별로 야생형과의 성장 비교 실험을 실시할 예정임.

○ *Clostridium* sp. AWRP의 xylose-inducible 발현시스템 구축 및 *mazF* counterselectable marker 개발

- 현재 구축된 유전자 조작 toolbox 외에 다양한 chromosomal manipulation을 위해 counterselectable marker를 개발하고자 하였음. 이러한 마커를 이용시 single-crossover mutant의 colony의 배제가 용이해져 mutant 구축 시간이 단축될 수 있음.
- Gram-positive 균주의 경우 counterselectable marker로 사용 가능한 유전자가 많지 않아 대장균에서 RNA를 파괴하는 toxin 유전자인 *mazF* 유전자를 이용하였으며, inducible promoter의 후보로서 xylose operon의 promoter를 이용하고자 하였음(그림 2-1-11).

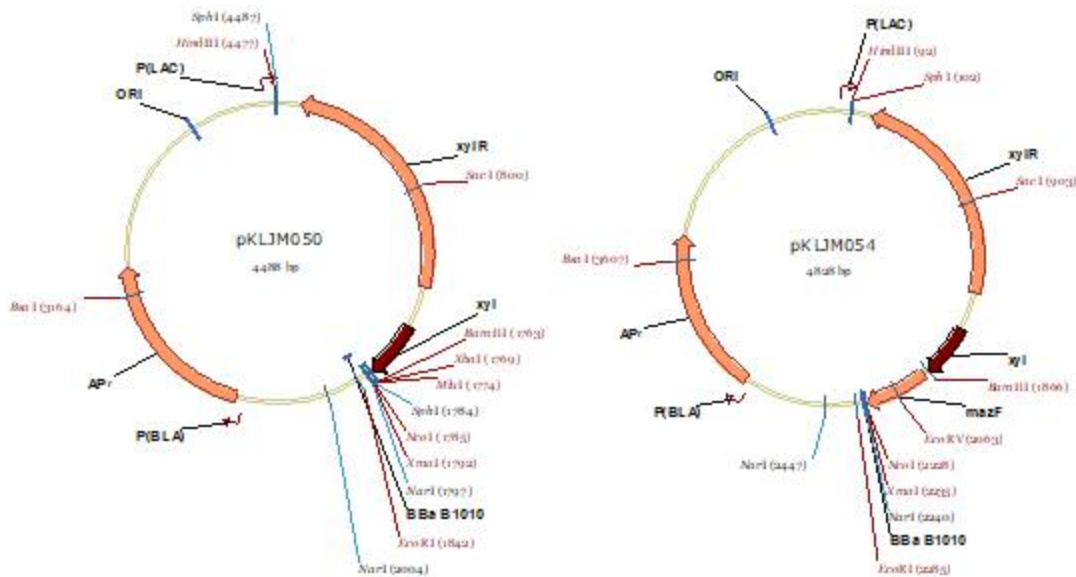


AWRP xylose operon

6902 bp

<그림 2-1-11. Clostridium sp. AWRP의 xylose operon>

- Clostridium sp. AWRP의 *xyIR* 유전자(DMR38_09125)와 *xyIA* 유전자(DMR38_09110) 상위의 promoter 서열을 클로닝하여 발현 플라스미드 pKLJM050과 여기에 대장균의 *mazF* 유전자까지 클로닝한 pKLJM054 플라스미드를 제작하였음(그림 2-1-12)



<그림 2-1-12. Clostridium sp. AWRP의 *xyIR* 유전자와 *xyIA* promoter가 결합된 발현 플라스미드 pKLJM050(좌)와 여기에 *mazF* toxin 유전자가 삽입된 발현 벡터 pKLJM054(우)의 모식도>

- Clostridium sp. AWRP의 *xyIR* 유전자(DMR38_09125)와 *xyIA* 유전자(DMR38_09110) 상위의 promoter 서열을 클로닝하여 발현 플라스미드 pKLJM050과 여기에 대장균의 *mazF* 유전자까지 클로닝한 pKLJM054 플라스미드를 제작하였음(그림 2-1-13)
- 2차년도에 개발한 *mazF* counterselectable marker는 기존 유전자 조작 toolbox와 함께 활용하여 대사공학적 균주 개량에 다양한 용도로 활용할 수 있을 것으로 기대되며, 추후 inducible promoter의 engineering을 통해 발현량 증가 및 민감도 개선을 진행할 예정임.



<그림 2-1-13. Xylose 포함 배지에서 *E. coli mazF* toxin 유전자의 발현 여부 확인.
(좌) *mazF*가 삽입되지 않은 대조군 (우) *mazF* 삽입 플라스미드 pKLJM054>

나. 가스 전환 배양 조건 개선

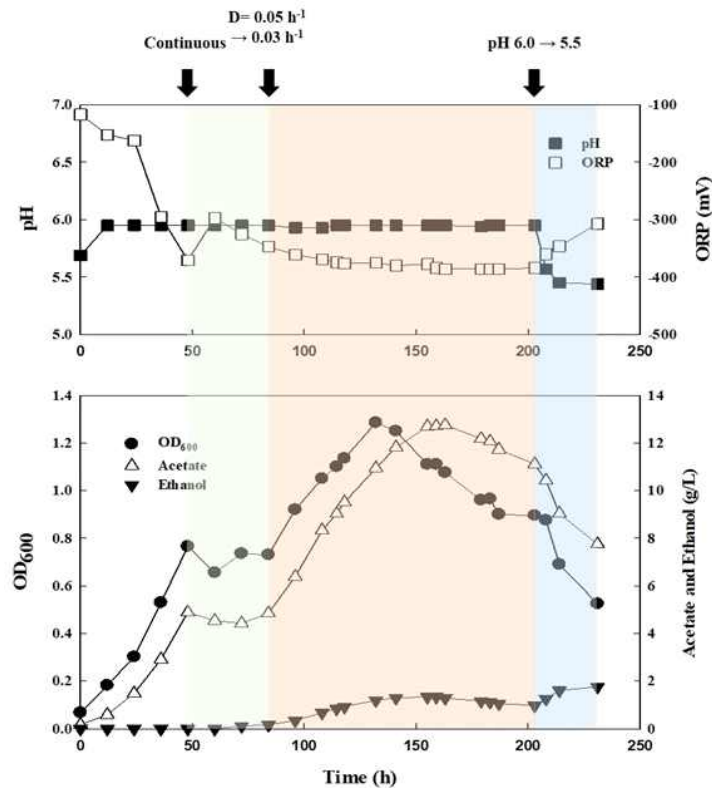
○ *Clostridium* sp. AWRP의 CO₂+H₂ 전환 연속배양 운전

- 가스 전환 공정의 특성상 회분식 배양보다는 연속 배양의 형태로 운전하는 것이 효율적이므로 모델 균주인 *Clostridium* sp. AWRP를 이용해 연속 배양을 진행하였음.
- 연속 배양은 총 배지 부피 1.6L로 진행하였으며, RM 배지에 yeast extract 2 g/L를 첨가하여 진행하였음. pH는 암모니아수 공급을 통해 초기 6.0으로 제어하면서 안정화된 후 5.5, 5.0 순으로 낮추어 pH 에 따른 배양 양상을 비교해 보고자 하였음.
- 아래 그림과 같이 배양기와 feed tank를 peristaltic pump로 연결 후 초기 회분식 배양을 진행하고, 48시간째에 연속 배양으로 전환하였음. 48~84시간 구간까지는 희석률을 0.05 h⁻¹로 설정하였으나, 균체 밀도가 낮은 것을 확인 후 0.03 h⁻¹로 감소시켰음.



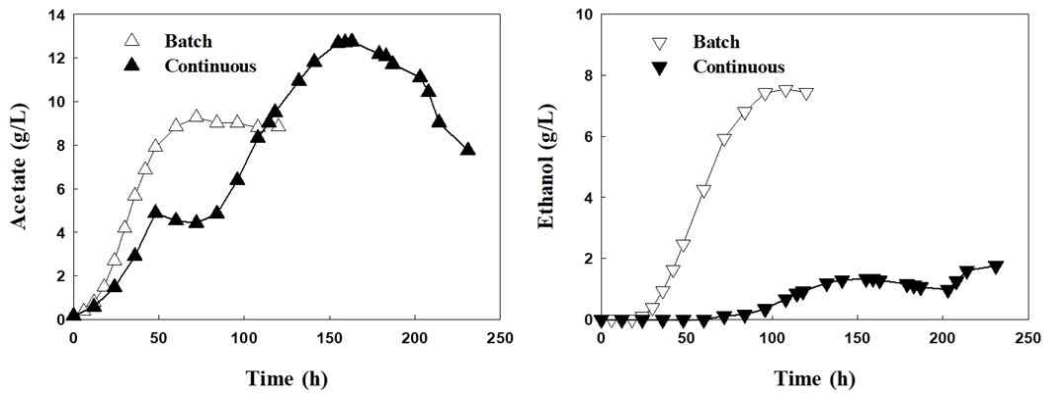
<그림 2-2-1. *Clostridium* sp. AWRP의 CO₂ 전환을 위한 연속 배양기 (좌) 및 실제 배양 사진 (우) >

- 희석률을 0.03 h⁻¹로 낮춘 후 균체 밀도가 1.3까지 안정적으로 증가하는 것을 확인하였으나, 이후 급격하게 감소하는 현상을 확인하였음. 그러나 균체가 감소하는 구간에서 아세트산의 농도는 약 12 g/L로 최대를 나타내었으나(그림 2-2-2), 이후 균체 활성 감소에 따라 희석되어 감소하는 추세를 나타내었음.



<그림 2-2-2. Clostridium sp. AWRP의 CO₂ 전환 연속배양 결과 >

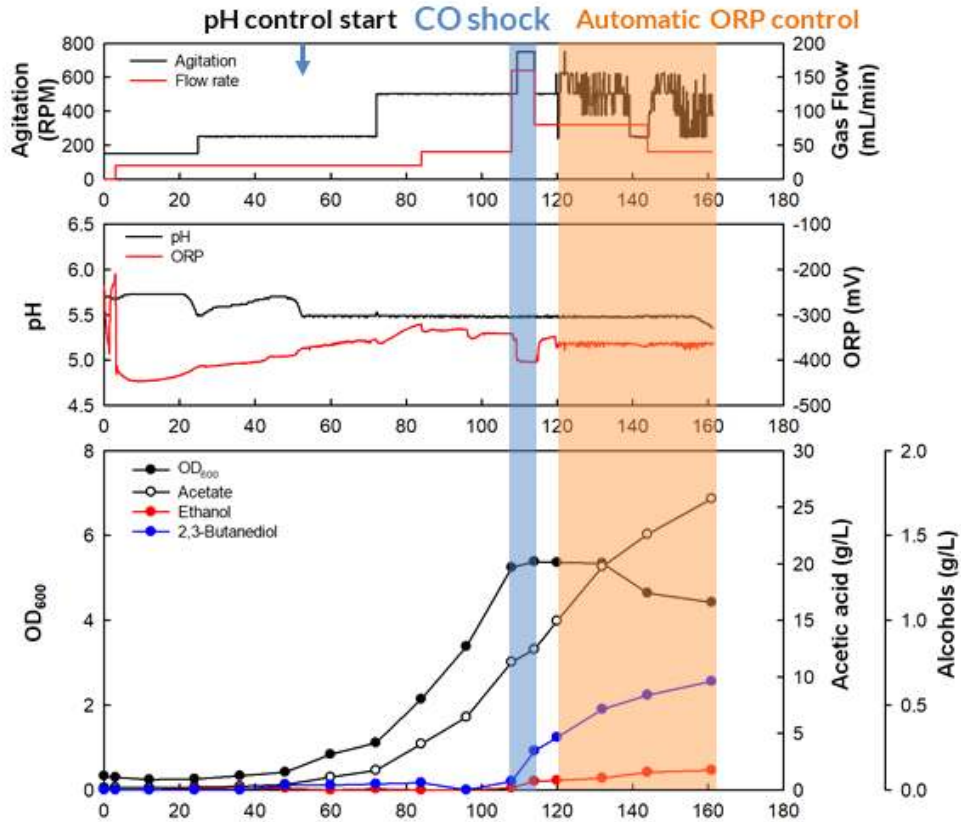
- 200시간째에 pH를 5.5로 낮추어 주었으나 배양이 회복되지 않음을 확인하고 종료하였음.
- pH를 6.0으로 증가시켜 아세트산에 대한 스트레스가 다소 완화될 것으로 기대하였으며, 실제 아세트산 농도는 소폭 증가하고, 에탄올 농도는 감소하였음이 확인되었음.
- 그러나 pH 6.0에서 전체적인 가스 소모 속도는 pH 5.0의 회분식 배양보다 떨어지는 것으로 확인되어 전환 효율 자체는 높지 않음이 확인되었으며, 추후 배양시에는 6.0보다 낮은 pH에서 안정화 여부를 확인해야 할 것으로 보임.
- 또한, 일반적인 연속 배양과 달리 균체의 밀도가 안정적으로 유지되지 못하는 것을 확인하였음. 이는 stationary phase에서 sporulation 유전자들의 발현으로 cell lysis가 일어나는 것으로 추측되며, 이러한 현상이 높은 희석률에서도 발생하는지의 여부를 추가적인 실험이 필요할 것으로 판단됨. Sporulation 외에도 prophage 활성화 등의 문제가 있을 수 있으므로, 당해 연도 제작된 유전자 조작 균주를 활용하여 비교 분석이 필요할 것으로 보임.



<그림 2-2-3. 배치배양과 연속배양에 따른 산물 생산 비교>

○ 낮은 가스 전달 속도에서 *Clostridium* sp. AWRP의 합성 가스 전환 특성 확인

- *Clostridium* sp. AWRP와 같은 아세트젠 균주들은 CO 또한 가스 기질로 사용을 할 수 있으나 탄소고정 경로 효소 중 하나인 formate dehydrogenase-hydrogenase 복합체가 CO에 저해를 받아 과도한 CO의 공급시 오히려 성장 저해 요인으로 작용함.
- *Clostridium* sp. AWRP의 경우 CO 공급 속도에 따라서 배지의 ORP와 산물 생산 패턴이 판이하게 변화하는 특성이 있음. 그러나 가스 공급을 제한한 상태에서 배양을 지속하였을 때의 산물 패턴과 세포농도가 증가한 정지기에서도 CO 공급에 의해 에탄올 생산량이 변화할 것인지는 확인하지 않음.
- *Clostridium* sp. AWRP 균주에 CO에 의한 저해를 최대한 억제하면서 Syngas를 공급한 뒤 높은 세포 농도 상황에서 CO 공급량을 늘려 주었을 때, 배지에 누적된 아세트산이 효율적으로 에탄올로 전환될 수 있는지 확인하고자 하였음.
- 기질 가스로는 합성 가스의 조성을 모사한 혼합 가스(CO 50%, CO₂ 10%, H₂ 10%, N₂ 30%)를 사용하였으며, pH는 암모니아수의 공급을 통해 5.5로 유지하였음. 가스의 공급 유량과 교반 속도는 headspace의 GC 측정을 통해 CO의 전환율이 50% 이상일 때 증가시켜 주었으며, CO에 의해 수소 소모가 저해되지 않게 조절하였음.
- CO의 전달이 제한된 상황에서는 아세트산이 주 산물로 생성되는 것을 확인하였음. 그러나 다른 유사균주에서 확인되는 것처럼 후반부에 알코올 생산으로 대사가 전환되지는 않았음.
- CO 저해가 없을 경우 전반적인 Wood-Ljungahl 경로의 flux가 증가하여 CO를 활발하게 공급했을 때보다 생산성은 개선되는 것을 확인.
- 특히 84~108시간 구간에서는 아세트산의 순간 생산성이 9 g/L/d까지 증가하는 것을 확인하였으며, 최종 아세트산 농도는 약 26 g/L로 확인되었음. 그러나 배양 초반의 CO 저해로 평균 생산성은 약 3.8 g/L/d로 최대 생산성과 큰 차이를 보이는 것을 확인함. 최고 균체 밀도는 약 5.4 수준으로, 영양적인 제한과 아세트산 누적이 동시에 작용한 것으로 판단됨.



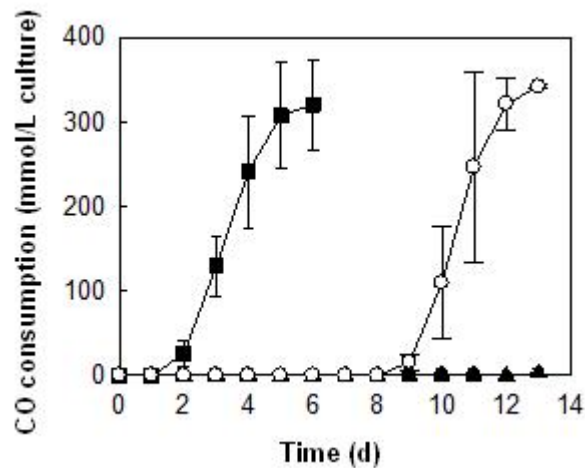
<그림 2-2-4. pH, ORP 조절을 통한 CO shock 영향 평가>

- 발효 후반부에 1차년도에 시험한 ORP 제어(-360 mV)를 시도하였는데, 일정한 수준으로 잘 유지되는 것은 확인하였으나, 배양 초반과는 다르게 후반부에서는 ORP를 낮춰 주어도 알코올의 생산이 활발하지 않았음. 이는 아세트산이 이미 고농도로 누적되어 세포의 활성 자체가 낮았기 때문으로 추정됨.
- 덧붙여, 세포농도가 낮은 배양 초반시 CO에 대한 저해 해결이 중요할 것으로 보임. 일반적으로 실험실에서 사용하는 autoclavable 배양기의 경우 가스관 전체를 stainless steel 재질로 사용하는 것이 불가능하여 일부 산소가 유입되는 구조이며, CO 저해로 인한 성장 지연이 오래 지속되는 경우 산소 오염으로 인한 실패가 일부 관찰되었음.
- 상기 문제를 해결하고, 다양한 조건(pH, agitation 등)에서 균주의 배양 양상을 확인하고 최적 배양 조건을 확립하여, 당해 연도에 제작한 다양한 개량 균주의 발효 성능 평가를 실시할 예정이다.

○ Acetate 첨가를 활용한 *Clostridium* sp. AWRP의 초반 CO 저해 개선

- 앞선 결과에서 언급하였듯이, CO를 사용한 배양에서의 가장 큰 어려움은 초반 낮은 균체 밀도에서 CO에 의한 저해로 생장이 지연되는 현상임. 향후 안정적인 배양기 운용을 위해서는 이러한 문제의 해결 방안이 필요함.

- CO에 대한 내성은 단순 유전자 조작으로 얻기 어렵고, 적응 진화 실험의 경우 시간이 장기간 소요되는 문제가 있음. 따라서, 배지에 당을 소량 첨가하여 균체 밀도를 올린 후 가스 배양으로 전환하는 방법들이 연구되고 있으나, 탄소원 전환시에도 배양 지연이 발생하는 것으로 알려져 있음.
- 배양 조건 최적화를 위한 serum bottle 실험 결과들을 종합하여 보았을 때, sodium acetate를 미량 첨가해 주었을 때, CO 소모가 빠르게 일어나는 것을 확인하였고, 개미산과 함께 배양 지연 개선 효과를 확인하였음.
- 개미산의 경우 탄소고정 경로의 중간 물질이나 CO에 의해 formate dehydrogenase가 저해되면 생합성이 크게 저해되어 전체적인 배양 지연이 된다는 것이 알려져 있음. 그러나 아세트산 첨가의 경우 가스 전환 미생물에서 어떤 역할을 하는지 정확하게 알려진 바 없음.
- 먼저, 20 mL의 배지를 이용한 serum bottle 배양을 수행하고 GC를 이용해 CO 소모량을 측정함으로써 성장 여부를 확인하였음. 가스 분석의 용이함을 위해 기존 합성 가스 대신 100% CO를 125 kPa로 충전하여 배양을 수행하였음(그림 2-2-5). Sodium acetate와 Sodium formate는 pH 5.5로 조정 후 첨가하였으며, 이들의 첨가에 따른 초기 배지 pH 변화 영향을 확인하기 위하여 대조군으로서 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid(MES)를 첨가한 조건도 같이 배양을 실시하였음.
- 그 결과, sodium acetate 첨가 실험군의 경우 약 6일만에 모든 CO를 소모한 반면, sodium formate의 경우 배양 13일차에도 유의미한 CO 소모를 보이지 못했음.

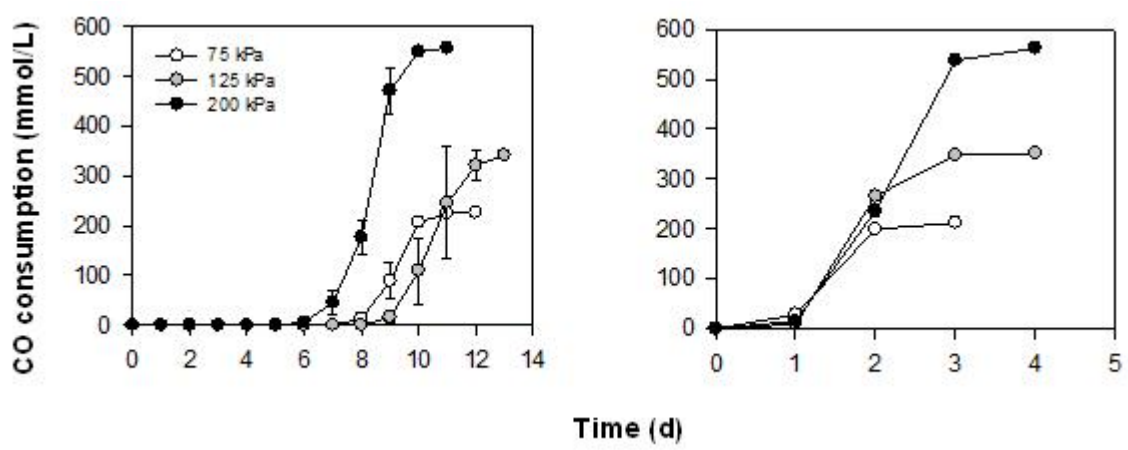


<그림 2-2-5. *Clostridium* sp. AWRP의 배지 첨가물에 따른 CO 소모량 비교 결과. ■ : 40 mM sodium acetate, ▲ : 40 mM sodium formate, ○ : 40 mM MES, ● : 첨가물 없음>

- 무첨가한 대조군의 경우도 syngas와는 달리 CO 소모가 일어나지 못했는데, 이는 기질에 CO₂가 배제됨으로써 배지의 pH가 합성 가스 배양시보다 높았기 때문으로 추측됨. 실제 MES를 첨

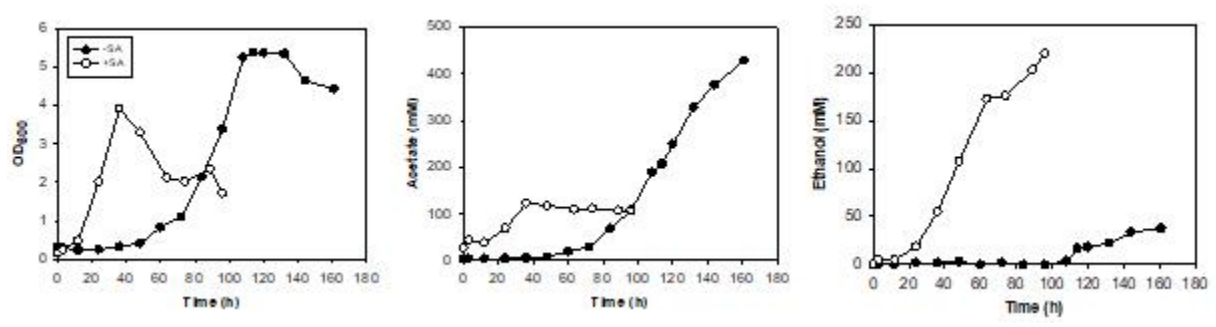
가해 초기 pH를 낮추어 준 대조군에서는 배양 9일차부터 CO 소모가 진행되었으나, sodium acetate 첨가 조건 대비 배양 지연이 크게 나타난 것으로 확인됨.

- CO의 분압에 따라 sodium acetate의 첨가 효과를 확인해 보기 위해서 CO의 분압이 각각 75, 125, 200 kPa인 조건에서 추가 배양 실험을 수행하였음. 본 실험에서는 CO 전환에 따른 배지의 pH 변화를 최소화하기 위해 모든 조건에서 배지에 40 mM MES를 첨가하였으며, 여기에 40 mM sodium acetate 첨가 유무에 따른 결과를 비교하였음(그림 2-2-6).



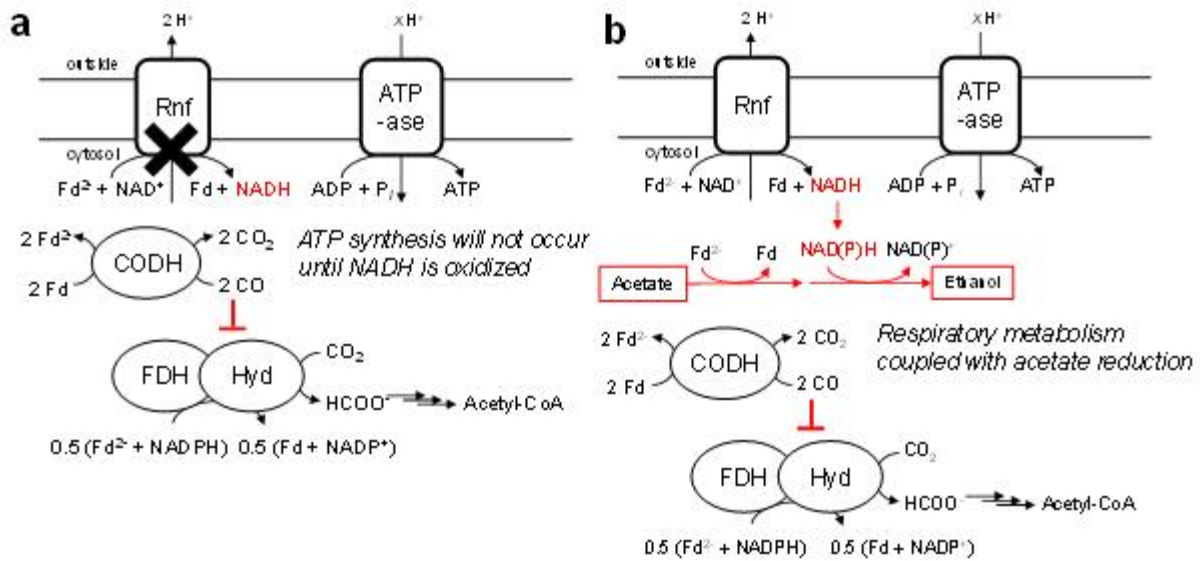
<그림 2-2-6. Clostridium sp. AWRP의 CO 분압에 따른 배양시 CO 소모. (좌) 40 mM MES 첨가 조건 (우) 40 mM MES와 40 mM sodium acetate 첨가 조건 >

- 높은 CO 분압에서도 효과가 있음이 확인되어, 배양기를 이용해 회분식 배양을 진행하였음. (그림 2-2-7). 미첨가 조건의 경우 CO 공급을 최소화해 주었음에도 약 2일 이상의 성장 지연이 발생한 반면, sodium acetate 첨가시 1일차부터 활발하게 성장하여 36시간째에 최고 균체 밀도에 도달하였음.



<그림 2-2-7. Sodium acetate 첨가 조건에서 Clostridium sp. AWRP의 회분식 반응기 배양 결과. 미첨가 조건은 CO 제한 조건에서의 배양 결과임. >

- 상기 발효 결과에서 초반부터 에탄올이 급격하게 상승하는 것을 확인할 수 있으며, GC 분석을 통해 초반에는 탄소 고정경로로 유입되는 CO의 비율보다 아세트산의 환원에 사용되는 CO의 비율이 높음을 확인하였음. 이러한 결과를 바탕으로 아래 그림과 같은 CO-아세트산 호흡 모델을 제시하였으며, 추가 실험을 진행할 예정임.



<그림 2-2-8. Clostridium sp. AWRP의 CO-아세트산 호흡 모델.

(좌) 아세트산 미첨가시의 CO 저해 상태 (우) 아세트산 첨가로 CO-아세트산 호흡으로 전환된 상태

- 이번 연구를 진행하여 아세트산 첨가를 통해 CO 배양 시간이 대폭 단축될 수 있음을 확인하였으며, 향후 빠르게 배양 조건 최적화가 가능할 것으로 기대함. 특히, 그 동안 CO 가스 이용 시 어려움을 겪었던 가스 유량 및 agitation 조건 실험이 더욱 용이해질 것으로 보이며, 에탄올 생산성 향상에도 활용이 가능할 것으로 기대됨.

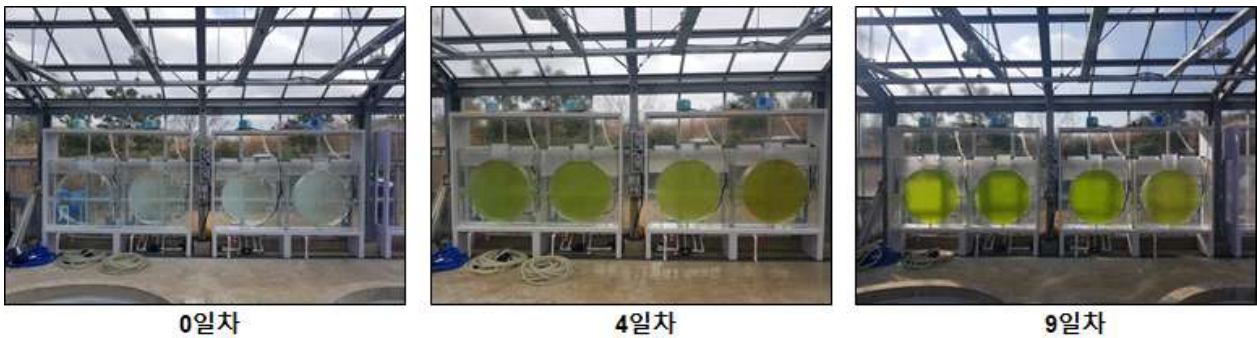
3. 미세조류 생산성

가. 고염분수 활용 미세조류 대량배양 연구

○ 농축 고염분수를 활용한 *Dunaliella salina* 배양 연구(200 L 규모)

- 본 배양 연구에 사용된 *Dunaliella salina* LIMS-PS-1511 종은 남해 해양시료도서관에서 분양받았으며 총 4기의 200 L 규모 광생물 반응기(ROSE max)에서 9일 동안 배양 연구를 진행(그림 3-1-1)
- 미세조류 바이오매스 확보를 위해 *Dunaliella salina* 배양 2회(1차, Lot #1; 2차, Lot #2) 진행됨. 이때 적정 배양 수온은 25°C로 설정, 수분 증발에 의한 염분 증가는 담수를 공급함으로써 조절되어 배양기간 동안 배양 환경을 일정하게 유지함

- 미세조류 배양은 33 psu조건 of 일반해수(NS) 및 용암해수(MS), 65 psu조건 of 용암해수+NaCl (MS+NaCl) 및 고염분수(HSMS)를 기반으로 하여 진행됨
- 위 네 가지 조건에 f*1.5 배지(표 3-1-1)를 영양원으로 하는 200 L의 배양액과 5 L의 미세조류 seed가 광 생물 반응기에 각각 공급됨



<그림 3-1-1. *Dunaliella salina* 배양 연구(200 L 규모)>

<표 3-1-1. 해수 기반 미세조류 배양용 배지 조성 >

f*1.5 medium		
	Component	Amount (g/L)
1	NaNO ₃	0.225
2	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.015
3	Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	0.45
4	NaNO ₃	2.5
9	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.00315
10	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0.00436
11	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.000022
12	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.00018
14	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.00001
15	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0000063
16	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0000098

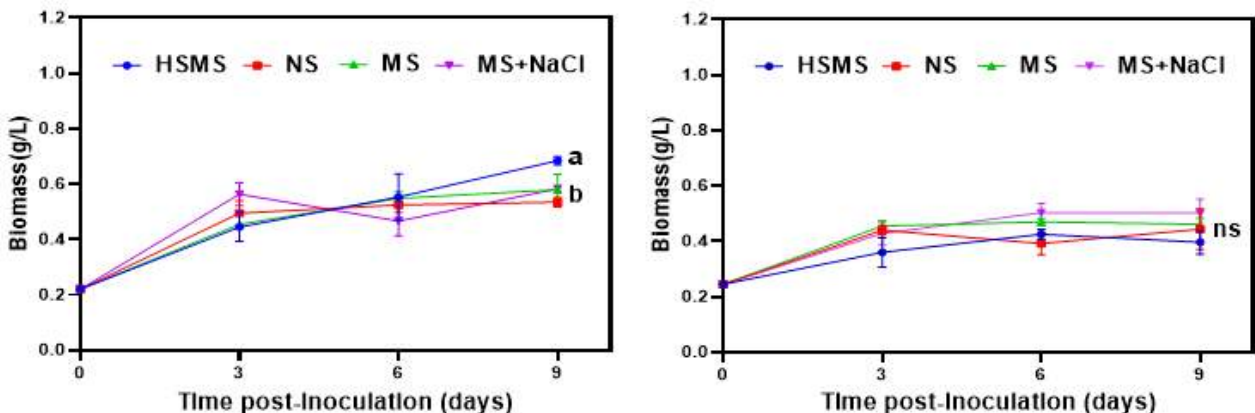
○ *Dunaliella salina* 배양환경 분석(200 L 규모)

- 배양환경은 배양이 진행되는 9일 동안 YSI 556-01 (Nist, USA)을 이용하여 수온, 염분 및 pH를 측정함으로써 분석함(1일 1회)
- 배양환경 분석 결과, 1차 배양에서 수온은 평균 26.14±1.9℃, 최고 29.11±0.32℃, 최저 22.96±0.12℃을 보였으며 2차 배양에서는 평균 26.51±1.9℃, 최고 30.22±0.23℃, 최저 24.41±0.18℃의 수온을 기록함. 설정 온도(25℃)를 유지하였으나 일일 조사량 및 기온 차에 의해 최대 6.15±0.44, 5.81±0.41℃의 수온 변화를 보임

- 염분은 고염의 조건(HSMS, MS+NaCl)에서 1차 배양에 평균 65.39 ± 0.2 psu, 최고 65.71 ± 0.12 psu, 최저 65.11 ± 0.11 psu을 보였으며, 2차 배양에서 평균 65.00 ± 8.13 psu 로 최고 66.98 ± 0.24 psu, 최저 65.14 ± 0.15 psu를 기록함. 33 psu 조건(NS, MS)에서는 1차에 평균 33.47 ± 0.21 psu, 최고 33.89 ± 0.14 psu, 최저 33.13 ± 0.16 psu을 보였으며, 2차에는 평균 33.99 ± 0.65 psu, 최고 34.65 ± 0.16 psu, 최저 33.30 ± 0.12 psu을 기록함
- pH 수준은 1차 배양에 9.86 ± 0.43 , 최고 10.61 ± 0.11 , 최저 9.28 ± 0.04 을 보였으며, 2차 배양에 평균 pH 9.80 ± 0.91 , 최고 10.81 ± 0.06 , 최저 8.28 ± 0.10 을 기록함. 배양이 진행됨에 따라 pH 수준이 증가함

○ *Dunaliella salina* 생체량 변화 분석(200 L 규모)

- 미세조류 생체량 변화는 미세조류 배양액 20 mL의 바이오매스를 측정함으로써 분석함. 방법으로는 미세조류 배양액 20 mL를 취수 및 여과(GF/C 여과지 이용)하여 24시간동안 50°C에서 건조 후, 무게를 측정함. 생체량 분석은 배양 9일 동안 3일 간격으로 진행함
- *Dunaliella salina* 1차 배양의 초기생체량은 0.22 ± 0.03 g/L로 4기의 200 L 규모의 광생물 반응기 (ROSE max)에 동일하게 접종되었음. 1차 배양기간 동안 HSMS (65 psu), NS (33 psu), MS (33 psu), MS+NaCl (65 psu), 조건에서 각각 최대 바이오매스 생산량 0.68 ± 0.01 , 0.53 ± 0.01 , 0.47 ± 0.01 , 0.58 ± 0.007 g/L 을 기록하였으며(배양 종료 시점), 평균 생체량은 0.51 ± 0.13 , 0.48 ± 0.06 , 0.49 ± 0.08 , 0.49 ± 0.09 g/L (배양 9일 간)을 기록함(그림 3-1-2)
- 2차 배양 초기생체량은 0.24 ± 0.02 g/L로 4기의 200 L 규모의 광생물 반응기(ROSE max)에 동일하게 접종되었음. 2차 배양기간 동안 HSMS (65 psu), NS (33 psu), MS (33 psu), MS+NaCl (65 psu)조건에서 각각 최대 바이오매스 생산량 0.42 ± 0.01 , 0.44 ± 0.07 , 0.58 ± 0.05 , 0.50 ± 0.03 g/L을 기록하였으며, 평균 생체량은 0.35 ± 0.09 , 0.39 ± 0.05 , 0.43 ± 0.06 , 0.44 ± 0.06 g/L (배양 9일 간)을 기록함(그림 3-1-3)
- 1차 배양에서 바이오매스 생산량은 HSMS 조건에서 유의하게 높았으며, 2차 배양에서는 유의한 바이오매스 생산량 차이를 보이지 않음(그림 3-1-2, 3-1-3)



<그림 3-1-2. *Dunaliella salina* 생체량 변화(왼쪽; 1차 배양, 오른쪽; 2차 배양)>

○ *Dunaliella salina* 최종 바이오매스 수확량(200 L 규모)

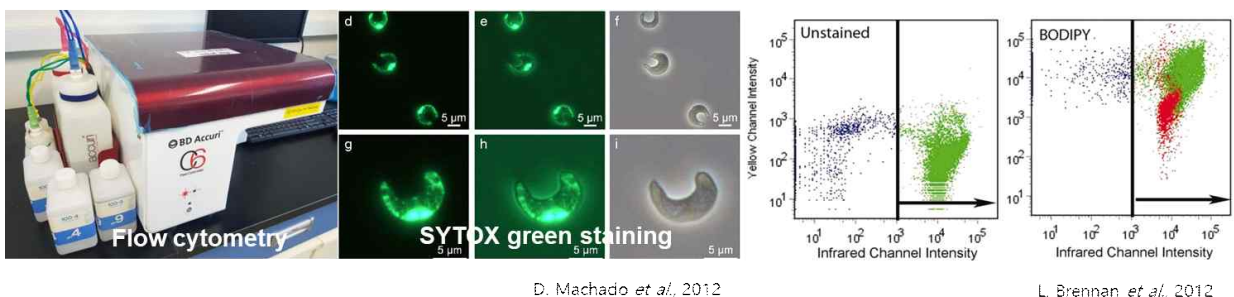
- *Dunaliella salina* 바이오매스 확보를 위해 필터가재(Pore size: 10 μm)를 이용하여 여과 및 수확 하였음. 수확물은 -50°C 에서 48시간 냉동 보관 하였으며, 이후 동결건조 진행. 건조 시료는 막 자사발을 이용하여 파쇄 하였으며, 건조된 파우더 시료는 차광된 4°C 에서 보관
- 최종 바이오매스 수확량은 HSMS (65 psu), NS (33 psu), MS (33 psu), MS+NaCl (65 psu)에서 1, 2차 각각, 34.37, 19.22, 23.74, 20.79 g 및 33.85, 21.0, 27.66, 30.47 g을 보임 (표 3-1-2).
- 2차 배양에서 유의한 바이오매스 생산량 차이를 보이지 않았지만 최종 바이오매스 수확량 차이를 보인 것은 고염의 조건(HSMS, MS+NaCl) 배양액을 구성하는 해수의 무기물 함량차이로 사료됨

<표 3-1-2. *Dunaliella salina* 바이오매스 수확량>

No.	Sample name	Dry weight(g)
1차 배양	HSMS	34.37
	NS	19.22
	MS	23.74
	MS+NaCl	20.79
2차 배양	HSMS	33.85
	NS	21.0
	MS	27.66
	MS+NaCl	30.47

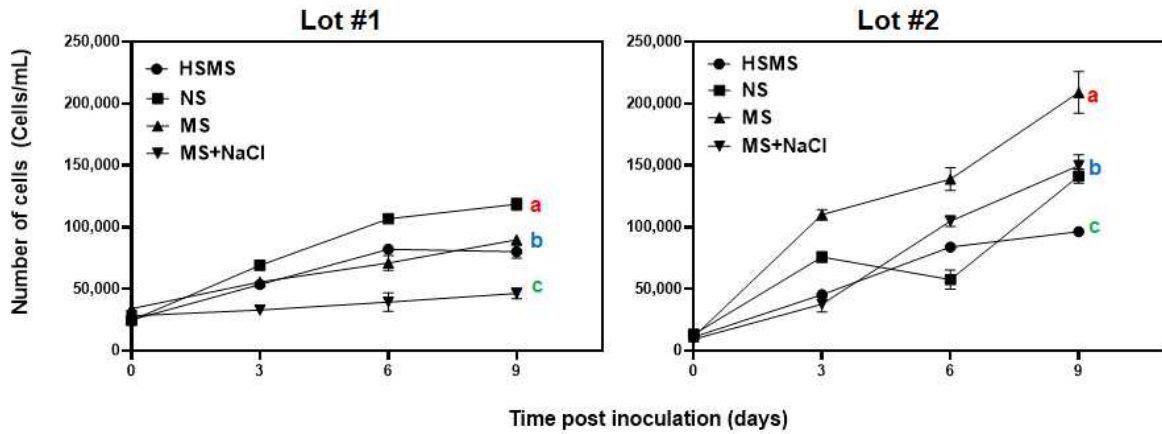
○ 유세포 분석

- 유세포 분석기 (Flow cytometry analyzer, BD Accuri™ C6 Plus)를 이용하여 미세조류의 Fluorescent (FL1, FL2, FL3), Forward Scatter (FSC) 및 Side Scatter (SSC) 분석을 통하여 세포 수(Number of cells), 세포 생존율(Cell viability), 지질 생산량(Lipid accumulation), 카로티노이드 생산성(Carotenoids productivity) 변화를 확인함(그림 3-1-3)
- Chlorophyll-*a*의 auto-fluorescence을 이용하여 미세조류 세포 분별이 가능하며(Olson *et al.*, 1989), 배양 기간동안 488 nm의 FL3-H 레이저를 통해 세포 수 증가 확인



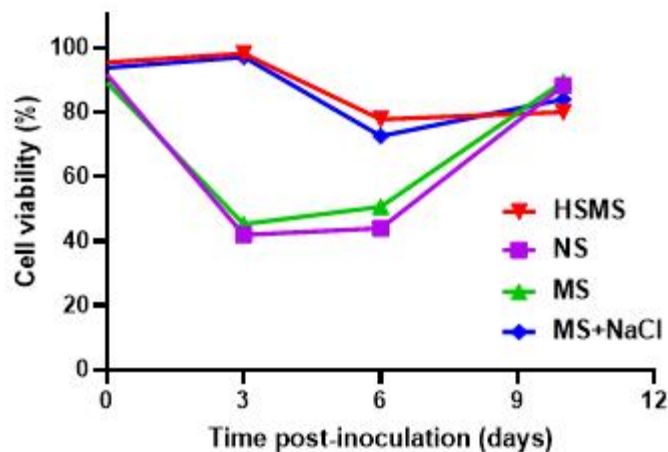
<그림 3-1-3. 유세포 분석(Flow cytometric analysis)>

- *Dunaliella salina* 세포 수 변화(200 L 규모) : 1차, 2차 배양결과, 33 psu (NS, MS)조건에서 각각 유의한 세포 수 증가를 보였으며, 65 psu (MS+NaCl, HSMS) 조건에서는 상대적으로 더딘 세포 성장을 보임(그림 3-1-4)
- 고염의 조건에서 *Dunaliella* sp.의 세포 수가 더디게 증가하는 연구 결과가 보고된 바 있으며(A. Rad *et al.*, 2011), 추가적인 세포 분석을 통한 염분 스트레스에 의한 세포 성장 양상 및 성분 변화 파악이 필요함



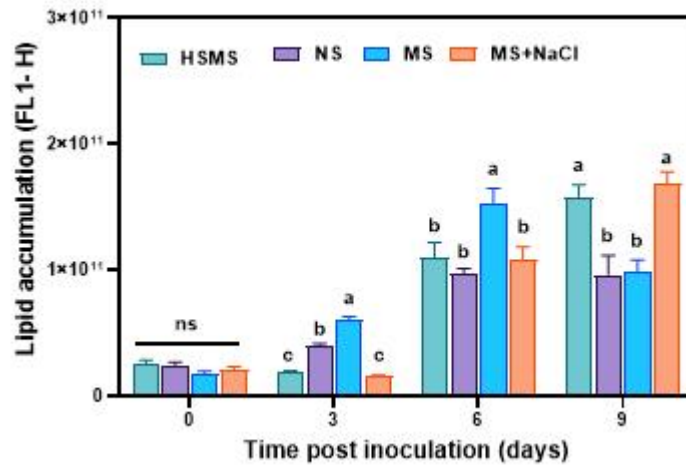
<그림 3-1-4. *Dunaliella salina* 세포 수 변화(200 L)>

- *Dunaliella salina* 세포 생존율 변화(200 L 규모) : 배양 초기, HSMS (65 psu), NS (33 psu), MS (33 psu), MS+NaCl (65 psu)조건에서 $92.8 \pm 4\%$ 수준의 세포 생존율을 보임. 배양 3-6일차 까지 65 psu 조건(HSMS, MS+NaCl)에서 33 psu 조건(NS, MS)에 비해 유의하게 높은 세포 생존율을 보임(그림 3-1-5)
- 세포생존율은 연구 도중 도입된 분석 방법으로써 추가적인 분석이 필요함



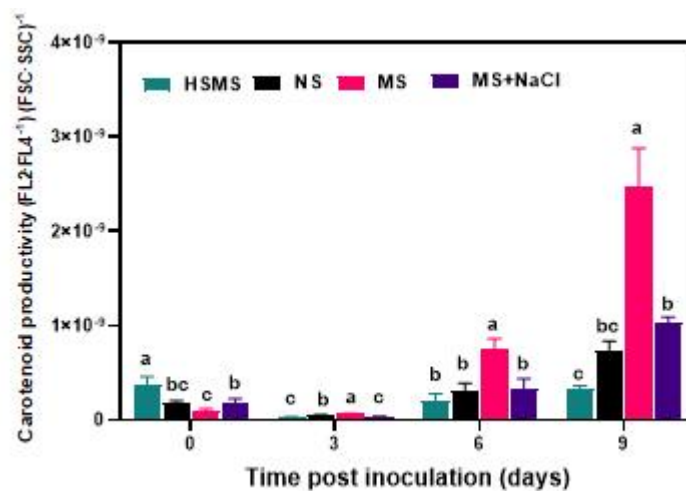
<그림 3-1-5. *Dunaliella salina* 세포 생존율 변화(2차 배양)>

- *Dunaliella salina* 지질 생산량 변화(200 L 규모) : 배양기간 동안 HSMS (65 psu), NS (33 psu), MS (33 psu), MS+NaCl (65 psu)조건에서 지질 생산량이 증가함. 수확이 진행된 배양 9일 차에는 65 psu 조건에서 33 psu 조건의 실험군에 비해 유의하게 높은 지질 생산량을 보임(그림 3-1-6). MS 조건에서는 배양 6일차 까지 지질 생산량이 증가하였으나 배양 종료시점에 감소하는 양상을 보임
- 염분 스트레스로 인한 *Dunaliella* sp. 세포 내 지질함량의 증가가 보고된 바 있음(Takagi *et al.*, 2006)



<그림 3-1-6. *Dunaliella salina* 지질 생산량 변화(2차 배양)>

- *Dunaliella salina* 카로티노이드 생산성 변화(200 L 규모) : 33 psu 조건(NS, MS)에서 배양기간 동안 지속적으로 카로티노이드 생산성이 증가함. 배양 9일차에는 MS (33 psu)조건에서 카로티노이드 함량이 유의하게 가장 증가하였으며, HSMS (65 psu)조건에서 카로티노이드 생산성이 유의하게 낮은 수준을 보임(그림 3-1-7)



<그림 3-1-7. *Dunaliella salina* 카로티노이드 생산성 변화(2차 배양)>

○ *Dunaliella salina* 배양 연구(고염 생물 10톤급 배양조건 확립)

- *Dunaliella salina* 배양연구를 10 ton 규모의 수로형 시스템(Open Raceway Pond, ORP)에서 15 일 동안 진행함(그림 3-1-8)
- 적정 배양 수온은 28°C로 설정, 수분 증발에 의한 염분 증가는 담수를 공급함으로써 조절되어 배양기간 동안 배양 환경을 일정하게 유지함
- 미세조류 배양은 65 psu조건인 고염분수(HSMS)를 기반으로 하여 진행됨
- 고염분수(HSMS)에 f*1.5 배지(표 3-1-1)를 영양원으로 하는 10 ton의 배양액과 200 L의 미세조류 seed가 수로형 시스템에 공급됨



<그림 3-1-8. *Dunaliella salina* 10톤 규모 배양 연구>

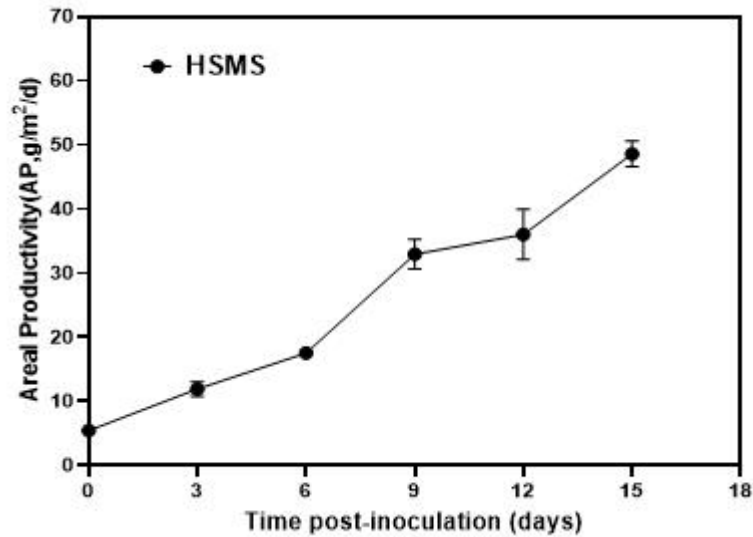
○ *Dunaliella salina* 배양환경 분석(10 ton 규모)

- 배양환경은 배양이 진행되는 15일 동안 YSI 556-01 (Nist, USA)을 이용하여 수온, 염분 및 pH를 측정함으로써 분석함(1일 1회)
- 배양환경 분석 결과, 수온은 평균 $29.3 \pm 2.9^\circ\text{C}$, 최고 $31.93 \pm 0.60^\circ\text{C}$, 최저 $24.28 \pm 1.21^\circ\text{C}$ 을 보였으며, 설정 온도(28°C)를 유지하였으나 일일 조사량 및 기온 차에 의해 최대 $7.53 \pm 1.14^\circ\text{C}$ 의 수온 변화를 보임.
- 염분은 평균 68.49 ± 5.6 psu, 최고 78.81 ± 0.04 psu, 최저 63.87 ± 0.12 psu를 보였으며, 배양이 진행됨에 따라 염분이 증가함
- pH 수준은 평균 9.37 ± 0.72 , 최고 10.17 ± 0.02 , 최저 8.28 ± 0.32 을 보임

○ *Dunaliella salina* 생체량 변화(10 ton 규모)

- 미세조류 생체량 변화는 미세조류 배양액 20 mL의 바이오매스를 측정함으로써 분석함. 방법으로는 미세조류 배양액 20 mL를 취수 및 여과(GF/C 여과지 이용)하여 24시간동안 50°C 에서 건조 후, 무게를 측정하였으며, 배양 15일 동안 3일 간격으로 진행함

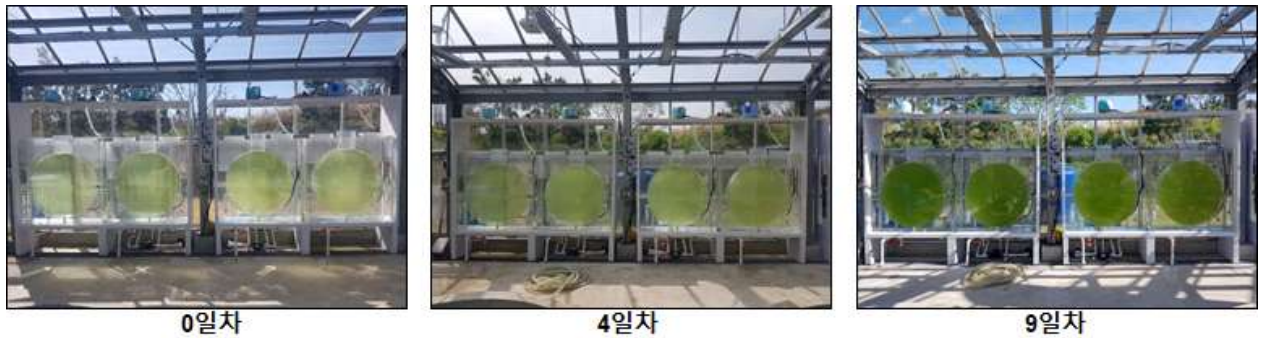
- *Dunaliella salina*의 초기생체량은 0.12 ± 0.02 g/L로 수로형 시스템(Open Raceway Pond, ORP)에 접종되었음.
- 단위면적당 생산성(Areal productivity)은 *Dunaliella salina*의 생물량을 면적으로 환산하여 계산하였으며, *Dunaliella salina*의 단위면적당 생산성(Areal productivity)은 배양 종료시점(15일 차)에 48.0 ± 1.2 g/m²/d을 기록하여 연구 목표 달성함(그림 3-1-9)



<그림 3-1-9. *Dunaliella salina* 단위면적당 생산성>

- *Dunaliella salina* 최종 바이오매스 수확량 측정(10 ton 규모)
 - *Dunaliella salina* 바이오매스 확보를 위해 초대형 원심분리기(CROWN MACHINERY, USA)를 이용하여 수확함. 수확물은 -50℃에서 48시간 냉동 보관 하였으며, 이후 동결건조기(OPERON, KOREA)를 사용하여 동결건조를 진행함. 건조 시료는 막자사발을 이용하여 파쇄 하였으며, 건조된 파우더 시료는 차광된 4℃에서 냉장보관함
 - 최종 바이오매스 수확량 : 610 g (DCW/10 ton)
- 농축 고염분수를 활용한 *Tetraselmis* sp. 배양 연구
 - 본 배양 연구에 사용된 *Tetraselmis* sp. KCTC 12432BP 종은 남해 해양시료도서관에서 분양받음
 - 총 4기의 200 L 규모 광생물 반응기(ROSE max)에서 9일 동안 배양 연구를 진행함(그림 3-1-10)
 - 적정 배양 수온은 25℃로 설정, 수분 증발에 의한 염분 증가는 담수를 공급함으로써 조절되어 배양기간 동안 배양 환경을 일정하게 유지함

- 미세조류 배양은 33 psu조건인 일반해수(NS) 및 용암해수(MS), 65 psu조건인 용암해수+NaCl (MS+NaCl) 및 고염분수(HSMS)를 기반으로 하여 진행됨
- 위 네 가지 조건에 f*1.5 배지(표 3-1-1)를 영양원으로 하는 200 L의 배양액과 5 L의 미세조류 seed가 광 생물 반응기에 각각 공급됨



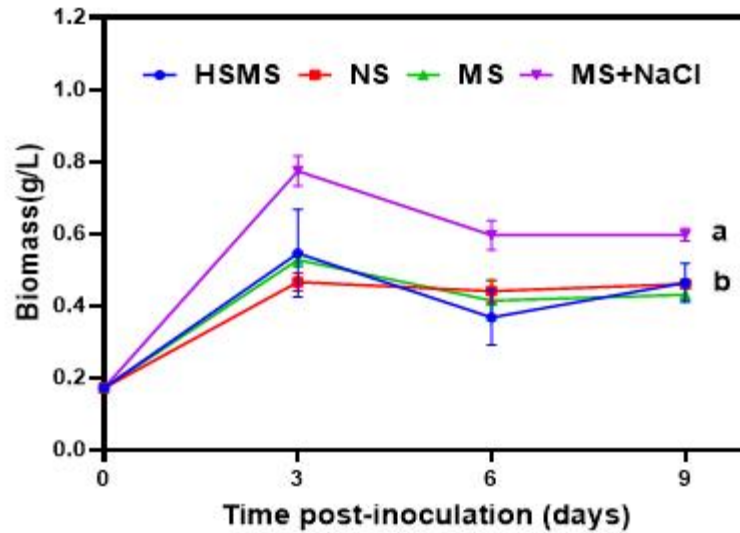
〈그림 3-1-10. *Tetraselmis* sp. 배양 연구(200 L 규모)〉

○ *Tetraselmis* sp. 배양환경 분석(200 L 규모)

- 배양환경 분석 결과, *Tetraselmis* sp. 수조의 수온은 평균 $27.35 \pm 2.5^\circ\text{C}$, 최고 $29.91 \pm 0.12^\circ\text{C}$, 최저 $21.96 \pm 0.15^\circ\text{C}$ 을 보였으며, 설정 온도(25°C)를 유지하였으나 일일 조사량 및 기온 차에 의해 최대 $7.95 \pm 0.27^\circ\text{C}$ 의 수온 변화를 보임
- 염분은 고염의 조건(HSMS, MS+NaCl)에서 평균 66.60 ± 4.21 psu, 최고 70.89 ± 0.14 psu, 최저 62.48 ± 0.23 psu을 보였으며, 33 psu 조건(NS, MS)에서는 평균 34.00 ± 0.70 psu, 최고 34.64 ± 0.22 psu, 최저 33.14 ± 0.13 psu을 기록함
 - pH 수준은 평균 9.66 ± 0.14 , 최고 9.93 ± 0.02 , 최저 9.50 ± 0.01 을 보였으며, 배양이 진행됨에 따라 pH 수준이 증가함

○ *Tetraselmis* sp. 생체량 변화 분석(200 L 규모)

- 미세조류 생체량 변화는 미세조류 배양액 20 mL의 바이오매스를 측정함으로써 분석함. 방법으로는 미세조류 배양액 20 mL를 취수 및 여과(GF/C 여과지 이용)하여 24시간동안 50°C 에서 건조 후, 무게를 측정함. 생체량 분석은 배양 9일 동안 3일 간격으로 진행함
- *Tetraselmis* sp.의 초기생체량은 0.22 ± 0.03 g/L로 4기의 200 L 규모의 광생물 반응기 (ROSE max)에 동일하게 접종되었음. HSMS (65 psu), NS (33 psu), MS (33 psu), MS+NaCl (65 psu)조건에서 각각 최대 바이오매스 생산량 0.54 ± 0.05 , 0.46 ± 0.04 , 0.52 ± 0.08 , 0.67 ± 0.019 g/L을 기록하였으며(배양 종료 시점), 평균 생체량은 0.53 ± 0.10 , 0.43 ± 0.04 , 0.44 ± 0.05 , 0.55 ± 0.13 g/L (배양 9일 간)을 기록함(그림 3-1-11)



<그림 3-1-11. *Tetraselmis* sp. 생체량 변화>

○ *Tetraselmis* sp. 최종 바이오매스 수확량(200 L 규모)

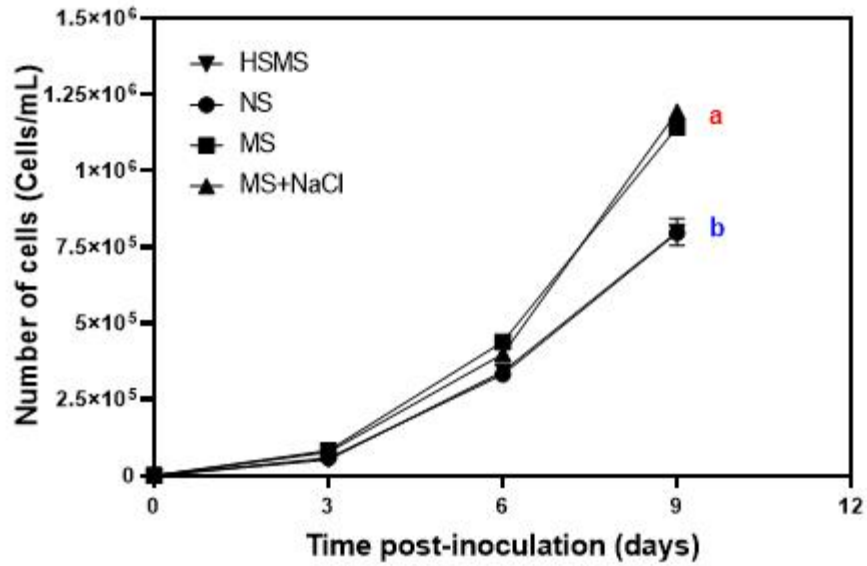
- *Tetraselmis* sp. 바이오매스 확보를 위해 필터가제(pore size: 10 μm)를 이용하여 여과 및 수확하였음. 수확물은 -50°C 에서 48시간 냉동 보관 하였으며, 이후 동결건조 진행. 건조 시료는 막자사발을 이용하여 파쇄 하였으며, 건조된 파우더 시료는 차광된 4°C 에서 보관
- HSMS (65 psu), NS (33 psu), MS (33 psu), MS+NaCl (65 psu), 조건에서 각각 13.0, 13.7, 14.4, 14.6 g (DCW/200 L)의 시료를 확보함(표 3-1-3)

표 3-1-3. *Tetraselmis* sp. 최종 바이오매스 수확량

Species	Sample name	Dry weight(g)
<i>Tetraselmis</i> sp.	HSMS	13.0
	NS	13.7
	MS	14.4
	MS+NaCl	14.6

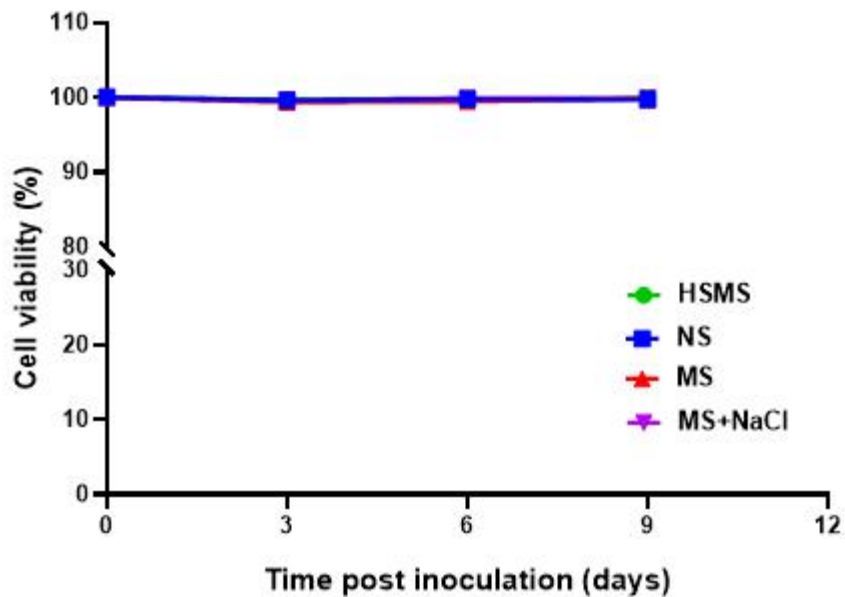
○ 유세포 분석

- *Tetraselmis* sp. 세포 수 변화(200 L 규모) : 배양 9일차에 용암해수 기반의 MS (33 psu), MS+NaCl (65 psu) 조건에서 유의한 세포 수 차이를 보임(그림 3-1-12)



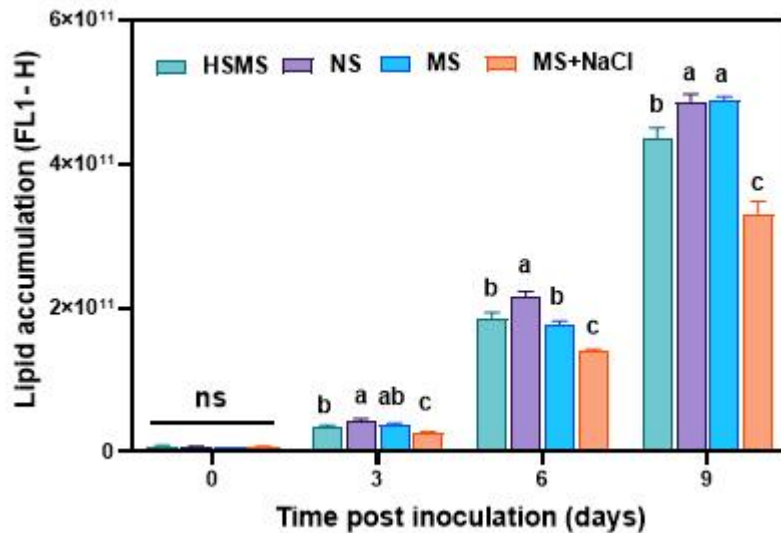
<그림 3-1-12. *Tetraselmis* sp. 세포 수 변화>

- *Tetraselmis* sp. 세포 생존율 변화(200 L 규모) : 배양 기간 동안 HSMS (65 psu), NS (33 psu), MS (33 psu), MS+NaCl (65 psu)조건에서 99.2%이상의 세포 생존율을 보임(그림 3-1-13)
- 세포생존율은 연구 도중 도입된 분석 방법으로써 추가적인 분석이 필요함



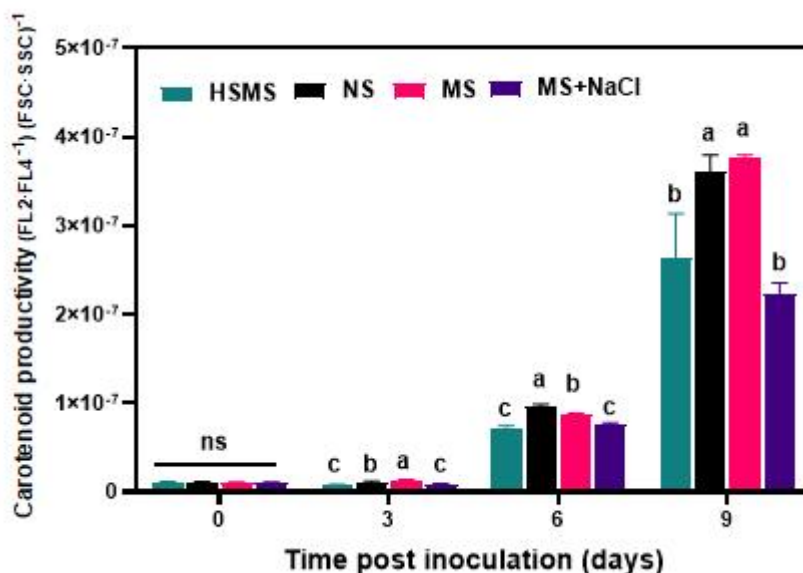
<그림 3-1-13. *Tetraselmis* sp. 세포 생존율 변화 (%)>

- *Tetraselmis* sp. 지질 생산량 변화(200 L 규모) : HSMS (65 psu), NS (33 psu), MS (33 psu), MS+NaCl (65 psu)조건에서 배양기간 동안 지질 생산량이 증가하였으며, 배양 종료시점에는 33 psu (MS, NS)조건에서 65 psu (HSMS, MS+NaCl) 조건에서 보다 유의하게 높은 지질 생산량을 보임(그림 3-1-14)



<그림 3-1-14. *Tetraselmis* sp. 지질 생산량 변화>

- *Tetraselmis* sp. 카로티노이드 생산성 변화(200 L 규모) : 배양 3-10일 동안 33 psu (NS, MS)조건에서 카로티노이드 생산성이 유의하게 증가함. 배양 기간 동안 66 psu (HSMS, MS+NaCl)조건에서 카로티노이드 색소 생산성이 증가하였으나, 33 psu (NS, MS)조건에 비해 유의하게 낮은 수준을 보임(그림 3-1-15)



<그림 3-1-15. *Tetraselmis* sp. 카로티노이드 생산성 변화>

○ *Tetraselmis* sp. 연구(고염 생물 10톤급 배양조건 확립)

- *Tetraselmis* sp. 배양연구를 10 ton 규모의 수로형 시스템(Open Raceway Pond, ORP)에서 18일 동안 진행함(그림 3-1-16)
- 적정 배양 수온은 28°C로 설정, 수분 증발에 의한 염분 증가는 담수를 공급함으로써 조절되어 배양기간 동안 배양 환경을 일정하게 유지함
- 미세조류 배양은 65 psu조건인 고염분수(HSMS)를 기반으로 하여 진행됨
- 고염분수(HSMS)에 f*1.5 배지를 영양원으로 하는 10 ton의 배양액과 200 L의 미세조류 seed가 수로형 시스템에 공급됨



<그림 3-1-16. *Tetraselmis* sp. 10톤 규모 배양 연구>

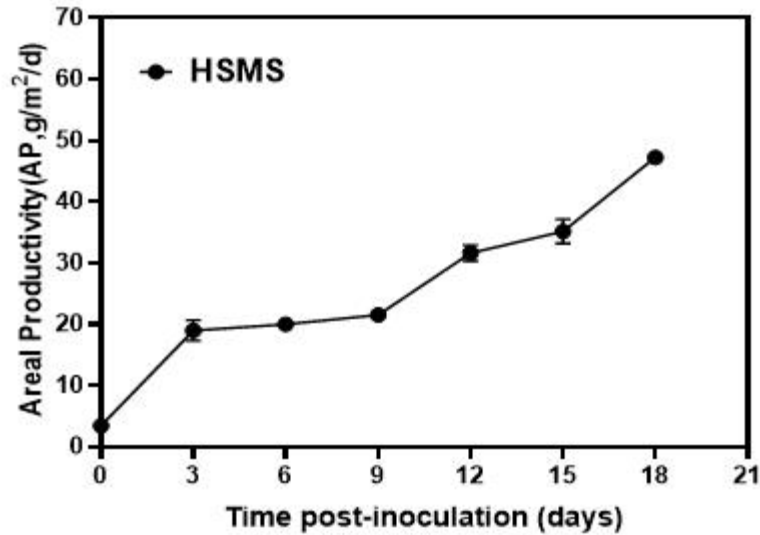
○ *Tetraselmis* sp. 배양환경 분석(10 ton 규모)

- 배양환경 분석 결과, 수온은 평균 $27.12 \pm 2.37^\circ\text{C}$, 최고 $32.98 \pm 0.54^\circ\text{C}$, 최저 $24.38 \pm 0.61^\circ\text{C}$ 을 보였으며, 설정 온도(28°C)를 유지하였으나 일일 조사량 및 온도차에 의해 최대 $8.68 \pm 0.58^\circ\text{C}$ 의 수온 변화를 보임.
- 염분은 평균 67.94 ± 1.43 psu, 최고 70.11 ± 0.84 psu, 최저 65.34 ± 0.42 psu를 보였으며, 배양이 진행됨에 따라 염분이 증가함
- pH 수준은 평균 9.92 ± 0.15 , 최고 10.08 ± 0.03 , 최저 9.64 ± 0.12 을 보임

○ *Tetraselmis* sp. 생체량 변화(10 ton 규모)

- 미세조류 생체량 변화는 미세조류 배양액 20 mL의 바이오매스를 측정함으로써 분석함. 방법으로는 미세조류 배양액 20 mL를 취수 및 여과(GF/C 여과지 이용)하여 24시간동안 50°C에서 건조 후, 무게를 측정하였으며, 배양 15일 동안 3일 간격으로 진행함
- *Tetraselmis* sp.의 초기생체량은 0.05 ± 0.01 g/L로 수로형 시스템(Open Raceway Pond, ORP)에 접종되었음.

- 단위면적당 생산성(Areal productivity)은 *Tetraselmis* sp.의 생물량을 면적으로 환산하여 계산하였으며, 단위면적당 생산성(Areal productivity)을 배양 18일 차에 $47.2 \pm 0.9 \text{ g/m}^2/\text{d}$ 을 기록하여 목표 달성함(그림 3-1-17)



<그림 3-1-17. *Tetraselmis* sp. 단위면적당 생산성>

○ *Tetraselmis* sp. 최종 바이오매스 수확량(10 ton 규모)

- *Tetraselmis* sp. 바이오매스 확보를 위해 초대형 원심분리기(CROWN MACHINERY, USA)를 이용하여 수확하였음. 수확물은 -50°C 에서 48시간 냉동 보관 하였으며, 이후 동결건조기(OPERON, KOREA)를 사용하여 동결건조를 진행함. 건조 시료는 막자사발을 이용하여 파쇄 하였으며, 건조된 파우더 시료는 차광된 4°C 에서 냉장보관함.
- 최종 바이오매스 수확량 : 284.4 g (DCW/10 ton)

나 미세조류-미생물 하이브리드 배양 연구

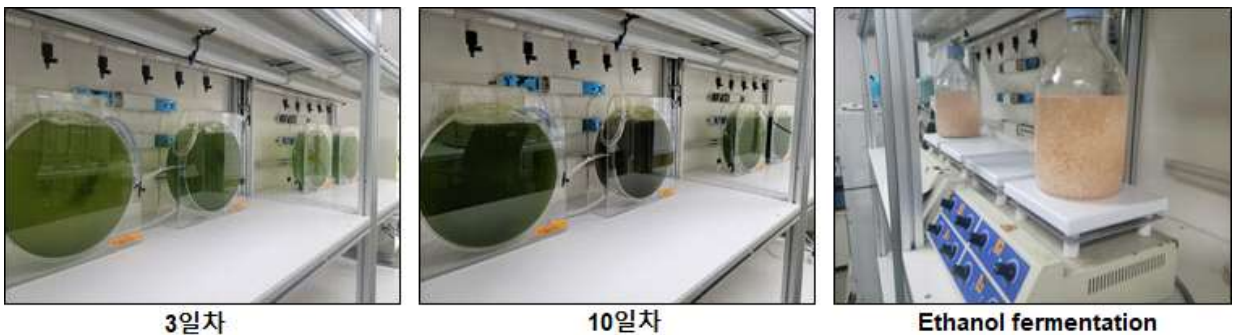
○ 미세조류-미생물 하이브리드 배양 목적

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

○ 미세조류-미생물 하이브리드 배양

- 1차년도 배양시스템의 단점을 보완하여 5L 규모의 하이브리드 배양수조 4기 제작

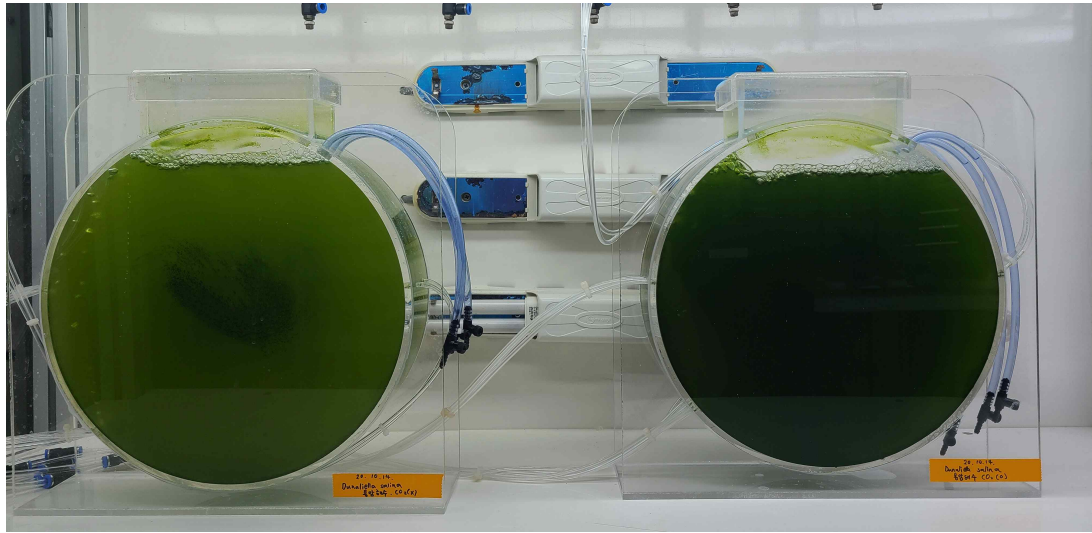
- 미세조류는 광범위 염분에서 성장할 수 있는 *Dunaliella salina*를 사용하였으며 이산화탄소 생산을 위한 에탄올 발효 미생물로 *Saccharomyces cerevisiae*를 사용
- *Saccharomyces cerevisiae* 담체제작: 이산화탄소 발생을 위한 에탄올 발효에 용이한 fed-batch 발효를 위하여 *Saccharomyces cerevisiae*를 대상으로 하여 calcium alginate 고정화 담체를 제작하였음. 5 mL의 *S. cerevisiae*를 2L의 potato dextrose broth (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 chloride용액에 떨어뜨려서 calcium alginate bead를 제작하였다. 제작된 calcium alginate bead는 4°C의 0.05 M calcium chloride 용액에서 24시간 동안 안정화를 거치고 이를 실험에 사용.
- 적정 배양 수온은 28 °C로 설정, 수분 증발에 의한 염분 증가는 담수를 공급함으로써 조절되어 배양기간 동안 배양 환경을 일정하게 유지함
- 미세조류 배양은 33 psu조건인 용암해수 (MS), 65 psu조건인 고염분수 (HSMS)를 기반으로 하여 진행됨
- 위 두 가지 조건에 미생물(효모)에 의해 생성된 CO₂ 주입 여부를 달리 하여 진행됨
- 총 네 가지 조건의 실험군에 f*1.5 배지를 영양원으로 하는 5 L의 배양액과 10 mL의 미세조류 seed가 광 생물 반응기에 각각 공급됨



<그림 3-2-1. 미세조류-미생물 하이브리드 배양 연구(5L 규모)>

○ *Dunaliella salina* 생체량 변화

- 미세조류 생체량 변화는 미세조류 배양액 20 mL의 바이오매스를 측정함으로써 분석함. 방법으로는 미세조류 배양액 20 mL를 취수 및 여과(GF/C 여과지 이용)하여 24시간동안 50°C에서 건조 후, 무게를 측정하였으며, 배양 12일 동안 2일 간격으로 진행함

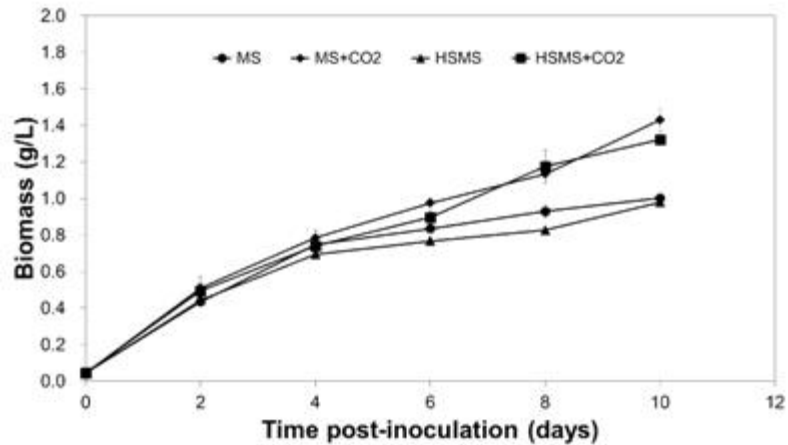


<그림 3-2-2. 배양 7일차 배양, 좌: 용암해수-f1.5배지, 우: 용암해수-f1.5-효모발효에 의한 CO2공급>



<그림 3-2-3. 배양 7일차 배양, 좌: 고염분수-f1.5배지, 우: 고염분수-f1.5-효모발효에 의한 CO2공급>

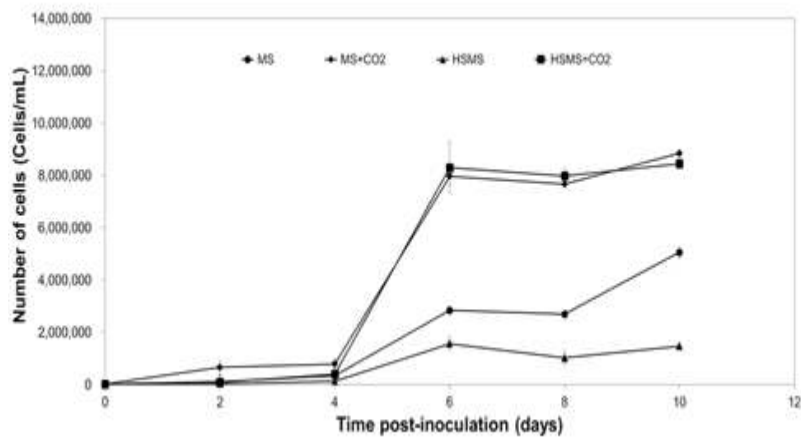
- 배양 후 12째에 동안 용암해수 (33 psu), 용암해수(33 psu) - 하이브리드(CO₂공급) 조건에서 바이오매스 생산량 1.0 ± 0.01 , 1.43 ± 0.06 을 나타내어 으며, 평균 생체량은 0.66 ± 0.3 , 0.81 ± 0.4 을 나타내었음 (그림 3-2-4).
- 고염분수(65 psu), 고염분수(65 psu)-하이브리드(CO₂공급) 조건에는 각각 최대 0.98 ± 0.01 , 1.32 ± 0.01 g/L의 바이오매스 생산량을 기록하였으며, 평균 생체량은 0.62 ± 0.3 , 0.77 ± 0.4 g/L을 기록함(그림 3-2-4)



<그림 3-2-4. *Dunaliella salina* 바이오매스 생산성 변화>

○ *Dunaliella salina* 세포 수 변화

- *Dunaliella salina*의 세포 수 변화는 배양 0일부터 12일까지 2일 간격으로 유세포 분석기(Flow cytometry analyzer, BD Accuri™ C6 Plus)를 이용하여 분석함
- 배양 기간 동안 용암해수와, 용암해수-하이브리드 조건 과 고염분수, 고염분수-하이브리드 조건에서 모두 지속적으로 세포수가 증가함 (그림 3-2-5)
- 배양 6일차 부터 CO₂를 공급한 실험군 용암해수-하이브리드, 고염분수-하이브리드 조건에서 높은 세포수 차이를 보임 (그림 3-2-5)

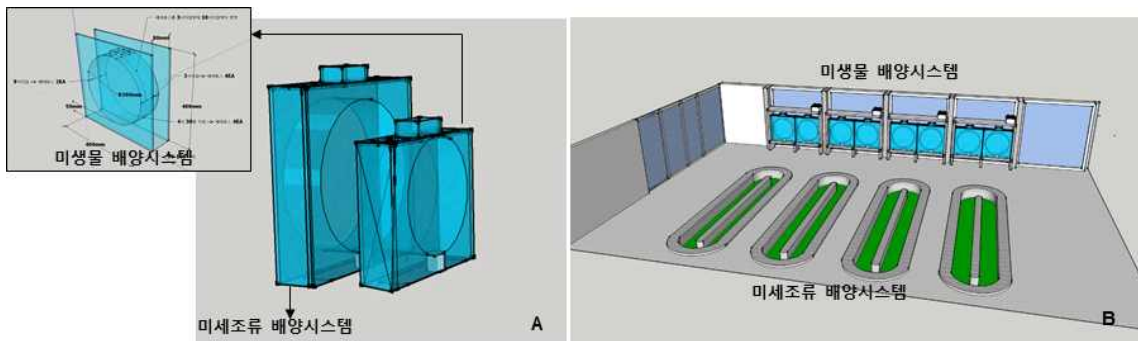


<그림 3-2-5. *Dunaliella salina* 세포수 변화>

- 용암해수와 고염분수에서 배양한 대조구에 비하여 하이브리드 시스템을 적용한 용암해수-하이브리드, 고염분수-하이브리드 시스템에서 세포 수는 약 2배 차이나는 결과를 확인하였음

- 하이브리드 시스템 적용으로 인하여 *Dunaliella salina*의 성장률이 높아지는 결과를 얻었으며, 바이오매스의 증가뿐만 아니라 유세포 분석을 통하여 하이브리드시스템 적용 시 *Dunaliella salina*의 세포 생존률 또한 두배 이상 증가시키는 결과를 확인하였음

○ 고염 활용 미세조류-미생물 하이브리드 대량 배양시스템 설계



<그림 3-2-6. 미세조류-미생물 하이브리드 대량 배양시스템 설계(A; 200L, B; 10ton)>

- Lab-scale 연구결과 기반 미세조류-미생물 하이브리드 배양시스템 설계안 도출
- 200 L 규모 하이브리드 배양시스템(A), 10톤 규모 하이브리드 대량 배양시스템(B)설계
- 설계도 기반 미세조류-미생물 하이브리드 대량 배양시스템 구축 예정(2021년)

4. 고염배양 해양생물 추출물 및 가공물 제조/효능평가

가. 고염배양 미세조류 추출물 제작 및 효능평가

○ 배양조건에 따른 *Dunaliella salina*의 일반성분, 유용성분 및 영양성분 분석

- *D. salina*의 탄수화물, 단백질, 지질, 회분, 수분 함량을 비교하였음.
- *D. salina*의 Chlorophyll a, b, Protochlorophyllide, Total carotenoid 함량을 비교하였음.
- *D. salina*의 아미노산과 지방산 함량을 비교하였음.

<표 4-1-1. *Dunaliella salina*의 일반성분 함량>

	Carbohydrate	Protein	Lipid	Ash	Moisture
NS	20.88±1.06	19.49±0.67	15.28±0.16	39.61±0.14	4.74±0.50
MS	26.44±0.11	16.2±0.59	10.08±1.35	43.09±0.27	4.19±0.22
MS+NaCl	22.41±0.26	14.68±0.54	8.99±0.26	51.02±0.19	2.9±0.55
HSMS	21.47±0.67	12.48±1.31	12.58±0.64	48.80±0.06	4.67±0.43

- 배양조건에 상관없이 일반성분 분석 결과 회분 및 탄수화물함량이 높음을 확인하였음.
- NS의 탄수화물, 단백질, 지질, 회분, 수분함량은 각각 20.9%, 19.55, 15.3%, 39.6%, 4.7%을 차지하고 있었으며, MS는 26.45, 16.2%, 10.08%, 43.1%, 4.2%, MS+NaCl은 22.4%, 14.7%, 9.0%, 51.0%, 2.9%를, HSMS는 21.5%, 12.5%, 48.8%, 4.7%의 함량을 나타내는 것을 확인할 수 있었음.

<표 4-1-2. *Dunaliella salina*의 유용성분 함량>

Contents (mg/100g)	NS	MS	MS+NaCl	HSMS
Chlorophyll a	371.81 ± 22.85	344.44 ± 1.51	386.29 ± 2.79	363.00 ± 10.74
Chlorophyll b	297.85 ± 20.40	247.52 ± 0.30	313.09 ± 0.12	288.18 ± 8.09
Protochlorophyllide	37.34 ± 2.95	20.51 ± 1.22	24.78 ± 2.35	20.12 ± 1.50
Total carotenoid	169.05 ± 8.99	164.81 ± 1.67	172.87 ± 1.88	173.63 ± 4.25

- *D. salina*는 Chlorophyll 함량이 높게 나타났으며, 고염일수록 (MS+NaCl, HSMS) Chlorophyll 함량이 높아짐을 확인할 수 있었음.
- Total carotenoid 함량확인 결과에서도 고염일수록 함량이 증가하였으며, 특히 HSMS에서 173.6 mg/100g의 높음 함량을 나타냄을 확인할 수 있었음.

<표 4-1-3. *Dunaliella salina*의 아미노산 함량>

	(%)			
	NS	MS	MS+NaCl	HSMS
Aspartic acid	10.59	10.26	9.31	10.07
Glutamic acid	16.11	16.52	15.60	16.83
Serine	4.97	4.90	5.00	4.41
Histidine	1.76	2.06	2.13	2.01
Glycine	5.67	5.58	5.62	5.66
Threonine	5.38	5.06	5.43	4.74
Arginine	9.06	10.11	9.75	8.89
Alanine	7.74	7.81	8.05	7.40
Taurine	0.76	0.93	1.70	1.33
Tyrosine	2.64	2.82	2.92	2.77
Valine	5.95	5.72	5.74	5.73
Methionine	2.07	2.42	2.05	2.33
Phenylalanine	5.36	5.06	5.48	4.92
Isoleucine	4.32	4.22	4.19	4.09
Leucine	8.28	7.79	8.16	7.79
Lysine	4.70	4.78	4.52	5.41
Proline	4.65	3.96	4.33	5.63
Total	100	100	100	100

- 아미노산 분석결과 Glutamic acid, Aspartic acid의 함량이 약 10~16%로 높게 차지하고 있었으며, 다음으로 Arginine, Alanine, Leucine의 함량이 약 7~10%를 차지하고 있었음. 배양조건에 따라 미미한 함량 차이가 있었으나, 구성 비율은 비슷한 것으로 확인되었음.

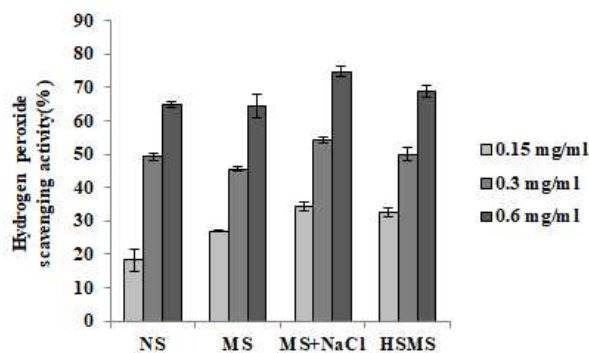
<표 4-1-4. *Dunaliella salina*의 지방산 함량>

		(mg/g)			
		NS	MS	MS+NaCl	HSMS
Palmitic acid (hexadecanoic acid)	C16 0	6.64	6.59	6.55	5.65
Oleic acid†	C 18 1n9 c	2.79	2.63	2.81	2.37
Linoleic acid	C 18 2n6 c	3.17	3.43	4.28	3.34
Gamma-linolenic acid (GLA)	C18 3n6	0.25	0.43	0.28	0.26
Alpha-linolenic acid (ALA)	C18 3n3	3.98	3.54	2.77	2.65
Eicosenoic acid†	C20 1	0.76	0.82	0.57	0.48
Eicosapentaenoic acid (EPA, Timnodonic acid)	C20 5n3	1.13	1.29	1.01	0.91
Total		18.73	18.72	18.27	15.66

- 지방산 분석결과 36종 지방산 중 *D. salina*는 총 7종의 지방산이 검출되었으며, Palmitic acid 함량이 가장 높게 나타남을 확인할 수 있었음. 다음으로 ALA, Linoleic acid, Oleic acid, EPA, Eicosenoic acid, GLA 함량 순이었으며, 배양조건에 따라 미미한 함량 차이가 있었으나, 구성 비율은 비슷한 것으로 확인되었음.

○ 배양조건에 따른 *Dunaliella salina* Carotenoid 추출물의 항산화 활성 탐색

- NS, MS, MS-NaCl, HSMS에 배양한 *D. salina* Carotenoid 추출물의 활성 산소 소거능 확인을 Hydrogen peroxide 소거능을 통해 측정하였음.



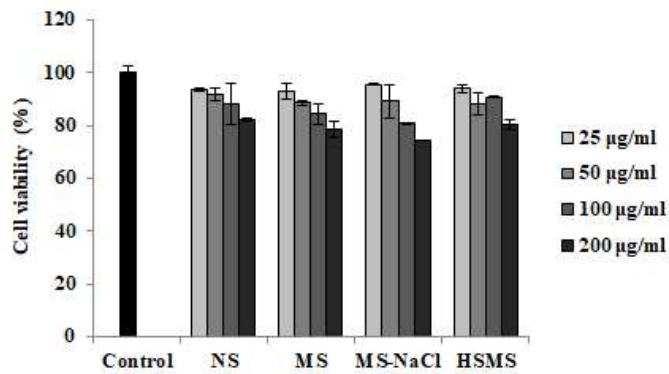
	NS	MS	MS+NaCl	HSMS
IC ₅₀ (mg/ml)	0.41 ± 0.01	0.44 ± 0.05	0.30 ± 0.01	0.34 ± 0.02

<그림 4-1-1. *Dunaliella salina* Carotenoid 추출물의 Hydrogen peroxide 소거능>

- Hydrogen peroxide 소거능 확인 결과 각각의 IC₅₀값은 NS 0.41 mg/ml, MS 0.44 mg/ml, MS+NaCl 0.30 mg/ml, HSMS 0.34 mg/ml의 값을 확인할 수 있었으며, 고염일수록 소거능이 우수함을 확인할 수 있었음.
- Hydrogen peroxide 소거능 순은 MS+NaCl > HSMS > NS > MS 순으로 나타남.

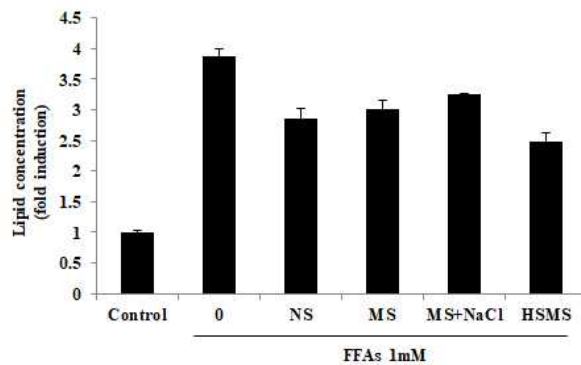
○ 배양조건에 따른 *Dunaliella salina* Carotenoid 추출물의 비알콜성 지방산 활성화 탐색

- NS, MS, MS+NaCl, HSMS에 배양한 *D. salina* Carotenoid 추출물의 HepG2세포에서의 MTT assay를 통한 세포독성 측정 및 Oil-red-O 염색을 통한 지방축적량을 측정하였음.



<그림 4-1-2. HepG2세포에서 *Dunaliella salina* Carotenoid 추출물의 세포독성>

- NS, MS, MS+NaCl, HSMS에 배양한 *D. salina* Carotenoid 추출물을 200 µg/ml까지 처리하였을 때 고농에서 80%이하의 생존율을 보여 실험에는 100 µg/ml 농도에서 실험을 진행하였음.

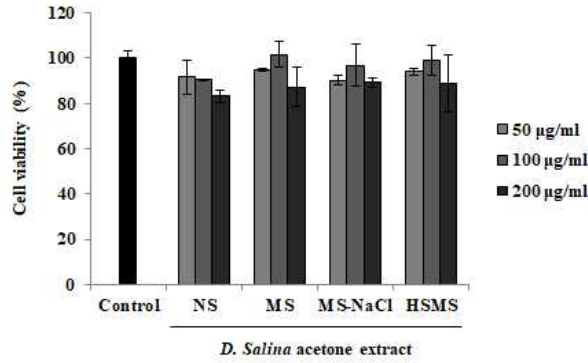


<그림 4-1-3. HepG2세포에서 *Dunaliella salina* Carotenoid 추출물의 지방축적량 >

- FFA로 유도한 지방 축적을 NS, MS, MS+NaCl, HSMS에 배양한 *D. salina* Carotenoid 추출물이 축적을 억제시켰으며, HSM > NS > MS > MS+NaCl 순으로 지방 축적을 억제시키는 것을 확인할 수 있었음.

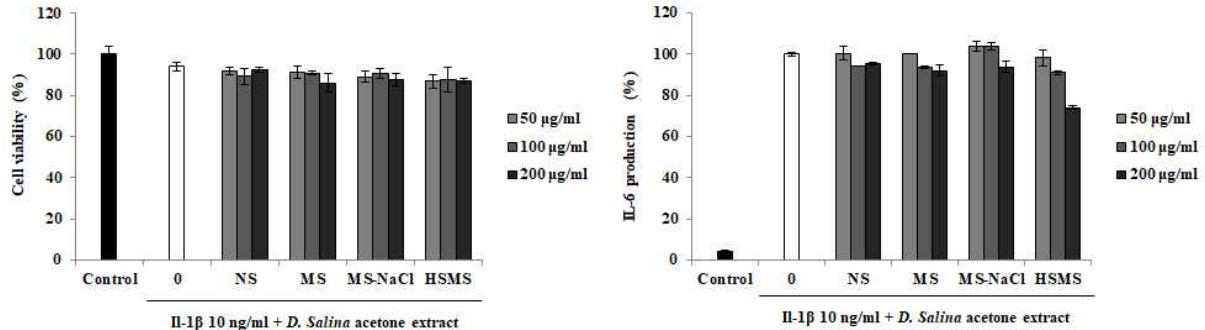
○ 배양조건에 따른 *Dunaliella salina* Carotenoid 추출물의 골관절염 활성 탐색

- NS, MS, MS-NaCl, HSMS에 배양한 *D. salina* Carotenoid 추출물의 MG-63세포에서의 MTT assay를 통한 세포독성, 세포생존율 측정 및 ELISA kit를 통한 IL-6생성량을 측정하였음.



<그림 4-1-4. MG-63세포에서 *Dunaliella salina* Carotenoid 추출물의 세포독성>

- NS, MS, MS-NaCl, HSMS에 배양한 *D. salina* Carotenoid 추출물을 200 µg/ml까지 처리하였을 때 독성이 확인되지 않아 실험에는 200 µg/ml 농도에서 실험을 진행하였음.



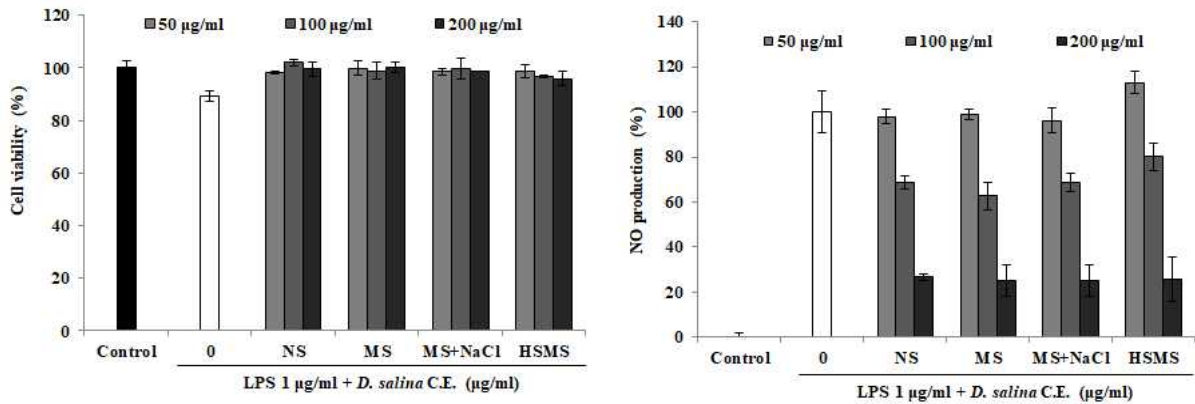
<그림 4-1-5. MG-63세포에서 *Dunaliella salina* Carotenoid 추출물의 세포생존율 및 IL-6생성량>

- IL-1β로 처리하였을 때 NS, MS, MS-NaCl, HSMS에 배양한 *D. salina* Carotenoid 추출물의 세포 생존율에 영향을 미치지 않았으며, IL-6 생성량 측정결과 HSMS 고농도에서 약 25%의 IL-6생성량을 감소시키는 것을 확인할 수 있었음.

○ 배양조건에 따른 *Dunaliella salina* Carotenoid 추출물의 항염증 활성 탐색

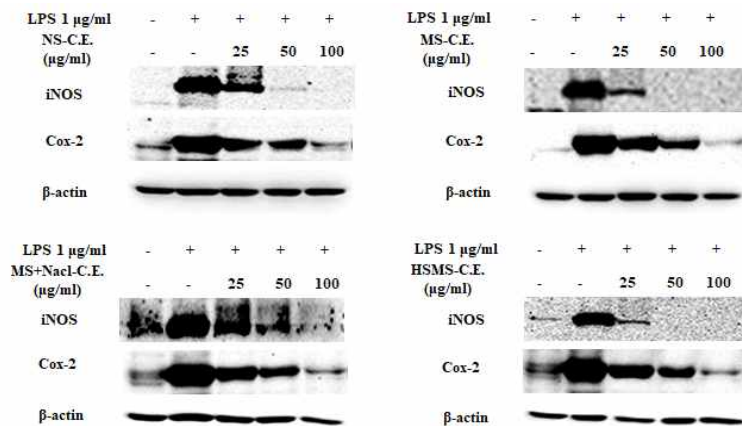
- NS, MS, MS-NaCl, HSMS에 배양한 *Tetraselmis* sp. Carotenoid 추출물의 RAW264.7세포에서 MTT assay를 통한 세포생존율, Griess reagent assay를 통한 NO 생성량, DCF-DA assay를 통

한 ROS 생성량 및 Western blot을 통한 단백질 발현량을 측정하였음.



<그림 4-1-6. RAW264.7세포에서 *Dunaliella salina* Carotenoid 추출물의 세포생존율 및 NO 생성량>

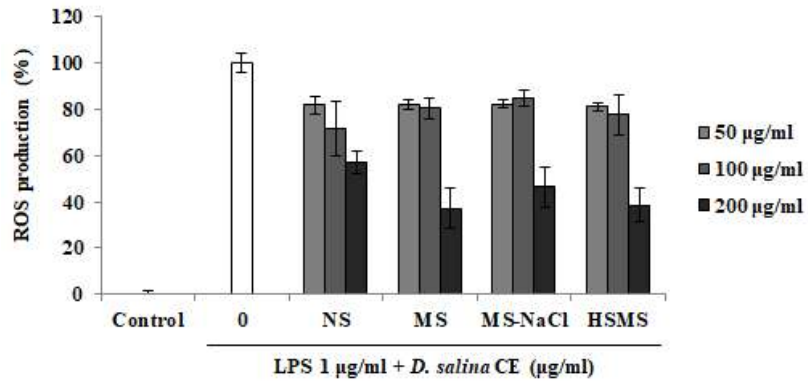
- LPS로 유도한 세포독성 확인결과 NS, MS, MS+NaCl, HSMS에서 200 µg/ml 농도 까지 독성이 보이지 않음을 확인할 수 있었음.
- LPS로 유도한 NO 생성량 측정결과 NS, MS, MS+NaCl, HSMS에서 농도가 증가할수록 NO생성량을 감소시키는 것을 확인할 수 있었으며, 소거활성은 비슷한 것으로 확인하였음.



<그림 4-1-7. RAW264.7세포에서 *Dunaliella salina* Carotenoid 추출물의 iNOS, COX-2 단백질 발현>

- LPS를 처리하였을 때 iNOS와 COX-2 단백질 발현이 현저히 증가하였으며, NS, MS, MS+NaCl, HSMS를 처리하였을 때 농도가 증가할수록 단백질 발현을 감소시키는 것을 확인할 수 있었음. 따라서 *D. salina* Carotenoid 추출물은 iNOS, COX-2 단백질을 감소시켜 항염증 효능을 나타낼 수 있었음.
- LPS를 처리하였을 때 ROS 생성량이 증가하였으며, NS, MS, MS+NaCl, HSMS를 처리하였을 때 농도가 증가할수록 ROS 생성량을 억제시키는 것을 확인할 수 있었음.

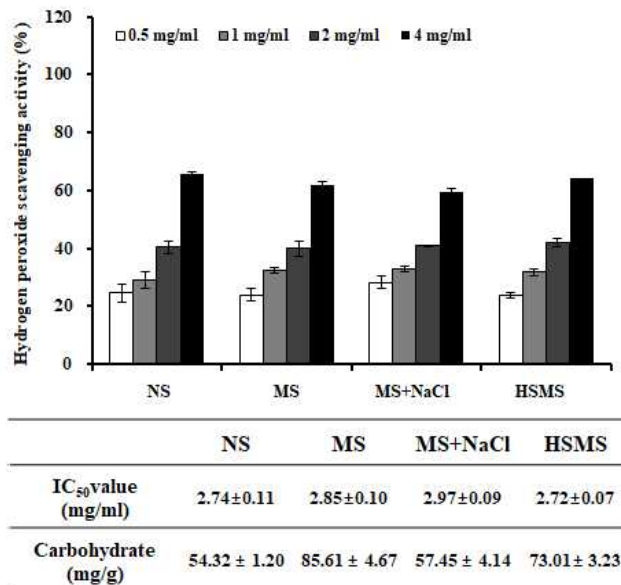
- 따라서 *D. salina* Carotenoid 추출물은 ROS 활성화를 억제하여 항염증 효능을 나타냄을 확인하였고, 이를 증명하기 위해 작용기전 탐색 연구를 진행 중에 있음.



<그림 4-1-8. RAW264.7세포에서 *Dunaliela salina* Carotenoid 추출물의 ROS 생성량 >

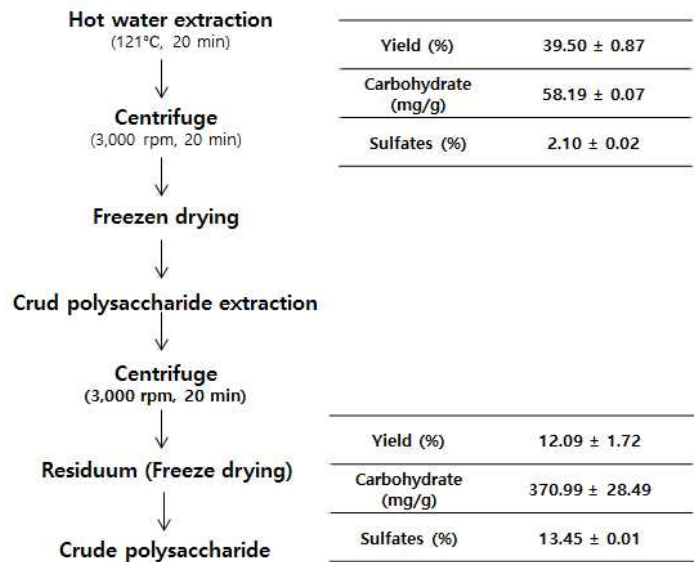
○ *Dunaliela salina* 다당류의 항산화 활성 탐색

- *D. salina*를 열수 추출하여, 원심 후 상층액을 동결건조하고, 이후에 에탄올 침전법을 활용하여 다당류를 분리하였음.
- 총 당 정량은 Phenol sulfuric acid assay를 통해 측정하였음.
- 활성 산소 소거능 확인을 Hydrogen peroxide 소거능을 통해 측정하였으며, Vero 세포에서 MTT assay를 통해 세포생존율을 측정하였음.



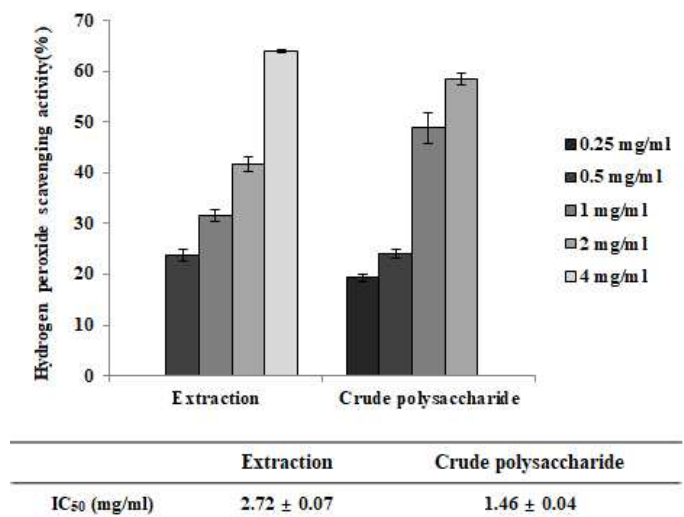
<그림 4-1-9. *Dunaliela salina* 열수 추출물의 Hydrogen peroxide 소거능>

- NS, MS, MS+NaCl, HSMS를 열수 추출하여 Hydrogen peroxide 소거능 확인 결과 각각의 IC₅₀값은 NS 2.74 mg/ml, MS 2.85 mg/ml, MS+NaCl 2.97 mg/ml, HSMS 2.72 mg/ml의 값을 확인할 수 있었으며, 배양조건별로 소거능이 비슷하지만 HSMS에서 가장 낮은 IC₅₀값을 나타냄을 확인할 수 있었음.
- 총 당 함량 측정결과 NS > MS+NaCl > HSMS > MS 순의 함량을 확인할 수 있었음.



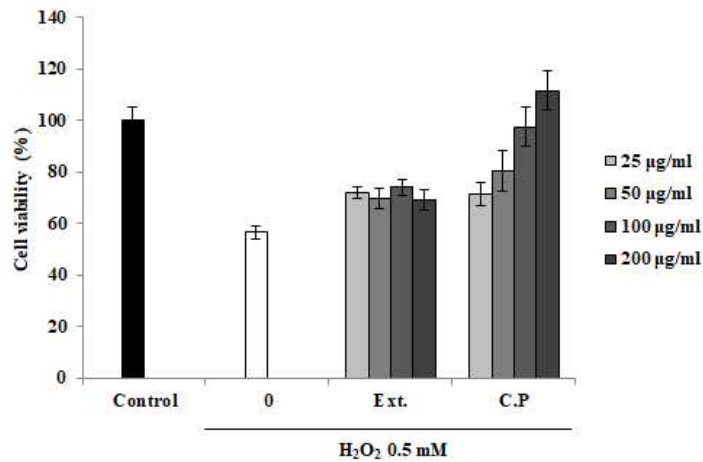
<그림 4-1-10. *Dunaliella salina* 다당류 분리 모식도 및 수율, 총 당, 황산기 함량>

- *D. salina*를 열수추출 하였을 때 수율, 총 당 함량, 황산기 함량이 각각 39.5%, 58.2 mg/g, 2.1%를 나타내었으며, 최종 얻은 다당류의 수율, 총 당 함량, 황산기 함량은 각각 12.1%, 371.0 mg/g, 13.5%를 나타내어, 고 함량의 당과 황신기를 포함하고 있는 것을 확인할 수 있었음.



<그림 4-1-11. *Dunaliella salina* 다당류의 Hydrogen peroxide 소거능>

- *D. salina*를 열수 추출물의 Hydrogen peroxide의 IC₅₀값은 2.72 mg/ml이었으며, 다당류는 1.46 mg/ml로 Hydrogen peroxide 소거능이 우수해짐을 확인할 수 있었음.
- Hydrogen peroxide로 유도한 세포사멸을 *D. salina*의 다당류 추출물이 농도가 증가할수록 세포 생존율을 증가시키는 것을 확인할 수 있었음.



<그림 4-1-12. Vero세포에서 *Dunaliella salina* 다당류의 세포생존율 >

- *D. salina*의 다당류의 우수한 항산화 효능을 확인하여 관련 작용기전 탐색 연구를 진행 중에 있음.
- 배양조건에 따른 *Tetraselmis* sp.의 일반성분, 유용성분 및 영양성분 분석
- *Tetraselmis* sp.의 탄수화물, 단백질, 지질, 회분, 수분 함량을 비교하였음.
 - *Tetraselmis* sp.의 Chlorophyll a, b, Protochlorophyllide, Total carotenoid 함량을 비교하였음.
 - *Tetraselmis* sp.의 아미노산과 지방산 함량을 비교하였음.

<표 4-1-5. *Tetraselmis* sp.의 일반성분 함량>

	Carbohydrate	Protein	Lipid	Ash	Moisture (%)
NS	23.52±0.16	34.87±0.13	7.15±0.29	22.61±0.25	11.95±0.08
MS	26.20±0.36	30.77±0.15	11.53±0.99	22.46±0.94	9.38±0.06
MS+NaCl	18.53±1.12	19.44±1.03	12.44±0.75	38.85±0.54	11.00±0.08
HSMS	19.81±1.31	34.74±0.84	6.85±0.07	26.7±0.34	11.87±0.16

- 배양조건에 상관없이 일반성분 분석 결과 단백질, 회분 및 탄수화물함량이 높음을 확인할 수 있었음.

- NS와 MS의 일반성분 비율은 단백질 34.7%, 30.8%, 탄수화물 23.5%, 26.2%, 회분 22.61%, 22.5% 순이었으며, 지질 7.15%, 11.53%, 수분 11.95%, 9.38%를 나타내는 것을 확인할 수 있었음.
- MS+NaCl은 특이적으로 회분함량이 38.9%로 높게 측정되었으며, 다음으로 단백질 19.4%, 탄수화물 18.5%, 수분 11.0%를 나타내는 것을 확인할 수 있었음.
- HSMS는 단백질 함량이 34.8%로 가장 높게 나타났으며, 다음으로 회분 26.7%, 탄수화물 19.8%, 수분 11.87%, 지질 6.85%를 나타내는 것을 확인할 수 있었음.

<표 4-1-6. *Tetraselmis* sp.의 유용성분 함량>

Contents (mg/100g)	NS	MS	MS+NaCl	HSMS
Chlorophyll a	301.47 ± 14.43	420.61 ± 2.15	320.54 ± 16.79	394.25 ± 10.98
Chlorophyll b	189.52 ± 19.42	426.47 ± 19.54	216.57 ± 22.58	389.94 ± 23.18
Protochlorophyllide	32.21 ± 3.51	113.52 ± 6.03	56.63 ± 14.00	75.43 ± 8.54
Total carotenoid	47.54 ± 2.92	77.31 ± 1.85	78.73 ± 1.85	74.82 ± 3.27

- *Tetraselmis* sp.는 Chlorophyll 함량이 높게 나타났으며, MS > HSMS > MS+NaCl > NS순으로 높은 함량을 나타내었음.
- Total carotenoid 함량확인 결과에서 NS 47.5 mg/100g을 MS, MS+NaCl, HSMS는 모두 70 mg/100g 이상으로 *Tetraselmis* sp.의 경우 MS, HSMS, MS+NaCl에서 유용성분 함량이 높게 나타남을 확인할 수 있었음.

<표 4-1-7. *Tetraselmis* sp.의 아미노산 함량>

(%)

	NS	MS	MS+NaCl	HSMS		NS	MS	MS+NaCl	HSMS
Aspartic acid	9.36	9.22	9.46	9.32	Tyrosine	3.24	3.32	3.25	3.13
Glutamic acid	14.09	14.79	14.41	15.19	Valine	5.52	5.81	5.37	5.33
Serine	5.31	5.35	5.39	5.53	Methonine	2.72	2.66	2.73	2.57
Histidine	2.14	2.30	1.93	2.31	Phenylalanine	5.50	5.77	5.61	5.63
Glycine	6.15	6.44	6.37	6.74	Isoleucine	3.86	4.27	3.91	3.89
Threonine	5.17	5.41	5.33	5.37	Leucine	9.12	9.42	9.14	9.16
Arginine	5.90	6.24	5.88	6.27	Lysine	6.34	6.04	6.37	6.30
Alanine	8.04	8.40	8.63	9.03	Proline	7.55	4.58	6.22	4.22
Taurine					Total	100	100	100	100

- 아미노산 분석결과 Glutamic acid, Aspartic acid, Leucine의 함량이 약 9~15%로 높게 차지하고 있었으며, 다음으로 Alanin, Proline, Lysine, Glycine, Arginine, Phenylalanin, Threonine의 함량이 약 5~9%를 차지하고 있었음. 배양조건에 따라 미미한 함량 차이가 있었으나, 구성 비율은 비슷한 것으로 확인되었음.

<표 4-1-8. *Tetraselmis* sp.의 지방산 함량>

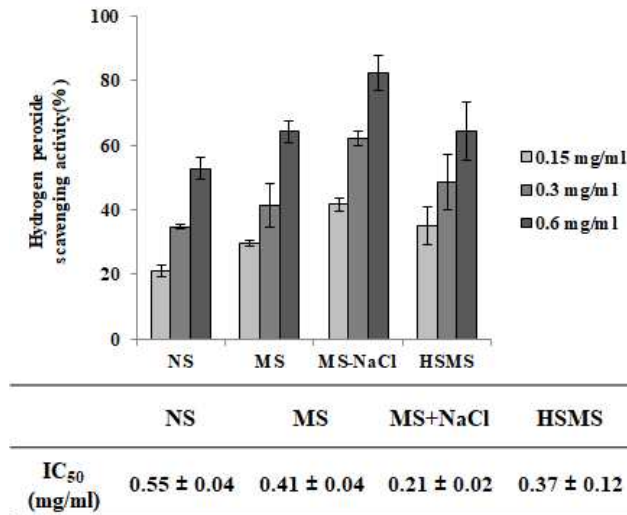
(mg/g)

		NS	MS	MS+NaCl	HSMS
Myristic acid	C14:0	0.19	0.21	0.18	0.15
Palmitic acid	C16:0	13.23	15.06	11.88	10.28
Stearic acid	C18:0	0.26	0.28	0.24	0.23
Oleic acid	C18:1 n9c	2.82	3.08	2.26	2.09
Linoleic acid	C18:2 n6c	7.19	8.60	7.43	5.85
Gamma-linoleic acid(GLA)	C18:3 n6	1.76	1.91	1.52	1.12
Alpha-linoleic acid (ALA)	C18:3 n3	21.30	24.03	20.73	11.76
Total		46.56	52.96	44.05	31.33

- 지방산 분석결과 36종 지방산 중 *Tetraselmis* sp.는 총 7종의 지방산이 검출되었으며, ALAd함량이 가장 높게 나타남을 확인할 수 있었음. 다음으로 Palmitic acid, Linoleic acid, Oleic acid, GLA, Myristic acid 함량 순이었으며, 배양조건에 따라 미미한 함량 차이가 있었으나, 구성 비율은 비슷한 것으로 확인되었음.

○ 배양조건에 따른 *Tetraselmis* sp. Carotenoid 추출물의 항산화 활성 탐색

- NS, MS, MS+NaCl, HSMS에 배양한 *Tetraselmis* sp. Carotenoid 추출물의 활성 산소 소거능 확인을 Hydrogen peroxide 소거능을 통해 측정하였음.

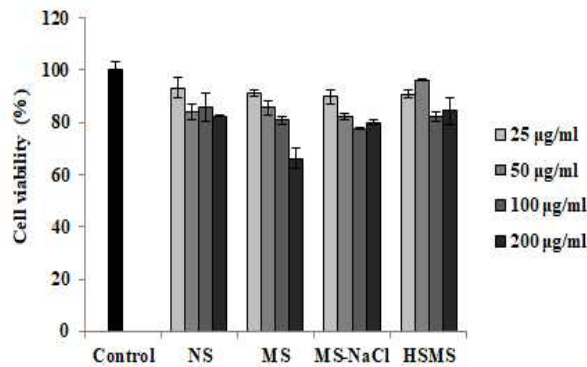


<그림 4-1-13. *Tetraselmis* sp. Carotenoid 추출물의 Hydrogen peroxide 소거능>

- Hydrogen peroxide 소거능 확인 결과 각각의 IC₅₀값은 NS 0.55 mg/ml, MS 0.41 mg/ml, MS+NaCl 0.21 mg/ml, HSMS 0.37 mg/ml의 값을 확인할 수 있었으며, 고염일수록 소거능이 우수함을 확인할 수 있었음.
- Hydrogen peroxide 소거능 순은 MS+NaCl > HSMS > MS > NS 순으로 나타남.

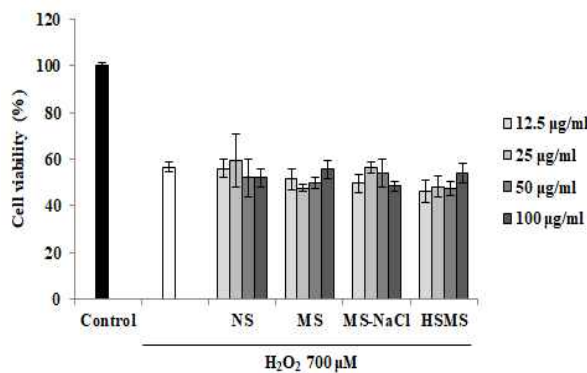
○ 배양조건에 따른 *Tetraselmis* sp. Carotenoid 추출물의 간보호 활성 탐색

- NS, MS, MS-NaCl, HSMS에 배양한 *Tetraselmis* sp. Carotenoid 추출물의 HepG2세포에서의 MTT assay를 통한 세포독성 및 세포생존율을 측정하였음.



<그림 4-1-14. HepG2세포에서 *Tetraselmis* sp. Carotenoid 추출물의 세포독성>

- NS, MS, MS-NaCl, HSMS에 배양한 *D. salina* Carotenoid 추출물을 200 µg/ml까지 처리하였을 때 MS고농에서 80%이하의 생존율을 보여 실험에는 100 µg/ml 농도에서 실험을 진행하였음.

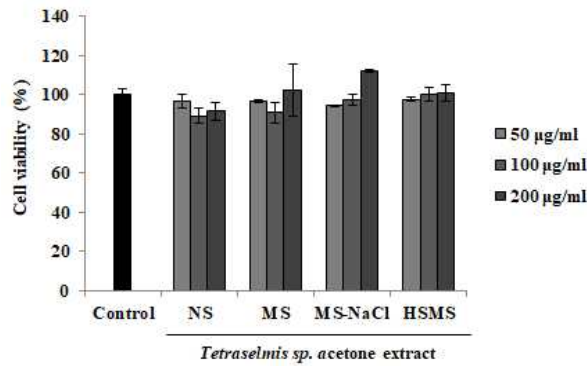


<그림 4-1-15. HepG2세포에서 *Tetraselmis* sp. Carotenoid 추출물의 세포생존율>

- Hydrogen peroxide로 세포사멸을 유도하였을때 NS, MS, MS-NaCl, HSMS에 배양한 *D. salina* Carotenoid 추출물이 세포생존율을 증가시키지 못해 간보호 활성이 확인되지 않았음.

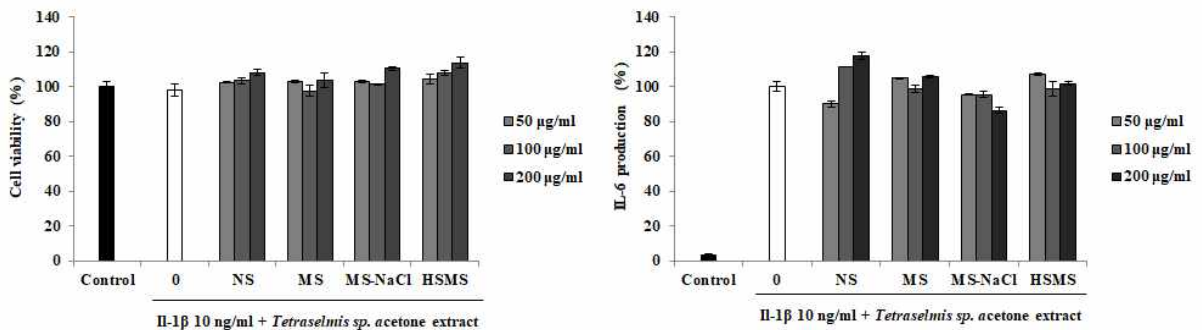
○ 배양조건에 따른 *Tetraselmis* sp. Carotenoid 추출물의 골관절염 활성 탐색

- NS, MS, MS-NaCl, HSMS에 배양한 *Tetraselmis* sp. Carotenoid 추출물의 MG-63세포에서의 MTT assay를 통한 세포독성, 세포생존율 측정 및 ELISA kit를 통한 IL-6생성량을 측정하였음.



<그림 4-1-16. MG-63세포에서 *Tetraselmis sp.* Carotenoid 추출물의 세포독성>

- NS, MS, MS-NaCl, HSMS에 배양한 *Tetraselmis sp.* Carotenoid 추출물을 200 µg/ml까지 처리하였을 때 독성이 확인되지 않아 실험에는 200 µg/ml 농도에서 실험을 진행하였음.

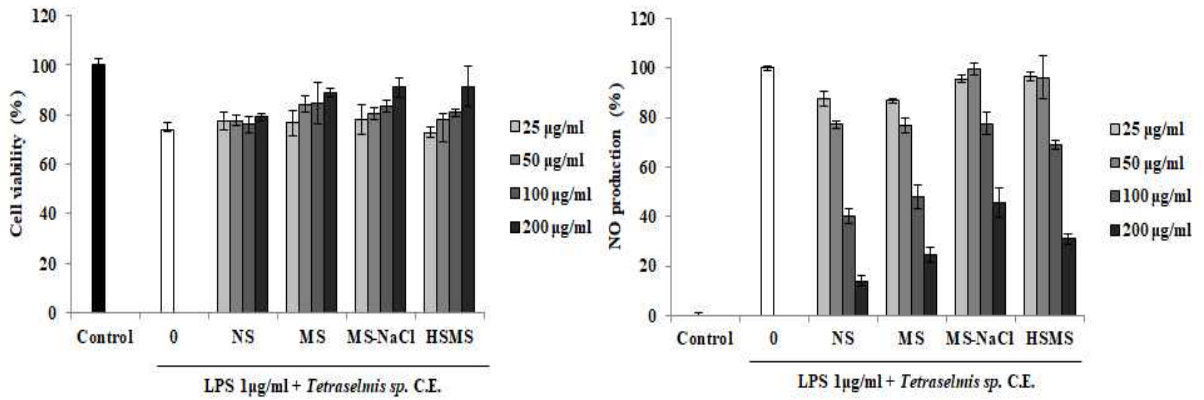


<그림 4-1-17. MG-63세포에서 *Tetraselmis sp.* Carotenoid 추출물의 세포생존을 및 IL-6생성량>

- IL-1β로 처리하였을 때 NS, MS, MS-NaCl, HSMS에 배양한 *Tetraselmis sp.* Carotenoid 추출물의 세포생존에 영향을 미치지 않았으며, IL-6 생성량 측정결과 IL-6 생성량이 감소하지 않아 골관절염 활성이 확인되지 않았음.

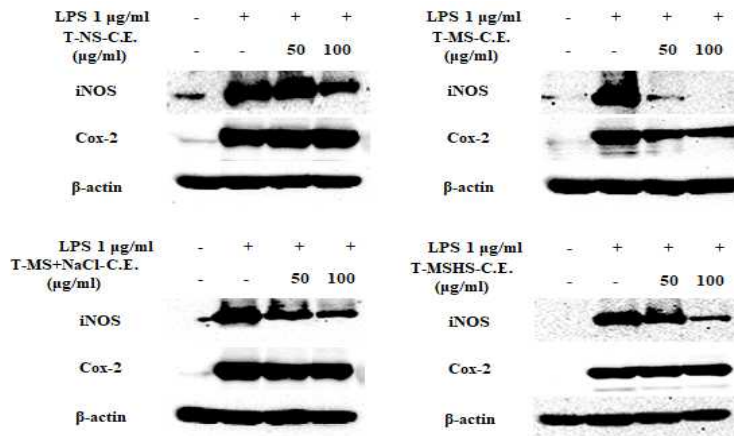
○ 배양조건에 따른 *Tetraselmis sp.* Carotenoid 추출물의 항염증 활성 탐색

- NS, MS, MS-NaCl, HSMS에 배양한 *Tetraselmis sp.* Carotenoid 추출물의 RAW264.7세포에서 MTT assay를 통한 세포생존율, Griess reagent assay를 통한 NO 생성량, DCF-DA assay를 통한 ROS 생성량 및 Western blot을 통한 단백질 발현량을 측정하였음.



<그림 4-1-18. RAW264.7세포에서 *Tetraselmis* sp. Carotenoid 추출물의 세포생존율 및 NO 생성량>

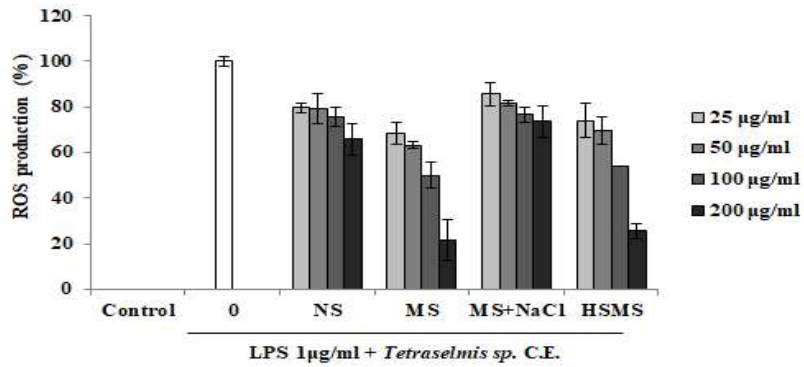
- LPS로 유도한 세포독성 확인결과 NS, MS, MS+NaCl, HSMS에서 200 µg/ml 농도 까지 독성이 보이지 않음을 확인할 수 있었음.
- LPS로 유도한 NO 생성량 측정결과 NS, MS, MS+NaCl, HSMS에서 농도가 증가할수록 NO생성량을 감소시키는 것을 확인할 수 있었으며, 소거활성은 비슷한 것으로 확인됨.



<그림 4-1-19. RAW264.7세포에서 *Tetraselmis* sp. Carotenoid 추출물의 iNOS, COX-2 단백질 발현>

- LPS를 처리하였을 때 iNOS와 COX-2 단백질 발현이 현저히 증가하였으며, NS, MS, MS+NaCl, HSMS를 처리하였을 때 농도가 증가할수록 iNOS 단백질 발현을 감소시키는 것을 확인할 수 있었음. 하지만 COX-2의 발현량은 감소시키지 않음. 따라서 *D. salina* Carotenoid 추출물은 iNOS 단백질을 감소시켜 NO 생성을 억제하여 항염증 효능을 나타냄을 확인할 수 있었음.
- LPS를 처리하였을 때 ROS 생성량이 증가하였으며, NS, MS, MS+NaCl, HSMS를 처리하였을 때 농도가 증가할수록 ROS 생성량을 억제시키는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 MS와 HSMS에서 우수한 ROS 소거능을 확인할 수 있었음.

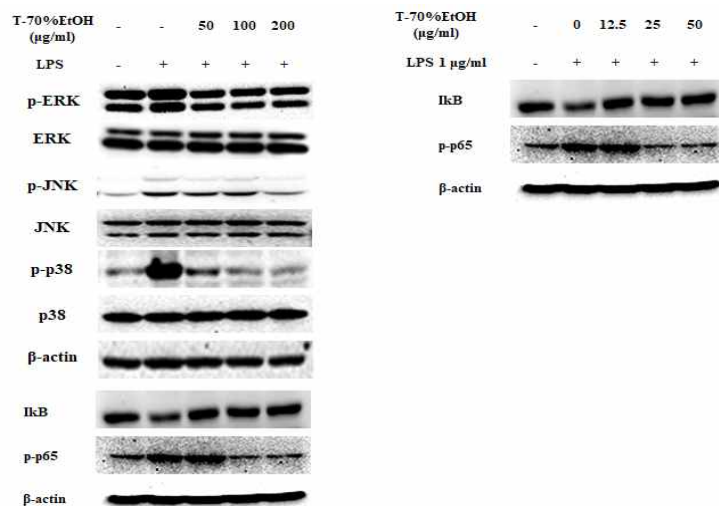
- 따라서 *Tetraselmis* sp. Carotenoid 추출물은 ROS 활성화를 억제하여 항염증 효능을 나타냄을 확인하였고, 이를 증명하기 위해 작용기전 탐색 연구를 진행 중에 있음.



<그림 4-1-20. RAW264.7세포에서 *Tetraselmis* sp. Carotenoid 추출물의 ROS 생성량>

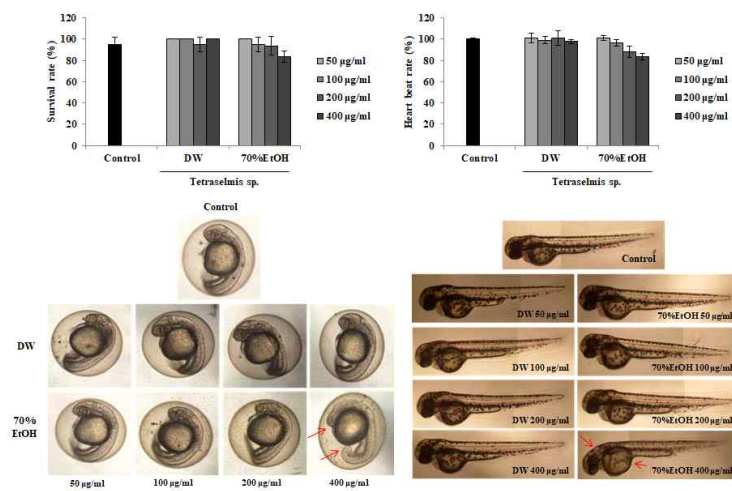
○ 배양조건에 따른 *Tetraselmis* sp.의 항염증 활성 탐색

- 1차년도에 HSMS에 배양한 *Tetraselmis* sp.의 70% 주정추출물의 NO, 염증성 Cytokines 생성량을 감소시키며, iNOS와 COX-2의 발현을 억제하는 것을 확인하였음.
- 2차년도에 MAPKs, NF- κ B의 작용기전과 제브라피쉬 모델에서의 항염증 효능을 확인하였음.
- RAW264.7세포에서 Western blot을 통한 단백질 발현량을 측정하였음.
- Zebrafish에서의 세포생존율, 심박수, 형태학적인관찰을 현미경상에서 측정하였고, Acridine orange 염색법을 활용한 Cell death, DAF-FM-DA 염색법을 활용한 NO 생성량을 측정하였음.



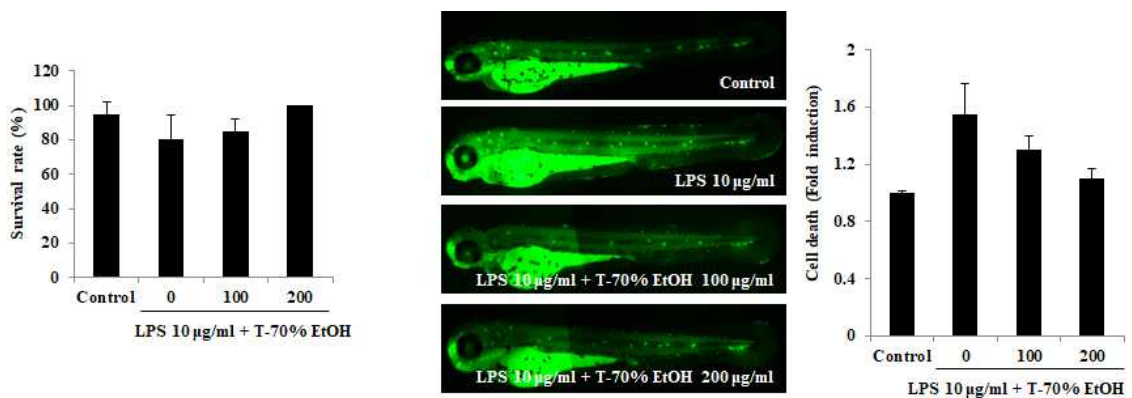
<그림 4-1-21. RAW264.7세포에서 *Tetraselmis* sp. 70% 주정추출물의 MAPKs, NF- κ B 단백질 발현>

- LPS를 처리하였을 때 MAPKs 인자인 ERK, JNK, p38의 단백질 발현이 증가하였으며, *Tetraselmis* sp. 70% 주정출물을 처리하였을 때 JNK, p38의 단백질발현이 감소하여, JNK, p38을 통해 염증을 억제하는 것을 확인할 수 있었음.
- LPS를 처리하였을 때 cytosol의 IκB의 단백질이 감소하고, p-p65의 단백질이 증가하였는데, *Tetraselmis* sp. 70% 주정출물을 처리하였을 때 IκB의 단백질이 증가하고, p-p65의 단백질이 감소하여, NF-κB 기전을 통해 염증을 억제하는 것을 확인할 수 있었음.
- 따라서, *Tetraselmis* sp. 70% 주정출물은 MAPKs(JNK, p38), NF-κB의 작용기전을 통해 iNOS, COX-2의 발현을 억제시켜, 염증성 cytokines 및 NO 생성량을 감소시켜 항염증 효능을 나타냄을 증명하였음.



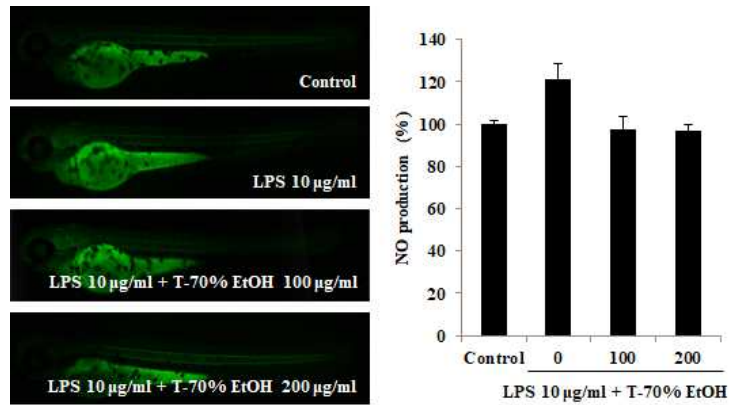
<그림 4-1-22. Zebrafish에서 *Tetraselmis* sp. 70% 주정출물의 독성 확인>

- *Tetraselmis* sp. 물추출물과 70% 주정출물을 400 μ g/ml까지 처리하였을 때 70% 주정출물의 고농도에서 생존율 및 심박수가 감소하였으며, 형태학적 관찰에서도 발생속도가 느린 것이 확인되어 차후 실험은 200 μ g/ml 이하에서 진행하였음.



<그림 4-1-23. Zebrafish에서 *Tetraselmis* sp. 70% 주정출물의 LPS 자극에 의한 cell death>

- Zebrafish에 LPS를 처리하여 염증을 유도하였을 때 생존율이 80%로 감소하였으나, *Tetraselmis* sp. 70% 주정출물을 처리하였을 때 생존율이 증가하였으며, 형광염색을 통한 Cell death 결과에서도 70% 주정출물을 처리하였을 때 Cell death를 감소하였음. 따라서 LPS 자극에 의한 보호 활성이 있음을 확인 할 수 있었음.



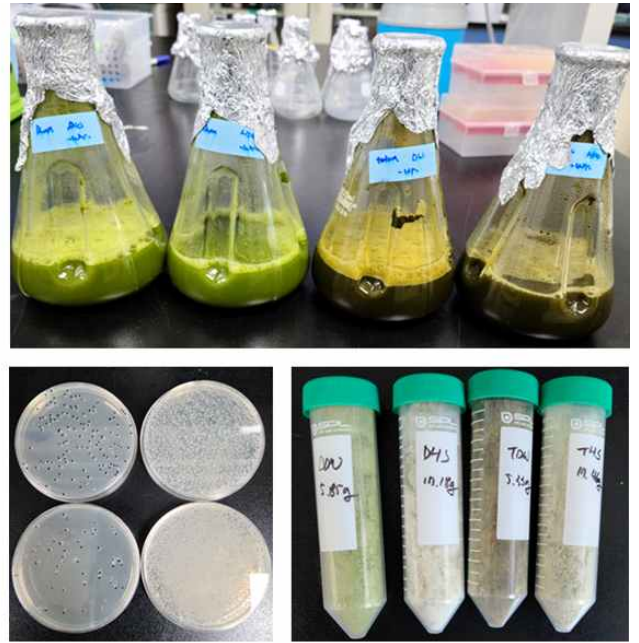
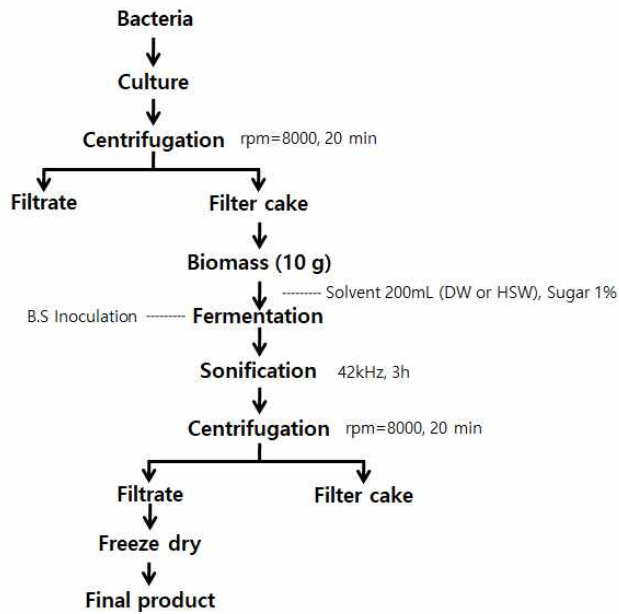
<그림 4-1-24. Zebrafish에서 *Tetraselmis* sp. 70% 주정출물의 LPS 자극에 의한 NO 생성량>

- Zebrafish에 LPS를 처리하여 염증을 유도하였을 때 NO 생성량이 증가하였으며, *Tetraselmis* sp. 70% 주정출물을 처리하였을 때 NO 생성량이 감소하였음. 따라서 Zebrafish model에서도 *Tetraselmis* sp. 70% 주정출물의 항염증 활성을 확인 할 수 있었음.

나. 고염배양 해양생물 바이오매스의 가공물 제조 및 효능평가

○ 고염분수 활용 해양생물 기능성 탐색을 위한 가공물 제조 공정 개발

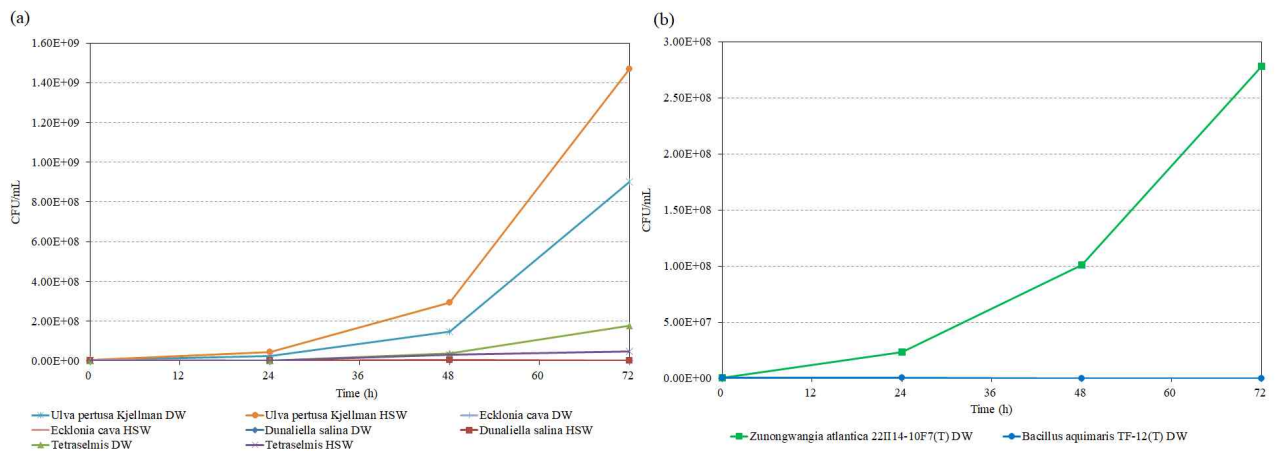
- 고염분수를 활용한 해양생물의 기능성 탐색을 위해 미세조류인 듀나렐라, 테트라셀미스 2종 (*Dunaliella salina*, *Tetraselmis* sp.)와 거대조류 구멍갈파래, 감태, 우뚝가사리 3종 (*Ulva* sp., *Ecklonia cava*, *Gelidium amansii*) 그리고 해양미생물 2종 (*Bacillus aquimaris* S2947, *Zunongwangia atlantica* S6003)을 활용하여 기능성 활성을 탐색을 실시함
- 해양조류와 해양미생물을 활용한 발효 공정 모식도는 하기와 같이 나타내었음
- 해양미생물 2종인 S2947, S6003 균주의 경우 biomass로 활용하기 위해 7일간 30도에서 배양하여 각각 1.211 g/L, 1.900 g/L의 성장성을 보였으며, 각각 7.27g과 13.3g의 biomass를 확보함
- 확보된 해양미생물을 biomass로 활용하여 발효를 진행하였으며, 해양조류의 경우 미리 수확한 샘플을 파우더로 제조하여 발효에 사용하였음
- 홍조류인 우뚝가사리의 경우 효소 처리를 추가로 진행하여 발효에 미치는 영향을 확인하였음



<그림 4-2-1. 해양조류 및 해양미생물을 활용한 발효 공정 모식도. >

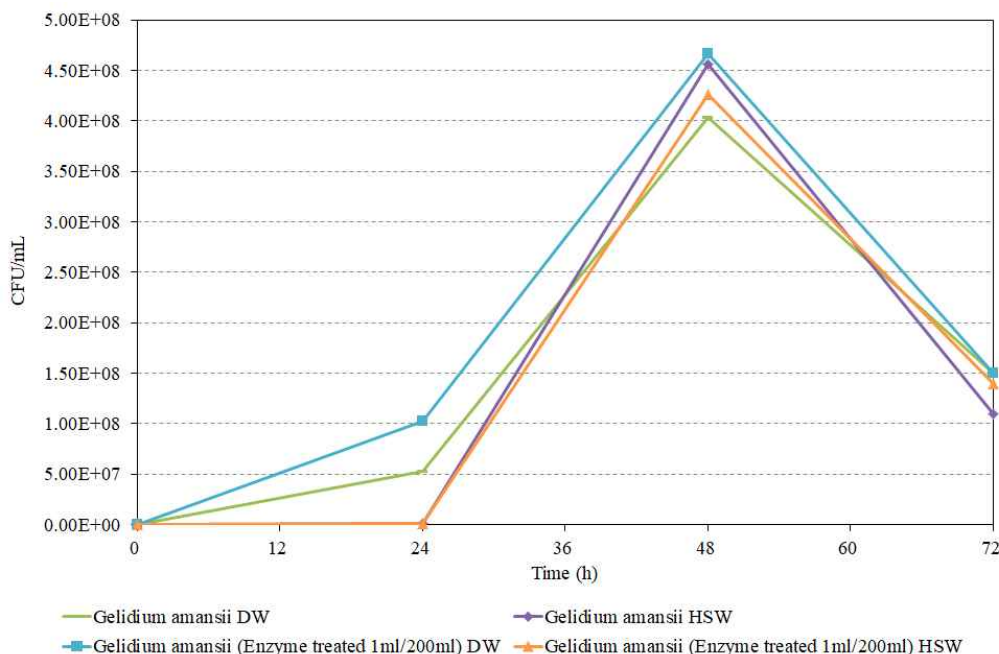
○ 해양조류 및 해양미생물별 배양배지 조성에 따른 미생물의 cell growth 측정

- 각각의 해양조류와 해양미생물의 배양배지 조성에 따른 미생물의 cell growth를 측정하기 위해 배지의 조성을 증류수 (DW)와 고염분수 (HSW)를 기본 배지 조성으로 실험하였음
- 접종할 해양미생물은 1차년도에 김치에서 분리한 *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*를 사용하였으며, 사전에 배양을 진행하여 접종하였음
- 모든 실험군은 접종 후 3일 (72시간)간 배양하였으며, 배양 종료 후 초음파처리하여 미생물을 불활성화 시킨 다음 원심분리를 이용하여 상층액을 얻어 동결건조 후 활성탐색에 사용하였음



<그림 4-2-2. (a) 해양조류 및 (b) 미생물 별 배지 조성에 따른 미생물 성장성 측정 결과.>

- 상기 그림은 해양조류 및 미생물별 배지 조성에 따른 미생물 성장성 측정결과로 (4-2-2a)의 경우 해양조류 (4-2-2b)는 미생물을 biomass로 하여 얻어진 결과를 나타내었음
- 해양조류를 활용한 발효 실험 결과 구멍갈파래에서 미생물의 성장성이 다른 해양조류에 비해 큰 것을 확인 할 수 있었음
- 특히, 구멍갈파래는 HSW를 기본 배양배지로 활용한 경우 1.47×10^9 CFU/mL의 성장성을 보여 다른 실험군과 비교하여 유일하게 10^9 CFU/mL의 양을 넘어선 것을 확인하였으며, 일반적으로 미생물을 배양하였을 경우 통상적으로 10^8 CFU/mL정도로 성장하는 것에 비해 성장이 촉진 되는 것을 확인함
- 그 이외에 해양조류를 활용한 발효에서 미생물의 성장에서 테트라셀미스에서 DW를 기본 배양 배지로 하였을 경우만 10^8 CFU/mL까지 성장하는 것을 확인하였음
- 반면, 감태와 듀나텔라의 경우 초기 접종 농도인 10^5 CFU/mL에서 거의 변화가 없이 일정하게 유지되는 것을 확인하였음
- 해양미생물을 이용한 발효 실험 (b)에서는 2가지 미생물이 극적으로 상이한 결과를 나타내는 것을 확인함
- 해양 미생물 *Zunongwangia atlantica* S6003을 biomass로 활용한 실험군의 경우 최종적으로 2.78×10^8 CFU/mL로 통상적인 성장성을 보인데 반해 *Bacillus aquimaris* S2947는 초기 접종량인 1.58×10^5 CFU/mL에서 48시간까지 7.00×10^3 CFU/mL로 계속 감소하다가 72시간 부터는 미생물 콜로니가 검출되지 않는 것을 확인하였음



<그림 4-2-3. 우뚝가사리(*Gelidium amansii*)의 효소 처리에 따른 미생물 성장성 측정 결과. >

- 다른 해양조류나 해양미생물과는 다르게 발효 미생물인 *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*에 대해 강한 항균 활성을 보이는 것으로 판단되어 미생물 발효에 적합하지 않는 biomass인 것으로 확인됨
- 전체적으로 모든 실험군은 48시간 이후 미생물 성장에 정체기가 오는 것으로 확인되며, 구멍갈파래, 테트라셀미스 및 S6003 군은 계속 증가세를 보여 발효에 적합한 샘플인 것을 확인함
- 상기 결과는 홍조류인 우뭇가사리를 활용한 미생물 발효 결과로, 모든 실험군이 배지 조성파 상관없이 유사하게 성장하는 것을 확인하였음
- 우뭇가사리를 활용한 4가지 실험군에서 $1.10\sim 1.50 \times 10^8$ CFU/mL의 성장을 보이는 것을 확인함
- 특히, 우뭇가사리의 경우 효소 처리를 실시하여 배양하였지만, 효소 처리 유무에 따른 유의적인 차이는 없는 것으로 확인됨

○ 해양조류 및 해양미생물별 배양배지 조성에 따른 발효 수율 측정

- 상기의 모든 실험군을 동결건조하여 얻어진 파우더의 수율을 측정하였으며, 그 결과를 하기에 나타내었음

<표 4-2-1. 해양조류 및 해양미생물을 활용한 발효 수율 측정 결과>

실험 군	용매 종류	수율 (%)
<i>Dunaliella salina</i>	DW	58.5
	HSW	171.8
<i>Tetraselmis</i> sp.	DW	53.3
	HSW	174.6
<i>Ulva</i> sp.	DW	38.2
	HSW	108.4
<i>Ecklonia cava</i>	DW	28.7
	HSW	127.7
<i>Gelidium amansii</i>	DW	-
	HSW	-
<i>Gelidium amansii</i> (Enzyme treated 1ml/200ml)	DW	-
	HSW	-
<i>Zunongwangia atlantica</i> 22II14-10F7(T)	DW	24.5
<i>Bacillus aquimaris</i> TF-12(T)	DW	49.0

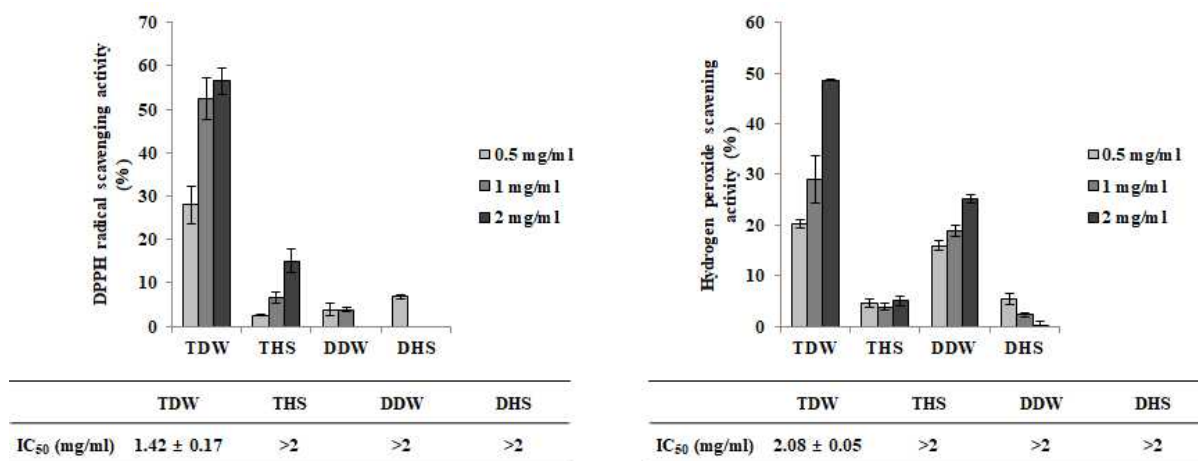
- 모든 실험군의 발효 수율을 비교한 결과 고염분수를 사용한 실험군에서 수율이 100%가 넘게 나온 것을 확인하였으며, 고염분수에 존재하는 고농도의 염으로 인해 수율이 증가한 것으로 판단됨
- 미세조류 발효 수율의 경우 2종 모두 DW를 사용한 발효는 50%이상으로 다른 실험군 보다 보다 매우 높은 수율을 얻은 것으로 확인됨
- 또한, 거대조류인 구멍갈파래와 감태 발효액의 경우 수율이 각각 38.2%, 28.7%로 준수한 수율

이 확보되는 것을 확인함

- 해양미생물을 활용한 발효액의 경우 *Bacillus aquimaris*의 경우 49.0%의 높은 발효 수율을 확보 하였으며, *Zunongwangia atlantica*의 경우 24.5%의 발효 수율이 나오는 것을 확인하였음
- 상기 고염분수를 활용한 해양생물의 기능성 탐색을 위한 발효 실험결과, 미세조류인 두나렐라, 테트라셀미스 2종 (*Dunaliella salina*, *Tetraselmis* sp.)와 거대조류 구멍갈파래, 감태, 우뭇가사리 3종 (*Ulva* sp., *Ecklonia cava*, *Gelidium amansii*) 그리고 해양미생물 2종 (*Bacillus aquimaris*, *Zunongwangia atlantica*)을 활용한 미생물 성장성을 확인하였음
- 그 결과, 구멍갈파래 (*Ulva* sp.)가 가장 높은 미생물 성장성을 보이는 것을 확인하였으며, 해양 미생물인 *Bacillus aquimaris*가 가장 낮은 미생물 성장성을 보이는 것을 확인함

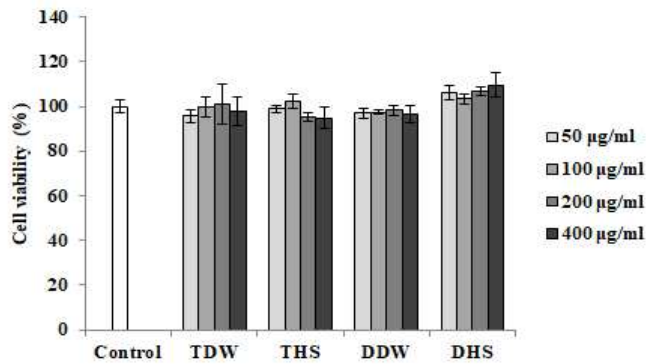
○ 미세조류 (*Dunaliella salina*, *Tetraselmis* sp.)의 발효물의 항산화 활성 탐색

- 미세조류 (*D. salina*, *Tetraselmis* sp.)의 배양조건에 따른 발효물 (DW, HS)의 활성 산소 소거능 확인을 Hydrogen peroxide 소거능을 통해 측정하였음.
- Vero 세포에서 MTT assay를 통한 세포독성 및 세포생존율과, DCF-DA assay를 통한 ROS생성량을 측정하였음.



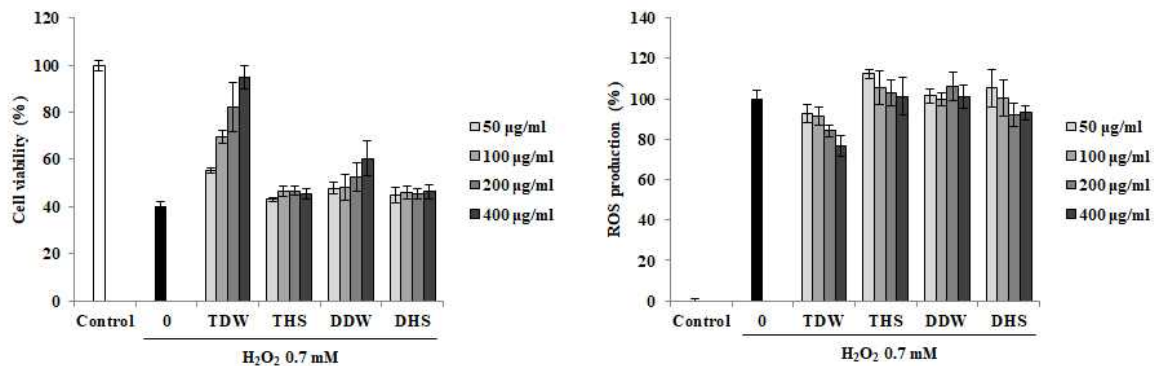
<그림 4-2-4. 미세조류의 발효물의 Hydrogen peroxide 소거능>

- *Tetraselmis* sp. 발효물 TDW의 DPPH radical IC₅₀값은 1.42 mg/ml, Hydrogen peroxide의 IC₅₀값은 2.08 mg/ml로 활성산소 소거능을 확인할 수 있었음.
- *Tetraselmis* sp. 발효물 THS와, *D. salina*의 발효물 DDW, DHS에서는 활성산소 소거능을 확인할 수 없었음.



<그림 4-2-5. Vero 세포에서 미세조류 발효물의 세포독성>

- TDW, THS, DDW, DHS 모두 400 µg/ml 농도까지 세포독성이 보이지 않는 것으로 확인되어 실험에는 400 µg/ml 농도에서 실험을 진행하였음.

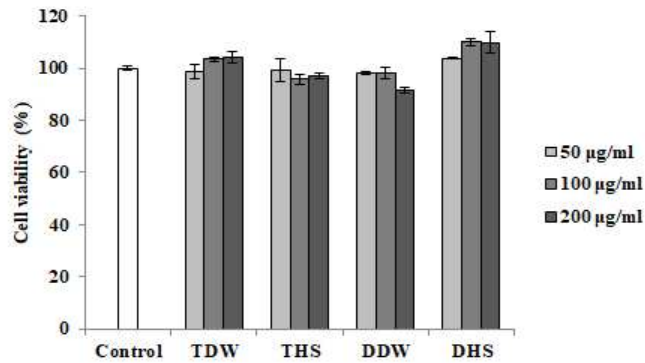


<그림 4-2-6. Vero 세포에서 미세조류 발효물의 세포 생존율 및 ROS 생성량>

- Hydrogen peroxide로 자극시킨 세포 사멸을 TDW은 농도가 증가할수록 세포 생존율을 증가시켜 TDW는 Hydrogen peroxide에 의한 세포 보호활성이 있음을 확인할 수 있었음.
- Hydrogen peroxide로 자극시킨 산화적스트레스에 의한 ROS 증가를 TDW는 농도가 증가할수록 ROS생성량을 감소시켜 TDW는 Hydrogen peroxide에 의한 산화적 스트레스 억제 활성이 확인할 수 있었음.
- 따라서, TDW는 Hydrogen peroxide 소거능이 우수하며, 세포에서의 세포 보호활성과, 산화적 스트레스 억제 활성이 확인되어 항산화 활성이 우수함을 확인할 수 있었음.
- 하지만, THS, DDW, DHS에서는 항산화 활성이 확인되지 않았음.

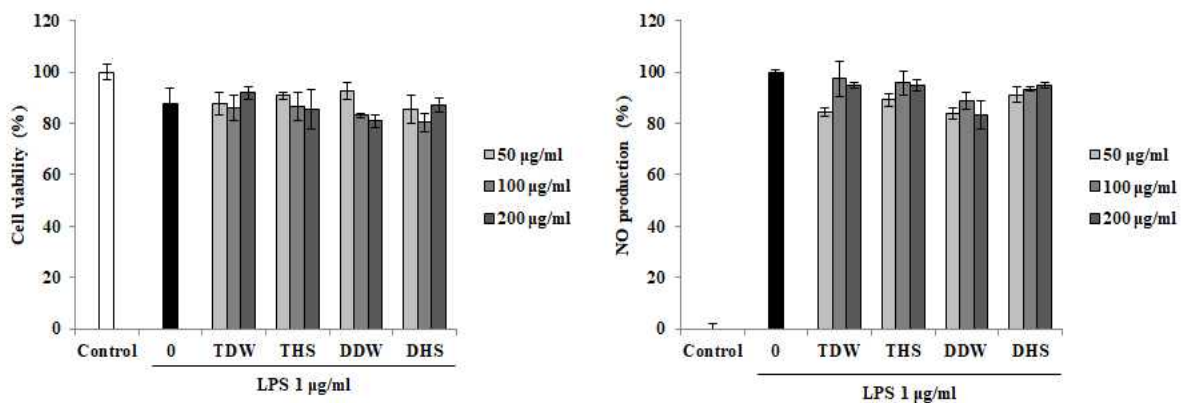
○ 미세조류 (*Dunaliella salina*, *Tetraselmis* sp.)의 발효물의 항염증 활성 탐색

- 미세조류 (*D. salina*, *Tetraselmis* sp.)의 배양조건에 따른 발효물 (DW, HS)의 RAW264.7 세포에서 MTT assay를 통한 세포독성 및 세포생존율과, Griess reagent를 활용한 NO 생성량, DCF-DA assay를 통한 ROS생성량을 측정하였음.



<그림 4-2-7. RAW264.7 세포에서 미세조류 발효물의 세포독성>

- TDW, THS, DDW, DHS 모두 200 µg/ml농도까지 세포독성이 보이지 않는 것으로 확인되어 실험에는 200 µg/ml 농도에서 실험을 진행하였음.

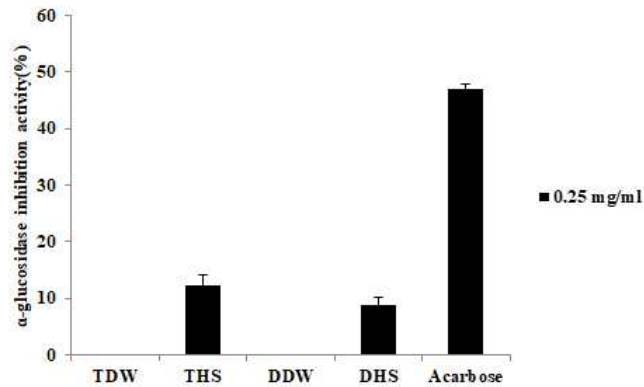


<그림 4-2-8. RAW264.7세포에서 미세조류 발효물의 세포생존율 및 NO 생성량>

- LPS로 유도한 세포독성 확인결과 TDW, THS, DDW, DHS에서 세포보호 활성이 있음을 확인하였음.
- LPS로 유도한 NO 생성량 측정결과 TDW, THS, DDW, DHS에서 NO 생성을 감소시키지 않아 항염증 활성이 없는 것으로 확인되었음.

○ 미세조류 (*Dunaliella salina*, *Tetraselmis* sp.)의 발효물의 항당뇨 활성 탐색

- 미세조류 (*D. salina*, *Tetraselmis* sp.)의 배양조건에 따른 발효물 (DW, HS)의 α -glucosidase 효소 억제 활성을 측정하였음.

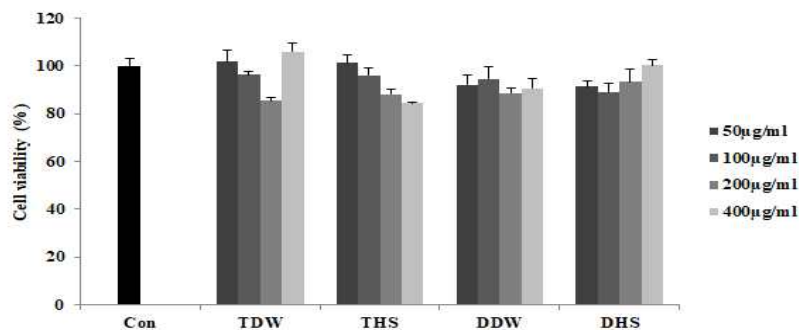


<그림 4-2-9. 미세조류 발효물의 α -glucosidase 효소 억제 활성>

- α -glucosidase 효소 억제 실험결과 THS, DHS에서 약 10%의 억제활성이 확인되었으나, positive control로 사용된 Acarbose와의 활성을 비교하였을 때 항당뇨 활성이 없는 것으로 확인되어짐.

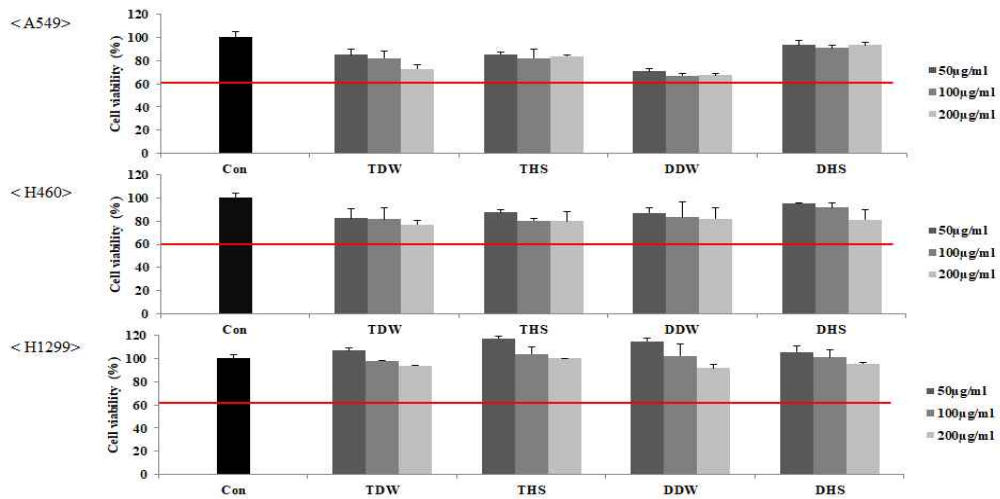
○ 미세조류 (*Dunaliella salina*, *Tetraselmis* sp.)의 발효물의 항암 활성 탐색

- 미세조류 (*D. salina*, *Tetraselmis* sp.)의 배양조건에 따른 발효물 (DW, HSW)의 Vero 세포에서 MTT assay를 통한 세포독성을 측정하였음.
- 항암활성은 폐암세포 (A549, H460, H1299), 대장암세포 (HCT116, SW620, CT26), 유방암세포 (HCC38, 1419, SKBR3)에서 MTT assay를 통한 세포생존율을 측정하였음.

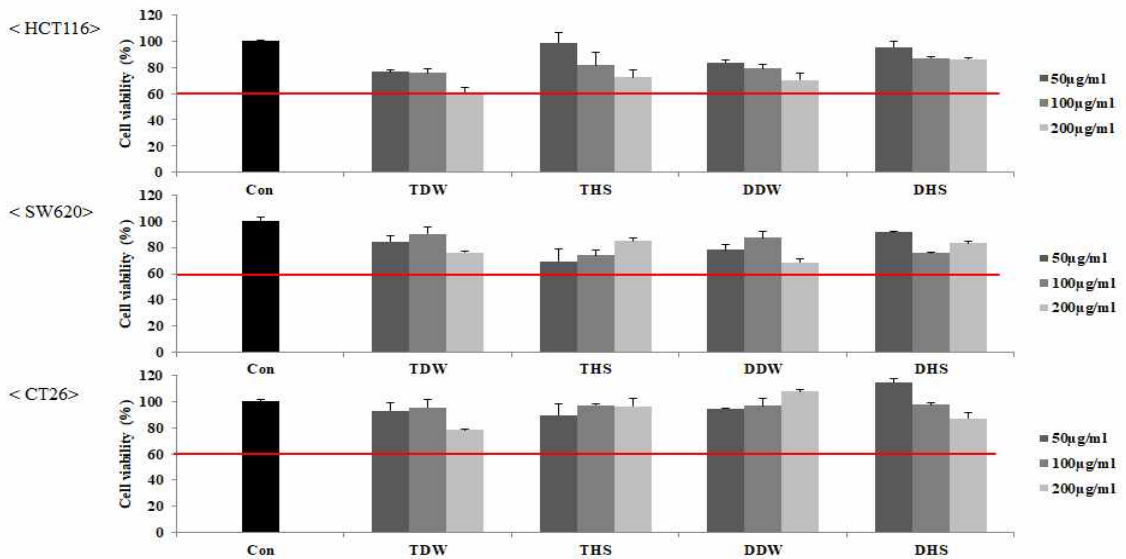


<그림 4-2-10. Vero 세포에서 미세조류 발효물의 세포독성>

- TDW, THS, DDW, DHS 모두 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지 세포독성이 보이지 않는 것으로 확인되어 실험에는 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 실험을 진행하였음.

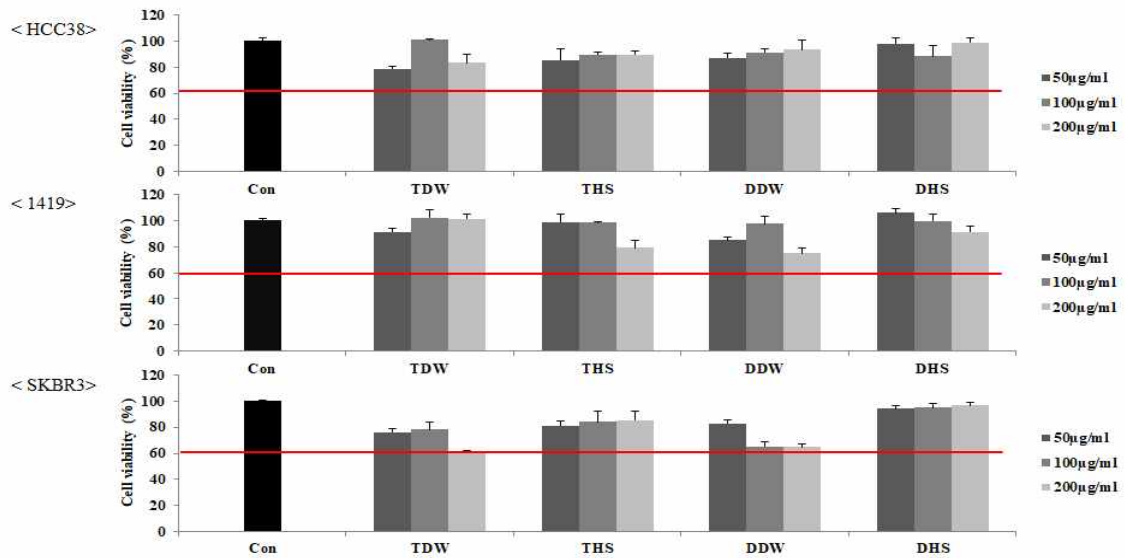


<그림 4-2-11. 폐암세포에서 미세조류 발효물의 세포독성>



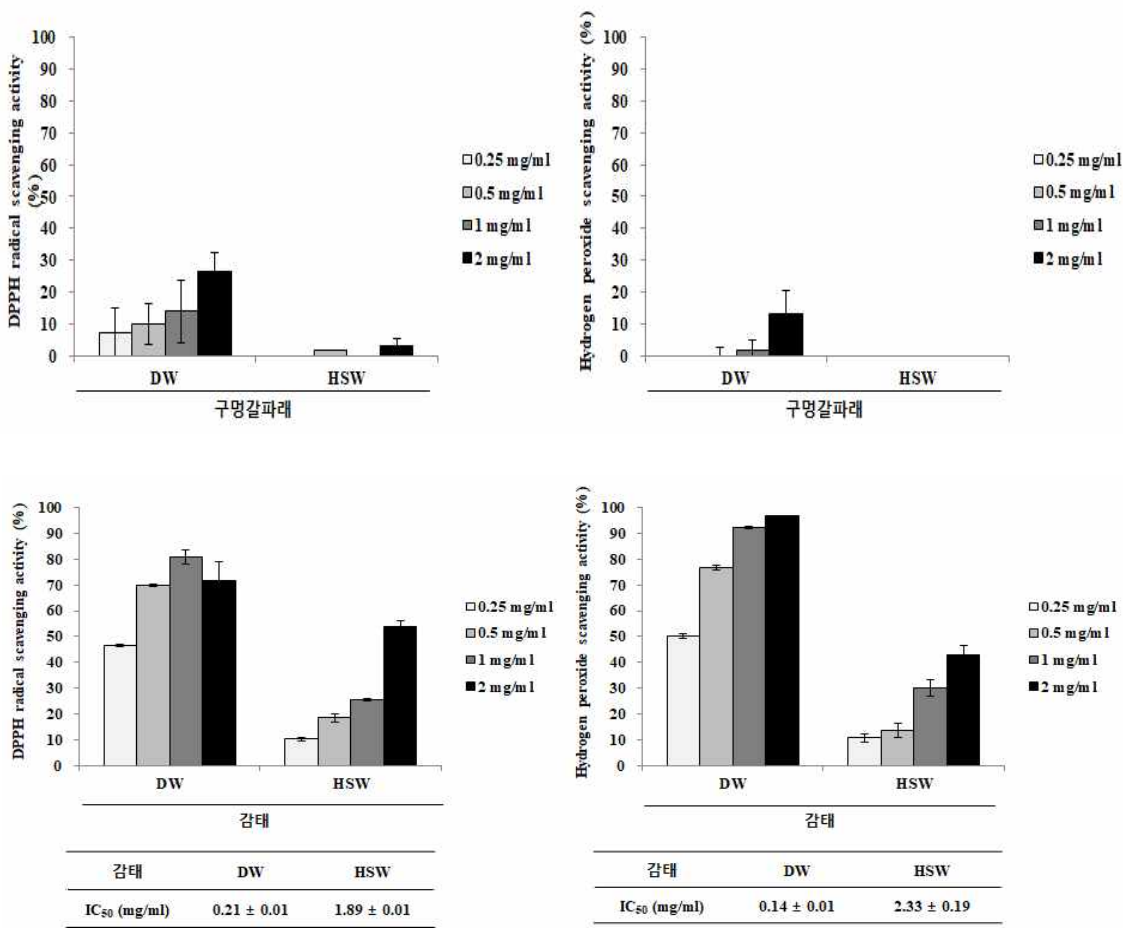
<그림 4-2-12. 대장암 세포에서 미세조류 발효물의 세포독성>

- 정상세포에서 독성이 없는 농도에서 실험을 진행하였음. 미세조류 (*D. salina*, *Tetraselmis* sp.)의 배양조건에 따른 발효물 (DW, HS)의 항암에 대한 활성은 다양한 암세포에서의 활성을 나타내지는 않았지만, 유방암 세포인 SKBR3 세포에서 DDW에서 특이적으로 암세포 억제 활성을 확인할 수 있었음.



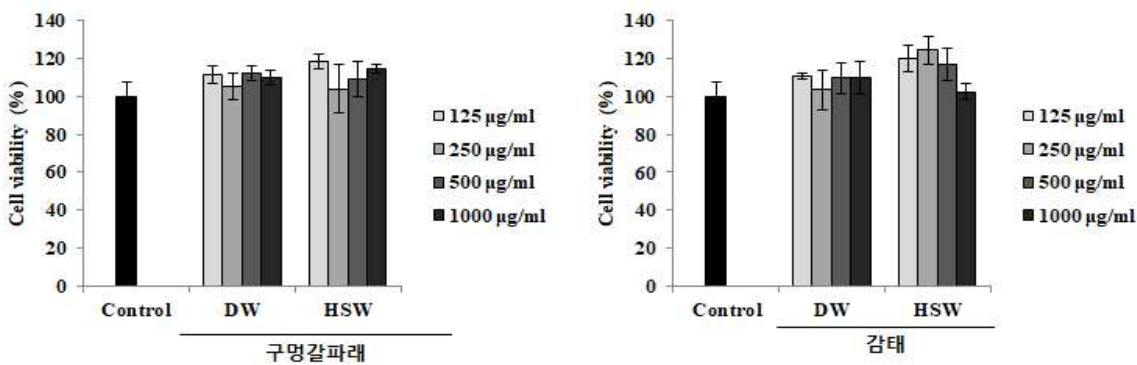
<그림 4-2-13. 유방암 세포에서 미세조류 발효물의 세포독성>

- 미세조류 (*Dunaliella salina*, *Tetraselmis* sp.)의 발효물의 콜라겐 합성능력 측정
 - 발효물의 콜라겐 합성능력 확인을 위해 collagenase 저해 활성을 측정
 - 10mg/ml 농도에서 2종 모두 collagenase 저해활성을 나타내지 않음
- 미세조류 (*Dunaliella salina*, *Tetraselmis* sp.)의 발효물의
 - 발효물의 보습능력을 확인하기 위해 Hyaluronidase 저해활성 측정.
 - 10mg/ml 농도에서 2종 모두 Hyaluronidase 저해활성을 나타내지 않음
- 해조류(구멍갈파래, 감태)의 발효물의 항산화 활성 탐색
 - 해조류(구멍갈파래, 감태)의 배양조건에 따른 발효물 (DW, HSW)의 활성 산소 소거능 확인을 Hydrogen peroxide 소거능을 통해 측정하였음.
 - Vero 세포에서 MTT assay를 통한 세포독성 및 세포생존율과, DCF-DA assay를 통한 ROS생성량을 측정하였음.
 - 구멍갈파래 발효물에서는 DPPH radical, Hydrogen peroxide의 활성산소 소거능을 확인할 수 없었음.



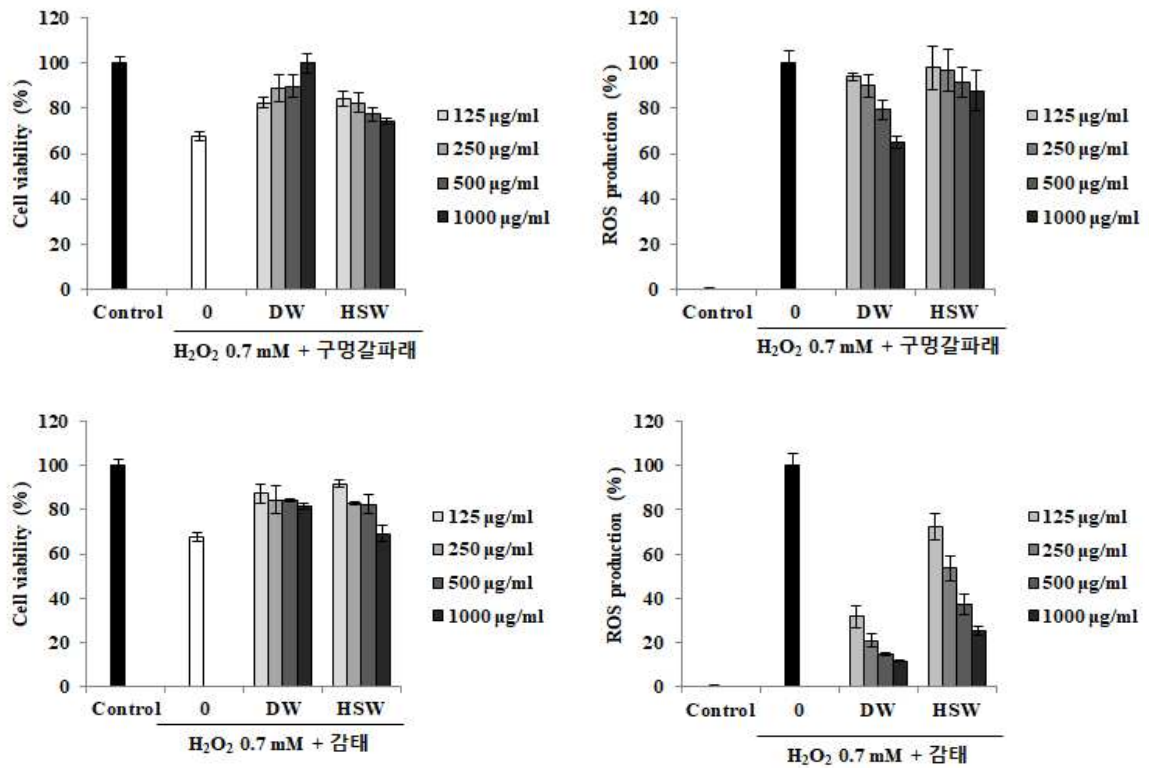
<그림 4-2-14. 미세조류의 발효물의 Hydrogen peroxide 소거능>

- 감태 발효물에서는 DPPH radical IC₅₀값은 DW 0.21 mg/ml, HSW 1.89 mg/ml, Hydrogen peroxide의 IC₅₀값은 DW 0.14 mg/ml, HSW 2.33 mg/ml으로 활성산소 소거능을 확인할 수 있었음.



<그림 4-2-15. Vero 세포에서 해조류의 발효물의 세포독성>

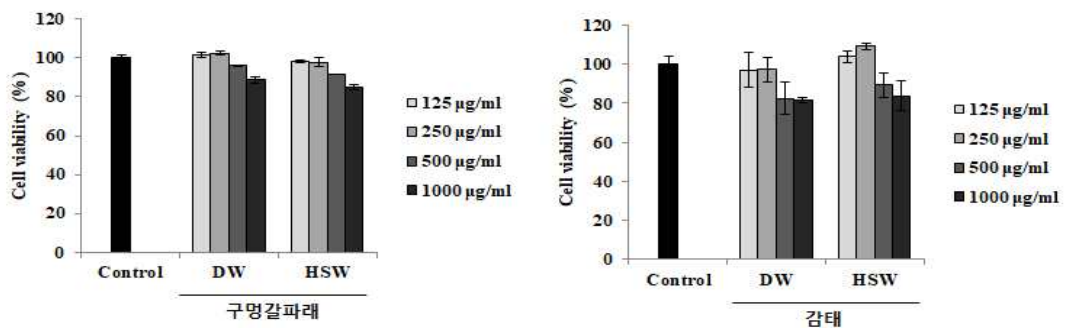
- 구멍갈파래, 감태의 발효물 모두 1,000 µg/ml농도까지 세포독성이 보이지 않는 것으로 확인되어 실험에는 1,000 µg/ml 농도에서 실험을 진행하였음.



<그림 4-2-16. Vero 세포에서 해조류의 발효물의 세포 생존율 및 ROS생성량>

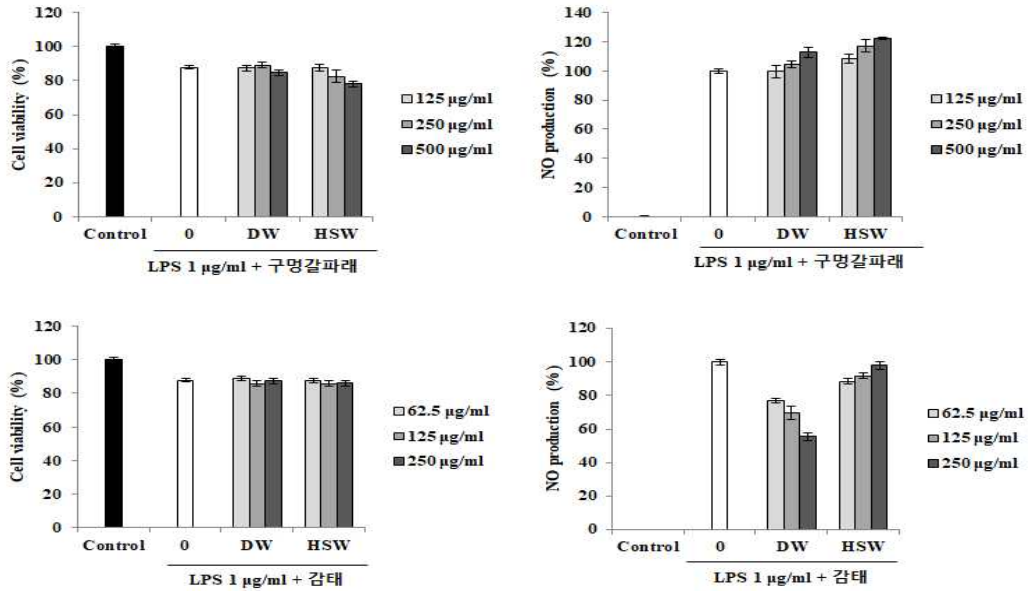
- Hydrogen peroxide로 자극시킨 세포 사멸을 구멍갈파래 DW는 농도가 증가할수록 세포 생존율을 증가시켰으며, 산화적 스트레스에 의한 ROS 증가를 농도가 증가할수록 ROS생성량을 감소시켜 구멍갈파래 DW는 Hydrogen peroxide에 의한 산화적 스트레스 억제 활성을 확인함
- Hydrogen peroxide로 자극시킨 세포 사멸을 감태 DW, HSW는 세포 생존율을 증가시켰으며, 산화적스트레스에 의한 ROS생성량을 감소시켜 감태 DW, HSW는 Hydrogen peroxide에 의한 산화적 스트레스 억제 활성이 확인할 수 있었음. 특히, DW 발효물이 항산화 활성이 우수함을 확인할 수 있었음.

○ 해조류(구멍갈파래, 감태)의 발효물의 항염증 활성 탐색



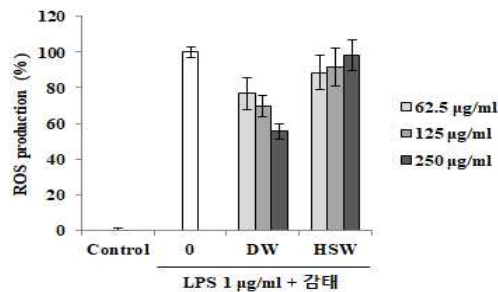
<그림 4-2-17. RAW264.7 세포에서 해조류의 발효물의 세포독성>

- 미세조류(구멍갈파래, 감태)의 배양조건에 따른 발효물 (DW, HS)의 RAW264.7 세포에서 MTT assay를 통한 세포독성 및 세포생존율과, Griess reagent를 활용한 NO 생성량, DCF-DA assay를 통한 ROS생성량을 측정하였음.
- 구멍갈파래 DW, HSW의 고농인 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 독성을 보였으며, 감태 DW, HSW의 500~1,000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 독성을 보여 구멍갈파래 500 $\mu\text{g/ml}$, 감태 250 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 실험을 진행하였음.



<그림 4-2-18. RAW264.7세포에서 해조류 발효물의 세포생존율 및 NO 생성량>

- LPS로 유도한 세포독성 확인결과 구멍갈파래 DW, HSW에서 세포보호 활성이 있음을 확인하였으며, NO 생성량 측정결과 NO 생성을 증가시켜 항염증 활성이 없는 것으로 확인되어짐.
- LPS로 유도한 세포독성 확인결과 감태 DW, HSW에서 세포보호 활성이 있음을 확인하였으며, NO 생성량 측정결과 DW에서 NO 생성을 감소시켜 항염증 활성이 있는 것으로 확인되어짐.



<그림 4-2-19. RAW264.7세포에서 감태 발효물의 ROS 생성량>

- LPS로 유도한 ROS생성량 측정결과 DW에서 ROS생성을 감소시켜 감태 DW는 ROS 활성화를 억제하여 항염증 활성을 나타내는 것으로 확인되어짐.

○ 해조류(구멍갈파래, 감태)의 발효물의 항당뇨 활성 탐색

- 해조류(구멍갈파래, 감태)의 배양조건에 따른 발효물 (DW, HSW)의 α -glucosidase 효소 억제 활성을 측정하였음.

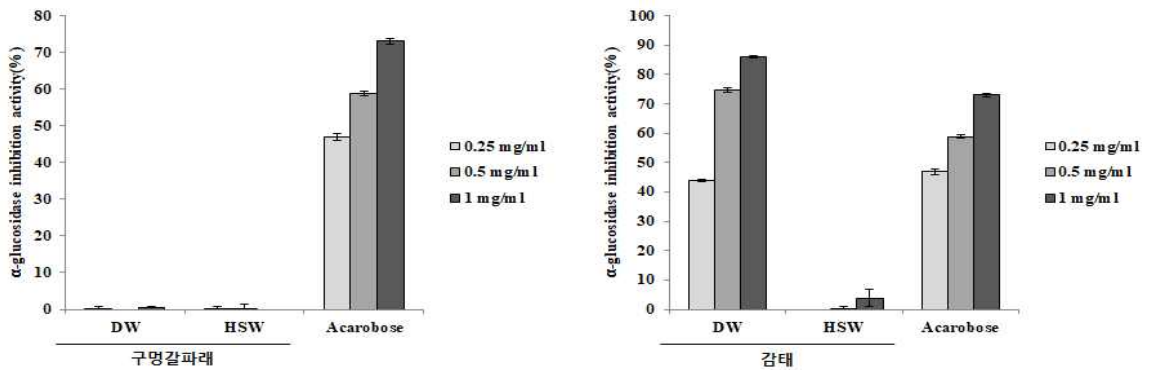


그림 4-2-19. 미세조류의 발효물의 α -glucosidase 효소 억제 활성

- α -glucosidase 효소 억제 실험결과 구멍갈파래에서는 α -glucosidase 효소 억제 활성을 확인할 수 없었지만 감태 DW에서 positive control로 사용된 Acarbose와의 활성을 비교하였을 때 우수한 효소 억제 활성을 나타내어 항당뇨 활성이 확인되어짐.

○ 해조류(구멍갈파래, 감태)의 발효물의 항암 활성 탐색

- 해조류(구멍갈파래, 감태)의 배양조건에 따른 발효물 (DW, HSW)의 Vero 세포에서 MTT assay를 통한 세포독성을 측정하였음.
- 항암활성은 폐암세포 (A549, H460, H1299), 대장암세포 (HCT116, SW620, CT26), 유방암세포 (HCC38, 1419, SKBR3)에서 MTT assay를 통한 세포생존율을 측정하였음.

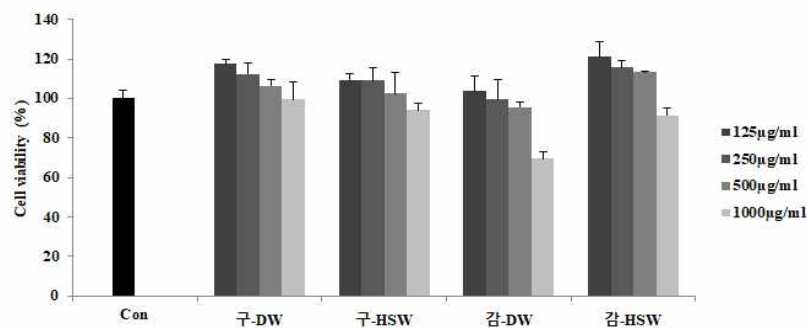
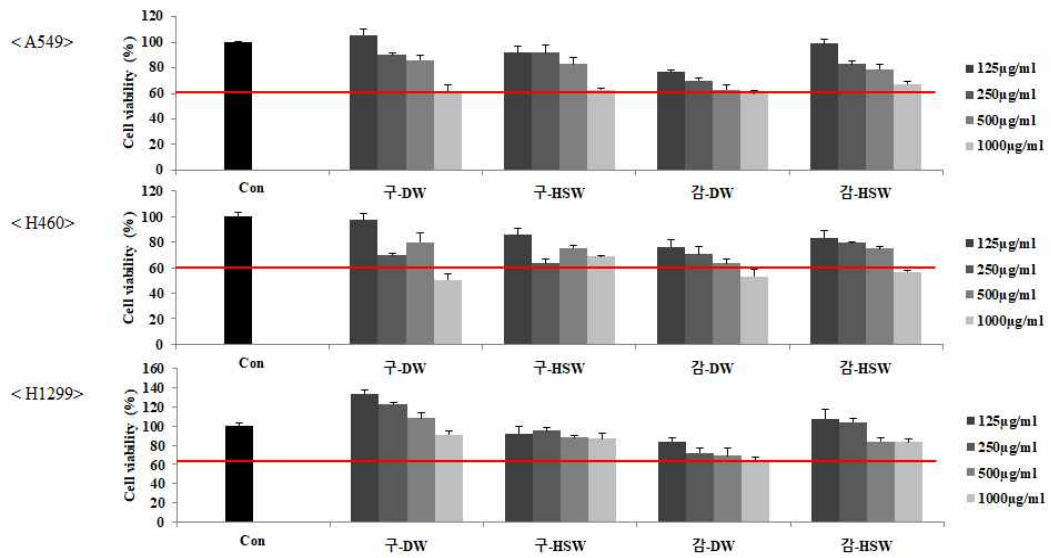
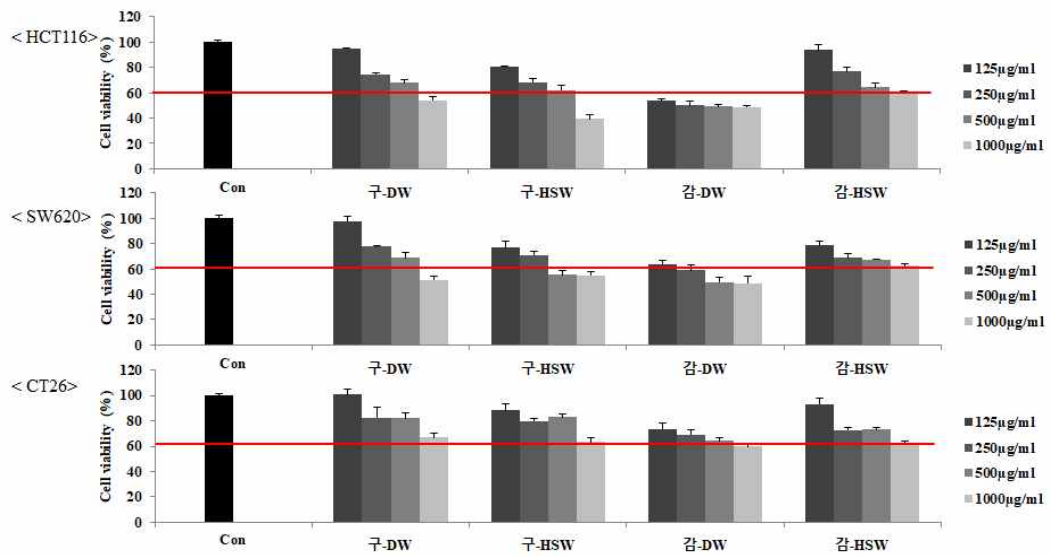


그림 4-2-20. Vero 세포에서 해조류 발효물의 세포독성

- 감태 DW 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 독성이 나타났지만 다른 샘플과 동일하게 최고농도까지 실험을 진행하였음.

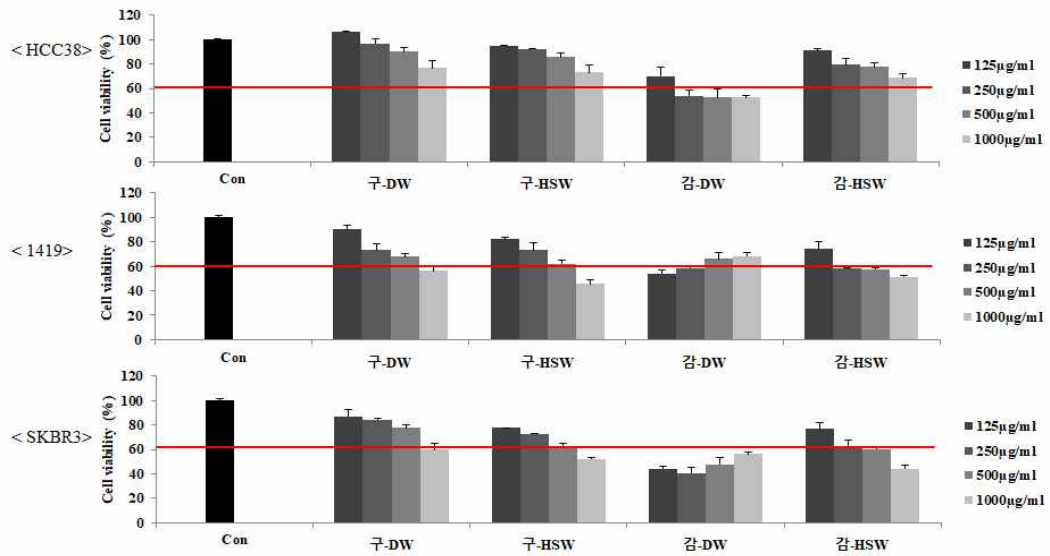


<그림 4-2-21. 폐암세포에서 해조류 발효물의 세포독성>



<그림 4-2-22. 대장암세포에서 해조류 발효물의 세포독성>

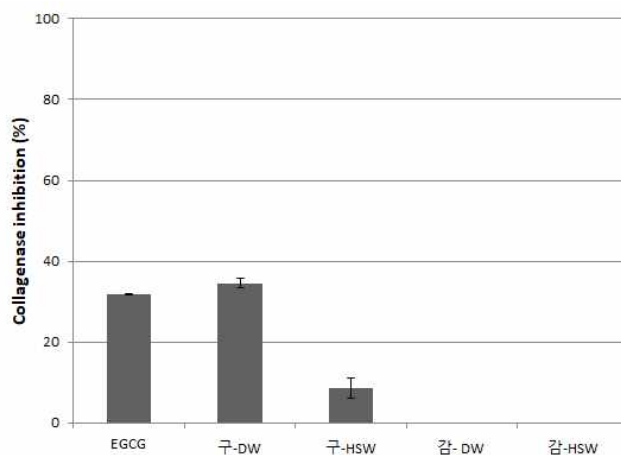
- 구멍갈파래, 감태 발효물에서 농도가 증가할수록 폐암, 대장암, 유방암 세포 억제활성을 나타내었으며, 특히 감태 DW에서 500 $\mu\text{g/ml}$ 이하농도에서 약 40%이상 암세포 억제활성을 확인할 수 있었음.



<그림 4-2-23. 유방암세포에서 해조류 발효물의 세포독성>

○ 해조류(구멍갈파래, 감태)의 발효물의 콜라겐 합성능력 측정

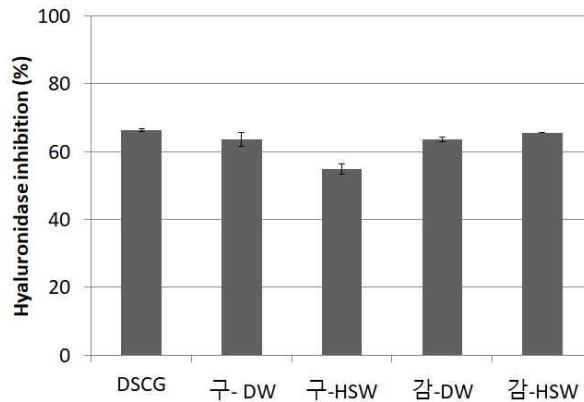
- 발효물의 콜라겐 합성능력 확인을 위해 collagenase 저해 활성을 측정
- Collagenase 저해활성은 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0)에 Azocoll(Azo dye-impregnated collagen) 1 mg을 녹인 기질액 0.8 ml 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 1.6 mg/ml 의 농도로 제조한 collagenase type I 효소 용액 0.1 mL을 첨가하여 43°C 에서 1시간 동안 반응시킨 후 반응이 완료되면 3000rpm에서 10분 동안 원심분리 시켜 상등액을 취하여 540 nm에서 흡광도를 측정.
- 시료는 모두 10mg/ml의 농도를 처리함. Positive control은 Epigallocatechin gallate(EGCG)을 사용하였으며 측정결과 구멍갈파래 발효물 DW에서 34.5%의 콜라게네이즈 저해 활성으로 EGCG(31.8%)보다 높은 저해 활성을 나타내었음. 구멍갈파래 HSW에서는 8.7% 저해활성을 나타내었고 감태 발효물에서는 활성이 나타나지 않음.



<그림 4-2-24 콜라겐 합성 능력>

○ 해조류(구멍갈파래, 감태)의 발효물의 보습활성

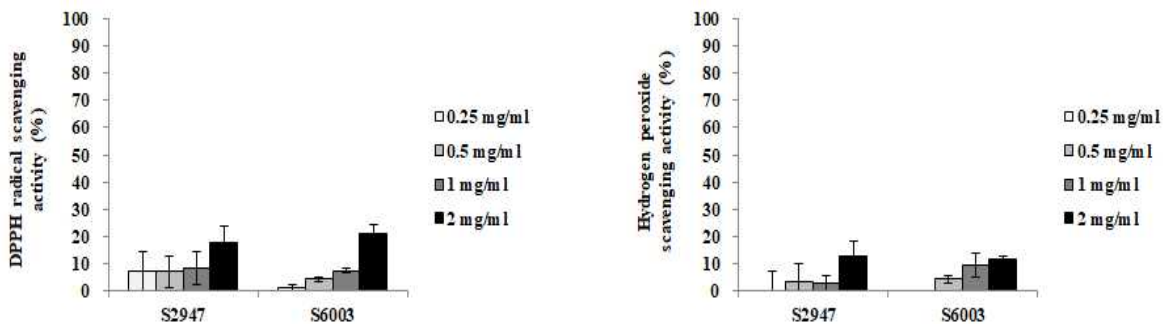
- 발효물의 보습능력을 확인하기 위해 Hyaluronidase 저해활성 측정. 0.1M acetate buffer (pH 3.5)에 녹인 HAase (8mg/ml) 10ul를 시료 용액 10ul와 혼합 시킨 후 37°C에서 20분간 반응.. HAase를 활성화 시키기 위하여 혼합액에 12.5 mM CaCl₂ 20ul를 가한 후 37°C에서 20분간 반응. 반응이 끝난 후 0.1M acetate buffer (pH 3.5)에 녹인 기질 용액 hyaluronate (2.4 mg/ml) 50ul를 반응액에 첨가하여 37°C에서 40분간 반응. 기질-효소 반응 정지를 위해 0.4N NaOH 20ul와 0.4M potassium tetraborate 20ul를 반응액에 가하여 100°C에서 3분간 반응시킨 후 DMAB solution 0.6 ml를 첨가하여 585 nm에서 흡광도를 측정.
- 시료는 모두 10mg/ml의 농도를 처리함. positive control로 Disodium cromoglycate (DSCG)를 사용하였으며 그 결과, 구멍갈파래 발효물 DW 및 HSW, 감태발효물 DW 및 HSW 처리구에서 hyaluronidase 저해활성이 각각 63.5 %, 54.9 %, 63.6 %, 65.6 %로 나타나 DSCG (66.3%)와 유사한 것으로 확인.



<그림 4-2-25. 해조류 발효물의 Hyaluronidase inhibition>

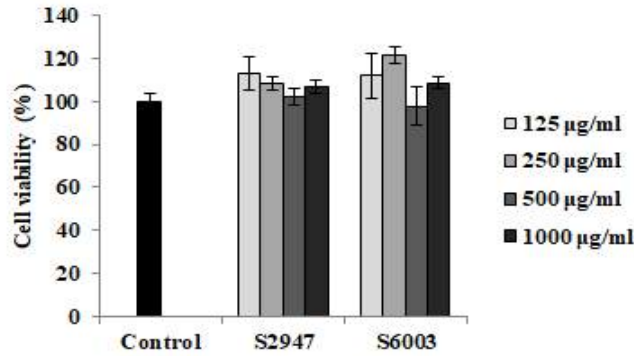
○ 미생물 발효물 (S2947, S6003)의 항산화 활성 탐색

- 미생물 발효물 (S2947, S6003)의 활성 산소 소거능 확인을 Hydrogen peroxide 소거능을 통해 측정하였음.



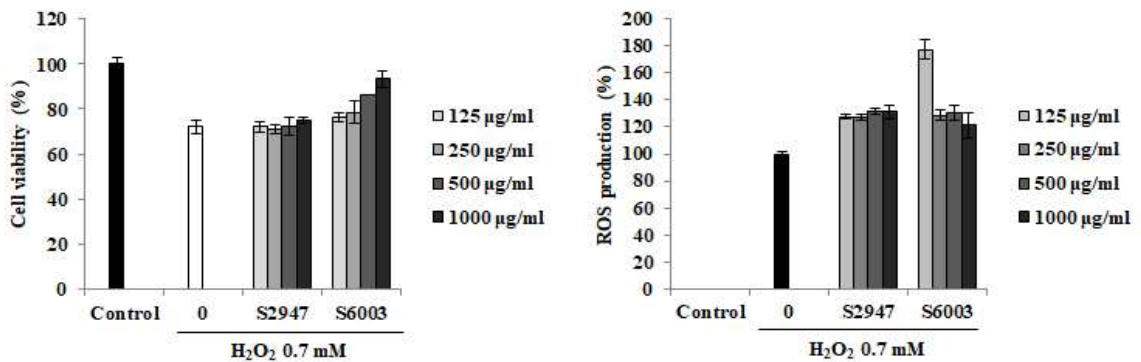
<그림 4-2-26. 미생물 발효물의 Hydrogen peroxide 소거능>

- Vero 세포에서 MTT assay를 통한 세포독성 및 세포생존율과, DCF-DA assay를 통한 ROS생성량을 측정하였음.
- 미생물 발효물에서는 DPPH radical, Hydrogen peroxide의 활성산소 소거능 확인할 수 없음.



<그림 4-2-27. Vero 세포에서 미생물 발효추출물의 세포독성>

- S2947, S6003 모두 1,000 µg/ml농도까지 세포독성이 보이지 않는 것으로 확인되어 실험에는 1,000 µg/ml 농도에서 실험을 진행하였음.

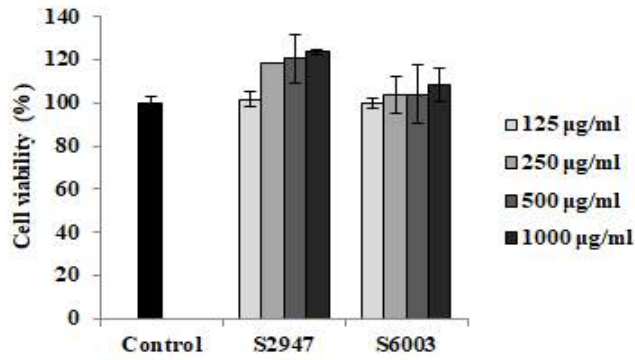


<그림 4-2-28. Vero 세포에서 미생물 발효추출물의 세포 생존율 및 ROS생성량>

- Hydrogen peroxide로 자극시킨 세포 사멸을 S6003는 농도가 증가할수록 세포 생존율을 증가시켰으며, 산화적스트레스에 의한 ROS 증가를 농도가 증가할수록 ROS생성량을 증가시켜 S6003은 Hydrogen peroxide에 대한 보호 활성은 있으나, ROS 생성을 감소시키지 못해 항산화 활성은 없는 것으로 확인되어짐.

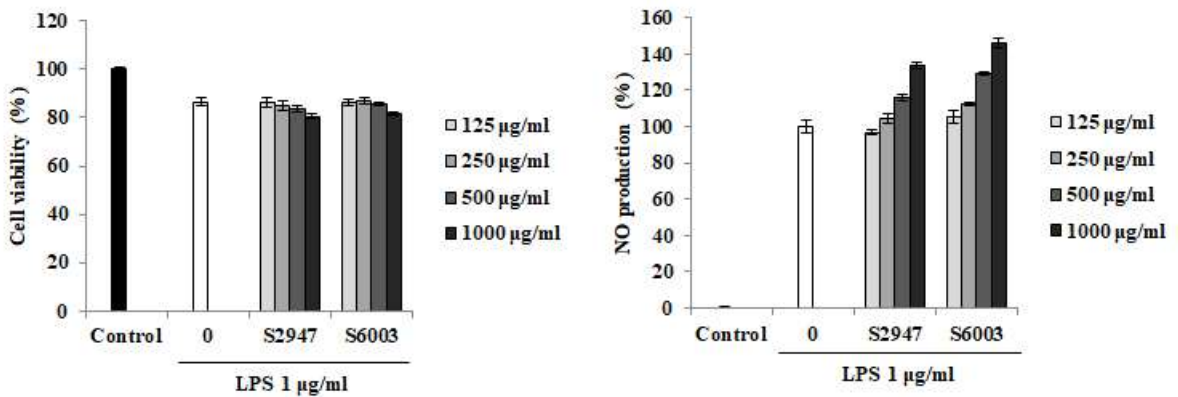
○ 미생물 발효물 (S2947, S6003)의 항염증 활성 탐색

- 미생물 발효물 (S2947, S6003)의 RAW264.7 세포에서 MTT assay를 통한 세포독성 및 세포생존율과, Griess reagent를 활용한 NO 생성량, DCF-DA assay를 통한 ROS생성량을 측정하였음.



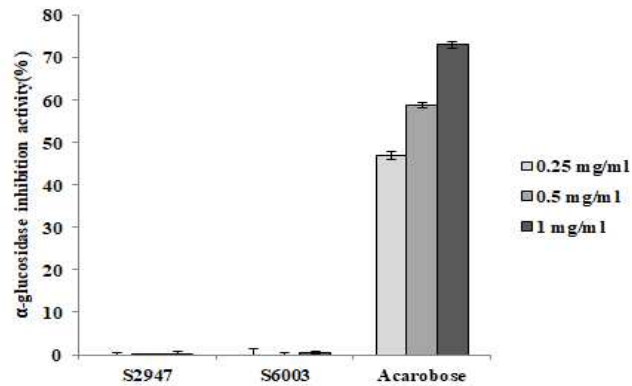
<그림 4-2-29. RAW264.7 세포에서 미생물 발효물의 세포독성>

- S2947, S6003 모두 1,000 µg/ml 농도까지 세포독성이 보이지 않는 것으로 확인되어 실험에는 1,000 µg/ml 농도에서 실험을 진행하였음.



<그림 4-2-30. RAW264.7세포에서 미생물 발효물의 세포생존율 및 NO 생성량>

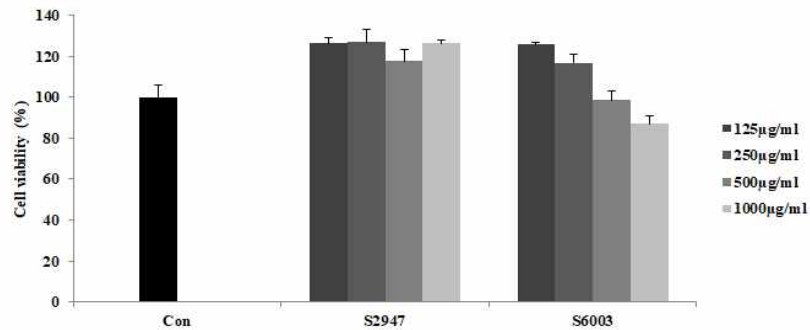
- LPS로 유도한 세포독성 확인결과 S2947, S6003에서 세포보호 활성이 있음을 확인하였음.
 - LPS로 유도한 NO 생성량 측정결과 S2947, S6003에서 NO 생성을 증가시켜 항염증 활성이 없는 것으로 확인되어짐.
- 미생물 발효물 (S2947, S6003)의 항당뇨 활성 탐색
- 미생물 발효물 (S2947, S6003)의 α-glucosidase 효소 억제 활성을 측정하였음.
 - α-glucosidase 효소 억제 실험결과 미생물 발효물 (S2947, S6003)에서는 α-glucosidase 효소 억제 활성을 확인 할 수 없었음.



<그림 4-2-31. 미생물 발효물의 α-glucosidase 효소 억제 활성>

○ 미생물 발효물 (S2947, S6003)의 항암 활성 탐색

- 미생물 발효물 (S2947, S6003)의 Vero세포에서 MTT Assay를 통한 세포독성을 측정하였음.
- 항암활성은 폐암세포 (A549, H460, H1299), 대장암세포 (HCT116, SW620, CT26), 유방암세포 (HCC38, 1419, SKBR3)에서 MTT assay를 통한 세포생존율을 측정하였음.



<그림 4-2-32. Vero 세포에서 미생물 발효물의 세포독성>

- S6003 1,000 μg/ml 농도에서 독성이 나타났지만 다른 샘플과 동일하게 최고농도까지 실험을 진행하였음.
- 미생물 발효물(S2947, S6003)의 항암(폐암, 대장암, 유방암) 활성 탐색

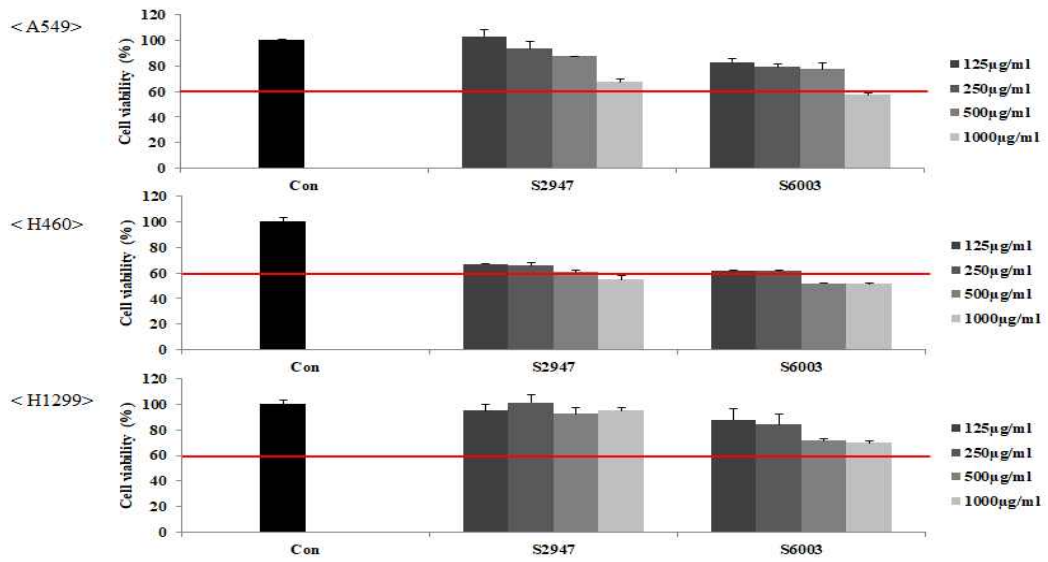
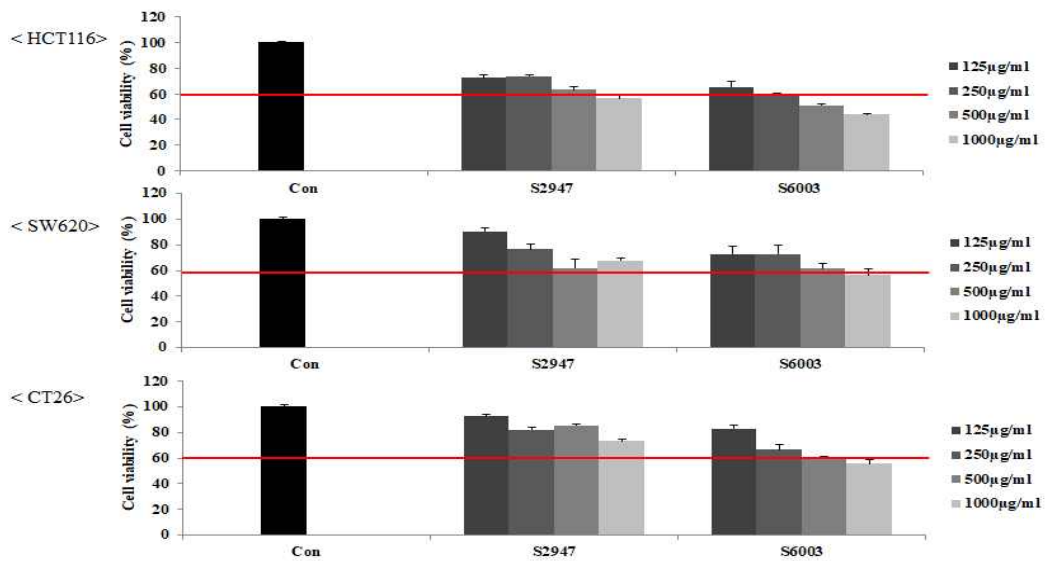
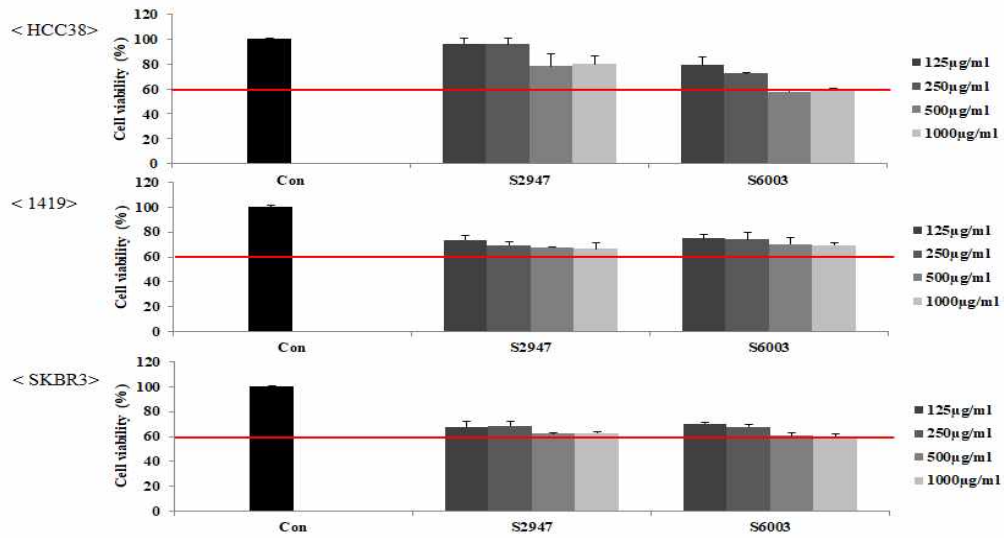


그림 4-2-33. 폐암세포에서 미생물 발효물의 세포독성



<그림 4-2-34. 대장암세포에서 미생물 발효물의 세포독성>

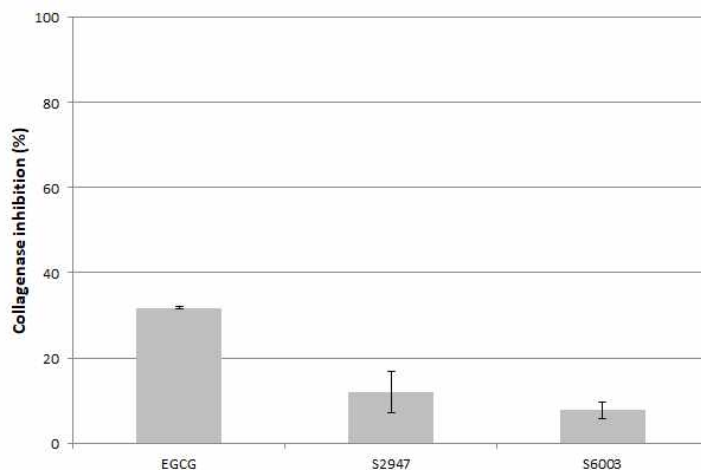


<그림 4-2-35. 대장암세포에서의 미생물 발효물의 세포독성>

- S2947과 S6003에서 농도가 증가할수록 폐암, 대장암, 유방암세포 억제활성을 나타냈으며, 특히 S6003에서 폐암세포 500 µg/ml 이하농도에서 약 40%이상 암세포 억제활성을 확인함.

○ 미생물 발효물 (S2947, S6003)의 콜라겐 합성능력 측정

- 발효물의 콜라겐 합성능력 확인을 위해 collagenase 저해 활성을 측정
- Collagenase 저해활성은 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0)에 Azocoll(Azo dye-impregnated collagen) 1 mg을 녹인 기질액 0.8 ml 및 시료용액 0.1 mL의 혼합액에 1.6 mg/ml 의 농도로 제조한 collagenase type I 효소 용액 0.1 mL을 첨가하여 43°C 에서 1시간 동안 반응시킨 후 반응이 완료되면 3000rpm에서 10분 동안 원심분리 시켜 상등액을 취하여 540 nm에서 흡광도를 측정. Positive control은 Epigallocatechin gallate(EGCG)을 사용하였으며 측정결과 S2947에서 12%, S6003에서 7.8%로 각각 나타냄.



<그림 4-2-36. 미생물 발효물의 콜라겐 합성능력>

○ 미생물 발효물 (S2947, S6003)의 보습활성

- 발효물의 보습능력을 확인하기 위해 Hyaluronidase 저해활성 측정.
- 10mg/ml 농도에서 Hyaluronidase 저해활성을 나타내지 않음

다. 항균물질 생산 해양미생물 탐색 및 추출물 제조

○ 항균활성을 나타내는 해양미생물 탐색

- 해양에서 분리한 미생물 111균주(108종)를 대상으로 colony picking method를 활용하여 항균 활성 미생물 탐색
- 병원성 미생물은 어류 병원성 미생물 4종(*Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio harvayi*, *Edwardsiella tarda*) 및 인체 유해균 6종(*Enterococcus faecalis*, *Citrobacter freundii*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Staphylococcus lentus*)을 대상으로 함
- colony picking method를 수행하기 위해 병원성 미생물과 테스트 미생물을 동시 배양해야 함으로 병원성 미생물을 배양하는 배지와 테스트 미생물을 배양하는 배지를 1:1로 혼합함으로써 양 쪽 미생물이 다 배양될 수 있음을 확인
- 병원성 미생물을 액체배양 후 각각의 미생물에 적합한 한천배지에 도말하고 각각 순수배양된 테스트 해양미생물 111균주를 그 위로 이주시게를 이용해 picking 한 후 30°C에서 1일간 배양

<표 4-3-1. 해양에서 분리된 미생물 111균주>

Strain name	Strain name	Genities	Strain name	Strain name	Genities	Strain name	Strain name	Genities
32044	<i>Acetivibacter indus</i> C.F. 110367(T)	99.73	34201	<i>Erythrobacter flavus</i> S.M. 446(T)	99.93	36616 (green)	<i>Pseudomonas rubra</i> ATCC 29670(T)	99.85
31391	<i>Acetivibacter lundii</i> DSM 14970(T)	97.75	31241	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i> DSM 8208(T)	99.79	37366 (red)	<i>Pseudomonas rubra</i> ATCC 29670(T)	99.85
30695	<i>Acetivibacter venustus</i> RAB-1(T)	99.89	32005	<i>Exiguobacterium profundum</i> 100 (T)	99.73	36030	<i>Pseudomonas rubra</i> DSM 300(T)	99.86
34774	<i>Aerulibacter aggregatus</i> M. 169(T)	100.00	32971	<i>Ferribacillus phosphotolerans</i> CaTT(T)	100.00	32914	<i>Pseudomonas shibasakiensis</i> JS3(T)	99.45
34660	<i>Acanthorax venustus</i> B04(T)	99.86	34891	<i>Saetubacter laevis</i> B.0119.014(T)	100.00	34648	<i>Pseudomonas shanghaensis</i> JS79(T)	99.40
37363	<i>Aeromonas saba</i> 190(T)	97.08	37381	<i>Saetubacillus m. arinus</i> HB09003(T)	99.86	31936	<i>Pseudomonas japonica</i> HBR.0.103040(T)	99.83
32026	<i>Aeromonas trossi</i> 1(T)	98.22	30958	<i>Saetubacillus languiensis</i> DSM 21883(T)	99.86	31958	<i>Pseudomonas lundii</i> DSM 13(T)	99.84
33205	<i>Aeromonas gracilis</i> 962(T)	99.85	34969	<i>Staphylococcus aerogenes</i> H.07C.2190(T)	99.88	31168	<i>Pseudomonas khazaria</i> T22(T)	99.81
33632	<i>Aeromonas borea</i> TF-22(T)	99.11	31244	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> DSM 4184(T)	99.88	3124	<i>Pseudomonas antarctica</i> DSM 10.1.1262(T)	99.71
30585	<i>Aeromonas mesocondria</i> ATCC 27126(T)	99.93	34933	<i>Staphylococcus aureus</i> H.07C.2190(T)	99.29	35170	<i>Pseudomonas boydii</i> DSM 157(T)	97.17
32165	<i>Aeromonas mediterranea</i> DE(T)	99.17	32053	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 4184(T)	99.99	34368	<i>Pseudomonas antarctica</i> DSM 29819(T)	97.90
36264	<i>Bacillus aquovorans</i> M. 2(T)	100.00	34655	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 4184(T)	99.79	35050	<i>Psychrobacter aeris</i> ATCC 101(T)	97.80
33183	<i>Bacillus aquovorans</i> M. 2(T)	99.82	073	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 4184(T)	99.86	33730	<i>Rhizobium lotum</i> DSM 363(T)	100.00
32947	<i>Bacillus aquovorans</i> TF-12(T)	99.25	M.E.B.018795	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 4184(T)	3.1190	31190	<i>Rhizobium lotum</i> DSM 363(T)	99.86
33304	<i>Bacillus coahuilensis</i> M. 4(T)	99.88	34612	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 4184(T)	99.48	32908	<i>Roseovarius halobius</i> DSM 10272(T)	99.12
32982	<i>Bacillus firmus</i> HBR.16305(T)	99.48	079	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 4184(T)	99.04	3250	<i>Roseovarius stantoni</i> ATCC 122(T)	99.84
32386	<i>Bacillus flexus</i> HBR.16716(T)	100.00	39688	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 4184(T)	99.83	33748	<i>Roseovarius stantoni</i> DSM 12(T)	99.71
32845	<i>Bacillus gottschalkii</i> C. 4685(T)	100.00	39650	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 4184(T)	99.72	33698	<i>Roseovarius stantoni</i> DSM 12(T)	100.00
35245	<i>Bacillus halodurans</i> DSM 93(T)	99.23	32041	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 4184(T)	100.00	077	<i>Saccharosporium antarcticum</i> DSM 157(T)	99.48
32392	<i>Bacillus halodurans</i> DSM 93(T)	99.86	33817	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 4184(T)	99.82	35814	<i>Salinibacterium aureum</i> DSM 157(T)	99.87
32023	<i>Bacillus indus</i> DSM 22865(T)	99.88	33855	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 4184(T)	99.93	31236	<i>Salinibacterium aureum</i> DSM 157(T)	99.58
32245	<i>Bacillus mediterraneus</i> R.0.1(T)	99.73	31771	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 4184(T)	99.84	30968	<i>Salinibacterium aureum</i> DSM 157(T)	99.93
30382	<i>Bacillus myzocorcorans</i> R.0.1(T)	99.48	33241	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 4184(T)	99.25	34482	<i>Salinibacterium aureum</i> DSM 157(T)	97.17
37399	<i>Bacillus pasteurii</i> ATCC 7061(T)	99.83	33110	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 4184(T)	99.90	34258	<i>Salinibacterium aureum</i> DSM 157(T)	99.84
37877	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. pasteurii DSM 10429(T)	100.00	33187	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 4184(T)	99.82	31180	<i>Salinibacterium aureum</i> DSM 157(T)	99.89
M.E.B.018779	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. pasteurii		34384	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 4184(T)	100.00	M.E.B.018150	<i>Salinibacterium aureum</i>	
34030	<i>Bacteroides aryae</i> DSM 4184(T)	99.88	37853	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 4184(T)	99.92	31182	<i>Salinibacterium aureum</i> DSM 157(T)	99.79
33889	<i>Bifidobacterium bifidum</i> DSM 384(T)	100.00	33112	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 4184(T)	100.00	37879	<i>Salinibacterium aureum</i> DSM 157(T)	99.88
37903	<i>Bifidobacterium bifidum</i> DSM 384(T)	99.79	34105	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 4184(T)	99.93	31984	<i>Salinibacterium aureum</i> DSM 157(T)	99.73
M.E.B.018867	<i>Bifidobacterium bifidum</i>		31189	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 4184(T)	97.88	32388	<i>Salinibacterium aureum</i> DSM 157(T)	99.40
M.E.B.018815	<i>Campylobacter coli</i>		34345	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 4184(T)	100.00	34078	<i>Salinibacterium aureum</i> DSM 157(T)	99.82
3103	<i>Campylobacter coli</i>	99.00	31894	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 4184(T)	99.28	31788	<i>Salinibacterium aureum</i> DSM 157(T)	97.84
33662	<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 277(T)	99.89	37708 (green)	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 4184(T)	99.18	M.E.B.018884	<i>Salinibacterium aureum</i>	
30366	<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 277(T)	99.00	31168 (purple)	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 4184(T)	99.59	32077	<i>Salinibacterium aureum</i> DSM 157(T)	99.98
34379	<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 277(T)	99.79	38435	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 4184(T)	99.93	33328	<i>Salinibacterium aureum</i> DSM 157(T)	99.93
34183	<i>Citrobacterium freundii</i> DSM 33403(T)	100.00	32140	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 4184(T)	99.79	31873	<i>Salinibacterium aureum</i> DSM 157(T)	99.93
33882	<i>Erythrobacterium aurantiacum</i> DSM 110(T)	98.72	32233	<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 4184(T)	100.00	36003	<i>Salinibacterium aureum</i> DSM 157(T)	99.88



<그림 4-3-1. Colony picking method를 이용한 항균물질 생산 미생물 탐색>

- Colony picking method 실험 결과 어류병원균과 인체유해균에 활성을 갖는 18균주 확보
- 항균물질 생산 해양미생물 18균주(16종) 탐색 (colony picking method)

표 4-3-2. 어류 병원균 및 인체 유해균에 활성을 나타내는 미생물

Strain names (Stock no.)	Similar strains	Similarities (%)	Fish pathogen					Human pathogen				
			Aeromonas hydrophila	Vibrio parahaemolyticus	Vibrio harveyi	Edwardsiella tarda	Enterococcus faecalis	Citrobacter freundii	Staphylococcus epidermidis	Pseudomonas aeruginosa	Candida albicans	Staphylococcus lentus
S5284	Bacillus aequororis M-8(T)	100.00	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
S7899	Bacillus pumilus ATCC 7061(T)	99.93	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
S4030	Bacterioplanes sanyensis GYP-2(T)	99.36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S7903	Brachybacterium paraconglomeratum LMG 19861(T)	99.79	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
S103	Celeribacter neptunius	96	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
S7859	Epibacterium mobile DSM 23403(T)	99.78	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
S7706 (green)	Pseudoalteromonas luteoviolacea DSM 6061(T)	99.18	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+
S1156 (purple)	Pseudoalteromonas luteoviolacea DSM 6061(T)	99.59	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
S2233	Pseudoalteromonas piscicida JCM 20779(T)	100.00	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
S6516 (green)	Pseudoalteromonas rubra ATCC 29570(T)	99.86	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
S7366 (red)	Pseudoalteromonas rubra ATCC 29570(T)	99.65	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S6030	Pseudoalteromonas ruthenica KMM 300(T)	99.66	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
S1131	Pseudoalteromonas xiamenensis	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
S1389	Pseudomonas juntendi BML3(T)	99.84	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
S1236	Salinimonas lutmaris DPSR-4(T)	99.58	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
MEBIC06894	Vibrio natriegens	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
S1873	Zooshikella ganghwensis JC2044(T)	99.93	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+
S6003	Zunongwangia atlantica 22II14-10F7(T)	99.86	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

○ 추출물 제조 및 항균활성 측정

- 항균활성을 갖는 미생물 중 다양한 병원성 미생물에 활성을 갖는 14균주를 선별하여 Marine broth에 48시간 100ml 배양



그림 4-3-2. Marine broth 활용 미생물 배양

- 배양된 미생물을 원심분리기를 이용하여 상등액 제거 후 침전물에 EtOH 100ml 첨가 후 24시간 침윤 추출

- EtOH 추출물을 감압 농축하여 조추출물을 얻어 증류수와 n-BuOH로 분획하여 염과 수용성물질을 제거한 후 분리된 유기물로 항균활성 실험 진행



<그림 4-3-3. n-BuOH 분획을 통한 수용성 물질 및 염 제거>



<그림 4-3-4. 해양미생물 14균주에 대한 EtOH 추출물>

- 인체 유해균 9종에 대한 에탄올 추출물의 항균활성 측정: 분획한 추출물을 1mg/ml의 농도로 희석하여 paper disc에 20μl를 접종한 뒤 병원성 미생물이 도말된 agar plate에 올려 24시간 배양하여 항균활성 확인

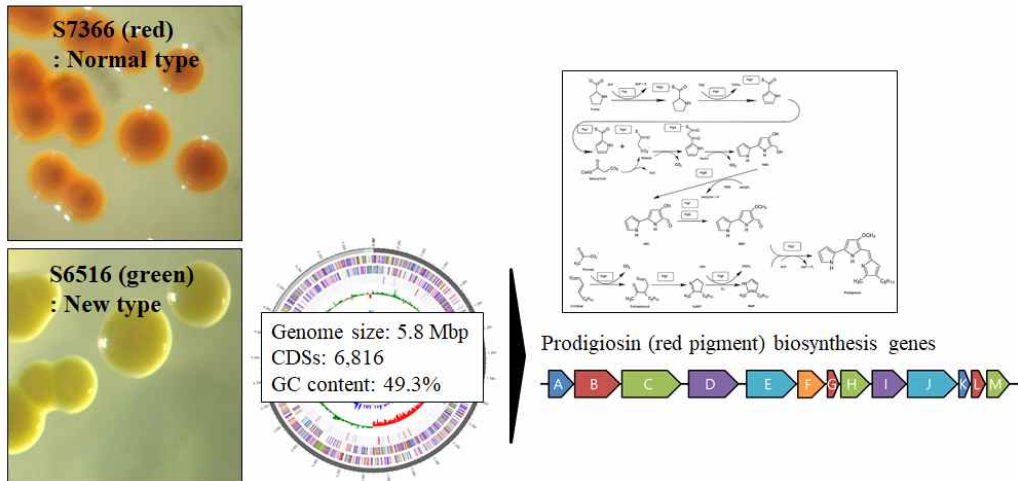
<표 4-3-3. 인체 유해균 9종에 대한 14균주의 에탄올 추출물 항균활성>

Strain names (Stock no.)	Similar strains	Similarities (%)	Human pathogen								
			Enterococcus faecalis	Citrobacter freundii	Staphylococcus epidermidis	Pseudomonas aeruginosa	Candida albicans	Staphylococcus lentus	Escherichia fergusonii	Kocuria rhizophila	Listeria monocytogenes
S5284	Bacillus aequororis M-8(T)	100.00	+	+	+	+	+	+	+	+	
S7899	Bacillus pumilus ATCC 7061(T)	99.93	-	+	+	+	-	+	+	+	
S7903	Brachybacterium paraconglomeratum LMG 19861(T)	99.79	+	+	-	+	-	+	+	+	
S7859	Epibacterium mobile DSM 23403(T)	99.78	+	+	+	+	+	+	+	+	
S7706 (green)	Pseudoalteromonas luteoviolacea DSM 6061(T)	99.18	+	+	+	+	-	+	+	+	
S1156 (violet)	Pseudoalteromonas luteoviolacea DSM 6061(T)	99.59	-	+	+	+	+	+	+	+	
S985	Pseudoalteromonas piscicida ATCC 15057(T)		-	+	-	+	+	+	+	-	
S6516 (green)	Pseudoalteromonas rubra ATCC 29570(T)	99.86	+	+	+	+	+	-	+	+	
S7366 (red)	Pseudoalteromonas rubra ATCC 29570(T)	99.65	+	+	+	+	+	-	+	-	
S6030	Pseudoalteromonas rutenica KMM 300(T)	99.66	+	-	+	+	+	+	+	-	
S1131	Pseudoalteromonas xiamenensis Y2(T)		+	+	-	+	-	+	+	+	
S1389	Pseudomonas juntendi BML3(T)	99.84	+	+	+	-	-	-	+	+	
S1236	Salinimonas lutimaris DPSR-4(T)	99.58	+	+	+	+	-	+	+	+	
S6003	Zunongwangia atlantica 22II14-10F7(T)	99.86	+	+	+	+	-	+	+	+	

very strong strong weakly

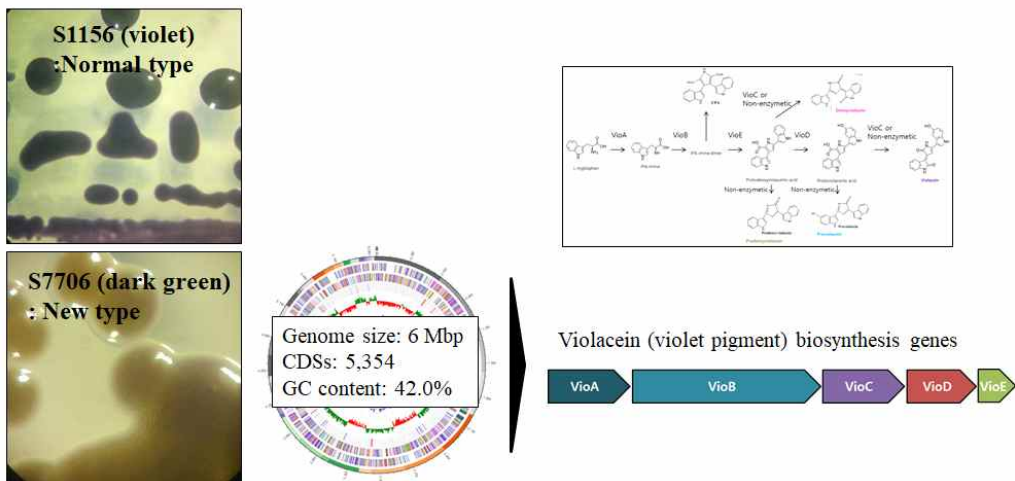
- 선택된 균주들의 에탄올 추출물들은 전반적으로 인간 유해균들에 다양하게 항균활성을 나타냄
- 기존의 균주와 유전학적으로 거의 유사하나 다른 pigment를 생산하는 두 종(*P. rubra* S6516, *P. luteoviolacea* S7706)으로부터 유전체 분석을 수행함
- *P. rubra* S6516의 유전체로부터 항균물질인 prodigiosin을 생합성하는 유전자들을 확보-분석한 결과 prodigiosin을 생합성하는 13개의 유전자로 구성된 오페론 확인
- *P. luteoviolacea* S7706의 유전체로부터 항균물질인 violacein을 생합성하는 유전자들을 확보-분석한 결과 violacein을 생합성하는 5개의 유전자(VioA~E)로 구성된 오페론 확인
- *P. luteoviolacea* S1156 / *P. luteoviolacea* S7706 과 *P. rubra* S7366 / *P. rubra* S6516 각 균주들을 유전체 분석 후 유전적 차이를 확인하고 *E. coli*에서 각 유전자를 활용하여 단백질 발현 실험 진행 중

Pseudoalteromonas rubra



<그림 4-3-5. 항균활성을 갖는 *P. rubra* 균주의 유전체 분석 및 prodigiosin biosynthesis genes>

Pseudoalteromonas luteoviolacea



<그림 4-3-6. 항균활성을 갖는 *P. luteoviolacea* 균주의 유전체 분석 및 violacein biosynthesis genes>

5. 냉수층 공간을 이용 위생안전 어·패류 복합양식해양생물자원개발

가. 수질 환경 및 수층공간 먹이생물 분포도

○ 수질환경

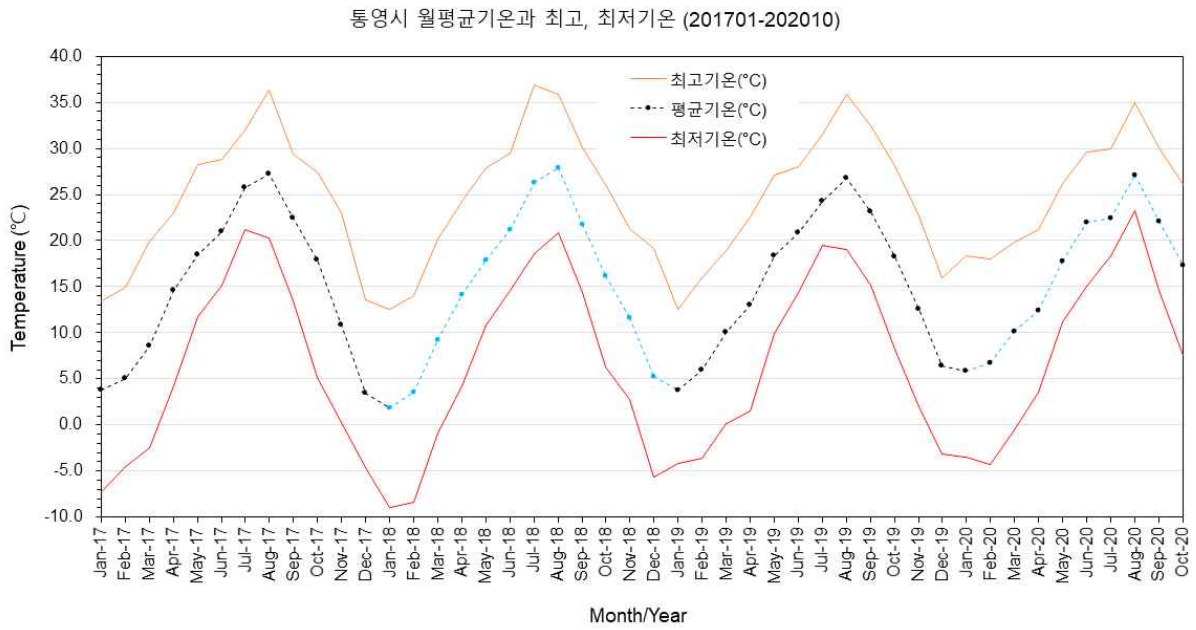
- 가리비, 우렁쟁이, 연어 등 냉수성 생물자원 양식에 있어 먹이생물의 파악, 해수의 유동, 병원체의 발현, 부착생물 방지 및 제거, 적정 서식수온 등 물리·화학적, 그리고 생물학적인 다양한 관점을 고려하여 적정서식지와 안정된 수층공간을 찾아 분석하여 대상생물의 정확한 생태환경 정보를 획득하는 것이 냉수성 어·패류 양식 초기의 유생시기 관리와 개체의 성장관리 및 촉진에 무엇보다 중요함
- 특히, 냉수성 대상생물인 가리비, 우렁쟁이, 연어 등의 양식에 있어 적정서식처의 해양 수질환경요인의 시·공간적 특성변화 분석은 냉수성 생물자원개발 양식기술의 성공 가능성을 결정할 수 있는데, 일시적인 동해의 저수온과 서남해의 여름철 고수온은 가리비 폐사를 유발하여 양식에 치명적인 영향을 미치고 있으며, 바이러스에 의한 우렁쟁이의 물렁증병 등은 어업인의 소득감소 및 수출에 영향을 미치고 있음. 따라서 일정한 적정수온을 유지하고 수온변화가 동해안보다 상대적으로 적을 것으로 예상되는 남해 통영연안의 해양과학기술원 해상과학기지 남측 해역을 실험대상 지역으로 선정함.
- 본 연구의 대상종인 참가리비라 부르는 큰가리비 (*Patinopecten yessoensis* Jay, 1857)의 산란은 주로 3-5월에 이루어졌으며, 최적 산란수온은 9.5~10.5°C, 난발생 최적수온은 10~15°C, 최적염분은 비교적 높은 37 psu로 알려져 있음. 또한 서식수심은 최대 60m 서식수온은 5~23°C 범위로 1년 중 봄·가을에 가장 높은 성장률을 보이며, 고수온기인 여름과 저수온기인 겨울철에 낮은 성장률을 보임 (장, 2002). 또한 Park (1998)과 Chung *et al.* (2008)은 성장 최적수온을 10~15°C로 보고하기도 하였으므로 이 종은 고수온과 저염분에 저항력이 떨어지고, 낮은 용존산소에도 영향을 받을 것으로 예상됨.
- 한해성 (寒海性)인 큰가리비에 비해 난해성 (暖海性) 비단가리비 (*Chlamys farreri* Jones & Preston, 1904; 파래가리비)는 수심 10~30m의 국내 전 연안에서 출현하며 자웅이체로 초승달 모양의 생식소 색상은 수컷은 유백색, 암컷은 분홍색을 띠고 6월말~7월초 (1차)와 9월초~중순 (2차)까지 2회 산란함. 최적산란수온은 7월초 (1차)에 14~15°C, 9월초 (2차)에 17~19°C이며, 서식수온은 3~28°C(최적수온 20~23°C)로 25°C 이상의 고수온과 8°C 이하의 저수온기는 낮은 성장률을 보임 (장, 2002). 수온과 염분변화에 강하고 성숙과 성장이 빨라서 약 3 cm 정도의 종묘를 수하식으로 양성했을 경우, 1년에 약 6~7 cm로 성장하여 수확 할 수 있는 장점이 있음.
- 척삭동물의 멧게과인 우렁쟁이 (*Halocynthia roretzi*)는 국내 전 연안에 분포하나, 주로 동해와 남해안에 많이 서식하며 수심 20 m 전후까지 서식. 적정 서식수온은 5~24°C, 수온 10°C 전후의 10월 중순에 산란하는 자웅동체이다. 성장은 2년 후에 8~10 cm 되면 수확 함 (유, 2000).
- 회유성인 연어 (*Oncorhynchus keta*)는 산란하기 위해 9~10월에 강으로 거슬러 올라가며 서식수온은 2~13°C로 여름철 20°C 이하, 서식염분은 33.8 psu, 산란수온은 5~8°C로 알려짐 (김, 1987).

- 위와 같은 냉수성 어·패류 생물자원의 서식환경 특성과 수질환경 자료를 참고하여 냉수성 어·패류 양식을 위한 최적의 수층공간활용 기술개발연구와 이를 통한 생산량 증대를 통해 지자체의 어민소득증대 향상에 기여하고자 한다. 조사지역은 통영 남측 해안으로 2017년~2020년 동안 적정서식지 환경조사를 위해 매일 주요 수질환경요인에 대한 시·공간적 변화를 분석함
- 수층공간 활용을 통한 냉수성 복합생물자원 개발 양식 적지 선정을 위해 통영 주변해역의 3개 지점 (그림 5-1-1)에서 2016년 11월 ~ 2020년 10월사이 매월 1회씩 CTD (SBE-19 Plus V2) 을 이용하여 수행수질환경 요인을 조사함.



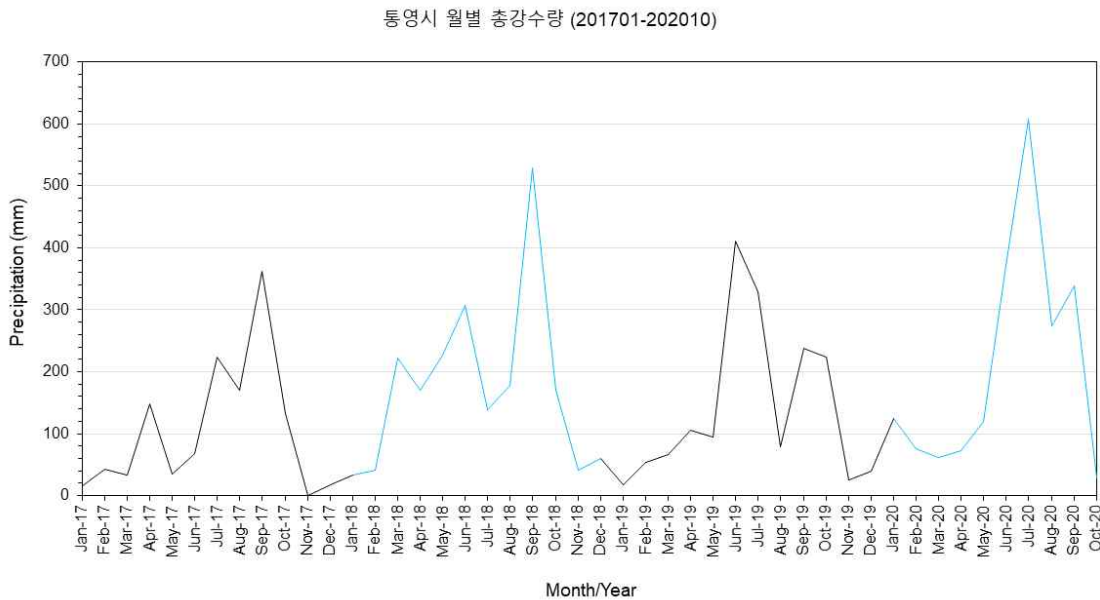
〈그림 5-1-1. 수층공간 활용을 통한 냉수성 복합생물자원 개발을 위한 수질환경조사 정점 (통영 연안)〉

- 측정된 CTD 자료는 전용 프로그램 SeaTerm V2와 Excel 2016을 이용하여 분석하였으며 조사 기간 동안에 기상청 기상자료개방포털의 통영센터에서 2017년~2020년 동안 측정된 기상관측자료 (기상청, 2020)를 추출하여 통영시의 육상기온 및 강수량 변화를 분석함
- 육상기온 (Air Temperature) : 기온은 겨울철인 12-2월 사이에 매우 낮은 값을 보이는데 2018년 1월에 -9.0℃로 가장 낮은 값을 보였으며 여름철 최고기온은 6-8월 사이로 2018년 6월 36.9℃로 최고기온을 보임 (그림 5-1-2)



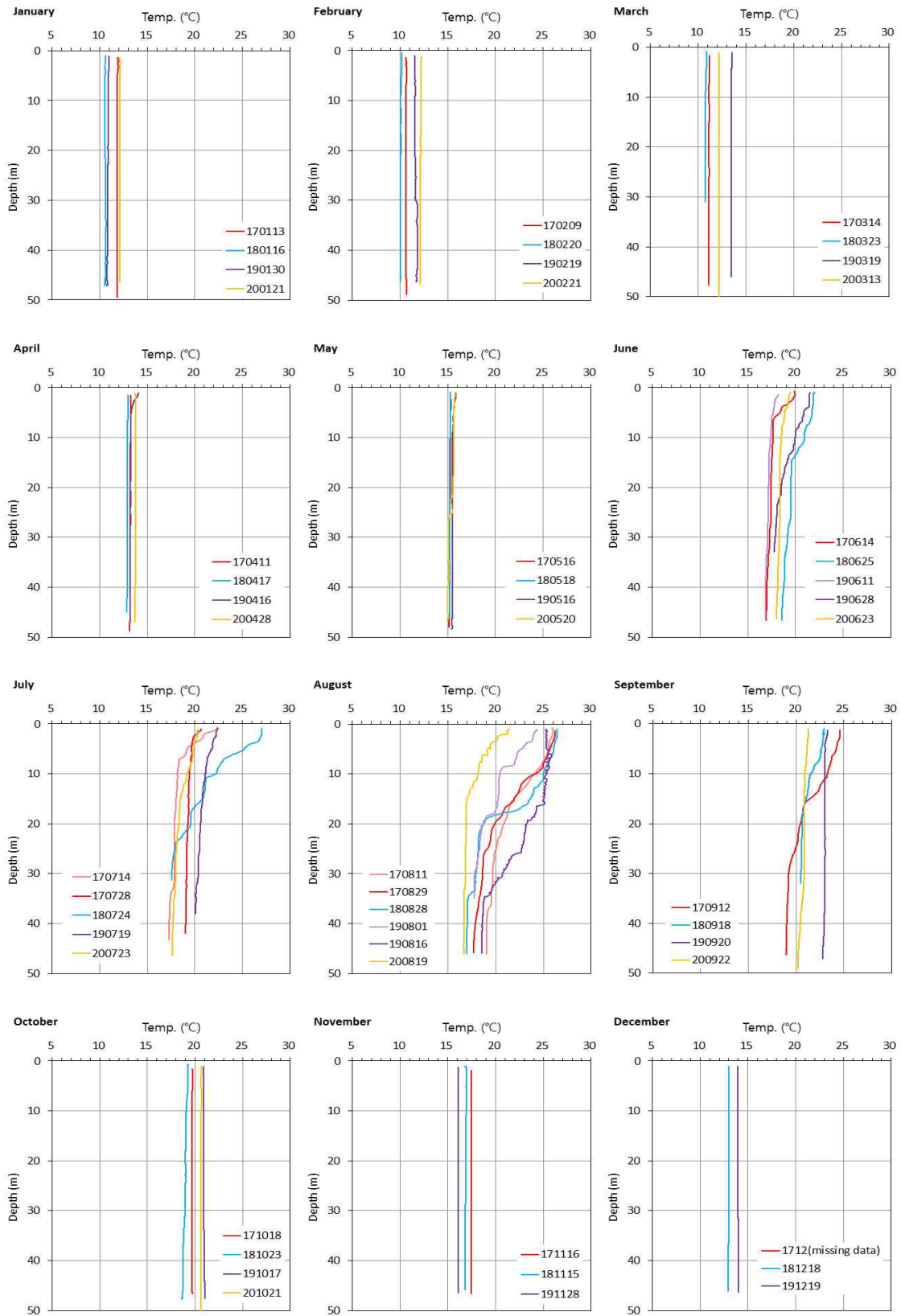
<그림 5-1-2. 2017년-2020년 조사기간 동안 통영시 월별 평균기온과 최고기온 및 최저기온 (기상청, 2020).>

- 강수량 (Precipitation) : 지난 30년 동안 (1981-2010년)의 측정 결과에 따르면 통영시 연평균 강수량은 1,450.8 mm로 국내 연평균 강수량 1,277 mm보다 다소 높게 나타나고 있으며 조사기간 동안 통영관측센터에서 측정한 총 연강수량은 2017년의 경우 1,249.4 mm, 2018년은 2,118.7 mm, 2019년은 1,684.6 mm, 2020년 10월까지 2,071.8 mm였음 (그림 5-1-3).

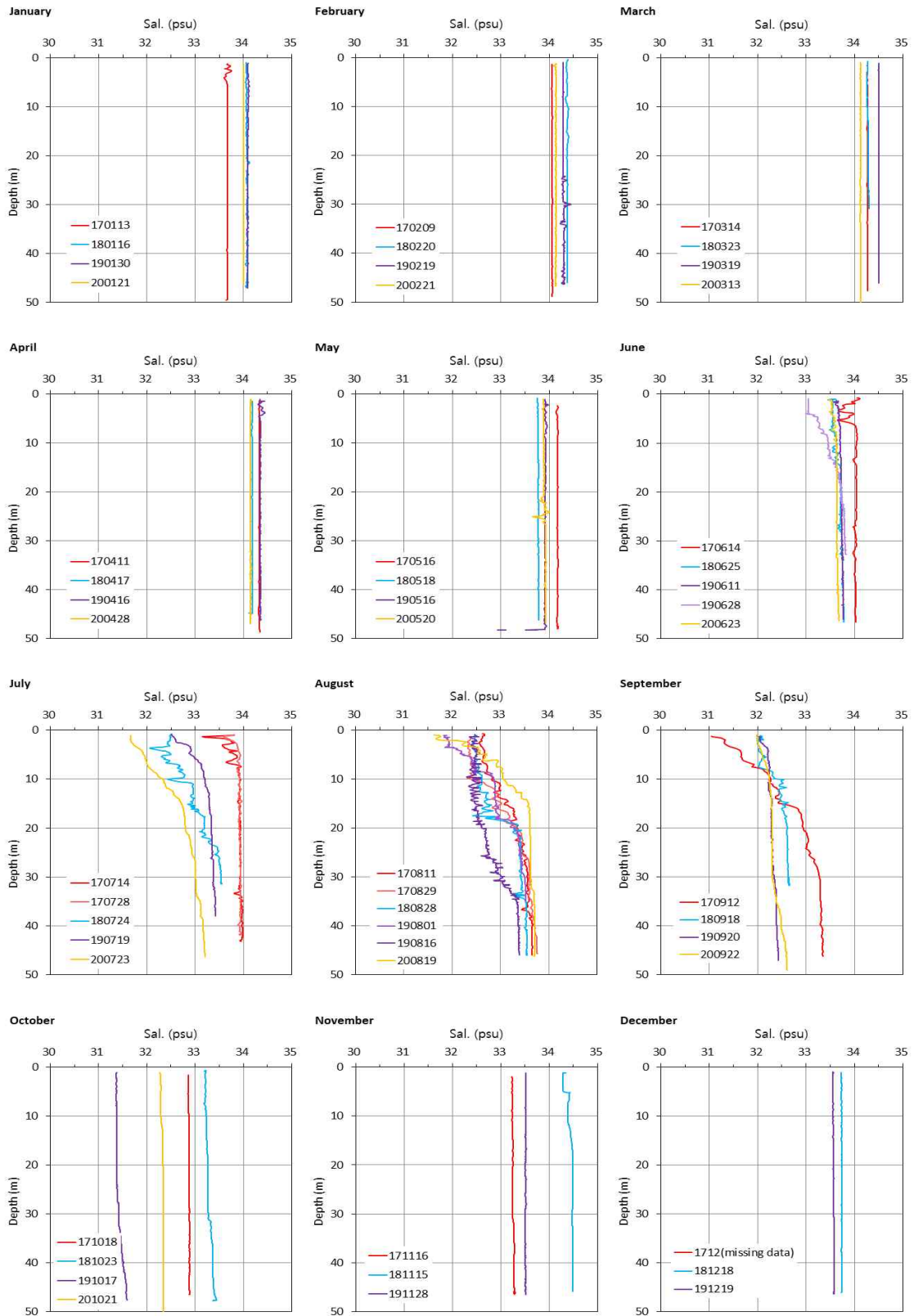


<그림 5-1-3. 2017년-2020년 조사기간 동안 통영시 월별 총강수량 현황 (기상청, 2020).>

- 계절별로는 6~9월 사이에 집중 호우 등으로 인하여 높은 강수량을 보였으며 (169.7-529.4 mm) 11-1월 사이 (1.0-33.8 mm)에 매우 낮은 강수량을 보이나 2020년은 예외적으로 4월에 61.8 mm로 가장 낮은 강수량을 보임
- 여름철, 특히 6-7월과 9월에 강우에 의한 표층 염분 저하를 양식시설 설치 위치 선정 등에 고려할 필요가 있음
- **원형가두리의 수온 변화** : 수심 46.4 m를 나타내는 원형가두리 인근의 가리비 시험양식 지점의 경우 관리의 용이성을 고려하여 조사 수행. 원형가두리 및 인근의 수온변화는 육상기온 변화와 유사한 변화양상을 보이고 있는데 (그림 5-1-4), 12-4월 사이에는 전 수층에서 10-15°C 사이, 5월과 10-11월 사이에는 15-20°C 사이에서 비교적 일정한 수온을 유지하고 있는 반면 6-9월 사이에는 수온약층이 형성되면서 경우에 따라 수심 30m까지 20°C 이상의 수온을 보임. 특히 7-8월에는 표층 수온이 25°C 이상으로 올라가기도 하였음
- 대체로 원형가두리 정점 (st. 1)의 수온변화는 4월부터 시작되어 6월이 되면서 수층별 변화가 나타나기 시작하면서 표층수온이 빠르게 상승하여 7월과 8월에 수온약층이 형성되었으며, 9월까지 유지되었음. 10월이 되면서 수층별 수온변화가 사라지고 표·저층 일정 수온을 유지하면서 11월과 12월에 동시에 하강하는 수온변화 패턴을 보였음. 여름철 원형가두리 주변해역에서 수층공간 확보 측면에서 냉수성 어·패류 양식시설은 수온 23°C 이하를 유지하여 비교적 안정되는 수심 20 m 아래로 유지할 필요가 있음
- **원형가두리의 염분 변화** : 염분의 경우 12-5월까지 전 수층에서 일정하게 34 psu 부근 값을 유지하였으나 6-9월 사이에는 담수 유입의 영향으로 표층 염분이 점차 감소하여 약 31 psu까지 떨어지며 점차 저층까지 염도가 낮아지는 경향을 보임. 10월 이후에는 다시 수층 혼합으로 인하여 표층과 저층의 차이가 없어지지만 연도별로 2 psu 정도의 차이를 보였음 (그림 5-1-5). 수온의 경우와 마찬가지로 여름철에 염도 변화의 영향을 적게 받도록 하기 위해서는 수심 20m 이상의 위치를 선정하는 것이 효과적으로 판단됨

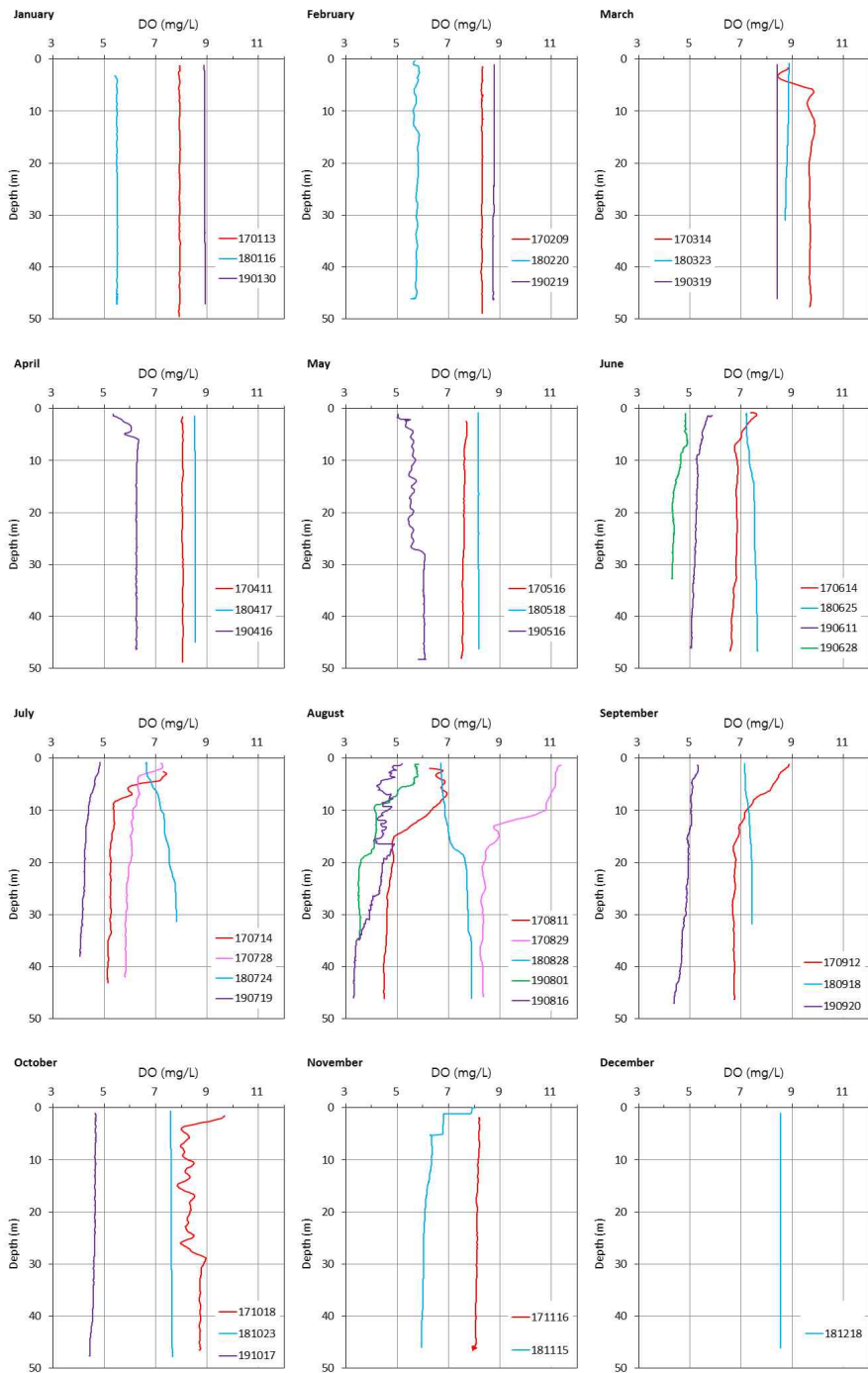


<그림 5-1-4. 2017-2020년 동안 원형가두리 정점 수온의 월별 수직분포 변화.>



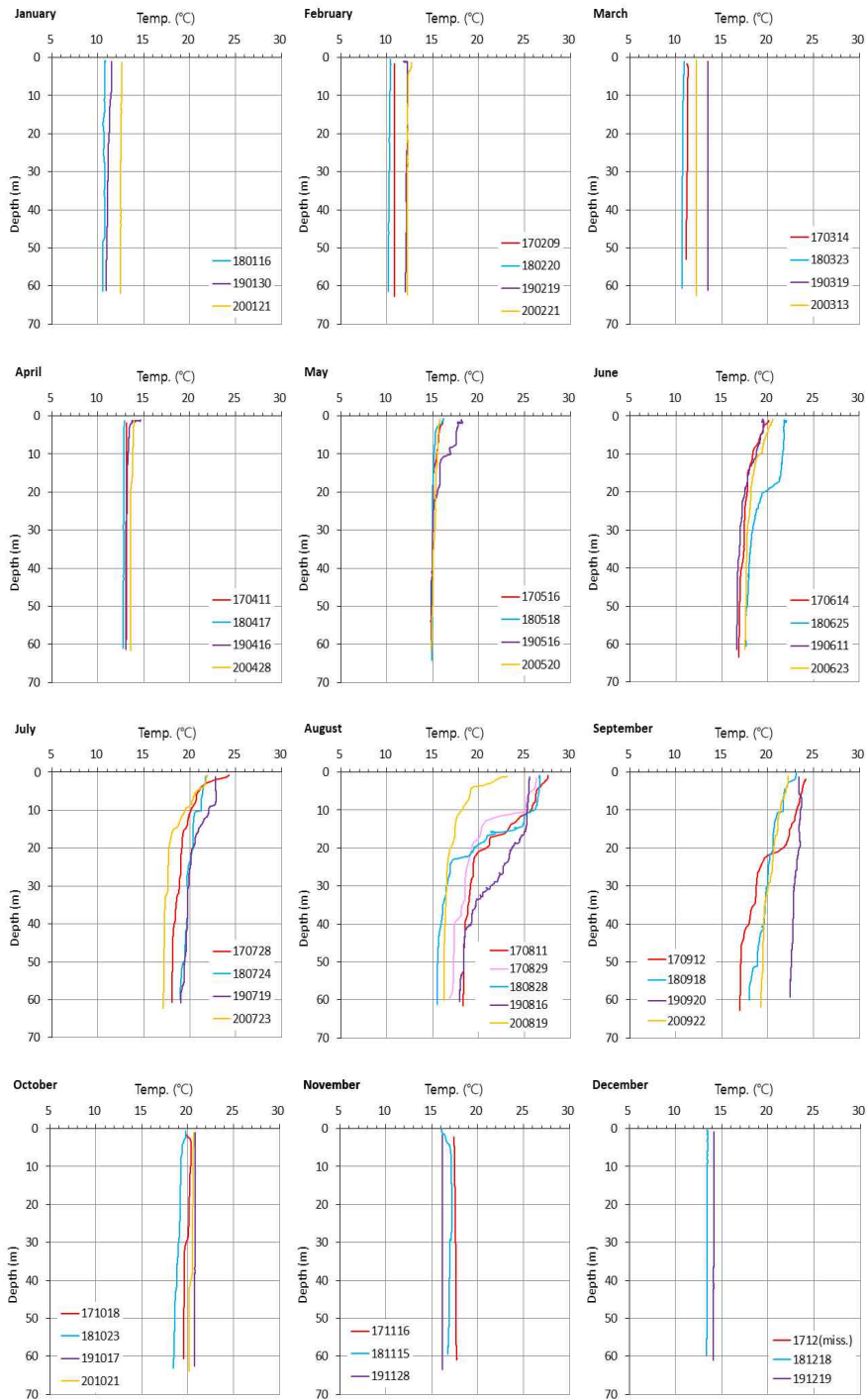
<그림 5-1-5. 2017-2020년 동안 원형가두리 정점 염분의 월별 수직분포 변화.>

- 원형가두리의 용존산소 변화 : 용존산소의 경우에는 수온-염분과는 반대 경향을 보여 여름철에 저층의 용존산소 농도가 낮아졌음 (그림 5-1-6). 연도에 따라 차이를 보이지만 6-9월 사이에는 5 mg/L 이하로 용존산소 농도가 감소하는 수심이 존재하므로 적정 용존산소 농도의 관점에서는 수온-염분과는 반대로 20m 이내의 수심이 양식에 적절할 수 있음



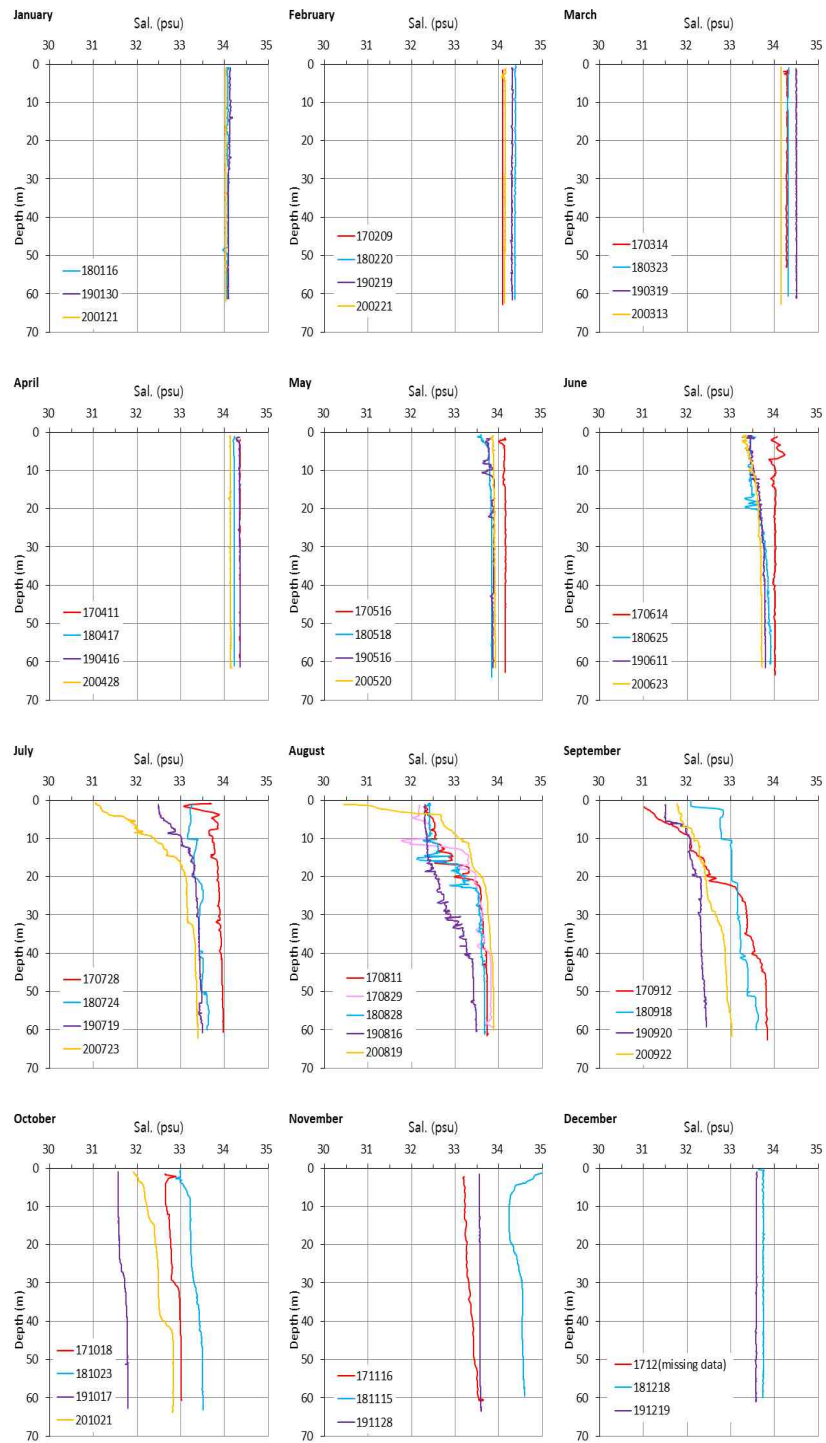
<그림 5-1-6. 2017-2019년 동안 원형가두리 정점 용존산소의 월별 수직분포 변화.>

- 만지도 주변의 수온 변화 : 만지도 정점은 원형가두리 정점에 비해 비교적 수심이 깊은 곳으로 최대 평균 61.3m을 나타내는데, 전반적인 경향은 원형가두리 정점과 차이를 보이지 않았으며 만지도 주변의 여름철 급격한 수온변화에 대응하여 냉수성 어·패류 양식을 위한 적정 수층공간 활용을 위해서는 수온 23℃ 이하를 유지하는 수심 15 m 이상이 적당할 것으로 판단되었음 (그림 5-1-7)



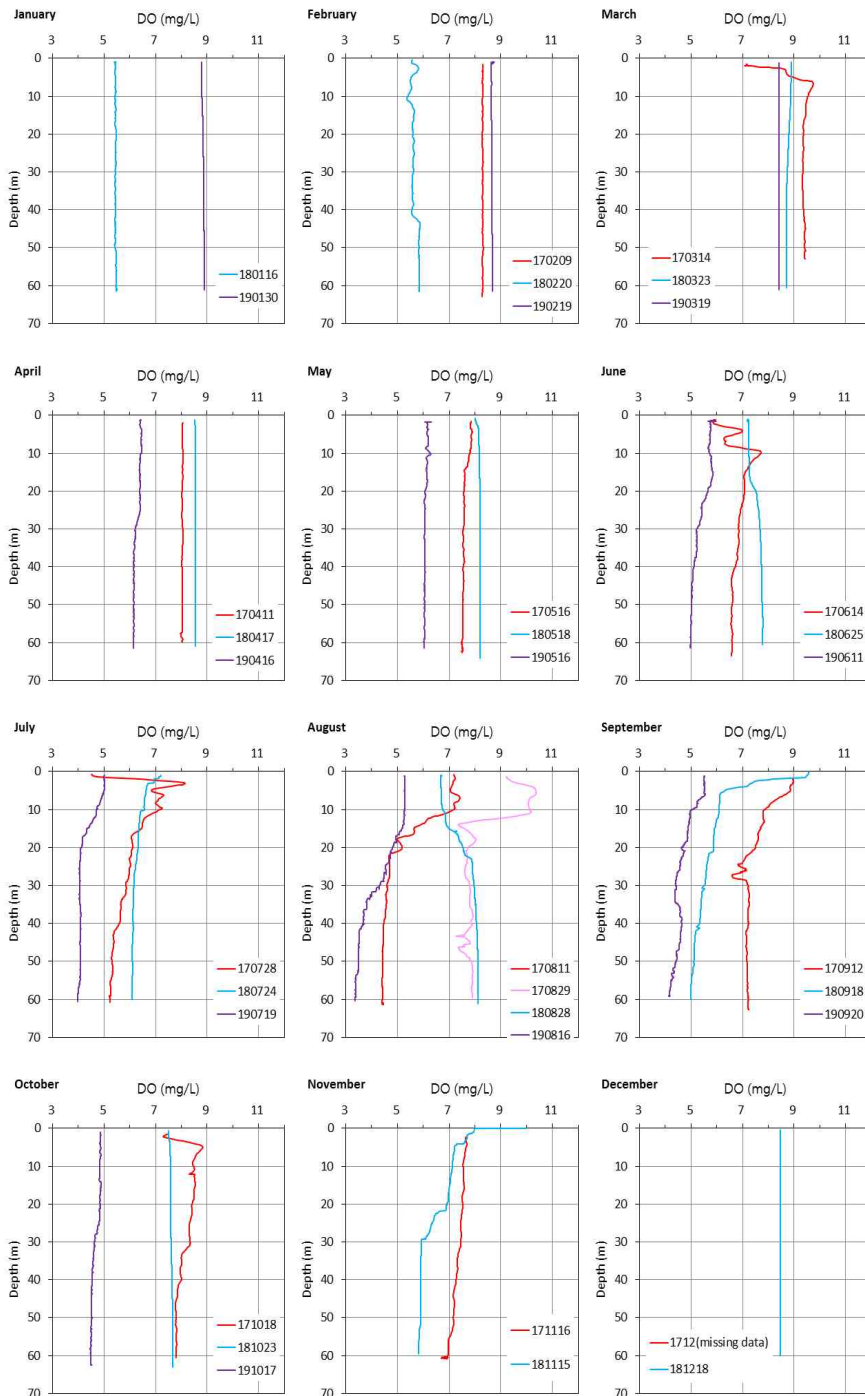
<그림 5-1-7. 2017-2020년 동안 만지도 정점 수온의 월별 수직분포 변화.>

- 만지도 주변의 염분 변화 : 만지도 정점의 염분 변화는 경향에 있어 원형가두리와 대동소이하였으나 여름철 표층 염분이 좀 더 낮게 떨어지는 경향을 보였음 (그림 5-1-8). 양식 측면에서는 원형가두리와 동일하게 20m 이상의 수심을 선정하는 것이 효과적으로 판단됨



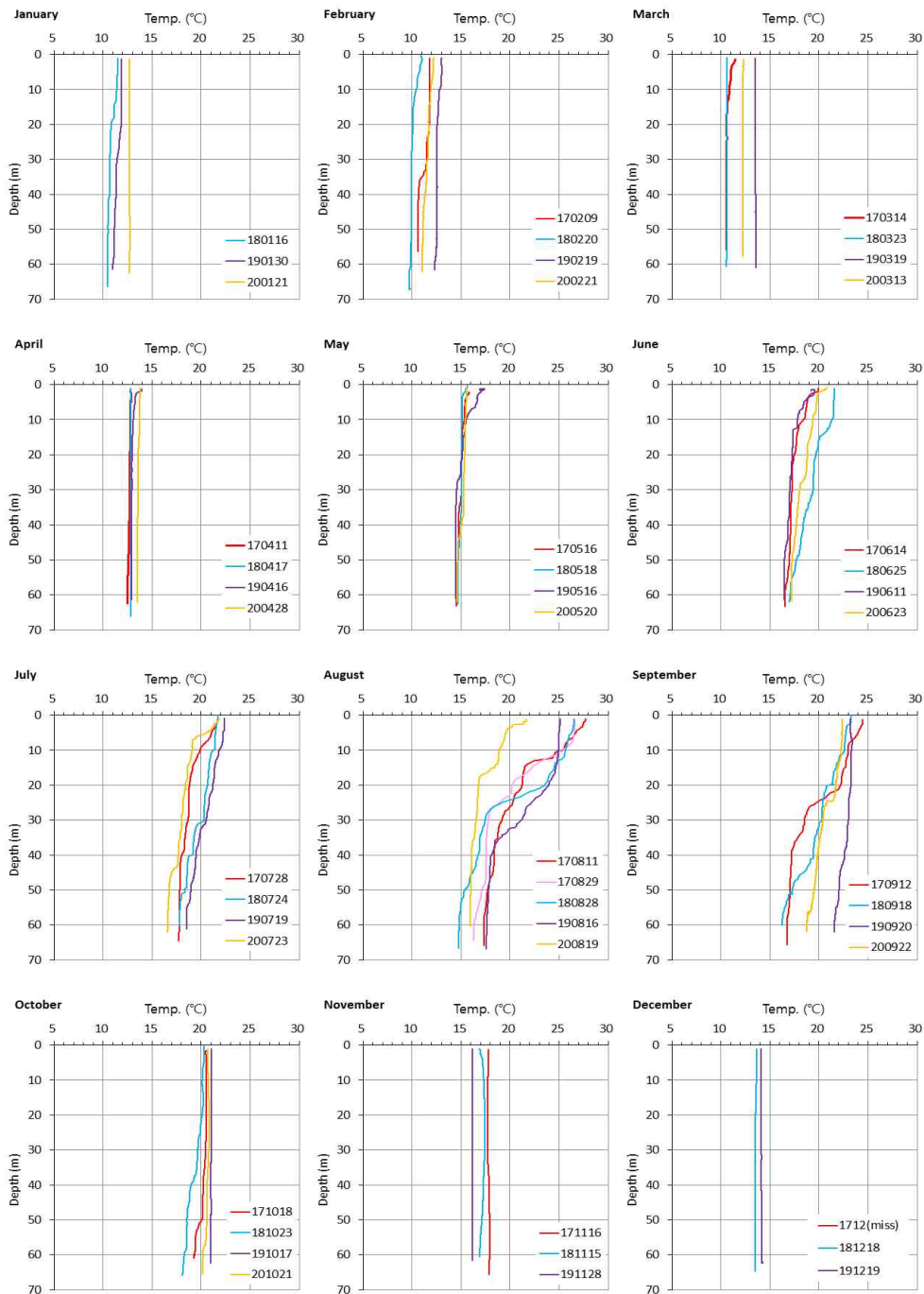
<그림 5-1-8. 2017-2020년 동안 만지도 정점 염분의 월별 수직분포 변화.>

- 만지도 주변의 용존산소농도 변화 : 만지도 주변의 용존산소 변화는 외부지도 주변과 매우 유사한 월별, 수층별 변화 패턴을 보였음 (그림 5-1-9). 용존산소 농도를 고려해 보면 고수온기인 7월~9월 동안의 냉수성 어·패류 양식을 위해서는 수심은 15-18 m 이상으로 이동하거나 유지하는 것이 적절할 것으로 판단됨



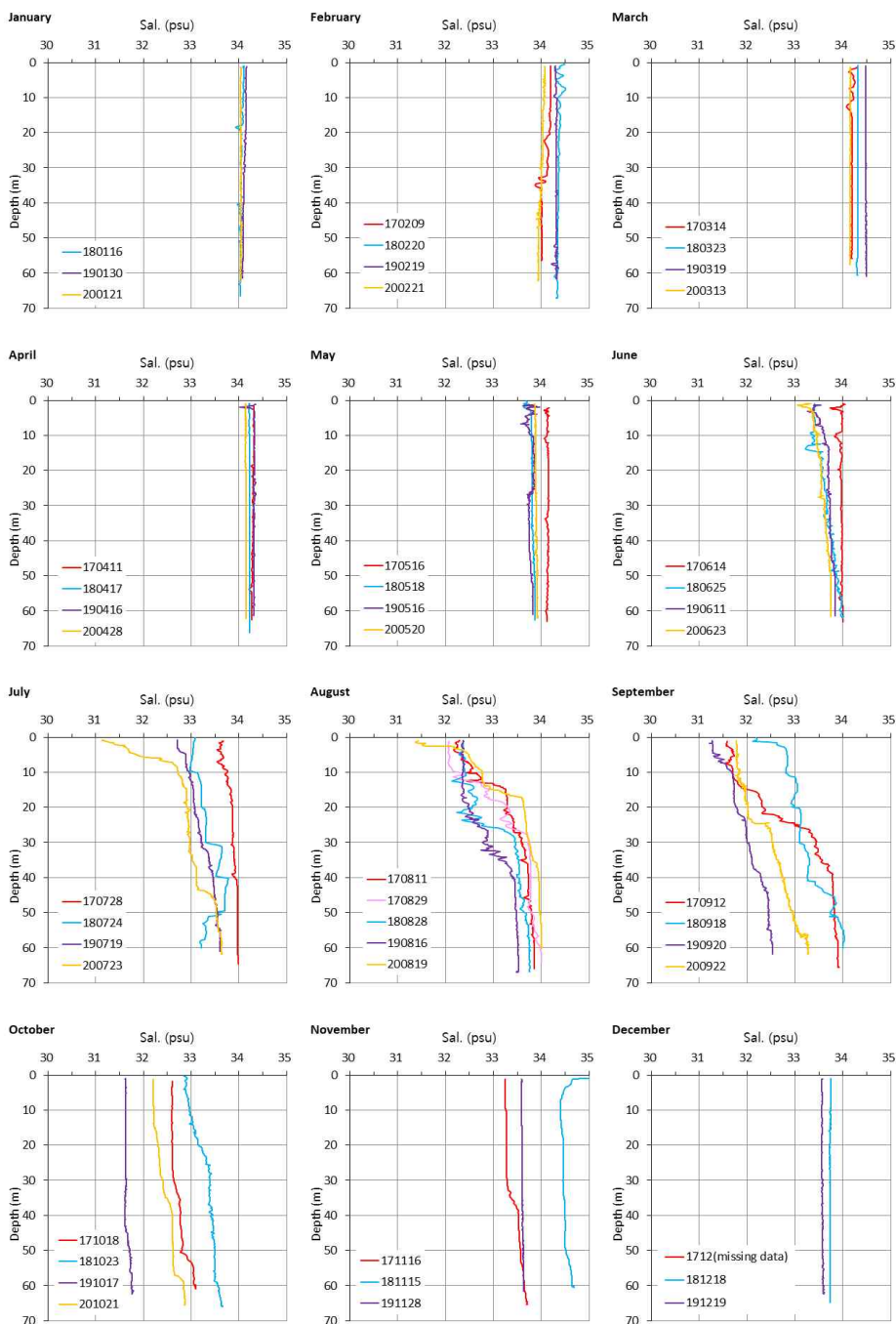
<그림 5-1-9. 2017-2019년 동안 만지도 정점 용존산소의 월별 수직분포 변화.>

- 외부지도 주변의 수온 변화 : 외부지도 정점은 만지도와 함께 비교적 수심이 깊은 곳으로 최대 평균 63.7m을 나타내는데, 전반적인 경향은 원형가두리 정점과 차이를 보이지 않았으며 외부 지도 주변의 여름철 급격한 수온변화에 대응하여 냉수성 어·패류 양식을 위한 적정 수층공간 활용을 위해서는 수온 23℃ 이하를 유지하는 수심 15 m 이상이 적당할 것으로 판단되었음 (그림 5-1-10)



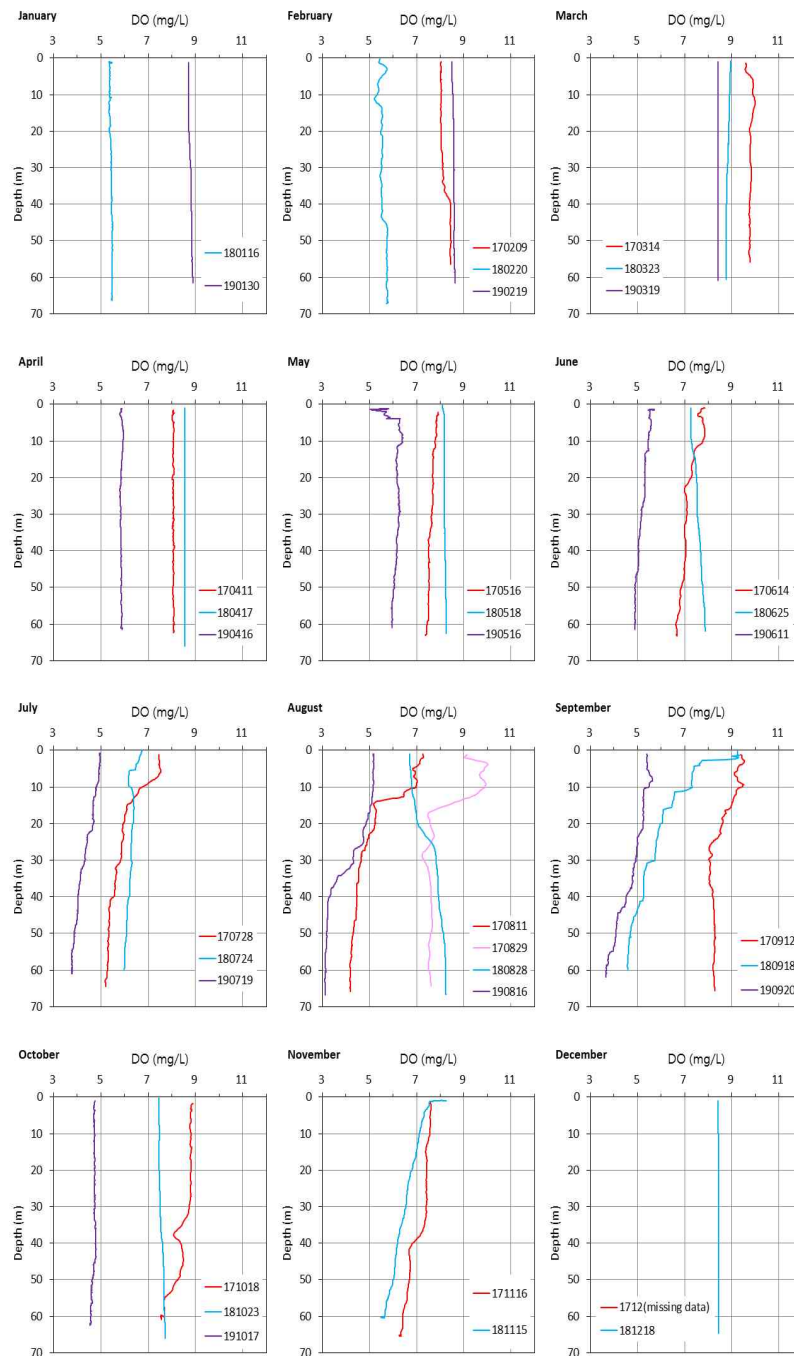
<그림 5-1-10. 2017-2020년 동안 외부지도 정점 수온의 월별 수직분포 변화.>

- 외부지지도 주변의 염분 변화 : 외부지도 정점의 염분 변화는 경향에 있어 원형가두리와 대동소이하였으나 여름철 수층별 염분 변화가 심하게 나타났음 (그림 5-1-11). 양식 측면에서는 원형가두리와 동일하게 20m 이상의 수심을 선정하는 것이 효과적으로 판단됨



<그림 5-1-11. 2017-2020년 동안 외부지도 정점 염분의 월별 수직분포 변화.>

- 외부지도 주변의 용존산소농도 변화 : 외부지도 주변의 용존산소 변화는 만지도 주변과 매우 유사한 월별, 수층별 변화 패턴을 보였음 (그림 5-1-12). 용존산소 농도를 고려해 보면 고수온 기인 7월~9월 동안의 냉수성 어·패류 양식을 위해서는 수심은 15 m 이상으로 이동하거나 유지하는 것이 적절할 것으로 판단됨

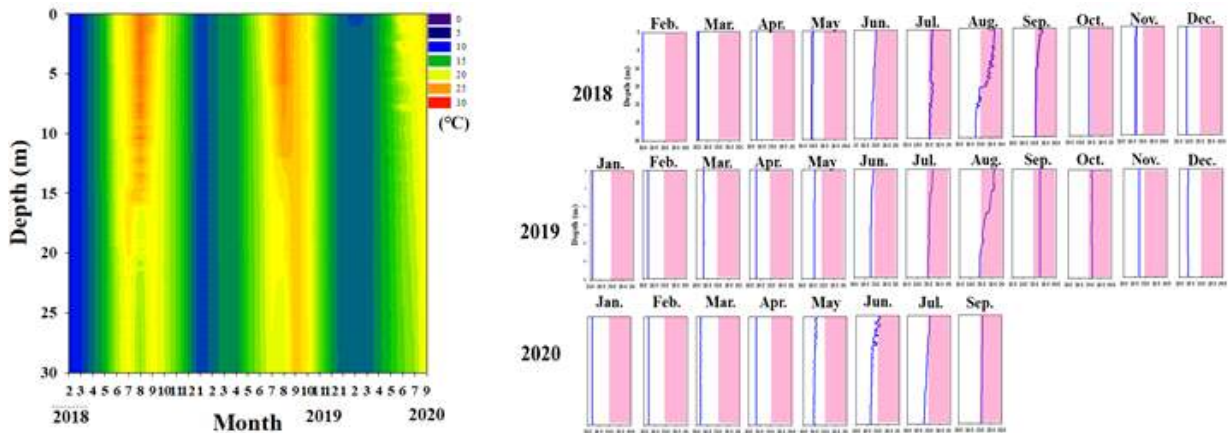


<그림 5-1-12. 2017-2019년 동안 외부지도 정점 용존산소의 월별 수직분포 변화.>

- 3개 정점 수질환경 조사 결과 요약 : 수심, 육지로부터의 거리에 차이가 있는 3개 정점에 대한 수온, 염분, 용존산소 농도의 연변화를 종합 고려하였을 때 수온-염분 관점에서는 여름철 수심 15-20m 이상이 냉수성 생물 양식에 적절한 반면 용존산소 관점에서는 수심 15m 이내가 적절한 것으로 평가되었음. 따라서 여름철 냉수성 생물 양식시설의 위치는 수심 15-20m 정도가 적절하며 수온-염분과 용존산소 농도의 실측값에 맞추어 적절한 조절이 필요한 것으로 판단됨

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

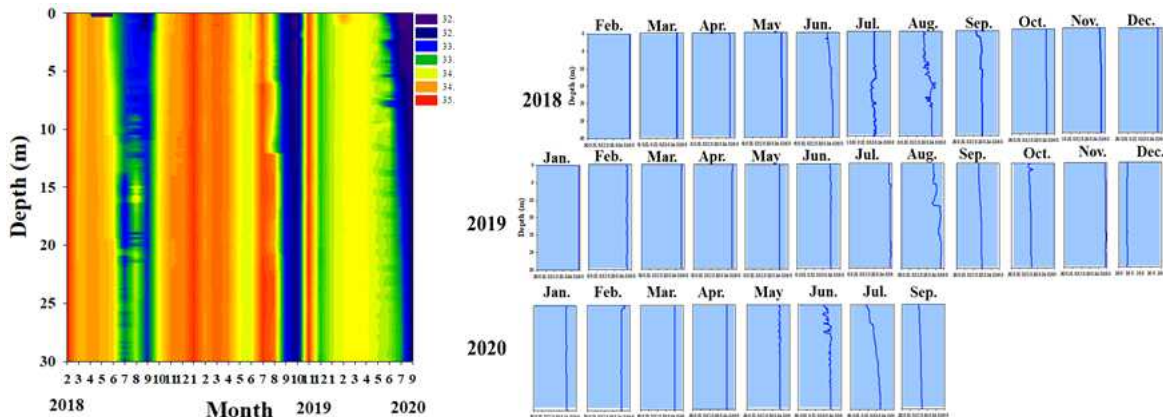
- 해양 환경 관측(수온, 염분, 용존산소, 영양염류): 2018년 2월부터 2020년 9월까지 고정 조사정점 (정점 1, 그림 5-1-1)에서 수심별 (0m, 5m, 20m, 30m)로 해양 환경 관측을 수행함
- 평균 수온은 2018~2020년 조사 기간 중 2월에 가장 낮았고 점차적으로 증가하여 8월에 가장 높았으며, 9월에 다시 감소하는 계절적인 변화를 보임. 수심별 수온의 변화는 8월을 제외하고 대부분 표층에서 30m 수심까지의 큰 차이를 보이지 않았지만, 2020년 6월과 7월에는 표층과 30m 수심의 수온차이가 약 3°C 정도 차이를 보임.
- 2018년 8월에는 표층에서 26.5°C로 가장 높았고, 29.4m에서 17.8°C로 8.7°C의 수온차이를 보였음. 2019년 8월은 2018년과 같이 표층에서 25.95°C, 30m에서 19.19°C로 6.76°C의 수온차를 보였고, 15~16m 수심에서 수온이 급격히 낮아지는 수온약층이 나타남 (그림 5-1-13). 2020년 6월에서 9월까지는 이전과 달리 표층부터 30m 수심에서 대체적으로 낮은 수온을 나타내었는데, 이는 8월과 9월에 연속적으로 한반도에 영향을 준 태풍의 영향과 이에 따른 많은 강수에 의해 담수가 유입됨에 따라 수온의 증가가 더딘 것으로 보임.



<그림 5-1-13. 수온의 시공간적 분포 및 월별 수직 분포>

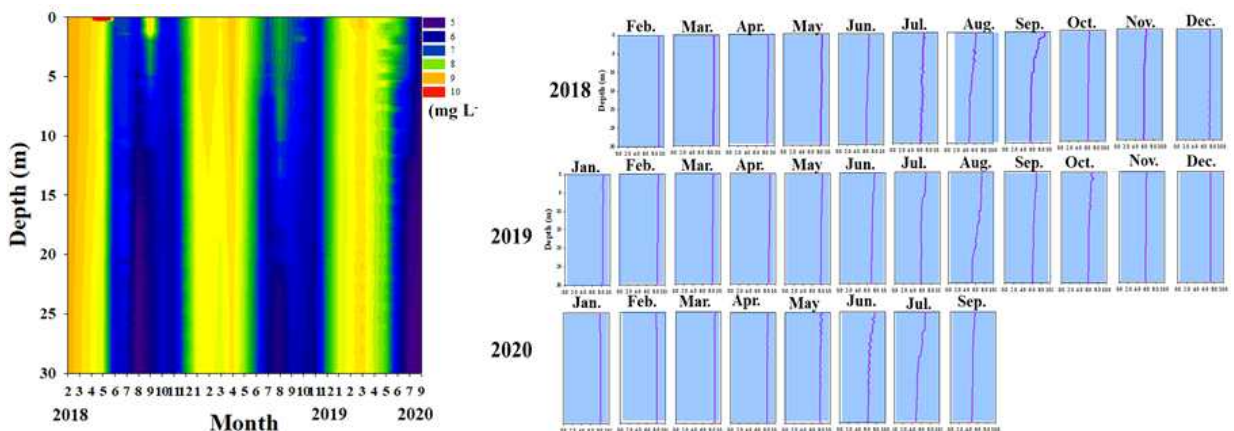
- 가리비와 같은 부착성 패류는 서식장소의 수온이 대사 작용과 먹이 섭취 등에 직접적인 영향을 미친다고 보고되어 있음(Newell and Kofoed, 1977). 2월부터 5월까지의 수온은 10~16°C로 수심별 변화는 없고, 동해안에서 참가리비의 봄 성장기의 수온(3월~5월, 8~13°C)과 유사함 (Park et al., 2001).

- 수층별 수온양상을 볼 때 수심 30m이하에서 수온 22℃ 이하의 안정적인 유지는 가리비류의 대량폐사 원인의 하나인 여름철 고수온 현상으로부터 피해를 최소화할 수 있고, 냉수성 패류의 양성을 위한 조건으로 적합한 것으로 보임.
- 월별 수심에 대한 평균 염분은 2018년 2월에 39.96로 가장 높았고, 2020년 9월에 32.21 psu로 가장 낮았으며, 7월에서 9월 사이 평균 염분은 1월에서 6월보다 1.34 psu 감소하였음. 2018년과 2019년의 평균 염분은 비슷하였음. 정점 1에서 수심별 염분의 변화는 2018년 2월부터 5월, 2019년 1월부터 6월, 2020년 1월부터 5월까지의 표층에서 30m 수심까지 큰 차이를 보이지 않았으나 6월부터 9월까지의 표층에 비해 저층에서 더 높은 염분 값을 보임.
- 참가리비 1년생의 개체는 22.5 psu에서 폐사가 일어나고, 32.4~33.7 psu에서 섬모의 운동성이 최적이라 알려져 있음(Maru et al., 1985). 따라서 연구 기간 동안 본 해역에서 염분은 비단가리비, 참가리비가 성장하기에 적절하다고 판단됨 (그림 5-1-14).



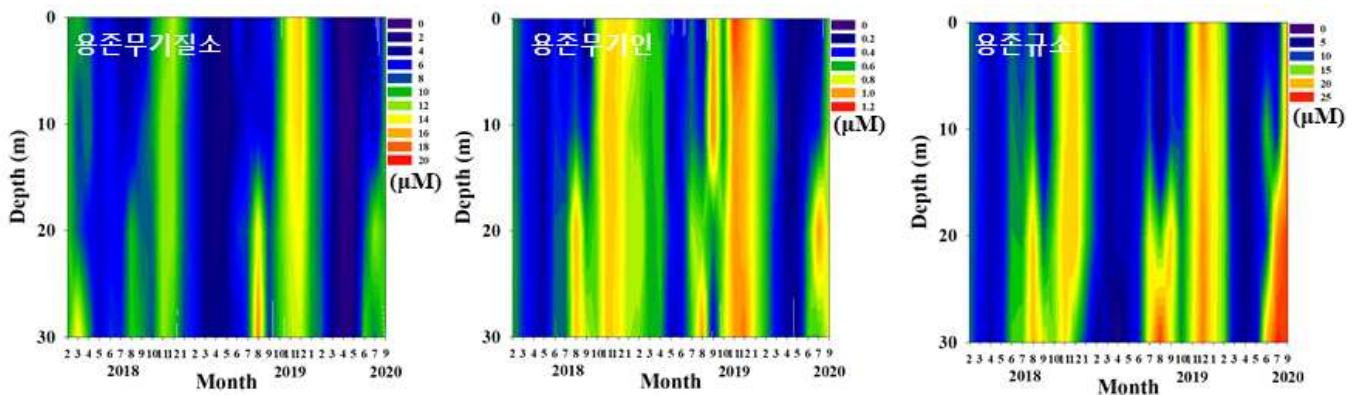
<그림5-1-14. 염분의 시공간적 분포 및 월별 수직 분포>

- 수심별 평균 용존산소는 대체적으로 겨울철에 높고, 특히 2018년 2월에 8.98 mg/L로 가장 높음. 평균 용존산소가 낮은 시기는 년도 별로 2018년 8월에 5.4 mg/L, 2019년 11월에 5.9 mg/L, 2020년 9월에 5.0 mg/L로 가장 낮음.



<그림 5-1-15. 용존산소의 시공간적 분포 및 월별 수직 분포>

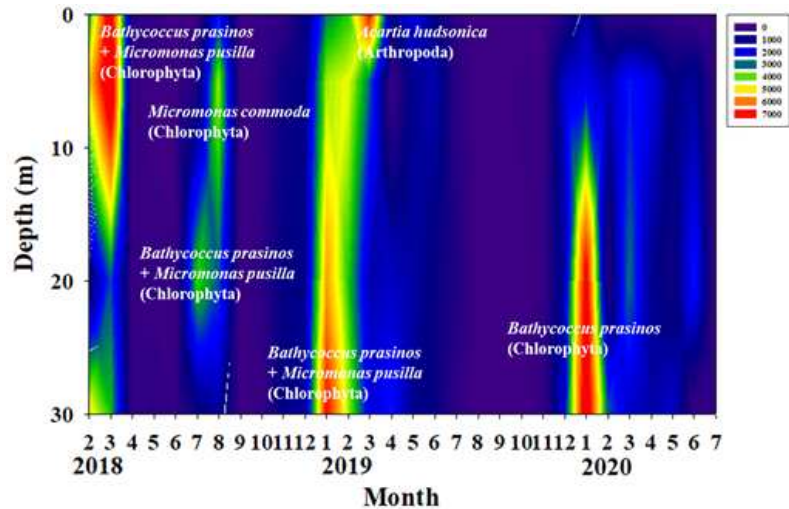
- 정점 2와 3에서 수심에 대한 평균 용존산소는 정점 1과 유사한 변화를 보임. 수심별 용존산소의 변화는 2018년 2월부터 5월, 2019년 1월부터 5월, 2020년 1월부터 5월까지는 표층에서 30m 수심까지 큰 차이를 보이지 않았으나 6월부터 9월까지는 표층에서 높고 수심이 깊어질수록 감소하는 양상을 보임 (그림5-1-15).
- 영양염류는 용존무기질소, 용존무기인, 용존규소에 대해 정점 1에서 수심별 표층, 5m(2018년 10m), 20m, 30m 로 분석을 실시함. 2018년 2월부터 2020년 9월까지 분석 결과, 월별 수심에 대한 용존무기질소의 평균 농도는 2019년 5월에 $.370 \mu\text{M}$ 로 가장 낮고 2019년 11월에 $1.02 \mu\text{M}$ 로 가장 높았음. 용존무기인은 매년 2월부터 6월에 표층에서 30m 수심까지의 전 수심에서 낮은 농도를 보였으며, 매년 10월과 11월의 평균 농도는 2018년 $0.80 \mu\text{M}$ 2019년 $0.826 \mu\text{M}$ 로 가장 높음. 용존규소는 매년 2월에서 6월에 가장 낮은 농도를 보였으며, 2018년과 2019년에는 각각 11월, 12월에 각각 $18.17 \mu\text{M}$ 과 $20.75 \mu\text{M}$ 로 가장 높았음. 수심별 용존무기질소 농도의 변화는 전반적으로 수심이 깊어질수록 농도가 증가하는 경향을 보임. 특히 7월부터 9월에 뚜렷한 증가패턴을 보였으며, 특히 2020년 9월에 저층에서 가장 높은 농도를 보임. 용존무기인과 용존규소는 2018년과 2019년 모두 2월부터 6월까지는 수심에 따른 농도의 차이를 크게 보이지 않았으나. 용존무기질소와 마찬가지로 7월부터 9월에 수심에 따라 증가하는 변화를 보임(그림 5-1-16)



〈그림 5-1-16. 용존무기질소, 용존무기인, 용존규소의 월별 수직 분포〉

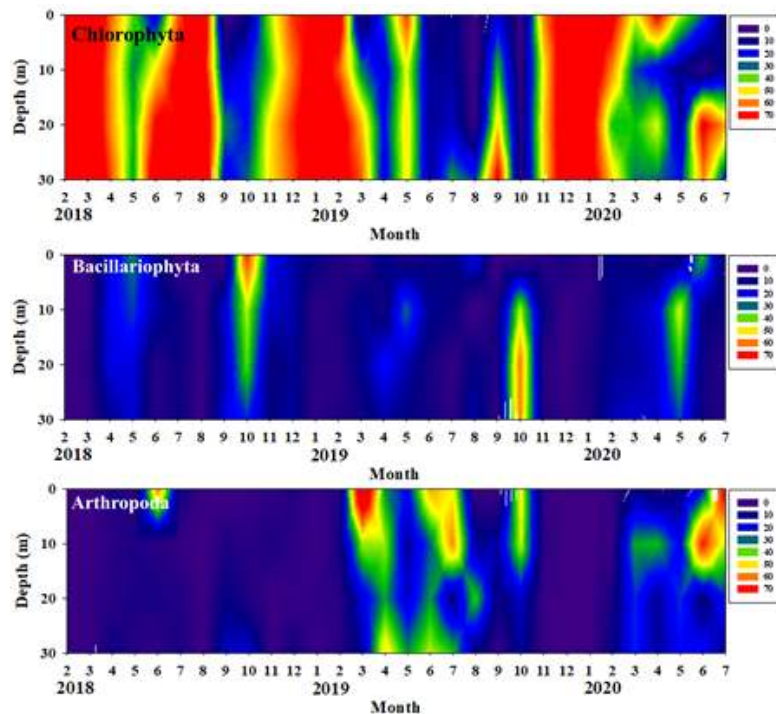
○ 수심별 먹이 생물 분포 : 식물플랑크톤

- 수심별 먹이생물 분포: 2018년 2월부터 2020년 7월까지 월별 수심별 수층 내 먹이생물 분포 변화를 파악하고자, 수심 표층, 5m(2018년 10m), 20m, 30m 해수를 채수하여 해수 내 생물의 genomic DNA (gDNA)를 추출함. 추출된 gDNA는 미토콘드리아 COI DNA marker를 이용하여 차세대염기서열(Next Generation Sequencing, NGS) 분석을 실시함.
- 조사기간 동안의 해수시료의 NGS 분석 결과, 녹조류가 47.7%, 규조류가 12.6%, 절지동물 14.6%, 그 외 식물플랑크톤 25.1%가 나타남 (그림 5-1-17).



<그림 5-1-17. 해수와 가리비 위 내용물에서 출현한 먹이생물 그룹 변동 (reads)>

- 1% 이상의 비율을 보인 먹이생물 중 녹조류는 *Bathycoccus prasinos*(31.3%), *Micromonas pusilla* (9.1%), *M. commoda*(7.4%), 규조류는 *Coscinodiscophyceae* (8.57%), 절지동물은 *Acartia hudsonia* (14.3%)임. 겨울철에는 수심에 관계없이 녹조류가 높은 빈도를 보인 반면, 여름철에는 녹조류가 비교적 낮은 빈도였음. 규조류는 4~5월에 표층부터 중·저층까지 적지 않은 빈도로 출현하였음. 녹조류와 규조류가 우점하지 않는 6~7월에 절지동물이 전 수심에서 높은 빈도로 나타남. 2020년의 초여름 식물플랑크톤의 빈도가 낮았는데, 이는 평년과 달리 일사량이 많이 줄어들어 수온이 평년 대비 낮아서 식물플랑크톤 개체 수가 낮은 것으로 판단됨 (그림 5-1-19).

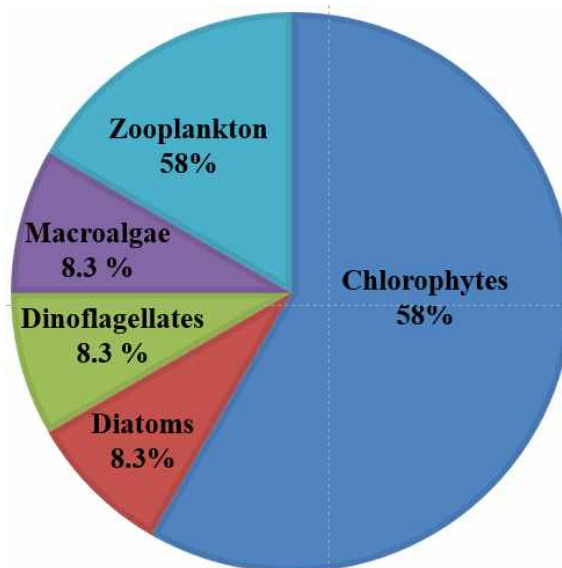


<그림 5-1-19. 가리비 양식장(정점 1) 해수에서 출현한 먹이생물의 상대풍부도 변동>

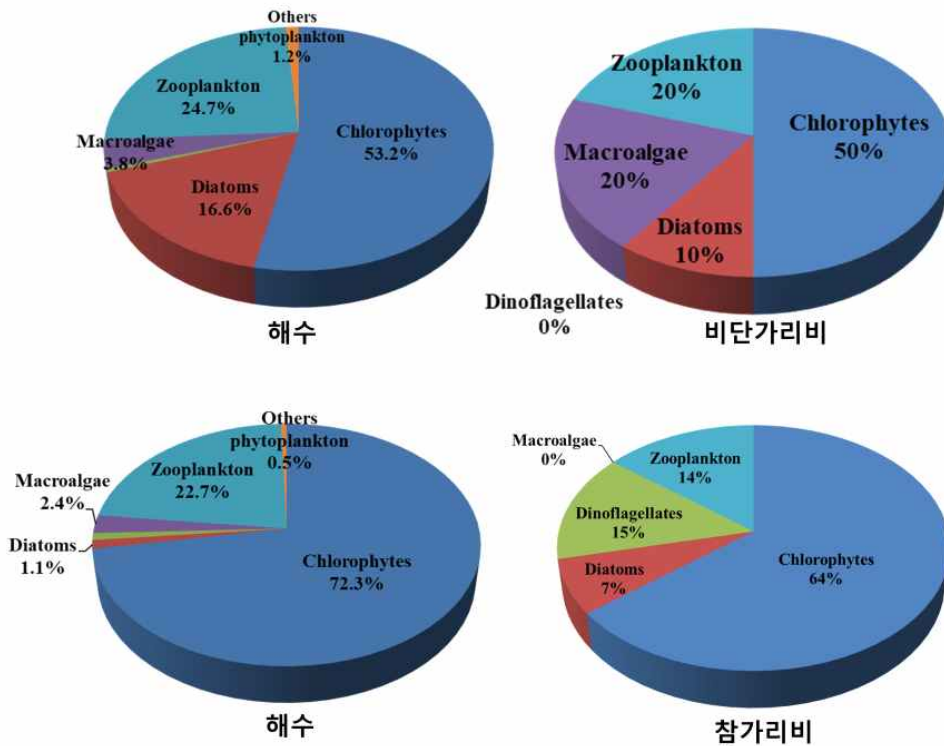
- 해수 내 식물플랑크톤에 대해 현미경과 NGS 분석 결과를 비교하였을 때(2019년 8월 이후 분석 중), 현미경 관찰 결과에서 규조류가 높은 비율로 나타난 반면, NGS 분석 결과에서는 녹조류가 높은 비율로 나타남. 현미경 관찰은 녹조류와 같이 작은 크기의 식물플랑크톤을 검정하기에 어려움이 있으나 NGS는 유전자를 이용하므로 생물의 크기에 대한 제한이 없어, 현미경 분석에 대한 한계점을 보완할 수 있다고 생각됨.

○ 가리비 위 내용물 내 먹이생물 조사

- 가리비가 섭식한 먹이원을 파악하기 위해 양식어장의 비단가리비와 참가리비 2종의 위 내용물을 조사함.
- 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 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 5-1-20).
- 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 5-1-21).



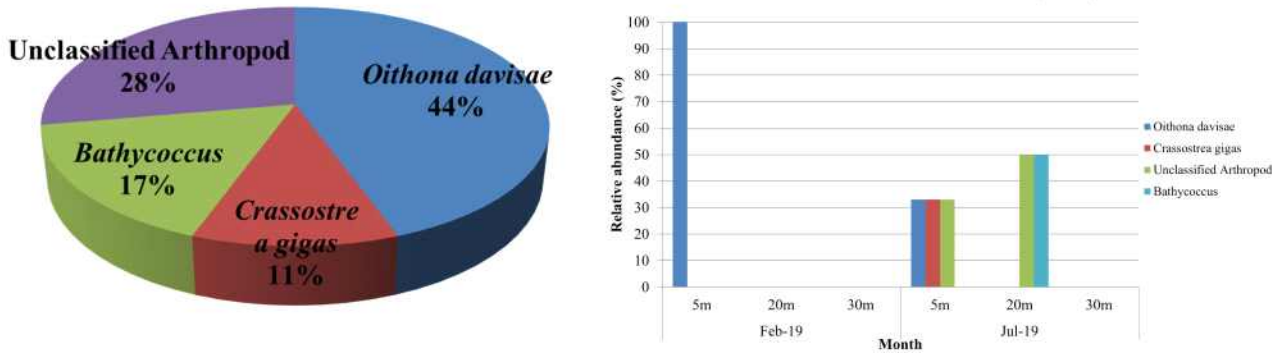
<그림 5-1-20. 비단가리비와 참가리비 2종의 위 내용물에서 출현한 먹이생물 그룹별 비율>



<그림 5-1-21. 비단가리비 (2월-8월)와 참가리비 (2월-4월)의 위 내용물 내 먹이생물 조성>

- 비단가리비의 위내용물 분석 결과, 녹조류가 50%, 규조류가 10%, 해조류가 20%, 동물플랑크톤이 20%를 차지하였음. 참가리비의 위내용물 분석 결과, 녹조류가 64%, 규조류가 7%, 외편모조류가 15%, 동물플랑크톤이 14%를 차지하였음. 비단가리비의 위내용물은 참가리비 보다 녹조류의 비율이 낮고 동물플랑크톤 비율이 1.4배 정도 높게 나타남. 또한 해조류는 비단가리비에서만 출현한 반면, 외편모조류는 참가리비에서만 출현하는 특징을 보임.
- 해수에서와 비단가리비 위내용분 비교 결과, 녹조류, 규조류, 동물플랑크톤의 비율은 거의 비슷하였지만, 해조류에서 해수는 3.8%와 비단가리비에서는 20%로 16.2% 차이를 보임.
- 해수에서와 참가리비 위내용분 비교 결과, 해수에서 녹조류와 동물플랑크톤이 참가리비 위내용물에서보다 각각 8.3%와 8.7% 더 높게 관찰됨. 반대로 규조류와 외편모조류는 참가리비 위내용물에서 각각 5.9%와 14.1% 더 높게 관찰됨.
- 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 NGS 분석을 실시함. 비단가리비 위내용물 샘플을 분석한 결과, 요각류 *Oithona davisae*가 33.3%, 이매패류 *Cressostrea (Magallana) gigas*가 16.7%, 미동정 절지동물이 33.3%, 녹조류 *Bathycoccus* sp.가 16.7% 비율로 나타남. 2019년 2월에는 20m와 30m에서 먹이생물이 검출이

되지 않았으나, 검출이 된 표층에서는 동물플랑크톤 *Oithona davisae*가 출현하였고, 7월에는 표층과 20m에서 먹이생물 *Oithona davisae*, *Crassostrea (Magallana) gigas*, Unclassified Arthropod가 검출되었음 (그림 5-1-22).

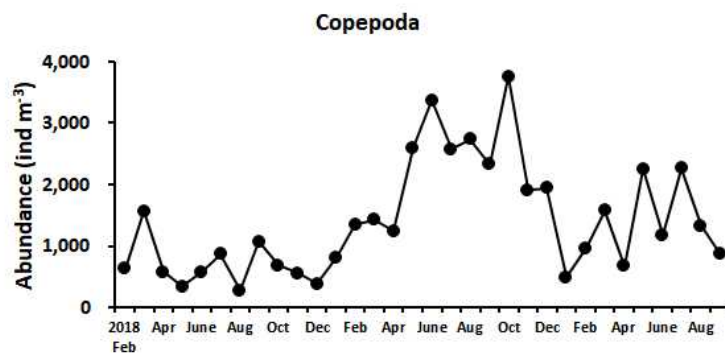


<그림 5-1-22. 비단가리비 위 내용물 내 먹이생물 비율>

- 2020년에는 수심별 비단가리비의 먹이생물을 파악하기 위하여 2020년 6월과 9월의 각장 및 각쪽의 유사한 40개체를 선별함. 선별된 비단가리비는 즉시 조직을 절개하여 소화맹낭을 추출하고 소화맹낭에 붙은 관자 및 생식소 부분을 제외 하였으며, 소화맹낭을 관자와 연결된 부분, 중간부, 생식소와 연결된 부분을 분리하여 gDNA를 추출함. 추출된 gDNA는 미토콘드리아 COI DNA maker로 하여 NGS 분석중에 있음.

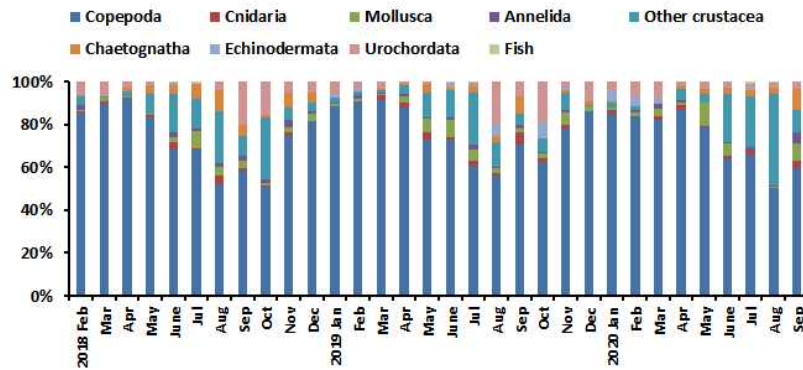
○ 동물성 먹이생물 월별조사

- 연안 어장 고정정점에서 2019년 1월부터 2020년 9월까지 월별 현장조사 수행하였으며 동물플랑크톤 종조성, 개체수, 우점종 파악에는 2018년 자료 활용
- 주요 동물성 먹이생물인 요각류 개체수 월변화(평균 1,413 개체/m³, 2018년 3월과 9월, 2019년 6월과 10월, 2020년 5월과 7월에 높았음. 연평균 요각류 개체수는 2019년도가 상대적으로 2018년보다 높았음)



<그림5-1-23. 통영 연안 고정 정점의 주요 동물성 먹이생물인 요각류의 개체수 월변화(2018.01-2020.09)>

- 중형동물플랑크톤 대분류군의 조성률 월변화(요각류가 71%로서 우점; 요각류가 중요한 동물성 먹이생물로 파악됨. 또한 2020년 6-8월에 계와 크릴 유생의 조성률도 22-43%로 중요하였음)



<그림5-1-24. 통영 연안 고정 정점의 동물플랑크톤 대분류군 조성률 월변화(2018.01-2020.09)>

나. 양식자원위해 환경 모니터링 : 바이러스

○ 수심별 해수 및 가리비 시료채집 및 바이러스의 유전체 분석

- 양식자원 건강성 평가를 위해 환경 병원체 목록작성은 2018년 1월부터 2020년 7월까지 수심 0, 15, 30m로부터 월별로 해수를 채집함.
- 또한, 양식자원인 가리비의 병원체를 확인하고자 가리비 위 내용물에서 바이러스를 분석함.



<그림 5-2-1. 가리비 시료.>

- 해수 내 바이러스의 DNA 추출을 위해 해수는 pre-filter하여 FeCl₃ 1시간 처리 후 0.8um membrane을 사용하여 바이러스를 필터링함. 필터링된 membrane은 Ascorbic-EDTA Buffer(Resuspending buffer)에서 1h 반응시킨 후 Viral Gene-spin™ Viral DNA/RNA Extraction Kit(Intron) 이용하여 바이러스 DNA 추출함.
- 가리비 소화관 내 바이러스의 DNA 추출을 위해 가리비의 소화맹낭을 분리한 후 소화맹낭 내 체액을 피펫을 사용하여 뽑아냄. 소화맹낭 내 체액은 homogenizer를 사용하여 균질화 시킨 후 Plant Genomic DNA Mini Kit (Qiagen) 이용하여 바이러스 DNA를 추출함.

- 해수와 가리비 시료로부터 추출된 genomic DNA는 차세대 염기서열 분석(Next Generation Sequencing, NGS)을 통해 유전체 정보를 확보하였음.
- 해수 및 가리비에서의 해양 바이러스의 분포 및 다양성의 연간 변동을 확인하고자, 2018년 3월부터 2020년 7월까지 월별 데이터를 비교 분석함.
- * 2020년 8월~의 해수 바이러스 및 2020년 가리비 위내용물은 현재 분석중으로 차년도에 기술할 예정임.

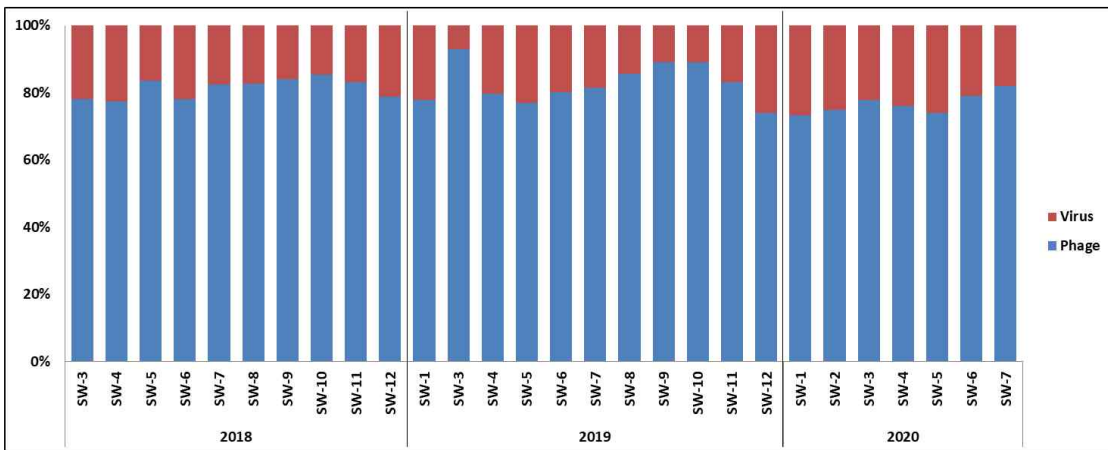
○ 해수 및 가리비 시료내 양식자원 위해 바이러스의 NGS 분석 결과

- NGS 분석 결과, 해수에서 total read수는 6,381,627-30,117,470개로 나타났고, 그 중 바이러스로 매칭된 read의 비율은 0.01-0.1%로 나타남. 가리비 소화맹낭 내용물의 Total read는 16,297,565-34,545,633개로 나타났고, 그 중 Virus로 매칭된 read의 비율은 0.002-0.009%로 해수에 비해 위 내용물이 비교적 낮은 Virus의 read가 매칭됨.

<표 5-2-1. NGS 분석을 통해 얻은 Total sequence read 값 중 virus DB에 매칭된 read의 비율>

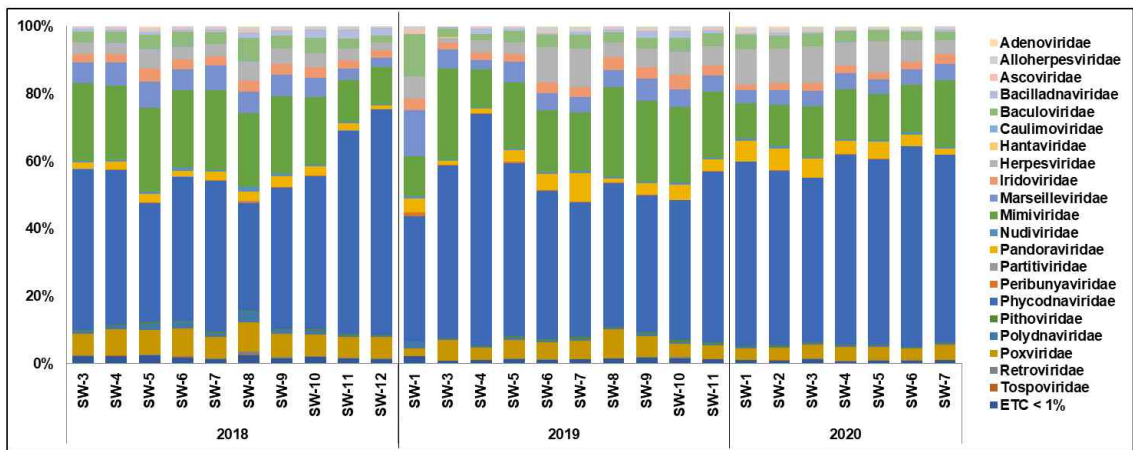
Year	Sample Type	Sample ID	2018			2019			2020							
			Total reads	Total viruses	% of viral	Total reads	Total viruses	% of viral	Total reads	Total viruses	% of viral					
2018	비단	FS-3	16,297,565	1316	0.008%	비단 가리비	FS-2	22,401,265	784	0.003%	2020	주변해수	SW-1	17,268,922	10769	0.062%
		FS-4	17,549,473	525	0.003%		FS-4	25,352,476	1366	0.005%			SW-2	20,034,635	12345	0.062%
		FS-5	19,657,095	384	0.002%		FS-7	31,940,811	2792	0.009%			SW-3	20,607,618	13391	0.065%
	가리비	FS-6	23,249,813	601	0.003%	주변해수	SW-1	6,369,931	736	0.012%			SW-4	15,134,523	9497	0.063%
		FS-7	20,529,087	918	0.004%		SW-3	11,319,816	13073	0.115%			SW-5	17,664,634	11369	0.064%
		FS-8	34,545,633	1420	0.004%		SW-4	13,730,506	6527	0.048%			SW-6	16,195,114	10336	0.064%
	주변	SW-3	15,867,335	6606.17	0.042%	SW-5	15,517,601	3952	0.025%	SW-7			16,177,423	12423	0.077%	
		SW-4	16,314,461	6244.67	0.038%	SW-6	29,251,474	14593	0.050%							
		SW-5	17,063,105	6011.67	0.035%	SW-7	28,309,608	15979	0.056%							
		SW-6	18,652,047	6480.00	0.035%	SW-8	15,750,105	15842	0.101%							
		SW-7	19,192,118	8297.75	0.043%	SW-9	21,420,627	17150	0.080%							
		SW-8	18,930,373	5918.50	0.031%	SW-10	17,703,306	12869	0.073%							
해수	SW-9	30,117,340	10618.38	0.035%	SW-11	14,617,332	11044	0.076%								
	SW-10	20,075,728	8724.13	0.043%	SW-12	13,892,724	8155	0.059%								
	SW-11	22,310,283	9675.18	0.043%												
	SW-12	16,185,690	9733.91	0.060%												

- 바이러스 중 진핵생물을 감염시키는 virus와 박테리아를 감염시키는 phage 비율을 분석함.

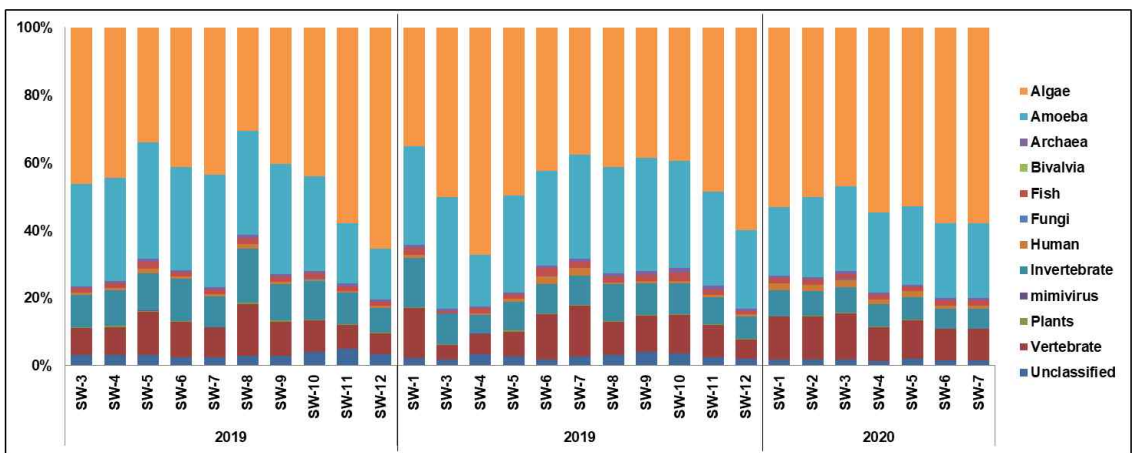


<그림 5-2-2. 연도별 해수 내 Phage 및 Virus >

- 2018~20년까지 해수내 바이러스 구성의 3년간 변동에서 2019년에 phage가 더 높은 비율로 출현하였고, 월별 phage와 virus 비율은 다른 해에 비해 2020년도에 거의 차이가 없음.
- 2018~20년까지 월별 채집된 해수시료로부터 바이러스 조성의 월별 변화는 크게 나타나지 않았으나, Phycodnaviridae는 12월 해수에서 66.84%로 차지하였고, 이에 따라 숙주인 조류의 비율이 높아짐. 반면에, 가리비의 위 내용물로부터 바이러스의 조성은 봄철에 Virus가 많았으나, 19년도 7월에 Phage의 증가를 확인할 수 있었음. 해수로부터의 바이러스 조성과는 달리 가리비 위 내용물에서는 무척추동물과 척추동물을 감염시키는 감염성 바이러스가 높게 나타남.



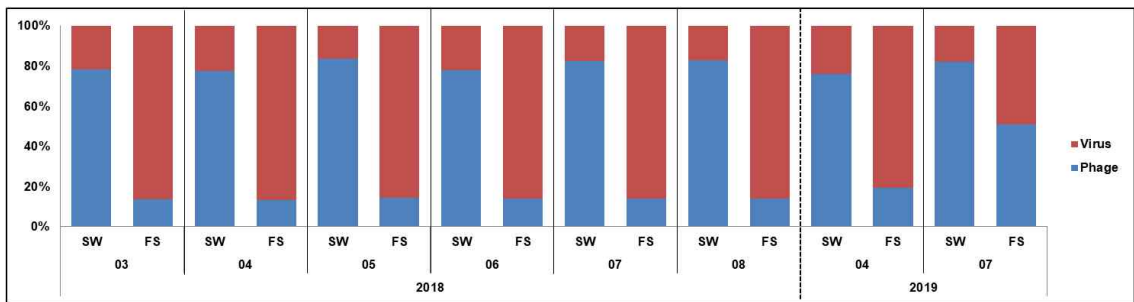
<그림 5-2-3. 연도별 해수 내 감염성 해양바이러스 >



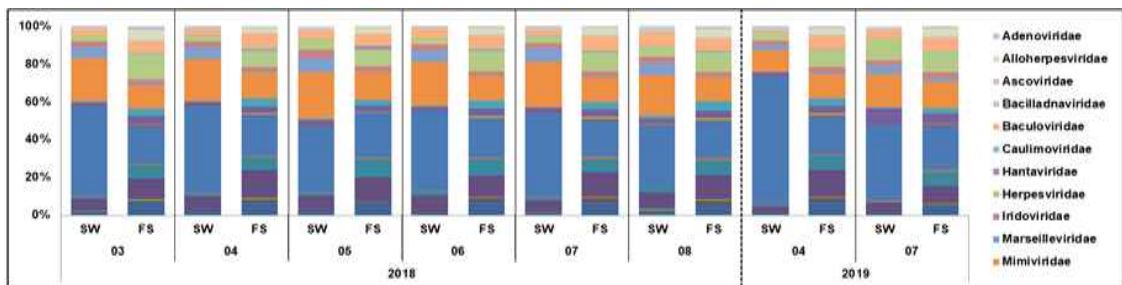
<그림 5-2-5. 연도별 해수 내 Host>

- 18년도와 19년도에 채집된 시료에서 virus family의 구성은 해수보다 가리비에서 고른 양상을 보임.
- 가리비의 위 내용물에서 Virus 비율이 극명하게 더 높은 비율을 차지함.
- 2019년 해수 및 가리비 위 내용물에서 감염성 바이러스와 그 숙주를 분석한 결과, 18년도와 비슷하게 해수에서는 Phycodnaviridae와 mimiviridae가 우점하였으나, 가리비에서는 Phycodnaviridae와 mimiviridae가 높은 비율로 출현함

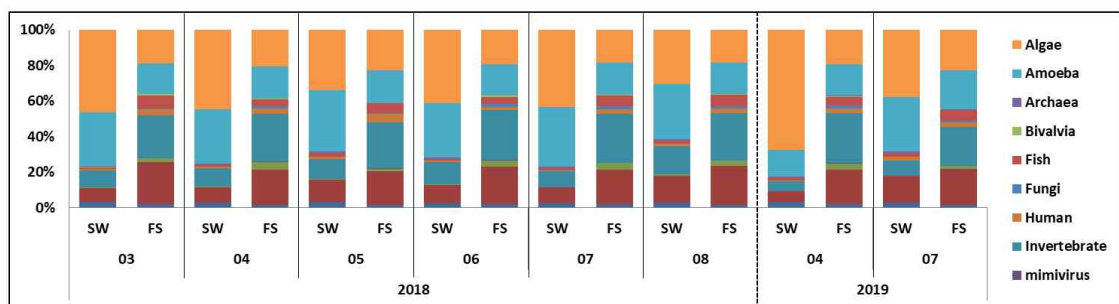
- 특히 가리비에서 18년도보다 Herpesviridae의 비율이 높게 나타났음. 숙주는 18년도와 유사하게 해수에서는 algae 비율이 높게 나타났으며, 가리비의 위 내용물에는 무척추 동물과 척추 동물을 감염시키는 감염성 바이러스가 높게 나타났음
- 2020년 해수에서 감염성 바이러스와 그 숙주를 분석한 결과, 19년도와 유사하게 해수에서 Phycodnaviridae와 mimiviridae가 우점하였으나, 특히 다른 년도에 비해 Herpesviridae의 비율이 높게 나타났다. 해수에서 감염성 바이러스의 숙주를 분석한 결과 Algae가 가장 높게 나타났고, 그 다음으로 Amoeba가 가장 높게 나타났음



<그림 5-2-6. 연도별 해수 및 가리비 내 Phage 및 Virus >



<그림 5-2-7. 연도별 해수 및 가리비 감염성 바이러스>



<그림 5-2-8. 연도별 해수 및 가리비 내 Host >

○ 감염성 해양바이러스 목록 작성

- 해수와 가리비에서 출현한 Bivalvia, Human, Fish 감염 바이러스 목록 작성 결과, 총 132개의 종이 검출되었고, 이 중 해수와 가리비에서 모두 출현한 바이러스는 85종이었고, 3종은 해수에서만, 43종은 가리비에서만 검출되었음.

- 해수와 가리비에 모두 출현한 바이러스 중 중 3종류의 바이러스 즉, *Cyprinid herpesvirus 1*, *Cyprinid herpesvirus 2*, *Human gammaherpesvirus 8*가 높은 비율로 나타났고, *Cyprinid herpesvirus 1*와 *Cyprinid herpesvirus 2*는 어류를 감염시키는 Alloherpesviridae이며, *Human gammaherpesvirus 8*은 herpesviridae에 속하는 인간을 감염시키는 바이러스임.

<표 5-2-2 . 해수와 가리비에서 출현한 Bivalvia, Human, Fish 감염 바이러스 종목록>

Infectious virus	Host	Sample	Infectious virus	Host	Sample
Abalone herpesvirus Victoria/AUS/2009	Bivalvia	Scallop	Human metapneumovirus	Human	Scallop
Adult diarrheal rotavirus strain J19	Human	Seawater	Human papillomavirus type 103	Human	Seawater, Scallop
Amphibola crenata associated bacilladnavirus 2	Bivalvia	Seawater	Human papillomavirus type 16	Human	Scallop
Anquillid herpesvirus 1	Fish	Scallop	Human papillomavirus type 166	Human	Seawater, Scallop
Astrovirus MLB3	Human	Seawater	Human papillomavirus type 32	Human	Scallop
Avon-Heathcote Estuary associated circular virus 13	Bivalvia	Seawater, Scallop	Human papillomavirus type 34	Human	Scallop
Avon-Heathcote Estuary associated circular virus 16	Bivalvia	Scallop	Human papillomavirus type 53	Human	Scallop
Avon-Heathcote Estuary associated circular virus 17	Bivalvia	Seawater, Scallop	Human papillomavirus type 54	Human	Seawater, Scallop
Avon-Heathcote Estuary associated circular virus 2	Bivalvia	Seawater, Scallop	Human papillomavirus type 7	Human	Scallop
Avon-Heathcote Estuary associated circular virus 21	Bivalvia	Seawater, Scallop	Human papillomavirus type 71	Human	Seawater, Scallop
Avon-Heathcote Estuary associated circular virus 22	Bivalvia	Seawater, Scallop	Human papillomavirus type 92	Human	Seawater, Scallop
Avon-Heathcote Estuary associated circular virus 29	Bivalvia	Seawater, Scallop	Human papillomavirus type 96	Human	Seawater, Scallop
Beihai hepe-like virus 4	Bivalvia	Scallop	Human parainfluenza virus 4a	Human	Seawater, Scallop
Beihai picorna-like virus 111	Bivalvia	Scallop	Human parvovirus B19	Human	Scallop
Beihai picorna-like virus 123	Bivalvia	Seawater, Scallop	Human polyomavirus 12	Human	Scallop
Beihai picorna-like virus 50	Bivalvia	Scallop	Human polyomavirus 6	Human	Seawater, Scallop
Beihai picorna-like virus 77	Bivalvia	Scallop	Human polyomavirus 9	Human	Seawater, Scallop
Beihai sobemo-like virus 8	Bivalvia	Seawater, Scallop	Human rhinovirus 1	Human	Seawater, Scallop
Beihai tombus-like virus 13	Bivalvia	Seawater, Scallop	Human rhinovirus A1	Human	Seawater, Scallop
Beihai weivirus-like virus 4	Bivalvia	Seawater, Scallop	Ictalurid herpesvirus 1	Fish	Seawater, Scallop
Bivalve RNA virus G3	Bivalvia	Scallop	Infectious hematopoietic necrosis virus	Fish	Seawater, Scallop
Black sea bass polyomavirus 1	Fish	Scallop	Infectious spleen and kidney necrosis virus	Fish	Seawater, Scallop
Bwamba orthobunyavirus	Human	Seawater, Scallop	Isfahan virus	Human	Scallop
Carp picornavirus 1	Fish	Seawater, Scallop	Lymphocystis disease virus - isolate China	Fish	Seawater, Scallop
Cercopithecine alphaherpesvirus 2	Human	Scallop	Lymphocystis disease virus 1	Fish	Scallop
Cercopithecine betaherpesvirus 5	Human	Seawater, Scallop	Lymphocystis disease virus Sa	Fish	Seawater, Scallop
Chinook salmon bafinivirus	Fish	Seawater, Scallop	Madrid virus	Human	Seawater, Scallop
Cricetid gammaherpesvirus 2	Fish	Seawater, Scallop	Molluscum contagiosum virus subtype 1	Human	Seawater, Scallop
Cutthroat trout virus	Fish	Seawater, Scallop	Monkeypox virus Zaire-96-I-16	Human	Scallop
Cyprinid herpesvirus 1	Fish	Seawater, Scallop	MW polyomavirus	Human	Scallop
Cyprinid herpesvirus 2	Fish	Seawater, Scallop	Mytilus sp. clam associated circular virus	Bivalvia	Seawater, Scallop
Cyprinid herpesvirus 3	Fish	Seawater, Scallop	NY_014 poxvirus	Human	Seawater, Scallop
Eel picornavirus 1	Fish	Scallop	Ostreid herpesvirus 1	Bivalvia	Seawater, Scallop
Eel virus European X	Fish	Scallop	Papiine alphaherpesvirus 2	Human	Seawater, Scallop
Encephalomyocarditis virus	Human	Seawater, Scallop	Perch perhabdovirus	Fish	Scallop
Epizootic haematopoietic necrosis virus	Fish	Scallop	Piscine myocarditis-like virus	Fish	Scallop
European catfish virus	Fish	Seawater, Scallop	Ranavirus maximus	Fish	Seawater, Scallop
Gastropod associated circular ssDNA virus	Bivalvia	Seawater, Scallop	Rhinovirus A	Human	Seawater, Scallop
Guaroa virus	Human	Seawater, Scallop	Rotavirus C	Human	Scallop
Hepatitis C virus genotype 1	Human	Seawater, Scallop	Rubella virus	Human	Scallop
Hepatitis C virus genotype 3	Human	Scallop	Salivirus FHB	Human	Scallop
Hepatitis C virus genotype 6	Human	Seawater, Scallop	Salmon gill poxvirus	Fish	Seawater, Scallop
Hepatitis C virus genotype 7	Human	Scallop	Sandfly fever Turkey virus	Human	Seawater, Scallop
Hudisavirus sp.	Human	Scallop	Scale drop disease virus	Fish	Seawater, Scallop
Human adenovirus 1	Human	Seawater, Scallop	Short-finned eel ranavirus	Fish	Scallop
Human adenovirus 7	Human	Seawater, Scallop	Singapore grouper iridovirus	Fish	Scallop
Human alphaherpesvirus 1	Human	Seawater, Scallop	Sosuga virus	Human	Scallop
Human alphaherpesvirus 2	Human	Seawater, Scallop	Sudan ebolavirus	Human	Seawater, Scallop
Human alphaherpesvirus 3	Human	Seawater, Scallop	Titi monkey adenovirus ECC-2011	Human	Seawater, Scallop
Human betaherpesvirus 5	Human	Seawater, Scallop	Torque teno midi virus 1	Human	Seawater, Scallop
Human betaherpesvirus 6A	Human	Seawater, Scallop	Torque teno midi virus 2	Human	Scallop
Human betaherpesvirus 6B	Human	Seawater, Scallop	Torque teno mini virus 2	Human	Seawater, Scallop
Human betaherpesvirus 7	Human	Seawater, Scallop	Torque teno mini virus 7	Human	Seawater, Scallop
Human coronavirus 229E	Human	Scallop	Torque teno virus 28	Human	Seawater, Scallop
Human coronavirus HKU1	Human	Scallop	Variola virus	Human	Seawater, Scallop
Human coronavirus NL63	Human	Scallop	Walleye dermal sarcoma virus	Fish	Seawater, Scallop
Human coronavirus OC43	Human	Seawater, Scallop	Wenzhou bivalvia virus 1	Bivalvia	Scallop
Human endogenous retrovirus K113	Human	Seawater, Scallop	Wenzhou gastropodes virus 2	Bivalvia	Scallop
Human fecal virus Jorvi3	Human	Seawater, Scallop	Wenzhou picorna-like virus 42	Bivalvia	Seawater, Scallop
Human gammaherpesvirus 4	Human	Seawater, Scallop	Wenzhou picorna-like virus 9	Bivalvia	Seawater, Scallop
Human gammaherpesvirus 8	Human	Seawater, Scallop	Wenzhou tombus-like virus 6	Bivalvia	Seawater, Scallop
Human herpesvirus 4 type 2	Human	Seawater, Scallop	Wenzhou tombus-like virus 6	Bivalvia	Seawater, Scallop
Human immunodeficiency virus 1	Human	Seawater, Scallop	Wenzhou yanvirus-like virus 2	Bivalvia	Seawater, Scallop
Human immunodeficiency virus 2	Human	Seawater, Scallop	White bream virus	Fish	Seawater, Scallop
Human mastadenovirus 2	Human	Seawater, Scallop	Yaba monkey tumor virus	Human	Scallop
Human mastadenovirus D	Human	Seawater, Scallop	Yaba-like disease virus	Human	Seawater, Scallop

○ PCR 기반 감염성 바이러스 진단기술 개발

- NGS 결과 해수와 가리비에서 공통적으로 검출된 바이러스 중 가장 출현빈도가 높았던 *Cyprinid herpesvirus 1* (CHV1)의 PCR 기반 검출기술을 개발하고 진단키트 제작에 활용함

- CHV1 유전자의 용이한 보관과 지속 활용 목적으로 외피단백질 유전자를 합성하였으며, 합성 유전자가 포함된 플라스미드를 대장균에 형질 전환하여 추후 연구에 이용하였음
- 대상 유전자에 특이적인 프라이머를 디자인하고, 이를 BLAST search 등의 *in silico* 분석을 통해 프라이머와 대상 유전자 간의 염기서열 특이성을 확인하였음 (그림 5-2-9).

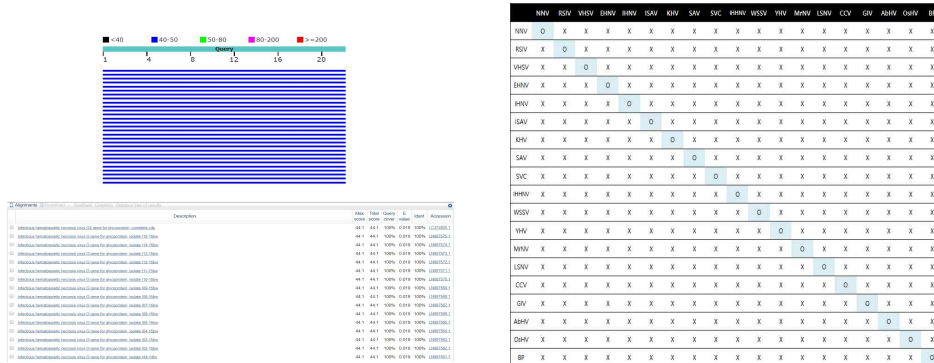


그림 5-2-9. *in silico* 분석을 통한 프라이머와 대상 유전자 간 서열 특이성 확인

- 다른 해양바이러스 유전자를 대조군으로 이용하여 실제로 PCR 반응에서 대상 유전자만을 증폭한다는 것을 확인함 (그림 5-2-10).

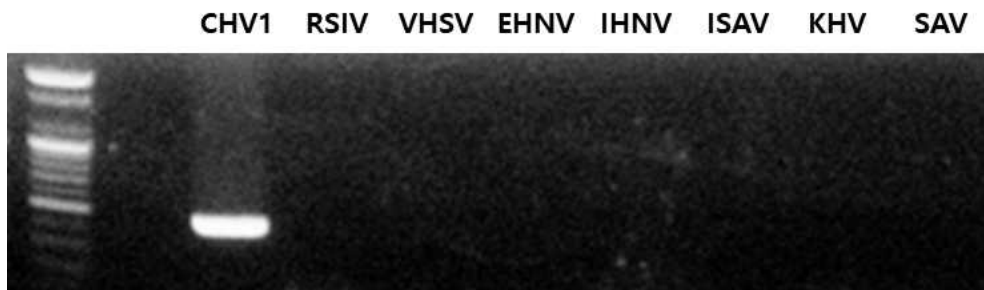


그림 5-2-10. 프라이머의 CHV1 유전자 특이적 증폭 확인

- 새롭게 디자인한 바이러스 X 프라이머의 PCR 조건을 확립하기 위해 어닐링 온도, DNA 합성 시간 조건을 테스트함. (기본 PCR 조건은 변성 - 95° C 30s, 어닐링 - 55° C 30s, 합성 - 72° C 30s, 35 사이클 반응)

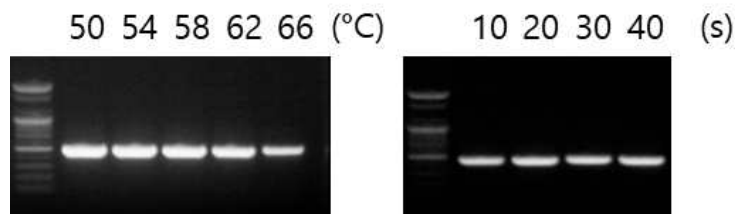


그림 5-2-11. 어닐링 온도 테스트 (좌), 합성 시간 테스트(우)

- 어류 유전체 DNA 존재 상황에서 반응성의 문제가 있는지 테스트를 하였으며, PCR 반응에서 문제없음을 확인함 (그림 5-2-12).
- 최종적으로 위와 같은 결과를 바탕으로 *Cyprinid herpesvirus 1* 에 대한 PCR 진단 키트를 개발 하였음 (그림 5-2-13).

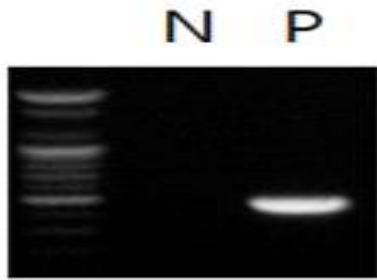


그림 5-2-12. 가리비 유전체 반응 테스트

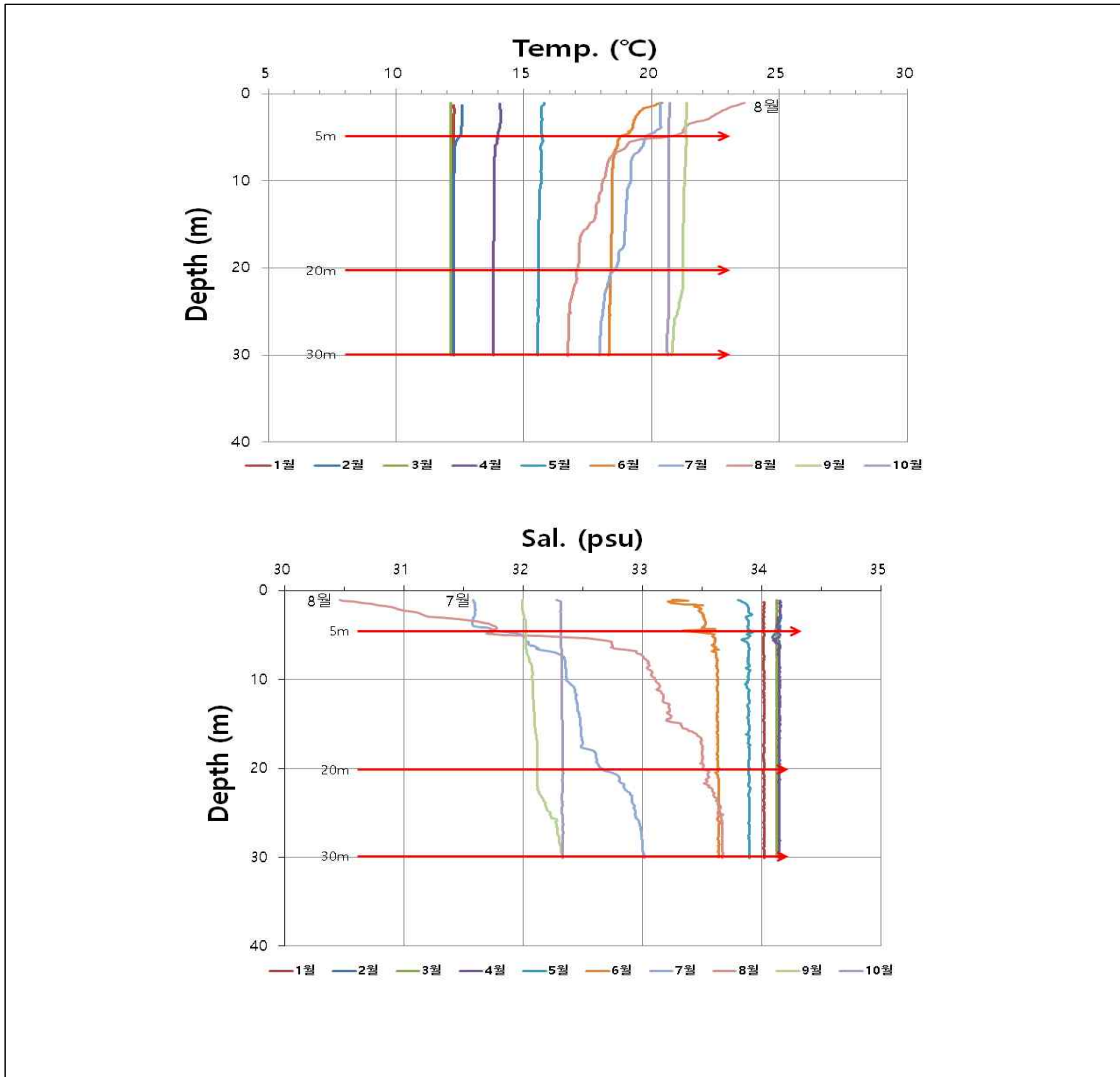


그림 5-2-13. 개발된 PCR 진단 키트

다. 양식어장 부착생물 저감방안

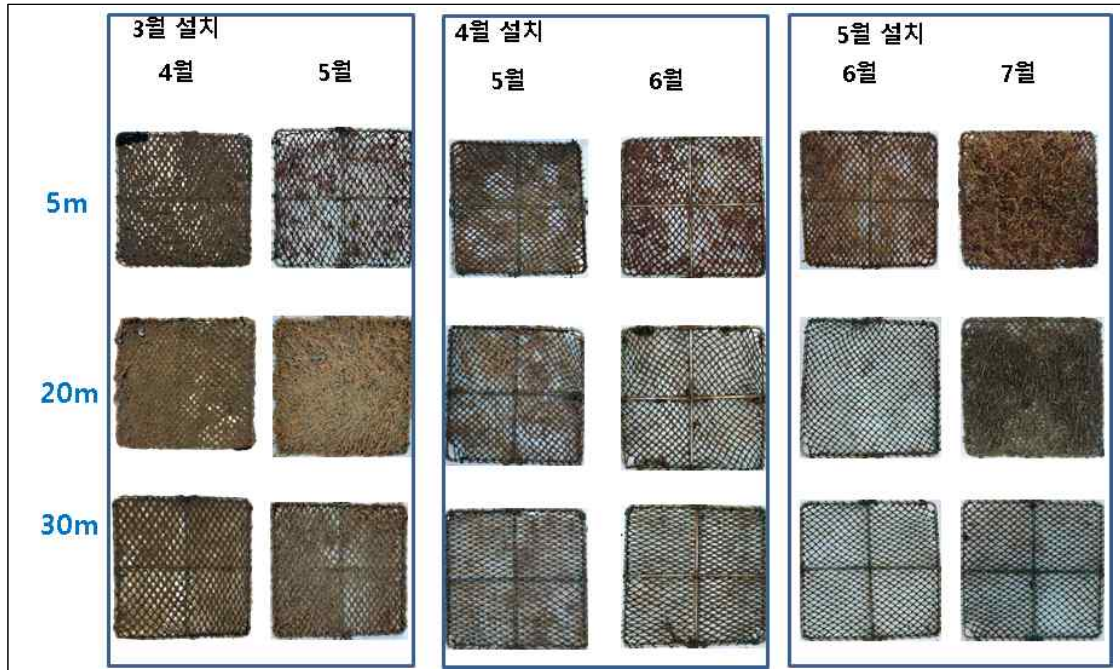
○ 부착생물가입 양상 분석

- 수층 환경 감시 : 매월 하반기에 조사 대상 지역에서 수직에 따른 수온 염분 변화를 측정함. 월별로 수온 변화는 2월 12.2℃ 7월에 22.4 ℃에서 연간 변화를 보임. 6-8월을 제외하고는 수층별 수온 변화가 나타나지 않음. 6월에는 수심 5m까지 수온이 증가하다가 5m 이하에서는 19도 정도로 일정하게 나타남. 이러한 양상은 7월에도 나타났는데, 다만 7월에는 20m 까지 점차적으로 감소하는 양상을 보임. 다만 8월에는 표층과 수심 30m에서의 수온차이가 7℃가량 나타났다. 수심 5-7m 사이에서 수온약층이 형성되는 것으로 관찰됨. 특히 저층에서는 냉수대가 나타나는 양상을 보임. 대상해역에서의 수온 변화는 여름철에 수심별로 상이한 양상을 나타냄.
- 수층별 염분도에서도 7월에서 9월 사이 수층별로 상이한 양상을 보임. 특히 7월과 8월은 올해 잦은 강우로 인한 표층 염분도 변화가 관측되었으나, 특히 8월에는 5-20m 사이에도 평균보다 1.5% 이 낮은 염수의 유입이 관측됨. 염분변화도 여름철 수층에 따라 상이하게 나타나는 경향을 보임. 이러한 양상은 작은 변화이지만 30m 수심에서도 나타남



<그림 5-3-1. 조사해역 월별 수온, 염분의 수직 분포 양상 >

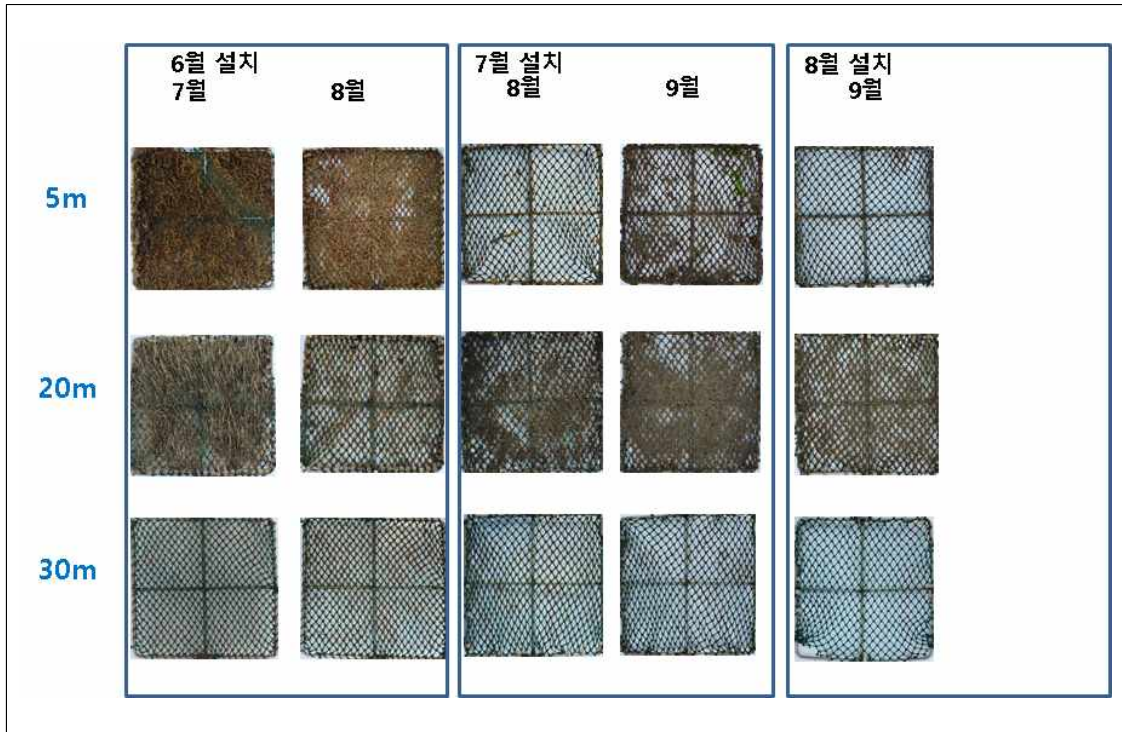
- 실험 방법 : 2020년에는 2019년 진행된 수층에 따른 부착생물 가입양상에서 설치 장소 문제에 따른 시설물 탈락과 걸림으로 누락된 자료를 보완하기 위해 기존 설치지역에서 이동하여 동일한 방식으로 진행함. 2020년 3월부터 기존과 동일하게 5m, 20m, 30m에 부착판을 시설하고, 1개월후, 2개월 후에 인양한 후에 사진을 촬영한 후 2월이 지나면 수거하여 부착생물 가입을 확인함. 부착 또는 부착판에 가입된 생물을 모두 수거하여, 동정을 진행한 후 계수하고 습중량을 측정함.
- 실험 결과 : 3월에 설치한 부착판에서는 다른 계절과 상이하게 20m 이상 중·저층에서 생물 가입이 강하게 나타남. 이러한 원인은 곡형동물이 가입이 진행된 것으로 곡형동물은 주로 20m 이상 깊은 수심에서 주로 가입하는 양상을 보임. 4월 이후 설치된 부착판에서는 5m 수심에서 전반적으로 높은 생물 가입 양상을 나타냄. 하지만 7월 이후에는 모든 수층에서 가입이 나타나지 않음. 통영 연안에서 생물 가입은 주로 3-6월 사이 진행되는 것으로 관측됨.



<그림 5-3-2. 수층에 부착판 설치 이후 생물 가입양상 (3월-5월)>

- 30m 수심에서는 기타 수심에서 진행되는 부착생물 가입 양상이 5월 이후 저조함. 5월에 시설한 부착판에서 7월 20m 수심에서 대량가입이 관측 되었는데, 히드로충류의 일시적 가입에 따른 바다대벌레가 가입되어 나타난 영향임. 5월에 설치하여 2개월이 지난 후 7월에 수거한 부착판에서는 이동성 소형 갑각류의 대량가입이 수심 5m, 20m에서 관찰됨. 6월에 대비하여 집중적으로 출현한 이동성 소형갑각류는 8월이후에는 거의 나타나지 않음. 이러한 양상은 일시적 가입요인에 대한 분석을 진행중 임.
- 하계(6월)이후 설치한 부착판에서도 30m 수심에서 부착생물 가입이 거의 나타나지 않음, 반면에 5m 수심과 20m 수심에서는 곡형동물과 히드로 충류의 가입이 지속적으로 나타남. 다만 중서식밀도에서는 봄철보다 감소하는 양상을 보임
- 하계 우점 부착생물 가입양상 분석 : 3월, 5월 9월에 투입된 부착판에서 총 37종 49,000 개체 (35.4 gWWt)의 생물이 채집됨. *Caprella scaura*는 수심이 깊어질수록 개체수가 감소하는 양상을 보임. 특히 30m에서 대체적으로 가장 적은 개체수를 나타냄. 수심이 깊어지면서 *Caprella scaura*가 서식조건에 대한 검토가 필요함. *Jassa slattery*는 봄철에는 수심이 깊어질수록 개체수가 감소하는 양상을 보이지만 여름철에는 20m에 가장 많은 개체수를 가지고 30m에서는 다시 적어짐. 여름철 표층에 가까운 5m는 각 수심중에 수온이 가장 높음. 여름철 *Jassa slattery*의 분포가 20m에서 가장 많은 것으로 보아 냉수성으로 판단됨. 30m는 *Jassa slattery*가 서식하기에 너무 낮은 수온과 용존산소량을 가짐. *Stenothoe valida*는 봄철에는 3, 50m에서 분포하나 초여름에서 여름이 지날수록 개체수가 감소하는 양상을 보임. 초여름에는 따뜻한 표층을 피해 20m에 분포하나 본 여름에는 개체수가 눈에 띄게 감소한 것을 보아 냉수성으로 판단됨. 곡형동물인 Kamptozoa는 국내 서식이 원활하지만 아직 미기록 종인데 봄철-초여름까지는 수심이 깊어질수록 가입량이 감소하나 여름철은 수심이 깊어질수록 가입량이 증가함. 봄철에 가장 많

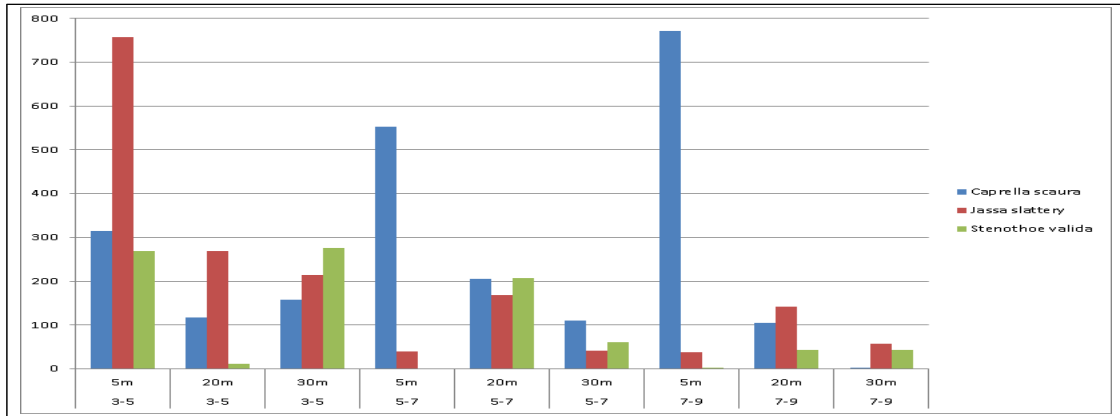
이 가입되며 초여름이 될수록 현저히 가입량이 낮아짐. 한여름에는 가입이 되지 않음. 수심이 깊어질수록 개체수가 작아짐.



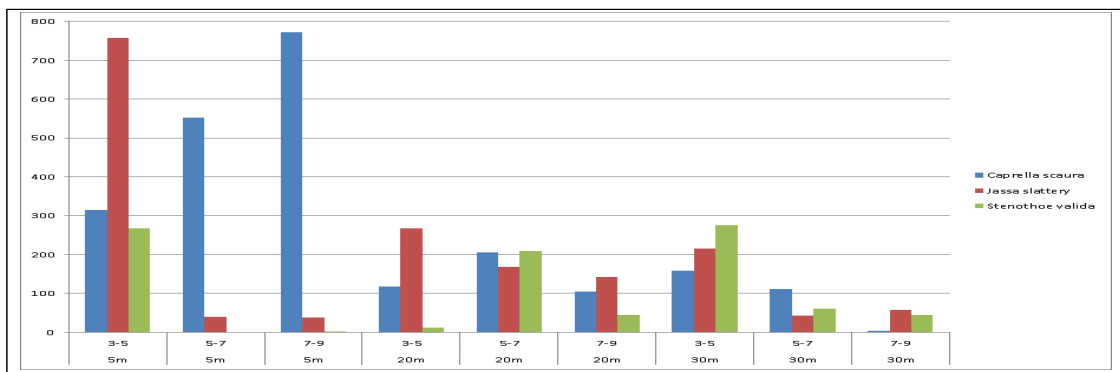
<그림 5-3-3. 수층에 부착관 설치 이후 생물 가입양상 (6월-8월)>

<표 5-3-1. 주요 우점종 분포 양상 >

우점종-계류기간	관측 수심		
	5m	20m	30m
<i>Caprella scaura</i>			
3-5월	314	118	158
5-7월	552	206	111
7-9월	772	105	3
<i>Jassa slattery</i>			
3-5월	758	268	215
5-7월	39	168	42
7-9월	37	142	57
<i>Stenothoe valida</i>			
3-5 월	268	12	276
5-7		208	61
7-9	1	44	44
Kamptozoa unid.			
3-5월	3952	1368	1368
5-7월	1368	456	456
7-9월	608	760	1216
<i>M. galloprovincialis</i>			
3-5월	329	114	93
5-7월	20	8	4
7-9월			



〈그림 5-3-4. 고착성 생물의 계절별 가입양상〉



〈그림 5-3-5. 이동성 생물의 계절별 가입 양상〉

라. 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 냉·온수성 양식자원생물을 양성 할 수 있는 공간을 조성함
- 대상어장의 수심은 최고 30-50m, 2020년 연중수온은 12.2 ~ 25℃를 나타냄. 표층에서 - 30m까지는 연중 12.2 ~ 25℃, 수심 30m이하에서는 2019년 여름철 20℃이하를 나타내고 있어 수온약층이 형성되었으나 2020년에는 태풍통과 후 상하층 전체가 교반되는 양상으로 표층과 수심 30m이하의 수심에도 표층과 같은 수온 분포를 보임
- 연승어장의 시설은 표준설계도를 작성하였으며, 어장시설 면적은 200×200m에 4계틀을 구성 후 연승줄 및 가릿줄을 시설 하였으며 연승의 간격은 외해임을 고려하여 10m간격으로, 부표는 연승수하 생물의 무게에 따라 부피 60리터 부표를 일정간격으로 시설함



<그림 5-4-1. 어장시설의 친환경 부표설치>

- 대상생물 선정 : 연중 수온이 24℃ 이하, 용존산소 3.5ppm 이상에서 생존 및 양식가능 또는 수온이 20℃ 이하에서 생존이 가능한 생물을 국내소비량 및 부가가치를 고려하여 선정함. 2019년 선정 어류인 무지개 송어는 조기 고수온으로 대량폐사가 발생할 우려가 많아 2020년도에는 남서해안에서 생산되는 참조기를, 무척추동물은 비단가리비를 선정함
- 대상 생물 선행연구 양성
 - 참조기 양식: 수층공간이용 복합양식을 위하여 온수성어종인 참조기 치어를 2020년 5월20일 민간 종묘생산장에서 양산한 치어 20,000마리를 유상 분양받아 통영해양생물자원기지의 가두리 시설에 방양하여 양성. 치어기의 참조기 크기는 전장이 평균 5.6cm, 중량은 평균 2.4g였으며, 치어기의 참조기는 외부충격이나 스트레스에 매우 예민하여 치어수송 및 가두리 순치가 매우 어려웠음.



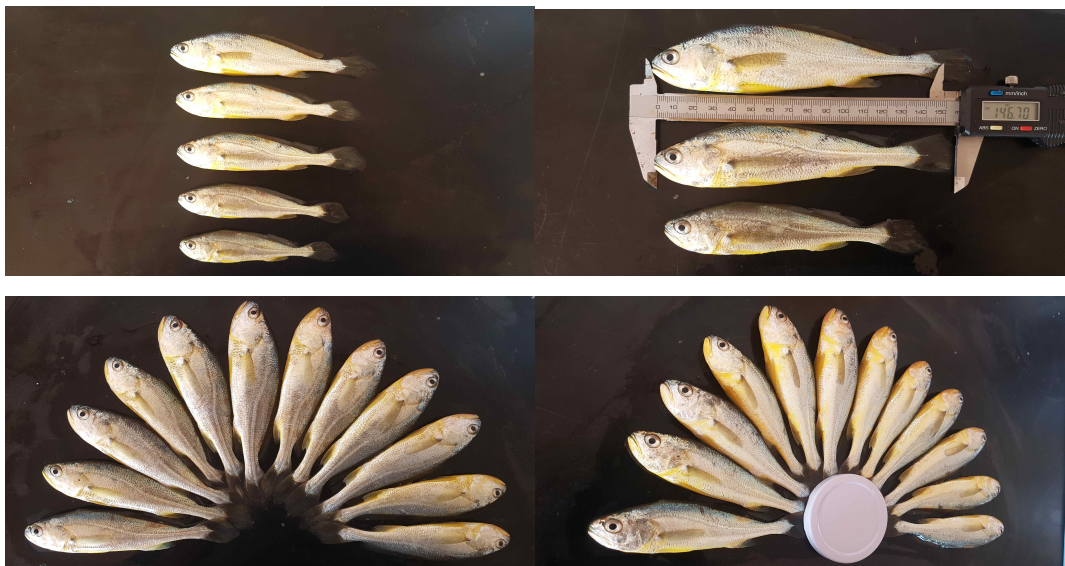
치어수송후 참조기 폐사체

치어 가두리 방양

치어 양성계측

<그림 5-4-2. 참조기 치어 가두리입식>

- 특히 계측을 위한 그물 작업시 대량폐사 현상까지 발생하여 초기감모율이 40%이상 나타나기도 하였음,
- 양성시 사료는 EP배합사료를 공급하였으며, 야간에 보안등을 켜주어 자연산먹이 응집을 통한 순치도 병행함. 5월 입식부터 7월 13일 까지 총 110kg, 7월 13일부터 10월 13일 까지 162kg의 사료를 공급함. 성장계측은 6월 1개월간 순치를 통하여 안정화 성장시킨 후 7월 13일과 10월 13일 일시적 계측을 위한 체포 후 실시. 3개월 양성 후 성장률은 차년도 연구의 준비단계임
- 참조기는 양성 과정중 다른 어종과 달리 표층으로 부상하는 경우가 매우 드물고, 사료공급시 외는 주로 저층 그물바다 주변에서 머무르며 활발히 행동할 때에도 그물벽을 타고 움직이는 등 행동패턴을 보여 혼양된 어종과의 먹이경쟁에서도 항상 처지는 양상을 보임
- 5월 20일 초기 방양후 7월 13일까지 성장은 평균 전장이 10.6cm이고 평균 중량은 10.46g으로 성장하여 있어 타어종과 유사한 성장 패턴이었음. 이후 3개월간 전장은 16.88cm, 중량은 46.65g으로 성장함, 생존율을 25%이상으로 산정 할 경우 증육계수는 1.16인데, 올해는 태풍에 의해 생존율이 감소함
- 참조기의 성장 속도는 다른어종과 유사하여 산업용으로 개발 시 경쟁력이 있을 것으로 판단됨. 참조기 상품성은 23cm에서 보이는데, 도달 기간은 24개월이고 통영 외해측의 가두리단지의 경우 겨울철 수온이 10℃ 이하까지 내려가지 않으므로 월동양식이 가능함



<그림 5-4-3. 참조기 성장관정 및 계측>

- 우렁쟁이(멍게): 기후변화로 인한 고수온으로 남해안에서 양식에 어려움을 겪고 있는 멍게를 2018년 11월 통영기지에 입식하여 수층공간이용 선형연구를 시행하였음. 초기 씨줄감기는 민간인 업체로부터 구입하여 양성하였는데, 본 양성은 수심 15m, 수심 25m 수층에 각각 분리하여 양성한 결과 수심 15m에서는 2019년 5월 전량 폐사, 수심 25m에 양성한 멍게는 전량 생

존하는 결과를 보임. 반복 실험 결과도 낮은 수심의 명게는 전량 폐사하였으나 깊은 수심의 명게는 4월 17일까지는 생존하고 성장도도 높았음. 수온이 20℃ 이상을 유지하고 있는 10월 말 현재도 일부가 생존하여 있을 것으로 생각되며, 생존개체수가 많을 경우 12월 말 명게 모패로 사용 할 계획임.



<그림 5-4-4.우렁쟁이 양성(명게)>

- 비단가리비 양식

- 재료 및 방법: 수심 5m, 22m에서 채롱망을 이용한 수층공간 가리비 양식을 하였으며 2019년 11월 같은 지역에서 채취한 중간육성패를 경남 고성군 삼산면 두포리 민간인 양식어장에서 양성시킨 비단가리비와 최종적으로 성장률을 비교조사 하였음.
- 비단가리비는 종묘 크기가 2~3 mm 내외이기 때문에 중간육성 과정을 거치지 않고 바로 양성용 채롱에 수용 할 경우 치폐가 너무 작기 때문에 수용하기가 힘들고 작업량이 많아져 비용 부담이 가중 되며 양성기간이 2년 이상으로 길어지고 고수온, 부니, 저산소에 저항력이 약하다는 단점을 지님. 이에 중간육성한 비단가리비를 구입하여 15단 채롱에 수용하여 가두리 양식어장에 수용하였으며 수용 밀도는 15단체롱 1단에 25미씩으로 하여 수심 5m와 22m에서 9개월간 양성 및 성장률을 조사하였음. 양성 과정중 발생하는 부착생물로 인한 직접적 양식어장피해 위협생물 가입양상을 부가로 조사함.



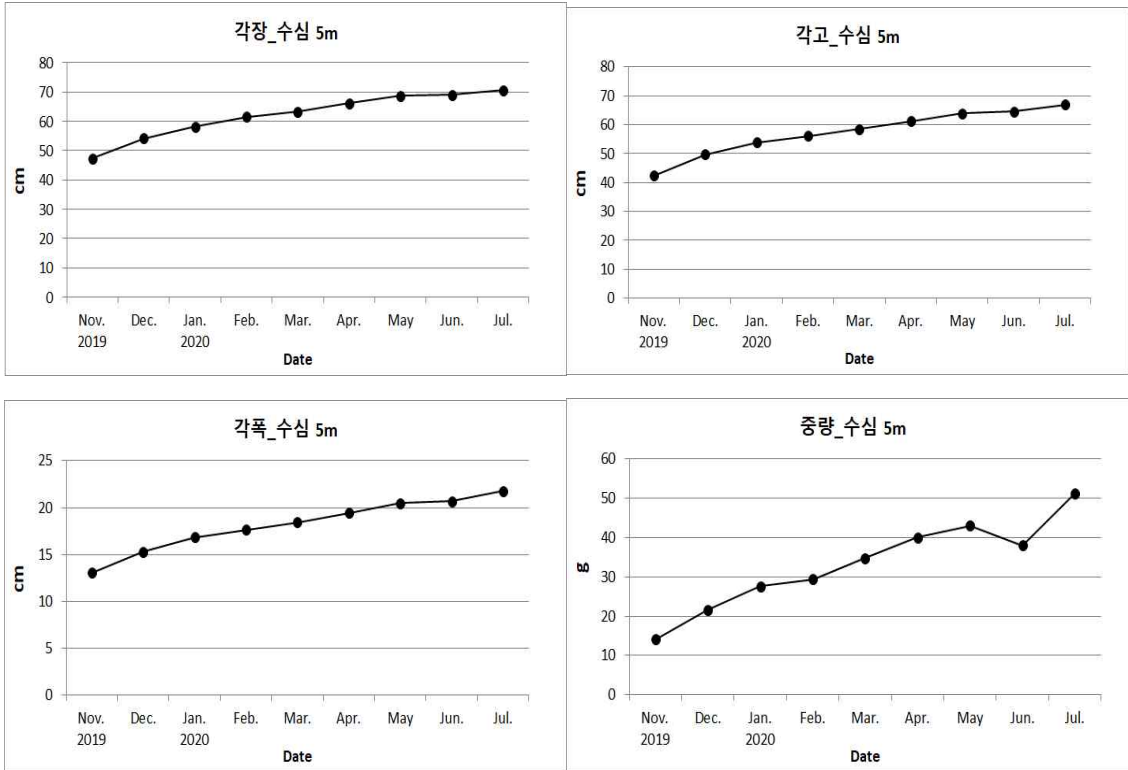
<그림 5-4-5. 비단가리비 중간육성종묘 입식>

- 결과 및 고찰: 수층공간이용 9개월간 성장률을 조사한 결과 폐사율은 수심 5m 실험구에서 48%, 수심 22m에서는 56%였으며 (그림 5-4-6, 5-4-7, 표 5-4-1, 5-4-2) 양성기간중 채룽망가리비의 부착생물피해를 조사한 결과 1월부터 5월 초까지 수심 5m채룽망에 가리비가 질식사할 정도로 진주담치가 대량으로 가입하여 4월 채룽망을 교체하였으나 수심 22m 채룽망은 진주담치의 가입량이 수심 5m에 비해 매우 적게 부착하였음. 주로 유령멍게가 5~6월 사이에 대량으로 가입하고 7월~8월에는 참굴이 대량가입하여 양식생물에 영향을 주었음 (그림 5-4-8). 또한 비단가리비의 중간종묘를 같은 기간 9개월간 양성하여 자란만 대조군과 비교한 결과 자란만 대조군은 평균중량이 39.1g인 반면 가두리 수심 22m에서 양성한 가리비는 평균 53g으로 매우 큰 성장률 차이를 보였는데 이는 연중 수온변화 폭이 크지 않는 것에 기인한다고 판단됨 (그림 5-4-9).

<표 5-4-1. 수층공간이용 수심- 5m에서의 비단가리비 성장률 조사>

(단위:평균)

월	각 장(mm)	각 고(mm)	각 폭(mm)	중 량(g)
9. Nov	42.43	42.43	13.07	14.04
Dec	54.12	49.67	15.31	21.66
20. Jan	58.15	53.81	16.82	27.66
Feb	61.49	56.05	17.65	29.36
Mar	63.28	58.52	18.45	34.79
Apr	66.21	61.23	19.41	40.04
May	68.64	63.85	20.47	43.09
Jun	69.10	64.52	20.68	38.05
Jul	70.60	66.94	21.76	51.29

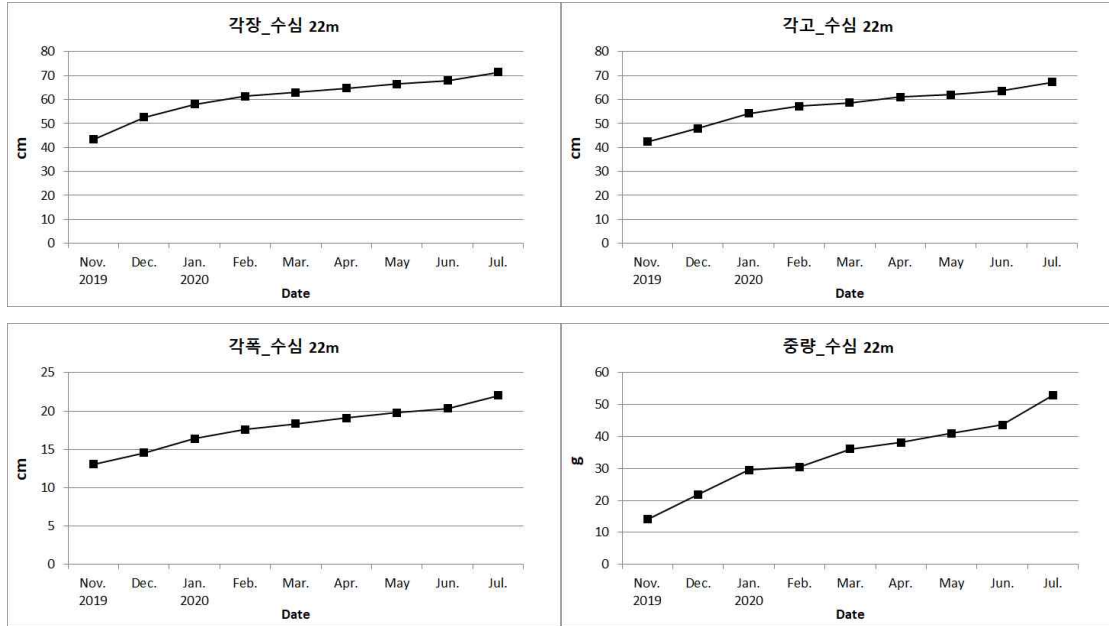


<그림 5-4-6. 2019년 11월 ~ 2020년7월 수심 -5m에서의 비단가리비 성장곡선>

<표 5-4-2. 수층공간이용 수심 -22m에서의 비단가리비 성장률 조사>

(단위:평균)

월	각 장(mm)	각 고(mm)	각 폭(mm)	중 량(g)	
9.	Nov	43.37	42.43	13.07	14.04
	Dec	52.58	47.93	14.55	21.83
20.	Jan	58.02	54.25	16.40	29.54
	Feb	61.35	57.22	17.56	30.43
	Mar	62.91	58.69	18.33	36.08
	Apr	64.70	61.04	19.08	38.16
	May	66.45	62.07	19.79	41.03
	Jun	67.96	63.68	20.34	43.66
	Jul	71.37	67.20	22.00	53.00



<그림 5-4-7. 2019년 11월 ~ 2020년7월 수심 -22m에서의 비단가리비 성장곡선>



<그림 5-4-8. 부착생물로 인한 양식생물 위협>

- 결론: 2020년 비단가리비 양식결론은 2019년과 같은 양상으로 도출 되었으나 수심별 성장은 수심 22m에서 부착생물영향도 없었고 성장도 수심 5m 보다 우수하였음. 다만 폐사율이 평균 52%로 다소 많았으며 이는 패류양식 기본 최고 생존률 50 ~ 60%에는 미치지 못하나 중간정도의 수확생존율에 해당함. 또한 연안 내만과 비교한 결과 같은 기간 평균중량이 14g정도가 더 나갔으며 이는 45일정도 빨리 큰 것인데, 내만에 비해 온도가 일정하게 유지되어 성장이 좋았던 것으로 판단됨

a) 가두리양식어장에서 수층별 비단가리비 성장(실험군)



b) 경남고성군 자란만 비단가리비(내만 대조군)



<그림 5-4-9. 가두리양식어장과 내만에서 자란 가리비의 성장 비교>

○ 비즈니스 해양공원 모델개발

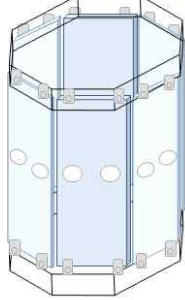
- 통영시 연안 수중체험 : 체험시설

- 좁은 해역에서의 복합적인 기능과 역할을 요구받고 있는 현실에서 항만, 어장, 보호구역 등 단일 목적으로 우리나라 연안 해양공간 관리를 정리할 수 없으므로 해양수산부의 해양공간의 통합관리와 계획적인 이용체계 구축(국정과제 84-5)과 관련된 지역협의회 활동과 향후 추진 방안을 감안한 해양공간의 복합 활용에 대한 모델 초안을 제시하고자 함
- 보다 많은 세계적인 해중공원 사례 분석과 대상 해역에서 연구 용역사업으로 추진된 통영바다목장 사업 결과물인 볼락류의 자원조성 기술, 참돔, 감성돔을 대상으로 포함하는 유어용 인공어초 개발의 과정을 융합하여 심층 양식과 자원조성, 해양레저산업, 체험, 교육 기능을 가진 해양공원, 또는 해중공원(Marine park) 모델의 실 해역 적용 검토
- 일반인, 학생 등 스쿠버 잠수 능력을 갖지 않은 이들을 위한 체험시설로는 아크릴 박스나 체인원통과 같은 시설(그림 5-4-10)을 활용하여 수중의 생태 관찰한데, 이와 같은 시설을 한국해양과학기술원의 해상과학기지에서 설치하는 안 제시 (그림 5-4-11).

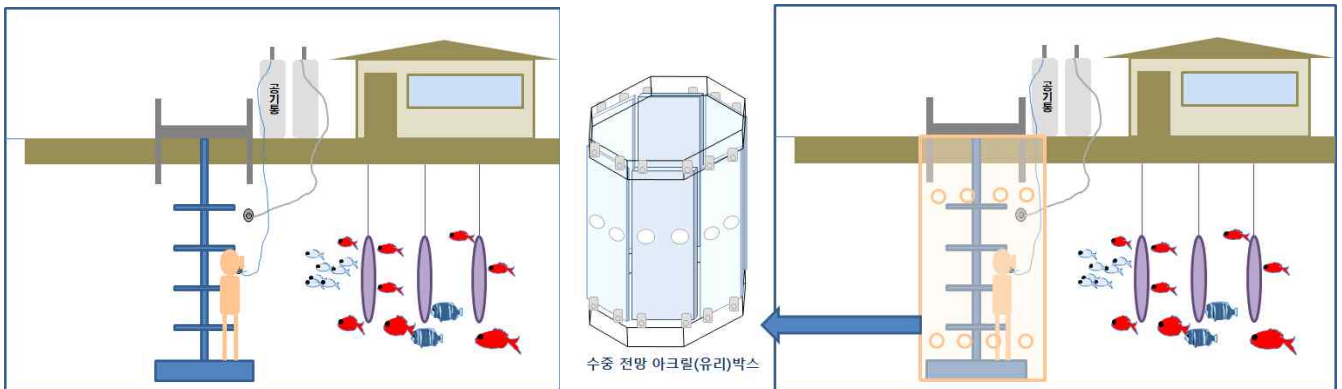
제 1안 : 체인형



제 2안 : 아크릴박스형



<그림 5-4-10. 해양공원 수중 체험시설 (체인형)>



<그림 5-4-11. 통영 해중공원 체험시설.>

- 통영시 연안 수중체험 : 해중림 생태

- 수중 체험시설을 활용하여 수중생태를 관찰하는 경우 표층에서 볼 수 있는 해중림, 양식시설, 인조 해조와 같은 모조품과 그곳에 군집한 어류들이 필요함. 바다목장과 같이 자원조성이 되어 있는 곳에서는 양식시설을 일종의 떠 있는 인공어초(부어초)로 활용 가능
- 해상 가두리 시설에 간단한 해중림(해조양식)을 만들어두면 어린 볼락류와 어류들이 그곳에 모여들게 되어 바다목장의 수중을 누구나 쉽게 관찰할 수 있으며(그림 5-4-12) 해중림과 유사한 기능은 표층에 설치한 양식시설(가리비채롱)에서도 볼 수 있기 때문에 양식 시설을 활용한 수중체험도 매우 바람직한 체험소재로 생각됨

- 대부분의 해조류는 여름철에는 소실되고 수온이 내려가는 초겨울에 다시 자라기 시작하므로 고수온기에는 플라스틱과 같은 인조 해조나 인조 모조물들을 활용할 수 있음(그림 5-4-13)



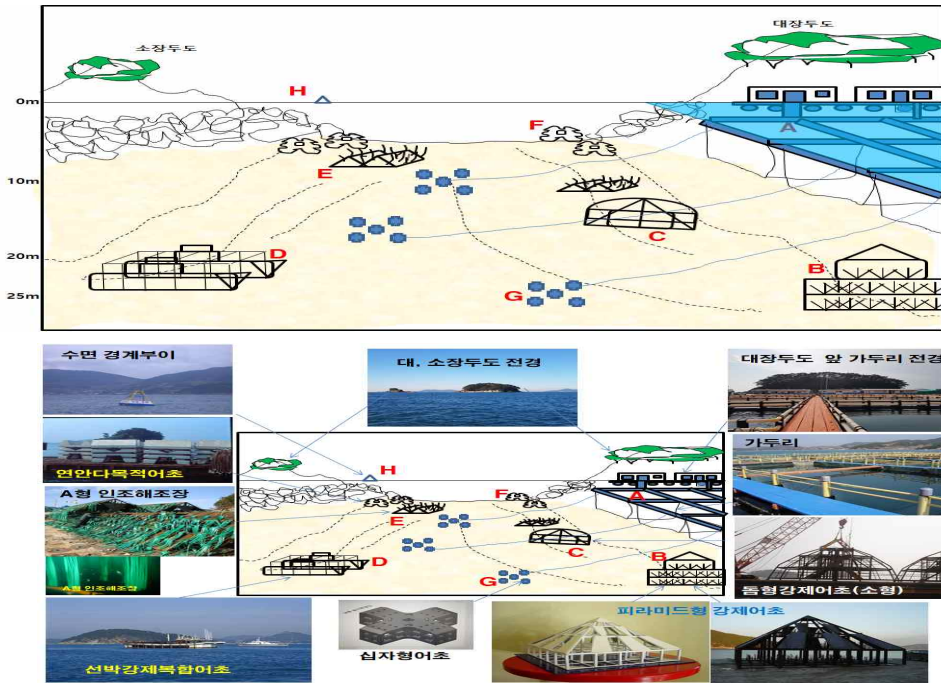
<그림 5-4-12. 다시마 양식시설 아래에 모인 볼락 (통영바다목장, 2020년 6월)>



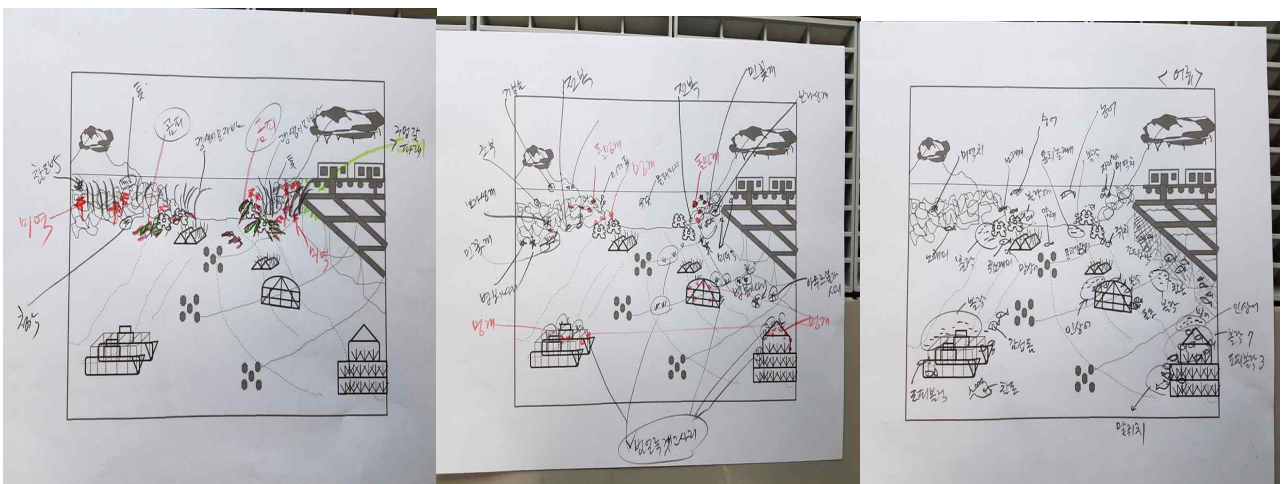
<그림 5-4-13. 여름철 해양 체험 장소에 설치 가능한 인조 식물>

- 통영시 연안 수중체험 : 생태지도

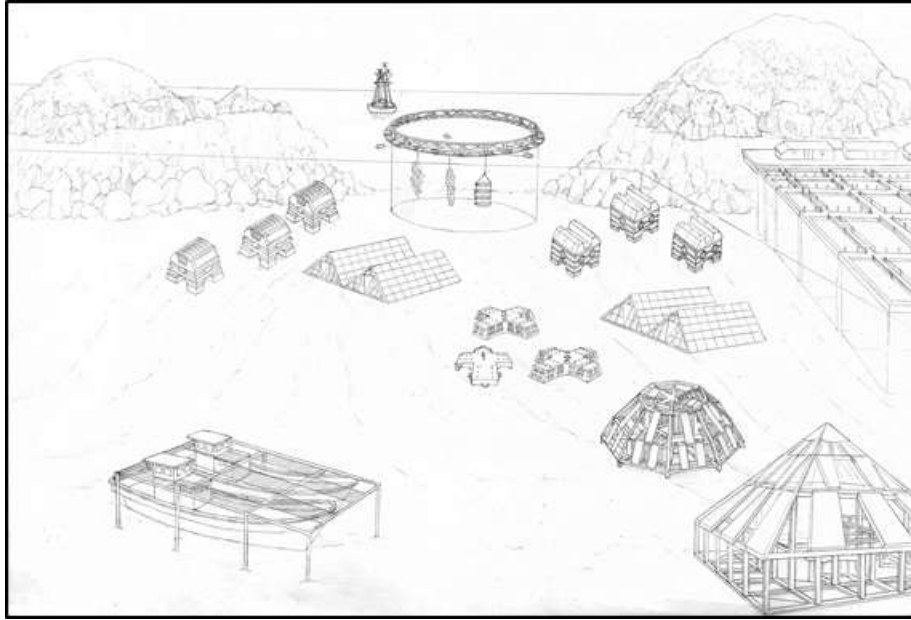
- 생태지도는 연안생태 건강성을 유지하고 환경변화에 수산자원의 관리 방향을 제시할 목적으로 면적 개념의 생물분포도를 작성하는 것인데 2020년에는 대장두도 동남쪽 연안의 수중 생태조사 결과들을 분석, 정리하여 생태지도를 제작함
- 대상해역은 통영바다목장 보호수면 내에 위치한 한국해양과학기술원 해양과학기지가 위치한 대장두도, 소장두도 연안이었으며 해저지형과 수중생태 자료(그림 5-4-14)와 각 분류군별 해양생물 분포도(그림 5-4-15), 밑그림(그림 5-4-16)으로 전문 화가 활용함



<그림 5-4-14. 통영바다목장의 수중생태지도 제작을 위한 기초 작업(밑그림(상)과 각 구조물의 실제 사진들(하))>



<그림 5-4-15. 생태지도 제작을 위한 분류군별 해양생물들의 분포 그림. (해조류(좌), 무척추동물(중), 어류(우))>


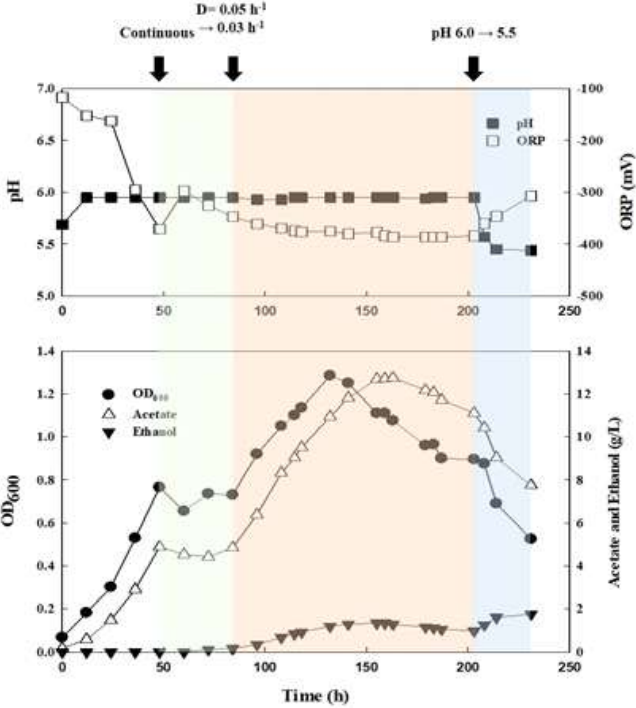


<그림 5-4-16. 통영연안 생태지도 밑그림.>

- 해양보호구역

- 해중공원으로 이용할 해역으로서는 수중경관이 우수하고 생물다양성이 높은 해역일수록 활용 가능성이 높지만 이러한 해역은 대부분 해양보호구역(MPA)으로 지정이 되었거나 후보지로 선정되어 있음
- 지정해역의 관리는 여러 가지 제한을 할 수 있지만, 부산시의 예를 들면 3개 지정 해역에서의 낚시, 해양레저 활동은 허락되고 있으며 단지 취사는 금지하고 있는데, 해양보호구역내의 환경변화는 인간 활동을 최소화한 연안에서 인위적인 관리 하에 장기모니터링이 가능하다는 점에서 장기적으로 해양공원화하기에 적합한 후보지역으로 판단되며 향후 보다 많은 생태적인 자료가 축적되고 관련된 정책들이 수립된다면 해양보호구역을 활용한 해중공원에 대한 인식도 점차 커질 것으로 생각됨

제3절 대표 성과

우수성과 -1.	배양조건 조절을 통한 C1 가스 전환효율 개선기술 개발
성과 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>Clostridium</i> sp. AWRP 균주를 대상으로 하여 CO₂ + H₂ 기질 조건에서 pH / 희석률 / 교반 속도별 영향 확인 - 각 요소의 조절을 통하여 아세트산-에탄올 생산의 전환과 관련된 균주의 특이성 확인 - 연속배양을 통하여 최대 약 8 g/L/d의 아세트산 생산성 달성
성과의 우수성	<ul style="list-style-type: none"> ○ 가스전환 공정 개발을 위한 플랫폼 균주 확보 - 기존 보고를 통해 알려지지 않은 대사조절 메커니즘 확인 - 낮은 균체에서도 C1 가스의 높은 전환율이 가능함을 확인
	
증빙자료	<ul style="list-style-type: none"> ○ 논문 및 특허 준비 중

우수성과 -2. 항균활성 해양미생물 대량 탐색 및 추출물 제조


성과 내용

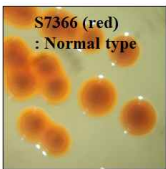
- 항균활성 해양미생물 대량 탐색
 - 자체 개발된 colony picking method를 이용하여 보유하고 있는 해양미생물 111균주(108종)을 대상으로 인체병원성 및 어류병원성 균주를 제어하는 18균주를 확보
 - 특이한 항균 pigment를 생산하는 미생물 2종에 대한 유전체 분석 및 pigment 생합성 유전자 그룹 확보
- 항균물질 추출물 제조
 - 14균주를 선별하여 에탄올 추출물 제작 및 paper disc method를 이용해 인체병원성 미생물 9종에 대한 항균활성 평가

성과의 우수성


- 항균물질 대량발굴 기술의 발판 마련
 - 자체개발 colony picking method를 응용하여 해양미생물과 육상병원성미생물을 동시 배양할 수 있는 배지를 확립하고 이를 토대로 항균물질 생산 해양미생물을 대량 발굴할 수 있는 토대를 마련
 - 기 보고되지 않은 항균활성 미생물 10종을 포함하는 18균주 확보. 이는 근 30년간 발굴되지 않은 새로운 항균물질 계열을 탐색하는 확률을 높일 수 있는 토대가 됨.

Pseudoalteromonas rubra

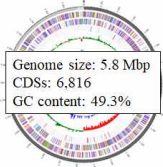




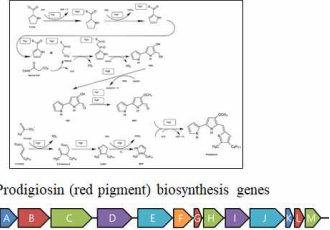
S7366 (red)
: Normal type



S6516 (green)
: New type



Genome size: 5.8 Mbp
CDSs: 6,816
GC content: 49.3%



Prodigiosin (red pigment) biosynthesis genes

Strain names (Stock no.)	Similar strains	Similarities (%)	Human pathogen									
			Enterococcus faecalis	Citrobacter freundii	Staphylococcus epidermidis	Pseudomonas aeruginosa	Candida albicans	Staphylococcus lentus	Escherichia fergusonii	Kocuria rhizophila	Listeria monocytogenes	
S5284	Bacillus aequororis M-8(T)	100.00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
S7899	Bacillus pumilus ATCC 7061(T)	99.93	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
S7903	Brachybacterium paraconglomeratum LMG 19861(T)	99.79	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
S7859	Epibacterium mobile DSM 23403(T)	99.78	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
S7706 (green)	Pseudoalteromonas luteoviolacea DSM 6061(T)	99.18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
S1156 (violet)	Pseudoalteromonas luteoviolacea DSM 6061(T)	99.59	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
S985	Pseudoalteromonas piscicida ATCC 15057(T)	99.86	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
S6516 (green)	Pseudoalteromonas rubra ATCC 29570(T)	99.86	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
S7366 (red)	Pseudoalteromonas rubra ATCC 29570(T)	99.65	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
S6030	Pseudoalteromonas rutenica KMM 300(T)	99.66	+	-	+	+	+	+	+	+	+	
S1131	Pseudoalteromonas xiamenensis Y2(T)	99.84	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
S1389	Pseudomonas juntendi BML3(T)	99.84	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
S1236	Salinimonas lutimaris DPSR-4(T)	99.58	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
S6003	Zunongwangia atlantica 22II14-10F7(T)	99.86	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

very strong
 strong
 weakly

증빙자료 ○ 활성이 우수한 균주들을 대상으로 특허 출원예정

우수성과 - 3.	비단가리비 적정 양식 공간 제시
성과 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 해역-수심에 따른 비단가리비 성장 비교 <ul style="list-style-type: none"> - 비단가리비는 외해 양식어장 22m 수심에서 연안 4m 수심에 비해 확연한 성장 보임
성과의 우수성	<ul style="list-style-type: none"> ○ 냉수성 양식자원의 남해안 양식 가능성 확인 ○ 수층공간 활용을 통해 양식생물의 성장을 증진시킬 수 있는 가능성 제시
<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">  </div> <p style="text-align: center;">외해양식어장의 수심 -22m 양성결과(8개월)</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">  </div> <p style="text-align: center;">자란만 연안 수심 - 4m 양성결과(8개월)</p>	
증빙자료	○ 기 타

제3장 연구개발목표 달성도 및 대외 기여도

제1절 연구개발 수행 적정성

○ 연도별 주요 추진 일정

구분	세부연구목표	추진 실적 및 계획												연구비 (천원)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
2020년 (2차년도)	1. 균주 확보, 특성 분석 및 배양조건 확립	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	320,000
	2. gas fermentation 기술 개발	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	430,000
	3. 고염분수 활용 대량 배양 기술	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	40,000
	4. 고염배양 바이오매스의 추출물/가공물로부터 유효성분 발굴					■	■	■	■	■	■	■	■	■	35,000
	5. 수층공간 활용 복합양식기술 개발	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	230,000

※ 파란색 : 계획 / 붉은색 : 실적

○ 당해연도 연구진도 적정 수행여부

- 신규미생물 자원확보를 위한 시료채취, 농후배양, 순수분리 등이 연구계획 대비 적절히 수행됨. 현재 연안 시료를 대상으로 Acetogen 그룹을 타깃으로 추가확보 연구를 진행 중에 있음.
- 확보된 미생물의 특성분석 연구는 연구계획 대비 적절히 수행됨. 신규성이 높은 2종에 대해 대사분석 및 유전체 분석 연구를 수행하였으며 신규성이 낮은 종들에 대해서는 유전체 분석 중에 있음.
- 전년도에 선정된 모델균주를 이용하여 다수의 결손주 및 적응진화균주 제작, 배양조건 조절 등을 통하여 OD 5.4를 달성하였으며 4차년도 목표였던 아세트산 생산성 6 g/L/d를 상회하는 결과를 생산함
- 적응진화, 형질전환 등의 방법을 적용하여 다수의 개량미생물을 제작함.
- 고염분수 활용 미세조류 대량배양 기술은 목표치를 달성함. 추출물/가공물로부터 유효성분 발굴은 우뚝가사리 가공물의 효능 측정을 제외하고 마무리 단계에 있음
- 수층공간별 월별 수산환경 조사, 먹이생물 분포 및 양식자원의 위내용물 추출한 먹이생물 추적하여 적정한 연구진도를 수행하였음.
- 수심별, 월별 위험생물 가입양상을 연구하였으며, 이를 분석 검토하여 실향역 양식어장 실증실험을 수행하였으며 이를 분석한 자료를 통하여 냉수성 어.패류의 적정 양식어장시설 수심을 정립함

[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	2020	30	
2	충남대학교	마하나마 디조이사	4	1	2020	30	

(2) 위탁과제 목표달성도 및 본과제에 대한 기여 내용

위탁과제명	당해연도 목표	목표달성도 (%)	본과제 목표달성에 대한 기여 및 활용 내용
1	고염 배양 해양생물자원의 지브라피쉬 모델 적용을 통한 건강도 평가	♦ 고염에서 배양된 해양생물 원료의 프리바이오틱 효과, 면역증진 등을 분석 90%	<ul style="list-style-type: none"> 장내 미생물 군집 분석 면역관련 유전자 발현 분석 조직학적 분석
2	고염 해양생물자원 유래 세포 및 조직 재생 효능 유효물질 발굴	♦ 고염 해양생물자원 유래 추출물 확보 및 조직 재생 능력 분석 80%	<ul style="list-style-type: none"> 추출물 제작 인간 조직세포 증식 효능 분석 인간 조직세포 이동 효능 분석 인간 조직세포 세포 분화 분석

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 10종	0.4	미생물 자원 확보 68종	100
		1-2. 신규자원 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
		4.1. 일일생산성 40g/m ² /d 이상	0.3	Tetraselmis sp., D. salina 각각 44.5, 46.3g/m ² /d 달성	100
	5. 수층공간 먹이생물 분포도	5.1. 수층공간 먹이생물 분포도 분석 1건	0.05	계절별 수층공간 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.신규 생물자원	1-1. 신규 미생물 8종 확보	0.1	자가영양 3종 5주, 종속영양 7종 확보	100
		1-2. 5종 대사경로 분석	0.1	2종 4주 완료, 2종 진행 중	80
	2.가스 전환기술 고도화	2-1. 개량균주 확보 1주	0.1	적응진화, 대사공학 기반 개량균주 10주 확보	100
		2-2. OD 7.0< 배양	0.15	최대 OD 5.4 도달	80
		2-3. 아세트산 생산성 (4년차 목표 조기달성)		연속배양을 통하여 약 8 g/L/d 달성	100
	3.미세조류 배양	3-1. 미세조류 일일생산성 47g/m ² /d 이상	0.1	Tetraselmis sp., D. salina 각각 47.2, 48g/m ² /d 달성	100
		3-2. 고염생물 2종 10톤급 배양	0.1	미세조류 2종 10톤급 배양	100
		3-3. 미세조류-미생물 하이브리드 배양 설계도면 1건	0.1	설계도면 2건	100
	4.미세조류 기능성	4-1. 해양생물 가공물제조 5건	0.1	가공물 제조 7건	100
		4-2. 미세조류펙틴 장내 미생물증진 동물실험	0.05	취를 이용한 장내미생물 증진 실험	100
	5. 수층공간 활용	5-1. 병원체 검출키트 1건	0.05	PCR 기반 CHV1 바이러스 검출키트 제작	100
		5-2. 어장시설 설계서 1건	0.05	어장시설 설계도 작성 1건	100
		5-3. 수층공간 종합 먹이생물 분포도 분석 1건		종합 먹이생물 분포도 1건	100
		5-4. 해양 병원성 바이러스 목록 1건		바이러스 출현 양상 분석 1건	100
계			1.0		95

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	부합여부	수행여부
신규 미생물 자원 확보	10	8종	8종	동등	수행
신규 미생물자원 대사경로 분석 (오믹스 분석)	10	5종	5종	동등	수행
개량균주 확보	10	1종	1종 (성과계획서)	동등	수행
가스전환 고농도 배양기술	15	OD 7.0<	OD 5.0<	초과	수행
미세조류 생산성	10	일일생산성 47g/m ² /d 이상	일일생산성 45g/m ² /d 이상 (성과계획서)	초과	수행
고염 생물 10톤급 배양조건 확립	10	2종	2종	동등	수행
미세조류-미생물 하이브리드 대량배양 시스템 설계 도면	10	1건	-	초과	수행
미생물 활용 해양생물 가공물 제조	10	5건	4건	초과	수행
미세조류 펙틴의 장내 미생물 증진	5	전임상	전임상 (성과계획서)	동등	수행
병원체 검출키트	5	1건	1건	동등	
어장시설 설계서	5	1건	1건	동등	수행
계	100%				

제3절 대외 기여도

1. 연구논문

번호	논문명	저자명 (KICST 저자만 표기)	게재일	학술지명	학술지구 분	ISSN	mrnIF	저자구분
1	Biological process for coproduction of hydrogen and thermophilic enzymes during CO fermentation	이성혁, 이성목, 이정현, 이현숙, 강성균	2020.06	Bioresource Technol	SCI(E)	0960-8524	100	주저자/교신저자
2	Direct Electron Transfer between the frhAGB-Encoded Hydrogenase and Thioredoxin Reductase in the Nonmethanogenic Archaeon <i>Thermococcus onnurineus</i> NA1	정해창, 임재규, 강성균, 이현숙	2020.03	Appl Environ Microbiol	SCI	0099-2240	76.77	주저자/교신저자
3	Long-term Operation of Continuous Culture of the Hyperthermophilic archaeon, <i>Thermococcus onnurineus</i> for Carbon Monoxide- dependent Hydrogen Production	이성목, 이현숙, 이정현, 강성균	2020.06	Biotech Bioprocess Eng	SCI	1226-8372	40.65	교신저자
4	<i>Paradesulfovibrio onnuriensis</i> gen. nov., sp. nov., a chemolithoautotrophic sulfate-reducing bacterium isolated from the Onnuri vent field of the Indian Ocean and reclassification of <i>Desulfovibrio senegalensis</i> as <i>Paradesulfovibrio senegalensis</i> comb. nov.	김윤재, 양정안, 임재규, 박미정, 양성현, 이현숙, 강성균, 이정현, 권개경	2020.04	<i>J Microbiol</i>	SCI(E)	1225-8873	46.62	주저자/교신저자
5	<i>Thermococcus indicus</i> sp. nov., and <i>Thermococcus indicus</i> sp. nov. an iron-reducing hyperthermophilic archaeon isolated from the Onnuri vent field of the Indian Ocean	임재규, 김윤재, 양정안, Teddy, 양성현, 박미정, 이현숙, 강성균, 이정현, 권개경	2020.04	<i>J Microbiol</i>	SCI(E)	1225-8873	46.62	주저자/교신저자
6	Description of <i>Luteithermobacter incheonensis</i> gen. nov. sp. nov. and reclassification of genus <i>Emcibacter</i>	박미정, Teddy, 양성현, 권개경	2020.08	<i>Int J Syst Evol Microbiol</i>	SCI(SCO PUS)	1466-5026	29.55 (2019 기준)	주저자/교신저자
7	Enhanced Alcohol Production from Synthesis Gas Using a CO-resistant Mutant of <i>Clostridium</i> sp. AWRP	권수재, 이종민, 이현숙	2019.12	Kor J Microbiol Biotechnol	KCI	1598-642X	-	주저자/교신저자
8	Marine Microalgae, <i>Spirulina maxima</i> -Derived Modified Pectin and Modified Pectin Nanoparticles Modulate the Gut Microbiota and Trigger	강도형	2020.03	MARINE DRUGS	SCI(E)	1660-3397	75.000	교신저자

번호	논문명	저자명 (KICST 저자만 표기)	게재일	학술지명	학술지구 분	ISSN	mrnIF	저자구분
	Immune Responses in Mice							
9	Antioxidant and anti-melanogenic activities of ultrasonic extract from <i>Stichopus japonicus</i> . Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine	허수진	2020.01	ASIAN PACIFIC JOURNAL OF TROPICAL BIOMEDICINE	SCI(E)	2588-9222	50.000	교신저자
10	Characterization and anti-tumor activity of saponin-rich fractions of South Korean sea cucumbers (<i>Apostichopus japonicus</i>)	김은아	2020.06	JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY	SCI(E)	0022-1155	46.377	공저자
11	Ishophloroglucin A, derived from <i>Ishige okamurae</i> , regulates high-fat-diet-induced fat accumulation via the leptin signaling pathway, associated with peripheral metabolism	강나래	2020.09	ALGAL RESEARCH	SCI(E)	2211-9264	76.129	제1저자
12	Diphlorethohydroxycarmalol Attenuates Palmitate-Induced Hepatic Lipogenesis and Inflammation	허수진	2020.09	Marine Drugs	SCI(E)	1660-3397	75.000	공저자
13	<i>Spirulina maxima</i> derived marine pectin promotes the in vitro and in vivo regeneration and wound healing in zebrafish	강도형	2020.10	Fish and Shellfish Immunology	SCI(E)	1050-4648	98.571	교신저자
14	Characterization of ionic cross-linked composite foams with different blend ratios of alginate/pectin on the synergistic effects for wound dressing application	허수진	2020.08	International Journal of Biological Macromolecules	SCI(E)	0141-8130	90.909	공저자
15	다기능 해양소재로서 홍해삼의 효과와 지역별 성분 비교를 통한 활용 가능성 연구 고찰	허수진	2020.06	한국해양바이오학회지	KCI후보	2383-5400	-	제1저자
16	해양조류 14종 유래 Marine Pectin의 추출 및 이의 함량과 항산화 활성에 관한 연구	강도형	2020.07	한국식품영양과학회지	KCI	1226-3311	-	교신저자
17	Physiological and oxidative stress response of goldfish <i>Carassius auratus</i> induced by a light dimming system	박홍식	2020.02	Fish Physiol Biochem	SCI	0920-1742	73.08	공저자
18	Exposure of bay scallop <i>Argopecten irradians</i> to micro-polystyrene: Bioaccumulation and toxicity	박홍식	2020.10	Comparative Biochem Physiol C-ToxicolPharmacol	SCI	1878-1659	97.61	공저자
19	Marine Metatranscriptome Profiling in the Sea Adjacent to Jeju Island, Korea, by RNA-sequencing	강민경, 김강은, 정승원, 이택견	2020.06	Journal of Life Science	KCI	2287-3406	-	교신저자

2. 저서

번호	서명	저자명 (KICST 저자만 표기)	발간일	출판사	발간 구분	ISBN	저자구분
1	해양바이오 R&D 현황	강도형	2020.05	현대해양	국내저서	0000-0000	제1저자

3. 학술발표

번호	논문명	저자명 (KICST 저자만 표기)	발표일	학술대회명	구분	국내/외	저자구분
1	Anti-inflammatory effect of ethanol extract of Turbo cornutus in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages and zebrafish model	강나래, 김은아, 김준성, 허수진	2020.10.22	2020 KFN International Symposium and Annual Meeting		국외	제1저자
2	Saringosterol acetate inhibits hepatocellular carcinoma growth and metastasis in a zebrafish xenograft model	김은아, 강나래, 김준성, 허수진	2020.10.22	2020 KFN International Symposium and Annual Meeting		국외	제1저자
3	Anti-osteoporotic effect of marine algae extracts in MG-63 osteoblast-like cells and RAW264.7 macrophage cells	김은아, 강나래, 김준성, 허수진	2020.10.22	2020 KFN International Symposium and Annual Meeting		국외	제1저자

4. 산업재산권 (특허/SW/신기술 등)

번호	특허명(SW명)	등록국가	출원번호	출원일	등록번호	등록일
1	해수 또는 천일염을 이용한 고온성 고세균 배양용 배지 조성물	대한민국			10-2096063	2020/
2	조류로부터 유도된 다중불포화 지방산을 포함하는 액체 지방 조성물 및 그 제조방법	대한민국			10-2086830	2020/03/03
3	홍해삼 효소 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 근육질환 치료 또는 근력개선용 약학적 조성물 및 식품	대한민국			10-2087432	2020/03/04
4	홍해삼 가수분해물을 포함하는 피부재생용 하이드로겔 및 그 제조방법	대한민국			10-2149218	2020/08/24
5	융합 태그가 없는 인간 섬유아세포 성장인자 19 재조합 단백질의 가용성 발현 및 그의 용도	대한민국	10-2020-0057108	2020/05/13		
6	해조류로부터 추출된 펙틴을 포함하는 어류용 사료조성물 및 이를 이용한 어류의 면역력 증진, 질병 억제, 및 성장 촉진 방법	대한민국	10-2020-0001500	2020/01/06		
7	써모코코스 온누리누스 WTF-350T 및 이를 이용한 수소 생산 방법	대한민국	10-2020-0147367	2020/11/06		

번호	특허명(SW명)	등록국가	출원번호	출원일	등록번호	등록일
8	온도안정성을 향상시킨 FGF7 폴리펩타이드 및 그 용도	대한민국		진행 중		
9	신규한 상피세포성장인자-TF 융합 단백질 및 이의 대량 생산 방법	대한민국		11/6 예정		
10	신규한 신호펩타이드-상피세포성장인자-세포투과펩타이드 융합 단백질 및 이의 대량 생산 방법	대한민국		11/6 예정		
11	다중벽 에어포켓 부표	대한민국	10-2020-0084994	2020/07/09		
12	신규한 상피세포성장인자-TF 융합 단백질 및 이의 대량 생산 방법	PCT		11/6 예정		
13	신규한 신호펩타이드-상피세포성장인자-세포투과펩타이드 융합 단백질 및 이의 대량 생산 방법	PCT		11/6 예정		
14	융합 태그가 없는 인간 섬유아세포 성장인자 19 재조합 단백질의 가용성 발현 및 그의 용도	미국	16/997,198	2020/08/19		
15	플러스공간 인공어초	페루	000413-2020/DIN	2020/04/21		
16	열적으로 안정한 FGF2 폴리펩타이드 및 그 용도	중국		진행 중		

5. 기술료 수입

번호	기술실시 계약명	최초 기술실시년도	당해연도 기술료(원)	계약 체결일
1	수층공간을 이용한 양식어장 개발기술	2020	5,000,000	2020.02.04

6. 기타(대외 및 홍보활동)

번호	활동명	유형	활동/시행일	계약 체결일
1	“광어 품종개량 연구를 위한 질병내성 유전형질 분석” 연구용역 제안서 평가	대외활동	평가위원/2020.08.27	
2	제주대학교 일반대학원 해양생명과학과 학위논문 심사	대외활동	심사위원/2020.06.11	
3	해양과학기술 학술교류 콜로키엄 실시에 따른 학/연 협력, 공동연구 활성화, 대학원생들의 전문지식 습득 및 연구 능력 강화 등을 위해 특강 진행	홍보활동	대중강연/2020.10.08	
4	미래의 해양을 이끌어갈 제주지역 청소년들에게 바다의 중요성을 인식시키고 해양과학연구 및 진로 탐색을 위한 강연 진행	홍보활동	대중강연/2020.09.28	

제4절 연구성과의 의의

구분	주요 내용
<p>자체 종합 평가 의견</p>	<ul style="list-style-type: none"> □ 우수한 정량 성과 달성 <ul style="list-style-type: none"> - 전체 19편의 논문 중 mrnIF 상위 20% 이상의 논문 4편, 상위 40%이상 5편 등 다수의 우수 논문을 발표함 □ 세계 최고수준에 근접한 기술 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 모델생물을 이용한 가스발효기술의 경우 다양한 반응기 운영 조건 조절과 연속 배양을 통하여 고농도의 아세트산 생산성 달성 (약 8 g/L/d) - 새로운 개념의 생물반응기 개발 등을 통하여 우수한 미세조류 생산성 달성 - 기존에 알려지지 않았던 다양한 미생물의 항균기능 확인 □ 현장 애로기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 수층 공간을 입체적으로 활용하여 수산자원의 양식효율을 높일 수 있음을 비단가리비 시험양식을 통해 입증 - 양식 위해요인의 모니터링을 통해 양식 효율성 제고 가능성 확인
<p>1차년 (2019년) 성과 및 의의</p>	<ul style="list-style-type: none"> □ 우수한 신규 생물자원 확보에 성공 □ 세계 최고수준의 회분식 가스전환 배양기술 확보 □ 고염분수 활용 미세조류의 고농도 배양기술 확보 □ 고염분수 활용 해양생물로부터 기능성 물질 확보 □ 남해에서도 수층공간을 활용하여 냉수성 수산물을 생산할 수 있음을 확인
<p>2차년 (2020년) 성과 및 의의</p>	<ul style="list-style-type: none"> □ 신규한 자가영양미생물 확보 성공 및 이들의 기능 평가를 통해 C1 물질 이용의 대사다양성 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 연안환경으로부터 Acetobacterium속과 Eubacterium속 사이에 존재하는 새로운 분류군을 확보함 - 이들의 유전체 분석, 대사과정 시험 등을 통해 기존 균주들보다 다양한 C1 물질 이용이 가능함을 확인함 □ 모델미생물을 이용하여 새로운 대사조절기작 확인 및 <ul style="list-style-type: none"> - 배지 개선을 통해 Clostridium sp. AWRP의 성장에 미치는 CO가스 저해현상 경감 시킴 - 적응진화/대사공학기술을 통해 AWRP 개량균주 확보 - pH/회석률/교반속도 등의 조절을 통해 약 8 g/L/d 수준의 아세트산 생산성 도달 □ 미세조류 10톤급 배양 및 추출물/가공물의 효능분석 <ul style="list-style-type: none"> - <i>Dunaliella salina</i>로부터 항산화, 항염증 활성을 나타내는 추출물 확보 - <i>Dunaliella salina</i>로부터 항암활성을 나타내는 가공물 확보 - <i>Tetraselmis</i> sp.로부터 항산화, 항염증 활성을 나타내는 추출물 확보

구분	주요 내용
	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Tetraselmis</i> sp.로부터 항산화, 항암 활성을 나타내는 가공물 확보 □ 구멍갈파래 가공물의 효능분석 <ul style="list-style-type: none"> - 콜라겐 합성과 보습 활성이 우수한 구멍갈파래 가공물 확보 - 환경문제를 야기하는 구멍갈파래의 산업적 활용 가능성 시사 □ 미세조류-미생물 하이브리드 배양시스템 테스트 및 대량배양 설계 <ul style="list-style-type: none"> - 미세조류-미생물 하이브리드 소규모 배양시스템에서 미세조류의 우수한 성장성을 나타냄. 이를 기반으로 대량배양 시스템 설계 □ 항균물질 생산 해양미생물 대량탐색 및 활성 추출물 제작 <ul style="list-style-type: none"> - 항균물질 생산 해양미생물의 대량 스크리닝 방법을 확립하여 18균주 (16종) 탐색, 14건의 활성 추출물 제작 - 기존에 항균활성이 보고되지 않은 종들이 다수 포함됨으로써 새로운 계열의 항생물질 발견 가능성이 높음 □ 장기 조사, 시험 양식 등을 통해 수층공간 이용의 타당성 입증 <ul style="list-style-type: none"> - 수온-염분 변화, 부착생물 가입 양상, 먹이생물 분포 등의 장기 조사를 통해 적정 양식 수심 도출 및 가리비 양식을 통한 실증 - 출현 빈도가 높은 <i>Cyprinid herpesvirus 1</i> (CHV1)의 PCR 기반 검출기술 개발

제4장 연구개발결과의 활용계획

1. 향후 연구 방향

본 과제는 2017년부터 시작된 3개 과제의 융합 형태로 진행 중이며 선행 과제의 성과를 이어받아 1-2년차 과제가 수행되었다. 3차년도에는 확보된 자원과 배양체들을 이용하여 고농도 미생물 배양 기술, 고염분수 활용하여 배양된 생물자원의 기능성 물질 함량 증진과 수층 복합양식기술의 고도화에 역량을 할애할 계획이다.

가. 해양극한 생명자원 지속 확보

- 국내외 환경시료의 농후배양, 균주 분리 및 분자동정, 유전체 분석, 생리학적 특성분석
- CO₂ 고정능이 우수한 균주 1주 이상 선정 및 정밀 분석을 통한 아세트산 전환능이 우수한 균주 1주 이상 선정
- 오믹스 기반 대사경로 및 특이 유전자 기능 분석

나. 가스발효 OD>10.0달성

- 가스전환 기술 최적화 : 배양조건 탐색, 가스발효 기술 개선을 통한 고농도 배양 기술 확립
 - 가스발효 공정 파라미터 최적화 공정개발 : 가스공급속도, 회석속도, 배지 중 주요영양분 농도, 액체순환속도 효과 분석 및 개선
 - 가스발효 적합 고농도 배양 기술 개발
- 가스전환 해양·극한미생물 플랫폼 확립 : 균주, gas fermentation기술, 소재 생산 연동 시스템 확립
 - 가스전환 우수균주 개발
 - 가스전환 산물 다양화 균주 확보

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

- 고염 해양생물자원 추출물/가공물로부터 유효성분 확보 및 효능 평가
 - 유효성분 발굴을 위한 물질 분리 및 정제
 - 유효성분의 효능 확인 및 작용기전 규명
 - 비임상 효력시험을 위한 제브라피쉬에서의 효능 평가
 - 미세조류-미생물 하이브리드 배양시스템을 이용한 대량배양
- 해양생물원료 성분 안정화 생산 프로토콜 구축
 - 최적 추출공정 개발 및 기준시험법 확립
 - 유해물질에 대한 규격 및 시험방법/안전성/기능성에 관한 자료 산출

라. 냉수층 공간을 이용 위생안전 어·패류 복합양식해양생물자원개발

- 냉수층 공간을 이용 위생안전 어·패류 복합양식해양생물자원개발
 - 양식생물 특이 병원체 진단기술 확립
 - 먹이생물 분포와 양식어종의 먹이특성 관계 규명 및 부착생물 관리 매뉴얼 작성
 - 품종별 양식적지 판정 도서 작성 및 수층 공간을 이용한 냉수성 어·패류 어장관리 매뉴얼 작성
 - 양식 생산성 향상과 함께 체험, 교육 개발 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

- Adam CL, Thomson LM, Williams PA, Ross AW. 2015. Soluble fermentable dietary fibre (Pectin) decreases caloric intake, adiposity and lipidaemia in high-fat diet-induced obese rats. *PLoS ONE* 10, e0140392.
- Aihara E, Engevik KA, Montrose MH. 2016. Trefoil factor peptides and gastrointestinal function. *Annu. Rev. Physiol.* 79, 357 - 380.
- Andersen RJ, Williams DE. 2000. Pharmaceuticals from the sea, pp. 55 - 79. In Hester RE, Harrison RM (eds), *Chemistry in the Marine Environment*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Balch WE, Schoberth S, Tanner RS, Wolfe RS. 1977. *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 27, 355-361.
- Bale SJ, Goodman K, Rochelle PA, Fry JRJC, Weightman AJ. 1997. *Desulfovibrio profundus* sp. nov., a novel barophilic sulfate-reducing bacterium from deep sediment layers in the Japan Sea. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 515-521.
- Baron EJ, Summanen P, Downes J, Roberts MC, Wexler H, Finegold SM. 2009. *Bilophila wadsworthia*, gen. nov. and sp. nov., a unique gram-negative anaerobic rod recovered from appendicitis specimens and human faeces. *Microbiology*. 135, 3405-3411.
- Bates JM, Akerlund J, Mittge E, Guillemin K. 2007. Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota. *Cell. Host Microbe*. 2, 371 - 382.
- Bäumer S, Murakami E, Brodersen J, Gottschalk G, Ragsdale SW, Deppenmeier U. 1998. The $F_{420}H_2$:heterodisulfide oxidoreductase system from *Methanosarcina* species: 2-Hydroxyphenazine mediates electron transfer from $F_{420}H_2$ dehydrogenase to heterodisulfide reductase. *FEBS Lett* 428, 295 - 298.
- Béjà O, Aravind L, Koonin EV, Suzuki MT, Hadd A, Nguyen LP, et al. 2000. Bacterial Rhodopsin: Evidence for a New Type of Phototrophy in the Sea. *Science* 289, 1902-1906.
- Biddle JF, Lipp JS, Lever MA, Lloyd KG, Sørensen KB, Anderson R, Fredricks HF, Elvert M, Kelly TJ, Schrag DP, Sogin ML, Brenchley JE, Teske A, House CH, Hinrichs K-U. 2006. Heterotrophic archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 3846 - 3851.
- Borrel G, Harris HMB, Tottey W, Mihajlovski A, Parisot N, Peyretailade E, Peyret P, Gribaldo S, O'Toole PW, Brugère J-F. 2012. Genome sequence of “*Candidatus Methanomethylophilus alvus*” Mx1201, a methanogenic archaeon from the human gut belonging to a seventh order of methanogens. *J Bacteriol* 194, 6944 - 6945.

- Bowman KS, Moe WM, Rash BA, Bae HS, Rainey FA. 2006. Bacterial diversity of an acidic Louisiana ground water contaminated by dense nonaqueous-phase liquid containing chloroethanes and other solvents. *FEMS Microbiol Ecol* 58, 120-133.
- Cao J, Gayet N, Zeng X, Shao Z, Jebbar M, Alain K. 2016. *Pseudodesulfovibrio indicus* gen. Nov., sp. nov., a piezophilic sulfate-reducing bacterium from the Indian Ocean and reclassification of four species of the genus *Desulfovibrio*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 3904-3911.
- Cavaleiro AJ, Abreu AA, Sousa DZ, Pereira MA, Alves AA. 2013. The role of marine anaerobic *Bacteria* and *Archaea* in bioenergy production. pp. 445-469 In Abdul M, Elisabeth G, Madalena A (eds.) Management of microbial resources in the environment. Springer, New York, USA.
- Chen HW, Yang TS, Chen MJ, Chang YC, Eugene I, Wang C, Ho CL, Lai YJ, Yu CC, Chou JC et al. 2014. Purification and immunomodulating activity of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* cultured using power plant flue gas. *Process Biochem.* 49, 1337 - 1344.
- Chen Y, Xu C, Huang R, Song J, Li D, Xia M. 2018. Butyrate from pectin fermentation inhibits intestinal cholesterol absorption and attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Nutr. Biochem.* 56, 175 - 182.
- Choi DH, Park K-T, An SM, Lee K, Cho J-C, Lee J-H, et al. 2015. Pyrosequencing revealed SAR116 clade as dominant dddP-containing bacteria in oligotrophic NW Pacific Ocean. *PLoS ONE* 10, e0116271.
- Chung WSF, Walker AW, Louis P, Parkhill J, Vermeiren J, Bosscher D, Duncan SH, Flint HJ. 2016. Modulation of the human gut microbiota by dietary fibres occurs at the species level. *BMC Biol.* 14, 1 - 13.
- Cotta MA, Whitehead TR, Falsen E, Moore E, Lawson PA. 2009. *Robinsoniella peoriensis* gen. nov., sp. nov., isolated from a swine-manure storage pit and a human clinical source. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 150-155.
- Cotta MA, Whitehead TR, Zeltwanger RL. 2003. Isolation, characterization and comparison of bacteria from swine faeces and manure storage pits. *Environ Microbiol* 5, 737-745.
- Darnaud M, Dos Santos A, Gonzale P, Augui S, Lacoste C, Desterke C, De Hertogh G, Valentino E, Braun, E.; Zheng, J.; et al. Enteric delivery of regenerating family member 3 alpha alters the intestinal microbiota and controls inflammation in mice with colitis. *Gastroenterology* 2018, 154, 1009 - 1023.
- De Roeck A, Duvetter T, Fraeye I, Van der Plancken I, Sila DN, Van Loey A, Hendrickx M. 2009. Effect of high-pressure/high temperature processing on chemical pectin conversions in relation to fruit and vegetable texture. *Food Chem.* 115, 207 - 213.
- DeLong EF. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 5685 - 5689.
- Desai MS, Seekatz AM, Koropatkin NM, Kamada N, Hickey CA, Wolter M, Pudlo NA, Kitamoto S,

- Terrapon N, Muller A et al. A 2016. dietary fiber-deprived gut microbiota degrades the colonic mucus barrier and enhances pathogen susceptibility. *Cell* 167, 1339 - 1353.
- Distaso A. 1912. Contribution à l'étude sur l'intoxication intestinale. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt I* 62, 433-468.
- Dridi B, Fardeau M-L, Ollivier B, Raoult D, Drancourt M. 2012. *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 1902 - 1907.
- Du J, Luo J, Yu J, Mao X, Luo Y, Zheng P, He J, Yu B, Chen D. 2019. Manipulation of intestinal antiviral innate immunity and immune evasion strategies of porcine epidemic diarrhea virus. *BioMed. Res. Int.* 3, 1862531.
- Edgar RC. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460 - 2461.
- Edirisinghe SL, Dananjaya SHS, Nikapitiya C, Liyanage TD, Lee KA, Oh C, Kang DH, De Zoysa M. 2019. Novel pectin isolated from *Spirulina maxima* enhances the disease resistance and immune responses in zebrafish against *Edwardsiella piscicida* and *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* 94, 558 - 565.
- Edwards JS, Palsson BO. 2000. The *Escherichia coli* MG1655 in silico metabolic genotype: Its definition, characteristics, and capabilities. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(10), 5528-5533.
- Elsaied H, Naqanuma T. 2001. Phylogenetic diversity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/ oxygenase large-subunit genes from deep-sea microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 64, 1751-1765.
- Escaffre AM, Kaushik S, Mambri M. 2007. Morphometric evaluation of changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) due to fish meal replacement with soy protein concentrate. *Aquaculture* 273, 127 - 138.
- Ettwig KF, Butler MK, Le Paslier D, Pelletier E, Mangenot S, Kuypers MMM, Schreiber F, Dutilh BE, Zedelius J, de Beer D, Gloerich J, Wessels HJCT, van Alen T, Luesken F, Wu ML, van de Pas-Schoonen KT, Op den Camp HJM, Janssen-Megens EM, Francoijs K-J, Stunnenberg H, Weissenbach J, Jetten MSM, Strous M. 2010. Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature* 464, 543 - 548.
- Fang MX, Zhang WW, Zhang YZ, Tan HQ, Zhang XQ, Wu M, Zhu XF. 2012. *Brassicibacter mesophilus* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic bacterium isolated from food industry wastewater. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 3018-3023.
- Felsenstein J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17, 368-376.
- Field CJ, McBurney MI, Massimino S, Hayek MG, Sunvold GD. 1999. The fermentable fiber content of the diet alters the function and composition of canine gut associated lymphoid tissue. *Vet. Immunol.*

- Immunopathol. 72, 325 - 341.
- Finster KW, Kjeldsen KU. 2010. *Desulfovibrio oceani* subsp. *oceani* sp. nov., subsp. nov. and *Desulfovibrio oceani* subsp. *galatae* subsp. nov., novel sulfate-reducing bacteria isolated from the oxygen minimum zone off the coast of Peru. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 97, 221-229.
- Fitch WM. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst. Zool.* 20, 406-416.
- Fontaine FE, Peterson WH, Mccoy E, Johnson MJ, Ritter GJ. 1942. A new type of glucose fermentation by *Clostridium thermoaceticum* n. sp. *J Bacteriol* 43, 701-715.
- Förster J, Famili I, Fu P, Palsson B, Nielsen J. 2003. Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. *Genome Res* 13(2), 244 - 253.
- Fox JG, Ge Z, Whary MT, Erdman, S.E, Horwitz, B.H. *Helicobacter hepaticus* infection in mice: Models for understanding lower bowel inflammation and cancer. *Mucosal Immunol.* 2011, 4, 22 - 30.
- Fraher MH, O'Toole PW, Quigley EMM. 2012. Techniques used to characterize the gut microbiota: A guide for the clinician. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9, 312 - 322.
- Galand PE, Potvin M, Casamayor EO, Lovejoy C. 2010 Hydrography shapes bacterial biogeography of the deep Arctic Ocean. *ISME J* 4, 564-576.
- Gam ZBA, Oueslati R, Abdelkafi S, Casalot L, Tholozan JL, Labat M. 2009. *Desulfovibrio tunisiensis* sp. nov., a novel weakly halotolerant, sulfate-reducing bacterium isolated from exhaust water of a Tunisian oil refinery. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1059-1063.
- Ganesh S, Parris DJ, DeLong EF, Stewart FJ. 2014. Metagenomic analysis of size-fractionated picoplankton in a marine oxygen minimum zone. *ISME J* 8, 187-211.
- Gao ZM, Xu X, Ruan LW. 2014. Enrichment and characterization of an anaerobic cellulolytic microbial consortium SQD-1.1 from mangrove soil. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 465-474.
- Ghiglione JF, Galand PE, Pommier T, Pedrós-Alió C, Maas EW, Bakker K et al. 2012. Pole-to-pole biogeography of surface and deep marine bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 17633-17638.
- Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, Noskov VN, Chuang RY, Algire MA, Benders GA, Montague MG, Ma L, Moodie MM, Merryman C, Vashee S, Krishnakumar R, Assad-Garcia N, Andrews-Pfannkoch C, Denisova EA, Young L, Qi ZQ, Segall-Shapiro TH, Calvey CH, Parmar PP, Hutchison CA 3rd, Smith HO, Venter JC. 2010. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* 329(5987), 52-56.
- Gibson GR. 1990. Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 69, 769-797.
- Giovannoni SJ. 1991. The polymerase chain reaction. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.),

- Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, United Kingdom, pp. 177-203.
- Girguis PR, Orphan VJ, Hallam SJ, DeLong EF. 2003. Growth and methane oxidation rates of anaerobic methanotrophic archaea in a continuous-flow bioreactor. *Appl Environ Microbiol* 69, 5472 - 5482.
- Goldstein EJ. 1995. Anaerobes under assault: from cottage industry to industrialization of medicine and microbiology. *Clin Infect Dis* 20(Supplement 2), S112-116.
- Gurry T, Gibbons SM, Kearney SM, Ananthakrishnan A, Jiang X, Duvallet C, Kassam Z, Alm EJ. 2018. Predictability and persistence of prebiotic dietary supplementation in a healthy human cohort. *Sci. Rep.* 8, 12699.
- Habib MAB, Parvin M, Huntington TC, Hasan MR. 2008. A review on culture, production and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish. In FAO Fisheries and Aquaculture Circular, No. 1034; FAO: Rome, Italy, 33p.
- Hallam SJ, Putnam N, Preston CM, Detter JC, Richardson PM, Rokhsar D, DeLong EF. 2004. Reverse methanogenesis: testing the hypothesis with environmental genomics. *Science* 305, 1457 - 1462.
- Hamdi O, Hania WB, Postec A, Bartoli M, Hamdi M, Bouallagui H, Fauque G, Ollivier B, Fardeau ML. 2013. Isolation and characterization of *Desulfocurvus thunnarius* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from an anaerobic sequencing batch reactor treating cooking wastewater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63,4237-4242.
- Haroon MF, Hu S, Shi Y, Imelfort M, Keller J, Hugenholtz P, Yuan Z, Tyson GW. 2013. Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage. *Nature* 500, 567 - 570.
- Harris JK, Caporaso JG, Walker JJ, and 11 others. 2013. Phylogenetic stratigraphy in the Guerrero Negro hypersaline microbial mat. *ISME J* 7, 50-60.
- Harrison BK, Zhang H, Berelson W, Orphan VJ. 2009. Variations in archaeal and bacterial diversity associated with the sulfate-methane transition zone in continental margin sediments (Santa Barbara Basin, California). *Appl Environ Microbiol* 75, 1487 - 1499.
- Hawkins AS, McTernan PM, Lian H, Kelly RM, Adams MW. 2013. Biological conversion of carbon dioxide and hydrogen into liquid fuels and industrial chemicals. *Curr Opin Biotechnol* 24(3), 376-384.
- Hedderich R, Berkessel A, Thauer RK. 1990. Purification and properties of heterodisulfide reductase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain Marburg). *Eur J Biochem* 193, 255 - 261.
- Heiden S, Hedderich R, Setzke E, Thauer RK. 1994. Purification of a two-subunit cytochrome-b-containing heterodisulfide reductase from methanol-grown *Methanosarcina barkeri*. *Eur J Biochem* 221, 855 - 861.

- Heo MG, Choung SY. 2018. Anti-obesity effects of *Spirulina maxima* in high fat diet induced obese rats via the activation of AMPK pathway and SIRT1. *Food Funct.* 9, 4906 - 4915.
- Himelbloom BH, Canale-Parola E. 1989. *Clostridium ethylpentosum* sp. nov.: a ring-shaped intestinal bacterium that ferments only methylpentoses and pentoses. *Arch Microbiol* 151, 287-293.
- Hino S, Sonoyama K, Bito H, Kawagishi H, Aoe S, Morita T. 2013. Low-methoxyl pectin stimulates small intestinal mucin secretion irrespective of goblet cell proliferation and is characterized by jejunum Muc2 upregulation in rats. *J. Nutr.* 143, 34 - 40.
- Hoiczyk E, Hansel A. 2000. Cyanobacterial Cell Walls: News from an unusual prokaryotic envelope. *J. Bacteriol.* 182, 1191 - 1199.
- Illumina. 2013. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. http://support.illumina.com/downloads/16s_metagenomic_sequencing_library_preparation.html. (28 December 2015, date last accessed)
- Inagaki F, Suzuki M, Takai K, Oida H, Sakamoto T, Aoki K, Nealson KH, Horikoshi K. 2003. Microbial communities associated with geological horizons in coastal subseafloor sediments from the Sea of Okhotsk. *Appl Environ Microbiol* 69, 7224 - 7235.
- Inoue H, Takimura O, Kawaguchi K, Nitoda T, Fuse H, Murakami K, Yamaoka Y. 2003. Tin-carbon cleavage of organotin compounds by pyoverdine from *Pseudomonas chlororaphis*. *Appl Environ Microbiol* 69, 878-883.
- Inoue K, Ono H, Abe-Yoshizumi R, Yoshizawa S, Ito H, Kogure K, and Kandori H. 2013. A light-driven sodium ion pump in marine bacteria. *Nat. Commun.* 4, 1678.
- Isenbarger TA, Finney M, Rios-Velazquez C, Handelsman J, Ruvkun G. 2008. Miniprimer PCR, a new lens for viewing the microbial world. *Appl Environ Microbiol* 74, 840-849.
- Iverson V, Morris RM, Frazar CD, Berthiaume CT, Morales RL, Armbrust EV. 2012. Untangling genomes from metagenomes: revealing an uncultured class of marine Euryarchaeota. *Science* 335, 587 - 590.
- Jagersma GC, Meulepas RJW, Heikamp-de Jong I, Gieteling J, Klimiuk A, Schouten S, Damsté JSS, Lens PNL, Stams AJM. 2009. Microbial diversity and community structure of a highly active anaerobic methane-oxidizing sulfate-reducing enrichment. *Environ Microbiol* 11, 3223 - 3232.
- Janssen PH. 2004. Propanol as an end product of threonine fermentation. *Arch Microbiol* 182, 482-486.
- Jiang T, Gao X, Wu C, Tian F, Lei Q, Bi J, Xie B, Wang HY, Chen S, Wang X. 2016. Apple-derived pectin modulates gut microbiota, improves gut barrier function, and attenuates metabolic endotoxemia in rats with diet-induced obesity. *Nutrients* 8, 126.
- Jukes TH, Cantor CR. 1969. Evolution of protein molecules, pp. 21-132. In Munro, H.N. (ed.), *Mammalian protein metabolism*, vol. 3. Academic Press, New York, USA.

- Kadnikov VV, Mardanov AV, Beletsky AV, Shubenkova OV, Pogodaeva TV, Zemskaya TI, Ravin NV, Skryabin KG. 2012. Microbial community structure in methane hydrate-bearing sediments of freshwater Lake Baikal. *FEMS Microbiol Ecol* 79, 348 - 358.
- Kane MD, Brauman A, Breznak JA. 1991. *Clostridium mayombe* sp. nov., an H₂/CO₂ acetogenic bacterium from the gut of the African soil-feeding termite, *Cubitermes speciosus*. *Arch Microbiol* 156, 99-104.
- Karunasena E, Kurkure PC, Lackey RD, McMahan KW, Kiernan EP, Graham S, Alabady MS, Campos DL, Tatum OL, Brashears MM. Effects of the probiotic *Lactobacillus animalis* in murine *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection. *BMC Microbiol.* 2013, 13, 1 - 13.
- Keane M, Semeiks J, Webb AE, Li YI, Quesada V, Craig T, Madsen LB, van Dam S, Brawand D, Marques PI, Michalak P, Kang L, Bhak J, Yim HS, Grishin NV, Nielsen NH, Heide-Jørgensen MP, Oziolor EM, Matson CW, Church GM, Stuart GW, Patton JC, George JC, Suydam R, Larsen K, López-Otín C, O'Connell MJ, Bickham JW, Thomsen B, de Magalhães JP. 2015. Insights into the evolution of longevity from the bowhead whale genome. *Cell Rep* 10(1), 112-122
- Keller MW, Schut GJ, Lipscomb GL, Menon AL, Iwuchukwu IJ, Leuko TT, Thorgersen MP, Nixon WJ, Hawkins AS, Kelly RM, Adams MWW. 2013. Exploiting microbial hyperthermophilicity to produce an industrial chemical, using hydrogen and carbon dioxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(15), 5840-5845.
- Kelly WJ, Leahy SC, Kamke J, Soni P, Koike S, Mackie R, Seshadri R, Cook GM, Morales SE, Greening C, et al. 2019. Occurrence and expression of genes encoding methyl-compound production in rumen bacteria. *Anim. Microbiome* 1, 15.
- Khelaifia S, Fardeau ML, Pradel N, Aussenagues C, Garel M, Tamburini C, Cayol JL, Gaudron S, Gaill F, Ollivier B. 2011. *Desulfovibrio piezophilus* sp. nov., a piezophilic, sulfate-reducing bacterium isolated from wood falls in the Mediterranean Sea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 2706-2711.
- Kho ZY, Lal SK. 2018. The human gut microbiome: A potential controller of wellness and disease. *Front. Microbiol.* 9, 1835.
- Kiel C, Serrano L. 2012. Structural data in synthetic biology approaches for studying general design principles of cellular signaling networks. *Structure* 20(11), 1806-13.
- Kim JJ, Kwon Y-K, Kim JH, Heo S-J, Lee Y, Lee S-J, Shim W-B, Jung W-K, Hyun J-H, Kwon KK, Kang D-H, Oh C. 2014. Effective microwell plate-based screening method for microbes producing cellulase and xylanase and its application. *J Microbiol Biotechnol* 24, 1559-1565.
- Kim S, Jeong H, Chun J. 2007. *Clostridium aestuarii* sp. nov., from tidal flat sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 1315-1317.
- Kim S, Jeong H, Kim S, Chun J. 2006. *Clostridium ganghwense* sp. nov., isolated from tidal flat

- sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 691-693.
- Kim W, Lee J-H, Kwon KK. 2016. *Abyssisolibacter fermentans* gen. nov. sp. nov., isolated from deep sub-seafloor sediment. submitted to *J Microbiol* 54, 347-352.
- Knittel K, Boetius A. 2009. Anaerobic oxidation of methane: progress with an unknown process. *Annu Rev Microbiol* 63, 311 - 334.
- Kononen E, Asikainen S, Saarela M, Karjalainen J, Jousimies-Somer H. 1994. The oral gram-negative anaerobic microflora in young children: Longitudinal changes from edentulous to dentate mouth. *Oral Microbiol. Immunol.* 9, 136 - 141.
- Kotsyurbenko OR, Simankova MV, Nozhevnikova AN, Zhilina TN, Bolotina NP, Lysenko AM, Osipov GA. 1995. New species of psychrophilic acetogens: *Acetobacterium bakii* sp. nov., *A. paludosum* sp. nov., *A. fimetarium* sp. nov. *Arch Microbiol* 163, 29-34.
- Kuever J, Rainey FA, Widdel F. 2005. Genus I. *Desulfovibrio* Kluver and van Niel 1936, 397AL, pp. 926-938. In Brenner, D.J., Krieg, N.R., and Staley, J.T. (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology vol. 2 the proteobacteria part C the Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. Springer US, Boston, MA, USA.
- Kwon SK, Kim BK, Song JY, Kwak MJ, Lee CH, Yoon JH, et al. 2013. Genomic Makeup of the Marine Flavobacterium *Nonlabens (Donghaeana) dokdonensis* and Identification of a Novel Class of Rhodopsins. *Genome Biol Evol* 5, 187 - 199.
- Kwon YM, Choi D, Yang S-H, Kwon KK, Kim S-J. 2014b. *Hoppeia youngheungensis* gen. nov., sp. nov., a member of the *Flavobacteriaceae* isolated from tidal flat sediment, and emended descriptions of the genus *Sediminibacter* and *Sediminibacter furfurosus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 2053-2059.
- Kwon YM, Kim S-Y, Jung K-H, Kim S-J. 2015. Diversity and functional analysis of light-driven pumping rhodopsins in marine Flavobacteria. *MicrobiologyOpen* 5, 212-223.
- Kwon YM, Yang S-H, Kwon KK, Kim S-J. 2014a. *Nonlabens antarcticus* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from glacier ice, and emended descriptions of *Nonlabens marinus* Park et al. 2012 and *Nonlabens agnitus* Yi and Chun 2012. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 400-405.
- Lee K-J, Jeong CS, Ahn YJ, Lee H-J, Park S-J, Seok Y-J, Kim P, Lee, J-H, Lee K-H, Cha SS. 2011. *FrsA* functions as a cofactor-independent decarboxylase to control metabolic flux. *Nature Chem Biol* 7, 434-436.
- Lee YS, Heo JB, Lee JH, Choi YL. 2014. A cold-adapted carbohydrate esterase from the oil-degrading marine bacterium *Microbulbifer thermotolerans* DAU221: gene cloning, purification, and characterization. *J Microbiol Biotechnol* 24, 925 - 935.
- Li SL, Whang LM, Chao YC, Wang YH, Wang YF, Hsiao CJ, Tseng IC, Bai MD, Cheng SS. 2010. Effects of hydraulic retention time on anaerobic hydrogenation performance and microbial ecology of bioreactors fed with glucose-peptone and starch-peptone. *Int J Hydrogen Energy* 35, 61-70.

- Li W, Godzik A. 2006. Cd-hit: A fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 22, 1658 - 1659.
- Lipscomb GL, Schut GJ, Thorgersen MP, Nixon WJ, Kelly RM, Adams MW. 2013. Engineering hydrogen gas production from formate in a hyperthermophile by heterologous production of an 18-subunit membrane-bound complex. *J Biol Chem* 289(5), 2873-2879.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method. *Methods* 25, 402 - 408.
- Lloyd KG, Schreiber L, Petersen DG, Kjeldsen KU, Lever MA, Steen AD, Stepanauskas R, Richter M, Kleindienst S, Lenk S, Schramm A, Jørgensen BB. 2013. Predominant archaea in marine sediments degrade detrital proteins. *Nature* 496, 215 - 218.
- Løbner M, Walsted A, Larsen R, Bendtzen K, Nielsen CH. 2008. Enhancement of human adaptive immune responses by administration of a high-molecular-weight polysaccharide extract from the Cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *J. Med. Food* 11, 313 - 322.
- Makhdoumi A, Dehghani-Joybari Z, Mashreghi M, Jamialahmadi K, Asoodeh A. 2015. A novel halo-alkali-tolerant and thermo-tolerant chitinase from *Pseudoalteromonas* sp. DC14 isolated from the Caspian Sea. *Int J Environ Sci Technol* 12, 3895 - 3904.
- Malys MK, Campbell L, Malys N. 2015. Symbiotic and antibiotic interactions between gut commensal microbiota and host immune system. *Medicina* 51, 69 - 75.
- Manivasagan P, Kim SK. 2014. Extracellular polysaccharides produced by marine bacteria. *Adv Food Nutr Res* 72, 79-94.
- Marshall KT, Morris RM 2015. Genome sequence of “*Candidatus Thioglobus singularis*” strain PS1, a mixotroph from the SUP05 clade of marine Gammaproteobacteria. *Genome Announc* 3, e01155-15
- Matsuyama H, Sawazaki K, Minami H, Kasahara H, Horikawa K, Yumoto I. 2014. *Pseudoalteromonas shioyasakiensis* sp. nov., a marine polysaccharide-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 101-6.
- McCoy E, Fred EB, Peterson WH, Hastings EG. 1926. A cultural study of the acetone butyl alcohol organisms. *J Infect Dis* 39, 457-483.
- McInerney MJ, Struchtemeyer CG, Sieber J, Mouttaki H, Stams AJ, Schink B, Rohlin L, Gunsalus RP. 2008. Physiology, ecology, phylogeny, and genomics of microorganisms capable of syntrophic metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 1125, 58 - 72.
- Mcorist S, Gebhart CJ, Boid R, Barns SM. 2009. Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov., sp. nov., the obligately intracellular bacterium of porcine proliferative enteropathy. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 820-825.
- Mehmood M, Jaffar NA, Nazim M, Khasawneh FA. 2014. Bacteremic skin and soft tissue infection caused by *Prevotella loescheii*. *BMC Infect. Dis.* 14, 2 - 5.

- Mesa J, Mateos-Naranjo E, Caviedes MA, Redondo-Gómez S, Pajuelo E, Rodríguez-Llorente ID. 2015. Endophytic cultivable bacteria of the metal bioaccumulator *Spartina maritima* improve plant growth but not metal uptake in polluted marshes soils. *Front Microbiol* fmicb.2015.01450.
- Meyer J, Schmidt A, Michalke K, Hensel R. 2007. Volatilisation of metals and metalloids by the microbial population of an alluvial soil. *Syst Appl Microbiol* 30, 229-238.
- Meyerdierks A, Kube M, Kostadinov I, Teeling H, Glöckner FO, Reinhardt R, Amann R. 2010. Metagenome and mRNA expression analyses of anaerobic methanotrophic archaea of the ANME-1 group. *Environ Microbiol* 12, 422 - 439.
- Miyazaki M, Nogi Y, Ohta Y, Hatada Y, Fujiwara Y, Ito S, Horikoshi K. 2008. *Microbulbifer agarilyticus* sp. nov. and *Microbulbifer thermotolerans* sp. nov., agar-degrading bacteria isolated from deep-sea sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 1128-33.
- Mizumori M, Ham M, Guth PH, Engel E, Kaunitz JD, Akiba Y. 2009. Intestinal alkaline phosphatase regulates protective surface microclimate pH in rat duodenum. *J. Physiol.* 587, 3651 - 3663.
- Mohapatra BR, Bapuji M, Sree A. 2003. Production of industrial enzymes (amylase, carboxymethylcellulase and protease) by bacteria isolated from marine sedentary organisms. *Acta Biotechnol* 23, 75 - 84.
- Motamedi M, Pedersen K. 2009. *Desulfovibrio aespoeensis* sp. nov., a mesophilic sulfate-reducing bacterium from deep groundwater at aspo hard rock laboratory, Sweden. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 311-315.
- Muyzer G, Stams AJ. 2008. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat Rev Microbiol* 6, 441 - 454.
- Na SI, Kim YO, Yoon SH, Ha SM, Baek IW, Chun JS. 2018. UBCG: Up-to-date bacterial core gene set and pipeline for phylogenomic tree reconstruction. *J. Microbiol.* 56, 280-285.
- Nakamura, K, Sakuragi, N, Takakuwa, A, Ayabe, T. Paneth cell α -defensins and enteric microbiota in health and disease. *Biosci. Microbiota Food Health* 2016, 35, 57 - 67.
- Ndongo S, Cadoret F, Dubourg G, Delerce J, Fournier PE, Raoult D, Lagier JC. 2017. '*Collinsella phocaeensis*' sp. nov., '*Clostridium merdae*' sp. nov., '*Sutterella massiliensis*' sp. nov., '*Suttarella timonensis*' sp. nov., '*Enorma phocaeensis*' sp. nov., '*Mailhella massiliensis*' gen. nov., sp. nov., '*Mordavella massiliensis*' gen. nov., sp. *New Microbes New Infect.* 17, 89-95.
- Nelson RW, Ihle SL, Lewis LD, Salisbury SK, Miller T, Bergdall,V, Bottoms GD. 1991. Effects of dietary fiber supplementation on glycemic control in dogs with alloxan-induced diabetes mellitus. *Am. J. Vet. Res.* 52, 2060 - 2066.
- Noreen, A, Akram, J, Rasul, I, Mansha, A, Yaqoob, N, Iqbal, R, Tabasum, S, Zuber, M, Zia, K.M. Pectins functionalized biomaterials; a new viable approach for biomedical applications: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 2017, 101, 254 - 272.

- O'Dor, Ronald K. 2003. The Unknown Ocean: The Baseline Report of the Census of Marine Life Research Program. Consortium for Oceanographic Research and Education: Washington DC, 28pp.
- O'Rourke C, Gregson T, Murray L, Sadler IH, Fry S.C. 2015. Sugar composition of the pectic polysaccharides of charophytes, the closest algal relatives of land-plants: Presence of 3-O-methyl-d-galactose residues. *Ann. Bot.* 116, 225 - 236.
- Ozuolmez D, Na H, Lever MA, Kjeldsen KU, Jørgensen BB, Plugge CM. 2015. Methanogenic archaea and sulfate reducing bacteria co-cultured on acetate: teamwork or coexistence? *Front Microbiol* 27, 492.
- Patra AK, Cho HH, Kwon YM, Kwon KK, Sato T, Kato C, et al. 2016. Phylogenetic relationship between symbionts of tubeworm *Lamellibrachia satsuma* and the sediment microbial community in Kagoshima Bay. *Ocean Sci J* 51, 317-332.
- Paul K, Nonoh JO, Mikulski L, Brune A. 2012. "Methanoplasmatales," *Thermoplasmatales*-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens. *Appl Environ Microbiol* 78, 8245 - 8253.
- Pereira IAC, Ramos AR, Grein F, Marques MC, da Silva SM, Venceslau SS. 2011. A comparative genomic analysis of energy metabolism in sulfate reducing bacteria and archaea. *Front Microbiol* 2, 69.
- Pester M, Schleper C, Wagner M. 2011. The *Thaumarchaeota*: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. *Curr Opin Microbiol* 14, 300 - 306.
- Pham VD, Hnatow LL, Zhang S, Fallon RD, Jackson SC, Tomb JF, DeLong EF, Keeler SJ. 2009. Characterizing microbial diversity in production water from an Alaskan mesothermic petroleum reservoir with two independent molecular methods. *Environ Microbiol* 11, 176-187.
- Pires RH, Lourenço AI, Morais F, Teixeira M, Xavier AV, Saraiva LM, Pereira IAC. 2003. A novel membrane-bound respiratory complex from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. *Biochim Biophys Acta* 1605, 67 - 82.
- Popov SV, Ovodov YS. 2013. Polypotency of the immunomodulatory effect of pectins. *Biochemistry* 78, 823 - 835.
- Postgate JR, Campbell LL. 1966. Classification of *Desulfovibrio* species, the nonsporulating sulfate-reducing bacteria. *Bacteriol. Rev.* 30, 732-738.
- Quaiser A, Zivanovic Y, Moreira D, López-García P. 2011. Comparative metagenomics of bathypelagic plankton and bottom sediment from the Sea of Marmara. *ISME J* 5, 285-304.
- Raghukumar C, Vipparthy V, David JJ, Chandramohan D. 2001. Degradation of crude oil by marine cyanobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 57, 433-436.
- Rahmatnejad E, Saki AA. 2016. Effect of dietary fibres on small intestine histomorphology and lipid

- metabolism in young broiler chickens. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 100, 665 - 672.
- Ranchou-Peyruse M, Goñi-Urriza M, Guignard M, Goas M, Ranchou-Peyruse A, Guyoneaud R. 2018. *Pseudodesulfovibrio hydrargyri* sp. nov., a mercury-methylating bacterium isolated from a brackish sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68, 1461-1466.
- Reeburgh WS. 2007. Oceanic methane biogeochemistry. *Chem Rev* 107, 486 - 513.
- Reed DW, Fujita Y, Delwiche ME, Blackwelder DB, Sheridan PP, Uchida T, Colwell FS. 2002. Microbial communities from methane hydrate-bearing deep marine sediments in a Forearc Basin. *Appl Environ Microbiol* 68, 3759 - 3770.
- Reith JH, Deurwaarder EP, Hemmes K, Curvers APWM, Kamermans P, Brandenburg W, Zeeman G. 2005. Grootschalige teelt van zeevieren in combinatie met offshore windparken in de Noordzee, Energy Commission of the Netherlands.
- Rezgui R, Ben Ali Gam Z, Ben Hamed S, Fardeau ML, Cayol JL Maaroufi A, Labat M. 2011. *Sporosalibacterium faouarensense* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from oil-contaminated soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 99-104.
- Roalkvam I, Jørgensen SL, Chen Y, Stokke R, Dahle H, Hocking WP, Lanzén A, Haflidason H, Steen IH. 2011. New insight into stratification of anaerobic methanotrophs in cold seep sediments. *FEMS Microbiol Ecol* 78, 233 - 243.
- Robb FT, Place AR, Sowers KR, Schreier HJ, DasSarma S, Fleischmann EM. 1995. Archaea: a laboratory manual, pp. 3-29. Cold spring harbor laboratory press, New York, USA.
- Ruff SE, Biddle JF, Teske AP, Knittel K, Boetius A, Ramette A. 2015. Global dispersion and local diversification of the methane seep microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 4015 - 4020.
- Saitou N Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Salazar G, Cornejo-Castillo FM, Benitez-Barríos V, Fraile-Nuez E, Alvarez-Salgado XA, Duarte CM, Gasol JM, Acinas SG. 2016. Global diversity and biogeography of deep-sea pelagic prokaryotes. *ISME J* 10, 596-608.
- Sardesai YN, Bhosle S. 2004. Industrial potential of organic solvent tolerant bacteria. *Biotechnol Prog* 20, 655-660.
- Sasser M. 1990. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids, MIDI Technical Note vol. 101. MIDI Inc, Newark, DE, USA.
- Sato T, Fukui T, Atomi H, Imanaka T. 2003. Targeted gene disruption by homologous recombination in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J. Bacterio.* 185, 210-220.
- Shivani Y, Subhash Y, Sasikala C, Ramana CHV. 2017. *Halodesulfovibrio spirochaetisodalis* gen. nov. sp. nov. and reclassification of four *Desulfovibrio* spp. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 87-93.
- Shpigelman A, Kyomugasho C, Christiaens S, Loey AMV, Hendrickx ME. 2015. The effect of high pressure homogenization on pectin: Importance of pectin source and pH. *Food Hydrocoll.* 43, 189 -

198.

- Shtriker MG, Hahn M, Taieb E, Nyska A, Moallem U, Tirosh O, Madar Z. Fenugreek galactomannan and citrus pectin improve several parameters associated with glucose metabolism and modulate gut microbiota in mice. *Nutrition* 2018, 46, 134 - 142.
- Smedile F, Messina E, La Cono V, Tsoy O, Monticelli LS, Borghini M et al. 2012. Metagenomic analysis of hadopelagic microbial assemblages thriving at the deepest part of Mediterranean Sea, Matapan-Vavilov Deep. *Environ Microbiol* 15, 167-182.
- Soriano S, Soriano A. 1948. Nueva bacteria anaerobia productora de una alteracion en sordinas envasadas. *Rev Asoc Argent Dietol* 6, 36-41.
- Srivastava, P, Malviya, R. Sources of pectin, extraction and its applications in pharmaceutical industry-An overview. *Indian J. Nat. Prod. Resour.* 2011, 2, 10 - 18.
- Stewart FJ, Cavanaugh CM. 2006. Symbiosis of thioautotrophic bacteria with *Riftia pachyptila*. *Prog Mol Subcell Biol* 41, 197 - 225.
- Suzuki D, Ueki A, Amaishi A, Ueki K. 2009. *Desulfovibrio portus* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium in the class *Deltaproteobacteria* isolated from an estuarine sediment. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 68, 1461-1466.
- Takahashi S, Tomita J, Nishioka K, Hisada T, Nishijima M. 2014. Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing. *PLoS ONE* 9, e105592
- Takii S, Hanada S, Hase Y, Tamaki H, Uyeno Y, Sekiguchi Y, Matsuura K. 2008. *Desulfovibrio marinisediminis* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from coastal marine sediment via enrichment with casamino acids. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 2433-2438.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28, 2731 - 2739.
- Tatusova T, Dicuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, Lomsadze A, Pruitt KD, Borodovsky M, Ostell J. 2016. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res.* 44, 6614-6624.
- Thabet OBD, Wafa T, Eltaief K, Cayol JL, Hamdi M, Fauque G, Fardeau ML. 2011. *Desulfovibrio legallis* sp. nov.: A moderately halophilic, sulfate-reducing bacterium isolated from a wastewater digester in Tunisia. *Curr. Microbiol.* 62, 486-491.
- Thauer RK, Kaster A-K, Goenrich M, Schick M, Hiromoto T, Shima S. 2010. Hydrogenases from methanogenic archaea, nickel, a novel cofactor, and H₂ storage. *Annu Rev Biochem* 79, 507 - 536.
- Thioye A, Ben Ali Gam Z, Mbengue M, Cayol JL, Joseph-Bartoli M, Touré-Kane, C, Labat M. 2017. *Desulfovibrio senegalensis* sp. Nov., a mesophilic sulfate reducer isolated from marine sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 3162-3166.

- Togashi Y, Shirakawa J, Okuyama T, Yamazaki S, Kyohara M, Miyazawa A, Suzuki T, Hamada M, Terauchi Y. 2016. Evaluation of the appropriateness of using glucometers for measuring the blood glucose levels in mice. *Sci. Rep.* 6, 25465.
- Tracy BP, Jones SW, Fast AG, Indurthi DC, Papoutsakis ET. 2012. *Clostridia*: the importance of their exceptional substrate and metabolite diversity for biofuel and biorefinery applications. *Curr Opin Biotechnol* 23, 364-381.
- Turnbaugh, P.J, Hamady, M, Yatsunenko, T, Cantarel, B.L, Duncan, A, Ley, R.E, Sogin, M.L, Jones, W.J, Roe, B.A, Affourtit, J.P, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009, 457, 480 - 484.
- US DOE. 2010. National Algal Biofuels Technology Roadmap.
- Van der Hoeven, J.S., Van den Kieboom, C.W.A., and Schaeken, M.J.M. 1995. Sulfate-reducing bacteria in the periodontal pocket. *Oral Microbiol. Immunol.* 10, 288-290.
- Veronese N, Solmi M, Caruso MG, Giannelli G, Osella AR, Evangelou E, Maggi S, Fontana L, Stubbs B, Tzoulaki I. 2018. Dietary fiber and health outcomes: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Am. J. Clin. Nutr.* 107, 436 - 444.
- Vigneron A, Cruaud P, Pignet P, Caprais J-C, Cambon-Bonavita M-A, Godfroy A, Toffin L. 2013. Archaeal and anaerobic methane oxidizer communities in the Sonora Margin cold seeps, Guaymas Basin (Gulf of California). *ISME J* 7, 1595 - 1608.
- Wang B, Ji S-Q, Tian X-X, Qu L-Y, Li F-L. 2015. *Brassicibacter thermophilus* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from coastal sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 65, 2870-2874.
- Webster G, Parkes RJ, Fry JC, Weightman AJ, Weightman J. 2004. Widespread occurrence of a novel division of bacteria identified by 16S rRNA gene sequences originally found in deep marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 70, 5708 - 5713.
- Welander PV, Metcalf WW. 2008. Mutagenesis of the C1 oxidation pathway in *Methanosarcina barkeri*: new insights into the Mtr/Mer bypass pathway. *J Bacteriol* 190, 1928 - 1936.
- Weusthuis RA, Lamot I, van der Oost J, Sanders JP. 2011. Microbial production of bulk chemicals: development of anaerobic processes. *Trends Biotechnol* 29, 153-158.
- Wolfe RS. 1999. Anaerobic life—a centennial view. *J Bacteriol* 181, 3317-3320.
- Woyke T, Teeling H, Ivanova NN, Huntemann M, Richter M, Gloeckner FO, et al. 2006. Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial consortium. *Nature* 443, 950-955.
- Yang S-H, Seo H-S, Lee J-H, Kim S-J, Kwon KK. 2016. *Pseudofulvibacter gastropodicola* sp. nov., isolated from a marine conch and emended description of the genus *Pseudofulvibacter* Yoon *et al.* 2013 and *Pseudofulvibacter geojedonensis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 66, 430-434.
- Yang Y, Millán JL, Mecsas J, Guillemin K. 2015. Intestinal alkaline phosphatase deficiency leads to

- lipopolysaccharide desensitization and faster weight gain. *Infect. Immun.* 83, 247 - 258.
- Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glöckner FO, Ludwig W, Schleifer KH, Whitman WB, Euzéby J, Amann R, Rosselló-Móra R. 2014. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 635-645.
- Yazdani SS, Gonzalez R. 2007. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr Opin Biotechnol* 18, 213-219.
- Yoon SH, Ha SM, Kwon SJ, Lim JM, Kim YS, Seo HS, Chun JS. 2017a. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 1613-1617.
- Yoon SH, Ha SM, Lim JM, Kwon SJ, Chun JS. 2017b. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. *Antonie. Van. Leeuwenhoek.* 110, 1281-1286.
- Yoshida N, Emoto T, Yamashita T, Watanabe H, Hayashi T, Tabata T, Hoshi N, Hatano N, Ozawa G, Sasaki N, et al. 2018. *Bacteroides vulgatus* and *Bacteroides dorei* reduce gut microbial lipopolysaccharide production and inhibit Atherosclerosis. *Circulation* 138, 2486 - 2498.
- Yoshizawa S, Kumagai Y, Kim H, Ogura Y, Hayashi T, Iwasaki W, et al. 2014. Functional characterization of flavobacteria rhodopsins reveals a unique class of light-driven chloride pump in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 6732-6737.
- Zehnder AJ, Brock TD. 1979. Methane formation and methane oxidation by methanogenic bacteria. *J Bacteriol* 137, 420 - 32.
- Zehnder AJ, Brock TD. 1980. Anaerobic methane oxidation: occurrence and ecology. *Appl Environ Microbiol* 39, 194 - 204.
- Zhang Y, Maignien L, Zhao X, Wang F, Boon N. 2011. Enrichment of a microbial community performing anaerobic oxidation of methane in a continuous high-pressure bioreactor. *BMC Microbiol* 11, 137.
- Zhang Y, Su X, Chen F, Wang Y, Jiao L, Dong H, Huang Y, Jiang H. 2012. Microbial diversity in cold seep sediments from the northern South China Sea. *Geosci Front* 3, 301 - 316.
- Zhao C, Gao Z, Qin Q, Li F, Ruan L. 2012. *Desulfobaculum xiamenensis* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Desulfovibrionaceae* isolated from marine mangrove sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62, 1570-1575.
- Zhou X, Sun F, Xu S, Fan G, Zhu K, Liu X, Chen Y, Shi C, Yang Y, Huang Z, Chen J, Hou H, Guo X, Chen W, Chen Y, Wang X, Tian L, Yang D, Zhou J, Huang B, Wang Z, Zhao W, Tian R, Xiong Z, Xu J, Liang X, Chen B, Liu W, Wang J, Pan S, Fang X, Li M, Wei F, Xu X, Zhou K, Wang J, Yang G. 2013. Baiji genomes reveal low genetic variability and new insights into secondary aquatic adaptations. *Nature Comm* 4, 2708.
- 강래선. 1999. 한국 동해안산 다시마(*Laminaria japonica* Areschoug : Phaeophyta)의 발아, 성장 및 생산에 관한 연구. 서울대학교 박사학위 논문.

- 박진숙. 2015. ARDRA와 DGGE를 이용한 *Halichondria panicea* 해면의 공생세균 다양성. 미생물학회지 51, 398-406.
- 성혜리, 김사열. 2010. 독도 주변의 해수에서 분리한 세균의 다양성과 군집구조 분석. 한국미생물생명공학회지 38, 263-272.
- 에너지경제연구원. 2011. 에너지통계연보.
- 온실가스종합정보센터. 2012. 2010년도 국가 온실가스 인벤토리 보고서.



- 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.