



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

극지 미세조류의 세포외 다당
분비 및 특성

2016년 6월

부 경 대 학 교 대 학 원

화학과

황태경

이 학 석 사 학 위 논 문

극지 미세조류의 세포외 다당
분비 및 특성

지도교수 김 학 준

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함.

2016 년 6 월

부 경 대 학 교 대 학 원

화학과

황태경

황태경의 이학석사 학위논문을 인준함.

2016 년 6 월 28 일



위 원 장 이학박사 김 현 우 (인)

위 원 이학박사 공 승 표 (인)

위 원 이학박사 김 학 준 (인)

목 차

목차.....	i
Abstract.....	iii
1. 서론.....	1
2. 연구 목적.....	7
3. 재료 및 방법	
3.1 균주 및 배지조성.....	8
3.2 배양조건.....	9
3.3 EPS 추출 및 측정	10
3.4 생존률 측정.....	11
3.5 Phyto-PAM 을 이용한 광합성 활성 측정.....	12
3.6 당 및 단백질 함량 측정.....	12
3.7 EPS 의 성분 원소 분석 및 크기배제 크로마토그래피	13
3.8 EPS 단당성분 및 글리코시딕 결합분석	13
3.9 EPS 황산 및 유론산 분석	14
3.10 EPS FT-IR 측정	15
3.11 EPS 의 NMR 측정	15
3.12 EPS 항산화 활성 측정	16
3.13 EPS 의 얼음 결합 특성 분석	18

3.14 EPS 의 동결보존 활성 측정	22
4. 결과 및 고찰	
4.1 극지 해빙 미세조류의 배양 조건에 따른 EPS 생산 및 대량 배양 시스템 구축	23
4.2 극지 해빙 미세조류의 EPS 추출 및 특성 분석	35
4.3 EPS 얼음결합 및 생리활성 특성 분석	45
5. 요약	58
6. 참고문헌	60



Characterization of extracellular polysaccharides from polar microalgae

Tae Kyung Hwang

Department of Chemistry, The Graduate School,
Pukyung National University

Abstract

Arctic sea ice algae are known to produce essential proteins to prevent freezing in the ice to survive. However, research on sea ice algae extracellular polysaccharides (EPS) is lagging behind. Microalgae have been reported to be about 30,000 species currently exist in the world. The polar region is an area where the environment change can happen rapidly. As a result, structural change of sea ice will affect the ecosystem, thereby causing a large ripple effect. Therefore, reduction of the ice according to the global warming has become a very big issue. However, research on EPS, which is secreted by sea ice algae is currently very limited. So I analyzed the production of EPS due to changes in the environment (temperature and salinity) and the characteristic of secreted EPS. As a result, microalgae EPS is abundant of fucose, rhamnose, xylose and the degree of sulfation is 40%, so that is sulfuric acid fucan. Analyzing spectroscopic characteristics of the EPS using a FT-IR, NMR showed similar results to the chemical analysis of the EPS. Further sea ice micro algae EPS has few or no ice recrystallization inhibition activity. Also this study showed that the EPS's antibacterial activity is very high. EPS produced by algae and bacteria are considered different. Therefore, If the experiment is proceeding more, it clarifies the detailed structure of each of the EPS and perform research on various physiological activities, that provide an important basis for identifying the role of EPS in sea ice.

1. 서론

1.1 극지의 환경

극지는 북극과 남극 주변의 지역으로, 지구 자전축 및 태양 공전 궤도면의 각도에 맞춰 북극권은 북위 66°33' 이북으로, 남극권은 남위 66°33' 이남 지역으로 정의되었다^[1]. 극지는 기온이 매우 낮으며, 일사량의 변화가 매우 급격한 특징을 가진다. 남극해는 표층수의 온도가 연중 2~5 °C의 범위를 보이며, 1년 내내 얼어 있는 상태인 해역과 계절에 따라 해빙을 형성했다가 녹는 해역 또한 존재하면서 다양한 변화를 보인다. 북극해 또한 비슷한 수온을 보이나, 염분이 남극해에 비해 약간 높으며, 심층수에 의해 영양염이 충분한 남극해와는 달리, 식물플랑크톤의 대발생으로 인해 영양염 고갈이 일어난다는 차이점을 가진다^{[2][3]}. 북극 및 남극은 지리적 특성 및 생물학적 다양성이 큰 차이를 보이나, 두 극지에서 살아가는 생물은 아주 낮은 온도환경에서 살아가야 한다는 공통점을 가지고 있다^[4]. 극지의 생태계는 보통 극한의 환경에서 형성되는 것으로 생각되나 오랜 기간을 통하여 물리, 화학적으로 안정된 환경이 조성되어있다^[5].

1.2 해빙 미세조류

해빙은 바닷물이 얼어서 형성되며, 대부분 북극 및 남극에 분포하고 있다. 겨울철에 면적이 최대가 되며, 이 때 전 지구 표면의 약 6%를 차지한다^[5]. 계절에 따른 해빙의 분포면적 변화는 전 지구의 기후 및 환경변화를 관찰하는데 가장 큰 요소로 작용한다^[7]. 극해는 해빙의 존재로 인해 다른 해양의 서식지와 큰 차이를 보인다. 해빙은 해양 표면에 위치함으로써 태양광을 막아 SIMCO (Sea Ice Microbial Community)라 불리는 식물 미세조류를 포함한 독특한 생태계를 조성한다^[8]. 또한 SIMCO는 phytoplankton의 EPS (Exopolysaccharide) 분비에 따라, brine channel이라 불리는 공극을 형성한다^[9]. 이를 통해 phytoplankton가 이동하면서 생존에 필요한 영양섭취가 원활해지고 극단적인 탄소축적이 이루어져 주변 생태계의 생물들의 주먹이로 이용된다^[8]. 이들 해빙은 태양에너지를 반사함으로써 극지 및 지구 전체의 평균기온을 유지한다. 그러나 최근 온난화로 인한 극지 해빙의 면적감소로 인해 흡수되는 태양에너지가 증가되어 온난화가 더욱 가속화되고있다. 따라서 이러한 극지의 해빙변화에 대한 관심이 더욱 증가하는 추세이다.

1.3 Exopolysaccharide (EPS)

Exopolysaccharide (EPS), 즉 세포외 다당류는 미생물에 의해 주변 환경으로 분비되는 고분자 화합물이다^[10]. 이들은 생물막의 기능 및 구조적 안정성을 높이면서 물리, 화학적 성질을 결정하는 중요한 요소이다^[11]. DNA, 지질 및 부식물질 (humic substance)과 같은 거대분자 또한 여기에 속한다. 또한 생물막 형성과 세포 표면 부착에 중요한 역할을 하는데, 생물막에 존재하는 유기물의 50~90 %를 차지한다^{[12][13]}.

세포외 다당류 (exopolysaccharides)는 해양 미생물 세포 주위에 존재하는 고분자 탄수화물 중합체이다^[14]. 그들은 세균 근처의 물리, 화학적 환경에 변화를 줌으로써 해양 미생물의 생존율을 향상시키는데, 최근 의약, 식품, 기타 산업용 응용을 위한 천연 고분자의 수요 증가는 미생물에 의해 생산되는 다당류에 대한 관심으로 이어지고 있다^[15]. 또한 많은 미생물이 세포외 다당류 또는 EPS를 생산하는 것으로 알려져 있다^[16]. 미생물의 EPS는 중합체가 세포 표면에 공유결합으로 연결된 capsular polysaccharides (CPS)와, 점액질로 이루어져 세포 외부에 느슨하게 붙어있는 두 가지 형태로 존재한다^[15]. 또한, 세포 외부로 분비된 다당류 중 일부는 세포 내부 및 외부에 존재하는 특정 분자의 확산을 제어하여 그 세포가 살아가는데 필요한 무기물과 영양소를 분해 및

흡수한다. 이는 곧 미생물이 계면 활성제 및 항생제에 저항 할 수 있게끔 하기도 한다^[17].

이러한 세포외 다당류로는 동종다당류 (homopolysaccharides), 복합다당류 (heteropolysaccharides)가 있다. 동종다당류에는 levan, pullulan, curdlan 등이 있으며, 복합다당류에는 xanthan, succinoglycan 등이 있다.

Levan은 다량의 d-fructofuranos 잔기들이 β -(2-6)결합에 의해 연결된 것으로, 세포 외부에서 합성된다. Levan은 *Zymomonas mobilis* 혹은 *Bacillus subtilis*와 같은 saccharose를 기질로 사용하는 세균의 발효에 의해 합성된다. Levan의 합성은 levansucras (sucrose 6-fructosyl -transferase, β -(2-6)-fructosyltransferase)이라 불리는 세포외효소에 의해 일어난다^[18].

Pullulan은 glucose로 이루어진 선형 동종다당류이다. Pullulan은 대개 maltotriose인데, 이는 α -(1-4)-Glu- α -(1-4)-Glu- α -(1-6)의 연결로 이루어진 삼당류로 이루어져있다. 또다른 pullulan의 유형으로는 maltotetraose로 α -(1-4)-Glu- α -(1-4)-Glu- α -(1-6)-Glu- α -(1-6)로 연결된 사당류로도 존재한다. Levan과는 달리, cytosol에서 합성되어 세포외부로 분비된다^[19].

Curdlan은 불용성 선형 동종다당류이다. 이는 D-glucose가 β -(1-3)-glucosid 결합에 의해 400~500개의 잔기로 이루어져 있다. Curdlan은 *Agrobacetrrium* 속의

Agrobacterium radiobacter, *A. faecalis* var *myxogenes* 와 같은 특정종에 의해서 생산된다.

Xanthan은 일반적으로 화장품이나 식품 증점제 및 안정화제로서 성분 이 탈을 방지하기 위해 사용되며^[20], 세균인 *Xanthomonas campestris* 에 의해 분비 되는 다당류이다^[20]. glucose, sucrose 또는 lactose의 발효에 의해 생산된다. Pentasaccharide가 반복되는 구조로 glucose, mannose, and glucuronic acid가 2:2:1의 몰비로 구성된다^[22].

1.4 엽록소 형광 방출 (Chlorophyll fluorescence emission)

엽록소의 형광방출은 엽록소 분자가 들뜬상태에서 바닥상태로 돌아가는 과정에서 빛으로 방출되는 것인데, 그 정도에 따라 고등 식물 및 조류, 세균 등이 광합성을 얼마나 수행하는지에 대한 지표로 사용된다. 들뜬상태의 엽록소는 흡수된 빛에너지를 이용해 비 광화학적 형광소멸 혹은 형광복사의 방출을 유도하여 광합성 (광화학 에너지 변환)을 수행하는데 사용한다^[23]. 이와 같이 엽록소가 빛을 흡수하는 것을 역으로 이용하여 특정 파장의 빛을 흡수하는 정도를 측정할 수 있다면, 이를 생물이 광합성을 얼마나 수행하는지에 대한 분석 방법으로 사용할 수 있다.

1.4.1 Phyto-PAM (Pulse Amplitude Modulation)

엽록소 형광은 phytoplankton의 양 및 일차생산량의 측정이 가능하여 점점 더 중요한 지표가 되고있다^[23]. Phyto-PAM은 엽록소의 함량 및 이들의 효율을 측정하기 위하여 개발되었다. Phyto-PAM은 다음 공식에 의해 광합성 효율을 측정한다.

$$F_v / F_m = (F_m' - F_t) / F_m' = dF / (F_t + dF)$$

F_v (형광변수)는 암적응 후 최대형광과 최소형광의 차이를 나타내며^[25], F_v / F_m 는 시료에서 발산하는 형광값의 역치로, 이는 photosystem II의 광화학 반응에 의한 광양자수율 (quantum yield)을 의미한다. dF 는 형광 효율 증가치, F_t 는 순간 형광률, F_m' 는 최대 형광률을 의미한다^[26].

Pulse Amplitude Modulation (PAM)의 원리는 빛의 강도는 크지만 매우 짧은 펄스를 선택적으로 증폭하여, 이들의 형광 신호를 측정하는 것을 기반으로 한다. Phyto-PAM은 light emitting diode (LED)를 통해 470 nm (파랑), 520 nm (초록), 645 nm (밝은 빨강), 665 nm (어두운 빨강)의 4가지 파장을 방출한다^[27].

2. 연구 목적

미세조류는 현재 전 세계적으로 약 3만여종이 존재한다고 보고되었다. 극지는 환경변화가 급격히 일어날 수 있는 지역으로, 주변환경에 따른 해빙의 구조변화는 생태계에 영향을 주고, 결국 지구 전환경과 생태계에 큰 파급효과를 일으킨다. 이에 따라, 현재 대두되고 있는 온난화에 따른 해빙의 감소는 매우 큰 이슈가 되고 있다.

그러나 현재까지 해빙 미세조류가 분비하는 EPS에 관한 연구는 극히 제한적이며, 이들이 해빙의 구조와 생태계에 미치는 영향에 대한 연구와 주변환경에 따른 EPS의 분비와 관련된 실험은 진행된 바가 거의 없다. 따라서 EPS를 생산하는 해빙 미세조류가 어떠한 종이 있는지 확인하고, 이들이 온도 및 염분과 같은 환경변화에 의한 EPS의 생산이 어떻게 변하며, 분비된 EPS가 어떤 특성을 가지는지 알아볼 필요성이 있다.

이에 따라, 본 논문은 극지연구소에서 분양받은 해빙 미세조류 2종 (*Synedropsis* sp., *Porosira pseudodenticulata*)의 온도 및 염도와 같은 배양환경에 따른 EPS의 분비 특성과 추출한 EPS의 특성을 분석하였다.

이는 곧 EPS가 해빙의 구조에 미치는 영향에 관한 실험의 기초자료가 될 수 있을 것이라 생각한다.

3. 재료 및 방법

3.1 균주 및 배지조성

Synedropsis sp., *Porosira pseudodenticulata* 의 경우, 기본 배지 및 염도변화에 따른 EPS 추출량 비교 실험에서 f/2 배지^[28]를 사용하였다. Seed culture는 2 °C, 34 ‰ 으로 실시하였다

Table 1 f/2 배지 조성

Stock		Per liter	Medium		Per liter
1)	NaNO₃	75 g	1)	NaNO₃	1.0 mL
2)	NaH₂PO₄·2H₂O	5.65 g	2)	NaH₂PO₄·2H₂O	1.0 mL
3)	Trace elements		3)	Trace elements	1.0 mL
	Na ₂ EDTA	4.16 g	4)	Vitamin mix	1.0 mL
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	3.15 g			
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.01 g			
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.022 g			
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.01 g			
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.18 g			
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.006 g			
4)	Vitamin mix				
	Vitamin B ₁₂	0.0005 g			
	Vitamin B ₁	0.1 g			
	Biotin	0.0005 g			

3.2 배양조건

3.2.1 해빙 미세조류의 대량배양 시스템 구축

대용량냉장고의 냉장실을 사용하여 본배양 온도인 2 °C를 유지하였고, 냉장실 내부에 형광등을 설치하여 2000 lux의 광량을 확보하였다. 공기압축기 (서원컴프레샤 (주), Korea) 및 공기여과기 (GSA Co., Ltd., Korea)를 통하여 냉장실 내부에 비치한 20 L PET 카보이 (NALGENE, USA)에 멸균된 외부공기를 주입하여 통기배양을 실시하였고, 조절밸브를 통하여 각 카보이마다 멸균공기가 균일하게 공급되면서 조류의 순환이 잘 이루어지도록 조절하였다.

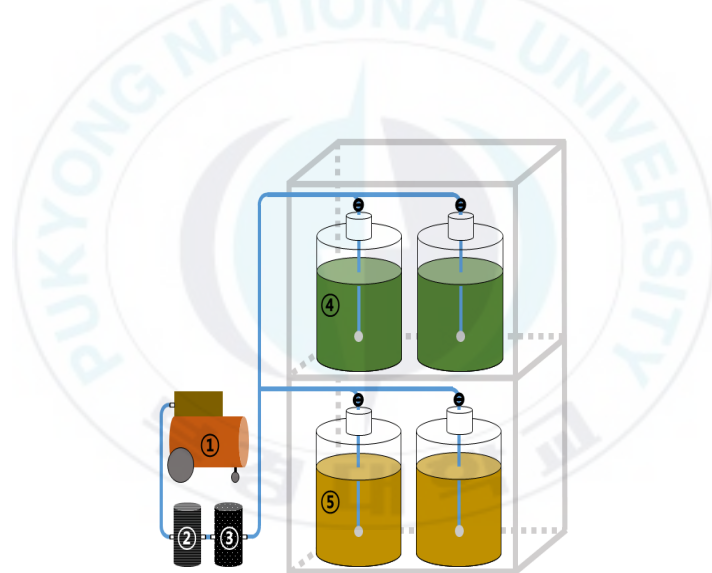


Figure 1 미세조류 대량배양 시스템

- ① 공기압축기, ② 1차 공기여과기, ③ 2차 공기여과기,
④ *Synedropsis* sp. 배양 카보이, ⑤ *Pseudodenticulata* 배양 카보이

3.2.2 온도

실험에 사용한 해빙 미세조류인 *Synedropsis* sp., *Porosira pseudodenticulata* 또한 저온미세조류임으로 원래 생육조건인 2 °C와 이보다 낮은 온도인 -3 °C에서 실험하여 본래의 조건과 보다 더 저온에서 분비되는 EPS를 각각 비교하였다.

3.2.3 염도 (NaCl)

Synedropsis sp., *Porosira pseudodenticulata* 의 경우에는, 두 조류 각각 원래 배양환경과 동일한 1) 34 ‰, 2 °C 과 2) 34 ‰, -3 °C, 3) 70 ‰, 2 °C, 4) 70 ‰, -3 °C를 세번씩 실험하였다.

3.3 EPS 추출 및 측정

EPS추출에는 Ethanol 침전법^[29], 측정에는 PSA (Phenol-sulfuric acid)법^[30]을 사용하였다.

Ethanol 침전법의 경우, 배양액을 원심분리 (10,000 rpm, 30 min)하여 상층액을 회수한 다음 0.45 µm filter로 filtration을 실시하여 filtrate를 회수하였다. 이

sample 50 mL에 cold ethanol을 3배 (150 mL) 첨가하고, 5 °C에 3시간 방치 후 원심분리 (10,000 g, 30 min)를 실시하였다. 이를 증류수에 1:1 희석비로 녹여준 후, MWCO 12,000의 dialysis bag으로 dialysis하였다.

PSA법의 경우, Dialysis 처리된 sample 2 mL에 5 % phenol solution 1 mL와 95 % 황산 5 mL를 넣고 vortex하여 잘 섞어 주었다. 황산을 넣을 때 열이 발생하므로 첨가 속도를 표준화하여 천천히 넣어주었다. 그 후, 30분간 반응시키고 Spectrophotometer를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이를 standard curve (glucose ; 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL)에 대입하여 농도를 측정하였다.

3.4 생존률 측정

미세조류의 생존률 측정은 다음과 같이 하였다. Tryphan Blue 1 % stock solution 3 mL과 PBS 7 mL을 혼합하여 Tryphan Blue working solution을 제조한다. 세포부유액 ($2\sim5\times10^6$ cells/mL)에 동량의 Tryphan Blue working solution은 동량을 혼합한다. 염색된 세포부유액을 Neubauer chamber에 채우고 살아있는 세포와 사멸 세포를 3분 이내에 감별 계수하여 세포 생존율 %를 구한다. 최소 총 200개 이상의 세포를 계수한다.

3.5 Phyto-PAM을 이용한 광합성 활성 측정

배양 시간에 따른 미세조류의 광합성효율 (F_m/F_v)은 Phyto-PAM (Walz, Effectrich, Germany)을 사용하여 측정하였다. 측정 전 최소 15분간 미세조류를 암적응시킨 후 Phyto-PAM의 조도는 8, 16, 32, 64, 90, 120, 210, 295, 350, 435 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 로 설정하여 20초 간격으로 측정하였다. 광합성효율은 다음 식으로 계산하였다.

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{(F_m - F_0)}{F_m}$$

F_m = 최대형광효율, F_0 = 최소형광효율

3.6 당 및 단백질 함량 측정

총 탄수화물 함량은 표준물질 D-glucose를 사용하여 Phenol-sulfuric acid 방법으로 490 nm에서 측정하였다^[29]. 간략하게 기술하면 시료 2 mL에 5 % phenol solution 1 mL를 첨가 후 vortex하였다. 여기에 95 % 황산 5 mL를 첨가하고 vortex를 한 다음 상온에 30분 방치하였다. 그 다음 490 nm에서 O.D.를 측정하였다. 표준물질 곡선은 glucose를 이용하여 위와 동일한 방법으로 수행하여 작성하였다. 단백질의 함량은 Bradford 방법으로 정량하였다^[31]. Bradford 용액 (G-250 50 mg, methanol 50 mL, phosphoric acid (85 %, w/v) 100 mL, 증류수 850 mL) 1

mL와 시료 20 μ L를 혼합한 다음 상온에서 5분간 방치한다. 이를 595 nm 파장에서 흡광도를 측정한다. 표준물질 곡선은 BSA (bovine serum albumin)를 이용하여 작성하였다.

3.7 EPS의 성분 원소 분석 및 크기배제 크로마토그래피

EPS의 탄소, 수소, 산소, 질소, 황 등 원소의 질량 백분을 분석은 Vario Macro/Micro (Elementar, Germany)를 이용하여 수행하였다. 건조된 EPS를 분쇄한 후 약 1 mg을 분석에 사용하였다. 시료를 1,115 $^{\circ}$ C 정도의 고온에서 산화 분해한 후 환원과정을 거쳐 열전도도 검출기로 원소의 종류와 함량을 측정하였다. 설파닐아마이드 (sulfanilamide) 를 표준물질로 사용하였다. EPS의 조추출물의 크기 크로마토그래피는 젤침투 크로마토그래피를 사용하였으며 용출물의 크기 분석을 위해 Multi-Angle Light Scattering을 이용하였다.

3.8 EPS 단당성분 및 글리코시딕 결합분석

EPS의 단당 조성을 분석을 위해 EPS 약 10 mg을 4 M trifluoroacetic acid에 녹인후 100 $^{\circ}$ C에서 6시간 동안 가수분해 하였다. 가수분해 수용액은 NaBD₄를 이용하여 환원하였고, acetic anhydride로 아세틸화 한 후 분석하였다^[32]. 시료를 HP-5MS capillary column (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)에 주입한 후 기체 크로마토그래피-질량 분석기 (6890N/MSD5973,

Agilent Technologies, Santa Clara, CA)를 이용하여 분석하였다.

그 후 EPS의 글리코시딕 결합은 Ciucanu 와 Kerek (1984)^[33]의 방법으로 수행하였고, 앞의 장비로 분석하였다. Hakomori (1964)^[34]의 방법을 약간 변형하여 수행하였다. 시료 2~3 mg을 질소기체 하에서 0.5 ml dimethylsulfoxide (DMSO)에 녹인 후, CH₃I 0.3 ml과 분말 NaOH로 메틸화한다. 완전히 메틸화된 시료를 4 M trifluoroacetic acid로 100 °C에서 6시간 동안 반응하여 산 가수분해하여 부분적으로 메틸화된 알디톨 아세테이트를 제조한다. 가수분해 산물은 NaBD₄를 이용하여 환원하였고, acetic anhydride로 아세틸화 하였다. 부분적으로 메틸화된 알디톨 아세테이트는 HP-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)에 주입한 후 기체 크로마토그래피-질량 분석기 (6890N/MSD5973, Agilent Technologies, Santa Clara, CA)를 이용하여 분석하였다.

3.9 EPS 황산 및 유론산 함량 분석

EPS의 황산 함량은 barium chloride gelatin 방법으로 결정하였다^[35]. 글리코시딕 HP-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)에 주입한 후 기체 크로마토그래피-질량 분석기 (6890N/MSD5973, Agilent Technologies, Santa Clara, CA)를 이용하여 분석하였다.

3.10 EPS의 FT-IR 측정

건조된 EPS 시료 약 2 mg을 100 mg의 KBr과 혼합한 후 7 kg cm^{-2} 의 압력으로 투명한 펠릿을 제작하였다^[36]. 시료를 Nicolet 6700 FT-IR spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)에 탑재하고 스펙트럼을 기록하였다. 데이터 수집 조건은 spectral region $4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$, resolution 2 cm^{-1} , 25°C 이었다. 스펙트럼은 10-point 필터 하였고 베이스 라인을 교정하였다. 중복된 띠들의 파동수를 결정하기 위하여 스펙트럼의 이차 도함수를 사용하였다.

3.11 EPS의 NMR 측정

NMR 실험은 60°C 에서 JEOL JNM ECP-600 spectrometer를 사용하여 측정하였다. NMR spectrometer의 기본 주파수는 프로톤 (^1H) 600.13 MHz 이다. EPS 시료 내 교환가능한 양성자는 중수 (D_2O)로 2회 동결건조를 실시하여 중수소로 치환하였다. 최종 시료는 건조 시료 약 10 mg을 99.9% D_2O 0.5 ml에 녹여 제조하였다. 화학적 이동은 TMS (tetramethyl silane)를 표준물질로 하여 상대적 값으로 나타내었다. DOH 신호는 이완되는 동안 낮은 전력의 펄스를 조사함으로써 억제하였다. 1D ^1H NMR 스펙트럼은 JEOL사에서 제공하는 펄스프로그램을 사용하여 수집하였다.

3.12 EPS의 항산화 활성 측정

3.12.1 DPPH 자유 라디칼 소거능

DPPH 자유 라디칼 소거능 측정은 Xiong et al. (2013)^[37]에 기술된 방법을 수정하여 사용하였다. 500 µL (1 mg/ml와 0.5 mg/ml) EPS 용액을 500 µL의 DPPH (0.1 mM)의 에탄올 용액에 첨가하였다. 대조구로 ascorbic acid (JUNSEI, Japan) (10 µg/ml와 8 µg/ml, 4 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml)와 xanthan gum (SIGMA, USA) (1 mg/ml와 0.5 mg/ml)을 사용하였다. 10초간 격렬하게 혼합한 후, 용액을 2.5 ml cuvette (Kartell, Italy)에 옮기고, EPS의 DPPH 라디칼 소거능을 BioDrop Touch Duo (BioDrop, England)을 이용하여 517 nm에서 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 아래 방정식으로 계산하였다.

$$DPPH\text{라디칼소거능}(\%) = [1 - (A - A_b) / A_0] \times 100$$

A; 시료와 DPPH 반응 후 흡광도

A_b; 시료의 흡광도

A₀; DPPH의 흡광도

3.12.2 과산화수소 라디칼 소거능

과산화수소 라디칼 소거능 측정은 Xiong et al. (2013)^[37]에 기술된 방법을 수정하여 사용하였다. 측정에 사용된 시료는 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 용액에 녹여 수용액 상태로 사용하였다. 측정 시료는 EPS_S와 EPS_P를 각각 1 mg/ml과 0.5 mg/ml로 준비하였고, 대조구로써 ascorbic acid (JUNSEI, Japan)를 600 µg/ml와 400 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml을 준비하였고, xanthan gum (SIGMA, USA)의 경우 1 mg/ml와 0.5 mg/ml을 준비하였다.

측정은 시료 400 µL에 hydrogen peroxide (SAMCHUN, Korea) 1 µL를 첨가하여 10분간 상온에서 반응 후 측정하였다. 반응시간 동안 30초씩 총 6회 pipetting을 통하여 섞어주었다. 반응 후 측정은 BioDrop Touch Duo (BioDrop, England)를 사용하여 230 nm에서 측정하였고, 수산화 라디칼 소거능은 아래 방정식으로 계산하였다.

$$\text{수산화라디칼소거능(\%)} = [1 - (A - A_b) / A_0] \times 100$$

A; 시료와 H₂O₂ 반응 후 흡광도

A_b; 시료의 흡광도

A₀; H₂O₂의 흡광도

3.13 EPS의 얼음 결합 특성 분석

3.13.1 온도 이력 활성화

EPS에 의한 얼음결정의 형태 변화는 디지털 카메라가 장착된 나노리터 삼투압계 (nanoliter osmometer, Otago osmometers, New Zealand)로 관찰하였다. 약 1, 0.1, 0.01 mg/ml EPS 용액 2 μ L를 시료 디스크내 구멍에 주입한 다음, 시료 디스크를 콜드 스테이지에 탑재한다. 콜드 스테이지의 온도를 -20°C 로 급속으로 내려 큰 크기의 다결정성 얼음을 만든다. 수 초~수 분 후 시료 구멍내 얼음의 형태를 관찰하면서 콜드 스테이지의 온도를 -20°C 에서 천천히 얼음의 녹는점 근처까지 높인다. 녹는점 부근에서 얼음의 단일 결정이 관찰되면 이번에는 반대로 천천히 온도를 내리면서 얼음 구조의 변화를 관찰한다. 결빙방지 단백질의 경우 온도가 하강해도 얼음 결정이 커지지 않고 일정한 형태를 유지하는 것을 관찰할 수 있는데, 용액의 온도가 어느점 이하로 내려가면 그때부터 급격하게 얼음 결정이 성장하는 것을 볼 수 있다. 대조구로 f/2 배지 또는 증류수를 사용하였다.

3.13.2 얼음재결정화 억제

EPS의 얼음 재결정화 억제는 splat assay 이용하여 측정하였다. 0.1, 0.01, 0.001 $\mu\text{g/ml}$ 을 함유한 수용액 10 μL 를 약 2 미터 높이에서 드라이 아이스를 이용하여 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 까지 냉각시킨 알루미늄 블록 위에 떨어뜨린다. 이때 떨어진 용액은 알루미늄 표면에 충돌하는 순간 얼어붙는데 두께 약 20 μm 이하, 직경 약 1 cm의 얇은 웨이퍼 형태가 된다. 이 웨이퍼를 조심스럽게 떼어서 두 개의 커버 글라스 사이에 넣고 최대한 빠르게 $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 로 고정된 콜드 스테이지에 올려 어닐링 (annealing) 시킨다. 그리고 60~120분 동안 얼음의 크기 변화를 현미경으로 관찰하고 디지털 카메라로 기록하였다. 대조구로 f/2, xanthan gum을 사용하였다. 각 시료의 얼음재결정화 억제 활성 비교는 $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 어닐링한 시료의 이미지를 획득한 후 분석하였다. 이미지 분석은 Image J를 이용하여 각 시료에서 크기가 최대인 10개의 결정을 취한 후 면적을 계산하고 평균 입자 크기 (MGS) 를 구하였다. 이 값들을 대조구로 사용한 f/2의 평균입자 크기와 비교하여 상대적으로 비교하였다. 얼음재결정화 억제 활성은 f/2 대조구의 상대적 백분율로 보고하였다. 높은 백분율 값은 평균입자 크기가 크다는 것으로 얼음재결정화 억제 활성이 약함을 의미한다.

3.13.3 얼음흡착 유지

해빙 형성시 EPS가 해빙내에 얼마나 흡착 유지되는지 알아보기 위하여 추출한 다당의 흡착유지 실험을 쿨드핑거가 장착된 장치를 사용하여 수행하였다. 쿨드핑거 장치는 냉각수 (-5 °C)가 지속적으로 흐르는 쿨드핑거와 약 -1.9 °C가 유지되는 단열된 상자로 구성하였다. 약 2 °C 시료 200 ml 이 들어있는 비이커를 얼음으로 채워진 -2 °C의 단열 상자 내에 위치한 다음, 실험이 진행중인 동안 마그네틱 바를 이용하여 계속 교반하였다. 쿨드핑거를 시료에 담근 후 약 5시간 동안 얼음이 자랄 수 있도록 방치하였다. 시료의 온도를 지속적으로 모니터링 하였다. 각 실험이 끝난 후 쿨드핑거를 제거하고 형성된 얼음을 제거하였다. 제거된 얼음을 녹인 후 그 부피와 염분의 농도와 당함량을 측정하였다. 대조구로 f/2배지와 xanthan gum을 사용하였다. 얼음에 흡착 유지되는 세포외 다당을 정량적으로 기술하기 위하여 Ewert와 Deming (2011)^[38]의 공식을 이용하였다. 간단히 설명하면 먼저 얼음에 흡착된 염의 비율은 염 유효분리계수 (effective segregation coefficients, k_{eff})로 나타내었다.

$$k_{eff_s} = \frac{S_{ice}}{S_{sol}}$$

여기에서 S_{ice} 는 얼음에 흡착된 염의 농도이며 S_{sol} 는 시

료에 들어있던 총 염분의 농도를 말한다. 이 공식을 좀 더 확장하면 EPS의

유효분리계수를 구할 수 있다.

$$k_{eff_E} = \frac{EPS_{ice}}{EPS_{sol}}$$

여기에서 EPS_{ice} 는 얼음에 흡착된 EPS의 농도이며

EPS_{sol} 는 용액 내에 들어있던 총 EPS의 농도를 말한다. 바닷물속의 용존 용질 (본 연구에서는 EPS)이 얼음과 결합하지 않는다면, 일반적인 염분의 분리되는 정도에 비례할 것이다. 따라서 용질의 얼음흡착 유지 정도는 염과 비교함으로써 보정할 수 있을 것이다.

$$I_s = \frac{k_{eff_x}}{k_{eff_s}}$$

보정된 강화 지수는 k_{eff_x} 로 나타낼 수 있다. 여기서 k_{eff_x} 는 용질 x의 분리계수이다. 만약 $I_s = 1$ 이라면 둘 다 얼음에서 배출되는 정도가 같다는 것이고, 만약 $I_s > 1$ 이라면 용질이 선택적으로 얼음 내에서 흡착 유지되는 것을 의미한다.

3.14 EPS의 동결보존 활성 측정

동결보호제로서 EPS의 활성을 측정하였다^[39]. 동결보존 활성은 대장균인 *E.coli* DH5 α 에 일정량의 EPS를 넣고 -20 °C에서 24시간, 48시간 동결한 후 생존한 대장균의 수를 상대적으로 나타내었다. 대조구로 생리식염수, 20 % 글리세롤, xanthan gum을 사용하였다. 약술하면, *E.coli* DH5 α 를 LB 배지에 접종한 후 37 °C에서 하룻밤 동안 배양하였다. 이튿날 1:100으로 희석하여 동일배지에 접종하고 O.D.600 = 1.2에 이를 때 까지 배양하였다. 균을 생리식염수로 10⁴배 희석하였다. 희석한 균 100 μ l를 1.5 ml 마이크로튜브에 분주하고 최종 농도가 각각 1 mg/ml, 10 mg/ml이 되도록 EPS 용액을 첨가하였다. 생리식염수를 이용하여 최종 부피가 500 μ l가 되도록 한 후 잘 혼합하였다. 혼합된 균 시료를 -20 °C에서 24시간, 48시간 보관하였다. 보관된 시료를 꺼내고 상온에서 해동시킨 후 LB한천 배지위에 일정량 도말한 후 37 °C에서 하룻밤 동안 배양하였다. 각 시료의 콜로니수는 대조구와 비교하여 상대적으로 나타내었다.

4. 결과 및 고찰

4.1 극지 해빙 미세조류의 배양 조건에 따른 EPS 생산

4.1.1 해빙 미세조류 2 종의 성장곡선

해빙 미세조류 두 종 (*Synedropsis* sp., *Porosira pseudodenticulata*)을 대량배양 시스템으로 f/2 배지 20 L 에 2 °C , 34 ‰, 2000 lux 에서 23 일간 배양하였다. 그 결과, *Synedropsis* sp.는 2.4E+6 cells/mL (Figure 2), *Porosira* 는 1.4E+4 cells/mL (Figure 3) 배양되었다.



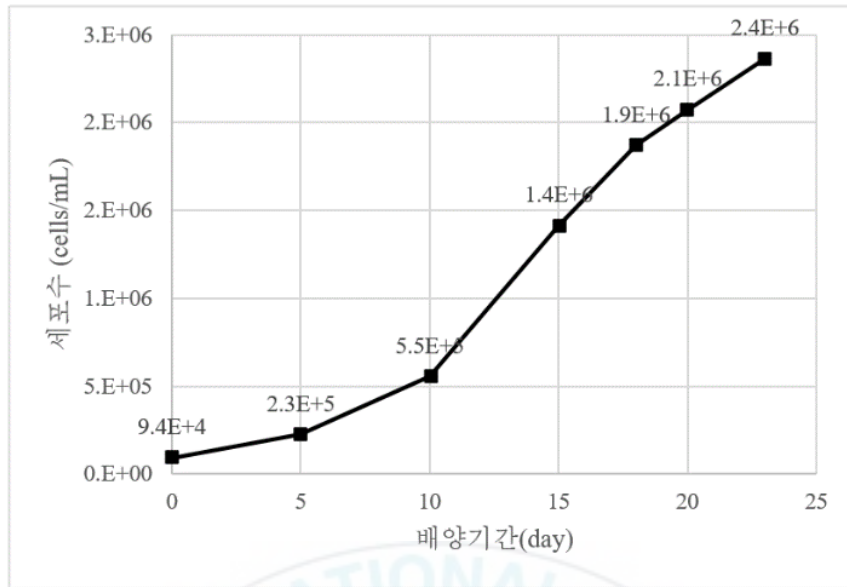


Figure 3 *Synedropsis* sp.의 배양일에 따른 세포수

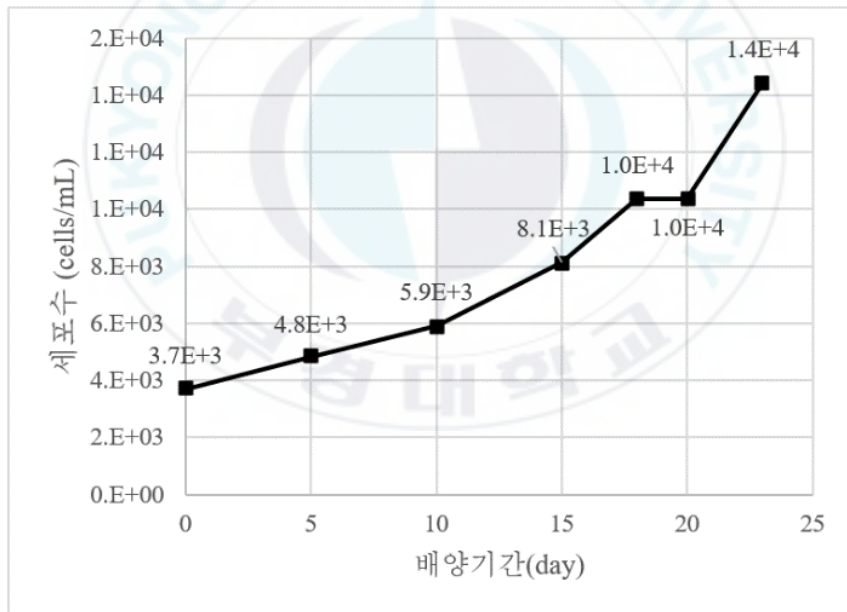


Figure 2 *Porosira pseudodenticulata*의 배양일에 따른 세포수

4.1.2 해빙 미세조류의 환경에 따른 EPS 생성량

해빙 미세조류의 온도 및 염도에 따른 EPS 생성량을 온도와 염도는 두 해빙 미세조류가 생육하는데 적합한 2 °C 와 34 ‰을 기초로 환경적 스트레스 배양조건인 -3 °C 와 70 ‰을 추가하여 총 4 가지 조건으로 14 일간 실험하였다.

실험결과 두 조류 모두 환경적 스트레스 배양조건인 -3 °C 와 70 ‰에서는 EPS 를 거의 생성하지 않거나 적은 EPS 를 생성하였다 (Figure 4, 5, 8, 9). 온도에 의한 경우 -3 °C 의 조건에서 *Synedropsis* sp.는 염도에 관련없이 EPS 를 거의 생성하지 않는 것을 확인하였고 (Figure 4, 5), *P.pseudodenticulata* 는 14 일차에서 적은 EPS 를 생성하는 것을 확인하였다 (Figure 8, 9).

또한 염도에 의한 차이 (34, 70 ‰)는 두 조류 모두 14 일차에서 34 ‰이 70 ‰에 비해 약 2 배의 EPS 를 더 생성하였다 (Figure 6, 7, 10, 11). 이는 낮은 온도에 의해 EPS 를 생성하는 효소의 활성이 낮아져 이러한 결과를 나타내는 것으로 보인다.

(1) *Synedropsis* sp.의 온도 및 염도에 따른 EPS 생성량

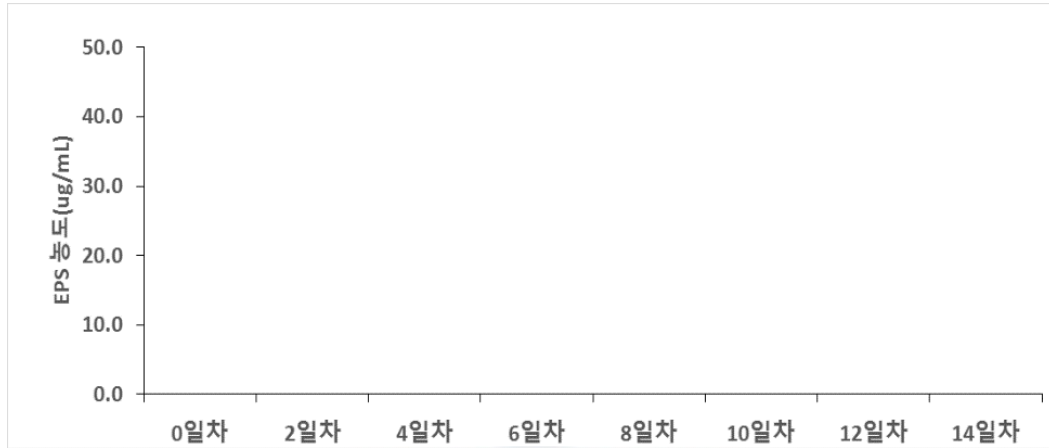


Figure 4 *Synedropsis* sp. -3 °C, 34 ‰의 EPS 생성량



Figure 5 *Synedropsis* sp. -3 °C, 70 ‰의 EPS 생성량

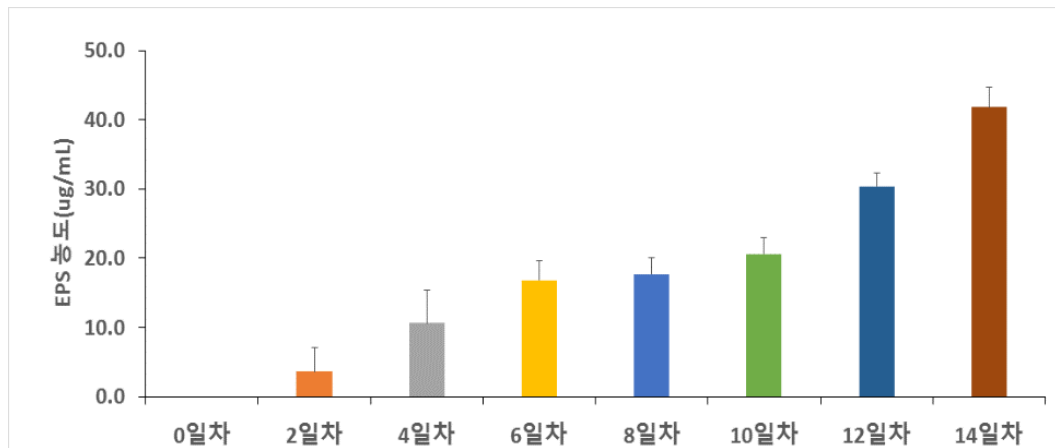


Figure 6 *Synedropsis* sp. 2 °C, 34 ‰의 EPS 생성량

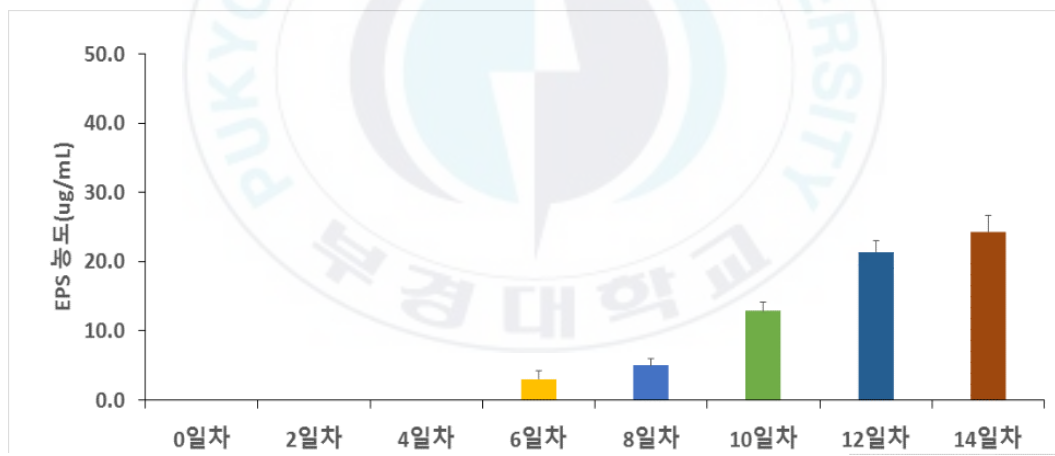


Figure 7 *Synedropsis* sp. 2 °C, 70 ‰의 EPS 생성량

(2) *Porosira pseudodenticulata* 의 온도 및 염도에 따른 EPS 생성량

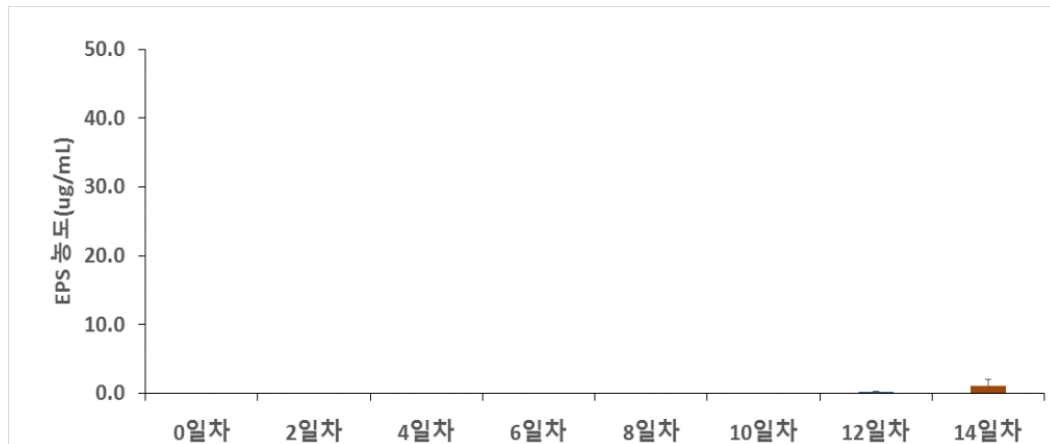


Figure 8 *Porosira pseudodenticulata* -3 °C, 34 ‰의 EPS 생성량



Figure 9 *Porosira pseudodenticulata* -3 °C, 70 ‰의 EPS 생성량

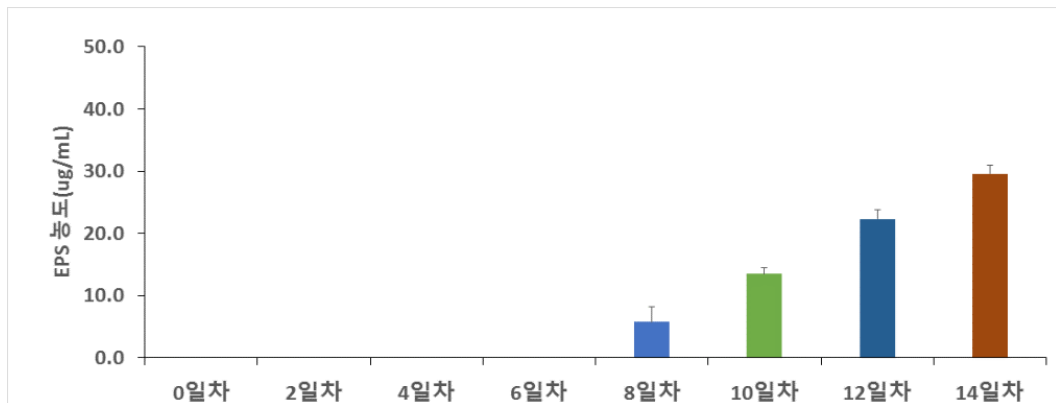


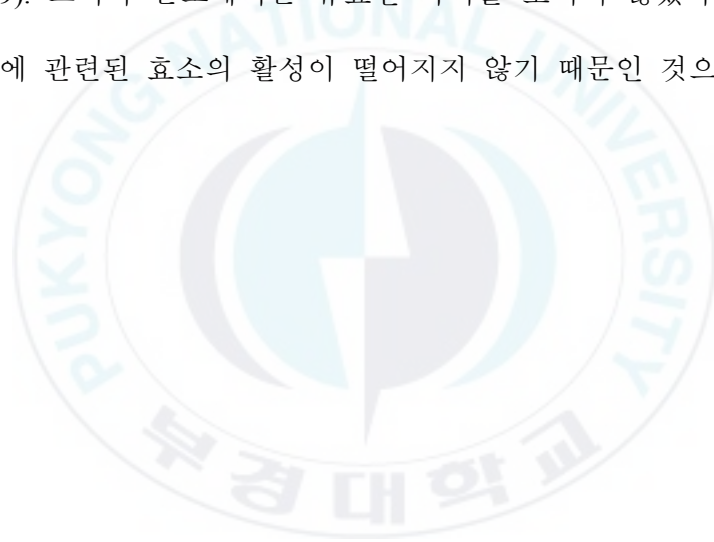
Figure 10 *Porosira pseudodenticulata* 2 °C, 34 ‰의 EPS 생성량



Figure 11 *Porosira pseudodenticulata* 2 °C, 70 ‰의 EPS 생성량

4.1.3 해빙 미세조류의 환경에 따른 광합성효율

해빙 미세조류의 온도 및 염도 환경에 따른 광합성효율을 측정하기 위하여 Phyto-PAM을 이용하였다. 측정 전 조류를 15분간 암적응시킨 후 측정하였으며, 조도는 8, 16, 32, 64, 90, 120, 210, 295, 350, 435 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 로 설정하여 20초 간격으로 측정하였다. 두 조류 모두 원래의 염도환경인 34‰에서 광합성 효율이 가장 높게 나타났으며 (Figure 12, 14, 16, 18), 환경적 스트레스 배양조건인 70‰에서는 상대적으로 낮은 수치를 나타내었다 (Figure 13, 15, 17, 19). 그러나 온도에서는 유의한 차이를 보이지 않았다. 이는 $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 또한 광합성에 관련된 효소의 활성이 떨어지지 않기 때문인 것으로 보인다.



(1) *Synedropsis* sp.의 온도 및 염도에 따른 광합성 yield

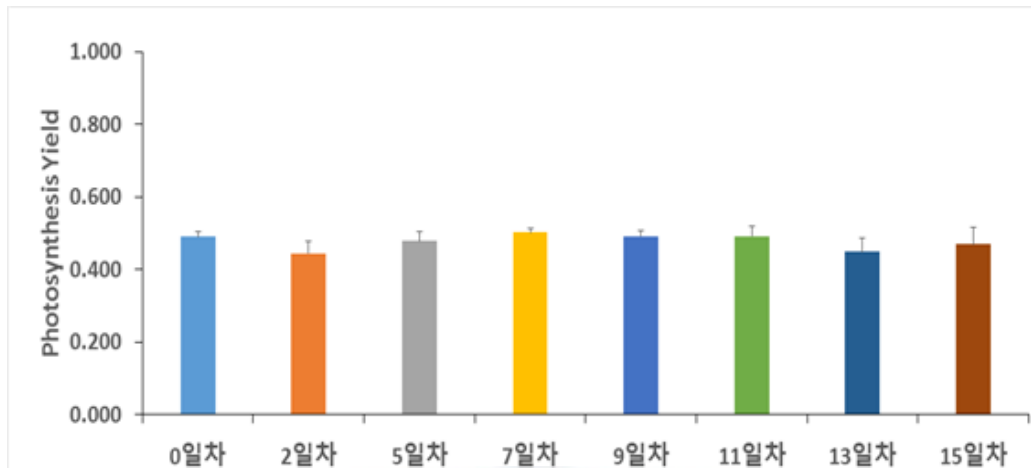


Figure 12 *Synedropsis* sp. -3 °C, 34 ‰의 광합성 yield

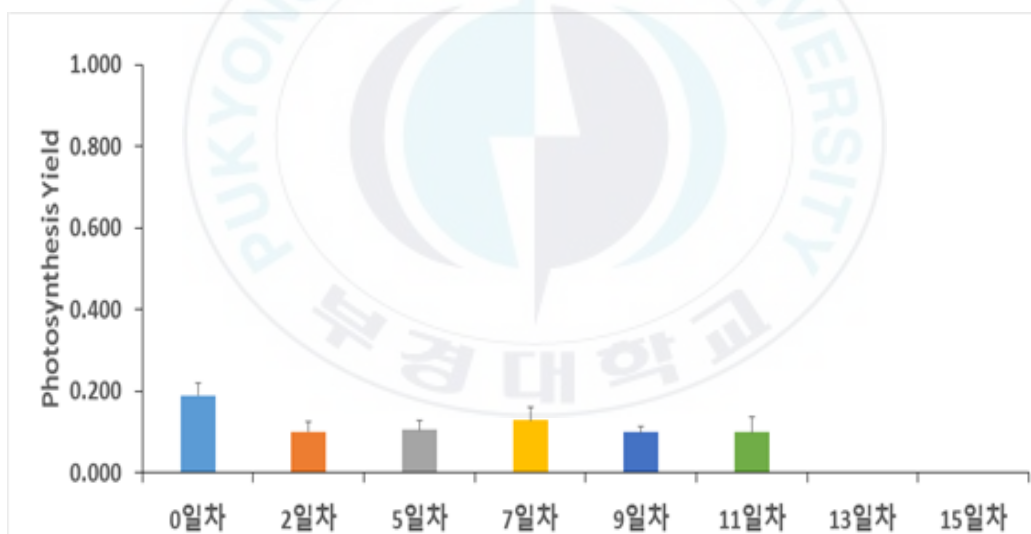


Figure 13 *Synedropsis* sp. -3 °C, 70 ‰의 광합성 yield

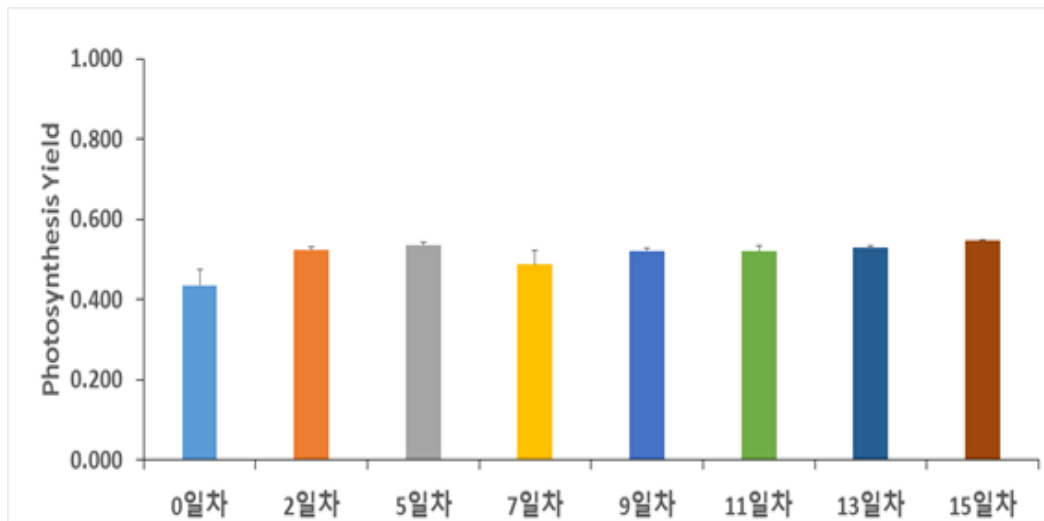


Figure 14 *Synedropsis* sp. 2 °C, 34 %의 광합성 yield

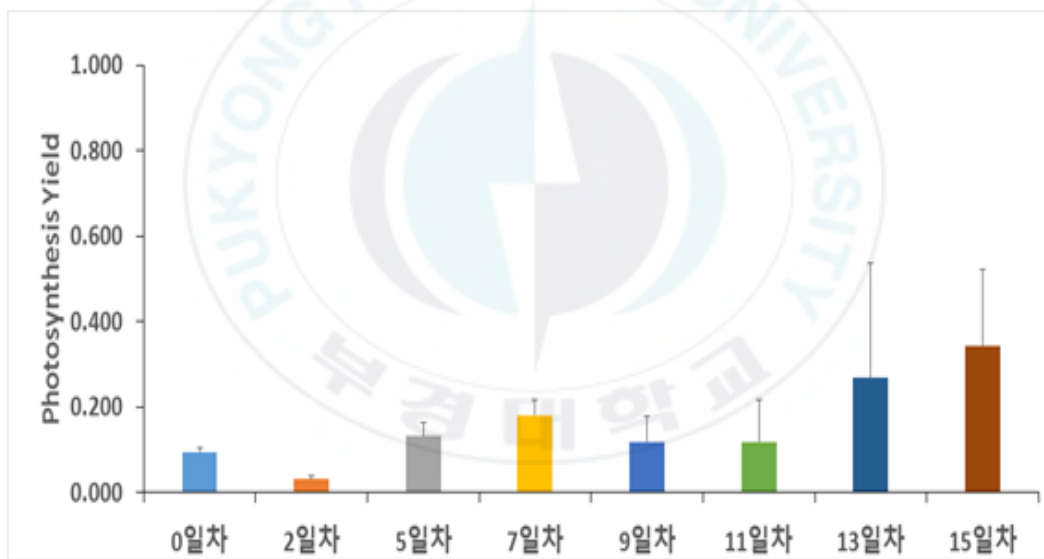


Figure 15 *Synedropsis* sp. 2 °C, 70 %의 광합성 yield

(2) *Porosira pseudodenticulata* 의 온도 및 염도에 따른 광합성 yield

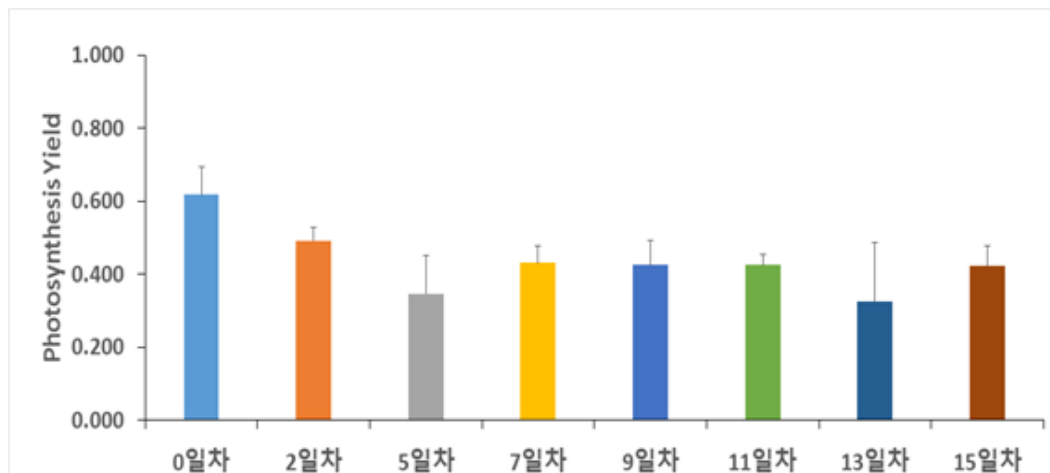


Figure 16 *Porosira pseudodenticulata* -3 °C, 34 %의 광합성 yield

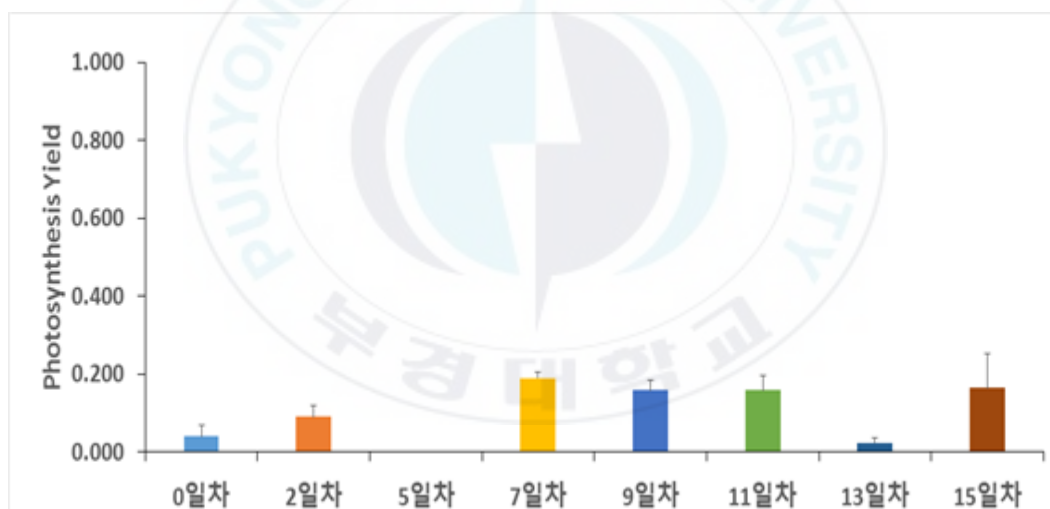


Figure 17 *Porosira pseudodenticulata* -3 °C, 70 %의 광합성 yield

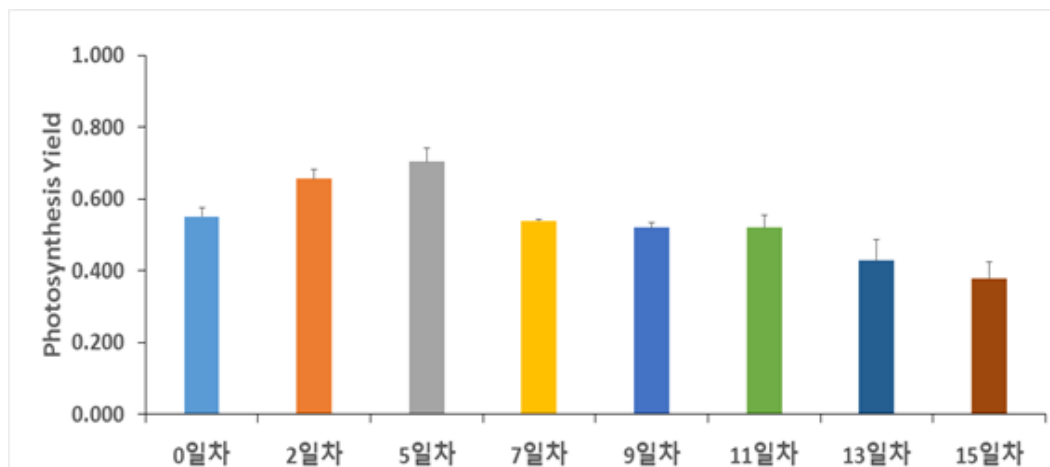


Figure 18 *Porosira pseudodenticulata* 2 °C, 34 %의 광합성 yield

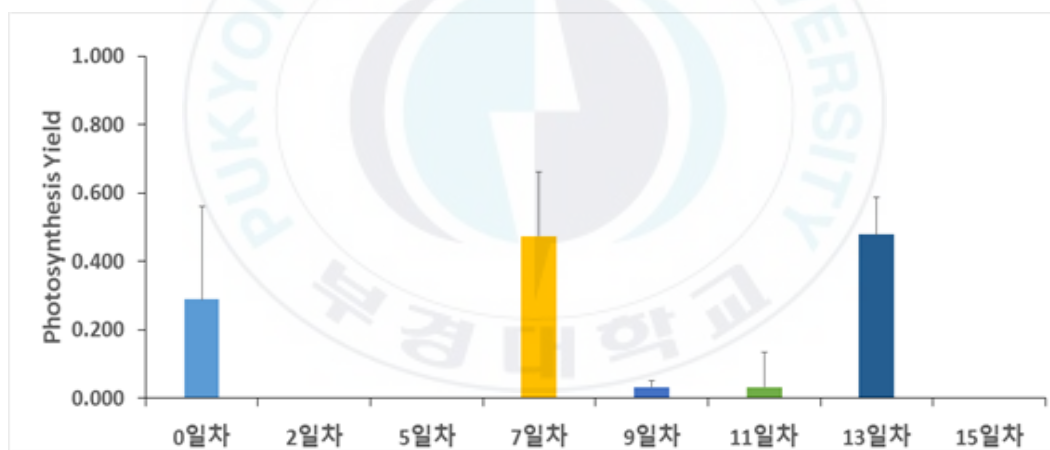


Figure 19 *Porosira pseudodenticulata* 2 °C, 70 %의 광합성 yield

4.2 극지 해빙 미세조류의 EPS 추출 및 특성 분석

4.2.1 해빙 미세조류의 EPS 및 기타 성분 정량

Ethanol을 이용한 EPS를 추출하는 과정 중 수행한 정량을 아래 Figure 20, 21에 나타내었다. 추출을 진행하는 동안 당의 농도는 증가함을 보이나 반대로 단백질의 양은 줄어듦을 알 수 있다. 추출을 진행하는 동안 최소한의 용매만을 사용하여 농축을 실시하였기 때문에 당의 농도가 증가한 것으로 판단된다. 투석 후 단백질이 줄어든 것은 당에 비하여 단백질의 크기가 작기 때문에 투석하는 동안 대부분의 단백질이 멤브레인을 빠져 나갔을 것으로 생각된다.



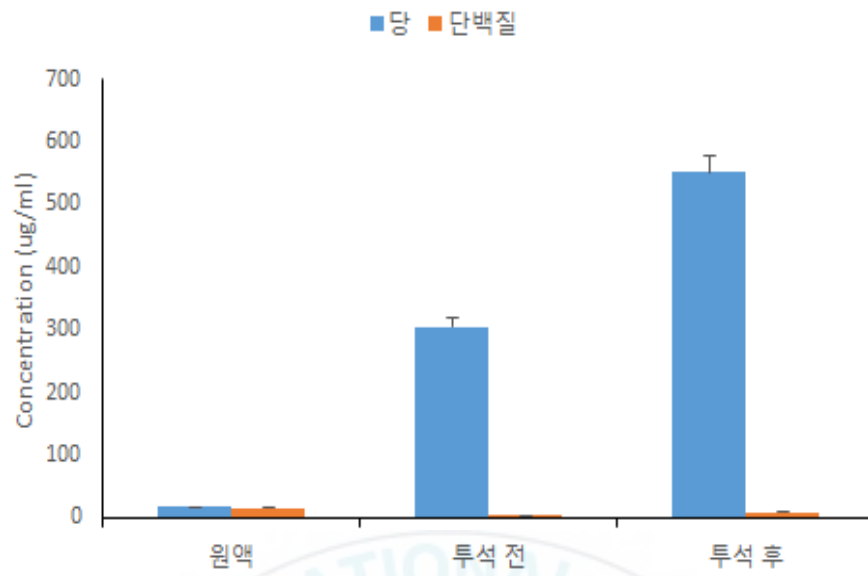


Figure 20 *Synedropsis sp* 의 EPS 추출 과정 중 정량

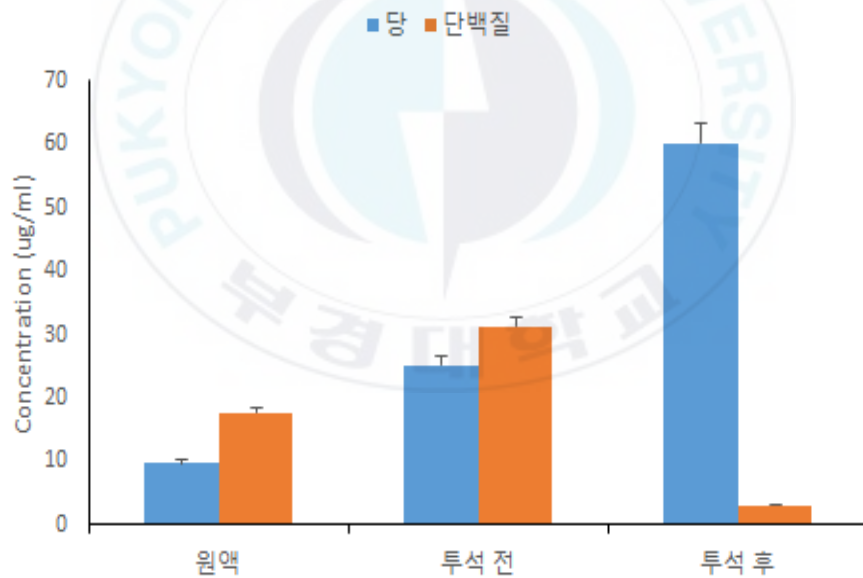


Figure 21 *Porosira pseudodenticulata* 의 EPS 추출 과정 중 정량.

4.2.2 해빙 미세조류의 EPS 성분 및 특성 분석

(1) 성분 원소 분석

미세조류 *Synedropsis* sp.와 *P. pseudodenticulata*에서 추출한 세포외 다당을 각각 EPS_S와 EPS_P로 명명하였다. 추출한 EPS_S, EPS_P의 네 가지 성분원소 분석을 실시하였다. EPS_S와 EPS_P 각각의 경우 탄소는 26.3 %와 6.25 %, 수소는 3.88 %와 1.96 %, 질소는 1.57 %와 0.09 %, 황은 5.43 %와 7.9 %였다 (Table 2). 이 결과는 두 EPS 모두에 황산염 그룹이 존재한다는 것을 의미한다. 하지만 EPS_P의 경우 다른 성분원소가 다량 혼합되어 있음 나타내고 있다. 따라서 EPS_P에 대한 성분당 분석, 분자량 분석, 황산 및 유론산 함량 분석 등은 수행하지 아니하였다.

Table 2 EPS_S와 EPS_P의 원소 분석

Element	Theoretical composition (% w/w)	Experimental Composition (% w/w)	Experimental Composition (% w/w)
	Sulfanilamide	EPS_S	EPS_P
% C	41.81	26.3	6.25
% H	4.65	3.88	1.96
% N	16.25	1.57	0.09
% S	18.62	5.43	7.9

(2) 유론산과 황산의 함량 및 구성당의 조성 및 분자량 측정

Table 3에서 EPS_S의 각 성분 분석을 정리하였다. EPS_S는 5.9 % 유론산, 40.4 % 의 황산 에스터를 각각 함유하고 있다. 이 데이터는 이 세포의 다당이 매우 황산화된 다당임을 보여준다. 카라기난이 40 % 가량 황산화된 다당이다^[40]. 이는 다른 규조류의 다당류 분석의 결과와 일치한다. Table 3과 같이, 구성 단당류의 조성을 살펴보면 fucose, rhamnose, xylose가 주요 성분당으로 각각 36.2 %, 27.9 %, 23.2 %를 차지하며 galactose, glucose가 미량 성분당으로 각각 11.2 %, 1.4 % 존재한다. 미세조류에서 세포외 다당으로 fucose, rhamnose, xylose 등은 주요 구성당으로 알려져있는데^[41] 극지 호냉성 규조류인 *Synedropsis*도 유사한 구성 성분당으로 생합성된 세포외 다당을 분비하는 것으로 판단된다. 높은 황산 함량과 단당류의 구성을 볼 때 *Synedropsis*가 분비하는 세포외 다당 (EPS_S)은 황산 펙칸 (sulfated fucans)으로 생각된다.

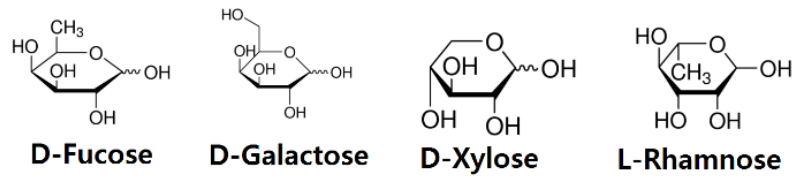
EPS_S의 분자량을 MALS (Multi-Angle Light Scattering) 디텍터가 장착된 젤 침투 크로마토그래피로 추정하였다. Figure 23과 같이 조추출물인 EPS_S는 크로마토그램에서 크게 두 개의 봉우리가 나타났는데 첫 번째 봉우리는 35~38 분 사이에, 두 번째 봉우리는 약 48~51분 사이에 용출되었다. 이는 조추출물이 균질한 시료가 아니라는 것을 의미한다. 각 봉우리에 해당하는 EPS 성분을 MALS 데이터로 분석해 본 결과, 각각 8.3×10^5 Da, 7.9×10^5 Da이었다. 또한

각 봉우리 내의 당 폴리머들의 다분산성 지수 (polydispersity index)를 보면 약 1.1~1.3으로 질량의 다분산 정도가 크지 않은 것으로 나타났다.

Table 3 EPS_S 유론산, 황산 함량 및 구성당 조성

Components	EPS
Uronic acid(%)	5.9 ± 0.1
Sulfate(%)	40.4 ± 0.7
Monosaccharide content	
Rhamnose(%)	27.9
Fucose(%)	36.2
Xylose(%)	23.2
Mannose(%)	0.1
Glucose(%)	1.4
Galactose(%)	11.2

(A)



(B)

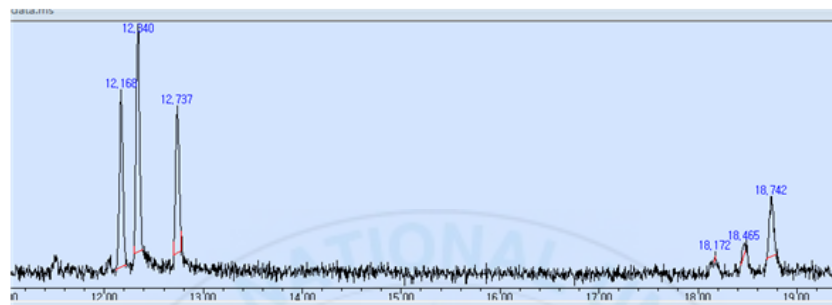


Figure 22 EPS_S의 주요 구성당의 화학 구조 (A) 및 EPS_S 성분당 분석의 용출 프로파일(B)
왼쪽부터 rhamnose, fucose, xylose, mannose, glucose, galactose

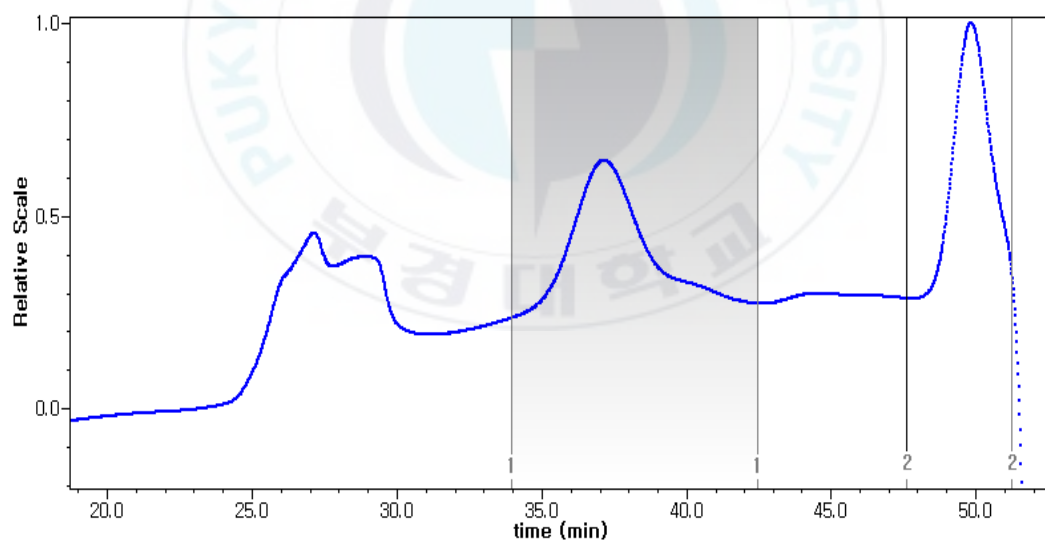


Figure 23 EPS_S의 겔침투 크로마토그래피의 용출 프로파일

4.2.3 EPS의 분광학적 분석

(1) FT-IR 분석

추출한 EPS_S, EPS_P의 FT-IR 스펙트럼을 Figure 24에 나타내었다. 시료의 FT-IR 스펙트럼 파수 지정은 문헌을 참고하였다^{[42]~[46]}. 두개의 스펙트럼을 보면, 1219 and 1211 cm^{-1} 파수에 강하고 넓은 적외선 띠들이 보이는 데, 이는 황산 에스터의 $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ 에 의한 비대칭적 신장 진동과 COH , CC , CO 진동들이 기여하는 것으로 해석 할 수 있다. 이 띠들의 강도가 황산화 전도와 비례한다^[47]. 또한 840 cm^{-1} 의 신호는 galactopyranosyl 잔기의 황산 에스터가 축 방향으로 향한 것을 나타낸다^[43]. 하지만 840 cm^{-1} 의 신호가 넓고 또 어깨 부분이 존재하기 때문에 galactose 단위에 6-sulfate와 3,6 anhydrogalactosyl 단위에 2-sulfate ester 그룹이 있을 가능성을 완전히 배제할 수 없다^[48]. 586과 587 cm^{-1} 의 적외선 피크는 sulfate $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ 의 대칭 비대칭 변형에 의한다. 그리고 1200-970 cm^{-1} 의 적외선 띠들은 주로 피라노이드 고리의 CC , CO 신장과 글리코시딕 결합의 COC 신장에 의한다. 모든 다당류는 흔히 이 지역에서 강하게 흡수한다^[46].

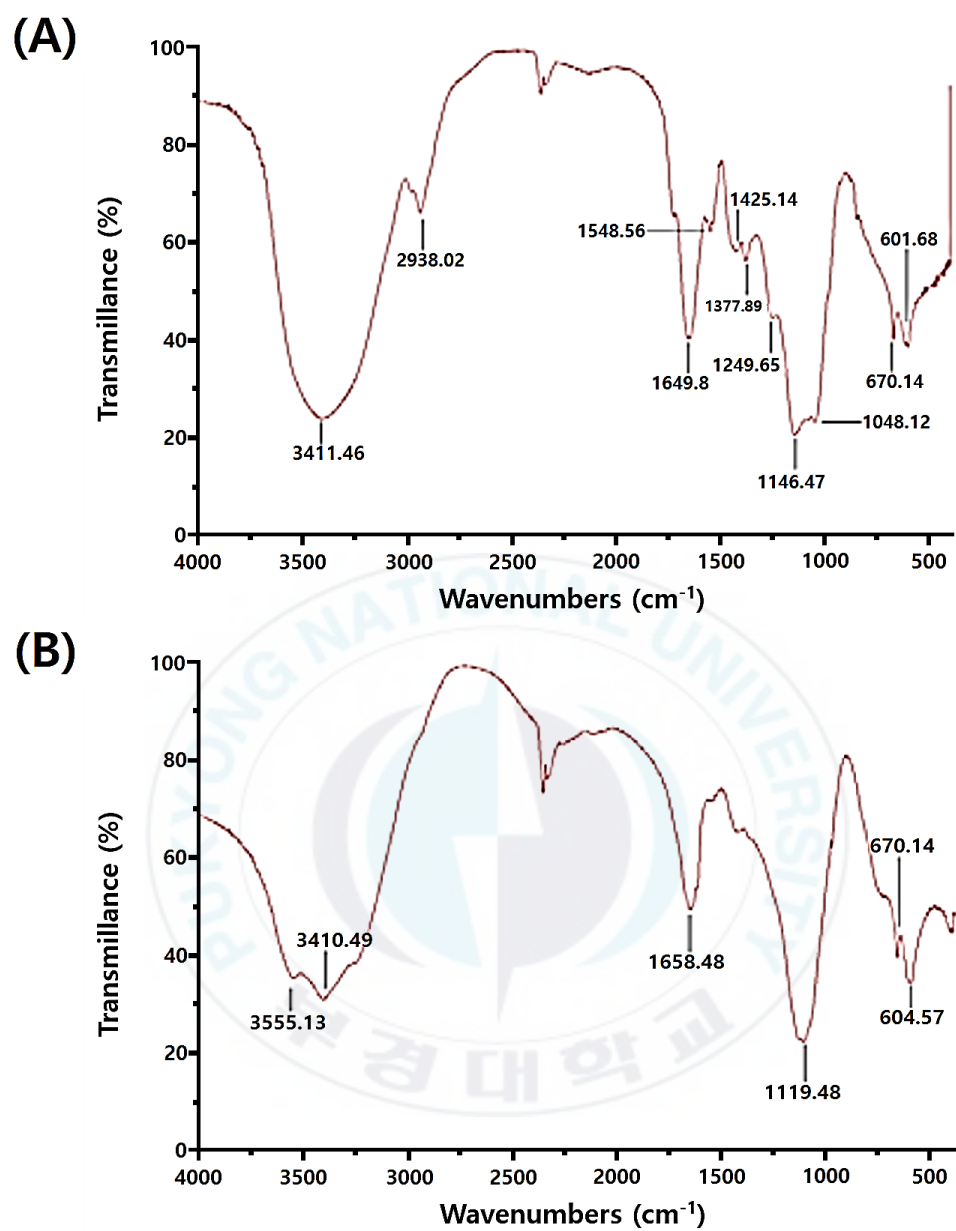
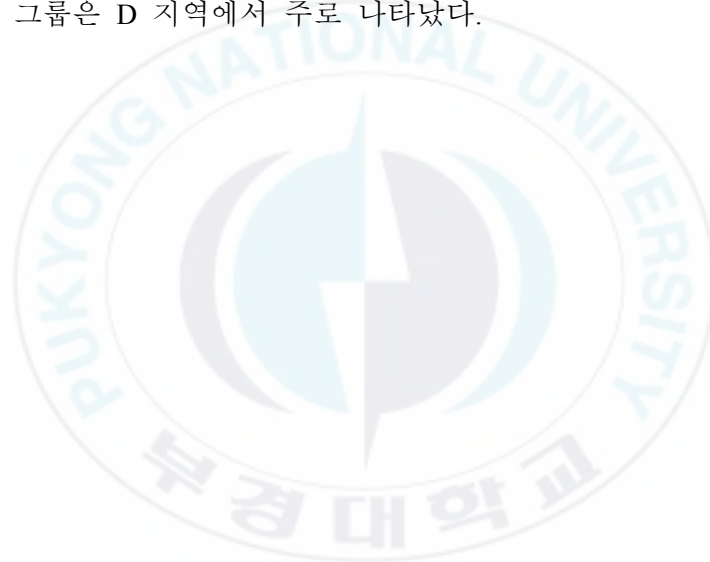


Figure 24 FT-IR spectrum. (A) EPS_S, (B) EPS_P

(2) 핵자기분광법 (NMR) 분석

Figure 25의 EPS_S ^1H NMR 스펙트럼 데이터를 분석해 보면 fucose, rhamnose, xylose의 특성을 잘 보여줌으로써 앞서 분석한 성분당 데이터를 지지해 준다. 각 당과 유론산의 아노머 양성자는 5.0 ppm 부근 (A)에서 나타나며, 또한 각 당의 메틸 그룹이 1.2~1.4 ppm 지역 (E)에 나타났다^{[49][50]}. 황산화된 H2, H3, H4, H5 신호들은 4.10에서 4.66 ppm (B 상자)에서 나타난 반면 황산화되지 않은 H2, H3, H4, H5 신호들은 3에서 4.2 ppm 사이 (C 상자)에서 나타났다. 특히 아세틸화 그룹은 D 지역에서 주로 나타났다.



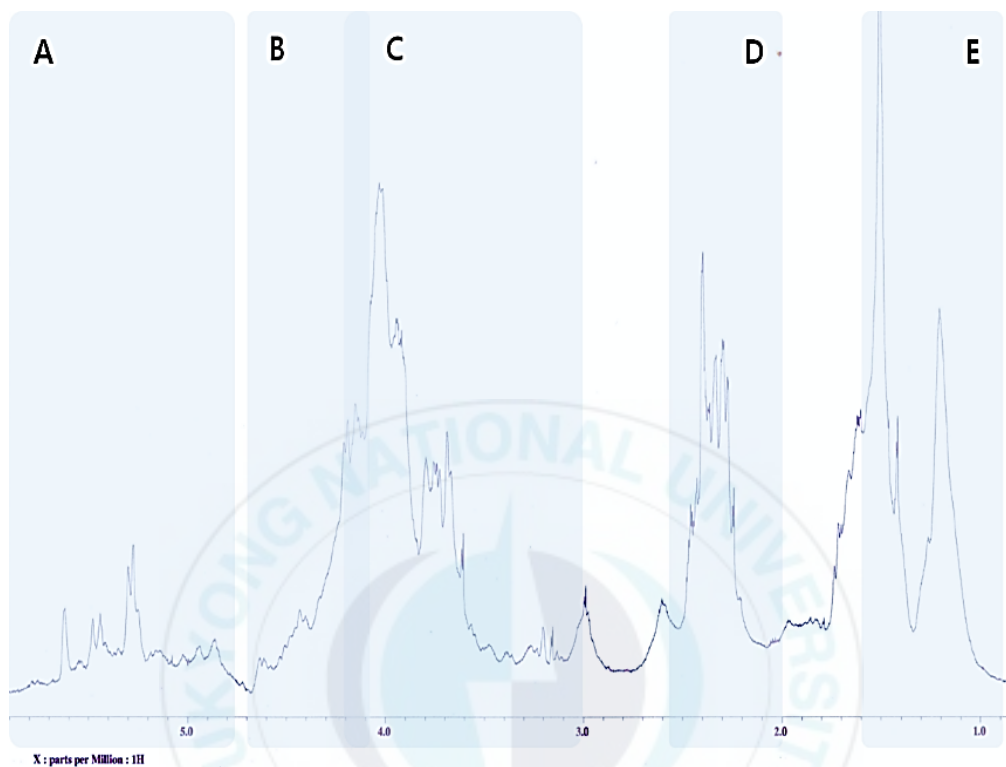


Figure 25 EPS_S의 ^1H NMR 스펙트럼 (600 MHz, 99.9 % D_2O). (A) 각 성분당의 아모머 양성자, (B) 황산화된 당의 H2, H3, H4, H5 (C) 비황산화된 당의 H2, H3, H4, H5 (D) 당의 메틸그룹 양성자 (H6)

4.3 EPS 얼음결합 및 생리활성 특성 분석

4.3.1 EPS의 얼음결합 특성

(1) EPS의 온도 이력 활성

일반적으로 용액은 녹는점과 어는점이 같아, 같은 온도에서 응고와 용해가 같이 일어난다. 그러나 저온에서 살아가는 생물의 경우 주변 환경의 온도가 낮기 때문에, 그에 적응하기 위해 어는점을 낮추는 물질을 생성한다. 알려진 것이 결빙방지단백질이다. 결빙방지단백질의 경우 얼음과 결합해 성장을 저해하기 때문에, 활성에 따라 낮춰진 어는점까지는 얼음 결정이 성장하지 않는 모습을 나타내나 그 온도보다 낮아지는 경우 급격하게 얼음이 커지는 것을 관찰할 수 있다^[51]. 대조구로 사용한 f/2배지의 경우, 얼음 결정이 크기를 유지하는 구간 없이 서서히 커지는 모습을 관찰할 수 있었다.

실험은 배양한 시간에 따른 배양액의 상층과 일정 농도의 정제 EPS 용액의 온도 이력 활성을 비교해보았다.

Porosira pseudodenticulata 보다 당의 함량이 높게 나왔던 *Synedropsis* sp. 의 0일차와 14일차 배양액의 온도 이력 효과를 비교했다. 0일차와 14일차의 배양액 상층 둘 다 약 0.03 °C 정도의 온도 이력 구간을 보였다. 또한, 대조구인 f/2 배지의 얼음 단결정 모양이 원형으로 커지는 것에 비해 배양액은 특정한 모양을 나타내는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 26).

정제한 EPS를 1 mg/ml을 만들고 이를 희석해 0.1 mg/ml, 0.01 mg/ml 의 농도에서 측정하였다. EPS를 녹인 용액의 경우 얼음 결정이 유지 되는 구간을 잡기가 힘들었고, 같은 온도에서도 진행되던 상태에 따라 응고되기도 용해되기도 하는 모습을 보였다. 따라서 조류 유래 EPS의 경우에는 온도 이력 활성이 없는 것으로 보인다.

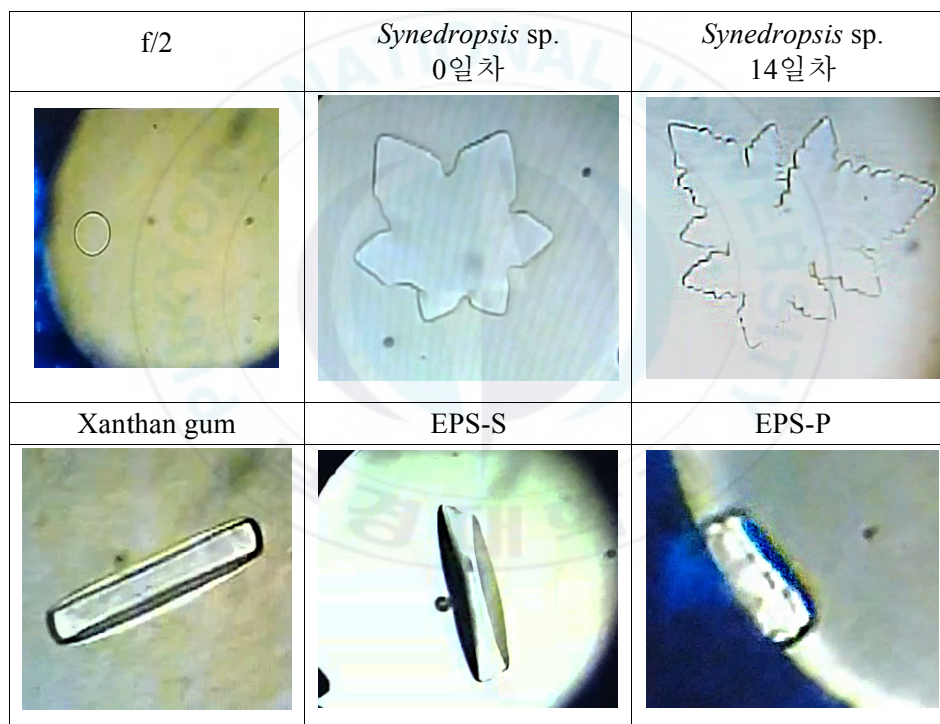
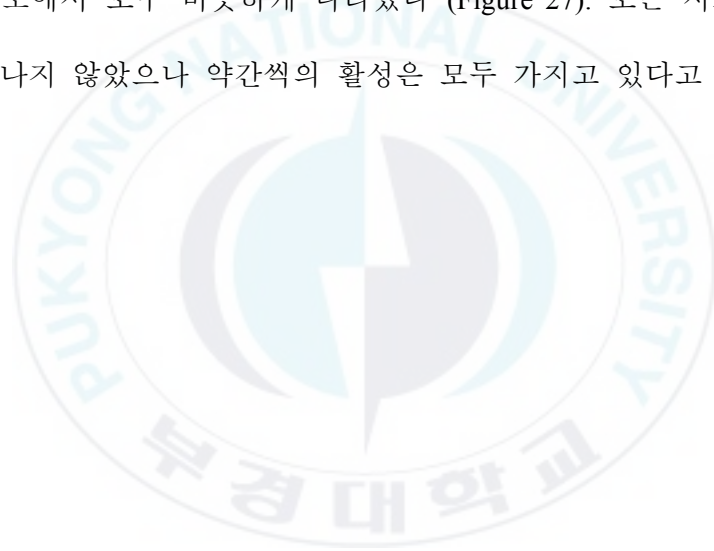


Figure 26 배양액과 EPS 시료의 얼음 단결정 모양

(2) EPS의 얼음재결정화 억제 활성

얼음재결정화 억제 활성은 물질이 얼음에 붙음으로써 얼음결정의 성장을 방해하기 때문에 나타나는 활성이다. 이 같은 활성을 가진 물질은 세포의 동결보존에 사용될 수 있다. 얼음이 생성될 때 결정의 크기가 커지면서 세포의 표면에 손상을 줌으로 세포의 소실이 많이 발생한다. 얼음재결정화 억제제를 첨가해줌으로써 결정으로 인한 세포 손상을 막을 수 있다^[52].

EPS_S 0.1 %의 경우 100 ± 4.4 %로 f/2와 똑같았고, EPS_P의 경우 평균 78 %로 3가지 농도에서 모두 비슷하게 나타났다 (Figure 27). 모든 시료에서 큰 경향성은 나타나지 않았으나 약간씩의 활성은 모두 가지고 있다고 생각된다.



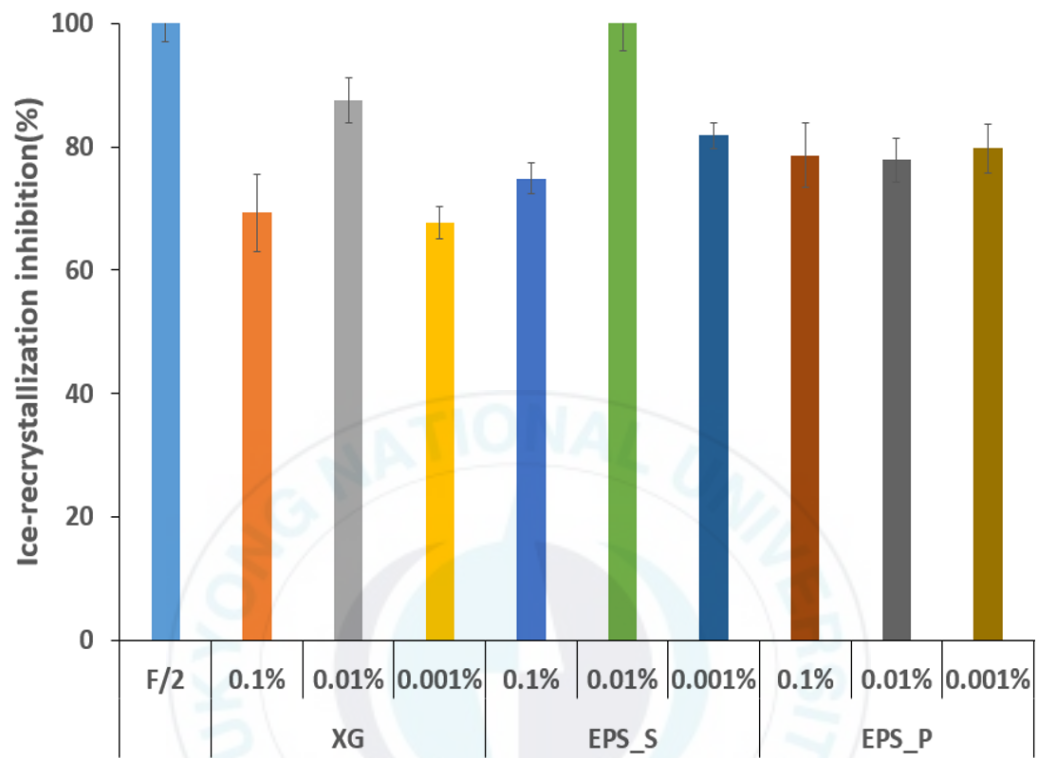


Figure 27 Xanthan gum과 EPS 시료의 얼음재결정화 억제 활성

(3) EPS의 얼음흡착 유지

EPS의 얼음흡착 유지 실험을 콜드핑거 장치를 제작하여 실험을 수행하였다 (Figure 28). 각 시료에 대해 동일한 실험을 3회 반복하여 실시하였다. 그리고 EPS의 얼음흡착 실험은 EPS 시료 확보의 문제로 EPS_S 만으로 실시하였다. 대조구로 xanthan gum을 사용하였다. 얼음 성장시 용액에 존재하는 염은 얼음에서 배제되기 때문에 염의 K_{effs} 값은 항상 1보다 작다. 본 실험에서 f/2로 실시한 대조구 실험에서도 K_{effs} 는 0.44 ± 0.01 값을 보였다 (Table 4). 이 값은 Ewert와 Deming (2011)^[38]이 제시한 0.39 ± 0.01 과 거의 일치한다. 또한 세포외 다당 용액에 들어있는 염도 f/2에 포함된 염과 같은 정도의 K_{effs} 값을 보일 것으로 예상할 수 있다. 예상한 바와 같이 수용액의 조성에 상관없이 염은 비슷한 정도로 얼음성장시 배제되었다. xanthan gum과 EPS_S는 각각 0.42 ± 0.02 와 0.44 ± 0.02 를 보였다.

Table 4 얼음흡착 전·후의 염의 농도

Solution	Salinity (‰)			k_{effs}
	Initial ^a	Ice ^b	Unfrozen ^c	
F/2	35.5 ± 0.5	15.6 ± 0.3	44.7 ± 0.6	0.44 ± 0.01
Xanthan gum	35.7 ± 0.3	15.3 ± 0.6	41.3 ± 1.2	0.42 ± 0.02
EPS_S	35.8 ± 0.3	15.7 ± 0.8	45.3 ± 0.6	0.44 ± 0.02

^aInitial은 얼음성장 전의 초기 수용액을 의미한다.

^bIce는 콜드핑거를 통해 성장한 얼음을 의미한다.

^cUnfrozen 은 얼지 않은 수용액 부분만을 의미한다.

세포의 다당이 얼음 성장시 흡착되지 않는다면 염과 유사한 Keffe 값을 보일 것이고 만약 흡착이 된다면 Keffe 값이 Keffs 보다 클 것이다. 흥미롭게도 본 실험에서 xanthan gum과 EPS_S의 Keffe는 Keffs와 거의 비슷한 각각 0.41 ± 0.01 와 0.42 ± 0.01 를 보였다 (Table 5). Xanthan gum은 *Xanthomonas campestris*가 분비하는 세포의 다당이어서 해빙과 무관하므로 얼음흡착 가능성이 거의 없는 것으로 생각되어 대조구로 사용하였고 결과 값에서 나타난 것처럼 얼음에 대한 흡착이 이루어지지 않은 것으로 판단할 수 있다. Xanthan gum에 대한 Keffs와 Keffe비, 즉 Is를 보면 거의 1의 값을 나타낸다. 이는 xanthan gum이나 염 모두 얼음 성장시 같은 정도로 배제된다는 것을 의미한다. 즉 xanthan gum은 얼음 흡착이 이루어지지 않는 것으로 볼 수 있다. Ewert와 Deming (2011)^[38]은 호냉성 박테리아인 *Colwellia psychrerythraea*의 EPS-얼음 흡착 실험을 통해 EPS가 선택적으로 얼음에 흡착된다는 의견을 제시하였다. 해빙 미세조류인 *Synedropsis* 속의 EPS도 얼음과의 흡착이 어느 정도가 있을 것으로 예상할 수 있다. 하지만 예상과 달리 EPS_S는 실제 얼음과 직접적 결합을 하지 않는 것으로 실험 결과 밝혀졌다

Table 5 얼음흡착 전·후의 당의 농도

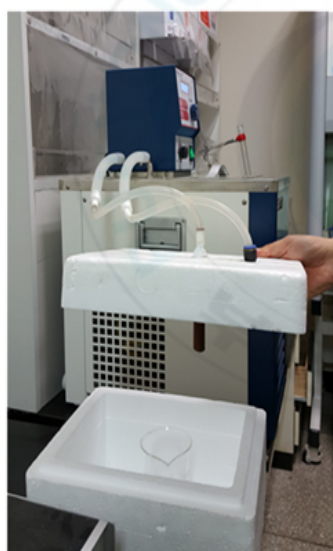
Solution	Carbohydrate content ($\mu\text{g/mL}$)			k_{effE}	I_s
	Initial ^a	Ice ^b	Unfrozen ^c		
F/2	0	0	0	-	-
Xanthan Gum	62.9 ± 0.8	25.71 ± 0.4	77.71 ± 0.9	0.41 ± 0.01	0.97 ± 0.05
EPS_S	63.3 ± 0.8	26.5 ± 0.5	76.2 ± 1.1	0.42 ± 0.01	0.95 ± 0.08

^aInitial은 얼음성장 전의 초기 수용액을 의미한다.

^bIce는 쿨드핑거를 통해 성장한 얼음을 의미한다.

^cUnfrozen은 얼지 않은 수용액 부분만을 의미한다.

(A)



(B)



Figure 28 EPS의 얼음흡착 유지 실험. (A) 쿨드핑거 장치. (B) f/2를 이용한 얼음생성.

4.3.2 EPS의 생리활성

(1) 항산화 활성 측정

라디칼 소거는 라디칼과 항산화제가 반응할 때 항산화제의 수소원자에 의해 라디칼이 환원됨으로써 일어난다. 여기에는 항산화제의 화학적인 작용과 더불어 이동성과 같은 물리적인 작용도 중요한 요소로 작용한다. 이런 이유로 인하여 중합체의 경우 고농도에서 점성이 증가하여 이동성이 떨어지므로 ascorbic acid와 같은 분자보다 반응이 천천히 일어나게 된다^[53].

DPPH의 라디칼은 517 nm에서 안정적인 흡광도를 보여주며 항산화제와 반응하면 흡광도가 감소한다. 대조구로 사용한 ascorbic acid의 DPPH 라디칼 소거능 결과를 나타내었는데, 농도가 증가할수록 라디칼 소거능이 증가하였으며, 8 µg/ml의 저농도에서 50 %이상의 라디칼 소거능을 보였다. xanthan gum과 EPS 시료의 라디칼 소거능의 경우 Xiong et al. (2013)^[37]의 측정에서는 xanthan gum은 1 mg/ml에서 50%정도의 활성을 나타내었다. 이는 본 실험의 결과 (xanthan gum의 경우 1 mg/ml에서 2 %)와 차이를 보였는데 그 이유는 Xiong et al. (2013)^[37]의 경우 산과 염기를 이용하여 xanthan gum을 oligo 형태로 분해하여 실험을 하였기 때문이라고 생각한다. 우리는 추출한 polymer 형태의 EPS와 비교하기 위하여 xanthan gum을 polymer상태에서 실험하였다. Xanthan gum과 비교하여 EPS의 경우 1 mg/ml에서 EPS_S; 8.31 %, EPS_P; 5.17 %로 보다 높은 라디칼 소

거능을 보였다 (Figure 30, 32).

H_2O_2 는 낮은 반응성을 가지고 있지만, Fe^{2+} 또는 Cu^{2+} 와 반응하여 수산화 라디칼을 형성하기도 한다^[37]. 이렇게 생성된 수산화 라디칼은 반응성이 매우 강하고, 반감기가 나노초 정도로 매우 짧다. 이런 짧은 수명에도 불구하고 거의 모든 종류의 분자들을 공격하여 필수 분자들을 없애버린다. 이를 예방하기 위한 항산화 작용으로 H_2O_2 가 있다.

대조구로 사용한 ascorbic acid의 수산화 라디칼 소거능에서 ascorbic acid는 400 $\mu g/ml$ 에서 50 % 이상의 수산화 라디칼 소거능을 보였으며 DPPH 라디칼 소거능 보다는 고농도에서 활성을 보였다 (Figure 29, 31). xanthan gum과 EPS 시료의 수산화 라디칼 소거능에서 xanthan gum은 1 mg/ml에서 15.78 %로 DPPH 라디칼 소거능보다 높은 활성을 보였다. EPS의 경우 1 mg/ml에서 EPS_S; 17.46 %, EPS_P; 27.66 % 로 xanthan gum보다 모두 높은 활성을 나타내었다. EPS_S와 EPS_P의 경우 DPPH 라디칼 소거능보다 수산화 라디칼 소거능이 더 높았다 (Figure 30, 32).

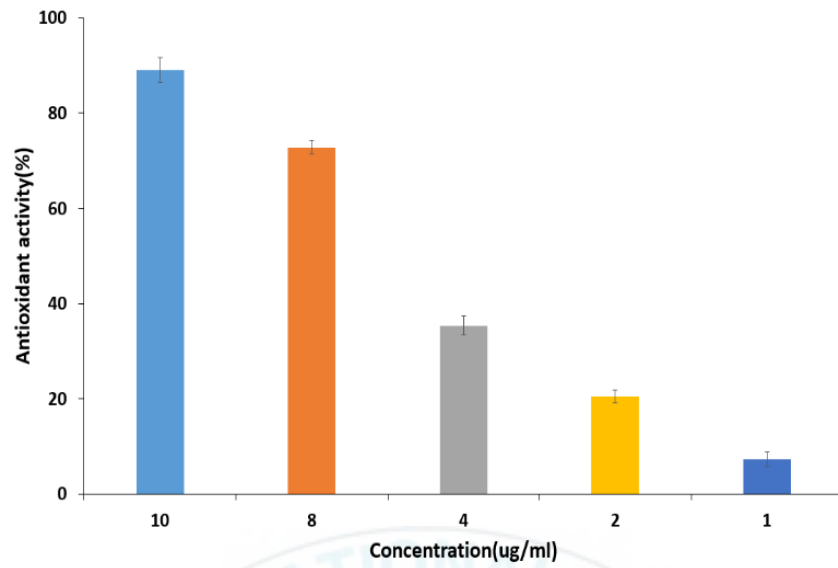


Figure 29 Ascorbic acid의 DPPH 라디칼 소거능

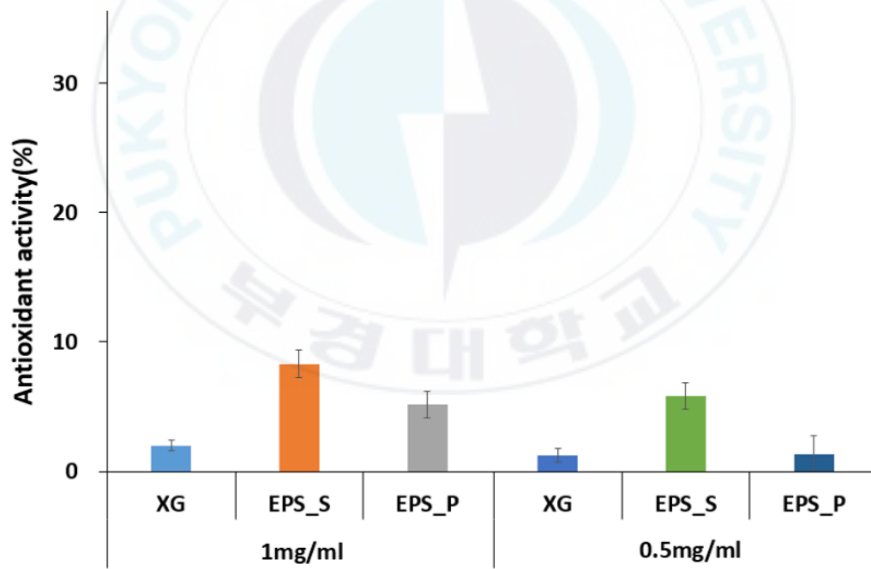


Figure 30 Xanthan gum(XG)과 EPS 시료의 DPPH 라디칼 소거능.

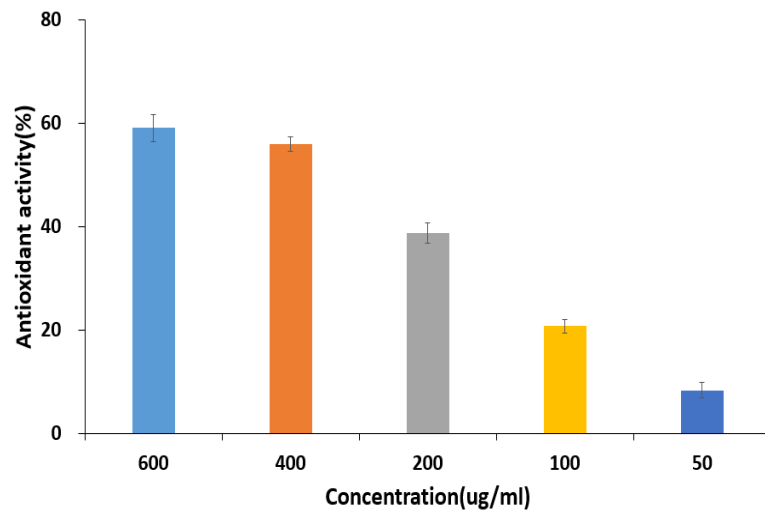


Figure 31 Ascorbic acid의 수산화 라디칼 소거능

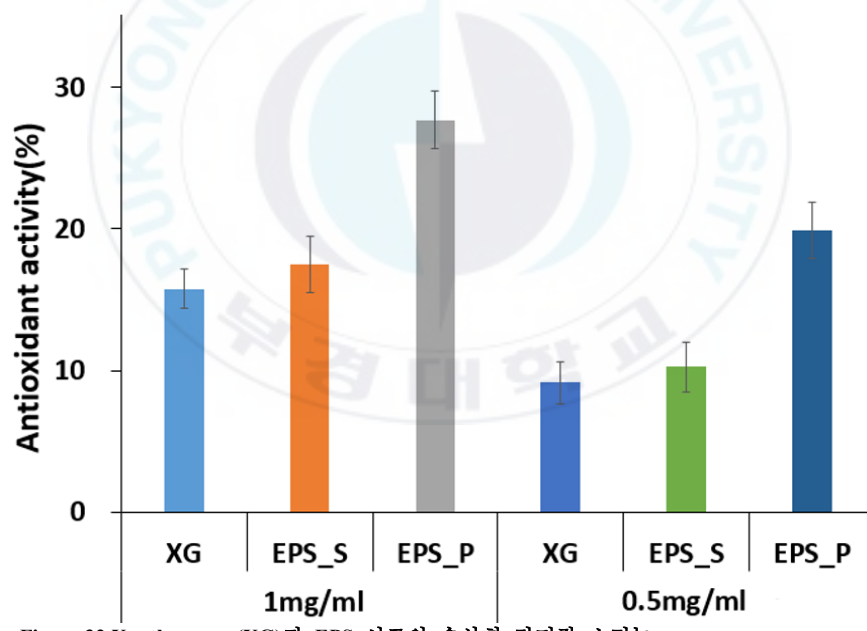


Figure 32 Xanthan gum(XG)과 EPS 시료의 수산화 라디칼 소거능

(2) 동결보호능 측정

동결보호능 측정 결과는 Figure 33 (24시간)과 Figure 34 (48시간)에 나타내었다. 생존율이 나타난 모든 시료에서는 시간에 따라 생존율이 감소하는 경향을 보였으며, EPS_S의 경우 최대 0.4 (0.1 %, 48시간)의 오차가 발생하였으나 모두 0 %가 나타났고, EPS_P의 경우 농도에 반비례하는 결과가 나타났다 (Figure 33, 34). 이 결과로 미루어 보아 EPS_S와 EPS_P의 경우 항균효과를 가진 EPS가 포함이 된 것으로 생각된다. EPS_P의 경우 항균효과를 가진 EPS가 포함이 되어 있으나 그 양이 적거나 혹은 효과가 미미한 EPS가 존재하여 0.1 %에서는 생존율이 나타나 것으로 판단된다. 하지만 EPS_S의 경우 항균성이 0.1 %에서도 생존율이 나타나지 않은 것으로 보아 항균성이 강한 EPS나 다량의 항균 EPS가 포함이 된 것으로 생각된다.

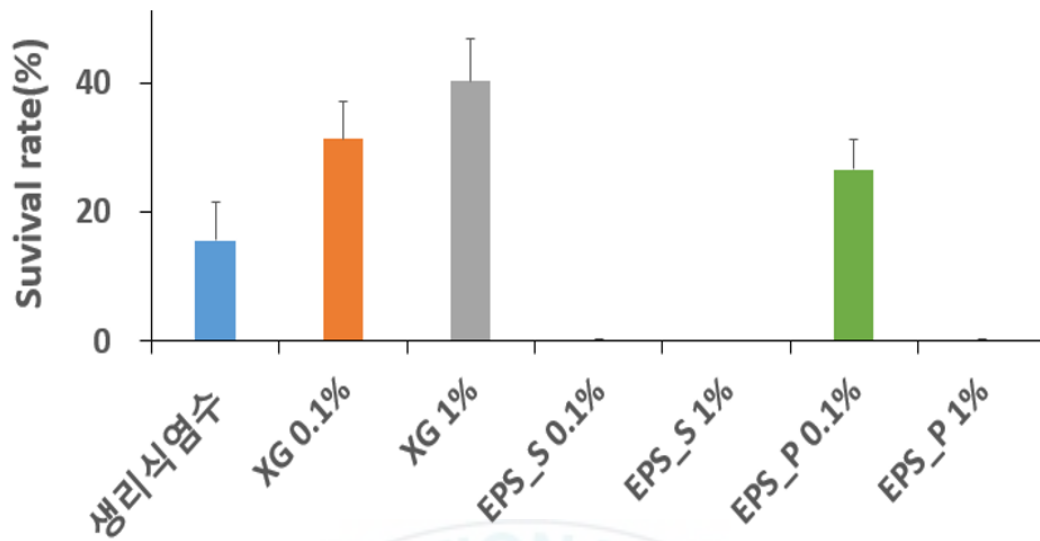


Figure 33 Xanthan gum과 EPS 시료를 첨가한 *E. coli*의 생존율 (24시간)

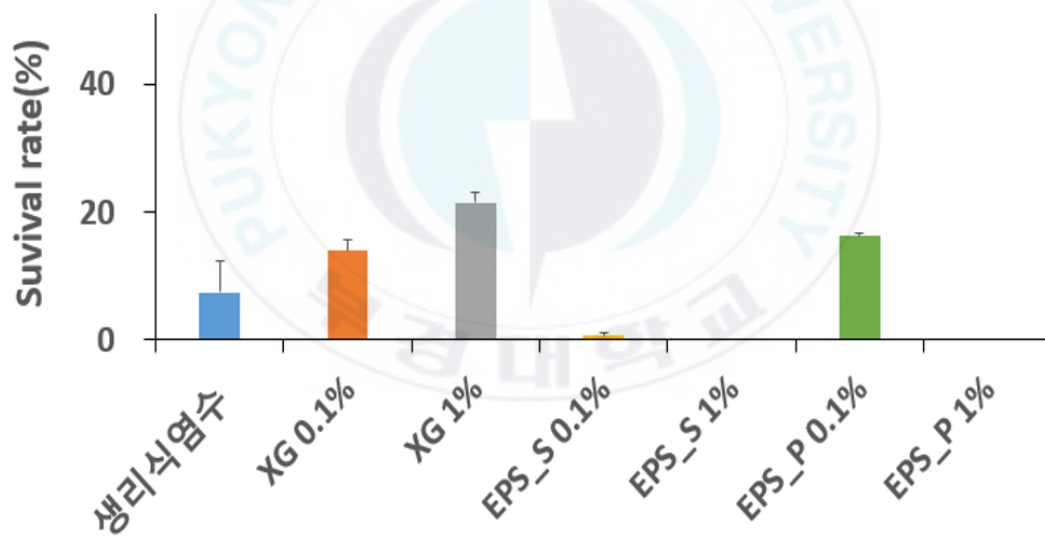


Figure 34 Xanthan gum과 EPS 시료를 첨가한 *E. coli*의 생존율 (48시간)

5. 요약

극지 해빙 미세조류는 해빙내의 생존에 필수적인 결빙방지단백질을 생산하는 것으로 알려져 있다. 하지만 그들이 생산하는 세포외 다당인 Exopolysaccharide (EPS) 에 대한 연구는 뒤쳐져 있다. 최근에 들어서야 호냉성 박테리아의 EPS 에 대한 연구를 일부 해외연구팀에서 수행하고 있다. 이에 따라 본 연구는 극지 해빙 미세조류가 생산하는 EPS 의 물리화학적 특성과 기존에 알려진 특성인 얼음결합특성과 얼음재결정화 억제 등의 특성을 자세히 규명하고자 하였다.

본 논문에서는 해빙 미세조류의 EPS 를 추출하여 구성당의 성분, 분광학적 특성, 분자량 추정, 얼음결합 특성인 온도이력활성, 얼음재결정화 억제, 얼음흡착 정도, 동결보호능에 대한 조사를 수행하였다. 그 결과 미세조류의 EPS 는 fucose, rhamnose, xylose 가 풍부하며 황산화 정도가 약 40%인 황산 푸칸임을 밝혔다. FT-IR, NMR 을 이용한 EPS 의 분광학적 특성 분석은 이 EPS 의 화학적 분석과 일치함을 보여주었다. 저자들이 조사한 바에 따르면 해빙 미세조류의 EPS 에 대한 가장 자세한 연구는 본 연구가 처음인 것으로 판단된다. 나아가 EPS 의 얼음 결합 특성 조사 결과, 우리가 익히 알고 있던 내용과는 달리 미세조류의 EPS 는 얼음재결정화 억제 활성이

거의 없으며, 얼음에 흡착하지 않는 것으로 밝혀졌다. 또한 미세조류의 EPS 는 박테리아를 냉해로부터 보호하는 것이 아니라 박테리아에 독성이 높아 항박테리아 활성이 매우 높은 것으로 나타났다.

현재까지의 연구 결과는 기존에 극지생물연구자가 생각했던 EPS 의 동결보호능, 얼음결합 특성과는 다소 배치되는 것으로 판단된다. 극지 해빙생태계에 서식하는 미세조류와 박테리아가 생산하는 EPS 는 그 구성성분이나 생리적 활성이 다소 다른 것으로 본 연구결과 판단된다. 따라서 추가연구를 통해 각 EPS 의 자세한 구조를 규명하고 각종 생리활성에 대한 조사를 수행할 경우, 해빙 EPS 의 역할 규명에 중요한 기초자료를 제공해 줄 수 있을 것으로 생각한다. 또한 많은 EPS 가 항산화, 항염증, 항바이러스, 항박테리아, 항암, 면역강화 등의 생리활성을 보이는 데, 본 연구의 해빙 EPS 예비 실험결과 항산화뿐 아니라 항박테리아 활성도 보이는 것으로 관찰되었다. 미지의 해빙 EPS 에 대한 생리활성 연구는 EPS 에 대한 건강보조제 등의 상용화로 이어질 수 있을 것으로 생각된다.

따라서 미세조류의 EPS 에 대한 추가 연구는 해빙내에서 미세조류나 박테리아가 분비하는 EPS 의 생태학적 역할에 대해 새로운 관점을 제공해 줄 것이라 생각한다.

6. 참고문헌

- [1] Gordon Elliott Fogg. The Biology of Polar Habitats. 1998 (Oxford University Press)
- [2] Deming J.W. Psychrophiles and polar regions. 2002. Curr. Opin. Microbiol. 5, 301–309.
- [3] Krembs C, Deming JW. The role of exopolymers in microbial adaptation to sea ice. In book: Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology. 2008. pp.247-264.
- [4] Fuller B.J., N. Lane, and E.E. Benson. Life in the frozen state. 2004 (CRC Press)
- [5] 강성호, 강재신, 이상훈, 김동선, and 김동엽. 전 지구 환경변화에 대한 극지 식물플랑크톤의 중요성. 2000. 환경생물 18, 1–20.
- [6] Krell A., C. Ummenhofer, G. Kattner, A. Naumov, D. Evans, G.S. Dieckmann, et al. The biology and chemistry of land fast ice in the White Sea, Russia?A comparison of winter and spring conditions. 2003. Polar Biol. 26, 707–719.
- [7] Cavalieri D.J., C.L. Parkinson, and K.Y. Vinnikov. 30-Year satellite record reveals contrasting Arctic and Antarctic decadal sea ice variability.
- [8] Hollibaugh J., C. Lovejoy, and A. Murray. Microbiology in Polar Oceans. 2007. Oceanography 20, 140–145.
- [9] Krembs C., H. Eicken, and J.W. Deming. Exopolymer alteration of physical properties of sea ice and implications for ice habitability and biogeochemistry in a warmer Arctic. 2011. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 3653–3658.
- [10] Staudt C., H. Horn, D.C. Hempel, and T.R. Neu. Volumetric measurements of bacterial cells and extracellular polymeric substance glycoconjugates in biofilms. 2004. Biotechnol. Bioeng. 88, 585–592.
- [11] Flemming H.-C., J. Wingender, T. Griebe, and C. Mayer. Physico-chemical properties of biofilms. 2000. Biofilms Recent Adv. Their Study Control 19–34.
- [12] Donlan R.M. Biofilms: Microbial life on surfaces. 2002. Emerg. Infect. Dis. 8, 881–890.

- [13] Donlan R.M., and J.W. Costerton. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. 2002. Clin. Microbiol. Rev. 15, 167–193.
- [14] Mancuso Nichols C.A., J. Guezennec, and J.P. Bowman. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the Southern Ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents: A review. 2005. Mar. Biotechnol. 7, 253–271.
- [15] Poli A., G. Anzelmo, and B. Nicolaus. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: Production, characterization and biological activities. 2010. Mar. Drugs 8, 1779–1802.
- [16] Singha T.K. Microbial Extracellular Polymeric Substances : Production , Isolation and Applications. 2012. IOSR J Pharm 2, 276–281.
- [17] Kambourova M., E. Toksoy Oner, and A. Poli. in: Industrial Biorefineries and White Biotechnology. 2015, pp. 523–554
- [18] Goncalves B.C.M., C. Baldo, and M.A.P.C. Celligoi. Levan And Levansucrase-A Mini Review. 2015. Int. J. Sci. Technol. Res. 4, 100–104.
- [19] Cheng K.C., A. Demirci, and J.M. Catchmark. Effects of plastic composite support and pH profiles on pullulan production in a biofilm reactor. 2010. Appl. Microbiol. Biotechnol. 86, 853–861.
- [20] Davidson R.L. Handbook of water-soluble gums and resins. (McGraw-Hill, c1980.)
- [21] Barrère G.C., C.E. Barber, and M.J. Daniels. Molecular cloning of genes involved in the production of the extracellular polysaccharide xanthan by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. 1986. Int. J. Biol. Macromol. 8, 372–374.
- [22] García-Ochoa F., V. Santos, J. Casas, and E. Gómez. Xanthan gum: production, recovery, and properties. 2000. Biotechnol. Adv. 18, 549–579.
- [23] Lazár D. Chlorophyll a fluorescence induction1Dedicated to Docent Jan Nauš on the occasion of his 50th birthday.1. 1999. Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg. 1412, 1–28.

- [24] Falkowski P., and Z. Kolber. Variations in Chlorophyll Fluorescence Yields in Phytoplankton in the World Oceans. 1995. Aust. J. Plant Physiol. 22, 341.
- [25] Heinz Walz GmbH. Phytoplankton Analyzer Phyto-PAM and Phyto-Win Software. 2003. Syst. Components Princ. Oper. 1–127.
- [26] Jesus B., C.R. Mendes, V. Brotas, and D.M. Paterson. Effect of sediment type on microphytobenthos vertical distribution: Modelling the productive biomass and improving ground truth measurements. 2006. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 332, 60–74.
- [27] Schreiber U. Chlorophyll fluorescence: new instruments for special applications. 1998. Photosynth. Mech. Eff. V, 4253–4258.
- [28] Guillard RRL, Ryther JH. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Grun. 1962. Can J Microbiol 8: 229–239.
- [29] De Brouwer J., and L. Stal. Does warm-water extraction of benthic diatoms yield extracellular polymeric substances or does it extract intracellular chrysolaminaran? 2004. Eur. J. Phycol. 39, 129–131.
- [30] Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers Pa, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. 1956. Anal Chem 28 (3): 350–356.
- [31] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. 1976. Anal Biochem 72 (1-2): 248–254.
- [32] Bao H, You S, Molecular characteristics of water-soluble Extracts from *Hypsizygus marmoreus* and their in vitro growth inhibition of various cancer cell lines and immunomodulatory function in RAW 264.7 cell. 2011. Biosci Biotechnol Biochem 75 (5): 891-898.
- [33] Ciucanu I, Kerek F. A Simple and Rapid Method for the Permethylation of Carbohydrates. 1984. Carbohydr Res 131 (2):209-217.
- [34] Hakomori S. 1964. A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulphonyl carbanion in dimethyl sulfoxide. J Biochem (Tokyo) 55: 205-208.

- [35] Souza BWS, Cerqueira MA, Bourbon AI, Pinheiro AC, Martins JT, Teixeira JA, Coimbra MA, Vicente AA. Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. 2012. *Food Hydrocoll* 27 (2): 287–292.
- [36] Yu G, Hu Y, Yang B, Zhao X, Wang P, Ji G, Wu J, Guan H. Extraction, isolation and structural characterization of polysaccharides from a red alga *Gloiopeltis furcata*. 2010. *J Ocean Univ China* 9 (2): 193–197.
- [37] Xiong X, Li M, Xie J, Jin Q, Xue B, Sun T. Antioxidant activity of xanthan oligosaccharides prepared by different degradation methods. 2013. *Carbohydr Polym* 92: 1166–1171.
- [38] Ewert M, Deming JW. Selective retention in saline ice of extracellular polysaccharides produced by the cold-adapted marine bacterium *Colwellia psychrerythraea* strain 34H. 2011. *Ann Glaciology* 52 (57): 111–117.
- [39] Jiang M, Ma J, Qiu LM. Cryoprotective effect of an insect antifreeze protein MpAFP 698 and its mutants from the desert beetle *Microdera punctipennis*. 2011. *Cryo Letters* 32 (5): 436–446.
- [40] Witvrouw M, De Clercq E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. 1997. *Gen Pharmacol Vasc Syst* 29 (4): 497–511.
- [41] Gügi B, Le Costaouec, Burel C, Lerouge P, Helbert W, Bardor M. Diatom-specific oligosaccharide and polysaccharide structures help to unravel biosynthetic capabilities in diatoms. 2015. *Mar Drugs* 13: 5993–6018.
- [42] Pereira L, Sousa A, Coelho H, Amado AM, Ribeiro-Claro PJA (2003) Use of FTIR, FT-Raman and ¹³C-NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. 2003. *Biomol Eng* 20 (4-6): 223–228.
- [43] Qiu X, Amarasekara A, Doctor V. Effect of oversulfation on the chemical and biological properties of fucoidan. 2006. *Carbohydr Polym* 63 (2): 224–228.
- [44] Sekkal M, Legrand P. A spectroscopic investigation of the carrageenans and agar in the 1500–100 cm⁻¹ spectral range. 1993. *Spectrochim Acta Part A Mol Spectrosc* 49 (2): 209–221.

- [45] Marx JG, Carpenter SD, Deming JW. Production of cryoprotectant extracellular polysaccharide substances (EPS) by the marine psychrophilic bacterium *Colwellia psychrerythraea* strain 34H under extreme conditions. 2009. *Can J Microbiol* 55: 63-72.
- [46] Synytsya A, Čopíková J, Matějka P, Machovič V. Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins. 2003. *Carbohydr Polym* 54 (1): 97–106.
- [47] Pereira L, Amado AM, Critchley AT, van de Velde F, Ribeiro-Claro PJA. Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). 2009. *Food Hydrocoll* 23 (7): 1903–1909.
- [48] Falshaw R, Furneaux RH, Stevenson DE. Structural analysis of carrageenans from the red alga, *Callophyllis hombroniana* Mont. Kütz (Kallymeniaceae, Rhodophyta). 2005. *Carbohydr Res* 340 (6): 1149–1158.
- [49] Chevolot L, Foucault A, Chaubet F, Kervarec N, Siquin C, Fisher AM, Boisson-Vidal C. Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity. 1999. *Carbohydr Res* 319: 154-165.
- [50] Saboural P, Chaubet F, Rouzet F, Al-Shoukr F, Azzouna RB, Bouchemal N, Picton L, Louedec L, Maire M, Rolland L, Potier G, Le Guludec D, Letourneur D, Chauvierre. Purification of a low molecular weight fucoidan for SPECT molecular imaging of myocardial infarction. 2014. *Mar Drugs* 12: 4851-4867.
- [51] Park KS, Do H, Lee JH, Park SI, Kim EJ, Kim S-J, Kang S-H, Kim HJ. Characterization of the ice-binding protein from Arctic yeast *Leucosporidium* sp. AY30. 2012. *Cryobiology* 64: 286–296.
- [52] Kim HJ, Shim HE, Lee JH, Kang Y-C, Hur YB. Ice-binding protein Derived from *Glaciozyma* Can Improve the Viability of Cryopreserved Mammalian Cells. 2015. *J Microbiol Biotechnol* 25 (12): 1989-1996.
- [53] Wu Y, Hui D, Eskin NAM, Cui SW. Water-soluble yellow mustard mucilage: A novel ingredient with potent antioxidant properties. 2016. *Int J Biol Macromol* In press