

공학박사 학위논문

*Cochlodinium polykrikoides*에서 분비되는
polysaccharide의 특성

지도교수 공 재 열

이 논문을 공재열의 논문으로 포함



2004년 2월

부경대학교 대학원

생물공학과

강 양 순

강양순의 공학박사 학위논문을 인준함

2003년 12월 22일

주 심 이학박사 류 병 호



부 심 농학박사 이 태 호



위 원 이학박사 김 학 군



위 원 이학박사 박 남 규



위 원 농학박사 공 재 열



목 차

List of Figures	IV
List of Tables	VII
Abstract	VIII
제 1 장 서론	1
제 2 장 재료 및 방법	7
제 1 절 <i>Cochlodinium polykrikoides</i> 에서 분리되는 유기물질	7
1. <i>C. polykrikoides</i> 에서 분리되는 유기물질의 기본 특성	7
1) <i>C. polykrikoides</i> 의 일반적인 특징	7
2) <i>C. polykrikoides</i> 의 분리 및 배양	7
3) 분석	10
2. Polysaccharide 생산의 최적 배양 조건	14
1) 영양염 농도의 영향	14
2) 영양물질의 결핍에 대한 영향	15
3) 광조건의 영향	15
4) 수온의 영향	16
5) 반연속 배양에 따른 polysaccharide의 생산	16
3. 적조 발생 전후의 수질 환경과 식물 플랑크톤 군집의 특성	17
1) 조사 정점	17
2) 수질 및 식물 플랑크톤 조사	17
3) 식물 플랑크톤의 군집변동	17
4) 통계 분석	19

제 2 절 Polysaccharide의 특성	20
1. Polysaccharide가 어류에 미치는 영향	20
1) 어류	20
2) 적조수 노출 실험	20
3) 혈액 분석	20
2. 이화학적 특성	21
1) 열적 특성(thermal property) 검토	21
2) 응집 활성(flocculant activity) 측정	21
3) 수분 보유력(Water-holding capacity, WHC) 측정	23
4) 용해성(solubility) 측정	23
제 3 장 결과 및 고찰	25
제 1 절 <i>Cochlodinium polykrikoides</i> 에서 분비되는 유기물질	25
1. <i>C. polykrikoides</i> 에서 분비되는 유기물질의 기본 특성	25
1) 세포성장특성	14
2) Polysaccharide와 단백질의 변화	25
3) 아미노산의 변화	31
4) 세포내 성분의 변화	33
5) 용존 유기탄소(Dissolved organic carbon, DOC)의 변화	36
6) 물질 분비의 속도	36
7) 배지 성분의 변화	42
2. Polysaccharide생산의 최적배양조건	46
1) 영양염 농도의 영향	46
2) 영양물질의 결핍에 대한 영향	60
3) 광조건의 영향	62
4) 수온의 영향	67

5) 반연속 배양에 따른 polysaccharide의 생산	69
3. 적조 발생 전후의 수질 환경과 식물 플랑크톤 군집의 특성	75
1) 수질분포 특성	75
2) 식물 플랑크톤의 현존량 및 종조성	81
3) 다양도와 균등도	82
4) 수질환경과 식물 플랑크톤의 변동	85
 제 2 절 Polysaccharide의 특성	88
1. Polysaccharide가 어류에 미치는 영향	88
1) <i>C. polykrikoides</i> 적조로 인한 어류폐사의 원인	88
2) Polysaccharide가 어류에 미치는 영향	90
2. 이화학적 특성	95
1) 열적 특성(thermal property)	95
2) 응집 활성(flocculant activity)	95
3) 수분 보수력(water-holding capacity, WHC)	98
4) 용해력(solubility)	98
 제 4 장 결 론	101
 제 5 장 감사의 글	103
 제 6 장 참고문헌	104

List of Figures

Fig. 1. Light microscopic views of <i>C. polykrikoides</i> . Intact cell consisted of six cells with length 20 - 40 μm (a), the organism attached to the lamella of a red sea bream(b).	8
Fig. 2. A map of Tongyeong, Korea, showing location of sampling stations in 2002.	18
Fig. 3. Procedures of flocculating activity measurement.	22
Fig. 4. Procedures of solubility measurement.	24
Fig. 5. Chain number of cells during cultivation of <i>C. polykrikoides</i>	26
Fig. 6. Mean diameter of <i>C. polykrikoides</i> during cultivation.	27
Fig. 7. Exopolysaccharide(EPS), intracellular polysaccharide(ICPS), and protein concentration, cell density during cultivation of <i>C. polykrikoides</i>	28
Fig. 8. Production of exopolysaccharide, intracellular polysaccharide and protein of the cell in <i>C. polykrikoides</i> culture.	30
Fig. 9. Extracellular amino acids concentrations during cultivation of <i>C. polykrikoides</i>	32
Fig. 10. Cell density, cellular carbon and nitrogen concentration during cultivation of <i>C. polykrikoides</i>	34
Fig. 11. Cellular carbon and nitrate concentration of the cell during cultivation of <i>C. polykrikoides</i>	35
Fig. 12. Dissolved organic carbon concentrations during cultivation of <i>C. polykrikoides</i>	38
Fig. 13. Nitrate concentrations during cultivation of <i>C. polykrikoides</i>	43
Fig. 14. Phosphate concentrations during cultivation of <i>C. polykrikoides</i>	44
Fig. 15. Ammonia concentrations during cultivation of <i>C. polykrikoides</i>	45

Fig. 16. Production of exopolysaccharide during cultivation of <i>C. polykrikoides</i> in media with different nitrate concentrations.	47
Fig. 17. Production of protein during cultivation of <i>C. polykrikoides</i> in media with different nitrate concentrations.	50
Fig. 18. Exopolysaccharide(EPS) and intracellular polysaccharide(ICPS) concentration during cultivation of <i>C. polykrikoides</i> at different nitrate and ammonia concentrations.	51
Fig. 19. Production of exopolysaccharide during cultivation of <i>C. polykrikoides</i> in media with different phosphate concentrations.	55
Fig. 20. Production of protein during cultivation of <i>C. polykrikoides</i> in media with different phosphate concentrations.	58
Fig. 21. EPS and IPCS concentration during cultivation of <i>C. polykrikoides</i> without N, P, Fe, Mn, or vitamin	61
Fig. 22. Production of exopolysaccharide during cultivation under conditions of different light(24 L or 14 L : 10 D).	63
Fig. 23. Production of intracellular polysaccharide during cultivation under conditions of different light(24 L or 14 L : 10 D).	64
Fig. 24. Production of protein during cultivation under conditions of different light(24 L or 14 L : 10 D).	65
Fig. 25. Concentration of EPS and protein concentration during cultivation at different temperature conditions.	68
Fig. 26. Specific growth rate(SGR) and productivity in N - limited semi - continuous culture at different dilution rates.	71
Fig. 27. Specific growth rate(SGR) and productivity in P - limited semi - continuous culture at different dilution rates.	72
Fig. 28. Exopolysaccharide production and cell density in N - limited semi - continuous culture at the dilution rate of 0.05 day ⁻¹	73

Fig. 29. Exopolysaccharide production and cell density in P - limited semi - continuous culture at the dilution rate of 0.05 day ⁻¹	74
Fig. 30. Seasonal variations of precipitation and typhoon at Tongyeong, 2002.	76
Fig. 31. Seasonal variation of <i>Cochlodinium</i> cell density during the season of red tide outbreak off the coast of Tongyeong, 2002.	77
Fig. 32. Mean values of water temperature, salinity and dissolved oxygen in the coastal waters off Tongyeong, 2002.	79
Fig. 33. Mean values of ammonia, nitrate and phosphate in the coastal waters off Tongyeong, 2002.	80
Fig. 34. Diversity index(a) and evenness index(b) of phytoplankton at the sampling stations.	84
Fig. 35. Distributions of factor loading by PCA for water quality 1st and 2nd component.	86
Fig. 36. Annual variations on maximum number of cell and the mortality of fishes by <i>C. polykrikoides</i> red tide outbreak in Korean coastal waters.	89
Fig. 37. Light microscopic views of gill filament of the red sea bream(a, b) and black rockfish(c) exposed to <i>C. polykrikoides</i>	91
Fig. 38. Changes of blood pH and PO ₂ of red sea bream by exposure at different polysaccharide concentration for 24 hrs.	92
Fig. 39. Thermogram of ESP by Differential Scanning Calorimeter(DSC).	96
Fig. 40. Flocculating activity of the polysaccharide and xanthan gum.	97
Fig. 41. Effects of various concentration on water holding capacity(WHC) of polysaccharide.	99

List of Tables

Table 1. Compositions of enrichment f/2 -Si	9
Table 2. Correlation matrix of variables in <i>C. polykrikoides</i> cultures	36
Table 3. Carbon production in <i>C. polykrikoides</i> culture for cellular and extracellular fraction	39
Table 4. Production rate of exopolysaccharide, intracellular polysaccharide, protein and amino acid per cell during cultivation of <i>C.</i> <i>polykrikoides</i> for different growth phases	41
Table 5. Specific growth rate and productivity of <i>C. polykrikoides</i> at different nitrate concentrations	48
Table 6. Specific growth rate and productivity of <i>C. polykrikoides</i> at different nitrate and ammonia concentrations	52
Table 7. Growth rate, accumulation rate of EPS and ICPS, protein concentration and the EPS/ICPS ratio of <i>C. polykrikoides</i> grown for 20 days with 50 μ M nitrate or ammonia addition	53
Table 8. Specific growth rate and productivity of <i>C. polykrikoides</i> at different phosphate concentrations	57
Table 9. Specific growth rate and productivity of <i>C. polykrikoides</i> at different light conditions	66
Table 10. Specific growth rate(SGR) and productivity of <i>C. polykrikoides</i> at different temperature conditions	70
Table 11. The dominant species of phytoplankton in the coastal waters off Tongyeong from July to September, 2002	83
Table 12. Changes in blood pH and PO ₂ of red sea bream exposed to polysaccharide solution	93
Table 13. Solubility of polysaccharide in various solvents	100

Characteristic properties of polysaccharide produced from *Cochlodinium polykrikoides*

Yang Soon Kang

Department of Biotechnology and Bioengineering, Graduate School
Pukyong National University

Abstract

Organic substances are released from phytoplankton cells during all phases of growth. Polysaccharides sometimes comprise 70 - 90 % of the total extracellular release. The type and amounts of polysaccharide excreted and the effects of nutrient limitation are often highly species - specific. Production of exopolysaccharide by phytoplankton is an important biological process.

Dinoflagellate, *Cochlodinium polykrikoides* grown in batch culture produced an exopolysaccharide. Exopolysaccharide and intracellular polysaccharide concentrations increased as *C. polykrikoides* cultures progressed from exponential phase, through stationary phase, to declining phase. In the exponential phase, the concentration of exopolysaccharide was relatively low, but in the stationary phase, it showed a rapid increase that seemed to coincide with the depletion of nitrate from the medium. The release rates of exopolysaccharide and intracellular polysaccharide were higher at the end of the stationary phase than in the exponential phase. Exopolysaccharide concentration per cell was more than two times higher during the end of stationary phase than that in exponential phase. *C. polykrikoides* produced extracellular polysaccharide at a rate of 47.04 pg cell⁻¹ day⁻¹.

Of the 20 amino acids analyzed, proline dominated in the organic matter of all cultures ranging from 48.2 to 79.9 nmol/L, and constituting the 20 - 90 % of total amino acids, and followed by histamine varying from 0.7 to 47.5 nmol/L. Leucine and cysteine were also abundant in the stationary phase.

Stimulation of exopolysaccharide accumulation is dependent on the type of nitrate depletion. This indicated that nitrogen depletion caused cessation of growth, and stimulated exopolysaccharide accumulation. Depletion of other nutrients such as Mn led to enhanced accumulation of exopolysaccharide.

The amount of exopolysaccharide was higher under a dark - treated condition(14 L : 10 D). The absolute rate of release for *C. polykrikoides* was 4 times higher in the semi-continuous culture than in the batch

culture.

The result of PCA on water quality vs phytoplankton biomass showed that the land loads of nutrient might be the main cause of the summer rally of phytoplankton biomass. The role of this phenomenon in the marine environment was of great importance due to the fact that it constitutes a significant pool of organic carbon for the food web.

Blood PO₂ declined in proportion to the increasing concentration of polysaccharide solution. Blood PO₂ of moribund fish was about 40 - 60 % of control test fish.

Flocculating activity was the highest at 1 %(w/v) and decreased at higher concentration than the optimized concentration of polysaccharide. And the results exhibited that the polysaccharide from *C. polykrikoides* had excellent flocculating activity. Water holding capacity of 1 % polysaccharide solution was at the highest activity.

제 1 장 서 론

식물 플랑크톤은 자연환경과 배양조건에서 모두 외부로 많은 유기물질들(organic compounds)을 분비한다. 이 물질에는 sugars, sugar-alcohols, polysaccharides, lipids, vitamins, growth factors, toxins, amino acids, 효소를 포함한 peptides와 단백질 등이 있으며(Hellebust, 1974), 이들은 주로 저분자의 대사산물로 광합성의 탄소환원계 또는 중간체로부터 활발한 대사과정에서 떨어져 나왔거나 아니면 조류세포가 소멸되거나 파괴되는 과정에서 생성되었다(Riebesell, 1991; Innamorati, 1995; Lancelot, 1995).

이러한 대사산물은 수중환경에서 에너지 흐름의 경로가 되어 용존 유기탄소(dissolved organic carbon)와 해양의 박테리아 생산 등의 일차생산력을 결정하는데 중요한 역할을 하며(Weisse et al., 1990), 먹이사슬을 구성한다는 관점에서 경제적으로도 매우 중요하다(Leppard, 1995). 또한 식물 플랑크톤의 물질분비는 정상적인 과정으로(Sharp, 1977) 세포 자체의 기능을 더 효과적으로 발휘할 수 있는 환경을 제공하고, 수온 또는 염분변화와 같은 외부적 환경 변화로부터 세포를 보호하는 기능을 한다(Fogg, 1983; Liu and Buskey, 2000).

분비된 유기물질의 주성분은 polysaccharide이고(Lancelot, 1984), 그 외 단백질(proteins), 핵산(nucleic acids), 지방(lipid) 등이 분비되는데(Fogg, 1983), 식물 플랑크톤이 분비하는 물질의 종류와 양은 종에 따라 다르므로 종구성은 과학적인 관점에서 매우 중요하다(Leppard, 1995). 예를 들어 *Chaetoceros affinis* (Chaetoceraceae)는 조건에 따라 전체 분비물질의 80 %에 달하는 extracellular polysaccharide와 약 1.5 %의 단백질을 생산한다(Myklestad et al., 1989). 그리고 *Phaeocystis pouchettii* (Prymnesiophyte)는 분비물질의 약 77 %가 polysaccharide로 구성된 macromolecule을 생산하고(Lancelote, 1984), *Skeletonema costatum* (Melosiraceae)은 다량의 polysaccharide 외에 7 % 아미노산을 생산하는 것으로 연구되었다(Margue et al., 1980). 이런 polysaccharide와 단백질의 비율은 식물 플랑

크톤의 기능적 특성에 영향을 미치는 중요한 요소로서(Tago and Aida, 1977), 분비된 유기물질을 구성하는 polysaccharide와 아미노산에 대한 정성적, 정량적 연구는 매우 중요하다고 생각된다.

분비된 유기물질들 중 많은 부분을 차지하는 polysaccharide는 세포벽 구성, 운동성, 부착성(sessile adhesion), 안정성(habitat stabilization), 콜로니 형성(colony formation) 등의 중요한 역할 외에 식물 플랑크톤들이 퇴적물(sediment bed)의 침식작용에 대한 저항을 증가시키는 matrix를 형성한다고 하였다((Hoagland et al., 1993; Yallop et al., 1994).

식물 플랑크톤이 분비하는 polysaccharide중 외부로 분비되는 exopolysaccharide의 양과 분비 시기도 성장조건과 종에 따라 많은 차이가 난다. 식물 플랑크톤의 물질분비는 모든 성장단계에서 이루어지고 있으며(Staats et al., 1999a), 종에 따라서 성장단계 중 정지기, 대수증식기 또는 대수증식기에서 정지기로 넘어가는 동안에 많은 양이 생산된다고 한다(Bhosle et al., 1995; Sutherland et al., 1998). 지금까지 연구된 논문에서 exopolysaccharide의 분비 양과 양상은 종에 따라 다른데 이는 식물 플랑크톤 종의 고유한 특성이다. 예를 들어 규조류인 *Ch. affine*는 *C. polykrikoides*와 동일한 정지기에 exopolysaccharide를 가장 많이 분비하지만, *Aureocumbr lagunensis* (Pelagophyceae)는 소멸기에, 규조류인 *Cylindrotheca clostrium*는 대수증식기와 정지기 사이에, *Navicular pelliculosa*(Lewin, 1995) 등 기타 종들(Waite et al., 1995)은 대수증식기 또는 대수증식기에서 정지기 사이로 가는 도중에 exopolysaccharide를 더 많이 분비하는 것으로 보고되고 있다(Myklestad, 1995; Liu and Buskey, 2000; Staats et al., 2000).

또한 polysaccharide의 생산을 조절하는 인자는 종의 특성에 따라 다르게 나타나는데, 규조류인 *Cylindrotheca closterium*의 경우 산화적 광합성(oxygenic photosynthesis)이 polysaccharide 분비의 필수 조건이므로 빛의 제한 및 다른 영양염의 영향을 받으며, *Aureocumbr lagunensis*(Pelagophyceae)는 염분의 농도

가 polysaccharide 생산에 영향을 미친다. 이러한 물질분비는 세포의 사멸 또는 환경적 스트레스의 영향은 아니라고 하였다(Staats et al., 1999b; Liu and Buskey, 2000). 현재 많은 종류의 식물 플랑크톤에서 분비되는 exopolysaccharide 생산에 미치는 영양염의 효과에 대한 연구가 진행되고 있으며, 여러 논문에서 exopolysaccharide의 생산량과 분비 시기는 세포의 성장속도와 영양염 제한의 종류에 따라서 영향을 받는다고 하였다(Myklestad and Haug, 1972; Waite et al., 1995). Extracellular polysaccharide의 생산과 축적되는 양은 종에 따라 많은 차이가 있는데 특히 *Ch. spp.*는 *Thalassiosira*와 *Skeletonema*보다 50배 이상의 많은 extracellular polysaccharide를 생산하는 것으로 보고되고 있다(Myklestad, 1977).

우리나라에 해마다 커다란 피해를 입히고 있는 *C. polykrikoides*는 1982년 최초로 발생한 이래 1995년 전남 고흥연안에서 강원도 강릉까지 광범위한 해역에 대규모 적조를 일으킨 이후 유사한 시기에 반복 발생되고 있다(Kim et al., 2001). 적조생물인 *C. polykrikoides*의 생리, 생태적 성장특성에 대해서는 많은 연구가 이루어졌는데 실내 배양에서는 수온 16-31℃에서 성장이 가능하였고, 특히 25℃에서 일간 성장을 및 최대밀도가 가장 높았다. 염분은 15-40에서 성장 가능하였으며 염분이 높아질수록 성장률도 함께 증가하였다. 그리고 pH는 6.0-7.5까지 성장이 가능하며 pH가 높아질수록 일간 성장이 점차 증가하였다. 일간 성장을 및 최대밀도는 염분이 40, pH 7.5에서 가장 높았다. 광량은 100-140 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 에서 최대로 증식하였고, vitamin B₁₂ 및 유기물질이 많이 함유된 토양 추출물에 의해 증식이 촉진되었다(Shim, 1998; Kim et al. 2000a, b).

*C. polykrikoides*는 질산질소 40.5 μM , 암모니아질소 40.5 μM , 인산인 4.05 μM 에서 최대성장률을 보여 각각 40, 50, 5 μM 의 영양요구량을 보였다. 질산질소와 인산인은 농도가 높아질수록 최대밀도에 도달하는데 걸리는 시간이 길어졌다. 그리고 암모니아는 121.5 μM 농도 이상에서 세포의 성장을 저해시켰다. 그리고 반포화 상수(Ks)는 질산질소, 암모니아질소, 인산인에 대하여 각각 14.94, 14.29,

1.49 μM 로 다른 적조 발생 종들 보다 비교적 높게 나타났다. 그리고 질소원으로는 질산질소보다 암모니아질소가 성장할 때 보다 유효한 영양염으로 선택되어 소비되었으며 암모니아질소가 거의 대부분 흡수된 후에 남아있는 질산질소의 흡수로 성장이 이루어지는 것을 알 수 있었다.

*C. polykrikoides*는 명기에서는 광합성으로 산소생성이 활발하여 용존산소가 7.08 mg/L로 높으나 암기에서는 용존산소 농도가 2.55 mg/L로 급격히 감소되었으며, 광량이 낮을수록 산소 소비율이 증가하여 암소에서는 명기보다 8배나 높은 산소 소비율을 보였다(Shim, 1998).

또한 수년간 적조생물이 어류를 죽이는 어독성 메카니즘(ichthyotoxic mechanism)에 대한 연구가 세계 여러 나라에서 계속되고 있는데, 일본의 경우 PSP(palalytic shellfish poison), 중국의 경우 PSP, NSP(neurotoxic shellfish poison), 그리고 DSP(diarrhetic shellfish poison), 캐나다에서는 밝혀지지 않은 독성물질을 내는 등 *Cochlodinium*이 어독성 물질(ichthyotoxic substances)을 생산한다고 하였으나(Hirayama and Abe, 1979; Onoue et al., 1985; Du Qi et al., 1988; Whyte et al., 2001), 한국에서는 *C. polykrikoides*에서 분비되는 물질의 유독성 존재여부를 확인한 결과 어떠한 독성이 나타나지 않았고(Lee, 1996; Kim et al., 2001), 또한 수용성 성분에서는 어류에 경련, 마비 및 아치사 현상이 있었지만 약 10시간 후 정상상태를 회복하였고, 지용성 성분에는 아무런 반응을 보이지 않아 적조생물에 유독한 물질은 없는 것으로 나타났다. 그리고 적조생물이 3,000 cells/mL 이상의 농도에서 어류가 치사하였으며 참돔>돌돔>쥐치>우럭>볼락>넙치 순으로 활동성 어류가 정착성 어류에 비하여 적조에 민감하게 반응하였다(NFRDI, 2002).

우리나라에서 적조를 일으키는 식물 플랑크톤 중 *C. polykrikoides*은 비교적 많은 양의 polysaccharide를 분비하는데 다른 적조생물인 *Alexandrium tamarense*, *Prorocentrum minimum*, *P. triestium* 등이 각각 7.25, 2.30, 4.60 $\mu\text{g}/10^4\text{cells}$ 인 것에 비해 36.70 $\mu\text{g}/10^4\text{cells}$ 의 농도로 5 - 10배 이상의 poly-

saccharide를 분비하는 것으로 알려져 있다. 당의 조성은 Fucose, Galactamine, Glucoamine, Galactose, Glucose, 그리고 Mannose의 농도가 각각 0.23, 0.06, 0.06, 1.16, 3.63, 1.28 nmol/mg 존재하는 것으로 조사되었는데 이는 다른 적조생물인 *P. micans*가 각각 0.41, 0.05, 0.05, 0.28, 0.62, 0.17 nmol/mg 존재하는 것에 비교하면 galactose, glucose, mannose가 더 많이 생산됨을 알 수 있다 (NFRDI, 2002).

*C. polykrikoides*에 의한 어류폐사의 원인으로는 *Cochlodinium* 적조생물자체가 생산한 다량의 점액물질이 어류의 아가미에 부착하여 용존 산소공급을 저해시킴으로서 어류가 호흡곤란을 받아 질식사하게 되고(Lee, 1996), 또한 아가미에 세포를 자극하여 점액성분을 과다 분비시켜 산소공급을 물리적으로 방해시키는 것으로 여겨진다(Kim et al., 1999, 2000). 그리고 적조생물이 생산하는 유해활성산소가 어류의 아가미 세포에 산화적 피해를 야기시켜 세포의 기능을 저하시키고 또한 carbonic anhydrase와 Na^+/K^+ -ATPase와 같은 ion transporting enzyme의 불활성화로 혈액 내 산소분압이 감소되므로 어류가 호흡곤란을 받게 되는 등 여러 가지 복합적인 원인에 의해 어류폐사가 일어난다고 알려져 있다 (Kim et al., 2000). 따라서 *C. polykrikoides*가 생산하는 점액질 성분 혹은 적조세포 자체가 어류의 아가미에 부착하여 물로부터 산소공급을 저해시킴으로서 어류가 호흡곤란으로 질식되는 것으로 여겨지고 있어 점액물질은 어류를 폐사시키는 직·간접적인 원인이 된다(Lee, 1996; Kim et al., 1999).

최근 많은 과학자들의 dinoflagellate가 생산하는 생리활성물질(bioactive substance)에 대한 연구를 많이 행하고 있다(Onoue and Nozawa, 1989a, b; Hasui et al., 1995). 그리고 적조생물체를 대상으로 신기능성 물질을 탐색하고 있으며 그 중 *Cochlodinium* 적조생물 자체는 항산화력이 크고, 분비하는 다당류는 항혈액 응고성을 보였으며, mycosporin-like amino acid는 항산화력 및 기능성 UV-A 차단력이 뛰어났다. 또한 분비된 물질의 지용성 성분 중에는 EPA(eicosapentaenoic acid), DHA(docosahexaenoic acid)가 동정되어 고도 불

포화지방산 자원으로 중요하다(Lee, 1996). 또한 *C. polykrikoides*이 생산한 sulfated polysaccharide가 human immunodeficiency virus에 대해 항바이러스 활성(antiviral activity)를 낸다는 연구결과를 발표하였다(Hasui et al., 1995). 또한 *C. polykrikoides*로 부터 분비된 polysaccharide는 여러 종류의 바이러스에 대해 세포병변효과(cytopathic effect)와 항바이러스 활성(antiviral activity) 및 항혈액 응고성을 나타내는 것으로 보고되고 있다(Schaeffer and Krylov, 2000).

따라서 *C. polykrikoides*의 유기물질 분비 특성을 파악하는 것은 적조발생시 해양생태계의 생산 특성을 알고, 어류폐사의 원인을 밝히는 기초적인 자료로 매우 중요하며, 분비된 polysaccharide는 새로운 신물질로 사용될 수 있다. 그러나 *C. polykrikoides* 적조생물자체에 대한 연구는 많이 보고되었으나 분비하는 물질에 대한 연구는 거의 없다. 따라서 *C. polykrikoides*에서 분비되는 유기물질의 특성과 polysaccharide 생산 조절의 인자를 연구하는 것은 여러 가지 면에서 중요하다.

본 논문은 *C. polykrikoides* 적조발생시 어류피해를 최소화하고, 분비된 물질을 활용하기 위한 기초 자료로써 *C. polykrikoides*에서 분비되는 유기물질의 기본적 특성과 polysaccharide 생산의 최적 분비 조건을 조사하였고, 또한 polysaccharide가 어류폐사에 미치는 영향과 그 이화학적 특성에 대해서도 조사하였다.

제 2 장 재료 및 방법

제 1 절 *Cochlodinium polykrikoides*에서 분리되는 유기물질

1. *C. polykrikoides*에서 분리되는 유기물질의 기본 특성

1) *C. polykrikoides*의 일반적인 특징

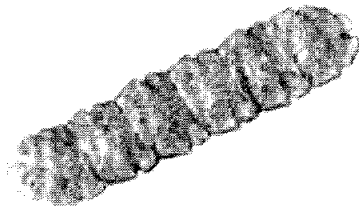
*C. polykrikoides*는 와편모조류에 속하며 세포의 크기는 30 - 40 μm , 폭 20 - 30 μm 내외이고 세포가 단독 또는 군체를 형성하고 군체는 보통 8개체 이하로 알려져 있다(Fig. 1). 이 종은 종구는 매우 좁고 얇으며 황구 출발점에서 시작되어 길이는 황구의 출발점과 종점의 0.8 - 0.9배이다. 핵은 앞쪽에 있으며 색소체는 황갈색으로 타원형이다(Fukuyo, 1987).

Margalef(1961)에 의해 푸에르토리코 남쪽연안에서 발견 명명된 이래 미국 대서양연안, 일본 중부-서일본 등지에서 자주 적조를 일으키고 있으며 일본의 Harima nada만과 일본 구주 Yatsushiro만에서 1983년 대규모 적조를 일으켜 양식방어와 돔의 대량피해를 일으켰다(Yuki and Yashimatsu, 1987; Sundstrom et al., 1990). 한국에서는 1982년부터 낙동강 하구에서 발생하기 시작하여 1995년 이후 해마다 주로 남해안을 중심으로 어류양식장에 많은 피해를 주고 있다.

2) *C. polykrikoides*의 분리 및 배양

2000년 10월 통영연안에서 *C. polykrikoides* 적조가 발생되었을 당시 해수를 채취하였다. 이 시료를 입체현미경하에서 capillary pipette으로 4개 세포군체를 분리하여 24 multi-cell well에 옮긴 후 f/2-Si 배지(Stein, 1973)에서 계대 배양하였으며, f/2-Si 배지조성은 Table 1과 같다. 배양조건은 온도 22℃, 광량 $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 광주기 14 L : 10 D로 실험하였다.

(a)



(b)

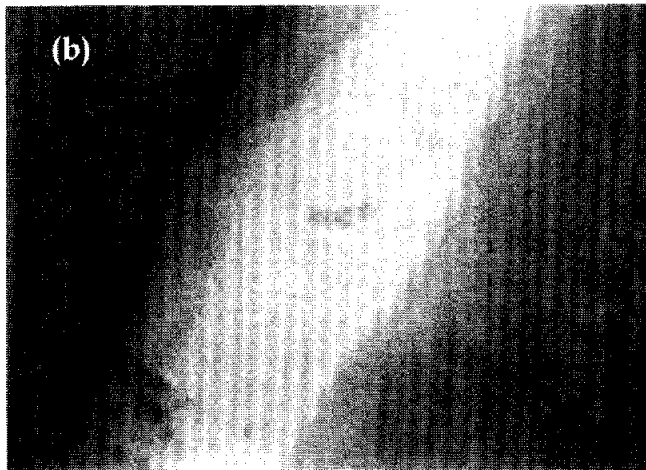


Fig. 1. Light microscopic views of *C. polykrikoides*. Intact cell consisted of six cells with length 20 - 40 μm (a), the organism attached to the lamella of a red sea bream (b).

Table 1. Compositions of enrichment f/2 - Si

Major nutrients	NaNO_3	75 mg
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5 mg
Trace metals	$\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA}$	4.36 mg
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3.15 mg
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.18 mg
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.01 mg
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.01 mg
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.022 mg
Vitamins	B_{12}	0.5 μg
	Biotin	0.5 μg
	Thiamin $\cdot \text{HCl}$	0.1 mg
Sterilized sea water		1 ℓ

실험에 사용된 모든 실험기구는 가압멸균기로 멸균(121℃, 15분)하여 무균 처리하였으며, 배지제조용 해수는 통영연안의 해수를 membrane filter로 여과한 후 가압 멸균하여 실온에서 방냉시켜 사용하였다.

3) 분석

(1) 세포의 계수

*C. polykrikoides*의 증식율을 관찰하기 위하여 시료 0.1 mL를 취하여 Sedgewick Rafter counting chamber를 이용하여 광학현미경(Olympus, BH-2)하에서 계수하였다.

배양시간에 따른 물질생산을 조사하기 위하여 대수증식기(exponential phase)에 있는 *C. polykrikoides* 시수 100 mL를 2 L의 f/2-Si배지에 접종하여 3일간 증식시킨 후 250 mL용량의 삼각플라스크에 시수 200 mL를 넣어 배양하였다.

그리고 접종시 환경변화로 인하여 성장 유도기가 길어지는 것을 최소화하기 위해 실험에 사용한 배양주들은 접종하기 전 그 환경에서 최소한 2세대 정도 적응시킨 후 사용하였다. 실험오차를 줄이기 위해 각 계열별로 2회 이상 반복 실험하였다.

배양 시 *C. polykrikoides*의 일간 증식율(Specific growth rate)은 증식속도가 대수증식기에 도달했을 때의 세포밀도를 계산하여 Stein(1973) 식으로 계산하였다.

$$SGR(day^{-1}) = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t_n - t_0} \times \frac{1}{\ln 2}$$

SGR : 일간 성장율(Specific growth rate)

N_t : 접종 후 t일 때의 세포밀도(cells/mL)

N_{t_0} : 접종 후 t_0 일 때의 세포밀도(cells/mL)

t_n, t_0 : 접종 후 배양일수

(2) 수질의 일반성분

배양중의 영양염 농도의 변화를 조사하기 위하여 sampling한 후 GF/C filter로 여과하여 수질분석을 하였다(Strickland and Parsons, 1972).

가. 암모니아-질소($\text{NH}_4\text{-N}$)

시수에 phenol-alcohol-용액, sodium nitroprousside, sodium citrate, sodium hypochlorite의 혼합시약으로 발색시킨 후 spectrophotometer로 측정하여 농도는 μM 로 계산하였다.

나. 질산-질소($\text{NO}_3\text{-N}$)

시수를 Cu-Cd column을 통과시켜 아질산질소로 환원 후 sulfanilamide와 NED(N-(1-Naphthyl-ethylenediaminedi-hydrochloride로 발색시킨후 Spectrophotometer로 측정하여 농도는 μM 로 계산하였다.

다. 인산-인($\text{PO}_4\text{-P}$)

시수를 ammonium molybdate, 황산, ascorbic acid 및 potassium antimonyltartarate의 혼합시약으로 발색시킨 후 농도는 μM 로 계산하였다.

(3) Polysaccharide의 정량

Exopolysaccharide(EPS)의 양은 sample을 원심분리하여 상등액을 hexose와 pentose를 포함하는 phenol/ H_2SO_4 법으로 분석하였으며(Dubois et al., 1956), 표준물질로 glucose를 사용하였다. Intracellular polysaccharide(ICPS)는 원심분리 후 pellet에 4 mL 0.05 M H_2SO_4 을 넣어 2시간 방치 후 계속 30분마다 흔들어 다시 2시간 후 12,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 상등액을 phenol/ H_2SO_4 법으로 분석하였다(Smith and Underwood, 2000).

(4) 아미노산 정량

유리아미노산은 시료를 PICO - tag방법을 이용하였으며 hydrolysis 및 PITC labelling 하여 기초과학지원연구소의 HPLC(Waters 510)를 이용하여 분석하였다. Column과 detector는 각각 Waters Pico - tag column(3.9×300 mm, $4 \mu\text{m}$)과 Waters 996 photodiode array detectors(PDA), 254 nm를 사용하였고, 분석용매는 140 mM sodium acetate와 60 % acetonitril을 flow rate 1.0 min으로 사용하였다.

(5) 단백질(Protein)의 정량

Extracellular protein은 sample을 원심분리한 후 상등액을 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 Bradford법으로 분석하였다(Herbert et al., 1971).

(6) 세포내 탄소와 질소(Cellular carbon, nitrogen)의 정량

Sample을 취하여 450°C 에서 2시간동안 강열하여 냉각한 GF/F filter(Φ 25 mm, 공경 $0.7 \mu\text{m}$)에서 50 mL를 여과하여 입자물질 중의 무기탄소를 제거하기 위해 진한 염산으로 약 30초 동안 훈증(acid fuming)하고, 50°C 에서 24시간 건조시킨 후 CHN analyzer(Perkin elmer, 2400)로 분석하였다(Sharp, 1974; Telex and Marshall, 1974).

(7) 용존 유기탄소(Dissolved organic carbon, DOC)의 정량

위에서 GF/F filter로 여과한 여과액을 분석 시까지 냉동보관한 후 DOC analyzer(Dormann)로 분석하였다.

(8) Polysaccharide의 추출

Exopolysaccharide를 분리하기 위하여 세포배양액을 12,000 rpm, 10°C 에서

15분간 원심분리하였고, pellet에 증류수를 첨가하여 다시 추출하여 12,000 rpm, 10 ℃에서 15분간 다시 원심분리하였다(Staats et al., 1999a). 상등액을 80 % (v/v) cold acetone (-20 ℃)으로 침전시켜 exopolysaccharide는 분리하였고, 이를 증류수 : acetone(1 : 1)용액에서 2번 세척하였다. 침전된 exopolysaccharide는 원심분리한 후 증류수에 녹여 dialysis하여 동결 건조하였다. 전체 exopolysaccharide양은 배지와 물속으로 추출된 양의 합으로 취하였다.

2. Polysaccharide 생산의 최적배양조건

1) 영양염 농도의 영향

(1) 질소원의 영향

가. 질산염 농도에 따른 변화

기본적으로 f/2-Si배지에서는 질소와 인이 고농도로 존재하기 때문에 f/20 배지에서 최소한 2세대이상 계대배양을 실시한 후 질소, 인이 제한된 최소배지에 1주일정도 처리하여 실험을 실시하였다. 최소배지에는 세포가 성장하기 위한 최소농도로 질소원으로는 NaNO_3 를 10 μM 를 첨가하였고 나머지는 f/2-Si 배지의 기본조성대로 첨가하였다. 초기농도는 200 cells/mL로 접종하였다.

영양염 농도에 대한 물질생산을 비교하기 위해 우선 질소원으로는 NaNO_3 를 0, 25, 50, 100, 200, 400 μM 농도로 각각 첨가하였고, 인원으로 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 f/2-Si배지의 기본조성대로 첨가하였다(P : 36.3 μM)

배양시 *C. polykrikoides*가 생산하는 polysaccharide의 생산속도 및 수율은 생산속도가 최대에 도달했을 때의 물질농도를 계산하여 물질생산속도를 구하였다(Stanbury and Whitaker, 1984).

$$q_p = Y_{p/x} \mu$$

q_p : 물질생산속도(specific productivity, $\text{ng} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$)

$Y_{p/x}$: 수율(yield of product)

μ : 일간성장률(specific growth rate, day^{-1})

나. 질산염과 암모니아 농도에 따른 변화

질소원의 종류에 따른 물질생산을 비교하기 위하여 NaH_2PO_4 와 미량금속 및 비타민은 f/2-Si 배지의 기본조성 그대로 하여 질소원으로 NaNO_3 , NH_4Cl 을 사용하였다. 두 질소원을 각각 0, 25, 50, 75 μM 로 농도별로 첨가하였고, 5일마다 배양액을 sampling하여 membrane filter로 여과하였고, 그 여과액을 즉시 분석하였다. 즉시 실험하지 않은 경우는 냉동 보관하였다.

(2) 인산염의 영향

질소원의 실험과 동일하게 하였으며 접종 시 최소배지에는 세포가 성장하기 위한 최소농도로써 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 1 μM 로 첨가하였고 나머지는 f/2-Si 배지의 기본조성대로 첨가하여 일주일동안 pre-incubation 시킨 후 초기농도 200 cells/mL로 접종하였다.

인산염으로는 무기인인 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 0, 1, 2.5, 5, 10 μM 농도로 각각 첨가하였다. 인산염의 농도에 대한 제한 실험에는 NaNO_3 를 f/2-Si배지의 기본조성대로 첨가하였다(N : 883 μM).

2) 영양물질의 결핍에 대한 영향

Polysaccharide 생산에 미치는 영양물질의 결핍에 대한 영향을 알아보기 위하여 f/20배지에서 2대이상 계대한 후 각각 N, P, Fe, Mn, EDTA, Vitamin이 결핍된 배지에서 배양하였다. 이를 5일마다 sampling하여 세포농도와 polysaccharide 생산량을 비교하였다.

3) 광조건의 영향

광조건에 따른 polysaccharide 생산량을 조사하기 위하여 대수증식기에 있는 *C. polykrikoides*을 f/2-Si배지에 접종하여 조건별로 배양하였다. 광조건을 24 L과 14 L:10 D로 두어 각 조건에서 5일마다 sampling하여 세포농도, polysaccharide의 생산량을 각각 비교하였다.

4) 수온의 영향

수온의 변화에 따른 polysaccharide 생산량을 비교하기 위해서 대수증식기의 세포를 f/2-Si배지에 넣어 20-26 °C로 각 수온에서 정지한 후 세포농도, polysaccharide의 생산량을 비교하였다.

5) 반연속 배양에 따른 polysaccharide의 생산

반연속 배양을 위해 N-limited medium은 NaNO_3 , NaH_2PO_4 각각 10 μM , P-limited medium은 NaNO_3 , NaH_2PO_4 각각 100 μM , 1 μM 로 만들어 일주일동안 pre-incubation 시킨 후 초기농도 200 cells/mL로 접종하였다. 반연속배양은 4일 간격으로 세포현탁액(cell suspension)을 제거하고 dilution rates가 0.0125 - 0.0750 day^{-1} 가 되도록 fresh medium을 첨가하였다. 세포현탁액에서 세포밀도를 현미경으로 계수하고, 여과한 후 exopolysaccharide의 양을 측정하였다.

3. 적조 발생 전후의 수질 환경과 식물 플랑크톤 군집의 특성

1) 조사정점

통영주변 해역의 수질 환경과 식물 플랑크톤 군집특성을 알기 위하여 2002년 *C. polykrikoides* 적조 발생 전후를 집중하여 7월부터 9월까지 6개 조사정점을 설정하여 10번의 현장조사를 실시하였다(Fig. 2).

2) 수질 및 식물 플랑크톤 조사

수온, 염분 그리고 용존산소를 Water analyzer (YSI 6600)를 이용하여 현장에서 측정하였고, 영양염(암모니아질소, 아질산질소, 질산질소, 인산인)은 현장에서 해수를 여과하여 냉장 보관하여 실험실로 운반한 뒤 즉시 분석하였다(Strickland and Parsons, 1972). 식물 플랑크톤은 현장에서 *C. polykrikoides*의 개체수를 확인하고, 표층해수 1 L를 채수하여 Lugol용액으로 고정하였다. 고정된 해수는 실험실에서 침전시켜 최종농도가 20 mL가 되도록 농축하였다. 검경은 농축된 시료 0.1 mL를 취하여 Sedgewick Rafter counting chamber를 이용하여 광학현미경(Olympus, BH-2)하에서 종의 동정과 단위체적당의 출현세포수를 산출하였다. 출현한 식물 플랑크톤 종의 동정은 Yamaji(1984)와 Chihara and Murano(1997)등을 참고하였다.

3) 식물 플랑크톤의 군집변동

식물 플랑크톤의 우점종은 총 출현 개체수에 순위를 정하고, 총 개체수 중 한 정점 이상에서 20 % 이상 출현한 종으로 하였다. 군집특성을 알기위해 종 다양성(diversity : H')과 균등도(evenness : J)는 각각 Shannon-Wiener index (Shannon and Wiener, 1963), Pielou index (Pielou, 1966)로 계산하였고 이때 정점은 1-4정점만을 계산하였다.

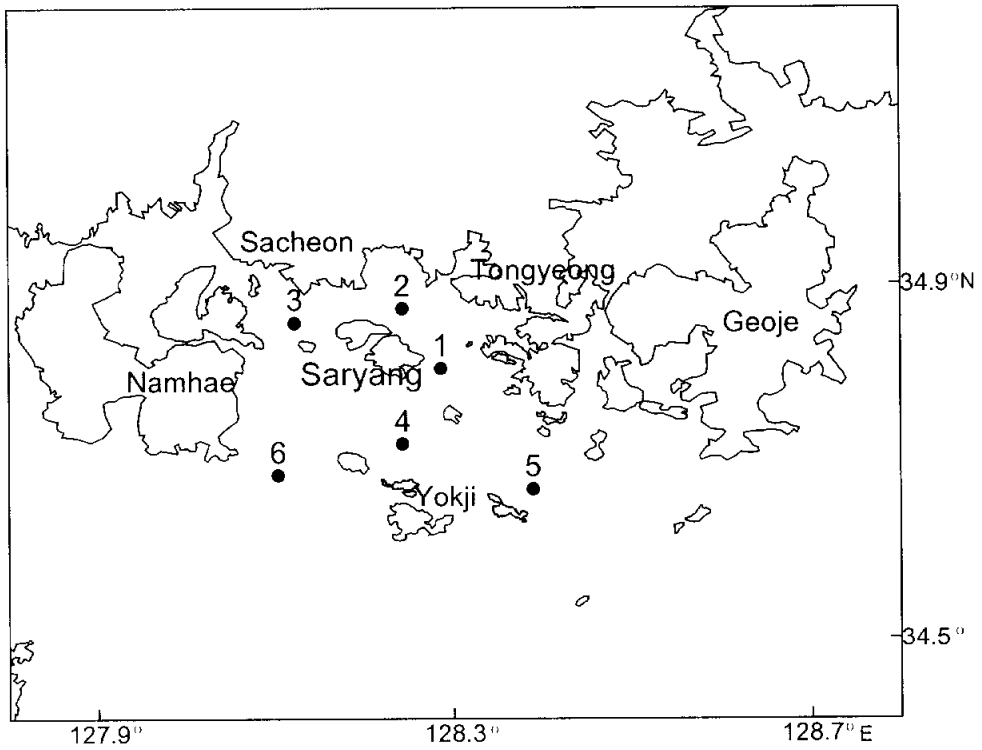


Fig. 2. A map of Tongyeong, Korea, showing location of sampling stations in 2002.

$$H' = \frac{n \log n - \sum_{i=1}^k f_i \log f_i}{n}$$

k : category 수

n : 표본의 크기

f_i : category i에서 관찰되는 수

$$J = \frac{H'}{H'_{\max}}, \quad H'_{\max} = \log k$$

4) 통계 분석

식물 플랑크톤의 종조성을 군집별, 시기별, 정점별로 파악하기 위해 우점종으로 주성분분석(Principal component analysis)을 실시하였다. 정점별로 유사성과 동질적인 집단을 분류하기 위하여 수질요인과 식물 플랑크톤 개체수의 집괴분석(Cluster analysis)을 실시하였다. 집괴분석은 Hierarchial cluster analysis로 제곱 유클리디언 거리지수(Squares Euclidean Distances)를 이용하였다. 그리고 식물 플랑크톤의 분포에 영향을 미치는 환경요인을 파악하기 위하여 수온, 염분, 투명도, 암모니아질소, 질산질소, 인산인, 식물 플랑크톤 개체수 등 7개 요인들의 상관 계수행렬(Correlation matrix)를 이용하여 주성분분석(Principal Component Analysis)을 실시하였다. 모든 통계분석은 SPSS 7.5 (SPSS Co.) 프로그램을 이용하여 실시하였다.

제 2 절 Polysaccharide의 특성

1. Polysaccharide가 어류에 미치는 영향

1) 어류

참돔(무게 평균 50 g, 길이 평균 12 cm)을 구입하여 연속적인 해수 공급 하에서 실험전에 1 - 2일간 적응시킨 후 실험하였다.

2) 적조수 노출 실험

2002년 경남 통영 근해에 *Cochlodinium* 적조가 발생했을 때 20,000 cells/mL 이상의 세포를 농축하여 원심분리한 후 상등액을 실험에 사용하였다. 적조수 상등액에 어류를 넣어 분비하는 물질이 어류에 미치는 영향에 대해 실험하였으며 자연해수에 어류를 넣어 control로 비교하였다. 적조수 상등액을 여과해수로 희석하여 phenol/H₂SO₄법으로 측정한 후 농도별로 실험하였다. 실험동안 수온은 23 - 24 ℃, 그리고 산소는 5 ppm으로 조절하였다.

3) 혈액 분석

24시간 동안 적조수 상등액에 넣어둔 어류의 혈액을 헤파린 처리된 syringe를 이용하여 채취하였다. 이를 즉시 Stat Profile ultra 5 analyzer(NOVA Biochemical Co.)를 이용하여 혈액내의 pH, PO₂를 측정하였다.

2. 이화학적 특성

1) 열적 특성(thermal property) 검토

동결 건조한 시료를 aluminum pan에 넣고 sample encapsulation press를 이용하여 밀봉한 후 상온에서부터 200 ℃ 범위로 질소 기류하(20 mL/min)에서 10 ℃/min로 가열하면서 흡열되는 열량을 DSC(Differential Scanning Calorimeter, perkin-elmer(USA, pyris1))를 이용하여 측정하였다. 이때 표준시료인 Indium (m.p. = 156.6 ℃, heat of fusion=6.8 cal/g)을 사용하여 온도와 엔탈피를 보정하였다. 열적 전이(thermogram)에서 흡열곡선의 면적으로 열량을 계산하였고 겔화의 개시온도(onset temperature : T_0), 최고온도(peak temperature : T_p), 완료온도(conclusion temperature : T_c)로 구분하여 측정하였다.

2) 응집활성(flocculating activity) 측정

Nakamura(1976) 방법을 변형하였는데 표준시료로 활성탄소(activated carbon, Sigma Co.)을 사용하여 시험관(17 × 190 mm)에 0.5 % (w/v, 5000 ppm) activated carbon 현탁액 10 mL 넣고 1.0 % (w/v) CaCl_2 용액 100 μL 를 첨가한 후 여기에 비교군 xanthan gum, EPS를 1 - 5 % (w/v)의 농도별로 각각 첨가하였다(Fig. 3). 이 혼합용액을 약 30초간 상온에서 혼합하였다. 이를 10분간 상온에서 정치 후에 상층액 만을 흡광도 A_{550} 에서 측정한 값을 아래 식에 계산하였다.

$$\text{Flocculating activity (U/mL)} = \frac{A-B}{A} \times 100 \times \text{dilution rate}$$

A : Absorbance of reference sample

B : Absorbance of reaction mixture

0.5 % activated carbon 10 mL + 1.0 % CaCl_2 0.1 mL

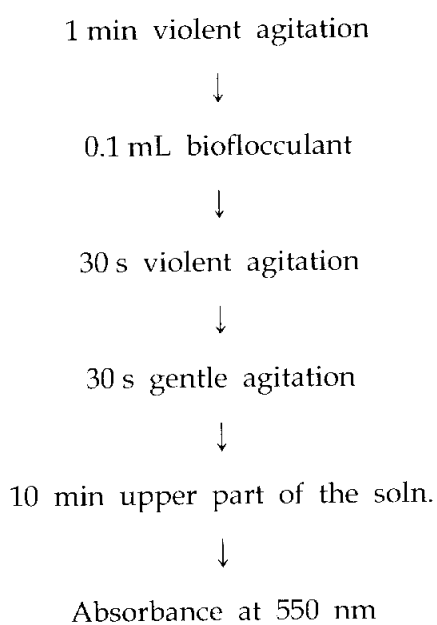


Fig. 3. Procedures of flocculating activity measurement.

3) 수분보습력(water-holding capacity, WHC) 측정

수분보습력을 측정하기 위해 polysaccharide 시료를 각각 0.1 - 2.0 % (w/v) 로 제조하여 미리 양량을 구한 원심분리관에 넣어 vortex mixer로 1분간 혼합한 다음 상온에서 1시간동안 방치한 후, 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 흡수종이에 원심분리관을 거꾸로 세워 15분간 잔존 수분을 충분히 제거하였다(Chen et al., 1988). 이것을 dry oven(110 °C, overnight)에서 항량하여 수분흡수시의 중량에서 건조중량의 차를 보수력으로 계산하였다.

4) 용해성(solubility) 측정

용해성 측정방법은 Fig. 4에서와 같이 각 용매에 sample을 넣은 후 균질화하여 원심분리한 후 당 함량을 phenol/H₂SO₄법으로 측정하였다. Polysaccharides의 각종 용매에 대한 용해성 측정을 위해 D.W., 산, 염기, 유기 용매를 종류별로 선정하여 측정하였으며 아래 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Soluble substance mass (mg/mL)} = \frac{A-B}{a} \times 0.9^*$$

$$\text{Solubility (\%)} = \text{solubility mass} \times 100$$

A : total substance mass (mg/mL)

B : soluble substance mass (mg/mL)

* : molecular weight ratio

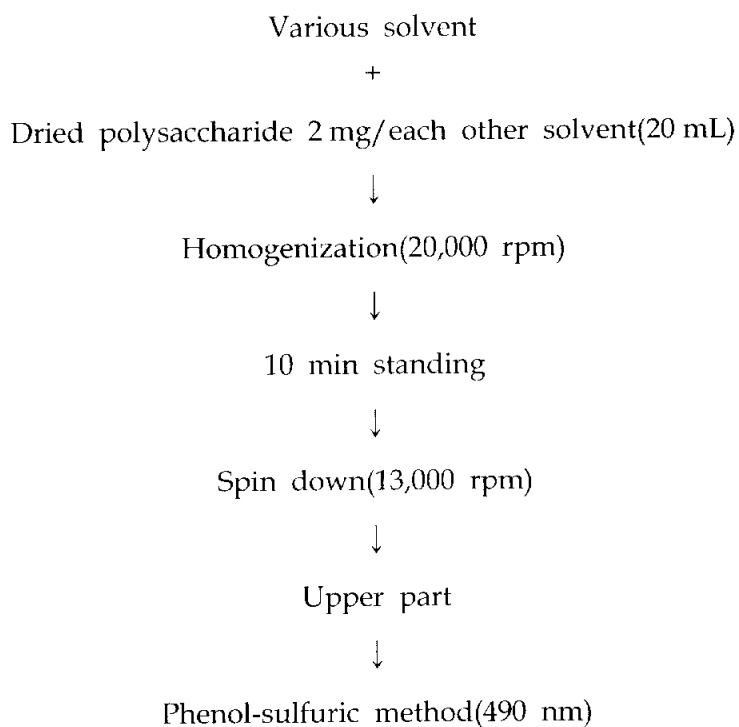


Fig. 4. Procedures of solubility measurement.

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 *Cochlodinium polykrikoides*에서 분비되는 유기물질

1. *C. polykrikoides*에서 분비되는 유기물질의 기본 특성

1) 세포성장특성

*C. polykrikoides*를 배양 시 각 성장단계별 세포의 chain 수는 배양 시작 후 8일째까지 8 chain을 보였지만 12일부터는 거의 2 - 4 chain을 보였고, 16일부터 1 cell이 나타났으며 24일에는 대부분 1 cell이었다(Fig. 5). 또한 세포의 평균 diameter를 측정해 보면 초기에는 20 μm 이었던 것이 대수증식기인 16일째는 28 μm 로 커졌다가 이후 소멸기에 세포의 크기가 21 μm 로 작아졌다(Fig. 6).

2) Polysaccharide와 단백질의 변화

*C. polykrikoides*를 f/2-Si배지에서 배양하여 세포수가 증가함에 따라 분비되는 polysaccharide와 단백질의 분비양상을 알기 위해 일자별로 조사한 결과를 Fig. 7에 나타내었다.

세포수는 초기에 190 cell/mL로 배양을 시작하여 대수증식기(exponential phase)를 거쳐 배양 후 12일에 3,300 cells/mL가 되었으며, 20일까지 3,400 cells/mL로 정지기(stationary phase)를 보이다가 이후 소멸기(declining phase)로 진행되면서 24일에 2,890 cells/mL로 세포수가 감소되었고, 일간성장율은 0.208 day⁻¹ 였다.

분비된 exopolysaccharide(EPS)의 농도는 초기 3.0 mg/L이 배양 후 8일에 3.43 mg/L로 증가되기 시작하여, 12일에는 4.00 mg/L, 그리고 정지기에 분비되는 양이 점차 증가되어 정지기 말기인 20일에 최대값인 6.02 mg/L를 보였으나

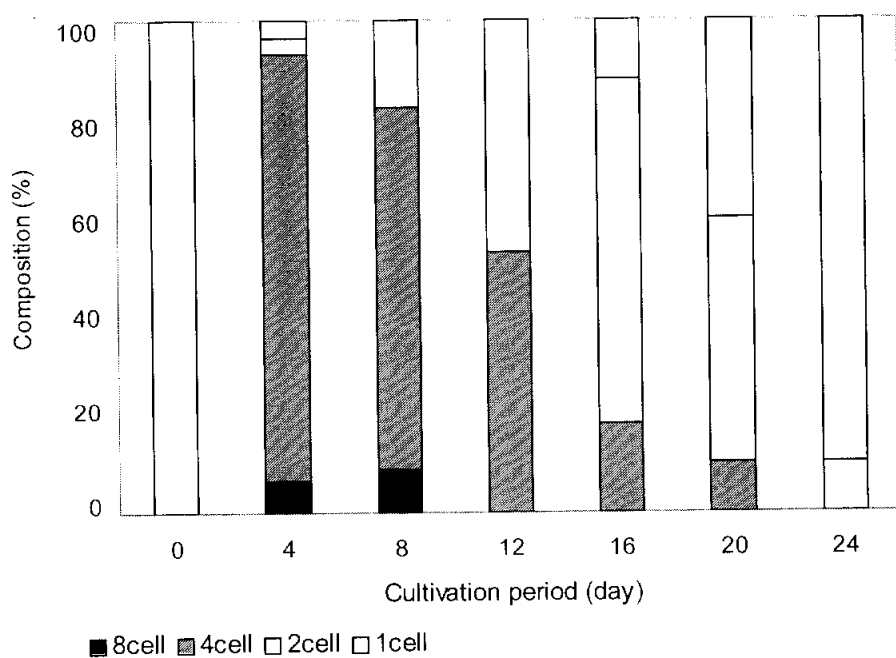


Fig. 5. Chain number of cells during cultivation of *C. polykrikoides*.

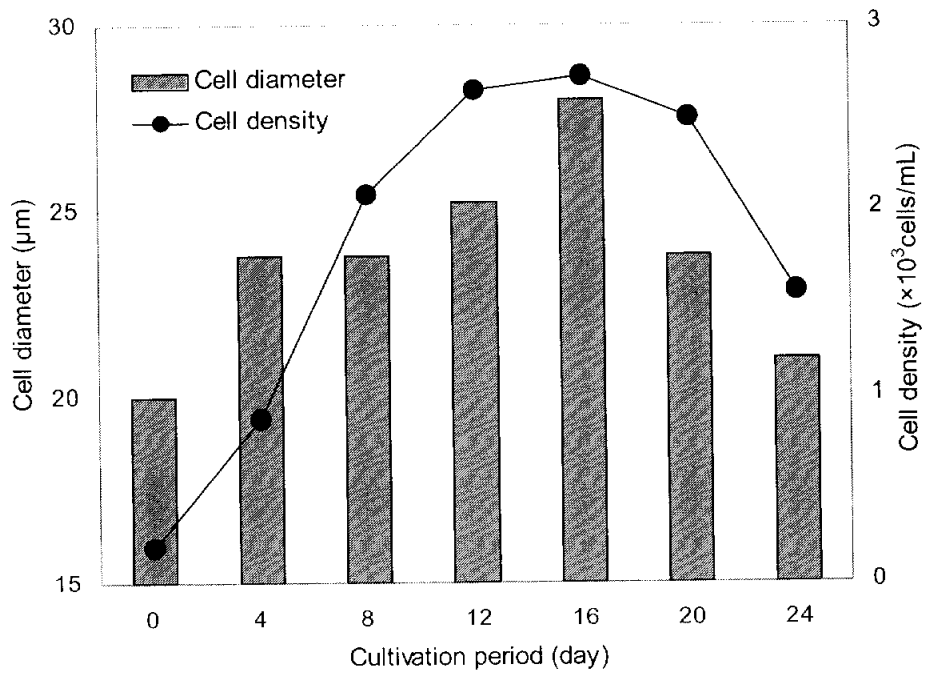


Fig. 6. Mean diameter of *C. polykrikoides* during cultivation.

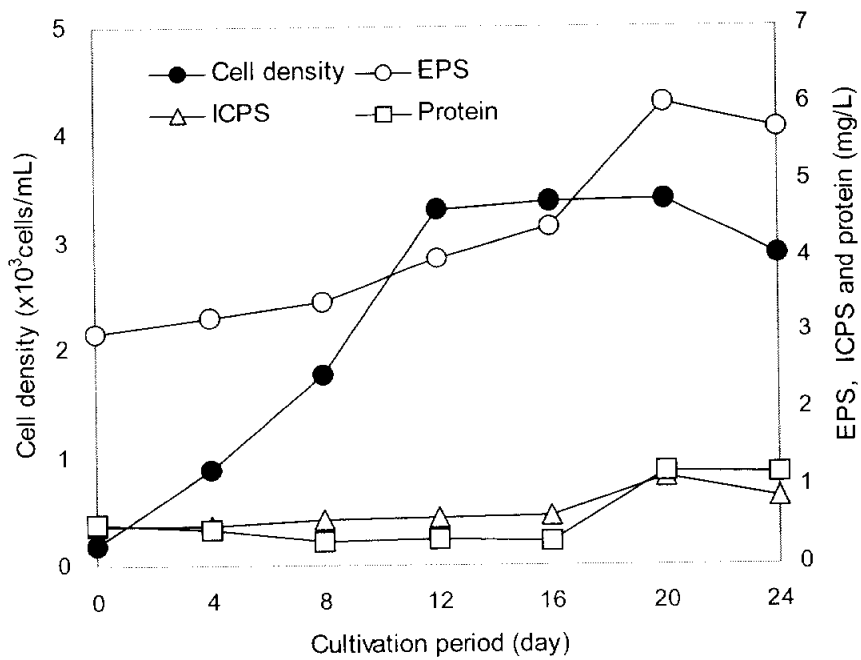


Fig. 7. Exopolysaccharide(EPS), intracellular polysaccharide(ICPS), and protein concentration, cell density during cultivation of *C. polykrikoides*.

이후 양이 감소되어 소멸기에는 5.69 mg/L로 값이 낮아졌다. Intracellular polysaccharide(ICPS)양은 초기에 0.52 mg/L 였으나 정지기인 16일까지 0.65 mg/L로 농도의 증가가 거의 없다가 정지기 말기에 증가되어 1.13 mg/L로 최대값을 보였고, 소멸기에 들어 0.88 mg/L로 감소하였다. 이를 통해 *C. polykrikoides*는 배양 시 exopolysaccharide와 intracellular polysaccharide의 농도가 증가되다가 정지기 말기에 각각 최대값을 보임을 알 수 있었다. 이것은 규조류인 *Cylindrotheca closterium*, *Chaetoceros affine* 등 대부분의 식물 플랑크톤에서 나타나는 현상과도 동일하게 나타났다(Myklestad, 1995; Staats et al., 2000).

분비된 단백질의 농도는 초기에 0.55 mg/L이었으나 배양이 진행되면서 정지기인 16일에 최소값인 0.31 mg/L로 낮아졌으나, 정지기 말기인 20일 이후 1.19 - 1.20 mg/L로 증가되었다. 이는 세포가 소멸기가 되어 cell lysis가 일어나면서 많은 단백질들이 분비되는 것으로 생각된다(Staats et al., 2000).

C. polykrikoides 세포 당 분비된 exopolysaccharide의 농도를 보면 12일에는 1.21 pg/cell로 가장 낮은 값을 보였으나, 정지기에는 exopolysaccharide의 생산이 증가되면서 말기에 1.77 pg/cell을 보였고, 소멸기에는 1.97 pg/cell로 가장 높은 값을 보였는데, 이는 소멸기에 세포수가 상대적으로 많이 떨어졌기 때문이다(Fig. 8). 그러나 intracellular polysaccharide는 정지기 초기에 0.19 pg/cell 이었다가 정지기 말기와 소멸기에 각각 0.33, 0.30 pg/cell이었다. 단백질은 exopolysaccharide의 분비양상과 동일하게 정지기로 들어가는 12일에 0.10 pg/cell로 가장 낮은 값을 보였으나 정지기에는 0.35 pg/cell, 소멸기에는 0.41 pg/cell로 최대값을 보였다. 이를 통해 배양초기에 생산된 carbohydrate와 단백질은 internal pool 증가에 사용되었음을 알 수 있었고, 배양말기에 exopolysaccharide와 단백질 분비가 증가되는 것은 세포성장이 멈춤에 따라 두 물질이 internal pool의 증가에 더 이상 사용되지 않고 세포로부터 점차 exopolysaccharide와 단백질이 해리됨에 따른 것으로 생각된다(Liu and Buskey, 2000).

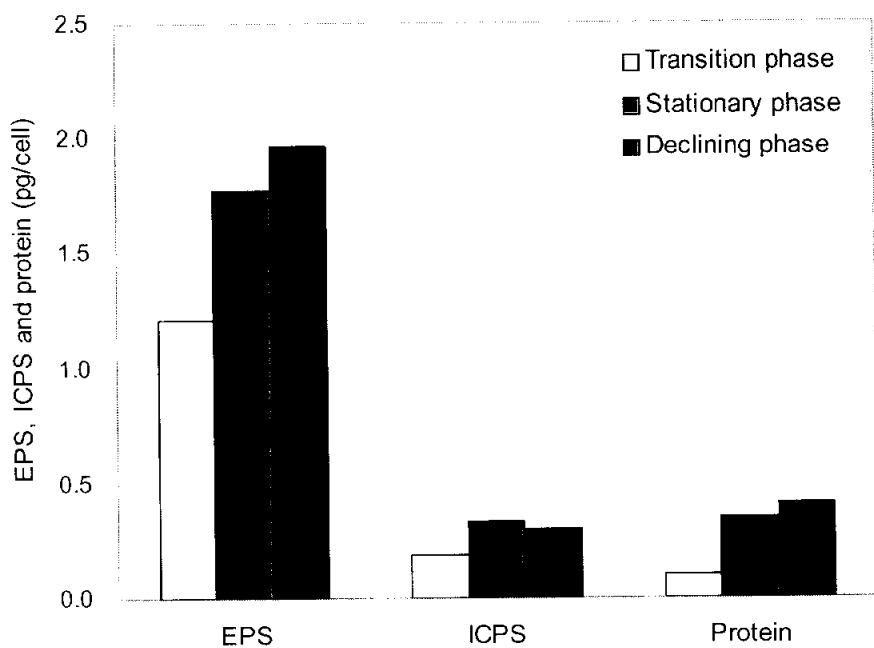


Fig. 8. Production of exopolysaccharide, intracellular polysaccharide and protein of the cell in *C. polykrikoides* culture.

3) 아미노산(amino acid)의 변화

배양단계별로 분비된 아미노산의 농도변화를 알기 위해 아미노산 20종을 분석하였으나 이중 양적 변화가 현저한 10종을 Fig. 9에 나타내었다.

Proline을 제외한 대부분 아미노산의 농도는 배양에 따라 거의 변화가 없다가 정지기 말기인 20일에 농도가 현저히 증가되었다. 특히 아미노산의 농도는 배양 초기에 비하여 종류별로 정지기 말기에 4.1 - 228.2 배까지 증가되었는데 cysteine, glycine, histamine, tyrosine, valine, lysine은 4.1 - 86.2배, leucine, phenylalanine, isoleucine은 178.6 - 228.2배까지 증가되었다. Proline은 전 배양 기간을 통해 가장 많이 분비되었고, 또한 배양시기에 따라 다른 아미노산과는 다른 농도분포를 보였다. Proline은 전체 아미노산 중 초기에는 84.2 - 90.3 %를 점하였으나 정지기에는 20.4 %, 소멸기에는 53.1 %를 차지하였다. 그 외 cysteine, histamine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine은 정지기에 전체 mole의 59.6 %를 점하였다. 그러나 그 외 아미노산들은 분비되는 양의 증가가 무시할 정도로 작았는데 이는 세포내에서 작은 turnover time을 가져서 분해된 후 성장하는 세포와 거의 같은 속도로 재합성되지 않았기 때문으로 생각된다(Myklestad et al., 1989).

C. polykrikoides 배양 시 분비된 아미노산의 종류는 다른 식물 플랑크톤에서 연구된 것과는 많이 달랐다. 규조류, 와편모조류, 남조류들은 분비물질(extracellular product)에서 아미노산을 확인하였는데 규조류인 *Chaetoceros affinis*, *Ch. debile*은 glutamine, glycine, glutamic acid 등, 그리고 *Phaeodactylum tricorutum*, *Coscinodiscus granii*, *Skeletonema costatum* 등은 glutamine의 농도가 매우 높았다(Poulet and Martin-Jezequel, 1983; Lu and Stephens, 1984; Admiraal et al., 1986). 또한 Lee and Cronin(1984)와 Wakeham(1984) 등은 해역에서 식물 플랑크톤의 종류에 상관없이 aspartic acid, glycine, serine, alanine을 포함한 15종의 아미노산을 분리하였으며, Eberlein 등은 *Phaeocystis bloom* 동안에 유리아미노산을 정량화하였다. 또 많은 과학자들이 남조류에서

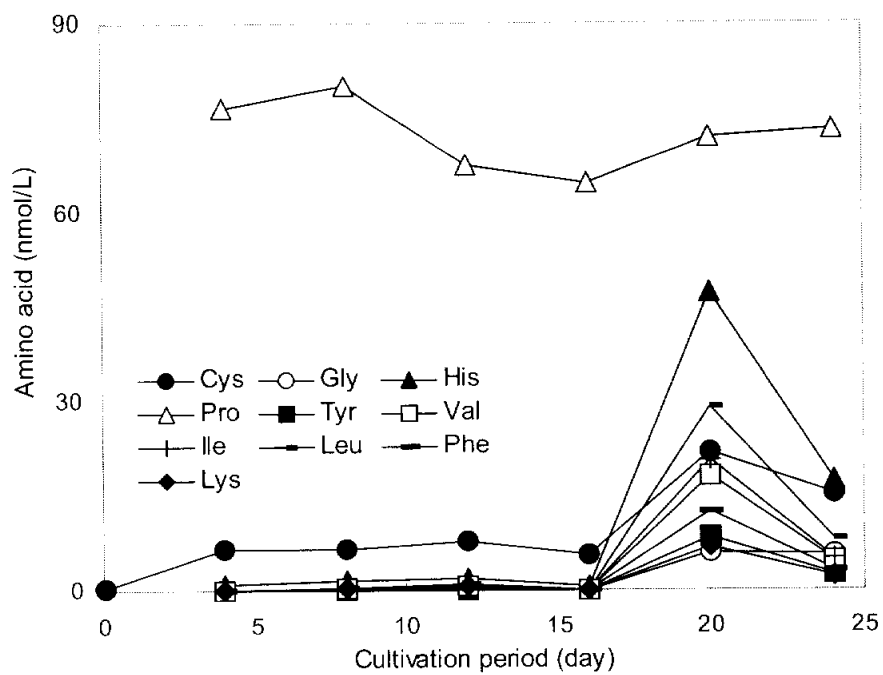


Fig. 9. Extracellular amino acids concentration during cultivation of *C. polykrikoides*.

분리한 아미노산에 대해 연구하였다(Ahlgren et al., 1992). 식물 플랑크톤에서 분리된 아미노산의 종류는 종에 따라 다르며, 이는 관련된 연구에서 종을 확인하는데 중요한 자료가 된다(Metaxatos et al., 2003)

4) 세포내 성분의 변화

세포성장에 따른 cellular carbon과 nitrogen의 변화를 조사하여 Fig. 10에 나타내었다. Cellular carbon의 양은 초기 1.85 mg/L 였다가 세포수가 증가함에 따라 점차 농도가 증가되어 정지기 말기에 5.52 mg/L로 가장 높았고 이후 세포수가 감소됨에 따라서 5.12 mg/L로 값이 감소되었다. 그러나 nitrogen의 양은 대수증식기에 0.53 mg/L의 값을 보였고, 소멸기에는 0.71 mg/L의 최대값을 보였다.

세포당 carbon의 농도는 배양 초기에 2.72 pg/cell로 가장 높았다가 12일에 1.40 pg/cell, 24일에 1.77 pg/cell의 값을 보였다. 세포당 nitrogen의 농도도 동일한 경향으로 배양초기에 0.33 pg/cell로 가장 높았다가 배양이 진행되면서 감소되었다가 정지기 이후 계속 증가되어 소멸기에 0.25 pg/cell의 값을 보였다 (Fig. 11) 이는 세포가 기하급수적으로 분열을 함에 따라 세포당 carbon, nitrogen의 양이 감소한 것으로 생각되며 여러 논문에서도 같은 연구 결과가 나왔다(Myklestad et al., 1989).

배양단계에 따른 분비된 물질간과 분비 시기의 관련성을 알기 위해 cellular carbon, nitrogen 그리고 세포밀도, exopolysaccharide, intracellular polysaccharide, protein, 아미노산의 농도와의 상관관계를 살펴보았으며 유의수준 0.05에서 유의성을 검정하였다(Table 2). 세포밀도는 cellular carbon, nitrogen과 유의적 상관관계를 가졌고, exopolysaccharide는 세포밀도를 제외한 항목과, 그리고 exopolysaccharide, 아미노산과 유의수준 0.001에서 유의적 상관관계를 가졌다. 이는 세포밀도와는 별도로 성장단계에 따라 exopolysaccharide가 분비되고, 또한 이와 거의 비슷한 시기에 단백질, 아미노산이 분비되어 위와 같은 결과가 나온 것으로 생각된다(Hellebust, 1974; Fogg, 1983).

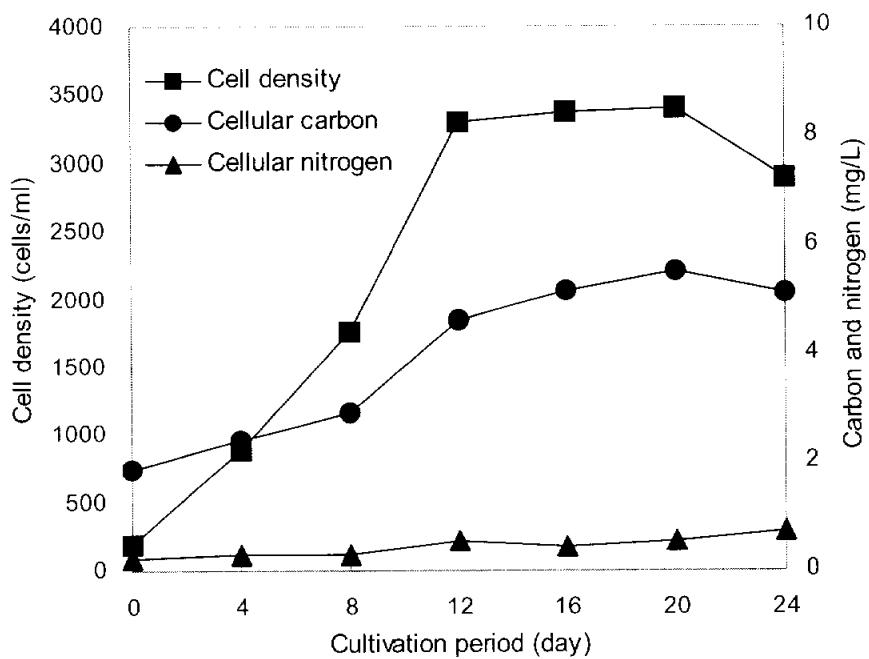


Fig. 10. Cell density, cellular carbon and nitrogen concentration during cultivation of *C. polykrikoides*.

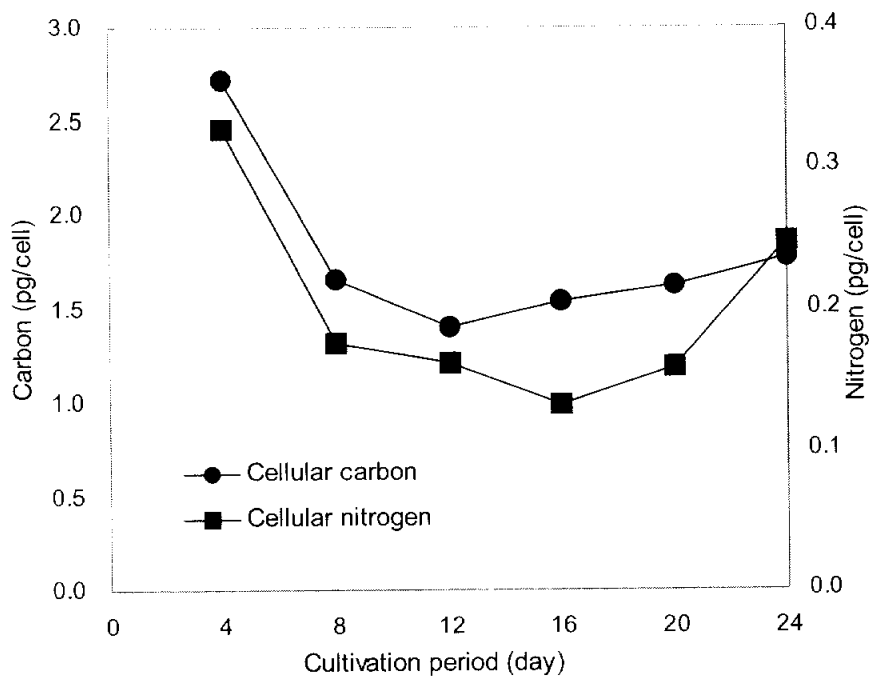


Fig. 11. Cellular carbon and nitrate concentration of the cell during cultivation of *C. polykrikoides*.

Table 2. Correlation matrix of variables in *C. polykrikoides* cultures

Constituents	Cell density	EPS	ICPS	Protein	Cellular carbon	Cellular nitrogen
EPS	0.731	-	-	-	-	-
ICPS	0.636	0.952**	-	-	-	-
Protein	0.280	0.851*	0.861*	-	-	-
Cellular carbon	0.817*	0.853*	0.704	0.627	-	-
Cellular nitrogen	0.818*	0.851*	0.705	0.626	1.000	-
Amino acid	0.494	0.837*	0.960**	0.823*	0.543	0.546

* Correlation is significant at 0.05 level

** Correlation is significant at 0.001 level

5) 용존 유기탄소(Dissolved organic carbon, DOC)의 변화

배양액으로 분비된 용존 유기탄소(dissolved organic carbon, DOC)의 양을 살펴보면 초기에 비해 대수증식기인 8일에 $5,323 \mu\text{g/L}$ 로 가장 낮은 값을 보이다가 소멸기에 $9,920 \mu\text{g/L}$ 로 가장 높은 값을 보였다(Fig. 12). 배양 중 생산된 exopolysaccharide, 단백질 등은 대부분 DOC를 이루는 것이다. 또한 다른 산물들도 DOC를 구성하기도 하는데 식물 플랑크톤의 종에 따라서 total carbohydrate의 70~80 %, 많게는 80 % 이상이 polysaccharide일 경우가 있다고 한다(Lancelot, 1984; Myklestad et al., 1989).

식물 플랑크톤이 분비하는 유기물질들은 수계에서 microbial food web에 매우 중요한 역할을 하는데, 해양의 전체 1차 생산 중 30 - 50 % 정도를 bacterioplankton에 의한 것이라는 보고되고 있다(Azam and Cho, 1987). 식물 플랑크톤에 의한 유기탄소의 분비는 *Chaetoceros* species 보다 *Skeletonema costatum*의 경우 훨씬 낮은 속도로 분비되고 식물 플랑크톤 군집에 따라 달라진다(Hellebust, 1965; Myklestad, 1974). 분비된 유기물질은 유기물을 이용하는 bacteria에 의해 효과적으로 인과 질소를 재무기화(remineralization)되어 자가영양세포(autotrophic cell)에 의해 동화될 수 있게 되어 결국 수계에서 중요한 역할을 하는 것이다(Azam and Cho, 1987)

배양액 내에서 전체 carbon의 양은 cellular carbon과 DOC로 나타낼 수 있다(Table 3). 분비되는 carbon의 양은 전체 carbon의 양 중에 53.54 - 65.95 %였으며, 이중 아미노산으로 분비되는 carbon의 양은 0.06 - 0.24%였다.

6) 물질 분비의 속도

유기물질의 외부 분비는 식물 플랑크톤의 자연적 생리현상으로 모든 성장 단계를 통해 일어난다. Exopolysaccharide는 대수증식기에는 $34.24 \text{ pg cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 의 속도로 생산되었고, 정지기에는 가장 높은 $47.04 \text{ pg cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 의 속도로 생산되었고 productivity는 $0.196 \text{ ng cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 다. Intracellular polysaccharide도

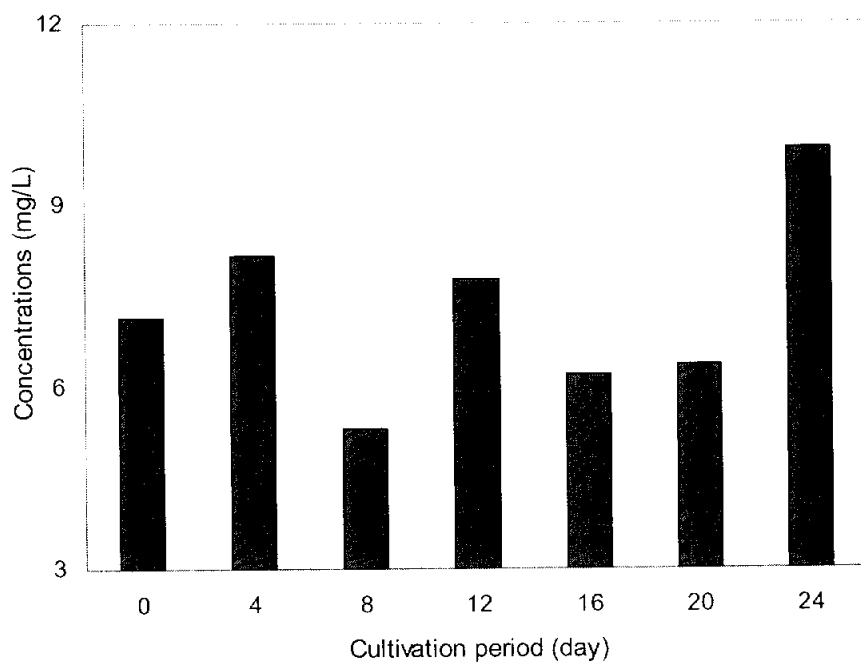


Fig. 12. Dissolved organic carbon concentrations during cultivation of *C. polykrikoides*.

Table 3. Carbon production in *C. polykrikoides* culture for cellular and extracellular fraction

No.	Time (day)	Cell density (cells/mL)	Cellular ($\mu\text{g/L}$)		Amino acid ($\mu\text{g/L}$)		DOC ($\mu\text{g/L}$)	Total ($\mu\text{g/L}$)	Per cell (pg/cell)	
			C	N	C	N		C	C	N
1	0	190	1854	204	3	1	-	-	-	-
2	4	880	2390	288	5	1	8150	10540	2.72	0.33
3	8	1760	2916	308	5	1	5320	8236	1.66	0.18
4	12	3300	4605	531	5	1	7770	12375	1.40	0.16
5	16	3380	5180	444	4	1	6200	11380	1.53	0.13
6	20	3340	5520	541	15	5	6360	11880	1.62	0.16
7	24	2890	5121	714	8	2	9920	15041	1.77	0.25

C : carbon, N : nitrogen

빠르게 증식하고 있는 대수증식기에서는 $6.05 \text{ pg cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 였지만 정지기에서는 $9.47 \text{ pg cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$, 소멸기에는 $5.49 \text{ pg cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 의 속도로 생산되었다. 단백질 및 아미노산은 정지기에 각각 10.13 , $39.17 \text{ pg cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 의 속도로 생산되었다(Table 4). 세포밀도에서 차이가 있는 것을 고려하면 polysaccharide와 amino acid의 분비속도는 biomass에 비례하여 증가하였는데 이것은 세포막을 통해 diffusion의 중요성을 나타낸다(Hellebust, 1974; Fogg, 1983).

식물 플랑크톤이 물질을 분비하는 메카니즘에 대한 연구는 저분자물질(sugar, amino acid, organic acid)이 세포막을 통해 단순 확산되는 것을 제외하고는 거의 알려진 것이 없다. 이때 해리속도는 물질에 대한 막의 침투성(permeability coefficient)에 의해 좌우되고(Allan et al., 1972), 세포막을 통한 대부분의 유기물질의 분비는 300 - 600 dalton 또는 그 이상이기 때문에 중간체를 경유해(mediated transport) 일어난다. 단백질과 polysaccharide와 같은 고분자 물질은 좀더 복잡한 메카니즘을 통해 분비된다. Carbohydrate는 광합성과 정에서 정지기에 단백질의 합성을 중단시켜 과도한 광합성탄소를 성장기 또는 재생산동안 대사되지 않고 탄소의 방출 메카니즘으로 분비되는 것이다.

또한 내부대사물질과 exopolysaccharide의 성분이 다르다는 것으로 단순한 세포용해(cell lysis)로 세포외(extracellular) 물질의 증가가 이루어지지 않는다는 연구결과가 있으며, 조류에서는 골지체가 polysaccharide를 가지고 소포체를 채운 후 그런 다음 세포막으로 이동한다. 소포체는 세포막과 융합하고 그 내용물은 외포작용(exocytosis)에 의해 세포 밖으로 배출되며(Ramus and Robins 1975; Hoagland et al. 1993), exopolysaccharide의 성분은 대부분 intracellular reserve와는 다르고, diatom을 둘러싼 점질성 막과 더 비슷하다는 연구보고가 있다(Allan et al, 1972; Mylkestad et al., 1972).

Table 4. Production rate of exopolysaccharide, intracellular polysaccharide, protein and amino acid per cell during cultivation of *C. polykrikoides* for different growth phase

	Rate of production			
		(pg cell ⁻¹ day ⁻¹)		(pmol cell ⁻¹ day ⁻¹)
	EPS	ICPS	Protein	Amino acid
Exponential phase	34.24	6.05	-18.31	12.36
Stationary phase	47.04	9.47	10.13	39.17
Declining phase	41.51	5.49	9.88	29.85

7) 배지 성분의 변화

배양 시 일자별 영양염 변화를 살펴보면 질산염의 농도는 세포증식에 따라 감소하는 경향을 보였다. 질산염의 초기농도는 804 μM 이었으나 지속적으로 감소하여 16일째는 639 μM 의 농도를 나타내었다가 이후 24일째는 708 μM 로 다소 증가되었다. 인산인의 농도는 세포증식에 따라 다소 불규칙적으로 증감을 반복하였으며 세포의 증식과 인산인의 농도 변화 간에는 뚜렷한 상관관계가 나타나지 않았다. 암모니아는 배양이 진행됨에 따라 뚜렷하게 감소하는 경향을 보였다. 전반적으로 영양염의 농도 변화를 보면 질산염과 암모니아는 세포밀도의 증가에 따라 감소하는 경향을 보였으나 인산은 세포밀도의 증가와 농도 변화 간에 상관관계가 없었다(Fig. 13 - 15).

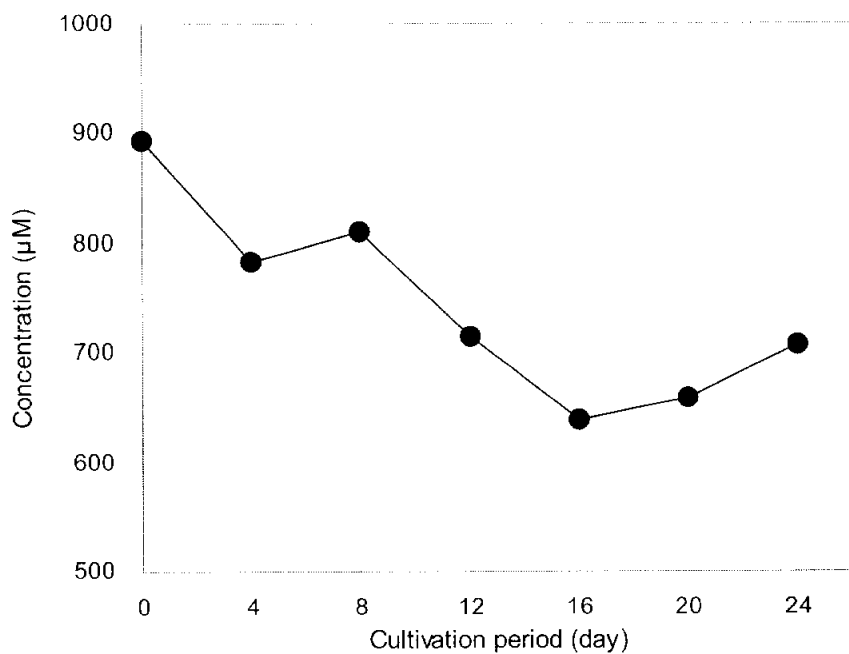


Fig. 13. Nitrate concentrations during cultivation of *C. polykrikoides*.

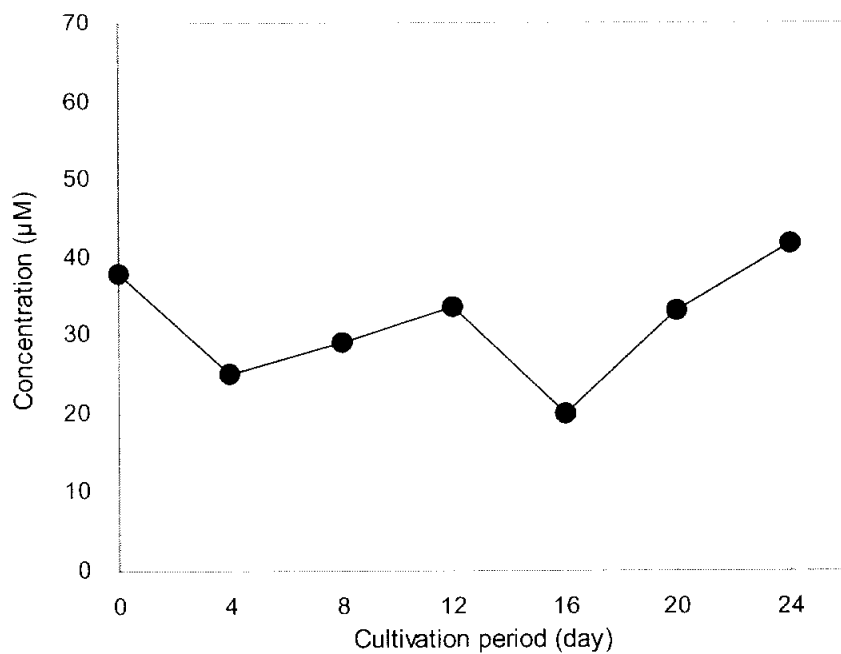


Fig. 14. Phosphate concentrations during cultivation of *C. polykrikoides*.

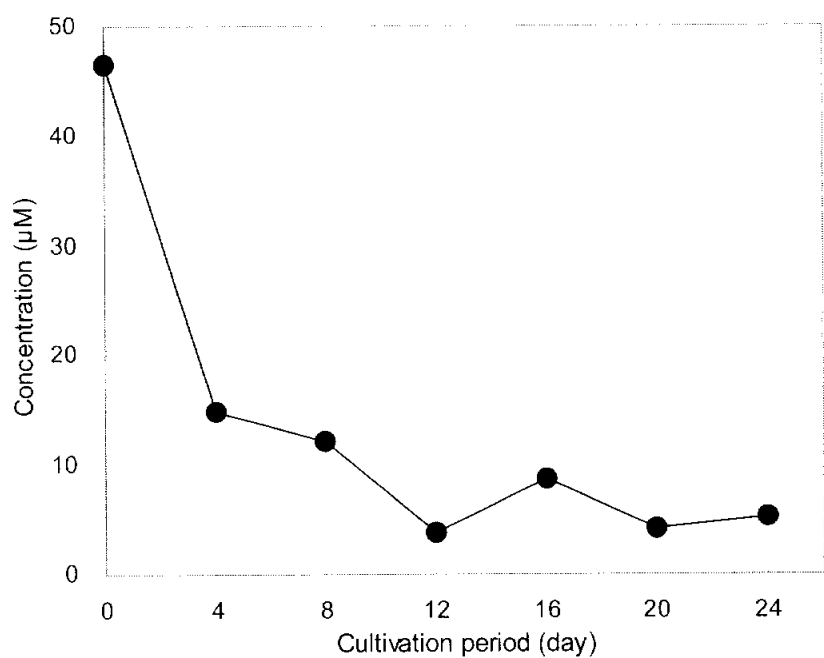


Fig. 15. Ammonia concentrations during cultivation of *C. polykrikoides*.

2. Polysaccharide 생산의 최적 배양조건

1) 영양염 농도의 영향

(1) 질소원의 영향

가. 질산염 농도에 따른 변화

질산염을 0, 25, 50, 100, 200, 400 μM 로 각각 첨가하였을 경우 세포 밀도를 보면 질산염이 첨가되지 않았을 경우는 최고 밀도에 도달하는 시간이 21일로 늦었고, 25 μM 이상을 첨가하였을 경우는 16일에 최대 밀도에 도달하였다(Table 9). 그리고 최대밀도는 질산염을 200 μM 첨가하였을 경우 가장 높았다. 배양단계에 따른 exopolysaccharide의 생산량을 보면 질산염을 첨가하지 않았을 경우 초기 2.50 mg/L에서 4.69 mg/L로 최대값을 보였고, 25 μM 농도로 첨가했을 경우 4.23 mg/L를 나타냈으나, 50 μM 이상에서는 생산량이 3.40 mg/L이하의 낮은 값을 보였다(Fig. 16). 여기서 질산염의 농도가 50 μM 미만으로 낮은 경우는 정지기에 접어들면서 2.39 mg/L에서 4.30 mg/L로 exopolysaccharide의 생산량이 급격히 증가하였으나, 질산염의 농도가 50 μM 이상일 경우 대수증식기에서부터 2.43 mg/L에서 2.77 mg/L로 생산량이 조금 증가하였고, 배양이 계속됨에 따라 생산량의 현저한 변화는 없었다.

세포성장속도는 질산염을 첨가하지 않았을 경우 0.193 day^{-1} 이었고 질산염의 농도가 200 μM 까지 농도가 증가함에 따라 대체로 증가하였지만 productivity는 질산염을 제한하였을 경우 $0.181 \text{ ng cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 로 가장 높았고, 50 μM 이상 첨가하였을 경우 $0.023 - 0.079 \text{ ng cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 로 비교적 낮은 값을 보였다(Table 5).

단백질의 양은 질산염을 50 μM 이하로 첨가했을 때 정지기 이후에 1.10 mg/L이상의 높은 값을 보였고, 100 μM 이상의 농도에서는 정지기 이후 1.0

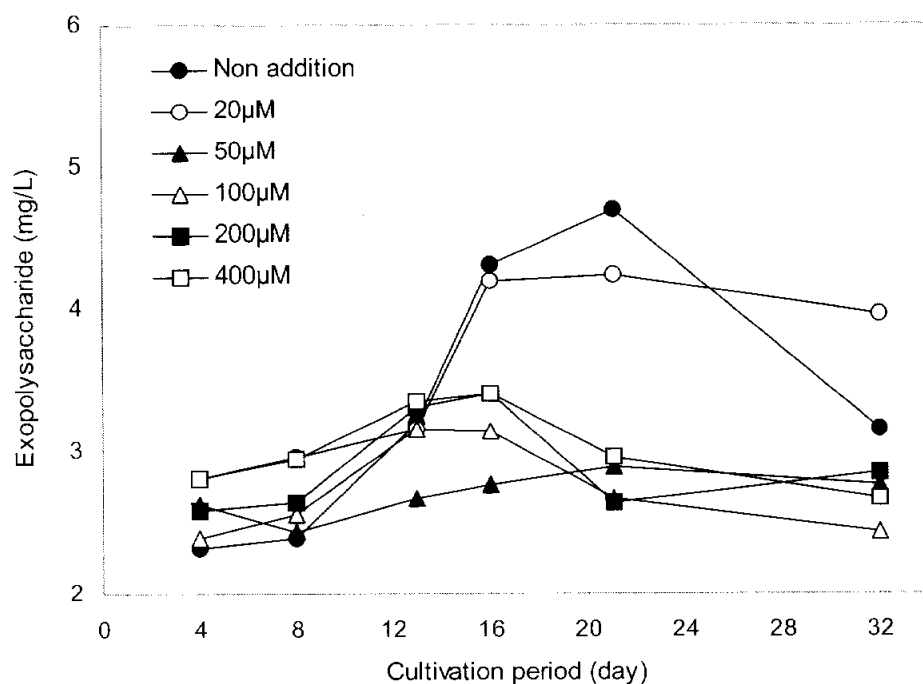


Fig. 16. Production of exopolysaccharide during cultivation of *C. polykrikoides* in media with different nitrate concentrations.

Table 5. Specific growth rate and productivity of *C. polykrikoides*
at different nitrate concentrations

Concentration	Incubation days (t_2-t_1)	Max. cell number (cells/ml)	SGR (day ⁻¹)	q_p (ng cell ⁻¹ day ⁻¹)
0	21	2,500	0.193	0.181
25	16	2,600	0.257	0.178
50	16	3,590	0.286	0.023
100	16	3,950	0.295	0.050
200	16	4,550	0.308	0.063
400	16	3,360	0.280	0.079

SGR : Specific growth rate

q_p : Specific productivity

mg/L 이하의 값을 보였으나 소멸기에 1.08 - 1.35 mg/L의 값을 보였다(Fig. 17). 첨가한 질산염의 농도가 100 μ M이하로 낮았을 경우 단백질의 양은 대수증식기에 낮은 값을 보였는데 이것은 낮은 질산염의 농도에서 세포수가 급속히 늘어나기 위해 단백질이 모두 내부성장에 사용됨에 따라 단백질의 분비가 급격히 감소된다는 연구와 동일한 결과이다(Staats et al., 2000).

나. 질산염과 암모니아 농도에 따른 변화

질산염 제한이 *C. polykrikoides*의 exopolysaccharide의 생산에 영향을 주는 인자 중의 하나라는 결과를 통해 질소원으로 질산염과 암모니아를 각각 0, 25, 50, 75 μ M 농도별로 첨가하여 exopolysaccharide의 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 그리고 exopolysaccharide가 생산되기 시작하는 정지기인 15일째와 정지기 말기인 20일의 결과를 비교하여 Fig. 18에 나타내었으며, 이때의 세포성장 속도와 productivity를 비교하여 Table 6에 나타내었다.

일간성장률은 질산염을 첨가하였을 때보다 암모니아를 첨가하였을 경우 더 높았고, 특히 암모니아를 50 μ M로 첨가하였을 경우 0.308 day⁻¹로 가장 높았다. 그러나 exopolysaccharide의 생산량은 질소원을 첨가하지 않았을 경우 정지기 말기에 가장 높았으며 암모니아와 비교하여 질산염을 25 μ M로 첨가하였을 경우 비교적 높게 나타났다. Intracellular polysaccharide는 암모니아를 50 μ M로 첨가하였을 때 정지기 말기에 1.06 mg/L로 가장 높은 값을 보였다.

Exopolysaccharide의 productivity는 질소원을 첨가하지 않았을 경우 0.183 ng cell⁻¹ day⁻¹로 가장 높은 값을 보였다. 암모니아를 첨가하였을 경우 농도에 현저한 변화는 없었다. 위의 결과를 통해 질소 제한배지에서 exopolysaccharide의 생산은 증가되었지만 intracellular polysaccharide의 양은 동일하여 질소원의 결핍에 따른 exopolysaccharide의 축적은 intracellular polysaccharide의 생산과 동반하지 않았고(Table 7), 이를 통해 intracellular polysaccharide의 합성과 분비는 다른 조절 메커니즘이 있는 것으로 사료된다(Staats et al., 2000).

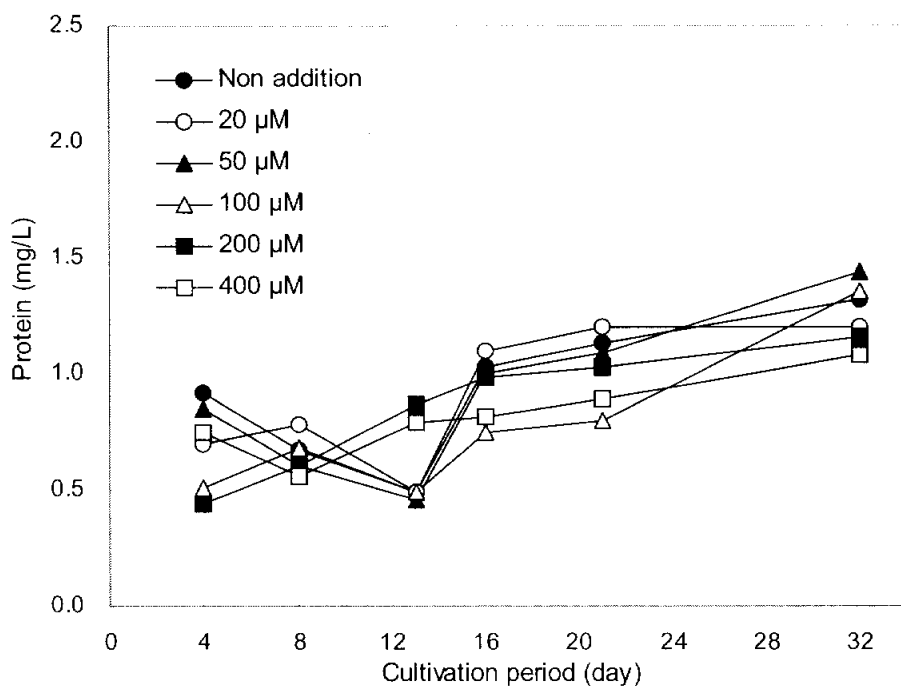


Fig. 17. Production of protein during cultivation of *C. polykrikoides* in media with different nitrate concentrations.

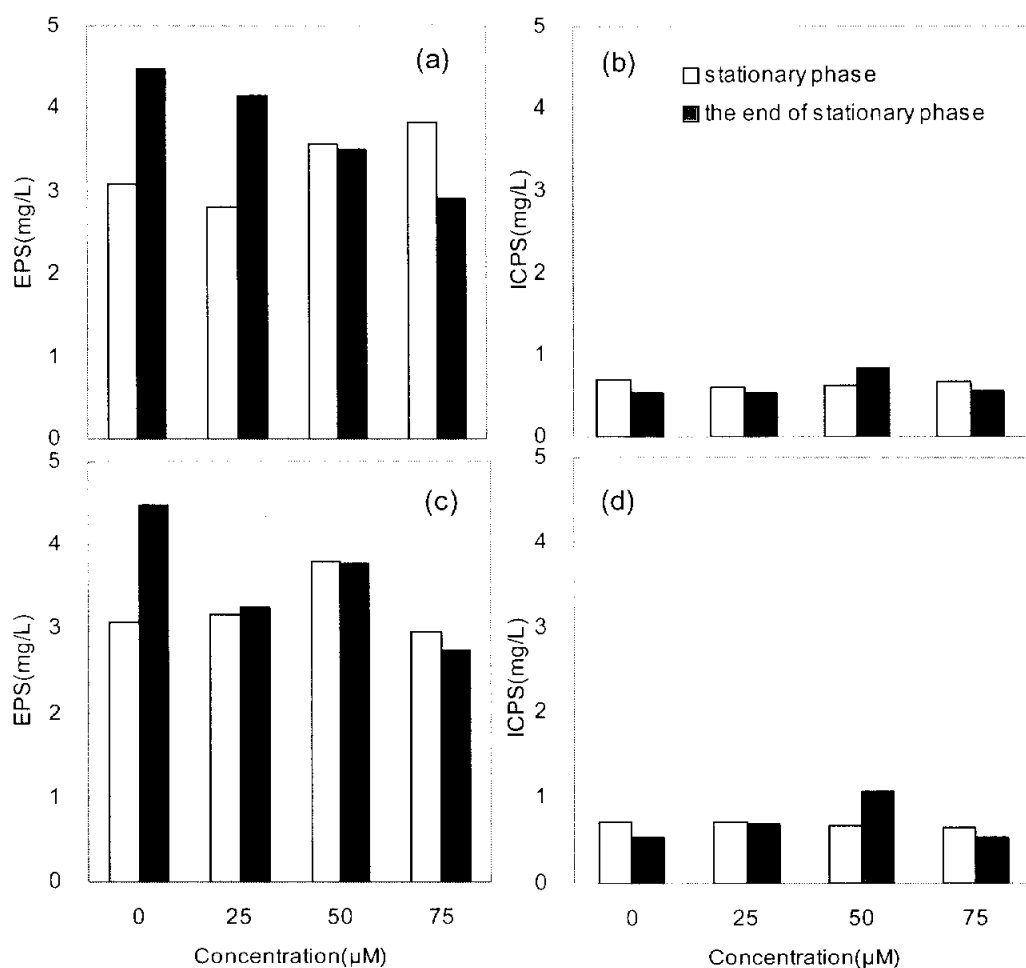


Fig. 18. Exopolysaccharide (EPS) and intracellular polysaccharide (ICPS) concentration during cultivation of *C. polykrikoides* at different nitrate (a, b) and ammonia concentrations (c, d).

Table 6. Specific growth rate and productivity of *C polykrikoides*
at different nitrate and ammonia concentrations

Concentration	Nitrate		Ammonia	
	SGR (day ⁻¹)	q _p (ng cell ⁻¹ day ⁻¹)	SGR (day ⁻¹)	q _p (ng cell ⁻¹ day ⁻¹)
0	0.190	0.183	0.182	0.179
25	0.198	0.132	0.295	0.060
50	0.216	0.064	0.308	0.069
75	0.223	0.024	0.279	0.041

SGR : Specific growth rate

q_p : Specific productivity

Table 7. Growth rate, accumulation rate of EPS and ICPS, protein concentration and the EPS/ICPS ratio of *C. polykrikoides* grown for 20 days with 50 μ M nitrate or ammonia addition

	Nitrate	Ammonia
SGR(day ⁻¹)	0.22	0.31
EPS accumulation rate (pg cell ⁻¹ day ⁻¹)	14.76	16.98
ICPS accumulation rate (pg cell ⁻¹ day ⁻¹)	6.47	7.83
Protein (pg/cells)	0.37	0.44
EPS/ICPS	2.28	2.17

세포 성장의 최적농도인 50 μM 로 암모니아와 질산염 첨가실험의 경우 세포성장속도 및 축적속도를 계산한 결과, 세포성장속도는 암모니아를 50 μM 로 첨가했을 경우 0.31 day^{-1} 로 가장 높았고, exopolysaccharide와 intracellular polysaccharide의 축적속도는 암모니아를 첨가했을 때 각각 16.98, 7.83 $\text{pg cell}^{-1} \text{day}^{-1}$ 로 더 높은 값을 보였다. 또한 세포당 protein의 농도도 암모니아를 첨가했을 경우 더 높았으나, EPS/ICPS의 비는 질산염을 첨가했을 경우 더 높은 값을 보였다.

이러한 식물 플랑크톤에서의 exopolysaccharide의 분비는 규조류의 경우 성장에 필요한 것 보다 과도하게 CO_2 를 고정하여 발생한 overflow metabolism의 결과라는 것으로 알려져 있다(Myklestad, 1995; Waite et al., 1995). 예를 들면 *Cylindrotheca closterium*은 exopolysaccharide를 질산염으로 암모니아 또는 질산염을 사용하였을 때 나타나는 성장차이로 overflow metabolism을 설명하고 있다. 질소원으로 암모니아를 사용하였을 경우, 질산염 보다 더 많은 전자를 CO_2 의 환원에 이용할 수 있기 때문에 더 많은 carbohydrate와 단백질을 생산할 수 있는 것이다. 질소원으로 질산염 또는 암모니아를 사용함에 관계없이 exopolysaccharide/intracellular polysaccharide의 비가 일정하다는 것을 통해 overflow metabolism으로 생산된다는 것이다(Turpin, 1991). 그러나 *C. polykrikoides*는 암모니아를 첨가했을 경우 세포성장과 물질생산은 더 많았지만, 암모니아를 첨가했을 경우 보다 질산염을 첨가했을 경우 exopolysaccharide/intracellular polysaccharide의 비가 더 높았다. 따라서 *C. polykrikoides* 물질분비의 metabolism에 대한 지속적인 연구가 필요하다.

(2) 인산염의 영향

*C. polykrikoides*의 물질생산의 최적 생산조건을 알기 위해 영양염 중 인원으로 인산염을 농도에 따라 첨가하여 polysaccharide와 단백질을 농도를 구하여 그 결과를 비교하였다(Fig. 19).

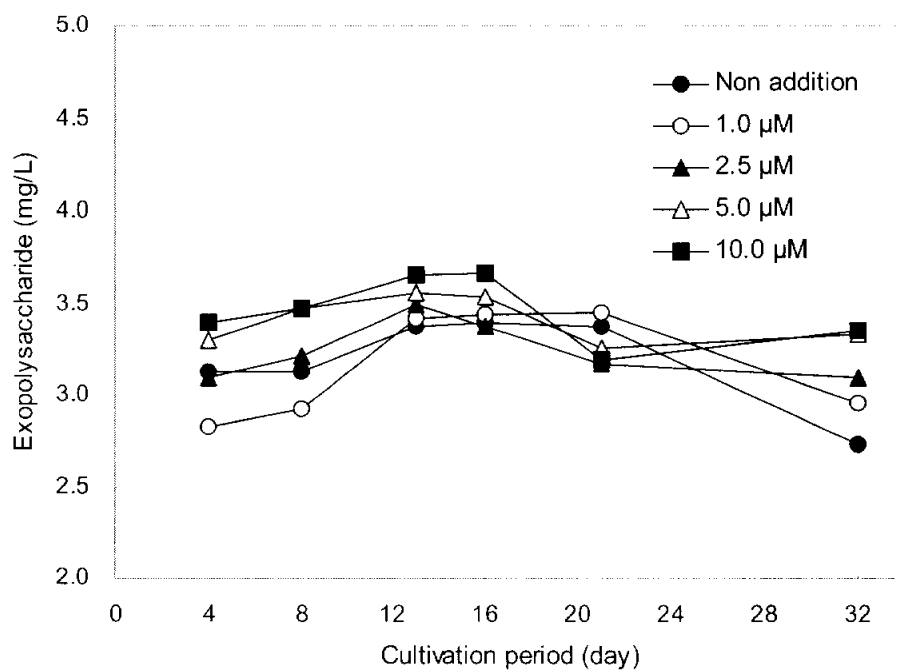


Fig. 19. Production of exopolysaccharide during cultivation of *C. polykrikoides* in media with different phosphate concentrations.

인산염을 0, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 μM 로 농도별로 첨가했을 경우 세포성장은 0 - 1.0 μM 농도에서는 최고밀도에 도달하는 시간이 16일이었지만, 2.5 μM 이상을 첨가하였을 경우는 13일에 최대밀도에 도달하였다. 질산염을 제한하였을 때보다 세포밀도는 낮았지만, 성장속도는 더 빨랐다. 농도에 따른 exopolysaccharide의 양을 보면, 10.0 μM 로 첨가하였을 경우 초기 2.0 mg/L에서 3.67 mg/L로 가장 높은 exopolysaccharide의 생산을 보였다. 그러나 질소원에 비하여 성장단계에 따른 exopolysaccharide의 뚜렷한 농도 증가가 없었고, 첨가한 인산염의 농도에 따른 exopolysaccharide의 생산량도 커다란 차이를 나타내지는 않았다.

세포 성장 속도는 인산염을 제한하였을 경우 0.225 day^{-1} 이었고 인산염의 농도가 10.0 μM 까지 농도가 증가함에 따라 증가하였고, exopolysaccharide의 productivity도 인산염의 농도 2.5 μM 이상의 경우 $0.145 - 0.149 \text{ ng cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 로 높았으나 0 - 2.5 μM 의 경우 $0.121 - 0.125 \text{ ng cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 로 낮은 값을 보였다(Table 8).

단백질의 양은 인산염을 첨가하지 않았을 경우 1.19 mg/L로 가장 높은 값을 보였고, 10 μM 로 첨가하였을 경우, 0.70 mg/L로 가장 낮은 값을 보였다(Fig. 20). 인산염 농도실험에서 질산염 실험에서와 다른 결과를 나타낸 것은 *C. polykrikoides* 종 자체의 특성으로 앞으로 원인에 대한 생리적인 연구가 계속되어야 될 것으로 생각된다.

인산염을 농도별로 첨가한 실험의 경우, 질산염의 양은 f/2 - Si 기본 배지 조성의 양으로 농도에 전혀 제한을 받지 않았고, 반대로 질산염의 농도 실험에서는 인산염의 제한을 받지 않았다. *C. polykrikoides*는 인산염을 제한했을 경우 exopolysaccharide의 생산량은 초기 2.00 mg/L에서 최대 3.40 mg/L이었지만, 질산염을 제한했을 때 4.60 mg/L로 exopolysaccharide의 생산량이 훨씬 많았고, 인산염을 제한했을 경우는 배양시간이 지남에 따라 생산량의 차이가 거의 없었지만, 질산염을 제한했을 경우 초기보다 2.3배 증가된 높은 생산량을 보였다.

Table 8. Specific growth rate and productivity of *C. polykrikoides*
at different phosphate concentrations

Concentration	Incubation days (t ₂ -t ₁)	Max. cell number (cells/ml)	SGR (day ⁻¹)	q _p (ng cell ⁻¹ day ⁻¹)
0	16	1,820	0.225	0.121
1.0	16	1,850	0.226	0.125
2.5	13	2,100	0.293	0.149
5.0	13	2,400	0.308	0.146
10.0	13	2,700	0.320	0.145

SGR : Specific growth rate

q_p : Specific productivity

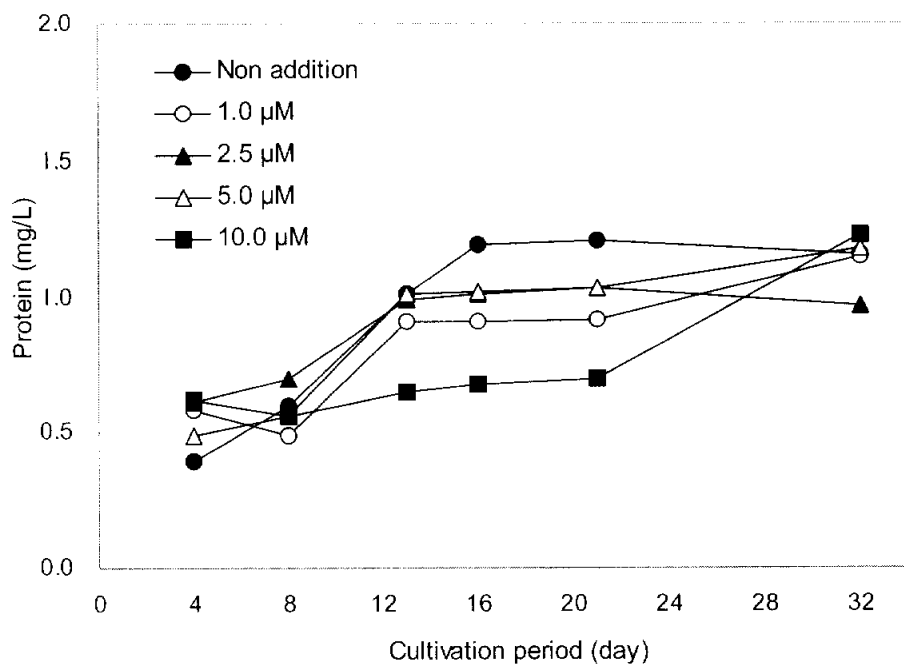


Fig. 20. Production of protein during cultivation of *C. polykrikoides* in media with different phosphate concentrations.

많은 연구자들은 식물 플랑크톤의 특이적인 exopolysaccharide 분비는 각종 생물학적 특징 외에 빛의 제한, 염분의 농도 등 환경적인 요인이 영향을 미치지만 특히, 영양염 조건들이 많은 영향을 미친다는 것을 여러 연구결과로 밝히고 있다(Hellebust, 1974; Myklestad, 1977; Wangersky, 1978; Buzzelli et al. 1997; Rijse. et al. 2000; Staats et al., 2000). Exopolysaccharide의 분비 패턴은 종간 특이성을 보이는데 종에 따라 같은 종간에서도 exopolysaccharide의 생산과 분비는 50배의 차이가 있다는 보고도 있다(Myklestad, 1977). 그러므로 식물 플랑크톤 종에 따른 exopolysaccharide 축적의 속도와 양은 환경적인 요인 특히, 배지의 성분에 영향을 많이 받아서 영양염 조건들에 따라 식물 플랑크톤 배양시 성장단계들이 달라지게 되고, exopolysaccharide의 생산도 조절받게 되는 것이다(Staats et al., 2000).

예를 들어 *C. closterium*의 경우 주로 대수증식기에서 정지기로 가는 도중에 exopolysaccharide가 생산된다고 하였다(Staats et al., 1999a). 그리고 이 종이 정지기로 들어가는 것은 질산염의 결핍 때문이고, 이것이 exopolysaccharide의 축적을 조절한다. 또한 *Ch. affinis*의 경우 배지에서 질산염이 결핍되면서 정지기로 들어가고, 이에 따라 exopolysaccharide가 생산되지만, 인산염을 제한했을 경우 보다 많은 양의 exopolysaccharide가 생산되었다. 이것은 인산염 제한하에서 지질의 합성이 저해되기 때문에 세포의 광합성 능력이 extracellular carbohydrate를 합성하게 하는 것이다. 그리고 세포성장에서 세포분열이 멈추고 세포 단백질과 세포내 carbohydrate의 생산이 멈춘 후 비교적 높은 속도로 exopolysaccharide를 생산한다(Myklestad and Haug, 1972). 그 외에 *Navicular pelliculosa*(Lewin, 1995) 등 기타 종들(Waite et al., 1995)도 질산염을 제한할 경우보다 인산염을 제한할 경우 exopolysaccharide를 많이 생산한다는 결과가 있다. 그러나 *Skeletonema costatum*은 N/P ratio와 독립적으로 영양염의 종류에 상관없이 exopolysaccharide를 생산한다. 이러한 여러 연구결과를 살펴보면 영양염의 농도는 물론이고 N/P ratio까지 중요하다는 것을 알 수 있다. 즉,

polysaccharide의 분비는 대체로 낮은 질소원 또는 인원의 농도에 의해 조절되고, 이렇게 질소원, 인원을 제한하게 되면 intracellular carbohydrate의 생산이 증가되는 것이 아니라 exopolysaccharide의 분비가 증가하는 것이다. 여기서 낮은 농도의 질소원 또는 인원 농도에 의한 polysaccharide의 분비 유도는 세포 내 탄수화물(intracellular carbohydrate)의 축적에 영향을 받지 않고, 다른 조절 메커니즘에 영향을 받는 것으로 생각된다(Staats et al., 2000). 이렇게 증가된 exopolysaccharide matrix는 유기영양염 또는 무기 영양염에 결합하는 고분자 전해질(polyelectrolyte)로 기능함으로써 생태계적으로 매우 중요하다(Admiraal and Werner, 1983). 또한 exopolysaccharide는 phosphatase가 활성화할 수 있는 자리를 제공하고, 저질의 산화에서도 중요한 역할을 한다(Myklestad, 1995).

위의 결과를 통해 *C. polykrikoides*의 경우 영양염 중 인산염의 농도가 제한되고, 질산염의 농도가 높았을 경우 exopolysaccharide의 생산량이 낮았고, 반대로 인산염의 농도가 높고, 질산염의 양이 제한되었을 경우 exopolysaccharide의 생산량이 높았다. 이를 통해 *C. polykrikoides*에서 exopolysaccharide의 생산은 질소원이 중요한 인자중의 하나임을 알 수 있었다.

2) 영양물질의 결핍에 대한 영향

정지기에 물질분비가 활발하기 때문에 정지기를 유도하기 위해 영양물질 결핍에 따른 물질생산을 비교하였다. 배양 후 15일과 20일째 시료를 취하여 생산된 exopolysaccharide, intracellular polysaccharide의 양을 비교하여 Fig. 21에 나타내었다. Exopolysaccharide의 생산량은 정지기 말기에 대조구에서 4.91 mg/L 생산된 것에 비하여 nitrogen과 Mn을 결핍시켰을 때 각각 5.45, 5.53 mg/L로 가장 많은 양이 분비되었고, 비타민을 결핍시켰을 경우는 4.88 mg/L로 분비량의 증가가 거의 없었다. Intracellular polysaccharide의 생산량은 모든 경우에 1.01 - 1.07 mg/L로 거의 비슷하였으나 Fe을 결핍시켰을 때 1.07 mg/L로 최대값을 보였다. 그리고 vitamin을 결핍시켰을 경우 대조구에 비하여 비교적 적은 양이 생산되었다.

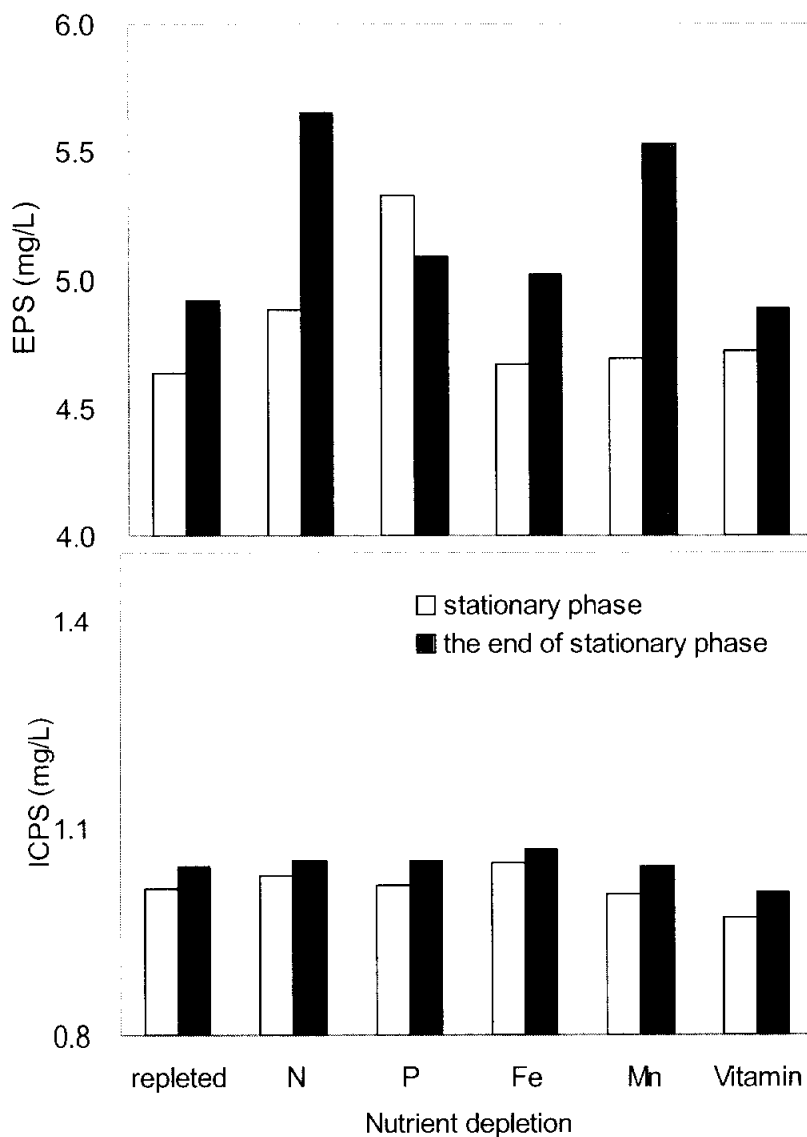


Fig. 21. EPS and ICPS concentration during cultivation of *C. polykrikoides* without N, P, Fe, Mn, or vitamin.

규조류인 *Cylindrotheca closterium*은 N, P, S를 결핍시켰을 경우 exopolysaccharide의 생산량이 증가되었지만, Si, Fe 등을 결핍시켰을 경우는 양의 증가가 없었고, 또 종에 따라서는 P가 결핍되면서 생산량이 증가된다는 결과가 있었는데(Staats, 2000), 이는 생물종 자체의 특성에 의한 것으로 생각된다. Polysaccharide의 분비패턴은 종특이적으로 영양염 제한효과도 종에 따라 매우 다르다. 또한 어떤 영양물질을 결핍시킴으로 intracellular polysaccharide양의 변화는 그다지 없었는데, 이는 exopolysaccharide와 다른 조절 메커니즘을 가지고 있는 것으로 생각된다.

3) 광조건의 영향

물질생산에 빛의 조건이 어떤 영향을 미치는가를 알기 위해 빛의 조건을 24 L 또는 14 L : 10 D로 주어 exopolysaccharide, intracellular polysaccharide 그리고 protein의 양을 비교하여 Fig. 22 - 24에 나타내었다.

배양초기에는 exopolysaccharide의 생산량이 24 L조건에서 더 높았지만 성장이 진행되면서 14 L : 10 D 의 조건에서 각각 5.49, 6.24 mg/L로 암반응시간을 두었을 때 1.13배 더 높은 생산량을 보였다. Intracellular polysaccharide의 생산량도 15일까지는 24 L 조건에서 더 높았지만 20일에는 14 L : 10 D조건에서 1.24 배 더 높았다. Protein의 양은 반대로 14 L : 10 D 조건에서 15일까지는 더 높았지만 20일에는 24 L조건에서 1.25 배 더 높은 값을 보였다.

또한 각각의 조건에서 세포성장속도를 조사해 보면 24 L과 14 L : 10 D 조건에서 각각 0.220 , 0.218 day^{-1} 로 비슷하였으나 exopolysaccharide의 productivity는 0.191 , $0.255 \text{ ng cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 으로 14 L : 10 D 의 조건으로 빛을 주었을 때 더 높았다. 그리고 intracellular polysaccharide의 productivity도 각각 0.031 , $0.048 \text{ ng cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 로 14 L : 10 D 의 경우 더 높은 값을 보였다(Table 9).

Glucan은 diatom에서 저장물질로 이용되고, EPS의 전구체로써 암기동안 EPS의 생산을 위한 탄소와 에너지원으로 사용된다(Myklestad et al., 1982).

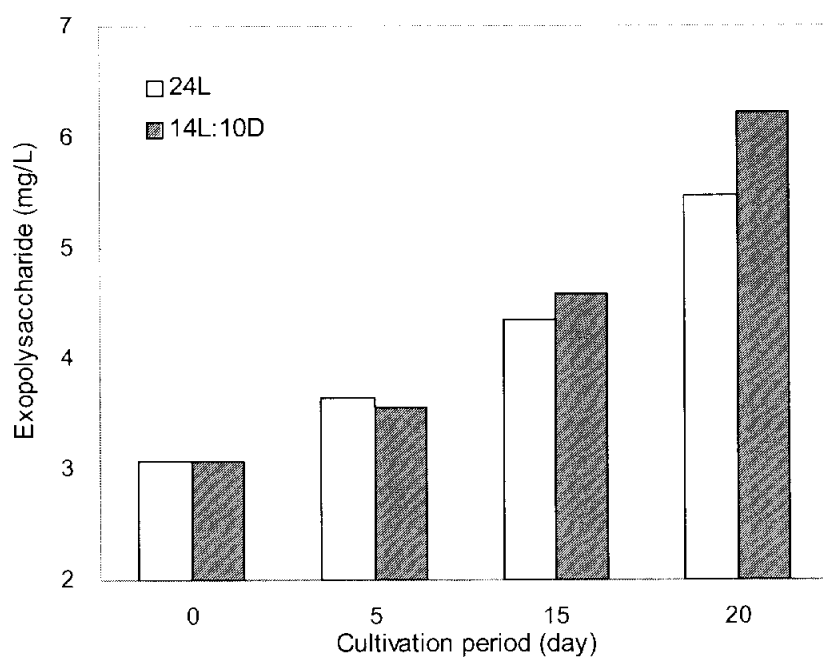


Fig. 22. Production of exopolysaccharide during cultivation under the conditions of different light(24 L or 14 L : 10 D).

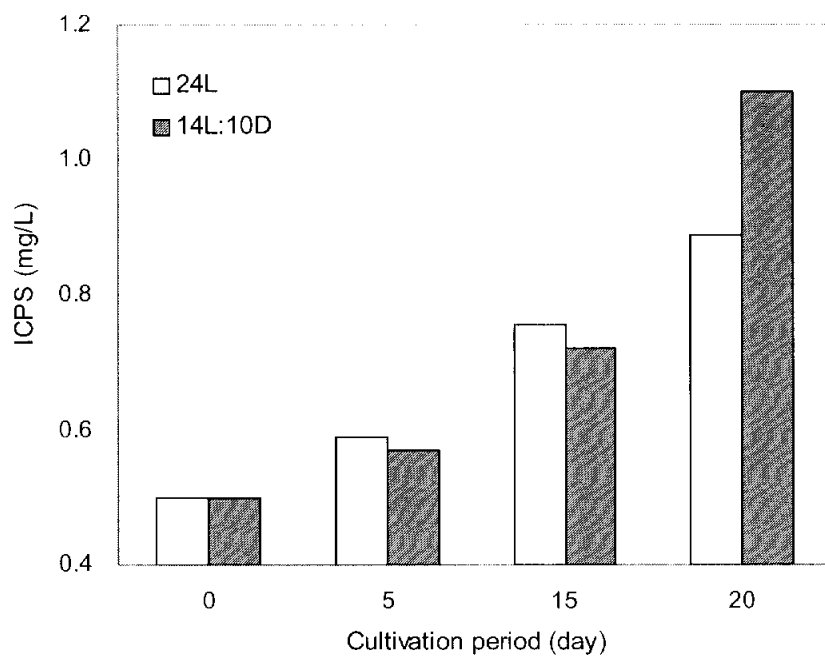


Fig. 23. Production of intracellular polysaccharide during cultivation under the conditions of different light(24 L or 14 L : 10 D).

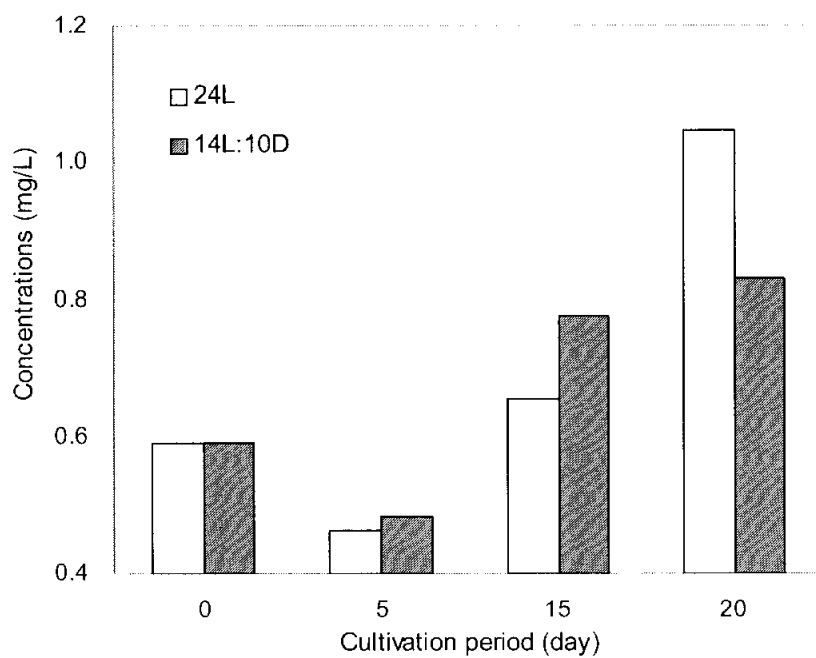


Fig. 24. Production of protein during cultivation under the conditions of different light(24 L or 14 L : 10 D).

Table 9. Specific growth rate and productivity of *C. polykrikoides* at different light condition

Conditions		Max. cell number (cells/mL)	SGR (day ⁻¹)	q _p (ng cell ⁻¹ day ⁻¹)
24L	EPS	2,940	0.220	0.191
	ICPS	2,940	0.220	0.031
14L:10D	EPS	2,850	0.218	0.255
	ICPS	2,850	0.218	0.048

SGR : Specific growth rate

q_p : Specific productivity

Intracellular carbohydrate은 종에 따라 암기(darkness) 또는 명기(light)에서 exopolysaccharide의 합성에 이용된다. 또한 diatom에서의 EPS 생산은 암반응과 관계있는 것이 아니므로 광합성의 CO₂ 동화에 빛의 직접적 영향이 없다는 연구보고도 있다(Smith and Underwood, 1998). Hellebust(1965)는 표층의 빛 강도가 물질분비를 증가시키는 중요한 요인이 되므로 full sunlight에서 세포가 광 손실을 입어서 더 많은 물질이 분비되고, Mague(1980)등은 다른 광조건에서 물질의 다른 분비효과를 보인다고 하였다. 규조류인 *Skeletonema costatum*은 빛이 제한인자(limiting factor)로 작용하여 빛의 강도가 감소하면 물질의 분비가 증가된다고 하였다. Benthic diatom의 경우 intracellular storage carbohydrate가 암기동안 EPS를 합성에 이용되고, 또한 광-의존적 과정에서 EPS가 생산된다는 것이 밝혀져 있다. 그러므로 빛에 대한 물질생산효과도 종에 따라 많은 차이가 있는 것을 알 수 있다. 또한 exopolysaccharide의 화학적성분과 물리적 특성도 성장단계에 따라 다르다는 연구결과가 나와 있다.

4) 수온의 영향

수온에 따른 polysaccharide 성장의 최적조건을 알기 위해 수온을 20, 22, 24, 26 °C로 나누어 polysaccharide와 protein의 생산량을 실험한 결과를 Fig. 25에 나타내었다. 수온 22와 24 °C에서 세포밀도가 더 높았고, 20, 26 °C에서는 세포밀도가 비교적 낮은 값을 보였으나 26 °C에서는 최대세포밀도에 도달하는 시간이 짧아졌다. 이는 생물자체의 특이한 생리적 현상으로 보고된 결과와 동일한 결과를 얻었다(Kim et al., 2001a). Polysaccharide의 생산량은 24, 26 °C에서 6.59 - 6.63 mg/L의 비교적 높은 값을 보였고, protein의 농도는 22 - 24 °C에서 20일 이후 28일에도 계속 1.37 - 1.61 mg/L의 값을 보이는 것에 비해 26 °C에서는 15일부터 1.45 mg/L의 값을 보이다가 28일에는 1.33 mg/L로 감소하는 경향을 보였다.

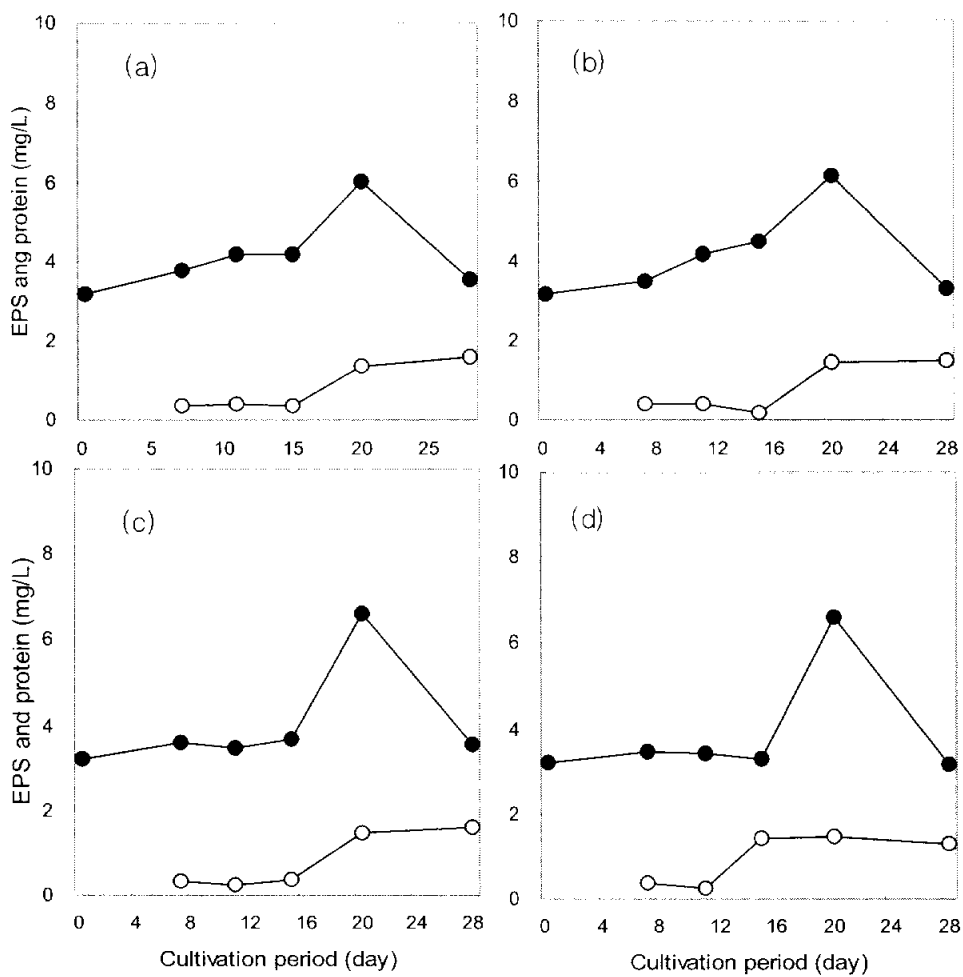


Fig. 25. Concentration of EPS(●) and protein(□) concentration during cultivation of different temperature conditions. (a) 20 °C, (b) 22 °C, (c) 24 °C, (d) 26 °C.

세포의 성장속도는 수온에 따라 거의 비슷하였으나 24 ℃일 경우 0.207 day⁻¹으로 가장 높은 값을 보였다. Productivity는 온도가 증가함에 따라 0.188 - 0.229 ng cell⁻¹ day⁻¹로 증가하여 26 ℃에서 가장 높은 값을 보였다(Table 10).

5) 반연속 배양에 따른 polysaccharide의 생산

해양에서는 연속적으로 영양염이 공급되기 때문에 실험실에서의 batch culture의 한계점을 보완하기 위해 반연속 배양을 실시하였다. 영양염 중 질소원을 제한하였을 경우 polysaccharide의 생산이 증가됨에 따라 질산질소와 인산인을 각각 제한한 상태로 dilution rate를 0.013 - 0.075 day⁻¹로 나누어 실험한 결과를 Fig. 26, 27에 나타내었다.

실험결과 모든 조건에서 배양시 유도기가 매우 짧고 바로 대수증식기로 접어들어 최대밀도까지 성장하는 결과를 얻을 수 있었으며 Kim(1999)의 결과와 일치하였다. 그리고 N-limited 조건에서는 dilution rate 0.050 day⁻¹에서 세포성장속도와 productivity가 각각 0.22 day⁻¹, 0.89 ng cell⁻¹ day⁻¹로 가장 높은 값을 보였다. 또한 P-limited 조건에서도 동일하게 dilution rate 0.050 day⁻¹에서 세포성장속도와 productivity가 각각 0.23 day⁻¹, 0.67 ng cell⁻¹ day⁻¹로 최대값을 보였다. Dilution rate가 0.050 day⁻¹에서 배양시간에 따른 세포밀도와 exopolysaccharide의 생산량을 비교하면 N-limited 조건에서는 정지기가 없이 바로 소멸기로 들어갔으며 16시간에 exopolysaccharide의 최대생산을 보였다. 그리고 P-limited 조건에서는 정지기가 끝난 후 소멸기에 최대생산을 보였다(Fig. 28, 29).

N-limited 조건에서 semi-continuous의 경우 batch culture에 비해서 productivity가 4배 이상 증가됨을 알 수 있었다.

Table 10. Specific growth rate(SGR) and productivity of *C polykrikoides* at different temperature conditions

Temperature (°C)	Incubation days (t ₂ -t ₁)	Max. cell numbers (cells/mL)	SGR (day ⁻¹)	q _p (ng cell ⁻¹ day ⁻¹)
20	20	3,210	0.200	0.188
22	20	3,400	0.204	0.188
24	20	3,540	0.207	0.213
26	20	3,140	0.199	0.229

SGR : Specific growth rate

q_p : Specific productivity

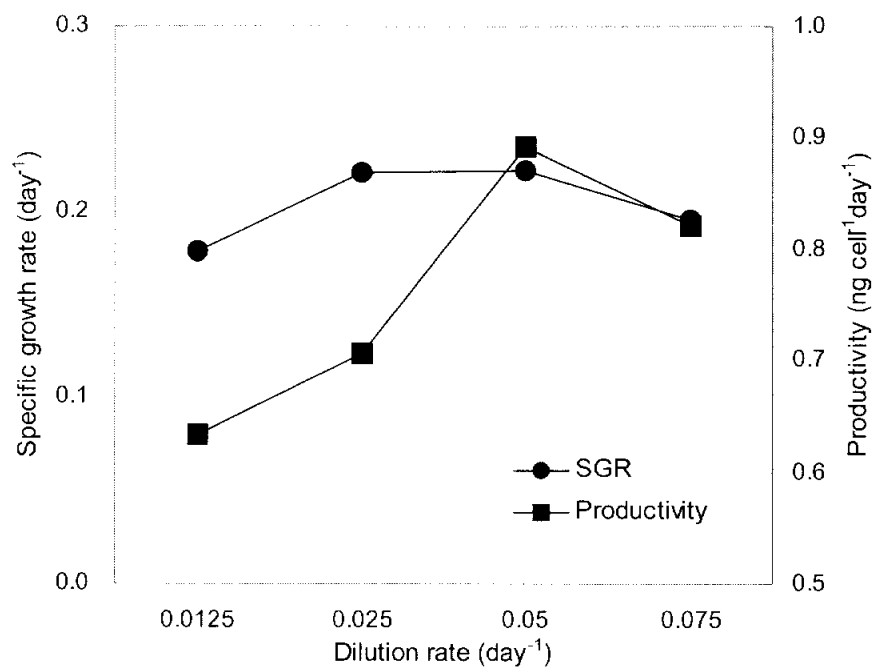


Fig. 26. Specific growth rate(SGR) and productivity in N-limited semi - continuous culture at different dilution rates.

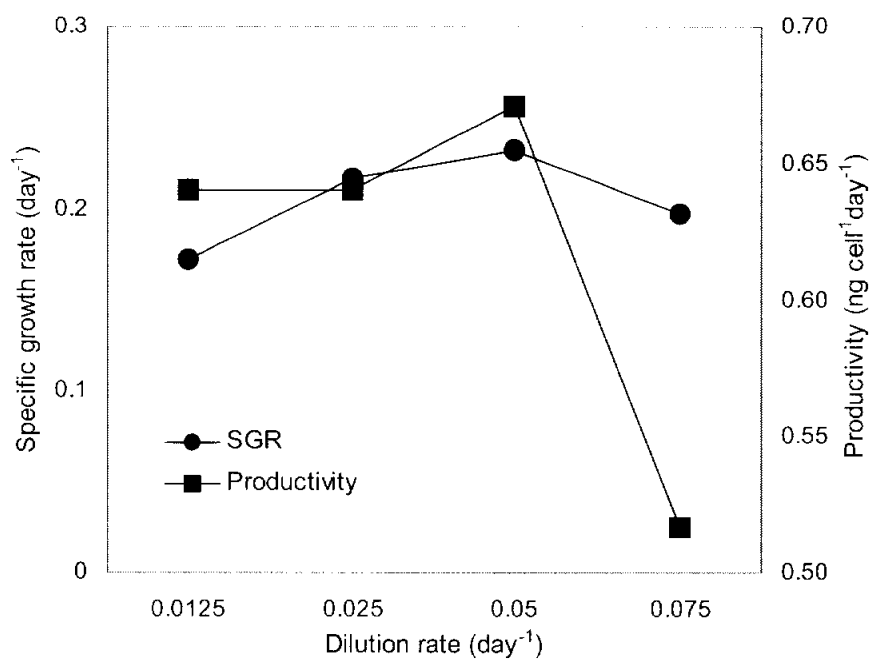


Fig. 27. Specific growth rate(SGR) and productivity in P -limited semi - continuous culture at different dilution rates.

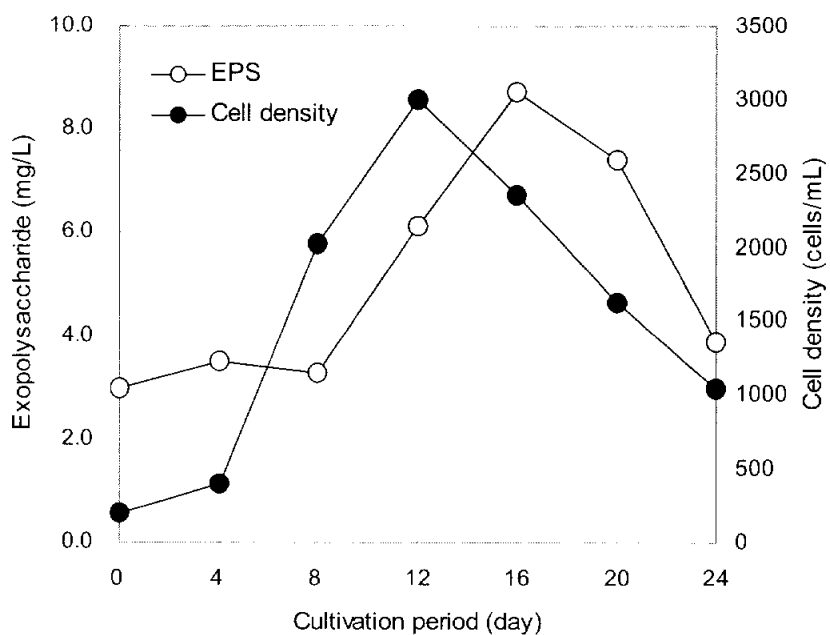


Fig. 28. Exopolysaccharide production and cell density in N - limited semi - continuous culture at the dilution rate of 0.05 day^{-1} .

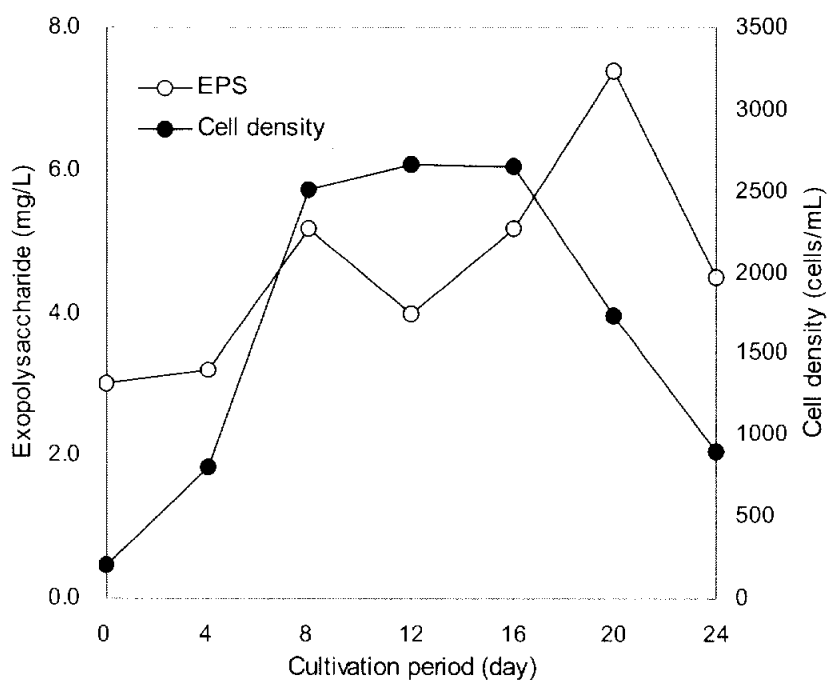


Fig. 29. Exopolysaccharide production and cell density in P - limited semi - continuous culture at the dilution rate of 0.05 day^{-1} .

3. 적조 발생 전후의 수질 환경과 식물 플랑크톤 군집의 특성

1) 수질분포 특성

C. polykrikoides 적조발생 전후의 식물 플랑크톤 군집은 환경요인들의 변화와 해역의 해양학적 특성에 따라 다르다. 또한 이 식물 플랑크톤의 종조성과 출현수는 환경요인에 영향을 받고, 환경요인이 적조 발생 후 *C. polykrikoides*의 유기물질 생산에 많은 영향을 미친다. 따라서 적조 발생 전후의 수질 환경과 식물 플랑크톤의 군집변화를 통해 해양생태계의 특성을 알기 위해 현장실험을 실시하였다.

(1) 2002년 유해적조의 특징

2002년에는 7월초부터 태풍 "RAMMASUN", "NAKRI", "FENGSHEN"의 영향을 받았고, 8월 6일부터 8월 15일까지 10일간 집중강우로 인하여 통영연안에 482.5 mm의 비가 내렸다. 그리고 8월 30일부터는 태풍 "RUSA"의 영향으로 3일간 강풍과 함께 190 mm 가량의 비가 내렸다(Fig. 30).

2002년도 적조는 남해안 여수 붓돌바다에서 8월 2일 최초 발생하여 전년 대비 2주정도 조기 발생하였고, 통영연안에서는 8월 4일 최초 발생하여 8월 9일 이후 고밀도로 확산되었다. 또한 적조는 9월초 강한 태풍 및 일사량 증가의 영향으로 소강과 확산을 반복하다가 9월 18일 이후 전해역에서 적조가 약화되어 9월 27일 적조주의보가 해제되었다(Fig. 31). 2002년도 적조는 최장기간인 56일간 발생하였으며 집중강우 후 8월 18일에서 8월 28일까지 내만해역에서는 무해성 규조 적조, 외측수역은 유해성 *Cochlodinium* 적조가 발생하여 지금까지 *Cochlodinium* 적조발생기간에는 80 % 이상이 *Cochlodinium* 만으로 우점한 단독종 적조인 것과는 다르게 혼합적조를 형성하였다.

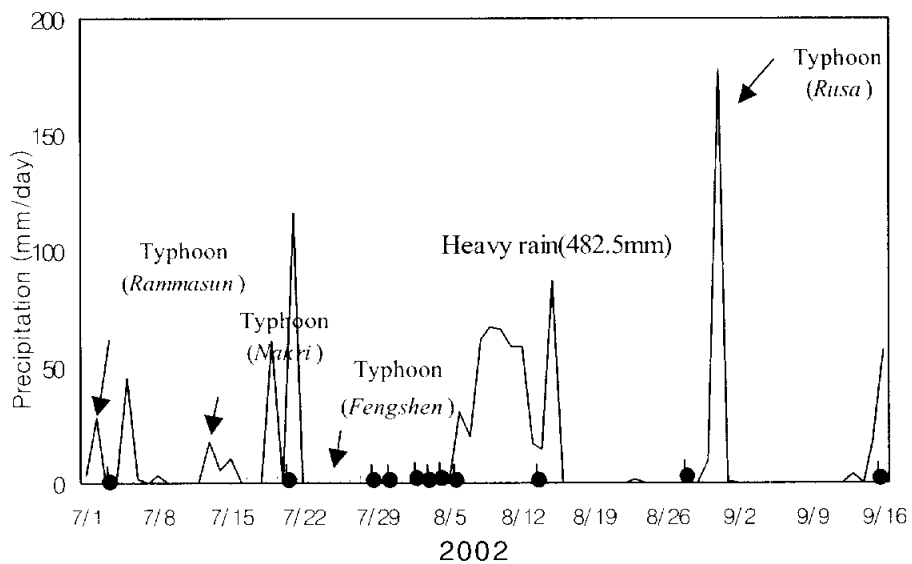


Fig. 30. Seasonal variations of precipitation and typhoon at Tongyeong, 2002 (Solid circles are survey date).

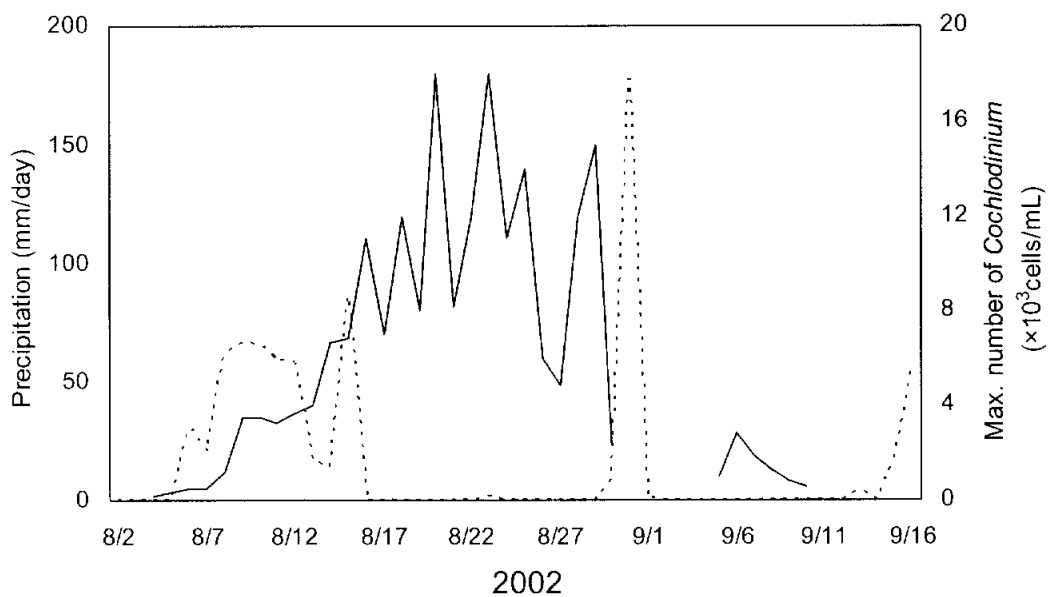


Fig. 31. Variation of *Cochlodinium* cell density during the period of red tide outbreak off the coast of Tongyeong, 2002 (solid line : cell density, dotted line : precipitation).

(2) 수질학적 특징

수온은 표층 25.34 ℃까지 상승되었다가 8월 14일에 22.15 ℃까지 떨어졌으나 이후 다시 일사량의 증가로 인하여 8월 29일 25.76 ℃까지 상승되었다(Fig. 32).

염분은 7월초부터 8월초까지 수층별로 거의 균등한 31.58 - 31.74의 염분농도를 보이다가, 집중강우로 인하여 표층 염분이 평균 28.73까지 떨어져서, 표·저층사이에 3 이상의 염분차이가 나는 염분약층을 형성하였다. 이후 8월 16일부터 8월 29일까지는 강우가 없었는데도 불구하고 계속 표·저층사이에 2.8의 높은 염분차로 계속하여 염분약층이 지속되었다..

용존산소는 8월 29일에 9.97 mg/L로 매우 높은 값을 보였는데, 이는 집중강우로 인하여 영양염이 증가되어 식물 플랑크톤의 생물학적 활동이 왕성하여 수중에 용존산소가 증가되었기 때문으로 사료된다.

암모니아는 적조발생초기인 8월 4일에 0.63 μM 로 낮은 값을 보였다가 집중강우 후인 8월 14일에 표층농도 4.84 μM 로 높은 값을 보였고, 이후 8월 29일에도 표·저층 모두 3.0 μM 이상의 높은 값을 보였으나, 9월 18일에는 표층 0.05 μM 로 예년에 비해 매우 낮은 값을 보였다(Fig. 33).

질산질소도 8월 중순의 집중강우로 인하여 표층 평균 10.10 μM 로 매우 높아졌으나, 8월 29일에는 2.40 μM 의 값으로 낮아졌다. 2002년의 경우 장기간의 집중강우로 인하여 육상기원물질의 대량 유입과 저염분 현상으로 인하여 적조 대량 증식시기에 용존 무기질소가 감소한다는 예년의 결과와는 다른 결과를 얻었다(Yang et al., 2000).

인산인은 적조발생초기인 8월초에는 표층보다 저층의 농도가 0.54~0.70 μM 로 더 높았는데, 이는 7월 중순 이후 태풍의 영향으로 저층이 교란되어 저층으로부터 인산인이 많이 유출된 것으로 추측할 수 있다. 그러나 집중강우 후 표·저층의 농도차가 0.15 μM 정도로 낮아졌는데 이는 집중강우 및 태풍으로 표·저층수의 혼합 및 육수유입으로 인해 인산인이 유입된 것으로 생각된다.

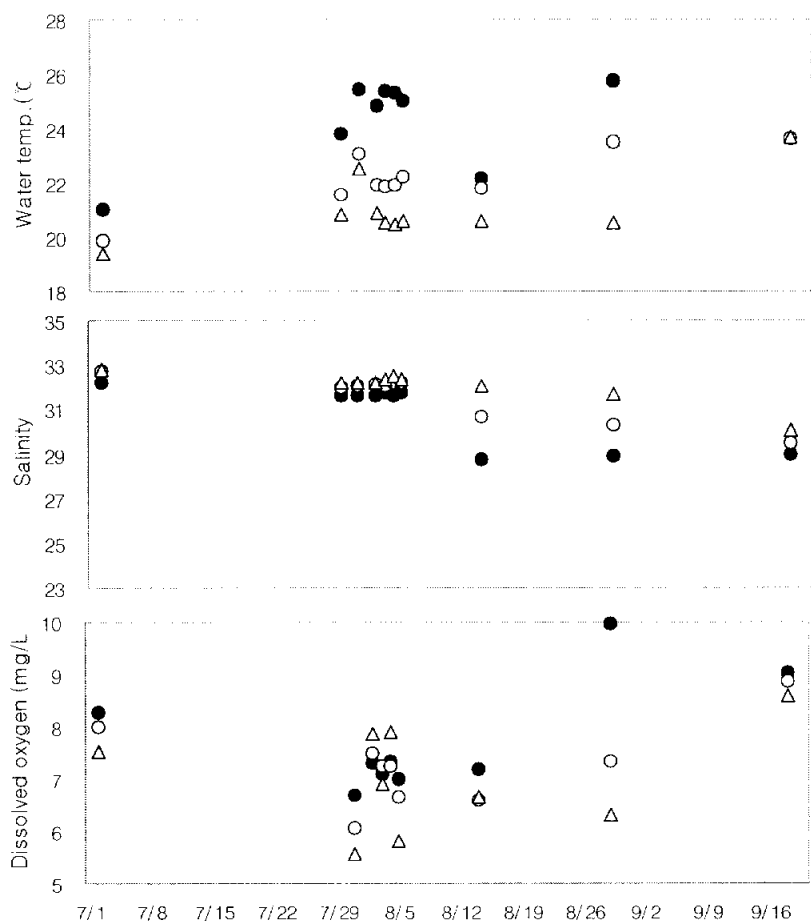


Fig. 32. Mean values of water temperature, salinity and dissolved oxygen in the coastal waters off Tongyeong, 2002 (● : surface, ○ : middle, △ : bottom).

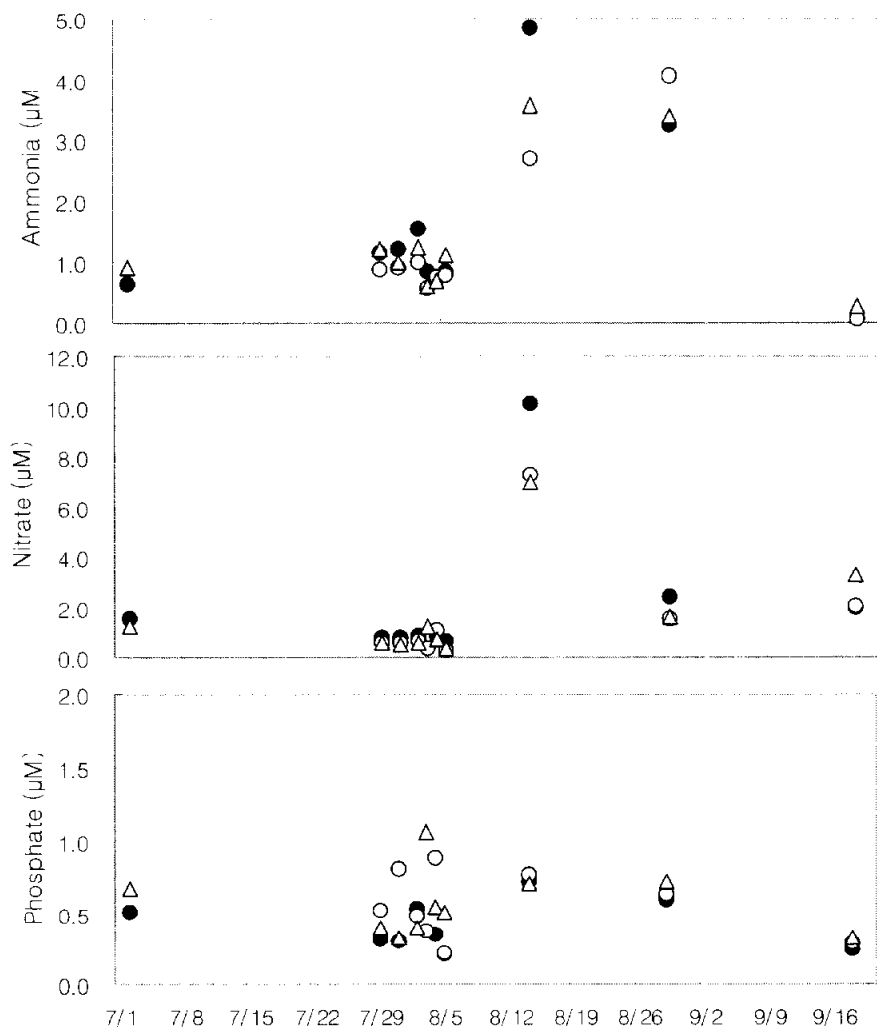


Fig. 33. Mean values of ammonia, nitrate and phosphate in the coastal waters off Tongyeong, 2002(● : surface, ○ : middle, △ : bottom).

식물 플랑크톤 현존량은 영양염 농도 증가와 함께 증가하여 8월 14일에 최대값을 보였다가 이후 감소하였다.

2) 식물 플랑크톤의 현존량 및 종조성

조사 기간동안 식물 플랑크톤의 종조성은 총 29속 48종이 동정되었는데 분류군별로는 규조류가 15속, 27종으로 전체의 51.8 %를 점하였고, 다음으로 와편모조류로 11속 18종으로 38.0 %, 그리고 규질편모조류로 2속, 2종으로 6.8 %, 유글레나조류가 1속, 1종으로 3.4 %를 점하였다. 남해연안의 식물 플랑크톤 종수가 Park(1980)의 보고에서는 60종 이상이 나타났다고 보고하였으나 Lim et al.(1999)의 연구에서는 8 - 30종으로 매우 단순화되었다는 보고와 같이 본 논문에서도 48종이 출현하여 다른 해역의 결과와 비교하여 남해안의 식물 플랑크톤 종수가 점차 단순화되어간다고 생각된다(Shim et al. 1995, Shim and Yeo, 1988). 출현종수는 *C. polykrikoides* 적조발생전후로는 많았지만 적조발생기간 동안에는 현저하게 감소하는 경향을 보였다. 조사기간 중 규조류는 거의 모든 시기에 출현되는 반면, *C. polykrikoides*가 속한 편모조류는 일정 시기에 집중적으로 출현하는 경향이 있어 조사 시기에 따라 많은 출현율의 차이를 보였다. 대부분의 정점에서 적조발생 전에는 규조류가 편모조류에 비하여 90 %이상을 차지하였지만 적조가 본격적으로 발생한 8월 5일에는 정점에 따라 71.43 - 100 %를 차지하였으나, 8월 14일에 0.43 - 80.00 %, 8월 29일에 3.61 - 75.00 %로서 적조 발생 기간동안 규조류가 현저히 감소되는 경향을 보였으며, 8월 5일 이후 와편모조류 특히 *C. polykrikoides*의 양이 증가되었다.

그러나 예년에 *C. polykrikoides* 적조 발생 기간 동안에는 80 %이상이 *C. polykrikoides* 단독 종이였으나 2002년에는 집중강우 후 내만해역에 규조적조가 발생하였다. 정점에 따라서는 규조류와 편모조류의 양이 현저한 차이를 나타냈는데 특히 정점 2의 경우 다른 정점에 비하여 적조발생 전에도 편모조류의 양이 많았으며 적조 발생 기간에도 편모조류의 뚜렷한 양적 증가를 보이지 않았

다. 8월 5일에는 정점 6에서, 8월 14일에는 정점 1과 4, 8월 29일에는 정점 5에서 *C. polykrikoides*의 개체수가 높았는데, 이를 통해 각 조사 시기와 정점에 따라 현존량 차이가 클 수 있었다. 이후 9월 18일에는 대부분의 해역에서 적조가 소멸되었고 일부 정점에서만 *C. polykrikoides*가 나타났다.

식물 플랑크톤의 종은 전 조사기간을 통해 규조류로는 *Chaetoceros* spp., *Nitzschia* spp., *Skeletonema costatum*, *Thalassionema nitzschioides* 등이 우점하였고, 적조 발생기간동안 대부분의 조사정점에서 *C. polykrikoides*가 출현하였으나, 일부해역에서 *Alexandrium* spp.가 우점하였고, 다른 와편모조류들은 출현은 하였으나 우점종은 아니었다(Table 11). *Chaetoceros* spp.는 정점별로 0-100 %, *Nitzschia* spp. 0.98-65.6 %, *Skeletonema costatum* 0-57.9 % 우점하였고 *C. polykrikoides*는 정점에 따라 0-100 %로 우점하였다. 적조발생기에는 거의 와편모조류인 *C. polykrikoides*이 0-100 %까지 우점을 하고 최고밀도도 20,000 cells/mL 이상이 된다.

3) 다양도와 균등도

식물 플랑크톤군집의 특성을 파악하기 위해 각 정점별, 조사시기별 다양도 지수 및 균등도 지수를 조사한 결과를 Fig. 34에 나타내었다. 다양도 지수는 조사일자별로 보면 정점 4를 제외한 모든 정점에서 적조발생 직전인 8월 2일에 0.95-2.33으로 가장 높은 값을 보였다. 이는 하계 통영만에서 Ko(1999)가 연구한 0.7-1.3보다 높은 결과이다. 이후 적조가 통영에 최초 본격적으로 발생한 8월 4일에는 0.04-0.35로 가장 낮았다. 정점별로 보면 정점 3에서 0.06-2.33으로 가장 높은 값을 보였고, 정점 4에서 0.03-0.99로 가장 낮았다. 정점 4의 경우 다른 정점과는 다르게 8월 2일 보다는 8월 3일에 0.99로 가장 높았고, 이후 8월 14일에 0.03으로 가장 낮았다. 정점 2와 3은 8월 4일에 0.04-0.06으로 매우 낮은 값을 보였다. 이를 통해 적조발생 직전인 8월 2일에 다양한 식물 플랑크톤 종조성을 보이다가, 8월 4일 적조가 발생되면서 종 다양도가 낮아졌으며, 이는 이미 앞에서 언급한 결과 및 Raymont(1980)와 일치함을 나타내었다. 그리고 정

Table 11. The dominant species of phytoplankton in the coastal waters off Tongyeong from July to September, 2002

Date	Dominant species	Dominance ratio (%)
2 July	<i>Chaetoceros</i> spp.	41.2-87.2
	<i>Skeletonema costatum</i>	10.1-23.5
29 July	<i>Chaetoceros</i> spp.	20.7-70.5
	<i>Skeletonema costatum</i>	243.6-43.7
31 July	<i>Chaetoceros</i> spp.	0-82.7
	<i>Coscinodiscus</i> spp.	0-31.6
	<i>Skeletonema costatum</i>	0-54.0
	<i>Thalassionema nitzschioides</i>	0-33.3
2 August	<i>Chaetoceros</i> spp.	14.0-85.7
	<i>Navicula</i> spp.	0-22.2
	<i>Skeletonema costatum</i>	0-62.8
3 August	<i>Chaetoceros</i> spp.	0-81.3
	<i>Coscinodiscus</i> spp.	0-60.0
	<i>Leptocylindrus</i> spp.	0-22.2
	<i>Skeletonema costatum</i>	0-24.5
	<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	0-72.7
4 August	<i>Chaetoceros</i> spp.	0.6-98.3
	<i>Skeletonema costatum</i>	0-97.8
5 August	<i>Chaetoceros</i> spp.	0-100.0
	<i>Leptocylindrus</i> spp.	0-42.9
	<i>Skeletonema costatum</i>	0-32.4
	<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	0-100.0
14 August	<i>Chaetoceros</i> spp.	0-33.3
	<i>Skeletonema costatum</i>	0.3-46.7
	<i>Alexandrium</i> spp.	0.2-50.0
	<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	0-99.2
29 August	<i>Chaetoceros</i> spp.	1.1-26.6
	<i>Nitzschia</i> spp.	0-32.8
	<i>Skeletonema costatum</i>	0-29.4
	<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	0-95.2
18 September	<i>Chaetoceros</i> spp.	2.4-57.3
	<i>Nitzschia</i> spp.	1.0-65.6
	<i>Skeletonema costatum</i>	0-57.9
	<i>Cochlodinium polykrikoides</i>	0-77.6

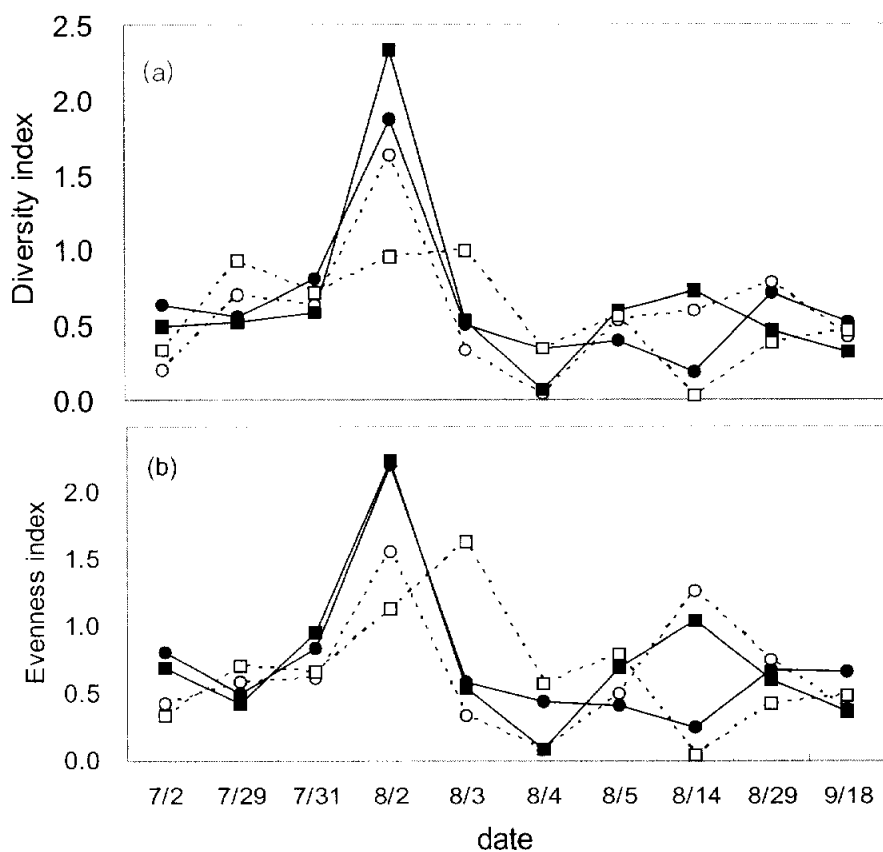


Fig. 34. Diversity (H') index (a) and evenness (J) index (b) of phytoplankton at the sampling stations (●: St. 1, ○: St. 2, ■: St. 3, □: St. 4).

적조발생 전후의 종 다양도 특성을 강하게 나타냈다.

균등도 지수도 조사일자별로 보면 정점 4를 제외한 모든 정점에서 대체로 8월 2일에 1.13~2.24로 높은 값을 보였고 이후 8월 4일에 0.09~0.54로 가장 낮은 값을 보였다. 정점별로는 정점 3에서 가장 높은 값을 보였으나 정점 4의 경우 다양도 지수와 동일하게 8월 3일에 0.58로 가장 높은 값을 보였다. 정점 2와 3은 8월 4일에 0.09, 정점 4는 8월 14일에 0.05로 매우 낮은 값을 보였다.

4) 수질환경과 식물 플랑크톤의 변동

식물 플랑크톤 우점종별로 주성분분석(PCA)을 한 결과 요인 1, 2, 3이 각각 25.69, 24.29, 18.38 %로 총변동량의 68.65 %를 설명하였다. 요인 1에 대해 *Chaetoceros* spp., *Skeletonema costatum*이 강한 양의 상관, *C. polykrikoides*, *Alexandrium* spp.는 강한 음의 상관을 가졌다. 이를 통해 규조류와 편모조류간에 상반되는 우점을 나타냄을 알 수 있다.

수질환경 및 식물 플랑크톤양 등을 분석하여 적조발생기의 변동요인을 알아보기 위해 수질항목을 평균하여 일자별로 PCA분석을 한 결과 요인 1, 2, 3이 각각 63.07, 13.64, 12.62 %로 총변동량의 89.32 %를 설명하고 있었다(Fig. 35). 특히 요인 1은 염분과 높은 음의 상관을 보이고, 암모니아, 질산질소, 아질산질소, 인산인, 식물 플랑크톤 양과 높은 양의 상관을 보였다. 이를 통해 하계에 강우와 이로 인해 육상으로부터 담수유입이 됨에 따라 영양염의 농도가 증가되고, 또한 식물 플랑크톤의 양도 증가됨을 알 수 있다. 그리고 식물 플랑크톤의 양을 규조류와 편모조류만을 나누어 분석한 결과를 보면, 규조류만을 분석했을 때는 정반대의 결과를, 편모조류만을 분석했을 때는 동일한 결과를 얻었다. 부영양화와 *C. polykrikoides* 적조가 음의 상관관계를 나타내고 있다는 결과와는 상반된 보고(구와 이, 2002)가 있으며, 적조발생전의 규조류의 농도에 비해, 적조발생기에 *C. polykrikoides*의 농도가 훨씬 높았고, 이시기에 집중강우로 영양염

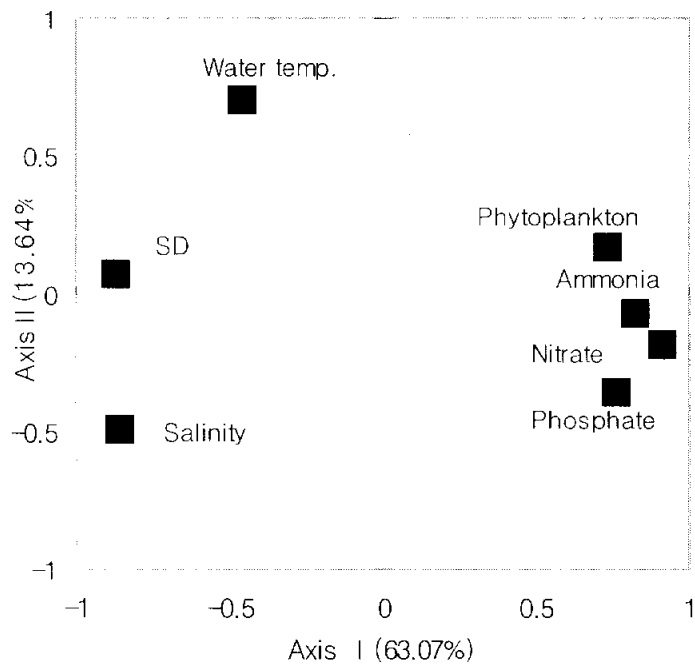


Fig. 35. Distributions of factor loading by PCA for water quality 1st and 2nd component.

의 농도가 높아 예년의 결과와 다른 차이가 있었으나 이 같은 현상은 2002년의
해황적 특성에 기인되는 것으로 생각된다(Lim et al., 2003). 요인 2는 하계에
기상이 전체 변동에 많은 영향을 미침을 알 수 있었다. 적조주발생기에는 *C.*
*polykrikoides*가 해역에 따라서 발생농도범위가 다르게 나타나지만 20,000
cells/mL 이상의 세포수를 나타낼 경우 해역에서는 75 mg/L이상의
polysaccharide를 생산함에 따라 용존 유기탄소를 증가시킨다.

제 2 절 Polysaccharide의 특성

1. Polysaccharide가 어류에 미치는 영향

1) *C. polykrikoides* 적조로 인한 어류폐사의 원인

연도별로 통영연안에서 적조가 발생하였을 때의 최고밀도와 어류폐사가 일어난 시기를 조사하여 Fig. 36과 같은 결과를 얻었다. 연도에 상관없이 적조가 발생한 후 5,000 cells/mL 이상의 적조발생시기의 중간단계에서 많은 폐사가 있었으며 적조가 거의 끝난 시기에도 간접적인 영향으로 어류폐사를 일으켰다.

Kim 등(2000a)은 참돔의 경우 *C. polykrikoides*가 3,000, 5,000 그리고 8,000 cells/mL가 있는 해수에서 24시간 내에 30, 60, 100 %의 치사율을 보였다. 반면에 넘치는 8,000 cells/mL에 노출되었을 때 30 %의 치사율을 나타낸다고 하였다. 그리고 어류 양식장에서도 활동성이 높은 방어 등의 폐사가 제일 먼저 일어나는 것으로 보아 결과적으로 고기의 폐사율은 활동성 어류에 높고, *C. polykrikoides*의 고기를 폐사시키는 역치밀도(threshold lethal density)는 약 3,000 cells/mL이었다.

C. polykrikoides 적조 발생에 의한 어류폐사의 원인을 살펴보면, 다량의 점액물질을 생산하여 이 물질 등이 어류의 아가미에 부착하여 물로부터의 산소공급을 저해시켜 어류가 호흡곤란을 받아 질식사된다. 또한, 적조생물자체가 어류의 아가미 세포에 산화적 피해를 야기시켜 세포의 기능을 저하시키고, 아가미에 부착하면 mucus 세포를 자극시켜 점액성분을 과다 분비시켜 아가미 표면을 재도말시켜 산소공급을 물리적으로 방해하는 것으로 여겨진다. 또한 적조에 노출된 어류는 아가미 mucus의 glycoprotein 조성의 변화를 유발시키고, 아가미 조직의 라멜라 세포의 손상을 야기시켜 복합적인 요인으로 폐사가 일어나는 것으로 연구되어 있다(Kim et al., 1999, 2000a, 2000b, 2001).

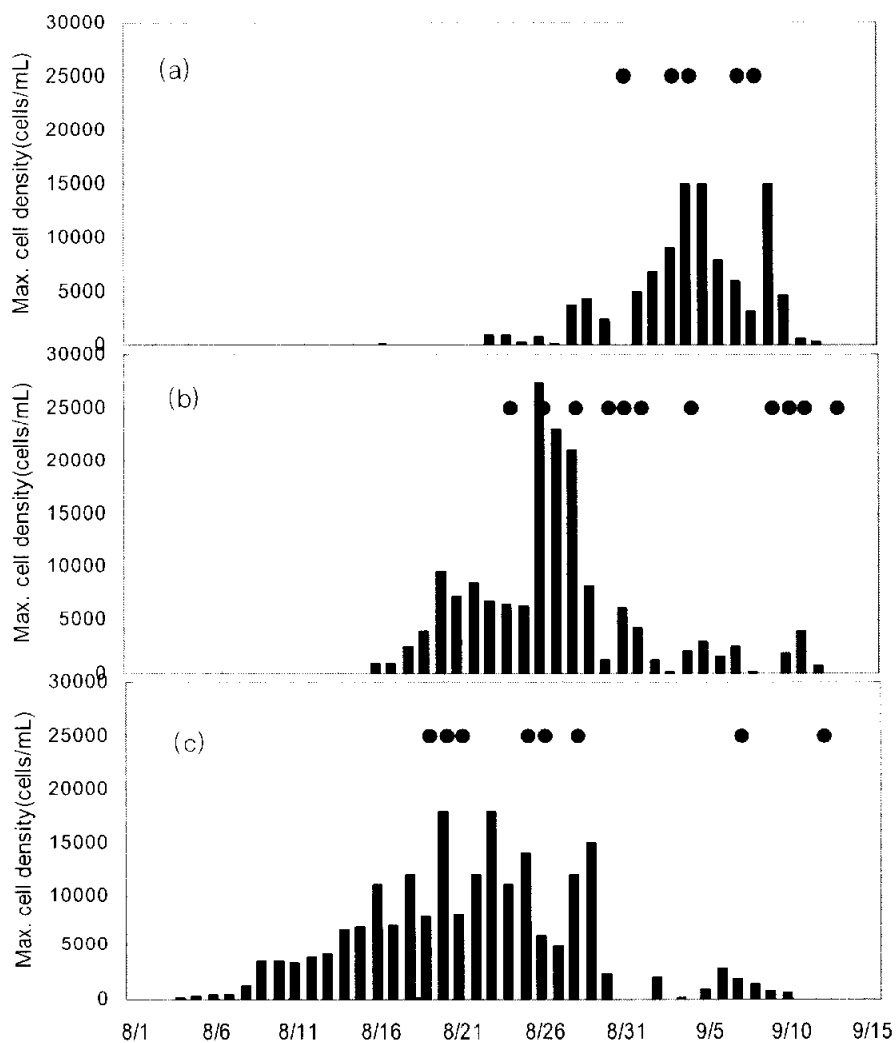


Fig. 36. Annual variations on maximum number of cell and the mortality of fishes by *C. polykrikoides* red tide outbreak in Korean Coastal Waters (a) 2000, (b) 2001, (c) 2002 (Solid circles are date of mortality).

Fig. 37은 *C. polykrikoides* 적조로 인해 어류가 폐사되었을 경우 아가미 조직을 떼어내어 현미경으로 관찰한 결과이다. Shim(1998)에 의하면 적조에 의해 폐사된 어류는 아가미 새엽의 gill lamella 상피외부가 박리되고, Kim 등 (2002)의 연구결과를 통해 아가미조직의 mucus에서 glycoprotein이 변화함을 알 수 있었다. 이를 통해 *C. polykrikoides* 점액질이 기계적인 영향을 미쳐 어류 아가미의 세포막에 구조적 손상을 일으켜 어류가 폐사되는 것과 밀접한 관련성이 있는 것으로 추정하고 있다. 결국 아가미에 gas exchange가 되지 않아 폐사가 일어나는데 이는 적조생물 자체가 점액질을 분비하여 막을 형성함을 알 수 있고 결국은 위의 같이 복합적인 원인으로 인해 어류폐사가 일어나는 것이다 (Kim et al., 2002).

2) Polysaccharide가 어류에 미치는 영향

적조생물이 분비하는 점액물질의 어류에 대한 영향을 알아보기 위하여 참돔을 적조 여과수에 농도별로 넣어 PO₂와 pH를 비교한 결과를 Fig. 38에 나타내었다.

20,000 cells/mL 적조 여과수에 어류를 담근지 24시간 후에 어류는 거의 죽기 직전의 상태로 polysaccharide의 농도에 따라 pH는 7.12에서 7.01로 약간의 변화를 보였으며 특히 PO₂는 75.0 mmHg에서 44.3 mmHg로 많이 낮아졌다 (Table 12). 이는 적조체가 5,000 cells/mL 있는 적조수에 어류를 넣었을 경우 산소분압이 비슷한 결과를 얻었다(Kim et al., 2000). 본 결과를 통해 분비한 점액물질 자체가 PO₂를 떨어뜨리는데 영향을 미침을 알 수 있으나 그 원인에 있어서는 지속적인 연구가 필요하다고 생각된다.

또한 어류 폐사의 원인에 있어 Kim(2000) 등은 한국에서 분리한 *C. polykrikoides*의 경우 활성산소를 발생시켜 아가미 세포에 산화를 야기시켜 어류를 폐사시키는 직접적인 원인이 된다고 하였으나, Kim(2002)등이 일본에서 분

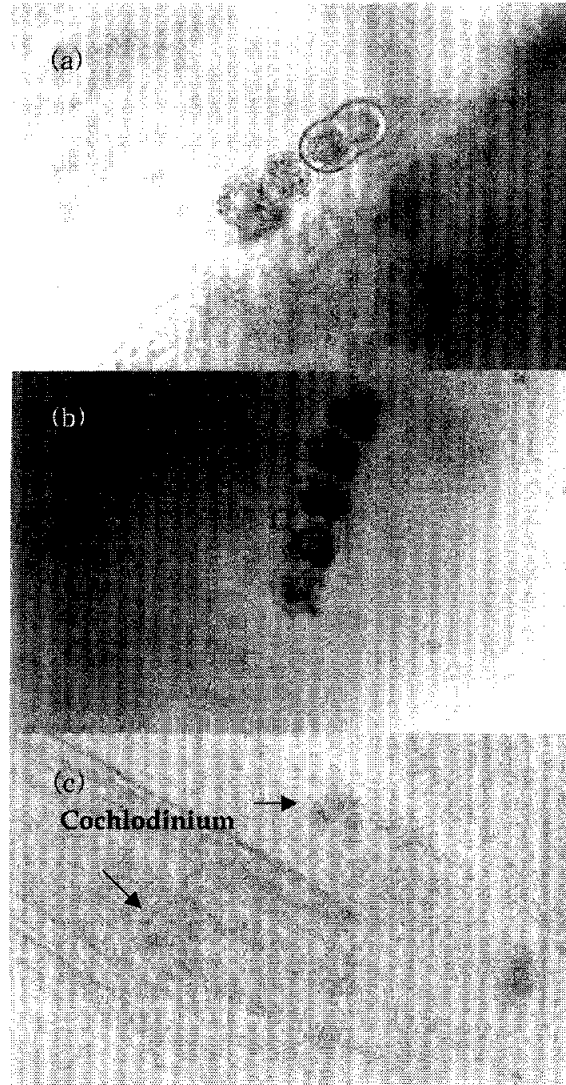


Fig. 37. Light microscopic views of gill filament of the red sea bream(a, b) and block rockfish(c) exposed to *C. polykrikoides*.

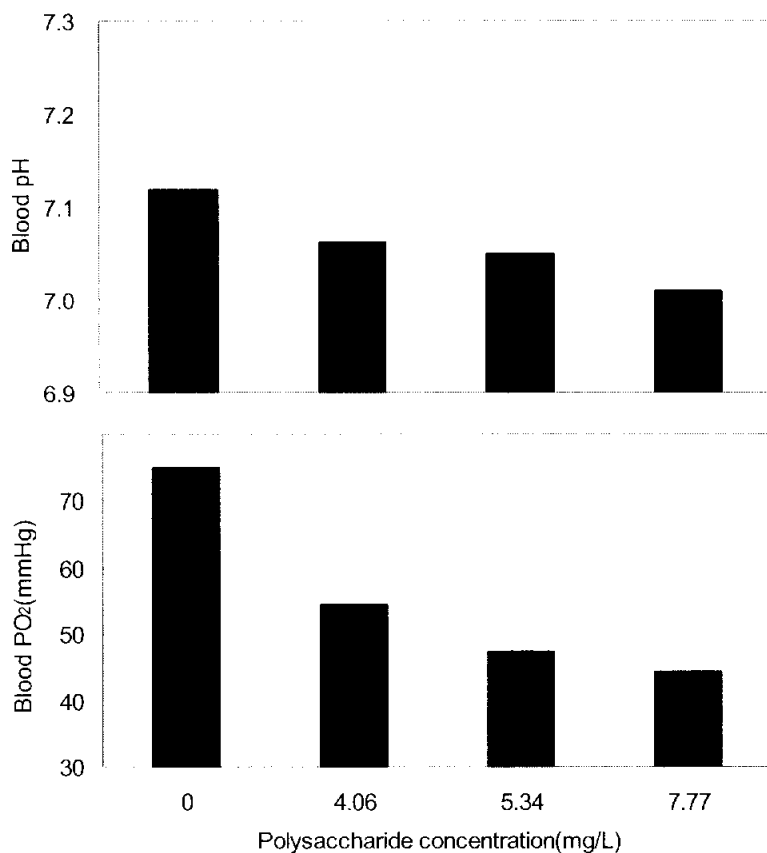


Fig. 38. Changes of blood pH(A) and PO₂(B) of red sea bream by exposure at different polysaccharide concentration for 24hrs.

Table 12. Changes in blood pH and PO₂ of red sea bream exposed to polysaccharide solution

Fish		pH	PO ₂ (mmHg)
Red sea bream	Control fish	7.12	75.0
	Struggling fish*	7.01	44.3

*The fish exposed to polysaccharide solution for 24hrs.

리한 *C. polykrikoides*에서는 활성산소를 거의 발생시키지 않고, 분비된 물질 중 어떤 부분에서 어류에 해를 야기한다고 하였다. 전 세계적으로 *C. polykrikoides*에 의해 어류 폐사가 일어나지만 그 폐사 원인은 나라마다 다르고 또한 명확하게 밝혀지지 않고 있다(Guzmán et al., 1990). 그러나 공통적으로 *C. polykrikoides* 적조로 인한 어류 폐사는 분비된 물질이 직접적인 영향을 미치는 것으로 생각하고 있다. 그러므로 한국에서 분리한 종의 특성과 폐사 원인을 밝혀내는 것이 중요하다고 생각된다.

2. 이화학적 특성

1) 열적 특성(thermal property)

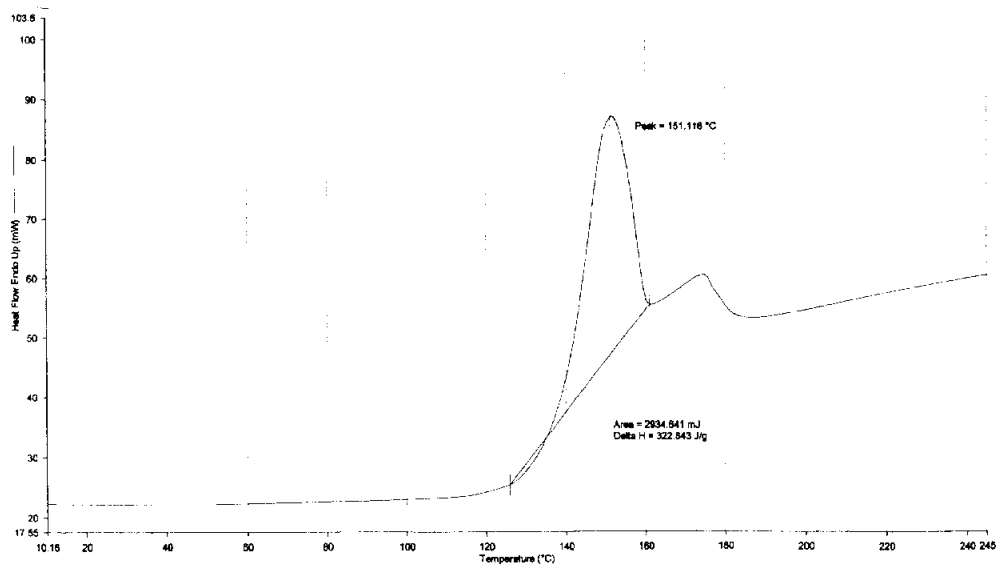
다당류의 열분해 특성은 DSC(Differential Scanning Calorimeter)를 이용하여 다당류의 융점 및 흡열되는 열량을 구하는 것으로 결정체 물질의 형태가 변화될 때 나타나는 물리적 변화에 수반되는 열의 흡수와 방출을 측정하기 위한 것이다.

151.116 °C에서 열분해가 일어났으며 이때 1 g의 exopolysaccharide를 녹이는데 필요한 열량은 322.843 cal로 나타났다(Fig. 39). Xanthan gum의 경우 열분해 온도와 엔탈피가 각각 177.87 °C, 113.5 cal/g 으로 다른 미생물 유래 다당에 비해 열분해 온도는 낮지만, 엔탈피는 높은 것으로 나타냈다(Kwon et al.).

2) 응집 활성(flocculant activity)

응집활성을 검토하기 위하여 xanthan gum을 비교군으로 선정하여 실험한 결과 *C. polykrikoides*가 분비한 exopolysaccharide의 경우 1 - 4 %까지 응집활성이 50 U/mL 이상 유지되었으나 xanthan gum의 경우 모든 농도에서 30 U/ml 이하의 활성을 나타내었고, 1 - 4 % 농도에서는 xanthan gum에 비해서 4.5 - 2.1 배 이상 높은 응집활성을 나타내었다(Fig. 40). Exopolysaccharide가 5 %에서 응집활성이 감소되는 것은 가교화에 필요한 입자표면의 흡착활성점이 감소하기 때문에 가교가 곤란하게 되어 입자간 상호반발에 의한 분산현상이 일어나기 때문인 것으로 사료되는 결과이다. 이는 식물플랑크톤의 polysaccharide는 colony를 형성하거나 부착능의 기능을 가지는데 응집능이 뛰어난에 따라 자기 방어를 위해 중요한 역할을 하는 것이라 생각된다(Hoagland, 1993).

Fig. 39. Thermogram of ESP by Differential Scanning Calorimeter(DSC).



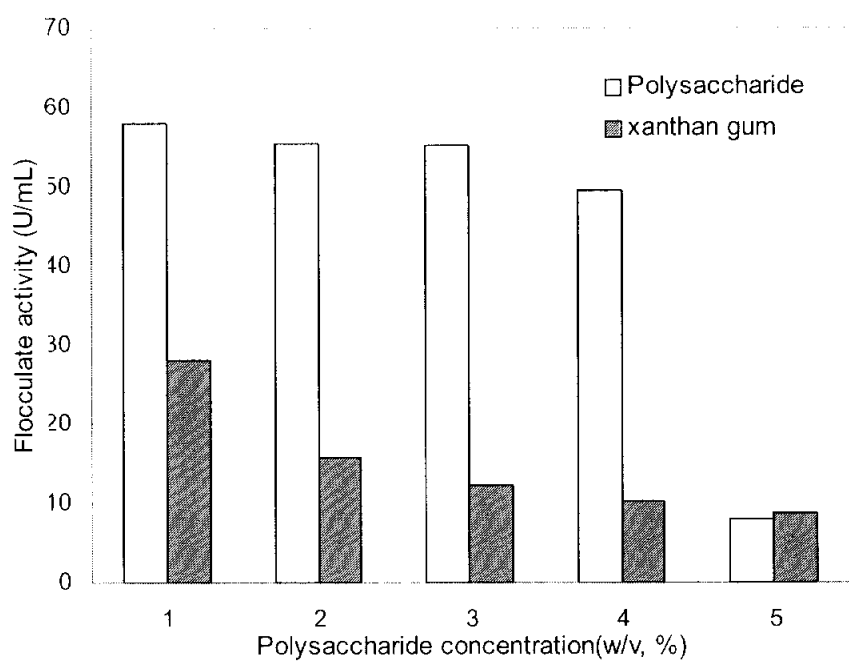


Fig. 40. Flocculating activity of the polysaccharide and xanthan gum.

3) 수분보수력(WHC)

보수력은 소재의 팽윤, 표면다공성 등 물리적인 구조요인에 의한 수분의 침투와 흡착에 기인하는 성질이다. 1-5 % (w/v) 다당류의 농도범위로 측정된 결과 고농도로 갈수록 점차 보수력이 감소함을 나타냈다. 이는 고농도로 첨가되는 고분자 사슬 단위의 물리적 변화에 따라 고분자단위 질량당 수분함유량은 감소되는 것으로 나타내는 결과로 사료된다. 1%(w/v)에서 가장 높은 보수력 3.82 g water/g polysaccharide를 나타냈다(Fig. 41).

4) 용해력(solubility)

다당류의 용해도에 있어 중요한 특징은 분자 내에 반응성이 풍부한 다수의 -OH기가 잔존하거나 비교적 강직한 고분자 또는 키랄성의 유무에 따라 결정되는데 -OH기가 잔존할 경우 다당류들은 분자 간 인력이 강하기 때문에 천연 상태로서 용해하는 것은 불가능하나 다당류의 관능기를 적절한 치환기, 특히 에테르 또는 에스테르 결합으로 알킬기와 같은 유연한 측쇄를 도입함으로써 용해성을 증대시킬 수 있다. 또한 온도, 다당류의 분자량 혹은 중합도(degree of polymerization, D.P.), 분자량 분포, 치환기의 화학구조, 길이 및 결합양식에 따라 용해도는 변화한다(Son et al., 1995).

Exopolysaccharide의 용해도를 조사한 결과, 물에 녹였을 경우 가장 높은 용해력을 보였고, 실험에 사용된 용매의 polarity에 크게 좌우됨을 알 수 있었다(Table 13). 식물플랑크톤이 분비하는 polysaccharide의 경우 종에 따라서 용해도가 많이 달랐다. Exopolysaccharide를 동결 건조 방법으로 분리한 것을 제외하고 화학적 방법으로 추출한 것들은 대부분 상온의 물에서는 잘 녹지 않고 약산 또는 약염기 용액에서 용해되었다(Hoagland et al., 1993)

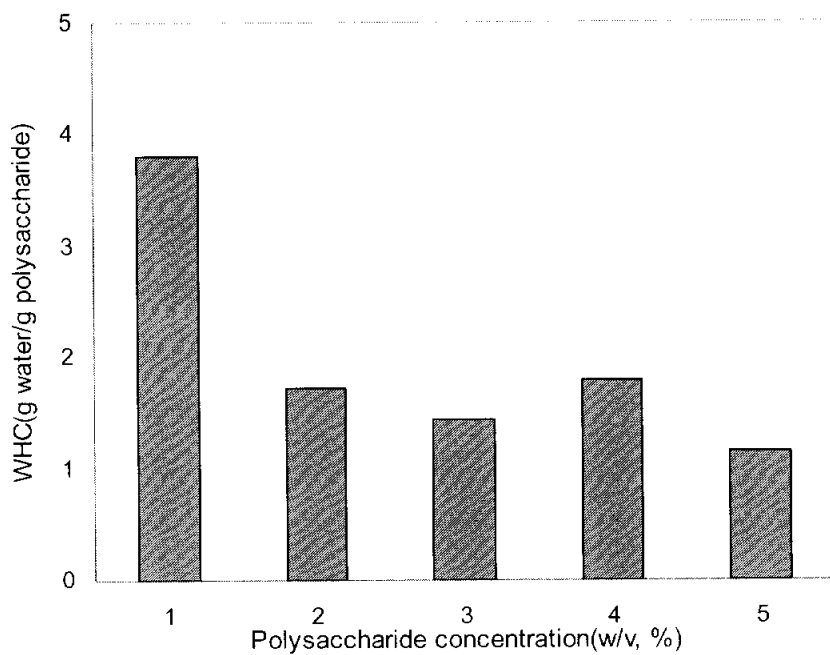


Fig. 41. Effects of various concentration on water holding capacity(WHC) of polysaccharide.

Table 13. Solubility of polysaccharide in various solvents

Solvent	Polarity (eo Al ₂ O ₃)	Solubility (%)
H ₂ O	High	85.6
5N-NaOH	High	42.1
5N-HCl	High	39.5
Acetic acid	High	34.4
Formic acid	High	57.8
Phosphoric acid	High	31.0
Methanol	0.95	25.8
Ethanol	0.88	11.5
n-Propanol	0.82	18.3
Acetonitrile	0.65	12.6
Dichloromethane	0.42	16.6
Chloroform	0.40	16.6
Benzene	0.32	15.4

제 4 장 결 론

C. polykrikoides 적조발생시 어류피해를 최소화하고, 분비된 물질을 활용하기 위한 기초자료로써 *C. polykrikoides*에서 분비되는 유기물질의 기본적 특성 및 polysaccharide 생산의 최적 분비 조건을 파악하였다. 또한 polysaccharide가 어류폐사에 미치는 영향 및 그 물리학적 특성에 대해 연구하였다.

*C. polykrikoides*를 배양하였을 때 exopolysaccharide(EPS)와 intracellular polysaccharide(ICPS)는 분비되는 양이 점차 증가되어 정지기 말기에 각각 6.02, 1.13 mg/L로 최대값을 나타내었다. 단백질의 양은 초기에 0.43 mg/L로 거의 일정한 값을 유지하다가 대수증식기 말기 이후 점차 증가되어 소멸기에 1.20 mg/L로 최대값을 보였다.

아미노산은 proline이 전 배양기간을 통해 가장 많이 분비되었고, 전체 아미노산 농도의 20 - 90%를 점하였다. 그 다음으로는 histamine, leucine, cysteine 등이 정지기에 높은 농도로 생산되었다.

Exopolysaccharide, intracellular polysaccharide, 단백질 그리고 아미노산 모두 정지기에 가장 높은 속도로 생산되었으며 특히 exopolysaccharide는 정지기에 가장 높은 $47.04 \text{ pg cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 의 속도로 생산되었다.

Cellular carbon의 양은 세포수가 증가함에 따라 점차 농도가 증가되어 정지기 말기에 가장 높았으나 nitrogen의 양은 소멸기에 최대값을 보였다. 또한 배양 중 분비된 carbon의 양은 전체 carbon의 53.54 - 65.95 % 였다.

Polysaccharide 생산의 최적 배양조건으로 질소원의 영향을 보면, 질산염을 제한하였을 경우 exopolysaccharide의 생산이 최대값을 보였고, 50 μM 이상에서는 생산량이 떨어졌다. 세포 성장속도는 암모니아를 50 μM 첨가하였을 경우 가장 높았고, productivity는 질산염을 제한했을 경우 $0.183 \text{ pg cell}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 으로 가장 높았다. 인산염은 제한하였을 때 보다 10.0 μM 로 첨가하였을 경우 더 높은 생산량을 보였고, 질소원에 비하여 첨가한 농도에 따른 생산량의 차이가 크지

않았다. 인산염을 제한했을 경우는 시간이 지남에 따라 생산량의 차이가 거의 없었지만, 질산염을 제한했을 경우 초기보다 2.0배 증가된 높은 생산량을 보였다.

금속이온 중 Mn을 결핍시켰을 경우 exopolysaccharide의 생산량이 증가되었고, Fe을 결핍시켰을 경우 Intracellular polysaccharide의 농도가 최대값을 보였다. 광조건으로 14 L:10 D로 암기를 주었을 경우 24 L보다 exopolysaccharide 및 intracellular polysaccharide의 생산량이 각각 1.13, 1.24배 증가되었다. 수온은 24 - 26℃ 범위에서 높을수록 polysaccharide의 농도가 증가되었고, 또한 productivity도 26℃에서 가장 높은 값을 보였다. 반연속 배양을 할 경우 dilution rate가 0.05 day⁻¹일 때 세포 성장속도와 productivity가 가장 높았고, batch culture에 비해서 productivity가 4배 이상 증가되었다.

C. polykrikoides 적조 발생 전에 강우와 이로 인한 육상으로부터 담수유입으로 오염물질이 공급되어 영양염의 농도가 증가되고, 또한 식물플랑크톤의 양도 증가됨을 알 수 있었다. 적조 주발생기에는 *C. polykrikoides*이 해역에 따라서 발생농도범위가 다르게 나타나지만 20,000 cells/mL 이상의 세포수를 나타낼 경우 해역에서는 75 mg/L이상의 polysaccharide를 생산함에 따라 용존 유기탄소량을 증가시킨다.

Polysaccharide용액이 어류에 미치는 영향을 살펴보면 혈액 내 산소분압을 떨어뜨리고, 산소분압은 polysaccharide의 농도가 증가됨에 따라 더 낮은 값으로 떨어짐을 알 수 있었다.

Polysaccharide의 열적특성을 검토한 결과 융점 151.116℃, enthalpy 322.843 cal/g로 나타났다. 응집활성은 1 - 4%까지 응집활성이 50 U/ml 이상 유지되었고, xanthan gum에 비해서 4.5 - 2.1배 이상 높은 응집활성을 나타내었고, 보수력은 1%(w/v)에서 가장 높은 보수력 3.82 g water/g polysaccharide를 나타냈다.

제 5 장 감사의 글

본 논문을 완성하기까지 많은 가르침으로 언제나 부족한 저를 일깨워 주시고 오늘까지 이끌어 주신 공재열 교수님께 먼저 깊은 감사를 드립니다.

그리고 심사 중 논문의 미진한 부분을 지적해 주시고 여러 가지 조언으로 논문을 다듬어 주신 류병호 교수님, 이태호 교수님, 김학균 부장님, 박남규 교수님께 감사를 드립니다. 학위과정동안 아낌없는 격려와 충고를 주신 김민용 교수님, 김종덕 교수님, 김학주 박사님께도 감사드립니다.

또한 식물 플랑크톤과 인연을 맺어 뭔지를 가르쳐준 심정민 연구사님, 논문의 완성을 위해 실험에 도움을 준 손재경 연구사님, 권정노 연구사님, 홍석진씨 그리고 강창근 박사님, 이원찬 연구사님, 최혜승 연구사님께도 감사를 드립니다. 양식환경연구소 손상규 소장님 이하 직원여러분 그리고 시료채취에 항상 기쁜 마음으로 도와주신 탐구 10호 선박 직원분들께도 감사를 드립니다. 또한 매번 가서 귀찮게만 해도 웃으며 반겨준 친구 황선희 박사, 후배 김동중 박사, 그리고 생물화학공학실험실 강성일, 장영부, 전병진, 김영문, 김선화 후배 모두에게 깊은 감사를 드립니다.

오늘의 제가 존재할 수 있도록 모든 것을 아끼지 않으시고 채찍질 해주신 부모님 은혜에 감사드립니다. 그리고 부족한 며느리를 딸보다 더한 정성과 사랑으로 격려해주신 시부모님께도 감사드립니다. 또한 저의 발전을 위해 항상 옆에서 충고와 격려를 아끼지 않던 언니내외와 도련님께도 고마움을 전합니다.

끝으로 재현이에게 부족한 엄마의 미안한 마음을 전하며 오늘이 있기까지 커다란 울타리가 되고 헌신적으로 인내해 준 사랑하는 남편과 아들에게 이 논문을 바칩니다.

제 6 장 참고문헌

- 구준석, 이동섭, 2002. 남해 *Cochlodinium* 적조와 부영양화와와의 관련성.
Proceedings of the autumn meeting, 2002 of the Korean soc. of
Oceano., November, 121
- Ahlgren, G., Gustafsson, I.B., Boberg, M., 1992. Fatty acid content and
chemical composition of freshwater microalgae. J. Phycol., 28(1), 37-50
- Allan, G.G., J. Lewin and P.G. Johnson, 1972. Marine polymers. IV. Diatom
polysaccharides. Botanica Mar., 15, 341-347
- Azam, F. and B.C. Cho, 1987. Bacterial utilization of organic matter in the
sea. In fletcher, M., Gray, T.R.G., and Jones, T.G.(eds), Ecology of
microbial communities. Cambridge Univ. Press Cambridge, SGM 41,
261-281
- Bhosle, N.B., S.S. Sawant, A. Garg, and A.B. Wagh, 1995. Isolation and
partial chemical analysis of exopolysaccharides from the marine fouling
diatom *Navicular subinflata*. Bot. Mar., 38, 103-110
- Buzzelli, E., R. Ginna, E. Marchiori, and M. Bruno, 1997. Influence of
nutrient factors on production of mucilage by *Amphora coffeaeformis* var.
perpusilla, Continental Shelf Research, 17(10), 1171-1180
- Chihara, M. and M. Murano, 1997. An illustrated guide to marine plankton
in Japan, Tokai Univ. Press, Tokyo, 1-262
- Du Qi, Yijian Huang and Xiaofeng Wang, 1993. Toxic dinoflagellate red tide
by a *Cochlodinium* sp. along the coast of Fujian, China, Toxic
phytoplankton blooms in the sea, 235-238
- Dubois, M., K.A. Gilles, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, and F.
Smith, 1956. Colorimetric methods for determination of sugars and

- related substances, *Anal. Chem.*, 28, 350-356
- Fogg, G.E., 1983. The ecological significance of extracellular products of phytoplankton photosynthesis. *Bon. Marina*, 26, 3-14
- Fukuyo., Y., 1987. A guide for studies of red tide organisms. *Nihon suisan shigen Hogo Kyokai*, ed., Shuwa, Tokyo, 332-345
- Guzmán, H.M., J. Cortés, P.W. Glynn and R.H. Richmond, 1990. Coral mortality associated with dinoflagellate blooms in the eastern Pacific (Costa Rica and Panama). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 60, 299-303
- Hasui, M., M. Matsuda, K. Okutani, 1995. In vitro antiviral activities of sulfated polysaccharides from a marine microalga(*Cochlodinium polykrikoides*) against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses, *Int. J. Biol. Macromol.*, 17(5), 293-297
- Hellebust, J.A., 1965. Excretion of some organic compounds by marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 10, 192-206
- Hellebust, J.A., 1974. Extracellular products. In : N.D. Steward(Ed), *Algal Physiology and Biochemistry*. Univ. of California Press, Berkeley, CA, 838-863
- Herbert, D., P.J. Phipps, and R.E. Strange, 1971. Chemical analysis of microbial cells. In: Norris, J. R., D. W. Ribbons(Eds.), *Methods in Microbiology*, Vol. 5B, Academic Press. London, 209-344
- Hirayama, K. and T. Abe, 1979. Red tide and toxicity occurred in Nagasaki coastal waters between 1976-78. in *Research Report on Ministry of Agriculture and Fishery. Japan*, 28-32 (in Japanese).
- Hoagland, K.D., J.R. Rosowski, M.R. Gretz, and S.C. Roemer, 1993. Diatom extracellular polymeric substances : function, fine structure, chemistry, and physiology. *J. Phycol.*, 29, 537-566

- Innamorati, M., 1995. Hyperproduction of mucilages by micro and macroalgae in the Tyrrhenian Sea. *Sci. Total Environ.* 165, 65-81 (Sp. Issue).
- Kim, C.S., S.G. Lee, C.K. Lee, H.G. Kim and J. Jung, 1999. Reactive oxygen species as causative agents in the ichthyotoxicity of the red tide dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*. *J. Plankton Res.*, 21(11), 2105-2115
- Kim, C.S., S.G. Lee, H.G. Kim, 2000a. Biochemical response of exposed to a harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 254, 131-141
- Kim, C.S., H.M. Bae, S.J. Yun, Y.C. Cho, and H.G. Kim, 2000b. Ichthyotoxicity of a harmful dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*: aspects of hematological responses of fish exposed to algal blooms. *Kor. J. Fish. Sci. Tech.*, 3(2), 111-117
- Kim, C.S., S.G. Lee, H.G. Kim and J.S. Lee, 2001. Screening for toxic compounds in the red tide dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides*: Is It Toxic Plankton?. *Algae*, 16(4), 57-462
- Kim, D.K., T. Oda, T. Muramatsu, D. Kim, Y. Matsuyama and T. Honjo, 2002. Possible factors responsible for the toxicity of *Cochlodinium polykrikoides*, a red tide phytoplankton. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 132(4), 415-423
- Kim, H.C., C.K. Lee, S.G. Lee, H.G. Kim, and C.K. Park, 2001. Physico-chemical factors on growth of *Cochlodinium polykrikoides* and nutrient utilization. *J. Korean Fish. Soc.*, 34(5), 445-456
- Lancelote, C., 1984. Extracellular release of small and large molecules by phytoplankton in the Southern bright of the North sea. *Estuar. Coastal Shelf Sci.*, 18, 65-77

- Lancelote, C., 1995. The mucilage phenomenon in the continental coastal waters of the North Sea. *Sci. Total Environ.* 165, 83-102 (Sp. Issue)
- Larsson, U. and Hagström, A. 1982, Fractionated phytoplankton primary production, exudate release and bacterial production in a Baltic eutrophication gradient. *Mar. Biol.*, 67, 57-71
- Lee, C. and Cronin, C., 1984. Particulate amino acids in the sea: effects of primary productivity and biological decomposition. *J. Mar. Res.*, 42 (4), 1075- 1097
- Lee, J.S., 1996. Bioactive components from red tide plankton, *Cochlodinium polykrikoides*, *J. Kor. Fish. Soc.*, 29(2), 165-173(in Korean)
- Leppard, G.G., 1995. The characterization of algal and microbial mucilages and their aggregates in aquatic ecosystems. *Sci. Total Environ.* 165, 103-131 (Sp. Issue)
- Lewin, J., 1995. The capsule of the diatom *Navicular pelliculosa*, *J. Gen. Microb.* 13, 162-169
- Lim, W. A., W.J. Choi, Y.C. Park and K.H. Eom, 1999. Species composition and abundance of phytoplankton and marine bacteria during a *Cochlodinium* Bloom in Tongyeong. *Bull. Nat'l. Fish. Res. Dev. Ins. Korea* 57, 145-151(in Korean)
- Liu, H. and E.J. Buskey, 2000. Hypersalinity enhances the production of extracellular polymeric substance (EPS) in the Texas brown alga, *Akroeuomba lagunensis* (Pelagophyceae), *J. Phycology*, 36, 71-77
- Lu, M. and Stephens, G.C. 1984, Demonstration of net influx of free amino acids in *Phaeodactylum tricornutum* using high performance liquid chromatography. *J. Phycol.*, 20, 584-589
- Mague, T.H., Friberg, E., Hughes, D.J. and Morris, I., 1980. Extracellular

- release of carbon by marine phytoplankton : a physiological approach.
Limnol. Oceanogr., 25, 262-279
- Metaxatos, A., C. Panagiotopoulosb, L. Ignatiadesa, 2003. Monosaccharide and amino acid composition of mucilage material produced from a mixture of four phytoplanktonic taxa, J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 294, 203-217
- Myklestad, S.L., 1974. Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. I. Comparison of nine different species in culture. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 29, 161-179
- Myklestad, S.L., 1977. Production of carbohydrates by marine planktonic diatom. II. Influence of the N/P ratio in the growth medium on the assimilation ratio, growth rate, and production of cellular and extracellular carbohydrates by *Chaetoceros affinis* var. *Willei*(gran) Hustedt and *Skeletonema costatum*(Grev.) Cleve. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 29, 161-179
- Myklestad, S.L., 1995. Release of extracellular products by phytoplankton with special emphasis on polysaccharides, The Science of the Environment, 165, 155-164
- Myklestad, S.L. and A. Haug 1972. Production of carbohydrates by the marine diatom *Chaetoceros affinis* var *willei*(Gran)Hustedt. I. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium, J. Exp. Mar. Bio. Ecol., 9(2), 125-136
- Myklestad, S.L. and A. Haug, 1976. Polysaccharides of marine diatoms with special reference to *Chaetoceros* species, Mar. Biol., 34, 217-222
- Myklestad, S.L., O. Holm-Hansen, K.L. varum, and B.E. Volcani, 1989. Rate of release of extracellular amino acids and carbohydrates from the

- marine diatom *Chaetoceros affinis*. J. plankton research, 11(4), 763-773
- NFRDI, 2002. Handbook of marine harmful algal blooms in Korean waters. 73-90
- Onoue, Y. and Nozawa, K., 1989a. Separation of toxins from harmful red tides occurring along the coast of Kagoshima prefecture. In Okaichi, T., Anderson, D.M. and Nemoto, T.(eds), red Tides: Biology, Environmental Science, and Toxicology. Elsevier, New York, 371-374
- Onoue, Y. and Nozawa, K., 1989b. Zink-bound PSP toxins separated from *Cochlodinium* red tide. In Natori, S., Hashimoto, K. and Ueno, Y.(eds), Mycotoxins and Phycotoxins '88. Elsevier, Amsterdam, 359-366
- Onoue, Y. and Nozawa, K., Kumanda, K., Takeda, K. and Aramaki, T., 1985. Toxicity of *Cochlodinium* type '78 Yatsushiro occurring in Yatsushiro Sea. Bull. Jpn Soc. Sci. Fish., 51, 147pp
- Park, J. S., 1980. Studies on seasonal changes in population and species composition of phytoplankton and their effects on oysters and local fishery resources as food organism and as a cause of red tide in the south coast of Korea. Bull. Nat'l Fish. Res. Dev. Agency, 23, 7-169(in Korean)
- Pielou, E.M. 1966. The measurement of diversity in different types of biological collection. J. Theoret. Biol., 13, 131-144
- Poulet, S.A., and Martin-Jezequel, V. 1983, Relationship between dissolved free amino acids chemical composition and growth of the marine diatom *Chaetoceros debile*, Mar. Biol., 17, 93-100
- Raymont, J. E. G., 1980. Plankton and productivity in the oceans. Vol.1-Phytoplankton. Pergamon Press Oxford, 489
- Riebesell, U., 1991. Particle aggregation during a diatom bloom: II.

- Biological aspects. Mar. Ecol., Prog. Ser., 69(3), 281- 291
- Rijssel. M., I. Janse, D.J.B. Noordkamp, and W.W.C. Gieskes, 2000. An inventory of factors that affect polysaccharide production by *Phaeocystis globosa*, J. Sea Research, 43, 297-306
- Schaeffer, D.J. and V.S. Krylov, 2000. Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria, Ecotoxicology and Environmental Safety, 45, 208-227
- Shannon, C.E., and W. Wiener, 1963. The mathematical theory of communication. Univ. of Illinois Press, Urbana, 125 pp
- Sharp, J.H., 1974. Improved analysis for particulate organic carbon and nitrogen from sea water, Limnol Oceanogr., 19, 984-979
- Sharp, J.H., 1977. Excretion of organic matter by marine phytoplankton: do healthy cells do it? Limnol. Oceanogr., 22, 381-399
- Shim, J.M., 1998. Ecophysiological study on the red tide organism, *Cochlodinium polykrikoides*, and its control in the aquaculture farm, Ph. D. thesis. Univ. Busan, 8-70
- Shim, J.H. and H.G. Yeo, 1988. Spatial and temporal variations of phytoplankton in Chonsu bay, The J. of the Korea Soc. of Oceano., 23(3), 130-145
- Shim, J.H., H.G. Yeo, and J.G. Park, 1995. Primary production system in the Southern Waters of the East Sea, Korea II. The structure of phytoplankton community, The J. of the Korea Soc. of Oceano., 30(3), 163~169
- Smith, D.J. and G.J.C. Underwood, 1998. Exopolymer production by intertidal epipellic diatoms. Limnol. Oceanogr, 43(7),
- Smith, D.J. and G.J.C. Underwood, 2000. The production of extracellular

- carbohydrates by estuarine benthic diatoms: The effects of growth phase and light and dark treatment. *J. Phycol.*, 30, 321-333
- Son, B.B., S.K. Park, S.K. Kang, S.W. Lee, C.N. Seong, and N.K. Sung, 1995. Isolation of the exopolysaccharide producing microorganism and their cultural characteristics. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23, 263-268
- Staats, N., B.De Winde, L.J. Stal, and L.R. Mur, 1999a. Isolation and characterization of extracellular polysaccharides from epipellic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Navicular salinarum*. *Eur. J. Phycol.*, 34, 161-169
- Staats, N., L.J. Stal, B.De Winder, and L.R. Mur, 1999b. Oxygenic photosynthesis as driving process in exopolysaccharide production of benthic diatom, *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 193, 261-269
- Staats, N., L.J. Stal, and L.R. Mur, 2000. Exopolysaccharide production by the epipellic diatom *Cylindrotheca closterium*: effects of nutrient conditions, *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, 249, 13-27
- Stanbury, P.F. and A. Whitaker, 1984. Principals of fermentation technology, Pergamon press, 11-16
- Stein, J.J., 1973. Handbook of phycological methods: Culture methods and growth measurements, Cambridge Univ. press, 27-51
- Strickland, J.D.H. and T.R. Parsons, 1972. A practical handbook of seawater analysis. *Bull. Fish. Res. Bd. Canada*, 310 pp
- Sundstrom, B., L. Edler and E. Graneli, 1990. The global distribution of harmful effects of phytoplankton. In *Toxic Marine Phytoplankton*, E. Graneli, B. Sundstrom. L. Edler and D.M Anderson, eds. Elsevier, Amsterdam, 537-541
- Sutherland, T.F., J. Grant, and C.L. Amos, 1998. The effect of carbohydrate

- production by the diatom *Nitzschia curvilineata* on the erodibility of sediment, *Limnol. Oceanogr.* 43, 65-72
- Tago, Y., K. Aida, 1977. Extracellular mucopolysaccharide closely related to bacterial floc formation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34(3), 308-314
- Telek, G. and N. marshall, 1974. Using a CHN analyzer to reduce carbonate interference in particulate organic carbon analysis. *Mar. Biol.*, 24, 219-221
- Turpin, D.H., 1991. Effects of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. *J. Phycol.* 27, 862-872
- V.M.F. Lai, A.L. Huang, C.Y. Lii, 1999. Rheological properties and phase transition of red algal polysaccharide-starch composites. *Food Hydrocolloids.*, 13: 409-418
- Waite, A.M., R.J. Olson, H.G. Dam, and U. Passow, 1995. Sugar-containing compounds on the cell surfaces of marine diatoms measured using concanavalin A and flow cytometry. *J. Phycol.* ,31, 925-933
- Wakeham, S., Lee, C., Farrington, J., Gagosian, R., 1984. Biogeochemistry of particulate organic matter in the oceans. *Deep-Sea Res.*, 31 (5), 509-528.
- Wangersky, P.J., 1978. Production of dissolved organic matter. In: O. Kinne (Ed), *Marine Ecology*, Vol. IV. Dynamics. John Wiley, London, 115-220
- Weisse, T., H. Muller, R.M. Pinto-Coelho, A. Schweizer, D. Springmann, G. Baldringer, 1990. Response of the microbial loop to the phytoplankton spring bloom in a large prealpine lake. *Limno., Oceanogr.*, 35, 781-794
- Whyte, J.N.C., N. Haigh, N.G. Ginther, L.J. Keddy, 2001. First record of blooms of *Cochlodinium* sp. (Gymnodiniales, Dinophyceae) causing mortality to aquacultured salmon on the west coast of Canada. *Phycologia*, 40(3), 298-304

- Yuki, K. and S. Yoshimatsu, 1987. Two fish killing species of *Cochlodinium* from Harimanada. Seto Inland sea, Japan. In *Red Tide Biology, Environmental Science and Toxicology*, T. Okaichi, D. M. Anderson and T. Nemoto, eds. Elsevier, New York, 451-454
- Yallop, M.L., B. De Winder, D.M. Paterson, and L.J. Stal, 1994. Comparative structure, primary production and biogenic stabilization of cohesive and non-cohesive sediments inhabited by microphytobenthos. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 39, 565-582
- Yang, J. S., H. Y. Choi, H. J. Jeong, J. Y. Jeong and J. K. Park., 2000. The outbreak of red tides in the coastal waters off Kohung, Chonnam, Korea:1. Physical and chemical characteristics in 1997. 「The sea」 J. of the Korea Soc. of Oceano., 5(1), 16~26
- Yamaji, I., 1984. *Illustration of the marine plankton of Japan*. 3rd ed. Hoikushm Publishing Co., 158 pp