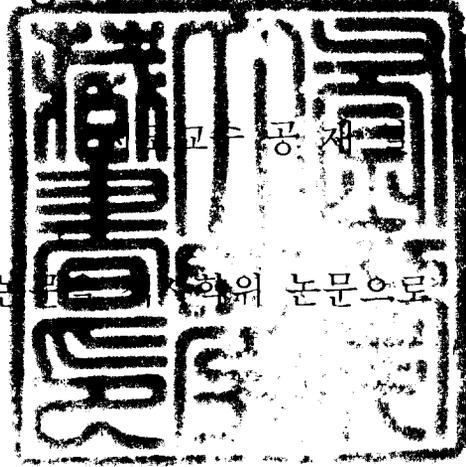


공학석사 학위논문

Xanthomonas translucens KCTC-
2751의 최적 배양 조건 검토와
빙핵화성능의 측정



이 논문은 공주대학교 대학원 생물공학과에서 제출함.

2005년 8월

부경대학교 대학원

생물공학과

김영문

김영문의 공학석사 학위논문을 인준함

2005년 8월 31일

주 심 공학박사

김 민 용



위 원 공학박사

김 성 구



위 원 농학박사

공 재 열



목 차

목 차	i
LIST OF TABLES	iii
LIST OF FIGURES	iii
ABSTRACT	v
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 사용 균주	4
2. 사용 배지 및 배양 조건	4
3. 빙핵활성능의 측정 방법	4
3-1. Thermal cell의 제작	4
3-2. Thermoelectric thermometry 의 제작	7
3-3. 빙핵활성능의 측정	13
4. 빙핵활성균주의 최적 배양 조건	15
4-1. 탄소원의 영향	15
4-2. 질소원의 영향	15
4-3. 무기 염류의 영향	15
4-4. 초기 pH의 영향	15
4-5. 배양 온도의 영향	16
4-6. 배양 시간의 영향	16
5. 농도에 따른 빙핵활성능과 온도안정성	16
5-1. 빙핵활성균주 농도에 따른 빙핵활성능	16
5-2. 보관온도에 의한 빙핵활성능의 안정성	16

III. 결과 및 고찰	17
1. 빙핵활성균주의 최적 배양 조건	17
1-1. 탄소원의 영향	17
1-2. 질소원의 영향	21
1-3. 무기 염류의 영향	29
1-4. 초기 pH의 영향	29
1-5. 배양 온도의 영향	29
1-6. 배양 시간의 영향	35
2. 농도에 따른 빙핵활성능과 온도안정성	35
2-1. 빙핵활성균주의 농도에 따른 빙핵활성능	35
2-2. 보관온도에 의한 빙핵활성능의 안정성	35
IV. 요약	41
V. 사 사	43
VI. 참고 문헌	44

LIST OF TABLES

- Table 1. The temperature range and voltage range of each type thermocouple
- Table 2. The freezing point by the baume degree of NaCl
- Table 3. The temperature correction of the thermocouple
- Table 4. The density and heat conductivity of domestic thermal insulation.

LIST OF FIGURES

- Figure 1. The schematic diagram of thermoelectric thermometry
- Figure 2. The standard curve of temperature by thermal electromotive force
- Figure 3. The three-dimensional diagram of the thermal cell with the insulator.
- Figure 4. The insulation effect of the thermal cell
- Figure 5. Typical freezing curve of solution material
- Figure 6. The effect of various carbons sources on the growth of *Xanthomonas translucens* KCTC-2751
- Figure 7. The effect of various carbons sources on the degree of supercooling by *Xanthomonas translucens* KCTC-2751
- Figure 8. The effect of maltose concentration on the growth of *Xanthomonas translucens* KCTC-2751
- Figure 9. The effect of various nitrogen sources on the growth of *Xanthomonas translucens* KCTC-2751
- Figure 10. The effect of various nitrogen sources on the degree of supercooling by *Xanthomonas translucens* KCTC-2751

- Figure 11. The effect of combination of nitrogen sources on the growth of *Xanthomonas translucens* KCTC-2751
- Figure 12. The effect of combination of nitrogen sources on the degree of supercooling by *Xanthomonas translucens* KCTC-2751
- Figure 13. The effect of yeast extract concentration on the growth of *Xanthomonas translucens* KCTC-2751
- Figure 14. The effect of yeast extract concentration on the degree of supercooling by *Xanthomonas translucens* KCTC-2751
- Figure 15. The effect of digested of gelatin concentration on the growth of *Xanthomonas translucens* KCTC-2751
- Figure 16. The effect of various inorganic salts on the growth of *Xanthomonas translucens* KCTC-2751
- Figure 17. The effect of various inorganic salts on the degree of supercooling by *Xanthomonas translucens* KCTC-2751
- Figure 18. The effect of KCl concentration on the growth of *Xanthomonas translucens* KCTC-2751
- Figure 19. The effect of various initial pH on the growth of *Xanthomonas translucens* KCTC-2751
- Figure 20. The effect of various initial pH on the degree of supercooling by *Xanthomonas translucens* KCTC-2751
- Figure 21. The effect of various temperature on the cell growth and ice nucleating activity of *Xanthomonas translucens* KCTC-2751
- Figure 22. The relationship between the growth curve and the ice nucleating activity of *Xanthomonas translucens* KCTC-2751 under the optimal culture conditions
- Figure 23. The effect of the cell concentration on the degree of supercooling at the addition of *Xanthomonas translucens* KCTC-2751
- Figure 24. The stability of ice nucleating activity at storage temperature

The investigation on optimal culture conditions and ice nucleating activity of
bacterium *Xanthomonas translucens* KCTC-2751

Young-mun Kim

*Department of Biotechnology and Bioengineering, Graduate School,
Pukyong National University*

ABSTRACT

The optimal culture conditions for ice nucleating activity and cell growth of *Xanthomonas translucens* KCTC-2751 were investigated. The strain was well grown in culture medium containing 1.0% maltose, 1.2% yeast extract, 0.8% digested of gelatin, 0.03% KCl. Optimal pH and temperature was 6.5 and 25°C.

Ice nucleation bacterium *Xanthomonas translucens* KCTC-2751 showed a high ice nucleating activity and the supercooling temperature of the cell suspension was increased (-1.4°C) which compared with the control solution (-7.6°C). Moreover, the supercooling time of the control solution (18 minutes) was reduced 86% to 2.5 minutes by the addition of the cells.

Ice nucleating activity was effected environmental condition such as culture temperature, initial pH, and culture time than nutritional conditions.

Ice nucleating activity decreased at temperature above 30°C and after stationary phase.

Key words: Ice nucleating activity, *Xanthomonas translucens*, Supercooling time.

Optimum, Supercooling temperature

I . INTRODUCTION

한해는 기온이 낮아짐에 따라 일어나는 작물의 여러 가지 생육장애로서 동해, 한풍해, 냉온장해, 상해 등이 있으나, 한해의 주체가 되는 것은 동해와 상해(저온장해)이다. 유럽이나 북미에서는 보통 양자를 통털어 Frost injury(동상해)라고 하는데 이는 상해나 동해 모두 세포조직 내에서 결빙이 일어남으로서 입는 피해이기 때문이다(1, 2). 생물학적 원인에 의한 동상해와 관련하여 지난 30여 년 동안 빙핵의 생물학적 근원에 대한 연구가 많은 과학자들에 의해 진행되었으며, 식물의 상해가 단순히 기후적인 영향에 기인한 현상이 아니라 미생물에 의해 촉진되는 생화학적 현상이라는 것이 밝혀지게 되었다(3-7). 또한, 상해의 원인이 미생물의 빙핵활성 단백질로부터 기인한다는 사실이 Schnell과 Vail(8, 9)에 의해 밝혀진 이후, Maki 등이 식물잎에서 *Pseudomonas sringae*(4, 7, 10-13)를 발견하였다, 이 발견 이래로 *Erwinia herbicola*(4, 11, 14), *Erwinia ananas*(10, 15), *Pseudomonas fluorescens*(16-18), *Pseudomonas viridiflava*(3, 19), *Xanthomonas campestris*(20), *Xanthomonas translucens*(21), Recombinant *E. coli*(22), *Erwinia uredovora*(23) 등 빙핵활성을 가진 여러 균주가 발견되었으며, 빙핵활성 단백질에 관한 연구가 본격적으로 시작되어 이 단백질이 빙핵(ice-nuclei)으로 작용한다는 것을 알게 되었다. 그리고 이러한 빙핵활성 단백질을 생산하는 미생물들은 식물잎의 표면에 서식하는 엽면 미생물(epiphytic microorganisms)로 밝혀졌다(3, 24).

일반적으로 빙핵활성 단백질은 3가지 타입으로 분류된다. 즉, $-2^{\circ}\text{C} \sim 5^{\circ}\text{C}$ 에서 빙핵을 형성시키는 단백질을 Type I, $-6^{\circ}\text{C} \sim -8^{\circ}\text{C}$ 에서 빙핵을 형성시키는 단백질을 Type II, $-8^{\circ}\text{C} \sim -10^{\circ}\text{C}$ 에서 빙핵을 형성시키는 단백

질을 Type III로 분류한다(25). 물은 0℃에서 어는 것으로 알려져 있으나 실제로 순수한 물은 -39℃ 정도의 과냉각(super cooling condition)를 거치면서 얼음이 된다. 하지만, 빙핵활성 단백질이 존재하면 물의 동결점을 2℃ 혹은 -4℃ 정도로 상승시켜 물의 결빙을 촉진시킬 수 있다. 따라서, 빙핵활성 단백질이 존재하면 -2℃ 또는 -4℃ 정도 에서도 물이 얼 수 있으므로, 물을 얼음이나 눈으로 변환시키는데 그 만큼의 에너지를 절약할 수 있다.

빙핵활성 단백질은 여러 산업분야에 이용되고 있는데, 대표적인 예로, 높은 온도에서 인공적으로 눈을 제조하기 위하여 대부분 빙핵제로 사용되는 inorganic chemical particle (AgI 등) 대신 빙핵 단백질을 생산하는 미생물(icenucleating microorganisms)을 빙핵제로 사용하는 것이 보고되어지며, 인공강우 촉진제로 이용하면 한발에 대비하여 인공강우를 유도할 수 있어서 현재 현장 실험을 진행하고 있다(26). 또한 냉동식품의 동결촉진제 및 난 동결식품의 동결농축이나 동결건조에 이용하는 것으로 보고되고 있다(27, 28). 그리고 국내에서는 이러한 빙핵 활성 미생물을 가열, 초고압 저온살균, 감마선 살균법을 사용하여 빙핵활성능을 비교한 연구 등이 보고되고 있다(29).

한편, 이와 같은 산업적 응용과 더불어 유전자 조작을 통한 균주의 개량과 높은 빙핵 활성능을 발현시키고자 하는 연구가 진행되어 여러 빙핵형성 미생물들에서 빙핵활성을 코드하는 유전자를 분리하여, 그 서열과 특성을 밝히는 연구가 이루어져 왔다(30-33). *Pseudomonas syringae*로부터 빙핵활성 유전자를 코드하는 *inaZ* 유전자가 밝혀진 이래로, *Pseudomonas fluorescense*로부터 *inaW*, *Erwinia herbicola*로부터 *inaE*, *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*로부터 *inaX* 등 빙핵활성 단백질을 코드하는 유전자의 염기서열이 밝혀졌고, 그 구조적 특성에 대한 연

구가 진행되어져 왔다(34-37).

하지만 정작 빙핵활성 단백질을 측정하기 위한 방법은 40 여년전 Vail 에 의해 고안된 drop freezing method(1, 2, 8, 17)가 지금까지 사용하였는데 이 방법은 aluminum block에 일정량의 균체 현탁액을 몇 drop씩 떨어뜨린 다음, aluminum block의 온도를 강하시키면서 동결된 drop의 수를 계산하여 Vail이 제안한 공식에 적용하는 방식이다. 그러나 이러한 방법은 실험자나 주위 환경의 약간의 온도 변화에 의해서도 실험 오차가 많이 발생할 수 있어 주관에 치우치기 쉽고 정량화가 어려운 단점을 가지고 있다. 본 실험에서 빙핵활성능을 측정하기 위해 만들어진 thermoelectric thermometry는 단열재를 사용하여 주위환경의 온도변화에 대한 영향을 제거하고 cooling bath로부터 thermal cell로 일차원적인 열전도로 인하여 온도 변화를 측정함으로써 그 실험오차를 크게 줄일 수 있게 되어 보다 객관적이고 정량화가 가능하다고 본다(39, 40, 43, 44). 그리고 이러한 thermoelectric thermometry를 이용하여 빙핵활성에 대한 *Xnathomonas translucens* KCTC-2751의 배양을 최적화함으로써 산업적으로 이용 가능할 것으로 생각된다.

II. 재료 및 방법

1. 사용 균주

본 실험에 사용된 균주는 한국 생명 공학 연구소의 생물자원센터에서 분양받은 *Xanthomonas translucens* KCTC-2751을 사용하였다(21, 38).

2. 사용 배지 및 배양 조건

기본 배지로서 beef extract 0.3%, Peptone 0.5% 인 nutrient medium을 사용하였으며, 25°C shaking incubator에서 180rpm, 30시간 배양하였다. 균주는 기본배지에 1.5% agar를 첨가한 고체배지에 접종시킨 후 25°C에서 3일간 배양한 후 2주일마다 계대 배양하였다.

실험에 사용된 시약은 Difco Co. (USA)으로부터 구입하여 사용하였다.

3. 병핵활성능의 측정

3-1. Thermal couple의 선정 및 온도 변환식

thermoelectric thermometry는 서로 다른 종류의 열전대(thermocouple)의 접점이 담겨져 있는 두 가지 이상의 junction의 온도차에 의하여 전류가 발생하는데 그 전압을 potentiometer로 측정하는 장치이다(40, 41)(Figure 1). thermal electromotive force(e.m.f.)을 측정하기 위한 센서인 thermocouple은 Table 1에서 온도 범위가 넓고 영하의 온도 측정에 적합하며 수분 환경에서 금속의 변성에 내성이 있는 T type을 선정하였다(39, 40). Thermal electromotive force

Table 1. The temperature range and voltage range of each type thermocouple

Thermocouple	temperature range(°C)	Voltage range(μV)	Error(°C)
Type T :	-200 ~ 0	-5603 ~ 0	-0.02 ~ 0.04
Copper(+) vs Constantan(-)	0 ~ 400	0 ~ 20,872	-0.03 ~ 0.03
Type J :	-210 ~ 0	-8995 ~ 0	-0.05 ~ 0.03
Iron(+) vs Constatan(-)	0 ~ 760	0 ~ 42,919	-0.04 ~ 0.04
Type K : Nick-10% chromium(+) vs Nickel-5% aluminum and silicon(-)	-200 ~ 0	-5,891 ~ 0	-0.02 ~ 0.04
	0 ~ 500	0 ~ 20,644	-0.05 ~ 0.04
Type E : Nickel-10% chromium(+) vs constantan(-)	-200 ~ 0	-3,999 ~ 0	-0.02 ~ 0.03
	0 ~ 600	0 ~ 20,613	-0.02 ~ 0.03
Type R : platinum-13% rhodium(+) vs platinum(-)	-50 ~ 250	-226 ~ 1,293	-0.02 ~ 0.04
Type S : platinum-10% rhodium(+) vs platinum(-)	-50 ~ 250	-235 ~ 1,874	-0.02 ~ 0.02

* NIST : National Institute of Standards and Technology

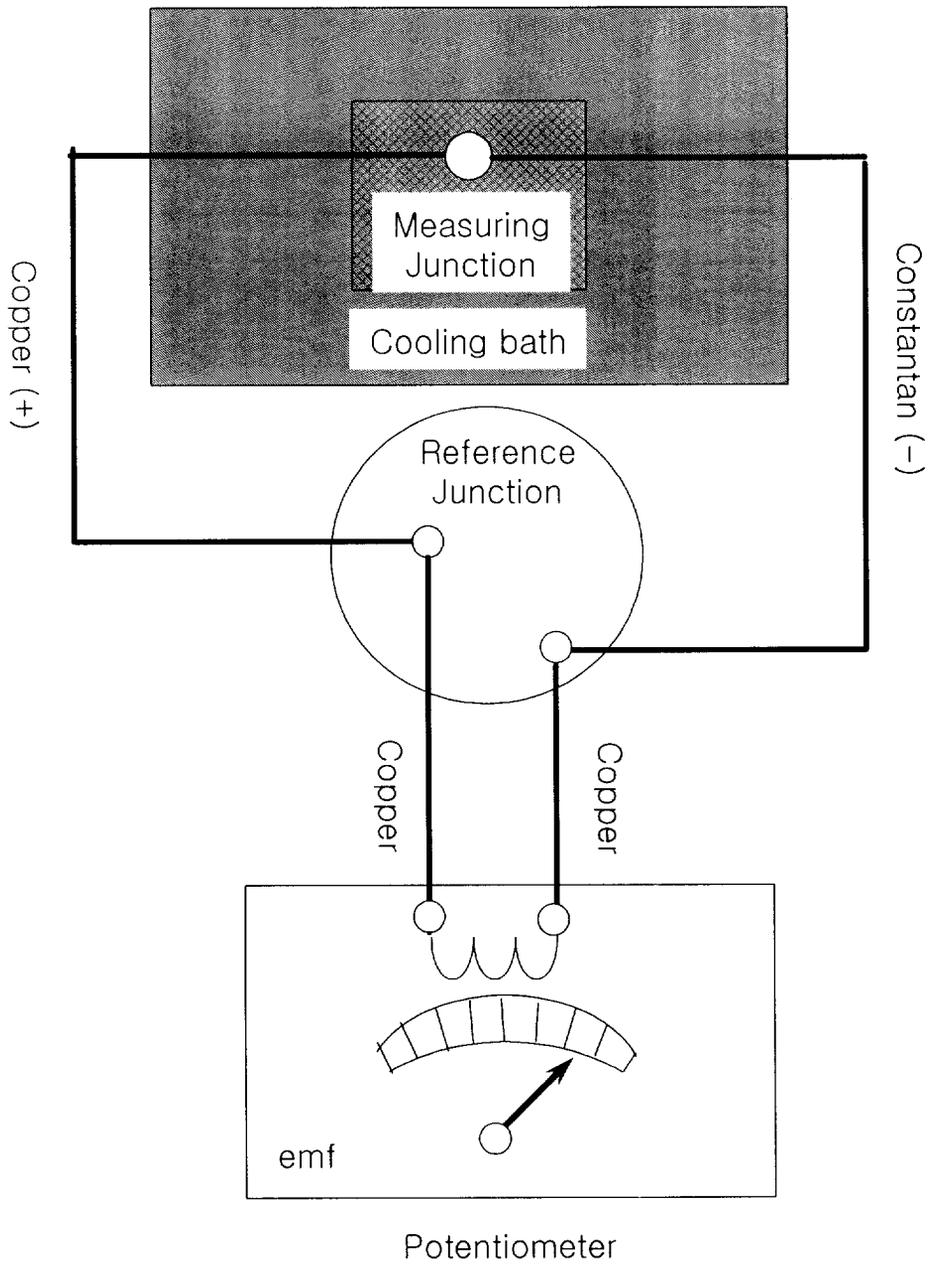


Figure 1. The schematic diagram of thermoelectric thermometry

의 온도변환식은 미국 국립표준기술연구소 (NIST : National Institute of Standards and Technology,)의 T-type thermocouple인 thermoelectric thermometry의 polynomial fit curve 관계식을 참고(50)로 하고 NaCl의 보메도에 따른 동결점의 변화에 의한 실험으로 polynomial linear equation을 만들어 내었다(Figure 2, Table 2).

$$T = 0.02636 \times E + 0.05669$$

T : Temperature (°C)

E : Thermal electromotive force (μV)

3 2. Thermal insulation cell의 제작

insulator는 Table. 4의 여러 가지 단열재 중 가공이 간단하며 열전도율이 가장 낮은 3가지 종류의 단열재인 glass wool, 난연성 발포 스티로폼, 폴리우레탄폼을 사용하여 만들었다(42). thermal cell은 직경 1cm의 아크릴 관에 동판을 집합시키고 나머지 부분은 insulator로 감싸서 1차원적인 열확산 cell을 제작하였다(43). 그리고 insulator와 brine 용액과의 접촉을 방지하기 위하여 아크릴 박스의 중심에 직경 1cm의 구멍을 뚫은 후 cell과 집합시켰다(Figure 3). 그리고, insulator의 단열능은 Figure 4에서 보는 바와 같이 4시간이 경과하여도 온도의 변화가 0.08°C 정도밖에 변하지 않았다. thermal cell(measure junction)을 cooling bath(Jeio tech. RBC 20 series)의 -20°C인 brine(ethylene glycol 50%)에 담가 cell 내부 용액의 온도를 강하시켰으며, potentiometer로는 Rikadenki HR-3312(Kogyo Co., LTD)를 사용하

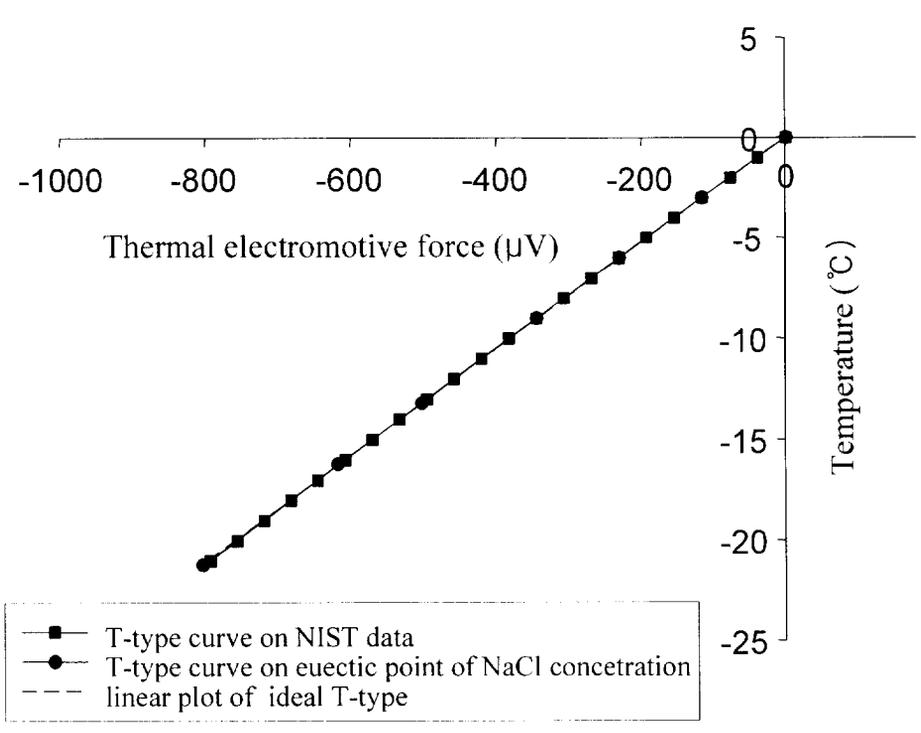


Figure 2. The standard curve of temperature by thermal electromotive force

Table 2. The freezing point by the baume degree of NaCl

Specific gravity	Baume degree	Freezing point (°C)	Thermoelectric force (μV)	Temperature (°C)
1.05	7	-4.4	-169.5	-4.41
1.08	11	-7.5	-288.0	-7.42
1.10	13.2	-9.8	-377.5	-9.79
1.12	15.6	-12.2	-466.0	-12.12
1.15	18.9	-16.6	-631.0	-16.54
1.175	21.6	-21.2	-806.1	-21.21

Table 3. The temperature correction of the thermocouple

Standard substance	Standard Temperature(°C)	Measurement temperature(°C)	Variation(°C)
Ice + Water	0	- 0.1	+ 0.1
Eutectic point of NaCl	- 21.2	- 21.2	+ 0.1

Table 4. The density and heat conductivity of domestic thermal insulation.

Thermal insulation	Density (g/cm ³)	Heat conductivity (kcal/mh°C)
Glass wool	0.01-0.04	0.028-0.043
Rock wool	0.03-0.10	0.024-0.029
Styrofoam	0.016-0.030	0.022-0.039
Plaster board	0.85-0.90	0.110-0.350
Urea form	0.01-0.02	0.025
Asbestos	0.08-0.14	0.022-0.039
Vermiculite	0.10-0.70	0.030-0.150
Calcium silicate insulating material	0.22	0.026-0.040
Gypsum plaster	0.89	0.350
Poly Urethane Foam	0.016-0.030	0.022-0.025

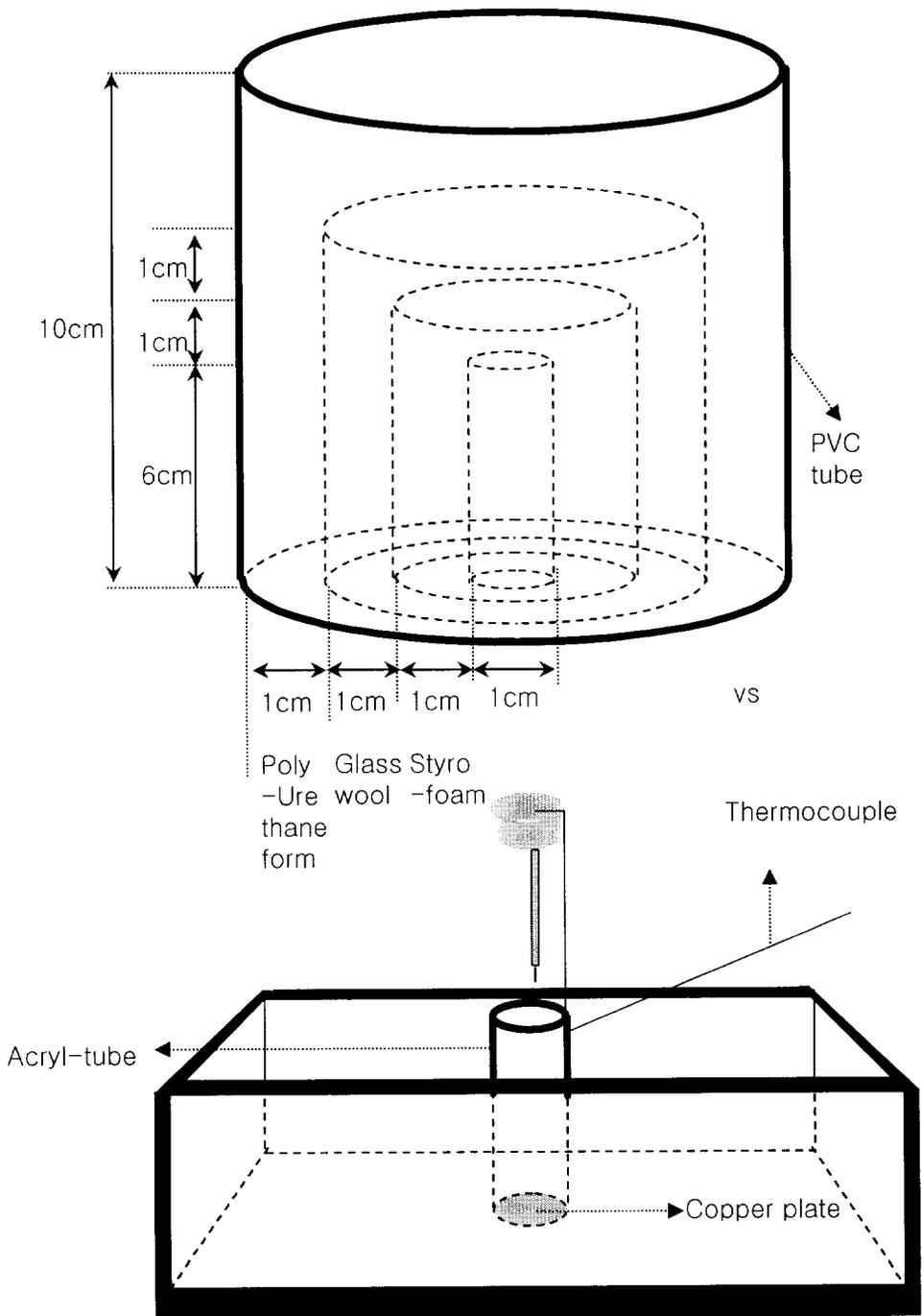


Figure 3. The three-dimensional diagram of the thermal cell with the insulator.

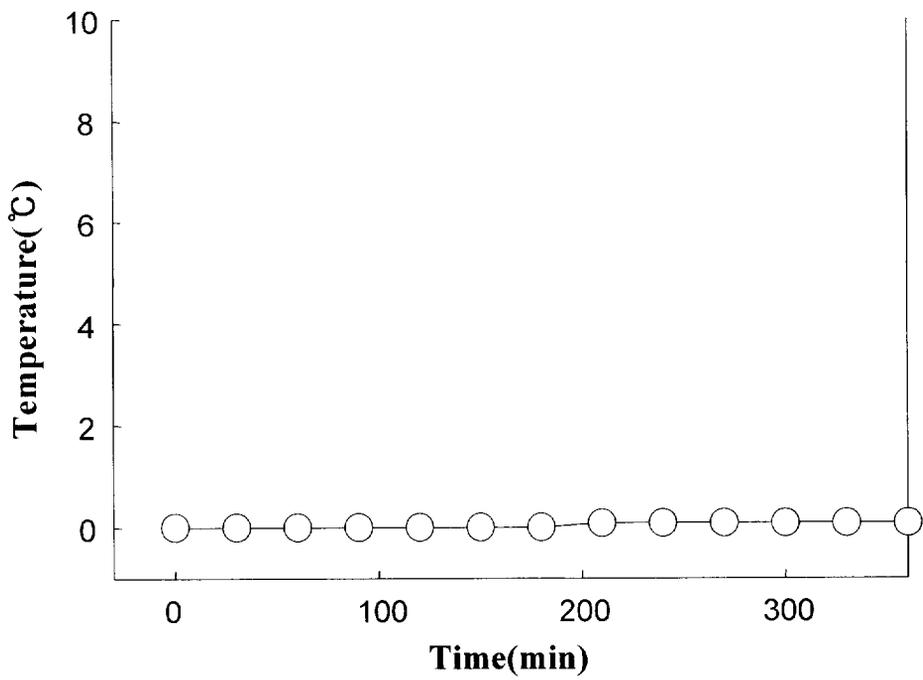
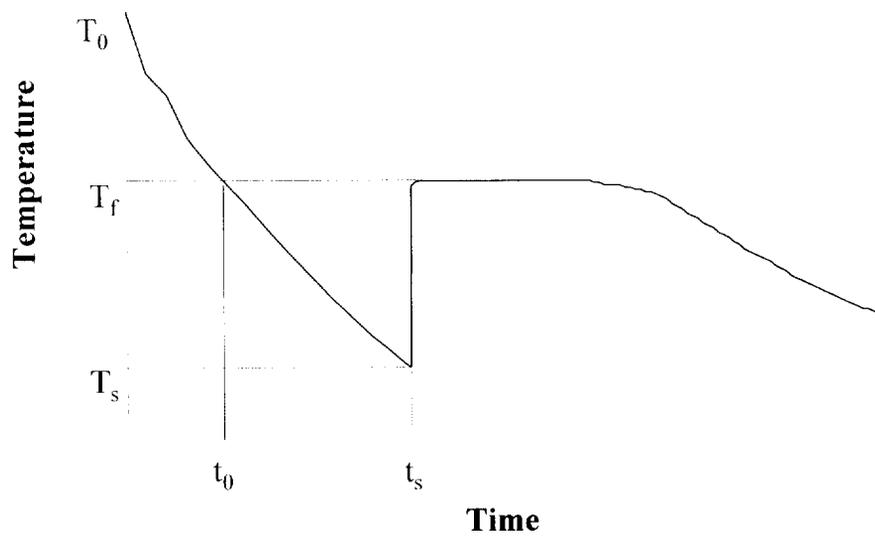


Figure 4. The insulation effect of the thermal cell

여 thermal electromotive force의 변화를 측정하였다. thermocouple의 온도 보정은 Table 3에서 보는바와 같이 표준온도에 비하여 실제온도가 0.1℃가 차이가 났으므로 측정온도에서 0.1℃ 상향 조정하여 보정하였다.

3-3. 빙핵활성능 측정

배양한 균주는 원심분리(10,000rpm, 10min)하였으며, 균체는 멸균한 증류수에 2회 세척하여 배지성분을 제거하였으며, 10배 희석하여 A₆₆₀에서 흡광도를 측정한 후 이 현탁액의 1mL을 흡광도 값이 0.01(1×10^7)이 되도록하였다. 그 후 3mL의 시료를 thermal cell에 넣고 thermocouple을 동판에서 5mm의 높이로 설치한 후, insulator로 cell의 주위를 단열시켜 potentiometer로 thermal electromotive force를 측정하였다. thermal cell은 10℃ circulator에 일정시간 놓아두어 sample의 초기 온도를 일정하게 맞추었다. 시료의 온도가 10℃로 되면, water : ethylene glycol = 50 : 50 인 -20℃ cooling bath에 넣고 thermal electromotive force의 변화를 potentiometer로 기록하였다. 표준시료는 균체를 첨가하지 않은 증류수 3mL을 사용하였다. 이러한 동결실험 결과로부터 얻어진 동결곡선으로부터 과냉각시간, 과냉각온도, 동결온도 등을 측정하여 빙핵활성능을 비교평가 하였다. 이때 과냉각시간이 짧을수록, 과냉각온도와 동결온도가 높을수록 빙핵활성능이 좋은 것으로 평가한다. 측정된 온도변화를 동결곡선으로 나타내면 Figure 5와 같으며 이때 과냉각온도(T_s)는 최저온도를, 동결점(T_f)은 급격히 온도가 상승하여 일정하게 지속되는 온도로 결정한다. 또한 과냉각온도를 나타내는 T_f 와 T_s 의 차가 적을수록 빙핵활성능이 좋은 것으로 평가한다(44).



- T_0 : Initial temperature
- T_s : Supercooling temperature
- T_f : Freezing temperature (nucleation temperature)
- $T_s - T_f$: Degree of supercooling
- t_0 : Time at 0°C
- t_s : Supercooling time

Figure 5. Typical freezing curve of solution material

4. 빙핵활성 세균의 최적 배양조건

4-1. 탄소원의 영향

미생물의 증식과 빙핵활성능에 미치는 영향을 알아보기 위해 nutrient medium에 glucose, fructose, sucrose, maltose, lactose, galactose, citric acid를 1%(w/v)씩 첨가하여 균체의 농도와 빙핵활성능을 측정하여 최적 탄소원을 선정하였다. 그리고 이 선정된 탄소원을 0~1.4%(w/v)까지 농도별로 배양하여 최적농도를 결정하였다.

4-2. 질소원의 영향

질소원의 영향을 알아보기 위해 nutrient medium에 beef extract와 peptone 대신 각종 질소원을 1%(w/v)씩 첨가하여 배양하였다. 이들 중 가장 균체 성장이 좋고 빙핵활성능이 뛰어난 질소원으로 선정한 후 0~1.6%(w/v) 까지 농도별로 배양하여 최적 농도를 결정하였다.

4-3. 무기 염류의 영향

미생물 증식과 빙핵활성능에 미치는 무기염류의 영향을 알아보기 위해 선정된 배지에 각종 무기염류를 0.04%(w/v)씩 첨가하여 배양하였다. 선정된 최적 무기염류의 농도를 0~0.08%(w/v) 범위에서 농도별로 배양하여 최적농도를 선정하였다.

4-4. 초기 pH의 영향

미생물 증식과 빙핵활성능에 미치는 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 초기 pH를 pH 4.5~8.5 범위까지 조절한 후 균체생육 및 빙핵활성능을 측정하였다.

4 5. 배양 온도의 영향

배양 온도에 의한 영향을 조사하기 위하여 25시간 배양 후 각각의 온도에서의 균체 생육과 빙핵활성능을 비교하였다.

4-6. 배양시간의 영향

미생물 증식과 빙핵활성능에 미치는 배양시간의 영향을 조사하기 위해서, 균주를 배양하면서 3시간마다 균주생장과 빙핵활성능, 배양액의 pH의 변화를 측정하였다. 균주의 생장은 배양액을 A₆₆₀에서 흡광도 측정 및 건조세포중량을 측정 하였다.

5. 농도에 따른 빙핵활성능과 온도안정성

5-1. 빙핵활성 균주의 농도에 따른 빙핵활성

빙핵활성 균주의 균체의 농도에 따른 과냉각 온도와 과냉각 시간을 알아보기 위해 균체를 A₆₆₀에서 흡광도 값이 0.001에서 0.02까지의 범위가 되도록 증류수에 현탁하여 만든 시료 용액들을 3mL씩 thermal cell에 넣은 후 각각의 빙핵활성능을 조사하였다.

5-2. 보관온도에 의한 빙핵활성능의 안정성

빙핵활성 균주를 4, 10, 15, 25℃의 온도에서 12시간 동안 보관하여 빙핵활성능이 보관온도에 관하여 얼마나 감소하는가를 관찰하였다. 그리고 각각을 3시간마다 sampling하여 시간이 지남에 따라 빙핵활성능이 얼마나 감소하는가를 조사하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 빙핵활성 세균의 최적배양조건

높은 빙핵활성능과 고농도 빙핵세균의 생산을 위하여 여러 가지 배양 조건과 배지조성에서 *Xanthomonas translucens* KCTC-2751을 배양하여 균체의 생육과 빙핵활성을 비교하였으며, 최적배양조건을 확립하였다.

1-1. 탄소원의 영향

탄소원은 미생물의 생육에 있어서 에너지원 및 세포구성 물질원으로 써 이용된다. 그러므로 미생물의 증식과 빙핵활성능에 미치는 탄소원의 영향을 알아보기 위해서 nutrient medium에 탄소원을 첨가한 배양액을 가지고 실험하였다(Figure 7). 그 결과 sucrose와 maltose가 균체 생장이 높은 기질이었다. 빙핵활성의 경우 Figure 7에서 보는 바와 같이 증류수의 경우 약 -7.7°C 까지 과냉각이 일어났고 과냉각시간이 18분 10초였다. 이와 비교하여 탄소원을 넣지 않은 균주와 glucose, lactose, maltose, fructose에 배양한 균주는 과냉각온도가 상승하였고, 과냉각 시간도 크게 절약됨을 보이는데 반해 sucrose, citric acid, galactose에 배양한 균주는 증류수보다는 높은 과냉각온도와 단축된 과냉각 시간을 보이지만 탄소원을 첨가하지 않은 균주의 빙핵활성능보다 현저히 낮은 수치를 나타내었다. 그러므로 최적 탄소원은 균체 성장과 빙핵활성능이 높은 maltose로 선정하였다.

또한, Figure 8에서 보는 바와 같이 maltose를 0~1.4%까지 농도별로 첨가하였을 때는 maltose의 농도가 1.0%이상일 때는 첨가한 탄소원에 비해 균체의 성장은 더 이상 증가하지 않았으며, 과냉각온도는 maltose

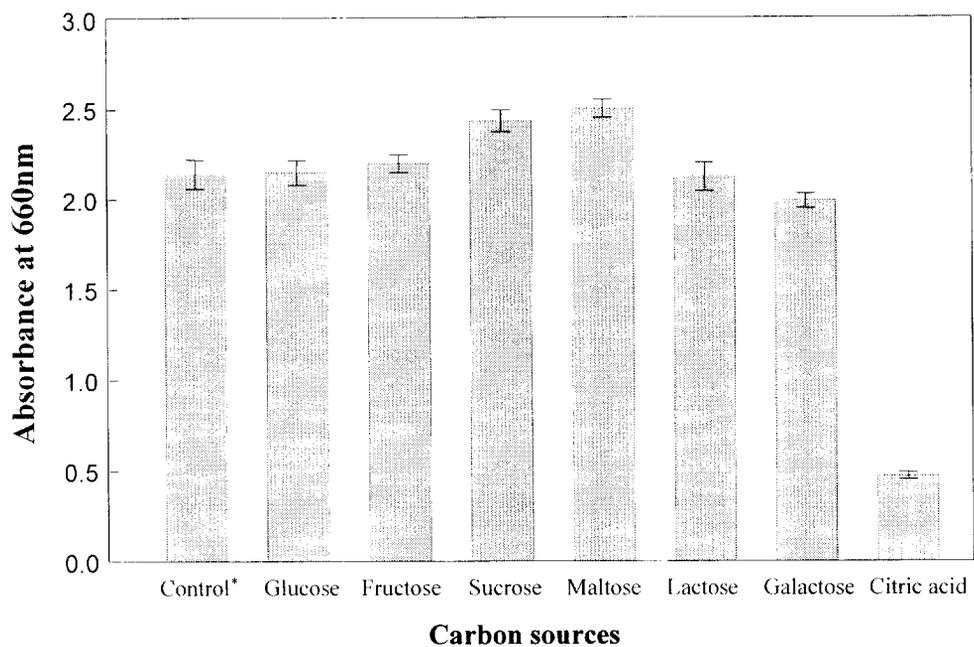


Figure 6. The effect of various carbons sources on the growth of *Xanthomonas translucens* KCTC-2751

Cells were grown for 25 hours at 25°C with shaking in medium containing 0.3% beef extract, 0.5% peptone and 1.0% carbon source.

*Cells were grown for 25 hours at 25°C with shaking in medium containing 0.3% beef extract, 0.5% peptone.

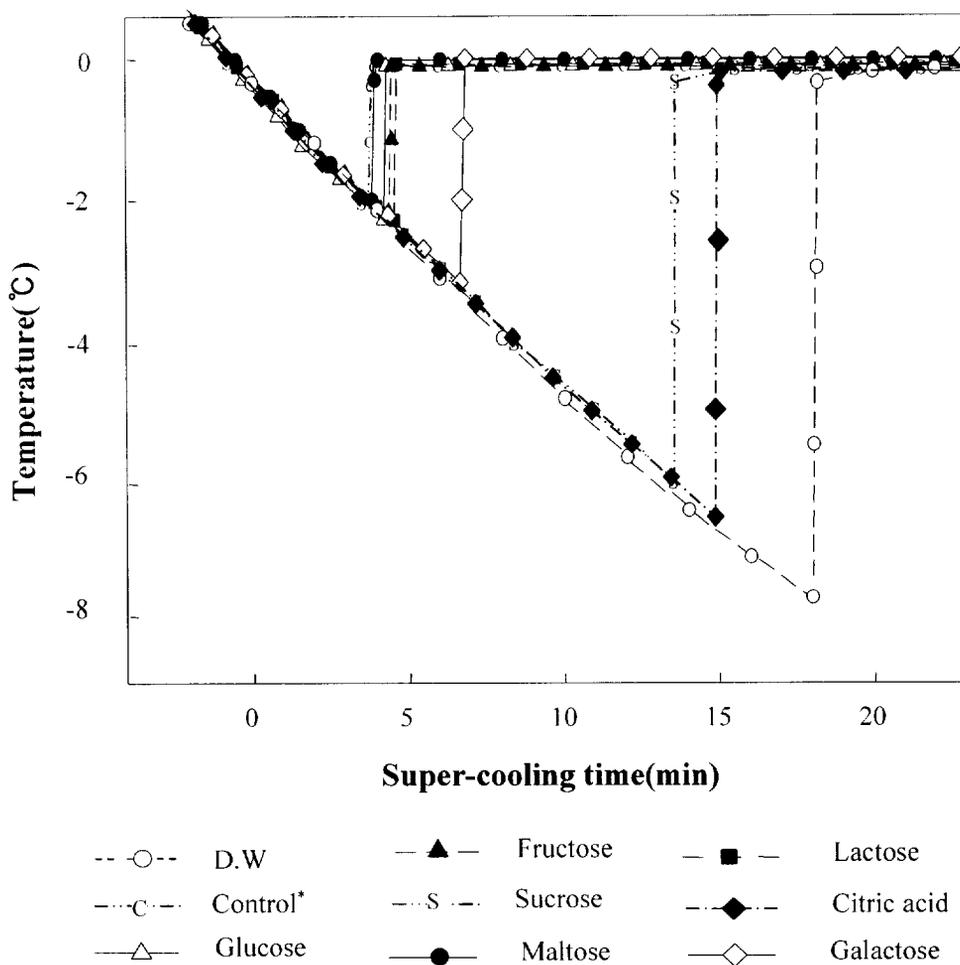


Figure 7. The effect of various carbons sources on the degree of supercooling by *Xanthomonas translucens* KCTC-2751

Cells were grown for 25 hours at 25°C with shaking in medium containing 0.3% beef extract, 0.5% peptone and 1.0% carbon source.

The cell concentration was adjusted to a A_{600} reading of 0.01. (3mL)

*Cells were grown for 25 hours at 25°C with shaking in medium containing 0.3% beef extract, 0.5% peptone

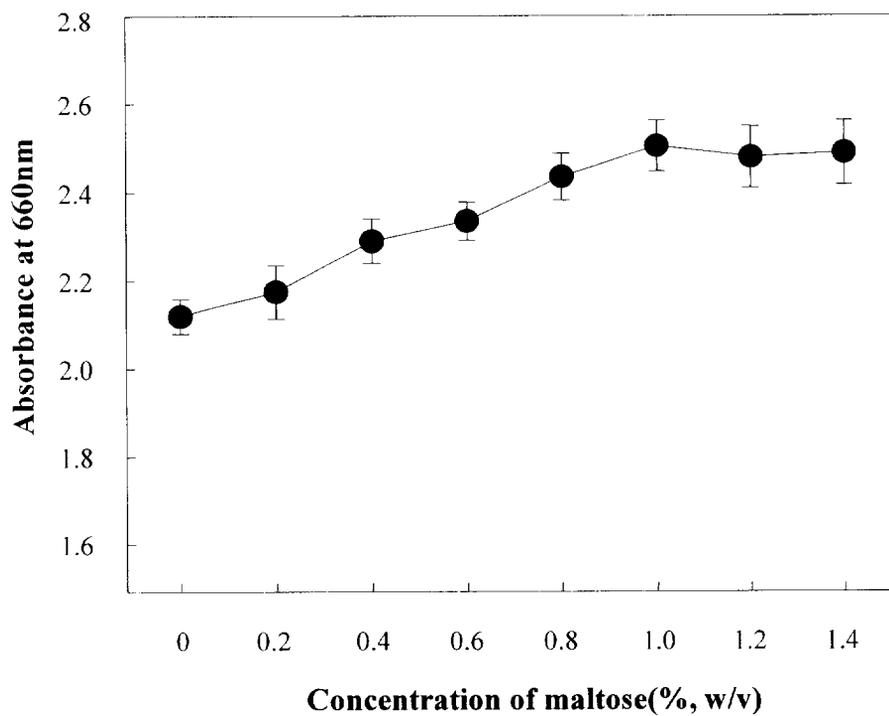


Figure 8. The effect of maltose concentration on the growth of *Xanthomonas translucens* KCTC-2751.

Cells were grown for 25 hours at 25°C with shaking in medium containing 0.3% beef extract, 0.5% peptone and each other concentration of maltose.

의 농도에 영향을 받지 않았다. 그러므로 1.0%의 maltose를 최적 탄소 원으로 선정하였다.

1-2. 질소원의 영향

질소원은 미생물 균체의 단백질과 핵산 등의 합성에 필요한 영양원으로 탄소원과 마찬가지로 에너지원으로서의 역할을 동시에 한다. Figure 9에서 나타낸 것처럼 여러 가지 질소원을 첨가한 결과, yeast extract가 가장 균체의 생장이 뛰어났다. 그리고 과냉각온도는 proteose peptone, digested of casein, yeast extract가 다른 질소원들보다 높았다(Figure 10). 그러므로 균체의 성장 뿐만 아니라 병핵활성능이 뛰어난 yeast extract로 선정하였다. 그리고 선정된 yeast extract를 고정시킨 후, 다른 질소원들을 첨가한 결과, digested of gelatin이 가장 과냉각온도가 높은 proteose peptone과 유사한 병핵활성능을 보이면서 가장 뛰어난 균체 성장을 나타내었다(Figure 11, 12).

digested of gelatin의 농도를 1%로 고정시킨 후 yeast extract를 0~1.6%의 농도별로 첨가한 결과, 1.2%이상의 농도에 비해 균체의 성장 차이가 없었고, 1.0%이상에서는 과냉각온도도 유사하였으므로 1.2%의 yeast extract를 최적 농도로 선정하였다(Figure 13, 14). 다음으로 yeast extract를 1.2%로 고정시킨 후 digested of gelatin을 0~1.6%의 농도별로 첨가한 결과 0.8%이상에서는 균체의 생장이 거의 일정했으며, 과냉각온도도 농도에 영향을 받지 않았으므로, 0.8%를 digested of gelatin의 최적 농도로 선정하였다(Figure 15).

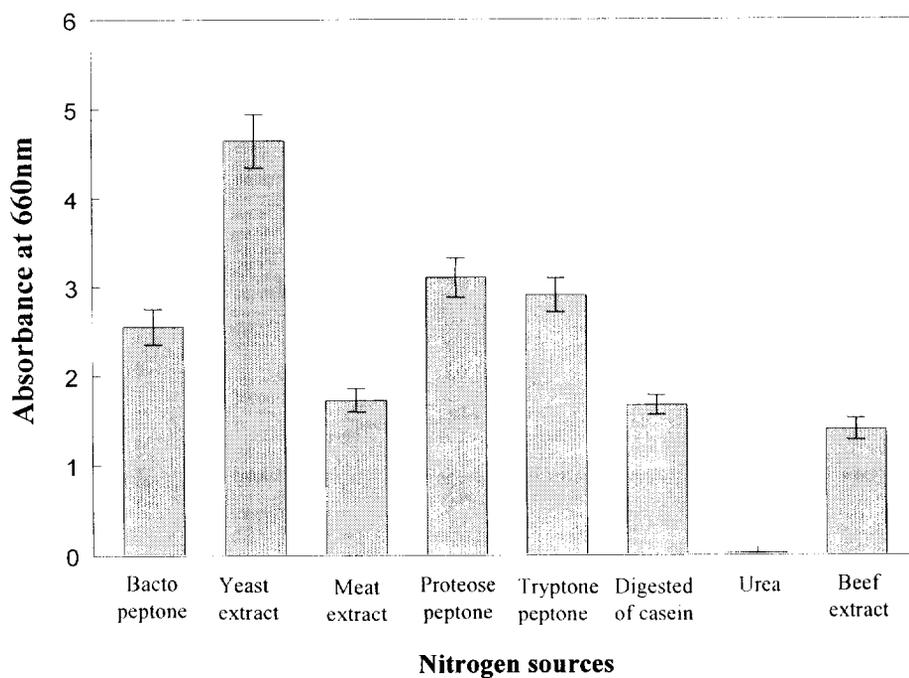


Figure 9. The effect of various nitrogen sources on the growth of *Xanthomonas translucens* KCTC-2751

Cells were grown for 25 hours at 25°C with shaking in medium containing 1.0% maltose and 1.0% nitrogen source.

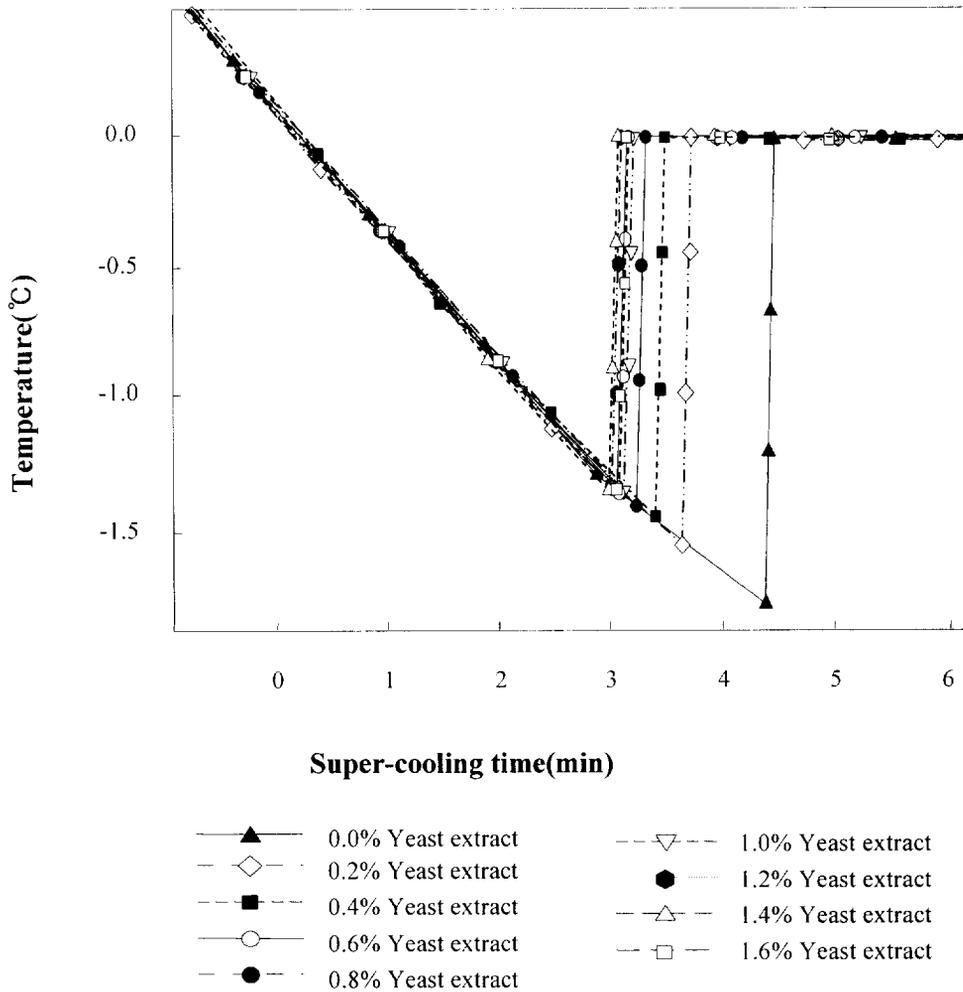


Figure 10. The effect of various nitrogen sources on the degree of supercooling by *Xanthomonas translucens* KCTC-2751

Cells were grown for 25 hours at 25°C with shaking in medium containing 1.0% maltose and 1.0% nitrogen source.

The cell concentration was adjusted to a A_{600} reading of 0.01(3mL).

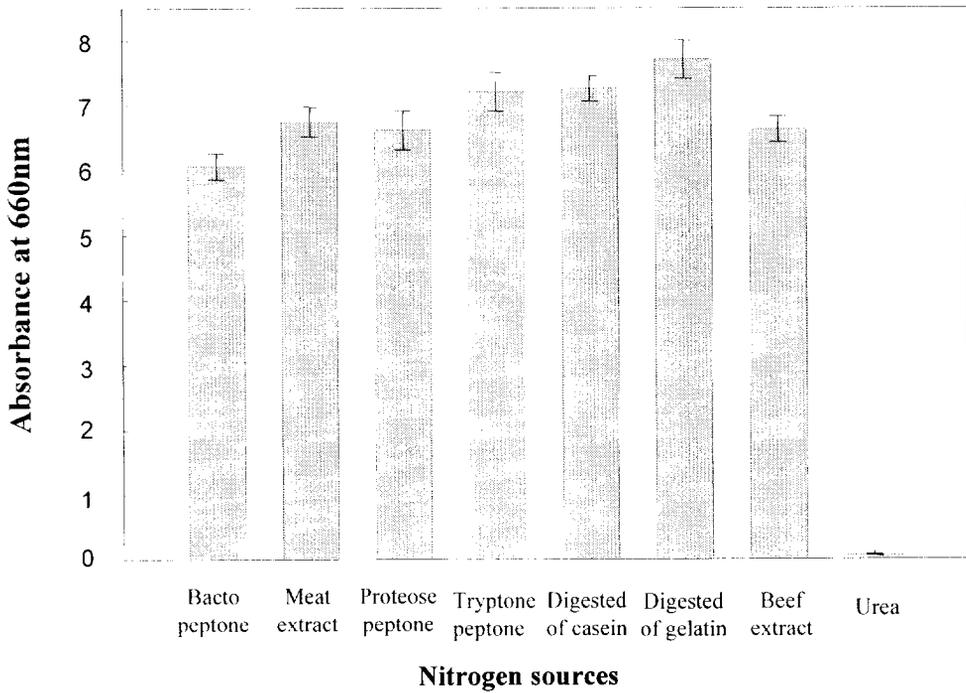


Figure 11. The effect of combination of nitrogen sources on the growth of *Xanthomonas translucens* KCTC-2751

Cells were grown for 25 hours at 25°C with shaking in medium containing 1.0% maltose, 1.0% yeast extract and other 1.0% nitrogen source.

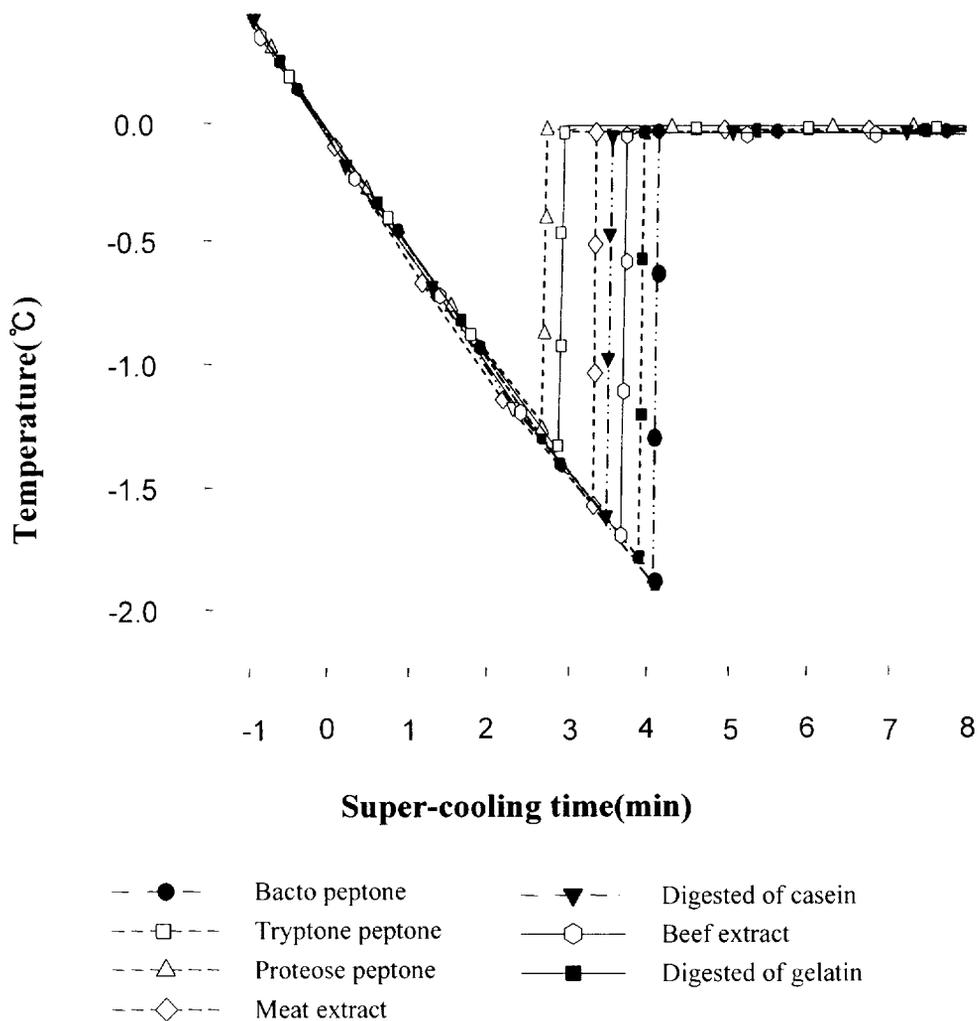


Figure 12. The effect of combination of nitrogen sources on the degree of supercooling by *Xanthomonas translucens* KCTC-2751

Cells were grown for 25 hours at 25°C with shaking in medium containing 1.0% maltose, 1.0% yeast extract and 1.0% other nitrogen source. The cell concentration was adjusted to a A_{660} reading of 0.01(3mL).

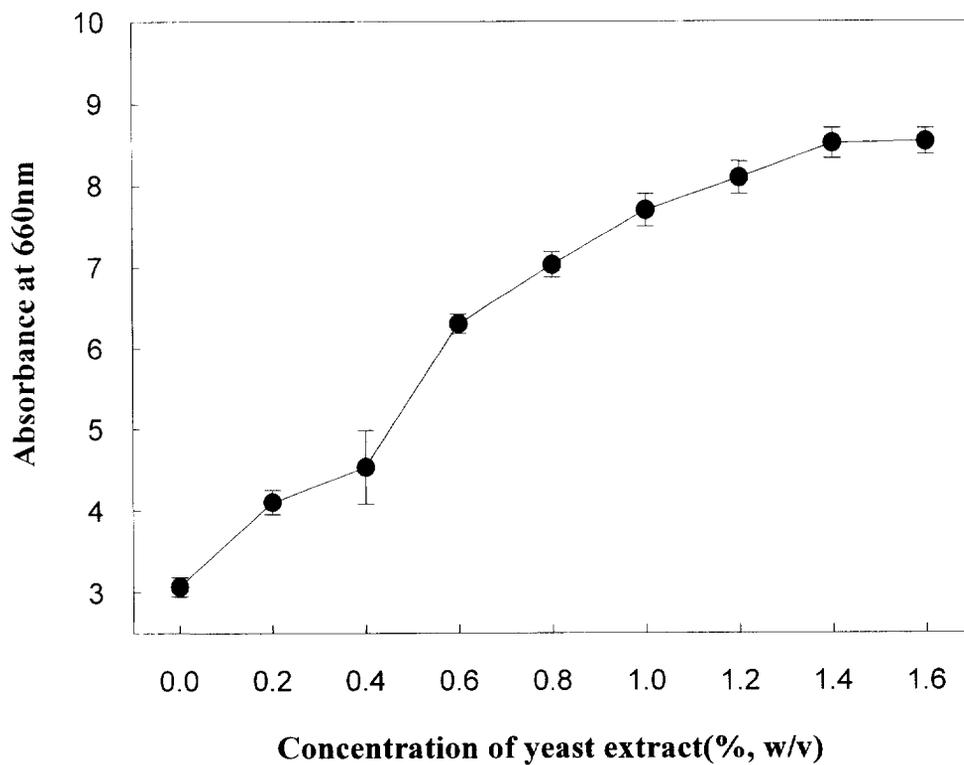


Figure 13. The effect of yeast extract concentration on the growth of *Xanthomonas translucens* KCTC-2751

Cells were grown for 25 hours at 25°C with shaking in medium containing 1.0% maltose, 1.0% digested of gelatin and each other concentration of yeast extract

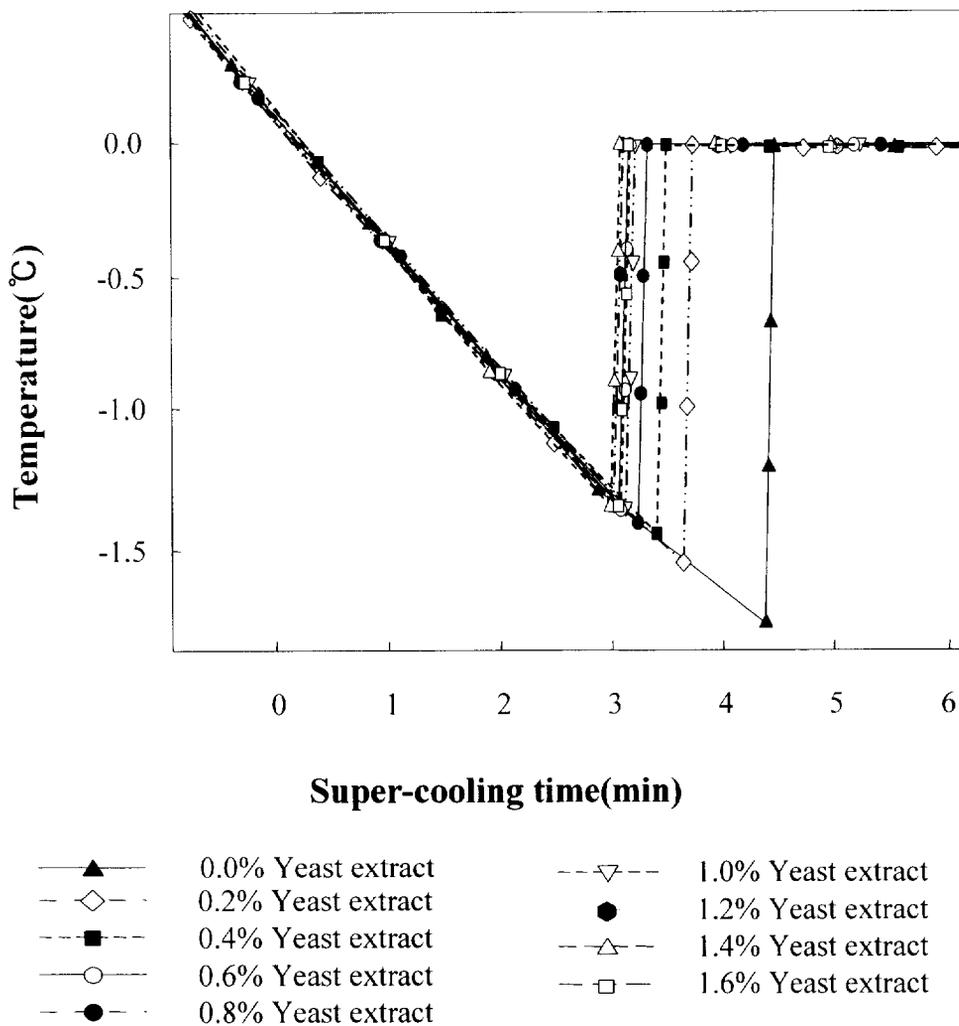


Figure 14. The effect of yeast extract concentration on the degree of supercooling by *Xanthomonas translucens* KCTC-2751

Cells were grown for 25 hours at 25°C with shaking in medium containing 1.0% maltose, 1.0% digested of gelatin and each other concentration of yeast extract.

The cell concentration was adjusted to a A_{630} reading of 0.01(3mL).

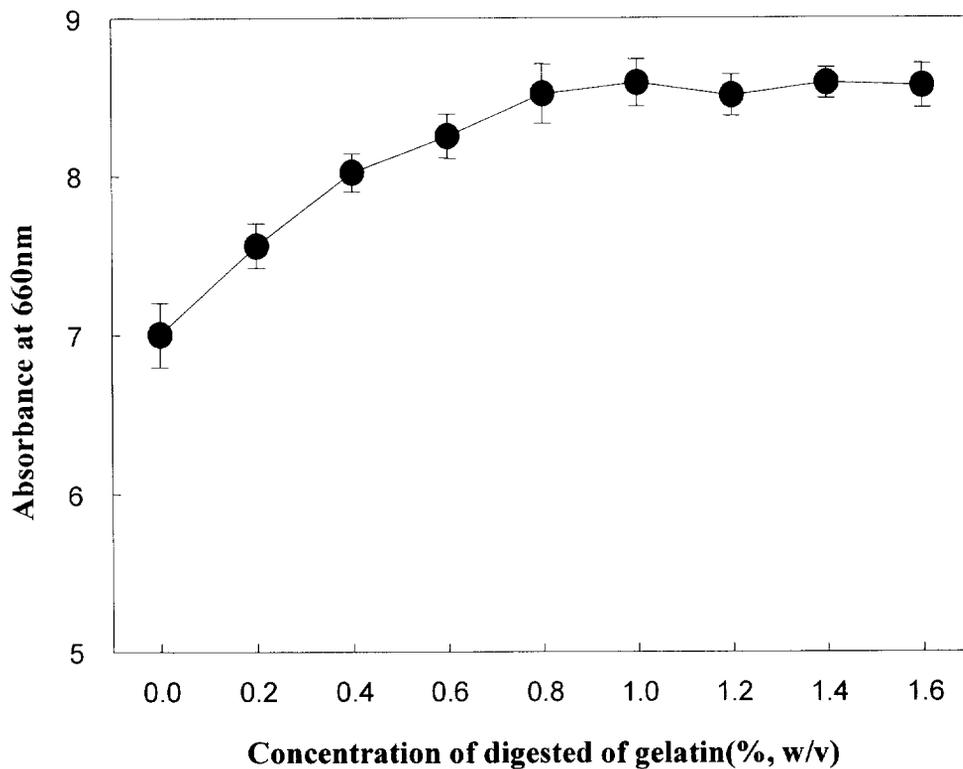


Figure 15. The effect of digested of gelatin concentration on the growth of *Xanthomonas translucens* KCTC-2751

Cells were grown for 25 hours at 25°C with shaking in medium containing 1.0% maltose, 1.2% yeast extract and each other concentration of digested of gelatin.

1 3. 무기염류의 영향

Figure 16과 Figure 17은 여러 가지 무기염류에 대한 영향을 나타낸 것이다. 세포의 성장에서는 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 가 가장 뛰어났지만 과냉각 온도가 다른 뛰어난 무기염들보다는 떨어졌으며, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 선정하지 않은 가장 큰 이유는 인간의 골아 세포에 독성을 가지는 중금속이기 때문에 두 번째로 세포의 생장이 뛰어나고, 빙핵활성능이 뛰어난 KCl을 무기염류로 선정하였다.

또한 KCl을 0~0.08%까지 농도별로 첨가한 결과 0.03%이상에서는 균체의 생장이 저조하였고, 과냉각온도는 KCl의 농도에 영향을 받지 않았으므로 0.03%의 KCl을 최적 무기염류로 선정하였다(Figure 18).

1-4. 초기 pH의 영향

균체의 생장은 초기 pH에 의해 크게 영향을 받으므로, pH 4.5~8.5까지 초기 pH를 달리하여 배양하였다. 그 결과 Figure 19에서 나타낸 것처럼 pH 6.5에서 균체의 생장이 가장 높았으며, pH 5.5이하와 pH 8이상에서는 현저하게 감소하였다. 또한 균체의 빙핵활성능은 pH 6.0~7.5에서 거의 유사하게 높은 수치를 나타내었으므로, pH 6.5를 최적 초기 pH로 선정하였다(Figure 20).

1 5. 배양온도의 영향

온도는 미생물 성장에 가장 많은 영향을 주는 중요한 환경요인으로, 온도가 상승하면 효소 반응이나 화학반응이 활발해져서 생장이 왕성해지나, 반대로 빙핵활성 단백질은 온도가 올라갈수록 열에 의해 불활성화 된다고 보고된바 있다.(29) 그러므로 가장 적당한 배양 온도를 정하기 위해 15~40℃ 범위에서 배양해 보았다. 보고된 바와 같이 균체의

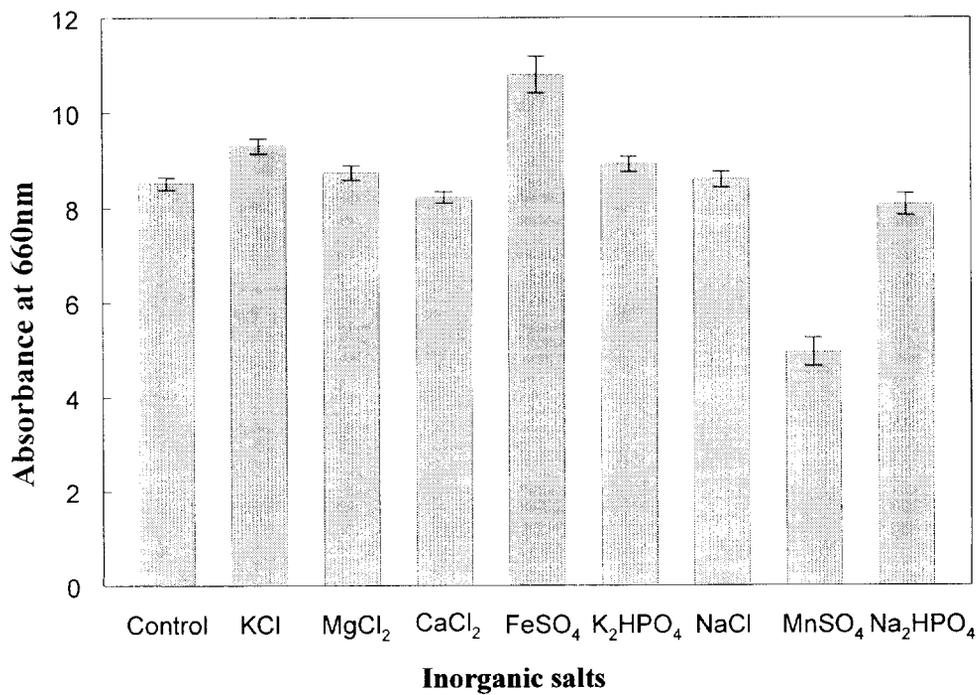


Figure 16. The effect of various inorganic salts on the growth of *Xanthomonas translucens* KCTC-2751

Cells were grown for 25 hours at 25°C with shaking in medium containing 1.0% maltose, 1.2% yeast extract and 0.8% digested of gelatin and 0.04% inorganic salt.

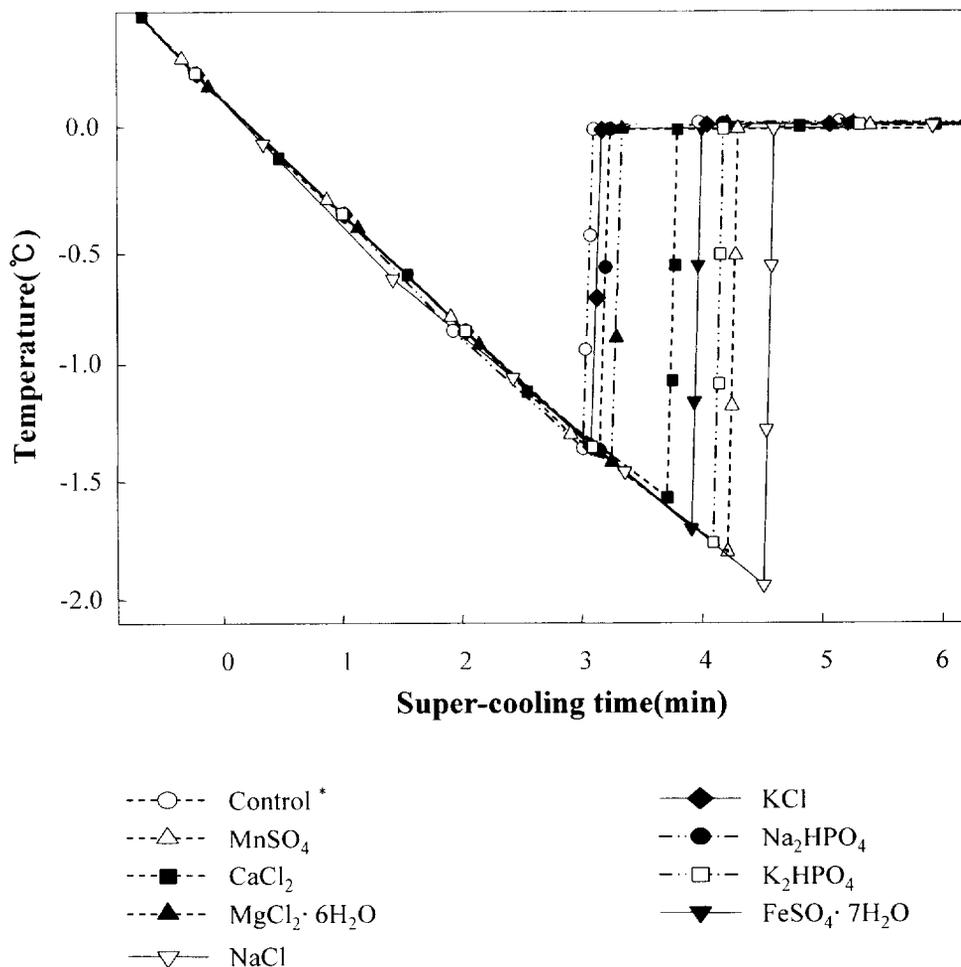


Figure 17. The effect of various inorganic salts on the degree of supercooling by *Xanthomonas translucens* KCTC-2751

Cells were grown for 25 hours at 25°C with shaking in medium containing 1.0% maltose, 1.2% yeast extract and 0.8% digested of gelatin and 0.04% inorganic salt.

The cell concentration was adjusted to a A_{660} reading of 0.01(3mL).

Cells were grown for 25 hours at 25°C with shaking in medium containing 1.0% maltose, 1.2% yeast extract and 0.8% digested of gelatin.

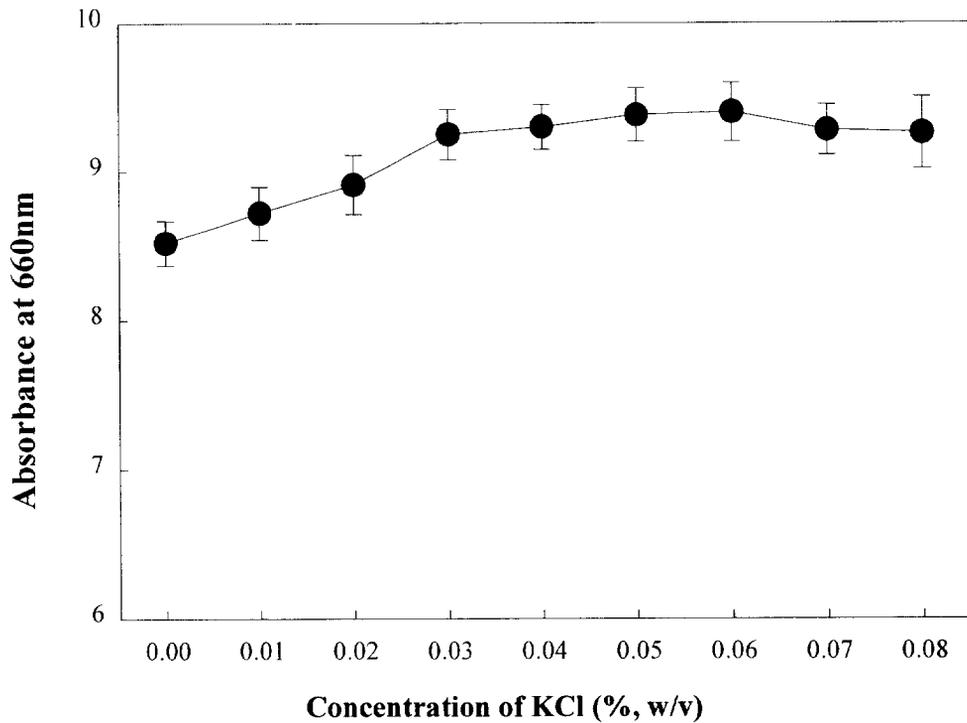


Figure 18. The effect of KCl concentration on the growth of *Xanthomonas translucens* KCTC-2751

Cells were grown for 25 hours at 25°C with shaking in medium containing 1.0% maltose, 1.2% yeast extract, 0.8% digested of gelatin and each other concentration of KCl.

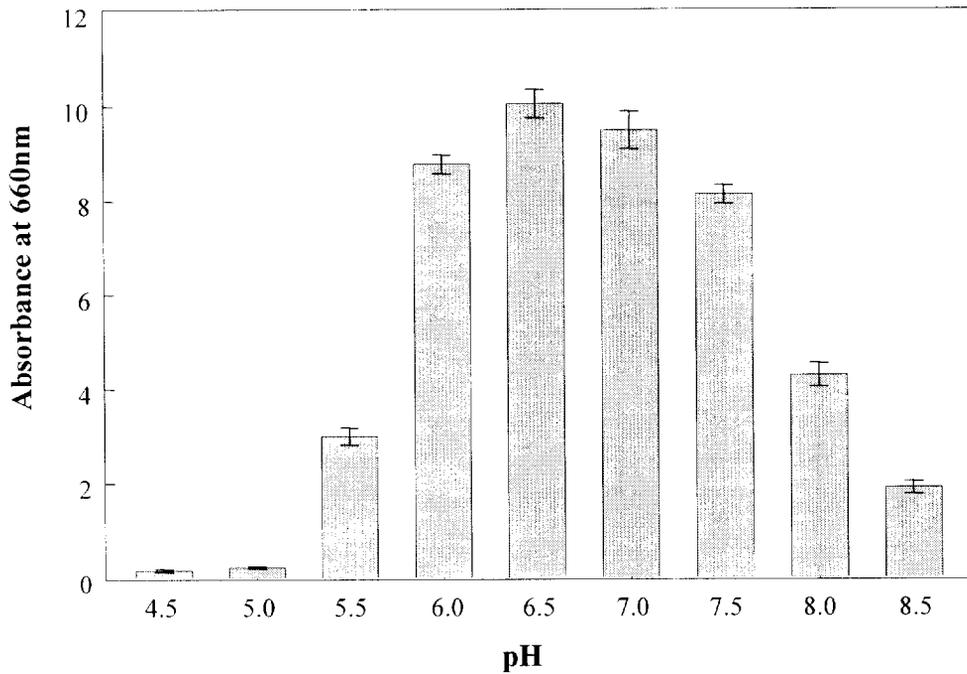


Figure 19. The effect of various initial pH on the growth of *Xanthomonas translucens* KCTC-2751

Cells were grown for 25 hours at 25°C with shaking in medium containing 1.0% maltose, 1.2% yeast extract, 0.8% digested of gelatin 0.03% of KCl and each initial pH.

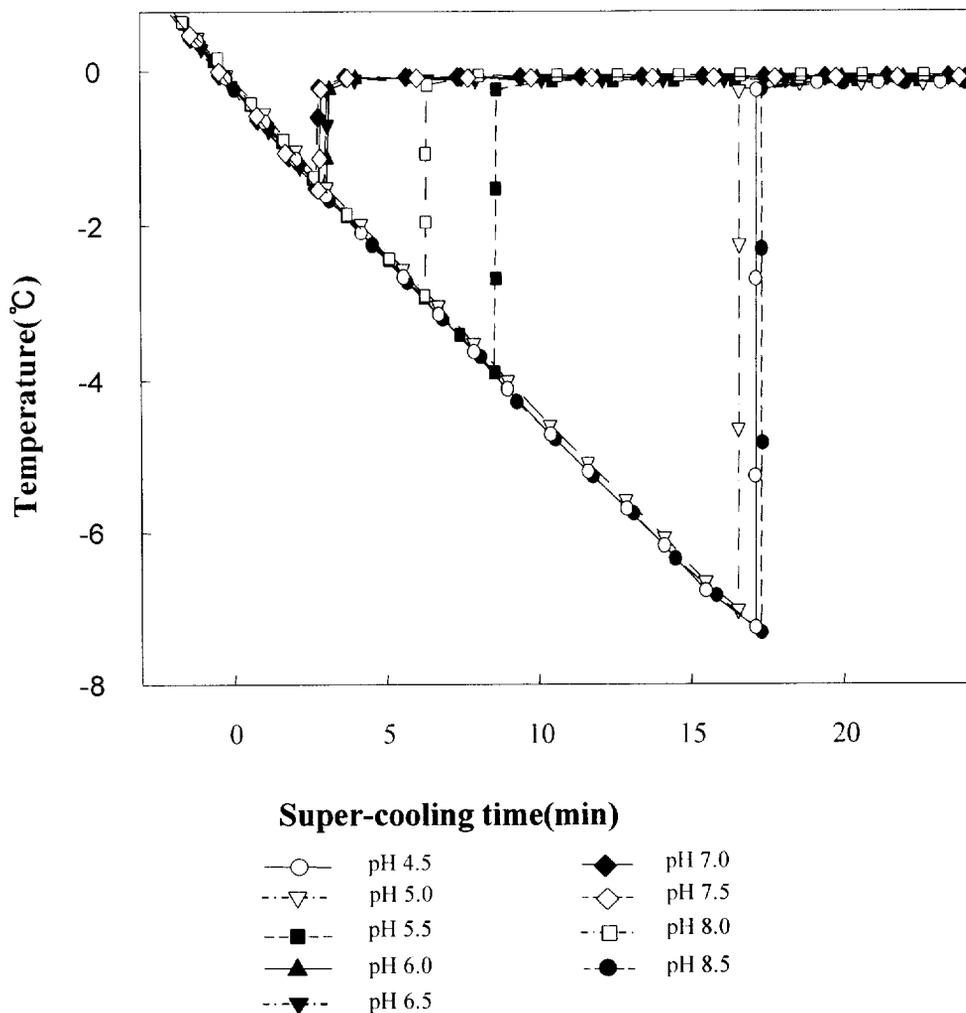


Figure 20. The effect of various initial pH on the degree of supercooling by *Xanthomonas translucens* KCTC -2751

Cells were grown for 25 hours at 25°C with shaking in medium containing 1.0% maltose, 1.2% yeast extract, 0.8% digested of gelatin 0.03% of KCl and each initial pH.

The cell concentration was adjusted to a A_{600} reading of 0.01(3mL).

생장과 빙핵활성능은 배양온도에 의해 크게 영향을 받을 수 있는데 균체는 25℃에서 최대로 성장하였으며, 37℃ 이상에서는 크게 생장이 저해되는 것으로 나타났다. 빙핵활성능 또한 20~25℃에서 높게 나타났으며, 30℃ 이상에서는 빙핵활성능이 크게 떨어졌다. 그러므로, 최적 배양 온도를 25℃로 선정하였다(Figure 21).

1-6. 배양시간의 영향

Figure 22는 높은 빙핵활성능과 균체생장을 의한 배양시간의 영향을 나타낸 것으로 배양액을 3시간마다 측정하였다. 균체의 생장은 24시간에서 최대를 나타냈으며, 27시간 이후로는 점차 생장이 감소하였다. 과냉각 온도는 초기에는 거의 활성을 나타내지 않다가 정지기에 들어선 15시간부터 높은 빙핵활성능을 보였으며, 사멸기인 33시간 이후에는 빙핵활성능이 감소하였다. 그러므로 최적 배양시간은 정지기에 해당하는 24시간으로 선정하였다.

2. 농도에 따른 빙핵활성능과 안정성

2-1. 빙핵활성균주 농도에 따른 빙핵활성능

Figure 23에서 보는 바와 같이 균체의 농도가 높을수록 과냉각온도가 기하급수적으로 상승하는 것을 볼 수 있으며, 균체의 농도가 2×10^7 이상일 경우에는 거의 과냉각 현상이 일어나지 않고 동결 현상이 시작되는 것을 볼 수 있었다.

2 2. 보관온도에 의한 빙핵활성능의 안정성

Figure 24에서 보는 바와 같이 보관 온도가 25℃일 경우에는 시간이

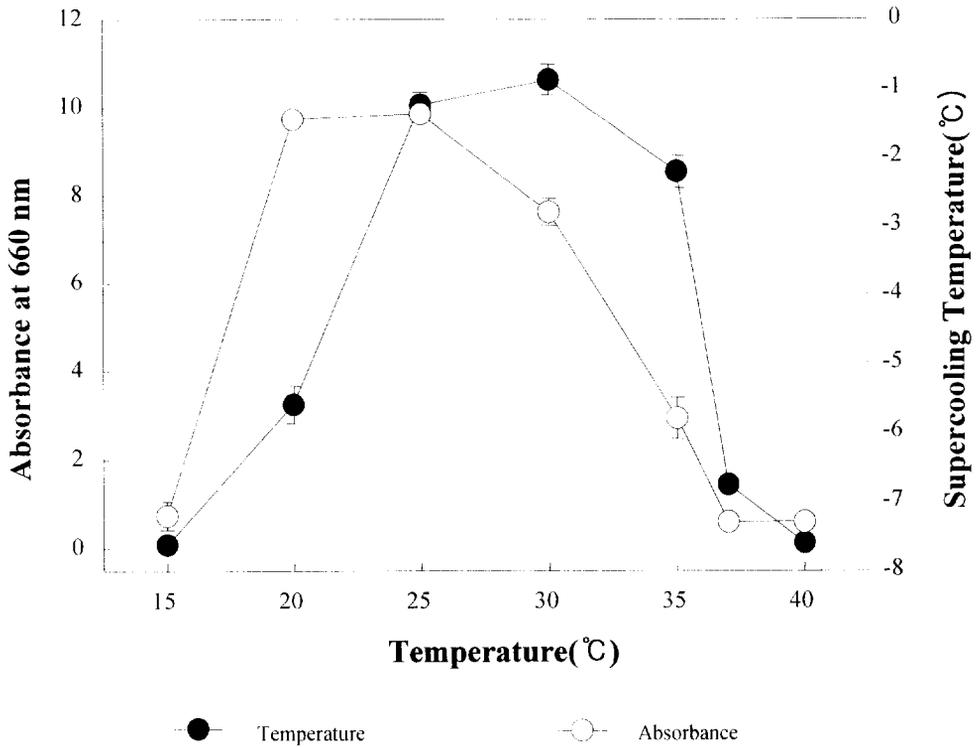


Figure 21. The effect of various temperature on the cell growth and ice nucleating activity of *Xanthomonas translucens* KCTC-2751

Cells were grown for 25 hours at various temperature with shaking in medium containing 1.0% maltose, 1.2% yeast extract, 0.8% digested of gelatin 0.03% of KCl and initial pH6.5.

The cell concentration was adjusted to a A_{660} reading of 0.01(3mL).

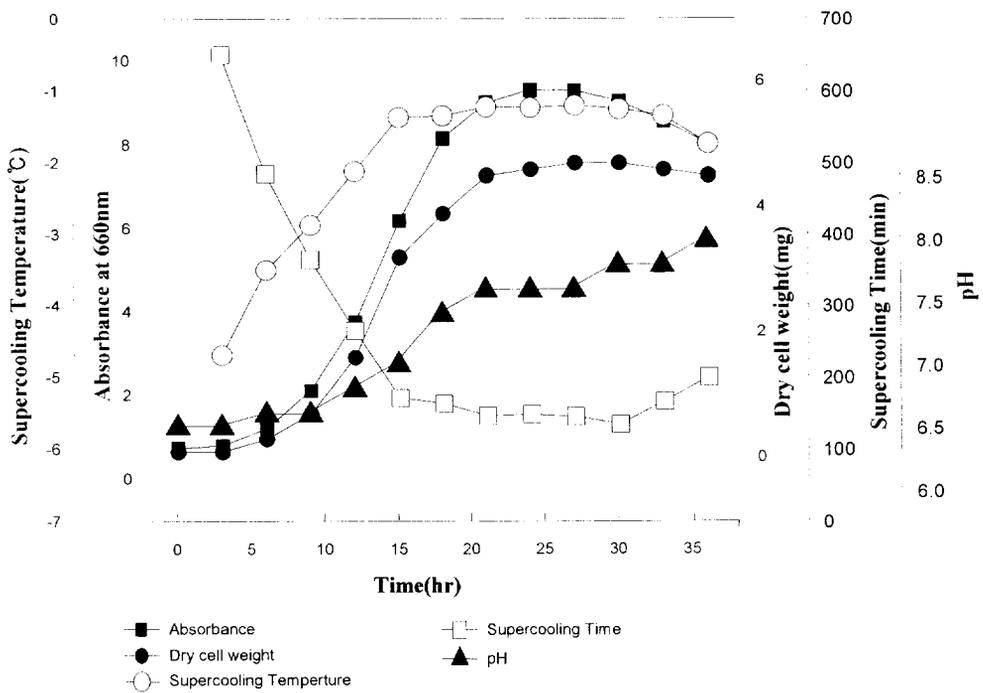


Figure 22. The relationship between the growth curve and the ice nucleating activity of *Xanthomonas translucens* KCTC -2751 under the optimal culture conditions

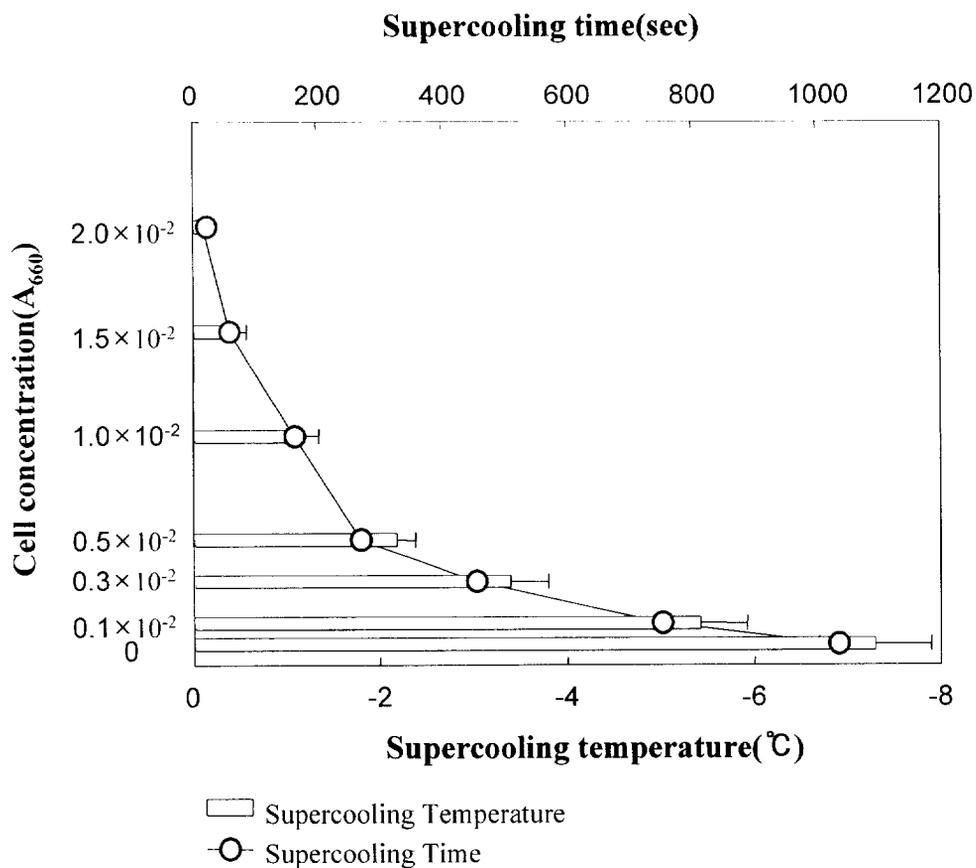


Figure 23. The effect of the cell concentration on the degree of supercooling at the addition of *Xanthomonas translucens* KCTC-2751

The cell concentration was diluted from A₆₆₀.

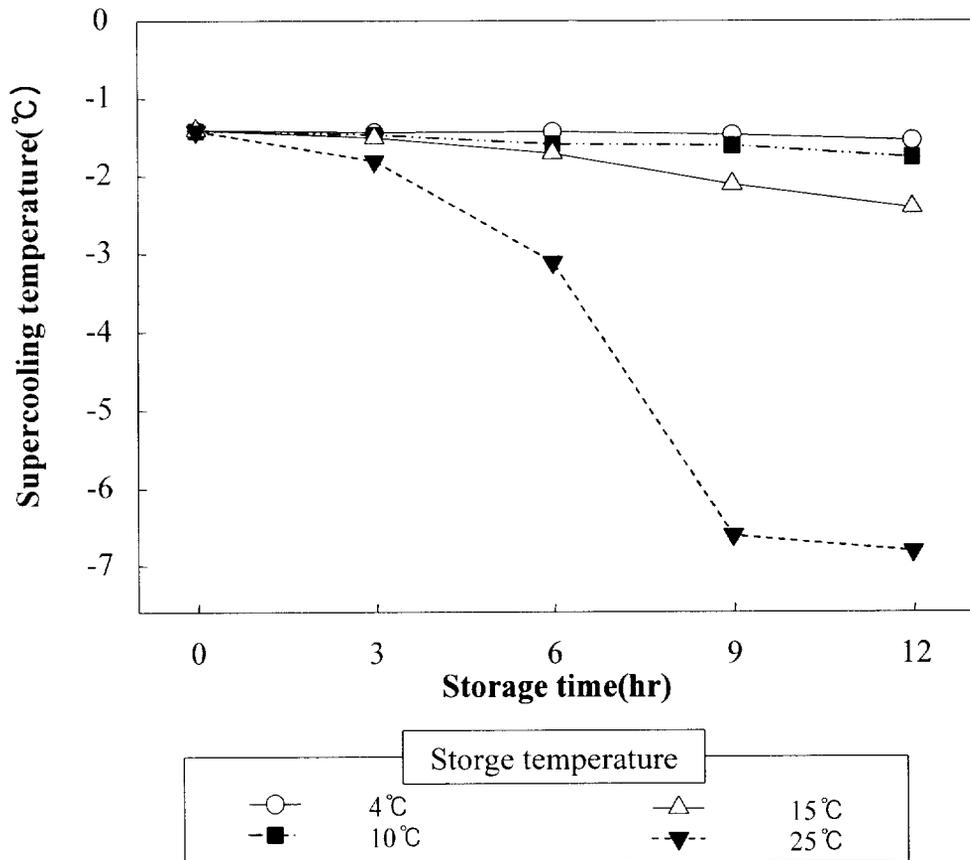


Figure 24. The stability of ice nucleating activity at storage temperature

지남에 따라 빙핵활성능이 급격히 감소하는 것을 보여주었으며, 보관시간이 9시간을 통과하였을 경우에는 활성이 거의 소실됨을 볼 수 있었다. 그에 반해 4℃일 경우에는 시간이 지나도 빙핵활성능이 거의 유지됨을 볼 수 있었는데, 이것으로 보아 이 빙핵활성 단백질의 활성을 유지하기 위해서는 4℃이하의 저온에서 보관해야 된다고 판단된다.

IV. 요약

본 실험에서는 기존의 실험 방법인 Vail에 의해 고안된 drop freezing method에 의하여 빙핵활성능을 측정하는 방법보다 보다 정확한 빙핵활성능을 연구하기 위하여 thermocouple을 사용한 thermoelectric thermometry를 응용하여 기계를 제작하여 과냉각온도와 과냉각시간을 보는 방법으로 빙핵활성능을 측정하였다.

본 실험에 사용된 균주는 한국 생명 공학 연구소의 생물자원센터에서 분양받은 *Xanthomonas translucens* KCTC-2751을 사용하였다. 균체 성장과 빙핵활성능의 향상을 위한 탄소원의 영향을 여러 가지 당을 이용하여 살펴본 결과 본 균주는 maltose를 사용하여 배양하였을 때 균체 생산량이 가장 좋았으며, 과냉각온도도 높게 나타났다. maltose를 0.0~1.4%(w/v) 농도별로 평가하여 균체의 생산량과 빙핵활성능을 살펴보았다. 그 결과 1.0%(w/v)에서 균체의 최대 생산량을 나타내었고 과냉각온도도 높게 나왔다. 질소원의 영향은 yeast extract 1.2%(w/v)와 digested of gelatin 0.8%(w/v)에서 가장 높은 균체 생산량과 빙핵활성능을 나타내었다. 또한 초기 pH의 영향에서는 pH 6.5에서 최대 균체 생산량과 빙핵활성능이 나타났고, 무기 염류의 영향에서는 KCl 0.03%(w/v)에서 빙핵활성능이 최대로 나타났다. 따라서 본 연구에서는 균체의 양은 5배나 증가하였으며 과냉각온도도 -1.8°C 에서 -1.4°C 로 상승하였다. 이것은 증류수를 넣고 측정한 빙핵활성능(-7.6°C)이 81%나 높게 나타났다. 그러므로 이 빙핵활성 세균을 초고압 저온 멸균을 시키거나 감마선에 의해 멸균을 하여 난동결식품에 첨가하여 동결농축이나 동결건조 등에 이용하든지 동결식품에 첨가할 경우 빠른 과냉각 현상이 일어나므로 식품의 조직의 파괴 등을 막을 수 있고 보다 높은 온도에서 동결장치를 가동해도 됨으로써 에너지

적 손실을 줄일 수 있을 것으로 사료되어 진다. 그리고 본 실험에서 고안된 Thermoclectric thermometry를 이용하여 다른 빙핵활성 균주의 빙핵 활성능을 측정하여 보다 신뢰도 있는 결과가 산출될 수 있을 것이라 생각된다.

V. 사 사

본 논문이 완성되기까지 아낌없는 격려와 세심한 배려로서 올바른 학문의 길로 이끌어주신 공재열 지도교수님께 진심으로 머리 숙여 감사드립니다. 그리고 논문이 완성될 수 있도록 실험을 지도해주시고 조언을 해주신 김민용 교수님께 진심으로 감사드리며, 학위과정동안 많은 가르침을 주신 생물공학과 김성구 교수님, 공인수 교수님, 박남규 교수님, 홍용기 교수님, 김중균 교수님께도 감사드립니다. 또한 항상 관심과 격려로서 지도해 주신 김학주 박사님, 배승권 박사님께도 진심으로 감사드립니다.

제대로 연구실에 적응도 못하던 저를 이끌어 주신 김학주 박사님과 미국에 계시는 김봉조 박사님, 동생처럼 아껴주신 캐다나에 계시는 하순득 박사님, 철없던 학부시절부터 많은 지도와 사랑으로 대해주신 황선희 박사님, 임동중 박사님께 깊이 감사드립니다. 가끔 오셔서 격려해 주시던 강양순 박사님, 정혜성 선배님, 멀리에서 항상 관심과 격려를 아끼지 않은 장재혁 박사님께도 감사드립니다. 항상 연구실에서 막내인 저를 친동생처럼 저를 아껴 주시며 즐거운 일, 힘든 일들을 늘 함께 생활한 강성일 선배님, 장영부 선배님, 전병진 선배님께 고마운 마음을 전합니다. 그리고 지금은 일본에서 공부하고 있는 한미진 후배님께도 감사의 말씀을 올립니다.

오랜시간 함께 해오면서 정신적, 물질적으로 정말 많은 격려와 도움을 준 상욱, 효진, 준혁, 완수, 성준에게도 고마움을 전합니다. 그리고 이웃 실험실에서 많은 도움을 준 호성 선배님, 승재 후배님에게도 감사의 뜻을 표합니다. 또한 애정으로 지켜봐주신 친지분들께도 깊은 감사를 드리고, 마지막으로 항상 저를 걱정해 주며 보살펴 주시고 사랑으로 돌봐주신 부모님, 형님, 누님들에게 이 한편의 논문을 바칩니다.

VI. 참고문헌

1. Yankofsky, S. A., Z. Levin, T. Bertold and N. Sandlerman (1981). Some basic characteristics of bacterial freezing nuclei. *American meteorological society*, **20**, 1013-1019.
2. Lindow, S. E., D. C. Army, and C. D. Upper (1978). *Erwinia herbicola* : A bacterial ice nucleus active in increasing frost injury to corn. *Phytopathology*, **68**, 523-527.
3. Lindow, S. E. (1983). The role of bacterial ice nucleation in frost injury to plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **21**, 363-384.
4. Lindow, S. E., D. C. Army, and C. D. Upper (1978). Distribution of ice nuclration-active bacteria on plants in nature. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 831-838.
5. Lindow, S. E. (1982). Epiphytic ice nucleation-active bacteria. In G. Lacy and M. Mount (ed.), *Phytopathogenic prokaryotes*, vol I. Academic Press, Inc., New York, 335-362.
6. Li, P. and A Sakai (1978). Plant cold hardiness and freezing stress-mechanism and crop implications. Academic Press, Inc., New York, 249-263.

7. Maki, L. R., E. L. Galyon, M. Chang Chien, and R. Caldwell (1974). Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*. *Appl. Microbiol.*, **28**, 456-459.
8. Vail, G. (1971). Quantitative evaluation of experimental results on the heterogeneous freezing nucleation of supercooled liquids. *J. Atmos. Sci.*, **28**, 402-409.
9. Schnell, R. C. and Vail G. (1972). Atmospheric ice nuclei from decomposing vegetation. *Nature*, **235**, 163-165.
10. Gerald, C., D. C. Sands, R. G. Layton, W. V. Zucker and J. R. Snider (1986). Biogenic ice nucleation : Could it be metabolically initiated? *J. Theor. Biol.*, **119**, 37-45.
11. Lindow, S. E., D. C. Arny and C. D. Upper (1982). Bacterial ice nucleation : A factor in frost injury to plants. *Plant Physiol.*, **70**, 1084-1089.
12. Blondeaux, A. and N. Cochet (1994). Ice nucleating activity of *Pseudomonas syringae* cultivated on a natural substrate ; influence of phosphate. *Appl. Microbiol. Biotech.*, **41**, 627-631.
13. Blondeaux, A. and N. Cochet (1994). High-level expression of the ice-nucleating activity of *Pseudomonas syringae* in relation to its

growth characteristics. *Appl. Microbiol. Biotech.*, **42**, 116-120.

14. Kozloff, L. M., M. Watanabe (1986). Ice nucleating activity of *Pseudomonas syringae* and *Erwinia herbicola*. *J. of bacteriology*, **153**, 222-231.

15. Arai, S. and M. Watanabe (1986), Freeze texturing of food materials by ice nucleation with bacterium *Erwinia ananas*. *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 169-175.

16. Maki, L. R. and K. J. Willoughby (1978). Bacteria as biogenic sources of freezing nuclei, *J. Appl. Meteorology*, **17**, 1049-1053.

17. Maki, L. R. and D. M. Garvey (1975). Bacterial induced ice nucleation. *EOS*, **56**, 994.

18. Hitoshi, O., Y. Saeki, J. Tanishita and T. Tokuyama (1987). Ice nucleating activity of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Ferment. Technol.*, **65**, 693-697.

29. Hitoshi, O., T. Nakai, F. Tanishita and T. Tokuyama (1989). Identification of an ice-nucleating bacterium and its ice nucleation properties. *J. Ferment. Bioeng.*, **67**, 143-147.

20. Watanabe, M. and J. Watanabe (1994). Screening, isolation, and

identification of food originated compounds enhancing the ice-nucleation activity of *Xanthomonas campestris*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 64-66.

21. Kim, H. K., C. Orser, S. E. Lindow and D. C. Sands (1987). *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* strains active in ice nucleation, *Plant Disease*, **71**, 994-997.

22. Orser, C., B. J. Staskawicz, N. J. Panopoulos, D. Dahlbeck and S. E. Lindow (1985), Cloning and expression of bacterial ice nucleation gene in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, **164**, 359-366.

23. Hitoshi, O., T. Tokuyama, S. Kawate, H. Hori and Y. Higashi (1990). Culture conditions of *Erwinia uredovora* in reference to its high ice-nucleating activity of the culture supernatant. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2171-2174.

24. Schnell, R. C., and G. Vali (1973). World-wide source of leaf-derived freezing nuclei. *Nature (London)*, **246**, 212-213.

25. Ruggles, J. A., M. Nemecek-Marshall, and R. Fall (1993). Kinetics of appearance and disappearance of classes of bacterial ice support an aggregation model for ice nucleus assembly. *Journal of bacteriology*, **175**, 7216-7221.

26. Margaritis, A. and A. S. Bassi (1991). Principles and

biotechnological applications of bacterial ice nucleation. *Critical Reviews in Biotechnology*, **11**, 277-295.

27. Li, J., M. P. Izquierdo and T. C. Lee (1997). Effects of ice nucleation active bacteria on the freezing of some model food systems. *International Journal Food science and Technology*, **32**, 41-49.

28. Watanabe, M. and S. Arai (1987). Freezing of water in the presence of the ice nucleation active bacterium, *Erwinia ananas*, and its application for efficient freeze-drying of foods. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 557-563.

29. Kim, H. J. and J. Y. Park (1997). Ice nucleating activities of ice nucleation-active bacteria sterilized with heat, pressure and irradiation, and their thermophysical effects on water. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **29**, 326-336.

30. Warren, G. and L. Corotto (1989). The consensus sequence of ice nucleation proteins from *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas fluorescences* and *Pseudomonas syringae*, *Gene*, **85**, 239-242.

31. Warren, G and L. Corotto (1986). Conserved repeats in diverged ice nucleation structural genes from two species of *Pseudomonas*. *Nucleic Acids Research*, **14**, 8047-8060.

32. Arai, S., K. Abe, *et. al.* (1989). Molecular cloning of an ice nucleation of an ice nucleation gene from *Erwinia ananas* and its expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **61**, 53-56.
33. Corotto, L. V., P. K. Wolber and G. J. Warren (1986). Ice nucleation activity of *Pseudomonas fluorescens* : mutagenesis, complementation analysis and identification of a gene product. *EMBO J.*, **5**, 231-236.
34. Abe, K., S. Watabe, Y. Emori, M. Watanabe and S. Arai (1989). An ice nucleation active gene of *Erwinia ananas* : Sequence similarity to those of *Pseudomonas* species and regions required for ice nucleation activity. *FEMS Lett.*, **258**, 297-300.
35. Warren, G. J. and Wolber, P. K. (1987). Heterogeneous ice nucleation by bacteria. *Cryo Lett.*, **8**, 204-215.
36. Mizuno, H. (1989). Prediction of the conformation of ice-nucleation protein by conformational energy calculation. *Protein Struct. Funct. Genet.*, **5**, 47-65.
37. Choy, L. Hew and Daniel S. C. Yang (1992). Protein interaction with ice. *European J. of Biochemistry*, **203**, 33-42.

38. Data sheets on quarantine pests : *Xanthomonas translucens* pv. *translucens*.
http://www.eppo.org/quarantine/bacteria/Xanthomonas_translucens/xanttr_ds.pdf
39. Schooley, James F. (1986). Thermometry. CRC Press, Inc, 172-186.
40. Pollock, Daniel D. (1991). Thermocouple : Theory and properties. CRC Press, Inc.
41. 미국 국립 표준 기술 연구소 (NIST : National Institute of Standards and Technology) <http://www.cstl.nist.gov/div836/836.05/thermometry/home.htm>.
42. 송인춘 (1984). 주택의 보온과 단열재 사용에 관한 연구. 대한 공업 교육 학회지, **9**, 22-31.
43. Kong, J. Y. (1976). The measurements of thermal diffusivity for Tofus.
44. Kim, M. Y., S. K. Bae, J. D. Kim, J. S. Kim, and J. Y. Kong (2002). Thermodynamic properties of ice nucleation bacterium in freezing process. International food machinery & technology exhibiton, **9**, 176-179.
45. 최유선, 하대호, 정세진 등 (2001). Effect of acanthopancis cortex on osteoblasts damaged by FeSO₄. 동의병리학회지, **15**, 581-584.