

최 종
연구보고서

해양미생물 *Zoogloea sp.* 의 발효공법개선에 의한
고 기능성 heteropolysaccharides의 대량생산 및
수산 연제품의 응용

Mass production of High Functional
Heteropolysaccharides by Fermentation Process and
its Applications to Fish Jelly Products

주관기관 과제명 : *Zoogloea sp.* 유래 heteropolysaccharides의
대량생산기술 및 고 품질 수산연제품 생
산을 위한 응용기술 개발

협동기관 과제명 : Heteropolysaccharides의 고기능성 응용연구

2004. 12

연 구 기 관

부경대학교 수산과학대학
부산대학교 의 과 대 학

해 양 수 산 부

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “해양미생물 *Zoogloea sp.* 의 발효공법개선에 의한 고기능성 heteropolysaccharides의 대량생산 및 수산 연제품의 응용에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 12월 20일

주관연구기관명 : 부경대학교 생물공학과

총괄연구책임자 : 공 재 열

연구원 : 황 선 희

연구원 : 임 동 중

연구원 : 장 영 부

연구원 : 강 성 일

협동연구기관명 : 부산대학교 의예과

협동연구책임자 : 정 병 선

요 약 문

I. 제목

해양미생물 *Zoogloea* sp.의 발효공법개선에 의한 고기능성 heteropolysaccharides의 대량생산 및 수산연제품에의 응용

II. 연구개발의 목적 및 중요성

해양미생물 *Zoogloea* sp.균주에 의한 생물공학적 고농도 대량 발효공정시스템을 개발함으로써 고기능성 heteropolysaccharides의 대량생산 및 수산연제품에의 적용을 통해 연제품의 물성개량과 생리기능성 등의 품질개선으로 제품의 대외 경쟁력을 높이고 시장에서의 경쟁적 우위 확보, 생산자의 근로 의욕 고취 및 소비자에게는 건강과 신뢰를 주는 제품을 개발하는데 연구 목표를 두고 있다. 또한 heteropolysaccharides의 대량생산을 통하여 주로 수입에 의존하던 국내 다당류 시장에 원료를 안정적으로 공급함으로써 수입대체 효과는 물론, 외화유출을 막을 수 있고, 관련기관 산업의 생산활동에 안정성 부여 및 산업적 고부가가치를 유도해 내고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

■제1세부과제 : *Zoogloea* sp. 유래 heteropolysaccharides의 대량생산기술 및 고품질 수산연제품 생산을 위한 응용기술개발

1. 효율적 생산을 위한 *Zoogloea* sp. 최적배양 조건 확립 및 heteropolysaccharides의 식품소재로서의 물성조사

- 최적배양조건 검토
(탄소원, 질소원, 무기염류, 온도, pH 등)
- 다당체의 분리·정제
- 수율조사
- 식품 소재로서의 물성조사
 - Shear rate의 영향
 - 온도, pH에 의한 영향
 - NaCl, 각종염에 의한 영향
 - 유체흐름의 특성
- 물리·화학적 특성 조사
 - 보수력, 용해도
 - 유화능력, 인장강도, 젤리강도
 - 점착성, 결합능, Texture

- 생분해능
- 2. 발효조를 이용한 대량생산 기술 개발 및 수산 연제품에의 적용 및 생산 공정 개발
 - 발효기를 이용한 다당류의 효율적 생산조건 조사
 - Batch fermentation
 - Fed batch fermentation
 - Semicontinuous fermentation (추가 항목)
 - 대형발효조 적용 가능성 검토
 - 분리 공정법 개발
 - 다당류 첨가 수산연제품의 최적 가공 조건 조사
 - 적정 배합량
 - 적정 가공방법 등
 - 다당류가 제품의 물성에 미치는 영향 조사
- 3. 산업적 실용화 기술 개발
 - 생산수율 등에 대한 경제성 검토
 - 대량생산을 위한 고수율 공정설계
 - 다당류 첨가 수산연제품의 생산실용화 기술개발
 - 설문조사
 - 품질 및 포장 개선
 - 관능 평가
 - 조직감, 냄새, 색택, 맛 등
 - 기존 첨가제와의 비교 검토

▣ 제2세부과제 : Heteropolysaccharides의 고 기능성 응용연구

1. Heteropolysaccharides의 생리기능성 검토
 - 생리기능성 조사
 - 항균활성(In vitro)
 - 항암 효과(In vitro)
 - 면역증강 효과(In vitro, In vivo)
2. 식품소재로서의 기능성 및 안전성 조사
 - 기능성 및 안정성조사
 - 항암효과(In vitro)
 - 항산화성(In vivo)
 - 급성독성검사(LD₅₀ 측정)
 - 만성 독성 검사
3. 가공제품의 생리기능성 분석
 - 가공제품의 생리기능 활성 조사
 - 항균활성
 - 항암효과
 - 면역증강 효과
 - 항산화성

IV. 연구개발결과

▣ 제 1 세부과제 : *Zoogloea* sp. 유래 heteropolysaccharides의 대량생산 기술 및 고 품질 수산연제품 생산을 위한 응용기술개발

- 1) 본 실험실에서 분리하여 균주 등록한 *Zoogloea* sp.(KCCM 10036)은 서로 다른 두 종류의 다당 WSP(Water Soluble Polysaccharide), CBP(Cell Bound Polysaccharide)를 생산하는 것으로 확인하였다.
- 2) 다당생산을 위한 균주의 최적배양 조건을 검토하였다.
- 3) Heteropolysaccharides를 추출한 결과 crude한 WSP 약 6.9 g/L, CBP 약 4.3 g/L를 회수하였다.
- 4) Heteropolysaccharides의 겔보기 점도, 응집활성, 열분해특성, 수분보수력, 유화능, 용해력, 겔형성능, 점착성 및 결착능, 인장강도, 생분해능이 타 다당류에 비해 우수함을 확인하였다.
- 5) 대량생산을 위해 Batch, Fed batch 및 Semicontinuous fermenter에서 배양한 결과, 7.13g/L, 6.28g/L, 8.23g/L의 heteropolysaccharides를 얻을 수 있었다.
- 6) Heteropolysaccharides 생산 후 분리·정제를 위한 공정을 modeling 하였다.
- 7) Heteropolysaccharides를 첨가한 수산가공식품을 제조하여 제품품질 향상을 시도하였다.
- 8) Heteropolysaccharides를 첨가한 수산연제품의 생산 실용화 기술을 개발하였다.
- 9) Pilot 스케일에서 Heteropolysaccharides를 대량 생산하기 위한 연속적인 process를 공정 설계하였다.

▣ 제2세부과제 : Heteropolysaccharides의 고 기능성 응용연구

- 1) Heteropolysaccharides가 lymphocyte의 증식능과 cytokine (IFN- γ)분비의 증가를 통하여 면역기능을 증가시킴을 확인하였다.
- 2) Heteropolysaccharides는 암 발생이 지연 및 성장억제 효과를 나타내었다.
- 3) Heteropolysaccharides는 복강대식세포에 의한 NO의 생산도 증가되어 대식세포를 활성화시킴을 확인하였다.
- 4) 독성실험결과 heteropolysaccharides는 무해한 식품첨가물임을 확인하였다.

V. 연구성과 및 활용계획

1. 연구성과

가. 국내외 학술지 발표 실적

◆국제학술논문집 논문발효 - 4건

- Jae-Hyuk Jang, Seoung-Kwon Bae, Dong-Jung Lim, Bong-Jo Kim, Jai-Yul Kong(2002) Rheological properties of polysaccharides produced by marine bacterium *Zoogloea* sp., *Biotechnol. Lett.*, 24(4):297-301.
- Dong-Jung Lim and Jai-Yul Kong, Physicochemical properties of heteropolysaccharides from *Zoogloea* sp.(KCCM10036), *Biotechnol. Lett.*, (in submitted)
- Dong-Jung Lim and Jai-Yul Kong, Biosorption of heavy metals by marine bacterium *Zoogloea* sp. *Water Research* (in submitted)
- Young-Boo Jang, Dong-Jung Lim and Jai-Yul Kong, Batch, fed batch, semicontinuous culture for high viscose polysaccharides production, *Applied Biotechnology and Microbiology* (in submitted)

◆ 국내학술논문집 논문발표 - 2건

- Byung-Seon Chung and Jai-Yul Kong(2002) A study for functional application of heteropolysaccharides I, *Journal of Life Science*, (투고중)
- Byung-Seon Chung and Jai-Yul Kong(2003) A study for functional application of heteropolysaccharides II, *Journal of Life Science*, (심사중)

나. 국내외 학술발표대회 참가실적

◆ 국제학술발표 - 2건

- 孔在烈, 任東中, 張暎富, 黃先姬, 海洋微生物由來의多糖類의利用, The 10th Academic Plaza in International Food Machinery Exhibition 2003, Abstract, p195-198, vol. 10, 6. 10.-13. 2003, Tokyo, Japan.
- Kong, J. Y., Jang, J. H., Lim, D. J., Bae, S. K., Hwang, S. H. and Kim, J. D. Rheological properties of polysaccharides produced by marine bacterium *Zoogloea* sp., The Fourth Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, 2002. 4. 22-26, p76, Honolulu, Hawaii, USA

◆ 국내학술발표 논문발표 - 6건

- 공재열, 해양미생물을 이용한 유용물질의 생산, 2003년 한국생물공학회 춘계학술발표대회, 초청특강, p5-9, 2003.4. 11-12. 부산, 부경대학교, Proceedings of Current Biotechnology and Bioengineering(XII)
- 장영부, 임동중, 황선희, 최영준, 공재열, Effects of polysaccharides produced from *Zoogloea* sp. on the quality of surimi gel, 2003년 한국생물공학회 추계학술 발표대회, p765-768, 2003.

10. 22-24., 서울, COEX, Proceedings of Current Biotechnology and Bioengineering(XIII)
- 。 임동중, 김종덕, 강양순, 공재열, Optimum conditions to biosorption of heavy metals by *Zoogloea* sp.(KCCM10036), 2002년 한국미생물 생명공학회 학술발표대회 p197, 2002. 10. 26. 서울, 건국대학교
- 。 임동중, 황선희, 김민룡, 공재열, *Zoogloea* sp.(KCCM10036)에 의한 중금속 생체흡착능 검토, 2002 한국생물공학회 추계학술발표대회, p271-274, 2002. 10. 9-12(10일 발표), 천안, 오송국제 바이오엑스포장, Proceedings of Current Biotechnology and Bioengineering(XI-A)
- 。 장영부, 임동중, 김종덕, 공재열, 회분식 유가식, 반연속식 배양을 이용한 고점질성 다당 생산 검토, 2002 한국생물공학회 추계학술발표대회, p153-156 2002. 10. 9-12(10일 발표), 천안, 오송 국제바이오엑스포장, Proceedings of Current Biotechnology and Bioengineering(XI-A)
- 。 임동중, 김종덕, 강양순, 공재열, 해양미생물 *Zoogloea* sp. 유래 고기능성 heteropolysaccharides의 물리·화학적 특성, 2002 한국생물공학회 춘계학술발표대회, p 573-576, 2002. 4. 13. 광주, 전남대학교, Proceedings of Current Biotechnology and Bioengineering(X)

2. 활용계획

- ▶ 맛살, 오징어포, 어묵, 소세지등의 수산가공제품에 직접 첨가함으로써 고기능성 함유 수산가공제품의 제조에 적극 활용한다.
- ▶ 다당류가 가지는 고유의 고기능성을 이용하여 식품안정제, 저장보존료 등으로 활용한다.
- ▶ 얻어진 성과로써 미생물 다당류의 대량생산에 적극 이용한다.
- ▶ 체내대사 조절 및 각종 고기능성에 따른 이점을 이용하는 제약 산업에 적극 활용한다.
- ▶ 다당류의 특성을 이용 그 특성에 따라 제지산업, 석유산업, 화장품산업, 페인트, 살충제 등지에 광범위하게 이용한다.
- ▶ 본 연구성과는 저명한 국내 및 국외 학술저널지에 발표 및 특허출원함으로써 고기능성 개발에 연관된 기술을 검증받고 수산가공식품산업에 응용함으로써 새로운 해외시장개척에 이바지한다.

S U M M A R Y

I . Title of research

Mass production of high functional heteropolysaccharides by improving fermentation of marine bacterium *Zoogloea* sp. and its application to the fish based products

II. Objects of research and its importance

- Mass production of high functional heteropolysaccharides by improving fermentation of marine bacterium *Zoogloea* sp.
- Developing the fish based products containing heteropolysaccharides to improve international competition

III. Contents and scopes of research

▣ PART I : Development of the process technology for the heteropolysaccharides' mass production by marine bacterium *Zoogloea* sp. and their applied technology for yielding seafood products

1. Optimization of *Zoogloea* sp.'s culture conditions for the heteropolysaccharides' efficient production and investigation of their texture properties as food ingredients.
 - Investigation of optimal culture conditions
 - carbon source, nitrogen source, inorganic source, temperature, pH, etc.
 - Isolation and purification of heteropolysaccharides
 - Investigation of heteropolysaccharides' production yields
 - Investigation on rheology of heteropolysaccharides as food ingredients
 - The effect of shear rate
 - The effect of temperature and pH
 - The effect of inorganic salts
 - The special property of liquid current
 - Investigation of physiochemical properties
 - Water holding capacity, solubility
 - Emulsion capacity, tensile strength, jelly strength
 - Adhesive properties, binding capacity, texture
 - Biodegradation

2. Development of the fermentation technology for the heteropolysaccharides' mass production, their application to surimi based products and development of their production process

- Investigation of *Zoogloea* sp.'s fermentation condition for the heteropolysaccharides' efficient production
 - Batch fermentation
 - Fed batch fermentation
 - Semicontinuous fermentation
- Analysis on possibility of scale up
- Development of separation process
- Investigation of optimal processing conditions for surimi based products containing heteropolysaccharides
 - Optimal mixture ratio of ingredient on surimi based products
 - Optimization of processing methods for surimi based products
- Investigation of heteropolysaccharides' influence on rheological properties of surimi based products

3. Development of industrial utilization technologies

- Economic analysis for production yields
- Determining bioprocess design of high yielding for the heteropolysaccharides mass production
- Development of surimi based products utilization technologies by addition of heteropolysaccharides
 - Research forum for surimi based products containing heteropolysaccharides
 - Improvement of quality and wrapping
- Sensory evaluation
 - Texture, smell, color, taste, etc.
- Analysis and comparison of heteropolysaccharides and commercial ingredients

▣ PART II : Applied investigation of heteropolysaccharides' high functional properties

1. Investigation of heteropolysaccharides' biofunctionalities

- Antibacterial activity (In vitro)
- Anticancer activity (In vitro)

- Immunomodulating activity (In vitro)
2. Investigation of functionality and safety as the food ingredient
 - Anticancer activity (In vitro)
 - antioxidant activity (In vivo)
 - Acute toxicity, LD₅₀
 - Chronic toxicity
 3. Biofunctional analysis of sea food containing heteropolysaccharides
 - Antibacterial activity
 - Anticancer activity
 - Immunomodulating activity
 - Antioxidant activity

IV. Results of research

▣ PART I : Development of the process technology for the heteropolysaccharides' mass production by marine bacterium *Zoogloea* sp. and their practical technology for yielding seafood products

1. A marine bacterium isolated in the southern sea, *Zoogloea* sp., was found out having two species of polysaccharides, WSP(Water Soluble Polysaccharide) and CBP(Cell Bound Polysaccharide).
2. The optimal culture conditions has been determined.
3. Heteropolysaccharides extracted in flask culture were obtained about 11.2g/L (WSP : about 6.9 g/L, CBP : about 4.3 g/L)
4. Heteropolysaccharides were better than commercial polysaccharides in the analysis of the apparent viscosity, flocculant activity, thermal property, water holding capacity, emulsion capacity, gelling ability, adhesive properties, binding capacity, tensile strength and biodegradation.
5. For the mass production, heteropolysaccharides were cultured in batch fermenter, fed batch fermenter and semicontinuous fermenter. And their productivity were 7.13 g/L, 6.28 g/L and 8.23 g/L, respectively.
6. Separation and purification process were modeled after cultivation heteropolysaccharides for their mass production

7. Developing the fish based products containing heteropolysaccharides was tried for improving sea food's product quality.
8. Development the utilization technology of surimi based products containing heteropolysaccharides.
9. Modeling the continuous process of heteropolysaccharides' mass production in pilot plant.

▣ PART II : Applied investigation of heteropolysaccharides high functional properties

- 1) Heteropolysaccharides increase immunomodulating activity by lymphocyte's proliferative capacity and increase of cytokine (IFN- γ) secretion
- 2) Heteropolysaccharides have effects of delaying cancer incidence and inhibiting cancer growth.
- 3) Mouse peritoneal macrophage was activated by the increase of nitrogen monoxide(NO) production when heteropolysaccharides have been injected in mice.
- 4) Heteropolysaccharides were certified to be harmless food ingredients.

V. Applications

1. Research results

A. Announcements of scientific papers

◆ The foreign papers (SCI) - 4

- Jae-Hyuk Jang, Seung-Kwon Bae, Dong-Jung Lim, Bong-Jo Kim, Jai-Yul Kong(2002), Rheological properties of polysaccharides produced by marine bacterium *Zoogloea* sp., *Biotechnol. Lett.* 24(4):297-301
- Dong-Jung Lim and Jai-Yul Kong, Physicochemical properties of heteropolysaccharides from *Zoogloea* sp.(KCCM10036), *Biotechnol. Lett.* (in submitted)
- Dong-Jung Lim and Jai-Yul Kong, Biosorption of heavy metals by marine bacterium *Zoogloea* sp. *Water Research* (in submitted)
- Young-Boo Jang, Dong-Jung Lim and Jai-Yul Kong, Batch, fed batch, semicontinuous culture for high viscose polysaccharides production, *Applied Biotechnology and Microbiology* (in submitted)

◆ The domestic papers (SCI) - 2

- Byung-Seon Chung and Jai-Yul Kong(2002) A study for functional application of

heteropolysaccharides I , *Journal of Life Science*, (in admitted)

◦ Byung-Seon Chung and Jai-Yul Kong(2003) A study for functional application of heteropolysaccharides II, *Journal of Life Science*, (in submitted)

B. Announcements of scientific meeting

◆ The foreign meeting - 3

◦ Kong, J. Y., Lim, D. J., Jang, Y. B. and Hwang, S. H., Application of heteropolysaccharides of marine bacterium, The 10th Academic Plaza in International Food Machinery Exhibition '2003, Abstract, p195-198, vol. 10, 2003. 6. 10.-13, Tokyo, Japan.

◦ Kong, J. Y., Lim, D. J., Hwang, S. H., Ha, S. D. and Kim, B. J. Distinctive properties and applications of polysaccharides produced by marine bacterium *Zoogloea* sp. The Fourth Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, 2003. 9. 21-27, p116, Chiba, Japan.

◦ Kong, J. Y., Jang, J. H., Lim, D. J., Bae, S. K., Hwang, S. H. and Kim, J. D. Pheological properties of polysaccharides produced by marine bacterium *Zoogloea* sp. The Fourth Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, 2002. 4. 22-26, p76, Honolulu, Hawaii, USA

◆ The Domestic meeting - 6

◦ Jai-Yul Kong, The production of valuable materials from marine bacterium, Korean institute of biotechnology and bioengineering conference 2003, Invited special lecture, p5-9, 2003.4. 11.-12. Busan, Pukyong Univ, Proceedings of current biotechnology and bioengineering(XII)

◦ Young-Boo Jang, Dong-Jung Lim, Sun-Hee Hwang, Yeung-Jun Choi, and Jai-Yul Kong, Effects of polysaccharides produced from *Zoogloea* sp. on the quality of surimi gel, Korean institute of biotechnology and bioengineering conference 2003, p765-768, 2003. 10. 22-24., Seoul, COEX, Proceedings of current biotechnology and bioengineering(XIII)

◦ Dong-Jung Lim, Jong-Duk Kim, Yang-Sun Kang, and Jai-Yul Kong, Optimum conditions to bioabsorption of heavy metals by *Zoogloea* sp.(KCCM10036), 2002 The Korean society for microbiology and biotechnology conference, p197, 2002. 10. 26. Seoul, Konkuk Univ.

◦ Dong-Jung Lim, Sun-Hee Hwang, Min-Yong Kim, and Jai-Yul Kong, The study on bioabsorption of heavy metals by *Zoogloea* sp.(KCCM10036), Korean institute of biotechnology and bioengineering conference 2002, p271-274, 2002. 10. 9-12., Cheonan, Osong international bioexposition site, Proceedings of current biotechnology and bioengineering(XI-A)

- Young-Boo Jang, Dong-jung Lim, Jong-Duk Kim, and Jai-Yul Kong, Batch, fed batch, semicontinuous culture for highly viscose polysaccharides production, Korean institute of biotechnology and bioengineering conference 2002, p153-156 2002. 10. 9-12., Cheonan, Osong international bioexposition site, Proceedings of current biotechnology and bioengineering(XI-A)
- Dong-Jung Lim, Jong-Duk Kim, Yang-Sun Kang, and Jai-Yul Kong, Physicochemical properties of high-functional heteropolysaccharides from marine bacterium *Zoogloea* sp., Korean institute of biotechnology and bioengineering conference 2002, p 573-576, 2002. 4. 13. Gwangju, Chonnam Univ., Proceedings of current biotechnology and bioengineering(X)

2. A plan of application

- ▶ To make the sea food products with high properties, heteropolysaccharides will be added to the surimi, razor clam, shrimp, cuttlefish, etc.
- ▶ Heteropolysaccharides will be used as food stabilizers, food preservatives, etc.
- ▶ Heteropolysaccharides will be applied to the pharmaceutical industry with using their high functional properties.

CONTENTS

PROPOSITIONS -----	1
SUMMARY -----	2
ENGLISH SUMMARY -----	7
ENGLISH CONTENTS -----	13
CONTENTS -----	20
Chapter 1. Summary of research -----	28
Section 1. Purpose of research -----	28
Section 2. Necessity of research -----	29
1. Technical aspect -----	29
2. Economic and industrial aspect -----	30
3. Social and cultural aspect -----	31
Section 3. Ranges of research -----	32
Chapter 2. Technical states of domestic and foreign -----	34
Section 1. Domestic technical state -----	34
Section 2. Foreign technical state -----	35
Chapter 3. Contents and results of research -----	36
Section 1. Contents -----	36
■ PART I	
1. Heteropolysaccharides' optimal product condition -----	36
(1) Microorganism -----	36
(2) Medium -----	36
(3) Effect of carbon source -----	36

(4) Effect of nitrogen source -----	36
(5) Effect of NaCl -----	38
(6) Effect of Na ₂ SO ₄ , K ₂ HPO ₄ and MgCl ₂ · 6H ₂ O -----	38
(7) Effect of Tris base -----	38
(8) Effect of pH -----	38
(9) Effect of temperature -----	38
2. Fermentation condition for the heteropolysaccharides' efficient production -----	38
(1) Precultivation of the microorganism -----	38
(2) Cultivation in flask -----	38
① Effect of nitrogen source -----	38
② Effect of C/N ratio -----	40
(3) Fermentation -----	40
① Precultivation -----	40
② Batch fermentation -----	40
③ Fed batch fermentation -----	40
④ Semicontinuous fermentation -----	40
(4) Isolation, purification and sequence's invention of polysaccharides -----	40
① Isolation of polysaccharides -----	40
② Measurement of polysaccharides -----	41
③ Measurement of cell mass -----	41
④ Scanning electron microscopy (SEM) -----	41
⑤ Measurement of glucose consumption -----	41
⑥ Purification and average molecular weight of polysaccharides -----	41
⑦ Analysis of polysaccharides by FT-IR -----	43
3. Investigation on applied possibility of pilot scale -----	43
4. Development of the large scale isolation process -----	43
5. Investigation of rheological properties as the food ingredient -----	43
(1) Manufacture of samples and measure of apparent viscosity -----	43
(2) Study of flow characteristics -----	46
(3) Temperature dependence on the apparent viscosity -----	46
(4) pH dependence on the apparent viscosity -----	46

(5) Effect of NaCl concentration of the apparent viscosity -----	46
6. Investigation of physiochemical properties -----	47
(1) Flocculant activity -----	47
(2) Thermal property -----	47
(3) Water holding capacity -----	47
(4) Emulsion capacity -----	47
(5) Solubility -----	49
(6) Film forming ability -----	49
(7) Gelling ability -----	49
(8) Tensile strength(jelly strength)- -----	49
(9) Texture -----	50
(10) Biodegradation -----	50
7. Optimization conditions of surimi based products containing polysaccharides -----	50
(1) Materials -----	50
(2) Manufacture of surimi gel -----	50
(3) Addition of polysaccharide on concentration -----	53
(4) Investigation of influence by pH and salt concentration -----	53
(5) Measurement of rheological properties -----	53
(6) Measurement of color -----	53
(7) Optimal formulation -----	56
(8) Statistical analysis -----	56
8. Investigation of rheological properties by presence of potassium sorbate	56
9. Comparison of surimi based products by addition of spices -----	56
10. Sensory evaluation of new surimi based products -----	56

■ PART II

1. Isolation of polysaccharides -----	59
2. Measurement of the immunomodulating activity -----	59
3. Measurement of the anticancer activity in vitro -----	59
(1) MTT method -----	59

(2) Measurement of apoptosis -----	60
(3) Inhibitory effect of polysaccharides on the growth of tumor cell in the test tube -----	60
(4) Measurement on inhibitory effect of tumor(lump) formation -----	61
4. Measurement of the toxicity -----	61
(1) Test of the cellular toxicity -----	61
(2) Test of the acute toxicity -----	61
(3) Test of the chronic toxicity -----	62
5. Test of immunoregulation effect -----	62
(1) Separation of splenocyte and macrophage cell -----	62
(2) Measurement of splenocyte's growth -----	63
(3) Measurement of nitrogen monoxide(NO) production -----	63
(4) Measurement of cytokine -----	63
6. Tests on the antibacterial activity of heteropolysaccharides by <i>Zoogloea</i> sp. KCCM 10036 -----	64
7. Measurement of the antioxidant activity -----	64
(1) Breeding and feeding of experimental animals -----	64
(2) Collection of the internal organ -----	64
(3) Measurement of glutathione level in liver tissues -----	64
(4) Measurement of lipid peroxide level in liver tissues -----	64
 Section 2. Results -----	 65
▣ PART I	
1. Optimal culture condition for heteropolysaccharides' production -----	65
(1) Effect of carbon source -----	65
(2) Effect of nitrogen source -----	65
(3) Effect of NaCl -----	68
(4) Effect of inorganic salts -----	68
(5) Effect of Tris base -----	68
(6) Effect of pH -----	75
(7) Effect of temperature -----	75
(8) The culture of fermentation -----	75

2. The isolation and purification of heteropolysaccharides -----	75
3. The investigation of yields -----	79
4. The investigation on heteropolysaccharides' rheological properties --	79
(1) Apparent viscosity of WSP and CBP at various concentration -----	79
(2) Variation of apparent viscosity on share rate -----	85
(3) Variation of share stress on share rate -----	85
(4) The flow characteristics of the fluids by power-law equation -----	85
(5) Temperature dependence on the apparent viscosity -----	85
(6) Activation energy for flow by arrhenius' equation -----	93
(7) pH dependence on the apparent viscosity -----	93
(8) Effect of NaCl concentration of the apparent viscosity -----	93
5. Investigation of heteropolysaccharides' physiochemical properties ---	93
(1) Flocculant activity -----	98
(2) Thermal property -----	98
(3) Water holding capacity -----	98
(4) Emulsion capacity -----	102
(5) Solubility -----	102
(6) Gelling ability, adhesive properties and bing capacity -----	102
(7) Film forming ability -----	105
(8) Tensile strength(jelly strength) -----	105
(9) Biodegradation -----	110
6. Fermentation condition for the heteropolysaccharides' efficient production -----	110
(1) Characteristics of <i>Zoogloea</i> sp. -----	110
(2) Batch fermentation -----	110
① Effect of nitrogen source -----	110
② Effect of C/N ratio -----	110
(3) Fed batch fermentation -----	119
① Intermittent feeding conditions -----	119
a. Feeding volume-----	119
b. Concentration of feeding substrate-----	119

(4) Semicontinuous fermentation -----	119
① Feeding volume-----	126
② Inoculum size-----	126
③ Feeding -----	126
7. Investigation on applied possibility of pilot scale -----	134
(1) Mass production of Heteropolysaccharides by the air flow rate -----	134
(2) Substrate -----	134
(3) Agitation speed-----	134
(4) Temperature-----	134
(5) pH-----	134
(6) Inoculum size-----	134
(7) Feeding volume-----	134
(8) Feeding interval-----	135
8. Development of the large scale isolation process -----	135
9. The process design of high yield for the mass production-----	135
10. Development of practical production technology -----	136
11. Optimal production condition of surimi based products	
containing polysaccharides -----	136
(1) Optimal concentration of heteropolysaccharides -----	138
(2) Effect of pH change and salt concentration -----	138
(3) Folding test of surimi based products -----	138
(4) Comparison and study of optimal production condition -----	147
12. Investigation of rheological properties by presence of potassium sorbate	147
(1) Change of rheological properties of surimi based products	
with potassium sorbate -----	147
(2) Change of rheological properties of surimi based products without	
potassium sorbate -----	147
(3) Comparison of surimi based products by addition of spices -----	147
13. Sensory evaluation of new surimi based products -----	156
▣ PART II	
1. Effect of the anticancer activity -----	159
2. The immunomodulating activity-----	165

(1) Effect of orally administrated CBP55 and WSP on the proliferation of mouse splenocytes -----	165
(2) Effect of CBP and WSP on the nitrogen monoxide(NO) production by peritoneal macrophages-----	168
(3) Effect of CBP and WSP on the production of cytokine -----	168
3. Test of the antitumor activity -----	173
4. Test of the antibacterial activity -----	173
5. Test of the antioxidant activity -----	177
6. Effect of the acute toxicity and chronic toxicity -----	177
1. Method of toxicity test-----	177
(1) The cellular toxicity -----	177
(2) The acute toxicity -----	177
(3) The chronic toxicity -----	178
 Chapter 4. Objectives and achievements of research----	183
Section 1. Objectives of research-----	183
Section 2. A progress chart of research-----	183
Section 3. Achievements of research-----	184
Section 4. Contributions in a field of research-----	189
 Chapter 5. A plan of application from research results-	191
 Chapter 6. Available foreign information on science and technology in the process of research---	193
 Chapter 7. References-----	195
 Complement contents-----	204

목 차

제 출 문-----	1
요 약 문-----	2
SUMMARY-----	7
CONTENTS-----	13
목 차-----	20
제 1 장 연구개발과제의 개요-----	28
제 1 절 연구개발의 목적-----	28
제 2 절 연구개발의 필요성-----	29
1. 기술적 측면-----	29
2. 경제·산업적 측면-----	30
3. 사회·문화적 측면-----	31
제 3 절 연구개발내용 및 범위-----	32
제 2 장 국내·외의 기술개발 현황-----	34
제 1 절 국내의 기술개발 현황-----	34
제 2 절 국외의 기술개발 현황-----	35
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과-----	36
제 1 절 연구수행의 내용-----	36

▣ 제 1 세부과제

1. Heteropolysaccharides의 최적생산조건-----	36
가. 사용균주-----	36
나. 배지선정-----	36
다. 탄소원의 영향-----	36
라. 질소원의 영향-----	36
마. NaCl의 영향-----	38
바. Na ₂ SO ₄ 와 K ₂ HPO ₄ , MgCl ₂ · 6H ₂ O첨가에 대한 영향-----	38
사. Tris base의 첨가에 대한 영향-----	38
아. 배양 pH에 따른 영향-----	38
자. 배양온도에 따른 영향-----	38
2. 발효조를 이용한 다당류의 효율적 생산조건-----	38
가. 미생물 전배양-----	38
나. Flask 배양-----	38
(1) 질소원의 영향-----	38
(2) C/N 비의 영향-----	40
다. 발효(Fermentation)-----	40
(1) 전배양-----	40
(2) 회분배양-----	40
(3) 유가식 배양 -----	40
(4) 반연속식 배양-----	40
라. 다당의 분리 · 정제 및 수율조사-----	40
(1) 다당의 분리 -----	40
(2) 다당의 생산량 측정 -----	41
(3) 균체량 측정 -----	41
(4) 주사전자 현미경 (SEM)-----	41
(5) 글루코스 소비량 측정-----	41

(6) 다당의 정제 및 평균 분자량 측정-----	41
(7) FT-IR 분석-----	43
3. 대형발효조 적용 가능성의 검토-----	43
4. 분리 공정법의 개발-----	43
5. 식품 소재로서의 물성조사-----	43
가. 시료제조 및 점도 측정-----	43
나. 유동특성의 검토-----	46
다. 겔보기 점도의 온도 의존성-----	46
라. 겔보기 점도의 pH 의존성-----	46
마. NaCl 첨가에 의한 겔보기 점도의 영향-----	46
바. 각종 salt 첨가에 의한 겔보기 점도의 영향-----	46
6. 물리화학적특성의 조사-----	47
가. 응집활성 (flocculant activity)-----	47
나. 열적 특성-----	47
다. 수분 보유력 (water holding capacity, WHC)-----	47
라. 유화력 (emulsion capacity)-----	47
마. 용해성 (solubility)-----	49
바. 필름 형성능-----	49
사. 겔 형성능-----	49
아. 인장강도(젤리강도)-----	49
차. Texture-----	50
카. 생분해능-----	50
7. 다당류 첨가 수산연제품의 최적 가공조건-----	50
가. 실험재료-----	50
나. 어묵의 제조-----	50
다. 다당의 농도별 첨가-----	53
라. pH와 염의 농도에 따른 영향 조사-----	53

마. 물성의 측정-----	53
바. 색도의 측정-----	53
사. 최적 포물레이션-----	56
아. 통계분석-----	56
8. 다당류에 potassium sorbate 첨가 유무에 따른 물성 검토-----	56
9. 향료 첨가에 따른 물성비교-----	56
10. 시제품의 관능평가-----	56

▣ 제 2 세부과제

1. 다당류의 분리-----	59
2. 면역증강효과의 측정-----	59
3. in vitro에서의 항암효과 측정-----	59
가. MTT 방법-----	59
나. 아포토시스측정-----	60
다. 시험관 내에서 종양세포 증식억제 효과-----	60
라. 종양괴 형성 억제능 측정-----	61
4. 독성실험-----	61
가. 정상세포에 대한 세포독성 실험-----	61
나. 급성독성 실험-----	61
다. 만성독성 실험-----	62
5. 면역반응 조절효과 측정-----	62
가. 비장세포 및 대식세포 분리-----	62
나. 비장세포 증식의 측정-----	63
다. NO 측정-----	63
라. 사이토카인 측정-----	63
6. Zoogloea sp. KCCM 10036 균주 유래 다당류의 항균활성검사-----	64
7. 항산화 작용의 측정-----	64

가. 실험동물의 사육 및 식이-----	64
나. 장기채취-----	64
다. 간 조직중의 글루타티온과 지질 과산화물 함량 측정-----	64
라. 간 조직중의 지질 과산화물 함량 측정-----	64
제 2 절 연구결과 -----	65
▣ 제 1 세부과제	
1. 다당생산을 위한 최적 생산조건 -----	65
가. 탄소원의 영향-----	65
나. 질소원의 영향-----	65
다. NaCl의 영향-----	68
라. 무기염류의 영향-----	68
마. Tris base의 영향-----	68
바. 배지의 초기 pH 영향-----	75
사. 배양 온도의 영향-----	75
아. 발효조에서의 배양-----	75
2. 다당의 분리 · 정제 -----	75
3. 수율의 조사 -----	79
4. 유용 polysaccharide의 물성조사 - 유동학적 특성 -----	79
가. WSP와 CBP의 농도별 겔보기 점도-----	79
나. 전달속도에 대한 겔보기 점도의 변화-----	85
다. 전달속도에 대한 전단응력의 변화-----	85
라. Power-law 식에 의한 유체흐름 특성-----	85
마. 겔보기 점도의 온도 의존성-----	85
바. Andrade's 식에 의한 유도 활성화 에너지-----	93
사. 겔보기 점도의 pH 의존성-----	93
아. 겔보기 점도에 미치는 NaCl의 영향-----	93

5. 다당류의 물리·화학적 특성조사 -----	93
가. 응집활성-----	98
나. 열적 특성-----	98
다. 수분 보수력-----	98
라. 유화능-----	102
마. 용해력-----	102
바. 겔 형성능, 점착성 및 결착능 - 각종 salt 첨가에 의한 효과-----	102
사. 필름 형성능-----	105
아. 인장강도(젤리강도)-----	105
자. 생분해능-----	110
6. 발효조를 이용한 다당류의 효율적 생산조건 -----	110
가. 균의 특성-----	110
나. 회분 배양-----	110
(1) 질소원의 영향-----	110
(2) C/N 비의 효과-----	110
다. 유기식 배양-----	119
(1) 간헐적 공급 조건-----	119
(가) 공급량-----	119
(나) 기질 공급 농도-----	119
라. 반연속식 배양-----	119
(1) 공급량-----	126
(2) 집종량-----	126
(3) 공급시간-----	126
7. 대형 발효조 적용 가능성의 검토 -----	134
가. 통기량(Air flow rate)에 따른 다당의 대량생산-----	134
나. 기질-----	134
다. 교반속도-----	134

라. 온도 -----	134
마. pH-----	134
바. 접종량-----	134
사. 공급량-----	134
아. 공급간격 -----	135
8. 대량 분리 공정법의 개발 -----	135
9. 대량 생산을 위한 고수율의 설계 -----	135
10. 생산 실용화 기술개발 -----	136
11. 다당류 첨가 수산 연제품의 최적가공조건 -----	136
가. 다당의 최적화 농도 -----	138
나. pH변화와 염의 농도에 따른 영향 -----	138
다. 연제품의 접힘측정 -----	138
라. 최적가공조건에 따른 비교검토 -----	147
12. Potassium sorbate 첨가 유무에 따른 물성의 검토-----	147
가. potassium sorbate 미 첨가에 따른 물성의 변화-----	147
나. potassium sorbate 첨가에 따른 물성의 변화-----	147
다. 향료첨가에 따른 물성비교-----	147
13. 시제품의 관능평가-----	156
▣ 제 2 세부과제	
1. 항암효과-----	159
2. 면역증강의 효과-----	165
가. 비장세포증식에 대한 영향-----	165
나. 대식세포의 NO생산에 대한 영향-----	168
다. 사이토카인생산에 대한 영향 -----	168
3. 항종양의 검사-----	173
4. 항균활성의 검사-----	173

5. 항산화성-----	177
6. 급성·만성독성 효과-----	177
가. 독성의 실험-----	177
(1) 세포독성-----	177
(2) 급성독성-----	177
(3) 만성독성-----	178
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에서의 기여도-----	183
제 1 절 연구 목표-----	183
제 2 절 연구 진도표-----	183
제 3 절 연구개발목표의 달성도-----	184
제 4 절 관련분야에의 기여도-----	189
제 5 장 연구개발결과의 활용계획-----	191
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보-----	193
제 7 장 참고문헌-----	195
보완사항 -----	204

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

Polysaccharide는 monosaccharide의 중합체로서 식물과 bacteria 등의 세포벽을 이루는 구성 물질이며, 식물과 동물의 체내에서 starch와 glycogen과 같은 형태로 에너지 저장역할을 하는 물질이기도 하다. 또한 polysaccharide는 다른 단백질이나 지질과 결합하여 glycoprotein과 glycolipid를 형성하여 세포표면에서 receptor로도 작용하기도 하는데, 이와 같은 생화학적 작용 및 물리학적 특성은 많은 분야에의 응용이 기대되고 있다. 주로 식물, 동물 및 미생물에 의해서 생합성 되는데 특히 미생물 다당류나 이의 유도체는 합성고분자와는 달리 독특한 물성과 생리활성을 나타내고 있다. 해조류 유래의 다당류는 세포내에 저장되어 에너지원으로서 역할을 하는 다당과 세포벽을 구성하는 다당으로 크게 구분된다. 저장 다당으로서는 녹조류 및 홍조류에 α -1, 4, β -1, 6, 결합을 하고 있는 glucan, 홍조류, 남조류 등에는 glycogen의 존재가 알려져 있으며 세포벽 다당으로서는 식물과 마찬가지로 glucan, cellulose, xylan, mannan 등이 존재하고 있다. 대표적인 해조류의 점질 다당으로서는 agar, porphyran, carrageenan, alginate 등의 구조가 밝혀져 있으며 식품, 의약공업 등에 광범위하게 사용되고 있다. 그러나 식물이나 해조류 등으로부터 생산된 다당류는 한정된 물량과 불균일한 품질 등이 문제점으로 지적되어 미생물 다당류의 탐색이 시작되었다.

미생물성 다당류에 대한 연구는 1942년에 *Leuconostoc mesenteroides*가 생산하는 다당류인 dextran이 혈장증량제로 개발된 이래 xanthan gum, pullulan 등을 비롯한 여러 가지 다당류에 대하여 기초 및 응용연구가 진행되어 왔다. 특히, 해양미생물 대상으로 다당류에 관한 연구로서는 *Zoogloea sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Cyanotheca sp.*, *Altermonas macleodii* 등이 생산하는 Zooglan에 대해서 보고된 바 있다. 또한 호염성, 내염성 미생물에서 생산되는 다당류를 분리하였으며, 높은 점도와 극한 pH, 온도 및 염분이 내성이 강하다는 결과가 보고되어졌다. 이외에도 *Cyanobacteria*는 건조한 악조건에 견디기 위하여 기능성 세포외 다당류를 분비하는 것으로 밝혀졌다. 국내의 경우 해양으로부터 세포외 다당을 생산하는 균주 *Hahella chejuensis*가 동정되었으며, 이 균주로부터 생산된 다당은 galactose, glucose, xylose 및 ribose으로 구성되어진 다당으로 분자량이 2×10^6 Da이며 생물유화능을 가진 것으로 알려졌다.

이러한 미생물성 다당류는 분자량, 구성당의 종류, 결합순서, 결합양식, 결합위치 및 분자결합 유무에 따라 많은 종류가 존재하며 이들은 점성을 갖거나 분산을 용이하게 하는 성질을 갖는 물질로서 조건에 따라 겔 형성능, 유화안정능, 표면장력의 조절능, 물 흡수능, 점착능, 윤활능 및 필름형성능 등의 광범위한 기능성을 가지고 있다.

이러한 기능 때문에 식품산업에서는 샐러드 소스, 치즈, 달걀 대용품, 푸딩, 음료 및 분말 스프제조 등에 이용되며 식품분야 외에도 연마제, 분무제, 세라믹제, 화장품, 잉크, 페인트 및 종이제조 등의 각종 산업에 이용되고 있다. 이와 같이 미생물성 다당류는 물성이 다양하고 독특하며 각종산업의 신소재로서 잠재력이 매우 크며, 실제적인 측면에서 적당한 생산균의 선택 및 배양방법으로 대량생산이 가능하고 발효액으로부터 회수가 쉽고 정제비용이 적게 들어 유망한 산업으로서의 가능성을 보여주고 있다. 더욱이 최근에 들어서 다당의 구조, 물성, 기능의 상호관계가 점차 연구되고 유전자조작 등에 의한 구조의 변환도 가능하게 되어, 원하는 물성의 다당류를 얻을 수 있는 biopolymer engineering이 가능하게 되어 미생물의 다당 및 유도체의 생산에 미생물을 이용한 유용물질생산에 관한 학문적, 상업적으로 중요성을 인식받게 되었다.

본 연구에서는 풍부한 국내수산자원임에도 불구하고 해양미생물을 이용한 유용물질을 생산함으로써 고부가가치 창출을 위한 산업적 응용의 기초자료를 제시함을 목적으로 하였다. 이에, 홍조류 등의 해조류가 의약, 식품산업에 널리 이용되고 있는 점질성의 다당류를 많이 생성하고 있는 점을 고려할 때 이와 같이 홍조류 등에 부착하여 생존하는 미생물도 다당류 생성에 관여하고 있을 것으로 예상되어, 자연 및 인공양식 해조류로부터 해양미생물을 분리하였다. 분리된 해양미생물로부터 다당류 생성능력이 뛰어난 10여균을 선택하였으며 그 가운데 1 균주만을 선별하여, 세균학적 특성을 조사함과 동시에 이 균주로부터 세포외로 생산되는 extrapolysaccharide의 생산성 최적화, 분리·정제 및 생리기능성에 대해서 검토하였다. 이와 아울러 산업적 이용의 기초작업으로 발효조내에서 생산조건을 조사하므로써 생산수율등에 대한 경제성 검토, 식품소재로서의 기능성 및 안정성에 대하여 조사하였다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

최근 해양자원의 중요성이 새롭게 인식됨에 따라 해양생물공학이 중요 분야로 대두되게 되었다. 특히 해양 미세조류나 해양 미생물은 대형 해조류나 해산동물에 비해 성장이 빠르고 인공대량배양이 가능하며 유전자재조합 및 단백질공학 같은 새로운 생물공학기술을 적용하기가 비교적 용이하여 생체고분자물질 생산을 통한 산업화에 적합하다. 또한 이들은 유용한 생체고분자 성분을 갖고 있는 종류가 많아 해양생물 중에서 유용성이 가장 높다. 해양생물공학이 생물공학의 새로운 응용분야로서 관심의 대상이 된 것은 생물공학기술과 1970년대 이후 해양천연물화학이 해양생물에 접목되면서 활발한 연구가 진행되고 있다. 또한 해양생물은 주로 단순한 식량자원, 비료, 사료 등의 저 부가가치성 소재로만 이용되어 왔으나, 해양생물은 서식환경이 육상생물과 달리 수생환경에 적응되어 있어 이들의 생리대사물질은 육상생물의 경우와 다른, 특이한 화학구조를 가지고 있는 것으로 보고되었으며, 해양천연물화학의 연구결과, 해양생

물의 다양한 생리활성이 알려지기 시작하였다. 최근 해양생물 유래의 생체고분자 물을 의약품, 식품, 소재산업 등에 응용할 수 있는 유용자원으로 개발하기 위하여 생물공학기술을 응용하려는 시도가 되어지고 있으며, 그중, 미생물 유래의 다당류 생성은 생화학합성 고분자물질의 생성에 있어 문제점이 되었던 균질의 양적 생산의 어려움을 극복하고 좀 더 다양한 다당류의 생성을 가능하게 하고 있다. 특히 미생물을 이용한 세포외 다당류의 생산은 전통적으로 식물과 해산조류에서 추출한 다당류 생산에 비교하여 그 종류와 이용도가 다양하고 생산에 있어 공간적, 환경적 제한을 받지 않으며 생명공학을 이용한 수율의 증가와 특수한 기능의 다당류 개발과 이용이 가능하다. 또한 미생물을 이용할 경우 발효조건에 따라 다당류의 생산을 조절할 수 있으며 연속배양에 의한 대량생산이 가능하고 생산물의 추출에 있어 산물의 분해를 방지할 수 있어 구조 및 물성적으로 안정된 고가의 다당류를 대량으로 확보할 수 있다.

- 가. 생체고분자(biopolymer)는 다당류(polysaccharides) 및 그 유도체가 이미 알려진 식물이나 해조류에서 유래된 천연다당류 또는 합성고분자와는 달리 독특한 물성을 지니며, 독성이 낮으며 생분해성이 있어 환경에 적합하여 학문적 연구 및 산업적 응용에 많은 연구를 진행할 수 있다.
- 나. 미생물이 생산되는 다당류는 세포에서의 기능에 따라 3가지 형태로 분류되어진다. 그 중 본 연구에서 수행중인 세포외 다당류는 미생물이 항체, 독성물질, 중금속, 원생동물 및 bacteriophage등으로부터 보호막의 역할을 하며 토양이나 수중의 미량원소를 흡수하고 건조 지역에서 수분을 유지시키는 등의 역할을 하여 극한 환경에서도 미생물의 환경적응을 가능하게 하는 요소로 이들 모두는 미생물에 의하여 생산되는 1,2 차 대사산물로 최적의 배양조건을 확립하면 대량생산이 용이하다는 것이다.
- 다. 생물공학적인 응용을 위하여 생산된 다당류의 세포생리 및 대사에 대한 기능적 이해를 규명함으로써 유용한 신규 다당류의 개발과 대량생산 공정개발 및 다양한 산업에의 응용이 가능할 수 있다.
- 라. 본 연구가 개발에 성공한 후, 그것을 기업체에 기술이전 시키기 위해서는 생물공정 설계, 즉 생물공정엔지니어링을 수행하여 개발의 경제성 분석과 대량생산에 기초가 될 생물공정 설계가 필요하다.
- 마. 해조류와 같이 해양미생물은 바다라는 특수한 환경에 서식하므로 육상유래 생물과는 또 다른 다양한 생리활성 물질을 함유하고 있을 것으로 추정되므로 새로운 기능성 소재로서 산업화가 기대된다.

2. 경제 · 산업적 측면

전 세계적인 다당류의 시장규모는 약 1천4백만달러(US), 식품첨가제 시장규모 1억9천만달러

에 5%에 해당하는 규모이며 1997년-2002년 기간 중에 2.5-4.0% 성장률을 보이고 있는 매우 거대한 시장이다, 성장추세를 보더라도 2002년에는 약 2천만달러를 육박할 것으로 예상되며 앞으로 국외시장으로 진출한다고 가정할 시에 많은 자본을 유치할 수 있는 잠재력 높은 분야로 사료된다.

또한 국내 당류산업 시장규모를 보면 1995년 이후로 5.9%-30%씩 꾸준히 성장하면서 1998년에는 출하액 993억원으로 최고 신장율을 나타냄으로써 매우 밝은 전망을 보이고 있다. 95년에는 설탕 및 포도당, 엿류가 주로 차지하는 반면 96년부터는 기능성 당류인 텍스트린, 올리고당류, 당시럽류 등이 등장함에 따라 소비자들의 기능성 당류에 대한 관심이 대두됨에 따라 식품의 제 3의 역할인 기능성을 의식하게 됨을 간접적으로 나타내며 97년, 98년 급격히 높은 신장세를 보여줌으로써 소비자들의 기능성 당류의 소비에 대한 선호도를 나타낸다. 따라서 식품 산업 및 다방면 부분에서도 기능성에 대한 식품소비가 증가하는 추세로 발전하는 것으로 사료되며 최근에는 기능성 다당류쪽의 수요가 증가됨에 따라 해양생물이 생산하는 다당류 부분에도 매우 밝은 용도 전망과 고도 생산기술의 적용으로 많은 신규 다당의 취득과 무한한 응용이 기대되어지고 있다. 특히, 다당류의 다양성은 이들의 분자량, 구성당의 조성, 결합순서 및 결합위치, branch 형태에 의해 이루어지며, 고유의 점성 및 분산능에 의한 물성을 통하여 겔 형성능, 유화안정능, 수분함유능, 표면장력 조절능, 점착능, 윤활능, 필름 형성능 등의 다양한 산업소재로서 공업적으로 중요한 중합체 매개원으로 이용된다. 현재 생합성 다당류는 식품의 가공과 보존을 위한 첨가제의 식품분야, 토양보수, 육묘용 종자, 식물재배 배지의 고형제등의 농업분야, 보습 및 피부개선을 위한 기능성 첨가물로서 화장품분야, 렌즈, 인공관절, 피부 피복제, 생리활성제, 약물전달계, 대용 혈청제제 등의 의약품분야, 섬유, 필름, 종이, 페인트, 잉크의 공업분야 등에서 산업적 응용이 이루어지고 있다. 그러나 생물공학을 이용한 다당류의 연구가 진행됨에 따라 이외 고부가 소재로서 물질분리, 농축소재 등의 화학공학분야, 반도체 산업의 대규모 집적회로의 광저항성 및 초전도복합소재로 사용되고 있으며, 특히 의약품분야에서 진단과 인체 소재로서 생체적합성과 혈액용화성을 갖는 의약품 소재로서 용도개발이 이루어지고 있다. 따라서 현재 비약적인 생물공학 및 화학공학의 발전을 통하여 다당류의 구조, 물성, 기능이 밝혀지고 이를 이용하여 원하는 물성의 다당류 생산이 가능함에 따라 상업적 중요성이 증대되고 있다.

3. 사회·문화적 측면

1. 생물산업은 새로운 수요가 계속 창출되는 선진국 간에 경쟁이 치열한 첨단 미래 산업으로, 국가 경쟁력을 갖추기 위해서는 비교적 풍부한 국내의 수·해양 생물자원의 개발에 대한 정부의 적극적인 기술개발 투자가 필요하다.
2. 지금까지 국내 수산생물의 이용은 주로 천연상태의 자원을 채취, 이를 원료상태 혹은 단순 가공공정을 통한 제품으로 판매하고 있는 것이 대부분이다. 그러나, 해양자원의 고갈로 인하여 원료상태의 단순가공공정이 한계에 도달하여 기존의 방법으로 수산자원의 생

산과 이용은 더 이상 국제 경쟁력을 기대하기는 어렵다. 따라서, 이상과 같은 상황극복은 해양생물 자원에서 새로운 기능성 물질을 회수, 산업적으로 응용할 수 있게끔 정부의 막대한 투자와 연구 인력 확보가 바람직하다.

3. 국내의 경우 인구의 고령화로 여러 가지 노인성 질환에 대한 국가적 부담이 증대될 것으로 예상, 이에 대한 일환으로 값싸고 안전하며, 신기능 생체물질인 바이오폴리머를 통해 국민 건강 증진에 크게 기여하게 되며, 이는 보건의식에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

제 3 절 연구개발 내용 및 범위

▣제1세부과제 : *Zoogloea* sp. 유래 heteropolysaccharides의 대량생산기술 및 고 품질 수산연제품 생산을 위한 응용기술개발

구 분	목 표	내용 및 범위
1차년도 (2001년)	<ul style="list-style-type: none"> • Heteropolysaccharide의 효율적 생산을 위한 <i>Zoogloea</i> sp. 최적배양 조건 확립 및 식품소재로서의 물성조사 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 문헌 및 자료수집 ◦ 최적배양조건 검토 (탄소원, 질소원, 무기염류, 온도, pH 등) ◦ 다당체의 분리·정제 ◦ 수율조사 ◦ 식품 소재로서의 물성조사 <ul style="list-style-type: none"> - Shear rate의 영향 - 온도, pH에 의한 영향 - NaCl, 각종염에 의한 영향 - 유체흐름의 특성 ◦ 물리·화학적 특성 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 보수력, 용해도 - 유화능력, 인장강도, 켈리강도 - 점착성, 결착능, Texture - 생분해능
2차년도 (2002년)	<ul style="list-style-type: none"> • 발효조를 이용한 대량 생산 기술 개발 및 수산 연제품에의 적용 및 생산 공정 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 발효기를 이용한 다당류의 효율적 생산조건 조사 <ul style="list-style-type: none"> - Batch fermentation - Fed batch fermentation - Semicontinuous fermentation (추가 항목) ◦ 대형발효조적용 가능성 검토 ◦ 분리 공정법 개발 ◦ 다당류 첨가 수산연제품의 최적 가공 조건 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 적정 배합량

		<ul style="list-style-type: none"> - 적정 가공방법 등 ◦ 다당류가 제품의 물성에 미치는 영향 조사
3차년도 (2003년)	<ul style="list-style-type: none"> • 산업적 실용화 기술 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 생산수율 등에 대한 경제성 검토 ◦ 대량생산을 위한 고수율 공정설계 ◦ 다당류 첨가 수산연제품의 생산실용화 기술개발 <ul style="list-style-type: none"> - 설문조사 - 품질 및 포장 개선 ◦ 관능 평가 <ul style="list-style-type: none"> - 조직감, 냄새, 색택, 맛 등 ◦ 기존 첨가제와의 비교 검토

■ 제2세부과제 : Heteropolysaccharides의 고 기능성 응용연구

구 분	목 표	내용 및 범위
1차년도 (2001년)	<ul style="list-style-type: none"> • Heteropolysaccharide의 생리기능성 검토 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 생리기능성 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 항균활성(In vitro) - 항암 효과(In vitro) - 면역증강 효과(In vitro, In vivo) - 항산화성(In vitro)
2차년도 (2002년)	<ul style="list-style-type: none"> • 식품소재로서의 기능성 및 안전성 조사 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 기능성 및 안정성조사 <ul style="list-style-type: none"> - 항암효과(In vitro) - 항산화성(In vivo) - 급성독성검사(LD₅₀ 측정) - 만성 독성 검사
3차년도 (2003년)	<ul style="list-style-type: none"> • 가공제품의 생리기능성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 기능성 및 안정성 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 만성 독성 검사(계속) ◦ 가공제품의 생리기능 활성 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 항균활성 - 항암효과 - 면역증강 효과 - 항산화성

제 2 장 국내 · 외의 기술개발 현황

제 1 절 국내의 기술개발 현황

- 육상유래 미생물의 경우 다양한 균종에 대한 분리보존, 및 배양기술, 특성등이 진행된 반면 해양미생물에 대한 연구는 매우 부진하고 이에 관련된 장치산업이 대부분 외국기술에 의존하고 있다.
- 기능성 다당류 연구의 경우 국내 몇몇 연구자등에 의해 다수의 다당류가 밝혀졌으나 해양 미생물 유래 천연기능성 다당류에 관한 연구는 거의 전무한 실정이다.
- 미생물 다당류는 기존 식물 및 해조류유래 다당류에 비해 균일한 품질, 일정한 공급 및 특수용도 제품생산시 필요한 기술적용 용이 등의 무궁무진한 장점이 있음에도 불구하고 수산 연제품에 대해 응용을 시도하려는 연구가 거의 전무하다
- 국외에 비해 소비가 많은 수산가공식품에 전분, 알긴산등 몇몇 다당류가 첨가되어 저장기간 연장, 품질향상 등에 이용되고 있으나 국내 원료의 대량확보가 불안정하여 동남아, 남미 등에서 싸게 수입되고 있다. 따라서, 국가 기반산업의 안정성을 유지하기 위해서는 이러한 원료개발에 대한 연구개발이 절실히 요구된다.
- 국내 경우 현재 수산가공업의 국제 경쟁력이 약화되어 있어 다수의 기업이 중국 청도, 대련 등지에서 가공한 후 일본, 미국, 유럽지역으로 OEM방식에 반제품, 원료형태로 수출하는 현실이다.
- 국내 연구개발되고 있는 다당류의 경우 생산단가의 고비용등으로 실용화에 장애가 되고 있어 생산가격을 낮추기 위한 값싼 기질이나 균주개량을 통한 대량생산, 연속생산이 가능한 bioreactor system, 원활한 회수방법 등에 관한 폭넓은 연구가 절실히 필요하다

제 2 절 국외의 기술 현황

- Curdlan은 열응고성, 내열성, 내산성, 내알칼리성, 내냉동성, 피막형성성, 겔이수방지등의 특성을 밝혀내어 1996년 FDA에서 식품첨가제로서 인증받아 식품 품질개량제로서의 식감개량, 피집억제, 탄력증가제로 이용되고 있으며 현재 미국 Takeda에서 Pureglucan이란 제품으로 일본, 한국, 타이완등지에 광범위하게 판매하고 있다.
- Xanthan gum 경우 1960년부터 미국 Kelco회사(미국 Merch & Co.일부)에서 중간공업시험으로 생산개시 FDA 등록을 얻어 식품등급으로 개발, 판매된 이래 2001년 현재 미국 Pfizer Inc., Chemical Division사, R.T Canderbilt Co. Inc., Belzak corperation등에서 시판되고 있다. 이외에도 일본 Kohjin Co. Ltd., 오스트리아 Jungbunziauer Xanthan AG, 오스트레일리아 Keit Harris & Co. Ltd., 아르헨티나 Meranol S.A.C.I.등 세계 각국에서 판매되고 있다.
- 일본에서는 pullulan을 발효생산하여 활성탄으로 탈색, 농축하여 건조분체상태로하여 PF-20 제품으로 개발, 식품 및 일반공업분야에 이용하고 있으며 PF-20중에 회분이나 단백질을 정제하여 PI-20로 개발, 의약품, 화장품등 회분제거가 필요한 분야에 이용하고 있다.
- 최국 미국의 농무성과 Sugar Processing Research와 공동연구를 통해 썩은 사탕수수줄기로 부터 levan을 생산하는 미생물을 분리하여 Kelco사와 특허 및 응용연구를 진행중에 있다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 연구수행의 내용

▣ 제1세부과제 : *Zoogloea* sp. 유래 heteropolysaccharides의 대량생산 기술 및 고 품질 수산연제품 생산을 위한 응용기술개발

1. Heteropolysaccharides의 최적생산조건

가. 사용균주

균주는 본 연구실에서 분리하여 균주 등록한 *Zoogloea* sp.(KCCM 10036)을 이용, Marine medium을 기본배지로 하여 1.5 %(w/v) agar 평판배지에서 30 °C, 72 hr 배양한 후, 냉장 보관하며 2주 간격으로 계대배양하며 본 배양에 사용하였다.

나. 배지선정

다당 생산과 관련된 기본배지의 선정을 위해 사용된 균체생육 배지조성은 Table 1과 같다. ASW(Artificial Sea Water)에 질소원으로 복합배지인 peptone과 탄소원으로 glucose를 첨가하여 pH 7.8로 조절한 후, autoclave에서 121 °C, 15분간 멸균하였다. 진탕배양기에서 stirring speed 180 rpm, 30 °C 조건하에서 6일 동안 균을 배양하였으며 실험에 사용된 모든 시약은 특급 시약을 사용하였다.

다. 탄소원의 영향

다당생산에 가장 밀접한 영향을 주는 탄소원을 선정하기 위하여 glucose, lactose, maltose, sucrose, fructose 등을 각각 1 % (w/v) 첨가하여 균 생산 및 두 가지 다당 생산량을 검토하였으며 최적기질 농도를 선정하였다.

라. 질소원의 영향

최적 질소원 선정을 위해 유기질소원 tryptone, yeast extract, meat extract, peptone, 무기질소원 NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{Mg}(\text{NH}_3)_2$ 등을 각각 첨가하여 다당생산과 균성장에 영향을 주는 최적 질소원을 선정하였다.

Table 1 Compositions of the medium

Medium	g/L
Peptone	5.00
Glucose	10.00
KCl	0.70
NaCl	23.40
MgCl ₂ ·6H ₂ O	10.60
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.10
NaSO ₄	3.90
NaHCO ₃	0.20
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.00
K ₂ HPO ₄	0.01
Tris base	6.05
Distilled water	1L

마. NaCl의 영향

기본배지인 인공해수 성분 중 NaCl의 농도가 균 성장 및 다당생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0~5 %(w/v)의 농도로 첨가하여 144 hr 배양 후 다당 생산량을 조사하였다.

바. Na₂SO₄와 K₂HPO₄, MgCl₂ · 6H₂O 첨가에 대한 영향

해수의 기본 구성성분 중 미량으로 첨가되는 Na₂SO₄와 K₂HPO₄, MgCl₂ · 6H₂O 등의 무기염이 균 성장 및 다당생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0~1.0 %(w/v), 0~10 mM, 0~1.5 %(w/v) 농도로 첨가하여 살펴보았다.

사. Tris base의 첨가에 대한 영향

인공해수의 pH 조절인자인 Tris가 다당 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Tris를 0.6 %(w/v) 첨가한 군과 첨가하지 않은 군으로 나누어 144 hr 배양한 후 두 종류 다당 생산량을 조사하였다.

아. 배양 pH에 따른 영향

다당생산에 미치는 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 전 실험에서 선정된 배지조건에서 pH를 1 N HCl 및 NaOH로 pH 2~12까지 조절하여 배지를 제조하여, 각각에서 균을 배양한 후 다당 생산량을 검토하였다.

자. 배양온도에 따른 영향

다당의 생산에 영향을 미치는 미생물 생육 최적 온도를 알아보기 위하여 전 실험에서 선정된 배지조건으로 20, 25, 30, 37 °C 각각 온도에서 균을 배양시킨 후 다당 생산능을 살펴보았다.

2. 발효조를 이용한 다당류의 효율적 생산 조건

가. 미생물 전배양

전배양은 500 ml baffled flask에 100 ml의 변형해수배지(Table 2)로 30 °C, 180 rpm, pH 7.8, 그리고 1 %(w/v) glucose를 첨가하여 shaking incubator에서 배양하였다.

나. Flask 배양

(1) 질소원의 영향

Zoogloea sp.의 세포성장 및 다당생산에 미치는 질소원의 영향을 알아보기 위하여 다음과 같은 질소원을 농도별로 배지에 첨가하여 배양하였다.(Casamino acid, Urea, Thiourea, Beef extract, Gelatin, Yeast extract, Proteose peptone, Peptone G, Bacto soytone, Bacto peptone).

Table 2. Composition of modified marine medium

Component	Composition
Peptone	5 g
NH ₄ NO ₃	0.0016 g
Na ₂ HPO ₄	0.008 g
Glucose	25 g
Natural Sea Water	1 L
pH	7.8

(2) C/N ratio의 영향

일반적으로 polysaccharides의 생산은 C/N (glucose / peptone)에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다. C/N 비의 최적배양조건을 알아보기 위하여 C/N 범위를 1에서 7까지 조절하여 기본배양조건에서 배양하였다.

다. Fermentation

(1) 전배양

발효조 전배양은 agar plate에 단일 colony를 500 ml baffled flask속 100 ml의 배지에 접종한 것을 사용하였으며, 조건은 30 °C에 기질 1 %(w/v) glucose, 180 rpm, 18 hr 동안 배양한 후 그 배양액을 발효기에 접종하였다

(2) 회분 배양

회분 배양의 최적발효조건을 살펴보기 위하여 3 L working volume, 1 vvm, 탄소원 glucose 2.5 %(w/v), 10 %(v/v) inoculum size, 400 rpm, 30 °C 조건에서 배양하였으며, 배지는 121 °C에서 40분간 멸균하였다.

(3) 유가식 배양

유가식배양은 3 L working volume에 feeding volume을 100, 200 그리고 500 ml로 달리하고, feeding substrate의 농도는 2.5, 5.0, 10 %(v/v)로 하였으며, 그 외 조건은 회분배양과 동일하게 유지하였다 feeding은 24 hr마다 공급하였다.

(4) 반연속식 배양

반연속식 배양은 배지를 교체하는 형식의 발효 배양으로, inoculum size는 10, 20 %(v/v), feeding volume은 200, 500 그리고 1000 ml의 조건으로 각각 feeding 간격 12 hr과 24 hr을 유지하며 최적 반연속식 배양 조건을 검토하였다. 나머지 조건은 기존 발효배양조건과 동일하게 유지하였다.

라. Polysaccharide의 분리·정제 및 수율 조사

(1) 다당의 분리

생산된 다당 분리과정은 Fig. 1에 나타내었다. 각각의 조건에서 배양 후, 배양액에 동량의 증류수를 첨가하여 잘 혼합한 뒤, 4°C, 9,000 rpm에서 30분간 원심분리한 후 상등액에 2배의 cold acetone을 처리하여 생긴 polysaccharide를 둥근 유리막대로 감아서 acetone과 증류수가 1 : 1로 혼합된 용액에 여러 차례 세정을 하여 얻은 polysaccharide를 다시 증류수에 녹여 12 hr 동안 동결건조시켜 crude WSP를 분리하였다. CBP는 원심분리에 의해 얻어진 cell 침전물에 처음 부피와 동일하게 증류수를 넣어 잘 현탁한 뒤, 60 °C에서 24 hr 동안 강하게 교반처리하여 이를 6,000

rpm, 60 °C, 20분동안 원심분리한 후, 4 °C로 냉각시킨 후, cetylpyridinium chloride (CPC)를 10 % (w/v)가 되게 첨가하여 polysaccharide를 분리하였다. 분리된 polysaccharide를 10 % (w/v) NaCl 용액 1 L에 녹여 CPC와 CBP를 분리시킨 후, 2배의 cold acetone을 첨가하여 CBP만을 분리한 후 12 hr 동안 투석한 것을 동결건조하여 crude CBP를 얻었으며, cell은 pellet을 증류수로 세척하여 얻었다.

균으로부터 분리한 두 종류의 다당은 ψ 0.2 μ m membrane을 이용하여 막 여과시킨 후, Sepharose CL-4B column (2×110cm)을 통과시켜 Fraction collector로 각각 분획하여 정제하였다. 분획물의 당 및 단백질은 Phenol-sulfuric method, 흡광도 측정법(A_{260} nm)과 Bradford 법에 의해 각각 정량하였다.

(2) Polysaccharides의 생산량 측정

실험 전 미리 호일을 크기에 맞게 자른 후 건조기에 넣어 완전 건조시킨 후 무게를 미리 측정해둔다. 그리고 acetone으로 분리·추출된 WSP와 CBP를 각각 호일에 담아 90 °C, 12 hr 동안 건조하여 건조 중량을 측정하여 다당 생산량을 환산하였다.

(3) 균체량 측정

균체량은 WSP와 CBP가 완전히 제거된 균체를 미리 건조해둔 호일에 담고 90 °C에서 12 hr 동안 건조를 하였다. 그리고 균체의 standard 곡선은 시간에 따른 배양 상층액을 희석하여 UV/VIS spectrophotometer (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech Ltd., England) 660 nm에서 측정된 값과 건조량을 비교하여 값을 얻었다(Fig.2).

(4) Scanning electron microscopy (SEM)

Scanning electron microscopy (SEM)은 균체를 잘라 4 °C의 glutaraldehyde 2 % (w/v)에 넣고 2 hr 동안 방치한 후 30, 50, 80, 90, 95 % (v/v)의 ethanol에 순서대로 침지하여 세척과 살균을 실시하였다. 그리고 염색을 위해 amyl acetate에 담근 후 균체의 표면을 금박 처리하여 scanning electron microscopy (Hitachi s-2400 SEM, Japan)로 관찰하였다.

(5) Glucose 소비량 측정

Glucose의 소비량은 배양 상층액 1 ml를 DNS (3,5-Dinitrosalicylic acid) method에 의해 UV/VIS spectrophotometer로 550 nm 측정하고, 그 결과값을 standard 곡선(Fig. 3)과 비교하여 잔존 기질 소비량을 측정하였다.

(6) 다당의 정제 및 평균 분자량 측정

GPC(Gel permeation chromatography, HP 1100series)에 PSM60, 300, 3000를 이용, 1 ml/min, 100 μ l 조건하에서 분리하였다. 검출기로 RI detector, mobile phase로 초순수 water를

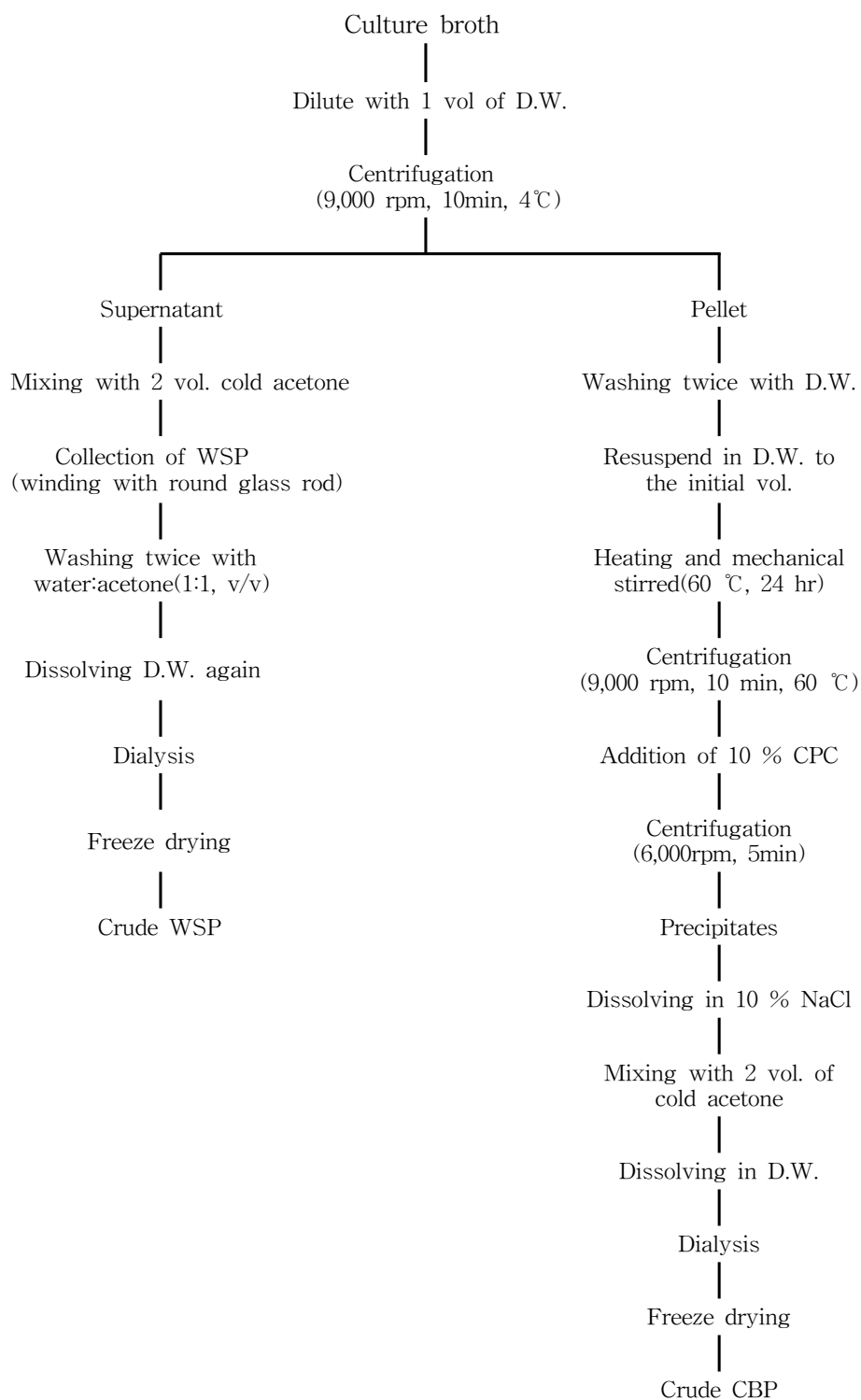


Fig. 1. Isolation steps of crude polysaccharides from culture broth.

사용하였고 표준당으로 분자량 측정 표준시료인 크기 71,400, 464,000, 2,000,000, 5,000,000의 Dextran(Sigma co.)을 기준으로 표준곡선을 작성하고 외삽법으로 정확한 분자량을 추정하였다.

(7) FT-IR분석

정제된 다당을 10 hr 동안 건조시킨 후 KBr를 이용, 얇은 박막을 제조한 후에 사용하였다. FT-IR e(Brlker IFS-88. Germany)에 DT·GS, MCT detector를 이용하여 분석하였다.

3. 대형 발효조 적용 가능성의 검토

고기능성 다당류를 생산하기 위한 최적 발효조건을 구한 다음, 대량생산을 위해 scale-up된 200 L fermentor에서의 대량생산을 검토해 보았다.

4. 분리 공정법의 개발

발효 생성물의 회수와 분리·정제는 어떤 상업적인 공정에서도 필수적이다. 발효액의 화학적 성질이 아주 복잡하거나 순도 높은 생성물이 요구되는 경우, 분리와 정제는 많은 공정단계를 필요로 한다. 발효생산물의 분리·정제에 차지하는 비용은 전체 제조비용 중 20 - 60 %를 차지하므로 어떤 경우에는 제조비용에 있어서 생성물 생산보다 더 많은 비용이 든다. 공정의 수율을 높이기 위해서는 공정장치의 선택이 중요하고 공정에 사용하는 장치는 배양이 끝난 배양물을 허용된 시간내에서 처리될 수 있도록 하는 적절한 처리능력을 가지고 있어야 한다. 따라서 대량생산을 위해서 기능성 다당 수율을 증대함과 동시에 분리·정제 비용도 절감할 수 있는 공정법을 개발하였다.

5. 식품 소재로서의 물성조사

가. 시료제조 및 점도측정

동결건조하여 얻어진 WSP와 CBP를 각각 60 °C에서 증류수에 서서히 첨가해 가면서 완전히 용해될 때까지 교반한 후, 기포를 제거하기 위하여 감압냉각과 degassing을 시킨 것을 시료로 사용하였다.

생산된 유용 polysaccharide의 유동특성을 파악하기 위하여 위와 같이 제조된 각 시료의 겔보기 점도를 측정하였다. Brookfield viscometer (DV-II+), spindle SC4-21, 8 ml small sample adaptor를 이용하여 여러 전단속도별로 각 시료의 점도를 측정하였다.

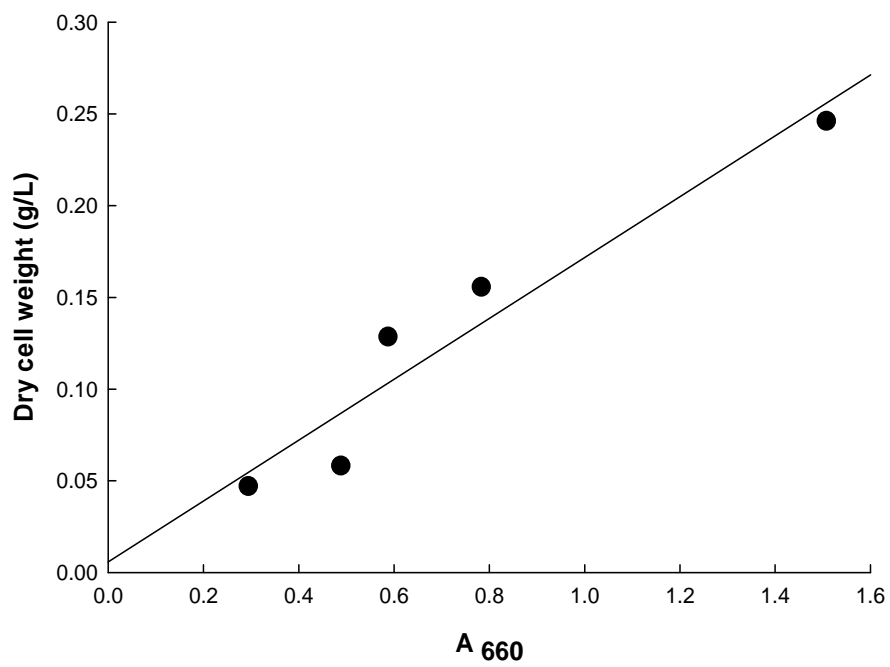


Fig. 2. Standard curve of dry cell weight by absorbance.

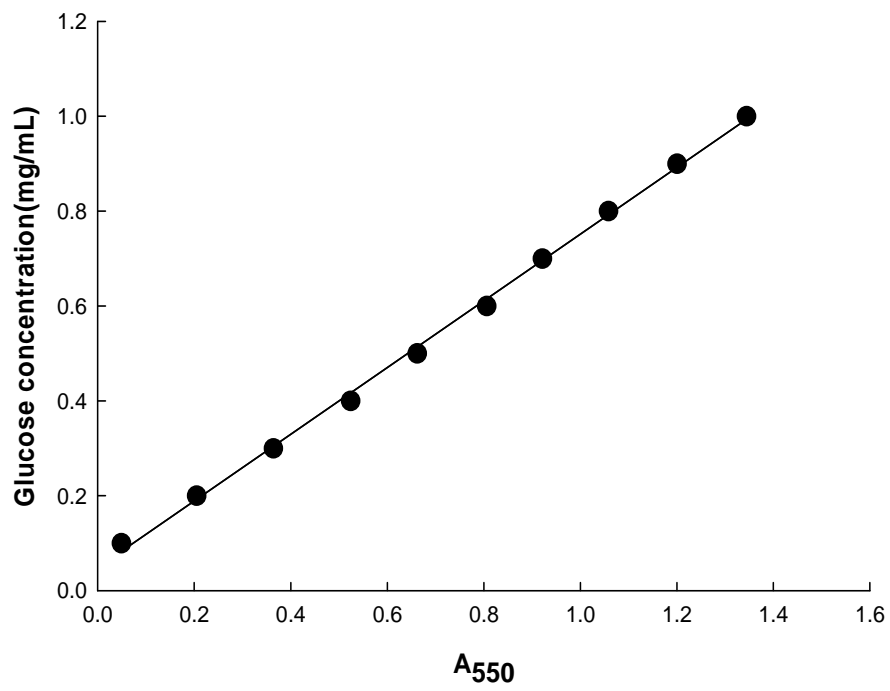


Fig. 3. Standard curve of glucose concentration by the DNS assay.

나. 유동특성의 검토

Viscometer에 의해 측정된 겔보기 점도, 전단속도, 전단응력의 data를 Power-law equation(1)으로 해석하였다.

$$\tau = K \cdot Y^n \text{ -----(1)}$$

- n : 유동지수 (Flow behavior index)
- K : 점조도 지수 (Consistency index, cp)
- τ : 전단응력 (Shear stress, Dyne / cm²)
- Y : 전단속도 (Shear rate, sec⁻¹)

다. 겔보기 점도의 온도 의존성

Polysaccharide 수용액에 대한 겔보기 점도의 온도의존성은 circulator(Multi-Temp III, Pharmacia Biotech)를 이용하여 조절된 20~80 °C의 온도범위에서 전단속도별로 측정하고, Andrade's equation(2)을 이용하여 해석하였다.

$$\eta_a = A \cdot \exp(E_a/RT) \text{ -----(2)}$$

- η_a : 겔보기 점도 (Apparent viscosity, cp)
- A : 빈도인자 (Frequency factor, cp · s)
- R : 기체상수 (Gas constant, 1.986 cal / mole · °K)
- T : 절대온도 (Absolute temperature, K)
- E_a : 유동활성화에너지 (Activation energy of flow, kcal / mole · °K)

라. 겔보기 점도의 pH 의존성

겔보기 점도의 pH 의존성은 2 N HCl과 2 N NaOH에 의해 pH 2~12로 조절된 0.5 %(w/v) 각 시료 용액을 이용하여 온도 30 °C, 전단속도 1.86 sec⁻¹에서 조사하였다.

마. NaCl 첨가에 의한 겔보기 점도의 영향

0.5 %(w/v) WSP와 CBP 수용액에 NaCl을 0.5~5 %(w/v) 첨가하여 0.48 sec⁻¹, 0.93 sec⁻¹, 1.86 sec⁻¹의 전단속도, 온도 30 °C에서 겔보기 점도를 측정하였다.

바. 각종 salts 첨가에 의한 겔보기 점도의 영향

0.5 %(w/v) WSP와 CBP 수용액에 NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, BaCl₂, ZnCl₂, FeSO₄, CuSO₄, MgSO₄를 0.2 % 되도록 첨가하여 전단속도 1.86 sec⁻¹, 온도 30 °C에서 겔보기 점도를 측정하여 염류를 첨가하지 않은 수용액의 겔보기 점도와 비교하여 겔 형성능을 조사하였다.

6. 물리화학적특성의 조사

가. 응집활성(flocculant activity)

Nakamura 방법을 변형하여 사용하였다(Fig. 4). 즉, activated carbon(Sigma Co.)을 표준시료로 하여 시험관(17×190 mm)에 0.5 %(w/v, 5000 ppm) activated carbon 현탁액 10 ml을 넣고 1.0 %(w/v) CaCl₂ 용액 100 μ l를 첨가한 다음 여기에 heteropolysaccharide (WSP, CBP)을 첨가하였다. 이 혼합용액을 약 30초간 상온에서 각각 격렬하고 온화한 조건으로 혼합하였다. 이를 10분간 상온에서 정치 후에 상층액만을 흡광도 A₅₅₀에서 측정하였다.

나. 열적 특성

실험에 사용된 DSC(Differential Scanning Calorimeter, Perkin-Elmer, USA, pyris1)는 시료를 aluminum pan에 넣고 sample encapsulating press를 이용하여 밀봉한 후, 상온에서부터 200 °C 범위로 질소기류하(20 ml/min)에서 10 °C/min로 가열하면서 흡열되는 열량을 측정하였으며, 이때 온도와 엔탈피는 표준시료인 Indium (m.p.=156.6 °C, heat of fusion=6.8 cal/g)을 사용, 보정하였다. 열적 전이 thermogram에서 흡열곡선의 면적으로 열량을 계산하였고 겔화의 개시온도(onset temperature: T_o), 최고온도(peak temperature: T_p), 완료온도(conclusion temperature: T_c)로 구분하여 측정하였다. heteropolysaccharide의 열적특성은 농도별(1, 2, 5, 10 %(w/v))에 따라 측정, 외삽하여 계산하였다.

다. 수분 보유력(water-holding capacity, WHC)

Chen등이 사용한 방법으로 WSP, CBP시료를 각각 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 %(w/v)로 제조하여 미리 함량을 구한 원심분리관에 넣은 후, Vortex mixer로 1분간 혼합한 다음 상온에서 1 hr 동안 방치한 후, 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 흡수종이에 원심분리관을 거꾸로 세워 15분간 잔존수분을 충분히 제거하였다. 이것을 Dry oven (110 °C, overnight)에서 충분히 건조 후 정량하였으며 수분흡수시의 중량에서 건조중량의 차를 보수력으로 계산하였다.

라. 유화력(emulsion capacity)

유화력(Emulsion capacity, EC)은 Marshall, Neu의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 4 ml Olive oil과 6 ml D.W을 혼합하여 O/W type을 형성시킨후에 여기에 1.0 %(w/v) heteropolysaccharide를 첨가하여 2분간 격렬히 혼합하여 실온(20 °C)에서 정치한 후 관찰하였다. 대조군으로 기존에 연구 수행된 생물고분자 Alginate, gellan gum, Xanthan gum, carragenan, 화학유화제인 Tween20, Tween40, Tween80, Triton X-100을 사용하였으며 모든 시약은 표준 특급시약(Sigma, USA)을 사용하였다.

0.5% activated carbon 10ml + 1.0% CaCl₂ 0.1ml



1min violent agitation



add 0.1ml bioflocculant



30s violent agitation



30s gentle agitation



10min standing, 20°C



1ml upper part of the soln.



A₅₅₀

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

A : Absorbance of reference sample

B : Absorbance of reaction mixture

Fig. 4. 응집활성 측정방법

마. 용해성(solubility)

heteropolysaccharide의 각종 용매에 대한 용해성 측정을 다음과정에 의해 수행하였으며 용해력 측정은 아래 식에 의해 계산하였다.

Various solvent(H₂O외 15종) + Dried polysaccharide 2 mg/each other solvent(20 ml)
↓
homogenization(20,000 rpm)
↓
10 min standing
↓
spin down(13,000 rpm) → supernatant → Phenol-sulfuric method(490 nm)

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

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

A : total substance mass(mg/ml)

B : soluble substance mass(mg/ml)

* : molarcular weight ratio

바. 필름 형성능

각 polymer의 film 형성능력을 검토하기 위하여 121 °C, 15 min 멸균 과정을 거친 1, 3, 5 %(w/v)의 농도별로 heteropolysaccharides를 멸균된 직경 18.5 cm petridish에 각각 붓고 이를 실온에서 24 hr 건조시켰다. 이것을 다시 desiccator에 옮겨 24 hr 건조 후 film을 형성 시켰다.

사. 겔 형성능

0.5 %(w/v) WSP와 CBP 수용액에 NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, BaCl₂, ZnCl₂, FeSO₄, CuSO₄, MgSO₄를 0.2 %(w/v)되도록 첨가하여 전단속도 1.86 Sec⁻¹, 30 °C에서 겔보기 점도를 측정하여 염류를 첨가하지 않은 수용액의 겔보기 점도와 비교하여 겔형성능을 조사하였다.

아. 인장강도(젤리강도)

Rheometer(Model : COMPAC-100, Sun Scientific Co., LTD., Japan)를 사용하여 농도별로 제조한 필름의 인장강도를 측정하였다. 구멍이 있는 평판 위에 필름(5 × 5 cm) 놓고 설치된 2 cm adaptor를 이용하여 table을 이동, 압축시켜 측정하였다. 측정조건은 table speed 60

mm/min, chart speed 20 mm/min, load range 20 kg, 1 bite, plunger Φ 0.1 cm로 실험을 행하였다. Jelly strength는 다음 식에 의해 구하였다.

$$\text{Jelly strength}(\text{g}\cdot\text{cm}) = \text{hardness}(\text{breaking stress, Kg}) \times \text{breaking stain}(\text{cm}^2)$$

차. Texture

Texture는 Universal testing machine(UTM, Instron model 1011)을 사용하여 Table 3의 조건으로 실험하였다. 다당을 첨가한 gel을 제조한 다음, 일정한 규격으로 잘라(직경 3 cm, 높이 5 cm) 직경 3 cm의 cylinder형 plunger로써 가압시의 force-deformation 곡선을 얻고, 이 곡선으로부터 texture parameter를 측정하였다. 부서짐성(brittleness)과 경도(hardness)는 시료를 정해진 가압율까지 가압함으로써 생긴 제1변형곡선의 최고점(kg) 및 첫 번째 peak의 높이(kg)로써 각각 나타내고, toughness는 정해진 가압율까지 가압하는데 필요한 단위부피당 일로 계산되는데 본 실험에서는 시료 크기가 일정하므로 제1변형곡선의 면적으로 계산하였다. 탄성(elasticity)은 force-deformation 곡선의 제1가압에 의해 생긴 곡선의 면적에 대한 탄성변형부분의 면적비로 계산하였고, 응집성(cohesiveness)은 제1변형곡선의 면적에 대한 제2변형곡선의 면적비로 계산하였으며, 씹힘성(chewiness)은 경도, 결합성 및 탄력성의 곱으로 나타낸다.

카. 생분해능

공시균주인 *Aspergillus niger*를 사용하여 soft agar overlay방법에 따라 측정하였다. 형성된 필름시료를 Table 4와 같은 조성의 영양배지에 올려놓고 생분해성 측정균주로부터 채취한 혼합포자 현탁액 1ml와 영양배지 10 ml를 섞은 후, 이를 배지 위에 부어 접종하였다. 이를 온도가 28 °C인 항온 항습기에서 4-5주간 배양하면서 필름 표면의 미생물의 생육정도를 조사하였다.

7. 다당류 첨가 수산연제품의 최적 가공조건

생산된 다당의 수산가공제품으로의 응용방안을 검토하기 위하여 다당을 첨가한 수산가공제품-어육 소세지를 제조하는데 있어 최적조건 및 여러 가지 물성을 검토하였다.

가. 실험재료

본 실험에 사용한 연육은 부산소재 (주)한성 기업에서 Alaska pollack(A또는AA등급)을 구입하여 실험실로 운반한 후 500 g단위로 자른 후 -20 °C의 냉동고에서 보관하면서 어묵 제조를 위한 시료로 사용하였다.

나. 어묵의 제조

어묵은 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 냉동고기풀을 얇게 절단하여 반해동 시킨 다음

Table 3. Conditions for texture profiles of polysaccharide gel using the universal testing machine(UTM)

Instrument	Instron, model 1011
Sample size	Φ 3 cm \times 2 cm
Deformation	50 %
Crosshead speed	50 mm/min
Chart speed	20 mm/min
Load range	5 kg
Number of bite	2 bite

Table 4. Composition of agar medium used for *A. niger*

Component	Concentration (g/100ml)
KH_2PO_4	0.7
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.7
NH_4NO_3	1.0
NaCl	0.005
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.002
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.002
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.001
Agar	1.5

stephan mixer(stephan UMC5, Stephan Universal Machine Co., Hanelin, Germany)로 1.5분간 마쇄한 어육에 수분함량을 얼음물과 오일을 78 %로 맞춘 뒤 각각 WSP, CBP를 균질기로 3분간 혼합하고, salt를 농도별로 첨가 후 다시 3분간 균질기로 균질화 시켜 후 pH를 보정하여 sausage 충전기(Buffalo, Sausage Maker, NY, USA)를 사용하여 stainless tube(Φ 3.0 cm \times 25 cm)에 충전, 결속하여 90 °C에서 15분간 가열하고 냉각수에 다시 15분간 냉각한 뒤 비닐 백에 넣어 18 hr 냉장 보관한 후 겔의 특성 실험에 사용하였다.

다. 다당의 농도별 첨가

WSP, CBP의 첨가에 의한 어육 소세지의 물성변화를 조사하기 위하여 0.02~0.1 % 농도별로 첨가하여 어육 소세지를 제조하였다(Table 5).

냉동고기풀을 얇게 절단하여 반해동 후 적당량의 surimi를 stephan mixer에 1분30초 동안 채육한 각각의 필요량을 kitchen aid에 넣고 3분 동안 surimi를 다시 혼합한다. 마쇄한 다음 수분함량을 얼음물과 오일을 78 %로 하고 균질기로 3분간 혼합 후 각각의 다당을 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 %를 첨가하고 5분간 균질기로 균질화한다. 균질화한 것을 비닐팩에 각각 담은 후 골고루 편 다음 stainless tube에 충전하여 90 °C, 15분 동안 가열 후 15분 동안 차가운 물에 담근다. 충전된 관에서 꺼낸 다음 4 °C에 18 hr 냉장 보관한 후 겔 특성 실험에 사용하였다.

라. pH와 salt concentration에 따른 영향 조사

pH와 salt concentration의 변화에 의한 소세지의 물성에 미치는 영향을 살펴보기 위해 다음과 같은 실험을 실시하였다(Table 6).

pH는 7.0, 7.5, 8.0의 범위와 salt concentration는 1.5, 2, 3 %로 첨가하였으며, pH는 어육 소세지를 충전전 보정하였다. 나머지 제조방법은 이전의 실험과 동일하게 하였다.

마. 물성의 측정

물성은 현재 사용되고 있는 Okada의 방법으로 측정하였다. 실린더형의 시료(ψ 3 \times 3 cm)위에 지름 5 mm의 구형(球形) plunger를 장착하여 60 mm/min의 속도로 올리면서 rheometer (Rheometer, Model CR-100D, Sun Scientific Co., Tokyo, Kapan)로 breaking force(g)와 deformation(mm)값을 측정하였다. 그리고 folding test는 3 mm 두께의 겔을 엄지와 집게손가락으로 접었을 때 금이 생기는 한계를 측정하여 등급을 나타내었다.

바. 색도의 측정

CIE Lab color는 색차계(ZE-2000, Nippon Densoku, Japan)을 이용하여 겔의 표면 색도(L*, a*, b*)를 측정하여 백색도 지표, L*-3b*를 이용하여 계산하였다. 측정은 시료 5개 이상을 측정하여 평균값으로 나타냈다.

Table 5. Alaska pollack surimi formulation by polysaccharide concentration

	Polysaccharide conc.(%)	Surimi weight(g)	Ice water (ml)	Oil (ml)	Total weight(g)
control	0.00	172.55	15.45		
	0.02	172.40	15.56		
	0.04	172.25	15.67		
WSP	0.06	172.10	15.78		
	0.08	171.95	15.90		
	0.10	171.80	16.01	12	200
	0.02	172.40	15.56		
	0.04	172.25	15.67		
CBP	0.06	172.10	15.78		
	0.08	171.95	15.90		
	0.10	171.80	16.01		

Table 6. The pH and salt concentration formulation by three-level fractional factory design

	Salt concentration (%)	pH	Surimi weight(g)	Ice water (ml)	Oil (ml)	Total weight(g)
WSP conc. 0.02%	1.5	7.0	160.64	24.33	12	200
		7.5				
		8.0				
	2.0	7.0	156.71	27.25		
		7.5				
		8.0				
	3.0	7.0	148.87	33.09		
		7.5				
		8.0				
CBP conc. 0.02%	1.5	7.0	151.71	33.25		
		7.5				
		8.0				
	2.0	7.0	148.01	35.95		
		7.5				
		8.0				
	3.0	7.0	140.60	41.36		
		7.5				
		8.0				

사. 최적 formulation

다당이 어육 연제품에 미치는 영향을 검토하기 위하여 통계 프로그램인 JMP를 이용하여 실험 계획을 선별하였다.

아. 통계분석

표준편차, 유의성 검증은 JMP 5.0(SAS institute. INC. USA)에 의한 Turkey's HSD test로 실시하였다.

8. 다당류에 Potassium Sorbate 첨가 유무에 따른 물성검토

본 연구에서 사용된 해양미생물 유래 고기능성 다당류가 제품의 물성에 미치는 영향을 조사하기 위해 Xanthan gum, Curdlan, Dextran, Carrageenan과 비교, 실시하였다(Table 7).

또한, 현재 연제품은 맛살류나 어육소시지 등에 이용되고 있으며, 맛살류와 같은 경우 식품급 방부제를 사용하고 있지 않아 유통기간이 짧으며, 이에 반해 어육소시지에는 방부제로서 Potassium Sorbate를 사용하고 있으며, 식품첨가물 공정법에 의하여 사용범위 농도를 2g/kg 이하로 규제하고 있다. 따라서 방부제의 첨가유무에 따른, 어육연제품의 물성을 검토하였다 (Table 8).

9. 향료 첨가에 따른 물성비교

본 실험에서 얻은 결과로 향료 첨가시 제품의 물성검토를 토대로 시제품의 가능성을 검토하였다. 향료로는 계향, 새우향, 분말치즈, 슬라이스 치즈를 각각 5 %를 첨가하여 제품화 하였다 (Table 9). 물성비교에서는 본 실험의 제품과, D사와 C사의 제품과 비교하였다.

10. 시제품의 관능평가

시제품이 관능평가는 7점 척도법에 의하여 control을 4점, 평가항목이 control 보다 우수할시 5, 6, 7점으로 표기, control보다 낮을시 3, 2, 1점으로 표기하였다. 관능평가를 위해 전문화된 패널 위원 20명을 선발한 후 시제품을 각각 섭취한 결과를 나타내었다. 유의성 평가는 JMP 5.0을 이용하여 검증하였다.

Table 7. Alaska pollack surimi formulation by a variety of polysaccharide

Ingredient	Surimi weight(g)	Ice water (ml)	Oil (ml)	Polysaccharide (g)	Salt (g)	pH	Total weight(g)
Control	461.59	89.09	36	0	9	7.5	600
WSP							
CBP							
Curdlan	465.48	89.41	36	0.12	9	7.5	600
Xanthan							
Carrageenan							
Dextran							

Table 8. Alaska pollack surimi formulation by a variety of polysaccharide on potassium sorbate

Ingredient	Surimi weight(g)	Ice water (ml)	Oil (ml)	Polysaccharide(g)	Salt (g)	Potassium sorbate(g)	pH	Total weight(g)
Control	461.59	92.27	36	0	9	1.2	7.5	600
WSP								
CBP								
Curdlan	461.16	92.57	36	0.12	9	1.2	7.5	600
Xanthan								
Carrageenan								
Dextran								

Table 9. Manufactures formulation by surimi on flavor

Ingredient No.*	Surimi weight (g)	Ice water (ml)	Oil (ml)	Polysaccharide (g)	Salt (g)	Potassium sorbate (g)	Flavor	pH	Total weight(g)
1	450.91	102.83	36	0.12	9	1.2	0	7.5	600
2	358.64	166.61	36	0.12	9	1.2	30g	7.5	600
3	358.64	166.61	36	0.12	9	1.2	30g	7.5	600
4	450.91	72.83	36	0.12	9	1.2	30ml	7.5	600
5	450.91	72.83	36	0.12	9	1.2	30ml	7.5	600

*1: 향료 무첨가, 2: 분말 치즈 첨가, 3: 슬라이스 치즈 첨가, 4: 계향 첨가, 5: 새우향 첨가

▣ 제 2 세부 과제 : Heteropolysaccharides 의 고 기능성 응용연구

1. 다당류의 분리

Kwon 등이 해수와 조류에서 분리한 *Zoogloea* sp.로부터 분리 정제한 수용성 다당류 (water-soluble polysaccharide, WSP)와 세포부착성 다당류 (cell-bound polysaccharide, CBP)를 연구에 사용하였다.

2. 면역증강효과의 측정

면역세포의 증식에 대한 효과는 다음과 같이 측정하였다. Mouse(C57BL/6)에서 비장세포를 분리하여 RPMI 1640 완전배지에 부유시켜 flat bottomed 96 well culture plate의 각 well 에 0.2 ml (2×10^6 cell/well)씩을 분주하여, 몇 가지 농도의 다당류를 첨가하였으며, 증식능을 비교하기 위하여 T세포 증식유도물질인 phytohemagglutinin-p(PHA-P) 및 B세포 증식유도물질인 lipopolysaccharide(LPS)도 사용하였다. 5 % CO₂, 37 °C의 배양기에서 72 hr 배양하였으며, ³H-thymidine(³H-TdR, specific activity: 2.0 Ci/mmol)pulse는 각 well에 배양종료 18 hr 전에 0.5 µl의 ³H-TdR을 가하여 실시하고, ³H-TdR incorporation 의 측정은 cell harvester로 glass fiber에 세포를 수확한 후 β-counter로 하였다.

대식세포에 의한 nitric oxide(NO) 생산은 다음과 같이 측정하였다. RAW264.7 macrophage cell line을 RPMI 1640배지에 2×10^6 cells/ml로 부유시켜 24-well plate에 0.2 ml씩 분주하여, 5 % CO₂ 37 °C에서 24 hr 배양한 후 몇 가지 농도의 다당류를 첨가하여 48 hr 후, 공기 중에서 NO로부터 산화된 nitrite를 Griess반응으로 측정하였다. 즉 100 µl의 배양 상층액에 1 % sulfanilamide(in 30% acetic acid)와 0.1% N-(1-naphthylethylenediamine dihydrochloride (in 60 % acetic acid)혼합액 100 µl을 가하여 실온에 20분간 방치한 후 ELISA reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. In vitro에서의 항암효과 측정

가. MTT방법

암세포에 대한 다당류의 항암성은 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide)방법으로 측정하였다. 암세포주로는 CEM/S (human leukemia carcinoma cells), LB 100-2 (vinblastine-resistant subline of CEM/S), F/S (mouse mammary carcinoma cell) 및 F/M (multidrug-resistant cell of F/S)세포들을 사용하였다.

MTT를 phosphate-buffered saline(PSB, pH 7.4)에 5 mg/ml의 농도로 녹여, 무균적으로 여과하여 4 °C의 어두운 곳에 보관한다. 각 암세포를 1×10^4 cell/ml (RPMI + serum 포함배지)의 밀도로 microtiter plate의 각 well당 200 µl씩 분주하고, 여러 가지 농도의 다당류와 비교하기

위해 항암제의 일종인 bleomycin (BLM)을 투여한 후 5 % CO₂, 37 °C에서 3~4일간 배양한다. 배양중인 microtiter plate의 각 well에서 상층의 배지를 제거한 다음 신선한 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, serum free)배지로 10배 희석한 MTT용액 (0.5 mg/ml)을 각 well에 100 µl씩 첨가한다. 이 때 세포를 함유하지 않은 well에도 MTT 용액을 가한다. 5 % CO₂ 37 °C에서 4 hr 배양한 후 well들의 상층 배지를 제거하고, 100 µl의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 가하여 실온에서 plate shaker로 20분간 흔들어 MTT가 환원되어 형성된 formazan 결정을 녹인 다음, ELISA reader (Bio-Tek Instruments)를 사용하여 570 nm 및 650 nm에서 흡광도를 측정하여, 세포의 viability를 비교하였다.

나. Apoptosis 측정

F/M세포는 RPMI배지에 10 % FBS(fetal bovine serum, GIBCO BRL, Life technologies, Inc.), penicillin(100 units/ml), 및 streptomycin(100 µg/ml)을 첨가하여 5 % CO₂하에서 37 °C에서 배양하였다. 또, FM3A/M세포는 BLM(10µg/ml), WSP(10µg/ml), 그리고 CBP(10µg/ml)에 대하여 24 hr 과 48 hr 처리하여 세포를 수거하였다. 수거한 세포에서 poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) degradation은 Western blot analysis로 측정하였다. 먼저, 수거한 세포는 ice-cold lysis buffer(20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1mM EGTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 20 µM leupeptin, 및 10 µg/ml aprotinin)로 15분 동안 용해시켰다. 세포로부터 추출한 단백질(100 µg)은 8 % SDS-PAGE로 전기영동 한 후, Hybond ECL(Amersham) membrane으로 transfer하였다. Immunoblot은 5 % nonfat dry milk 가 함유된 Tris-buffered saline-Tween(TBS-T, 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1 % Tween 20)으로 4 °C에서 overnight로 blocking하였다. Blocking된 membrane은 Tris buffered saline-Tween (TBS-T)로 3번 세척 한 후 primary antibody(1:1000, PARP(H-250), Santa Cruz Biotech.)를 2 hr 동안 반응시켰다. Primary antibody를 제거한 후 TBS-T로 3번 세척하고 horseradish peroxidase-conjugated anti rabbit secondary antibody(1:2000, Amersham Pharmacia Biotech.)로 1 hr 동안 반응시켰다. Immunoreactivity는 Super Signal chemiluminescent substrate (Pierce Chemical Company)을 이용하여 Molecular Imager System (Bio-Rad, Model GS-525)으로 detection하였다.

다. 시험관 내에서 종양세포 증식억제 효과

실험에 사용된 BALB/c 마우스는 생후 6~8 주령의 수컷을 사용하였다. 한 실험군에는 10마리의 마우스를 사용하였다.

1차년도 실험에서 WSP와 CBP에 의해 가장 저해율이 높았던 항생제 다제내성 세포인 F/M cell을 24 well plate에 1×10⁵/ml씩 분주하고, 3 well씩을 한 실험군으로 하였다. 대조군을 제외한 각 실험군에 *Zoogloea sp.* 균체 다당체인 CBP, WSP를 각각 100 µg/ml, 300 µg/ml, 600 µg/ml 농도로 접종하여 배양하였다. 배양하면서 각 시간대 별로 각 배양 well의 세포를 수거하여

1 ml의 PBS에 부유시킨 다음 trypan blue로 염색하여 살아있는 세포수와 죽은 세포수를 계산하여 세포의 증식과 사멸의 정도를 대조군과 비교 검토하였다.

라. 종양괴 형성 억제능 측정

주령 7주의 C3H mouse (암컷)에 FM3A 세포주 (mouse mammary carcinoma cell, F/S) 및 약제내성 세포주인 F/M 세포를 mouse의 등에 접종하여 암을 형성시키고, CBP 및 WSP를 투여하여 그 효과를 관찰하였다. 즉 C3H mouse를 6 마리씩 5 군으로 나누어 대조군, F/S 접종 CBP 투여군, F/S 접종 WSP 투여군, F/M 접종 CBP 투여군, 및 F/M 접종 WSP 투여군으로 하였으며, RPMI 1640 (supplemented with 10% fetal calf serum)배지에서 배양된 암세포주들을 mouse의 왼쪽 등에는 1×10^5 cells/50 μ l로, 오른쪽 등에는 5×10^5 cells/ μ l을 피하에 접종하였으며, 접종 7일 후부터 CBP 및 WSP (각각 200 μ g/0.1 ml in PBS) 1일 1회 10일간 복강으로 투여하고, 대조군에는 PBS를 동량 투여하여 종양괴의 크기를 캘리퍼로 측정하여 비교하였다

4. 독성 실험

가. 정상세포에 대한 세포독성 실험

CBP와 WSP의 정상세포에 대한 독성을 MTT(3-(4,5-dimethylthiazolyl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide)방법으로 측정하였다. 정상 세포주로는 mouse liver cell과 rat kidney OK cell을 사용하였다. MTT는 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)에 5 mg/ml의 농도로 녹여, 무균적으로 여과하여 4 °C의 어두운 곳에 보관하여 4주 이내의 것을 실험에 사용하였다. 각 세포를 2×10^4 cells/ml (RMPI + serum 포함배지)의 밀도로 96 well plate 의 각 well당 200 μ l씩 분주하여 3~4 hr 배양한 후, 여러 가지 농도의 CBP 및 WSP와 비교군으로 glycogen (rabbit liver Type III)을 투여하여 5 % CO₂, 37 °C에서 3일간 배양한 후 각 well에서 상층의 배지를 제거한 다음 신선한 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, serum free)으로 10배 희석한 MTT용액 (0.5 mg/ml)을 각 well에 100 μ l씩 첨가한다. 이 때 세포를 함유하지 않은 well에도 MTT용액을 가하여 negative control로 사용하였다. 5 % CO₂, 37 °C에서 4 hr 반응시킨 후, 상층액을 제거하고 각 well에 100 μ l의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 가하여 실온에서 plate shaker로 20분간 흔들어 MTT가 환원되어 형성된 formazan 결정을 녹인 후, ELISA reader(Bio-Tek Instruments)를 사용하여 570 nm 및 650 nm에서 흡광도를 측정하여, 세포의 생존률(cell viability)을 비교하였다.

나. 급성독성 실험

독성시험에 적당한 실험동물로서 현재 급성독성시험에 가장 널리 사용되고 있는 마우스를 선택하여 실험을 실시하였다. 급성독성검사에 사용된 실험동물은 BALB/c 계통의 수컷 마우스

를 특정병원균이 부재된 것으로 한국화학연구소 안전성연구센터 실험동물육종실에서 구입하여 실험에 사용하였다. 동물입수 후 외관을 육안으로 검사하고, 실험을 실시하는 동물사육실에서 7일간 순화시킨 후 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 사용하였다.

동물사육실의 환경조건은 실내온도 22 ± 3 °C, 상대습도 55 ± 15 %, 12 hr (오전 8시~오후 8시) 주기로 명암을 조절하였고, 고형사료와 수분을 충분히 공급하였다. 실험기간 중 사육실 온·습도는 자동 온·습도측정기로 매 시간마다 측정하였으며, 실험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동사항은 발견되지 않았다.

실험동물의 입수 시 마우스는 3주령이었고, 이 때 체중은 각각 평균 16.9~18.2 g이었다. 투여 개시 시 실험동물은 4주령이었고, 체중은 21.2~22.4 g이었다. 예비실험의 경우, 투여 개시 시 동물 수는 각각 10마리였고, 본 실험의 경우는 각각 25마리씩 3군으로 나누어 PBS (phosphate buffered saline, 대조군), PBS에 녹인 WSP 투여군, PBS에 녹인 CBP 투여군으로 실험을 실시하였다.

급성독성검사에 사용된 예비시험 한계용량인 200 mg/100g body weight를 기준으로 1000 mg씩 늘려 300, 400, 500, 600, 700 mg/100g body weight까지 투여하여 사망을 일으키는 용량 수준을 확인하였다. 투여 전날 하룻밤을 절식 시킨 후 일회용 주사기를 이용하여 투여 당일 오전에 개체별로 단회 복강 투여하였다. 복강투여 후 6 hr까지는 한 시간 간격으로, 14일까지는 매일 1회 이상 일반증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였다. 실험종료 후 생존동물을 에테르로 마취시키고 개복하여 방혈 치사시킨 후 육안으로 모든 내부 장기를 관찰하였고, 채취한 혈액은 혈액분석기로 대조군과 투여량에 따른 차이를 비교·분석하였다. 혈액의 생화학적 검사는 BUN(Blood Urine Nitrogen), Blood glucose, Serum protein, serum albumin, total cholesterol, Triglyceride 항목으로 분석하였다.

다. 만성독성 실험

주령 8주의 20 g 전후의 BALB/c mouse를 10마리씩 3군으로 나누어 PBS(대조군), PBS에 녹인 CBP(5 mg/ml)와 WSP(5 mg/ml)를 500 mg/Kg 농도로 2주간 1일 1회 복강내에 주사하고, 9주간 이상여부를 관찰하고 체중 변화를 측정하였다.

5. 면역반응 조절효과 측정

가. 비장세포 및 대식세포 분리

실험동물로는 6~7 주령의 ICR mouse 수컷을 부산대 의대 동물사육실의 표준조건에서 사육하여 실험에 사용하였다. Mouse를 3군으로 나누어 CBP 및 WSP를 PBS에 녹여 5 mg/ml 씩을 5번 복강에 주사하여 마지막 주사 후 그 다음날(투여 후 9일째) 실험에 사용하였으며, PBS만 투여한 것을 대조군으로 하였다. Mouse로부터 비장을 적출하여 비장세포를 분리하여 RPMI 1640완전배지에 부유시켜, 비장세포의 증식능 및 cytokine생산의 측정에 사용하였으며,

대식세포는 동일하게 처리된 mouse의 복강으로부터 분리하였으며, 그 활성화는 nitric oxide (NO) 생산량으로 측정하였다.

나. 비장세포 증식의 측정

세포증식에 대한 CBP 및 WSP의 영향은 ^3H -thymidine incorporation 방법으로 측정하였다. 각 세포를 96 well culture plate의 각 well에 $0.2\text{ ml}(1\times 10^6\text{ cells/ml in RPMI 1640 medium supplemented with 10 \% fetal bovine serum, glutamine and 2-mercaptoethanol})$ 씩을 분주하고, B lymphocyte 증식유도물질인 lipopolysaccharide(LPS) 또는 T lymphocyte 증식유도물질인 concanavalin A(Con A)를 최종농도 $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ 로 첨가하여 $5\% \text{ CO}_2$, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 에서 72 hr 배양하였으며, ^3H -thymidine(89 Ci/nmol , Amersham Biosciences, UK) pulse는 각 well에 배양종료 18 hr 전에 $1\text{ }\mu\text{Ci/well}$ 의 ^3H -thymidine을 가하여 실시하고, 세포의 thymidine incorporation의 측정은 자동 cell harvester (Inotech, Dottikon, Switzerland)로 세포를 수확한 후 Microbeta scintillation counter (Wallac, Turku, Finland)로 하였다.

다. NO 측정

대식세포에 의한 nitric oxide 생산은 Griess반응을 이용하여 배양액에 축적된 nitrite를 측정하였다. 복강에서 분리한 대식세포를 RPMI 1640배지에 $1\times 10^6\text{ cells/ml}$ 로 부유시켜, 24 well plate에 0.2 ml 씩 분주하여 200 ng/ml 의 LPS를 첨가하고 $5\% \text{ CO}_2$, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 에서 24 hr 배양한 후 $50\text{ }\mu\text{l}$ 의 배양 상층액에 동량의 Griess 반응액 ($1\% \text{ sulfanilamide in } 2.5\% \text{ H}_3\text{PO}_4$ 와 $0.1\% \text{ N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride in } 2.5\% \text{ H}_3\text{PO}_4$ 의 혼합액)을 가하여 실온에서 10 분간 반응시킨 후 SLT-spectra reader(SLT Lab Instruments, Austria)로 540 nm 에서 흡광도를 측정하였으며, nitrite농도는 sodium nitrite standard curve로부터 구하였다.

라. Cytokine 측정

CBP 또는 WSP가 투여된 mouse로부터 분리된 비장세포를 RPMI 1640 배지에 $1\times 10^6\text{ cells/ml}$ 로 부유시켜, phorbol-myristate acetate (PMA, 50 ng/ml) 및 ionomycin($1\text{ }\mu\text{M}$)을 가하고 4 hr 후 비특이적 결합을 억제하기 위하여 normal goat serum을 10% 로 첨가하여 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 에서 15 분간 방치 후 PBS로 washing한 다음 fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated CD3 antibody ($1\text{ }\mu\text{g}/1\times 10^6\text{ cells}$)로 처리하여 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 에서 15 분간 방치한다. Isotype-matched Ig로 염색된 세포들을 negative control로 사용하였다. 고정된 세포들은 제조회사 (PharMingen, San Diego, USA)의 방법에 따라 Cytotfix/Cytoperm kit로 permeation하였으며, 세포내의 interferon (IFN)- γ 는 fluorescein R-phycoerythrin (PE)-conjugated antibodies(in permeation buffer)로 염색하였다. 세포들은 CellQuest program에 따라 FACScalibur flow cytometer (Becton Dickenson, San Jose, USA)로 분석하였다.

6. *Zoogloea* sp. KCCM 10036 균주 유래 다당류의 항균활성검사

CBP와 WSP를 phosphate-buffered saline에 녹여(5 mg/ml), autoclave하여 Mueller Hinton broth에 2배 계단 희석법으로 희석한 후 일정량의 균을 접종하여 37 °C에서 24 hr 배양하였다. 실험에 사용한 균의 발육 유무는 고체배지에 접종하여 37 °C에서 24~48 hr 배양하여 확인하였다. 균주로는 *E. coli*, *Methicillin resistant Staphylococcus aureus*(MRSA) 및 *Pseudomonas aeruginosa*를 사용하였으며, 항균능을 비교하기 위한 항균제로는 gentamycin sulfate와 methi-cillin을 사용하였다.

7. 항산화 작용의 측정

항산화작용은 활성산소와 ONOO⁻의 제거능으로 측정하였다. 활성산소 제거능은 DCFDA 분석법으로 측정하였으며, ONOO⁻ 제거능은 Kooy등의 방법으로 측정하였다.

가. 실험동물의 사육 및 식이

실험동물로는 BALB/c 계통의 수컷 마우스를 10일간 적응시킨 후 평균체중 16.9~18.2 g인 것을 난괴법에 의해 정상군과 투여군으로 나누어 6주간 사육하였다. 사육기간 동안 정제된 다당을 첨가하여 제조한 사료를 체중 kg당 30 mg을 8일 동안 1일 1회씩 구강 투여한 후 대조군과 비교 검토하였다.

나. 장기채취

6주간 사육한 마우스를 장기 채취전 12 hr 동안 물만 주고 절식 시킨 후 에테르로 가볍게 마취하여 개복하고 간조직을 적출하였다. 간을 적출하여 0.89 % 생리 식염수로 간조직 내의 혈액을 제거한 후 -70 °C에 냉동보관하였다. 혈청의 분리는 3000 rpm에서 20 분간 원심분리한 후 실험 전 까지 냉동보관하였다.

다. 간 조직 중의 glutathione과 지질 과산화물 함량 측정

Glutathione의 함량 측정은 Bernt와 Bergmey의 방법에 따라서 측정하였다. 산화형 glutathione은 glutathione reductase반응을 이용하였고, 이 반응에서 소모된 NADPH량을 340 nm에서 측정하여 정량하였으며, 환원형 glutathione은 glyoxalase 반응을 이용하여 생성된 S-lactiosyl-GSH를 240 nm에서 측정하여 정량하였다.

라. 간 조직 중의 지질 과산화물 함량 측정

지질과산화 측정은 thiobarbituric acid (TBA)와 반응하여 생성되는 malondialdehyde를 측정하는 Satoh법을 이용하였다.

제 2 절 연구 결과

▣ 제1세부과제 : *Zoogloea* sp. 유래 heteropolysaccharides의 대량생산 기술 및 고 품질 수산연제품 생산을 위한 응용기술개발

1. 다당생산을 위한 최적배양조건

가. 탄소원의 영향

다당생산과 관련된 탄소원의 영향을 살펴보기 위하여 기본배지에 glucose 대신 maltose, lactose, fructose, sucrose를 각각 10 g/L의 농도로 첨가하고 250 ml flask, 180 rpm, 30 °C에서 132 hr 배양하여 두가지 종류의 다당생산능을 검토하였다(Fig. 5). 탄소원을 전혀 첨가하지 않은 것을 대조군으로 하여 살펴본 결과, WSP의 생산량은 glucose, sucrose, lactose 순으로 많이 생산되었고 (3.5 g, 3.2 g, 3.1 g/L), CBP는 sucrose, glucose, lactose 순으로 (2.8 g, 2.7 g, 2.6 g/L) 많이 생산되는 것으로 나타났다. 두 당류의 최대 생산 탄소원은 조금 차이가 있으나 glucose와 sucrose, lactose 첨가군의 총 다당 생산량은 각각 6.2 g, 6.0 g, 5.7 g/L인 것으로 나타났다. 이러한 결과는 WSP와 CBP로 유도되는 과정 중에 각각 전구물질 종류에 따라 유도되어 생산되는 다당의 조성비와 조성비가 달라질 수 있음을 나타내며, 또한 두 가지 다른 다당의 차별생산을 가능케 하는 결과이다. 또한 fructose와 maltose의 경우, 균 성장 면에서는 가장 뛰어났으나, 다당생산능은 낮은 것으로 나타났다.

따라서 최적 탄소원으로 glucose를 선정하였으며, glucose의 최적농도를 선정하기 위해 농도를 1, 3, 5, 7, 9 %(w/v)로 달리하여 균성장 및 다당생산을 검토하였다(Fig. 6). 그 결과, glucose의 농도가 증가됨에 따라 다당생산은 비례적으로 증가되었으나, 7 %(w/v) 이후 균 성장 저해현상이 나타났는데 이는 기질농도 증대로 인해 배지상에서 삼투압이 증가하여 균 성장에 영향을 미치는 것으로 사료되는 결과이며, 균성장이 저해됨으로 다당생산량도 감소되는 경향이 나타났다. 따라서 최대 다당생산 탄소원의 농도는 glucose 5 %(w/v)로 선정하였으며 이때 다당생산량은 2배 가량 증가하였다.

나. 질소원의 영향

다당생산에 영향을 주는 질소원을 알아보기 위하여 유기 질소원으로 tryptone, yeast extract, meat extract, peptone, 무기질소원으로 NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{Mg}(\text{NH}_3)_2$, NaNO_3 , KNO_3 등을 첨가하여 균을 배양하며 당 생산능을 검토하였다. 그 결과, 유기질소원을 첨가하지 않고 무기질소만을 첨가한 실험군에서는 균 성장 및 다당생산이 전혀 발생하지 않았으며, 유기질소원을 첨가하여야만 균 성장과 당 생산이 관찰되었다(Fig. 7).

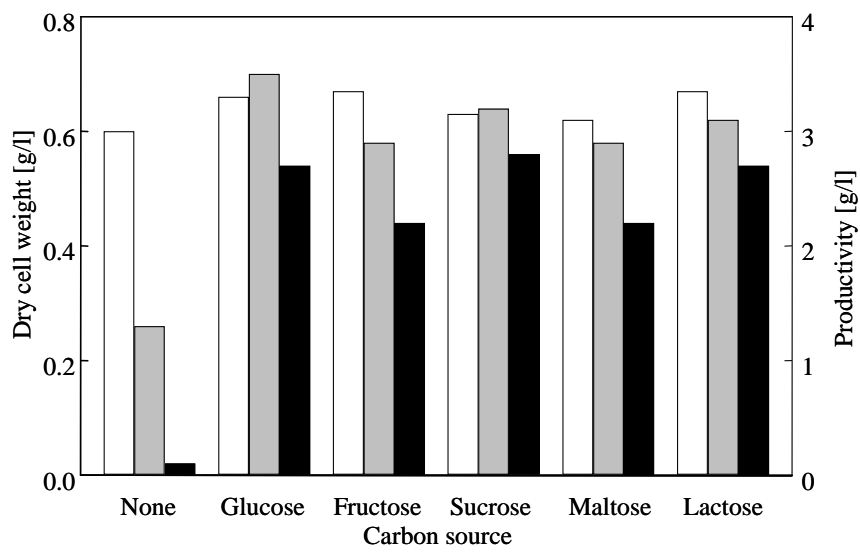


Fig. 5. Amounts of polysaccharide recovered from the culture supernatant and cell after grown in media containing different carbon sources.

□ Dry cell weight ■ WSP ■ CBP

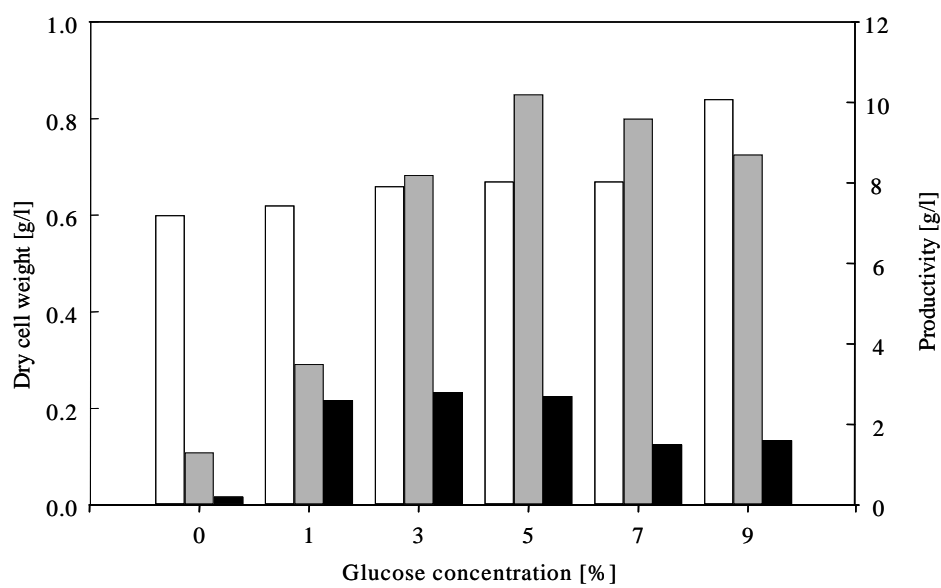


Fig. 6. Influence of addition of increasing concentrations of glucose on the polysaccharide productions and cell growth.

□ Dry cell weight ■ WSP ■ CBP

균체성장은 tryptone, yeast extract, meat extract, peptone이 각각 균체량 0.69, 0.72, 0.74, 0.65 g/L로 균일하게 진행되었으나 당 생산은 조금씩 차별현상이 나타났다. WSP는 각각 3.8, 3.4, 2.2, 4.4 g/L로 생산되었으나, CBP는 peptone을 제외한 실험군에서 모두 0.5 g/L이하의 수치가 나왔으므로 최적 질소원으로 peptone으로 선정하였다. Peptone의 농도별로 최고 당생산 정도를 살펴본 결과, 0.5 %(w/v) 농도에서 가장 많은 양의 당(9.0 g/L)을 생산하는 것으로 나타났다.

다. NaCl의 영향

기본배지인 ASW성분중 NaCl의 농도가 균 성장 및 다당생산에 미치는 영향을 조사한 결과를 Fig. 8.에 나타내었다. 본 실험에 사용된 *Zoogloea* sp. 경우 NaCl이 첨가되지 않는 담수조건에서는 거의 성장하지 못하고 다당도 생산되지 않았으나, 1.0 %(w/v) 농도만 첨가하여도 급격한 성장과 다당생산이 관찰되었으며 일반해수 NaCl 농도와 비슷한 2.0 %(w/v)에서 DCW 6.4 g/L, WSP 4.8 g/L, CBP 4.0 g/L로 최대 생산량이 관찰되었다.

이러한 결과로 미루어 *Zoogloea* sp.가 해양세균의 특성이 있음을 알 수 있었고, 육상에서 유입된 균주라 하더라도 해양조건에 적응되었다고 판단할 수 있었다.

라. 무기염류의 영향

기본배지내에 미량으로 첨가되는 무기염류중 K_2HPO_4 , Na_2SO_4 , $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 를 농도별로 첨가하여 그 영향을 살펴보았다. K_2HPO_4 첨가배지에서 WSP 생산능은 10~100 μM 에서 유사한 결과를 나타낸 반면, CBP 경우 100 μM 농도에서 최대치를 나타내며 그 이상의 농도에서는 감소함에 따라 최적농도를 100 μM 로 선정하였다. 이때 다당 생산능이 WSP 4.7 g/L, CBP 3.7 g/L로 총 다당 생산량은 8.4 g/L로 최대치를 나타내었다(Fig. 9).

Na_2SO_4 를 첨가한 경우 0.6 %(w/v)까지 점차 증가하던 다당 생산량이 CBP는 0.8 %(w/v)부터 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 10). 0.6 %(w/v)에서는 WSP 0.5 g/L, CBP 4.4g/L, 0.8 %(w/v)에서는 WSP 5.4 g/L, CBP 4.2 g/L으로 총 다당 생산 조건은 0.8 % (w/v) (9.6 g/L)로 선정하였다.

$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 의 첨가에 대한 영향을 살펴본 결과(Fig. 11), 첨가하지 않은 대조군과 0.3-1.5 % (w/v)으로 첨가한 실험군에서 모두 고르게 균성장 및 당 생산이 나타났다. Mg^{2+} 이온이 본 균주에는 영향을 미치지 않는다는 결과이다.

그러므로 미량으로 첨가되는 ASW 성분중 K_2HPO_4 100 μM , Na_2SO_4 0.8 %(w/v), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 는 무첨가를 최적조건으로 선정하였다.

마. Tris base의 영향

인공해수에서 pH 조절역할을 하는 Tris의 첨가가 다당 생산에 미치는 영향을 Fig. 12.에 나타내었다. Tris base 첨가군과 첨가하지 않은 군으로 나누어 조사한 결과, 두 실험군의 다당

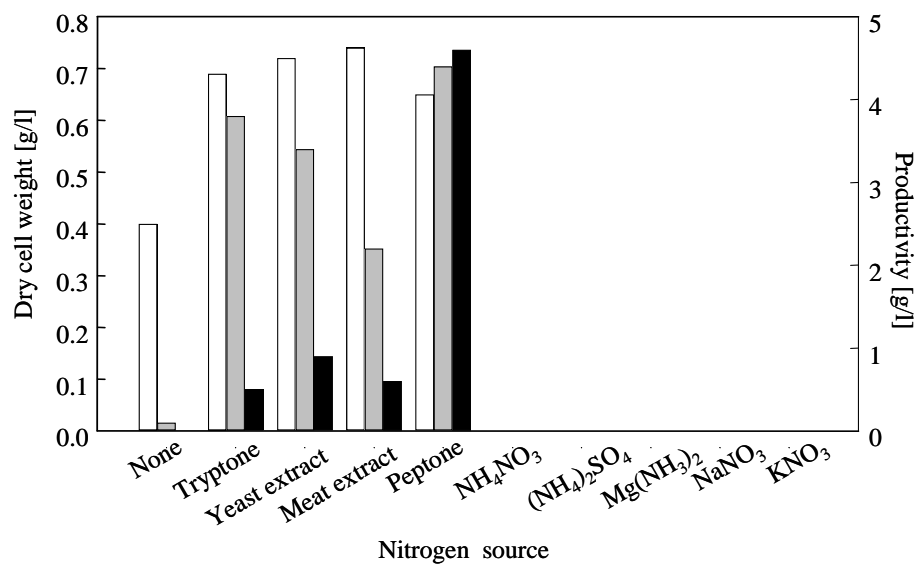


Fig. 7. Influence of organic and inorganic nitrogen sources on the cell growth and polysaccharide production.

□ Dry cell weight ■ WSP ■ CBP

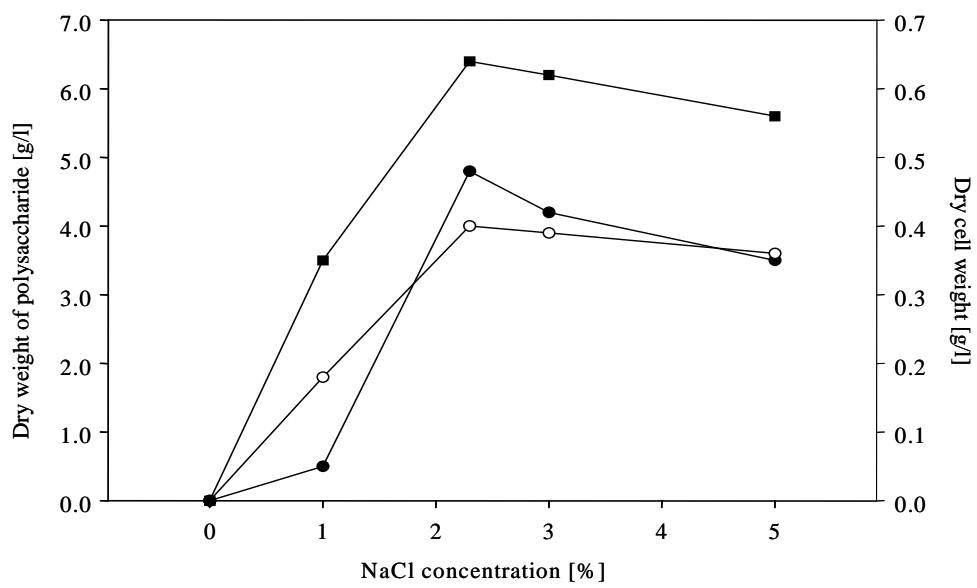


Fig. 8. Influence of increasing concentration of NaCl on cell growth and polysaccharide production.

- Dry weight of WSP
- Dry weight of CBP
- Dry cell weight

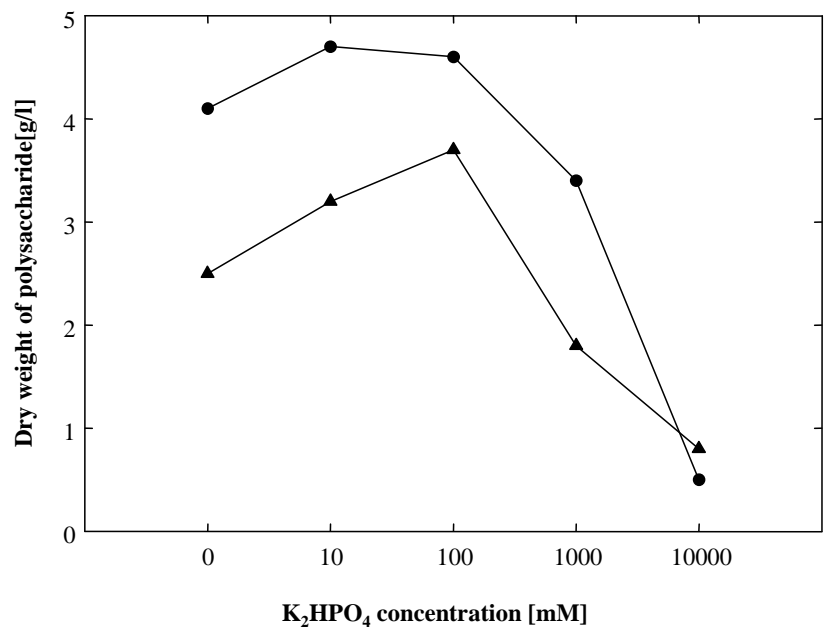


Fig. 9. Influence of increasing concentration of K₂HPO₄ on polysaccharide production.

- Dry weight of WSP
- ▲— Dry weight of CBP

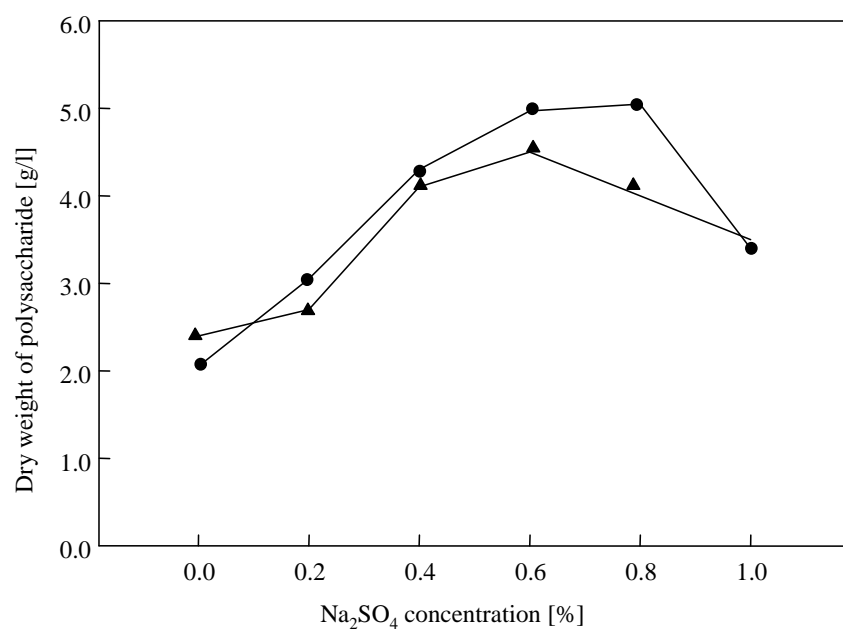


Fig. 10. Influence of increasing concentration of Na₂SO₄ on polysaccharide production

● Dry weight of WSP
▲ Dry weight of CBP

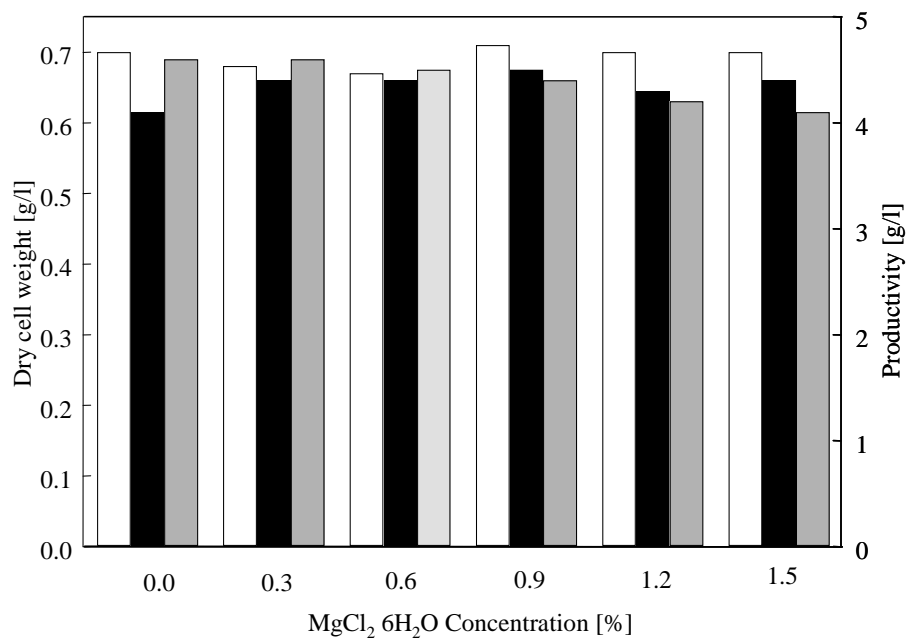


Fig. 11. Influence of increasing concentration of MgCl₂·6H₂O on the cell growth and polysaccharide production.

□ Dry cell weight (g/l) ■ WSP (g/l) ■ CBP (g/l)

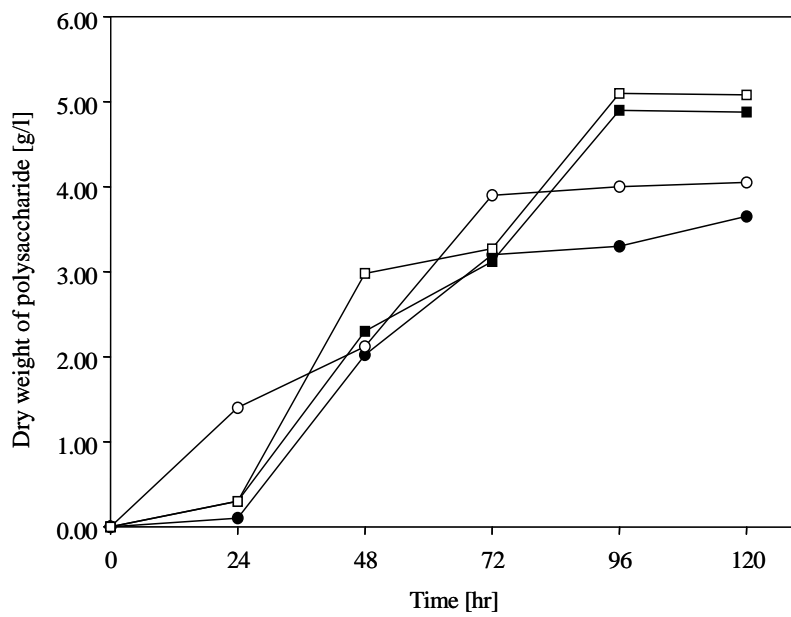


Fig. 12. Influence of Tris on polysaccharide productions.

Without Tris	With 0.6% Tris
○ Dry weight of WSP	● Dry weight of WSP
□ Dry weight of CBP	■ Dry weight of CBP

량이 유사한 것으로 나타났다. 그러나, flask level이 아닌 fermentation 조건에서는 Tris를 첨가하지 않고 배양을 실시하면 pH 변화가 급격하게 일어나므로 그대로 첨가하여 본 배양을 실시하였다.

바. 배지의 초기 pH 영향

앞선 실험에서 정해진 배지 성분을 모두 넣고, 최종적으로 pH를 2~12까지 다양하게 조절된 후 균을 배양하며 다당 생산에 가장 효율적인 pH를 조사하였다. 중석영역에서 생육하는 균이 극 산성이나 극 염기성 조건에서는 거의 성장하지 않는 일반 미생물과 달리 본 균주 *Zoolgoea* sp.(KCCM10036)은 pH 2~10의 넓은 영역에서 잘 성장하는 것으로 나타났다(Fig. 13). pH 7.8~8을 중심으로 염기성 쪽으로 급격하고 산성 쪽으로 완만한 형태의 종모양의 균성장을 보였으며 다당 생산도 이에 비례하고 pH 7.8에서 WSP 11.2 g/L, CBP 4.3 g/L로 가장 높게 나타나 pH 7.8을 최적 조건으로 선정하였다.

사. 배양 온도의 영향

온도에 따른 다당 생산량을 조사한 결과, 20 °C와 37 °C에서는 거의 성장하지 않았으며 30 °C에서 균성장과 다당 생산이 모두 가장 높게 나타났다(Fig. 14).

아. 발효조에서의 배양

이러한 결과치에서 탄소원으로 glucose 5 %(w/v), 질소원으로 peptone 0.5 %(w/v), NaCl 2.0 %(w/v), K₂HPO₄ 100 μM, Na₂SO₄ 0.8 %(w/v), pH 7.8, 30 °C가 최적 배양조건으로 선정되었다. 이 조건에서 발효조 배양을 실시하며 배양 시간별로 균 생산량, 다당 생산량, 배지의 viscosity 등을 조사하였다(Fig. 15).

균 성장은 배양 개시 24 hr 경과 후 stationary phase에 도달하였으며 지속적으로 건조균체량 6 g/L 정도의 수준을 유지하는 것으로 나타났다. 균성장이 stationary phase에 도달한 직후부터 WSP가 생산되기 시작하였으며 배양 48 hr 후부터 CBP도 서서히 생산되는 것으로 나타났다. 탄소원으로 첨가된 glucose는 96 hr 후 완전히 고갈되었으며, 120 hr 경과 후부터 WSP와 CBP 생산량은 빠른 속도로 증가되었다. Polysaccharides가 생산될 때 배양액의 점도도 비례하여 증가하였으며 132 hr 경과시 점도 2,700 cp였다. WSP, CBP 생산량은 5.1 g/L, 4.3 g/L로 polysaccharide가 총 9.4 g/L 생산되는 것으로 나타났다.

배지의 pH는 7~8로 일정하게 유지되었으며, 배양 156 hr 경과 후에는 생산이 감소하기 시작하고 배양액의 점도도 2,500 cp로 조금 감소하는 경향이 나타나 배양을 종료하였다.

2. 다당의 분리 · 정제

Fig. 1에 나타난 모식도의 방법으로 CBP와 WSP를 분리하고 Sepharose CL-4B column을

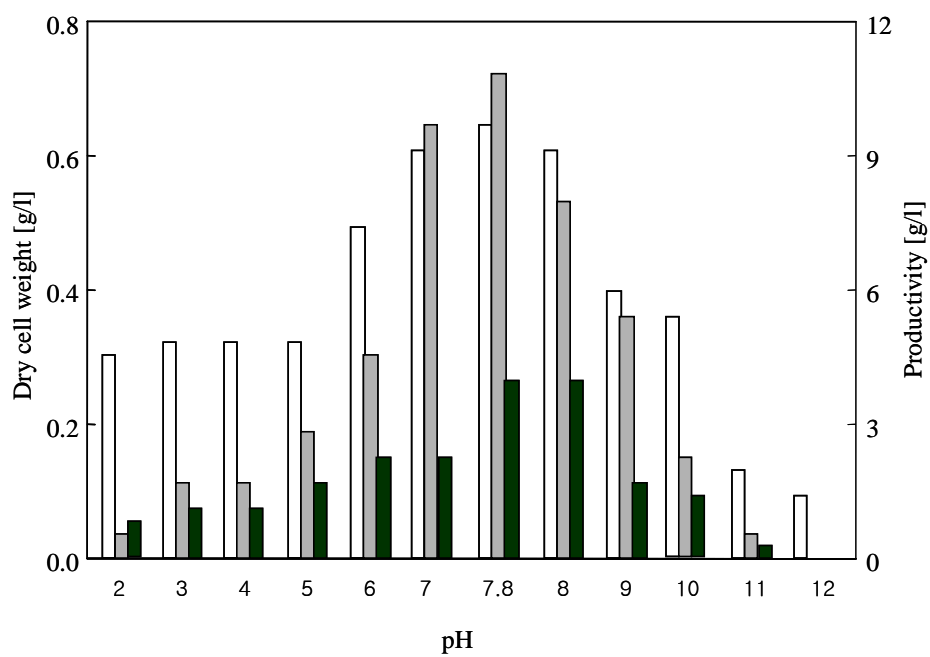


Fig. 13. Effect of initial pH on the cell growth and polysaccharides production.

□ Dry cell weight ■ WSP ■ CBP

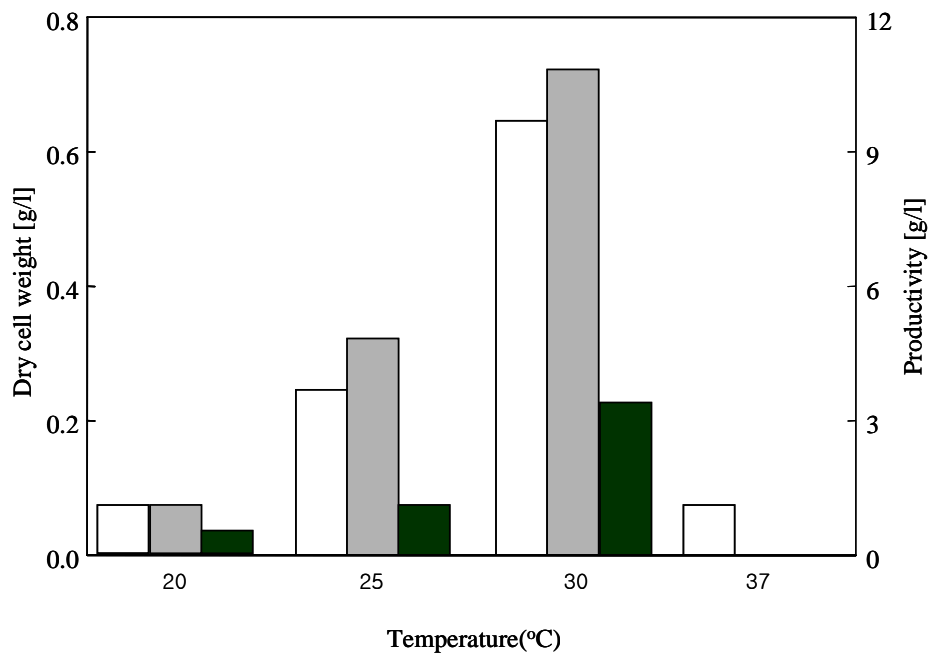


Fig. 14. Effect of the temperature on the cell growth and polysaccharides production.

Dry cell weight
 WSP
 CBP

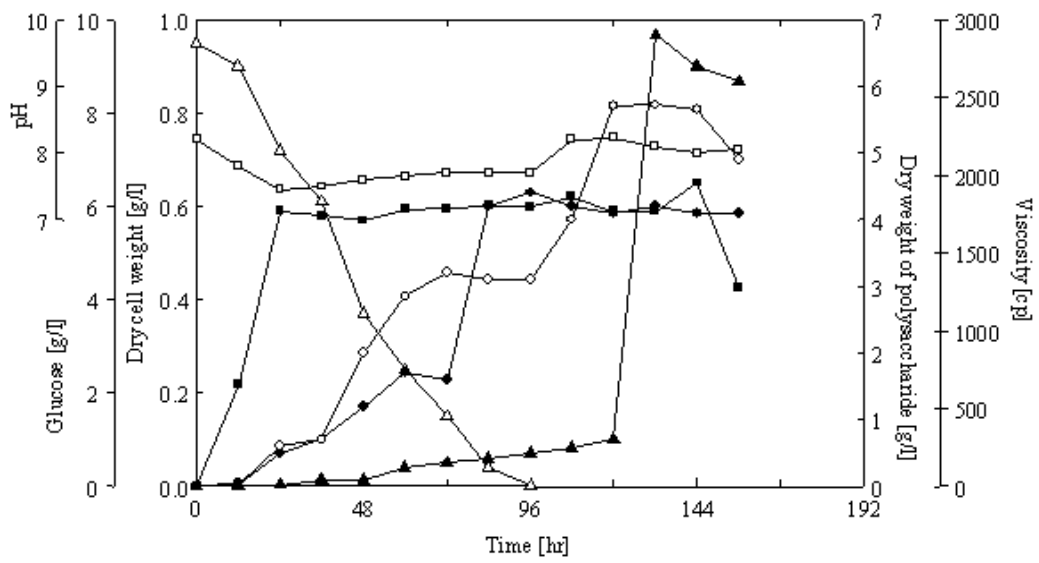


Fig. 15. The growth curve and polysaccharide production of isolated *Zoogloea* sp. KCCM10036 on the glucose containing medium.

- Dry cell weight
- Dry weight of WSP
- ▲ Dry weight of CBP
- pH
- Concentration of Glucose
- △ Apparent viscosity

이용하여 정제하였다. 정제된 WSP와 CBP는 GPC를 이용하여 분자량을 측정하고 FT-IR 분석을 실시하였다.

Zoogloea sp. 유래 다당의 평균 분자량을 조사한 결과 WSP, CBP가 각각 4.07×10^6 , 3.43×10^6 였으며 이러한 결과는 지금까지 보고된 세균 유래 다당류 중에 높은 분자량에 속하는 것으로 나타났다(Fig. 16, 17). 또한 생산되어 정제된 다당의 결합양식 또는 구성성분을 추정하기 위해 정제 다당류의 적외선 흡수 spectrum을 조사한 결과를 Fig. 18 (WSP), Fig. 19 (CBP)에 각각 나타내었다. 당류 및 단백질에 특이적으로 나타나는 3400 cm^{-1} 에서의 강한 흡수가 나타났으며 $2880\text{-}2980 \text{ cm}^{-1}$ 부근의 C-H stretching을 1400 cm^{-1} 와 1600 cm^{-1} 부근에서는 carboxyl기의 흡수가 관찰되었다. 또한 finger printer region중 $800\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$ 에서의 낮은 peak는 다당류내 β -glucosidic 결합이 함유되어 있는 것으로 사료되는 결과이다. 또한 다당수율은 GPC결과를 검토하였을 때 다른 분자량을 가진 물질이 검출되지 않고 dispersion정도가 낮음에 따라 물질의 순도가 높은 다당을 얻을 수 있었다.

3. 수율의 조사

발효조에서 균을 배양하며 그 수율을 조사하였다(Fig. 20). 교반속도 400 rpm, 공기 통기량 2 vvm, 접종량 10 %의 조건으로 batch culture를 실시한 결과, 균체의 최대성장 시간은 36~48 hr로 나타났으므로 이 시간에서의 productivity와 substrate와의 상관관계를 조사하였다. 비성장 속도 μ_{max} 는 0.036 h^{-1} 로 나타났고, 균체당 다당 생산율 $Y_{P/X} = 0.489/\text{h}$, 기질당 균체 생산율 $Y_{X/S} = 0.048/\text{h}$, 기질당 다당 전환율 $Y_{P/S} = 0.281/\text{h}$ 로 계산 되었다.

이러한 결과를 바탕으로 2차년도에는 본격적으로 발효조를 이용한 다당 생산을 시도할 계획이다.

4. 유용 polysaccharide의 물성조사 - 유동학적 특성

분리 정제된 다당류를 식품첨가물로 사용하기 위한 기초단계로 다음과 같은 유동학적 특성을 살펴보았다.

가. WSP와 CBP의 농도별 겔보기 점도

겔보기점도는 생물고분자의 형태, 크기와 모양, 분자량, 용매와 다당류의 상호작용, overlap parameter에 좋은 지표를 제공하며, 묽은 용액에서 개개의 다당류가 차지하는 hydrodynamic volume으로도 표현된다. 그러므로, 최적배양에 의해 생산된 WSP와 CBP를 분리한 후, 각각의 수용액 점도를 농도별로 조사하였다.

WSP와 CBP의 겔보기 점도는 농도 의존적으로 증가하였으며, WSP 수용액의 경우, CBP 수용액보다 높은 겔보기 점도를 나타내었다(Fig. 21).

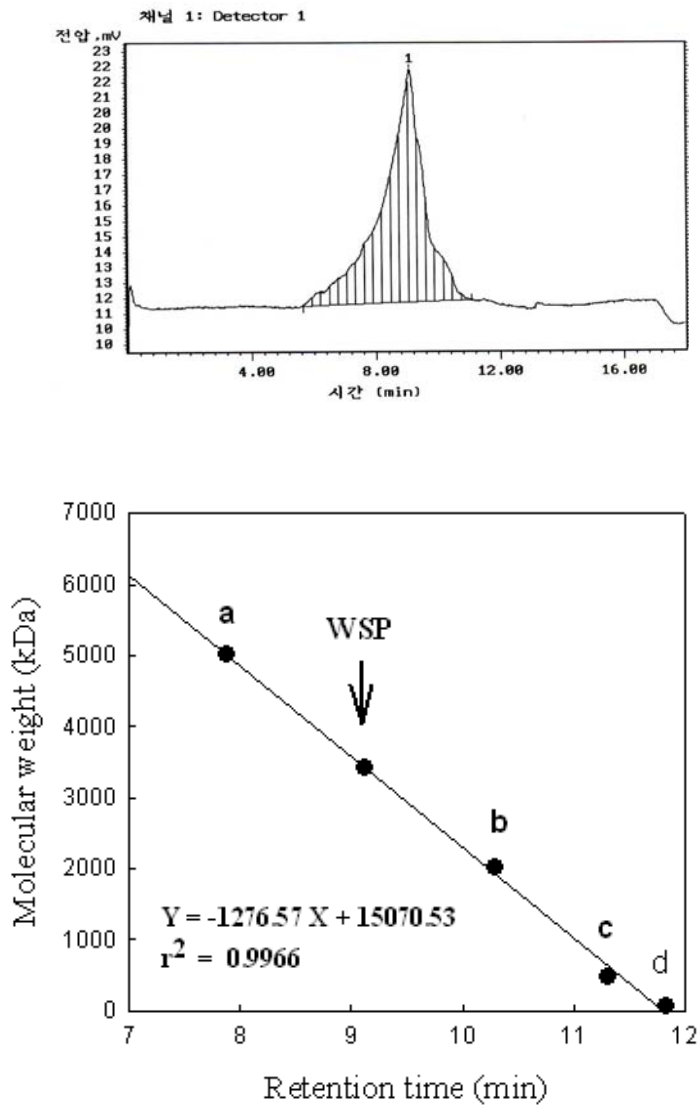


Fig. 16. Estimation of molecular weight of water soluble polysaccharide by gel permeation chromatography.

Standard a: Dextran ($M_w, 5 \times 10^6$), b: Dextran ($M_w, 2 \times 10^6$), c:

Dextran ($M_w, 4.64 \times 10^5$), d: Dextran ($M_w, 7.14 \times 10^4$)

Flow rate: 1.0 ml/min, 40 °C

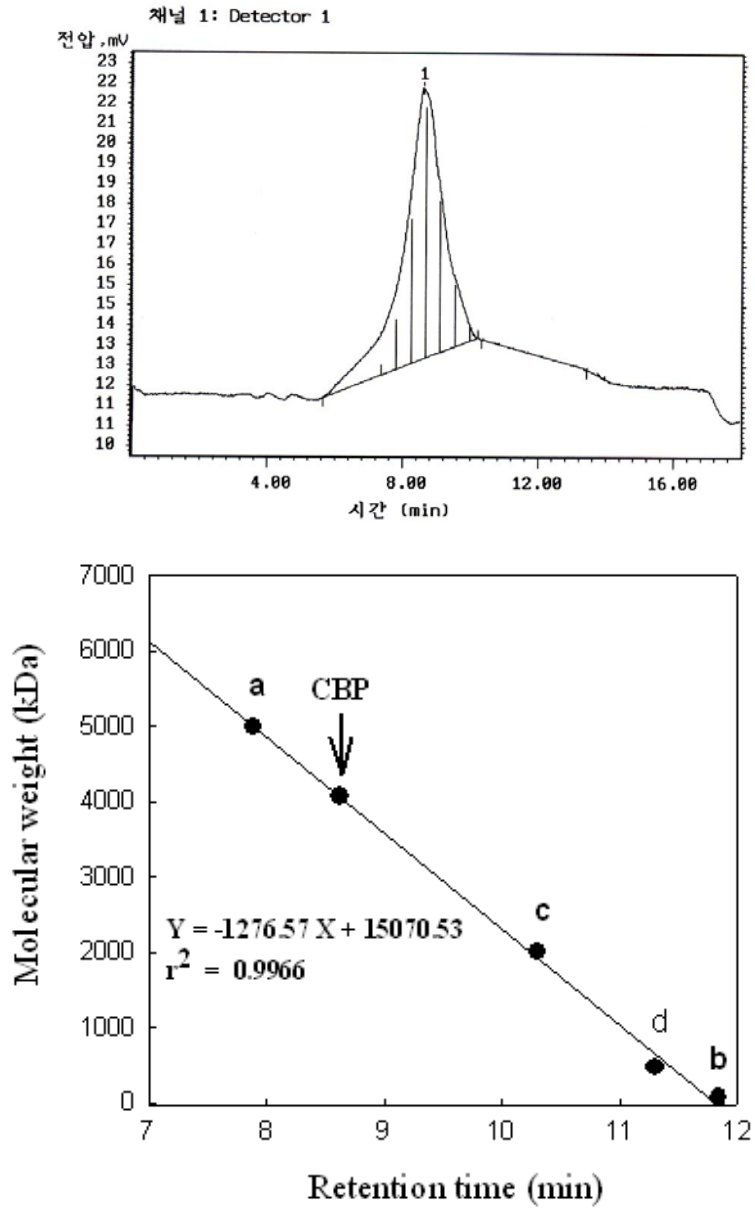


Fig. 17. Estimation of molecular weight of cell bound polysaccharid by gel permeation chromatography. Standard a: Dextran(Mw, 5×10^6), b: Dextran (Mw, 2×10^6), c: Dextran (Mw, 4.64×10^5), d: Dextran (Mw, 7.14×10^4) Flow rate: 1.0 ml/min, 40°C

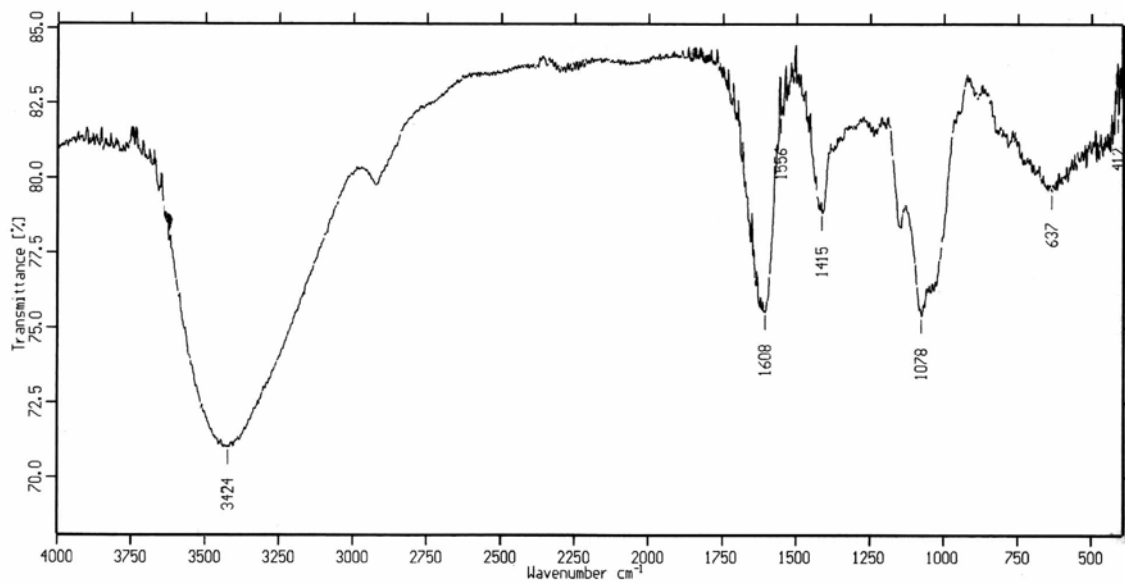


Fig. 18. Infra-red absorption spectrum of the isolated water soluble polysaccharide with KBr pellet.

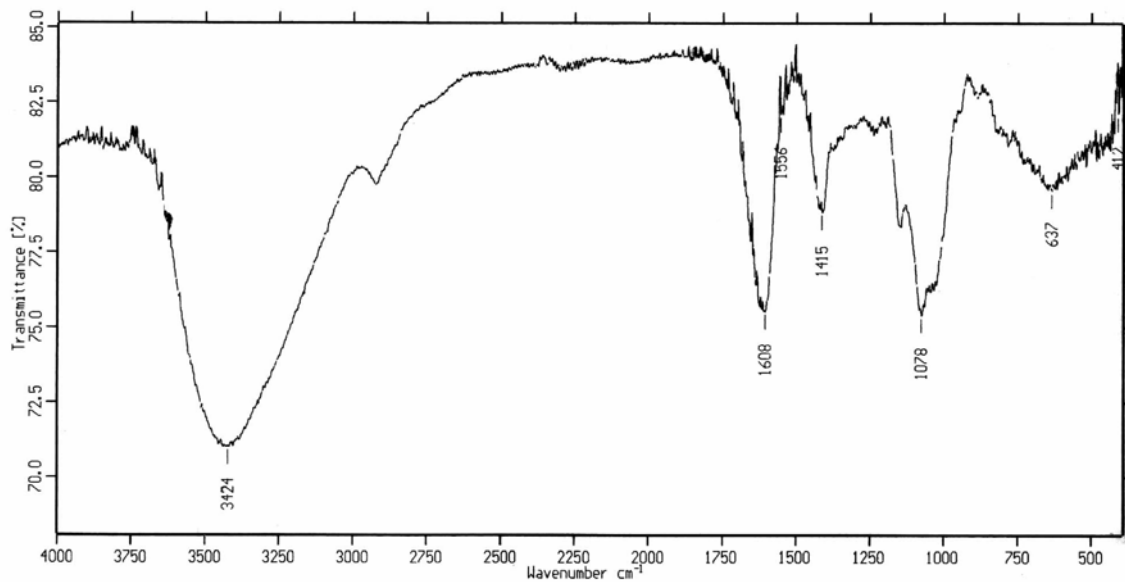


Fig. 19. Infra-red absorption spectrum of the isolated cell bound polysaccharide with KBr pellet.

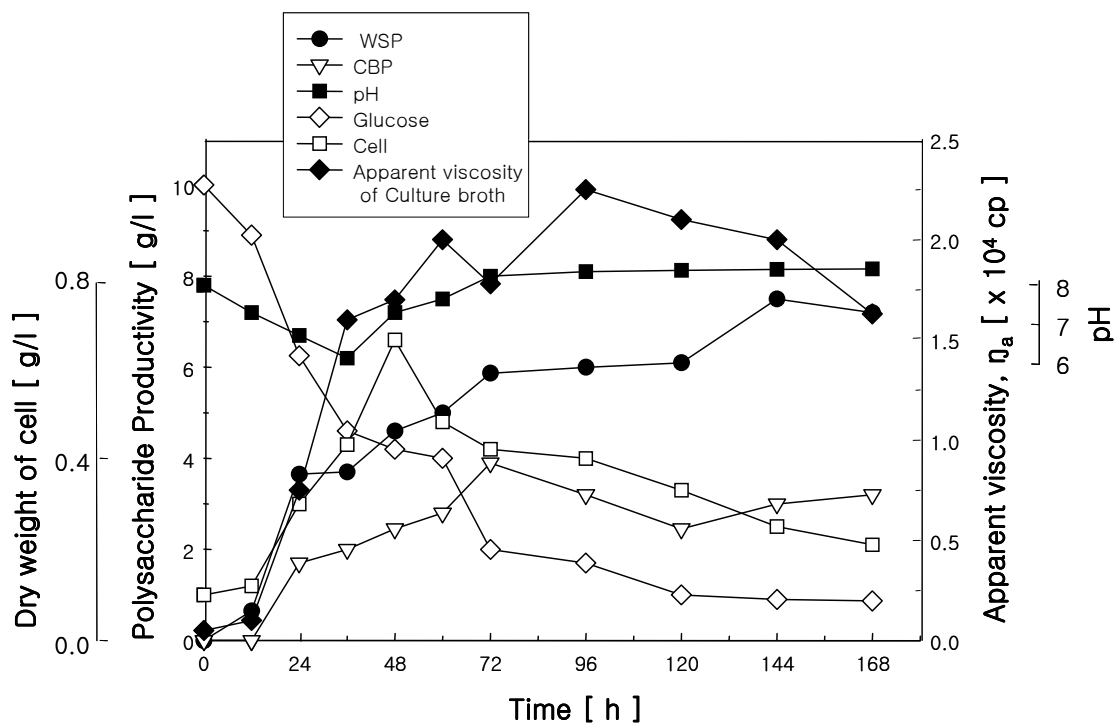


Fig. 20. Time course on the polysaccharide produced by marine bacterium *Zoogloea* sp. under the optimized fermentation condition. (400rpm, 2vvm, Inoculum size 10%)

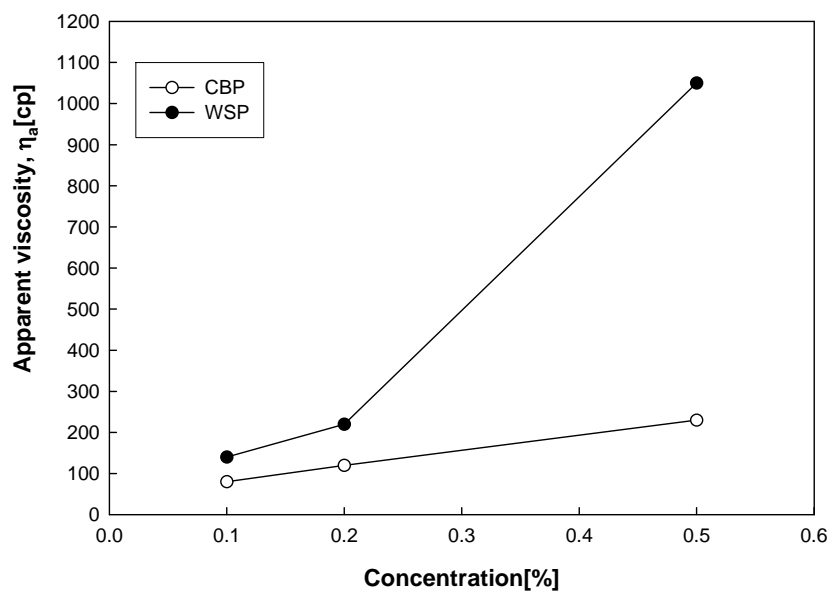


Fig. 21. Effect of concentration on the apparent viscosity of WSP and CBP solutions.

나. 전단속도에 대한 겔보기 점도의 변화

WSP와 CBP의 겔보기 점도를 전단속도별로 측정한 결과, 각 용액의 겔보기 점도는 전단속도가 증가함에 따라 선형적으로 감소하는 경향을 보였다(Fig. 22, 23).

다. 전단속도에 대한 전단응력의 변화

서로 다른 농도의 WSP 및 CBP 수용액을 30 °C에서 전단속도와 전단응력과의 관계를 나타내었다(Fig. 24). WSP와 CBP는 전단속도가 증가함에 따라 전단응력이 비직선적으로 증가하는 전형적인 비뉴우튼 유체의 성질을 나타내었으며, 그 정도는 WSP가 CBP보다 높게, 그리고 WSP 및 CBP의 농도가 증가할수록 전단응력이 크게 나타났다. 또한, 이들 시료는 전단속도의 증가에 따라 전단응력의 증가 속도가 감소하는 의가소성 유체의 특성을 보였다.

라. Power-law 식에 의한 유체흐름 특성

이들 시료는 전단속도의 증가에 따라 전단응력의 증가속도가 감소하는 의가소성 유체의 특성을 보였으며, 의가소성의 증가는 WSP가 보다 현저하였고 농도 의존적으로 발생하였다. WSP의 경우, 0.5 %(w/v) 농도에서 유동지수(n) 값은 0.295였으며, 점조도지수(K) 값은 15.736(cp)으로 나타났으며, CBP의 경우는 n 값이 거의 일정한 값을 보여 의가소성이 농도에 크게 의존하지 않음을 보였다(Table 10). 각 용액의 점성 특성은 power-law equation과 높은 상관관계를 보였으며, 흐름 특성을 나타내는 유동지수의 값이 농도의 증가에 따라 감소하여 의가소성이 증가함을 알 수 있었다. 또한, 온도에 따른 유동지수 n 값의 변화를 살펴보면, 온도가 증가함에 따라 n 값이 증가하여 의가소성이 다소 감소됨을 알 수 있었다 (Table 11)..

의가소성의 성질은 입안에서의 느낌을 아주 좋게 하여 주며 또한 식품가공시 매우 바람직한 유동성이기 때문에 Xanthan gum은 이런 목적을 위해서도 각종 식품에 널리 사용되고 있음과 견주어 보면 본 연구에서 생산되는 다당류들도 식품분야에 사용될 잠재력이 매우 클 것으로 사료된다.

마. 겔보기 점도의 온도 의존성

WSP와 CBP의 수용액에 대하여 20~80 °C의 온도 범위에서 농도 및 전단속도를 달리하여 겔보기 점도를 측정한 후, 0.5 %(w/v) 농도의 WSP 및 CBP 수용액에 대하여 겔보기 점도($\ln \eta_a$)와 온도 ($1/T$)와의 관계를 전단속도별로 나타내었다(Fig. 25). 겔보기 점도는 온도 및 전단속도의 증가에 따라 감소하는 경향을 보였으며, Fig. 26 에서는 20~80 °C의 온도범위에서 WSP 및 CBP 용액에 대한 겔보기 점도에 대한 온도 안정성을 나타내었다. WSP와 CBP 용액은 대조군으로 사용한 Xanthan gum에 비하여 상대적인 겔보기 점도값은 낮지만 동일한 온도 범위내에서의 안정성이 대단히 뛰어나며, 특히 80 °C에서는 WSP 용액이 Xanthan gum 보다 오히려 높은 점도값을 나타내어 고온에서의 이용성이 기대된다.

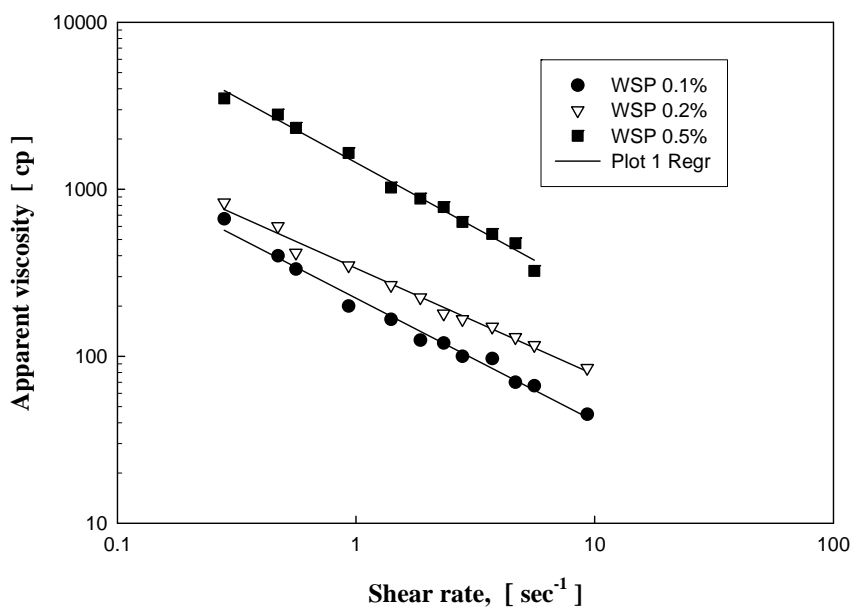


Fig. 22. Effect of shear rate on apparent viscosity of WSP solution at various concentrations.

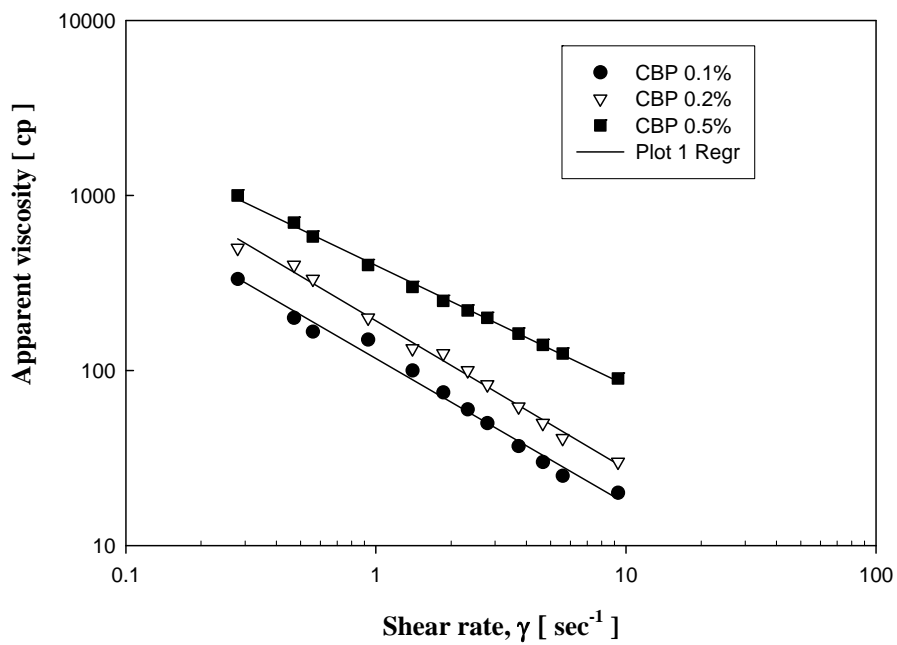


Fig. 23. Effect of shear rate on apparent viscosity of CBP solution at various concentrations.

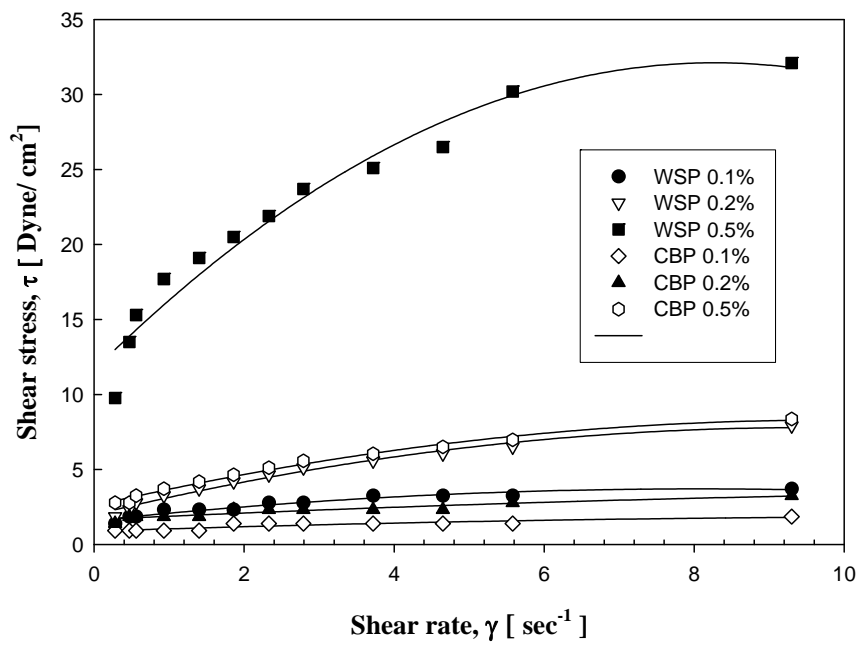


Fig. 24. Power law curves of WSP and CBP solutions at 30°C.

Table 10. Rheological parameters of WSP and CBP solutions
at various concentration at 30°C

Conc. (%)	WSP			CBP		
	n	K [cp]	r*	n	K [cp]	r*
0.1	0.315	2.026	0.991	0.372	1.052	0.975
0.2	0.388	3.287	0.999	0.373	1.896	0.979
0.5	0.295	15.736	0.999	0.370	3.841	0.995

r* : Correlation coefficient

Table 11. Effects of temperature on the rheological parameters
of 0.5% WSP and CBP solutions

Conc. (%)	WSP			CBP		
	n	K [cp]	r*	n	K [cp]	r*
20	0.2985	16.459	0.9973	0.3700	4.193	0.9951
30	0.2939	17.010	0.9888	0.3704	3.841	0.9958
40	0.3385	14.909	0.9966	0.3021	1.560	0.9842
50	0.3240	13.920	0.9976	0.3476	3.824	0.9988
60	0.3322	14.305	0.9969	0.4649	2.134	0.9988
70	0.3902	9.166	0.9936	0.4488	2.164	0.9989
80	0.3905	8.633	0.9970	0.4550	1.790	0.9979

r* : Correlation coefficient

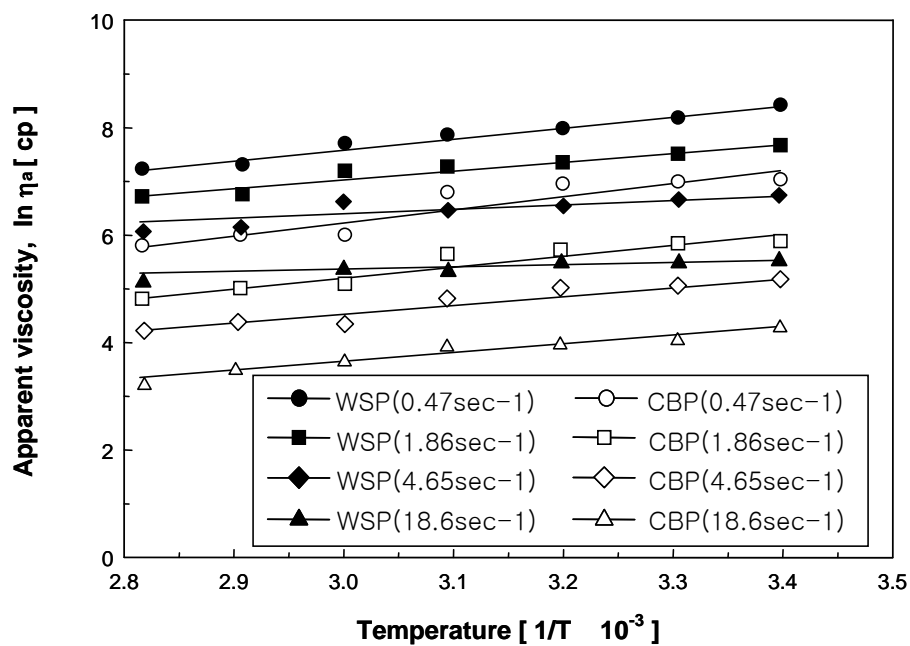


Fig. 25. Effect of temperature on the apparent viscosity of 0.5%(w/v) WSP and CBP solutions.

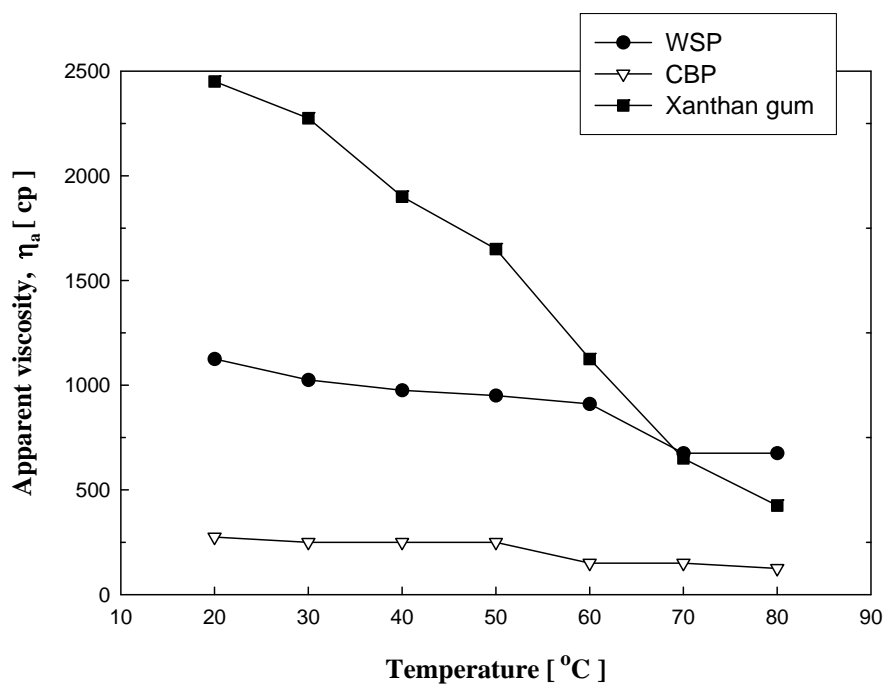


Fig. 26. Effect of temperature on the apparent viscosity of 0.5% polysaccharide solutions.

바. Andrade's 식에 의한 유동 활성화 에너지

실험결과로부터 Andrade's 식을 이용하여 각 조건에서의 유동활성화 에너지를 계산한 결과 (Table 12), WSP의 유동활성화 에너지는 전단속도 및 농도증가에 따라 감소하는 경향을 보였으며, CBP는 그다지 큰 변화가 없는 것으로 나타났다. 또한 각 용액의 유동활성화 에너지 값은 전체적으로 비교적 낮은 값을 보였다.

사. 겔보기 점도의 pH 의존성

일정한 온도 및 전단속도에서 0.5%의 WSP와 CBP 수용액의 겔보기 점도에 미치는 pH의 영향을 조사하였다(Fig. 27). WSP와 CBP 수용액의 겔보기 점도는 pH 7~8의 범위에서 가장 높은 것으로 나타났으며, pH 2~12의 넓은 범위에서 비교적 일정한 점도값을 보여, pH 안정성이 Xanthan gum 보다 우수한 것으로 나타났다.

아. 겔보기 점도에 미치는 NaCl의 영향

0.5 % WSP와 CBP 수용액에 NaCl을 0.5~5 % 첨가하여 0.48 sec⁻¹, 0.93 sec⁻¹, 1.86 sec⁻¹의 전단속도, 온도 30 °C에서 겔보기 점도를 측정된 결과(Fig. 28, 29), 전단속도 0.47 sec⁻¹에서 측정된 점도는 WSP는 각각 2,800, 4,117, 4,282, 3,952, 3,623, 2,305, 2,010 cp 로 NaCl 3.0 % 까지 첨가하였을 때, WSP 수용액은 점도가 증가하였으나, 5%를 첨가하였을 때는 점도가 다소 감소하는 경향을 보였다. 반면 CBP 수용액은 각각 700, 1,400, 2,100, 2,100, 2,000, 1,950, 1,800 cp로 NaCl 5 % 까지의 첨가에서 점도가 계속적으로 증가함을 보였다. 그 밖의 다른 전단속도에서도 비슷한 경향을 나타내었다.

특히, 식품산업에서 일반적으로 이용되고 있는 농도인 3.0 % 이하의 농도에서 점도 증가의 경우를 보여 식품산업에 첨가제로서의 이용가능성이 클 것으로 사료된다.

이상의 결과에서 살펴보면 polysaccharide (WSP, CBP) 수용액의 유동특성을 Power-law 식 및 Andrade's 식에 적용시킨 결과, polysaccharide 수용액은 비뉴턴 유체의 성질과 의가소성 유체의 성질을 가지는 것으로 나타났다. 이들 수용액의 겔보기 점도는 넓은 범위의 pH (2~12) 와 온도 (20~80 °C)에서 대조군으로 사용한 Xanthan gum 보다 높은 안정성을 보였다. 또한 NaCl의 첨가에 따른 겔보기 점도의 변화에서도 WSP의 경우 3 %, CBP는 5 % 까지의 농도에서도 높은 점도 향상능을 보였다. 각종 염류에 대한 점도 향상능 및 유지능도 우수하였으며, CBP의 경우 gel 형성능의 가능성도 보여 각종 산업에서의 점증제 및 새로운 바이오 소재로서의 이용 가능성이 클 것으로 기대된다.

5. 다당류의 물리·화학적 특성 조사

생산되어진 다당류를 여러 가지 제품에 첨가하기 위해 그 기본적인 물리·화학적 특성을 조사하였다.

Table 12. A function of temperature of WSP and CBP solutions at various concentration

Shear rate [sec ⁻¹]	WSP				CBP			
	Con. (%)	Ea (Kcal/mol·°K)	A (cp·s)	r*	Con. (%)	Ea (Kcal/mol·°K)	A (cp·s)	r*
0.47	0.1	5.3054	0.0612	0.8904	0.1	2.2234	2.8972	0.9432
	0.2	2.6920	6.3983	0.9733	0.2	5.3732	0.0509	0.9340
	0.5	2.4495	47.0404	0.9439	0.5	3.4834	2.1773	0.8703
1.86	0.1	6.4841	0.0031	0.9393	0.1	3.0137	0.5379	0.7652
	0.2	1.7660	11.1453	0.9608	0.2	3.9417	0.1636	0.9598
	0.5	1.7379	59.6204	0.8948	0.5	2.8469	2.3251	0.9106
4.65	0.1	7.6872	0.0001	0.9500	0.1	2.9222	0.2523	0.7281
	0.2	2.2876	2.8777	0.8917	0.2	3.3089	0.2251	0.9277
	0.5	1.6228	38.1680	0.8567	0.5	2.3543	2.8791	0.9339
18.6	0.1	6.8061	0.0003	0.9389	0.1	2.7420	0.1279	0.8874
	0.2	1.3346	5.9168	0.8147	0.2	2.7974	0.2215	0.8967
	0.5	1.0607	35.7303	0.8337	0.5	2.1546	1.7726	0.9481

r* : Correlation coefficient

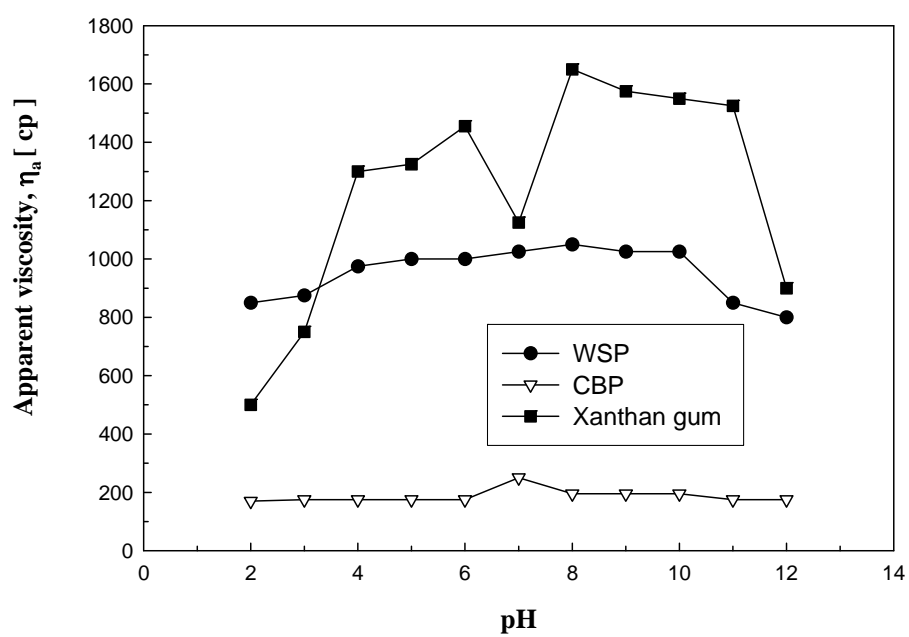


Fig. 27. Effect of pH on the apparent viscosity of 0.5% polysaccharide solutions at 30°C.

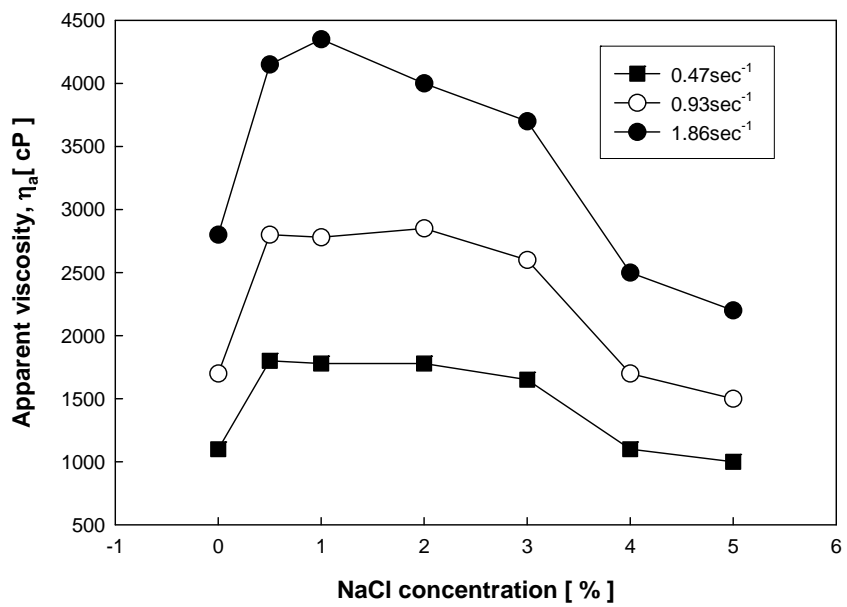


Fig. 28. Effect of added NaCl concentration on the viscosity of WSP solutions.

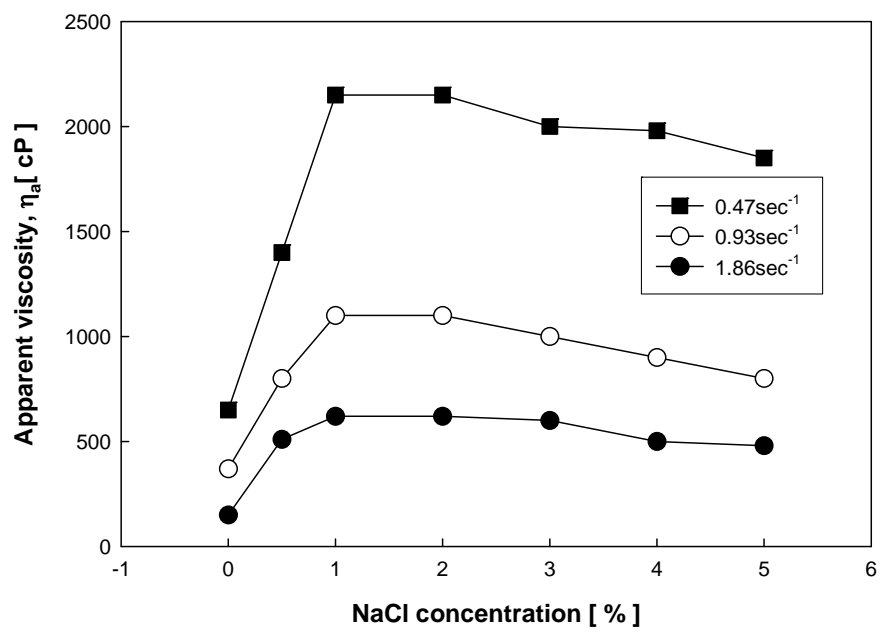


Fig. 29. Effect of added NaCl concentration on the viscosity of CBP solutions.

가. 응집활성

응집효과를 비교하기 위해 xanthan gum을 비교군으로 선정하였다. WSP, CBP의 경우 0.01-1.0 %(w/v)까지 80 U/ml이상 유지되었으나 xanthan gum 경우 0.01-0.1 %(w/v)정도 에서만 80 U/ml 이상 활성을 나타내었으며 1.0 %(w/v)이상 농도 첨가시 급격히 감소됨을 알 수 있다(Fig. 30). 그러나 WSP, CBP 경우 안정적인 감소 경향을 볼 수 있다. 이러한 과잉 첨가시 응집활성 감소현상은 가교화에 필요한 입자표면의 흡착 활성점이 감소하기 때문에 가교가 곤란하게 되어 입자간 상호반발에 의한 분산현상이 일어나기 때문인 것으로 생각된다. WSP가 0.01-0.03 %(w/v)에서 탁도제거 및 침강속도면에서 최고값 92.3 U/ml값을 나타내었다. 고분자 응집제는 분자량이 높을수록 응집력은 증가하지만, 반면에 분자량이 크면 용해가 곤란하게 된다. 또한 응집과정에서 금속교반과 같은 조작에 의하여 분자사슬이 절단되어 응집제로서의 성능이 저하하는 단점이 있다. 고분자응집제는 일반적으로 소량을 원수에 첨가하는 것만으로 견고한 플록을 생성하며, 침강속도가 빠르고 pH, 온도 등의 영향을 비교적 많이 받지 않고, 또 침강 분리 장치의 소용면적을 적게 할 수 있으며, sludge의 탈수 처리도 용이하게 할 수 있는 이점이 있다. 본 실험결과 또한 이렇게 미량첨가시 높은 응집활성을 나타남에 따라 산업화하기 위한 충분한 잠재성이 있다 하겠다.

나. 열적 특성

다당류의 열적 특성은 결정체의 물질이 형태가 변화될 때 나타나는 물리적 변화에 수반되는 열의 흡수와 방출을 측정하기 위한 것으로 DSC(Differential Scanning Calorimeter)를 이용하여 다당류의 용점 및 흡열되는 열량을 측정하였으며 결과를 알아보았다(Fig. 31). WSP (water soluble polysaccharide) 경우 162.82 °C에서 열분해가 일어났으며 이때 1 g WSP를 녹이는데 필요한 열량은 453.49 cal로 나타났다(Fig. 31, 32, Table 13). CBP(cell bound polysaccharide) 경우 열분해 온도와 엔탈피가 각각 166.05 °C, 529.78 cal/g으로써 나타났다(Fig. 33, 34, Table 14). 기존 권 등은 *Bacillus polymyxa* 변이주로부터 얻은 heteropolysacch -aride의 경우 열분해온도 183.25 °C, 엔탈피 100.3 cal/g로 나타났으며, xanthan gum의 경우 각각 177.87 °C, 113.5 cal/g으로 조사되어졌다. 또한 정 등은 levansucrase를 이용, 합성한 levan의 열적특성을 조사한 결과 최대용점 178.4 °C, 엔탈피는 1.66 cal/g으로 측정되었다.

다. 수분 보수력

보수력은 소재의 팽윤, 표면 다공성 등 물리적인 구조요인에 의한 수분의 침투와 흡착에 기인하는 성질이다. 식품가공제조시 보수의 문제는 기술적으로 해결해야할 문제로서 특히 식품의 동결 후 냉동시에 보통 20-25 %(w/v) 수분침출이 발생할 수 있으며 이러한 결과로 풍미성분 또는 수용성 단백질 유실로서 해동 후 제품의 품질저하 결과를 가져올 수 있다. 현재 산업소재로 가장 많이 이용되는 Xanthan gum을 비교군으로 사용하였다. 0.5-2.5 %(w/v)농도범위로 측정된 결과 고 농도로 갈수록 점차 보수력은 감소함을 나타냈다. 이는 고농도로 첨가되는 고

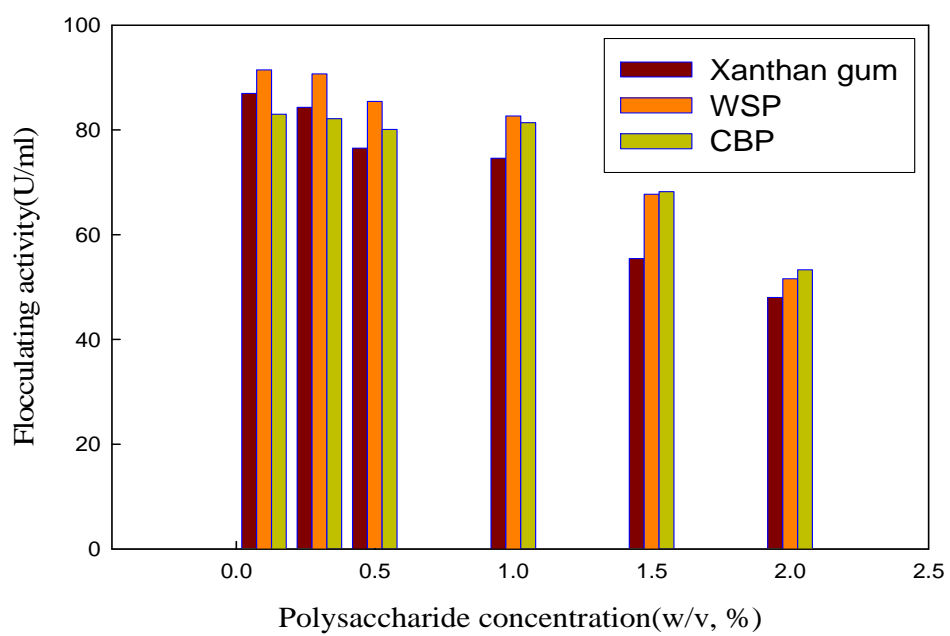


Fig. 30. Flocculating activity of the heteropolysaccharide and xanthan gum.

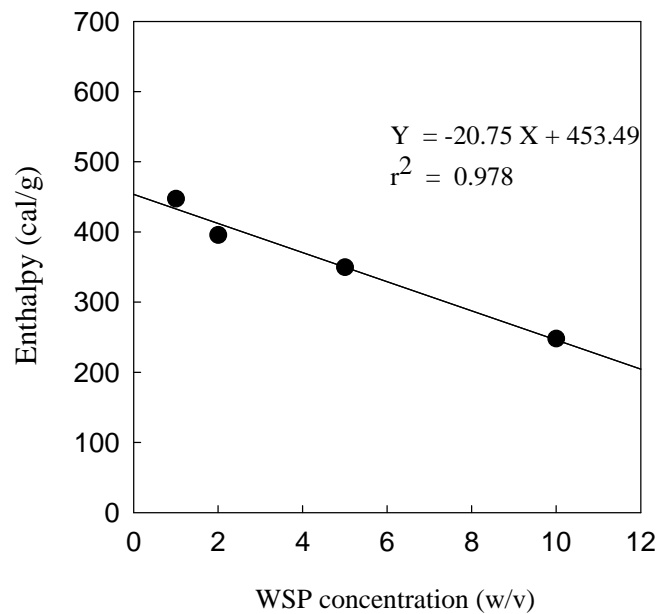


Fig. 31. Standard curve of enthalpy on WSP concentration.

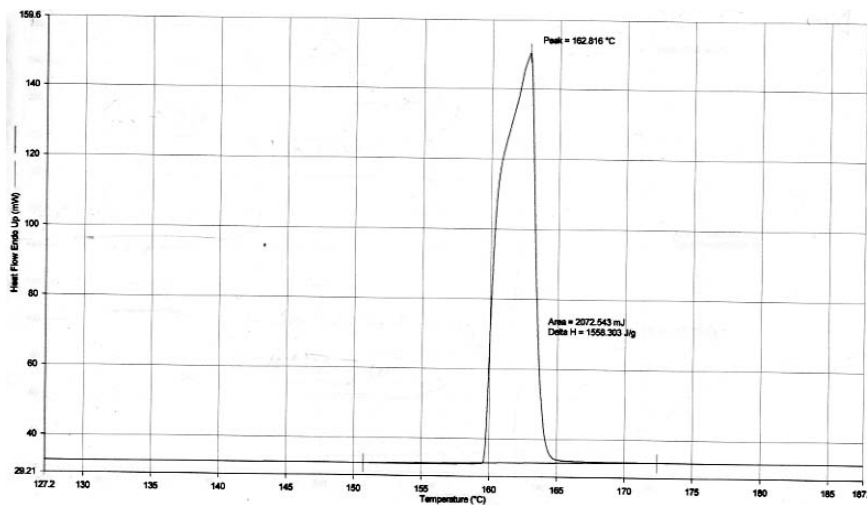


Fig. 32. Thermogram of water soluble polysaccharide by DSC.

Table 13. DSC thermogram values of water soluble polysaccharide

	Peak temperature (melting point, °C)	Enthalpy (cal/g)
WSP	162.82	453.49

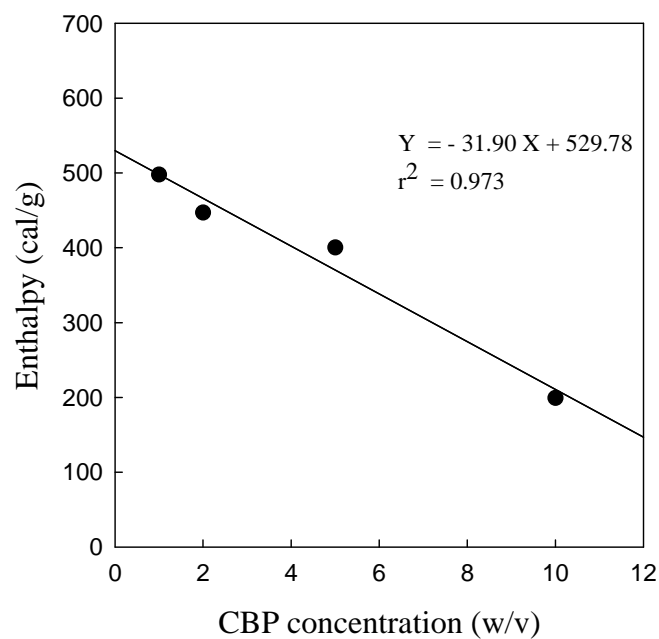


Fig. 33. Standard curve of enthalpy on CBP concentration.

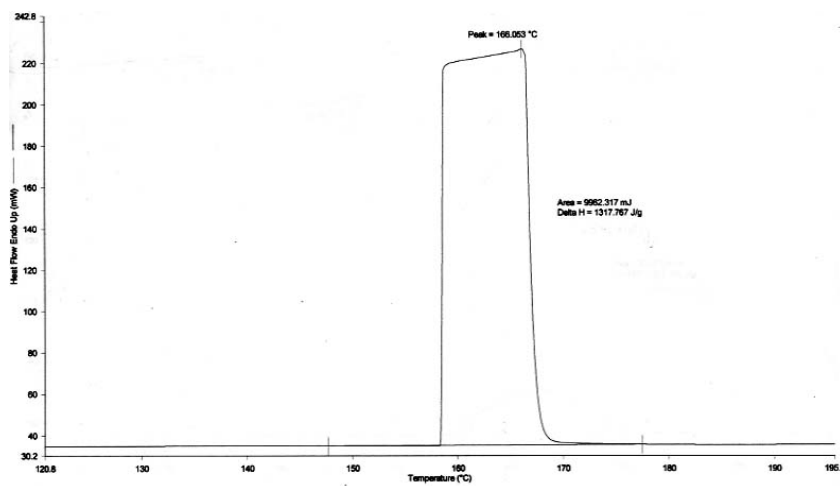


Fig. 34. Thermogram of cell bound polysaccharide by DSC.

Table 14. DSC thermogram values of cell bound polysaccharide

	Peak temperature (melting point, °C)	Enthalpy (cal/g)
CBP	166.05	529.78

분자의 사슬단위의 물리적 변화에 따라 고분자 단위 질량당 수분함유량은 감소됨으로 사료되며 CBP 경우 1.5 %(w/v)까지 상당히 안정적인 보수효과를 나타내었으며 0.5 %(w/v) WSP에서 가장 높은 보수력 127 g water/g polysaccharide을 보여주었다(Fig. 35).

라. 유화능

각종 다당류와 WSP, CBP의 유화능을 비교하였다(Fig. 36, Table 15). Na-alginate의 경우 정지 30분후 액층과 oil층이 분리되기 시작하여 24 hr후에 완전히 분리되었다. gellan gum, carragenan 경우 gel화로 인한 별다른 유화능을 얻지 못하였다. 상업적으로 이용되는 Tween series, Triton 경우 초기 12-24 hr동안 완벽한 유화능을 보였으나 48 hr 후부터는 점차 유화안정성이 감소함을 보였다. 그러나 Xanthan gum과 WSP, CBP 경우 초기에 유화활성능이 안정한 형태로 장시간동안 유지됨을 나타냈으며 48 hr 이후 WSP의 유화안정능이 감소할 뿐이며 특히 본 연구에서 사용한 WSP 경우 148 hr 이후까지 우수한 유화안정능을 유지함으로써 하였다. 이러한 결과는 유화제산업에 생물소재로서 polysaccharide의 잠재적 가능성을 제시한 결과라 사료되며 유화제로서의 차후 용도개발을 위해서는 사용 유지의 종류, 물성 및 작용기작을 충분히 고려되어야 할 것으로 사료된다.

마. 용해력

기존 권 등은 *Bacillus polymyxa* KS-1 균주로부터 얻은 다당류 경우 formic acid, formaldehyde, H₂O등에 매우 잘 용해되며 각종 alcohol류, benzene, DMSO등에 용해되지 않음을 보고하였다. 손 등은 *Xanthomonas* sp. 유래 다당류의 용해력을 조사한 결과 H₂O, formaldehyde, formic acid등에 우수한 용해성을 보였으며 유기용매에는 불용성 침전물을 형성함을 보고하였다.

WSP와 CBP의 용해도는 실험에 사용된 용매의 polarity에 크게 좌우됨을 알 수 있었다(Table 16). WSP 경우 가장 polarity값이 높은 H₂O에서 98.7 % , CBP의 경우 71.4 %로서 WSP가 CBP에 비해 친수성기를 포함한 물질이 많이 포함된 것으로 사료되며 이러한 결과는 2-propanol에서 용해력이 WSP, CBP가 각각 17.9 % , 36.5 %로써 CBP경우 WSP에 비해 비극성부위가 더 많이 잔존해있는 것으로 사료된다. Formic acid, phosphoric acid, acetic acid와 같은 강산의 경우 고분자사슬과 접촉시에 가수분해반응에 의한 사슬의 끊어짐, 또는 탈수 반응으로 인한 고분자사슬간 공간에 수분이 들어갈 공간의 증대로 인해 용해도가 증가된 것으로 사료된다.

바. 겔 형성능, 점착성 및 결착능 - 각종 Salts 첨가에 의한 효과

두 다당류 자체로는 겔 형성이 불가능하므로 0.5 %의 농도에서 점도를 측정하여 겔 형성능, 점착성, 결착능 등을 살펴보았다. 특히 각종 염들을 첨가하여 염의 종류에 따른 특성 조사를 하였다.

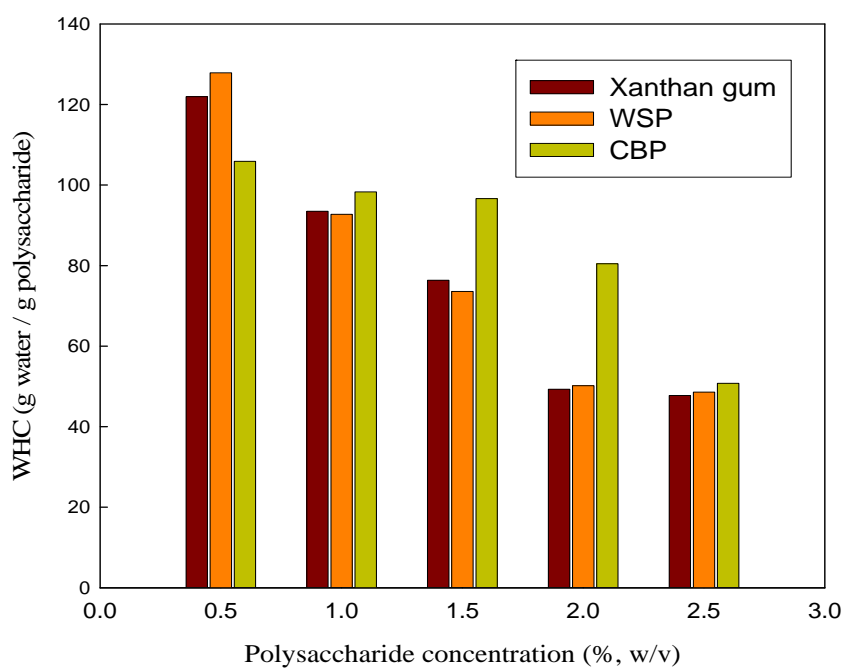
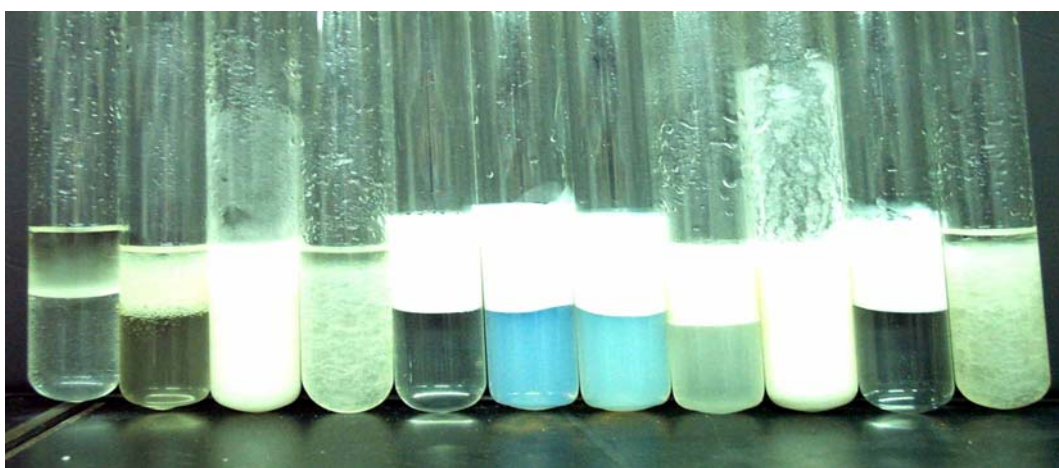


Fig. 35. Effect of various concentration on WHC of heteropolysaccharides and xanthan gum.



A B C D E F G H I J K

Fig. 36. Emulsion stability of various emulsifier after 72hr.

A: Water(standard), B: Na-alginate, C: Xanthan gum,
 D: Gellan gum, E: Tween 20, F: Tween 40, G: Tween
 80, H: WSP, I: CBP, J: Triton X-100, K: Carragenan,

Table 15. Emulsion stability test of the heteropolysaccharides and other polymer

Emulsifier	Emulsion stability (hr)											
	0.1	0.5	1	3	5	12	24	48	72	120	144	
A Water(standard)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B Na-alginate	+++	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
C Xanthan gum	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
D Gellan gum	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E Tween 20	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	+	+	+	+
F Tween 40	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	+	+	+	+
G Tween 80	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+
H WSP	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	-
I CBP	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
J Triton X-100	+++	+++	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-
K Carragenan	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

0.5 % WSP와 CBP 수용액에 NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, BaCl₂, ZnCl₂, FeSO₄, CuSO₄, MgSO₄를 0.2 %(w/v) 되도록 첨가하여 전단속도 1.86 sec⁻¹에서 겔보기 점도를 측정된 결과 (Fig. 37, 38), WSP 수용액의 경우 BaCl₂, KCl의 경우를 제외하고는 겔보기 점도에 영향을 주었으며, 특히 ZnCl₂의 경우에는 다른 염류보다 2.5배 정도의 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 반면 CBP 수용액의 경우는 NaCl, KCl, MgCl₂, MgSO₄를 제외한 나머지 염류들에 의해 급격한 점도 증가를 보여 CBP가 WSP에 비해 염류에 대한 반응성이 상당히 높은 것으로 나타났다. 이러한 현상은 WSP, CBP와 염 사이에 착물형성, cross-linking 효과 및 이온 회합효과를 가지기 때문으로 사료된다. 유동상태에서 측정된 점도로 미루어 상업적으로 가장 널리 사용되는 생물 유래 다당 Xanthan gum에 비해 점착력이나 결착능이 뛰어나지 않은 것으로 관찰되어졌다. WSP의 경우는 일반적으로 식품사업에 이용되는 염류 중 NaCl, KCl, MgCl₂, MgSO₄ 등에 대한 점도 향상능 및 점도 유지능이 우수하므로 식품보조제로서 용도가 넓은 것으로 사료되며, 고정화 담체로서 CBP의 bead 형성능이 크다는 것을 입증해 주는 결과이기도 하다.

사. 필름 형성능

다당류의 특징 중 하나인 필름 형성능을 검토하기 위하여 xanthan gum, gellan, carragenan을 대조군으로 *Zoogloea* sp. 유래 WSP, CBP와 비교하였다. Xanthan gum는 3 %(w/v) 농도에서 표면이 불규칙한 불투명 필름이 형성되었으나 5 %(w/v) 이상에서는 고점도 용액의 점도로 인해 필름이 형성되지 않았다. Gellan 및 carragenan 경우 1, 3, 5 %(w/v)에서 필름형성능을 보였으며, 알지네이트로 제조한 필름은 잘 부스러지는 특성이 나타났다. WSP, CBP 경우 1, 3, 5 %(w/v) 모두 필름형성이 되었으며 백색 투명한 필름이 제조되었다. 그러나 1 %(w/v) WSP, 1 % CBP의 필름의 경우 실온, 대기 중에 장기보관(30 days) 후에는 필름자체의 균열, 파괴가 일어났다.

이러한 결과로 미루어 볼 때 WSP와 CBP를 첨가한 필름이 식품의 식용 가능한 포장재질로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

아. 인장강도(젤리강도)

다당 필름의 인장강도(젤리강도)를 Fig. 39.에 나타내었다. 인장강도는 필름의 강성을 나타내는 인자이다. WSP와 CBP의 인장강도는 3 % 농도에서 각각 585, 612 kg/cm²로 나타났다. 나 등의 결과에 의하면 1.5 %(w/v) 다당류 시료의 인장강도는 1.5% carragenan 800 kg/cm², lactan 650 kg/cm², chitosan 210 kg/cm²로 기존 조사된 결과와 유사한 수치를 나타내었다.

다당 자체로는 젤리 형태의 시료를 제조할 수 없으므로 젤리의 주성분으로 사용되는 carragenan에 다당의 농도를 달리 첨가하여 젤리를 제조한 후 그 강도를 측정하였다. 단순히 carragenan으로 제조한 대조군과 첨가군 사이에는 특별한 차이가 관찰되지 않았으며, 이는 염의 존재 유무에 따라, 그리고 염의 종류에 따라 점도 및 texture에 영향을 받는 CBP, WSP의 성질에서 기인한 결과로 판단된다.

Table 16. Solubility of the heteropolysaccharide in various solvents

Solvent	Polarity ($\epsilon^* \text{ AlPO}_5$)	Soluble substance Mass (mg/20ml)		Solubility (%)	
		WSP	CBP	WSP	CBP
H ₂ O	High	1,974	1,428	98,7	71,4
5N-NaOH	High	1,408	1,692	70,4	84,6
5N-HCl	High	1,428	1,346	71,4	67,3
Acetic acid	High	1,424	1,404	71,2	70,2
Formic acid	High	1,812	1,680	90,6	84,0
Phosphoric acid	High	1,368	1,710	68,4	85,5
Methanol	0,95	1,106	0,944	55,3	47,2
Ethanol	0,88	0,810	1,196	40,5	59,8
N-propanol	0,82	0,486	0,510	24,3	25,5
2-propanol	0,82	0,358	0,730	17,9	36,5
Acetonitrile	0,65	0,456	0,666	22,8	33,3
Acetone	0,56	0,344	0,196	28,0	24,8
Dichloromethan	0,42	0,380	0,504	19,0	25,2
Chloroform	0,40	0,126	0,470	6,3	23,5
Benzene	0,32	0,126	0,189	6,3	9,4

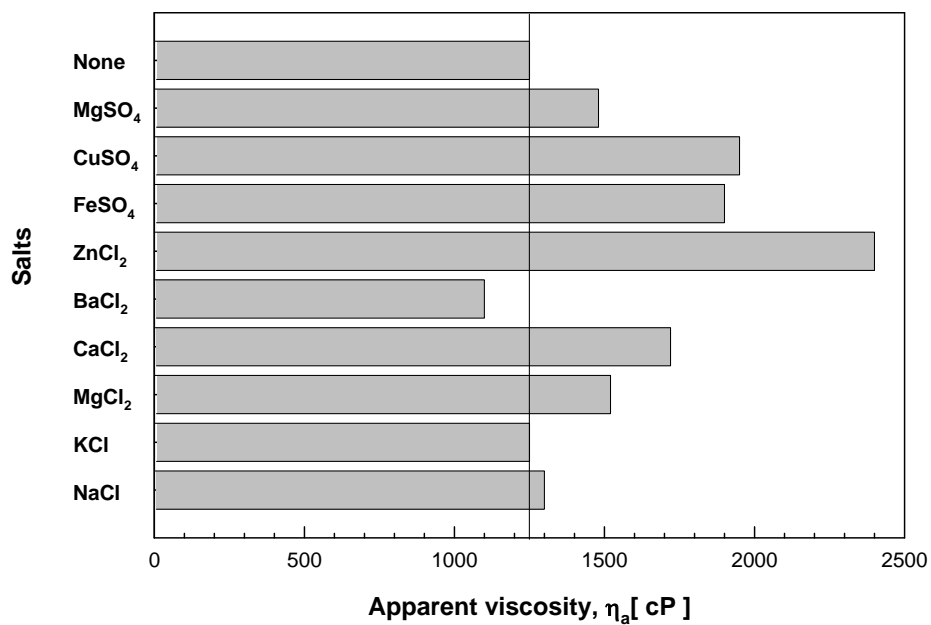


Fig. 37. Effect of salts on gel formation of the WSP solution with added salts.

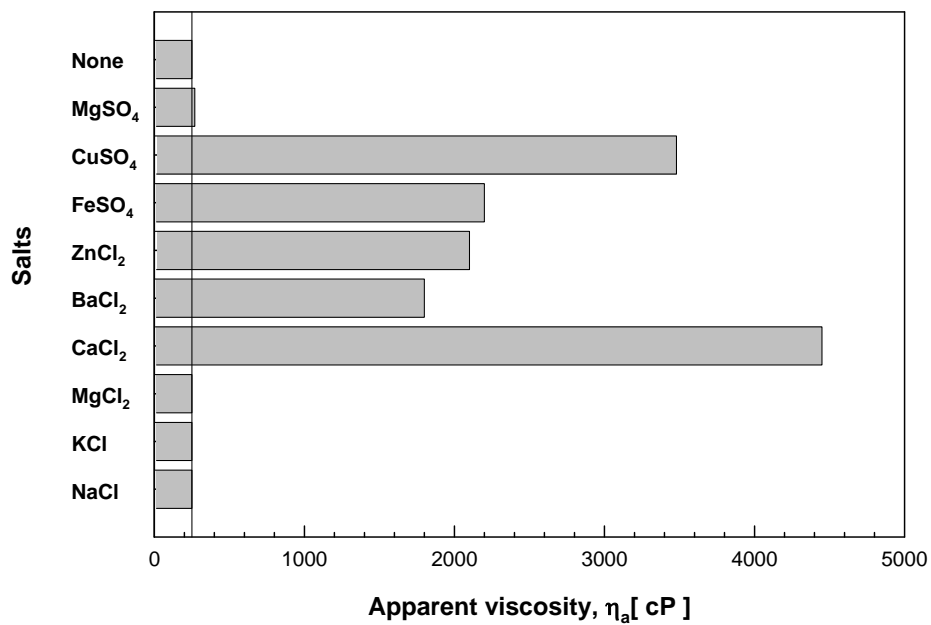


Fig. 38. Effect of salts on gel formation of the CBP solution with added salts.

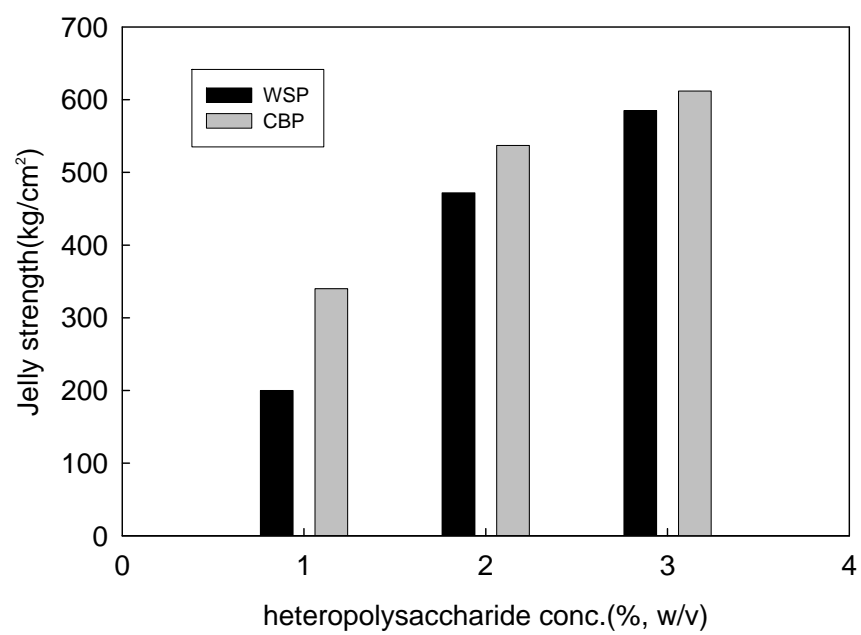


Fig. 39. Jelly strength of heteropolysaccharide film.

자. 생분해능

제조된 다당류 film의 생분해능을 조사하기 위하여 *A. niger* 배양 고체 배지위에 필름을 얹고 균을 도말한 후 배양기 내에서 균의 성장을 관찰한 결과, WSP, CBP 필름 모두 4일째 균이 성장하기 시작하였으며(Fig. 40), 8일이 경과하면서 필름이 완전히 덮이는 현상이 관찰되었다. 이것은 WSP와 CBP film의 생분해도가 매우 뛰어나다는 것을 나타내는 결과이다.

6. 발효조를 이용한 다당류의 효율적 생산 조건

가. 균의 특성

해양에서 분리된 *Zoogloea* sp.(KCCM10036)는 다당을 생산하는 균주로 배양액 중으로 분리되는 다당 WSP(Water-Soluble Polysaccharide)와 세포벽 부착 다당 CBP(Cell-Bound Polysaccharide)의 두 가지 서로 다른 다당을 생산한다. 두 다당은 배양초기부터 대수성장기까지 매우 많은 양이 생산된다. 탄소원과 질소원에 영향을 따라 WSP와 CBP 생산량은 각기 조절될 수 있는 특징이 있다. 또한 분리된 *Zoogloea* sp.는 다당 생산량과 균체 증가량에 뚜렷한 상관관계가 없는 것으로 사료되어지며, 조건 조절로 다량의 다당을 회수할 수 있다.

SEM의 결과를 볼 때 *Zoogloea* sp.는 가늘고 둥근 막대모양인 간균체로 직경은 1.0-1.3 μm 이고, 길이는 2.1-3.6 μm 로 캡슐형태를 하고 있다(Fig. 41).

나. 회분 배양

균의 성장에 미치는 질소원의 영향과 C/N 비에 관해 알아보았다. 본 실험은 flask 배양과 발효조를 이용한 회분배양으로 실시하였다.

(1) 질소원의 영향

먼저 casamino acid, urea, thiourea, beef extract, gelatin, yeast extract, peptone G, proteose peptone, bacto soytone, bacto peptone과 같은 질소원을 flask 배양하였다. 그 결과, 다양한 질소원 중 bacto peptone 첨가군의 다당 생산량이 3.70 g/L으로 가장 높았다(Fig. 42). 이 결과를 바탕으로 flask 배양의 상위 protease peptone, peptone G, Bacto soytone, Bacto peptone를 첨가한 배지로 발효기 배양한 결과, flask 배양과 동일하게 bacto pepton 첨가군에서 다당 생산이 가장 높게 나타났으며, 생산량은 11.3 g/L로 3배 정도 향상되었다(Fig. 43-46).

(2) C/N 비의 효과

다당 생산에 영향을 미치는 C/N 비의 효과를 flask 배양을 통하여 살펴보았다. C/N비의 범위는 1~7 까지 실험하였으며, C/N 비 5까지는 다당생산이 증가하였으나 6과 7은 감소하는 경향을 나타내었다. 최대 다당생산은 C/N 비가 5일 때 7.13 g/L이었다(Table 17).

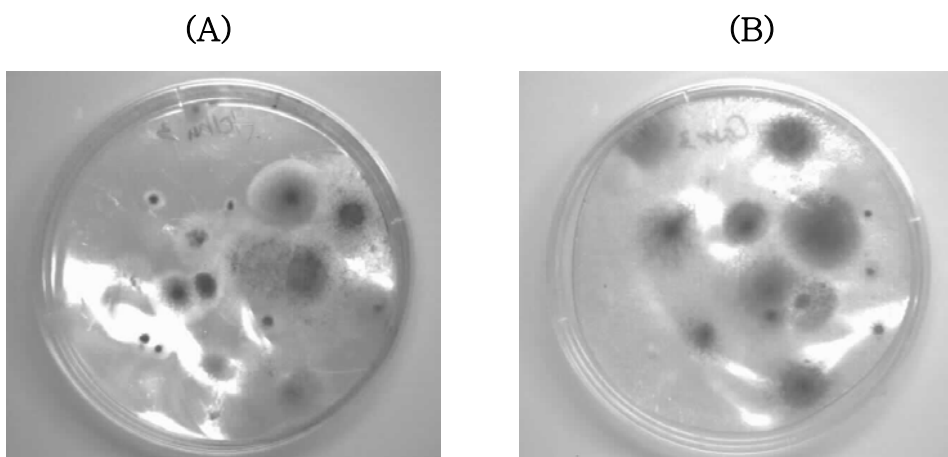


Fig. 40. Growth of *A. niger* in WSP and CBP films.

(A) WSP, (B) CBP



a



b

Fig. 41. SEM of *Zoogloea* sp.(KCCM10036) on the batch fermentation with culture time (a, after 24h; b, after 48h).

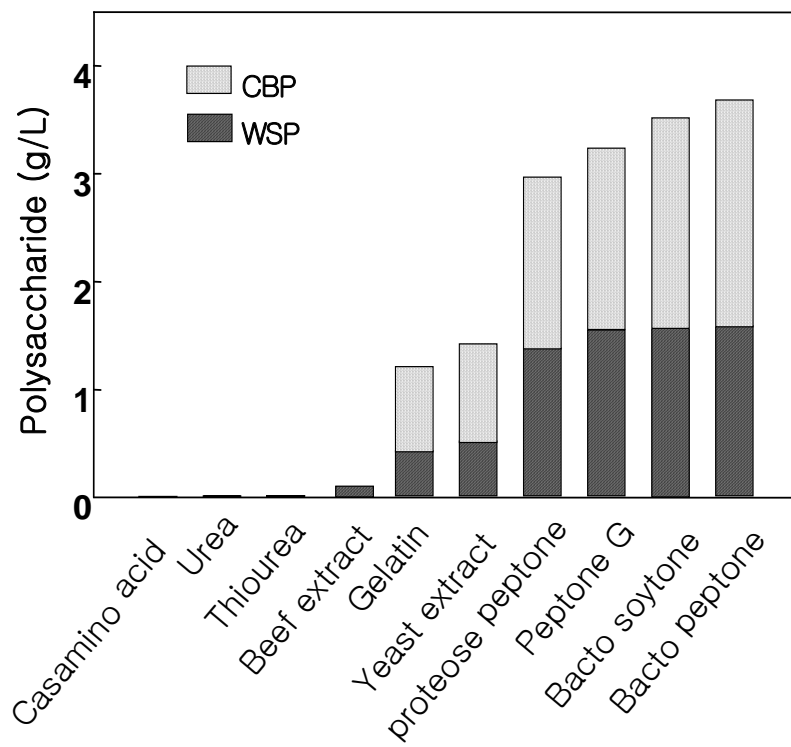


Fig. 42. Effect of the nitrogen source for the polysaccharides production.

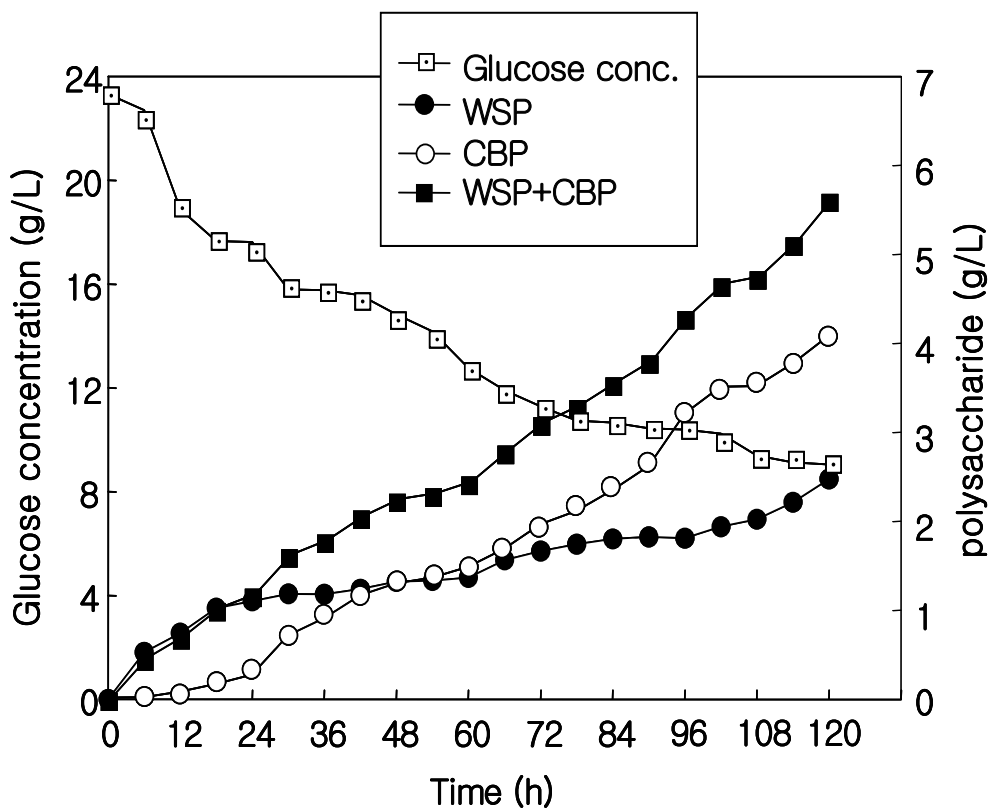


Fig. 43. Time course on the polysaccharides produced by marine bacterium *Zoogloea* sp. in 7L fermentor with the batch culture 0.5 % (w/v) bacto soyton, 2.5 % (w/v) glucose, 400rpm, 1vvm, 10% inoculum size. The polysaccharides production was 5.61g/L.

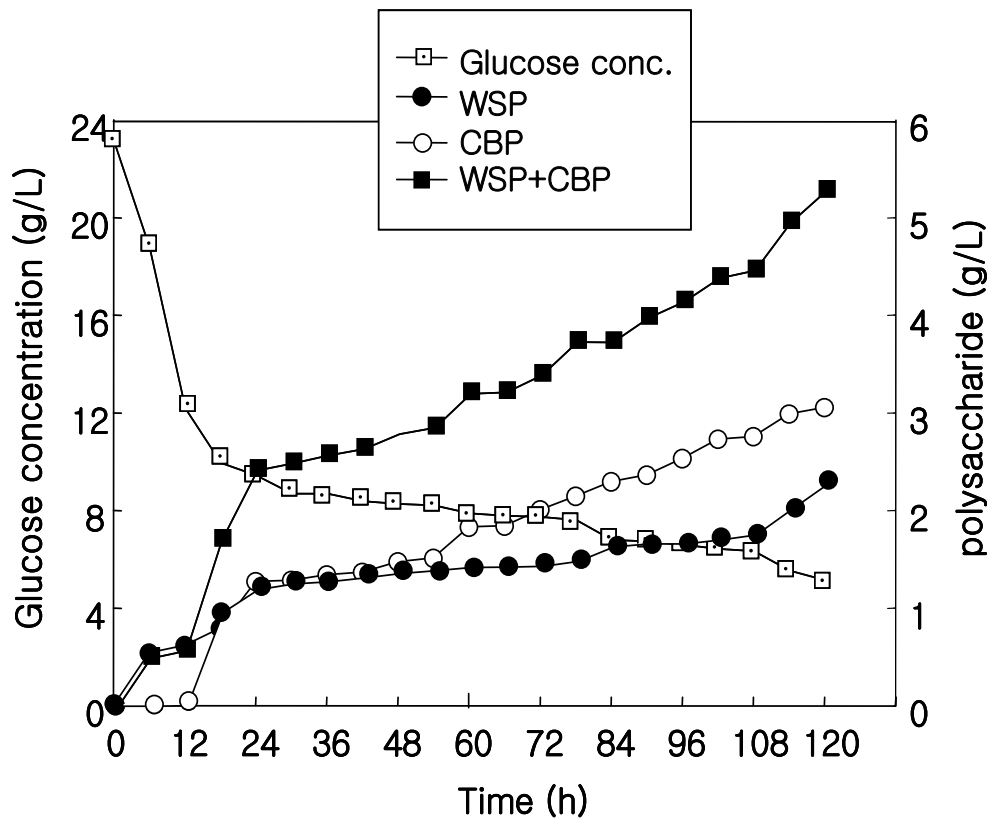


Fig. 44. Time course on the polysaccharides produced by marine bacterium *Zoogloea* sp. in 7L fermentor with the batch culture 0.5 % (w/v) proteose peptone, 2.5% (w/v) glucose, 400rpm, 1vvm, 10% inoculum size. The polysaccharides production was 5.33g/L.

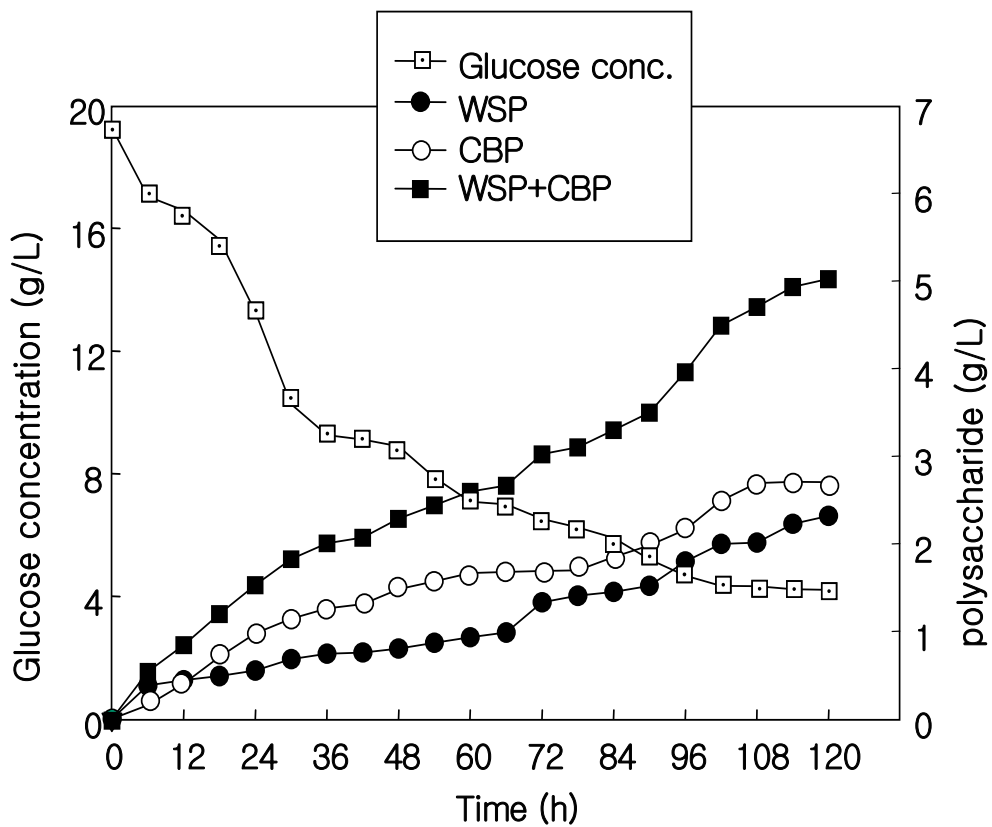


Fig. 45. Time course on the polysaccharides produced by marine bacterium *Zoogloea* sp. in 7L fermentor with the batch culture 0.5 %(w/v) peptoneG, 2.5(w/v) % glucose, 400 rpm, 1vvm, 10 % inoculum size. The polysaccharides production was 5.02 g/L.

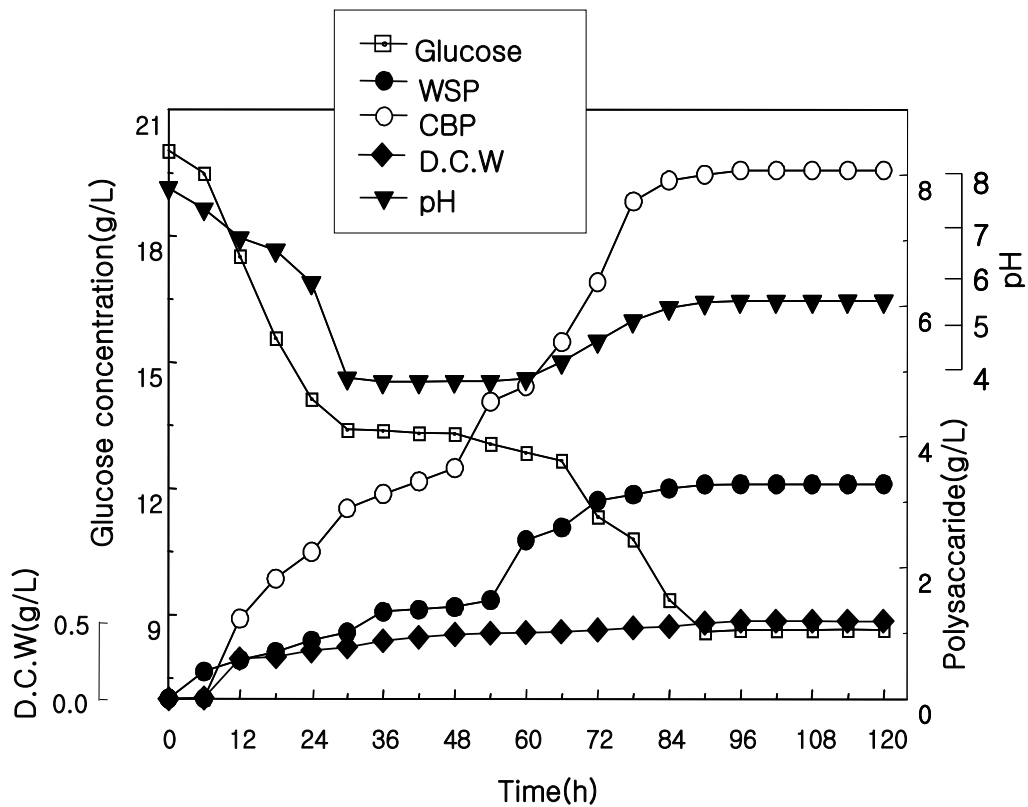


Fig. 46. Time course on the polysaccharides produced by marine bacterium *Zoogloea* sp. in 7L fermentor with the batch culture 0.5%(w/v) peptone, 2.5%(w/v) glucose, 400rpm, 1vvm, 10% inoculum size.

Table 17. Effect of the C/N ratio for the polysaccharide production

C/N ratio	Carbon source(g/L)	Nitrogen source(g/L)	Polysaccharide(g/L)		
			WSP	CBP	Total
1	0.5	0.5	3.487	0.787	4.274
2	1.0	0.5	2.063	3.508	5.571
3	1.5	0.5	2.405	3.530	5.935
4	2.0	0.5	2.166	4.081	6.247
5	2.5	0.5	2.409	4.719	7.128
6	3.0	0.5	2.507	1.712	4.219
7	3.5	0.5	2.991	0.218	3.209

다. 유가식 배양

유가식 배양은 고농도의 기질이 균성장을 저해하는 것을 예방하기 위한 배양법으로 배양 중간 중간 기질을 feeding하여 최적 feeding 조건에서 최대의 반응 산물을 회수할 수 있다. 유가식 배양에 있어 기본적인 결과는 회분식 배양을 통하여 실험을 하였다.

그리고, feeding volume과 기질 농도의 최적 조건을 달리하여 다당의 생산성을 검토하였다. 결론적으로, 최적 feeding volume과 기질농도는 각각 200 ml과 glucose 2.5 %(v/v)였다. 최종 다당생산은 120 hr 배양했을 때 6.28 g/L였으며, 총 배양액은 3.8 L였다.

(1) Intermittent feeding conditions

(가). Feeding volume

유가식배양에서 feeding 방법은 Table 18 과 같은 방법으로 시행하였으며, 결과는 Fig. 47-49에 나타낸 것과 같이 다당생산은 각각 5.42, 6.28, 4.76 g/L이었다. 결론적으로 최적 feeding volume은 200 ml이었다.

(나). Concentration of feeding substrate

Zoogloea sp.로부터 유가식 배양을 통한 다당 생산을 위해 최적 기질량을 구하고자 2.5, 5, 10 %(w/v)의 농도로 실험을 행하였고 feeding volume은 200 ml로 하였다. 24 hr 간격으로 feeding한 결과, 2.5 %(w/v)의 기질을 공급한 것의 다당 생산은 5, 10 %(w/v)로 공급한 것보다 높은 생산을 하였다.

이는 기질의 고농도로 인한 기질저해로 균성장에 유해한 작용을 한 것으로 사료된다(Fig. 50, 51). 다당 생산은 각각 6.28, 5.12 그리고 4.35 g/L이었다. 그러므로 최적 기질 농도는 2.5 %(w/v)였다(Fig. 49).

라. 반연속식 배양

유가식 배양이 회분식 배양보다 다당 생산량이 저조한 이유는 본 균주 *Zoogloea* sp.가 생산하는 다당류가 고점성을 띠므로 여기서 유발되는 산소전달 문제, 불균질화, 전단응력에 의한 세포 회손 등을 충분히 해결하지 못했기 때문으로 사료된다. 그러므로 이 문제를 해결할 한 방법으로 고점도 문제를 해결할 수 있다고 예상되는 반연속식 배양을 실시하였다.

반연속식 배양은 대수성장기에 새로운 배지와 교체함으로서 균의 성장을 계속적으로 유지시켜 주는 방법이다. 반연속식 배양에서 가장 중요한 실험인자는 희석율이며 다음과 같은 식으로 표현된다.

$$D = \frac{V_n}{V_R} \quad \begin{array}{l} D = \text{Dilution ratio, } V_n = \text{New medium volume} \\ V_R = \text{Working volume} \end{array}$$

Table 18. Effect of various feeding conditions for the polysaccharides production in the fed batch culture

Feeding conditions	Cell concentration (g-D.C.W./L)	Polysaccharides production(g/L)	
	100	0.41	5.42
Feeding volume (ml)	200	0.54	6.28
	500	0.59	4.76
	2.5	0.54	6.28
Concentration of feeding substrate (% glucose, v/v)	5	0.32	5.12
	10	0.29	4.35

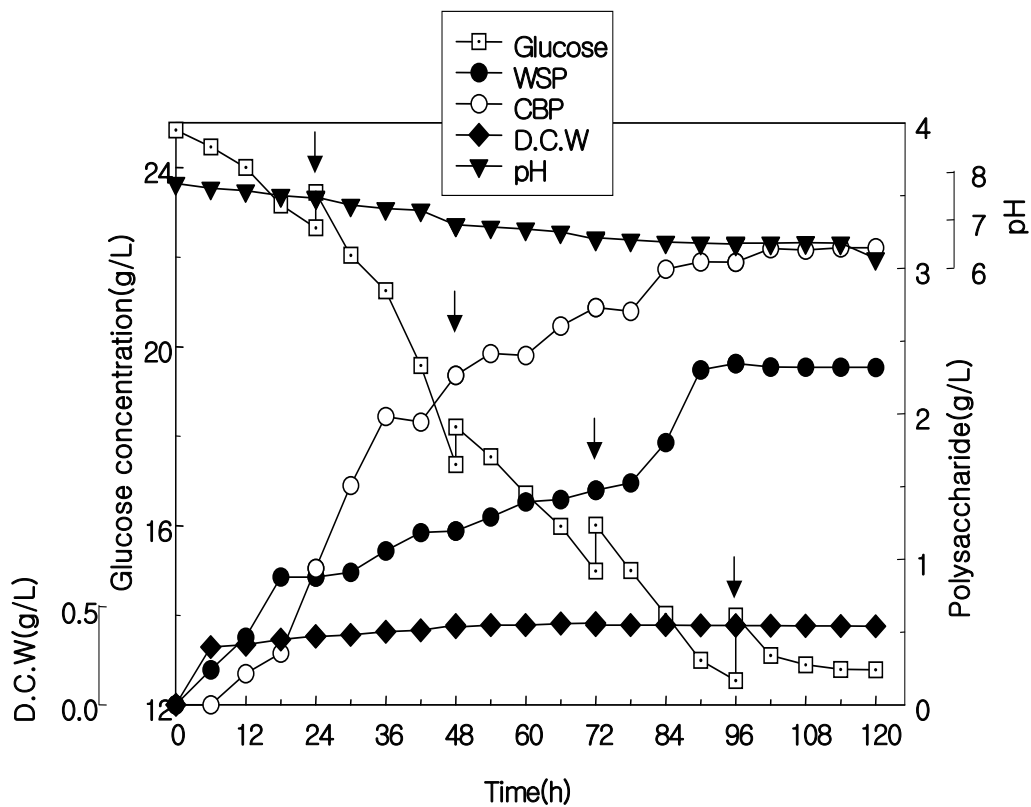


Fig. 47. Time course on the polysaccharides produced by marine bacterium *Zoogloea* sp. in 7 L fermentor with the fed batch culture, 2.5 % glucose. The arrows(\downarrow) indicated the start of medium feeding each other (2.5 g glucose/100 ml medium).

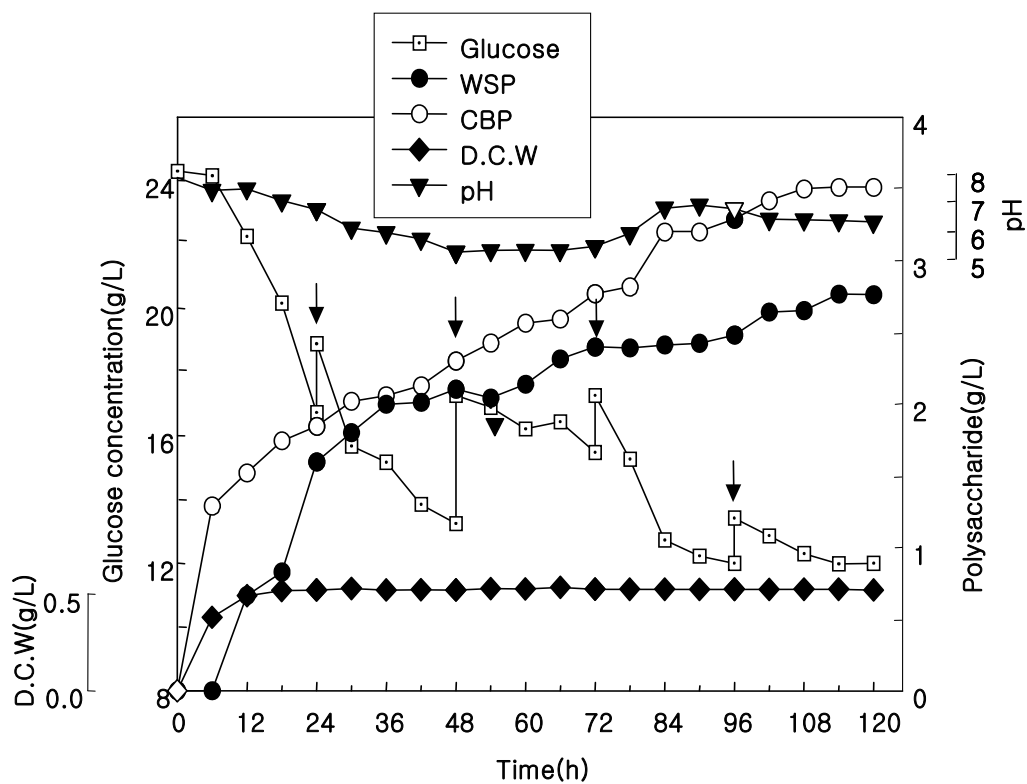


Fig. 48. Time course on the polysaccharides produced by marine bacterium *Zoogloea* sp. in 7L fermentor with the fed batch culture, 2.5 % (w/v) glucose. The arrows (\downarrow) indicated the start of medium feeding each other (5 g glucose/200 ml medium).

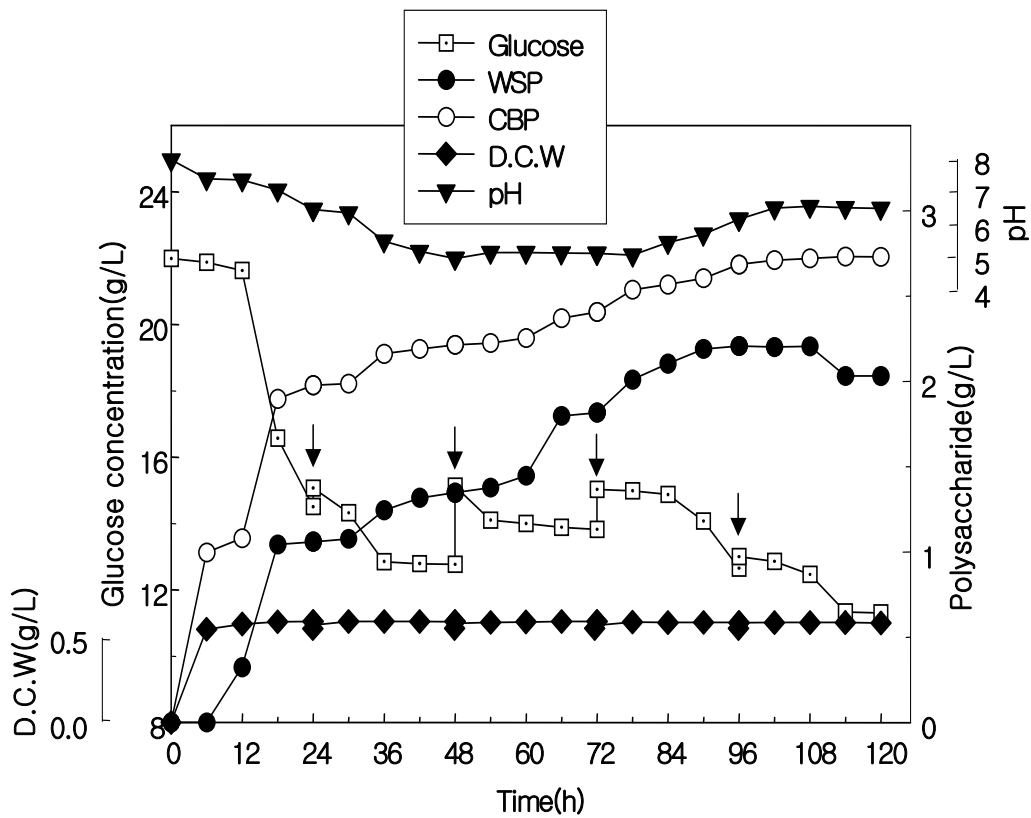


Fig. 49. Time course on the polysaccharides produced by marine bacterium *Zoogloea* sp. in 7L fermentor with the fed batch culture, 2.5 %(w/v) glucose. The arrows(↓) indicated the start of medium feeding each other (12.5 g glucose/500 ml medium).

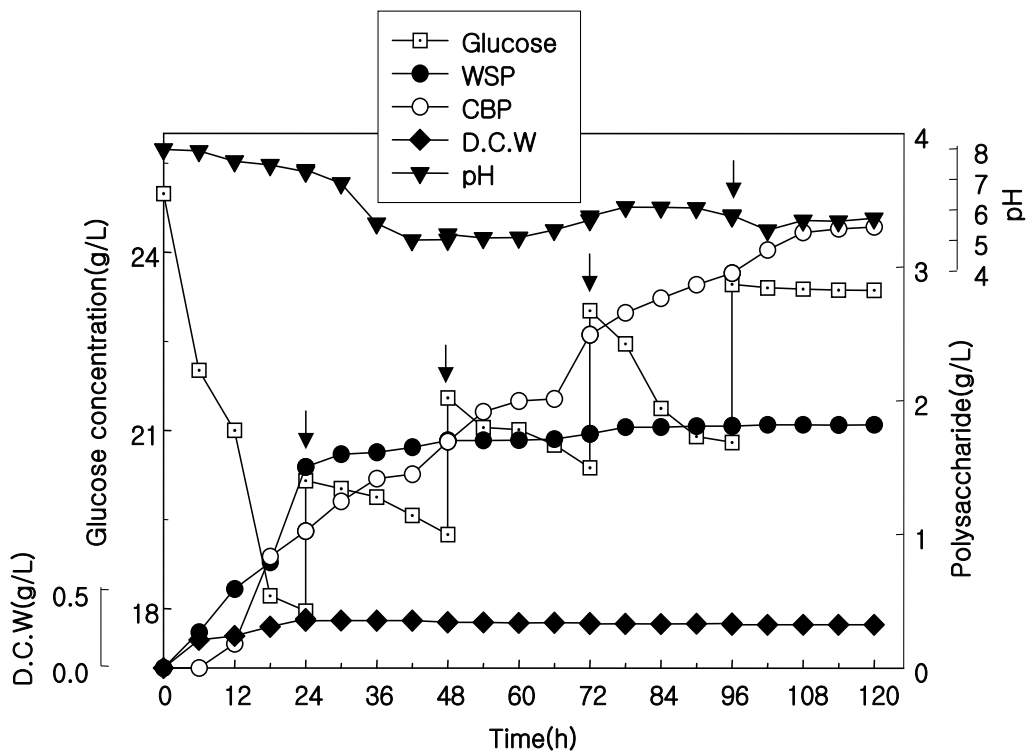


Fig. 50. Time course on the polysaccharides produced by marine bacterium *Zoogloea* sp. in 7 L fermentor with the fed batch culture, 2.5 %(w/v) glucose. The arrows(↓) indicated the start of medium feeding each other (10g glucose/200 ml medium).

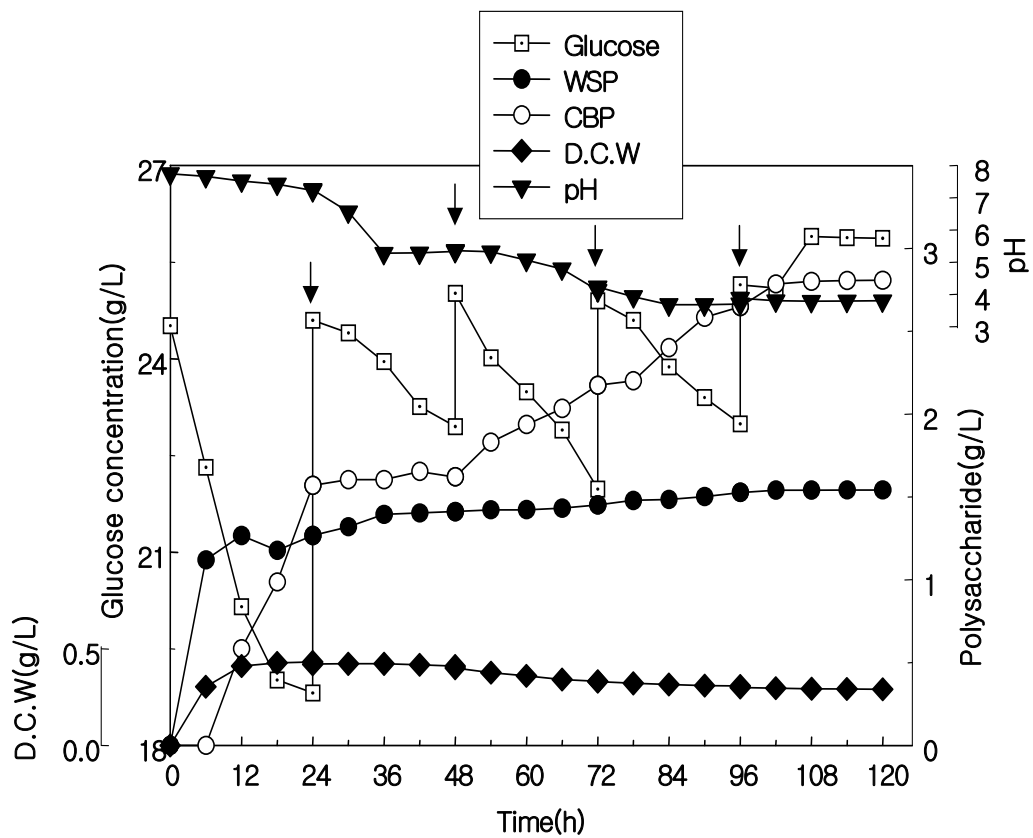


Fig. 51. Time course on the polysaccharides produced by marine bacterium *Zoogloea* sp. in 7 L fermentor with the fed batch culture, 2.5 % (w/v) glucose. The arrows (\downarrow) indicated the start of medium feeding each other (20g glucose/200 ml medium).

실험에 있어 feeding volume은 200, 500 그리고 1000 ml 즉, 희석율은 0.04, 0.1 그리고 0.2로 조절하였으며, inoculum size는 10 과 20 %(v/v), feeding 간격은 12 hr과 24 hr 간격으로 배지를 교체하는 실험을 각각 실시하였다.

이 결과, 반연속식배양의 최적 조건은 feeding volume은 500 ml, 10 %(v/v)의 inoculum size, feeding 간격은 24 hr이었으며, 144 hr 배양한 결과, 다당생산량은 8.23 g/L였으며, 최종 배양액은 8 L였다.

(1) Feeding volume

Feeding volume에 따른 다당 생산은 Table 19에 나타난 바와 같다. 200 ml의 feeding volume은 고점도를 해결하는데 문제를 야기시키며 1000ml의 경우에는 wash out 현상으로 대량생산을 하는데 있어 부적합한 결과를 가져왔다(Fig. 53, 54). 그 결과, 다당 생산은 각각 6.59, 8.23 그리고 4.17 g/L 이었다. 그러므로 최적 조건은 500ml이었다(Fig. 52).

(2) Inoculum size

다당 생산에 있어 inoculum size에 대한 영향을 검토하였으며, 실험은 10과 20%로 수행하였다(Table 20).

그 결과, 다당생산은 각각 8.23 과 5.25 g/L였다. 20 %의 inoculum size를 주입한 경우 많은 수의 균은 기질을 다당 생산에 사용 하지 않고 호흡을 위한 에너지로 주로 이용하는 것으로 사료된다(Fig. 55). 결론적으로 10 %의 inoculum size가 최적인 것으로 밝혀졌다(Fig. 53).

(3) Feeding time

Feeding 시간에 따른 다당 생산을 알아보았다.

Feeding 시간은 12, 24 hr 간격으로 수행하였다. 실험결과에 따르면 12 hr 간격은 과도한 희석으로 인한 다당 생산에 적합하지 않았다(Fig. 56). 다당 생산은 각각 5.91, 8.23 g/L였다. 그러므로, 최적 feeding 시간은 24 hr 간격인 것으로 밝혀졌다(Table 19)(Fig. 52).

회분 배양의 최적조건은 working volume 3 L, 400 rpm, 1 vvm, 30 °C, 탄소원으로서 glucose 2.5 %(w/v), inoculum size는 10 %(v/v)이었다. 이 때 120 hr 후에 11.3 g/l의 다당을 생산하였다. 유가식배양의 최적조건은 feeding volume과 기질의 접종 농도는 200 ml와 2.5 %(w/v) glucose 였다. 배지의 접종은 24 hr 간격으로 행하여졌고 다당류의 생산은 120 hr 후에 6.28 g/l 였으며, 최종 배양액은 3.8 L였다.

반연속식 배양의 최적조건은 feeding volume 500 ml. inoculum size 10 %(v/v)였고, 접종시간은 24 hr이었다. 이 조건하에서 다당류의 생산은 144 hr 후에 8.23 g/L였고, 최종 배양액은 8 L이었다.

이상의 결과, 회분배양, 유가배양, 반연속시배양에 대한 다당 생산량, 생산율 등을 Table 20에 정리하였다.

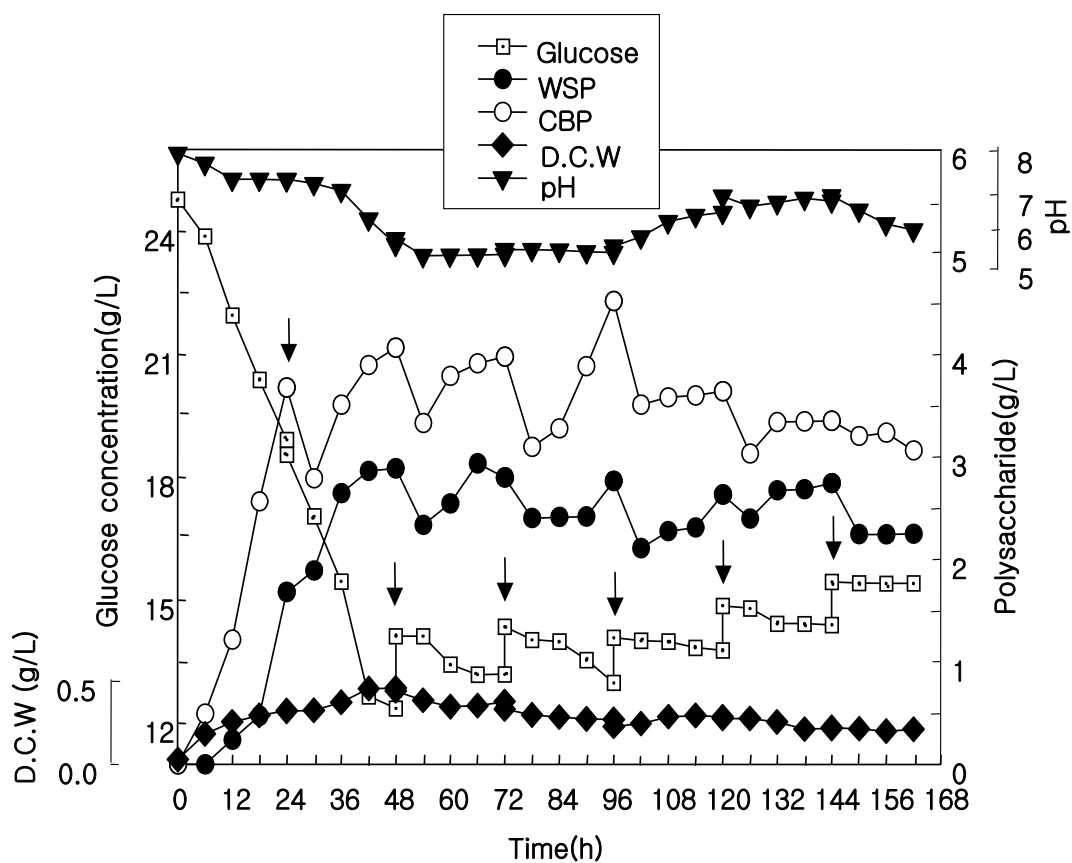


Fig. 52. Time course on the polysaccharides produced by marine bacterium *Zoogloea* sp. in 7 L fermentor with the semicontinuous culture. The arrows(\downarrow) indicated the time in which the medium (12.5 g glucose/500 ml medium) has been replaced.

Table 19. Effect of various feeding conditions for the polysaccharides production in the semicontinuous culture

Feeding conditions		Cell concentration (g-D.C.W./L)	Polysaccharides production(g/L)
Feeding volume (ml)	200	0.45	6.59
	500	0.50	8.23
	1000	0.36	4.17
Inoculum size (%, v/v)	10	0.50	8.23
	20	0.66	5.25
Feeding time interval(h)	12	0.35	5.91
	24	0.50	8.23

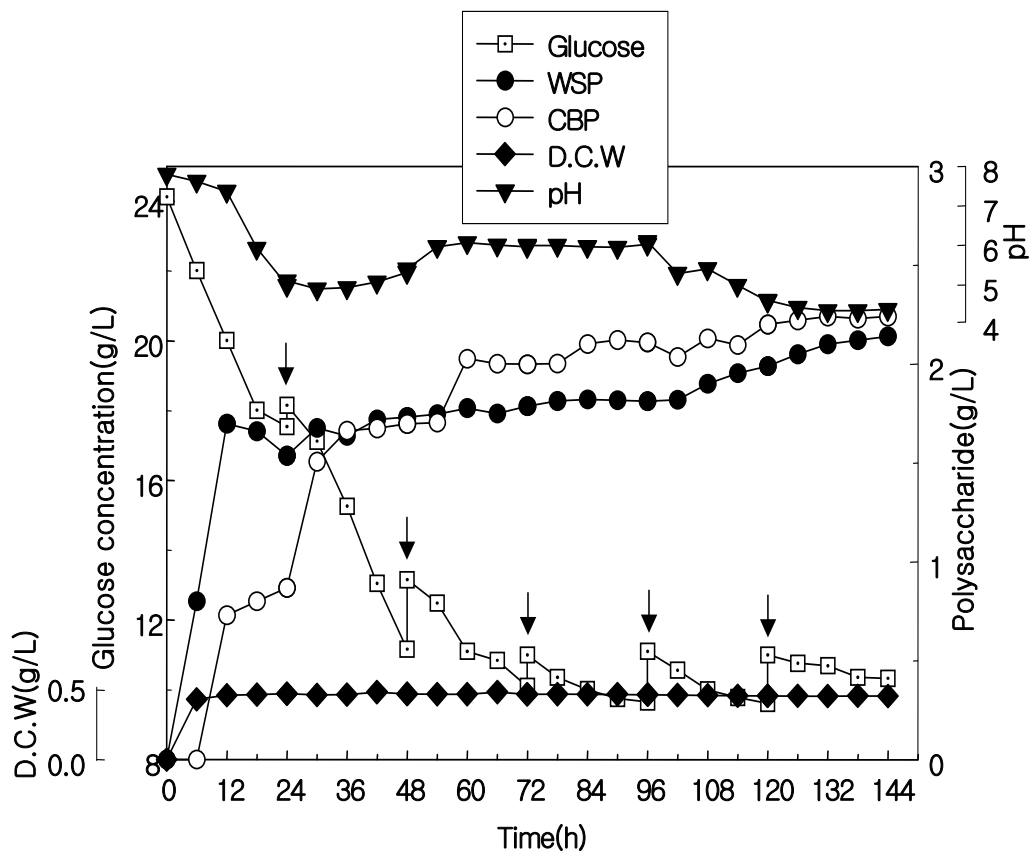


Fig. 53. Time course on the polysaccharides produced by marine bacterium *Zoogloea* sp. in 7 L fermentor with the semicontinuous culture. The arrows(\downarrow) indicated the time in which the medium (5 g glucose /200 ml medium) has been replaced.

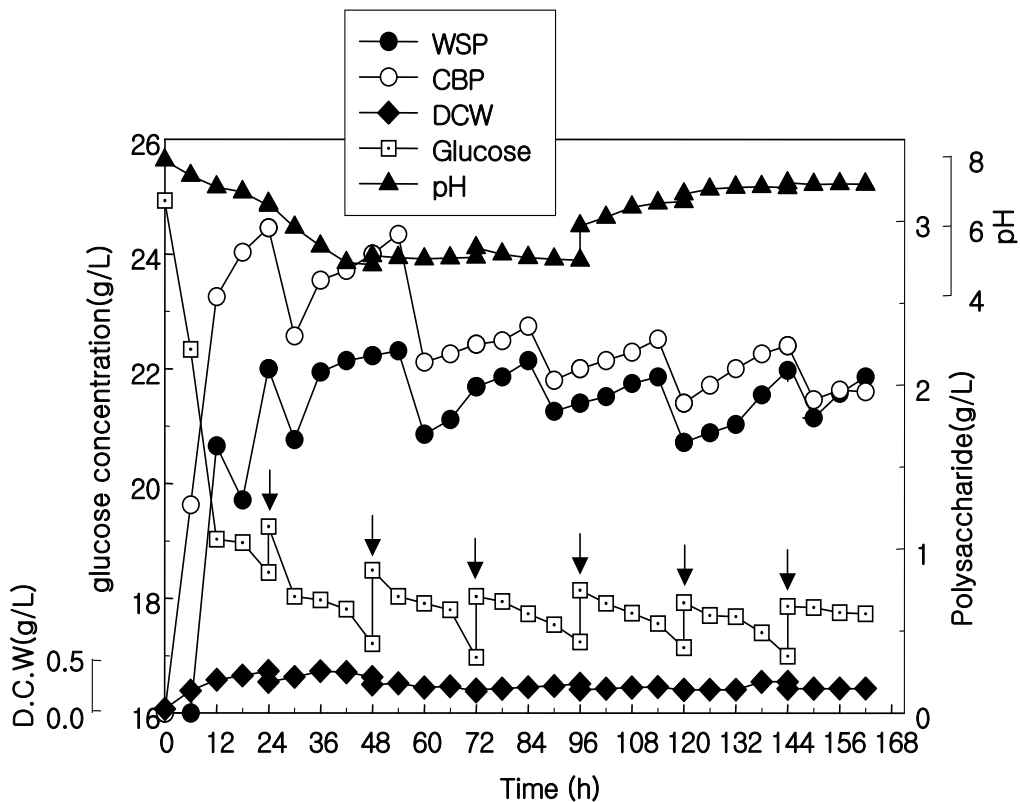


Fig. 54. Time course on the polysaccharides produced by marine bacterium *Zoogloea* sp. in 7 L fermentor with the semicontinuous culture. The arrows(\downarrow) indicated the time in which the medium (25 g glucose /1000 ml medium) has been replaced. Supply with feed in a interval for 24h.

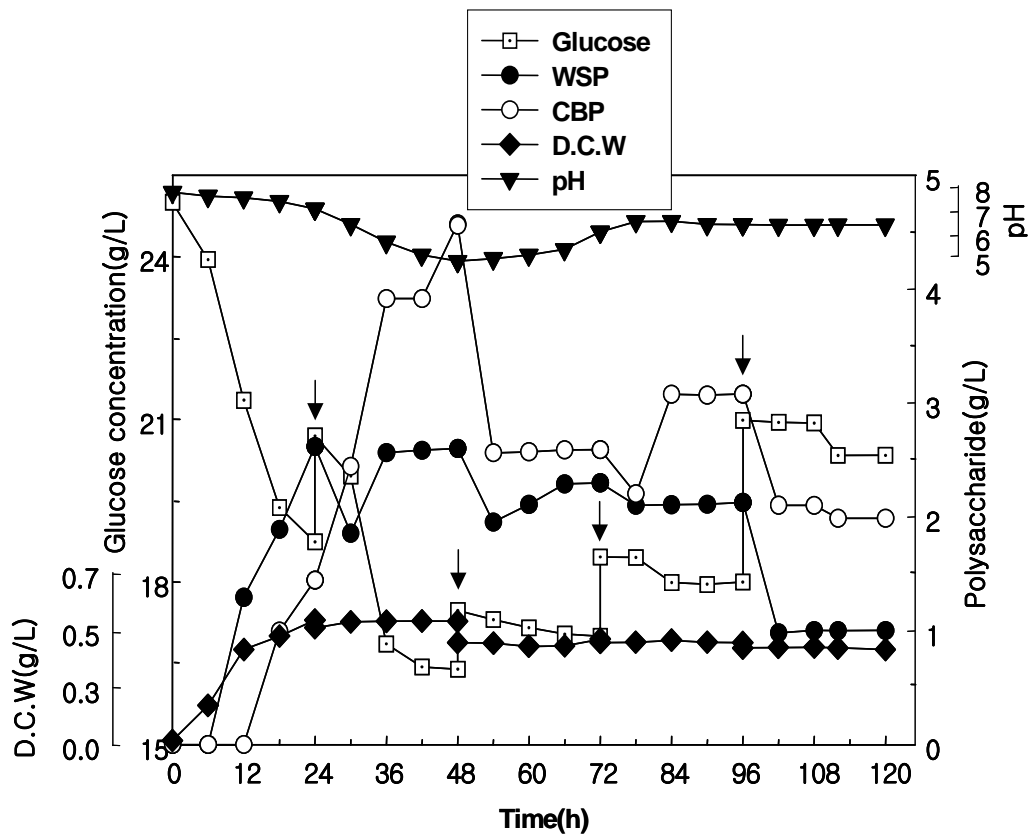


Fig. 55. Time course on the polysaccharides produced by marine bacterium *Zoogloea* sp. in 7 L fermentor with the semicontinuous culture. 20 % inoculum. The arrows(↓) indicated the time in which the medium(12.5 g glucose/500 ml medium) has been replaced.

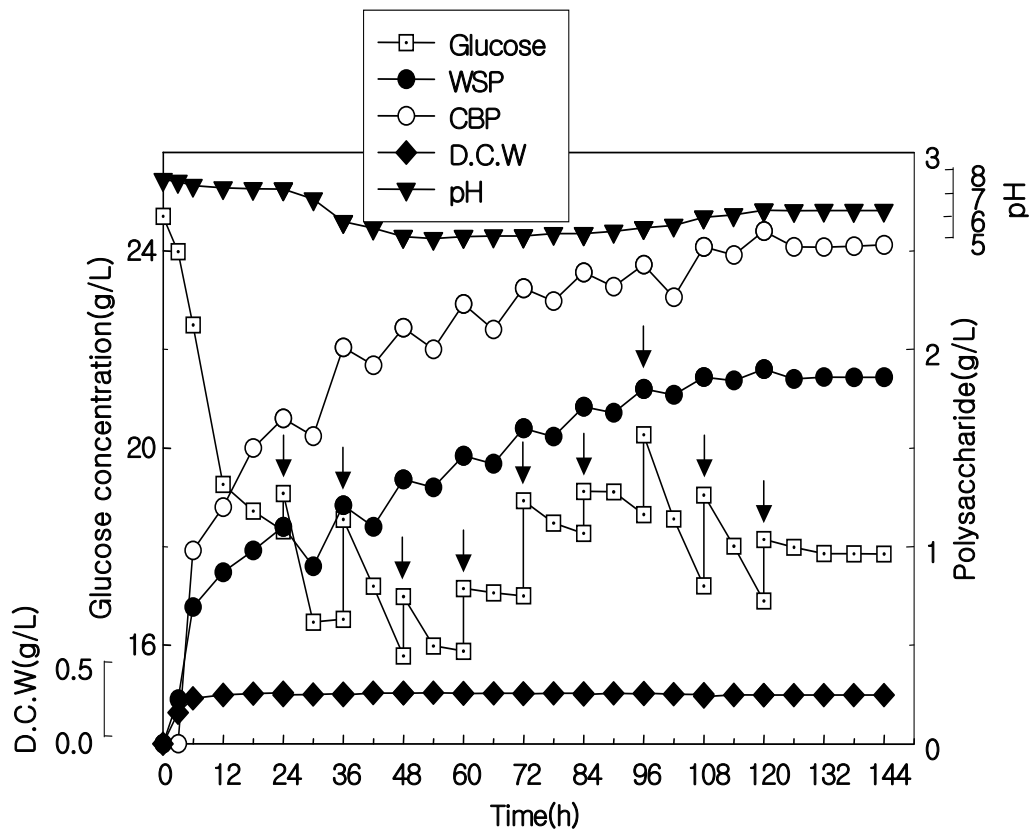


Fig. 56. Time course on the polysaccharides produced by marine bacterium *Zoogloea* sp. in 7 L fermentor with the semicontinuous culture. The arrows(\downarrow) indicated the time in which the medium (12.5 g glucose/500 ml medium) has been replaced. Supply with feed in an interval for 12h.

Table 20. Comparison of the batch, fed batch and semicontinuous culture for the polysaccharides production by *Zoogloea* sp.

Kinetic parameters	Batch culture	Fed batch culture	Semi continuous culture
Polysaccharides concentration (g/L)	11.34	6.276	8.226
Polysaccharides yield (g product / g glucose utilized)	0.995	0.510	0.777
Specific polysaccharides production rate (g polysaccharides / g biomass dry weight per day)	4.312	2.929	4.674
Biomass concentration (g/L)	0.526	0.430	0.309
Biomass yield (g biomass dry weight / g glucose utilized)	0.046	0.035	0.033
Specific biomass production rate (g biomass dry weight / g glucose utilized per day)	0.009	0.007	0.007
Specific glucose uptake rate (g glucose / g biomass dry weight per day)	4.311	5.720	6.067
Final polysaccharides productivity (g polysaccharides/ L total volume per day)	6.804	4.770	9.750

결론적으로, *Zoogloea* sp.(KCCM10036)로부터 polysaccharides를 생산하기 위해 반연속식 배양법이 가장 효과적인 방법인 것으로 사료된다.

7. 대형 발효조 적용 가능성의 검토

다당류를 대량생산하기 위해 scale up된 200 L fermentor에서 생산을 검토해 보았다. 발효형태는 본 연구를 결과를 토대로 semicontinuous fermentor를 사용한다.

가. 통기량(Air flow rate)에 따른 다당의 대량생산

200 L fermentor를 이용하여 working volume은 160 L, 1 vvm으로, DO sparger에서의 hole의 size 또한 scale up 할 필요가 있으며, sparger는 다양한 실험을 통해본 결과, spider sparger를 사용하는 것이 적당하다고 판단되어진다.

나. Substrate

기질로는 2.5 %(w/v) glucose(저가의 대용량 포대시약)를 사용하며, foam에 의해 다량의 배양액이 overflow되는 것을 막기 위해서 1 %(w/v) antiform을 사용한다.

다. Agitation speed

교반속도에 앞서 impeller의 종류는 rushton turbine impeller를 사용해야 되지만, 배양시간이 지남에 따라 viscosity 증가하게 되면 vessel 내각에 stagnant zones가 발생한다. 그러므로, impeller를 anchor impeller와 rushton turbine impeller를 함께 사용하는 것이 더 효율적이다. Agitation speed는 400 rpm으로 설정하였다.

라. Temperature

배양은 30 °C를 유지하며, lab형의 heating pad와는 다른 scale up에 있어서 external heat exchanger형으로 하는 것이 온도유지에 이점이 있다.

마. pH

배양 초기에 pH 7.8을 유지 배양한다.

바. Inoculum size

최적 inoculum size인 2.5 %(v/v)를 접종한다.

사. Feeding volume

Feeding volume은 working volume의 2.5 %(v/v)를 유지한다.

아. Feeding interval

배양을 통한 feeding interval은 24 hr 간격을 두고 replace한다.

이와 같은 조건을 통하여 대형 발효조에서 배양하였을 경우, 앞선 결과를 미루어 볼 때 200 L의 발효기에 working volume 160 L을 semicontinuous fermentor로 배양했을 경우 scale up에 따른 표면적비와 배양 환경조건의 변화로 인해 다소 생산에 차이는 있을 것으로 보며, 대량 생산을 하였을 경우 시간에 따른 생산비 절감을 가져올 것으로 사료된다.

8. 대량 분리 공정법의 개발

발효 생성물의 회수와 분리·정제는 어떤 상업적인 공정에서도 필수적이다. 발효액의 화학적 성질이 아주 복잡하거나 순도 높은 생성물이 요구되는 경우, 분리와 정제는 많은 공정단계를 필요로 한다. 발효생산물의 분리와 정제에 차지하는 비용은 전체 제조 비용 중 20 - 60 %를 차지하므로 어떤 경우에는 제조비용에 있어서 생성물 생산보다 더 많은 비용이 든다. 공정의 수율을 높이기 위해서는 공정장치의 선택이 중요하고 공정에 사용하는 장치는 배양이 끝난 배양물을 허용된 시간내에서 처리될 수 있도록 하는 적절한 처리능력을 가지고 있어야 한다. 따라서 대량생산을 위해서 기능성 다당의 수율도 높이는 동시에 분리·정제 비용도 절감할 수 있는 공정법을 개발하였다.

9. 대량 생산을 위한 고수율의 설계

해양미생물 *Zoogloea* sp. 유래 기능성 다당류를 대량생산하기 위한 설계공정을 나타내었다. 그림에서 볼 수 있듯이 공정은 크게 발효(생물반응)부분과 제품 분리·회수부분으로 나누었다.

미생물 발효 배양액으로부터 기능성 다당류의 분리·정제를 위한 공정은 Fig. 57과 같다. 전 Flask level에서 전배양된 미생물 배양액을 2.5 % Inoculum volume으로 종 배양조(7 L)로 접종한 후(4), 18시간동안 최적배양조건에서 배양한다. 종 배양 종료 후 같은 양의 Inoculum volume를 대형 발효조(200L)에 옮겨 배양시킨다. 배양된 액은 연속 원심분리기(7)를 통해 cell과 배양 상등액으로 분리한다. 배양 상등액은 추출조(8)로 옮겨 아세톤 용매·추출하고 나면 WSP가 회수되며, 가라앉은 cell은 추출조(9)로 옮겨져 아세톤 용매추출을 하고나면 CBP가 회수된다. 회수된 WSP와 CBP는 각각 투석조(12, 13)로 옮겨져 탈염과정을 거치고, 건조 및 정제한 후 포장하면 완제품이 생산된다. 아세톤 추출 후 사용된 아세톤은 진공증발기(11)를 거쳐 재사용할 수 있다. 공정의 효율 및 안정화를 위해 요건으로 종균 및 본 배양에서의 소포제는 최소화하였고 용매의 다당 분리능은 다당의 추출량과 직결되는 문제이므로 반응 후 용매회수는 3회 이하로 제한하였다. CBP의 경우 균체와 복합체를 형성하고 있기 때문에 50 °C정도 가열하여 충분히 용매에 용해시킨 후 용매추출과정을 수행하였을 때 최대의 수율을 나타냈다.

본 발효공정은 4일의 본 배양과정을 거친 후 원심분리~제품포장까지의 전 단계는 10일이 소요되며 1 cycle 당 2 kg의 양질의 고기능성다당류를 생산할 수 있다.

10. 생산 실용화 기술개발

여러 가지 미생물에 의해 생산되는 미생물 다당류는 특이한 물성을 나타내는 수용성 고분자이다. 물리적 성질의 다양성으로 인하여 미생물 다당류는 식품, 의약 및 기타 산업에서 널리 응용되고 있다. 이러한 생물고분자는 고분자 재료로서 산업적으로 중요한 위치를 차지하게 될 것이며, 해조류 및 기타 식물에서 생산되는 천연 gum과 경쟁이 가능하게 될 것이다. 특히 유전 공학의 발달과 더불어 우수한 유전자 조작 균주에 의해 다양하고 독특한 성질의 생물고분자 생산도 기대할 수 있으며, 지속적으로 수요가 증가하게 될 것이다. 생물고분자들은 현재 식품첨가물, 화장품 첨가제, 특수 화학약품, 에너지 생산용 화학약품, 의약품, 바이오 의약품 등으로 다양하게 이용되고 있으며, 이들의 응용성은 수용액계에서의 물성학(rheology)적 특성에 좌우된다. 다당류의 유변학적 성질은 응용분야에서도 중요할 뿐만 아니라 이를 생산하는 발효에 있어서도 매우 중요하다. 일반적으로 다당류의 생산에 의하여 발효조내의 점도가 증가하여 교반 및 산소전달과 열 제거의 어려움으로 생산원가의 상승을 초래한다. 발효 초기에는 뉴튼 유체에서 발효가 진행됨에 따라 비뉴튼 유체로 변화한다. 그러나 대부분의 고분자가 의가소성 성질을 가지고 있어 일정 농도 이상에서는 동력의 증가는 그다지 심하지 않다

Zoogloea. sp. 유래 hetero형의 다당류는 생분해성이므로 공해문제가 없고, 인체에 대한 독성이 없어 인체에 흡수되면 소화기관에서 거의 분해가 일어나지 않아 저 칼로리 식품첨가제로 주목 받고 있다. 또한 각종의 생리활성도 밝혀져 제약공업에서의 첨가제로서도 주목받은 바, 매우 밝은 용도 전망을 보이고 있으며 고도 생산기술의 적용으로 많은 신규 다당의 취득과 무한한 응용이 기대된다.

11. 다당류 첨가 수산 연제품의 최적 가공조건

새로운 식품의 개발에 있어서 소재가 점유하는 역할은 매우 중요하다. 고분자 다당류는 식품 중에 미량의 존재로 기능을 발휘하는 소재이므로 다당의 이용은 그동안 각종 식품공업에서 전통적인 식품제조기술로서 널리 행해져 왔다. 본 연구에서 생산한 미생물 유래 고기능성 다당은 항균, pH, 열안정성 등의 특징을 가지고 있다. 또한 중금속 흡착, 유화, 보습, 응집활성, 탄력, 겔형성, 필름형성, 인장강도, 조직형성능 등과 같은 물리·화학적 특성을 함유하고 있어 식품 소재로 첨가할 경우, 기능성 제품의 개발과 저장성 연장이 가능하다.

현재로서는 식품관련 다당류 중 가장 다양하게 사용되는 것은 전분과 셀룰로오스이며 미생물 다당류는 매우 작은 부분을 차지하는데 불과하다. 그러나 미생물 다당류 또는 이의 유도체는 이미 알려진 식품 및 해조류 유래의 천연 다당류나 기타 합성고분자와는 달리 독특한 물성과 생리활성을 나타낸다. 또한 미생물 다당의 또 다른 이점은 천연적으로 유래하여 독성이 낮고 생분해되므로 환경적으로 안정하다는 장점이 있다.

이러한 장점을 살려 *Zoogloea* sp.가 생산하는 고기능성 polysaccharide를 어육 연제품에 첨가하여 우수한 고기능성 품질의 어육소세지를 얻기 위해 다음의 실험을 실시하였다.

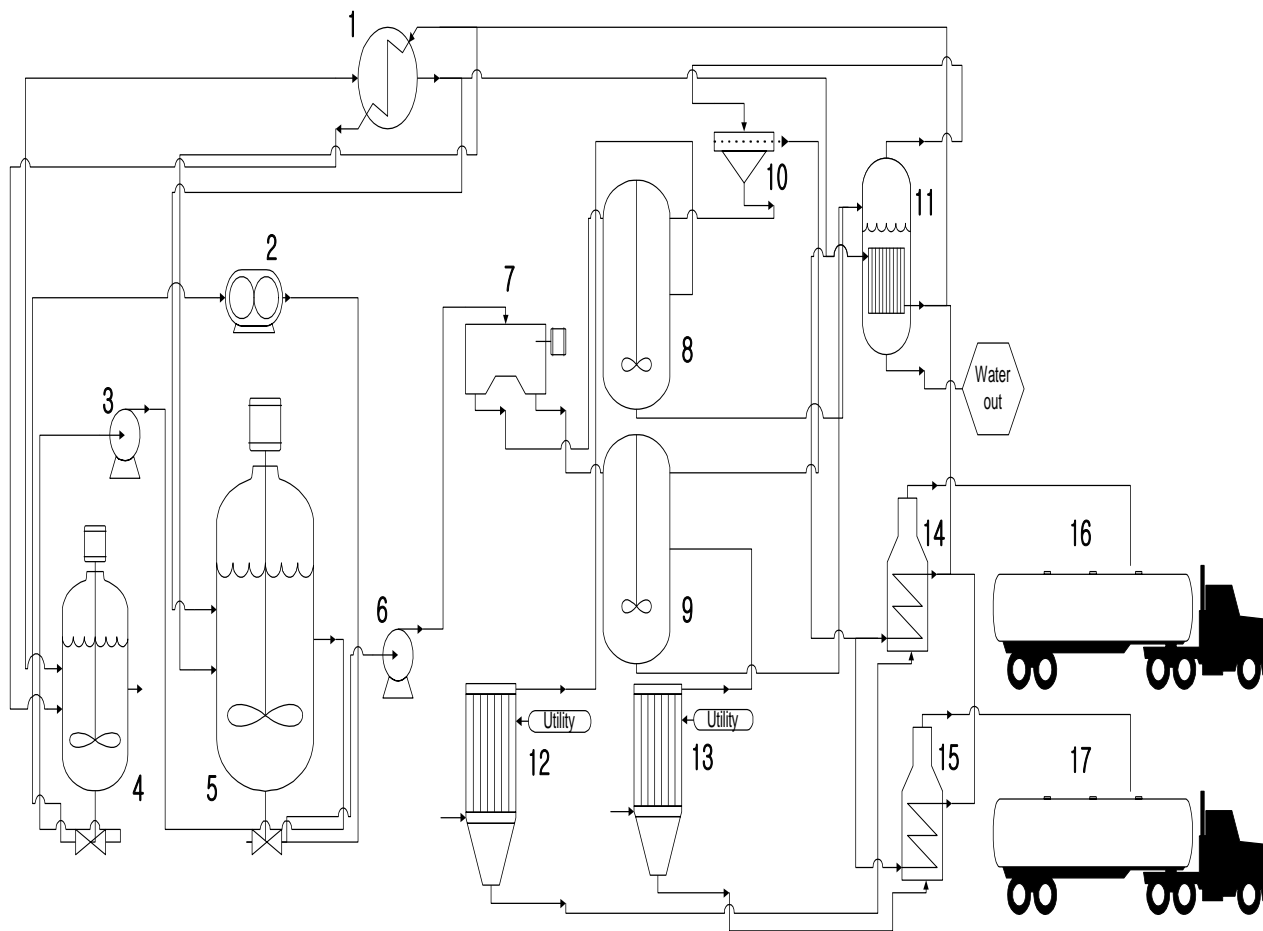


Fig. 57. The process flow chart for polysaccharides production.

- | | | |
|-----------------------------|------------------------|------------------------|
| 1. Boiler | 2. Air compressor | 3. Pump 1 |
| 4. Tank 1(Seed Culture, 7L) | 5. Tank 2(200L) | 6. Pump 2 |
| 7. Centrifuger | 8. Extractor 1 for WSP | 9. Extractor 2 for CBP |
| 10. Solvent | 11. Evaporator | 12. Dialyzer 1 for WSP |
| 13. Dialyzer 2 for CBP | 14. Dryer 1 for WSP | 15. Dryer 2 for CBP |
| 16. Product 1 for WSP | 17. Product 2 for CBP | |

가. Polysaccharide의 최적화 농도

본 실험에서는 다당(WSP, CBP)을 농도별로 첨가하였을 때 물성과 색차값을 통하여 최적 농도를 알아보았다(Table 21, Fig. 58~61). 각각의 다당을 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 %(w/v)의 농도로 첨가하여 측정된 결과, WSP의 경우 whiteness는 무첨가에 비해 다소 높았으며, breaking force는 0.02 %에서 174 g이었고, deformation는 무첨가가 더 높게 나타났다. CBP의 경우 whiteness는 0.06 %에서 가장 높았고, breaking force는 무첨가보다 낮았으며, deformation는 0.02 %에서 5.45 mm 였다.

이상의 결과에서 WSP와 CBP의 최적 농도는 각각 0.02 %로 선정할 수 있었으며 이후 모든 실험은 0.02 %의 polysaccharides를 사용하였다.

나. pH 변화와 salt concentration의 농도에 따른 영향

Alaska pollack surim gel에 pH의 변화와 salt 농도에 따른 물성의 영향을 알아보았다(Table 22). Salt의 농도는 현재 통용되는 1.5 %(Europe), 2.0 %(U.S.A), 3.0 %(Japan)으로 실험을 하였다.

WSP의 경우, whiteness는 No.2, 5, 6이 유사한 값을 나타냈으며(Fig. 62), deformation No.1, 2, 3 유사값이며, breaking force는 No.1, 2, 3가 유사값이었다(Fig. 63). CBP의 경우 whiteness는 No.7이 높았으나(Fig. 64), 전체적으로 비슷한 값이었으며, breaking force는 No.1,2이 높았으며, deformation는 No.1, 2이 가장 높게 나왔다(Fig. 65).

이 결과를 살펴볼 때, WSP, CBP가 유사한 수치를 나타냈지만, No.2를 최적 선정하였다. Table 22.에서 No.가 올라감에 따라 물성값이 감소하는 경향을 볼 수 있다.

이는 surimi gel를 형성하기 위해 염의 첨가하는 염은 myosin을 녹이고 가열 중에 myosin의 망상구조에 기여함으로써 탄성적인 겔의 형성에 중요한 역할을 행사하기 때문에 surimi의 가열 겔 형성을 위해 염의 첨가는 필수적이지만, 염의 함량이 증가함에 따라 breaking force의 값이 감소하는 경향을 나타냈다. 또한 Fig. 66, 67에서와 같이 물성값과 pH, salt의 농도와의 상관관계를 볼 수 있다.

WSP와 CBP 모두 deformation의 경우 pH에 대해서는 약간의 증가를 나타냈으며, breaking force는 salt와 pH가 증가함에 감소하였다.

다. 연제품의 folding test

Folding test는 3 mm 두께의 겔을 엄지와 집게손가락으로 접었을 때 금이 생기는 한계를 측정하여 등급으로 표기하였으며(Table 23), WSP와 CBP 각각의 시료를 측정된 결과 WSP의 salt conc.(%) 1.5 %, pH 7.5의 surimi gel이 가장 높은 AA의 등급이었고, breaking force와 deformation의 값이 높음에 따라 folding test 값이 상대적으로 높았다.

Table 21. Changes in whiteness, deformation and breaking force of adding polysaccharides to Alaska pollack surimi gel

	Polysaccharide conc.(%)	Whiteness	Deformation (mm)	Breaking force(g)	Deviation (W)	Deviation (D)	Deviation (F)
WSP	0.00	62.20	5.66	165	1.29	0.30	8.82
	0.02	63.11	4.86	174	0.74	0.49	11.30
	0.04	63.93	4.89	156	0.48	0.37	6.43
	0.06	63.82	5.27	147	0.47	0.34	8.44
	0.08	63.21	4.33	136	0.92	0.28	4.10
	0.10	63.44	4.52	124	0.78	0.10	3.97
	CBP	0.00	56.78	5.25	158	1.20	0.51
0.02		58.27	5.45	151	0.77	0.42	13.14
0.04		59.84	4.52	135	0.91	0.25	3.29
0.06		59.97	4.54	140	0.98	0.27	7.23
0.08		58.35	4.80	129	0.19	0.50	4.98
0.10		57.29	4.32	113	0.26	0.52	6.83

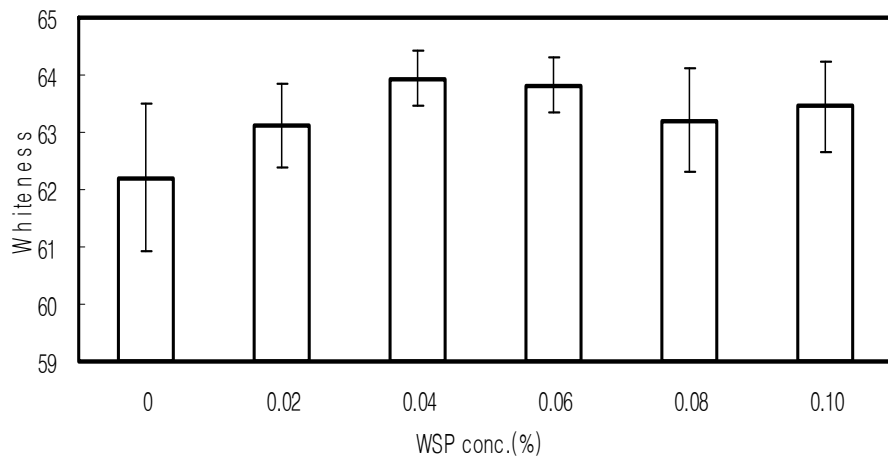


Fig. 58. Effect of WSP on whiteness of Alaska pollack surimi gel.

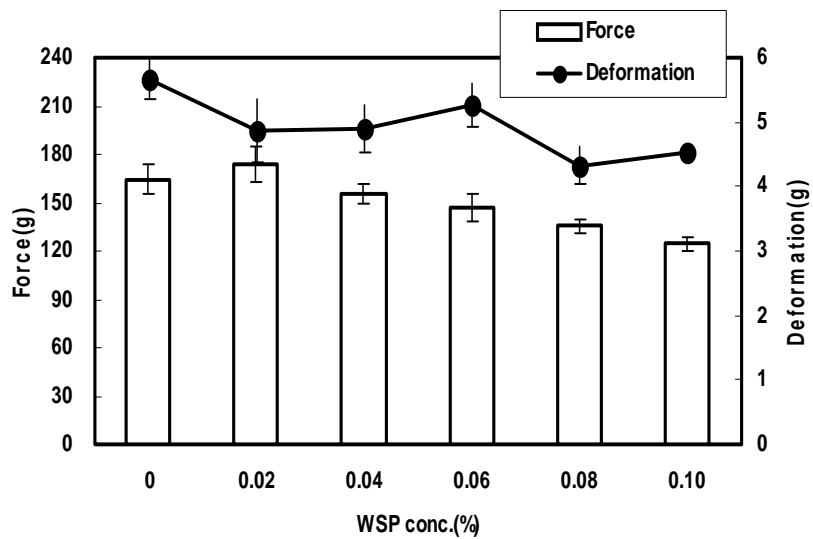


Fig. 59. Effect of WSP on breaking force and deformation of Alaska pollack surimi gel.

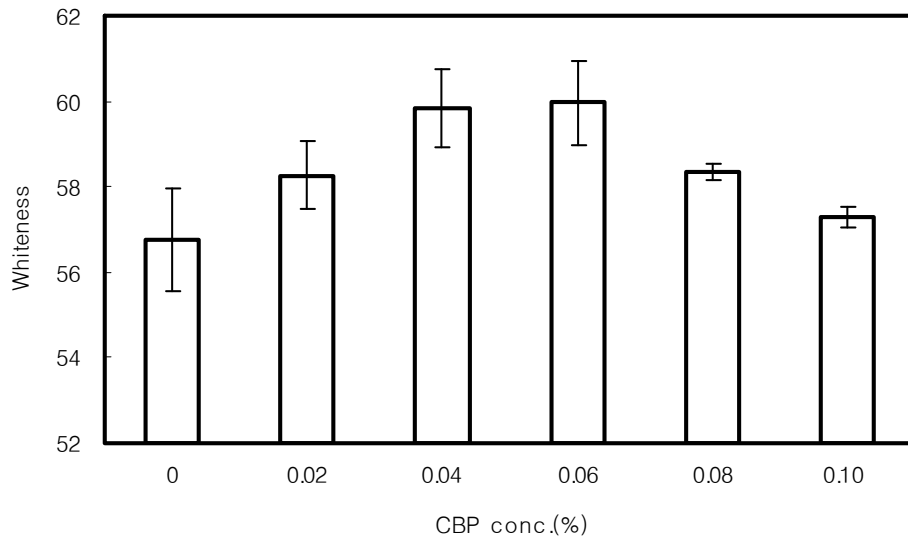


Fig. 60. Effect of CBP on whiteness of Alaska pollack surimi gel.

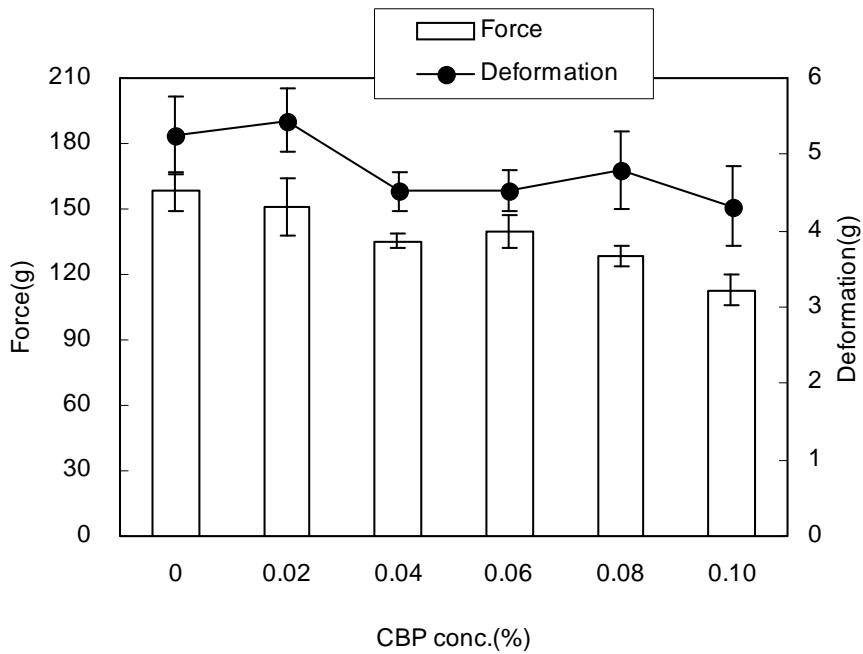


Fig. 61. Effect of CBP on breaking force and deformation of Alaska pollack surimi gel.

Table 22. Changes in whiteness, deformation and breaking force of pH and salt various Alaska pollack surimi gel containing polysaccharides

NO.*	Whiteness	Deformation (mm)	Breaking force(g)	Deviation (W)	Deviation (D)	Deviation (F)	
	1	64.11	6.59	225.00	0.21	0.33	16.09
	2	64.60	7.49	245.20	0.43	0.56	10.92
	3	64.05	7.52	253.20	0.12	0.37	11.54
	4	64.53	6.69	221.00	0.29	0.31	5.39
WSP	5	64.75	6.64	179.20	0.50	0.30	5.63
0.02%	6	64.63	6.80	187.00	0.67	0.36	6.63
	7	63.62	5.88	146.60	0.71	0.20	5.68
	8	63.62	6.30	150.80	0.89	0.32	7.79
	9	63.82	6.08	137.40	0.29	0.20	7.73
	1	60.05	5.63	164.00	0.60	0.28	8.72
	2	60.04	5.74	170.00	1.15	0.43	13.56
	3	61.15	5.49	134.40	0.84	0.24	1.52
	4	61.08	5.26	137.20	0.61	0.24	5.40
CBP	5	60.17	5.19	147.40	0.78	0.21	6.07
0.02%	6	60.16	5.23	133.00	0.41	0.19	5.52
	7	62.35	5.16	94.00	0.96	0.30	3.54
	8	61.29	4.82	96.40	0.86	0.24	3.85
	9	60.05	4.73	86.80	0.56	0.20	4.55

- * 1. salt(%)1.5, pH7
2. salt(%)1.5, pH7.5
3. salt(%)1.5, pH8
4. salt(%)2, pH7
5. salt(%)2, pH7.5
6. salt(%)2, pH8
7. salt(%)3, pH7
8. salt(%)3, pH7.5
9. salt(%)3, pH8

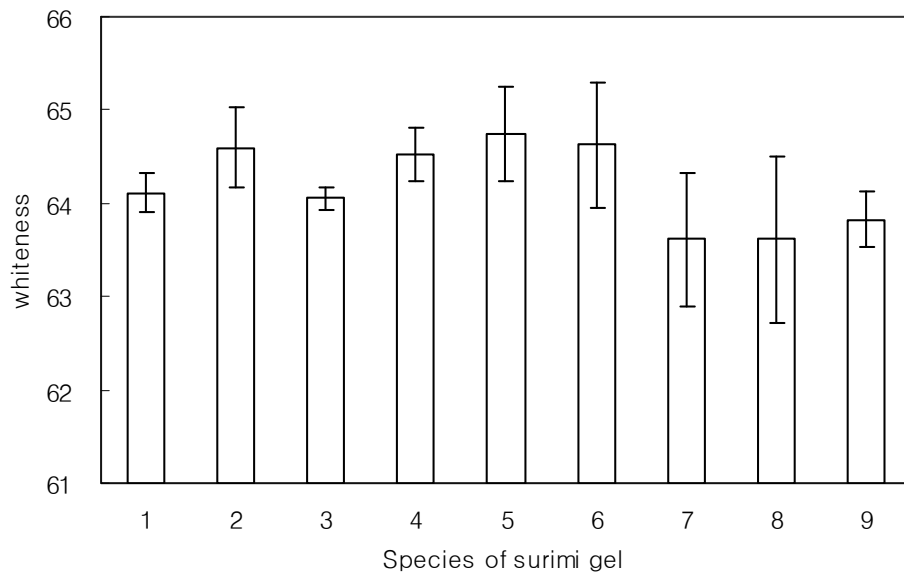


Fig. 62. Effect of salt concentration and pH on whiteness of various Alaska pollack surimi gel containing WSP.

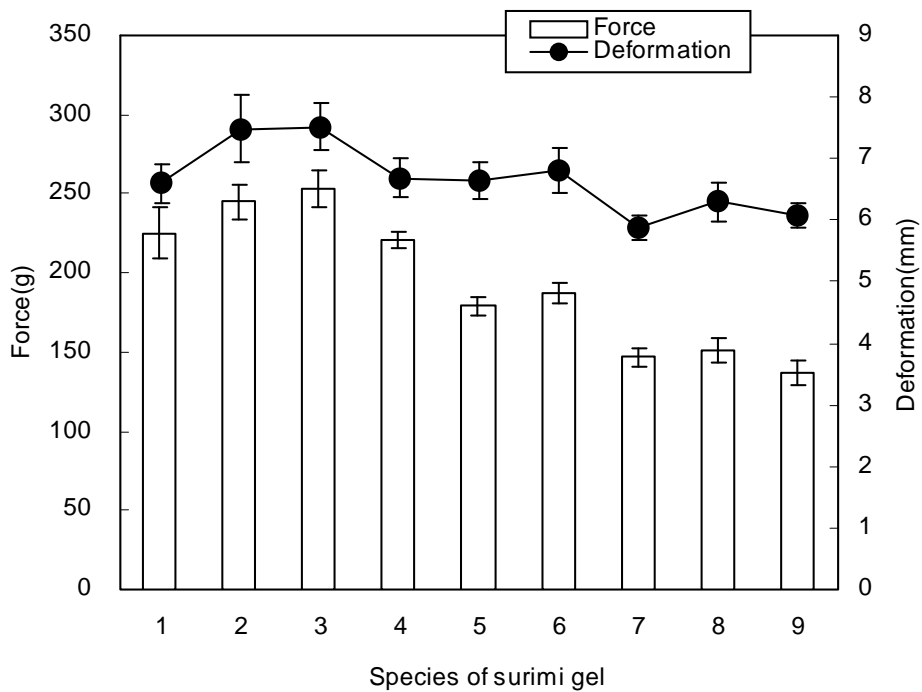


Fig. 63. Effect of salt concentration and pH on breaking force and deformation of various Alaska pollack surimi gel containing WSP.

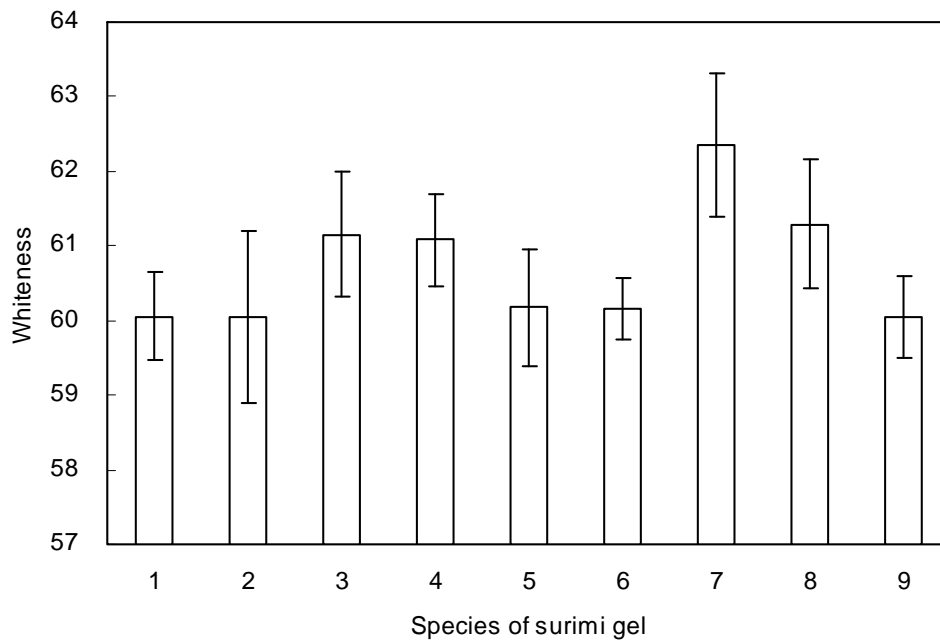


Fig. 64. Effect of salt concentration and pH on whiteness of various Alaska pollack surimi gel containing CBP.

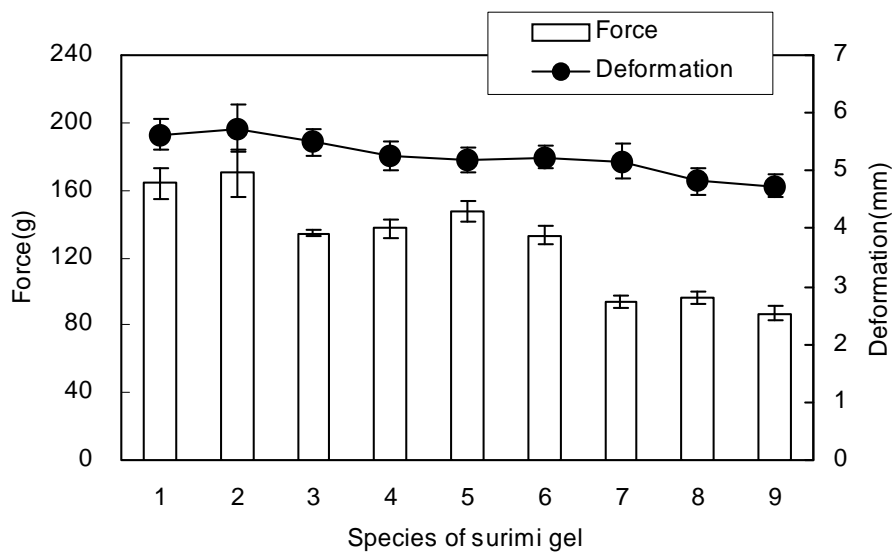


Fig. 65. Effect of salt concentration and pH on breaking force and deformation of various Alaska pollack surimi gel containing CBP.

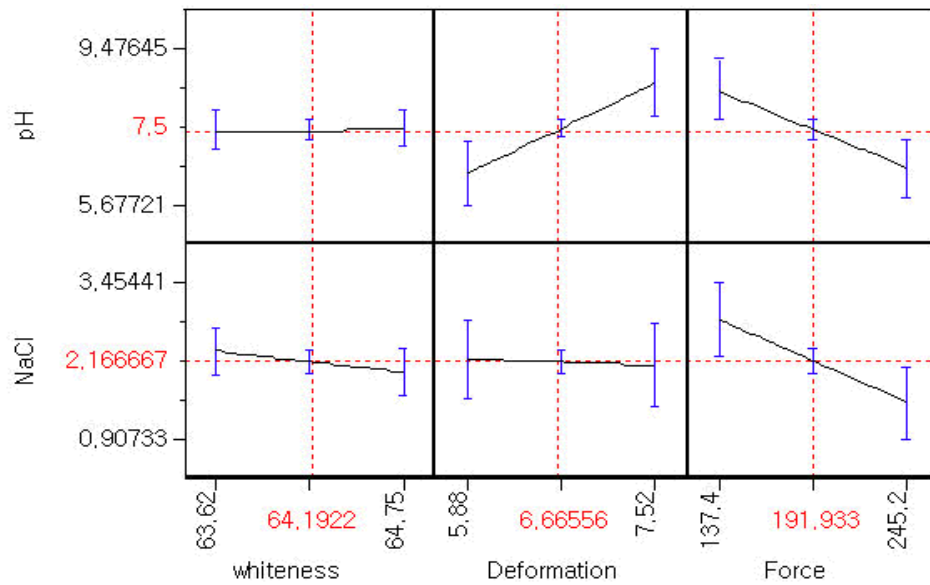


Fig. 66. Prediction profiler of salt concentration and pH on whiteness, deformation, breaking force of Alaska pollack surimi gel containing WSP.

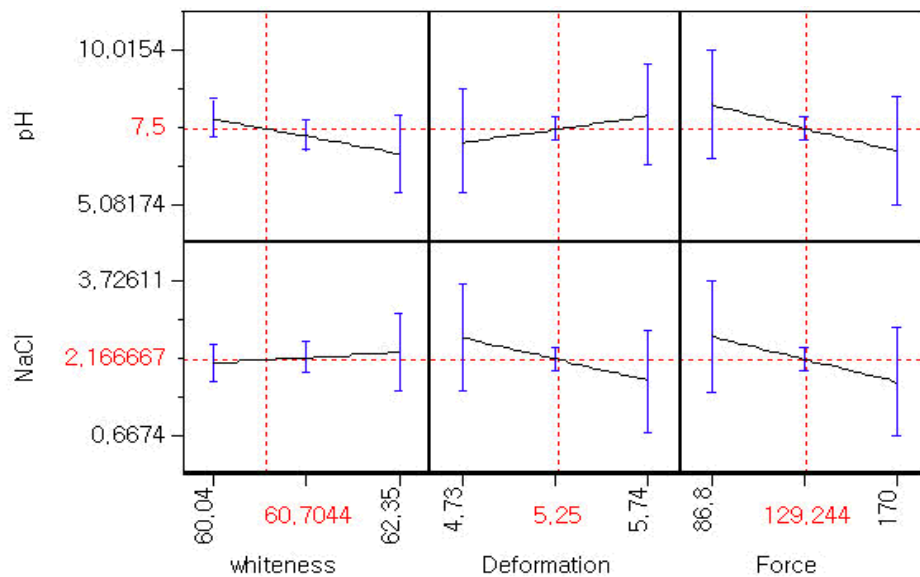


Fig. 67. Prediction profiler of salt concentration and pH on whiteness, deformation, breaking force of Alaska pollack surimi gel containing CBP.

Table 23. Effect of salt concentration and pH on folding test of various Alaska pollack surimi gel containing polysaccharides

Species of surimi gel		WSP	CBP	
Salt conc. (%)	pH	Grade		
1.5	7	B	C	AA= No crack occurs after folding twice, but no crack occurs after folding once
	7.5	AA	A	A= Crack occurs after folding twice, but no crack occurs after folding once
	8	A	B	B= Crack occurs gradually after folding once
2	7	A	B	C= Crack occurs immediately after folding once
	7.5	B	C	
	8	B	C	
3	7	C	C	D= Breakable by finger press without folding
	7.5	C	B	
	8	C	C	

라. 최적가공조건에 따른 비교검토

앞에서 실험한 결과, 최적가공조건은 pH 7.5, salt concentration 1.5 % 그리고 WSP, CBP의 농도는 0.02 % 이었다.

대조구는 당을 첨가하지 않은 것으로 WSP와 CBP 비교한 결과 whiteness는 WSP가 가장 높은 값을 나타냈다(Fig. 68). 이는 WSP만의 자체 색깔을 보여주는 것이었으며, deformation은 WSP가 7.49mm로 가장 높았으며 CBP는 대조구 보다 다소 높은 값을 나타냈다.(Fig. 69) breaking force는 WSP와 CBP 모두 대조구 보다는 높은값을 나타냈으며 WSP 같은 경우 대조구에 비해 2배에 가까운 breaking force를 나타냈다. 전체적으로 WSP는 CBP에 비해 높은 물성값을 나타냈다. 이에 수산가공제품에 다당첨가 함에 좋은 결과를 얻을 수 있으며, 저농도로 첨가하여도 물성에 큰 영향을 미치는 것을 나타냈다(Table 24).

12. Potassium Sorbate 첨가 유무에 따른 물성의 검토

가. Potassium Sorbate 미 첨가에 따른 물성의 변화

소르빈산칼륨은 방부제로 사용되는 물질로 부패 미생물이 번식해서 부패할 수 있는 음식에 미생물의 발육을 억제하기 때문에 미생물이 더 이상 번식을 할 수 없게 만드는데, 소르빈산칼륨을 첨가하지 않은 것을 10일 동안 물성의 변화를 비교 검토하였을때, Whiteness는 다당류를 비교하였을때, WSP가 가장 높게 나왔으며, deformation과 Breaking force는 전반적으로 시간에 지남에 따라 서서히 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 70~72). 이는 시간이 지남에 따라 미생물에 의한 부패로 사료되어진다.

나. Potassium Sorbate 첨가에 따른 물성의 변화

소르빈산칼륨을 2g/kg의 농도로 첨가하여 제품의 물성변화를 검토하였을때, whiteness는 다당류를 첨가하지 않는 것에 비해 상대적으로 모두 높았으며, deformation 또한 일정한 값을 유지하였다. 이는 소르빈산칼륨이 미생물의 번식을 막는, 방부제이므로 surimi gel의 조직 변성을 방지하였으며, 생균수 측정시, 물성측정을 하는 동안 생균수는 전실험에 걸쳐 검출되지 않았다.(Data not shown) deformation과 breaking force 또한 시간이 지남에 따라서도 일정값을 유지하였고, breaking force는 CBP의 경우 Xanthan 보다 높은값을 나타내었으며, WSP의 경우도 Carrageenan, Dextran, Curdlan 보다는 좋은 값을 나타냈다(Fig. 73~75).

다. 향료첨가에 따른 물성비교

제품 향미의 향상을 위해 분말치즈, 슬라이스치즈, 계향, 새우향을 첨가하여 시판중인 D사와 C사의 제품의 물성을 비교 검토하였다(Table 25). 결과적으로 향료를 첨가하지 않는 제품의 breaking force는 189.40g를 나타냈으며, 계향과 새우향은 이와 유사한 결과값을 나타내었다. 또한 현재 시판중인 D사와 C사의 제품과 비교하였을 때, 유사하거나 다소 높은 값을 나타내었

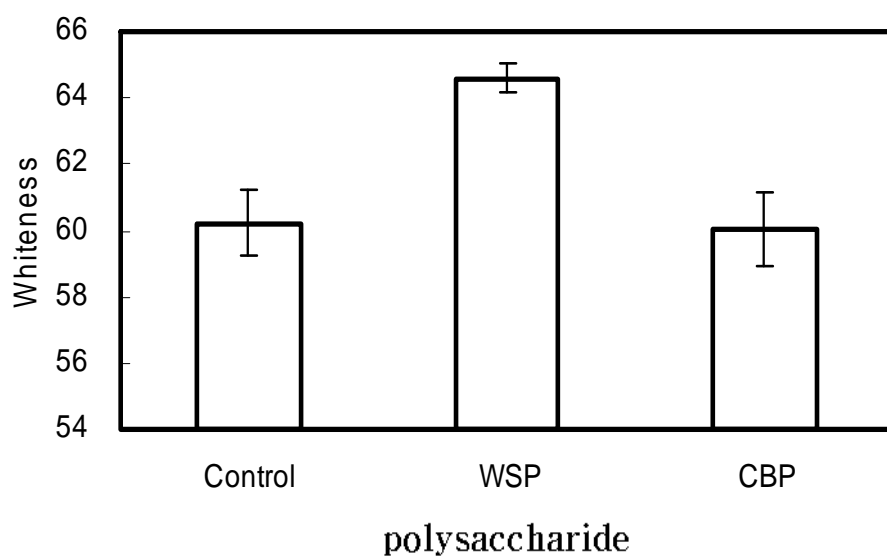


Fig. 68. Effect of polysaccharides on whiteness of Alaska pollack surimi gel.

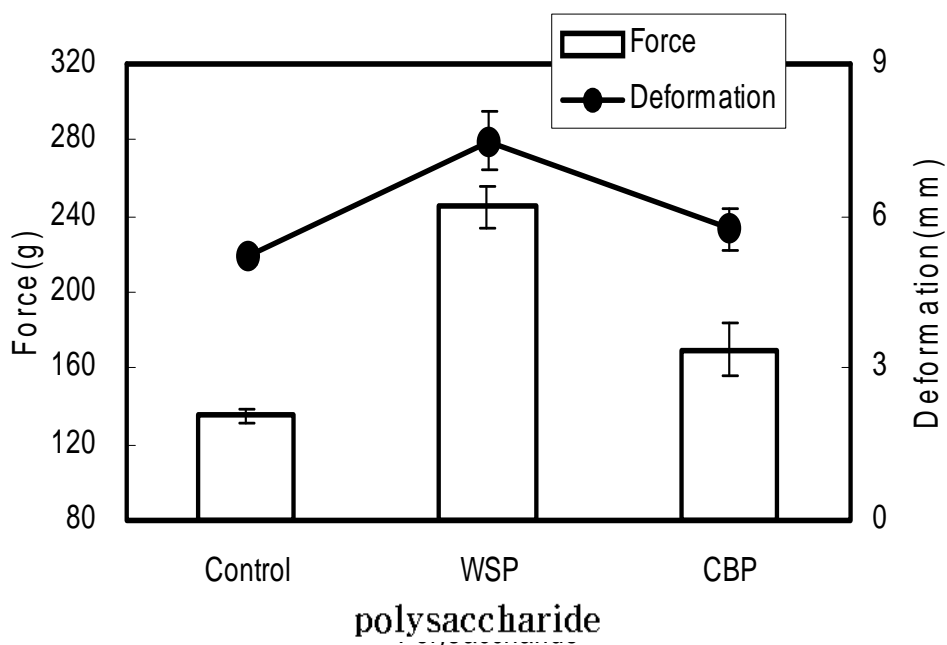


Fig. 69. Effect of polysaccharides on breaking force and deformation of Alaska pollack surimi gel.

Table 24. Effect of polysaccharides on whiteness, breaking force and deformation of Alaska pollack surimi gel

	Whiteness	Deformation (mm)	Breaking force(g)	Deviation (W)	Deviation (D)	Deviation (F)
Control	60.22	5.20	135.00	1.00	0.17	3.32
WSP	64.60	7.49	245.20	0.43	0.56	10.92
CBP	60.04	5.74	170.00	1.15	0.43	13.56

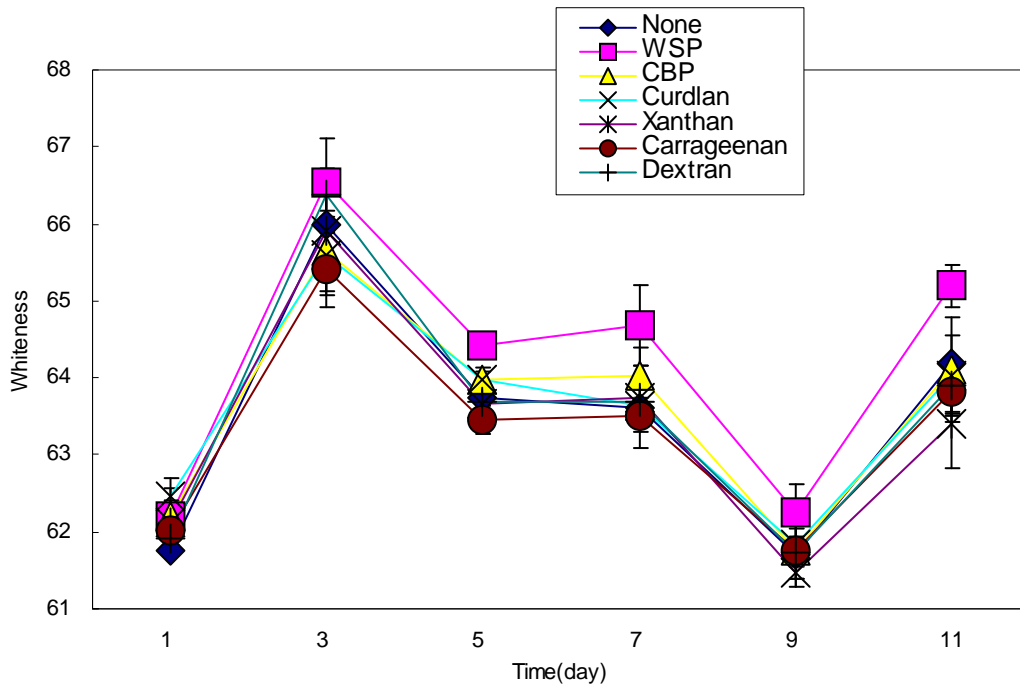


Fig. 70. Effect of polysaccharides on whiteness of Alaska pollack surimi gel.

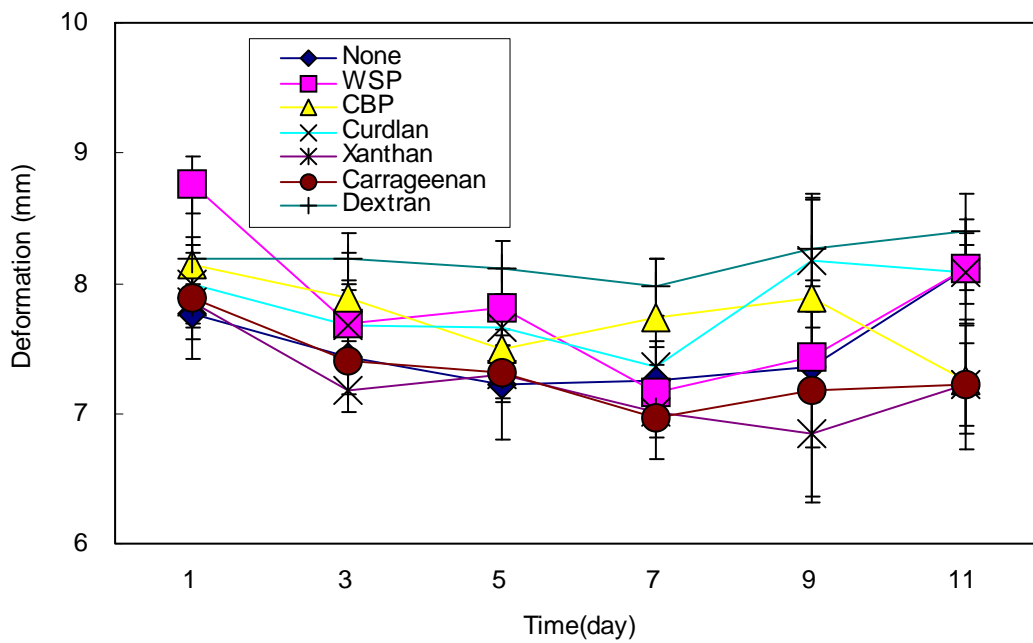


Fig. 71. Effect of polysaccharides on deformation of Alaska pollack surimi gel.

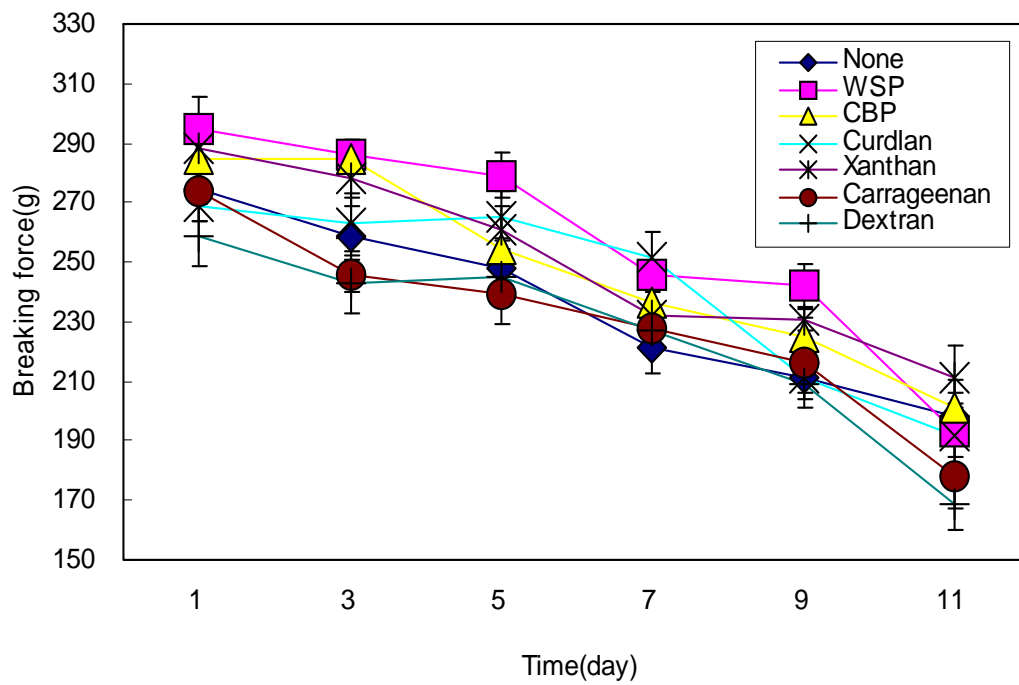


Fig. 72. Effect of polysaccharides on breaking force of Alaska pollack surimi gel.

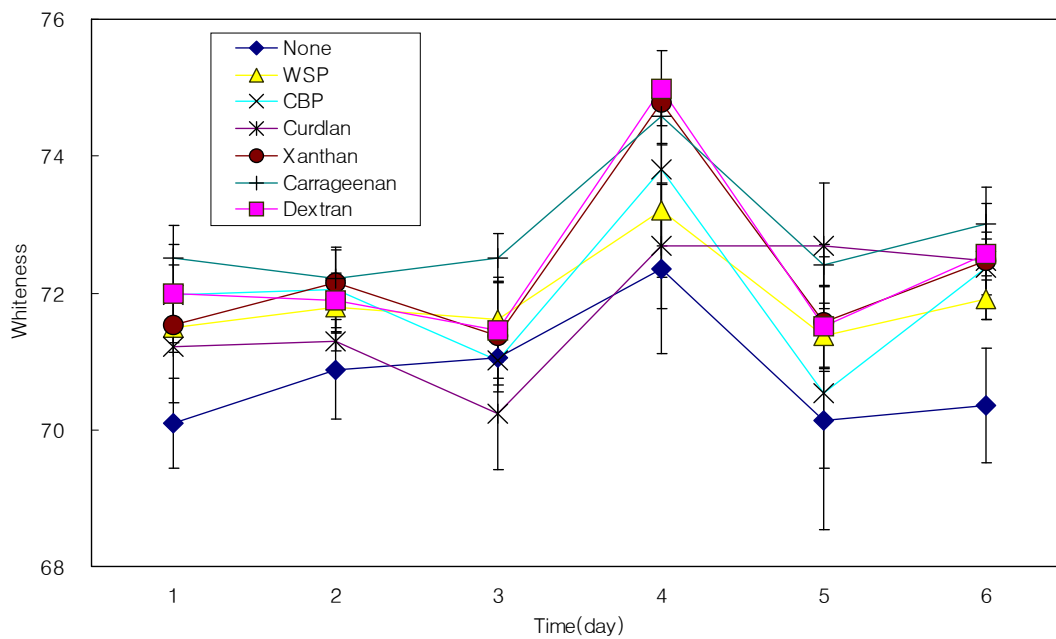


Fig. 73. Effect of potassium sorbate on whiteness of surimi gel.

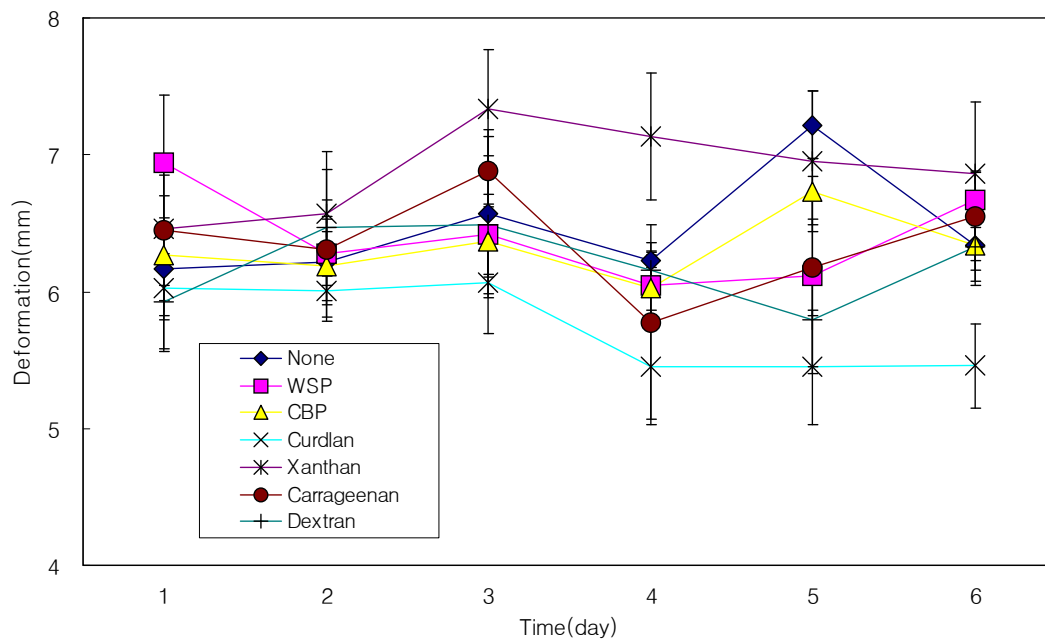


Fig. 74. Effect of potassium sorbate on deformation of surimi gel.

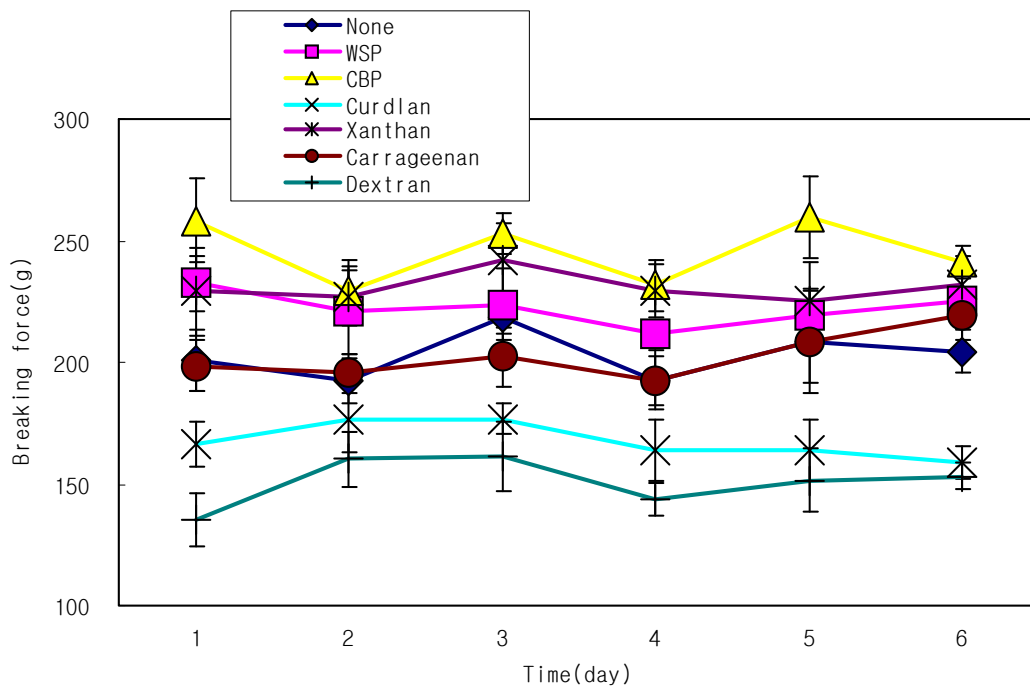


Fig. 75. Effect of potassium sorbate on breaking force of surimi gel.

Table 25. Comparison of rheology with surimi gel contains spicery

	Whiteness	Deformation (mm)	Breaking force(g)	STDEV (W)	STDEV (D)	STDEV (B)
향료 무첨가	72.92	6.13	189.40	0.55	0.56	5.32
분말치즈 첨가	54.66	4.29	45.80	0.37	0.27	2.59
슬라이스 치즈 첨가	69.56	4.79	64.40	0.66	0.14	3.36
계향 첨가	61.29	6.13	189.00	0.37	0.27	6.24
새우향 첨가	8.29	5.21	184.60	0.95	0.31	7.27
D사 제품	22.91	3.26	186.40	0.53	0.19	11.63
C사 제품	32.21	5.14	186.60	4.03	0.28	8.38

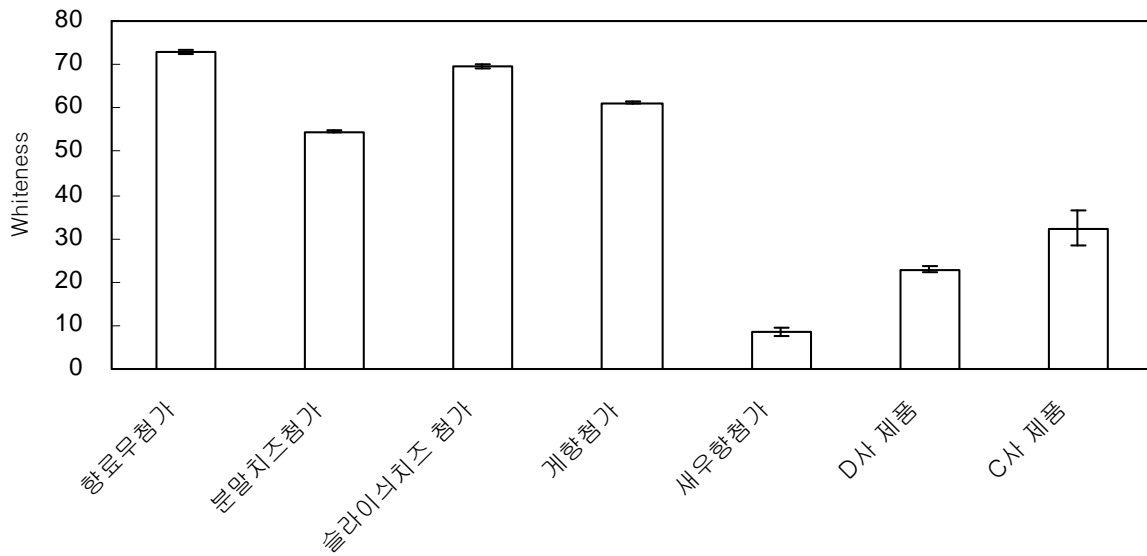


Fig. 76. Comparison of whiteness with surimi gel contains spicery

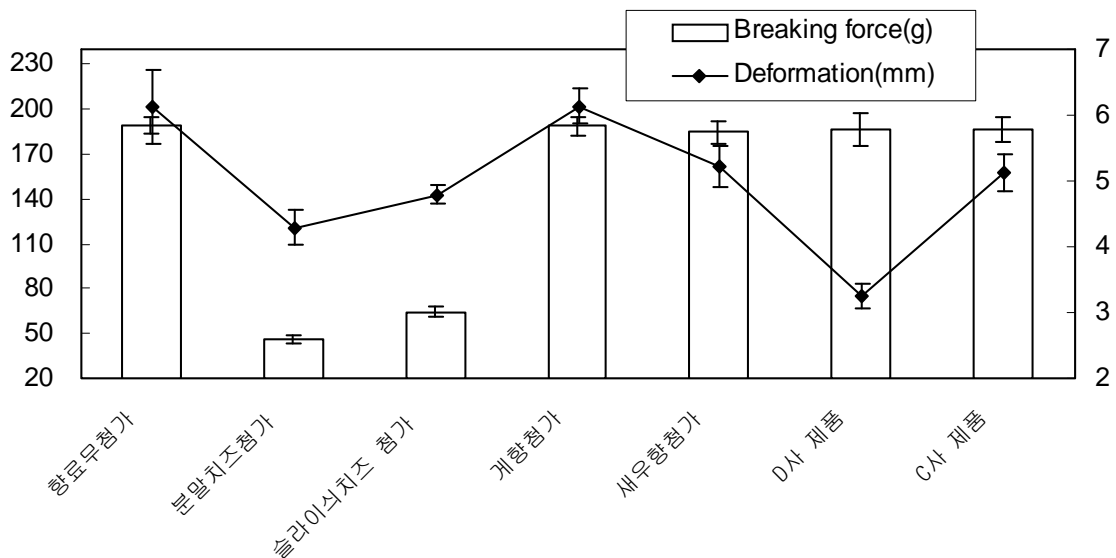


Fig. 77. Comparison of deformation and breaking force with surimi gel contains spicery

다. whiteness 는 각각의 향료의 선택으로 인하여 다소 차이가 있었다(Fig. 76~77).

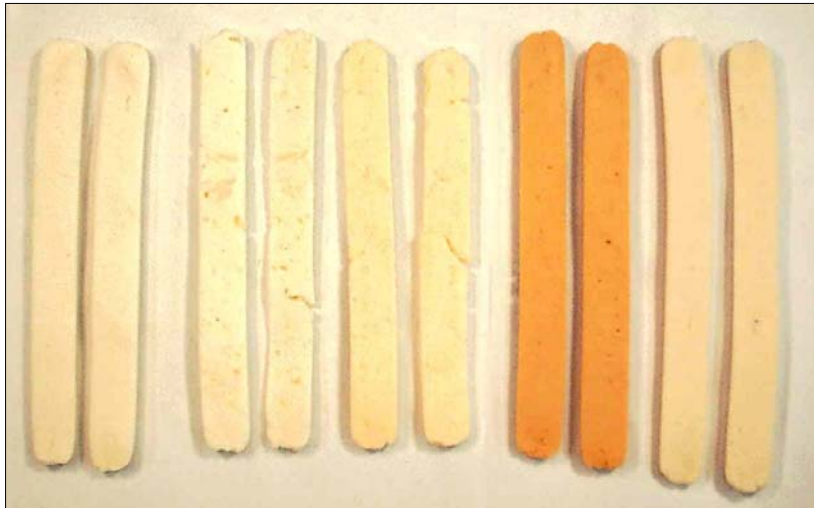
13. 시제품의 관능평가

관능평가는 7점 척도법에 의하여 향(냄새), 조직감, 색깔, 맛, 외관 5개 항목을 통하여 control 을 4점, 평가항목이 control 보다 우수할시 5, 6, 7점으로 표기, control보다 낮을시 3, 2, 1점으로 표기하였다(Table 26). 평가요원으로 20명을 선발하여 조사하였다. 결과적으로 1번 제품을 기준으로 하였을때, 2번과 3번은 1번과 유사한 수치를 나타냈다. 이는 향미효과를 내는 계, 새우향미를 첨가하지 않고도 제품화가 될 수 있을 것으로 사료된다(Fig. 78).

Table 26. Comparison of sensory evaluations with surimi gel contains spicery

평가항목 제품	향(냄새)	조직감	색깔	맛	외관
1	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
2	4.40±0.73	5.20±0.81	3.90±1.04	4.45±0.92	4.15±0.85
3	3.40±0.80	4.45±0.74	2.75±0.77	3.25±0.62	3.20±0.60
4	2.90±0.89	1.81±0.51	3.52±0.97	2.81±1.12	2.19±0.36
5	2.62±0.86	1.71±0.46	3.43±0.92	2.33±0.56	2.00±0.32

*1: 향료 무첨가, 2: 계향첨가, 3: 새우향첨가, 4: 분말치즈첨가, 5: 슬라이스치즈첨가



향료무첨가 분말치즈첨가 슬라이스치즈 새우향첨가 게향첨가

Fig. 78. The Final products

▣ 제 2 세부 과제 : Heteropolysaccharides 의 고 기능성 응용연구

1. 항암효과

MTT법으로 WSP와 CBP의 암세포에 대한 세포독성을 항암제인 bleomycin과 비교하여 Table 27 및 Fig. 79에 나타내었다. WSP는 F/S 세포와 LB 100-2세포에 대하여 세포독성을 나타내지 않았으며, CBP도 F/S 세포와 LB 100-2 세포에 별다른 독성을 보이지 않았다.

WSP와 CBP는 CEM/S 세포와 F/M 세포에서는 세포독성을 보이고 있는데, F/M 세포에 대한 WSP의 세포독성이 가장 강하였다. WSP가 항생제 감수성인 F/S 세포에는 아무런 영향이 없었는데 비하여 이 세포주의 다제내성 세포인 F/M 세포에 대하여는 강한 증식억제작용을 나타내고 있다. 항암제인 bleomycin의 F/S 세포에 대한 IC₅₀이 3.2 µg/ml에서 F/M 세포의 27 µg/ml로 약 8.4배 증가된 것에 비하여 WSP의 IC₅₀은 각각 795.1 µg/ml에서 63.7 µg/ml로 약 12.3배가 감소하였다. CBP도 F/S 세포에 비하여 F/M세포에서 IC₅₀이 약 2배정도 감소를 나타내었다. 이는 기존 보고된 항암제에 비해 뛰어난 항암활성을 가진다고 볼 수 있다. WSP에 의한 세포독성이 가장 높았던 F/M 세포를 택하여 세포독성과 apoptosis와의 관련성을 알아보기 위하여 bleomycin, WSP 및 CBP에 의한 apoptosis유도 여부를 조사하였다.

Bleomycin, WSP 및 CBP를 24시간 처리한 모두에서 apoptosis의 marker의 하나인 PARP degradation이 관찰되지 않았고, 48시간 처리한 경우에 bleomycin, WSP 및 CBP에서 PARP degradation이 일어났으나, bleomycin, WSP가 CBP에 비해 F/M 세포의 apoptosis를 더 많이 유도했다는 것을 알 수 있다(Fig. 80).

최근 다당류들이 apoptosis를 유도하며, 이것이 다당류에 의한 세포독성의 기전의 하나일 것으로 제시되고 있다. *Zoogloea* sp.의 다당류들도 apoptosis를 일으켰는데, WSP의 경우는 apoptosis를 유도하는 물질로 알려져 있는 bleomycin과 비슷한 정도로 apoptosis를 유도하였으며, 그 유도효과가 CBP보다 컸는데 이것은 F/M 세포에 대한 세포독성의 경향과도 일치한다.

그러나 이 다당류들의 세포독성이 apoptosis유도에 의한 것인지, 그 유도기전 등에 대하여는 아직 알 수 없다.

Zoogloea sp. 유래 다당류를 100, 300, 600µg/ml의 농도로 배지에 첨가하고, 무첨가군을 대조군으로 F/M cell의 성장률과 사멸율을 살펴보았다. Fig. 81~84에 F/M 세포에 분리된 WSP와 CBP수용액이 함유된 배지에서의 F/M 암세포의 성장 및 사멸 양상을 나타내었다. 여기에서 항암세포에 대하여 강한 저해 효과를 보였으며 분리된 다당이 암세포에 대하여 직접적인 세포독성을 가지고 있으며 이는 형태학적 변화와 세포 파괴에서 기인된 것은 아닌 것으로 확인되었다.

96시간 배양 후 대조군에는 10⁶개의 세포가 생존하였으나, 600µg/ml WSP 첨가군은 1.1×10⁶cell/ml, CBP 1.2×10⁵cell/ml의 세포가 생존하여 암세포 생존율은 각각 89 %, 88 %로 나타났다. 또한 무첨가 대조군의 96시간 경과 후 사멸세포는 1.3×10⁵이였으나, WSP, CBP 첨가군은 각각 최고 3.9×10⁶, 3.2×10⁵으로 세포 사멸율은 33 %, 40 %로 높게 나타났다.

Table. 27. Comparison of IC₅₀ values of heteropolysaccharides and anticancer drug in various cancer cells

Cells	Drugs($\mu\text{g}/\text{ml}$)	IC ₅₀
CEM/S	WSP	111.7
	CBP	94.0
	BLM	2.1
LB100-2	WSP	224.4
	CBP	203.6
	BLM	5.1
F/S	WSP	795.1
	CBP	197.9
	BLM	3.2
F/M	WSP	63.7
	CBP	93.4
	BLM	27.0

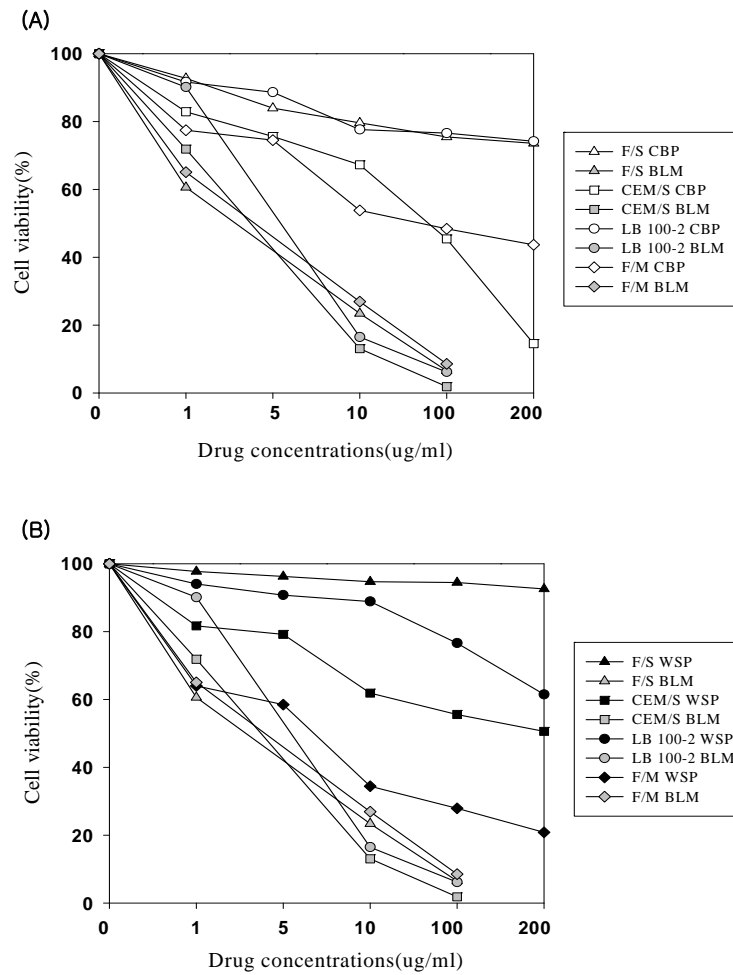


Fig. 79. Cytotoxicity of CBP(A), WSP(B) and anticancer drug in various cancer cells.

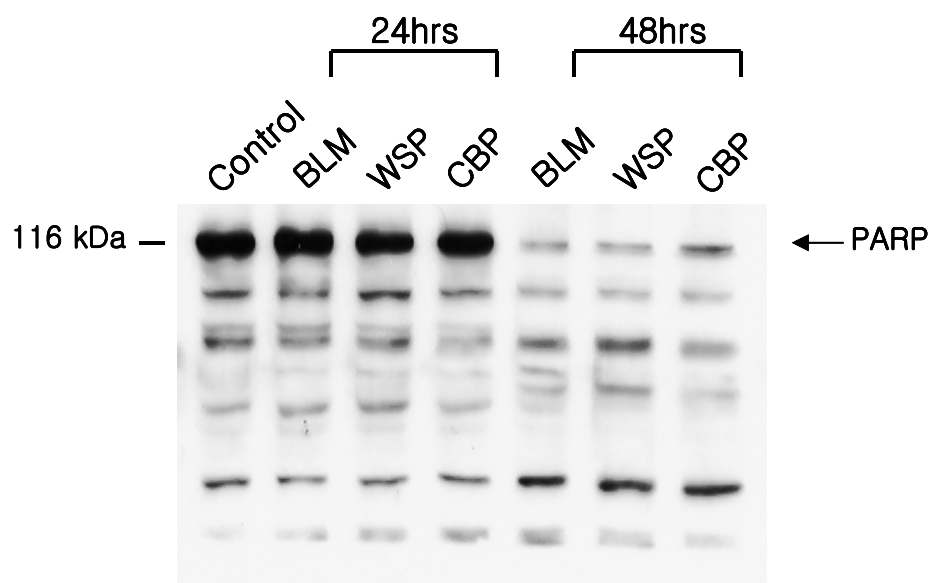


Fig. 80. Western blot analysis for PARP degradation of heteropolysaccharides and anticancer drug in F/M.

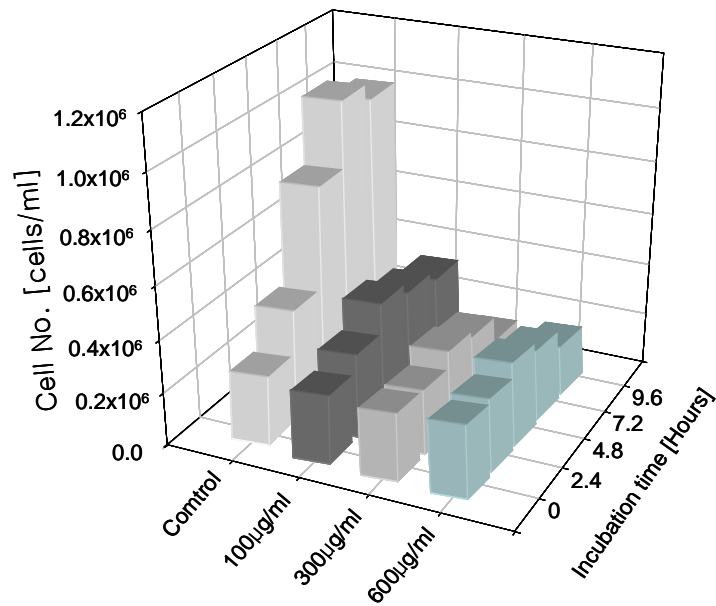


Fig. 81. Growth chart of F/M cells in the culture medium containing WSP.

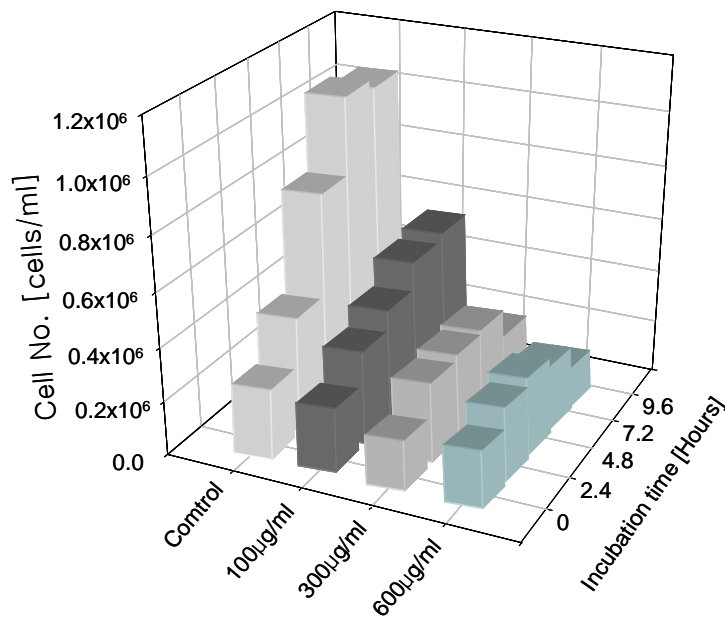


Fig. 82. Growth chart of F/M cells in the culture medium containing CBP.

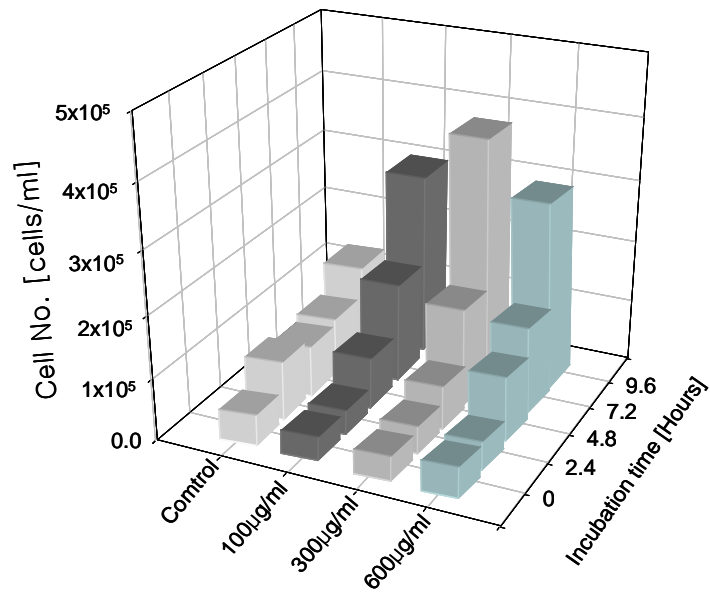


Fig. 83. Death chart of F/M cells in the culture medium containing WSP.

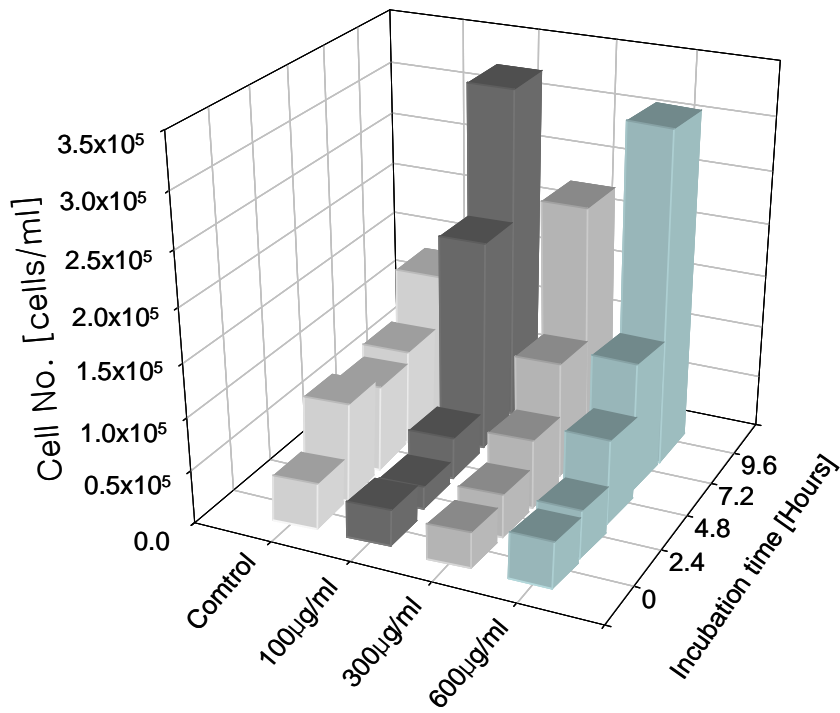


Fig. 84. Death chart of F/M cells in the culture medium containing CBP.

2. 면역증강 효과

분리정제된 다당류의 면역증가효과를 살펴보기 위하여 비장세포의 증식에 대한 WSP와 CBP의 영향을 측정하였다(Fig. 85). WSP와 CBP 두 가지 모두 비장세포의 증식을 크게 증가시켰다. 면역증강물질로 알려진 PHA-P나 LPS를 대조군으로 하여 실험을 실시한 결과, WSP가 CBP에 비하여 그 효과가 더 컸으며, 500 µg/ml의 WSP 첨가군에서는 대조군에 비하여 약 7.6배 비장세포의 증식능을 증가시켰다.

또한, 면역증강효과를 알아보기 위하여 대식세포의 NO생산에 미치는 WSP와 CBP의 영향을 살펴보았다(Fig. 86). WSP와 CBP에 의해 NO 생산능이 크게 증가되었으며, 500 µg/ml의 WSP 및 CBP 첨가군에서 대조군에 비하여 각각 12배 및 11.3배 NO 생산이 증가되었다.

면역활성증강은 림프세포들의 증식증가와 활성화에 의하여 tumor necrosis factor (TNF)- α 및 interferon (INF)- γ 등의 cytokine들이 유리되며, 이 cytokine들이 면역반응조절과 항암작용에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 또 대식세포가 여러 가지 자극에 의하여 활성화되면 생체방어기전의 하나로 활성 산소종 및 NO같은 활성 질소종을 생산하게되어 세균 등의 탐식작용이 증가된다. 다당류들도 이러한 기전을 통하여 면역증강과 항암작용을 나타낸다는 연구가 있으며, *Zoogloea* sp.의 다당류들도 일부 암세포에 대하여 세포독성을 보였으며, 림프세포증식과 대식세포에 의한 NO생산을 증가시킨 점을 보면, 이 다당류들도 상기와 같은 기전으로 작용함을 알 수 있으며, in vivo에서도 면역활성증가와 암세포 증식억제작용을 나타낼 수 있음을 시사한다. 이 다당류들은 분자량이 크므로 세포내의 효소나 세포내 기관들에 직접영향을 미치는 것은 어려울 것으로 알려져 있으며, 이 다당류의 암세포에 대한 in vitro에서의 세포독성의 기전에 대하여는 잘 알려져 있지 않다.

다당류들의 항암작용은 암세포에 대한 직접적인 세포독성에 의한 것이 아니고, 숙주 면역계의 면역기능들을 증강시킴으로서 항암작용을 나타낸다고 한다. 이 다당류들은 면역 활성 세포인 T 및 B lymphocyte들의 증식을 증가시키고, 이 세포들로부터의 항체생산과 면역작용의 조절 및 대식세포의 활성화에 중요한 cytokines의 분비를 증가시킨다고 한다. 대식세포는 암세포 및 침입 외부세포들을 탐식하는 생체방어기전에 중요한 역할을 하는 세포로서, T 세포에서 분비되는 INF- γ 등의 cytokines 및 여러 가지 자극들에 의하여 활성화되며, 활성 산소종 및 NO 같은 활성 질소종을 생산하여 탐식작용을 하게 된다. 대식세포에 대한 자극은 치료적 응용의 중요한 요소가 되는데, 일부 다당류들은 T 세포를 자극하여 INF- γ 등의 cytokine의 분비를 증가시키며, 이 cytokine들이 대식세포를 활성화시켜 살균 및 항암작용을 나타낸다고 한다. 그러므로 항암효과 측정을 위해 비장세포 및 대식세포 증식능, NO 생산에 대한 영향, cytokine 생산량 측정 등을 통한 면역증강효과를 확인하였다.

가. 비장세포증식에 대한 영향

CBP 및 WSP의 비장세포의 증식에 대한 효과를 조사하기 위하여 CBP 및 WSP를 경구 또는 복강 투여한 mouse로부터 분리한 비장세포에, B lymphocyte 증식자극물질인 LPS 및 T

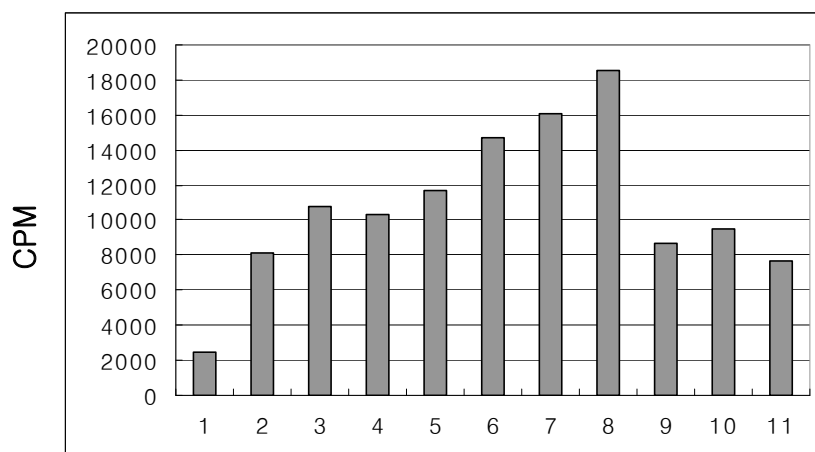


Fig. 85. The effect of WSP and CBP on the proliferation of whole spleen cells. WSP and CBP were added at concentrations from 100 to 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to whole spleen cells for 72h. After incubation, the degree of lymphocyte proliferation was measured by incorporating ^3H -thymidine into the cellular DNA.

1 : spleen cell (negative control)	7 : WSP 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$
2 : PHA-P 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	8 : WSP 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$
3 : PHA-P 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	9 : CBP 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
4 : LPS 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$	10 : CBP 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$
5 : LPS 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	11 : CBP 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$
6 : WSP 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	

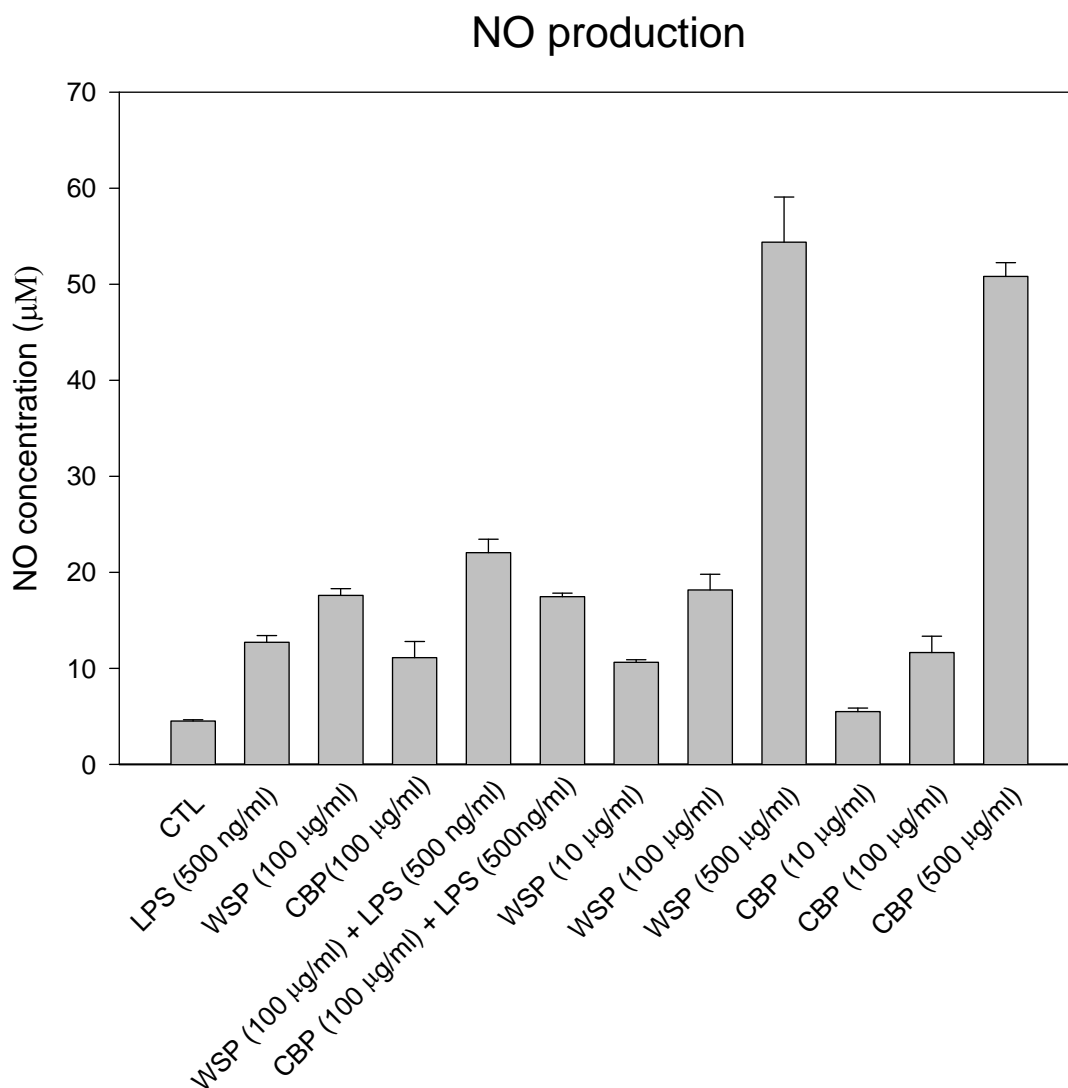


Fig. 86. NO production level in RAW264.7 mouse macrophage cell lines by WSP and CBP treatment. RAW264.7 cells (2×10^6 cells/ml) were plated in 24-well plate and incubated for 24 hr at 37°C in 5% CO₂ and then stimulated using different amounts of the WSP and CBP. The NO levels in the culture medium were assayed using griess reagent and measuring absorbance at 540 nm.

lymphocyte 증식자극물질인 Con A를 처리하여 비장세포의 증식능에 미치는 영향을 조사하였다. CBP 복강 투여군에서는 LPS에 대한 증식반응능이 대조군 (PBS 투여군)에 비하여 100% (2-fold)증가되었고, WSP 복강 투여군에서는 LPS에 의하여 76%, Con A에 의하여 54% 비장세포증식이 증가되었다(Fig. 87). 또한 CBP 경구 투여군에서는 LPS에 의한 증식능이 대조군에 비해 57%, Con A에 의해서는 37% 증가되었고, WSP 경구 투여군에서는 LPS에 의하여 45%, Con A에 의해서는 20% 세포증식이 증가되었다(Fig. 88).

나. 대식세포의 NO생산에 대한 영향

CBP 및 WSP를 투여한 mouse의 복강에서 분리한 대식세포의 NO생산은 LPS로 대식세포를 자극하였을 때, Fig. 89에서 보는 것처럼 대조군 (PBS 투여군)보다 CBP 및 WSP 투여군에서 각각 36% 및 48%의 NO생산이 증가되었다.

다. Cytokine생산에 대한 영향

IFN- γ 는 면역반응의 유도 및 조절에 중요한 역할을 하는 cytokine으로 알려져 있으므로, CBP 및 WSP의 투여가 비장세포에 의한 IFN- γ 의 생산을 유도할 수 있는가를 조사하여 Fig. 90에 나타내었다. IFN- γ 의 생산은 CBP 투여군에서는 별다른 증가가 없었으나, WSP 투여군에서 증가되었다.

Zoogloea sp.에서 분리한 heteropolysaccharide인 CBP와 WSP를 복강에 투여한 후 분리한 비장세포들은 B 세포 증식자극물질인 LPS 및 T 세포 증식자극물질인 Con A로 자극하였을 때 증식능이 CBP 및 WSP 투여군에서 증가되었으며(Fig. 87), 비장세포에 의한 면역반응의 주요 조절물질의 하나인 IFN- γ 의 생산도 WSP 투여군에서는 증가되었다(Fig. 90). 또 CBP와 WSP는 복강대식세포를 LPS로 자극하였을 때 NO 생산도 증가시켰는데, 이 NO는 여러 가지 작용을 가지고 있는 반응성 분자로서 대식세포의 탐식작용에도 중요한 역할을 한다.

여러 생물체들로부터 추출되는 다당류들 중에서 일부 다당류들은 면역기능 조절작용 및 항암작용을 나타낸다고 알려져 있다. 다당류들의 항암작용은 암세포에 대한 직접적인 세포독성에 의한 것이 아니고, 숙주의 면역계의 면역기능을 증강시킴으로써 항암작용을 나타낸다고 한다. 이 다당류들은 면역 활성 세포인 T 및 B lymphocyte들의 증식을 촉진시키고, 이 세포들로부터의 항체생산과 면역작용의 조절 및 대식세포의 활성화에 중요한 cytokines의 분비를 증가시킨다고 한다. 다당류들의 이러한 작용의 기전에 대하여는 아직 잘 알려져 있지 않다. 면역기능 조절작용과 항암작용이 있다고 알려진 inulin 및 oligofructose 등 비소화성 당질의 경우는, 이들 당질에 의하여 장내 세균집단의 변화가 일어난다고 한다. 즉 이 당질을 발효시킬 수 있는 세균들 특히 건강에 유익하며, 면역기능을 증강시킨다고 알려져 있는 lactate 생산세균들이 증가된다. 그러므로 lactate 생산세균들의 증가는 체면역기능 증강을 수반하여 cytokine profiles를 변화시키고 순환계의 IFN- γ 농도를 증가시키며, 또 대식세포의 활성화 등을 통하여 이 세균

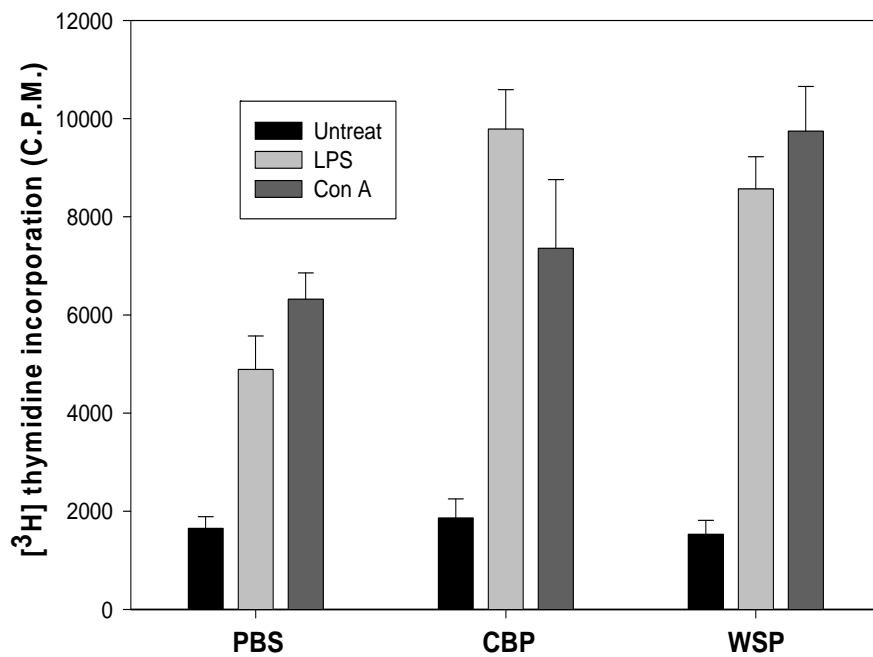


Fig. 87. Effect of peritoneal administration of CBP and WSP on the proliferation of mouse splenocytes in response to LPS and Con A. Mice were injected peritoneally with CBP or WSP (0.5 mg/ml in PBS) 5 times for 8 days. One day after the last administration, mice were sacrificed and splenocytes suspended in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS were cultured with or without LPS or Con A for 3 days. The proliferation of splenocytes was determined using H^3 -thymidine incorporation.

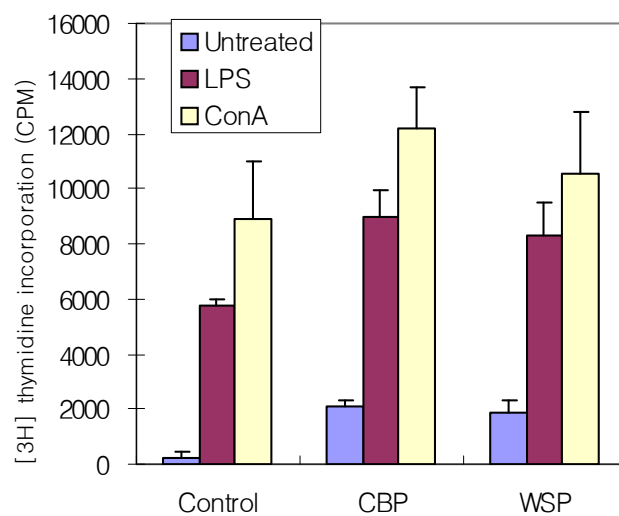


Figure 88. Effect of orally administrated CBP and WSP on the proliferation of mouse splenocytes in response to LPS and Con A. Mice were administrated orally with CBP and WSP (5 mg/ml in distilled water) every day for 2 weeks. One day after the last administration, mice were sacrificed and splenocytes suspended in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS were cultured with or without LPS or Con A for 3 days. The proliferation of splenocytes was determined using H³-thymidine incorporation.

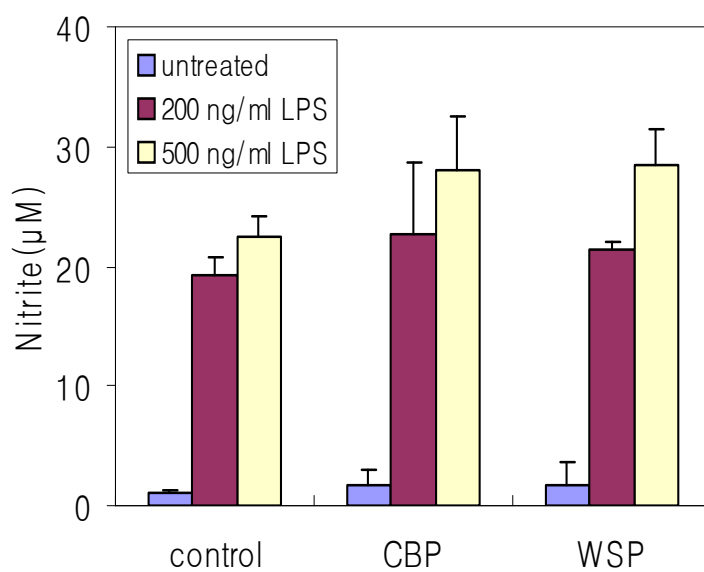


Fig. 89. Effect of CBP and WSP on the NO production by peritoneal macrophages stimulated with LPS. Peritoneal macrophages were isolated from mice treated with CBP and WSP as described in Figure 1. Macrophages were suspended in RPMI 1640 medium (1×10^6 cells/ml) and stimulated with LPS for 24 hours at 5% CO₂, 37°C. NO was measured as nitrite by using griess reaction.

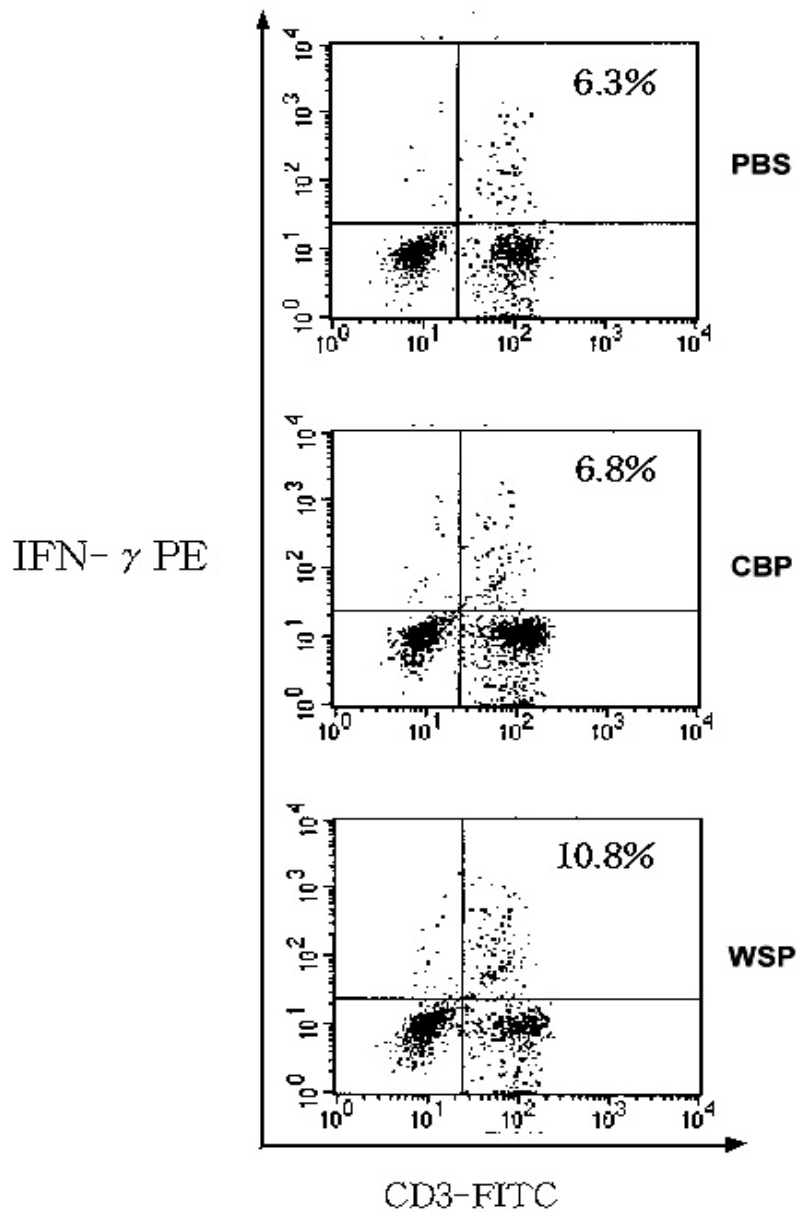


Fig. 90. Effect of CBP and WSP on the production of IFN- γ from splenocytes. Mice were treated as described in Fig. 3. Splenocytes were stained FITC-conjugated CD3 antibody for 30 min. at 4°C and then the cells were fixed and permeated with the Cytotfix/Cytoperm kit. Intracellular IFN- γ stained with fluorescein R-phycoerythrin conjugated antibodies in permeation buffer was analyzed on a FACScaliber flow cytometer.

들이 종양의 발생 및 성장을 억제하는 효과를 나타낸다고 제시되고 있다.

CBP 및 WSP의 결합구조가 아직 규명되지 않았고, 소화성 여부 및 장내세균집단의 변화에 대한 영향 등을 조사해 보지 않았으므로 이 다당류들이 어떠한 기전으로 면역기능 등을 증강시켰는지는 알 수 없으나, 지금까지의 전 연구 결과들을 종합하여 보면, 이들 다당류들은 면역기능을 증강시켰으며, 암 발생의 지연 및 성장억제 효과도 나타내었으므로 경구적으로 계속으로 섭취하면 암 발생의 예방적인 효과 등 인체에 유익한 효과가 있을 것으로 생각된다.

본 연구의 결과를 종합해 보면 *Zoogloea* sp.에서 분리된 다당류들은 정상세포에 대한 직접 세포독성실험과 급성독성실험에서 아무런 독성 작용을 보이지 않았으며, CBP 및 WSP를 경구적으로 투여하였을 때, 비록 한정된 수의 면역기능을 조사하였지만, CBP와 WSP는 lymphocyte의 증식능과 cytokine (IFN- γ) 분비의 증가를 통하여 면역기능을 증가시켰고, 복강대식세포에 의한 NO의 생산도 증가되어 대식세포를 활성화시켰으므로 종양의 발생과 성장을 지연시키는 효과를 나타냄으로서 이 다당류들은 암 등에 대한 인체의 방어기전에 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다.

3. 항 종양 검사

종양세포의 성장에 미치는 다당류들의 영향을 관찰하기 위하여 종양세포를 접종한 후 3일째부터 CBP 및 WSP를 복강에 투여하면서 종양세포의 성장을 조사하였다. 낮은 농도의 종양세포를 접종한 왼쪽 등에서는 실험동물 모두에서 종양이 생기지 않았으나, 높은 농도를 접종한 오른쪽 등에서는 거의 모두에서 종양이 나타났다. Fig. 91 및 92에서 보는 것처럼 F/S 세포 접종군에서만 WSP 투여에 의하여 성장이 억제되는 양상을 보이고 있으나, 다른 군에서는 항암 효과를 나타내지 않았다.

종양세포를 접종한 후에 다당류를 복강으로 투여한 연구에서 만족할만한 암 치료효과를 얻지 못하였으므로, 이 다당류들을 경구적으로 투여하였을 때 암의 발생을 억제할 수 있는 예방적인 효과가 있는지를 조사하였다. 종양세포를 접종하기 전 8주간 경구적으로 CBP 및 WSP를 투여한 후, 종양세포를 접종시켜 종양의 성장을 조사하였다.

Fig. 93에서 보는 것처럼 다당류 투여군 모두에서 종양의 성장이 지연되는 것을 관찰할 수 있었으며, F/M 세포 접종 WSP 투여군에서 그 효과가 가장 컸다.

4. 항균 활성 검사

계단희석법으로 적당한 범위의 다당류를 함유한 배지를 조제하고, 표준 균액량을 접종, 배양하여 균의 발육 유무를 관찰하였다. 비교하기 위하여 사용한 항균제들에 의하여는 세균의 발육 저지가 관찰되었으나, 다당류들에서는 사용 된 전 범위의 농도(2.5 mg/1ml - 39 μ l)에서 발육 저지를 관찰할 수 없었으므로 균에 대한 독성을 내포하지 않는 것으로 나타났다.

이러한 결과로 미루어 두 가지 다당류가 균에 대한 생육억제능이 없는 것으로, 실제로 산업에 응용하여 필름제조나 식품류의 포장재질로 제품화하였을 때 미생물에 의한 생분해가 가능

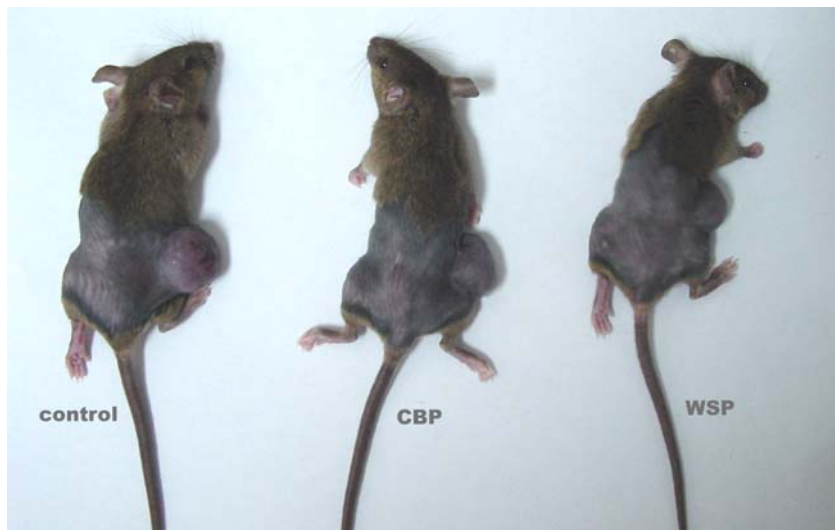
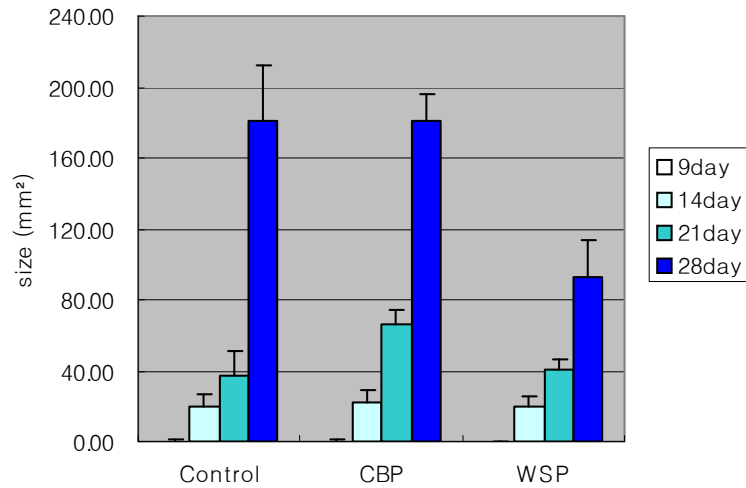


Fig. 91. Effect of polysaccharides intraperitoneally injected on the growth of F/S tumour cell in mice. Tumour cells were inoculated into the left flank (2×10^5 cells) and the right flank (1×10^6 cells) subcutaneously. CBP or WSP was treated intraperitoneally into mice on 3rd day of inoculation of tumour cells and continued every other day, a total of 10 injections. The tumour size was measured using calipers. Results shown represent the means \pm SEM for each group, $n = 5$. Photograph represents mice of 28 days after tumour cell inoculation.

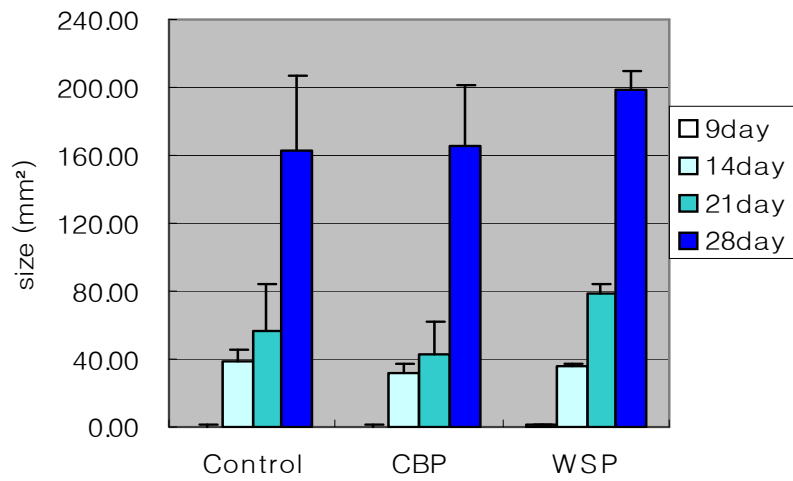


Fig. 92. Effect of polysaccharides intraperitoneally injected on the growth of F/M tumour cell in mice. Methods are the same as described in the figure 91 except tumour cell line.

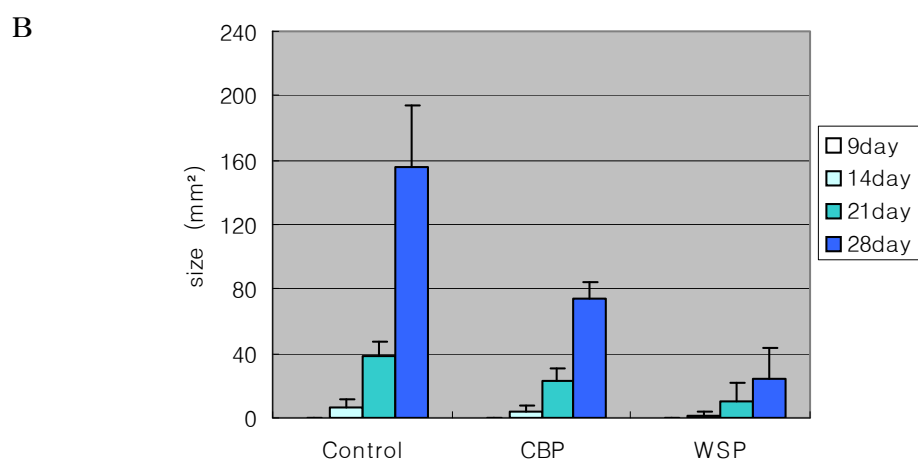
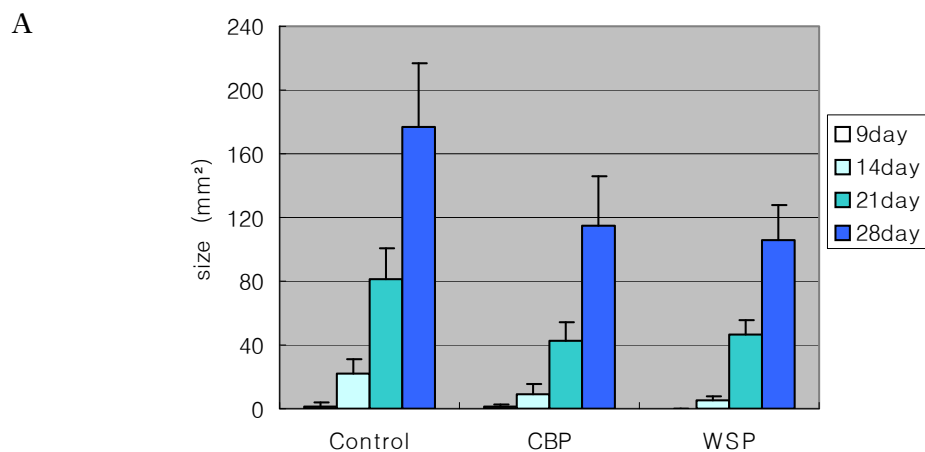


Fig. 93. Effect of polysaccharides orally treated on the growth of F/S and F/M tumour cells in mice. 4 mg of polysaccharides dissolved in distilled water were given orally into mice every day for 8 week before inoculation of tumour cell lines. F/S cells (A) and F/M cells (B) were inoculated into mice the by the same methods as described in figure 91.

하다고 사료되어지므로 환경친화성 제품으로의 개발이 기대되어진다.

5. 항산화성

항산화 기능성 천연 식품소재는 최근 각종 성인병의 원인을 해결하는 생체리듬의 조절, 예방, 방어, 회복 및 노화조절 등 다양한 용도로 응용되고 있다. 이것은 식품산업 전 분야에서 필요로 하는 기반 기술이 될 뿐만 아니라 질병의 발생을 미리 차단하는 예방효과가 크기 때문에 전 국민의 건강한 삶(Quality of Life)의 유지에 큰 도움이 될 것이다.

다당류들이 항산화능력을 가지고 있는지를 활성산소와 ONOO⁻ 제거능으로 in vitro 상에서 항산화능을 살펴본 실험결과에서 500 μ l/ml의 농도범위에서도 항산화 효과가 관찰되지 않았으므로 이후 농도를 높여 실험해 본 결과, 1mg/ml의 고 농도에서 유의할 만한 항산화 효과가 나타났다. 그러나 in vivo 실험에서 섭취된 30mg/day의 사료 중 포함된 1mg의 다당류는 mouse에 유의할 만한 항산화 효과를 유발시키지 못하는 것으로 나타났다. 다당류들이 생물활성들을 나타내기 위하여서는 어떤 구조적인 특징이 요구된다고 알려져 있다. 항균 또는 항virus작용에는 황산염 다당류구조가 필요하며, 분자량과 황산염화 정도가 증가할수록 항virus작용이 증가된다고 한다. 또 (1→6)구조의 짧은 가지가 많이 있는 β -(1→3)-D-glucan구조가 필요하다고도 하였으며, 항산화작용에도 황산염 구조가 필요하다고 하였다. 그러나 *Zoogloea* sp.로부터 분리된 세포의 다당류들의 구성성분으로 황산염이 함유되어 있지 않았다. 이러한 이유로 WSP와 CBP는 항균 및 항산화작용을 나타내지 않은 것으로 사료된다.

6. 급성·만성독성 효과

가. 독성의 실험

(1) 세포독성

정상세포에 대하여 CBP와 WSP가 독성을 나타낼 수 있는가를 알아보기 위하여, 정상 mouse 간세포와 opossum 콩팥 (OK) 세포에 대한 직접 세포독성을 조사하였다. 세포 배양액에 직접 CBP 및 WSP를 첨가하여 MTT assay로 cell viability를 측정된 결과는, Fig. 94과 같다. 대조군으로 첨가한 glycogen과 동일하게 CBP와 WSP 전 농도에서 독성은 전혀 나타나지 않았다.

(2) 급성독성

급성독성검사의 예비실험에서 한계용량인 WSP, CBP 200 mg/100 g body weight 투여군에서 시험기간을 통하여 사망동물은 관찰되지 않았으며, 실험동물에 대한 본 시험물질의 LD₅₀값은 각각 200 mg/kg을 상회할 것으로 사료되었다.

본 실험에서는 mouse를 각각 11군으로 나누어 WSP 투여군 4군, CBP 투여군 4군으로 각각 300 mg/100g body weight, 400 mg/100g body weight, 500 mg/100g body weight, 600 mg/100g body weight, 700 mg/100g body weight, PBS 투여한 대조군으로 나누어 1회 복강 투여 후 14일간의 사망율, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였으며 그 결과는 다음과

같으며 Fig. 95로 간략하게 표현할 수 있다.

(가) WSP와 CBP에 의한 사망률은 각각 500mg/100g body weight에서 한 마리의 사망이 나타났고, CBP는 600mg/100g body weight에서 2마리의 사망이 나타났다. WSP, CBP 모두 700mg/100g body weight에서는 전체 사망을 나타내었으므로 LD₅₀치는 500mg/100g body weight를 상회할 것으로 여겨진다.

(나) 일반증상의 경우, 생존한 모든 시험군에서 관찰기간 동안 시험물질의 투여와 관련된 어떠한 이상증상도 관찰되지 않았다.

(다) 체중변화의 경우, 생존한 모든 시험군에서 정상적인 체중증가를 나타내었다.

(라) 사망직후 복강개복과 내장기관의 부검소견의 경우, 사망한 실험동물에서 육안으로는 이상 소견이 관찰되지 않았다.

(마) 계획도살 부검소견의 경우는 생존한 실험동물 모든 개체군에서 육안으로는 이상소견이 발견되지 않았다.

(바) 계획도살 후 채취한 혈액의 생화학적 분석을 수행한 결과는 Table 28, 29와 같다.

투여후 14일 동안 생존한 실험동물을 계획도살한 후 혈액을 채취하여 혈청만을 분리한 후 자동혈액분석기로 혈청총단백질, BUN, Glucose, Albumin, 총 cholesterol, Triglyceride를 분석한 결과 대조군과 비교했을 때, 수치상의 큰 차이는 찾아볼 수 없었다.

거의 모든 항목에서 대조군과 비교했을 때 큰 차이를 보이지 않는 것으로 신장이나 간의 대사가 투여된 다당류에 의해 영향을 받지 않고 정상적으로 대사됨을 알 수 있는 결과라고 하겠다. 따라서 시험물질이 복강을 통해서 투여된 후, 대사과정을 거치는 동안 우려할 부작용은 일어나지 않는 것으로 판단된다.

(3) 만성독성

CBP 및 WSP의 in vivo 만성독성여부를 조사하기 위하여 각각을 2주간 복강에 투여하고, 65일간 살펴보며 이상 여부를 관찰하였으나 대조군과 행동상의 차이를 발견하지 못하였다. 또한, 체중의 변화를 조사하였으나 대조군과 아무런 차이가 없었다(Fig. 96).

상기의 세포독성시험과 급성시험의 결과를 종합해 보면, CBP 및 WSP는 생체에 아무런 독성을 나타내지 않는 물질로 사료된다.

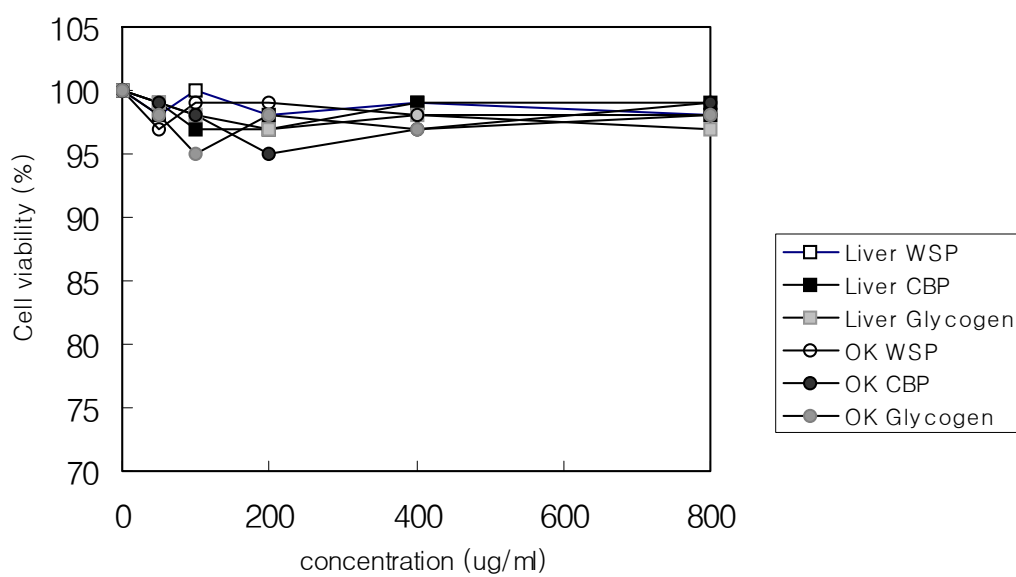


Fig. 94. Cytotoxicity of CBP, WSP and glycogen in normal mouse liver cells and kidney OK cells cell viability was measured by MTT assay.

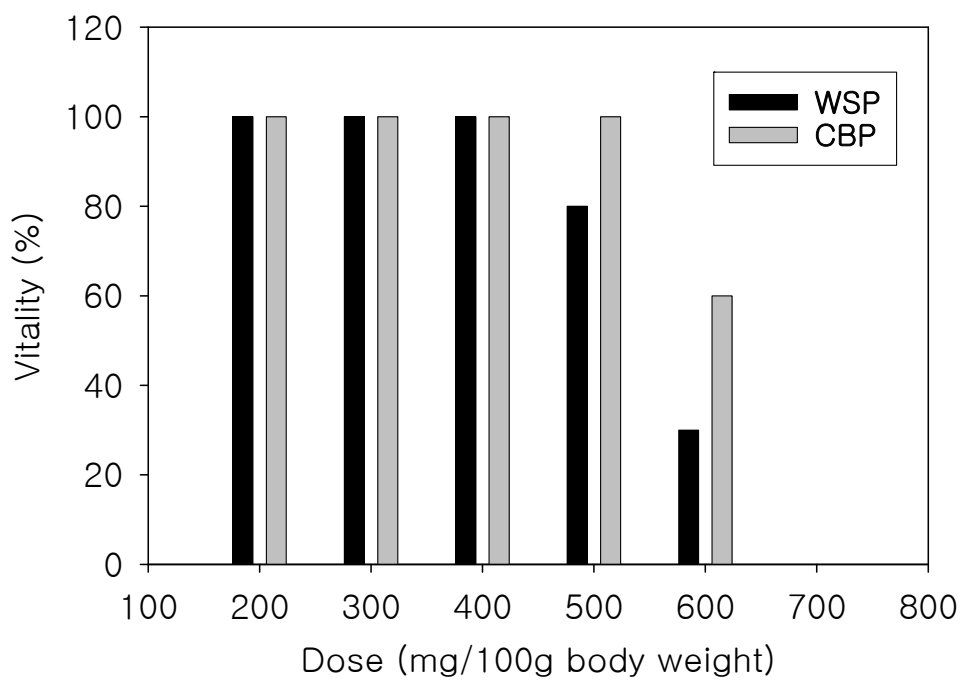


Fig. 95. Vitality of BALB/c mouse on the various doses.

Table 28. Blood analysis results of ICR mouse injected WSP

Items	Control	WSP	
	not treated (n=5)	200 mg/100 g body weight (n=5)	400 mg/100 g body weight (n=5)
BUN(mg/dL)*	21.0± 0.7	24.6± 0.9	28.7± 1.2
Glucose(mg/dL)	176.0±21.0	192.0±14.5	182.0±15.6
Total protein(g/dL)	6.0± 0.8	5.4± 0.8	5.4± 1.2
Albumin(g/dL)	4.1± 0.6	3.0± 0.4	3.1± 0.2
Cholesterol(mg/dL)	104.0±10.2	110.0± 8.8	121.0±10.3
Triglycerides(mg/dL)	65.0± 5.7	65.3± 6.4	86.0± 4.6

* BUN : Blood Urine Nitrogen

Table 29. Blood analysis results of ICR mouse injected CBP

Items	Control	CBP	
	not treated (n=5)	200 mg/100 g body weight (n=5)	400 mg/100 g body weight (n=3)
BUN(mg/dL)*	21.0± 0.7	20.6±1.2	22.3± 2.3
Glucose(mg/dL)	176.0±21.0	178.0±9.6	179.0±13.6
Total protein(g/dL)	6.0± 0.8	5.8±0.8	5.7± 0.5
Albumin(g/dL)	4.1± 0.6	3.9±0.1	3.8± 0.1
Cholesterol(mg/dL)	104.0±10.2	98.0±5.4	94.0±12.3
Triglycerides(mg/dL)	65.0± 5.7	64.5±3.6	57.0± 4.5

*BUN:Blood Urine Nitrogen

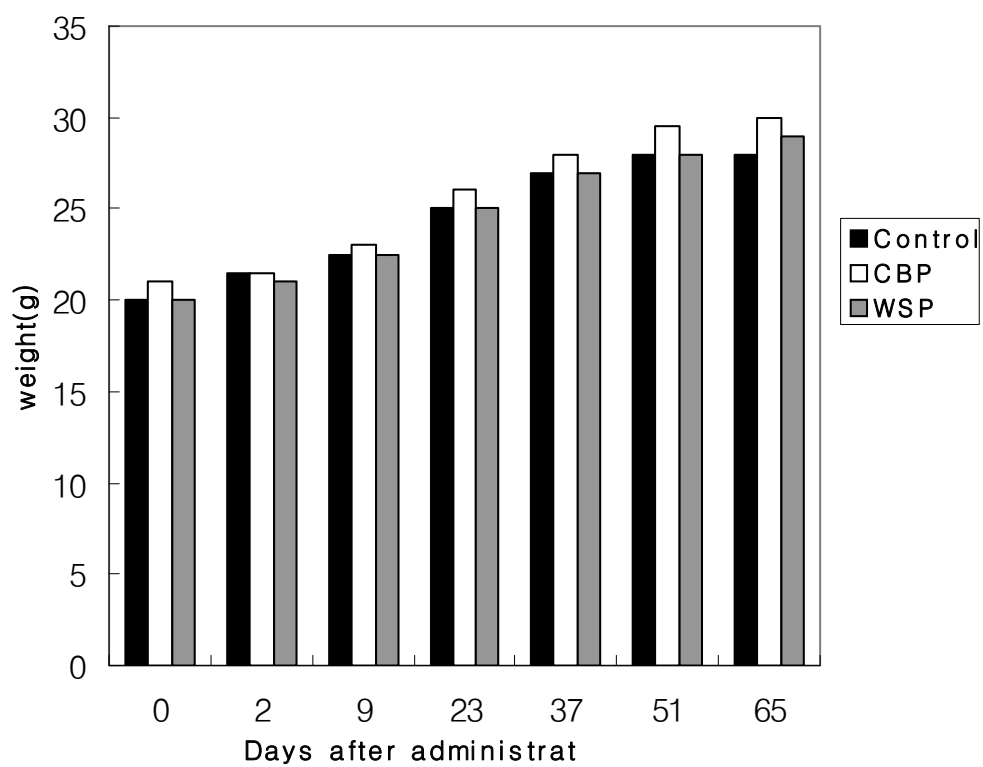


Fig 96. The weight change of mice after chronic administration of CBP and WSP. CBP and WSP were administered by intraperitoneal injection of 5 mg/ml of PBS once in a day during 2 weeks.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구목표

본 연구에서는 해양으로부터 분리·동정해 낸 미생물 *Zoogloea* sp.가 생산하는 두가지 서로 다른 다당류 WSP(water soluble polysaccharide)와 CBP(cell bound polysaccharide)를 생산해 내고자 최적생산조건 및 pilot 발효생산 가능성을 검토하였으며, 분리·정제 공정을 통한 다당의 다양한 물성 특성 및 물리·화학적 특성을 규명하였다. 또한 생산된 다당을 이용, 생리기능성 및 안전성을 검토하였으며 고기능성 수산가공식품소재로서 응용을 목적으로 하였다.

제 2 절 연구 진도표

구분 개발내용	2001 년 (1차년도)												2002 년 (2차년도)												2003 년 (3차년도)												진도 (%)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
▶해양미생물 <i>Zoogloea</i> sp.의 발효공법개선에 의한 고기능성 heteropolysaccharide의 대량생산 및 수산 연계품의 응용에 관한 연구																																						
- 최적 배양 조건검토																																					100	
- 다당 분리·정제, 수율조사																																					100	
- 식품소재로서의 물성조사																																					100	
- 식품소재로서의 생리기능성 조사																																					100	
- 발효조내의 최적생산 조건 및 대량분리 공정법 개발																																					100	
- 최적가공조건조사																																					100	
- 제품물성에 미치는 영향 검토																																					100	
- 식품첨가제로서의 안정성 조사																																					100	
- 생산수율등에 대한 경제성 검토																																					100	
- 대량생산을 위한 고수율 공정설계																																					100	

한 결과는 지금까지 보고된 세균 유래 다당류 중에 높은 분자량에 속하는 것으로 나타났다. 당류 및 단백질에 특이적으로 나타나는 3400 cm^{-1} 에서의 강한 흡수가 나타났으며 $2880\text{--}2980\text{ cm}^{-1}$ 부근의 C-H stretching을 1400 cm^{-1} 와 1600 cm^{-1} 부근에서는 carboxyl기의 흡수가 관찰되었다. 또한 finger printer region중 $800\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ 에서의 낮은 peak는 다당류내 β -glucosidic 결합이 함유되어 있는 것으로 나타났다.

3. 수율 조사

5 L 발효조에서 교반속도 400 rpm, 공기 통기량 2 vvm, 접종량 10 %의 조건으로 batch culture를 실시한 결과, 균체의 최대성장 시간은 36~48 h로서 비성장 속도 μ_{\max} 는 0.036 h^{-1} 로 나타났고, 균체당 다당 생산율 $Y_{P/X} = 0.489/\text{h}$, 기질당 균체 생산율 $Y_{X/S} = 0.048/\text{h}$, 기질당 다당 전환율 $Y_{P/S} = 0.281/\text{h}$ 로 계산 되었다.

4. 유용 polysaccharide의 물성조사 - 유동학적 특성

Polysaccharide (WSP, CBP) 수용액의 유동특성을 Power-law 식 및 Andrade's 식에 적용시킨 결과, polysaccharide 수용액은 비뉴우톤 유체의 성질과 의가소성 유체의 성질을 가지는 것으로 나타났다. 이들 수용액의 겔보기 점도는 넓은 범위의 pH (2~12)와 온도 (20~80 °C)에서 대조군으로 사용한 Xanthan gum 보다 높은 안정성을 보였다. 또한 NaCl의 첨가에 따른 겔보기 점도의 변화에서도 WSP의 경우 3 %, CBP는 5 % 까지의 농도에서도 높은 점도 향상능을 보였다. 각종 염류에 대한 점도 향상능 및 유지능도 우수하였으며, CBP의 경우 gel 형성능의 가능성도 보여 각종 산업에서의 점증제 및 새로운 바이오 소재로써의 이용 가능성이 클 것으로 기대된다.

5. 다당류의 물리·화학적 특성 조사

WSP, CBP의 경우 0.01-1.0 %(w/v)까지 80 U/ml이상 응집활성이 유지됨으로서 비교군인 xanthan gum 경우 0.01-0.1 %(w/v)정도 에서만 80 U/ml 에 비교하여 우수함을 보였다. WSP (water soluble polysaccharide) 경우 $162.82\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 열분해가 일어났으며 이때 1 g WSP를 녹이는데 필요한 열량은 453.49 cal로 나타났다. CBP(cell bound polysaccharide) 경우 열분해 온도와 엔탈피가 각각 $166.05\text{ }^{\circ}\text{C}$, 529.78 cal/g 으로써 나타났다. 0.5-2.5 %(w/v)농도범위로 측정된 결과 고 농도로 갈수록 점차 보수력은 감소함을 나타냈다. 이는 고농도로 첨가되는 고분자의 사슬단위의 물리적 변화에 따라 고분자 단위 질량당 수분함유량은 감소됨으로 사료되며 CBP 경우 1.5 %(w/v)까지 상당히 안정적인 보수효과를 나타내었으며 0.5 %(w/v) WSP에서 가장 높은 보수력 127 g water/g polysaccharide을 보여주었다. WSP, CBP의 유화활성능 결과 안정한 형태로 장시간동안 유지됨을 나타냈으며, 48 hr 이후 WSP의 유화안정능이 감소할 뿐이며 특히 본 연구에서 사용한 CBP 경우 148 hr 이후까지 우수한 유화안정능을 유지함으로써 하였다. 이러한 결과는 유화제산업에 생물소재로서 polysaccharide의 잠재적 가능성을 보여준

결과라 사료된다.

WSP 수용액의 경우 $ZnCl_2$ 의 염류에 2.5배 CBP는 NaCl, KCl, $MgCl_2$, $MgSO_4$ 를 제외한 나머지 염류들에 의해 급격한 점도 증가를 보여 CBP가 WSP에 비해 염류에 대한 반응성이 상당히 높은 것으로 나타났다. WSP의 경우는 일반적으로 식품사업에 이용되는 염류 중 NaCl, KCl, $MgCl_2$, $MgSO_4$ 등에 대한 점도 향상능 및 점도 유지능이 우수하므로 식품보조제로서 용도가 넓은 것으로 사료되며, 고정화 담체로서 CBP의 bead 형성능이 크다는 것을 입증해 주는 결과이기도 하다.

6. 발효조를 이용한 다당류의 효율적 생산 조건

회분 배양의 최적조건은 working volume 3 L, 400 rpm, 1 vvm, 30 °C, 탄소원으로써 글루코스 2.5 % (w/v), inoculum size는 10 % (v/v)이었다. 이 때 120 hr 후에 11.3g/l의 다당을 생산하였다. 유가식 배양의 최적조건은 feeding volume과 기질의 접종 농도는 200 ml와 2.5 % 글루코스였다. 배지의 접종은 24 hr 간격으로 행하여졌고 다당류의 생산은 120 hr 후에 6.28 g/l였으며, 최종 배양액은 3.8 L였다. 반연속식 배양의 최적조건은 feeding volume 500 ml, inoculum size 10 % (v/v)였고 접종시간은 24 hr이었다. 이 조건하에서 다당류의 생산은 144 hr 후에 8.23 g/L였고, 최종 배양액은 8 L이었다. 결론적으로, *Zoogloea* sp.(KCCM10036)로부터 polysaccharides를 생산하기 위해 반연속식 배양법이 가장 효과적인 방법인 것으로 사료된다.

7. 대형 발효조 적용 가능성 검토

다당류를 대량생산하기 위해 scale up된 200 L fermentor에서 생산을 검토해 보았다. 앞선 결과를 미루어볼때 200 L의 대형발효기에 working volume 160 L을 semicontinuous fermentor로 배양했을 경우 scale up에 따른 표면적비와 배양 환경조건의 변화로 인해 다소 생산에 차이는 있을 것으로 사료되며, 대량생산을 하였을 경우 시간에 따른 생산비 절감을 가져올 것으로 판단된다.

8. 분리공정법 개발

전 배양된 미생물 배양액을 2.5 % 본배양조(200 L)로 접종한 후, 최적배양조건에서 배양한다. 배양된 액은 원심분리기를 통해 cell과 배양 상등액으로 분리한다. 배양 상등액은 추출조로 옮겨 아세톤 추출 하고나면 WSP가 회수되며, 가라앉은 cell은 추출조로 옮겨져 아세톤 추출을 하고나면 CBP가 회수된다. 회수된 WSP와 CBP는 각각 투석조로 옮겨져 탈염과정을 거치고, 건조한 후 포장하면 완제품이 생산된다. 아세톤 추출 후 사용된 아세톤은 진공증발기를 거쳐 재사용할 수 있다. 4일의 본 배양과정을 거친 후 원심분리 ~ 제품포장까지의 전 단계는 10일이 소요되며 1 cycle 당 2 kg의 고기능성다당류를 생산 가능하였다.

9. 다당류 첨가 수산연제품의 최적가공조건

WSP의 경우 whiteness는 무첨가에 비해 다소 높았으며, breaking force는 0.02 %(w/v)에서 174 g 이었고, deformation는 무첨가가 더 높게 나타났다. CBP의 경우 whiteness는 0.06 %(w/v)에서 가장 높았고, breaking force는 무첨가보다 낮았으며, deformation는 0.02 %에서 5.45 mm였다. 이상의 결과에서 WSP와 CBP의 최적 농도는 각각 0.02 %(w/v)로 선정할 수 있었으며 이후 모든 실험은 0.02 %(w/v)의 polysaccharides에서 최적이었다. WSP의 경우, whiteness는 No.2, 5, 6이 유사한 값을 나타냈으며, deformation No.1, 2, 3 유사값이며, breaking force는 No.1, 2, 3가 유사값이었다. CBP의 경우 whiteness는 No. 7이 높았으나, 전체적으로 비슷한 값이었으며, breaking force는 No. 1, 2이 높았으며, deformation는 No. 1, 2이 가장 높게 나왔다. 이 결과를 살펴볼 때, WSP, CBP가 유사한 수치를 나타냈지만, No. 2를 최적 선정하였다. WSP와 CBP 모두 deformation의 경우 pH에 대해서는 약간의 증가를 나타냈으며, breaking force는 salt와 pH가 증가함에 감소하였다.

WSP와 CBP 첨가군을 Folding test 결과 WSP의 salt conc.(%) 1.5 %(w/v), pH 7.5의 surimi gel이 가장 높은 AA의 등급이었고, breaking force와 deformation의 값이 높음에 따라 folding test 값이 상대적으로 높았다. Deformation은 WSP가 7.49 mm로 가장 높았으며 CBP는 대조구 보다 다소 높은 값을 나타냈다. Breaking force는 WSP와 CBP 모두 대조구 보다는 높은값을 나타냈으며 WSP 같은 경우 대조구에 비해 2배에 가까운 breaking force를 나타냈다. 전체적으로 WSP는 CBP에 비해 높은 물성값을 나타냈다. 이에 수산가공제품에 다당을 첨가한 군에서 좋은 결과를 얻을 수 있으며, 저농도로 첨가하여도 물성에 큰 영향을 미치는 것을 나타냈다.

10. 다당류가 제품의 물성에 미치는 영향 조사

기존 연제품에 대표적으로 첨가되는 카라기난 등을 대조군으로하여 *Zoogloea* sp. 유래 다당류는 고점성(시판되고 있는 당류 대비 최고치)을 띠며, 응집활성, 수분보수력, 유화능, 용해능, 겔 형성력, 점착력 등의 모든 물리화학적 특성이 뛰어나며(단연 탁월), 0.02 %(w/v)의 소량 첨가에도 젤리강도가 무첨가에 비해 높으므로 바람직한 식품 첨가물로 평가된다. 또한 항암, 면역활성 증강능 등의 기능성을 가지므로 고기능성 식품 제조에 이용될 수 있을 것이다. 더 나아가 보습력, 유화능, 점착력 등의 특성을 이용하여 기능성 화장품소재로의 개발도 가능하다.

11. 생산실용화 기술개발 및 관능평가

연제품에 여러 다당류(Xanthan, Curdlan, Dextran, Carrageenan)와 *Zoogloea* sp. 유래 다당류(WSP, CBP)를 첨가하여 식품에서의 물성검토와 시제품을 생산을 위한 식품첨가제를 부합하여 패널을 통한 관능평가를 실시 및 자료를 검토하여 생산실용화로 고기능성 어육 연제품으로서 제품화 개발이 가능하다.

▣ 제 2 세부 과제 : Heteropolysaccharides 의 고 기능성 응용연구

1. 항암효과

WSP와 CBP는 CEM/S 세포와 F/M 세포에서는 세포독성을 보이고 있는데, F/M 세포에 대한 WSP의 세포독성이 가장 강하였다. WSP가 항생제 감수성인 F/S 세포에는 아무런 영향이 없었는데 비하여 이 세포주의 다제내성 세포인 F/M 세포에 대하여는 강한 증식억제작용을 나타내고 있다. 항암제인 bleomycin의 F/S 세포에 대한 IC₅₀이 3.2 µg/ml에서 F/M 세포의 27 µg/ml로 약 8.4배 증가된 것에 비하여 WSP의 IC₅₀은 각각 795.1 µg/ml에서 63.7 µg/ml로 약 12.3배가 감소하였다. CBP도 F/S 세포에 비하여 F/M 세포에서 IC₅₀이 약 2배정도 감소를 나타내었다. 이는 기존 보고된 항암제에 비해 뛰어난 항암활성을 가진다고 볼 수 있다.

2. 면역증강효과

WSP와 CBP 두 가지 모두 비장세포의 증식을 크게 증가시켰다. 면역증강물질로 알려진 PHA-P나 LPS를 대조군으로 하여 실험을 실시한 결과, WSP가 CBP에 비하여 그 효과가 더 컸으며, 500 µg/ml의 WSP 첨가군에서는 대조군에 비하여 약 7.6배 비장세포의 증식능을 증가시켰다. 또한, WSP와 CBP에 의해 NO 생산능이 크게 증가되었으며, 500 µg/ml의 WSP 및 CBP 첨가군에서 대조군에 비하여 각각 12배 및 11.3배 NO 생산이 증가되었다. IFN-γ의 생산은 CBP 투여군에서는 별다른 증가가 없었으나, WSP 투여군에서 증가되었다.

3. 항 종양검사

다당류 투여군 모두에서 종양의 성장이 지연되는 것을 관찰할 수 있었으며, F/M 세포 접종 WSP 투여군에서 그 효과가 가장 컸다.

4. 항균활성검사

다당류들에서는 사용된 전 범위의 농도(2.5 mg/1ml - 39 µl)에서 발육저지를 관찰할 수 없었으므로 균에 대한 독성을 내포하지 않는 것으로 나타났다.

이러한 결과로 미루어 두 가지 다당류가 균에 대한 생육억제능이 없는 것으로, 실제로 산업에 응용하여 필름제조나 식품류의 포장재질로 제품화하였을 때 미생물에 의한 생분해가 가능하다고 사료되어지므로 환경친화성 제품으로의 개발이 기대되어진다.

5. 항 산화성

다당류들이 항산화능력을 가지고 있는지를 활성산소와 ONOO⁻ 제거능으로 in vitro 상에서 항산화능을 살펴본 실험결과, 1mg/ml의 고 농도에서 유의할 만한 항산화 효과가 나타났다. 그러나 in vivo 실험에서 섭취된 30mg/day의 사료 중 포함된 1mg의 다당류는 mouse에 유의할

만한 항산화 효과를 유발시키지 못하는 것으로 나타났다.

6. 급성·만성 독성효과

정상세포에 대하여 CBP와 WSP 전 농도에서 독성이 전혀 나타나지 않았다. 급성독성효과에서는 신장이나 간의 대사가 투여된 다당류에 의해 영향을 받지 않고 정상적으로 대사됨을 알 수 있었다. CBP 및 WSP의 in vivo 만성독성여부를 조사하기 위하여 각각을 2주간 복강에 투여하여 65일간 살펴보며 이상 여부를 관찰한 결과 대조군과 아무런 차이가 없었다.

제 4 절 연구분야에의 기여도

1. 기술적 측면

- ▶ 해양미생물 유래 고기능성 다당류의 추출 및 분리·정제 기술의 확보 가능
- ▶ 고기능성 다당류를 생산하는 대량발효생산을 위한 scale-up의 know-how 확보
- ▶ 고기능성 다당류의 개발로 수산가공제품(통조림, 어육연제품등)에 대한 저장기간 연장가능
- ▶ 산업분야별 이용기술의 확보
- ▶ 해양미생물의 고 기능성 다당류의 당쇄공학에 기여
- ▶ 유전공학적 기법을 이용, 타신규 생리활성물질 개발에 응용
- ▶ 고기능성 다당류 개발을 위한 생물공학적 응용기술의 확보가 가능
- ▶ 미생물 이용으로 대량생산이 가능하기에 지속적인 원료공급이 가능함
- ▶ 식품산업(연제품, 제과등), 의약품등 기타 연계산업에 응용
- ▶ 어육연제품, 통조림등에 첨가함으로써 고기능성 수산식품 창출
- ▶ 고 기능성 수산가공제품의 제조 및 공정기술의 확보

2. 경제·산업적 측면

- ▶ 국내 수산연제품 분야의 생산현황은 95년 출하액 1,065억원, 96년 2,229억원, 97년 2,705억원이며 98년도에는 3,069억원 상당으로 매년 평균 30% 성장율을 보이며 98년 기준 국외 수출량은 약9,970만 달러로써 본 연구가 이러한 국가기반산업에 기여하게 되면 막대한 시너지 효과를 창출할 수 있을 것으로 기대된다.
- ▶ 다당류의 경우 98년 183만톤이 생산되었으며 생산액 8억6766만원, 수출량 41만톤, 수출액 1억 4,206만원상당으로 충분한 잠재력이 있는 산업으로 동 부분에 대한 연구가 집중투자

된다면 국내산업은 물론 해외시장 확장에 무궁무진한 개발 가능성이 있을 것으로 사료된다.

- ▶ 국내기업의 해양생물공학 발전참여유도
- ▶ 해양미생물의 대량배양기술에 의한 부가가치창출
- ▶ 기능성 바이오 신소재 물질 확보
- ▶ 산학연의 협동체제에 의한 수산가공기술의 혁신 및 축척
- ▶ 건강기능성 연제품의 안정성 확보 및 생체조절기능 부여

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 세부과제에서는 “*Zoogloea* sp. 유래 heteropolysaccharides의 대량생산기술 및 고품질 수산연제품 생산을 위한 응용기술개발”의 연구를 수행하였다. 우리나라 남해안 지역에서 분리·동정해낸 해양미생물 *Zoogloea* sp.로부터 두 가지의 서로 다른 신규 생물고분자 다당류를 분리·정제해 냈다. 본 해양미생물로부터 생산된 두 가지 서로 다른 다당류는 국내외 어느 곳에서도 연구된 바 없는 신규 물질로서 균주로부터 최적생산조건 및 분리·정제기술, 물성 및 물리적 특성을 조사 검토함으로써 본 연구의 기본 목표에 충분히 도달하였다.

최적조건하에서 발효조를 이용 다당 생산한 결과 10 g/L이상 생산성을 나타내어 산업화를 위한 조건을 갖추었다고 판단되며 반연속식 배양법(semicontinuous fermentation)을 이용한 대량생산시 scale-up에 따른 표면적비와 배양 환경조건의 변화로 인해 다소 생산에 차이는 있을 것으로 보며, 대량생산을 하였을 경우 시간에 따른 생산비 절감을 가져올 것으로 사료된다.

생산된 다당류는 4일의 본 배양과정을 거친 후 원심분리 ~ 제품포장까지의 전 단계는 10일이 소요되며 1 cycle 당 2kg의 고기능성다당류를 생산 가능하였다.

정제된 다당류는 기존 상업화된 다당류에 비교하여 탁월한 물성 및 물리·화학적 특성을 함유한 것으로 밝혀졌다. 각종 염류에 대한 탁월한 점도 향상능 및 유지능과 CBP의 경우 gel 형성능의 가능성도 보여 각종 산업에서의 점증제 및 새로운 바이오 소재로써의 이용 가능성이 클 것으로 기대된다. 물리·화학적 특성면에서도 응집활성, 수분보수력, 유화능, 용해능, 겔형성력, 점착력 등의 모든 물리·화학적 특성이 뛰어나며(단연 탁월), 0.02 %의 소량 첨가에도 젤리강도가 무첨가에 비해 높으므로 바람직한 식품 첨가물로 평가됨으로서 응용분야에 대한 잠재적 가능성을 나타내었다. 또한 이러한 결과를 바탕으로 다당류를 식품(연제품)에 첨가하여 대조구에 비해 2배에 가까운 breaking force증대시켰다. 또한, 시제품 생산을 위한 여러 다당을 첨가 후 비교 시에도 탁월한 효과를 얻을 수 있었고, 관능검사를 통해 수산가공제품에 응용시 좋은 효과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

제 2 세부과제에서는 “Heteropolysaccharides 의 고 기능성 응용”를 목표로 하여 항균, 항산화, 항암 및 급·만성독성검사를 실시하여 우수한 기능성을 확인하였다. 기 항목이외 다당류의 면역활성을 검토하여 면역활성 증강효과를 함유한 것으로 밝혀졌다.

해양미생물 *Zoogloea* sp.로부터 다당류 대량생산을 위해 생산최적조건 및 생산된 다당류의 물성, 우수한 물리화학적 기능성, 항암, 면역활성 증강효과 등의 고기능성 생리활성과 동시에 식품첨가제로서의 안정성을 검증하였으며, 수산연제품에 첨가시 제품의 질적·양적면에서 다양한 제품개발 가능성 등을 검증하였고 수산연제품 산업분야로의 고기능성 제품응용가능성이 있

는 것으로 판단됨으로서 본 연구목적을 충족한 것으로 판단된다.

이런 결과를 이용하여 다음과 같은 분야에 응용할 수 있을 것으로 사료되어진다.

- ▶ 맛살, 오징어포, 어묵, 소세지등의 수산가공제품에 직접 첨가함으로써 고기능성 함유 수산가공제품의 제조에 적극 활용한다.
- ▶ 다당류가 가지는 고유의 고기능성을 이용하여 식품안정제, 저장보존료 등으로 활용한다.
- ▶ 얻어진 성과로써 미생물 다당류의 대량생산에 적극 이용한다.
- ▶ 체내대사 조절 및 각종 고기능성에 따른 이점을 이용하는 제약 산업에 적극 활용한다.
- ▶ 다당류의 특성을 이용 그 특성에 따라 제지산업, 석유산업, 화장품산업, 페인트, 살충제 등지에 광범위하게 이용한다.
- ▶ 본 연구성과는 저명한 국내 및 국외 학술저널지에 발표 및 특허출원함으로서 고기능성 개발에 연관된 기술을 검증받고 수산가공식품산업에 응용함으로써 새로운 해외시장개척에 이바지한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

세계 바이오 산업의 시장규모는 1992년 100억달러에서 1999년 313억달러로 급격히 성장하여 2000년에는 540억달러, 2003년에 740억달러, 2008년에 1,250억달러에 이를 것으로 전망된다. 연평균 성장률 기준으로 2000년부터 2013년까지 26.9%에 이르는 고성장이 예상되고 있는 것이다.

특히, 바이오산업중 60%를 차지하고 있는 바이오의약 분야를 제외한 부분에서 바이오공정이 핵심산업으로 현재 각광받고 있는 반도체나 통신, 자동차산업 등에 비해 부가가치가 매우 높은 산업이다.

세계 바이오 산업의 시장 규모

구 분	1997	2000	2003	2008	2013	연평균 성장율
바이오의약	18.8	32.4	44.4	68.8	115.5	19.7
바이오화학	-	3.8	5.2	10.0	16.8	26.3
바이오환경	1.8	3.2	4.4	8.7	14.7	27.6
바이오식품	1.6	2.7	3.7	7.5	12.6	28.2
바이오에너지, 자원	0.6	1.1	1.5	3.7	6.3	36.4
바이오농업, 해양	1.6	2.7	3.7	7.5	12.6	28.2
바이오공정, 측정시스템	4.7	8.1	11.1	18.8	31.5	22.2
총 계	29.1	54.0	74.0	125.0	210.	26.9

자료 : OECD 전망(1997)

특히, 국가별 시장점유율을 볼 때 미국이 55.6%, 일본이 28.8%, 유럽이 9.6% 순으로 이들 3개국이 90% 이상을 점유하고 있으며 2000년 이후에는 일본, 유럽의 비중이 점차 증대될 것으로 추정되고 있다. 또한, 각국의 해외연구개발현황을 살펴볼 때 미국의 경우 21세기를 위한 4대 생명공학과제에 있어 해양생명공학을 우선으로 농업, 환경, 생물공정을 선정하였으며, RID GE Program을 주도하며, 초기 해저지구물리탐사에서 극한 해양 생물자원 기능분석 및 활용기술로 연구방향을 재편하였다. 그리고, LExEN (Life in Extreme Environment) Program을 통해 2000년도에 벌써 1,200 만불을 투자하였다. 일본의 경우 미국에 genome project에서 밀린 이후 해양자원에 눈을 돌려 1998년 현재 해양생명공학관련 총 연구개발비가 약 10억불 규모로 막대한

투자를 하고 있다. 이러한 예로 일본해양과학기술연구센터(JAMSTEC)에서는 심해 미생물프론티어 연구에 10년 동안 500억엔을 투자하고 있으며, 해양생명공학연구소 (MBI : Marine Biotechnology Institute)는 정부와 24개 민간기업이 공동출자한 연구기관으로 연간 16억엔의 연구비를 투자하고 있다. 유럽국가의 경우는 EU 프로그램을 통해 (European Amores, Marflux/ATJ Projech등)을 통해 심해, 열수 환경연구 및 유용생물 자원 확보에 공동 투자하여, 극한 미생물 유전자 분석 등에서 미국, 일본 수준의 요소기술을 확보하고 있는 것으로 조사되었다. 아시아의 3대 용에 해당하는 중국은 해양발전 863 program 및 해양생명공학 819 계획을 통해 양식, 육종, 내염성 식물, 의료용 생체물질 및 생물공정 상품화 기술개발을 추진하고 있는 것으로 조사되었다. 따라서, 자원이 없는 한국으로서는 해양이라는 풍부한 자원을 바탕으로 정부 및 기업에서 투자와 이에 관련된 고급인력을 확보가 시급한 것으로 사료된다.

제 7 장 참고문헌

- Ahn, D. H. and Y. C. Chung. 1992. Biopolymer production of *Zoogloea ramigera* in batch, fed batch and continuous culture processes. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 196-202.
- Aspinal, G. O. 1982. The Polysaccharides. Vol.II. Academic Press Inc., UK.
- Baba, M., Pauwels, R., Balzarini, J., Arnout, J. and Desmyter, J. 1988. Mechanism of inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on replication of human immunodeficiency virus in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 6132-6136.
- Bao, X .F., Liu, C. P., Fang, J. N. and Li, X. Y. 2001. Structural and immunological studies of a major polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum*. *Carbohydr. Res.* **332**, 67-74.
- Bao, X. F., Wang, X. S., Dong, Q., Fang, J. N. and Li, X. Y. 2002. Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry* **59**, 175-181.
- Bart, D., V. Ferderik, and L. D. Vuyst 2001. Microbial physiology, fermentation kinetics, and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal.* **11**, 747-757.
- Bengmark, M. 1998. Ecological control of the gastrointestinal tract: the role of probiotic flora. *Gut.* **42**, 2-7.
- Bendtzen, K., Hansen, M. B., Ross, C., Poulsen, L. K. and Svenson, M. 1995. Cytokines and auto-antibodies to cytokines. *Stem Cells* **13**, 206-222.
- Božidar, S. and M. Vladimir. 1995. Temperature and dissolved oxygen concentration as parameters of *Azotobacter chroococcum* cultivation for use in biofertilizers. *Biotechnol. Lett.* **17**, 453-458.
- Buddington, K. K., Donahoo, J. B. and Buddington, R. K. 2002. Dietary oligofructose and inulin protect mice from enteric and systemic pathogens and tumor inducers. *J. Nutr.* **132**,

472-477.

Carr, L., Tucker, A. and Fernandez-Botran, R. 2003. In vivo administration of L-dopa or dopamine decreases the number of splenic IFN γ -producing cells. *J. Neuroimmunology* **17**, 87-93.

Cathcart, R., Sdhwiers, E. and Ames, B. M. 1983. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein fluorescent assay. *Anal. Biochem.* **134**, 111-116.

Chang, M. W., Y. S. Kang, J. W. Hong, J. D. Kim, and J. Y. Kong 1995. Production conditions of two polysaccharides from marine bacterium *Zoogloea* sp. *Korean J. Biotechnology and Bioengineering.* **10**, 518-524.

Chaplin, m. f. and J. F. Kennedy. 1996. Carbohydrate analysis. OXFORD UNIV. PRESS, Oxford New York Tokyo. 3. feeding. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 370-374.

Chen, H., Rubenthaler, G. L. and Schanus, E. G. 1988. Effect of apple fiber and cellulose on the physical properties of wheat flour. *J. Food Sci.* **53**, 304.

Choi, Y. J., Lee, H. S. and Cho, J. J. 1999. Optimization of ingredients formulation in low grades surimi sor improvement of gel strength. *J. Korean Fish. Soc.* **32**(5), 556-562.

Cooper D. G., Goldenburg B. G. 1987. Surface active agents of two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 224-229.

Craig, M. I., Benencia, F. and Coulombie, F. C. 2001. Antiviral activity of an acidic polysaccharides fraction extracted from *Cedrela tubiflora* leaves. *Fitoterapia* **72**, 113-119.

Damonte, E., Neyts, J., Pujol, C. A. Snoeck, R., Andrei, G., Ikeda, S., Witvrouw, M., Reymen, D., Haines, H., Matulewicz, M. C., Cerezo, A., Coto, C. E. and De Clercq, E. 1994. Antiviral activity of a sulphated polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. *Biochem. Pharmacol.* **47**, 2187-2192.

Daniel, I. C. W., L. C. Charles, L. D. Arnold, and D. Peter. 1979. Fermentation and enzyme

technology, 157–193.

De Clercq, E. 2000. Current lead natural products for the chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Medicinal Research Reviews* **20**, 323–349.

Ding, A., Nathan, C. F. and Steuhr, D. J. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from peritoneal macrophages: Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* **141**, 2407–2412.

Ebrigerova, A. Kardosova, A., Hromadkova, Z. and Hribalova, V. 2003. Mitogenic and comitogenic activities of polysaccharides from some European herbaceous plants. *Fetotherapia* **74**, 52–61.

Escribano, J., Diaz-Guerra, M.J.M., Riese, H.H., Ontanon, J., Garcia-Olmo, D., Garcia-Olmo, D.C., Rubio, A. and Fernandez, J.A. 1999. In vitro activation of macrophages by a novel proteoglycan isolated from corms of *Crocus sativus* L. *Cancer Letters* **144**, 107–114.

Gan, L. Zhang, S.h., Liu, Q. and Xu, H.B. 2003. A polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum* upregulates cytokine expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Eur. J. Pharmac.* **471**, 217–222.

Gandon, C. and Bruneteau, M. 1998. Structural studies of the extracellular β -D-glucans from *Phytophthora parasitica* Dastur. *Carbohydr. Res.* **313**, 259–263.

Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. 1982. Analysis of nitrate, nitrite and ^{15}N nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**, 131–138

Guillouet, S., J. H. Choi, C. K. Rha, and A. J. Sinskey. 1999. Effects of yeast extract on the production and the quality of the exopolysaccharides, zooglan, produced by *Zoogloeal ramigera* 115LR. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 235–240.

Hasui, M., Matsuda, M. and Okutani, K. 1995. In vitro antiviral activities of sulfated polysaccharides from a marine microalga (*Cochodinium polykrikoides*) against human

immunodeficiency virus and other enveloped viruses. *Int. J. Biol. Macromol.* **17**, 293–297.

Holan, V., Krulova, M., Zajicova, A. and Pindjakova, J. 2001. Nitric oxide as a regulatory and effector molecule in the immune system. *Molecular Immunology* **38**, 989–995.

Hong, J. W., Y. S. Kang, S. K. Bae, J. D. Kim, and J. Y. Kong. 1995. Studies on metal bioabsorption by polysaccharide produced by *Zoogloea* sp. *Korean Institute of Biotechnology and Bioengineering Conference '95*, Abstract, 58.

Hu, j. f., Gen, M. Y., Zhang, J. T. and Jiang, H. D. 2001. An in vitro study of the structure–activity relationships of sulfated polysaccharide from brown algae to its antioxidant. *J. Asian Natr. Products Res.* **3**, 353–358.

Jang, J. D. and B. P. John. 2000. An unstructured kinetic model of macromolecular metabolism in batch and fed batch cultures of hybridoma cells producing monoclonal antibody. *Biochemical Engineering Journal* **4**, 153–168.

Jang J. H., Bae S.K., Kim B. H., Ha S. D., Kong J. Y. 1998. Effects of fermentation conditions on the production of the useful polysaccharide from marine bacterium *Zoogloea* sp. new biomaterial for metal adsorption and enzyme immobilization. *J. Mar. Biotechnol.* **6**, 99–103.

Jang J. H., Bae S. K., Lim D. J., Kim B. J., Kong J. Y. 2002. Rheological properties of polysaccharides produced by a *Zoogloea* sp. *Biotechnology Letters* **24**, 297–301.

JMP. 1995. Statistics and graphics guide. SAS Institute Inc, N. C., USA

Jung, S. J., Song, K. B., Kim, B. Y., Chun, U. H. and Rhee, S. K. 1999. Viscosity and thermal characterization of levan. *Food Engineering Progress* **3**(3) 176–180.

Kamat, J. P., Bloor, K. K., Devasagayam, T. P. A. and Venkatachalam, S. R. 2000. Antioxidant properties of *Asparagus racemosus* against damage induced by γ -radiation in rat liver mitochondria. *J. of Ethnopharmacology* **71**, 425–435.

Kato, I. 2000. Antitumor activity of the lactic acid bacteria. In: Probiotics (Fuller, R. and

Perdigon, G., eds.) pp.115–138. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Kelly–Quagliana, K. A., Nelson, P. D. and Buddington, R. K. 2003. Dietary oligofructose and inulin modulate immune functions in mice. *Nutr. Res.* **23**, 257–267.

Kim, H. M., Han, S .B., Oh, G. T., Kim, Y. H., Hong, D. H., Hong, N. D. and Yoo, I. D. 1996. Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phellinus linteus*. *Int. J. immunopharmac.* **18**, 295–303.

Kim, S. K., I. S. Kong, K. J. Kwon, C. H. Rha, A. J. Sinskey, and J. Y. Kong. 1994. Exopolysaccharides produced by *Z. ramigera* mutants and analysis of solution properties. *Biotechnology Lett.* **16**, 789–794.

Kong, J. Y., Lee, H. W., Hong, J. W., Kang, Y. S, Kim, J. D., Chang, M. W. and Bae, S. K. 1998. Utilization of a cell bound polysaccharide produced by the marine bacterium *Zoogloea* sp.: New biomaterial for metal adsorption and enzyme immobilization. *J. Mar. Biotechnol.* **6**, 99–103.

Kooy, N. W., Royall J. A., Ischiropoulos, H. and Beckman, J. S. 1994. Peroxy–nitrite–mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic. Res. Commun.* **16**, 149–156.

Kulicke, W. M., Lettau, A. I. and Thielking, H. 1997. Correlation between immunological activity, molar mass, and molecular structure of different (1→3)–β–D–glucans. *Carbohydr. Res.* **297**, 135–143.

Kole, M. M., I. Darper, and D. F. Gerson. 1988. protease production by *Bacillus subtilis* in oxygen–controlled, glucose fed batch fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 404–408.

Kwon, G. S., Joo, S. H. and Oh, T. K. 1992. Isolation of exopolysaccharide producing *Bacillus polymyxa* KS–1 and some properties of exopolysaccharide. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 34–39.

Kwon, K. J. Park, K. J., Kim, J. D., Kong, J. Y. and Kong, I. S. 1994. Isolation of two different polysaccharides from halophilic *Zoogloea* sp. *Biotechnol. Lett.* **16**, 783– 788.

Lee, J. M., Kwon, H. J., Jeong, H., Lee, J. W., Lee, S. Y., Back, S. J. and Surh Y. J. 2001. Inhibition of lipid peroxidation and oxidative DNA damage by *Ganoderma lucidum*. *Phytother. Res.* **15**, 245-249.

Lee, J. S., S. Y. Lee, and S. W. Park. 1999. Control of fed batch fermentations. *Biotechnology Advances* **17**, 29-48.

Lee, J. Y, H. A. Kang, and J. W. Yand. 1999. The Characteristics of carbon dioxide fixation by *Chlorella* sp. HA-1 in semicontinuous operation, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 742-746.

Lee, S. M. and Y. M. Koo. 2001. Pilot-scale production of cellulase using *trichoderma reesei* Rut C-30 in fed Batch Mode. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 229-233.

Li, Y., J. Chen, D. F. Liang, and S. Y. Lun. 2000. Effect of nitrogen source and nitrogen concentration on the production of pyruvate by *Torulopsis glabrata*, *Journal of Biotechnology* **81**, 27-34.

Lui, F., Ooi, V. E. C. and Chang, S. T. 1997. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Science* **60**, 763-771.

Marshall, W. H., Dutson, T. R., Carpenter, Z. L. and Smith, G. C. 1975. A simple method for emulsion end-point determination. *J. Food Sci.* **40**, 896.

Matsuda, M., Shigeta, S. and Okutani, K. 1999. Antiviral activities of marine *pseudomonas* polysaccharides and their over sulfated derivatives. *Mar. Biotechnol.* **1**, 68-73.

Mcneil, B. and L. M. Harvey. 1990. Fermentation. THE PRACTICAL APPROACH SERIES, 113-114.

Miyazaki, T. and Nishijima, M. 1981. Studies on fungal polysaccharides, XXVII. Structure examination of a water soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* **29**, 3611-3616.

- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **65**, 55–63.
- Nakamura J., Miyashiro S., Hirose Y. 1976. Screening, isolation and some properties of microbial cell flocculants. *Agri. Biol. Chem.* **40**. 619.
- Naoka S. and Misaki A. 1992. Isolation, characterization, and antitumor activities of the cell wall polysaccharides from *Elsinoe leucospila*, *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 29.
- Neu, T. R., Poralla, K. 1990. Emulsifying agents from bacteria isolated during screening for cells with hydrophobic surfaces, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 521.
- Nienow, A. W. and T. P. Elson. 1988. Aspects of mixing in rheologically complex fluids. *Chem. Eng. Res.* **66**, 5–15.
- Okada, M. 1963. Elastic property of kamaboko. *Nippon Suisan Gakkaishi.* **36**(1):75–76.
- Park, J. W., 1994. Functional protein additives in surimi Gels. *J. Food Sci.* **59**(3), 525–527.
- Phillips, C. R. and Y. C. Poon. 1988. Electron Microscopy. In Immobilization of cells. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, 97–103.
- Punal, A., M Trevisan, A. Rozzi, and J. M. Lema. 2000. Influence of C:N ration on the start-up of up-flow anaerobic filter reactors. *Wat. Res.* **34**, 261–264.
- Reddy, B. 1999. Possible mechanism by which pro- and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumor growth. *J. Nutr.* **129**, 1478S–1482S.
- RICHAR, F. U. Genus VI. *Zoogloea Itzighohn 1868.* *30*^{AL} 214.–219.
- Rouhier, P., Kopp, M., Begot, V. Bruneteau, M. and Fritig, B. 1995. Structural features of fungal β -D-glucans for the efficient inhibition of the initiation of virus infection on *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* **37**, 57–62.
- Ruperez, P., Ahrazem, O. and Leal, J. A. 2002. Potential antioxidant capacity of sulfated

polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *J Agric. Food Chem.* **50**, 840–845.

Ryu, B. H., Kim, D. S., Cho, K. H. and Sin, D. B. 1989. Antitumor activity of seaweeds toward Sarcoma-180. *Korean J. Food Sci. Technol.* **21**, 595–600.

SAS Institute. 1996. SAS user guide. Release 6.12 edition, SAS Institute Inc, N.C. USA

Sasaki, S., Kodama, K. and Yoshino, H. 1985. Antitumor activity of cell walls of microorganisms. *Agric. biol. Chem.* **49**, 2807–2808.

Shi, Y. L., James, A. E., Benzie, I. F. F. and Buswell, J. A. 2002. Mushroom-derived preparations in the prevention of H₂O₂-induced oxidative damage to cellular DNA. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* **22**, 103–111.

Shin, H. K., J. Y. Kong, J. D. Lee, and T. H. Lee. 2000. Synthesis of hydroxybenzyl- α -glucosides by amyloglucosidase-catalyzed transglycosylation. *Biotechnol. Lett.*, **22**, 321–325.

Shin, K. H., Lim, S. S., Lee, S. H., Lee, Y. S. and Cho, S. Y. 2001. Antioxidant and immunostimulating activities of the fruiting bodies of *Paecilomyces japonica*, a new type of *Cordyceps* sp. *Ann of the New York Acad. of Sci.* **928**, 261–273.

Singh, A. and O. P. Ward. 1997. Production of high yields of arachidonic acid in a fed batch system by *Mortierella alpina* ATCC 32222. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 1–5.

Sogawa, K., Kodama, E., Matsuda, M. Shigeta, S and Okutani, K. 1998. Marine microalgal polysaccharide induces apoptosis in human lymphoid cells. *J. Mar. Biotechnol.* **6**, 35–38.

Sogawa, K., Matsuda, M. and Okutani, K. 1998. Induction of apoptosis by a marine microalgal polysaccharide in a human leukemic cell line. *J. Mar. Biotechnol.* **6**, 241–243.

Sogawa, K., Yamada, T., Sumia, T., Hamakawa, H., Kuwabara, H., Matsuda, M., Muramatsu, Y., Kose, H., Matsumoto, K., Sasaki, Y., Okutani, K., Kondo, K and Monden, Y. Induction of apoptosis and inhibition of DNA topoisomerase-I in K-562 cells by a marine microalgal polysaccharide. *Life Sciences* **66**, 227–231.

Son, B. S., Park, S. K., Kang, S. K., Lee, S. W., Seong, C. N. and Sung, N. K. 1995. Isolation of the exopolysaccharide producing microorganism and their cultural characteristics . *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**(3), 263-268.

Sone, Y., Okuda, R., Wadw, N., Kishida, G. and Misaki, A. 1985. Structures and anti-tumor activities of polysaccharides isolated from fruiting body and growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 2641-2653.

Suzuki, T., T. Yamane, and S. Shimizu. 1986. Mass production of poly- β -hydroxybutyric acid by fed batch culture with controlled carbon/nitrogen feeding. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 370-374.

Taper, H. S. and Roberfroid, M. 1999. Influence of inulin and oligofructose on breast cancer and tumor growth. *J. Nutr.* **129**, 1488S-1491S.

Witvrouw, M. and De Clercq, E. 1997. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *Gen. Pharmac.* **29**, 497-511.

Wang, S. Y., Hsu, M. L., Hsu, H. C., Tzeng, C. W., Lee, S. S., Shiao, M. S. and Ho, C. K. 1997. The antitumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. *Int. J. Cancer* **70**, 699-705.

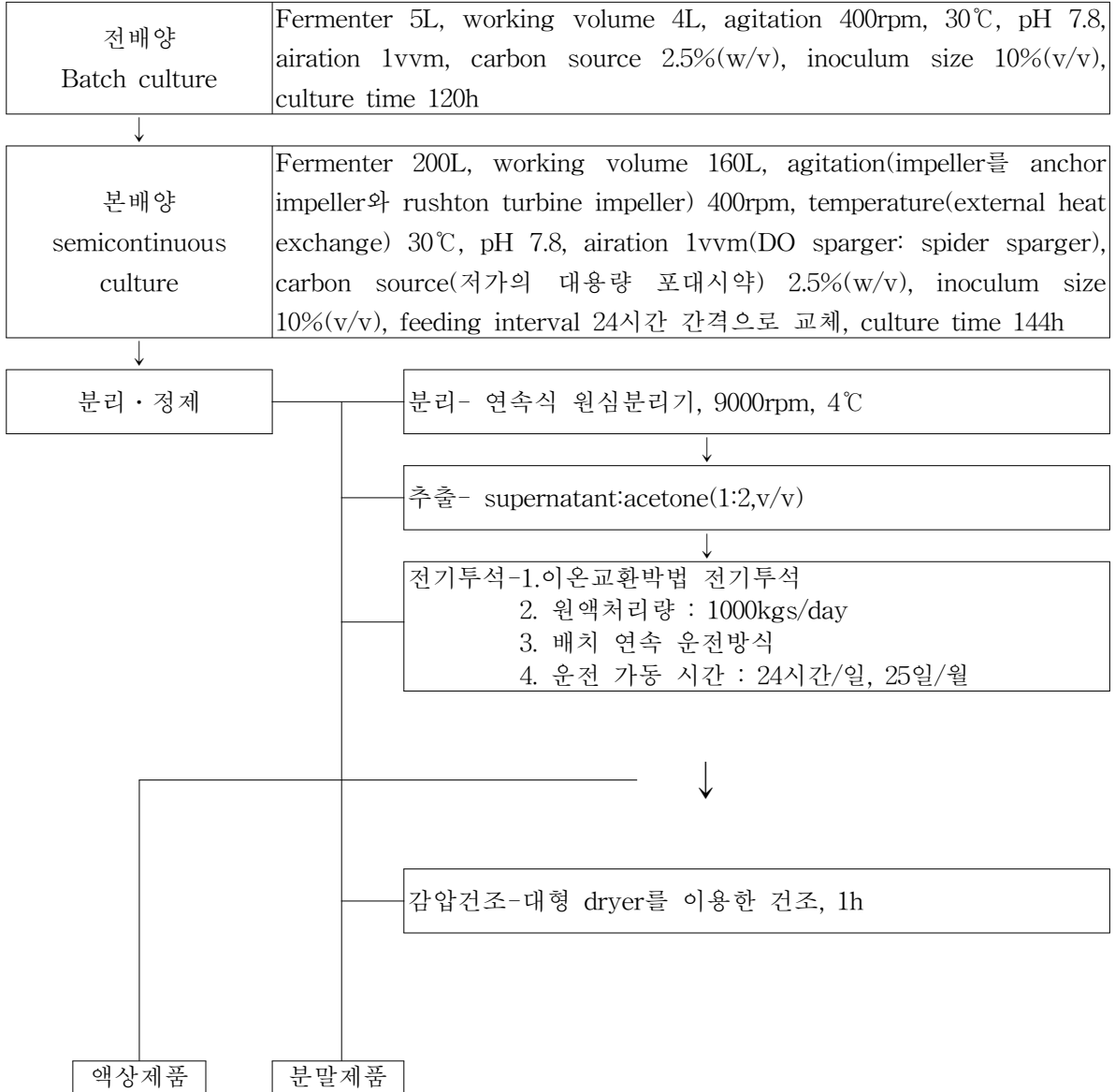
Waser, S. P. and Weis, A. L. 1999. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Critical Reviews in Immunology* **19**, 65-96.

Yuan, L., Kobayashi, M., Kuramitsu, Y., Li, Y., Matsushita, K. and Hosokawa, M. 1997. Restoration of macrophage tumoricidal activity by bleomycin correlates with the decreased productin of transforming growth factor β in rats bearing KDH-8 hepatoma cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **45**, 71-76.

류태형, 등 1992. 생쥐에 이식한 암세포에 있어서의 linolic acid의 암 억제효과, *대한암학회지*, **24**, 293.

2004년도 수산특정연구개발사업 보완사항

[1] 대량생산을 위한 공정의 표준화를 검토할 것



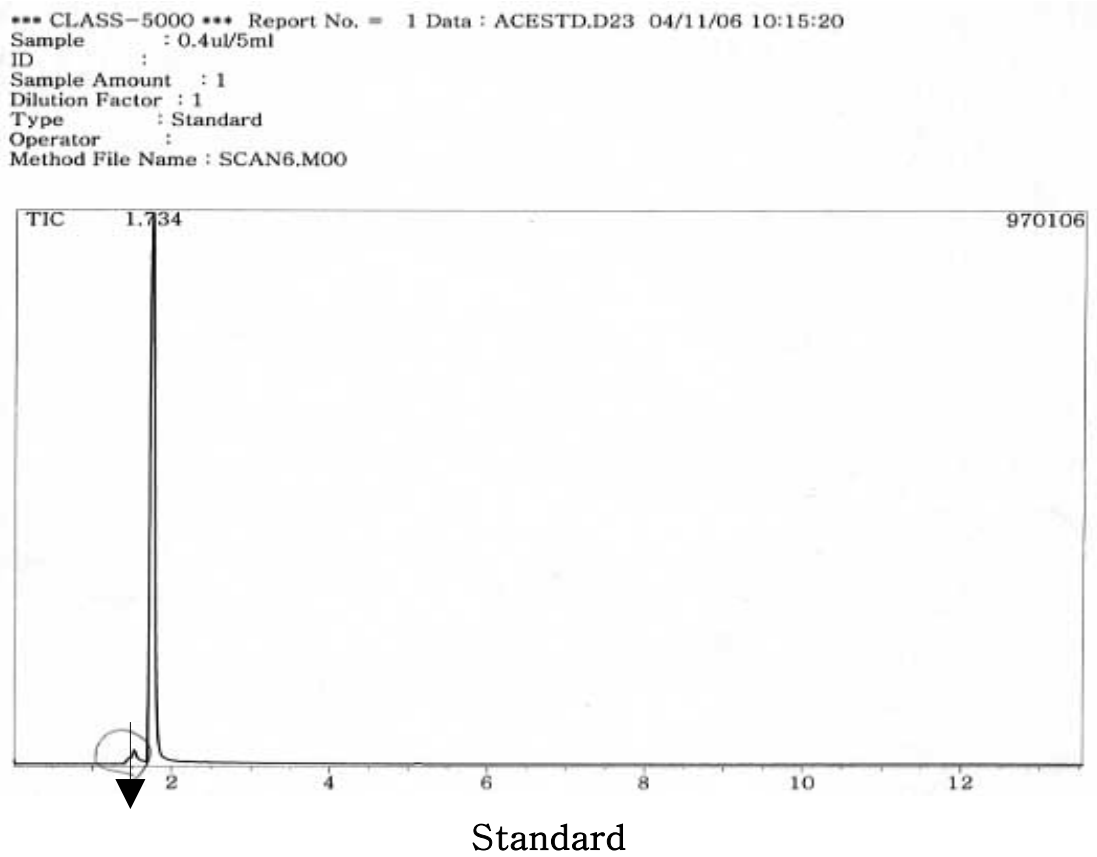
[2] 식품 또는 의약품 활용을 위한 용매추출방법을 현행 식품관련법에 준하여 검토할 것

최종생산물인 WSP와 CBP에 acetone의 잔존량을 측정하기 위해 Gas chromatography /Mass spectrometer(shimadzu, GCMS QP-5050A)를 이용하여 Headspace 법으로 측정하였다. 실험은 WSP 0.035g, CBP 0.029g를 5ml 증류수에 녹여 측정하였다. 각각의 농도는 0.313nl/ml 과 0.204nl/ml였다.

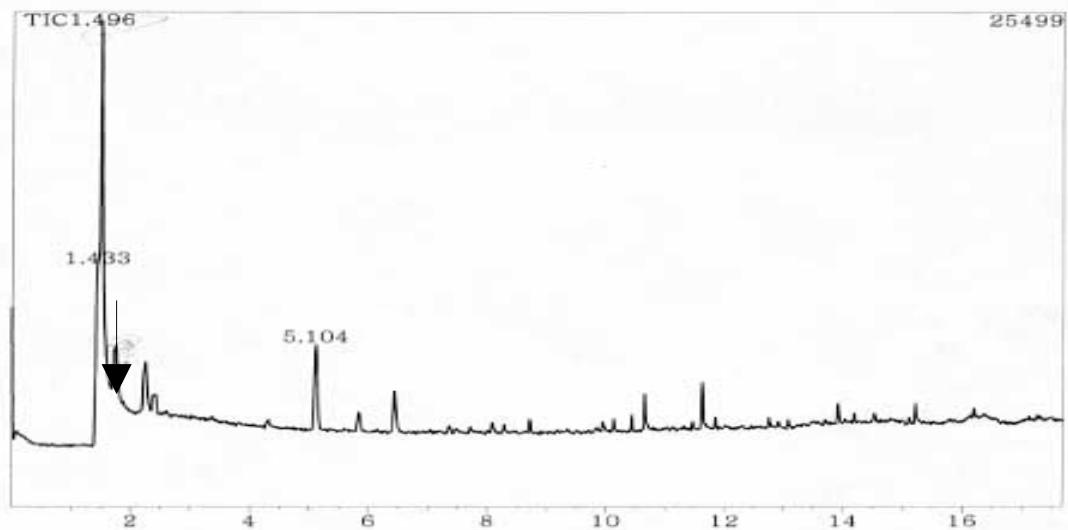
그 결과 시료 1g당 아세톤의 양은 WSP는 44.71 nl/g, CBP는 35.17 nl/g 이였고, 백분율로는 각각 $0.3536 \times 10^{-2} \text{ \% (g/g)}$, $0.2781 \times 10^{-2} \text{ \% (g/g)}$ 이였다.

본 실험 결과로 WSP와 CBP를 식품 및 의약품에 사용하더라도 무해한 것으로 판명되었다.

*참조: 의약품잔류용매기준가이드라인(案)

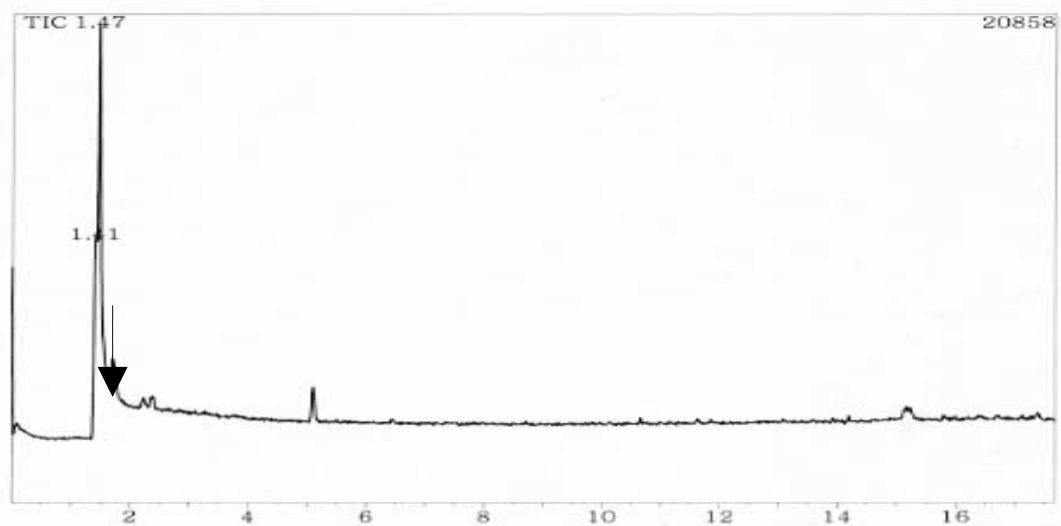


*** CLASS-5000 *** Report No. = 1 Data : WSP.D23 04/11/06 10:42:02
Sample : 0.035
ID :
Sample Amount : 1
Dilution Factor : 1
Type : Unknown
Operator :
Method File Name : SCAN6.M00



WSP

*** CLASS-5000 *** Report No. = 1 Data : CBP.D23 04/11/06 11:47:49
Sample : 0.035
ID :
Sample Amount : 1
Dilution Factor : 1
Type : Unknown
Operator :
Method File Name : SCAN6.M00



CBP

의약품잔류용매기준가이드라인(案)

-저독성 용매

분류 3의 용매(표 3)는 독성이 적고 사람의 건강에 있어 위험정도가 낮은 것이다. 분류 3은 의약품중 일반적으로 인정되는 범위내에서 사람건강에 유해하다고 알려진 용매는 포함되지 않는다. 그러나, 분류 3의 용매중 많은 용매가 장기독성이나 발암성에 대하여 연구되어 있지 않다. 현재 입수된 데이터에 의하면 분류 3의 용매는 급성독성 또는 단기독성에서 저독성이며, 유전독성에서 음성을 나타내었다. 하루에 50mg이하(방법 1에서 5,000ppm이나 0.5%에 상당량)의 경우 잔류용매의 양은 타당한 자료없이도 인정될 수 있다. 이보다 높은 잔류량에 대하여도 제조업자의 제조능력이나 의약품제조 및 품질관리기준(GMP)의 이행상 필요성으로 판단할 때 타당성이 인정되는 경우 허용된다.

표 3. 의약품중 분류 3의 용매 의약품제조및품질관리기준 또는 그외 품질기준에 따라 규제되는 용매

초산 아세톤 아니솔 1-부탄올 2-부탄올 초산n-부칠 t-부칠메칠에틸 크멘 디메칠설펍시드 에탄올 초산에칠 디에칠에틸(에틸) 개미산에칠 개미산	헵탄 초산이소부칠 초산이소프로필 초산메칠 3-메칠-1-부탄올 메칠에칠케톤 메칠이소부틸케톤 2-메칠-1-프로판올 펜탄 1-펜탄올 1-프로판올 2-프로판올 초산프로필 테트라히드로푸란
--	--