

질량분석 시스템을 이용한 극지 토양 유래 신규 미생물의 지질 A 화학적 구조 분석

황철환[†], 박한규[†], 김윤곤*

Determination of Lipid A Profile of Gram-Negative Bacteria from Arctic Soils Using Mass Spectrometric Approaches

Cheol-hwan Hwang[†], Han-Gyu Park[†], and Yun-Gon Kim*

Received: 18 October 2016 / Accepted: 9 November 2016

© 2016 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: For decades, the microorganisms in arctic soils have been newly discovered according to the climate change and global warming. In this study, the chemical structure of a lipid A molecule from *Pseudomonas sp.* strain PAMC 28615 which was newly discovered from arctic soils was characterized by mass spectrometric approaches such as matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) and MALDI multi-stage tandem mass spectrometry (MS). First, lipopolysaccharide (LPS) from *Pseudomonas sp.* strain PAMC 28615 was extracted and subsequently hydrolyzed to obtain the lipid A. The parent ion peak at m/z 1632 was determined by MALDI-TOF MS, which also can validate our lipid A purification method. For detailed structural determination, we performed the multiple-stage tandem mass analysis (MS^4) of the parent ion, and subsequently the abundant fragment ions in each MS stage are tested. The fragment ions in each MS stage were produced from the loss of phosphate groups and fatty acyl groups, which could be used to confirm the composition or the position of the lipid A components. Consequently, the mass spectrometry-based lipid A profiling method could provide the detail chemical structure of lipid A from the *Pseudomonas sp.* strain PAMC 28615 as an arctic bacterium from the frozen arctic soil.

Keywords: Arctic soils, Gram negative bacteria, Lipid A, MALDI-TOF MS, MALDI multi-stage tandem MS

1. INTRODUCTION

최근 전 세계적 기후 변화가 남극과 북극의 온도를 증가시키기에 따라, 극지 영구동토층 (permafrost)도 점진적으로 그러나 매우 광범위하게 녹고 있다 [1,2]. 이로 인해, 기존에 발견되지 않았던 새로운 종의 미생물들이 녹은 극지 토양으로부터 발견되고 있어서, 새로 발견되는 극지 미생물에 대한 분류학적, 기능적 다양성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다 [3, 4]. 하지만, 향후 신규 극지 미생물을 이용하여 인간에게 유용한 생물 자원을 확보하기 위한 도입에 있어서 상대적으로 극지 유래 신규 미생물에 대한 독성 및 안전성 연구는 매우 미비한 상황이다.

극지 동토층으로부터 스크리닝된 미생물 중 그람 음성균 (Gram-negative bacteria)은 내독소 (endotoxin)라 불리는 lipopolysaccharide (LPS)가 존재하는데, 이는 사람 또는 동식물에 게 염증, 패혈성 쇼크 및 균혈증과 같은 병적 증상을 일으키는 주 원인으로 작용한다 [5-8]. 이러한 그람 음성균의 내독소는 전통적으로 *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL) 테스트를 통해 존재 유무를 쉽게 판단할 수 있지만, 여기서 내독소의 존재 유무 판별이 곧 내독소의 독성 유무를 입증해주지는 못하는 것으로 보고되고 있다. 그래서, 여러 선행 연구들에서는 LPS의 화학적 구조 분석을 통해 각 내독소의 구조적 특성을

[†]These authors contributed equally to this work.

숭실대학교 화학공학과
Department of Chemical Engineering, Soongsil University, Seoul, Korea
Tel: +82-2-828-7099, Fax: +82-2-812-5378
e-mail: ygkim@ssu.ac.kr

파악하고 이를 면역 생물학적 독성 평가에 활용하여 왔다 [9]. 따라서, 본 극지 유래 신규 미생물의 독성 평가의 위한 연구에 있어서도 내독소에 대해 보다 구체적인 화학적 분석을 통해 기존의 우리 주변의 미생물들이 갖고 있는 LPS 구조와 비교해 봄으로써 극지 미생물이 갖는 독성을 예측해 볼 수 있는 연구가 필요하다.

LPS는 화학 구조적으로 크게 O-항원 (O-antigen), 중심 올리고당 (core-oligosaccharide), 그리고 지질 A (lipid A) 부분으로 구성된다. O-항원은 균종에 따라 다른 구조를 가지기 때문에 체내에서 균을 인지하는 표면항원으로 작용한다 [10]. 중심 올리고당은 O-항원 및 지질 A 사이에 직접 연결되어 있으며 당과 keto-deoxyoctulosonate (KDO)로 구성되어 있다. 그리고 지질 A는 소수성을 띄며 LPS가 세포 외막에 고정되어 있도록 한다 [11]. 지질 A는 미생물 종마다 다른 화학적 구조를 가지고, 이에 따라 생물학적 활성측면에서 세포 내 독성을 결정짓는다. 그러므로, 지질 A의 화학적 구조 분석은 사람 또는 동식물에게 일으킬 수 있는 독성의 유형을 파악하는데 있어서 매우 중요하다. 특히 지질 A의 구조에 있어서 아실 사슬 (acyl chain)의 위치와 개수 및 인산기의 존재 유무가 내독소 활성에 큰 영향을 끼친다 [12]. 지질 A 구조 분석을 위한 선행 연구들에 있어서는, 핵자기공명 분광기 (nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy) [13], 전기분무 질량분석기 (electrospray ionization coupled tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS)) [14], 모세관 전기영동 질량분석기 (capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS)) [15], 및 매트릭스 보조 이온화/탈착 질량분석기 (matrix-assisted laser ionization/desorption time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)) [16]를 다양하게 이용하여 그람 음성균 지질 A의 화학적 구조를 규명하였다.

본 연구에서는, 다양한 질량분석 시스템을 이용하여 해빙된 북극 동토층으로부터 분리한 신규 극지 미생물 지질 A의 화학적 구조를 규명하였다. 먼저, 새롭게 스크리닝한 극지 미생물은 16S RNA sequencing을 통하여 *Pseudomonas* 속 (genus)임을 확인하였으며, Phenol/water extraction 방법을 기반으로 한 kit를 이용해 LPS를 추출한 뒤, 가수분해를 통해 최종적으로 분석하고자 하는 lipid A를 확보하였다 [17]. MALDI-TOF MS는 지질 A의 추출 여부 및 예상되는 질량값을 확인시켜주었으며, 보다 자세한 화학적 구조 분석을 위해 다단계 질량분석 (tandem mass spectrometry)이 가능한 MALDI 사중극자 이온트랩 (QIT) TOF MS (MALDI-QIT-TOF MS)를 이용하여 지질 A의 아실 사슬의 개수 및 위치, 인산기, 글루코사민 이당류의 존재 유무를 성공적으로 규명할 수 있었다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 극지 토양 샘플 채취

본 연구에서 사용한 토양은 2014년 7월에 Svalbard Science Forum (RIS ID: 6752)의 허가를 받아 Svalbard의 Ny-Ålesund

지역에 위치한 Midtre Lovénbreen 빙하에서 채취되었다. 빙하 앞 0~5 cm 깊이의 토양을 멸균된 50 mL Falcon tube를 이용하여 채취하였으며 5°C에 보관하였다. 이후, 채취된 토양을 -70°C에 미리 얼려둔 아이스팩이 담긴 얼음통을 이용해 실험실로 옮겼고, 박테리아를 분리할 때까지 4°C에서 보관하였다.

2.2. Arctic *Pseudomonas*의 분리 및 배양

채취한 극지 토양 1 g을 10 mL의 Nutrient Broth (Acumedia)와 Luria Bertani (LB) broth (Merck KGaA)에 접종하고, 20°C에서 24시간 동안 호기 조건으로 배양하였다. 그것을 다단계 희석하여 100 µL를 *Pseudomonas* Isolation Agar (17208, Sigma-Aldrich) 플레이트에 (Peptic digest of animal tissue, 20 g/L; Potassium sulfate, 10 g/L; Magnesium chloride, 1.4 g/L; Triclosan (Irgasan), 0.025 g/L; Agar, 13.6 g/L; pH, 7.0±0.2) 4, 15, 20 그리고 25°C 조건으로 2주 동안 평판배양하였다. 다양한 콜로니 중 한 가지를 분리하여 위와 같은 조건으로 반복 배양 하였다. 이를 통해 단일 콜로니로 분리하였고 종을 확인하기 위해 16S rRNA sequencing을 수행하였다. 분리된 *Pseudomonas*로부터 게놈 DNA를 추출하였고, 16S rRNA 유전자는 universal degenerate primer인 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 사용하여 PCR (polymerase chain reaction)을 통해 증폭되었다 [18]. 증폭된 후 TOPO TA cloning kit (Invitrogen)를 사용하여 복제하였고, 16S rRNA의 유전서열을 확인하여 신규 *Pseudomonas* 종으로 Polar and Alpine Microbial Collection (PAMC, <http://pamc.kopri.re.kr>)에 등록하였다 (*Pseudomonas* sp. strain PAMC 28615).

2.3. Arctic *Pseudomonas*의 지질 A 추출

배양하여 얻은 균을 용해하기 위해 LPS extraction kit (Intron Biotechnology, USA)의 lysis buffer 1 mL를 20 mg의 *Pseudomonas* sp. strain PAMC 28615 세포에 첨가하고 와류혼합기를 이용하여 완전히 용해될 때까지 혼합하였다. 이후, 세포가 용해된 시료에 200 µL의 chloroform을 첨가한 후 13,000 rpm, 4°C에서 45분간 원심 분리하였다. 분리된 상층액 400 µL 추출한 후, LPS를 정제하기 위하여 LPS extraction kit의 purification buffer 800 µL를 첨가 및 혼합하고 -20°C에서 2시간 동안 보관하였다. 이후, 시료를 14,600 rpm, 4°C에서 10분간 원심 분리를 하여 침전된 LPS를 얻었다. 얻어진 LPS를 70% EtOH로 2회 반복하여 세척한 후, Speed-Vacuum 건조기를 이용하여 건조시켰다.

LPS에서 지질 A를 얻기 위해 1% acetic acid 200 µL를 건조된 LPS에 첨가한 후 100°C에서 90분간 가열하여 가수분해하였다. 상온에서 식힌 후 chloroform 400 µL와 methanol 200 µL를 첨가 및 혼합하였고, 8000 rpm, 15°C에서 5분간 원심 분리하였다. 소수성의 지질 A를 얻기 위해 아래의 chloroform층을 새로운 1.5 mL tube에 옮긴 후 질소 가스를 이용하여 건조시켰다.

2.4. 지질 A의 탈인산화

탈인산 구조의 단편과 지질 A의 중추 부분인 Chitobiose의 글리코시드 결합이 끊어진 단편을 얻기 위해 48% 플루오린화 수소산 100 μ L를 첨가하여 4°C에서 48시간 동안 가수분해하였다.

2.5 MALDI-TOF MS 분석

MALDI-TOF MS 분석을 위해 건조된 지질 A 시료를 50% (v/v) 메탄올/클로로포름 10 μ L에 첨가하였고 1 μ L를 matrix 용액 (50 mg/mL 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) / 70% (v/v) acetonitrile (ACN)) 1 μ L와 혼합하여 MALDI 분석용 플레이트에 1 μ L를 점적한 후 상온에서 건조시켰다. Microflex LRF MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Germany)의 negative mode와 reflectron mode에서 지질 A 분석을 수행하였고, 스펙트럼은 spot당 200 shot씩 각각 다른 5개의 spot에서 합하여 1000 shot을 얻었다. MALDI 분석은 가속 전압 = 20 kV, 레이저 주파수 = 60 Hz, 이온 소스 1 전압 = 19 kV, 이온 소스 2 전압 = 16 kV, 렌즈 전압 = 9.8 kV, 검출기 획득 = 5.8 그리고 레이저 세기 = 55~65%의 조건으로 수행하였다.

2.6. MALDI-QIT-TOF MSⁿ 분석

지질 A의 구조를 결정하기 위해 MALDI-QIT-TOF MS (Axima Resonance, Shimadzu, Manchester, UK)를 사용해 MSⁿ 분석을 수행하였다. 지질 A의 이온화 및 탈착은 레이저 (90~100 power)로 인한 펄스 (337 nm, 3 ns pulse width, max pulses rate 10 Hz) 발생으로 이뤄진다. 다단계 질량분석을 위해 이온들은 3차원 이온 트랩 (2×10^{-5} to 2.5×10^{-5} mBar)에 붙잡히며 그 안에서 CID (Collision-induced dissociation) 설정 값 (100~120)에 따라 단계별로 분해했다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 지질 A의 MALDI-TOF MS 분석

극지 동토에서 새로 발견된 균 중 분리된 *Pseudomonas*는 16S rRNA sequencing 결과, 새로운 종으로 확인되었다 (*Pseudomonas* sp. strain PAMC 28615). Phenol/water extraction을 기반으로 한 LPS extraction kit를 이용하여 LPS를 추출하였고, 추출한 LPS에 1% acetic acid 200 μ L을 첨가한 후 100°C에서 90분 동안 가수분해하여 지질 A를 추출하였다 [19]. MALDI 기반 분석조건에선 parent ion에 대한 fragment ion들이 발생하기 때문에 이를 통한 지질 A의 구조정보 확인이 용이하여 MALDI-TOF MS를 이용한 지질 A의 구조분석을 수행하였다. MALDI-TOF MS의 질량분석 결과와 이전 선행 연구들에서 보고된 *Pseudomonas* 지질 A의 일반적인 구조를 기반으로 *Pseudomonas* sp. strain PAMC 28615의 지질 A 구조를 확인할 수 있었다 (Fig. 1(a)) [20-23]. MS 스펙트럼에서 온전한 지질 A 구조에 해당하는 m/z 1632 피크와 그 단편 구조들에 해당하는 m/z 1552, m/z 1462 그리고 m/z 1382 피크들이 발견되었다 (Fig. 1(b)). m/z 1552는 m/z 1632에서 GlcN I C-1자리의 아인산 (phosphite group)이 잘린 구조이며, m/z 1462은 GlcN II C-3'자리의 'A2'아실 사슬 10:0 (3-OH)이 가까이 존재하는 GlcN II의 인산기에 의한 'charge-driven'과정으로 중성 케텐 유도체 (neutral ketene derivatives) 형태로 잘린 구조의 피크로 확인되었다. 그리고 m/z 1382는 m/z 1462에서 GlcN I의 C-1 자리의 아인산 (phosphite group)이 하나 떨어진 구조인 것으로 확인되었으며, m/z 1552와 동일하게 GlcN I의 C-1자리에서 먼저 아인산이 잘리는 이유는, GlcN II의 C-4'탄소보다 당에 존재하는 산소원자에 가깝기 때문에 분자 내 전자 불균형으로 상대적으로 불안정하여 외부 에너지에 의해 끊어지기 쉽기 때문이다 [24].

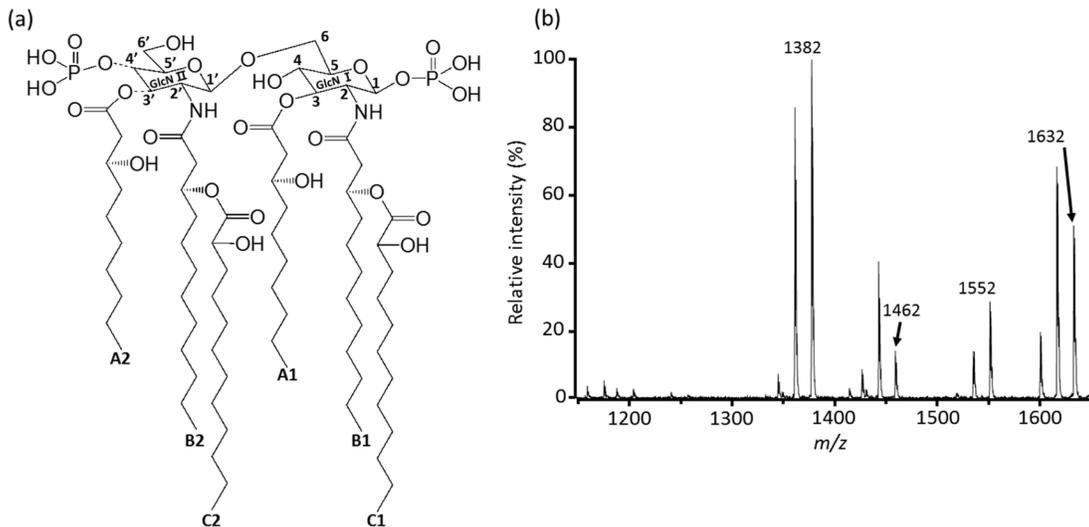


Fig. 1. (a) The proposed structure of lipid A in previous researches; 'GlcN' indicates the glucosamine (b) negative-ion MALDI-TOF M spectrum of the lipid A; the x-axis is mass to charge ratio, and the y-axis is the relative intensity (%).

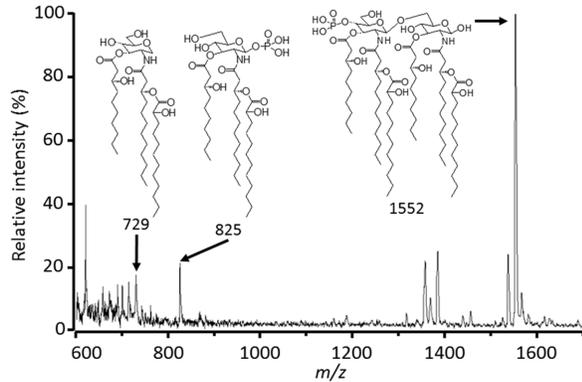


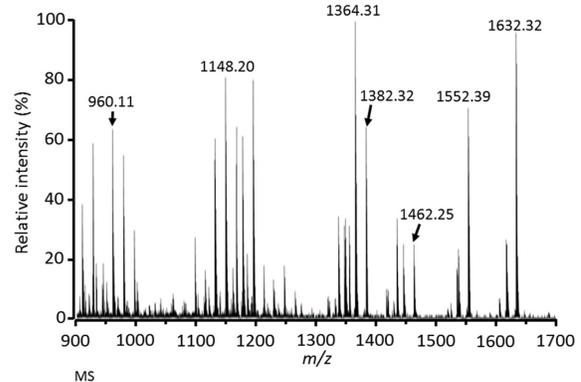
Fig. 2. Negative-ion MALDI-TOF MS spectrum of the dephosphorylated lipid A; the x-axis is mass to charge ratio, and the y-axis is the relative intensity (%); the described structures were neutral molecule.

MALDI-TOF MS 분석으로 지질 A의 인산기를 확인하기 위해 추출된 지질 A에 48% 플루오린화수소산 (HF) 100 μ L를 첨가하고 4°C에서 48시간 동안 배양하여 탈인산화를 수행하였다. 탈인산화된 지질 A의 MALDI-TOF MS 분석 결과, m/z 1552이 어미 피크로 검출되는 것을 확인하였다 (Fig. 2). 이 결과는 앞서 온전한 지질 A의 MS 분석결과에서 나오는 m/z 1552는 m/z 1632에서 인산기가 잘려 생성된 구조의 피크인 것을 입증하는 결과이고, 이는 지질 A에 인산기가 포함되어 있음을 의미한다.

MALDI-TOF MS 기반으로 하는 지질 A의 구조 분석 결과 지질 A에 인산기가 존재하는 것을 확인하였으며 10:0 (3-OH)의 아실 사슬이 포함되어 있음을 유추할 수 있었다. 그러나 MS 분석만으로 아실 사슬 및 인산기의 수와 위치를 알 수 없고 MS 스펙트럼에서 샘플 준비과정에 의한 의도치 않은 피크가 검출될 가능성이 있기 때문에, 각 피크들을 확인 및 검증하여 지질 A 구조를 입증하고자 추가적으로 MALDI-QIT TOF MS를 이용한 다단계 질량 분석 (MS^n)를 수행하였다.

3.3. MALDI-QIT TOF MS 기반의 MS^n 분석을 통한 지질 A 구조 확인

MALDI-TOF MS 분석에서 유추한 지질 A의 구조를 입증하기 위해 추출한 지질 A를 MALDI-QIT TOF MS를 통해 MS^n 분석을 수행하였다. 우선 MALDI-QIT TOF MS를 이용한 MS 분석을 수행하였고, 그 결과 MALDI-TOF MS와 동일하게 지질 A의 온전한 구조 [M_L-H]에 해당하는 m/z 1632.32 피크와 10:0 (3-OH)의 아실 사슬과 인산기가 잘린 구조라고 예상되는 m/z 1552.38, 1462.25, 1382.32 피크가 검출되었다. 그리고 MALDI-TOF MS 분석에서 검출되지 않았던 m/z 1148.20은 m/z 1364.31로부터 12:0 (2-OH) 아실 사슬이 잘린 구조의 피크로써, 이를 통해 12:0 (2-OH) 아실 사슬의 존재를 확인할 수 있었다. 특히 이 m/z 1148.20은 이중결합을 남기며 아실 그룹이 양성자의 재배열에 따른 'charge-remote' 과정에 의하여 유



No.	Observed mass ^a	Calculated mass ^a	Interpretation ^b
1	1632.32	1631.98	[M_L-H]
2	1552.38	1552.01	[M_L-P_1-H]
3	1462.25	1461.86	[$M_L-A_{2CDF}-H$]
4	1382.32	1381.89	[1462.25 - P_1]
5	1364.31	1363.88	[1462.25 - P_2]
6	1148.20	1147.70	[1364.31 - C_{1CRF}]
7	960.11	959.56	[1148.20 - A_{1CRF}]

^aObserved mass and calculated mass are the form of [$M-H$].

^b M_L , lipid A; P_1 , phosphite group; P_2 , phosphate group;

CDF, charge driven fragmentation; CRF, charge remote fragmentation.

Fig. 3. Negative-ion MALDI-QIT TOF MS spectrum of the lipid A; the x-axis is mass to charge ratio, and the y-axis is the relative intensity (%).

리지방산 (free fatty acid)으로 떨어진 구조이다 [25,26]. 또한, 이미 10:0 (3-OH) 아실 사슬이 잘린 구조에 해당하는 m/z 1148.20에서 10:0 (3-OH) 아실 사슬의 질량만큼 차이가 나는 m/z 960.11이 검출되었고, 이 결과로 지질 A에 두 개의 10:0 (3-OH) 아실 사슬이 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 3).

MALDI-QIT TOF MS를 이용한 MS^n 분석은 ion trap 내의 특정 피크만 선택하여 collision-induced dissociation (CID)을 기반으로 단편 이온 피크를 발생 및 검출하기 때문에 MS 분석과는 다르게 분석 시료에 포함된 염의 방해가 적어 보다 민감하고 정확한 화학적 구조분석에 적합하다 [27]. 따라서 MS^n 분석 시 검출된 단편 이온들은 어미 이온으로부터 유래한 것이므로 MS 분석에서 확인된 단편 이온 피크들이 지질 A의 온전한 구조 [M_L-H]에서 유래된 것인지 검증하기 위해 m/z 1632.32에 대한 MS^2 분석을 수행하였다 (Fig. 4). 그 결과 m/z 1364.30, 1346.29, 1148.20과 같이 MS분석과 동일한 질량을 갖는 피크들이 검출되어 m/z 1632.32 피크로부터 유래된 것임을 확인하였고, 따라서 MS 분석을 통해 유추한 10:0 (3-OH) 아실 사슬 및 인산기가 존재하는 것을 입증하였다.

그리고 MS 및 MS^2 에서 확인하지 못한 지질 A의 아실 사슬을 확인하기 위해 앞서 확인된 12:0 (2-OH), 10:0 (3-OH) 아실 사슬과 인산기가 이미 잘린 구조에 해당하는 m/z 1130.20의 MS^3 을 수행하였다 (Fig. 5). MS^3 분석 결과 m/z 1130.20로부터 인산기가 잘린 m/z 1032.25 피크를 통해 먼저 인산기가 두 개 존재함을 확인하였고, 12:0 (2-OH) 아실 사슬이 잘린 m/z 914.06는 12:0 (2-OH) 아실 사슬 또한 두 개가 있음을 보여주

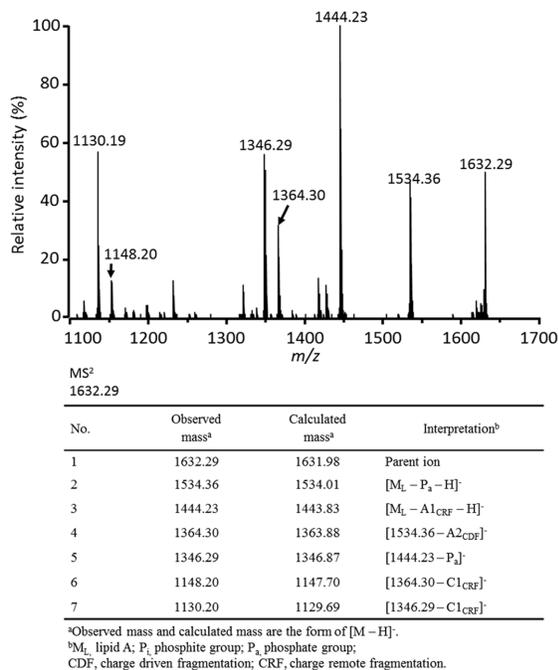


Fig. 4. Negative-ion MALDI-QIT TOF MS2 spectrum of m/z 1632.29; the x-axis is the mass to charge ratio, and the y-axis is the relative intensity (%).

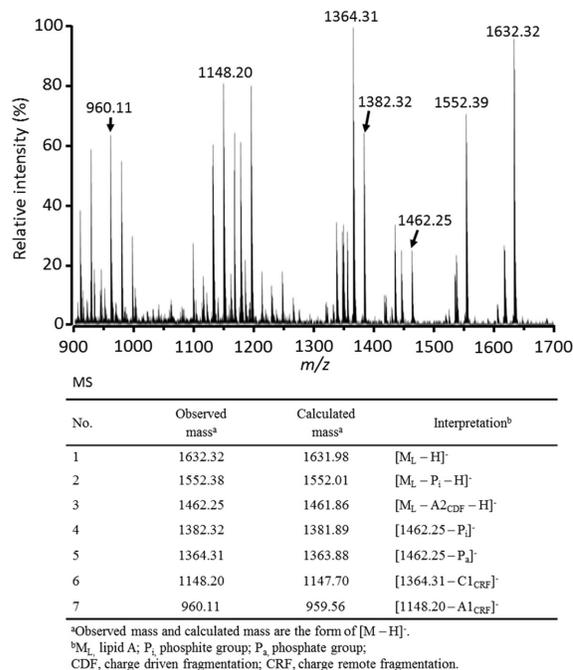


Fig. 6. Negative-ion MALDI-QIT TOF MS4 spectrum of m/z 1032.23; the x-axis is the mass to charge ratio, and the y-axis is the relative intensity (%).

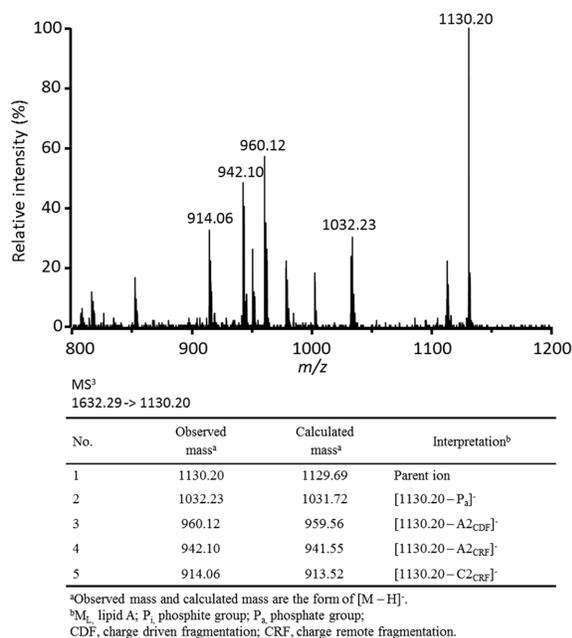


Fig. 5. Negative-ion MALDI-QIT TOF MS3 spectrum of m/z 1130.20; the x-axis is the mass to charge ratio, and the y-axis is the relative intensity (%).

었다. 그리고 이 결과는 MS⁴에서 m/z 1032.25로부터 12:0 (2-OH) 아실 사슬이 잘린 m/z 816.08이 검출됨으로써 재확인할

수 있었다 (Fig. 6). 그리고 m/z 1130.20에서 10:0 (3-OH) 잘린 구조에 해당하는 m/z 942.10이 검출되었고 지질 A에 두 개의 10:0 (3-OH) 아실 사슬이 있음을 확인하였다.

MSⁿ 분석 결과로 추출한 지질 A의 각 아실 사슬의 길이와 수 그리고 인산기의 질량과 수를 확인할 수 있었고 이 결과와 Fig. 2의 m/z 729와 m/z 825의 피크를 통해 각 인산기 및 아실 사슬들의 위치를 확인할 수 있었다. 따라서 MS 및 MSⁿ 분석을 종합하면 *Pseudomonas* sp. strain PAMC 28615의 온전한 지질 A의 구조는 글루코사민 이합체를 중추로 인산기는 C-1과 C-4'에 하나씩 존재하며, 10:0 (3-OH) 지방산은 C-3과 C-3'에 에스터 결합으로 아실화되어 있으며, 12:0 (2-OH) 지방산이 아실화되어 있는 12:0 (3-OH) 지방산은 C-2와 C-2'에 아마이드 결합으로 아실화된 구조임을 확인하였다.

4. CONCLUSION

최근 급격한 지구 온난화로 인해 북극 및 남극 동토층 토양이 녹고 있으며, 그로인해 새로운 종의 극지 미생물이 급속도로 증가하고 유입되고 있다. 특히 그람 음성균은 사람 또는 동식물에게 치명적인 병적 증상을 일으키는 주 원인으로 작용할 수 있기 때문에 이에 대한 선제적인 독성 연구가 매우 중요하다. 본 연구에서는 극지 토양으로부터 신규로 발견된 *Pseudomonas* sp. strain PAMC 28615의 지질 A 구조를 다양한 질량 분석 시스템을 활용하여 입증하였다. 그람 음성균의 LPS에

존재하는 지질 A의 구조 분석은 균의 독성을 결정하고 그 면역 생물학적 독성 평가에 활용될 수 있기 때문에 추가적으로 극지 토양에서 스크리닝되는 신규 미생물에 대한 독성 평가 연구에도 적극적으로 응용이 가능할 것으로 기대된다.

Acknowledgements

본 연구는 한국연구재단 (NRF-2015M1A5A1037196, NRF-2016M1A5A1901797)의 지원을 받아 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Romanovsky, V., D. Drozdov, N. Oberman, G. Malkova, A. Kholodov, S. Marchenko, N. Moskalenko, D. Sergeev, N. Ukraintseva, and A. Abramov (2010) Thermal state of permafrost in Russia. *Permafrost: Periglacial Process.* 21: 136-155.
- Brown, J. and V. E. Romanovsky (2008) Report from the International Permafrost Association: State of permafrost in the first decade of the 21st century. *Permafrost: Periglacial Process.* 19: 255-260.
- Soina, V. S., A. L. Mulyukin, E. V. Demkina, E. A. Vorobyova, and G. I. El-Registan (2004) The structure of resting bacterial populations in soil and subsoil permafrost. *Astrobiology* 4: 345-358.
- Crevecoeur, S., W. F. Vincent, J. Comte, and C. Lovejoy (2015) Bacterial community structure across environmental gradients in permafrost thaw ponds: methanotroph-rich ecosystems. *Front. Microbiol.* 6: 192.
- Glauser, M., G. Zanetti, J. D. Baumgartner, and J. Cohen (1991) Septic shock: pathogenesis. *Lancet.* 338: 732-736.
- Heumann, D. and T. Roger (2002) Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin. Chim. Acta.* 323: 59-72.
- Kim, M. J., N. Y. Bae, K. B. W. R. Kim, J. H. Park, S. H. Park, Y. J. Cho, and D. H. Ahn (2015) Anti-inflammatory effect of water extract from tuna heart on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 cells. *KSBB J.* 30: 326-331.
- Mun, O. J., M. S. Kwon, M. J. Bae, B. N. Ahn, F. Karadeniz, M. Kim, S. H. Lee, K. H. Yu, Y. Y. Kim, and Y. Seo (2015) Anti-inflammatory activity of *Hizikia fusiformis* extracts fermented with *Lactobacillus casei* in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *KSBB J.* 30: 38-43.
- Takayama, K., N. Qureshi, C. Raetz, E. Ribi, J. Peterson, J. Cantrell, F. Pearson, J. Wiggins, and A. Johnson (1984) Influence of fine structure of lipid A on *Limulus ameobocyte* lysate clotting and toxic activities. *Infect. Immun.* 45: 350-355.
- Lerouge, I. and J. Vanderleyden (2002) O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 17-47.
- Raetz, C. R. (1990) Biochemistry of endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 129-170.
- Schroemm, A. B., K. Brandenburg, H. Loppnow, A. P. Moran, M. H. Koch, E. T. Rietschel, and U. Seydel (2000) Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. *Eur. J. Biochem.* 267: 2008-2013.
- Molinari, A., A. Silipo, R. Lanzetta, M. Parrilli, P. Malvagna, A. Evidente, and G. Surico (2002) Determination of the structure of the lipid A fraction from the lipopolysaccharide of *Pseudomonas cichorii* by means of NMR and MALDI-TOF mass spectrometry. *European J. Org. Chem.* 2002: 3119-3125.
- Suda, Y., T. Ogawa, W. Kashihara, M. Oikawa, T. Shimoyama, T. Hayashi, T. Tamura, and S. Kusumoto (1997) Chemical structure of lipid A from *Helicobacter pylori* strain 206-1 lipopolysaccharide. *J. Biochem.* 121: 1129-1133.
- Harper, M., F. St Michael, J. A. Steen, M. John, A. Wright, L. van Dorsten, E. Vinogradov, B. Adler, A. D. Cox, and J. D. Boyce (2015) Characterization of the lipopolysaccharide produced by *Pasteurella multocida* serovars 6, 7 and 16: Identification of lipopolysaccharide genotypes L4 and L8. *Glycobiology* 25: 294-302.
- Sturiale, L., A. Palmigiano, A. Silipo, Y. A. Knirel, A. P. Anisimov, R. Lanzetta, M. Parrilli, A. Molinari, and D. Garozzo (2011) Reflectron MALDI TOF and MALDI TOF/TOF mass spectrometry reveal novel structural details of native lipooligosaccharides. *J. Mass Spectrom.* 46: 1135-1142.
- Takayama, S., E. Saitoh, R. Kimizuka, S. Yamada, and T. Kato (2009) Effect of eel galectin AJL-1 on periodontopathic bacterial biofilm formation and their lipopolysaccharide-mediated inflammatory cytokine induction. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 34: 355-359.
- Jiang, H., H. Dong, G. Zhang, B. Yu, L. R. Chapman, and M. W. Fields (2006) Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3832-3845.
- Yin, E. T., C. Galanos, S. Kinsky, R. A. Bradshaw, S. Wessler, O. Lüderitz, and M. E. Sarmiento (1972) Picogram-sensitive assay for endotoxin: Gelation of *Limulus polyphemus* blood cell lysate induced lipopolysaccharides and lipid A from gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 261: 284-289.
- Gross, M., H. Mayer, C. Widemann, and K. Rudolph (1988) Comparative analysis of the lipopolysaccharides of a rough and a smooth strain of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Arch. Microbiol.* 149: 372-376.
- Kulshin, V. A., U. Zähringer, B. Lindner, K. E. Jäger, B. A. Dmitriev, and E. T. Rietschel (1991) Structural characterization of the lipid A component of *Pseudomonas aeruginosa* wild-type and rough mutant lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* 198: 697-704.
- Ernst, R. K., C. Y. Eugene, L. Guo, K. B. Lim, J. L. Burns, M. Hackett, and S. I. Miller (1999) Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* 286: 1561-1565.
- Ernst, R. K., A. M. Hajjar, J. H. Tsai, S. M. Moskowitz, C. B. Wilson, and S. I. Miller (2003) *Pseudomonas aeruginosa* lipid A diversity and its recognition by Toll-like receptor 4. *J. Endotoxin Res.* 9: 395-400.
- Lee, C. S., Y. G. Kim, H. S. Joo, and B. G. Kim (2004) Structural analysis of lipid A from *Escherichia coli* O157:H7:K - using thin-layer chromatography and ion-trap mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 39: 514-525.
- Kussak, A. and A. Weintraub (2002) Quadrupole ion-trap mass

- spectrometry to locate fatty acids on lipid A from Gram-negative bacteria. *Anal. Biochem.* 307: 131-137.
26. Hsu, F. F. and J. Turk (2000) Charge-remote and charge-driven fragmentation processes in diacyl glycerophosphoethanolamine upon low-energy collisional activation: A mechanistic proposal. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11: 892-899.
27. Koy, C., S. Mikkat, E. Raptakis, C. Sutton, M. Resch, K. Tanaka, and M. O. Glocker (2003) Matrix-assisted laser desorption/ionization-quadrupole ion trap-time of flight mass spectrometry sequencing resolves structures of unidentified peptides obtained by in-gel tryptic digestion of haptoglobin derivatives from human plasma proteomes. *Proteomics* 3: 851-858.