

BSPE16350-051-12

극지생물 유래 유용 대사체  
활용기반 구축

Development of useful metabolites  
from polar organisms

2017. 2. 28

한국해양과학기술원  
부설극지연구소

## 제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “극지생물 유래 유용 대사체 활용기반 구축”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 2. 28.

연 구 책 임 자	: 임정한
참 여 연 구 원	: 김일찬, 한세종, 윤의중, 김상희
“	: 이홍금, 김성진, 김태경, 강필성
“	: 박하주, 김정은, 송진행, 박경민
“	: 김민주, 홍주미

### 위탁연구기관명 및 위탁연구 책임자

- : 고려대학교 이동호
- : 원광대학교 오현철
- : 신라대학교 손재학
- : 한양대학교 정희경
- : 성균관대학교 조동규
- : 성균관대학교 표석능
- : 성균관대학교 이재성
- : 가톨릭대학교 김형권

## 보고서 초록

과제관리번호		해당단계 연구기간	2016.06.01. - 2016.12.31	단계 구분	(해당단계) / (총단계)
<u>연구사업명</u>	중 사업 명	기관목적사업			
	세부사업명				
<u>연구과제명</u>	중 과 제 명	실용화 과제			
	세부(단위)과제명	극지생물 유래 유용 대사체 활용기반 구축			
연구책임자	임정한	해당단계 참여연구원수	총 : 48 명 내부 : 15 명 외부 : 33 명	해당단계 연구비	정부: 119,861 천원 기업: 천원 계: 119,861 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국해양과학기술원 부설 극지연구소 극지생명과학연구부		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :	상대국연구기관명 :			
위탁 연구	연구기관명: 고려대학교	연구책임자: 이동호	연구기관명: 성균관대학교	연구책임자: 조동규	
	연구기관명: 원광대학교	연구책임자: 오현철	연구기관명: 성균관대학교	연구책임자: 표석능	
	연구기관명: 신라대학교	연구책임자: 손재학	연구기관명: 성균관대학교	연구책임자: 이재성	
	연구기관명: 한양대학교	연구책임자: 정희경	연구기관명: 가톨릭대학교	연구책임자: 김형권	
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)				보고서 면수	204

### ○ 연구목표

극지고유 저온적응 생물의 대사체 라이브러리 확보, 생명기작 규명, 바이오신소재 발굴을 통한 극지 바이오 연구의 활성화

### ○ 연구내용 및 결과

- 극지 고유 생물 유래 대사체를 확보하기 위하여 남극 로스해 유래 154종 미생물 균주의 추출물 및 52종의 진균 추출물을 확보함.
- 극지고유 생물 유래 MS-라이브러리는 600개의 화합물 정보를 입력 완료함 (화합물 번호, 이름, 화학식, 분자량 등의 기본적이 정보가 포함됨).
- 7종의 극지 대사체를 분리하였으며 그 중 3종의 구조 분석을 완료함.
- 양극해 해양 진균 SF6796V 균주의 배양추출물이 항염증효과가 있음을 밝힘.
- 로바릭산과 로바스틴의 염증질환 억제 작용기전을 연구하였고 라말린과 로바릭산이 항아토피활성이 있음을 확인함.
- 극지 추출물 10종이 병행처리시 TMZ의 항암활성을 제고하는 효과가 있음을 밝힘.
- 저온성 단백질 분해효소 P66의 대량생산 시스템을 구축하여 원가 절감효과를 도출함.
- 항동결물질 p-CY01 LM이 세포외 수분과 결합하여 열음 결정성장을 억제하고 세포내 수분함량을 감소시켜 세포의 동결보호를 유도한다는 기작을 제안함.
- 주석을 함유하지 않는 라말린을 합성하였고 라말린의 치매억제 기작을 연구함.
- 극지유래 리파아제 LipBL을 대장균에서 생산하여 높은 활성을 얻었음.
- 극지 해양미생물의 생산조건을 모델링을 이용하여 최적화 하였고 산호 공생미생물을 확보함.
- 극지 요각류를 활용하여 자외선에 따른 영향연구 및 분자기작을 규명함.

### ○ 연구결과의 활용

이와 같은 연구결과는 극지 생물자원 활용연구 및 관련 산업 활성화에 기여할 것임.

색인어 (각 5개 이상)	한 글	대사체, 극지생물, 추출물, 저온효소, 항동결 바이오플리머, MS 라이브러리
	영 어	Metabolites, Polar organisms, Extract, Cold-active enzyme, Anti-nucleating polysaccharide, MS-library

## 요 약 문

### I. 제 목

극지생물 유래 유용 대사체 활용기반 구축

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 목적은 극지 고유 저온적응 생물의 대사체 라이브러리를 확보하고, 생명기작을 규명하며 바이오신소재를 발굴하여 극지 바이오 연구를 활성화하는 데 있다.

### III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구개발의 목적을 달성하기 위하여 아래와 같은 연구가 진행되었다.

- 극지 고유생물 유래 대사체 확보
  - 남극 로스해 해양생물 추출물 확보
  - 극지 고유생물 유래 MS 라이브러리 확보
  - 대사체 분석 및 구조 규명
- 유용 대사체 상용화 기반연구
  - 신규 대사체 유용성 확보
  - 저온성 단백질분해효소 P66의 대량생산 시스템 확보
  - 항동결물질 p-CY01의 줄기세포 동결보존 기작 규명
  - 항치매치료제 라말린의 치매억제 기작 규명
  - 리파아제 효소 발굴
  - 유용 미생물 분리 및 활성 검증
  - 극지 요각류의 단백질체 변화 양상

### IV. 연구개발결과

본 연구개발 결과는 다음과 같다.

#### 1. 극지 고유생물 유래 대사체 확보

##### 가. 남극 로스해 해양생물 추출물 확보

2015, 2016년 남극 로스해 해역으로부터 분리된 154개 미생물 균주의 추출물을 확보하였다. 그 외 52종의 진균의 ethyl acetate 추출물을 추가로 확보하였다.

##### 나. 극지 고유생물 유래 MS 라이브러리 확보

남극 로스해 해양진균 추출물 시료를 대상으로 ESI Q-TOF MS 분석을 수행하였고, 그 중 의미 있는 데이터를 자체 라이브러리에 입력하여 600 개의 정보입력을 완료하였다. 1차 저장되어진 라이브러리 정보를 excel database로 구축하였으며, 입력되는 정보는 라이브러리에 인식되는 compound ID, compound name 과 formula 정보, molecular weight 등의 기본적인 정보가 담겨있다.

##### 다. 대사체 분석 및 구조 규명

극지 유래 대사체의 분석 및 구조 규명을 위한 SPE, filtration, solvent extraction, solvent partition 등의 조건을 확립하였다. LC의 이동상, 고정상 조건, MS의 이온화 조건 등 다양한 분석 조건의 변화를 통하여 최적의 분석 조건을 확립하였다. 확립된 조건으로 시료를 분석하여

대사체의 UV spectrum, MS spectrum을 확보하였고 문헌과의 비교를 통해 예측된 대사체의 DB를 구축하였다. 확보한 추출물 2종 유래 분획물에서 총 7종의 대사체를 분리하였으며, 분리된 7종 활성 후보 대사체 가운데 3종의 구조 분석을 완료하였다.

## 2. 유용 대사체 상용화 기반연구

### 가. 신규 대사체 유용성 확보

Lobaric acid와 Lobastin이 면역세포인 대식세포의 염증억제에 미치는 영향을 확인하였다. 대식세포주인 RAW264.7세포에서 Lobaric acid와 Lobastin이 inflammatory mediators의 발현을 억제하는 것을 확인하여 염증억제로서의 개발 가능성을 제시하였다. 또한 이를 바탕으로 면역작용에서 Lobaric acid와 Lobastin이 염증조절에 있어서 분자면역학적 작용기전을 확인하였다. 대식세포주인 RAW264.7세포에서 극지생물에서 추출한 다양한 물질들의 면역조절 작용을 확인하였으며, 일부 물질에서 면역조절 효과가 나타남을 확인하였다. 피부각질세포인 HaCat세포에서 Ramalin과 Lobaric acid가 항아토피 효과가 있음을 확인하였다.

양극해 해양생물 유래 진균 SF6796V 균주의 배양 추출물로부터 분리된 대사체 6,8,1'-tri-O-methyl averantin에 대한 항염증 활성 확인하였다. 화합물 6796V-53 (compound 1) 이 마우스 microglial 유래의 BV2 세포에서 MAPK, NF-κB경로를 억제함으로써 우수한 항염증 활성을 갖는다는 것을 확인하였고, PI3K/Akt와 Nrf2 기전을 통한 HO-1의 발현이 항염증 활성에 관여하는 것도 밝혀 낼 수 있었다. 또한 쥐의 뇌에서 분리한 미세아교세포의 초대 배양 세포에서 HO-1의 발현도 확인하여 HO-1에 의한 항염증 활성이 미세아교세포의 초대 배양 세포에서도 작용할 수 있음을 제시하였다.

항암활성 효능 연구 결과, NB4에서는 추출물 12종을 단독 또는 기준 항암제인 arsenic trioxide (ATO)와 병행 처리했으나, 기준인 ATO 단독처리 항암활성보다 같거나 높은 추출물이 없었다. T98G에서는 추출물 30여 종을 단독 처리하였을 때 기준인 기존 항암제 temozolomide (TMZ)보다 같거나 높은 추출물을 없었으나, 병행 처리 시 TMZ의 항암활성을 제고하는 추출물을 10여 종 동정하였다.

### 나. 저온성 단백질분해효소 P66의 대량생산 시스템 확보

다량체로 생산된 P66과 그의 mutant들에 대한 활성 비교를 통해, P66의 저온 활성 특징을 확인하였다. P66 I.B. 생산성과 활성형의 P66 회수율은 각각 57 배 및 2.8 배 증가되었고, 단백질 농축 방법이 정립되었다. P66은 의료 세척제, 주방 세제 및 사료 첨가물 같은 가양한 산업 분야에 적용이 가능한 것을 확인하였다.

### 다. 항동결물질 p-CY01의 줄기세포 동결보존 기작 규명

p-CY01 LM의 동결보존 기작을 확립하기 위하여 다양한 실험결과를 분석한 결과, 동결과정 중 하나 이상의 복합적인 동결보호기작을 가질 것으로 예상하였다. p-CY01 LM의 경우 세포외부에 존재하면서 먼저 세포외에 존재하는 수분과 결합하여 ice crystal growth inhibition을 유도하여 일차적으로 세포막 수준의 손상을 감소시키고 동시에 dehydration을 통해 세포내 수분 함량을 감소시켜 세포막내에서 형성될 수분의 ice crystal 함량을 감소시킬 것이다. 이는 enthalpy change level 값을 감소시켜 냉동 및 해동 cycle 내에서 Ice crystallization될 수 있는 수분의 총량이 감소하였음을 의미한다.

### 라. 항치매치료제 라말린의 치매억제 기작 규명

산인 HCl gas를 이용하여 ACN 용매 하에서 주석을 제거하는 실험과 주석을 사용하지 않는 합

성법에서 모두 주석이 검출되지 않았다. 기존 합성법으로 이미 합성된 라말린은 산을 이용해 주석을 제거한 후 치매 억제 기작 규명 실험의 시료로 사용 할 수 있다.

Ramalin은 BACE1 promoter 조절 능력이 없음을 luciferase assay를 통하여 간접적으로 확인하였다. Ramalin은 BACE1 단백질 조절능력은 Promoter에 의한 mRNA 변화에 의한 효과가 아님을 증명하였다. Ramalin은 BACE1 단백질 분해효소 저해능력을 낮음을 확인하였고, Ramalin은 UTR에 stability 조절에 관여하지 않음을 확인하였다. Ramalin은 mRNA에 영향을 주지 않음을 3가지 실험을 통하여 확인하였고, 추후 UTR 조절능을 이용한 신규 drug screening 가능성이 있음을 확인하였다. Ramalin은 HDAC6의 저해 효과가 15.4uM ~ 25 uM 정도의 IC50 값을 가짐을 확인하였다. Ramalin의 경우 동물 실험의 PK 결과를 볼 때 충분한 노출을 확인하였고, 그 노출시에 HDAC6의 저해 효과를 가질 수 있다고 판단된다. HDAC6 저해제가 가지는 항염증 효과 및 microtubule 안정 효과를 통한 신경세포 보호효과를 Ramalin도 보유하고 있는 것으로 판단된다.

#### 마. 리파아제 효소 발굴

극지 유래 리파아제 생산균주 46종으로부터 활성이 우수한 균주를 선별하고 그 효소 LipBL을 대장균에서 생산하고 활성을 측정한 결과, 923 U/mL로 밝혀졌다. SDS-PAGE zymogram으로 단백질을 확인한 후에는, LipBL의 효소 반응 특성을 규명하고자 한다.

#### 바. 유용 미생물 분리 및 활성 검증

생산모델링을 통하여 해수를 사용하는 생산방식에서 벗어나 좀 더 재현성이 있는 생산조건을 규명할 수 있었다. 다양한 생산모델 기법을 응용하여 더 많은 요인에 대한 탐색이 필요하며, 이 최적화 생산 배지 조건을 기존에 조사된 생산조건과 대체하고자 한다.

남극에서 채취한 붉은 산호에서 공생미생물을 채취하였을 때, 총 56 균주를 확보 하였다. 7 균주를 제외한 49 균주에 대해서는 기존의 동정된 종들과 98% 이상의 일치도를 보이는 것을 확인할 수 있었다. 배양한 공생미생물들의 특성을 알기위하여 온도별 성장을 균주별로 확인하였다.

#### 사. 극지 요각류의 단백질체 변화 양상

극지요각류에서 대규모 발현유전체 정보를 확보하고, 자외선 노출에 따른 단백질체 및 유전체 변화를 분석하였다. 극지요각류를 활용하여 자외선에 따른 영향연구 및 문자기작을 규명하였다. 즉 stress 및 antioxidant response 관련유전자의 발현 양상을 분석하였다.

### V. 연구개발결과의 활용계획

극지 유래 생물의 대사체 분석 결과를 통해 대사체를 미리 예측하여 신규 물질 또는 유용 활성 물질을 탐색하여 효용성 높은 균주를 선택하는데 도움을 주며, 추후 극지 생물 분리 정제 연구를 위한 발판으로 활용이 가능하다. 또한 극지 생물 자원들의 연구를 위한 기초 자료로써 기여한다.

추출물의 확보 및 생리활성검색의 DB화를 통하여 기초연구 및 산업화 연구개발기간 단축, 연구비용 절감 등을 위한 극적인 효과를 제공한다.

공동연구팀과의 연계를 통하여 대사체의 생리활성을 기초로 하여 미지의 생명현상 규명 또는 질병 현상 규명과 관련된 연구 분야에 chemical probe 으로도 활용이 가능하다.

새로운 물질의 제조나 생산에 대한 관련 특허의 확보가 가능하여 물질특허 외에도 이의 활용도 가능하다. 국내에서 최종 상품화에 성공하면 관련 식품의약산업이나 제약산업의 성장과 활성화에 획기적인 전기를 마련할 수 있다.

## S U M M A R Y

### I. Title

Development of useful metabolites from polar organisms

### II. Purpose and Necessity of R&D

The purpose of this study is to obtain the library of polar metabolites from cold-adapted polar organisms and clarify the mechanisms of life and enable to activate the polar research.

### III. Contents and Extent of R&D

The following studies were conducted to achieve the objectives of this research and development.

- Securement of metabolites derived from polar organisms
  - Acquisition of marine life extracts from Antarctic Ross Sea
  - Obtaining MS library derived from polar organisms
  - Metabolism analysis and structural analysis
- Research on commercialization of useful metabolites
  - Ensuring availability of new metabolites
  - Mass production system of cold-active protease P66
  - Identification of cryopreservation mechanism of anti-freezing agent p-CY01
  - Identification of dementia inhibition mechanism of ramalin
  - Excavation of lipase enzyme
  - Isolation of useful microorganisms and validation of their activities
  - Changes in the protein structure of polar copepods

### IV. R&D Results

The results of this research are as follows.

#### 1. Securement of metabolites derived from polar organisms

##### A. Acquisition of marine life extracts from Antarctic Ross Sea

Extracts of 154 microbial strains isolated from Antarctic Ross Sea in 2015 and 2016 were acquired. In addition, we obtained additional 52 ethyl acetate extracts from fungi.

##### B. Obtaining MS library derived from polar organisms

ESI Q-TOF MS analysis was performed on the samples of the Antarctic marine fungus extracts, and 600 significant items were entered into the library. The library

information is stored in an excel database, and the input information contains basic information such as compound ID, name, formula, and molecular weight.

### C. Metabolism analysis and structure identification

The conditions for SPE, filtration, solvent extraction, and solvent partition were established for the analysis of polar metabolites. Optimal conditions of analysis were established through various analysis conditions such as LC mobile phase, stationary phase condition, and MS ionization condition. By analyzing the samples under established conditions, the UV and MS spectra of the metabolites were obtained and the metabolic database was constructed by comparing with the literature. Seven kinds of metabolites were isolated from the two fractions derived from the extracts, and the structures of three kinds of metabolites were analyzed.

## 2. Research on commercialization of useful metabolites

### A. Ensuring availability of new metabolites

Lobaric acid and Lobastin were found to inhibit the inflammation of macrophages. Lobaric acid and lobastin inhibited the expression of inflammatory mediators in RAW264.7 cells. Based on these results, Lobaric acid and Lobastin in the immune function confirmed the molecular mechanism of immunological function in inflammation control. In RAW264.7 cells, the macrophage cell line, immunoregulatory activities of various substances extracted from polar organisms were confirmed, and immunomodulatory effects were observed in some substances. It was confirmed that Ramalin and Lobaric acid had anti-atopic effect in HaCaT cells, keratinocytes.

An anti-inflammatory activity of the metabolite 6,8,1'-tri-O-methyl averantin isolated from the culture extract of SF6796V strain was confirmed. Compound 6796V-53 (compound 1) inhibited MAPK and NF-κB pathway in BV2 cells derived from mouse microglial and showed excellent anti-inflammatory activity. It was also found that expression of HO-1 through PI3K / Akt and Nrf2 was involved in anti-inflammatory activity. In addition, HO-1 expression was also confirmed in microglial cells isolated from mouse brain, suggesting that HO-1-induced anti-inflammatory activity may also act on primary cultured cells of microglial cells.

As a result of the anticancer activity test, 12 extracts were simultaneously treated with arsenic trioxide (ATO) alone or in combination with existing anticancer agent NB4, but no extracts were found to be equal to or higher than the standard antitumor activity of ATO alone. In T98G, 10 extracts were identified that they did not have the same or higher activity than the conventional anticancer agent temozolomide (TMZ). About 10 extracts were identified to enhance the anticancer activity of TMZ during concurrent treatment.

### B. Mass production system of cold-active protease P66

Cold activity of P66, produced larger than molecular weight of monomer, was confirmed by comparing its mutants. P66 inclusion body productivity and active-P66 recovery were increased 5.7 and 2.8 fold, respectively, and method for protein concentration was set-up. It was confirmed that P66 could be applied to various industrial fields such as medical cleaners, dishwashing detergents, and feed additives.

#### C. Identification of cryopreservation mechanism of anti-freezing agent p-CY01

In order to establish the cryopreservation mechanism of p-CY01 LM, various experimental results were analyzed and it was expected that it would have a complex cryoprotecting mechanism more than one during the freezing process. In the case of p-CY01 LM, it first binds to extracellular water and induces ice crystal growth inhibition, which firstly reduces cell membrane level damage, and at the same time reduces water content in cells through dehydration. It also reduces the ice crystal content of water to be formed. This means that the total amount of ice crystallization that can be ice-crystallized in the freezing and thawing cycles is reduced by decreasing the enthalpy change level.

#### D. Identification of dementia inhibition mechanism of Ramalin

No tin was detected in both tin-removing and tin-free synthesis using acidic HCl gas. Ramalin, which has already been synthesized by the conventional synthesis method, can be used as a sample of the dementia inhibition mechanism after removal of tin using acid.

Ramalin indirectly confirmed the lack of BACE1 promoter regulatory ability through luciferase assay. Ramalin demonstrated that the ability to regulate BACE1 protein was not due to the mRNA change by the promoter. Ramalin was found to be low in BACE1 protease inhibitory ability, and Ramalin was not involved in UTR stability regulation. Ramalin was confirmed to have no effect on mRNA by three experiments, and it was confirmed that there is possibility of new drug screening using UTR regulation function. Ramalin showed that the inhibitory effect on HDAC6 with an IC<sub>50</sub> value of about 15.4 uM to 25 uM. In the case of Ramalin, the PK results of the animal test showed that the HDAC6 could be inhibited by the exposure. Ramalin is also thought to have an anti-inflammatory effect and a microtubule-stabilizing effect on HDAC6 inhibitors.

#### E. Excavation of lipase enzyme

From the 46 strains producing lipase from polar regions, strains with excellent activity were selected. The enzyme LipBL was produced in *Escherichia coli* and its activity was found to be 923 U / mL. After the protein was identified by SDS-PAGE zymogram, the enzyme reaction characteristics of LipBL were investigated.

#### F. Isolation of useful microorganisms and validation of their activities

Through production modeling, we identified production conditions that are more reproducible than those using seawater. We need to explore more factors by applying various production model techniques, and substitute this optimized production medium condition with the existing production conditions.

When symbiotic microorganisms were collected from red coral from Antarctica, a total of 56 strains were obtained. As for the 49 strains except 7 strains, it was confirmed that they had more than 98% agreement with the existing strains. In order to know the characteristics of cultivated symbiotic microorganisms, temperature effect on the growth was confirmed.

#### G. Changes in the protein structure of polar copepod

Large-scale genomic information was obtained from polar copepod, and the changes in the protein body and genome by ultraviolet exposure were analyzed. Polar copepod was used to investigate the effects of ultraviolet rays and molecular mechanisms. The expression patterns of stress and antioxidant response related genes were analyzed.

### V. Application Plans of R&D Results

The results of the analysis of the metabolites from polar organisms can be used to predict the metabolites and to search for novel substances or useful active materials. It also contributes as a basis for the study of polar biological resources.

Securing extracts and constructing database of physiologically active substances provide a dramatic effect for shortening the time and period of basic and developmental research, cost reduction, and industrialization. It can be used as a chemical probe in research fields related to identification of unknown life phenomenon or disease phenomenon based on physiological activity of metabolism through linkage with collaborating research team.

It is possible to acquire the patents related to the manufacture or production of new substances. Successful commercialization of the product from polar regions in Korea can provide a breakthrough in the growth and revitalization of the related food and pharmaceutical industries.

# C O N T E N T S

Abstract .....	2
Summary .....	6
Contents .....	10
List of Figures .....	16
List of Tables .....	21
Chapter 1. Introduction .....	23
Section 1. Objective .....	23
Section 2. Necessity and scope of the project .....	23
Chapter 2. Current research trends .....	28
Section 1. Overseas research trends .....	28
Section 2. Domestic research trends .....	31
Chapter 3. R&D Results .....	32
Section 1. Securement of metabolites derived from polar organisms .....	32
1. Acquisition of marine life extracts from Antarctic Ross Sea .....	32
A. Research goal .....	32
B. Materials and methods .....	32
C. Results .....	38
D. Conclusion and suggestions .....	48
2. Obtaining MS library derived from polar organisms .....	48
A. Research goal .....	48
B. Materials and methods .....	49
C. Results .....	51
D. Conclusion and suggestions .....	52
3. Metabolism analysis and structure identification .....	52
A. Research goal .....	52
B. Materials and methods .....	52
C. Results .....	54
D. Conclusion and suggestions .....	84
제2절 Research on commercialization of useful metabolites .....	85
1. Ensuring availability of new metabolites .....	85
A. Research goal .....	85
B. Materials and methods .....	85

C. Results .....	88
D. Conclusion and suggestions .....	106
2. Mass production system of cold-active protease P66 .....	107
A. Research goal .....	107
B. Materials and methods .....	108
C. Results .....	112
D. Conclusion and suggestions .....	122
3. Identification of cryopreservation mechanism of anti-freezing agent p-CY01 .....	123
A. Research goal .....	123
B. Materials and methods .....	124
C. Results .....	126
D. Conclusion and suggestions .....	131
4. Identification of dementia inhibition mechanism of Ramalin .....	132
A. Research goal .....	132
B. Materials and methods .....	133
C. Results .....	135
D. Conclusion and suggestions .....	146
5. Excavation of lipase enzyme .....	147
A. Research goal .....	147
B. Materials and methods .....	147
C. Results .....	148
D. Conclusion and suggestions .....	158
6. Isolation of useful microorganisms and validation of their activities .....	158
A. Research goal .....	158
B. Materials and methods .....	159
C. Results .....	164
D. Conclusion and suggestions .....	178
7. Changes in the protein structure of polar copepod .....	179
A. Research goal .....	179
B. Materials and methods .....	179
C. Results .....	183
D. Conclusion and suggestions .....	190
Chapter 4. Achievement and contribution .....	192

Section 1. Achievement of R&D .....	192
Section 2. External contribution .....	193
Chapter 5. Plan to utilize R&D results .....	196
Chapter 6. Overseas information collected during R&D .....	197
Chapter 7. References .....	198

## 목 차

제출문 .....	1
보고서초록 .....	2
요약문 .....	3
Summary .....	6
Contents .....	10
목차 .....	13
List of Figures .....	16
List of Tables .....	21
제 1 장 서론 .....	23
제1절 연구개발의 목적 .....	23
제2절 연구개발의 필요성 및 범위 .....	23
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	28
제1절 국외 연구수준 .....	28
제2절 국내 연구수준 .....	31
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	32
제1절 극지 고유생물 유래 대사체 확보 .....	32
1. 남극 로스해 해양생물 추출물 확보 .....	32
가. 연구 목표 .....	32
나. 연구 수행방법 .....	32
다. 연구 결과 .....	38
라. 결론 및 제언 .....	48
2. 극지 고유생물 유래 MS-라이브러리 확보 .....	48
가. 연구 목표 .....	48
나. 연구 수행방법 .....	49
다. 연구 결과 .....	51
라. 결론 및 제언 .....	52
3. 대사체 분석 및 구조 규명 .....	52
가. 연구 목표 .....	52
나. 연구 수행방법 .....	52
다. 연구 결과 .....	54
라. 결론 및 제언 .....	84
제2절 유용 대사체 활용화 기반 연구 .....	85

1. 신규 대사체 유용성 확보	85
가. 연구 목표	85
나. 연구 수행방법	85
다. 연구 결과	88
라. 결론 및 제언	106
2. 저온성 단백질분해효소 P66의 대량생산 시스템 확보	107
가. 연구 목표	107
나. 연구 수행방법	108
다. 연구 결과	112
라. 결론 및 제언	122
3. 항동결물질 p-CY01의 줄기세포 동결보존 기작 규명	123
가. 연구 목표	123
나. 연구 수행방법	124
다. 연구 결과	126
라. 결론 및 제언	131
4 항치매치료제 라말린의 치매억제 기작 규명	132
가. 연구 목표	132
나. 연구 수행방법	133
다. 연구 결과	135
라. 결론 및 제언	146
5. 리파아제 효소 발굴	147
가. 연구 목표	147
나. 연구 수행방법	147
다. 연구 결과	148
라. 결론 및 제언	158
6. 유용 미생물 분리 및 활성 검증	158
가. 연구 목표	158
나. 연구 수행방법	159
다. 연구 결과	164
라. 결론 및 제언	178
7. 극지 요각류의 단백질체 변화 양상	179
가. 연구 목표	179
나. 연구 수행방법	179
다. 연구 결과	183

라. 결론 및 제언 .....	190
제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도 .....	192
제1절 연구개발목표 달성도 .....	192
제2절 대외기여도 .....	193
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	196
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	197
제 7 장 참고문헌 .....	198

## List of Figures

Fig. 1-1. 현재 임상실험단계에 진입한 해양유래 대사체의 생산 해양생물종에 따른 분류 .....	25
Fig. 1-2. 신규 대사체를 생산하는 해양 진균의 분리원 .....	25
Fig. 1-3. 전임상연구 또는 임상시험단계의 항 염증 효과를 가진 해양유래 선도물질 .....	26
Fig. 3-1. 추출물제작을 위한 흐름도 .....	35
Fig. 3-2. 미생물 동정 흐름도 .....	36
Fig. 3-3. 동정된 진균의 분포 .....	47
Fig. 3-4. A list of bacteria extracts derived from Ross Sea .....	48
Fig. 3-5. An example of 4 kinds of data to be uploaded library - TIC, XIC, TOF MS, MS/MS	50
Fig. 3-6. An example of uploaded data on library .....	50
Fig. 3-7. An example of library excel DB for single metabolites .....	51
Fig. 3-8. SF7013, PDA 배지, 10일 배양 .....	52
Fig. 3-9. SF7024, PDA 배지, 10일 배양 .....	52
Fig. 3-10. SF7013 (왼쪽)와 SF7024 (오른쪽) 분생자 .....	53
Fig. 3-11. 확립된 LC-MS 분석조건 .....	54
Fig. 3-12. SF7013 추출물 UPLC 분석 결과 .....	54
Fig. 3-13. SF7013 추출물 MS 분석 결과 .....	55
Fig. 3-14. SF7024 추출물 UPLC 분석 결과 .....	55
Fig. 3-15. SF7024 추출물 MS 분석 결과 .....	56
Fig. 3-16. SF7013 peak (1)의 UV, MS 분석 결과 .....	56
Fig. 3-17. SF7013 peak (2)의 UV, MS 분석 결과 및 예측 화합물 .....	57
Fig. 3-18. SF7013 peak (3)의 UV, MS 분석 결과 및 예측 화합물 .....	58
Fig. 3-19. SF7013 peak (4)의 UV, MS 분석 결과 및 예측 화합물 .....	59
Fig. 3-20. SF7013 추출물 내의 peak 1~4 de-replication 결과 .....	60
Fig. 3-21. SF7024 peak (1)의 UV, MS 분석 결과 및 예측 화합물 .....	61
Fig. 3-22. SF7024 peak (2)의 UV, MS 분석 결과 및 예측 화합물 .....	62
Fig. 3-23. SF7024 peak (3)의 UV, MS 분석 결과 및 예측 화합물 .....	63
Fig. 3-24. SF7024 peak (4)의 UV, MS 분석 결과 및 예측 화합물 .....	63
Fig. 3-25. SF7024 peak (5)의 UV, MS 분석 결과 및 예측 화합물 .....	64
Fig. 3-26. SF7024 peak (6)의 UV, MS 분석 결과 및 예측 화합물 .....	65
Fig. 3-27. SF7024 peak (7)과 (8)의 UV, MS 분석 결과 및 예측 화합물 .....	66
Fig. 3-28. SF7024 추출물 내의 peak 1~8 de-replication 결과 .....	67
Fig. 3-29. 진균 SF6155 으로부터 유래된 활성 대사체의 분리도 .....	69
Fig. 3-30. 진균 SF6796V 으로부터 유래된 활성 대사체의 분리도 .....	70
Fig. 3-31. Structure of SF6796V-53 .....	70
Fig. 3-32. SF6796V-53의 1H-NMR Spectrum .....	71

Fig. 3-33. SF6796V-53 의 <sup>13</sup> C-NMR Spectrum .....	71
Fig. 3-34. SF6796V-53 의 DEPT-NMR Spectrum .....	72
Fig. 3-35. SF6796V-53 의 HMQC-NMR Spectrum .....	72
Fig. 3-36. SF6796V-53 의 COSY-NMR Spectrum .....	73
Fig. 3-37. SF6796V-53 의 HMBC-NMR Spectrum .....	73
Fig. 3-38. SF6796V-53 의 HR-ESITOF mass spectrum .....	74
Fig. 3-39. SF6796V-53 의 <sup>1</sup> H-NMR 및 <sup>13</sup> C-NMR Spectrum (Recorded in CDCl <sub>3</sub> ) .....	74
Fig. 3-40. Structure of SF6796V-522-1-2 .....	75
Fig. 3-41. SF6796V-552-1-2 의 <sup>1</sup> H-NMR Spectrum .....	76
Fig. 3-42. SF6796V-552-1-2 의 <sup>13</sup> C-NMR Spectrum .....	76
Fig. 3-43. SF6796V-552-1-2 의 DEPT-NMR Spectrum .....	77
Fig. 3-44. SF6796V-552-1-2 의 HMQC-NMR Spectrum .....	77
Fig. 3-45. SF6796V-552-1-2 의 COSY-NMR Spectrum .....	78
Fig. 3-46. SF6796V-552-1-2 의 HMBC-NMR Spectrum .....	78
Fig. 3-47. SF6796V-552-1-2 의 HR-ESITOF mass spectrum Spectrum .....	79
Fig. 3-48. SF6796V-552-1-2 의 <sup>1</sup> H-NMR 및 <sup>13</sup> C-NMR Spectrum (Recorded in CDCl <sub>3</sub> ) .....	79
Fig. 3-49. Structure of SF6796V-522-4 .....	80
Fig. 3-50. SF6796V-552-4 의 <sup>1</sup> H-NMR Spectrum .....	81
Fig. 3-51. SF6796V-552-4 의 <sup>13</sup> C-NMR Spectrum .....	81
Fig. 3-52. SF6796V-552-4 의 HMQC-NMR Spectrum .....	82
Fig. 3-53. SF6796V-552-4 의 COSY-NMR Spectrum .....	82
Fig. 3-54. SF6796V-552-4 의 HMBC-NMR Spectrum .....	83
Fig. 3-55. SF6796V-552-4 의 <sup>1</sup> H-NMR 및 <sup>13</sup> C-NMR Spectrum (Recorded in CDCl <sub>3</sub> ) .....	83
Fig. 3-56. Structure of 3 compound isolated from SF6796V .....	84
Fig. 3-56. The effect of Lobaric acid on the inhibition of cytokines mouse peritoneal macrophages .....	89
Fig. 3-57. Effect of lobaric acid on the mRNA levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ and IL-18 in LPS-induced mouse peritoneal macrophages .....	90
Fig. 3-58. Effect of lobaric acid on the NLRP3 expression in LPS-induced mouse peritoneal macrophages .....	91
Fig. 3-59. The effect of Lobastin on the inhibition of MAPK in macrophages .....	92
Fig. 3-60. Effect of lobastin on protein levels of iNOS and Cox-2 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells .....	93
Fig. 3-61. The Effect of lichen extracts on the Nitrite production in macrophages .....	94
Fig. 3-62. Effect of Ramalin on the mRNA levels of inflammatory mediator in TNF- $\alpha$ -induced HaCaT cells .....	95
Fig. 3-63. The inhibitory effect of ramalin on TNF- $\alpha$ -stimulated nuclear factor-kappa B and	

mitogen-activated protein kinases (MAPK) pathways	97
Fig. 3-64. Atopic dermatitis-like skin lesions and symptoms in 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)-induced mice	98
Fig. 3-65. Effect of lobaric acid on the mRNA levels of inflammatory mediator in TNF- $\alpha$ -induced HaCaT cells	99
Fig. 3-66. Effects of three compounds (1-3) on cell viability in BV2 cells (A-C)	100
Fig. 3-67. Effects of three compounds (1-3) on expression of HO-1 protein in BV2 cells (A-C)	100
Fig. 3-68. Effects of compound 1 on nuclear translocation of Nrf2 in BV2 cells	100
Fig. 3-69. Effects of compound 1-induced MAPK activation on HO-1 expression in BV2 cells	101
Fig. 3-70. Effects of compound 1 on HO-1 expression through the PI3K/AKT cascade in BV2 cells	101
Fig. 3-71. Effects of compound 1 on LPS-induced nitrite (A) and PGE2 (B) production and expression of iNOS and COX-2 protein (C) in BV2 cells	102
Fig. 3-72. Effects of compound 1 on the LPS-induced activation of NF- $\kappa$ B, and binding activity to DNA of NF- $\kappa$ B protein in BV2 cells	102
Fig. 3-73. Effects of tin protoporphyrin (SnPP) on inhibition of nitrite (A), PGE2 (B), iNOS (C), and COX-2 (D) by compound 1 pre-treatment of LPS-stimulated BV2 cells	103
Fig. 3-74. Effects of compound 1 on expression of HO-1 protein in primary microglia cells	103
Fig. 3-75. APL 세포주에서 검정할 추출물의 선별 (12종)	104
Fig. 3-76. APL 세포주에서의 단독투여 효과 검정(#100, 99, 90)	104
Fig. 3-77. APL 세포주에서의 단독투여 효과 검정(#239, 114, 115)	105
Fig. 3-78. APL 세포주에서의 단독투여 효과 검정(#95, 238, 240, 118, 119, 109)	105
Fig. 3-79. APL 세포주에서 ATO와의 병행투여 효과 검정(#100, 99, 90, 239, 114, 115). 적색 점선은 기존 항암제인 ATO의 효과	106
Fig. 3-80. APL 세포주에서 ATO와의 병행투여 효과 검정(#95, 238, 240, 118, 119, 109). 적색 점선은 기존 항암제인 ATO의 효과	106
Fig. 3-81. Refolding of P66-wild type or - mutants (T326L, S421L, and T326L+S421L)	113
Fig. 3-82. Effects of temperature on P66-wild type or - mutants (T326L, S421L, and T326L+S421L)	113
Fig. 3-83. SDS-PAGE and zymography analyses of P66 and its mutants	115
Fig. 3-84. P66-I.B. extraction from recombinant E. coli cell by sonicator (lane 1) or lysozyme/DNaseI cell-lysis system	116
Fig. 3-85. Production of P66 I.B. in fermentation	116
Fig. 3-86. Refolding of P66 I.B. on 1:4 or 1:20 dilution methods	117
Fig. 3-87. Determination of P66 activity and protein amount in two methods after refolding	118
Fig. 3-88. Concentration of P66 in glass fiber filter	119
Fig. 3-89. Determination of proteolytic activity after concentration	120

Fig. 3-90. Effects of temperature on SWP or P66 activity .....	120
Fig. 3-91. Effects of temperature on 순샘 벼블(Aekyung) or P66 activity .....	121
Fig. 3-92. Drying of P66 in diluting agent .....	122
Fig. 3-93. The proliferation efficiency of cryopreserved human stem cells .....	127
Fig. 3-94. Image of ice crystal growth .....	128
Fig. 3-95. Freezing images of RBC .....	130
Fig. 3-96. Cryo-protection mechanism of p-CY01 .....	132
Fig. 3-97. 기존 라말린 합성중 하이드라진 부분 합성법 .....	132
Fig. 3-98. 라말린의 구조적 특징 .....	133
Fig. 3-99. CuI를 이용한 새로운 하이드라진 부분 합성법 .....	134
Fig. 3-100. 주석을 사용하지 않는 새로운 합성법 .....	134
Fig. 3-101. 기존 합성법 및 주석제거 합성법으로 합성된 라말린 NMR 데이터 .....	137
Fig. 3-102. Ramalin does not affect BACE1 full length promoter .....	138
Fig. 3-103. Ramalin does not affect BACE1 promoter variants .....	138
Fig. 3-104. qPCR result with ramalin in neuronal cell line .....	139
Fig. 3-105. Ramalin decreases BACE1 protein expression in neuronal cell .....	139
Fig. 3-106. Ramalin decreases BACE1 enzyme activity .....	140
Fig. 3-107. IC50 calculation with Ramalin against BACE-1 .....	140
Fig. 3-108. Effect of BACE-1 expression with Ramalin according to BACE-1 UTR .....	141
Fig. 3-109. Effect of GFP expression by Ramalin on BACE-1 UTR .....	142
Fig. 3-110. Evaluation of BACE-1 expression level using VPS16, CWC15, MSI1, MSI2 and EIF4E siRNAs .....	143
Fig. 3-111. Evaluation of BACE-1 expression level and anti-inflammatory effect using SCD inhibitor MK8245 .....	143
Fig. 3-112. Ramalin inhibits HDAC1, HDAC2, HDAC4 and HDAC6 .....	144
Fig. 3-113. Panal assay against 11 isotype of HDACs by reaction biology .....	144
Fig. 3-114. Ramalin has anti-inflammatory effect .....	145
Fig. 3-115. Acetylated histones and tubulin level under Ramalin treatment .....	145
Fig. 3-116. Ramalin improve mitochondria movement which deteriorated by A $\beta$ in primary hippocampal neuron .....	146
Fig. 3-117. 재조합 리파아제 발현 실험 결과 .....	155
Fig. 3-118. pET vетor에 삽입된 LipBL의 TBN 배지에서의 halo 형성 .....	158
Fig. 3-119. Effect of carbon sources on EPS production and growth of <i>Pseudoalteromonas</i> sp. RosPo-2 .....	165
Fig. 3-120. Effect of sucrose concentrations on EPS production and growth of <i>Pseudoalteromonas</i> sp. RosPo-2 .....	165
Fig. 3-121. Effect of Nitrogen sources on EPS production and growth of <i>Pseudoalteromonas</i> sp. RosPo-2 .....	166

Fig. 3-122. Effect of carbon / nitrogen ratio on EPS production and growth of <i>Pseudoalteromonas</i> sp. RosPo-2 .....	167
Fig. 3-123. Normal Probability Plot of the Residuals for the response of p-RosPo-2 production .....	168
Fig. 3-124. Normal Probability Plot of the standardized effects for the response of p-RosPo-2 production .....	168
Fig. 3-125. Normal Probability Plot of the Residuals for the response of p-RosPo-2 production .....	170
Fig. 3-126. Normal Probability Plot of the standardized effects for the response of p-RosPo-2 production .....	170
Fig. 3-127. Three-dimensional response surface plot .....	173
Fig. 3-128. The p-RosPo-2 production from SZB (A) and optimized medium (B) .....	174
Fig. 3-129. 남극 Ross 해에서 채취한 붉은 산호 .....	175
Fig. 3-130. 공생미생물의 온도별 균주 성장 (3일, 7일, 18일) .....	177
Fig. 3-131. 극지요각류 RNA-seq 분석 논문 .....	180
Fig. 3-132. 요각류에서의 자외선 및 염분에 따른 영향 연구 논문 .....	180
Fig. 3-133. 남빙해 계절별 염분도(NODC; <a href="http://www.nodc.noaa.gov/">http://www.nodc.noaa.gov/</a> ) .....	181
Fig. 3-134. 남극지역 UV-index 및 기후변화를 고려한 UV 변화예측도(Williamson CE et al., 2014) .....	181
Fig. 3-135. 자외선 및 염분에 따른 영향 연구 논문 .....	182
Fig. 3-136. 요각류에서의 자외선에 반응하는 유전체 연구 논문 .....	183
Fig. 3-137. 실험 방법 참고 논문의 예 .....	184
Fig. 3-138. <i>T. kingsejongensis</i> 의 자외선 노출에 대한 치사율 .....	185
Fig. 3-139. Real-time RT-PCR .....	186
Fig. 3-140. 산화스트레스 관련 유전자들의 mRNA 발현양상 분석 .....	187
Fig. 3-141. Heat shock protein 유전자들의 mRNA 발현양상 분석 .....	188
Fig. 3-142. 항산화 방어기작 모식도 .....	189
Fig. 3-143. 활성산소종 및 항산화 효소 활성 분석 .....	190
Fig. 3-144. 극지 요각류의 자외선 노출에 대한 영향연구 논문 .....	191

## List of Tables

Table 3-1. 극지시료의 좌표 및 시료명 .....	32
Table 3-2. 해양미생물 분리를 위한 배지 조성 .....	34
Table 3-3. 극지 환경으로부터 진균의 분리 .....	38
Table 3-4. 극지 환경으로부터 세균의 분리 .....	39
Table 3-5. 극지생물 유래 미생물 (진균)의 추출물 제조 결과 .....	40
Table 3-6. 확보된 EA 추출물에 대한 1차적 항당뇨 활성 검색 목록 .....	42
Table 3-7. 세균의 온도별 성장특성 .....	43
Table 3-8. 진균의 온도별 성장특성 .....	44
Table 3-9. 추출물 제작된 이용된 진균의 ITS 동정결과 .....	45
Table 3-10. HPLC multi step gradient (Sample injection : 2 ppm / 3 uL injection) .....	49
Table 3-11. MS method experiment 1 .....	49
Table 3-12. MS method experiment 2 .....	49
Table 3-13. 극지 해양미생물 유래 추출물 제작 목록 .....	68
Table 3-14. SF6796V-53 의 1H-NMR 및 13C-NMR data (Recorded in CDCl <sub>3</sub> ) .....	74
Table 3-15. SF6796V-552-1-2 의 1H-NMR 및 13C-NMR data (Recorded in CDCl <sub>3</sub> ) .....	79
Table 3-16. SF6796V-552-4 의 1H-NMR 및 13C-NMR data (Recorded in CDCl <sub>3</sub> ) .....	83
Table 3-17. DSC analysis of p-CY01 LM solution .....	131
Table 3-18. ICP-MS 분석결과 .....	135
Table 3-19. 산을 이용한 주석제거 실험의 ICP-MS 분석결과 .....	136
Table 3-20. 신규 합성법에 의한 라말린의 ICP-MS 분석결과 .....	137
Table 3-21. 극지유래 리파아제 생산 균주 목록 .....	148
Table 3-22. 극지 미생물의 리파아제 활성 측정 결과 .....	149
Table 3-23. 리파아제 유전자 정보 분석 .....	150
Table 3-24. 극지 미생물 중에서 리파아제 활성이 확인되고 유전자가 보고된 균주 .....	150
Table 3-25. PCR 클로닝을 위한 Primer .....	151
Table 3-26. Sequence of LipBL ( <i>Marinobacter lipolyticus</i> ) (L) .....	152
Table 3-27. Sequence of Triacylglycerol lipase ( <i>Marinobacter lipolyticus</i> ) (T) .....	152
Table 3-28. Sequence of Acylglycerol lipase ( <i>Marinobacter lipolyticus</i> ) (A) .....	153
Table 3-29. Sequence of Probable lipase ( <i>Croceibacter atlanticus</i> ) (C) .....	153
Table 3-30. 재조합 리파아제 효소활성 시험 결과 .....	155
Table 3-31. 재조합 플라스미드 내 LipBL 유전자 염기 서열 ( <i>Marinobacter lipolyticus</i> ) .....	156
Table 3-32. 재조합 LipBL 아미노산 서열 비교 .....	156
Table 3-33. LipBL의 PCR cloning을 위한 primer .....	157
Table 3-34. Statistical analysis of medium components using the initial Plackett-Burman design .....	161

Table 3-35. Statistical analysis of selected medium components using the secondary Plackett-Burman design .....	162
Table 3-36. Box-Behnken optimization of selected significant medium components .....	163
Table 3-37. Analysis of variance for predictive equation for EPS production by <i>Pseudoalteromonas</i> sp. RosPo-2 .....	172
Table 3-38. 붉은 산호에서 분리한 공생 미생물의 특성과 동정 .....	175
Table 3-39. 같은 종으로 묶어 정리한 공생미생물 .....	176

## 제 1 장 서론

### 제 1 절 연구개발의 목적

생물의 대사체는 다양한 구조 및 생리활성을 풍부하게 지니고 있는 자원으로 인식되고 있으며, 특히 극지 생물의 대사체는 많은 연구가 이루어지지 않은 희소자원으로서 생리활성 물질의 탐색 대상으로 적합한 생물자원이다. 따라서 신규 의약 소재 및 기타 기능성 소재의 원천자원으로서의 무한한 잠재가치를 가지는 극지 생물 유래 대사체를 효과적으로 분리하고 관련 기초자료를 제공하여 연구목표인 극지 고유생물의 생물공학적 보전가치를 규명하고 활용기반을 구축하여 차세대 국가 성장 동력 창출의 기초자료를 제공에 기여 하고자 한다.

WTO 체제의 출범으로 지적 및 산업소유권 강화로 기술의 배타적 권리를 점차 엄격하게 보호하는 방향으로 전개됨으로써 부가가치가 높은 새로운 물질을 탐색하고 그 물질의 응용에 대하여 독자적인 기술 영역을 구축할 필요가 있다. 또한 기초식품과 의약품의 자체 공급능력 및 수산업 종사 국민들의 생존권 보호를 위해서 식품 또는 의약품의 자원으로써의 고부가가치 생물자원의 생산이 가능하도록 과학적인 신물질 창출연구가 필요하다.

### 제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위

지금까지 인류가 질병의 치료에 사용하고 있는 대부분의 의약품은 식물이나 미생물의 대사산물이나 성분들에서 유래한 것으로 현재 가장 많이 사용하고 있는 항암제, 항생제, 면역 억제제, 콜레스테롤 합성 저해제, 당뇨병 치료제들은 그 기원이 대부분 미생물의 대사산물이나 식물에서 발견된 2차 대사산물들에서 출발한 것들이다. 특히 질병의 원인이 발현된 단백질의 이상화나 유전자의 발현조절의 이상화로 기인한다는 결과가 밝혀지면서 의약품의 개발을 위한 새로운 방법으로 원인 단백질의 구조를 밝히고 작용점을 정확히 분석하여 이를 근거로 화학합성에 의해서 이들을 조절하는 화합물을 설계하거나 수백만 개의 chemical library에서 특이적 조절제를 HTS에 의해서 발굴하고 이 화합물을 출발물질로 하여 의약품으로 개발을 시도하고 있다. 그러나 식물이나 미생물유래의 2차 대사산물들은 단백질과 화합물의 구조와 활성과의 상관관계를 예측할 수 없었던 경우가 대부분이고 화합물을 분리하여 활성을 분석한 후에나 단백질 구조와의 상관관계를 알 수 있을 정도로 현재까지의 구조 기반 설계기술에서 불가능한 새로운 화합물을 제공할 수 있다. 따라서 이들 대사산물의 발굴은 타겟 단백질과 결합부위를 분석하여 새로운 화합물의 설계를 가능하게 하거나 타겟 단백질이나 질병원인의 새로운 기작을 제공할 수 있는 기술로 여전히 그 중요성이 인정되고 있다. 아울러 화학합성의 어려움이나 자연계에 존재하는 2차 대사산물은 앞으로 발굴될 수 있는 화합물의 구조를 전혀 예측할 수 없기 때문에 현재 확보된 chemical library의 화합

물 골격과 유도체의 다양성의 한계를 극복할 수 있어서 여전히 의약품개발을 위한 중요한 선도물질의 제공원으로 인식된다.

생물자원유래의 2차 대사산물이 의약품개발을 위한 화합물의 제공원로 사용하는 이유는 2차 대사산물의 화합물 구조의 다양성에 기인하며 이는 의약활성을 예측할 수 없는 골격구조의 다양성으로 확대된다. 이러한 화합물의 다양성은 자연계에 존재하는 생물종의 종류가 무수히 많고 또한 각각의 생물종은 그 생육조건이나 환경에 따라 대사 기작이 달라지게 되어 이들이 생산하는 2차 대사산물은 다양성을 무한적으로 제공할 수 있을 것으로 기대된다. 극지역의 독특한 극한환경 및 생태환경이 이 지역에 서식하는 생물의 이차대사물질 생합성 과정에 영향을 미치고 있으며 특히, 이러한 대사산물은 공생미생물과 밀접한 상관관계가 밝혀짐으로서 공생미생물에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히, 극한미생물은 고등생물보다 생산성 측면에서 높은 산업적인 활용성을 가지고 있다. 따라서 본 연구에서는 남극 생물로부터 생물자원의 다양성을 확보하고 배양체로부터 얻어진 추출물을 구축하고 그 활용성을 높이기 위한 생리활성검색을 통한 DB를 구축하고자 하였다.

체계적인 해양생물을 대상으로 한 연구는 식물 등 육상 생물계에 대한 연구에 비해 상당히 늦은 1970년대 중반에 시작 되었으며 약 2500여종의 새로운 물질 1977-1987년 사이에 이 해양생물로 부터 분리된바 있으며 이는 해양생물체가 주요한 신물질의 보고로서 가치고 가지고 있음을 보여주는 증거라 볼 수 있다 (Gragg and Newman, 2013; Blunt et al., 2014, Blunt et al., 2015, Blunt et al., 2016). 해양 생물은 지구 생물자원의 상당 부분을 구성한다는 점과 독특한 구조, 대사 경로, 생식 시스템, 화학 방어 메커니즘을 갖기 때문에 새로운 화합물의 제공 원으로서 과학적 관심이 높아지고 있는 생물자원이며 실질적으로 해양유래의 천연물은 그 구조가 육상에서 분리되는 물질과 상이한 경우가 많음으로 신약 개발 시 중요한 요소로 인식되는 분자구조의 다양성구축면에서 장점을 지니고 있다 (Gerwick and Moore, 2012). 최근 들어 의약품으로의 임상 평가가 진행되는 해양유래의 천연물의 경우 대부분 대형 해양생물에서 분리된 것으로서 실질적으로는 이들과 공생하거나 관련된 미생물들에 의해 생산된다는 결과가 알려지고 있으며 따라서 해양유래 미생물에 대한 관심도 높아지고 있다 (Rateb and Ebel, 2011; Gerwick and Fenner, 2013).

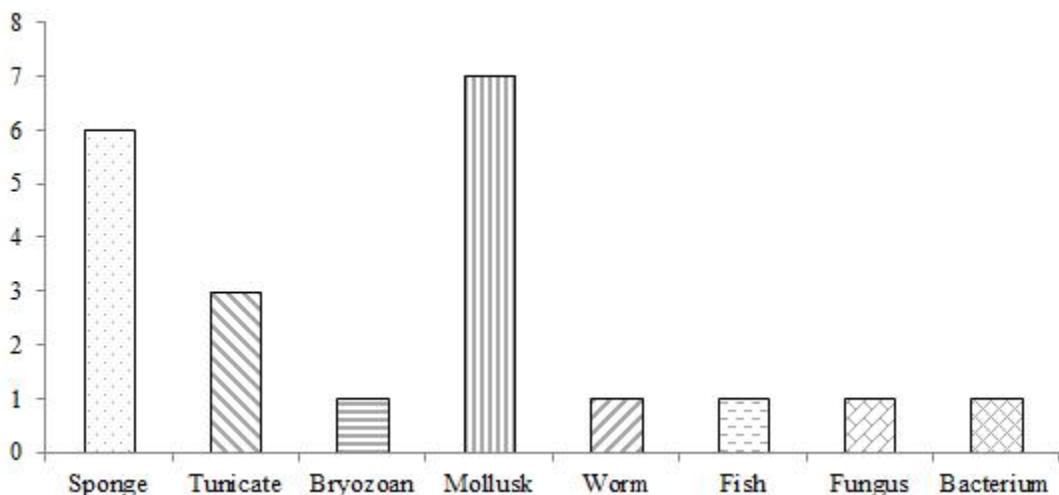


Fig. 1-1. 현재 임상실험단계에 진입한 해양유래 대사체의 생산 해양생물종에 따른 분류

해양미생물 중에서 최근 해양 유래 진균에서 얻은 이차대사물질들이 주목받고 있고, 특히 1990년대 이후 발표된 구조들의 수가 급격히 증가되었으며 그 중 많은 물질들이 구조적으로 독특하고, 흥미를 유발하는 생물학적, 약리학적 특징들을 가지고 있음이 밝혀지고 있다 (Rateb and Ebel, 2011). 최근의 연구결과를 보면 대부분의 해양환경유래의 진균 종은 *Aspergillus* 나 *Penicillium*속에 속하는 종들이며 보고되는 신규 2차 대사물질의 생산균주는 해양동물이나 식물에서 분리된 종임을 알 수 있으며 특히 남중국해에서 분리된 2차 대사물질에 대한 보고가 증가 하고 있는 추세이다. 따라서 해양미생물분리의 대상이 되는 해양 환경이나 해양생물종의 범위를 확대하고 생리활성검색법의 종류나 범위를 확대한다면 해양 진균은 향후에도 신약개발의 가능성을 가지는 천연물탐색의 좋은 생물자원이 될 수 있을 것으로 기대된다.

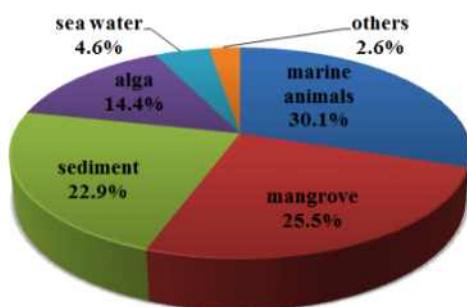


Fig. 1-2. 신규 대사체를 생산하는 해양 진균의 분리원

현재 사용되는 대부분의 염증 치료제는 스테로이드 계열과 NSAID (non-steroidal anti-inflammatory drugs)이며, 이들 치료제의 치료효과는 인정되나 경우에 따라 심각한 부작용이 발생한다. 따라서 상기 약물의 작용기전과 구별되는 작용기전에 근거한 항염증 치

료제의 개발이 필요하다. 또한 만성염증이 직접, 간접적으로 심장질환 암, 당뇨, 관절염, 치매등과 같은 만성질환과 관련이 있는 것이 밝혀짐으로서, 항 염증 약물에 대한 조사는 그 중요성이 더욱 커지고 있으며 이 경우 다양한 염증인자의 생성을 억제하는 천연물의 탐색이 중요한 연구 분야가 될 수 있다. 최근에는 해양천연물을 이용한 항염증 연구 또한 활발하게 이루어지고 있다 (Cheung et al., 2016).

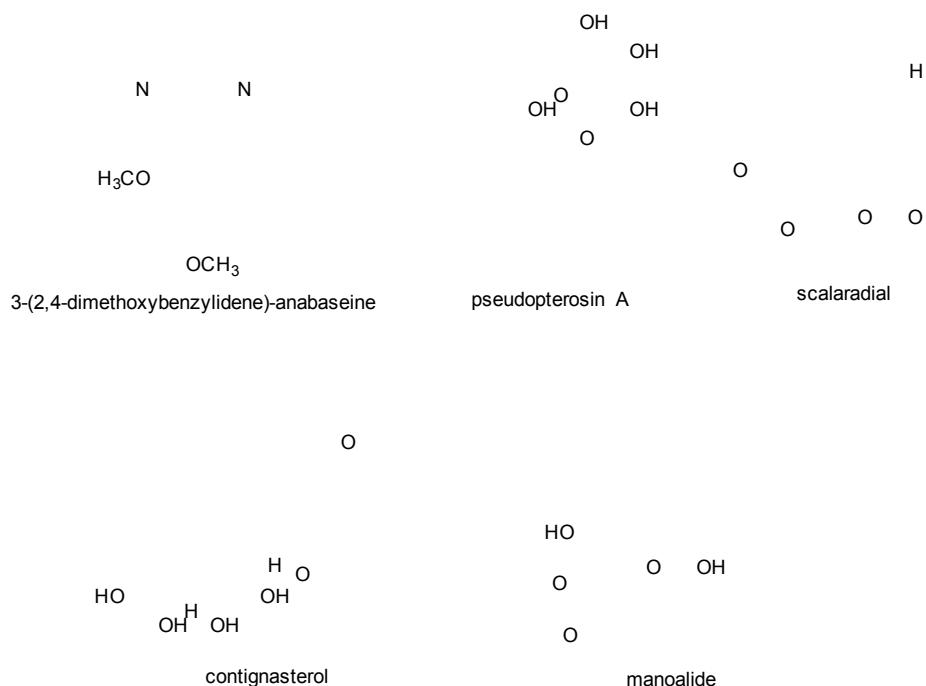


Fig. 1-3. 전임상연구 또는 임상시험단계의 항 염증 효과를 가진 해양유래 선도물질

면역 증강제는 병원체에 대한 방어 기능을 증가시키거나 면역기능의 상승을 통해 항암 작용 및 항바이러스 작용을 증가시킨다. 또한 암세포의 성장과 변형을 감소시키거나 변형된 암세포에 대한 면역기능을 증가시킨다. 이와 반대로 장기이식 시 면역반응에 관여하는 세포들의 증식을 억제하여 면역억제 기능을 나타내는 면역억제제가 있다. 특히 면역억제제 개발의 경우 선진국에서 관심을 가지고 있는 분야로, 이전에는 불가능하게 여겨져 왔던 장기이식을 가능하게 하는 혁명적인 의료기술을 가지고 왔다. 이들 중 가장 널리 사용되고 있거나 혹은 임상 시험중인 약물로는 cyclosporin A, FK-506, rapamycin 등이 있으며 이들은 모두 진균류(fungi)에서 기원하고 있는 약물로 천연물에서 면역조절제를 도출하는 것이 얼마나 중요한 것인가를 보여주고 있다.

면역조절제의 시장성도 매우 큰 것으로 판단되어 면역억제제인 cyclosporin A만 보더라도 1994년도 현재 전 세계적으로 약 10억불 규모의 시장이 형성되어, 그 제한적인 사용범위를 생각하면 면역억제제 시장이 매우 크다고 판단된다. 다양하게 응용되는 면역조절물질의 생물학적 특성 및 작용기전을 연구하는 것은 효율적인 생체 반응조절제로서 새로운 면역조

질제의 개발에 도움을 줄 것이라 생각된다.

바이오 신의약 산업은 차세대 우리나라의 성장 동력산업이며, 특히 해양생물 산업은 국가 경제의 중추적 역할을 할 미래의 성장산업이다. 천연자원으로부터 분리된 순수 화합물이나 추출물 혹은 부분 정제된 생리활성 분획물을 이용한 기능성 식품 또는 신약개발은 높은 투자 효율성 및 고부가가치 산업으로 평가되고 있다. 기능성 소재나 신약 개발에 있어서 성패는 질적, 양적으로 우수한 화합물 또는 추출물 라이브러리를 확보했는지의 여부에 달려 있으며, 극지생물 유래의 추출물이나 화합물구축은 미래 핵심 산업인 신약후보 물질을 제공 할 수 있는 매우 중요한 자원으로 인식되고 있다. 극지 미생물 및 그 추출물 그리고 기타 연구정보에 대한 국내 연구자들의 체계적인 접근은 전무한 실정이며 공동 연구자들이 근접 할 수 있는 극지생물 및 추출물을 구축하고 그 활용성을 극대화하기 위한 system을 구축 할 필요가 있다.

신약개발의 여러 단계 중 특정 질병에 대한 치료를 위한 분자표적이 정해진 후 분자표적에 작용하는 선도 화합물을 도출하기 위하여 다양한 종류의 화합물 library를 검색 하게 되는 단계 (target selection 및 screening 단계)는 전체적인 신약개발 과정에서 매우 중요한 출발점이다. 특히 인간 유전체 연구와 더불어 현대 과학에서는 인간의 질병, 예방 및 진단과 관련된 천~만개 정도의 새로운 표적 단백질이 새로이 규명된 것으로 평가되고 있으며, 고속 혹은 초고속 스크리닝 방법의 발전에 의하여 일회에 수천종의 화합물에 대한 분자표적을 대상으로 한 활성 탐색이 가능 하므로 더 이상 분자 표적을 대상으로 한 탐색 단계 자체는 신약 개발과정에 있어서 많은 시간과 노력이 필요한 속도결정 단계가 아니며 오히려 이러한 스크리닝 시스템에 적용할 화합물 라이브러리의 질 및 양이 신약 개발의 성공에 있어서 중요한 요소로 간주된다. 다양한 분자표적에 작용하는 생리활성 물질의 창출을 위한 스크리닝 단계에서 필요한 다양한 분자의 확보는 전 세계적으로 관심을 가지고 추구할 분야가 될 것이다. 최근 생명공학기술이 급진적으로 발전하고 생물자원의 활용 방안이 광범위하게 가속화 되면서, 세계 각국은 자국의 생물자원에 대한 network체계 구축을 중요시하고 있다. 세계 인구의 지속적 증가와 경제수준의 향상으로 건강에 대한 관심이 고조하여 난치병에 대한 치료제 개발 등 의약산업과 건강식품, 기능성 식품산업은 지속적으로 성장 할 것으로 예상 되며 따라서 양극해 해양자원의 활용도 극대화 및 재산권 확보의 측면에서 우리나라 도 시급히 구축해야 할 필요가 있다고 판단된다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국외 연구수준

- 선진국들은 쇄빙선, 대륙기지 및 남북극권 국가 간의 공동연구를 통하여 극지 해양생물에 대한 자원탐사를 실시하고 있으며, 현재에도 과학 활동의 명목으로 미답지역의 생물자원을 확보하고 있다.
- 극지생물다양성, 생물계통·진화, 스트레스반응 등에 대한 연구를 위해 2007/2008 IPY를 통하여 국제공동연구 체계가 이루어지고 있으며, 이외 저온효소 등의 신규 생물 소재 연구를 공식적으로 보고하였다.
- SCAR 내 EBA(Evolution and Biodiversity in the Antarctic) 프로그램에서는 남극생물의 진화, 적응, 생태적 서식처의 다양성, 다양성의 예측 등에 대한 연구를 진행하고 있다.
- 미국
  - 1958년부터 NCI (국립암연구소, [www.nci.nih.gov](http://www.nci.nih.gov))를 주축으로 천연물 유래 항암제 개발을 위한 연구 사업을 본격적으로 추진하여 1986년부터 약 5만 여종의 식물 추출물과 만 여종의 해양생물 유래 추출물 은행을 구축하고 분양사업을 실시하고 있다.
  - 주목으로부터 개발한 “Taxol”은 연간 12억 달러 이상의 매출을 기록하고 있으며 최근에도 AIDS 바이러스에 대한 치료가능성이 있는 화합물을 발굴하였다.
  - 국립암연구소(NCI)에서는 항암제를 생산하는 해면과 이끼벌레를 해저에서 대규모로 양식하여 해당물질을 대량으로 확보하는 단계에 돌입하였다.
  - 제약회사인 Lilly group, Corey group, Merck사 등에서도 천연물을 이용한 신약개발 프로젝트를 진행하고 있다.
  - Univ. of South Florida의 연구진은 남극유래의 Tunicate로부터 항암세포 사멸효과를 가지는 palmerolide A라는 신규 macrolide형 대사체를 분리하였다.
  - University of Alabama at Birmingham의 연구진은 수년간 남극유래 해양생물을 대상으로 한 이차대사물질 연구를 지속적으로 수행하고 있으며, 최근 2016년에 남극유래 균주로 부터 methicillin 내성을 갖는 darwinolide라는 대사체를 분리 하였다 (von Salm et al., 2016).
  - 미국은 북극이사회 회원국이자 남극조약 원초서명국으로 국립과학재단(National Science Foundation: NSF)이 극지연구정책 및 연구사업을 총괄하고 있으며, 재단 내의 극지프로그램연구청(Office of Polar Program: NSF-OPP)이 크게 남극연구부와 북극연

구부로 구분되어 남극·북극 과학 연구를 담당하고 있다.

### ○ 유럽

- 독일은 은행잎으로부터 ginkoflavone glycoside를 분리, 혈액순환 개선제로 개발하여 연간 약 20억 달러이상의 매출을 기록하고 있으며 최근 정부주도하에 “Natural Product Pool”을 시작하여 천연물 성분물질과 유도체를 수집하여 대단위 생리활성 검색을 통하여 신의약품, 신농약 등의 개발 사업을 시작하였다.
- 러시아는 극지연구소 (Arctic and Antarctic Research Institute of Roshydromet: AARI)가 연구 활동을 주관하여 담당하고 있으며 남북극 환경 구성요소(빙설권, 수권, 지권, 대기권, 고층대기권) 내 기작 및 기작 간 상호작용에 대한 규명, 원거리 탐사 및 심부빙하시추 기술개발 및 수행, 동토공학, 북극 생태연구, 남북극 해양활동 지원을 위한 수문기상 연구 및 실시간 모니터링 활동 등 활발한 연구를 진행 중이다.
- 영국은 LTMS (Long-term Monitoring and Survey) 장기 모니터링 및 관측 프로그램을 별도로 운영하고 있으며, 국립해양센터를 중심으로 해양 생물다양성 조사(Census of Marine Life)를 실시하여 남극해에 서식하는 생물종과 환경을 보고하였으며, 해양생명공학의 소재로 특유의 방어 기작을 지닌 극지 저서동물 연구를 확대하고 있다.
- 이탈리아의 Consiglio Nazionale Delle Ricerche - Istituto Di Chimica Biomolecolare의 연구진은 남극유래의 nudibranch로부터 granuloside라는 대사체를 분리 하였다 (Cutignano et al., 2015).
- 노르웨이의 UiT The Arctic University of Norway의 연구진은 수년간 남극유래 해양 생물을 대상으로 한 이차대사물질 연구를 지속적으로 수행하고 있으며, 최근 2014년에 남극유래 해초로 부터 synoxazolidinones 대사체 2종과 pulmonarins 대사체 2종을 분리 하였다 (Trepos et al., 2014).

### ○ 중국

- ‘중국 극지연구소’ 주도하에 ‘극지표본자원 공유 플랫폼’ 사업을 통하여 남극지역을 대상으로 자원 활용이 가능한 남극 광물, 생물자원을 수집하고 있으며, 해양사업 발전계획에 따라 2020년까지 해양환경 변화와 해양생물자원의 지속가능한 이용, 대양 및 심해 연구에 대한 지원을 강화하고 있다.
- Ocean University of China의 연구진과 South China Sea Institute of Oceanology의 연구진은 각각 남극유래의 균주로부터 chrodrimanins 대사체 2종과  $\alpha$ -pyrone

merosesquiterpenoids 계열 대사체 6종을 분리 하였다 (Zhou et al., 2015; Wang et al., 2016).

### ○ 일본

- 미생물, 해양생물 등의 천연자원으로부터 활성물질분리, 열대식물로부터 활성물질 분리 등에 적극적인 투자 중이다.
- 일본 문부과학성 산하 국립 극지연구소(National Institute of Polar Research: NIPR)가 남북극 연구 활동을 주관하고 있으며, 크게 다섯 개로 구성된 연구그룹의 하나인 생명과학 연구 그룹은 해양생물연구, 육상생물연구, ‘펭귄, 크릴, 해포 등 생물에 대한 해동 생태연구’등으로 나뉘어진다.

### ○ 오세아니아

- 뉴질랜드의 캔터베리 대학의 연구진은 지난 수년간 남극해양 유래의 해양생물을 대상으로 한 이차대사물질을 지속적으로 수행하고 있으며 대표적으로 강력한 CDK 저해제인 variolins를 발굴한 바 있다.
- 호주는 CSIRO, AIMS, New South Wales Univ. 등 연구기관이 자국 및 아세안 국가 연안의 해양생물로부터 항암제 등 신의약품과 신기능성 유용소재 생산연구를 진행 중이다. 특히 AIMS에서는 세계에서 가장 규모가 큰 해양추출물 library를 보유 (2만 여종)하고 있다.
- 호주의 남극연구소는 영국의 남극연구소와 공동으로 30년 가까이 약 5년 단위의 장기 프로그램을 통해 남극 수산자원과 해양생태계 변동과정 연구를 지속적 수행 중이다.

### ○ 동남아, 남미

- 싱가포르의 경제개발청 등이 주관(1993년 발족)하여 Centre for Natural Products Research (CNPR)을 설립 84,000점의 추출물 확보하였으며 2002년 영국의 제약회사 등이 투자한 MerLion Pharmaceuticals로 사영화하여 운영하고 있으며 현재 세계에서 가장 다양한 추출물 Library를 보유한 것으로 평가되고 있다.
- 칠레의 University of Chile의 연구진은 남극유래의 균주로부터 nitroasterric acid 계열의 대사체 4종을 분리 하였다 (Figueroa et al., 2015).

## 제 2 절 국내 연구수준

- 1985년 이후 물질특허제의 도입과 함께 천연물 과학 분야에 대한 관심이 높아져 한국생명공학연구원, 한국과학기술원, 한국화학연구원, 한국해양연구원 등을 중심으로 천연물 성분 연구에 대한 관심이 증대하고 있다.
- 우리나라에서는 2001년을 시작으로 천연물신약연구개발촉진계획이 수립됨에 따라 경쟁력 있는 글로벌 천연물신약 연구기반을 구축하고, 만성, 난치성, 노인성 질환 치료 천연물신약을 개발하기 위해서 정부차원의 지원이 한층 강화되었으며 최근 3차 천연물신약연구개발촉진계획 (2011~2015)이 수립되어 기존사업 확대 및 신규 사업에 투자되었다.
- 그러나 국내의 경우 천연물신약개발에 기초가 되는 천연물 생리활성 탐색기술과 약리작용 및 독성연구 등에 대한 기초연구가 아직 미흡한 편이며 이에 따라 대부분의 천연물 성분 및 생리활성 연구가 지속적, 조직적, 효율적, 체계적으로 이루어지지 못하고 있다.
- 1988년 남극에 세종기지가 건설되면서 본격적인 극지에 관한 과학적 연구가 시작되었고, 북극에 관한 연구는 2002년 노르웨이 스발바드 군도 스피츠베르겐 섬 니알슨에 한국해양연구원이 다산과학기지를 개설한 후부터 본격적으로 시작되었다.
- 2004년 한국해양연구원 부설 극지연구소 설립 후 학연 협동연구가 활발히 진행되고 있으며, 다산과학 기지가 있는 니알슨 섬은 국제적인 북극 연구 단지로서 우리나라를 비롯한 노르웨이, 독일, 영국, 프랑스, 일본, 이탈리아, 중국, 인도 등 9개국이 기지를 운영하고 있고 국가 간 협력 또는 연구소 간의 협력에 기반 한 국제 공동연구를 진행 중이다.
- 극지연구소는 극지바이오 연구 활성화를 위하여 극지생물 DB 구축/운영, 극지 저온 생물 연구, 극지 생물해양 연구, 극지생물 기능 유전체 연구 등을 통해 극한환경 적응기작, 대사체 확보 및 활용연구를 진행하고 있다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제1절 극지 고유생물 유래 대사체 확보

#### 1. 남극 로스해 해양생물 추출물 확보

##### 가. 연구 목표

극지 해양미생물의 다양성을 확보하고 추출물을 획득하여 대사성 질환을 타겟으로 생리활성을 검증하여 해양자원활용을 위한 DB를 구축하고자 한다. 추출물 및 생물자원을 제공함으로서 사업의 성과물을 확산하도록 지원하고자 한다.

남극 로스해는 생명체가 성장하고 생존하기에 가장 극단적인 저온환경을 구성하고 있다. 이 지역에 서식하는 미생물은 고세균, 세균, 시아노세균, 곰팡이, 조류 및 지의류 등 다양한 생물들이 보고되었다. 대부분의 미생물들은 연중 낮은 온도의 환경을 구성하고 있어 저온 및 저온내성을 갖는 종들이 상대적으로 우점하는 것으로 알려져 있다. 따라서 대부분의 미생물은 저온환경에서 성장 및 생존하기 위한 대사물질을 가지고 있는 것으로 예측하지만 그 정보는 대부분 알려져 있지 않은 상황이다. 특히, 세균의 대사체는 terpenes, alkaloids, peptides 및 그 외 서로 다른 생물학적인 활성을 가지는 다양한 형태인 이차대사산물의 풍부한 공급원으로서 알려져 있다. 또한 공생미생물의 경우, 양 확보에 어려움이 있는 해양생물의 대사체 연구에 새로운 방향으로 연구가 되고 있다. 연구를 통해 얻은 화합물들은 새로운 의약품, 화장품 및 방부제 등의 개발을 위한 중요한 prototype을 제공할 수 있다.

본 연구에서는 남극 로스해 생물 및 환경자원을 확보하고 이로부터 다양한 미생물을 분리 및 보존하였으며 특히, 세균을 대상으로 추출물을 제작하여 생리활성검색을 위한 database를 구축하는 데 그 목적이 있다.

##### 나. 연구 수행방법

###### (1) 시료확보

북극 및 남극으로부터 채취된 해양생물을 냉동상태로 보존된 시료를 확보하였다 (Table 3-1).

Table 3-1. 극지시료의 좌표 및 시료명

No.	Latitude [N]	Longitude [W]	Sample Name	Depths(m)
-----	--------------	---------------	-------------	-----------

No.	Latitude [N]	Longitude [W]	Sample Name	Depths(m)
1	74-52-7875	164-04-0523	2016RS3 #ST01-DR-BS-21	208
2			2016RS3 #ST01-DR-BS-23	
3			2016RS3 #ST01-DR-BS-26	
4			2016RS3 #ST01-DR-BS-27	
5			2016RS3 #ST01-DR-BS-30	
6			2016RS3 #ST01-DR-BS-35	
7			2016RS3 #ST01-DR-BS-36	
8			2016RS3 #ST01-DR-BS-39	
9			2016RS3 #ST01-DR-BS-44	
10			2016RS3 #ST01-DR-BS-46	
11			2016RS3 #ST01-DR-BS-47	
12			2016RS3 #ST01-DR-BS-48	
13			2016RS3 #ST01-DR-BS-49	
14			2016RS3 #ST01-DR-BS-54	
15			2016RS3 #ST01-DR-BS-55	
16			2016RS3 #ST01-DR-BS-56	
17			2016RS3 #ST01-DR-BS-57	
18			2016RS3 #ST01-DR-BS-58	
19	74-31-7149	170-12-9476	2016RS3 #ST04-DR-BS-5	348
20			2016RS3 #ST04-DR-BS-7	
21			2016RS3 #ST04-DR-BS-20	
22			2016RS3 #ST04-DR-BS-40	
23			2016RS3 #ST04-DR-BS-41	
24	73-23-1187	173-20-6802	2016RS3 #ST06-DR-BS-50	330
25			2016RS3 #ST06-DR-BS-61	
26			2016RS3 #ST06-DR-BS-62	
27	73-12-3895	169-20-5906	2016RS3 #ST07-DR-BS-29	297
28			2016RS3 #ST07-DR-BS-30	
29			2016RS3 #ST07-DR-BS-31	
30	71-49-0810	171-53-2324	2016RS3 #ST08-DR-BS-46	495
31	71-28-5662	170-42-9551	2016RS3 #ST09-DR-BS-68	151
32			2016RS3 #ST09-DR-BS-69	
33			2016RS3 #ST09-DR-BS-70	
34			2016RS3 #ST09-DR-BS-71	
35			2016RS3 #ST09-DR-BS-72	
36			2016RS3 #ST09-DR-BS-73	
37			2016RS3 #ST09-DR-BS-74	
38			2016RS3 #ST09-DR-BS-75	
39			2016RS3 #ST09-DR-BS-76	
40			2016RS3 #ST09-DR-BS-77	
41			2016RS3 #ST09-DR-BS-78	
42			2016RS3 #ST09-DR-BS-79	
43			2016RS3 #ST09-DR-BS-80	

## (2) 미생물의 분리

채취된 해양생물시료는 일정량을 무균적으로 채취하여 멸균된 막자사발을 이용하여 균질화하였으며 멸균된 해수를 이용하여 연속희석(10 fold dilution method)하여 아래의

Table 3-2와 같이 총 5종의 고형배지에 도말하여 10°C에서 10~30일간 배양하였다.

Table 3-2. 해양미생물 분리를 위한 배지 조성

Medium 1	Medium 2	Medium 3
<b>Marine agar</b>	ISP 2(부영양배지)	ISP4(빈영양배지)
Peptone 5g	Yeast extract 3g	soluble starch 10g
Yeast extract 1g	Malt extract 10g	Diphotassium phosphate 1g
FePO <sub>4</sub> 10mg	Dextrose 4g	MgSO <sub>4</sub> 1g
Aged seawater 1L	Aged seawater 1L	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1g
Agar 15g	Agar 20g	Calcium carbonate 1g
		Ferrous sulfate 1mg
		MgCl <sub>2</sub> 1mg
		Zinc sulfate 1mg
		Aged seawater 1L
		Agar 20g
Medium 4	Medium 5	
<b>YPG (부영양배지)</b>	<b>GYA (빈영양배지)</b>	
Yeast extract 5g	Yeast extract 3g	
Peptone 5g	Glucose 1g	
Glucose 10g	Aged seawater 1L	
Aged seawater 1L	Agar 20g	
Agar 20g		

배양된 plate로부터 미생물은 시료별 colony의 형태, 색을 기준으로 순수분리 하였다.

이후 순수배양체는 10% glycerol 용액에 부유하여 -80°C 초저온냉동고에 보존하였다.

### (3) 해양생물유래 공생미생물의 추출물 제조

분리된 미생물중 이차대사산물의 빈도가 높은 진균을 대상으로 대량배양을 진행하였다. 배지는 해수가 첨가된 PDA배지를 이용하여 plate (90mmx15mm) 및 편박 플라스크를 이용하여 10°C에서 7~30일 배양하였다 (균의 종에 따라 차이가 있음).

배양후 ethyl acetate를 이용하여 추출하였으며 이후 여과한 후 진공농축기를 이용하여 용매를 제거하여 조추출물을 확보하였다. 추출과정의 대략적인 흐름은 아래의 그림과 같다 (Fig. 3-1).



Fig. 3-1. 추출물 제작을 위한 흐름도

농축된 시료는 계량하여 무게를 기록하였으며 이후 실험에 이용되기 까지 냉장보관하였다. 대사체/신규물질연구를 위해 공동연구팀에게 시료를 제공하였으며 대사체 및 신규물질의 가능성이 높은 시료는 대량배양을 통하여 추가적인 추출물을 제작하여 제공하였다.

#### (가) 남극 로스해 유래 박테리아 추출물

남극 로스해 해역으로부터 분리된 해양미생물 시료로부터 추출물을 확보하였다.

- ① 분리된 미생물 박테리아를 대상으로 소량 배양 (50 mL)을 진행하였다. MB배지와 SZB배지를 이용하여 100 mL 삼각 플라스크에 50 mL씩 배양하였고, 15°C에서 7 ~ 14일 shaker 배양하였다.
- ② 배양 후 Ethyl acetate 50 mL을 이용하여 추출하였으며, 이후 여과한 후 농축하여 용매를 제거해 추출물을 확보하였다.
- ③ 농축된 시료는 계량하여 무게를 기록하였으며, 이후 실험에 이용되기까지 4°C에서 냉장보관 하였다.

#### (나) 남극 로스해 산호 공생미생물 추출물

남극 로스해 해역으로부터 채집된 붉은 산호에서 분리된 공생미생물 시료로부터 추출물을 확보하였다.

- ① 분리된 미생물 박테리아를 대상으로 소량 배양 (50 mL)을 진행하였다. MB배지, ZB배지, R2A배지, NB배지를 이용하여 100 mL 삼각 플라스크에 50 mL씩 배양하였고, 15°C에서 14 ~ 30일 shaker 배양하였다.
- ② 배양 후 동량의 Ethyl acetate 50 mL을 이용하여 추출하였으며, 이후 여과한 후 농

축하여 용매를 제거해 추출물을 확보하였다.

- ③ 농축된 시료는 계량하여 무게를 기록하였으며, 이후 실험에 이용되기까지 4°C에서 냉장보관 하였다.

#### (5) 조추출물의 생리활성측정

생리활성은 각종 질병치료의 분자표적으로 인식되는 탈인산화 효소 (PTP1B)를 이용한 항당뇨관련 활성 검색법을 1차 스크리닝의 방법으로 적용하여 각 추출물에 대한 활성을 검토하고 그 결과를 토대로 향후 적용할 생리활성 평가법을 결정하였다. 또한 얻어진 자료는 추출물과 함께 DB를 구축하였다.

**PTP1B분석:** PTP1B는 BIOMOL International LP에서 구입하였다. 효소활성은 p-nitrophenyl phosphate (pNPP)를 사용하여 측정하였다 (Na et al., 2007). 각각의 96 well plate에 2 mM pNPP와 50 mM citrate (pH 6.0), 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, and 1 mM dithiothreitol (DTT)를 포함하는 완충용액을 100uL첨가한 후 시료 (0.3~30ug/ml)를 첨가하였으며 대조구는 시료대신 시료용해액을 첨가하였다. 이 후 3 7°C 배양기에서 30분 동안 반응시킨다. 10M NaOH를 넣어 반응을 종결시켰다. 생산된 p-nitrophenol의 양을 405nm의 흡광도에서 측정하였다.

#### (6) 미생물동정을 위한 분자생물학적 분류

##### (가) 분리균주를 대상으로 2개의 온도에서 성장특성 분석

분리된 세균과 진균은 각각 2장의 Marine agar와 PDA agar 배지에 도말한 후 5, 10, 25°C 배양기에서 배양한 후 일정 기간간격으로 성장여부를 확인하여 기록하였다. 이를 통하여 저온성균주와 내냉성 및 저온균주 여부를 판정하였다.

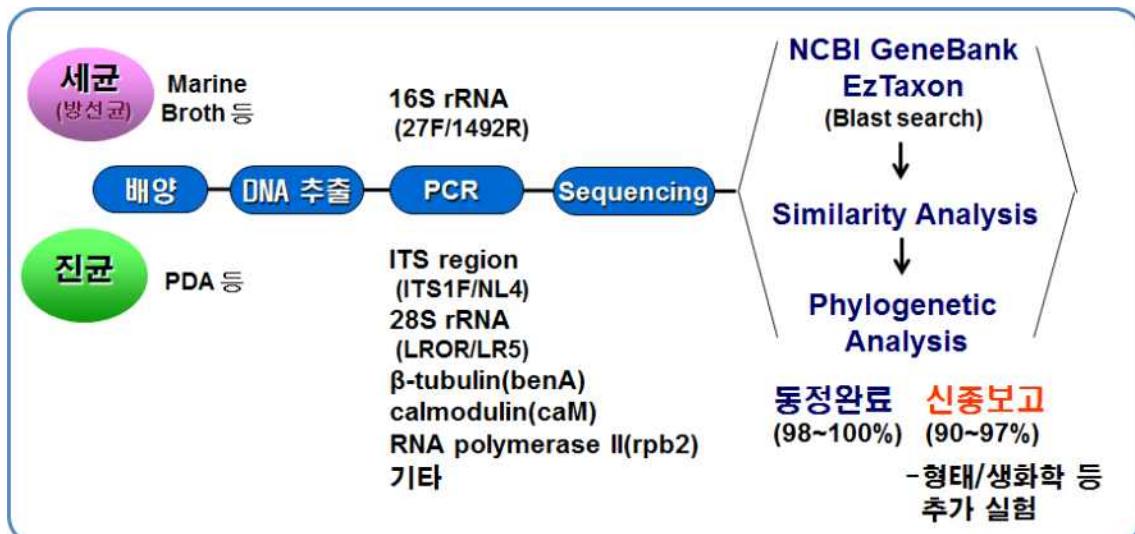


Fig. 3-2. 미생물 동정 흐름도

#### (나) 세균 (16S rDNA 염기서열분석)

16S rDNA는 16S rDNA primer, 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'; *Escherichia coli* nucleotide 8~27) 와 1518R (5'-AAG GAG GTG ATC CAN CCR CA-3'; *Escherichia coli* nucleotide 1541~1522) (Giovannoni, 1991)을 사용하여 PCR에 의해 genomic DNA로부터 증폭하였다. PCR 산물은 전기영동 (0.8% agarose)에 의해 DNA가 증폭되었음을 확인하였다. 16S rDNA는 자동염기서열장치를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 16S rDNA 염기서열의 분석은 National Center Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)(Altschul et al., 1990)로부터 얻어진 분류군의 염기서열을 이용하여 서열화하였으며 Phylogenetic Interference Package (PHYLIP) (Felsenstein, 1993)로 서열 데이터를 분석하기 위해 사용되었다. Phylogenetic tree는 neighbour-joining (Saitou & Nei, 1987)방법을 이용하였으며, Evolutionary distances matrices는 Jukes & Cantor (1969)모델에 따라 작성되었다. neighbour-joining tree topology는 1000 resampling에 기초한 bootstrap analysis (Felsenstein, 1985)에 의해 평가되었다.

#### (다) 진균 (28S rDNA 염기서열분석)

균류는 액체질소를 이용한 gliding 방법을 이용하여 세포를 파쇄한 후 DNA분리키트를 이용하여 genomic DNA를 분리하였으며 partial 28S rDNA 염기서열은 LR0R (ACCCGCTGAACCTTAAGC; 26~42)과 LR5(TCCTGAGGGAAACTTCG; 964~948)을 그리고 ITS(ITS1-5.8S-ITS2)는 ITS1F (5'-CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA)과 NL4(5'-GGTCCGTGTTCAAGACGG)을 사용하여 PCR에 의해 genomic DNA로부터 증폭하였다. PCR 산물은 전기영동 (0.8% agarose)에 의해 DNA가 증폭되었음을 확인하였다. 28S rDNA는 자동염기서열장치를 이용하여 염기서열을 결정하였다. ITS 및 28S rDNA 염기서열의 분석은 National Center Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)로부터 얻어진 분류군의 염기서열을 이용하여 서열화하였으며 Phylogenetic Interference Package (PHYLIP) (Felsenstein, 1993)로 서열 데이터를 분석하기 위해 사용되었다. Phylogenetic tree는 neighbour-joining (Saitou & Nei, 1987)방법을 이용하였으며, Evolutionary distances matrices는 Jukes & Cantor (1969)모델에 따라 작성되었다. Neighbour-joining tree topology는 1000 resampling에 기초한 bootstrap analysis (Felsenstein, 1985)에 의해 평가되었다.

### (7) 남극 로스해 추출물 database 작성

추출물 관리를 위한 database는 sample number, research project, origin, site number, import date, method, sample ID, sample type, amount (mg), extract solvent, organization, storage place, operator, stock date, storage name, MS data code, barcode, release organization, date discarded, notes 등 총 20 개 항목으로 구성되어 있다.

## 다. 연구 결과

### (1) 양극해 해양생물유래 공생미생물의 분리 및 보존

극지시료 (Table 3-1)를 5종의 분리배지에 도말하여 배양하였으며 이중 균체의 특성에 따라 1차로 세균과 진균을 분리하였고 필요에 따라 2~3차에 걸쳐 순수배양체를 확보하였다. 순수배양체인 세균 73균주와 진균 52균주는 glycerol stock하여 -80°C에 보존하였다 (Table 3-3, 3-4).

Table 3-3. 극지 환경으로부터 진균의 분리

No.	시료명	분리 배지	부여 번호	Stock		No.	시료명	분리 배지	부여 번호	Stock	
				개수	날짜					개수	날짜
1	2016RS3 #ST01-DR-BS-44	YPG	SF-7237	4	16.09.05	27	2016RS3 #ST09-DR-BS-68	PDA	SF-7263	4	16.09.13
2	2016RS3 #ST01-DR-BS-49	PDA	SF-7238	4	16.09.05	28	2016RS3 #ST01-DR-BS-47	PDA	SF-7264	4	16.09.20
3	2016RS3 #ST09-DR-BS-72	PDA	SF-7239	4	16.09.05	29	2016RS3 #ST01-DR-BS-47	PDA	SF-7265	4	16.09.20
4	2016RS3 #ST08-DR-BS-46	Zobell	SF-7240	4	16.09.05	30	2016RS3 #ST06-DR-BS-62	GYA	SF-7266	4	16.09.20
5	2016RS3 #ST09-DR-BS-70	PDA	SF-7241	4	16.09.05	31	2016RS3 #ST01-DR-BS-35	PDA	SF-7267	4	16.09.20
6	2016RS3 #ST09-DR-BS-76	YPG	SF-7242	4	16.09.05	32	2016RS3 #ST01-DR-BS-44	Zobell	SF-7268	4	16.09.20
7	2016RS3 #ST09-DR-BS-80	PDA	SF-7243	4	16.09.05	33	2016RS3 #ST01-DR-BS-35	PDA	SF-7269	4	16.09.20
8	2016RS3 #ST08-DR-BS-46	Zobell	SF-7244	4	16.09.05	34	2016RS3 #ST01-DR-BS-44	Zobell	SF-7270	4	16.09.20
9	2016RS3 #ST01-DR-BS-44	PDA	SF-7245	4	16.09.05	35	2016RS3 #ST09-DR-BS-79	PDA	SF-7271	4	16.09.20
10	2016RS3 #ST01-DR-BS-39	PDA	SF-7246	4	16.09.05	36	2016RS3 #ST01-DR-BS-48	PDA	SF-7272	4	16.09.20
11	2016RS3 #ST01-DR-BS-39	Zobell	SF-7247	4	16.09.05	37	2016RS3 #ST01-DR-BS-47	YPG	SF-7273	4	16.09.20
12	2016RS3 #ST04-DR-BS-5	YPG	SF-7248	4	16.09.05	38	2016RS3 #ST09-DR-BS-72	GYA	SF-7274	4	16.09.20
13	2016RS3 #ST09-DR-BS-76	YPG	SF-7249	4	16.09.06	39	2016RS3 #ST06-DR-BS-62	GYA	SF-7275	4	16.09.22
14	2016RS3 #ST01-DR-BS-35	PDA	SF-7250	4	16.09.06	40	2016RS3 #ST04-DR-BS-41	PDA	SF-7276	4	16.09.22
15	2016RS3 #ST01-DR-BS-44	Zobell	SF-7251	4	16.09.06	41	2016RS3 #ST01-DR-BS-47	YPG	SF-7277	4	16.09.22
16	2016RS3 #ST01-DR-BS-36	PDA	SF-7252	4	16.09.06	42	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	YPG	SF-7278	4	16.09.22
17	2016RS3 #ST01-DR-BS-30	YPG	SF-7253	4	16.09.06	43	2016RS3 #ST07-DR-BS-30	Zobell	SF-7279	4	16.10.07

No.	시료명	분리 배지	부여 번호	Stock		No.	시료명	분리 배지	부여 번호	Stock	
				개수	날짜					개수	날짜
18	2016RS3 #ST09-DR-BS-70	YPG	SF-7254	4	16.09.06	44	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	PDA	SF-7280	4	16.10.07
19	2016RS3 #ST09-DR-BS-80	YPG	SF-7255	4	16.09.06	45	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	PDA	SF-7281	4	16.10.07
20	2016RS3 #ST01-DR-BS-35	PDA	SF-7256	4	16.09.06	46	2016RS3 #ST07-DR-BS-30	YPG	SF-7282	4	16.10.07
21	2016RS3 #ST01-DR-BS-47	PDA	SF-7257	4	16.09.06	47	2016RS3 #ST01-DR-BS-57	YPG	SF-7283	4	16.10.07
22	2016RS3 #ST01-DR-BS-35	PDA	SF-7258	4	16.09.06	48	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	PDA	SF-7284	4	16.10.07
23	2016RS3 #ST07-DR-BS-30	YPG	SF-7259	4	16.09.13	49	2016RS3 #ST01-DR-BS-57	YPG	SF-7285	4	16.10.07
24	2016RS3 #ST09-DR-BS-71	PDA	SF-7260	4	16.09.13	50	2016RS3 #ST01-DR-BS-55	PDA	SF-7286	4	16.10.07
25	2016RS3 #ST01-DR-BS-30	GYA	SF-7261	4	16.09.13	51	2016RS3 #ST07-DR-BS-31	YPG	SF-7287	4	16.10.07
26	2016RS3 #ST01-DR-BS-47	PDA	SF-7262	4	16.09.13	52	2016RS3 #ST01-DR-BS-48	GYA	SF-7288	4	16.10.07

Table 3-4. 극지 환경으로부터 세균의 분리

No.	시료 No	분리 배지	부여 번호	Stock		No.	시료 No	분리배 지	부여 번호	Stock	
				개수	날짜					개수	날짜
1	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	Zobelle	SB-3534	4	16.10.14	38	2016RS3 #ST04-DR-BS-5	GYA	SB-3571	4	16.10.21
2	2016RS3 #ST09-DR-BS-72	Zobelle	SB-3535	4	16.10.14	39	2016RS3 #ST08-DR-BS-46	Zobelle	SB-3572	4	16.10.21
3	2016RS3 #ST09-DR-BS-72	Zobelle	SB-3536	4	16.10.14	40	2016RS3 #ST09-DR-BS-76	Zobelle	SB-3573	4	16.10.21
4	2016RS3 #ST04-DR-BS-40	YPG	SB-3537	4	16.10.14	41	2016RS3 #ST04-DR-BS-40	PDA	SB-3574	4	16.10.21
5	2016RS3 #ST04-DR-BS-40	Zobelle	SB-3538	4	16.10.14	42	2016RS3 #ST09-DR-BS-68	Zobelle	SB-3575	4	16.10.21
6	2016RS3 #ST04-DR-BS-40	Zobelle	SB-3539	4	16.10.14	43	2016RS3 #ST04-DR-BS-5	GYA	SB-3576	4	16.10.21
7	2016RS3 #ST09-DR-BS-68	YPG	SB-3540	4	16.10.14	44	2016RS3 #ST08-DR-BS-46	Zobelle	SB-3577	4	16.10.21
8	2016RS3 #ST09-DR-BS-68	Zobelle	SB-3541	4	16.10.14	45	2016RS3 #ST01-DR-BS-47	Zobelle	SB-3578	4	16.10.21
9	2016RS3 #ST09-DR-BS-74	Zobelle	SB-3542	4	16.10.14	46	2016RS3 #ST01-DR-BS-47	Zobelle	SB-3579	4	16.10.21
10	2016RS3 #ST09-DR-BS-74	Zobelle	SB-3543	4	16.10.14	47	2016RS3 #ST09-DR-BS-76	Zobelle	SB-3580	4	16.10.21
11	2016RS3 #ST09-DR-BS-68	PDA	SB-3544	4	16.10.20	48	2016RS3 #ST01-DR-BS-21	Zobelle	SB-3581	4	16.10.21
12	2016RS3 #ST04-DR-BS-40	YPG	SB-3545	4	16.10.20	49	2016RS3 #ST01-DR-BS-39	Zobelle	SB-3582	4	16.10.21
13	2016RS3 #ST01-DR-BS-44	GYA	SB-3546	4	16.10.20	50	2016RS3 #ST01-DR-BS-39	Zobelle	SB-3583	4	16.10.21
14	2016RS3 #ST04-DR-BS-40	Zobelle	SB-3547	4	16.10.20	51	2016RS3 #ST01-DR-BS-21	Zobelle	SB-3584	4	16.10.21
15	2016RS3 #ST04-DR-BS-40	YPG	SB-3548	4	16.10.20	52	2016RS3 #ST07-DR-BS-29	PDA	SB-3585	4	16.10.21
16	2016RS3 #ST01-DR-BS-39	YPG	SB-3549	4	16.10.20	53	2016RS3 #ST01-DR-BS-54	Zobelle	SB-3586	4	16.10.22
17	2016RS3 #ST09-DR-BS-74	PDA	SB-3550	4	16.10.20	54	2016RS3 #ST01-DR-BS-39	Zobelle	SB-3587	4	16.10.22
18	2016RS3 #ST09-DR-BS-74	PDA	SB-3551	4	16.10.20	55	2016RS3 #ST04-DR-BS-7	PDA	SB-3588	4	16.10.22
19	2016RS3 #ST08-DR-BS-46	Zobelle	SB-3552	4	16.10.20	56	2016RS3 #ST09-DR-BS-69	PDA	SB-3589	4	16.10.24

No.	시료 No	분리 배지	부여 번호	Stock		No.	시료 No	분리 배지	부여 번호	Stock	
				개수	날짜					개수	날짜
20	2016RS3 #ST01-DR-BS-44	PDA	SB-3553	4	16.10.20	57	2016RS3 #ST09-DR-BS-73	Zobelle	SB-3590	4	16.10.24
21	2016RS3 #ST08-DR-BS-46	GYA	SB-3554	4	16.10.20	58	2016RS3 #ST01-DR-BS-56	Zobelle	SB-3591	4	16.10.24
22	2016RS3 #ST07-DR-BS-31	PDA	SB-3555	4	16.10.20	59	2016RS3 #ST01-DR-BS-56	Zobelle	SB-3592	4	16.10.24
23	2016RS3 #ST01-DR-BS-57	Zobelle	SB-3556	4	16.10.20	60	2016RS3 #ST01-DR-BS-55	Zobelle	SB-3593	4	16.10.24
24	2016RS3 #ST01-DR-BS-39	Zobelle	SB-3557	4	16.10.20	61	2016RS3 #ST09-DR-BS-69	GYA	SB-3594	4	16.10.24
25	2016RS3 #ST04-DR-BS-41	YPG	SB-3558	4	16.10.20	62	2016RS3 #ST09-DR-BS-71	Zobelle	SB-3595	4	16.10.24
26	2016RS3 #ST09-DR-BS-68	GYA	SB-3559	4	16.10.20	63	2016RS3 #ST09-DR-BS-71	GYA	SB-3596	4	16.10.24
27	2016RS3 #ST09-DR-BS-72	PDA	SB-3560	4	16.10.21	64	2016RS3 #ST01-DR-BS-46	GYA	SB-3597	4	16.10.27
28	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	Zobelle	SB-3561	4	16.10.21	65	2016RS3 #ST01-DR-BS-54	YPG	SB-3598	4	16.10.27
29	2016RS3 #ST01-DR-BS-39	Zobelle	SB-3562	4	16.10.21	66	2016RS3 #ST07-DR-BS-30	GYA	SB-3599	4	16.10.27
30	2016RS3 #ST01-DR-BS-39	YPG	SB-3563	4	16.10.21	67	2016RS3 #ST01-DR-BS-54	GYA	SB-3600	4	16.10.27
31	2016RS3 #ST09-DR-BS-76	PDA	SB-3564	4	16.10.21	68	2016RS3 #ST01-DR-BS-56	GYA	SB-3601	4	16.10.27
32	2016RS3 #ST09-DR-BS-76	Zobelle	SB-3565	4	16.10.21	69	2016RS3 #ST01-DR-BS-54	YPG	SB-3602	4	16.10.27
33	2016RS3 #ST09-DR-BS-80	GYA	SB-3566	4	16.10.21	70	2016RS3 #ST04-DR-BS-5	GYA	SB-3603	4	16.10.27
34	2016RS3 #ST01-DR-BS-21	Zobelle	SB-3567	4	16.10.21	71	2016RS3 #ST01-DR-BS-54	YPG	SB-3604	4	16.10.27
35	2016RS3 #ST01-DR-BS-54	Zobelle	SB-3568	4	16.10.21	72	2016RS3 #ST01-DR-BS-54	GYA	SB-3605	4	16.10.27
36	2016RS3 #ST01-DR-BS-54	GYA	SB-3569	4	16.10.21	73	2016RS3 #ST01-DR-BS-54	Zobelle	SB-3606	4	16.10.27
37	2016RS3 #ST07-DR-BS-31	GYA	SB-3570	4	16.10.21						

## (2) 극지생물 유래 미생물의 추출물 확보 연구

분리된 진균은 대량배양 및 ethyl acetate 용매추출을 통하여 52균주에 대한 추출물 제조를 완료하였고 (Table 3-5), 본 연구팀이 생리활성검색에 사용된 시료 외에는 자체적으로 DB를 구축하여 보존하고 있다.

Table 3-5. 극지생물 유래 미생물(진균)의 추출물 제조 결과

	Strain No.	Extracts(mg)		Strain No.	Extracts(mg)
1	SF-7237	2.9	27	SF-7263	3.9
2	SF-7238	5.0	28	SF-7264	2.3
3	SF-7239	2.2	29	SF-7265	3.2
4	SF-7240	2.7	30	SF-7266	32.8
5	SF-7241	11.9	31	SF-7267	2.8
6	SF-7242	3.8	32	SF-7268	13.8

	Strain No.	Extracts(mg)		Strain No.	Extracts(mg)
7	SF-7243	3.5	33	SF-7269	4.7
8	SF-7244	3.1	34	SF-7270	41.3
9	SF-7245	3.9	35	SF-7271	1.6
10	SF-7246	3.5	36	SF-7272	4.2
11	SF-7247	2.8	37	SF-7273	49.2
12	SF-7248	15.5	38	SF-7274	0.3
13	SF-7249	6.7	39	SF-7275	20.8
14	SF-7250	0.6	40	SF-7276	7.7
15	SF-7251	2.6	41	SF-7277	17.8
16	SF-7252	4.4	42	SF-7278	77.7
17	SF-7253	3.7	43	SF-7279	5.8
18	SF-7254	5.4	44	SF-7280	4.0
19	SF-7255	5.7	45	SF-7281	6.1
20	SF-7256	8.3	46	SF-7282	6.4
21	SF-7257	5.1	47	SF-7283	6.6
22	SF-7258	9.1	48	SF-7284	3.2
23	SF-7259	6.9	49	SF-7285	6.4
24	SF-7260	16.2	50	SF-7286	6.0
25	SF-7261	5.2	51	SF-7287	5.1
26	SF-7262	1.5	52	SF-7288	7.3

### (3) 생리활성검증

PTP1B 저해활성에 의한 항당뇨 검색: 진균추출물을 대상으로 항당뇨 질병의 분자표적으로 인식되는 탈인산화효소인 PTP1B (Protein tyrosine phosphatase 1B)를 저해하는 *in vitro* assay를 수행하였으며 이를 통하여 진균 추출물의 항당뇨 저해능력을 평가하였다. 해양미생물인 진균으로부터 얻어진 추출물에 대한 PTP1B 저해활성은 총 52균주의 시료를 대상으로 조사하였으며 그 중 추출물의 농도를 0.3 ug/ml 수준에서 50%이상 PTP1B 저해활성을 보인 시료는 총 6균주로 나타났다 (Table 3-6). 0.3 ug/ml의 농도로 추출물을 처리하였을 때 PTP1B 저해활성은 SF-7278과 SF-7272균주가 78.12%와 70.24%로 가장 높은 활성을 보였다. 그 다음으로 SF-7276균주가 65.07% 그리고 SF-7283, SF-7287, SF-7288균주가 각각 56.82%, 55.70%, 54.15%로 나타났다. 3 ug/ml의 농도로 추출물을 처리하였을 때 PTP1B 저해활성이 70%이상을 나타낸 시료는 총 46균주로 나타났다.

Table 3-6. 확보된 EA 추출물에 대한 1차적 항당뇨 활성 검색 목록

(unit: inhibition(%))

No.	Sample ID	Conc.( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )			No.	Sample ID	Conc.( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		
		0.3	3	10			0.3	3	10
1	SF-7237	29.01	99.44	100.42	27	SF-7263	15.52	99.04	98.74
2	SF-7238	4.01	98.95	99.12	28	SF-7264	-2.99	99.37	99.55
3	SF-7239	17.05	100.32	100.18	29	SF-7265	19.64	99.65	100.13
4	SF-7240	11.41	98.39	99.45	30	SF-7266	2.50	75.15	100.13
5	SF-7241	39.87	97.93	100.69	31	SF-7267	9.92	99.87	99.61
6	SF-7242	35.73	91.21	100.41	32	SF-7268	40.66	99.82	100.37
7	SF-7243	18.15	95.32	100.39	33	SF-7269	13.85	98.48	99.24
8	SF-7244	17.95	97.69	99.67	34	SF-7270	6.12	62.78	99.55
9	SF-7245	7.79	95.09	99.63	35	SF-7271	30.28	99.52	99.88
10	SF-7246	-0.05	80.32	99.56	36	SF-7272	<b>70.24</b>	100.09	100.15
11	SF-7247	8.57	95.64	100.15	37	SF-7273	27.35	99.16	99.74
12	SF-7248	10.28	99.94	100.12	38	SF-7274	14.95	99.74	99.08
13	SF-7249	8.91	26.08	99.91	39	SF-7275	12.30	69.76	100.95
14	SF-7250	11.97	90.51	99.61	40	SF-7276	<b>65.07</b>	99.83	100.27
15	SF-7251	5.08	26.80	100.38	41	SF-7277	19.96	93.90	99.51
16	SF-7252	16.55	99.62	99.50	42	SF-7278	<b>78.12</b>	98.92	98.97
17	SF-7253	17.55	99.82	100.36	43	SF-7279	9.93	99.75	99.82
18	SF-7254	23.15	98.57	99.77	44	SF-7280	13.93	98.97	99.77
19	SF-7255	20.00	99.87	100.84	45	SF-7281	27.55	99.27	99.39
20	SF-7256	3.43	62.46	99.60	46	SF-7282	32.65	99.19	99.35
21	SF-7257	22.84	97.95	99.92	47	SF-7283	<b>56.82</b>	100.02	100.19
22	SF-7258	11.52	95.64	99.88	48	SF-7284	5.55	99.01	100.10
23	SF-7259	38.16	99.92	100.96	49	SF-7285	5.24	99.69	99.88
24	SF-7260	7.36	14.36	99.69	50	SF-7286	40.59	99.32	99.03
25	SF-7261	40.43	83.42	99.93	51	SF-7287	<b>55.70</b>	99.52	99.79
26	SF-7262	29.71	95.44	100.53	52	SF-7288	<b>54.15</b>	99.50	99.62

## (4) 미생물동정을 위한 분자생물학적 분류

## (가) 극지미생물의 성장온도 평가

극지로부터 분리된 73종의 세균을 대상으로 5, 10, 15°C에서 성장특성을 조사하였으며, 이 중 18균주가 15~5°C에서 성장이 가능한 우수한 내냉성 균주로 판단된다 (Table

3-7). 또한 16균주는 5°C와 20°C보다는 10°C에서 성장이 뛰어나 저온성균주로 판단되며 성장특성에 대한 추가적인 조사가 필요할 것으로 판단된다.

Table 3-7. 세균의 온도별 성장특성

균주번호	균주번호	배양온도				균주번호	배양온도		
		15°C	10°C	5°C			15°C	10°C	5°C
1	SB-3534	+++	+++	+++	38	SB-3571	+++	++	+
2	SB-3535	+++	+++	+++	39	SB-3572	+++	+++	-
3	SB-3536	+++	+++	+++	40	SB-3573	+++	+++	+++
4	SB-3537	+++	+++	+++	41	SB-3574	++	+++	+
5	SB-3538	+++	+++	+++	42	SB-3575	+++	+++	+++
6	SB-3539	+++	+++	+++	43	SB-3576	+++	+++	-
7	SB-3540	+++	+++	+	44	SB-3577	+++	+	-
8	SB-3541	+++	+++	+++	45	SB-3578	+++	+++	+
9	SB-3542	+++	+++	+++	46	SB-3579	++	+++	-
10	SB-3543	+++	+++	+++	47	SB-3580	+++	++	-
11	SB-3544	++	+++	+	48	SB-3581	++	+	-
12	SB-3545	++	+++	+	49	SB-3582	+++	++	+
13	SB-3546	+++	+++	+	50	SB-3583	+++	++	+
14	SB-3547	++	+	-	51	SB-3584	++	+++	-
15	SB-3548	++	+++	+	52	SB-3585	+	+++	-
16	SB-3549	++	+++	+	53	SB-3586	++	+++	-
17	SB-3550	+++	++	+	54	SB-3587	+++	++	-
18	SB-3551	++	+++	+	55	SB-3588	++	+	+
19	SB-3552	++	+++	+	56	SB-3589	+++	+++	+++
20	SB-3553	+++	++	-	57	SB-3590	+++	+++	+++
21	SB-3554	++	+++	-	58	SB-3591	+++	+++	+++
22	SB-3555	+++	++	+	59	SB-3592	++	++	-
23	SB-3556	+++	++	-	60	SB-3593	+++	++	-
24	SB-3557	++	+++	+	61	SB-3594	+++	+++	+++
25	SB-3558	+++	++	+	62	SB-3595	+++	+++	+++
26	SB-3559	+++	++	+	63	SB-3596	++	+++	+
27	SB-3560	++	+++	+	64	SB-3597	++	++	-
28	SB-3561	+++	++	+	65	SB-3598	+++	++	-
29	SB-3562	+++	++	+	66	SB-3599	+++	++	-
30	SB-3563	+++	+++	+++	67	SB-3600	+	-	-
31	SB-3564	+++	+++	+++	68	SB-3601	+	++	-
32	SB-3565	+++	+++	-	69	SB-3602	+++	+	-
33	SB-3566	+++	++	+	70	SB-3603	+++	+	-
34	SB-3567	+++	+++	-	71	SB-3604	+++	++	-
35	SB-3568	+++	++	+	72	SB-3605	+++	-	-
36	SB-3569	+++	+++	-	73	SB-3606	+	+	-
37	SB-3570	+++	++	+					

극지로부터 분리된 진균을 대상으로 5, 10, 20°C에서의 성장특성을 조사하였으며, 이 중 9균주가 20°C와 비교하여 10°C에서 동일한 성장특성을 보여 우수한 내냉성 균주로 판단된다. 또한 세균과 비교하여 저온성균주는 검출되지 않았다. 대부분의 균주는 10°C에서 성장이 가능하나 5°C에서 다소 더디지만 성장하는 균주는 29종으로 확인되었다. 특히 이 균주는 내냉성이 높은 것으로 판단된다 (Table 3-8).

Table 3-8. 진균의 온도별 성장특성

	균주번호	배양온도				균주번호	배양온도		
		20°C	10°C	5°C			20°C	10°C	5°C
1	SF-7237	+++	+++	++	27	SF-7263	++	+	-
2	SF-7238	+++	+++	+	28	SF-7264	+++	++	-
3	SF-7239	+++	++	+	29	SF-7265	+++	+++	++
4	SF-7240	+++	+++	+	30	SF-7266	+++	+++	-
5	SF-7241	+++	+	-	31	SF-7267	+++	++	+
6	SF-7242	+++	+++	+	32	SF-7268	+++	+	-
7	SF-7243	+++	++	+	33	SF-7269	+++	++	+
8	SF-7244	+++	+++	++	34	SF-7270	+++	++	+
9	SF-7245	+++	+++	++	35	SF-7271	+++	++	+
10	SF-7246	nt*	++	+	36	SF-7272	+++	++	+
11	SF-7247	nt	++	-	37	SF-7273	+++	++	+
12	SF-7248	+++	++	+	38	SF-7274	+++	++	+
13	SF-7249	+++	++	+	39	SF-7275	+++	++	-
14	SF-7250	+++	+++	+	40	SF-7276	+++	++	+
15	SF-7251	+++	++	+	41	SF-7277	+++	++	+
16	SF-7252	+++	++	+	42	SF-7278	+++	+	-
17	SF-7253	+++	++	+	43	SF-7279	+++	+	-
18	SF-7254	+++	++	+	44	SF-7280	+++	++	-
19	SF-7255	+++	++	+	45	SF-7281	++	+	-
20	SF-7256	+++	++	+	46	SF-7282	+++	++	-
21	SF-7257	+++	+	-	47	SF-7283	+++	++	-
22	SF-7258	+++	++	-	48	SF-7284	nt	nt	nt
23	SF-7259	+++	+	-	49	SF-7285	+++	++	-
24	SF-7260	+++	+	-	50	SF-7286	+++	++	-
25	SF-7261	+++	+	+	51	SF-7287	+++	++	-
26	SF-7262	++	+	-	52	SF-7288	+++	++	-

## (나) 극지 진균의 동정

총 52개 분리진균을 대상으로 ITS영역의 염기서열을 결정한 후 NCBI BLAST 및 EzTaxon 프로그램을 이용하여 유사도가 높은 균주를 선발한 후 PHYDIT 프로그램을 이용하여 ClustalW alignment를 수행하여 유사도를 분석하였다. 그 결과 12개의 genus 가 확인되었으며 속내의 분리종은 *Cladosporium* 속(23), *Penicillium* 속(16), *Aspergillus* 속(3), *Engyodontium* 속(2), *Epicoccum* 속(1), *Peniophoral* 속(1), *Pseudocercosporaella* 속(1), *Talaromyces* 속(1), *Acremonium* 속(1), *Acrodontium* 속(1), *Ustilago* 속(1), *Pithomyces* 속(1)의 순으로 나타났다 (Table 3-9, Fig. 3-3).

Table 3-9. 추출물 제작된 이용된 진균의 ITS 동정결과

	Strain No	Closest relative	Similarity(%)
1	SF-7237	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100
2	SF-7238	<i>Penicillium rubens</i>	100
3	SF-7239	<i>Cladosporium oxysporum</i>	99.79
4	SF-7240	<i>Ustilago nuda</i>	100
5	SF-7241	<i>Aspergillus awamori</i> (JX500083), <i>Asp. foetidus</i> (FJ537131)	100
6	SF-7242	<i>Penicillium purpurascens</i> (AF033408), <i>P. lapidosum</i> (AF033409)	100
7	SF-7243	<i>Cladosporium tenuissimum</i> (JX310566), <i>Cladosporium lycoperdinum</i> (HM148113)	100
8	SF-7244	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100
9	SF-7245	<i>Cladosporium silenes</i>	100
10	SF-7246	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100
11	SF-7247	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	99.58
12	SF-7248	<i>Cladosporium perangustum</i> (HM148132), <i>Cla. phyllactiniicola</i> (HM148151)	100
13	SF-7249	<i>Penicillium rubens</i>	100
14	SF-7250	<i>Cladosporium oxysporum</i>	100
15	SF-7251	<i>Cladosporium inversicolor</i> (HM148104), <i>Cla. tenuissimum</i> (AY545639), <i>Cla. subuliforme</i> (HM148196)	100
16	SF-7252	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (HM999909), <i>Cla. globisporum</i> (HM148096)	100
17	SF-7253	<i>Cladosporium inversicolor</i>	100
18	SF-7254	<i>Cladosporium inversicolor</i>	100
19	SF-7255	<i>Cladosporium oxysporum</i>	99.79
20	SF-7256	<i>Penicillium rubens</i>	100
21	SF-7257	<i>Pithomyces chartarum</i>	100
22	SF-7258	<i>Cladosporium halotolerans</i>	99.79

	Strain No	Closest relative	Similarity(%)
23	SF-7259	<i>Acremonium implicatum</i>	100
24	SF-7260	<i>Engyodontium album</i>	100
25	SF-7261	<i>Engyodontium album</i>	100
26	SF-7262	<i>Acrodontium crateriforme</i>	99.77
27	SF-7263	<i>Pseudocercospora fraxini</i>	99.78
28	SF-7264	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	100
29	SF-7265	<i>Penicillium commune</i>	100
30	SF-7266	<i>Penicillium glabrum</i>	100
31	SF-7267	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100
32	SF-7268	<i>Penicillium cosmopolitanum</i>	99.6
33	SF-7269	<i>Epicoccum nigrum</i>	99.57
34	SF-7270	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100
35	SF-7271	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100
36	SF-7272	<i>Penicillium rubens</i>	100
37	SF-7273	<i>Penicillium herquei</i>	99.8
38	SF-7274	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100
39	SF-7275	<i>Periconia pseudobyssooides</i>	99.15
40	SF-7276	<i>Penicillium rubens</i>	100
41	SF-7277	<i>Cladosporium oxysporum</i>	100
42	SF-7278	<i>Aspergillus glaucus</i>	100
43	SF-7279	<i>Aspergillus versicolor</i>	100
44	SF-7280	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100
45	SF-7281	<i>Talaromyces cecidicola</i>	100
46	SF-7282	<i>Penicillium atrosanguineum</i>	98.42
47	SF-7283	<i>Penicillium rubens</i>	100
48	SF-7284	<i>Peniophora incarnata</i>	99.62
49	SF-7285	<i>Penicillium rubens</i>	100
50	SF-7286	<i>Penicillium rubens</i>	100
51	SF-7287	<i>Penicillium rubens</i>	100
52	SF-7288	<i>Penicillium rubens</i>	100

대부분의 분리된 진균의 유사도는 기준 보고된 종과 98~100%를 나타냈으며 SF-7282 균주의 경우 *Penicillium atrosanguineum*과 98.42%의 가장 낮은 유사도를 나타내었다.

또한 일부의 분리종은 ITS영역의 염기서열만으로는 종수준의 동정이 이루어지질 않아 추가적인 프라이머를 이용한 분석이 필요할 것으로 판단된다.

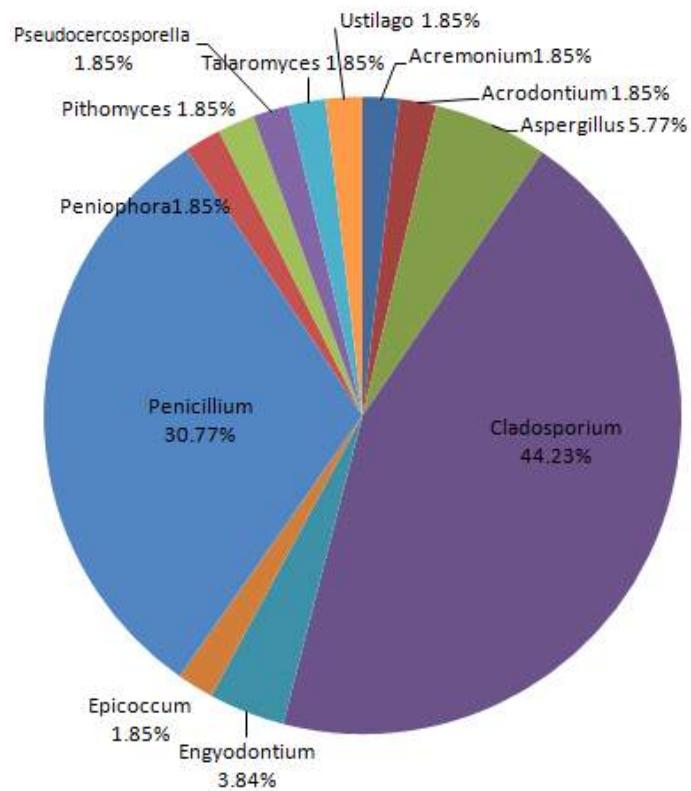


Fig. 3-3. 동정된 진균의 분포

진균의 동정결과 항당뇨 활성이 높은 진균은 *Penicillium rubens*(5)과 *Aspergillus glaucus*(1)로 나타났다. 온도에 대한 저항성이 높은 내냉성 진균은 *Cladosporium* 속 (*C. cladosporioides*(2), *C. oxysporum*, *C. silenes*)이 4종, *Penicillium* 속 (*P. commune*, *P. glabrum*, *P. purpurascens*, *P. rubens*)이 4종 그리고 *Ustilago* 속 (*U. nuda*)이 1종으로 총 3속 8종으로 나타났다. *Penicillium rubens*은 항당뇨 활성이 우수한 내냉성 진균임을 확인할 수 있었다.

##### (5) 남극 로스해 유래 균주 선별 및 추출물 확보

남극 로스해 해역으로 분리된 균주를 선별하여 총 149 균주를 배양하였으며, 배양 불가인 7 균주를 제외한 142 균주에 대해 추출물을 확보하였다. 남극 로스해에서 채집된 붉은 산호에서 분리된 공생미생물 균주를 선별하여 총 12 균주를 배양하였으며, 12 균주 모두에 대해 추출물을 확보하였다. 확보된 총 154개의 추출물을 대상으로 추출물 database를 작성하여 관리하고 있다.

남극 Ross sea 해양미생물 및 공생미생물 추출물 리스트																				
Abbreviations																				
No	Sample No	Research project	Origin	Site No.	Import date	Method	Sample ID	Sample type	Amount (mg)	Extract solvent	Organization	Storage place	Operator	Stock date	Storage name	MS data code	Barcode	Refine organization	Date discarded	Notes
1	KES4494	Ross sea	#ST10	2015. 01	CTD	RS2 #ST10-CTD-B	Bacterial	3.2	EA	Kopri	2621호(자온실)	송진행	2016. 11	#9-A1	KES4494					
2	KES4495	Ross sea	#ST10	2015. 01	CTD	RS2 #ST10-CTD-B	Bacterial	2.8	EA	Kopri	2621호(자온실)	송진행	2016. 11	#9-A2	KES4495					
3	KES4496	Ross sea	#ST10	2015. 01	CTD	RS2 #ST10-CTD-B	Bacterial	2.4	EA	Kopri	2621호(자온실)	송진행	2016. 11	#9-A3	KES4496					
4	KES4497	Ross sea	#ST10	2015. 01	CTD	RS2 #ST10-CTD-B	Bacterial	3	EA	Kopri	2621호(자온실)	송진행	2016. 11	#9-A4	KES4497					
5	KES4498	Ross sea	#ST10	2015. 01	CTD	RS2 #ST10-CTD-B	Bacterial	2.7	EA	Kopri	2621호(자온실)	송진행	2016. 11	#9-A5	KES4498					
6	KES4499	Ross sea	#ST10	2015. 01	CTD	RS2 #ST10-CTD-B	Bacterial	2	EA	Kopri	2621호(자온실)	송진행	2016. 11	#9-A6	KES4499					
7	KES4500	Ross sea	#ST10	2015. 01	CTD	RS2 #ST10-CTD-B	Bacterial	2.1	EA	Kopri	2621호(자온실)	송진행	2016. 11	#9-A7	KES4500					
8	KES4501	Ross sea	#ST10	2015. 01	CTD	RS2 #ST10-CTD-B	Bacterial	3	EA	Kopri	2621호(자온실)	송진행	2016. 11	#9-A8	KES4501			#9-A9		
9	KES4502	Ross sea	#ST10	2015. 01	CTD	RS2 #ST10-CTD-B	Bacterial	X												
10	KES4503	Ross sea	#ST12	2015. 01	CTD	2015K2 #ST12-CTD-S	Bacterial	3	EA	Kopri	2621호(자온실)	송진행	2016. 11	#9-E5	KES4503					
11	KES4504	Ross sea	#ST11	2015. 01	CTD	RS2 #ST11-CTD-B	Bacterial	1.7	EA	Kopri	2621호(자온실)	송진행	2016. 11	#9-E6	KES4504					
12	KES4505	Ross sea	#ST11	2015. 01	CTD	RS2 #ST11-CTD-B	Bacterial	2.3	EA	Kopri	2621호(자온실)	송진행	2016. 11	#9-E7	KES4505					
13	KES4506	Ross sea	#ST11	2015. 01	CTD	RS2 #ST11-CTD-B	Bacterial	3.7	EA	Kopri	2621호(자온실)	송진행	2016. 11	#9-E8	KES4506					
14	KES4507	Ross sea	#ST11	2015. 01	CTD	RS2 #ST11-CTD-B	Bacterial	1.7	EA	Kopri	2621호(자온실)	송진행	2016. 11	#9-E9	KES4507					
15	KES4508	Ross sea	#ST11	2015. 01	CTD	RS2 #ST11-CTD-B	Bacterial	3.1	EA	Kopri	2621호(자온실)	송진행	2016. 11	#9-E10	KES4508					
16	KES4509	Ross sea	#ST11	2015. 01	CTD	RS2 #ST11-CTD-B	Bacterial	1.8	EA	Kopri	2621호(자온실)	송진행	2016. 11	#9-E11	KES4509					
17	KES4510	Ross sea	#ST11	2015. 01	CTD	RS2 #ST11-CTD-B	Bacterial	2.5	EA	Kopri	2621호(자온실)	송진행	2016. 11	#9-E12	KES4510					
18	KES4511	Ross sea	#ST11	2015. 01	CTD	RS2 #ST11-CTD-1	Bacterial	2.7	EA	Kopri	2621호(자온실)	송진행	2016. 11	#9-G9	KES4511					
19	KES4512	Ross sea	#ST13	2015. 01	CTD	RS2 #ST13-CTD-7	Bacterial	1.8	EA	Kopri	2621호(자온실)	송진행	2016. 11	#9-H3	KES4512					
20	KES4513	Ross sea	#ST13	2015. 01	CTD	RS2 #ST13-CTD-7	Bacterial	1.5	EA	Kopri	2621호(자온실)	송진행	2016. 11	#9-H4	KES4513					
21	KES4514	Ross sea	#ST13	2015. 01	CTD	RS2 #ST13-CTD-B	Bacterial	2.1	EA	Kopri	2621호(자온실)	송진행	2016. 11	#9-H5	KES4514					
22	KES4515	Ross sea	#ST13	2015. 01	CTD	RS2 #ST13-CTD-B	Bacterial	2.4	EA	Kopri	2621호(자온실)	송진행	2016. 11	#9-H6	KES4515					
23	KES4516	Ross sea	#ST13	2015. 01	CTD	RS2 #ST13-CTD-B	Bacterial	4	EA	Kopri	2621호(자온실)	송진행	2016. 11	#9-H7	KES4516					
24	KES4517	Ross sea	#ST13	2015. 01	CTD	RS2 #ST13-CTD-6	Bacterial	3	EA	Kopri	2621호(자온실)	송진행	2016. 11	#9-H8	KES4517					
25	KES4518	Ross sea	#ST13	2015. 01	CTD	RS2 #ST13-CTD-6	Bacterial	2.1	EA	Kopri	2621호(자온실)	송진행	2016. 11	#9-H9	KES4518					
26	KES4519	Ross sea	#ST13	2015. 01	CTD	RS2 #ST13-CTD-6	Bacterial	2	EA	Kopri	2621호(자온실)	송진행	2016. 11	#9-H10	KES4519					
27	KES4520	Ross sea	#ST13	2015. 01	CTD	RS2 #ST13-CTD-6	Bacterial	2.8	EA	Kopri	2621호(자온실)	송진행	2016. 11	#9-H11	KES4520					
28	KES4521	Ross sea	#ST13	2015. 01	CTD	RS2 #ST13-CTD-6	Bacterial	5	EA	Kopri	2621호(자온실)	송진행		#9-H12	KES4521					

Fig. 3-4. A list of bacteria extracts derived from Ross Sea

## 라. 결론 및 제언

본 연구를 통해 2015년 남극 로스해 해역으로부터 분리된 해양미생물 시료 중 형태학적 분류를 통해 선별된 균주 149 종과 2016년 남극 로스해에서 채집된 붉은 산호에서 분리된 공생미생물 12 종을 각각 50 mL씩 배양하여 추출물을 제작하였으며, 배양불가인 7 개 균주를 제외하고 최종 154개 균주에 대해 추출물을 확보하였다. 제작된 추출물은 이후 실험에 이용되기 전까지 4°C에서 냉장보관 중이며 각 추출물 database 작성하여 관리하고 있다. 이로부터 다양한 생리활성 screening을 통해 서로 다른 생물학적인 활성을 가지는 다양한 형태의 이차대사산물 연구 활성화에 중요한 기본 자료로 활용될 것이라 기대된다.

## 2. 극지 고유생물 유래 MS-라이브러리 확보

### 가. 연구 목표

남극 로스해 생물 및 환경자원을 확보하고 이로부터 분리된 다양한 미생물을 대상으로 추출물을 제작하여 생리활성검색을 위해 구축된 database를 활용하여 각 추출물의 ESI-Q-TOF MS 분석을 통해 MS 라이브러리를 확보하고자 하였다. 라이브러리에 더 많은 시료의 분석정보를 입력하고 확보하게 되면, 뛰어난 효과를 가지는 천연물이 발견 될 경우 천연물 DB와 라이브러리를 이용하여 이 천연물을 포함하고 있는 추출물 시료들에 대한 정보를 얻거나 그 시료와 비슷한 유도체들의 존재 여부 등의 유용한 정보를 얻을 수 있는 MS 라이브러리를 확보할 수 있다.

### 나. 연구 수행방법

기 확보한 추출물을 대상으로 극지 유래 대사체 분석 및 라이브러리 제작을 위하여 ESI Q-TOF MS에서 분석하였다.

(1) 극지해양생물의 대사체 라이브러리 작성

① HPLC 분석조건: Column : Endeavorsil (2.1 x 30 mm) / oventemp : 40°C, 이동상 : A = Water (0.1% FA) / B = ACN (0.1% FA).

Table 3-10. HPLC multi step gradient (Sample injection : 2 ppm / 3 uL injection)

Time (min)	Flow (mL/min)	A %	B %
0	0.3	80	20
2	0.3	0	100
5	0.3	0	100
5.5	0.3	80	20
9.9	0	80	20
10	0	80	20

② Q-TOF MS 분석조건 : 아래 같이 두 가지 조건하에서 분석하였다.

Table 3-11. MS method experiment 1

Method	Parameter
Scan type	TOF-MS
Accumulation time	0.25 sec
IDA experiment	on
TOF masses	100 ~ 1000
Duration	5min
cycles	428
Source gas (1) & (2)	(1) : 30 / (2): 30
Curtain gas	15
Source temp	400°C
Ion Spray Voltage Floating (ISVF)	5500
Collision Energy (CE)	10
Declustering potential	80

Table 3-12. MS method experiment 2

Method	Parameter
Scan type	Product ion
Accumulation time	0.099988 sec
IDA experiment	on
Mass range	100 ~ 1000
Duration	5min
Declustering potential	80

Method	Parameter
Collision Energy (CE)	44
Collision Energy Spread (CES)	0
Ion Release Delay (IRD)	30
Ion Release Width (IRW)	15

③ 대사체 라이브러리 분석 : 입력된 라이브러리 자료와 TIC (Total ion chromatography), XIC (Extract ion chromatography) 자료를 기반으로 DB구축 하고 있다.

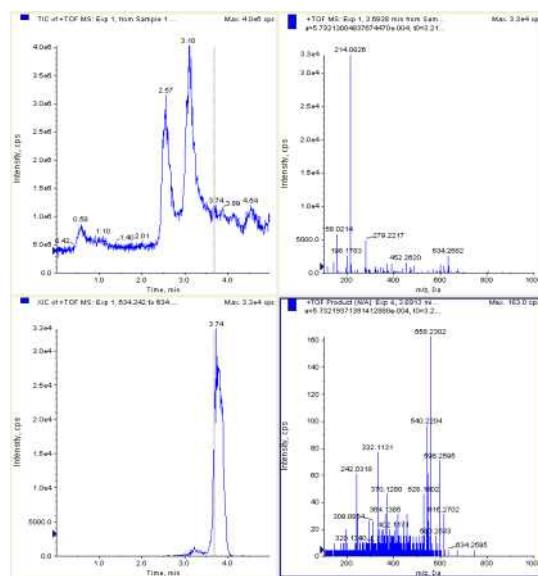


Fig. 3-5. An example of 4 kinds of data to be uploaded library – TIC, XIC, TOF MS, MS/MS

Add a Record

Mass Spectral Information | General Information

Identification

Compound Name: 13R55F\_0006\_3\_6913  
Synonyms:  
Formula: C24H34N19O7  
Molecular Weight: 516.2702  
CAS Number:  
Compound Class:  
User Value: 0  
Comp. ID:  
Comment 1:

+ File(D0) CE(44.0) RT(3.7) Max: 264.8 cps

Mass Spectrum: m/z (Da) Intensity (cps)

1	131.0635	2.0000
2	165.0674	2.0000
3	173.0911	3.0000
4	175.1083	1.0000
5	178.0747	1.0000
6	179.2124	1.0000
7	185.0687	2.0000

Current Spec.: + Precision:0.0 CE:=44.0 RT:=3.7[min]

Database: TRN

Mass Spec Data

Instrument Model: TripleTOF 4600  
Ion Source: DuoSpray Ion Source  
Polarity: Positive  
Scan Type: TOF MS2  
1st Precursor m/z: 0 Da  
Collision Ene: 44 CES Charge State 1: +1  
2nd Precursor m/z: 0 Da  
Excitation Energy: 0 Charge State 2: -1  
CAD Gas Type: CAD Gas Value: 0 Retention Time: 3.5313 min Resolution: unit  
Comment 2:  
Comment 3:

OK Cancel Print Help

Fig. 3-6. An example of uploaded data on library

## (2) 입력된 라이브러리 정보의 excel DB 확보 및 관리

AB Sciex ESI Q-TOF 장비의 오퍼레이팅 프로그램에 1 차 저장되어진 라이브러리 정보를 excel DB로 구축하였으며, 입력되는 정보는 라이브러리에 인식되는 compound ID, compound name 과 formula 정보, molecular weight 등의 기본적인 정보가 담겨있다.

#### 다. 연구 결과

### (1) 대사체 라이브러리 제작

기 확보한 극지 유래 대사체 분석 및 라이브러리 제작을 위하여 ESI Q-TOF MS에서 분석하였다. 총 319 개의 추출물 시료 중 82 개의 시료가 분석이 완료되었고, 그 중 의미 있는 데이터를 자체 라이브러리에 입력하는 작업하여 600 개의 정보입력이 완료하였다. 정보입력을 완료한 개의 MS 라이브러리를 바탕으로 excel DB를 작성하여 관리하고 있다.

Fig. 3-7. An example of library excel DB for single metabolites

라. 결론 및 제언

기 확보한 남극 로스해 해양진균 추출물 시료를 대상으로 ESI Q-TOF MS 분석을 수행하였고, 그 중 의미 있는 데이터를 자체 라이브러리에 입력하여 600 개의 정보입력을 완료하였다. 1 차 저장되어진 라이브러리 정보를 excel database로 구축하였으며, 입력되는 정보는 라이브러리에 인식되는 compound ID, compound name 과 formula 정보,

molecular weight 등의 기본적인 정보가 담겨있다. 이후 연구를 통해 뛰어난 효과를 가지는 물질이 발견 될 경우 천연물 DB와 MS 라이브러리를 이용하여 이 천연물을 포함하고 있는 추출물 시료들에 대한 정보를 얻거나 그 시료와 비슷한 유도체들의 존재 여부 등의 유용한 정보를 얻을 수 있는 database로 활용될 것으로 기대된다.

### 3. 대사체 분석 및 구조 규명

#### 가. 연구 목표

LC-MS를 이용한 극지 미생물 대사체 분석 기법 확립 및 대사체 분석, DB 확보를 통하여, 유효한 균주를 효과적으로 선별한다. 극지 미생물 대사체의 target, non-target 분석을 통하여, 극지 미생물 유래 대사체 활용기술 개발을 위한 대사물질 분리에 있어 효과적인 접근법 제시한다. 해양유래 미생물의 이차대사물질을 효과적으로 분리하고 관련 기초자료를 제공하여 차세대 국가 성장 동력 창출의 기초자료를 제공한다.

#### 나. 연구 수행방법

##### (1) LC-MS를 이용한 극지미생물의 대사체 분석

극지 미생물 SF7013, SF7024의 대사 물질 분석을 위해 해수조건의 potato dextrose agar 배지에 25 °C 조건에서 10일간 정체 배양하고, 현미경을 통해 포자를 관찰하여 Ginus를 예측하였다. 배양된 극지 미생물을 MeOH를 이용하여 추출하고 여과 후 농축하였다. 이를 다시 증류수에 혼탁시킨 후 같은 양의 EtOAc로 용매 분획을 실시하였고, EtOAc 추출물을 얻었다.



Fig. 3-8. SF7013, PDA 배지, 10일 배양



Fig. 3-9. SF7024, PDA 배지, 10일 배양

현미경을 통한 포자 관찰 결과, SF7013, SF7024 두 균주는 *Aspergillus*속의 분생자를 가지는 것으로 예측되었다.

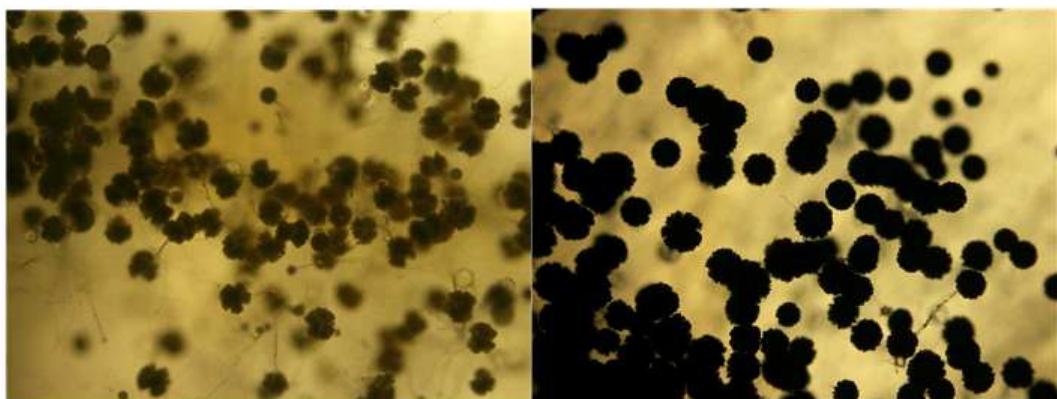


Fig. 3-10. SF7013 (왼쪽)와 SF7024 (오른쪽) 분생자

## (2) 극지 해양미생물 유래 대사체 구조분석

해양 유래 균주로부터 생리 활성 물질을 탐색하기 위하여 EtOAc 추출물에 대하여 역상 C18 flash column chromatography를 단계적 기울기 용리법 [20%, 40%, 60%, 80%, 100% (v/v) MeOH in H<sub>2</sub>O (400mL each), dichloromethane:MeOH (1:1)]으로 진행하였다. 각종 크로마토그래피법을 이용한 성분 분리된 시료는 MS, NMR 등의 기기 분석을 통해 그 구조를 규명하였다.

## 다. 연구 결과

### (1) LC-MS를 이용한 극지미생물의 대사체 분석

#### (가) 극지 미생물 추출물의 LC-MS 분석 조건 확립

분석을 위해 추출물을 MeOH에 녹여 0.2  $\mu\text{l}$ 의 membrane filter로 필터 후 LC-MS (Waters UPLC/Ion trap (IT) MS and quadtruple time of flight (Q-ToF) MS system)를 이용하여 metabolite가 충분히 분리되고 MS가 detect 될 수 있는 최적의 분석 조건을 확립하였다. UPLC 이동상 조건으로 0.05 %의 Formic acid가 든 물과 ACN을 사용

하여 ACN 20–100 %로 gradient주어 7분간 분석조건을 확립하고, 적절한 MS 이온화 조건을 확립하였다 (Fig. 3-11).

## LC/MS 분석

UPLC		Q-ToF																															
• UPLC system: Waters ACQUITY UPLC™		• Capillary (V)	2800.0																														
• Column ACQUITY UPLC BEH C18		• Sample Cone (V)	28.0																														
• (2.1 x 100mm, 1.7μm)		• Extraction Cone (V)	0.8																														
• Mobile phase A: 0.05 % FA in Water		• Desolvation Temp (°C)	300.0																														
• B: Acetonitrile		• Source Temp (°C)	100.0																														
• Flow rate: 300μl/min		• TOF Flight Tube (V)	5630.0																														
• Injection volume: 2μl		• Reflectron (V)	1730.0																														
• Column temperature: 35°C		• Pusher	860.4																														
• Gradient condition:		• Puller	650.0																														
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>Flow rate (μl/min)</th> <th>% A</th> <th>% B</th> <th>Curve</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Initial</td> <td>300</td> <td>80.0</td> <td>20.0</td> <td></td> </tr> <tr> <td>7.00</td> <td>300</td> <td>0.0</td> <td>100.0</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>8.50</td> <td>300</td> <td>0.0</td> <td>100.0</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>8.60</td> <td>300</td> <td>80.0</td> <td>20.0</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>10.00</td> <td>300</td> <td>80.0</td> <td>20.0</td> <td>6</td> </tr> </tbody> </table>	Time (min)	Flow rate (μl/min)	% A	% B	Curve	Initial	300	80.0	20.0		7.00	300	0.0	100.0	6	8.50	300	0.0	100.0	6	8.60	300	80.0	20.0	6	10.00	300	80.0	20.0	6		• Start Mass	100.0
Time (min)	Flow rate (μl/min)	% A	% B	Curve																													
Initial	300	80.0	20.0																														
7.00	300	0.0	100.0	6																													
8.50	300	0.0	100.0	6																													
8.60	300	80.0	20.0	6																													
10.00	300	80.0	20.0	6																													
		• End Mass	1500.0																														
		• Start Time (min)	0.0																														
		• End Time (min)	5.0																														
		• Scan Time (sec)	0.48																														
		• InterScan Time (sec)	0.1																														

Fig. 3-11. 확립된 LC-MS 분석조건

### (나) 극지 미생물 추출물 분석

#### ① SF7013 추출물의 LC-MS 분석

확립된 LC-MS 분석조건으로 SF7013 추출물을 분석하였다 (Fig. 3-12). SF7013 추출물 LC-MS 분석 결과, UV와 MS상에서 4개의 특징적인 peak이 나타났다 (Fig. 3-13).

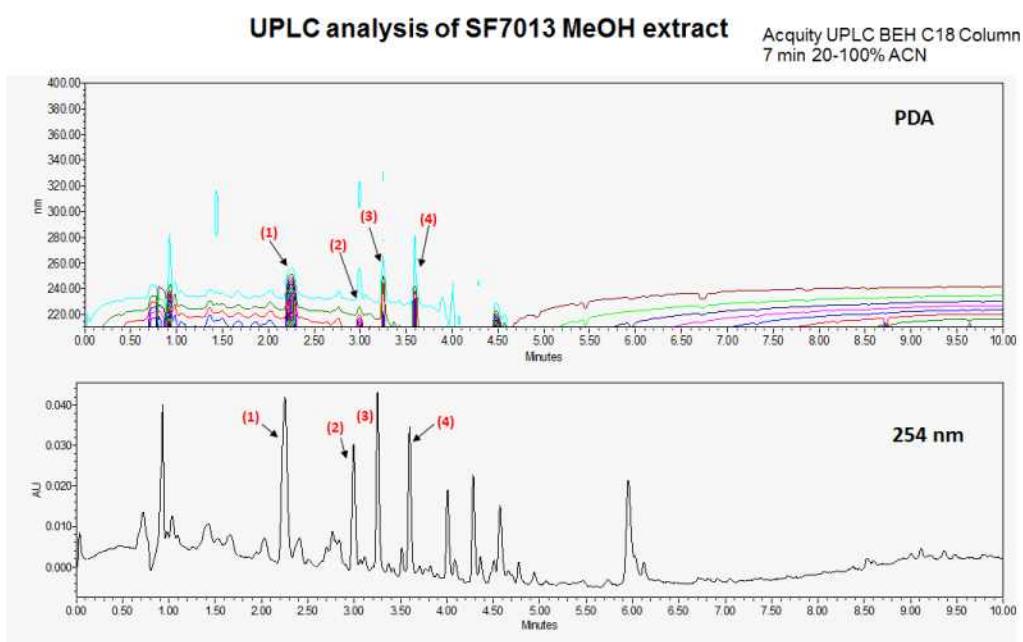


Fig. 3-12. SF7013 추출물 UPLC 분석 결과

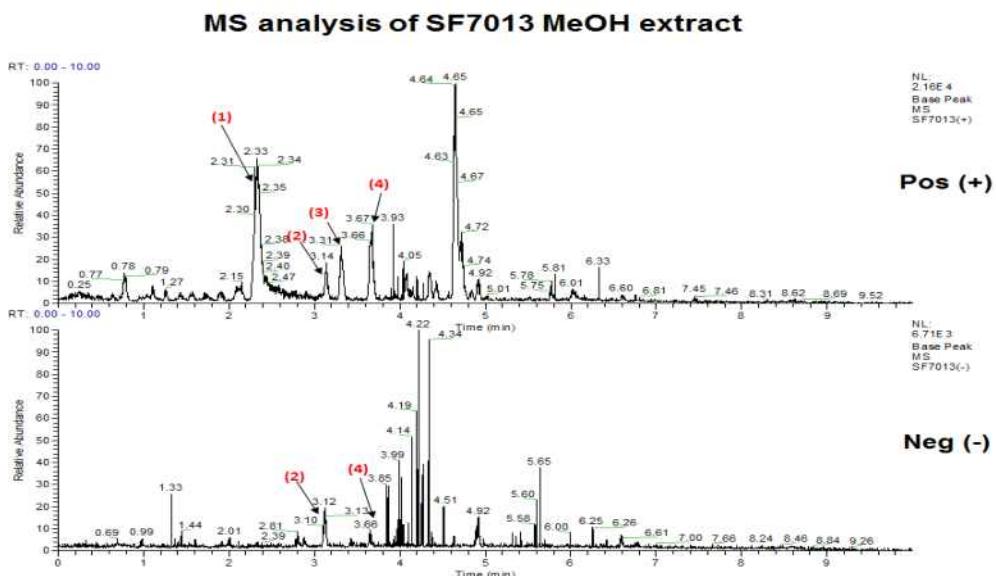


Fig. 3-13. SF7013 추출물 MS 분석 결과

## ② SF7024 추출물의 LC-MS 분석

학립된 LC-MS 분석조건으로 SF7024 추출물을 분석하였다 (Fig. 3-14). SF7024 추출물 LC-MS 분석 결과, UV와 MS상에서 8개의 특징적인 peak이 나타났다 (Fig. 3-15).

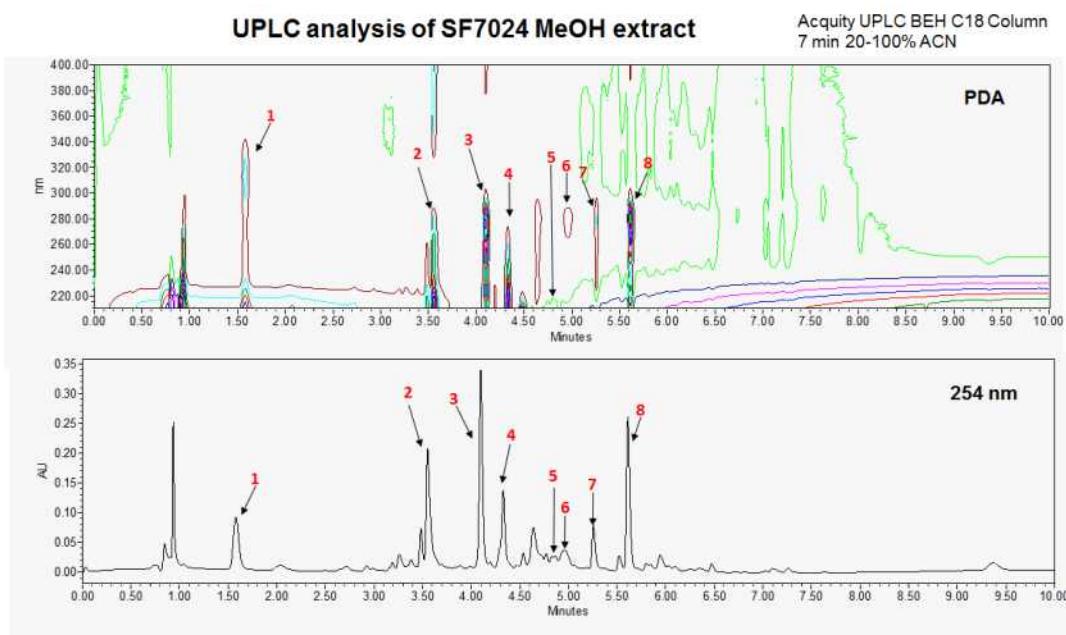
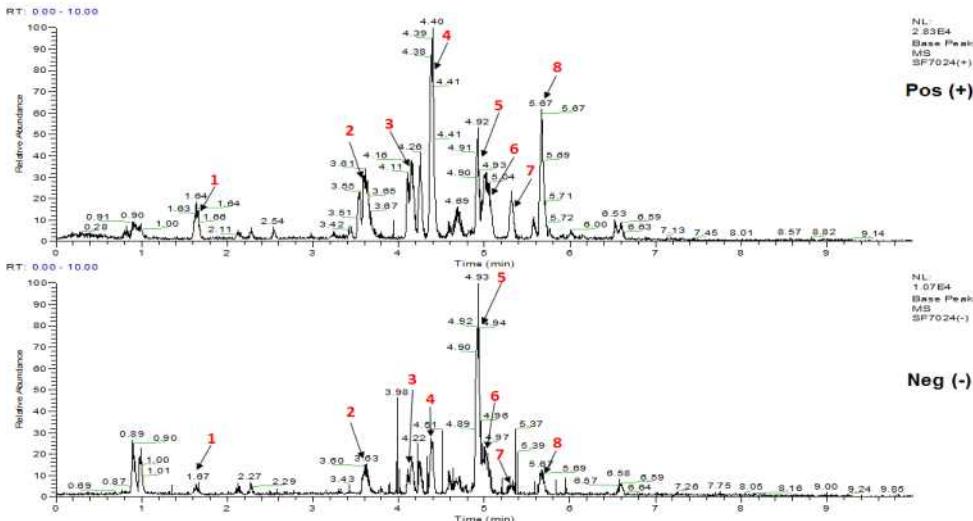


Fig. 3-14. SF7024 추출물 UPLC 분석 결과

### MS analysis of SF7024 MeOH extract



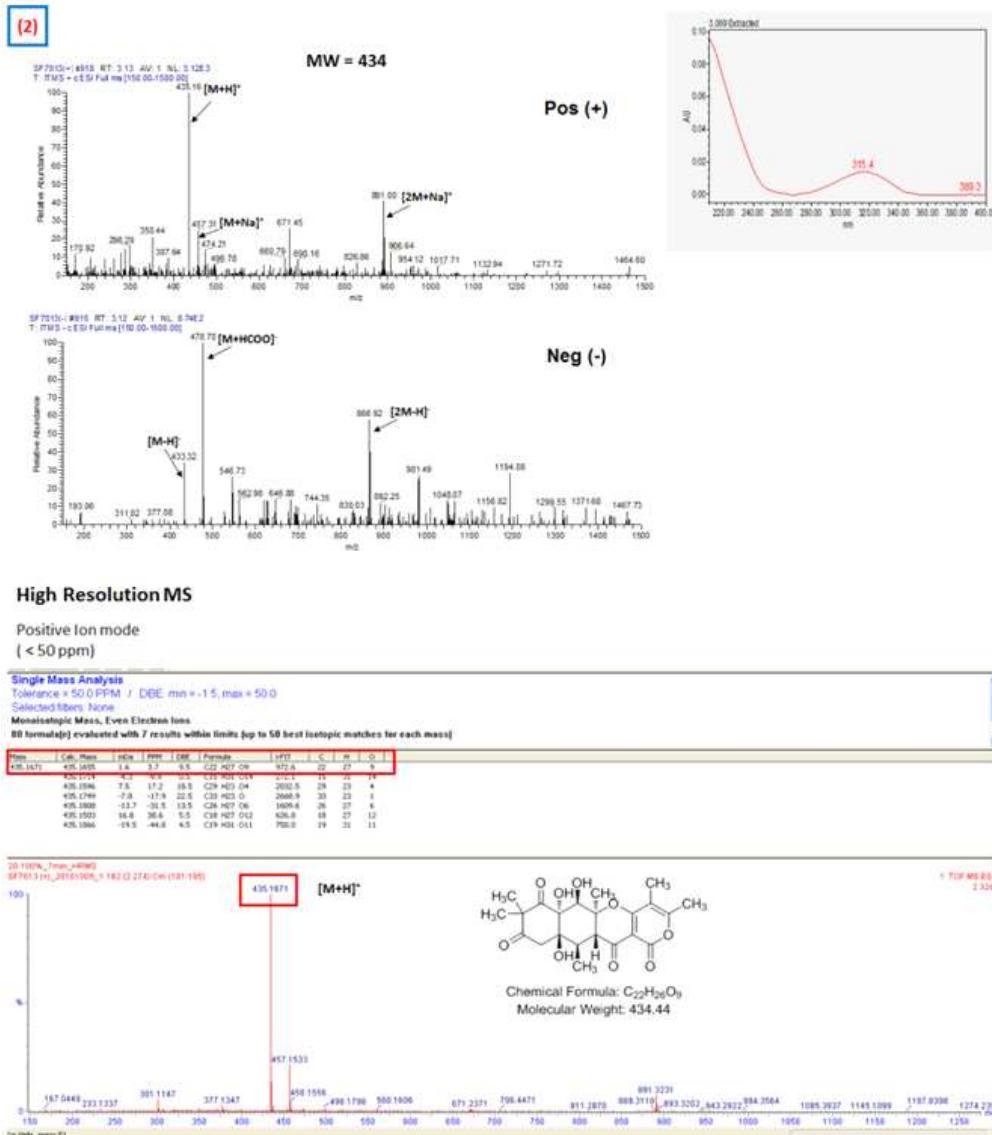


Fig. 3-17. SF7013 peak (2)의 UV, MS 분석 결과 및 예측 화합물

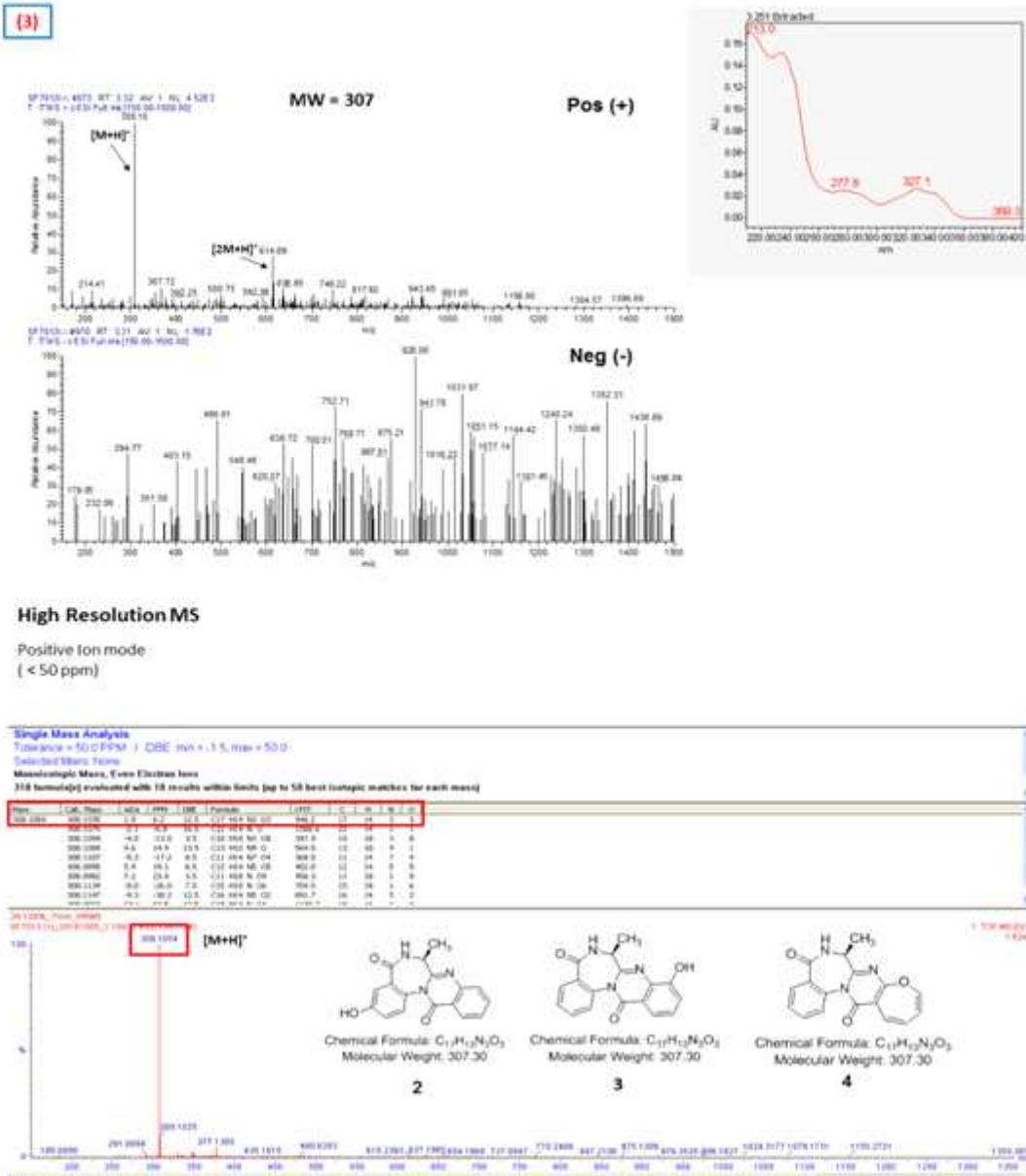
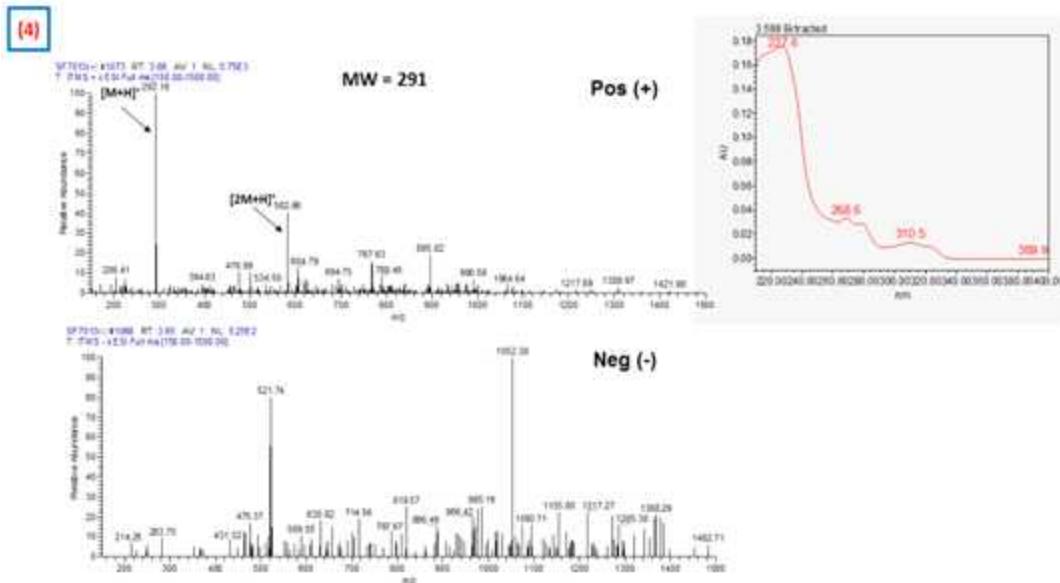


Fig. 3-18. SF7013 peak (3)의 UV, MS 분석 결과 및 예측 화합물



#### High Resolution MS

Positive Ion mode  
(< 50 ppm)

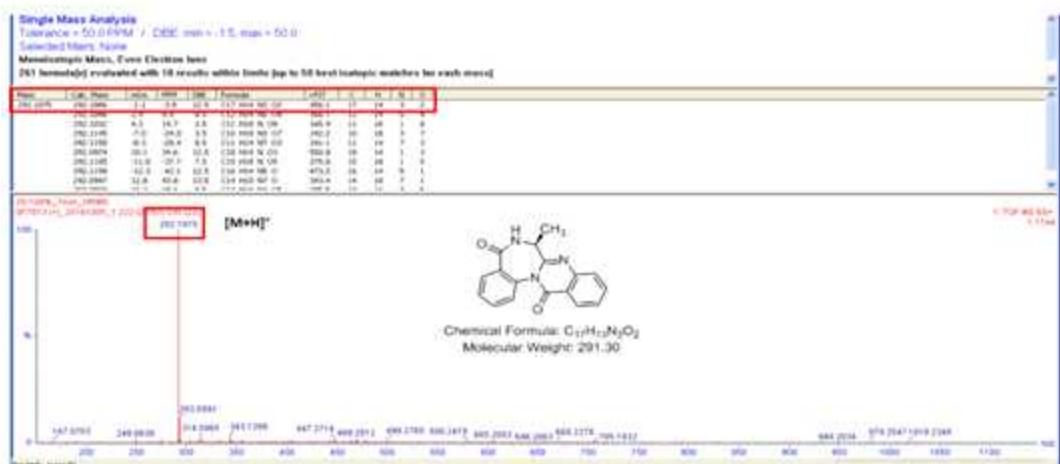


Fig. 3-19. SF7013 peak (4)의 UV, MS 분석 결과 및 예측 화합물

해당 분자량과 UV 패턴을 *Aspergillus*속 위주로 문헌을 검색한 결과, peak (2)는 aspertetranone A로, peak (3)은 circumdatin C, circumdatin G, circumdatin L 중 하나로 예측되었고, peak(4) 역시 같은 계열의 circumdatin F로 예측되었다 (Fig. 3-20)..

### De-replication Results of SF7013 MeOH extract

No.	Name	Molecular formula	Molecular Weight	Structure
1	—			정확한 분자량 찾지 못함
2	Aspertetranone A	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	434.44	
3	Circumdatin C Circumdatin G Circumdatin L	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	307.3	
4	(S)-(-)-Cicumdatin F	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	291.31	

Fig. 3-20. SF7013 추출물 내의 peak 1~4 de-replication 결과

#### ② SF7024 추출물의 대사체 분석 및 DB 구축

SF7024 추출물의 대사체 분석에서 나타난 8개의 특징적인 peak에 대해 이에 대해 MS 및 UV spectrum을 분석하여 Reaxys, SciFinder와 같은 문헌 검색 database를 이용한 de-replication을 시행하고 HR/MS 분석으로 molecular formula를 예측하였다.

SF7024 추출물의 8개의 peak의 MS와 HR/MS 분석 결과, peak (1)은 분자량 223, molecular formula C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>5</sub>로, peak (2)는 288, C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>로, peak (3)은 272, C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>로, peak (4)는 343, peak (5)는 529로 확인되었다 (Fig. 3-21, 22, 23, 24, 25). Peak (6)은 분자량 574, molecular formula C<sub>31</sub>H<sub>26</sub>O<sub>11</sub>로, peak (7)과 peak (8)은 같은 분자구조로 556, C<sub>31</sub>H<sub>24</sub>O<sub>10</sub>로 분석되었다 (Fig. 3-26, 27, 28). 그 중 peak (3), (6), (7), (8)은 유사한 UV 패턴으로 같은 계열의 화합물로 예상되었다.

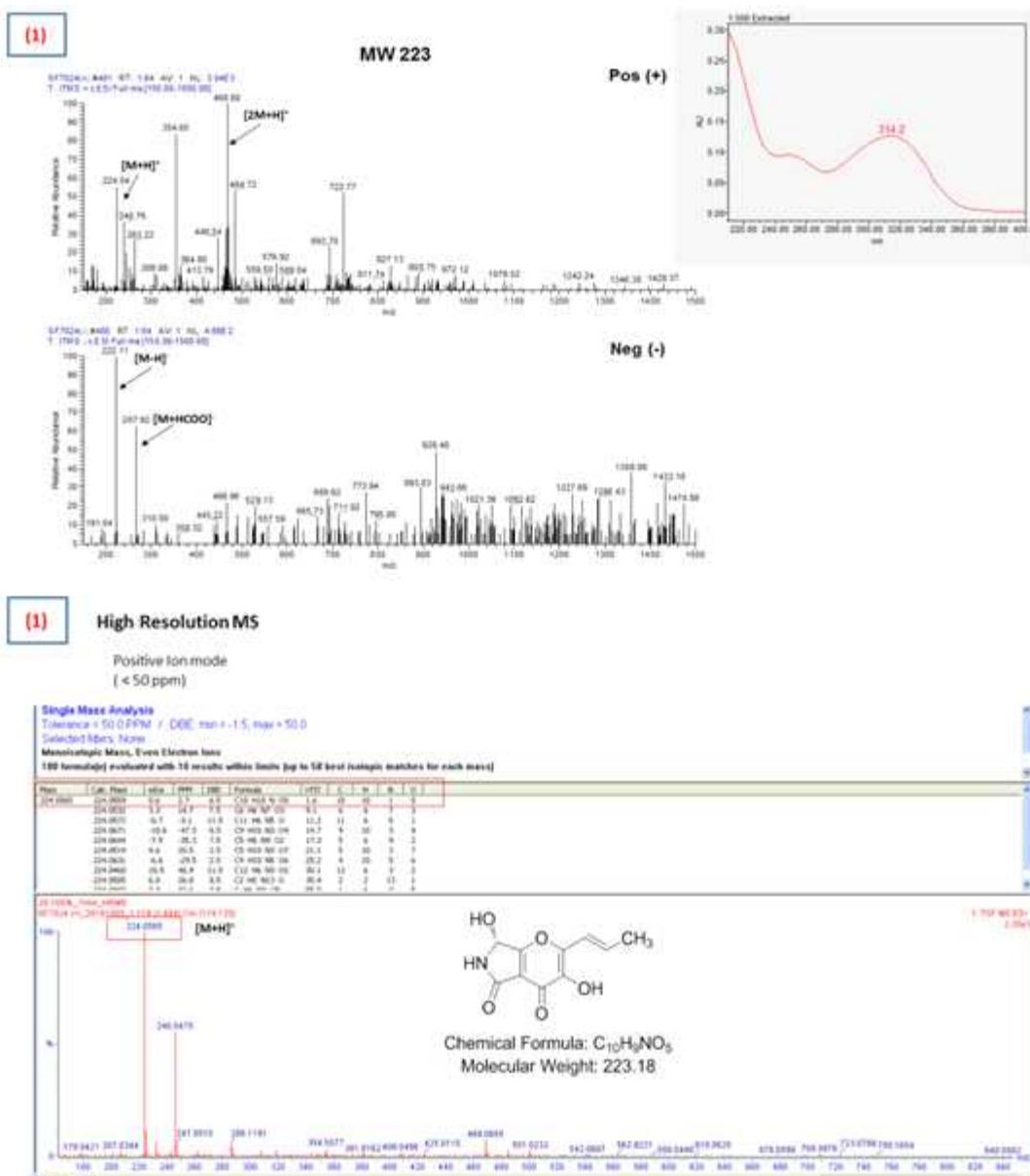


Fig. 3-21. SF7024 peak (1)의 UV, MS 분석 결과 및 예측 화합물

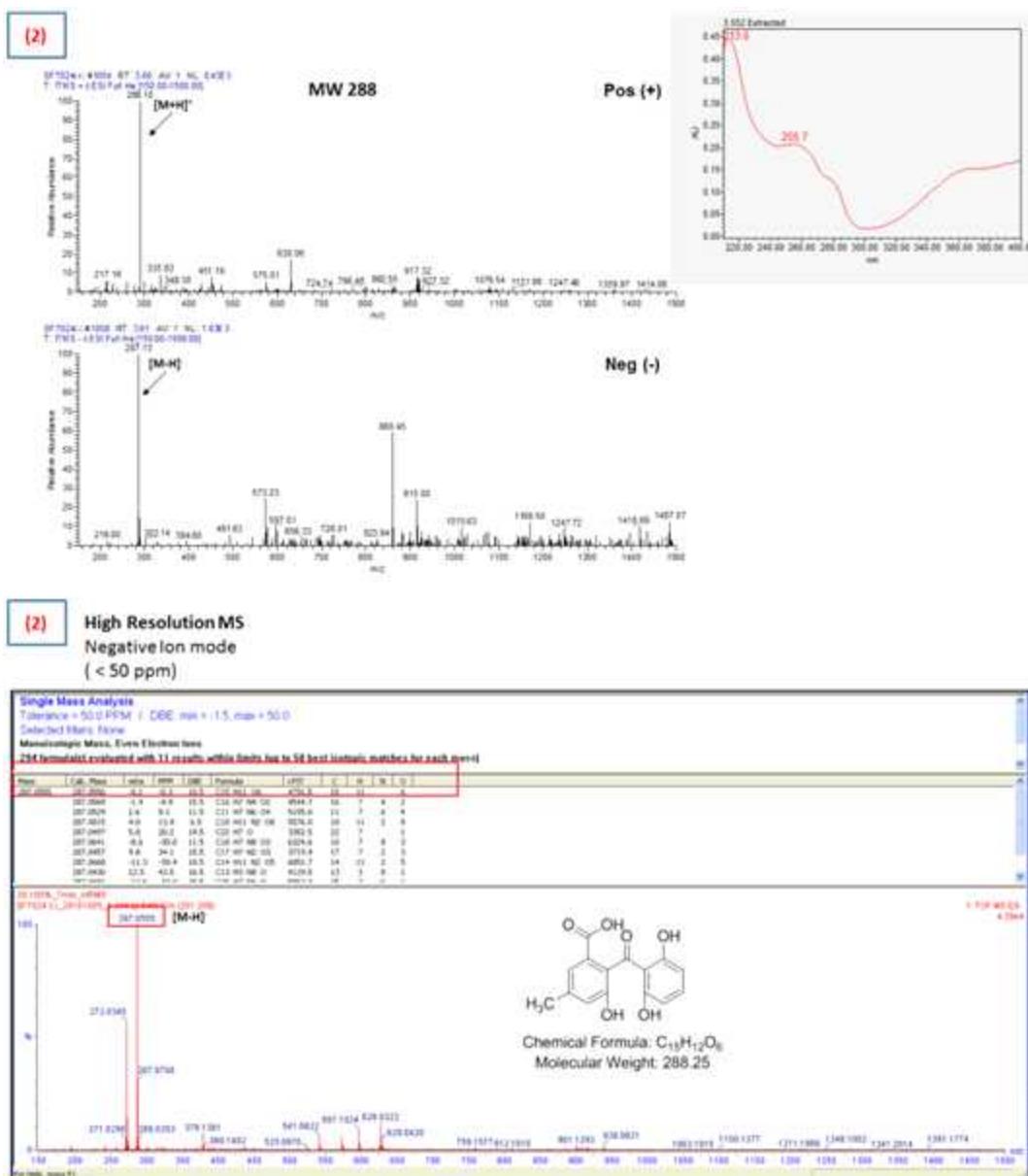


Fig. 3-22. SF7024 peak (2)의 UV, MS 분석 결과 및 예측 화합물

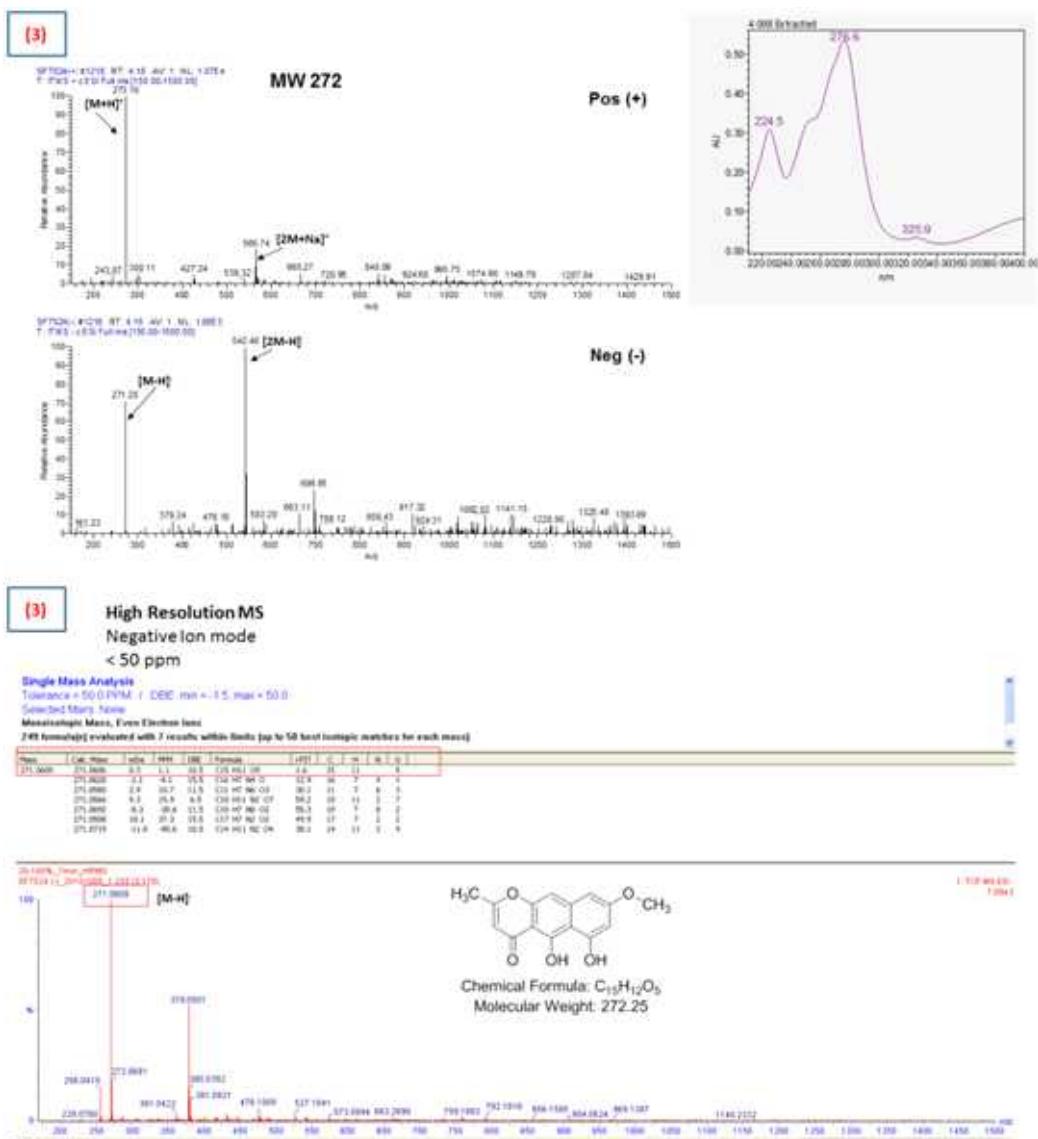


Fig. 3-23. SF7024 peak (3)의 UV, MS 분석 결과 및 예측 화합물

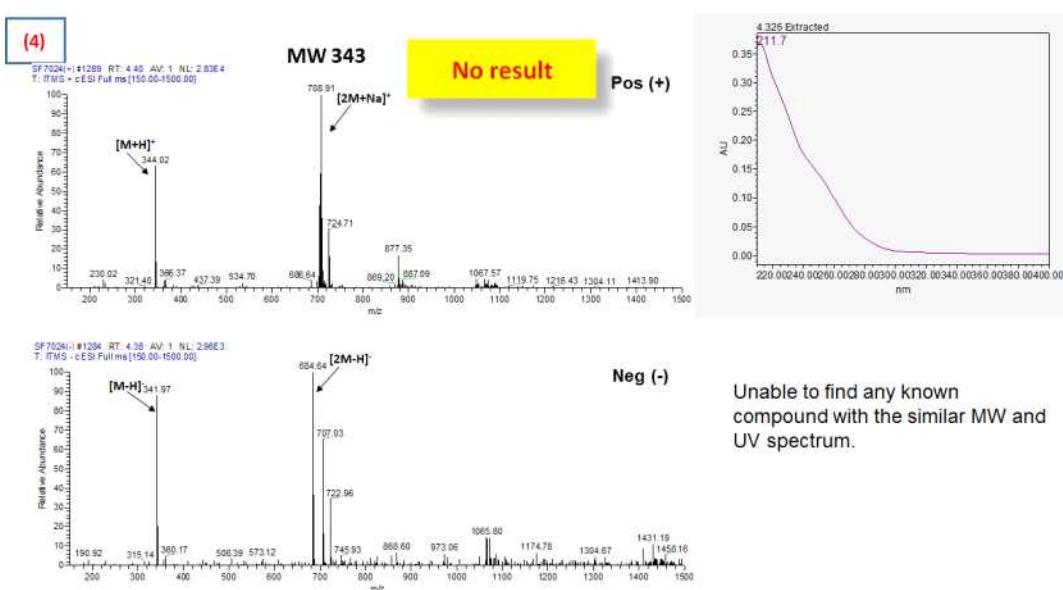


Fig. 3-24. SF7024 peak (4)의 UV, MS 분석 결과 및 예측 화합물

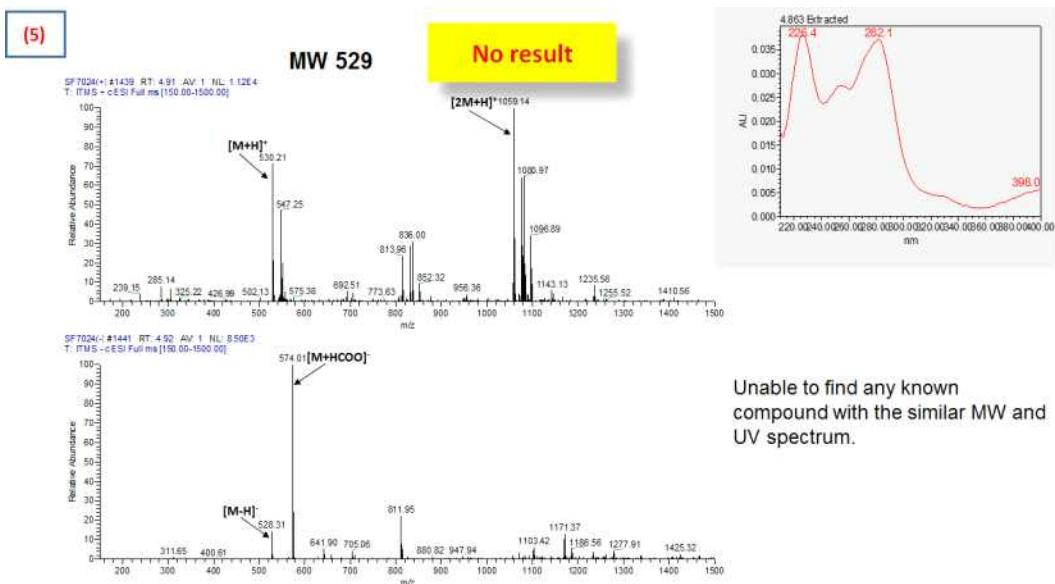
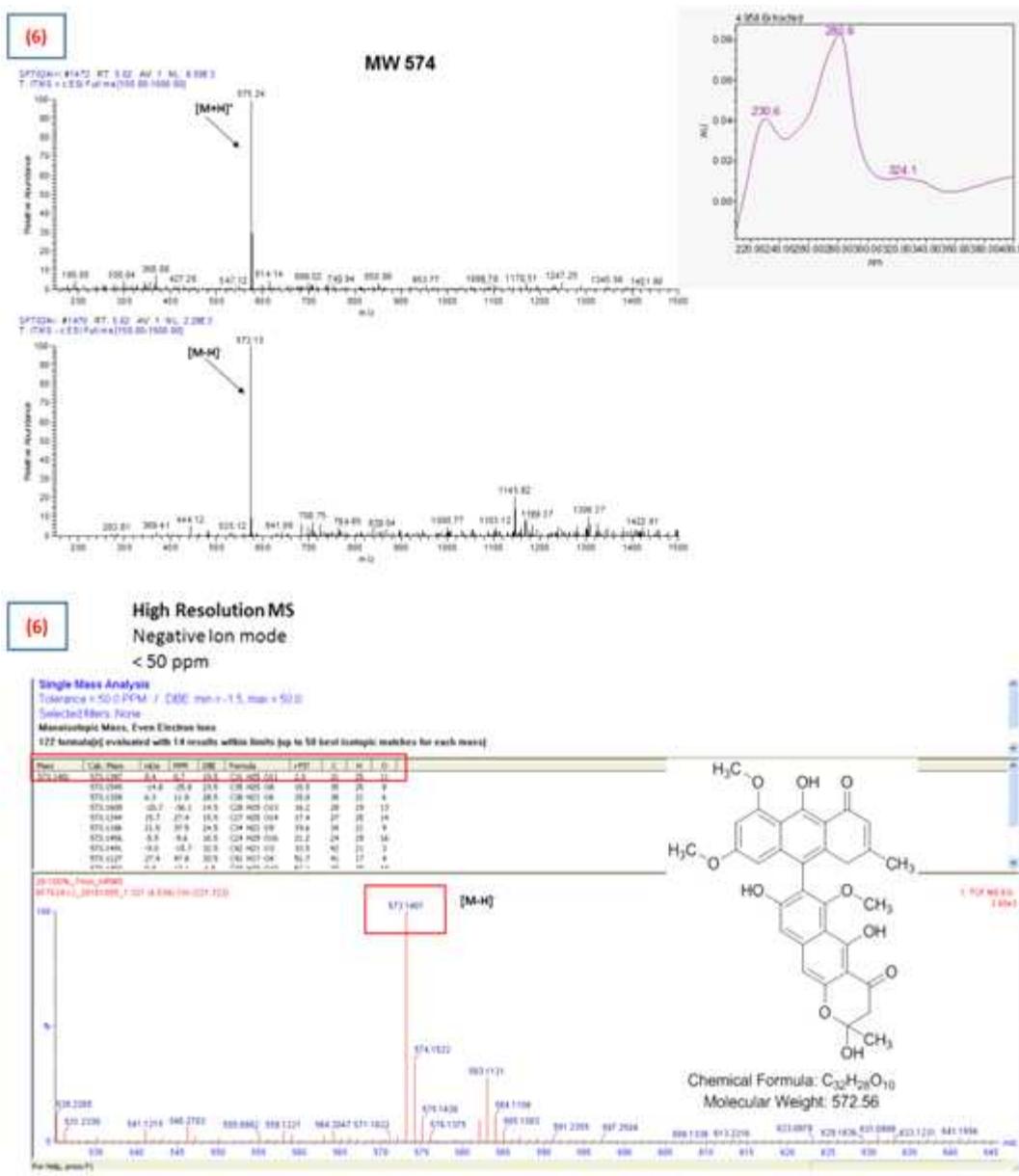
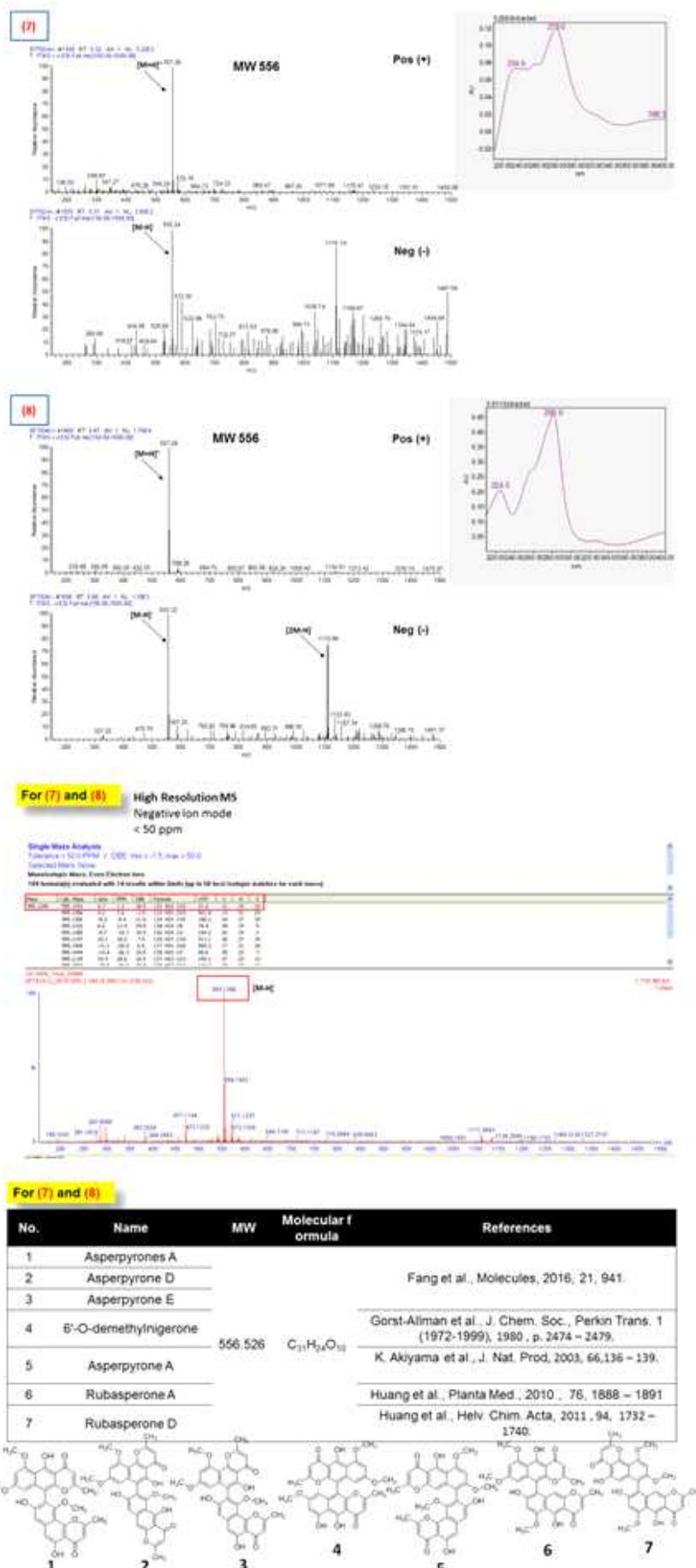


Fig. 3-25. SF7024 peak (5)의 UV, MS 분석 결과 및 예측 화합물





해당 분자량과 UV 패턴을 *Aspergillus*속 위주로 문헌을 검색한 결과, peak (1)은 pyranonigrin A로, peak (2)은 monodictyphenone로 peak (3)은 rubrofusarin로 예측되었고, peak (4)와 peak (5)는 기존 문헌에서 분자량과 UV 패턴을 만족하는 화합물 찾지 못하였다. 그리고 peak (6)은 aurasperone F로 예측되었고, peak (7)과 peak (8)은 같은 분자구조를 가진 7개의 유사한 화합물 중 하나라고 예측되었다 (Fig. 3-28).

De-replication Results of SF7013 MeOH extract

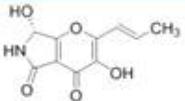
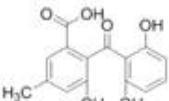
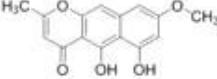
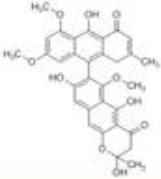
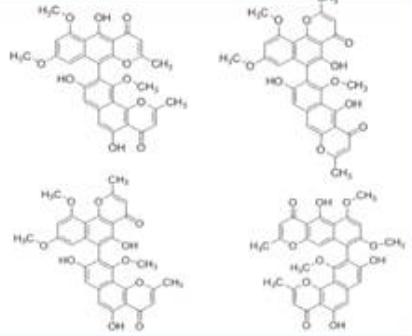
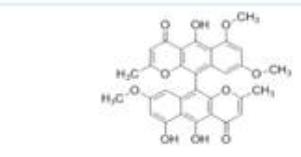
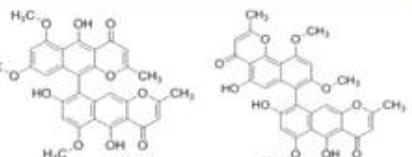
No.	Name	Molecular formula	Molecular Weight	Structure
1	Pyranonigrin A	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>5</sub>	223.185	
2	Monodictyphenone	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	288.257	
3	Rubrofusarin	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	272.257	
4	—	343	분자량과 UV 패턴을 만족하는 화합물을 찾지 못함	
5	—	529	Peak 6, 7, 8 과 유사 구조 예상 (UV 패턴 유사)	
6	Aurasperone F	C <sub>31</sub> H <sub>26</sub> O <sub>11</sub>	574.541	
7&8	Asperpyrones A Asperpyrone D Asperpyrone E Asperpyrone A	556.526	C <sub>31</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	
7&8	6'-O-demethylnigerone	556.526	C <sub>31</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	
7&8	Rubasperone A Rubasperone D	556.526	C <sub>31</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	

Fig. 3-28. SF7024 추출물 내의 peak 1~8 de-replication 결과

## (2) 극지 해양미생물 유래 대사체 구조분석

## (가) 극지해양미생물 유래 생리활성 대사체의 분리

양극해 해양생물 유래 진균 SF7077 균주의 배양 추출물 62.5mg와 4종의 균주배양 추출물을 확보하였다 (Table 3-13).

Table 3-13. 극지 해양미생물 유래 추출물 제작 목록

NO	Sample ID	유래 소재	추출용매	추출물 무게
1	SF7077(PDA)	극지생물 유래 미생물	EtOAc	62.5 mg
2	SF7077(vermiculite)	극지생물 유래 미생물	EtOAc	911.9 mg
3	SF7126(PDA)	극지생물 유래 미생물	EtOAc	62.3 mg
4	SF7126(vermiculite)	극지생물 유래 미생물	EtOAc	927.2 mg
5	SF7136(PDA)	극지생물 유래 미생물	EtOAc	188.2 mg

## ① 극지생물 유래 미생물 SF6155로부터 제조된 분획물에서 활성 대사체 분리 연구

해양 유래 균주 SF6155로부터 생리 활성 물질을 탐색하기 위하여 EtOAc 추출물 1535.6 mg은 역상 C<sub>18</sub> flash column chromatography를 단계적 기울기 용리법 [20%, 40%, 60%, 80%, 100% (v/v) MeOH in H<sub>2</sub>O (400mL each), dichloromethane:MeOH (1:1)]으로 진행하였다. 80% 메탄올 분획물 SF6155-4 (585 mg)은 silica gel column chromatography를 용매조건 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Acetone (80:1-0:1)로 진행하여 18개의 분획물 (SF6155-4-1~18)을 얻었다. 분획물 SF6155-4-5 (71.4 mg)는 semi-preparative reversed phase HPLC를 단계적 기울기 용리법 [75%-88% MeOH (0~35 min) 88%-100% MeOH (35~36 min) 100% MeOH (36~66 min) in H<sub>2</sub>O (0.1% formic acid)]으로 진행하여 8가지 분획물 (SF6155-45-1~8)을 얻었고, 그 중 화합물 SF6155-45-4 (30.5 mg)와 SF6155-45-5 (6.8 mg)를 얻었다. 분획물 SF6155-4-6 (67.3 mg)은 semi-preparative reversed phase HPLC를 단계적 기울기 용리법 [55%-100% Acetonitrile (0~51 min) 100% Acetonitrile (51~61 min) in H<sub>2</sub>O (0.1% formic acid)]으로 진행하여 6가지 분획물 (SF6155-46-1~8)을 얻었고, 그 중 화합물 SF6155-46-3 (3 mg)을 얻었다. 분획물 SF6155-46-4 (7.3 mg)은 semi-preparative reversed phase HPLC를 단계적 기울기 용리법 [94%-94% MeOH (0~50 min) 94%-100% MeOH (50~51 min) 100% MeOH (51~61 min) in H<sub>2</sub>O (0.1% formic acid)]으로 진행하여 화합물 SF6155-464-1 (2.4 mg)을 얻었다.

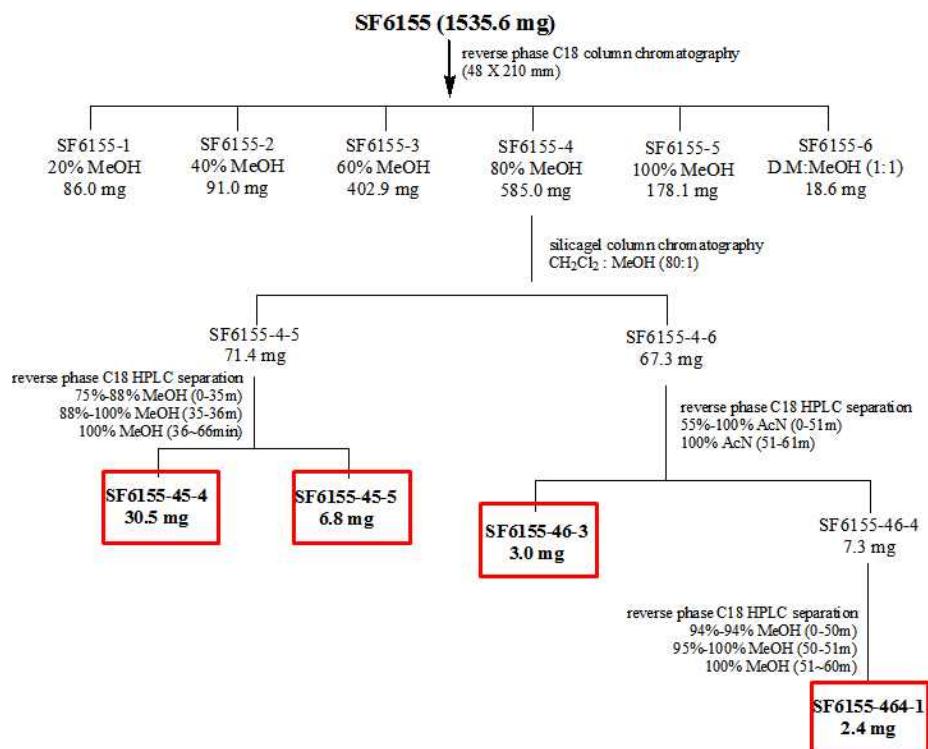


Fig. 3-29. 진균 SF6155 으로부터 유래된 활성 대사체의 분리도

## ② 극지 생물 유래 미생물 SF6796V로부터 제조된 분획물에서 활성 대사체 분리 연구

극지 해양 유래 미생물 SF6796로부터 생리활성 물질을 탐색하기 위하여 fernbach flask 20개에 각각 질석 75g 을 배합하여 14일간 배양하였다. EtOAc (20 L)로 추출 하여 5.18g을 얻었고, 이 추출물로 C<sub>18</sub> flash column chromatography(CC, 45×380mm)를 수행하였다. 이때 용출용매로는 단계적 기울기 용리법을 사용하였고 [20, 40, 60, 80, and 100%(v/v) MeOH in H<sub>2</sub>O (700mL each)], 추출물 6796V-1~6을 얻었다. 100% 메탄올 분획물 6796V-5 에 대하여 Silica gel CC [CHCl<sub>3</sub>-MeOH (1:0 to 1:2)]를 수행하여 6796V-5-3 (12 mg)과 함께 소분획물 6796V-51-14를 얻었다. 소분획물 6796V-55에 대하여 Sephadex LH-20 CC [Hexane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:4)]를 수행하여 6개의 소분획물 6796V-551~6를 얻었다. 그 중 소분획물 6796V-552에 대하여 Silica gel CC [Hexane-Acetone (10:1 to 2:1)]를 수행하여 6796V-5521 (17 mg) 과 6796V-552-4 (7.6 mg)을 얻었으며, 6796V-5521에 대하여 semi-preparative RP HPLC [60-100% MeOH (with H<sub>2</sub>O), in 50min]를 수행하여 6796V-552-1-2 (8 mg, t<sub>R</sub>=20 min)을 얻었다.

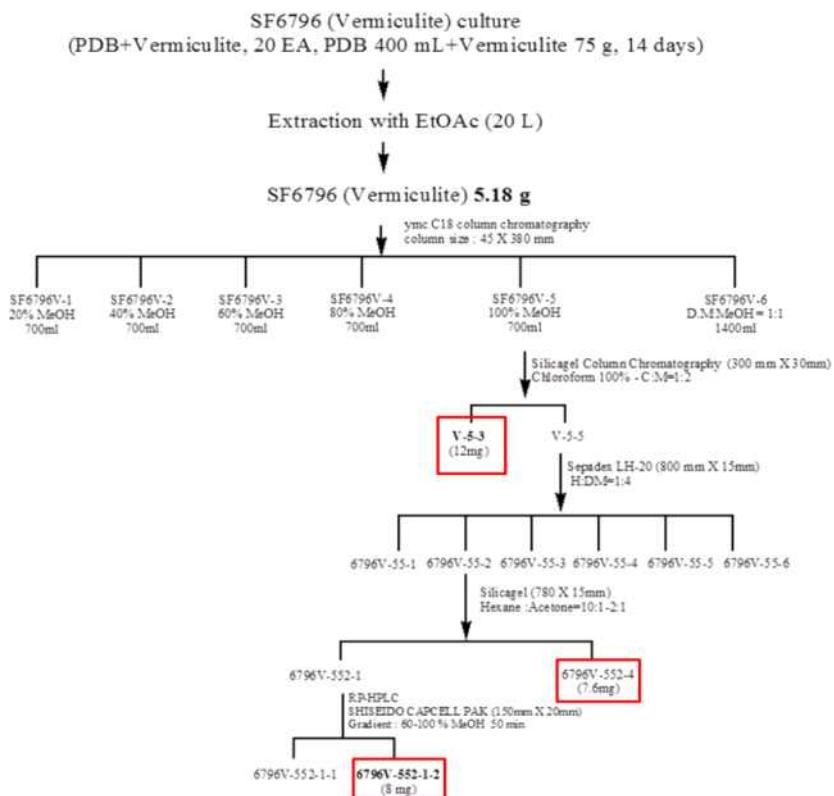


Fig. 3-30. 진균 SF6796V 으로부터 유래된 활성 대사체의 분리도

#### (나) 활성 대사체의 구조 분석

##### ① SF6796V-53 (6,8,1'-tri-O-methyl averantin) 의 구조 결정

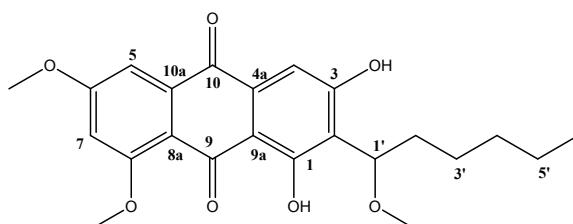


Fig. 3-31. Structure of SF6796V-53

화합물 SF6796V-53 는  $^1\text{H}$  NMR spectrum 상에서 hydrogen-bonded hydroxyl group 인  $\delta_{\text{H}}$  13.77 (s, OH-1), hydroxyl group인  $\delta_{\text{H}}$  9.44 (s, OH-3), 2개의 meta-coupled aromatic protons [ $\delta_{\text{H}}$  7.44 (d,  $J$  = 2.4 Hz, H-5), 6.77 (d,  $J$  = 2.4 Hz, H-7)], 1개의 aromatic proton [ $\delta_{\text{H}}$  7.22 (s)], 3개의 methoxy groups [ $\delta_{\text{H}}$  4.00 (s, OCH<sub>3</sub>-8), 3.97 (s, OCH<sub>3</sub>-6), 3.46 (s, OCH<sub>3</sub>-1')], 4개의 methylene groups [ $\delta_{\text{H}}$  1.75 (m, H-2'), 1.83 (m, H-2'), 1.40 (m, H-3'), 1.30 (overlapped, H-4'), 1.32 (overlapped, H-5')]] 신호가 보였다.  $^{13}\text{C}$ , DEPT NMR spectrum 상에서 23개의  $^{13}\text{C}$  신호를 확인하였고, 1개의 methyl group, 3개의 methoxy groups, 4개의 methylene carbons, 4개의 methine carbons,  $\delta_{\text{C}}$  186.9, 182.1의 carbonyl carbons를 포함한 11개의 quaternary

carbons 를 확인하였다.  $^1\text{H} - ^1\text{H}$  COSY spectrum에서 H-1'에서 H-3'까지의 연결과, H-5'와 H-6'의 연결을 확인하였고, HMBC spectrum에서 H-4'에서 C-2', C-5', C-6'의 correlation을 확인하여 six-carbon chain의 존재를 확인하고, 또한 HMBC spectrum에서 H-1'에서 C-2가 보이는 것으로 six-carbon chain moiety 가 C-2와 연결된 것을 알았다. 2개의 aromatic protons인 [ $\delta_{\text{H}}$  7.22 (H-4) 과 7.44 (H-5)]에서는 각각 [ $\delta_{\text{C}}$  182.1 (C-10), 133.1 (C-4a), 162.3 (C-3), 110.3 (C-9a), 119.1 (C-2)]과의 correlation, [ $\delta_{\text{C}}$  182.1 (C-10), 115 (C-10a), 137.6 (C-8a), 105 (C-7), 165 (C-6)]과의 correlation을 확인하여 C-4, C-5 그리고 C-10의 위치를 결정하였다.

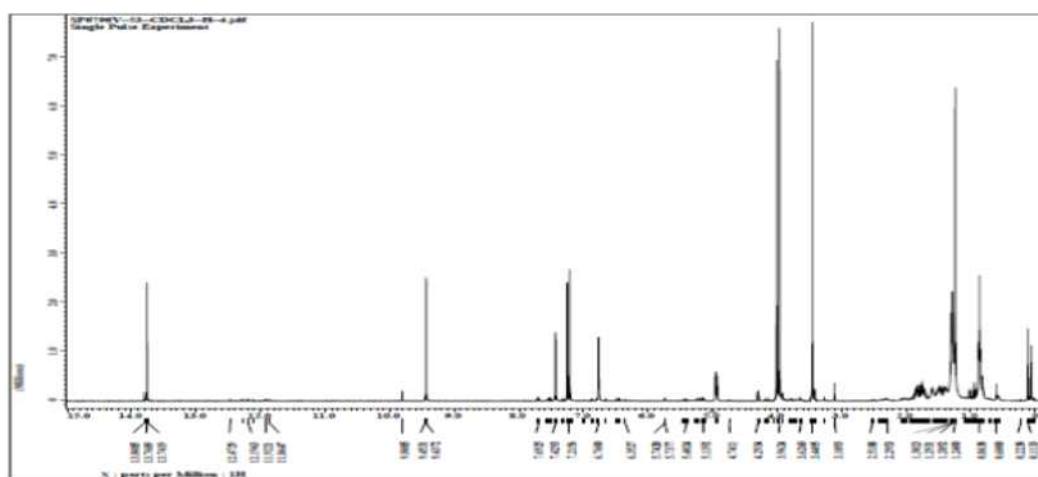


Fig. 3-32. SF6796V-53의  $^1\text{H}$ -NMR Spectrum

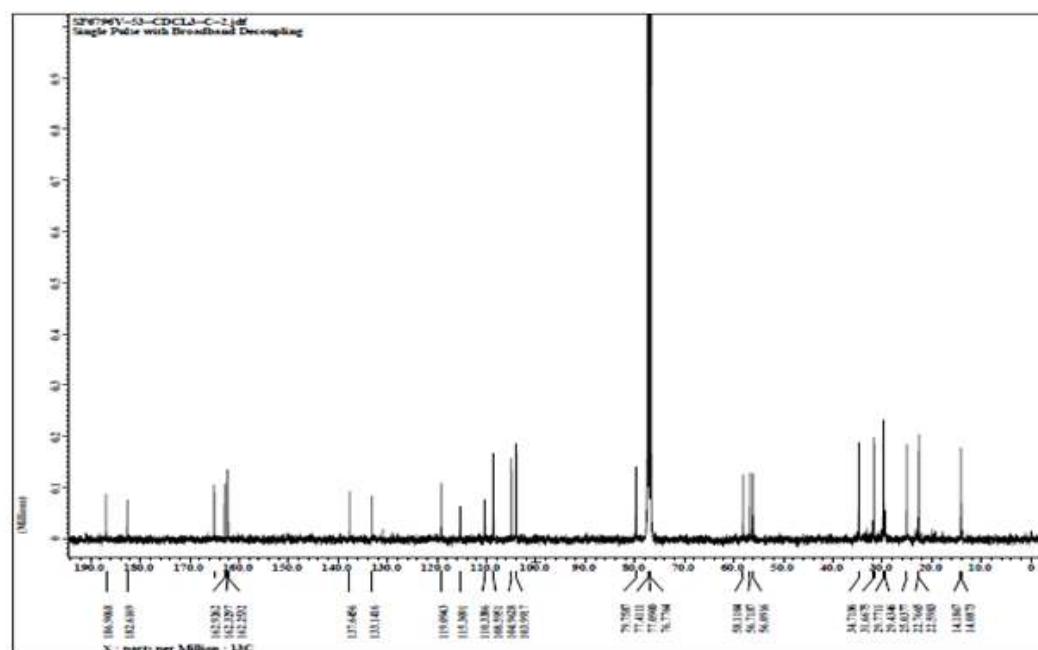


Fig. 3-33. SF6796V-53 의  $^{13}\text{C}$ -NMR Spectrum

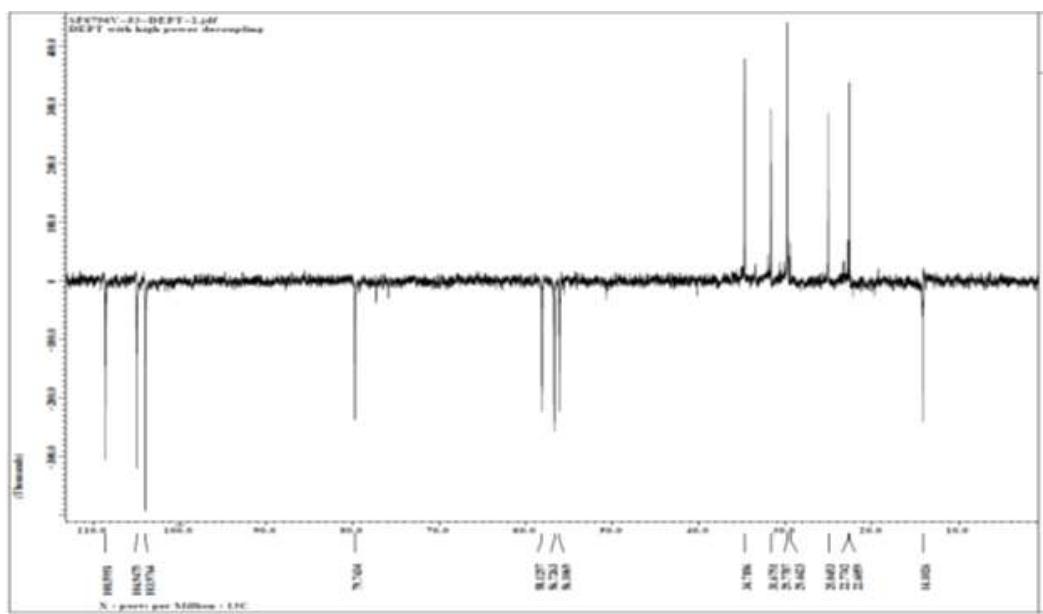


Fig. 3-34. SF6796V-53 의 DEPT-NMR Spectrum

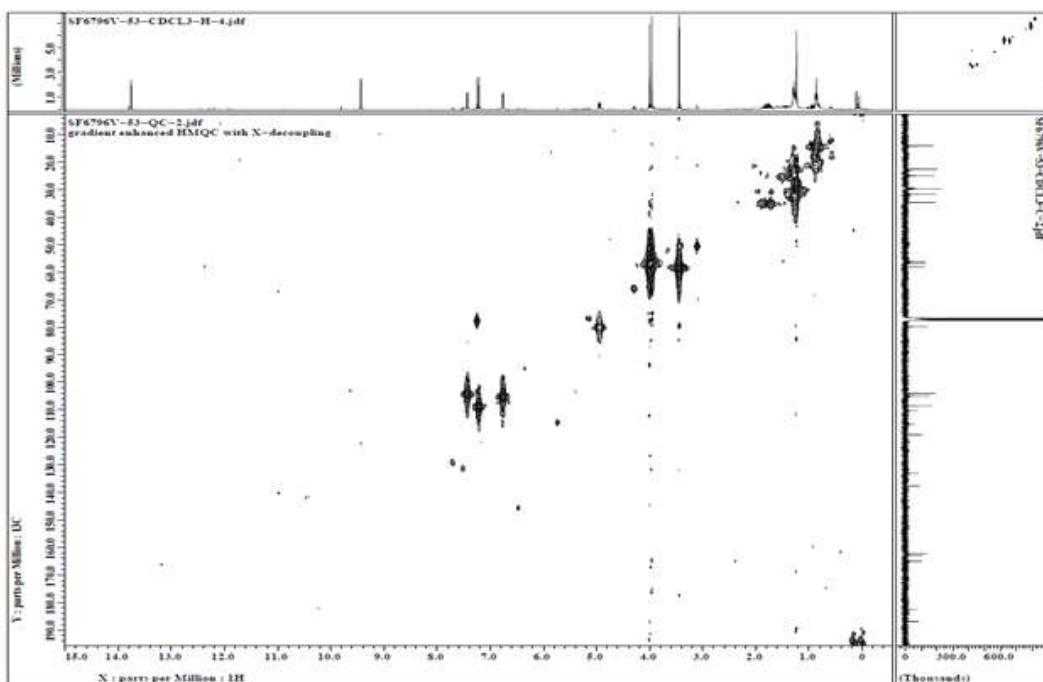


Fig. 3-35. SF6796V-53 의 HMQC-NMR Spectrum

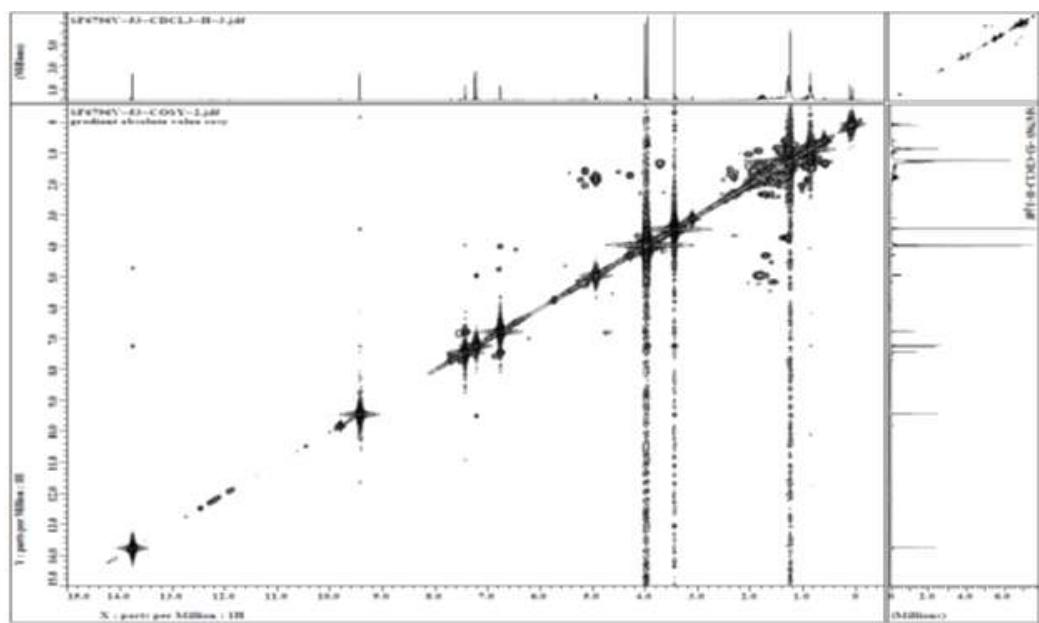


Fig. 3-36. SF6796V-53 의 COSY-NMR Spectrum

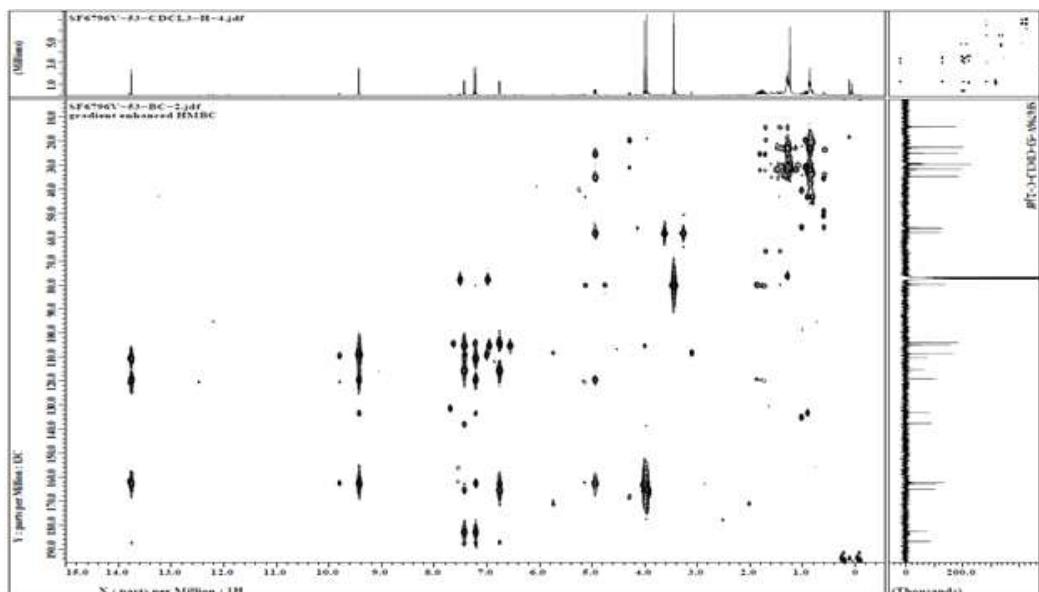


Fig. 3-37. SF6796V-53 의 HMBC-NMR Spectrum

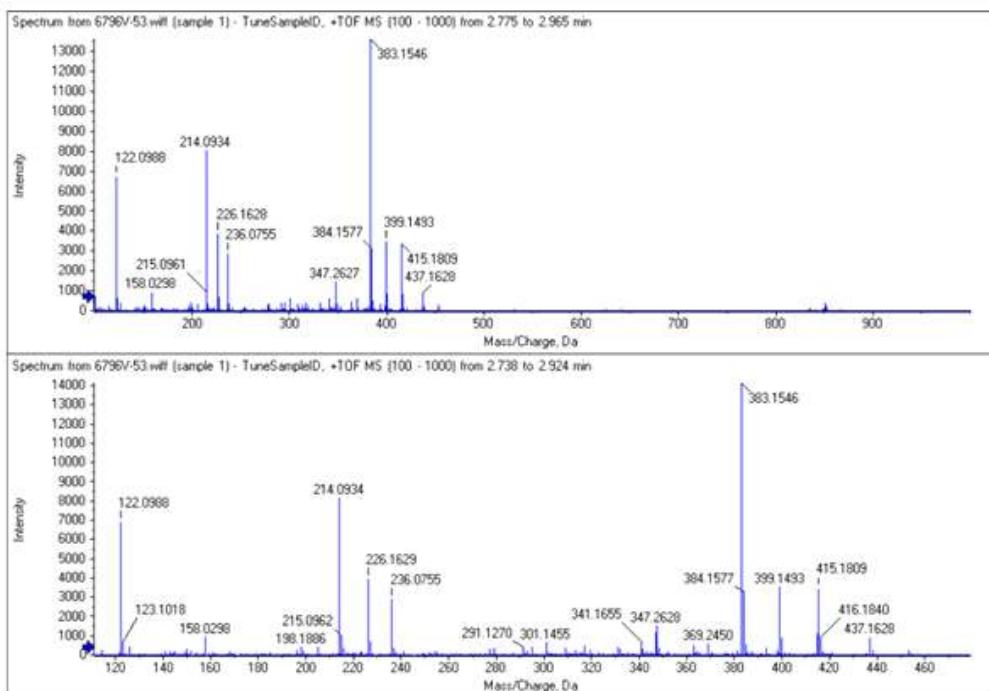


Fig. 3-38. SF6796V-53 의 HR-ESI-TOF mass spectrum

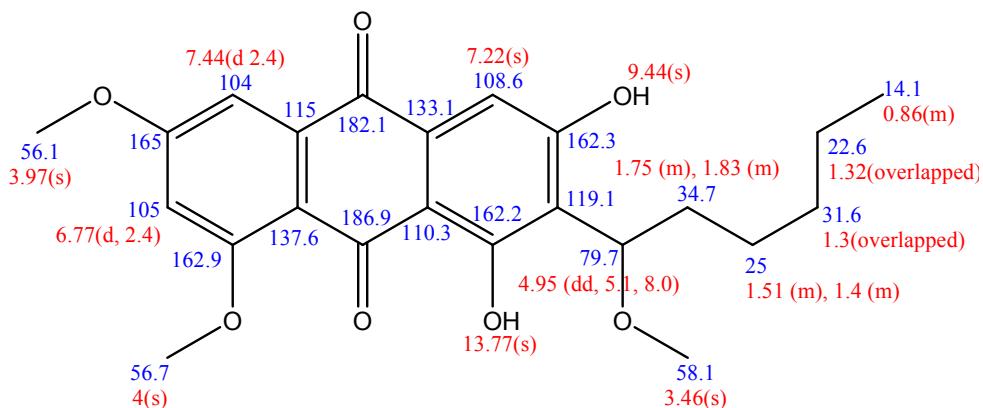


Table 3-14. SF6796V-53 의 <sup>1</sup>H-NMR 및 <sup>13</sup>C-NMR data (Recorded in CDCl<sub>3</sub>)

position	<sup>13</sup>C-NMR	<sup>1</sup>H-NMR (J in Hz)


<tbl\_r cells="3" ix="2" maxcspan="

position	$\delta C^{a,b}$	$\delta H^{a,c}$ ( $J$ in Hz)
10	182.1	
10a	115	
1'	79.7	4.95 (dd, 5.1, 8.0)
2'	34.7	1.75 (m), 1.83 (m)
3'	25	1.51 (m), 1.40 (m)
4'	31.6	1.30 (overlapped)
5'	22.6	1.32 (overlapped)
6'	14.1	0.86 (m)
6-OCH <sub>3</sub>	56.1	3.97 (s)
8-OCH <sub>3</sub>	56.7	4.00 (s)
1'-OCH <sub>3</sub>	58.1	3.46 (s)
1-OH		13.77(s)
3-OH		9.44(s)

<sup>a</sup>Recorded in CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup>100 MHz, <sup>c</sup>400MHz.

② SF6796V-522-1-2 (6,8-di-*O*-methyl averufin) 의 구조 결정

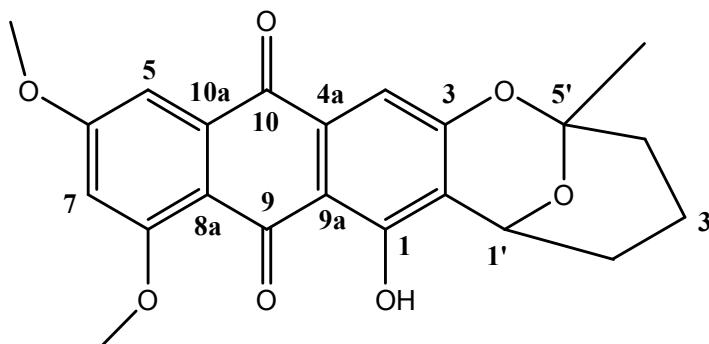


Fig. 3-40. Structure of SF6796V-522-1-2

화합물 SF6796V-552-1-2 는 <sup>1</sup>H NMR spectrum 상에서 hydrogen-bonded hydroxyl group [ $\delta_H$  13.55 (s, OH-1)], 2개의 *meta*-coupled aromatic protons [ $\delta_H$  7.46 (d,  $J$  = 2.4 Hz, H-5), 6.78 (d,  $J$  = 2.4 Hz, H-7)], 1개의 aromatic proton  $\delta_H$  7.21 (s, H-4), 2개의 methoxy groups [ $\delta_H$  4.01 (s, OCH<sub>3</sub>-8), 3.97 (s, OCH<sub>3</sub>-6)], 1개의 methyl group인  $\delta_H$  1.57(s, H-6'), 1개의 oxygenated methine인  $\delta_H$  5.38 (d,  $J$  = 3.1 Hz, H-1') 그리고 3개의 methylene groups 인 [ $\delta_H$  (1.87 (m, H-2'), 2.09 (m, H-2'), 1.65 (m, H-3'), 1.83 (m, H-4'), 2.06 (m, H-4')]를 확인하였다. <sup>13</sup>C, DEPT NMR spectrum 상에서 22개의 <sup>13</sup>C 신호를 확인하였고, 1개의 methyl group ( $\delta_C$  27.8) 2 개의 methoxy group ( $\delta_C$  56.1, 56.7), 3개의 methylene carbons ( $\delta_C$  16.0, 27.5, 36), 4개의 methine carbons ( $\delta_C$  67.2, 104.0, 105.0, 107.1), 2개의 carbonyl carbons ( $\delta_C$  182.7, 186.9)와 10개의 quaternary carbons ( $\delta_C$  100.9, 110.1, 115.4, 116.9, 132.6, 137.7, 159.7, 159.7, 162.9, 165.0)를 확인하였다.

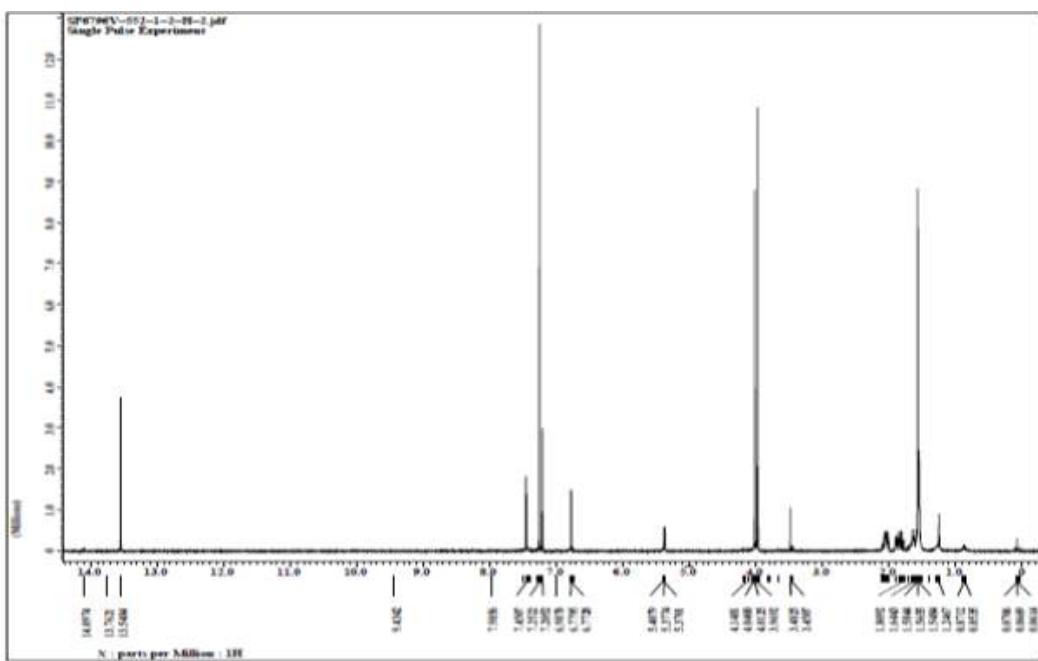


Fig. 3-41. SF6796V-552-1-2 의  $^1\text{H}$ -NMR Spectrum

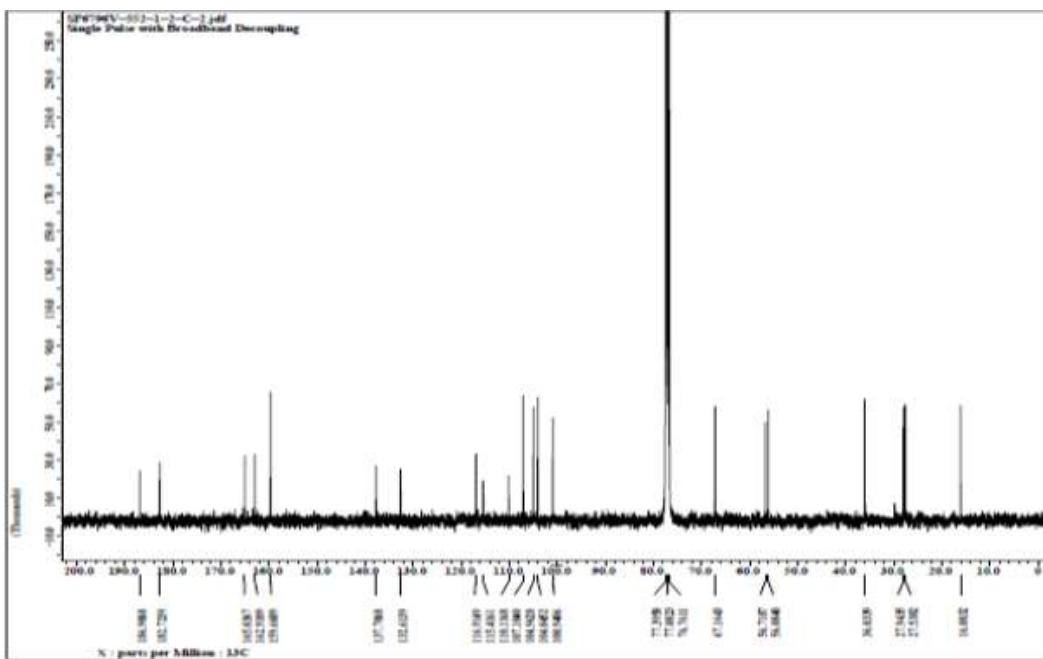


Fig. 3-42. SF6796V-552-1-2 의  $^{13}\text{C}$ -NMR Spectrum

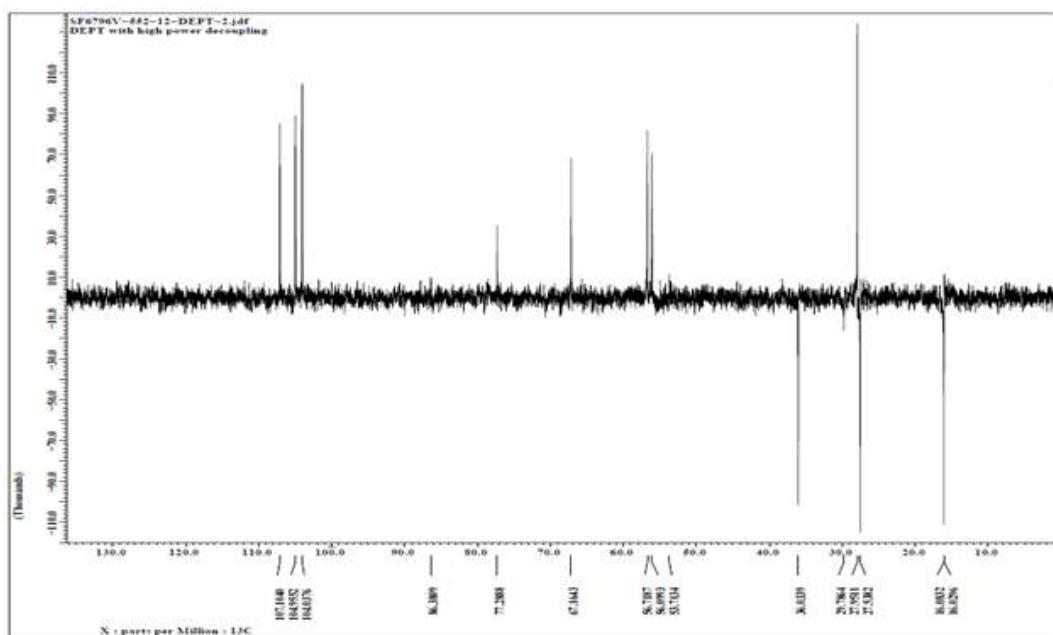


Fig. 3-43. SF6796V-552-1-2 의 DEPT-NMR Spectrum

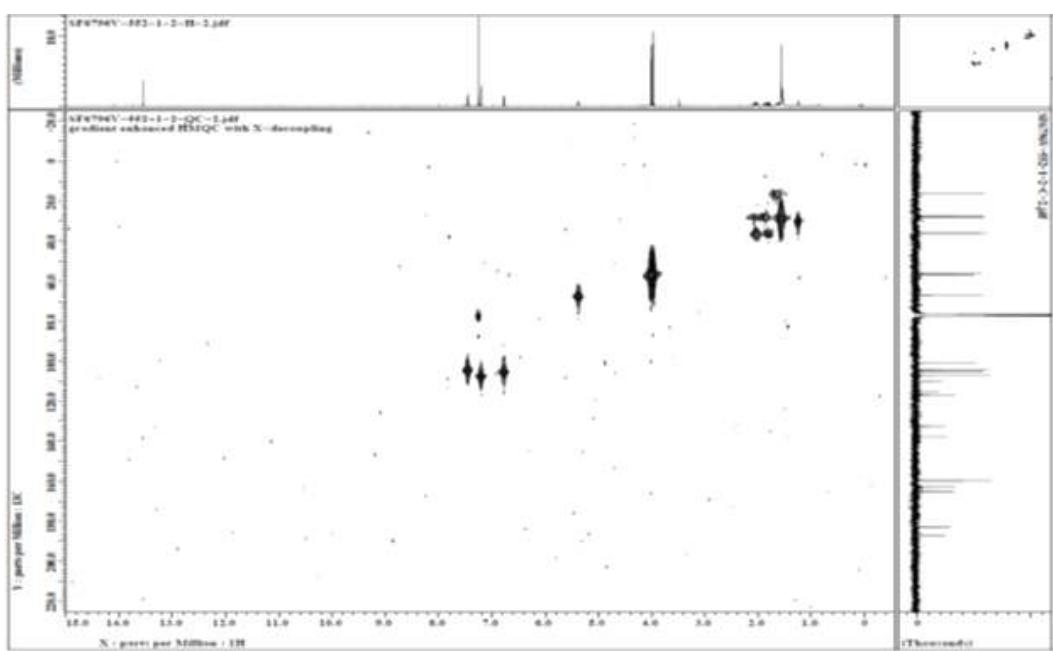


Fig. 3-44. SF6796V-552-1-2 의 HMQC-NMR Spectrum

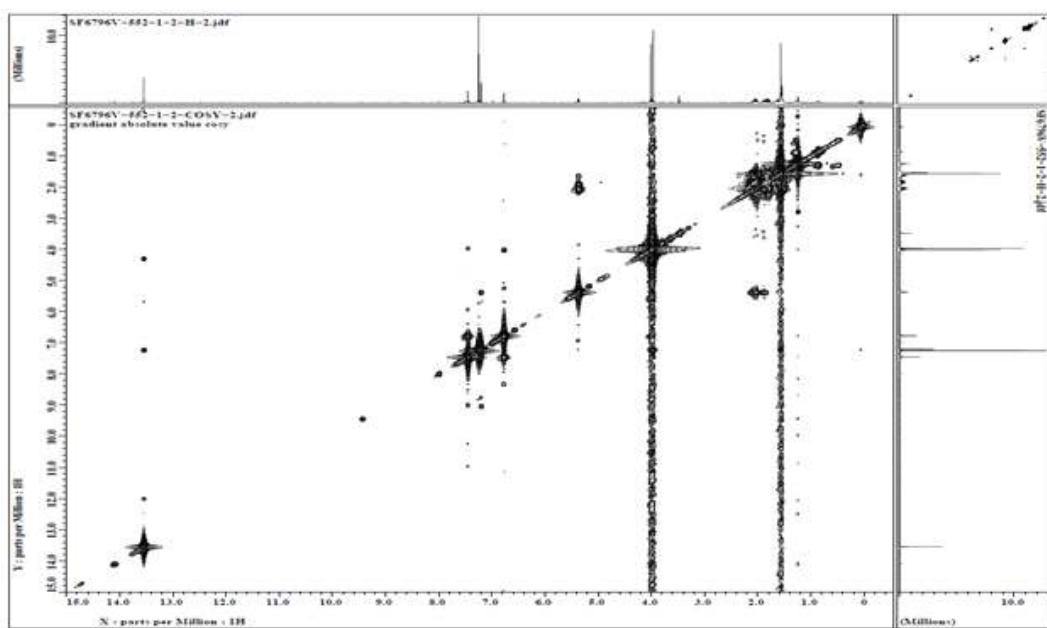


Fig. 3-45. SF6796V-552-1-2 의 COSY-NMR Spectrum

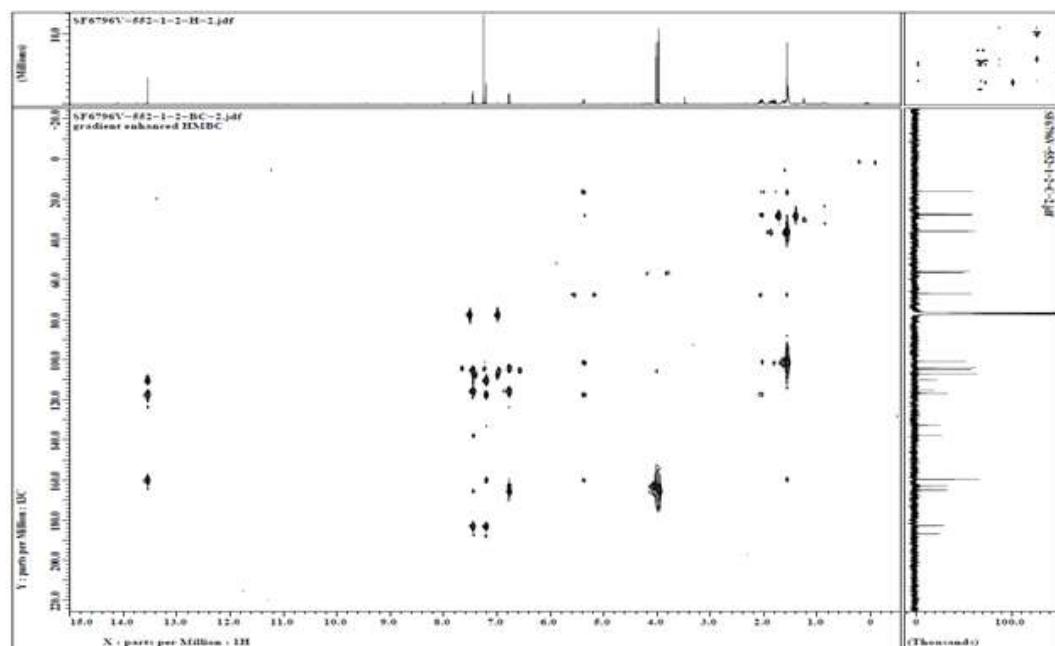


Fig. 3-46. SF6796V-552-1-2 의 HMBC-NMR Spectrum

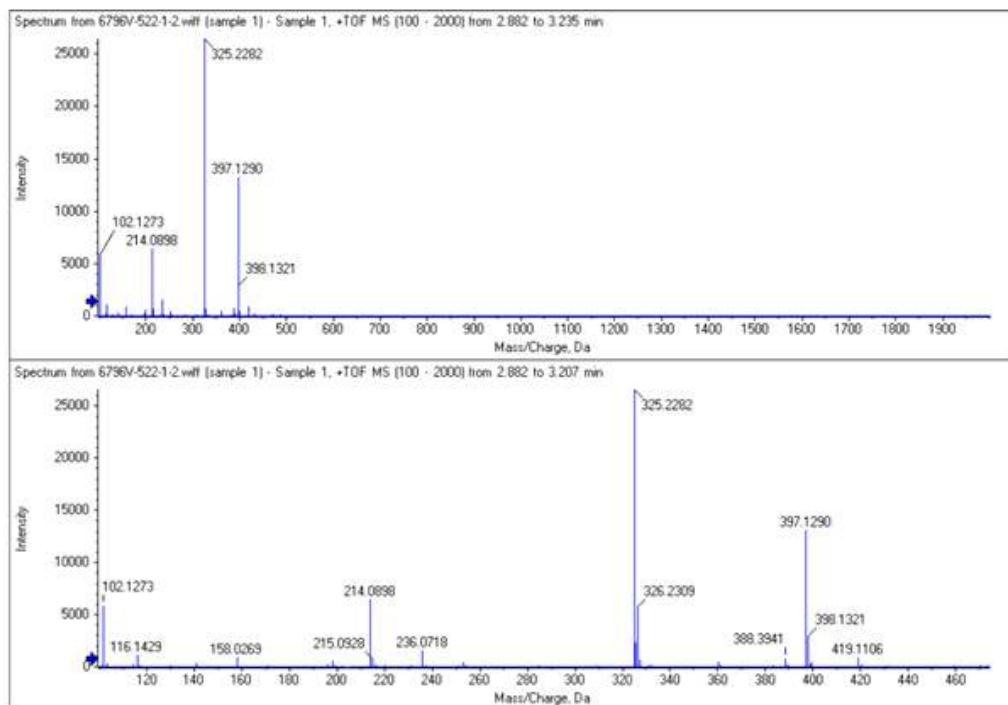


Fig. 3-47. SF6796V-552-1-2 의 HR-ESI-TOF mass spectrum Spectrum

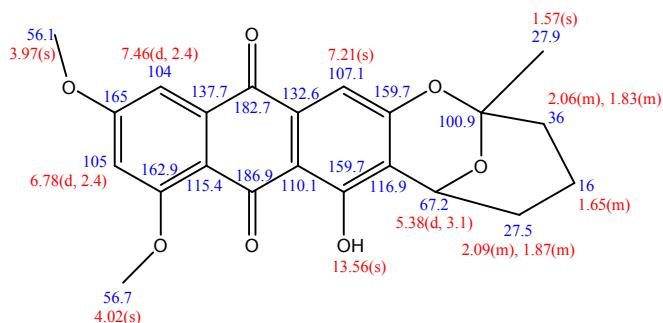


Fig. 3-48. SF6796V-552-1-2 의  $^1\text{H}$ -NMR 및  $^{13}\text{C}$ -NMR Spectrum (Recorded in  $\text{CDCl}_3$ )

Table 3-15. SF6796V-552-1-2 의  $^1\text{H}$ -NMR 및  $^{13}\text{C}$ -NMR data (Recorded in  $\text{CDCl}_3$ )

position	$\delta\text{C}^{\text{a},\text{b}}$	$\delta\text{H}^{\text{a},\text{c}}$ ( $J$ in Hz)
1	159.7	
2	116.9	
3	159.7	
4	107.1	7.21 (s)
4a	132.6	
5	104	7.46 (d, 2.4)
6	165	
7	105	6.78 (d, 2.4)
8	162.9	
8a	115.4	
9	186.9	

position	$\delta C^{a,b}$	$\delta H^{a,c}$ ( $J$ in Hz)
9a	110.1	
10	182.7	
10a	137.7	
1'	67.2	5.38 (d, 3.1)
2'	27.5	1.87 (m), 2.09(m)
3'	16.1	1.65 (m)
4'	36	1.83 (m), 2.06 (m)
5'	100.9	
6'	27.9	1.57 (s)
6-OCH <sub>3</sub>	56.1	3.97 (s)
8-OCH <sub>3</sub>	56.7	4.02 (s)
1-OH		13.56 (s)

<sup>a</sup>Recorded in CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup>100 MHz, <sup>c</sup>400MHz.

### ③ SF6796V-522-4 (sterigmatocystin) 의 구조 결정

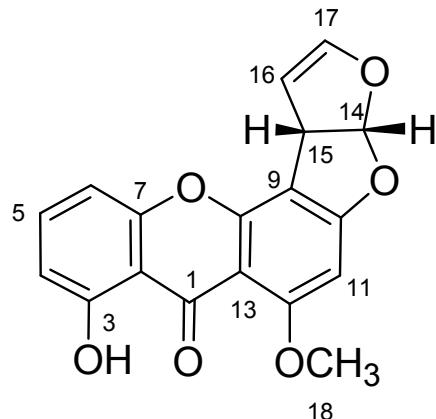


Fig. 3-49. Structure of SF6796V-522-4

화합물 SF6796V-552-4 는 <sup>1</sup>H NMR spectrum 상에서 4개의 aromatic protons인 [ $\delta_H$  6.44(s, H-11), 6.76 (d,  $J$  = 8.3 Hz, H-4), 6.83 (d,  $J$  = 7.3 Hz, H-6), 7.50 (t,  $J$  = 8.3 Hz, H-5)], 2개의 olefinic methine protons인 [ $\delta_H$  5.45 (t,  $J$  = 2.7 Hz, H-16), 6.50 (t,  $J$  = 2.7 Hz, H-17)], 1개의 oxygenated methine인  $\delta_H$  6.83 (d,  $J$  = 7.3 Hz, H-14), 1개의 hydroxyl group인  $\delta_H$  13.22(s, OH-3), 1개의 methoxy group인  $\delta_H$  3.99 (s, OCH<sub>3</sub>-18)을 확인하였다. <sup>13</sup>C NMR spectrum 상에서 18개의 <sup>13</sup>C 신호를 확인하였고, 1 개의 methoxy group ( $\delta_C$  56.9), 1개의 carbonyl carbon ( $\delta_C$  181.5), 1개의 methine carbon ( $\delta_C$  48.2), 1개의 oxygenated methine carbon ( $\delta_C$  113.3), 12개의 aromatic carbons ( $\delta_C$  90.6, 105.9, 106.1, 106.6, 109.1, 111.4, 135.8, 154.2, 155.1, 162.4, 163.4, 164.7), 2개의 olefinic carbons ( $\delta_C$  102.6, 145.5)을 확인하였다.

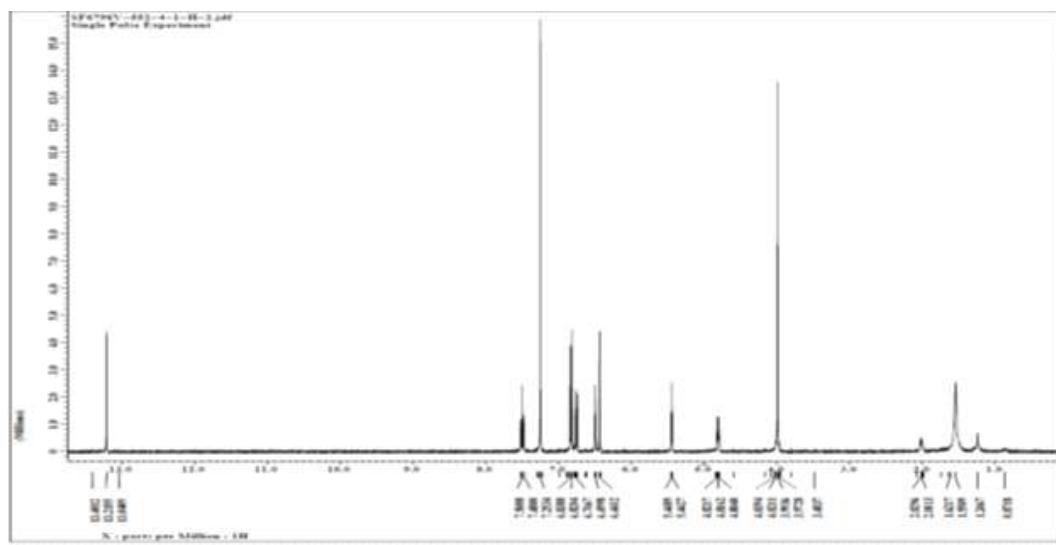


Fig. 3-50. SF6796V-552-4 의  $^1\text{H}$ -NMR Spectrum

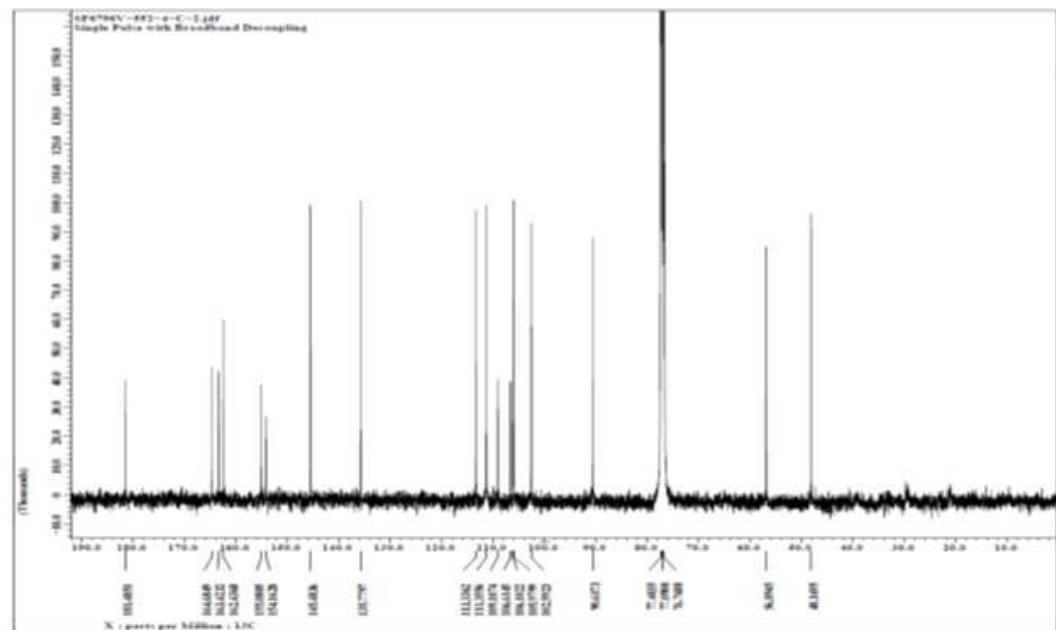


Fig. 3-51. SF6796V-552-4 의  $^{13}\text{C}$ -NMR Spectrum

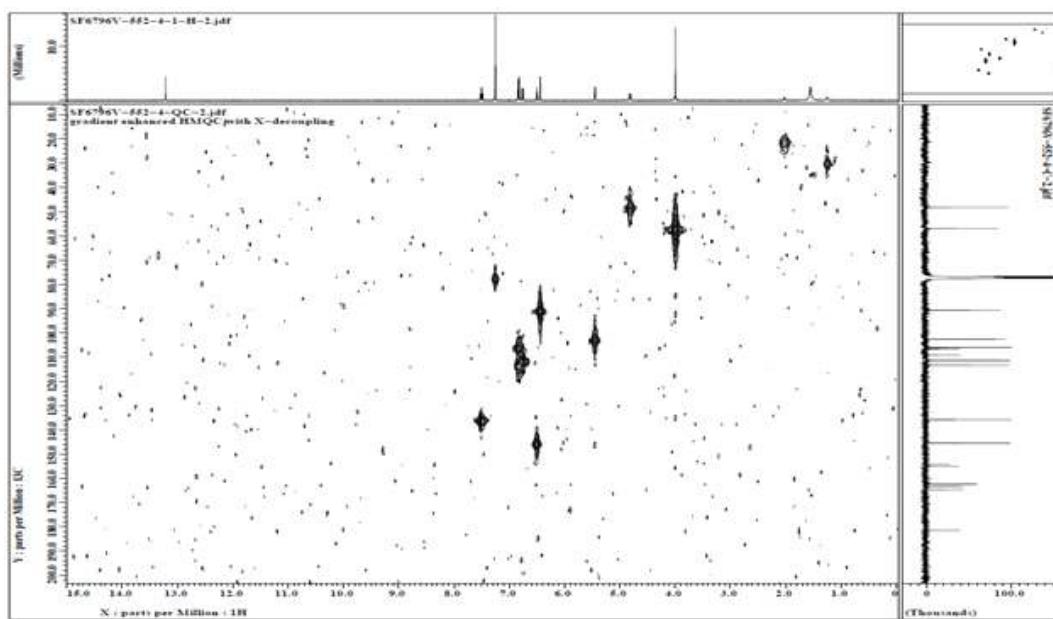


Fig. 3-52. SF6796V-552-4 의 HMQC-NMR Spectrum

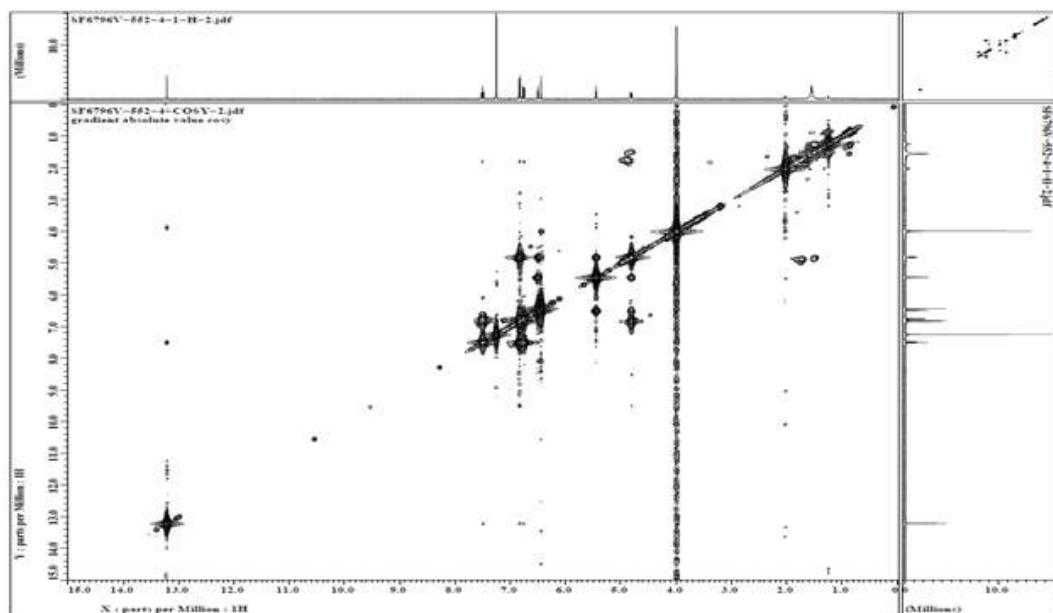


Fig. 3-53. SF6796V-552-4 의 COSY-NMR Spectrum

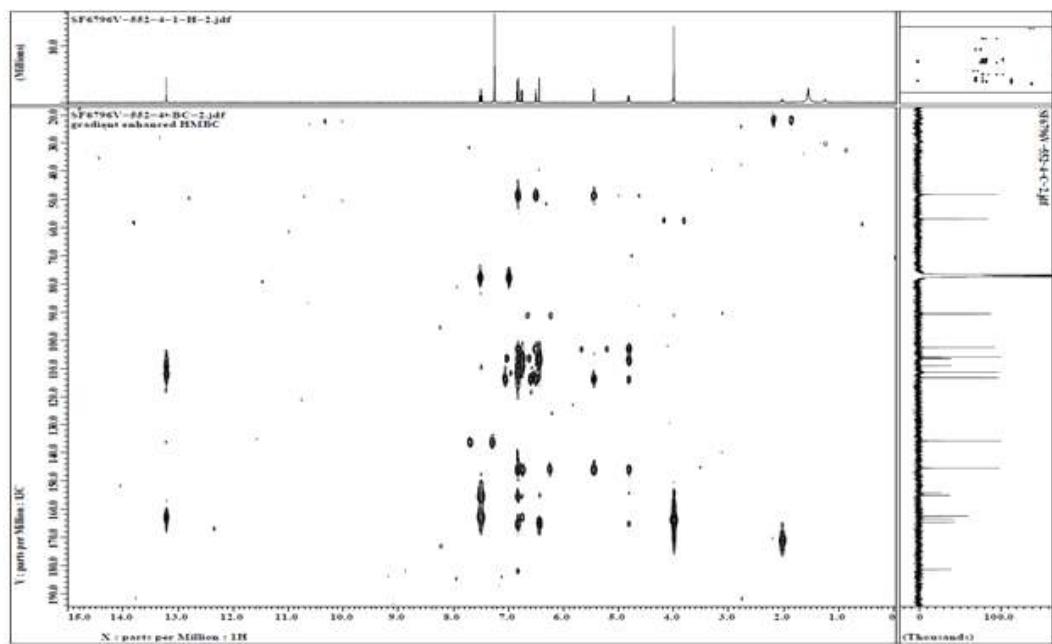


Fig. 3-54. SF6796V-552-4 의 HMBC-NMR Spectrum

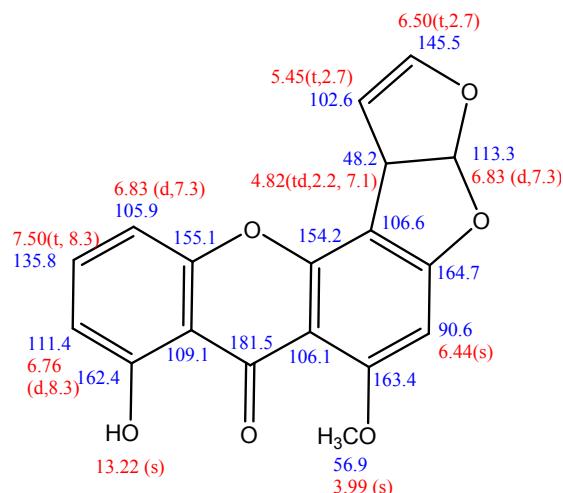


Fig. 3-55. SF6796V-552-4 의  $^1\text{H}$ -NMR 및  $^{13}\text{C}$ -NMR Spectrum (Recorded in  $\text{CDCl}_3$ )

Table 3-16. SF6796V-552-4 의  $^1\text{H}$ -NMR 및  $^{13}\text{C}$ -NMR data (Recorded in  $\text{CDCl}_3$ )

position	$\delta\text{C}^{\text{a},\text{b}}$	$\delta\text{H}^{\text{a},\text{c}}$ ( $J$ in Hz)
1	181.5	
2	109.1	
3	162.4	
4	111.4	6.76 (d, 8.3)
5	135.8	7.50 (t, 8.3)
6	105.9	6.83 (d, 7.3)
7	155.1	
8	154.2	
9	106.6	
10	164.7	
11	90.6	6.44(s)

position	$\delta C^{a,b}$	$\delta H^{a,c}$ (J in Hz)
12	163.4	
13	106.1	
14	113.3	6.83 (d, 7.3)
15	48.2	4.82 (td, 2.2, 7.1)
16	102.6	5.45 (t, 2.7)
17	145.5	6.50 (t, 2.7)
18	56.9	3.99 (s)
3-OH		13.22 (s)

<sup>a</sup>Recorded in CDCl<sub>3</sub>, <sup>b</sup>100 MHz, <sup>c</sup>400MHz.

#### 라. 결론 및 제언

극지 유래 대사체의 분석 및 구조 규명을 위한 SPE, filtration, solvent extraction, solvent partition 등의 조건을 확립하였다. LC의 이동상, 고정상 조건, MS의 이온화 조건 등 다양한 분석 조건의 변화를 통하여 최적의 분석 조건을 확립하였다. 확립된 조건으로 시료를 분석하여 대사체의 UV spectrum, MS spectrum을 확보하였고 문헌과의 비교를 통해 예측된 대사체의 DB를 구축하였다.

확보한 추출물 2종 유래 분획물에서 총 7종의 대사체를 분리하였으며, 분리된 7종 활성 후보 대사체 가운데 3종의 구조 분석을 완료하였다 (Fig. 3-56).

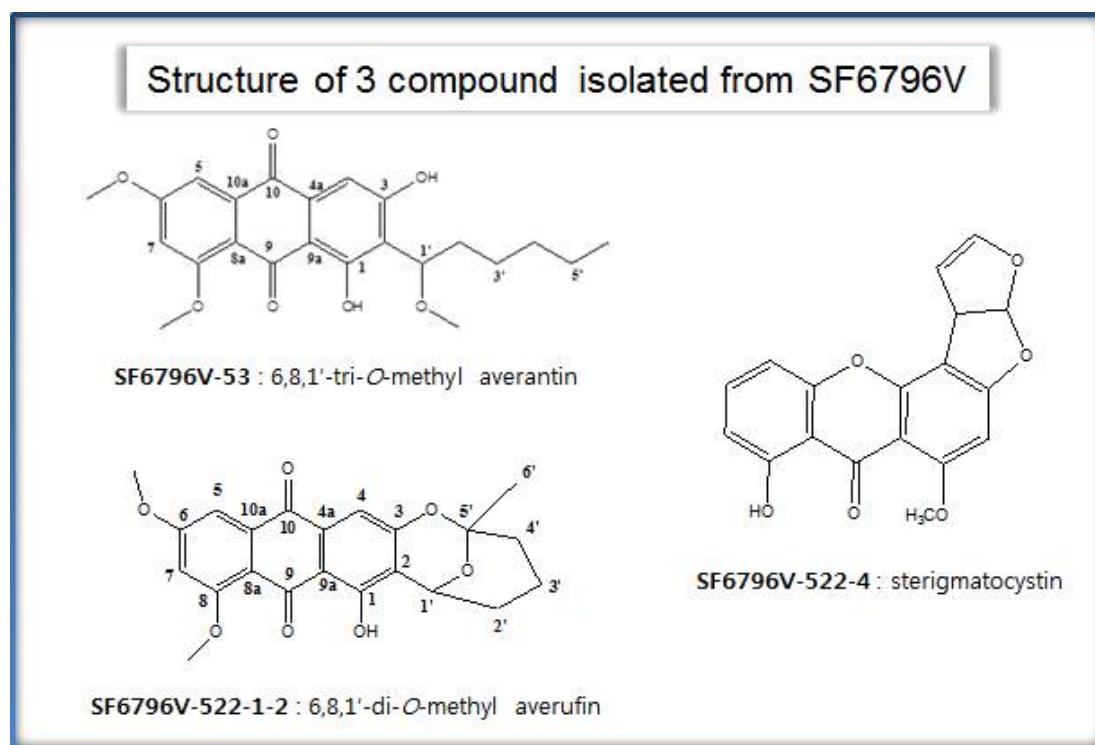


Fig. 3-56. Structure of 3 compound isolated from SF6796V

## 제2절 유용 대사체 활용화 기반 연구

### 1. 신규 대사체 유용성 확보

#### 가. 연구 목표

극지 해양생물 성분인 Lobaric acid, Lobarin, Lobastin의 면역 조절효과를 측정하기 위하여 *in vitro* 실험방법을 이용하여 면역조절 작용을 확인한다. 평활근세포에서 세포부착물질 억제, 지방전구세포에서 지방분화 억제효과를 확인한다.

#### 나. 연구 수행방법

##### (1) 항아토피 활성 연구

###### (가) 세포배양

RAW 264.7은 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin (10,000 U pen/mL, 10,000 µg strep/mL)의 혼합된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지에서 배양하였으며 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건을 유지하였다. 세포는 세포배양판 (microplate 또는 petridish)에 세포를 분주한 후 12시간 이상 CO<sub>2</sub> 세포 배양기에서 안정시킨 후 다양한 실험에 이용하였다.

###### (나) 세포 생존도 (Cell viability)

RAW 264.7 세포를 96-well plate에 각각 well당 4×105 세포로 분주하고 다양한 처리 조건으로 세포를 배양한 후에 세포 생존률을 측정하기 위해서 MTT (2mg/ml)를 25 µl 첨가한 후 5% 조건에서 2시간동안 배양하였다. 상등액을 제거하고 150 µl의 DMSO를 가하여 formazan을 용해시킨 후 microplate reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존률을 비교하였다.

###### (다) NO (nitric oxide) 생성 측정

생쥐의 대식세포주인 RAW 264.7을 1×10<sup>6</sup> cells/well을 분주하여 바닥에 부착하도록 하였다. 세포가 부착된 것을 확인하고 d-PBS로 세척한 후 양극해 생물 유래 물질을 다양한 농도로 처리하였다. 20시간 이상 배양한 후 배양 상등액 중의 NO 생성농도를 Ding 등(1998)의 방법에 따라 측정하였다. 100 µl 상등액을 취하여 96 well plate에 옮긴 후 각각의 well에 100 µl의 Griess 시약을 가하여 Microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO농도는 NaNO<sub>2</sub>를 사용하여 작성한 표준 곡선으로부터 계산하였다. Griess 시약은 중류수에 녹인 0.1% naphthylethyl-enediamine dihydrochloride, 와 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>용액에 녹인 1% sulfanilamide를 동량씩 혼합한 것으로 사용직전에 만들어 사용하였다.

#### (라) 총단백질의 분리 및 정량과 Western blot analysis

세포를 60 mm culture dish와 100mm culture dish에 plate당  $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$  세포를 분주하고 다양한 처리조건으로 세포를 배양하였다. 배양된 세포를 회수하여 d-PBS를 이용하여 세척하고 세포침전물에 lysis buffer (20 mM Hepes pH 7.0, 2mM EGTA, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 150mM NaCl, 20mM  $\beta$ -glycerophosphate, 5 ng/ml leupeptin, 0.1 TIU/ml aprotinin) 50~100  $\mu\text{l}$  넣고 침전물을 녹인 후에 ice에 30~60분간 방치해 놓은 후에 원심분리 (4°C, 13000 rpm, 10분)하여 상등액을 취해 protein assay kit (BioRad, USA)를 이용하여 단백질의 양을 정량하였다.

실험에 이용할 20~50  $\mu\text{g}$ 의 단백질을 적당한 농도의 SDS-PAGE gel에 전기 영동한 후 Hybond-ECL nitrocellulose membrane으로 overnight transfer하였다 단백질이 옮겨진 membrane은 1시간 동안 상온에서 5% skim milk in TBST (Tris Buffered Saline with Tween; 25 mM Tris, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.05% Tween-20, pH 8.0)를 blocking buffer로 만들어 처리한 후 primary Ab in blocking buffer를 1시간 동안 상온에서 처리하거나 혹은 4°C에서 12시간이상 처리하였다. TBST로 6회 세척 후 HRP-conjugated secondary Ab in blocking buffer를 1시간 동안 상온에서 처리하였다. TBST로 6회 세척 후에 detection reagent (ECL)를 가한 후 Kodak scientific imaging film에 노출시켜 각각의 단백질 발현을 확인하였다.

#### (마) Total RNA의 분리 및 정량

RAW 264.7 세포를 60 mm culture dish에 plate당  $2 \times 10^5$  세포를 분주하고 다양한 처리조건으로 세포를 배양하였다. 배양된 세포로부터 상등액을 제거하고 d-PBS를 이용하여 세척하고 Trizol reagent (Invitrogen, USA) 0.5 ml을 가하여 culture dish 바닥에 점도가 사라질 때까지 pipetting하고 e-tube에 옮겼다. 5분 동안 다 녹을 정도로 inversion한 후에 chloroform을 200  $\mu\text{l}$ 를 가하고 15초 동안 흔들어주었다. 상온에서 10분 정도 방치한 후 11600rpm, 15분 동안 4°C 원심분리 하였다. 상등액을 새로운 e-tube에 옮긴 후 isopropanol을 상층액과 동량으로 가하고 inversion한 후 상온에서 15분 방치하고 11600rpm, 15분 동안 4°C 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 pellet이 완전히 건조되지 않은 상태에서 20~40  $\mu\text{l}$  DEPC가 처리된 멸균 3차 중류수에 용해시켰다. 이때 추출된 total RNA는 UV spectrophotometer를 이용하여 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 보정하고, -70°C에 냉동 보관 하였다.

#### (바) Quantitative Real-Time PCR

RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction)을 이용하여 cytokines의 mRNA 발현량을 측정하였다. 추출된 total RNA는 RevertAidTM H Minus first strand cDNA synthesis kit (Fermentas, USA)를 이용하여 mRNA 발현량을 측정하였다. 먼저 reverse transcription step인 total RNA를 cDNA로 만드는 과정으로 추출한 total RNA를 2~5 µg과 oligo dT primer 1 µl, DEPC-treated water를 넣어서 total 10 µl가 되게 만든 후 65°C에서 5분 동안 반응시킨 후 4°C에서 2분간 방치하였다. 여기에 5×reaction buffer (final 1×), 10mM dNTP Mixture 2 µl, RNase inhibitor (20 units/µl) 1 µl, M-MuLV Reverse Transcriptase (200 units/µl) 1 µl 를 첨가한 후에 42°C에서 60분, 70°C에서 5분간 반응시킨 후에 생성된 cDNA mixture 1 µl를 PCR 반응에 사용하였다. cytokines 발현을 확인하기 위한 PCR을 위하여 1 µl의 DNA와 PCR mixture (dNTP Mixture (final 300 uM), 10×EF taq buffer (final 1×), EF taq polymerase (final 2.5 units/100 µl), PCR primer, DW)를 혼합하여 총 25 µl의 반응액을 25~30회 반복하는 PCR cycle로 반응하였다. 이때 각각의 RT-PCR에서 동량의 RNA가 사용되었음을 확인하기 위하여 house keeping gene인 GAPDH를 사용하여 함께 PCR을 진행하였다.

real-time PCR을 통하여 TNF-α, IL-6, IL-1β and IL-18 mRNA 발현량을 확인하였다. 추출된 total RNA는 RevertAidTM First Strand cDNA synthesis kit (Fermentas, USA)를 이용하여 cDNA로 변환하였다. SYBR Green과 특이적인 primers(Xenotech, USA)를 이용하여 real-time PCR을 수행하였다. 사용된 primer는 다음과 같다.

TNF-α (forward, 5'-CCCTCACACTCAGATCATCTTCT-3' ; reverse, 5'-GCTACG ACGTGGGCTACAG-3'); IL-6 (forward, 5'-CCACGGCCTTCCCTACTTC-3' ; reverse, 5'-TTGGGAGTGGTATCCTCTGTGA-3'); IL-1β (forward, 5'-TTGACGGGACC CCAAAAGATG-3' ; reverse, 5'-TGGACAGCCCAGGTCAAAG-3'); IL-18 (forward, 5'-CTGAAGAAAATGGAGACCTGGAA-3' ; reverse, 5'-TCCGTATTACTGCCGTT GTACAGT-3'); GAPDH (forward, 5'-TGC ATC CTG CAC CAC CAA-3'; reverse, 5'-TCC ACG ATG CCA AAG TTG TC-3').

#### (사) 핵 단백질의 분리 및 정량

세포를 100mm culture dish에 plate당 2×10<sup>6</sup> 세포로 분주하여 24시간동안 안정화시킨 후 다양한 처리 조건으로 세포를 배양하였다. 핵 추출물을 분리하기 위해 세포를 d-PBS로 세척하고 cell pellet에 buffer A (10 mM HEPES pH 7.9, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 1mM DTT, 1mM PMSF, 0.1% NP-40)를 200µl 넣고 icee에서 10분 동안

방치하여 세포막을 파괴하였다. 그 후 원심분리 ( $1,500 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 10분)하여 상등액을 취하며 세포질을 정량하였다. Pellet에  $200\mu\text{l}$ 의 buffer A' (Buffer A without NP-40)를 넣고 혼탁하여 다시 원심분리 ( $1,500 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 10분) 하였다. 다시 상등액을 제거하고  $50\mu\text{l}$ 의 buffer C (20mM HEPES pH 7.9, 0.2M NaCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM EDTA, 25% Glycerol, 1mM PMSF)를 넣고 핵으로부터 핵 단백질을 추출하기 위하여 40분 동안 ice에 방치하였으며 매 10분 간격으로 격렬하게 15초 동안 교반하여 주었다. 그 다음 원심분리 (14,000rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ , 10분)하고 핵 단백질이 포함된 상등액을 취하여 Bio-Rad protein assay kit를 이용하여 핵 추출물을 정량하였다.

#### (아) Immunofluorescence

6 well plate 위에 멸균시킨 slide를 넣고 그 위에 세포를  $1 \times 10^6$  cell/ml로 분주하여 12시간 동안 세포를 안정화 시킨 후 다양한 처리조건으로 세포를 배양하였다. PBS로 세포를 세척한 후 3.7% formaldehyde가 포함된 PBS로 상온에서 15분 동안 세포를 고정시킨다. 고정액을 버리고 PBS로 5번 세척한 후에 차가운 100% 메탄올을 이용하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 10분동안 permeabilization 시킨 후 PBS로 세포를 1시간 동안 상온에서 blocking 한 후 p65 1차 항체를 처리하여  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 overnight 한다. 어두운 곳에서 fluorochrome이 conjugation 된 2차 항체를 1시간 동안 처리한 한다. 마운팅 배지를 첨가한 후 커버 글라스를 덮고 현미경으로 관찰하였다. 형광 염색 표본 당 세포 형태가 잘 유지된 곳에서 4회씩 p65 발현 강도를 Confocal microscope로 관찰하고 영상분석기를 이용하여 각각의 형광의 발현 정도를 측정하였다.

### 다. 연구 결과

#### (1) 항아토피 활성 연구

##### (가) 양극해 생물 유래 물질의 면역세포 기능변화 및 분비물질 생성조절 연구

① 대식세포주 Raw 264.7에서 Lobaric acid에 의한 염증 매개 물질 변화 확인

② RAW 264.7 세포에서 Lobaric acid에 의한 cytokine 발현 확인

대식세포주 RAW 264.7 세포가 분비하는 독성물질의 하나인 cytokine 생성에 대한 Lobaric acid의 영향을 알아보기 위하여 대식세포주인 Raw 264.7 세포에 0.1, 1 and 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 Lobaric acid를 처리하여 cytokine 생성량을 확인하였다. lobaric acid를 처리한 구간에서 cytokine 생성이 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다.

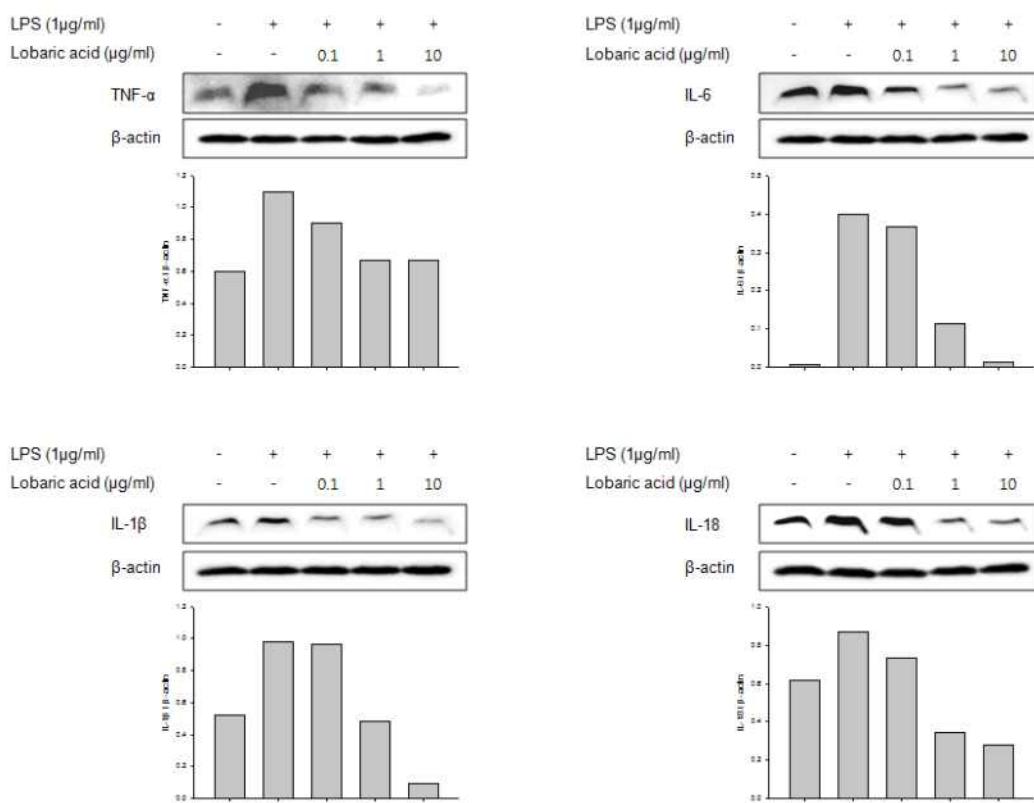


Fig. 3-56. The effect of Lobaric acid on the inhibition of cytokines mouse peritoneal macrophages. Raw264.7 cells were pre-treated with various doses (0.1–10  $\mu$ g/ml) of Lobaric acid for 2 hrs, further incubated with medium alone or were treated with LPS 1  $\mu$ g/ml for 24hrs. The cytokine level was measured by Western blot analysis.

#### ④ RAW 264.7에서 Lobaric acid에 의한 cytokine mRNA 확인

대식세포주에서 Lobaric acid에 의하여 cytokine의 mRNA level을 알아보기 위하여 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  그리고 IL-18의 mRNA level을 real-time PCR을 통하여 확인하였다. cytokine 모두 lobaric acid의 처리에 의해 mRNA 생성이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

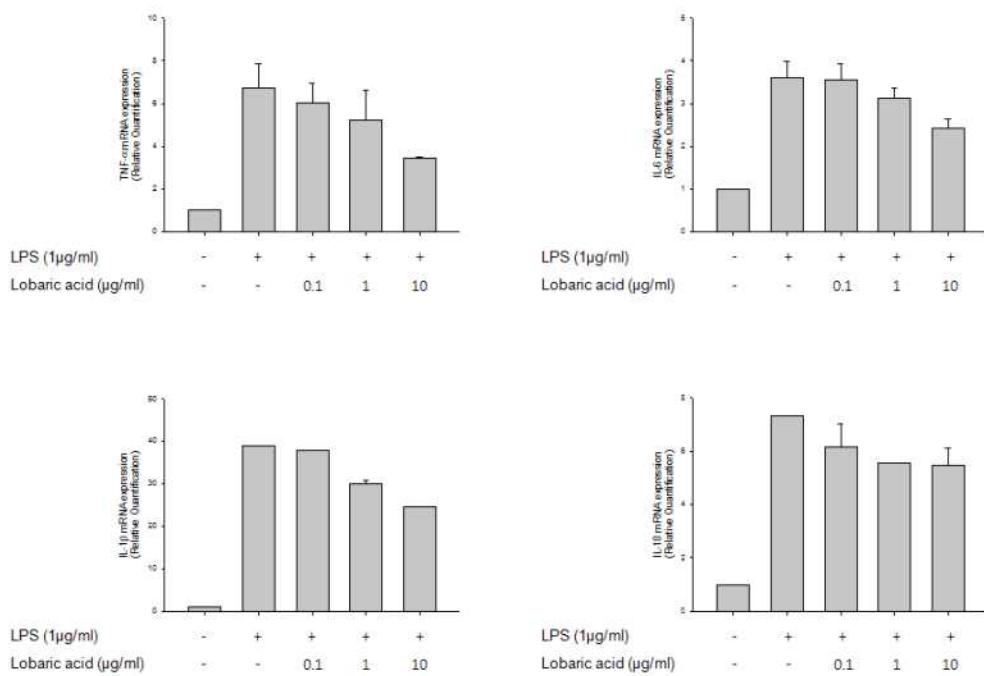


Fig. 3-57. Effect of lobaric acid on the mRNA levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  and IL-18 in LPS-induced mouse peritoneal macrophages. Mouse peritoneal macrophages were pretreated with lobaric acid for 2 h prior to stimulation of LPS (1  $\mu$ g/mL) for 24 h. The mRNA expression of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , and IL-18 was determined by RT-PCR.

#### ④ RAW 264.7에서 Lobaric acid에 의한 NLRP3 inflammasome 변화 확인

대식세포주에서 NLRP3 inflammasome<sup>o</sup> Lobaric acid에 의하여 영향을 받는지 알아보기 위하여 NLRP3 inflammasome components의 발현을 western blot assay를 통하여 확인하였다. NLRP3, ASC, caspase-1 그리고 IL-1 $\beta$ 은 lobaric acid 농도 의존적으로 감소하는 것으로 확인되었다.

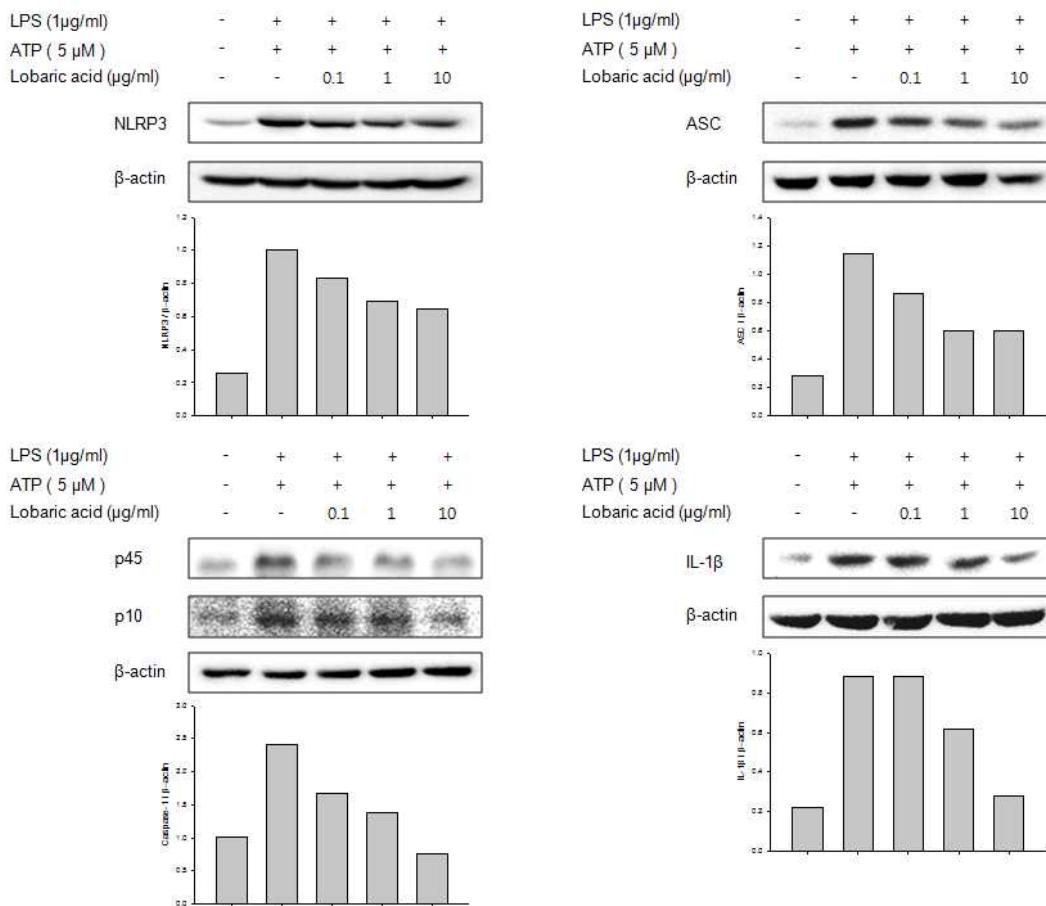


Fig. 3-58. Effect of lobaric acid on the NLRP3 expression in LPS-induced mouse peritoneal macrophages. Cells were pretreated with indicated concentrations of lobaric acid for 2 h, followed by treatment with LPS(1  $\mu$ g/ml) for 8 h. Cell lysates were prepared, and the level of NLRP3 expression was determined by Western blot analysis.

② 대식세포주 Raw 264.7에서 Lobastin에 의한 염증 매개 물질 변화 확인

ⓐ RAW 264.7 세포에서 Lobastin에 의한 MAPKs 발현 확인

대식세포주에서 MAPK가 Lobastin에 의하여 영향을 받는지 알아보기 위하여 MAPK의 발현을 western blot assay를 통하여 확인하였다. MAPK는 lobastin에 의하여 농도 의존적으로 감소하는 것으로 확인되었다.

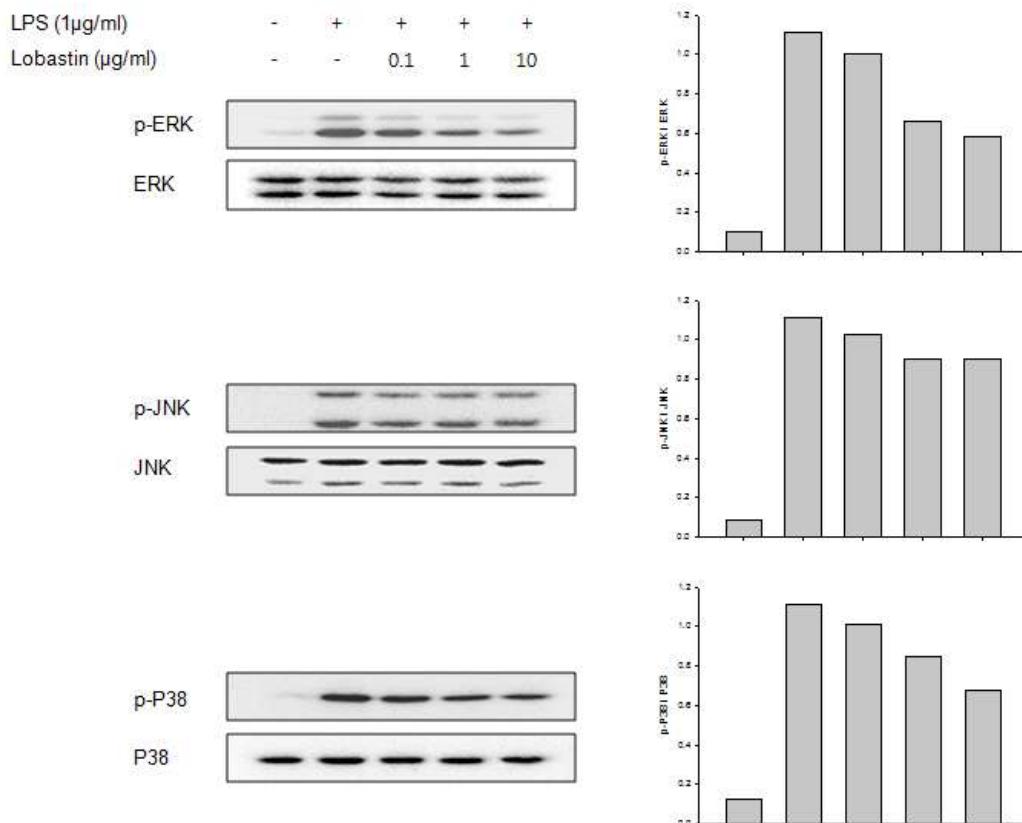


Fig. 3-59. The effect of Lobastin on the inhibition of MAPK in macrophages. Raw264.7 cells were pre-treated with various doses (0.1–10  $\mu$ g/ml) of Lobastin for 2 hrs, further incubated with medium alone or were treated with LPS 1  $\mu$ g/ml for 24hrs. The cytokine level was measured by Western blot analysis.

#### ④ RAW 264.7 세포에서 Lobastin에 의한 iNOS와 Cox-2 발현 확인

대식세포주에서 Cox-2 그리고 iNOS가 Lobastin에 의하여 영향을 받는지 알아보기 위하여 발현을 western blot assay를 통하여 확인하였다. Cox-2와 iNOS는 lobastin에 의하여 농도 의존적으로 감소하는 것으로 확인되었다.

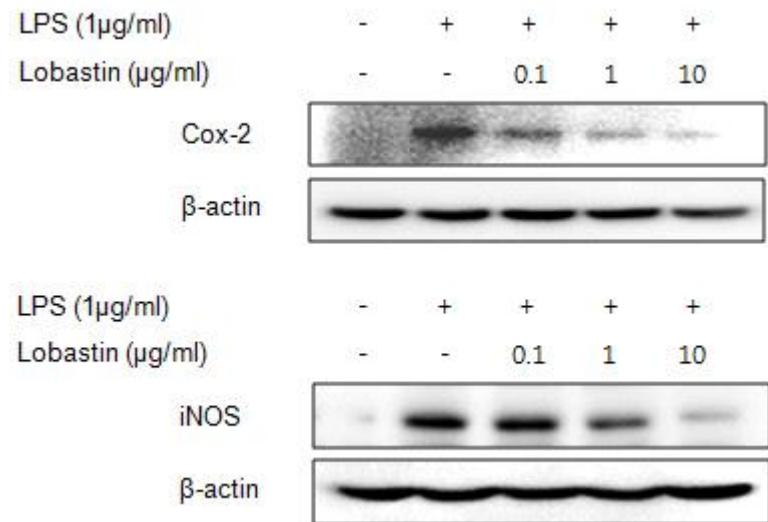


Fig. 3-60. Effect of lobastin on protein levels of iNOS and Cox-2 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cells were pretreated with lobastin for 2 h prior to stimulation of LPS (1  $\mu$ g/mL). The protein levels of MAPKs, Cox-2, and iNOS were measured by Western blot assay.

#### (나) 극지생물 추출물의 면역조절 효과측정

① 대식세포주 Raw 264.7에서 극지생물 추출물에 의한 염증 매개 물질 변화 확인

ⓐ RAW 264.7 세포에서 극지생물 추출물에 의한 nitric oxide 발현조절 확인

대식세포가 분비하는 독성물질의 하나인 nitric oxide 생성에 대한 극지생물 추출물의 영향을 알아보기 위하여 대식세포주인 Raw 264.7 세포에 다양한 농도(0.1, 1, 10  $\mu$ g/ml)의 2015년 3월 12일 2013 ROSS SEA 해양미생물 추출물 sample을 처리하여 nitrite 생성량을 확인하였다. 대부분의 추출물들이 nitrite 감소 효과가 없었으며, 일부 추출물에서만 약간의 감소 효과가 있었다.

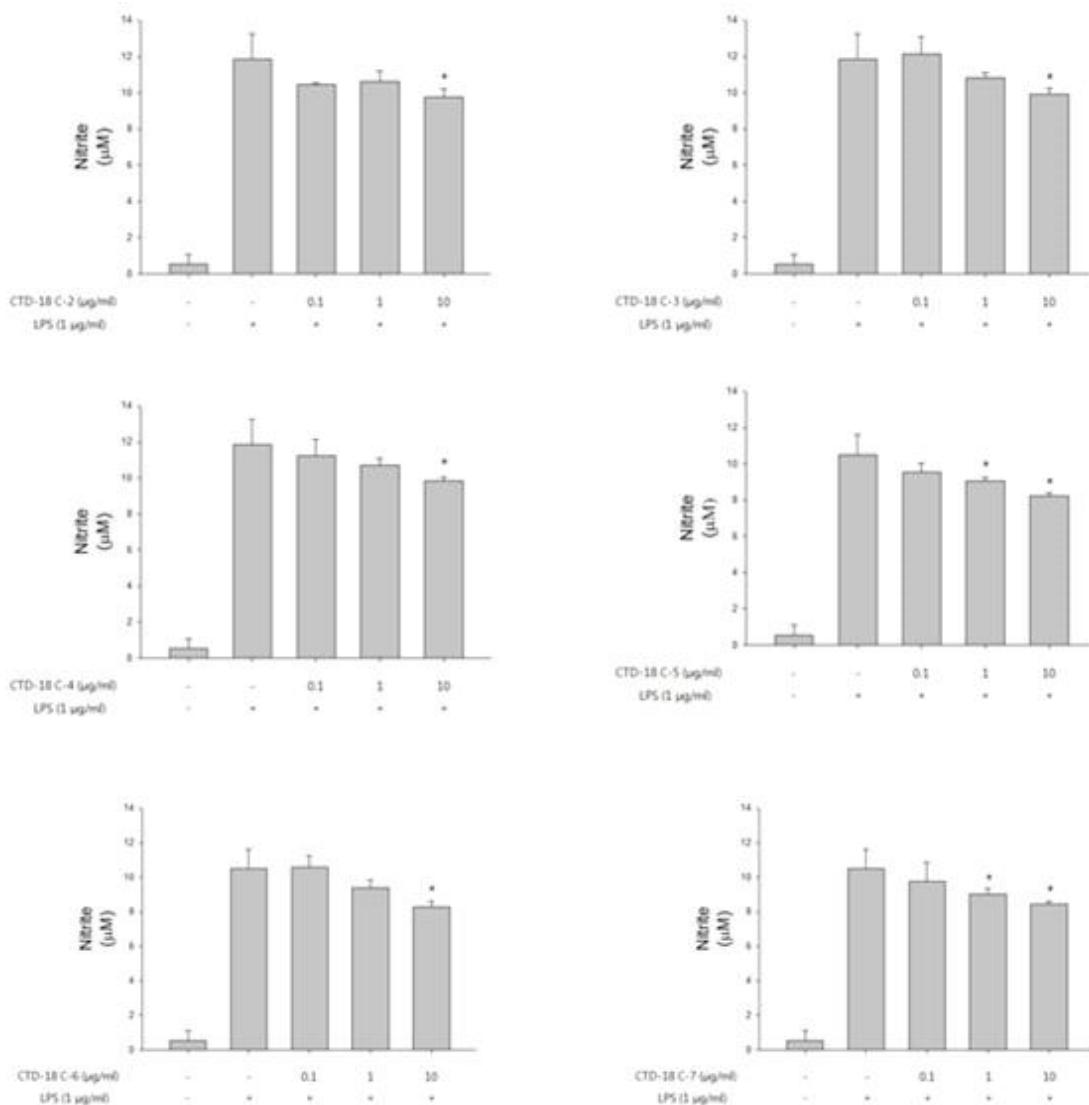


Fig. 3-61. The Effect of lichen extracts on the Nitrite production in macrophages. Raw 264.7 cells were pre-treated with indicated concentrations of lichen extracts for 2 hrs and then incubated with LPS (1 $\mu$ g/ml) for 24 hrs. Culture supernatants were collected and the levels of Nitrite were obtained by the Griess method. Results are the means  $\pm$  S.E. of representative of three independent experiments.

## (다) 극지생물 추출물의 면역조절 효과측정

## ① 아토피질환에서 Ramalin에 의한 염증 매개 물질 변화 확인

## ⓐ 아토피질환에서 Ramalin에 의한 inflammatory mediator 발현조절 확인

Atopy 질환에서 HaCaT세포가 분비하는 mediator 생성에 대한 Ramalin의 영향을 알아보기 위하여 HaCaT세포에 0.1, 0.5 and 1 µg/ml의 농도로 Ramalin를 처리하여 mediator 생성량을 확인하였다. Ramalin를 처리한 구간에서 mediator 생성이 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다.

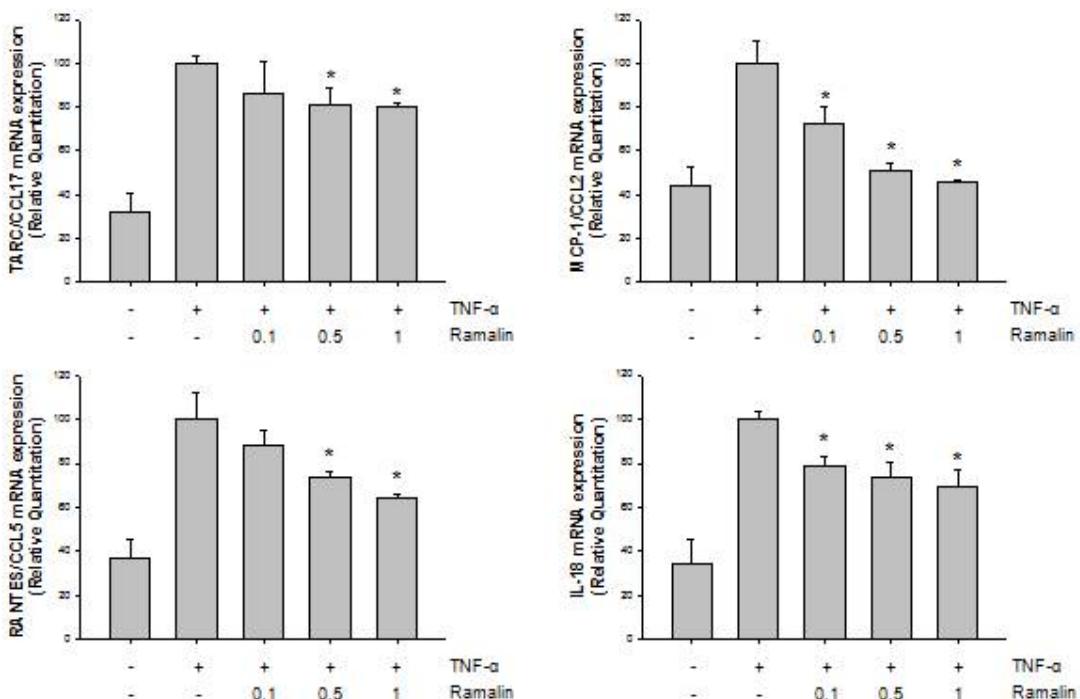


Fig. 3-62. Effect of Ramalin on the mRNA levels of inflammatory mediator in TNF- $\alpha$ -induced HaCaT cells. HaCaT cells were pretreated with Ramalin for 2 h prior to stimulation of TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) for 6 h. The mRNA expression of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , and IL-18 was determined by RT-PCR.

#### ⑪ 아토피 질환에서 Ramalin에 의한 NF- $\kappa$ B 활성변화 확인

아토피 질환에서 Ramalin이 NF- $\kappa$ B 발현과 활성에 관여하는지 알아보기 위하여 Western blot, immunofluorescence analysis 그리고 Luciferase assay를 통하여 확인하였다. Ramalin에 의하여 NF- $\kappa$ B의 발현과 활성이 감소하는 것을 확인 할 수 있었다.

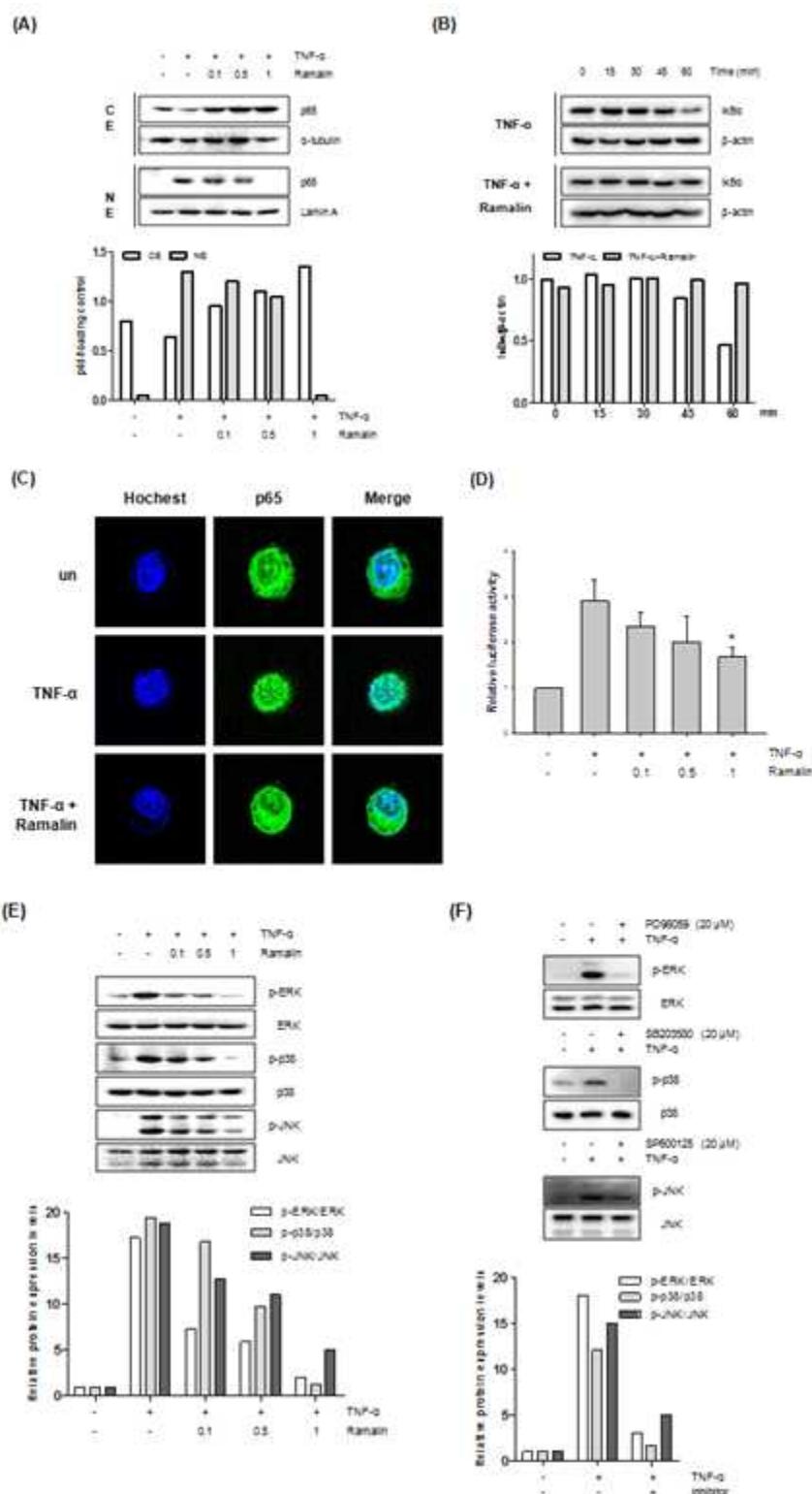


Fig. 3-63. The inhibitory effect of ramalin on TNF- $\alpha$ -stimulated nuclear factor-kappa B and mitogen-activated protein kinases (MAPK) pathways. HaCaT cells were pretreated with 0.1-1  $\mu$ g/mL ramalin for 2 h then stimulated with 10 ng/mL of TNF- $\alpha$  for 4 h and 30 min. (A) p65 translocation was inhibited by ramalin treatment on the cells. CE, Cytoplasmic Extract; NE, Nuclear Extract. (B) I $\kappa$ B $\alpha$  degradation was inhibited in a time-dependent (0 - 60 min) manner after TNF- $\alpha$  stimulation of the cells. (C) Inhibition of p65 translocation was determined using immunofluorescence analysis. (D) Inhibition of p65 activity was determined by ramalin treatment on the cells using luciferase assay. All values are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. of three experiments performed in triplicate. \*p<0.05 versus only TNF- $\alpha$ - induced group (E, F) MAPKs including ERK1/2, p38, and JNK were assessed by Western blot analysis. (F) HaCaT cells were pretreated with 20  $\mu$ M ERK inhibitor (PD98059), 20  $\mu$ M p38 MAPK inhibitor (SB203580), or 20  $\mu$ M JNK inhibitor (SP600125) for 2 h then stimulated with 10 ng/mL of TNF- $\alpha$  for 30 min.

④ 아토피질환에서 Ramalin에 의한 면역조절 작용과 동물실험

HaCaT 세포를 통한 in vitro 실험으로 확인한 Ramalin의 항아토피 효과를 마우스를 이용한 in vivo 실험을 통하여 확인하였다. 아토피 병변을 일으킨 마우스에 Ramalin을 처리하면 긁는 횟수가 감소하였고 IgE와 IL-4의 생성이 감소하는 것을 확인 할 수 있었다.

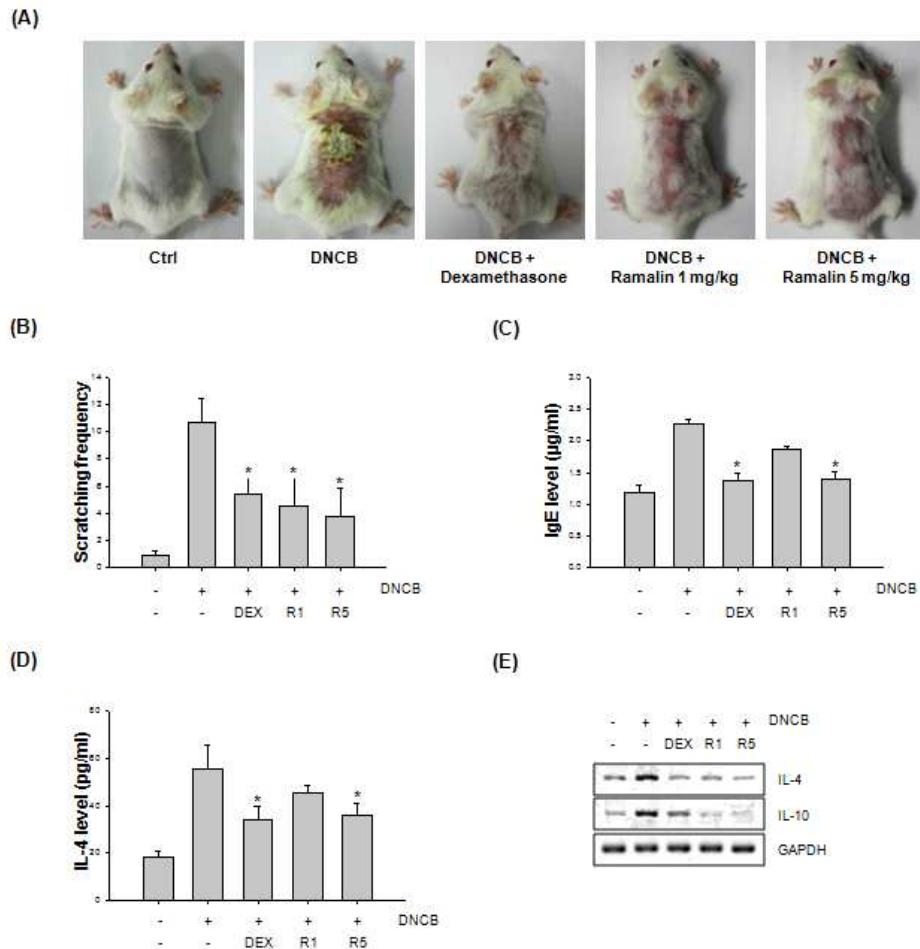


Fig. 3-64. Atopic dermatitis-like skin lesions and symptoms in 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)-induced mice. (A) Atopic dermatitis-like skin lesions were induced by topical application of DNCB for four times in twice a week, and oral administration of ramalin application improved overall skin condition. Skin features of mice were noted at the end of this experiment. Representative images are from five mice per group. (B) The number of scratching events was counted over 10 min. This measurement was repeated five times (50 min in total). (C) The effect of ramalin on serum level of IgE in DNCB-induced mice. (D) The effect of ramalin on DNCB-induced IL-4 secretion in splenocytes. (E) The inhibitory effect of ramalin on mRNA expression of IL-4 and IL-10 in DNCB-induced mice. Reverse transcription polymerase chain reaction analysis was performed to measure mRNA levels of IL-4 and IL-10.

## ② 아토피질환에서 Loric acid에 의한 염증 매개 물질 변화 확인

### ⓐ 아토피질환에서 Lobaric acid에 의한 inflammatory mediator 발현조절 확인

아토피질환은 Lobaric acid에 의하여 영향을 받는지 확인하기 위하여 아토피질환과 관련한 mediator들을 확인하였다. 그 결과 Lobaric acid에 의하여 mediator들이 감소하는 것을 확인 할 수 있었다.

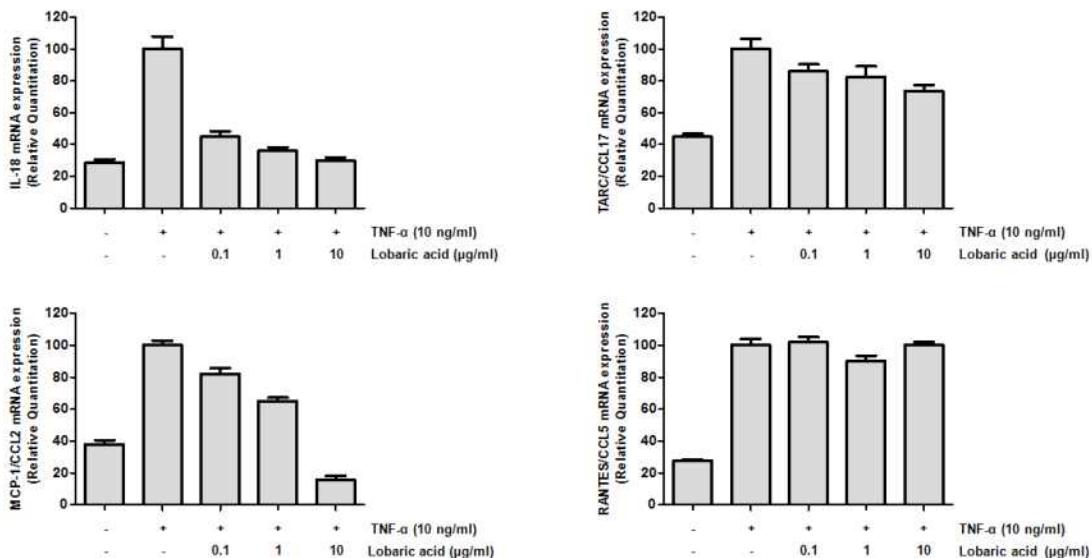


Fig. 3-65. Effect of lobaric acid on the mRNA levels of inflammatory mediator in TNF- $\alpha$ -induced HaCaT cells. HaCaT cells were pretreated with lobaric acid for 2 h prior to stimulation of TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) for 6 h. The mRNA expression of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , and IL-18 was determined by RT-PCR.

## (2) 항염증/세포보호 성분의 작용 기전 규명

### (가) 극지생물 유래 미생물 SF6796V로부터 분리한 대사체의 활성 검토

극지생물 유래 미생물 **SF6796V**로부터 분리한 화합물 가운데 구조가 확인된 **6796V-53** 외 2 종의 대사체의 다양한 생리 활성을 검색하였다. 그 결과 **6796V-53**은 항염 효과가 우수하게 나타났으며, 뇌에 존재하는 면역세포인 미세아교세포(microglia)에서 항염증 관련 기전 연구를 탐색하였다.

**6796V-53** (compound 1), **6796V-552-1-2** (compound 2), **6796V-552-4** (compound 3)는 NMR 결과를 바탕으로 구조를 동정 하였으며, BV2 세포에서 화합물 단독 처리 시 나타내는 세포 독성을 확인하였고 추후 실험은 독성이 나타나지 않는 범위의 농도로 진행하였다 (Fig. 3-66).

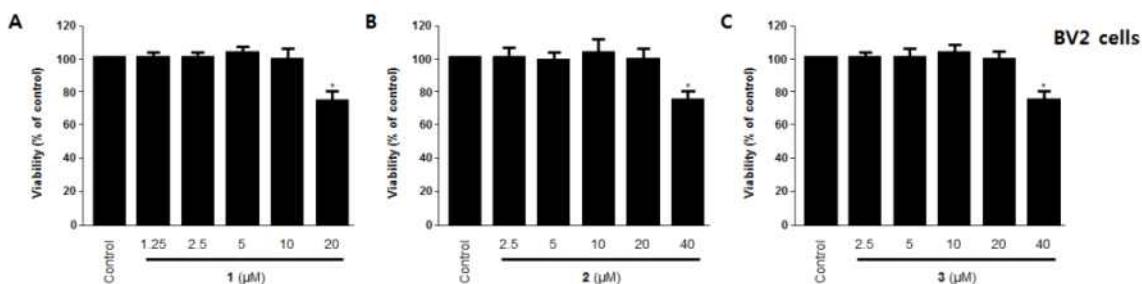


Fig. 3-66. Effects of three compounds (1-3) on cell viability in BV2 cells (A-C).

6796V-53 (compound 1), 6796V-552-1-2 (compound 2), 6796V-552-4 (compound 3)가 BV2 세포에서 HO-1의 과발현에 관여하는지 실험한 결과 6796V-53 (compound 1)에서 농도 의존적으로 HO-1 단백질을 과발현시키는 것을 확인하였다 (Fig. 3-67).

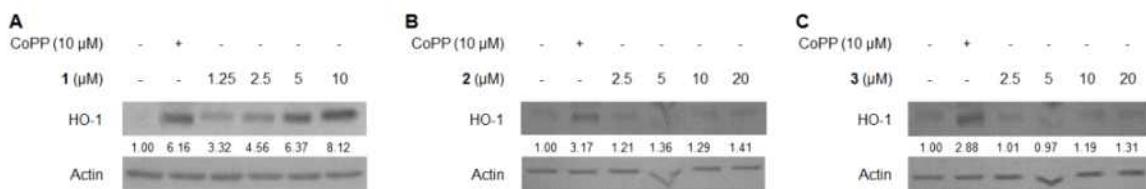


Fig. 3-67. Effects of three compounds (1-3) on expression of HO-1 protein in BV2 cells (A-C).

6796V-53 (compound 1)는 BV2 세포에서 HO-1의 발현을 조절하는 것으로 알려진 상위 전사인자인 nuclear translocation of nuclear transcription factor-E2-related factor 2 (Nrf2)를 핵 내로 전사시키는 효과가 있었다.

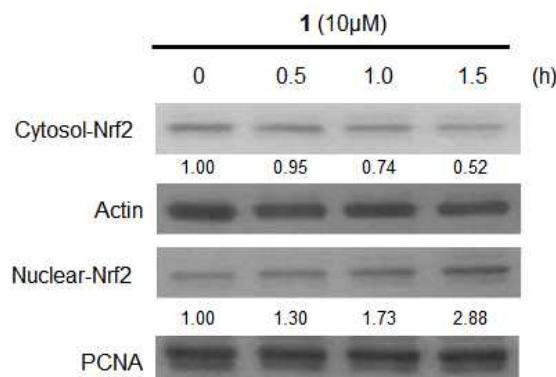


Fig. 3-68. Effects of compound 1 on nuclear translocation of Nrf2 in BV2 cells.

6796V-53 (compound 1)는 BV2 세포에서 HO-1의 발현을 조절하는 것으로 알려진 상위 신호전달 경로인 MAPK 경로 중 p38 단백질의 인산화에 관여하는 것을 확인하였다.

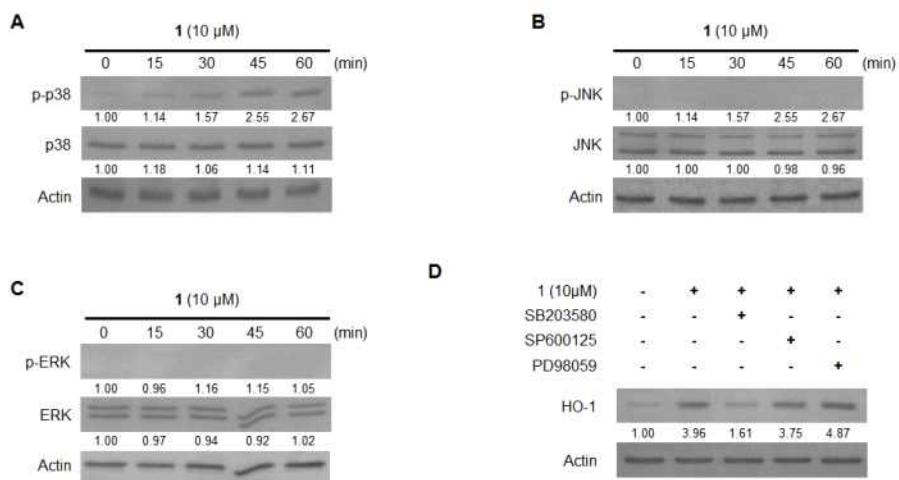


Fig. 3-69. Effects of compound 1-induced MAPK activation on HO-1 expression in BV2 cells.

6796V-53 (compound 1) 는 BV2 세포에서 Nrf2 전사를 조절하는 것으로 알려진 상위 신호전달 경로인 PI3K/AKT경로의 AKT 단백질의 인산화에 관여하는 것을 확인하였다.

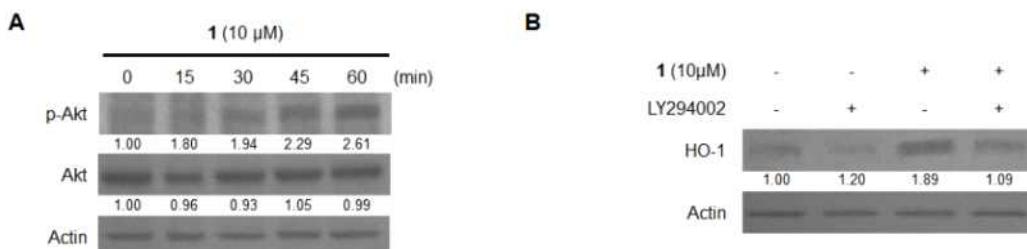


Fig. 3-70. Effects of compound 1 on HO-1 expression through the PI3K/AKT cascade in BV2 cells.

6796V-53 (compound 1) 는 BV2 세포에서 LPS로 유발한 nitrite와 PGE<sub>2</sub> 생성을 현저하게 감소시키는 효과가 있었다. 또한 LPS로 유발된 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 감소시켰다.

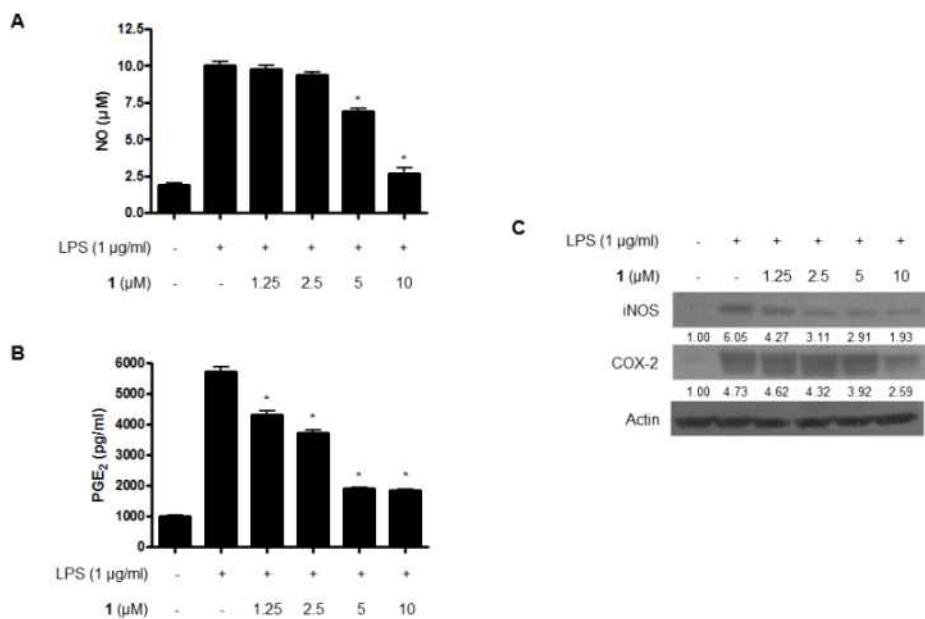


Fig. 3-71. Effects of compound 1 on LPS-induced nitrite (A) and PGE<sub>2</sub> (B) production and expression of iNOS and COX-2 protein (C) in BV2 cells.

6796V-53 (compound 1) 는 항염증 효과 기전을 탐색하기 위하여 다음 연구를 진행하였다. 먼저 iNOS, COX-2 발현을 시키는 상위 signal 에 해당되는 nuclear factor κB (NF-κB) pathways 를 억제하는 효과가 있었다.

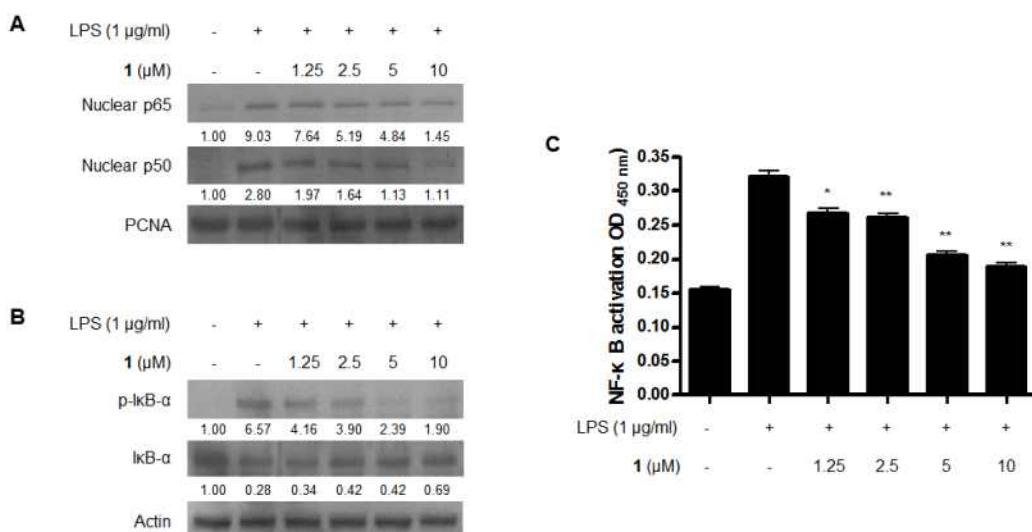


Fig. 3-72. Effects of compound 1 on the LPS-induced activation of NF-κB, and binding activity to DNA of NF-κB protein in BV2 cells.

6796V-53 (compound 1) 의 HO-1에 의한 항염증 효과를 확인하기 위해서 HO의 활성 억제제인 SnPP를 전처리 시에 6796V-53 (compound 1) 에 의한 항염증 효과가 역전되는 것을 확인하여 HO-1의 발현이 6796V-53 (compound 1) 의 항염증 효과에 관

여할 것으로 예상된다.

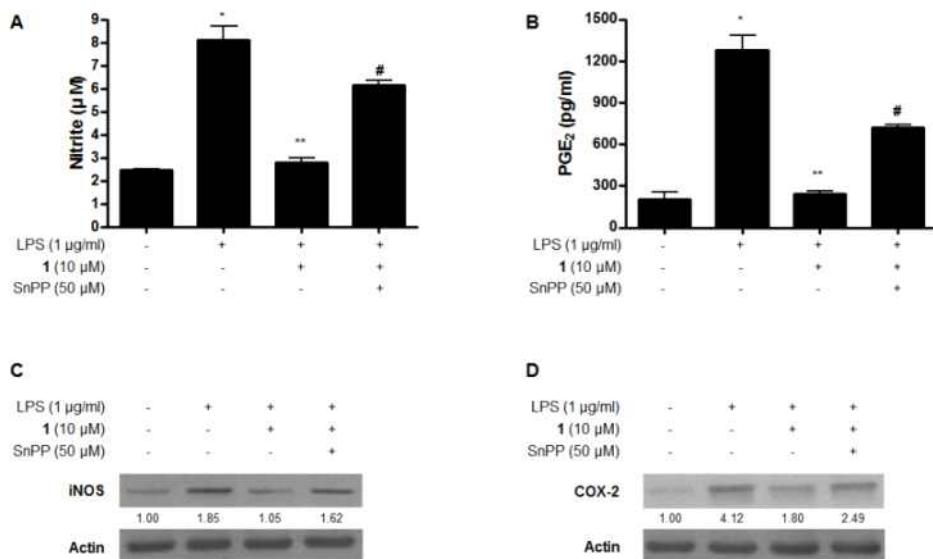


Fig. 3-73. Effects of tin protoporphyrin (SnPP) on inhibition of nitrite (A), PGE<sub>2</sub> (B), iNOS (C), and COX-2 (D) by compound 1 pre-treatment of LPS-stimulated BV2 cells.

6796V-53 (compound 1) 가 쥐의 뇌에서 분리한 미세아교세포 초대 배양 세포에서 HO-1의 과발현에 관여하는지 실험한 결과 6796V-53 (compound 1)에서 농도 의존적으로 HO-1 단백질을 과발현시키는 것을 확인하였다.

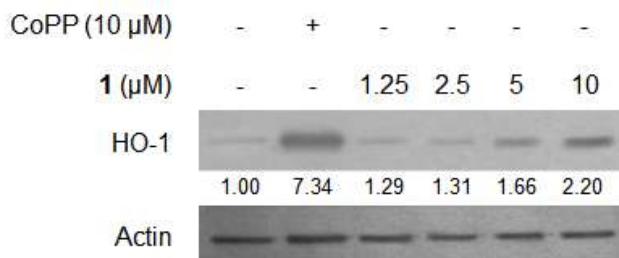


Fig. 3-74. Effects of compound 1 on expression of HO-1 protein in primary microglia cells.

### (3) 항암활성 효능 연구

#### (가) APL 세포주에서 검정할 추출물의 선별

극지 해양 생물 추출물 12종을 선정하여 APL 세포주에서 단독 또는 병행투여 효과를 검증하였다 (Fig. 3-75).

## <APL 세포주인 NB4에서의 검정에 사용할 추출물>

No.	Sample No.	Method	Amount (mg)	Storage name
1	100	KES2144	CTD	1.0
2	99	KES2143	CTD	1.0
3	90	KES2134	CTD	0.6
4	239	KES2337	CTD	0.9
5	114	KES2161	CTD	0.7
6	115	KES2162	CTD	1.1
7	95	KES2139	CTD	0.8
8	238	KES2336	CTD	0.6
9	240	KES2338	CTD	1.0
10	118	KES2172	CTD	1.2
11	119	KES2175	CTD	0.8
12	109	KES2153	CTD	1.0

(사용 번호)

Fig. 3-75. APL 세포주에서 검정할 추출물의 선별 (12종)

### (나) APL 세포주에서의 단독투여 효과 검정

극지 해양 생물 추출물을 APL 세포주에 단독투여한 결과 기존 항암제인 ATO와 비교하여 효과가 우수한 추출물을 찾지 못하였다 (Fig. 3-76, 77, 78).

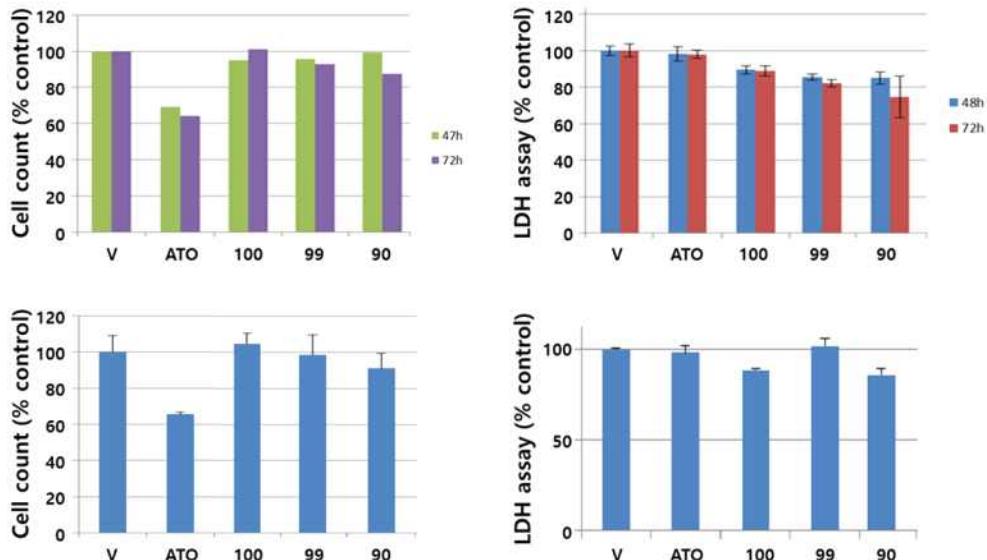


Fig. 3-76. APL 세포주에서의 단독투여 효과 검정(#100, 99, 90)

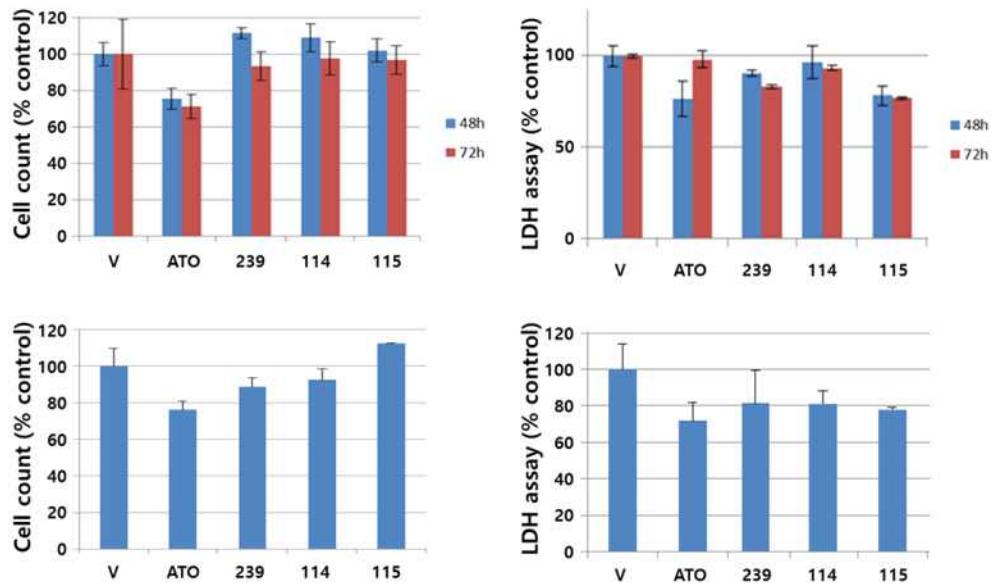


Fig. 3-77. APL 세포주에서의 단독투여 효과 검정(#239, 114, 115)

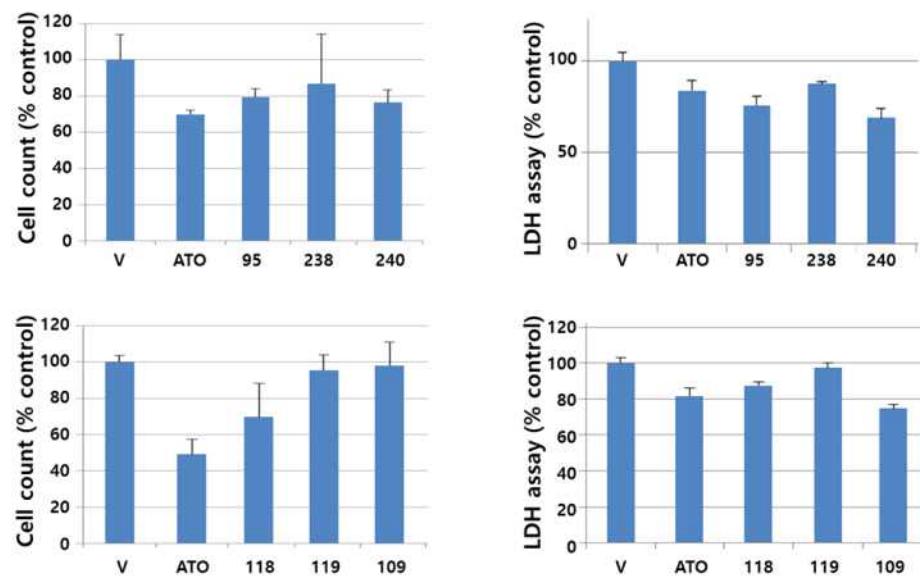


Fig. 3-78. APL 세포주에서의 단독투여 효과 검정(#95, 238, 240, 118, 119, 109)

#### (다) APL 세포주에서의 병행투여 효과 검정

극지 해양 생물 추출물을 APL 세포주에 ATO와 병행투여한 결과 기존 항암제인 ATO와 비교하여 효과가 우수한 추출물을 찾지 못하였으나 항암활성을 제고하는 10종을 찾을 수 있었다. (Fig. 3-79, 80).

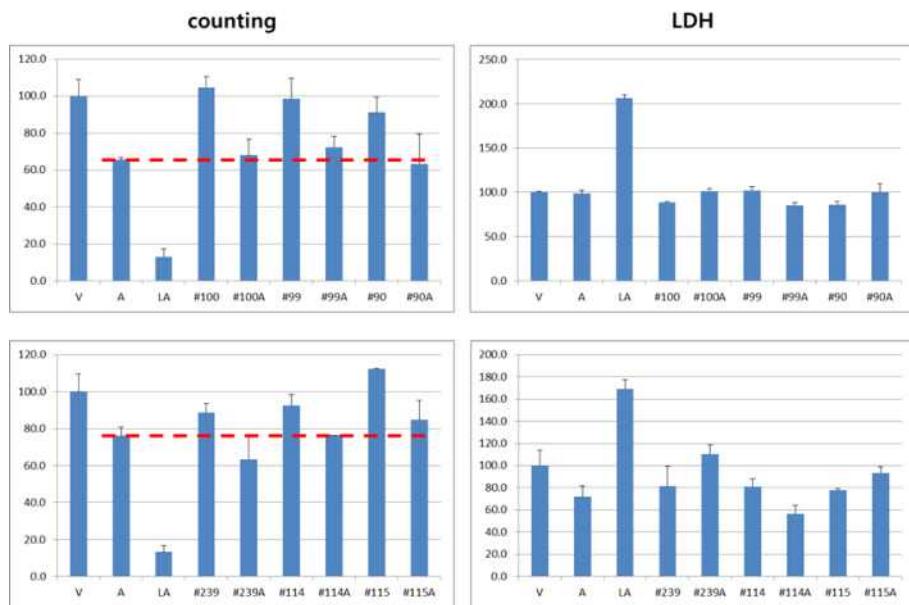


Fig. 3-79. APL 세포주에서 ATO와의 병행투여 효과 검정(#100, 99, 90, 239, 114, 115).  
적색 점선은 기존 항암제인 ATO의 효과

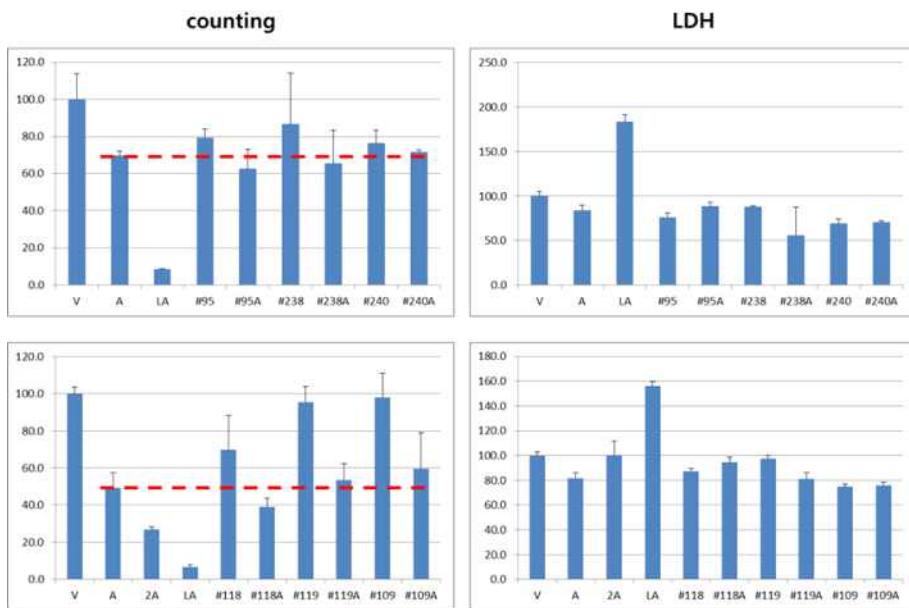


Fig. 3-80. APL 세포주에서 ATO와의 병행투여 효과 검정(#95, 238, 240, 118, 119, 109).  
적색 점선은 기존 항암제인 ATO의 효과

#### 라. 결론 및 제언

극지 생물 유래 물질인 Lobaric acid와 Lobastin이 면역세포인 대식세포의 염증억제에 미치는 영향을 확인하였다. 대식세포주인 RAW264.7세포에서 Lobaric acid와 Lobastin이 inflammatory mediators의 발현을 억제하는 것을 확인하여 염증억제제로서의 개발 가능성을 제시하였다. 또한 이를 바탕으로 면역작용에서 Lobaric acid와 Lobastin이 염증조절

에 있어서 분자면역학적 작용기전을 확인하였다. 대식세포주인 RAW264.7세포에서 극지 생물에서 추출한 다양한 물질들의 면역조절 작용을 확인하였으며, 일부 물질에서 면역조절 효과가 나타남을 확인하였다. 피부각질세포인 HaCaT세포에서 Ramalin과 Lobaric acid가 항아토피 효과가 있음을 확인하였다.

양극해 해양생물 유래 진균 SF6796V 균주의 배양 추출물로부터 분리된 대사체 6,8,1'-tri-*O*-methyl averantin에 대한 항염증 활성을 확인하였다. 화합물 6796V-53 (compound 1) 이 마우스 microglial 유래의 BV2 세포에서 MAPK, NF-κB경로를 억제함으로써 우수한 항염증 활성을 갖는다는 것을 확인하였고, PI3K/Akt와 Nrf2 기전을 통한 HO-1의 발현이 항염증 활성에 관여하는 것도 밝혀 낼 수 있었다. 또한 쥐의 뇌에서 분리한 미세아교세포의 초대 배양 세포에서 HO-1의 발현도 확인하여 HO-1에 의한 항염증 활성이 미세아교세포의 초대 배양 세포에서도 작용할 수 있음을 제시하였다.

항암활성 효능 연구 결과, NB4에서는 추출물 12종을 단독 또는 기존 항암제인 arsenic trioxide (ATO)와 병행 처리했으나, 기준인 ATO 단독처리 항암활성보다 같거나 높은 추출물이 없었다. T98G에서는 추출물 30여 종을 단독 처리하였을 때 기준인 기존 항암제 temozolomide (TMZ)보다 같거나 높은 추출물을 없었으나, 병행 처리 시 TMZ의 항암활성을 제고하는 추출물을 10여 종 동정하였다.

## 2. 저온성 단백질분해효소 P66의 대량생산 시스템 확보

### 가. 연구 목표

효소 산업은 생명 공학의 발전과 더불어 급속히 증가하고 있다(Kirk et al., 2002). 산업 효소는 치즈, 맥주, 와인, 식초, 육류 가공 등의 식품 생산에서부터 가죽, 세제 같은 상품 제조, 사료 첨가 같은 다양한 산업에 적용되고 있다. 효소 시장은 세계적으로 1995년 \$1 억에서 2000년 \$15억으로 급속히 성장하였고, 북미 시장에서는 2024년 약 \$40억의 시장을 형성할 것으로 예상되고 있다(Godfrey and West, 1996; Garand View Research Group, 2016; McCoy, 2000). 효소 시장은 산업용과 특수용으로 나뉘며, 가장 광범위(약 59%)하게 사용되는 효소인 protease 중, alkaline protease는 가장 높은 비중을 차지하고 있다(Rao et al., 1998).

Protease는 세탁/세척, 식품, 음식 소화 촉진 첨가제 등의 다양한 산업 영역에서 사용되고 있다(Rao. et al., 1998). 세탁 첨가물로서의 저온 활성 protease는 세탁에 필요한 에너지를 줄여 주고 환경에 해로운 영향을 줄 수 있는 세탁 첨가물 사용을 제한 할 수 있다. 식품 산업에서의 사용을 예로 들면, 저온 활성 protease는 치즈 숙성에 도움을 주며, 냉동 육류의 풍미 개선에 도움을 준다(Cavicchioli et al., 2002; Gerday et al., 2000; Huston, 2008). 효소 시장에서는 낮은 온도에서도 높은 활성의 생화학적 기능을 갖는

protease에 대한 수요가 증가하고 있다. 이에 따라, 새로운 세균 분리, 저온 효소 탐색 및 산업 효소 개발 측면에서 남극과 북극 유래 원핵생물 연구에 대한 관심이 증가하고 있다(Antranikian and Egorova, 2007; Huston, 2008; Nichols et al., 1999). 일반적으로, 남극 및 북극 같은 극한 환경에서 생장하는 저온 적응 미생물을 직접 이용하거나 저온 적응 미생물 유래 효소를 산업적으로 이용하는 것은 경제적, 생태학적 이점을 제공하는 것으로 인정을 받고 있다(Kasana and Gulati, 2011; Kasana, 2010; Margesin and Schinner, 1994).

저온 protease에 대한 산업적 요구에도 불구하고, 현재까지 저온 활성 protease의 특징 보고 사례는 극히 적다(Chen et al., 2007; Huston et al., 2004; Kulakova et al., 1999; Wang et al., 2005). 이러한 이유로 극지연구소에서는 Alpine Microbial Collection(PAMC)에 기탁되어 있는 남극 유래 세균인 *Pseudoalteromonas antarctica* PAMC 21717 유래 저온 활성의 알칼리성 serine protease(P66)를 *E. coli*에서 대량 생산하여 단백질 구조를 밝혔고, 효소 특성 규명을 수행하였다. 또한, 생산 수율 증가를 위한 방법을 제시하였고, 효소 안정화 제제를 조성하였다.

본 연구에서는 P66의 저온 활성 및 dimerization 특성을 규명하고, P66의 산업적 이용을 위한 대량 생산 방법을 구축하는 것을 목표로 하였다. 또한, 확보된 P66 대량 생산 시스템을 통해 생산된 단백질의 다양한 산업적 응용성을 확인하기 위한 연구를 진행하였다.

#### 나. 연구 수행방법

##### (1) P66 생산

이전에 P66 생산을 위해 구축한 Pro21717-PCD(*Pseudoalteromonas antarctica* PAMC 21717 유래 serine protease의 pro-sequence와 catalytic domain으로 구성)를 함유하는 *E. coli* BL21(DE3)를 100μl/ml의 kanamycin이 첨가된 1L의 LB 액체배지에서 배양하였다(37°C). 600nm의 흡광도 값이 1.0에 도달하였을 때, 1.0mM IPTG를 첨가하고 24시간 동안 37°C에서 배양하여 단백질 생산(Pro21717-PCD, P66 I.B.)을 유도 하였다. 배양 상층액이 제거된 세포를 4ml의 50mM sodium phosphate buffer에 혼탁한 후, sonicator를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 세포 파쇄를 통해 얻은 불용성 분획을 원심 분리(10,000×g, 30분, 4°C)를 통해 얻은 후, 20ml의 0.5% Triton X-100을 이용하여 2회 세척하였다(10,000×g, 30분, 4°C). 세척된 P66 I.B.(1g)를 20ml의 unfolding buffer(pH8.0; 4M urea, 10mM mercaptoethanol, 20mM glycine)에 첨가하고 1시간 동안 37°C에서 가용화 하였다. 변성된 단백질 용액을 80ml(1:4 희석법) 또는 400ml(1:20 희석법)의 refolding buffer(pH8.0; 20mM glycine, 20mM CaCl<sub>2</sub>)에 첨가하여 refolding 된 P66을 얻었다(4°C, 3일). P66 용액에 보존제(pH8.0; 20mM glycine, 1mM

4-formylphenyl boronic acid, 6% glycerol)를 첨가하여 최종 P66을 생산하였다.

### (2) Protease 활성 측정

P66의 단백질 분해 활성 측정을 위해, 1 $\mu$ g P66, 0.65% azocasein 및 50 mM Tris-HCl(pH8.0)으로 구성된 1.1ml의 반응액을 제조하였다. 반응액을 30°C에서 30분 간 반응한 후, 110mM trichloroacetic acid를 첨가하고 30분 동안 37°C에서 방치하였다. 원심분리(12,000×g, 4°C, 3분)를 통해 얻은 상층액을 0.45 $\mu$ m 필터에 여과한 후, 0.5ml 여과액과 0.25ml Folin & Ciocalteu's phenol 시약, 1.25ml의 500mM sodium carbonate를 혼합하였다. 37°C에서 30분 방치한 후, 660nm 흡광도 측정하고, L-tyrosine 표준 곡선에 기초하여 활성 측정을 수행하였다. Protease 활성의 1unit은 30°C에서 1mg 단백질이 1nmole 아미노산을 방출하는 것으로 정의하였다. 단백질 양은 Bradford 단백질 농도 측정법에 의한 BSA 표준 곡선과의 비교를 통해 측정하였다.

SDS-PAGE gel 상에서 protease 활성을 측정하는 zymogram 방법을 사용하여 단백질의 분자량을 확인하였다. 1% Skim milk가 포함된 10% SDS-PAGE gel에 열처리를 하지 않은 단백질을 로딩하고, 전개를 수행한 후, gel에 100ml의 renaturing buffer(27g Triton X-100/L)를 첨가하여 세척하였다. 세척에 의해 SDS가 제거된 gel에 100mL의 developing buffer(1.21g Tris base, 6.3g Tris-HCl, 11.7g NaCl, 0.74g CaCl<sub>2</sub>, 0.02% Brij 35/L)를 첨가하고 30분 동안 방치하여 추가적인 gel 세척을 마친 후, 새로운 100ml의 developing buffer 내에서 gel을 배양(4°C, 4시간)하였다. 그 후, gel을 염색하여 단백질 분해 활성 밴드를 확인하였다. 또한, skim milk를 첨가하지 않은 10% SDS-PAGE gel에서 전개된 단백질을 절취한 후, 1% skim milk가 첨가된 고체 배지에 부착하여 단백질 분해 활성 밴드를 확인하였다. 모든 SDS-PAGE는 Tris/Glycine buffer 시스템에서 수행되었다.

### (3) P66의 저온 활성 및 dimerization 규명

P66의 저온 활성 규명을 위해 이전에 제작한 Pro21717-PCD T326L, S421L 및 T326L+S421L mutant들과 야생형 Pro21717-PCD이 각각 삽입된 *E. coli* BL21(DE3)에서 얻은 mutant 및 야생형 I.B.를 ‘P66 생산’ 과정에 따라 refolding(1:20 희석법)하였다. Refolding 시간에 따라 단백질 용액을 취하여, 단백질 양을 측정하고, SDS-PAGE 및 zymogram을 수행하였다. Refolding이 완료된 각 효소(1 $\mu$ g)를 0.65% azocasein과 5-5 0°C에서 30분 동안 반응하여, 온도에 따른 활성을 비교하였다.

Refolding된 protease가 고분자화 되는 것을 확인하기 위해, 1:20 희석법으로 생산한 P66 야생형과 T326L, S421L 및 T326L+S421L mutant 모두를 대상으로 zymogram을

수행하여 단백질 분자량 변화를 비교하였다.

#### (4) P66 대량 생산 시스템 구축

##### (가) P66 I.B. 대량생산

Pro21717-PCD를 함유하는 *E. coli* BL21(DE3)를 1L의 액체배지에 접종, 배양하였다. 배양 배지(pH7.0; initial media)는 glucose 10.0g/L, yeast extract 2.5g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  4.0g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  13.5g/L, citric acid 1.7g/L,  $\text{MgSO}_4\text{7H}_2\text{O}$  1.2g/L, kanamycin 0.1g/L 및 미량 금속 용액 10ml/L(EDTA 0.42g/L,  $\text{CoCl}_2\text{6H}_2\text{O}$  0.125g/L,  $\text{MnCl}_2\text{4H}_2\text{O}$  0.75g/L,  $\text{CuSO}_4\text{5H}_2\text{O}$  0.11g/L,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.15g/L,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4\text{2H}_2\text{O}$  0.125g/L,  $\text{ZnSO}_4\text{7H}_2\text{O}$  0.85g/L 및  $\text{FeCl}_3\text{6H}_2\text{O}$  5.0g/L)로 구성하였다. 37°C 배양으로 600nm 분광 광도계(Scinco S-3150) 값이 약 6.0이 되면 1mM IPTG를 첨가하여 P66 I.B. 발현을 유도(37°C, 24시간)하였다. P66 I.B. 생산의 scale-up을 위해, 5L 용량의 jar 발효기(Minifors, Infors HT)를 사용하였다. 2L의 initial media에 Pro21717-PCD를 함유하는 *E. coli* BL21(DE3) 접종하였다. 37°C 발효 중 추가적인 영양분 공급을 위해, pH STAT 방법으로 feed media[glucose 400g/L, yeast extract 100g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  1.0g/L,  $\text{MgSO}_4\text{7H}_2\text{O}$  2.5g/L, kanamycin 0.1g/L]를 발효기 내로 첨가하였다. 600nm 분광 광도계 값이 약 30.0이 되면, 1mM IPTG를 첨가하고, 37°C, 24시간 동안 추가 발효를 수행하였다. 두 종류의 배양에서의 단백질 과발현은 SDS-PAGE 분석을 통해 확인하였다.

배양된 *E. coli* BL21(DE3)의 세포 파쇄를 위해, sonicator 또는 lysozyme/DNaseI 세포 파쇄 시스템을 사용하였다. Sonication은 ‘P66 생산’에서 서술한 방법으로 수행되었다. Lysozyme/DNaseI 세포 파쇄 시스템은 *E. coli* BL21(DE3) 배양액에서 직접 수행되었다. 1L의 배양액에 lysozyme buffer(pH7.0; 1% Triton X-100, 5mM EDTA, 20mM borate)와 0.5–10ml의 lysozyme을 첨가하여 세포를 파쇄(상온, o/n)하였다. 용출 DNA를 제거하기 위해, DNaseI buffer(pH7.5; 20mM  $\text{MgCl}_2$ , 50mM borate)와 0.3–6ml의 DNaseI를 세포 파쇄액에 첨가, 배양(상온, o/n)하였다. 원심 분리(9,000×g, 10분, 4°C)를 통해 회수된 P66 I.B.를 세척한 후, SDS-PAGE 분석을 수행하여 P66 I.B. 추출을 확인하였다.

##### (나) P66 대량 생산

추출된 약 195g P66 I.B.(wet base)를 이용하여 활성형 P66을 대량 생산하였다. 이를 위해, 4,030ml의 unfolding buffer에서 I.B.를 가용화하였고, 가용화된 단백질 용액을 79,990ml의 refolding buffer에 첨가(1:20 희석법)하여 P66 refolding(총 부피=83,990ml)을 유도하였다. 이때에, 1:4 희석법을 사용한 P66(5ml)과 대량 생산 P66을 8일 배양

(4°C)하며 단백질 양과 효소 활성을 추적하였다.

#### (다) P66 농축

생산된 P66을 농축하기 위해, 흡착, refolding 방법 변경 및 filtration 방법을 적용하였다. 효소의 흡착은 activated charcoal(Sigma), 음이온 교환 레진(Sigma; weak exchanger인 IRA-67과 - 96, strong exchanger인 IRA-400, -410 및 - 900)을 통해 수행되었다. 50mg의 charcoal 또는 1g의 음이온 교환 레진(4% NaOH를 통해 activation)에 5ml의 P66을 첨가하고 배양(4°C, 1시간)하여 단백질의 흡착을 유도하였다. 상층액이 제거된 흡착 침전물에 20mM glycine(pH8.0)이 포함된 다음과 같은 5ml의 용액을 첨가하여 단백질 용출을 유도하였다: 50% ethyl acetate; 1M NaCl; 0.3% formic acid; 1M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1M NaNO<sub>3</sub>; 2mM EDTA; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. 단백질 흡착 상층액과 단백질 용출액 내 단백질 양을 측정하여, P66의 흡착과 용출 정도를 비교하였다.

4M urea에 의해 가용화된 P66 I.B.(6ml)에 18ml의 D.W.를 첨가하였다. 3kDa cut-off spin membrane(Millipore)를 사용하여 D.W. 혼합액을 농축(6ml)한 후, 24ml의 refolding buffer를 첨가하여 단백질 refolding을 수행(Modified 1:20 희석법)하였다. Modified 1:20 희석법에 의해 생산한 P66의 단백질 양 및 활성을 1:20 희석법의 P66과 비교하였다.

1,425ml의 P66(1:20 희석법)을 glass fiber membrane(WaterSep; cut-off size=5kDa; 막 면적=0.0155m<sup>2</sup>)에서 농축하였다. Feeding pressure를 2bar로 고정하여 5시간 이상 농축을 진행하였다. 농축 시간에 따라 여과 속도 및 농축 정도를 산출한 후, 단백질 양 및 농축액의 활성을 측정하였다.

#### (5) P66의 산업적 응용성

의료 기기 세척제에 첨가되는 protease(SWP라 명명)를 (주)성우에서 제공받았다. 또한 드럼 세탁용 세제인 Act'z, Persil 및 LiQ와 주방 세척 세제인 애경 순샘 유자와 애경 순샘 버블을 구입하여 P66과의 활성을 비교에 사용하였다. SWP powder(1mg)와 1ml의 D.W.를 혼합한 후, 단백질 양을 측정하였다. 7.3μg SWP 또는 P66 각각의 azocasein에 대한 단백질 분해 활성을 측정, 비교하였다(10, 20 및 30°C 반응온도, 10분).

5 종류의 세제 제품 내 단백질 양은 ×10<sup>-3</sup>-10<sup>-0</sup>의 다양한 희석 용액에서 측정되었다. 세제의 단백질 분해 활성은 ×10<sup>-3</sup>-10<sup>-0</sup>으로 희석된 20μl 세제액을 30°C에서 30분 동안 배양하여 산출하였다. 실험에 사용한 세제 제품 중, 주방 세척 세제인 애경 순샘 버블과 P66의 온도에 따른 활성은 각각 20μl의 용액을 10, 20 및 30°C에서 30분 동안 반응시켜 산출하였다.

옥수수와 대두를 원재료로 하는 부형제를 통한 P66 건조를 air-drying(R.T.) 또는 drying oven(33°C)에서 수행하였다. Air-drying을 위해, 약 600mg의 부형제에 다음과 같은 400μl의 액체를 첨가하였다: D.W.; 10<sup>-3</sup> 희석된 Savinase(Novozyme); 1:20 희석법의 P66+D.W.; 1:20 희석법의 P66+보존제. Drying oven에서는 약 3g의 부형제를 air-drying에서와 동일한 종류의 각 2ml 첨가액과 혼합하여 건조시켰다. 두 종류의 건조는 42시간 동안 진행되었고, P66의 보존제는 'P66 생산'의 조성을 사용하였다. 부형제-첨가액의 무게를 측정한 후, 부형제-첨가액에 2 또는 10ml을 D.W.를 첨가하고 혼탁시켰다. 혼탁액 상층의 용출 첨가액의 활성은 30°C에서 30분 동안 반응시켜 산출하였다.

#### 다. 연구 결과

##### (1) P66의 저온 활성 및 dimerization

이전 실험에서, P66의 단백질 구조를 결정하였다. P66 단백질 구조를 Subtilisin Carlsberg와 비교하면, P66은 substrate pocket size가 상대적으로 크고, 기질의 유입이 용의하도록 disulfide bond를 보유하고 있었다. 비록, disulfide bond 제거한 mutant는 단백질 refolding이 불가하여 disulfide bond와 관련된 P66의 저온 활성 규명을 하지 못했지만, substrate pocket size가 작아진 mutant를 생산할 수 있었다. P66 보다 substrate pocket size가 작을 것으로 예상되는 P66 T326L, S421L 및 T326L+S421L mutant와 P66 야생형의 I.B.는 1L 배양으로 1.2–1.4g 생산되었다. 이 I.B.들을 1:20 희석법으로 refolding하며 활성 추적을 수행하였다 (Fig. 3-81). 모든 I.B.는 24시간의 refolding에서 총 단백질의 14–19%가 잔존하였고, 이와 관련된 단백질 활성 (776–992U/mg)을 나타냈다. 1% Skim milk가 포함된 SDS-PAGE gel에서도 24시간 refolding 단백질 용액의 단백질 분해 활성(약 55kDa의 분자량의 zymogram 밴드)을 확인하였다. Refolding 시간이 48시간 이상이 되면 P66 야생형 및 mutant의 총 단백질 양은 안정화되어 약 216시간의 refolding 시간에서 최종적으로 6–13%의 단백질이 잔존하였다.

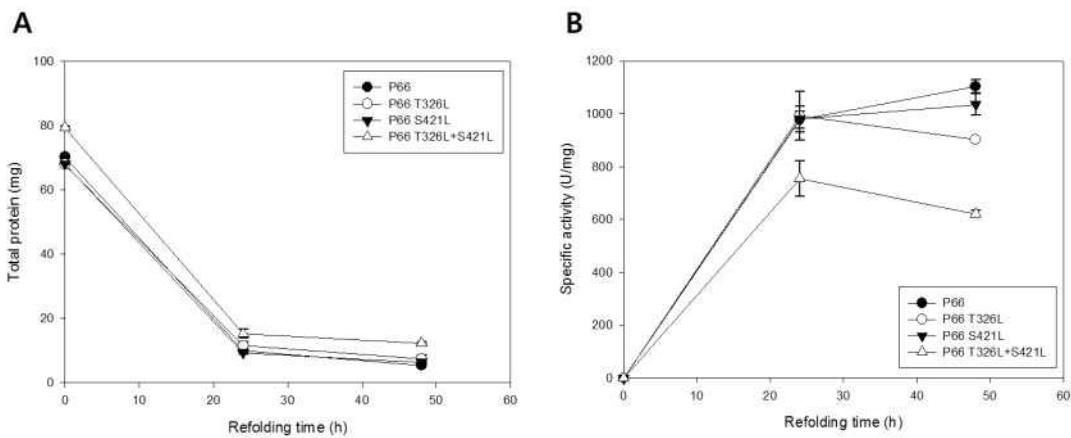


Fig. 3-81. Refolding of P66-wild type or - mutants (T326L, S421L, and T326L+S421L). Each unfolded protein solution was added to refolding buffer (1:20-dilution method), composed with 20 mM glycine (pH 8.0) and 20 mM CaCl<sub>2</sub>. In time interval, total protein (A) and activity (B) was determined.

생산된 야생형 또는 mutant P66(S411L 및 T326L+S421L)은 온도 상승에 따라 단백질 분해 활성이 증가하여, 50°C의 온도에서 최고 활성(1,387–1,466U/mg)을 나타낸 반면, T326L mutant는 45°C 이상의 온도에서 활성이 감소하였다 (Fig. 3-82). 모든 온도 구간에서 야생형 P66은 모든 mutant P66 보다 높은 활성을 나타냈는데, 특히 10–20°C의 온도 구간에서 야생형 P66은 mutant P66(S411L 및 T326L+S421L) 보다 1.31–1.40배 높은 활성을 나타냈다.

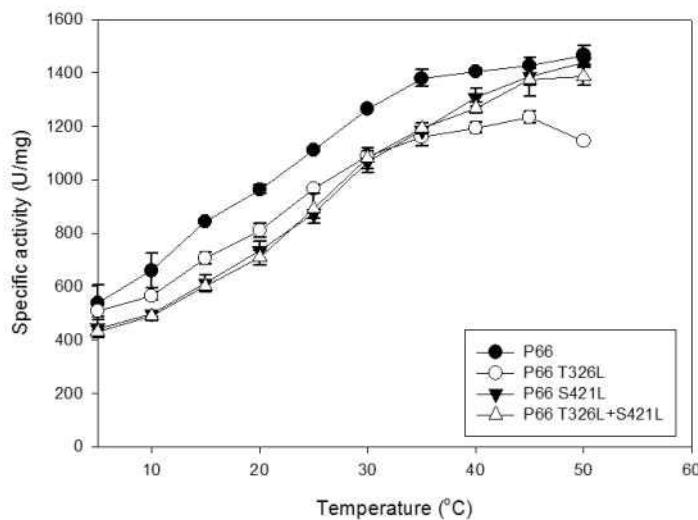


Fig. 3-82. Effects of temperature on P66-wild type or - mutants (T326L, S421L, and T326L+S421L).

Unfolded P66은 prosequence와 catalytic domain으로 구성(457개의 아미노산, 약

47kDa)되어 있으며, refolding 과정에서 prosequence가 제거되고 catalytic doamin 만이 존재하는 활성형 P66(341개의 아미노산, 약 34kDa)이 된다. 하지만 이전 실험에서 zymogram을 수행하면, 해당 분자량 보다 큰 분자량의 활성 단백질이 검출되었다. 효소의 dimerization 현상 발생 여부를 확인하기 위해, zymography 재분석을 수행하였다 (Fig. 3-83). 기존에 생산하여 보관중인 P66은 SDS-PAGE gel 상에서 P66 dimer 분자량인 약 75kDa의 단백질 랜드를 나타냈다(Left figure in Fig. 3-83A). 흥미롭게도, SDS-PAGE gel을 분자량에 따라 절취하여 skim milk가 포함된 고체배지에 부착하면, 50-150kDa 분자량 범위의 gel에서 단백질 분해에 의한 투명환이 나타났다(Middle figure in Fig. 3-83A). 이를 통해, 생산된 P66은 dimer(약 68kDa 분자량으로 추정) 뿐만 아니라, trimer(102 kDa), tetramer(136 kDa) 까지 형성하는 것을 확인하였다. Skim milk가 포함된 SDS-PAGE gel에서는, P66의 활성이 억제(1mM PMSF 첨가)된 불활성 P66 단백질 랜드는 약 60kDa의 분자량으로 확인되었고, 이는 기질이 포함되지 않은 SDS-PAGE 결과와 차이를 보였다(Right figure in Fig. 3-83A). 이러한 차이는 skim milk가 첨가된 gel에서의 전기영동 결과의 왜곡에 의한 것으로 추정된다. 새로이 생산한 야생형 또는 mutant P66 사이에서 특별한 차이를 확인할 수 없었지만, P66 단백질 랜드가 dimer 크기 이상에서도 존재하는 것을 염색된 gel에서 확인하였다(left figure in Fig. 3-83B). 또한, 모든 생산 단백질은 Fig. 3-83A와 같은 패턴의 zymogram 결과를 보였다.

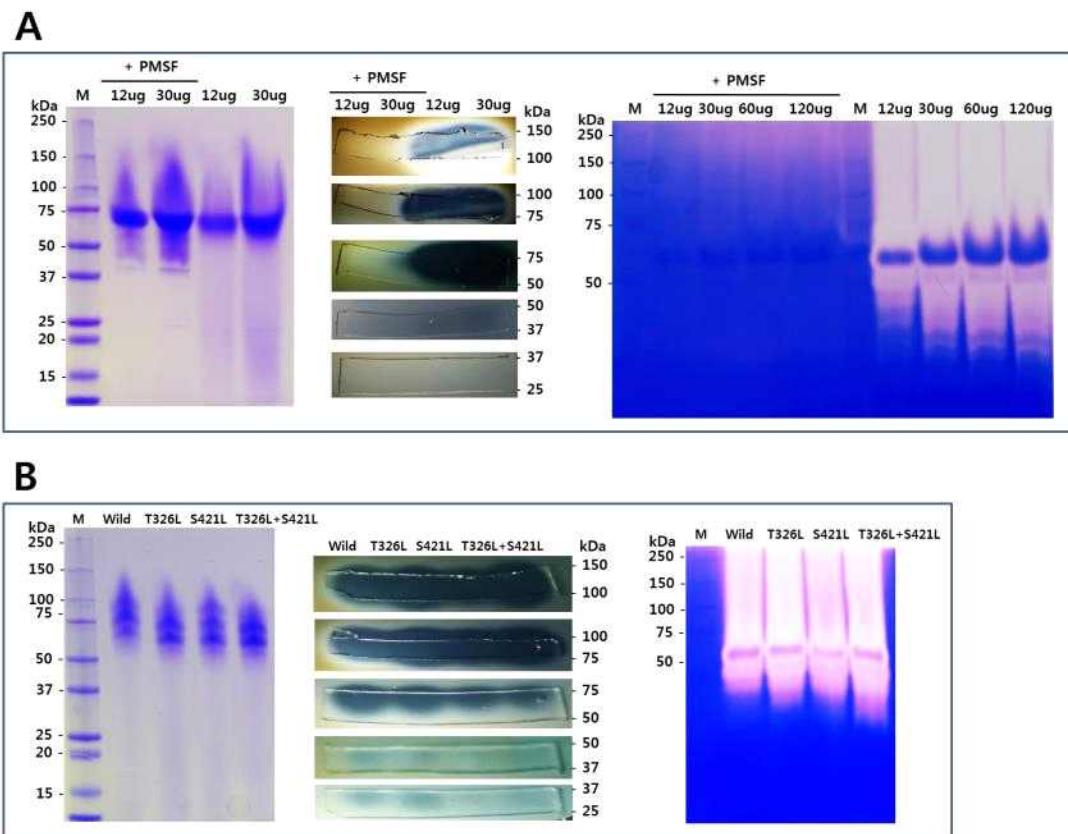


Fig. 3-83. SDS-PAGE and zymography analyses of P66 and its mutants. SDS-PAGE analyses (left figures) of enzymes were performed on 10% polyacrylamide slab gels usin Tris-glycine buffer system. And then, the gels were attached on agar plate containing 1% skim milk (middle figures). zymogram was also performed in SDS-PAGE gels containing 1% skim milk, directly (right figures). (A) P66, produced previously was analyses in condition with/without 1 mM of PMSF as serine-protease inhibitor. (B) P66 and its mutants, produced in this study were also analysed.

## (2) P66 대량 생산 시스템 구축

### (가) P66 I.B. 대량생산

P66 I.B.는 1L의 initial media 배양(flask)와 feed media가 첨가되는 2L의 initial media 배양(jar fermentor)에서 생산되었다. Flask에서 배양된 Pro21717-PCD 삽입 *E. coli*는 약 30시간의 배양으로 O.D.<sub>600nm</sub>=6.28을 기록하였으며, 1mM IPTG를 첨가한 후 진행된 24시간의 P66 I.B. 생산 유도로 배양이 완료(O.D.<sub>600nm</sub>=7.03, 54시간 배양)되었다. 배양이 완료된 세포 내 P66 I.B.를 sonicator 또는 lysozyme(10ml/L)/DNaseI(6ml/L) 세포 파쇄 시스템으로 추출하였다 (Fig. 3-84). Sonicator 또는 lysozyme/DNaseI 세포 파쇄 시스템 모두를 통해 1L 배양 세포에서 I.B.를 추출하였고, 세척된 I.B.의 무게는

(wet-base) 2.45g으로 측정되었다.

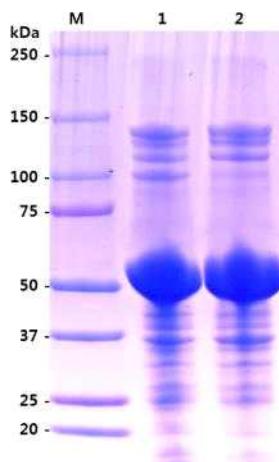


Fig. 3-84. P66-I.B. extraction from recombinant *E. coli* cell by sonicator (lane 1) or lysozyme/DNaseI cell-lysis system. P66 I.B., extracted and washed, was analysed on SDS-PAGE.

Feed media(최종 0.5L 첨가)가 첨가되는 initial media(2.0L)에서 재조합 *E. coli*는 약 66시간 배양(O.D.<sub>600nm</sub>=63.3)되었다 (Fig. 3-85). 배양 시간에 따라 생장이 증가된 재조합 *E. coli*(약 42시간의 배양, O.D.<sub>600nm</sub>=30.4)에 1mM IPTG를 첨가하여 P66 I.B.(약 50kDa)를 생산하였다. 배양이 완료된 세포 배양액에서의 P66 I.B.는 lysozyme(0.5ml/L)/DNaseI(0.3ml/L)의 저농도 세포 파쇄 시스템에서도 추출되었다. 최종 회수한 세척 P66 I.B.는 약 350g(wet base)으로 계산되었는데, 이는 flask 배양 보다 L 당 57배 높은 생산 증가였다.

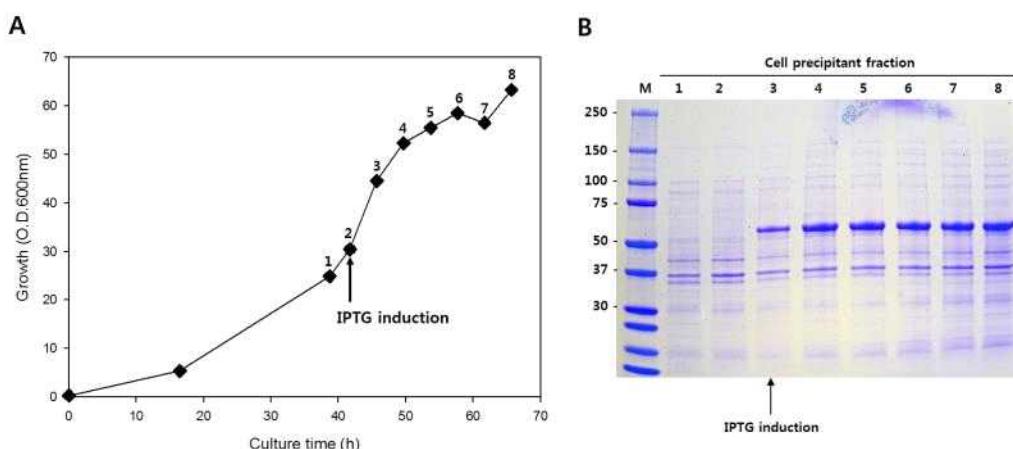


Fig. 3-85. Production of P66 I.B. in fermentation. (A) Recombinant *E. coli* was grown in initial media supplied feed media. Growth value (O.D.<sub>600nm</sub>) was recorded

at time intervals, and target protein was produced by adding of IPTG. (B) SDS-PAGE analysis of cultured cell precipitant at the same time intervals as in (A). Lane 1–8, cultured cell precipitant at time intervals.

#### (나) 활성형 P66 대량 생산

P66을 대량 생산하기 위해, 약 195g P66 I.B.를 1:20 희석법으로 refolding 하였다. 또한, 1ml의 unfolded P66 용액을 1:4 희석법으로 refolding 하여 대량 생산된 P66과 비교하였다(Fig. 3-86). 1:4 희석법은 refolding에 7일이 소요되지만, 1:20 희석법은 2일 배양으로 refolding이 완료되었다. 1ml unfolded 용액을 기준으로, 두 희석법에 의해 잔존하는 단백질 양은 유사하지만(Fig. 3-86A), 단위 단백질 당 활성(U/mg, Fig. 3-86B)은 1:20 희석법이 월등히 높았다(518U/mg, 1:4 희석법; 1,352U/mg, 1:20 희석법). 8일 배양된 각 시료의 단위 부피 당 활성은 1:4 희석법과 1:20 희석법에서 각각 88과 66U/ml으로 확인되었다(Fig. 3-86C). 1:20 희석법에서 단위 단백질 활성이 증가한 것을 감안하면, 195g P66 I.B.에서 대량 생산된 활성형 P66은 약 84L 부피 내 10.94g으로 산출되었다. 즉, P66 I.B.로부터 약 5.6% 수율로 활성형 P66을 생산한 것인데, 이러한 결과를 통해 단백질 생산 수율(약 2.8배 증가; 기존 방법=I.B.로부터 2% 수율)이 증가한 것을 확인하였다.

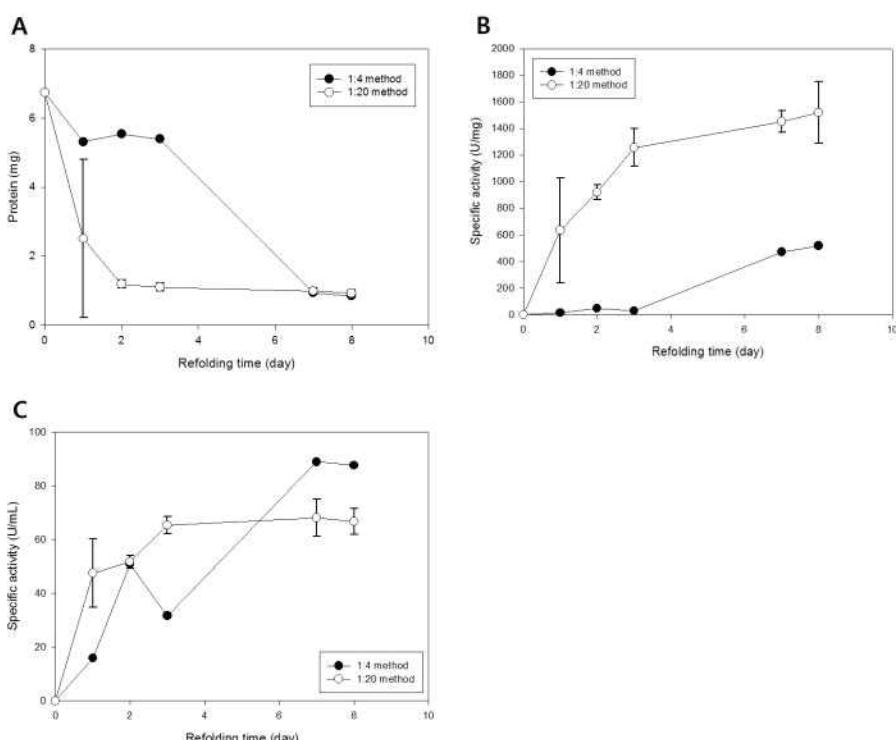


Fig. 3-86. Refolding of P66 I.B. on 1:4 or 1:20 dilution methods. One milliliter of unfolded protein solution was added to 4 or 20 ml of refolding buffer and then,

protein and activity was determined in each solution at refolding-time intervals. (A) Total protein; (B) activity per protein; (C) activity per volume.

#### (다) P66 농축

1:20 희석법에 의해 생산된 P66은 높은 I.B.로부터 회수율 및 높은 단위 단백질 활성의 장점이 있지만, 농축을 필요로 한다. P66을 농축하기 위해, 흡착, refolding 방법 변경 및 filtration 방법을 적용하였는데, 효소는 activated charcoal과 음이온 교환 레진 IRA-900에 흡착되는 것을 확인하였다. 0.1ml의 P66은 1mg charcoal에 완전히 흡착되지만, 100% ethyl acetate에서 5%만이 용출되었다. IRA-900 1g은 약 0.6mg의 P66을 흡착하였고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 첨가로 흡착물에서 약 27%의 단백질이 용출되었다. Charcoal과 IRA-900은 좋은 P66 흡착 능력을 보였지만, 용출의 비효율성으로 인해 P66 농축에 맞지 않은 것으로 판단하였다.

4M urea에 의해 가용화된 P66 I.B.을 1:20 희석법으로 refolding하면, 최종 urea 농도는 약 0.2M이 된다. 가용화된 P66 I.B.의 urea 농도를 1M로 전환한 후, urea 농도가 희석된 용액과 4배의 refolding buffer를 혼합하면, urea 농도는 0.2M이 되고, 생산된 P66 용액의 부피는 약 4.3배 줄일 수 있다. 이와 같은 Modified 1:20 희석법과 1:20 희석법으로 생산한 P66의 단백질 양과 활성을 비교하였다 (Fig. 3-87). 1:20 희석법 및 Modified 1:20 희석법에 의해 생산된 단백질은 각각 6.7 및 6.1mg이었으며, 효소 활성은 각각 1,116 및 1,140U/mg으로 산출되었다. 참고로, 1:4 희석법을 사용하면, 약 2.2mg 단백질(1,113U/mg)이 생산되었다. 이를 통해, Modified 1:20 희석법과 같이 urea의 농도를 낮추는 refolding과 filter를 적용하는 P66 농축이 P66 생산에 있어 좋은 방법인 것을 확인하였다.

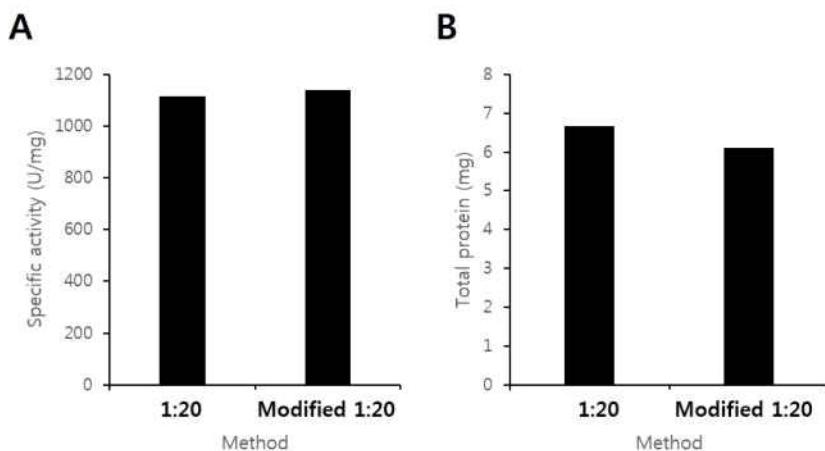


Fig. 3-87. Determination of P66 activity and protein amount in two methods after refolding. (A) Proteolytic activity against substrate azocasein; (B) calculated protein

amount.

Filter를 적용한 P66 농축을 확립하기 위해, 1:20 희석법으로 생산한 1,425ml의 P66(24.6mg)을 glass fiber membrane(WaterSep)에서 농축하였다 (Fig. 3-88). 초기 농축은 1L의 부피로 시작하였으며, 농축 시간 150분에 추가로 425ml의 P66을 첨가하여 총 1,425ml의 P66을 최종 94ml 효소액으로 농축(15배)하였다. 여과 초기의 flux(20LHM)와 여과 속도(5ml/min)는 여과 시간의 증가에 따라 감소하였는데, 10LHM flux로 떨어질 시점까지 농축을 계속하면 9시간의 농축으로 약 50배 농축이 가능한 것으로 계산되었다. 94ml의 농축액 내 총 단백질 양은 22.4mg으로 계산되어 약 91%의 단백질이 농축액 내에 존재하는 것을 확인하였다.

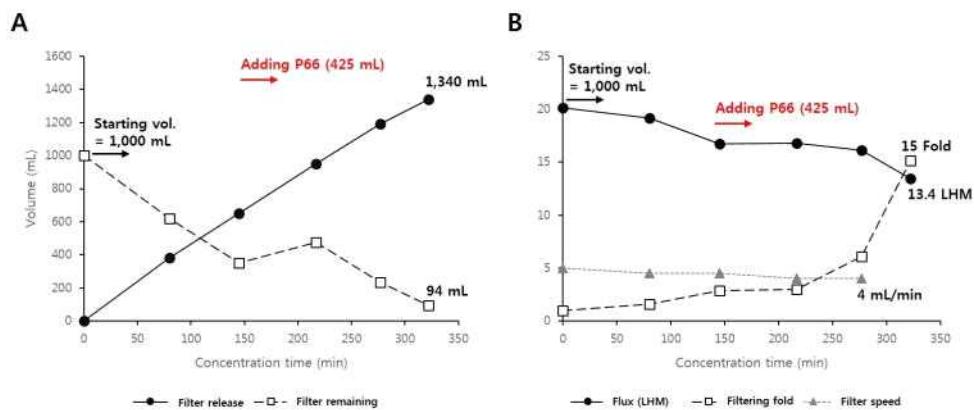


Fig. 3-88. Concentration of P66 in glass fiber filter. (A) Volume changes of filtrate during filtration; (B) determination of filter flux, filtering fold, and filter speed in time intervals.

농축된 P66의 활성 보존을 확인하는 효소 활성 측정을 수행하였다 (Fig. 3-89). 여과 방출액(5kDa 이하)에서 미량의 농축 전 효소(P66)가 존재하여 약한 활성을 나타냈지만, 대부분의 효소는 5kDa 이상의 여과 잔존액에 존재하는 것을 확인하였다. 농축된 P66의 단위 단백질 및 단위 부피 활성이 각각 899U/mg 및 215U/mL로 확인되었는데, 이는 농축 전 P66과 비교하여 각각 90% 및 1250%의 활성이었다.

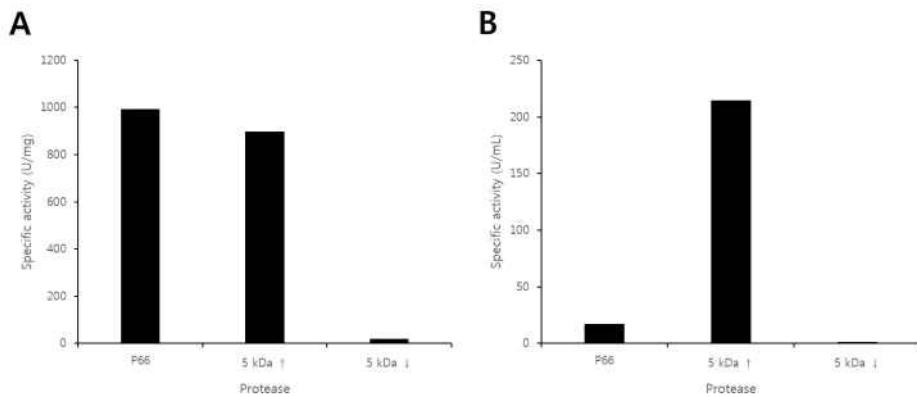


Fig. 3-89. Determination of proteolytic activity after concentration. P66, 5 kDa↑, and 5 kDa↓ are mean original enzyme, filter remaining, and filter release, respectively. (A) Activity per protein; (B) activity per volume.

### (3) P66의 산업적 응용성

(주)성우는 10% 염산알킬디아미노에틸글리신, 10% 벤젠코늄염화물, 11% 에탄올, 0.56% NaOH 및 SWP라 명명한 protease(0.0934%)로 구성된 의료 기기 세척제를 생산하고 있다. (주)성우에서 제공받은 SWP powder 1g에는 약 4.7mg의 단백질이 포함되어 있었다. SWP와 P66의 온도에 따른 활성을 비교하였다 (Fig. 3-90). 10–37°C의 모든 온도 구간에서 P66은 SWP 보다 높은 활성을 나타냈는데, P66은 10, 20 및 37°C에서 SWP 보다 각각 1.4, 1.3 및 1.7배 높은 단백질 분해력을 보였다.

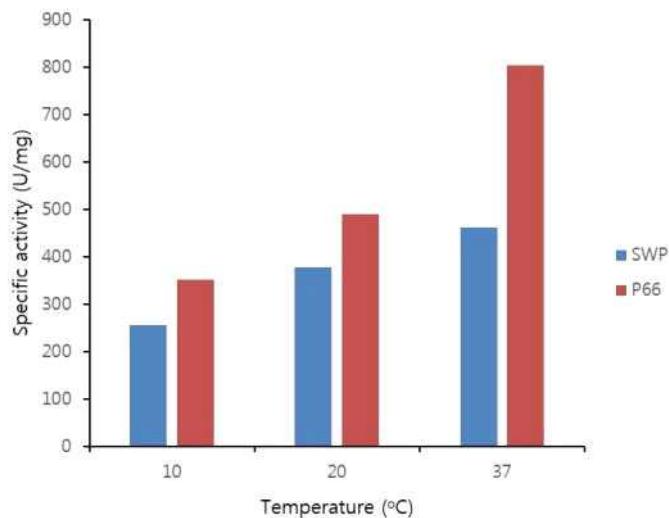


Fig. 3-90. Effects of temperature on SWP or P66 activity.

P66의 세제 적용 가능성을 확인을 위해, 5 종류의 세제 제품을 구매하였다. 세탁 세제인 Act'z, Persil 및 LiQ 1ml에는 각각 8.7, 9.3 및 10.0μg 단백질이 함유되어 있었고, 주방 세제인 순샘 유자와 순샘 버블에는 각각 1.3과 1.1mg/ml의 단백질이 존재하였다. 구매

세제들의 단백질 분해 활성(1-28U/mg)에 비해 P66의 활성은 1,071U/mg으로 많은 차이를 보였다. 세제들 중 가장 높은 활성을 나타낸 순샘 버블과 P66의 부피 당 활성을 구체적으로 비교하였다 (Fig. 3-91). 30°C에서의 P66활성은 55±3U/ml로 순샘 버블의 활성(38±1U/ml)보다 1.4배 높았으며, 10°C 저온에서는 그 차이가 더 커다 (1.7배; P66=27±1U/ml, 순샘 버블=16±1U/ml).

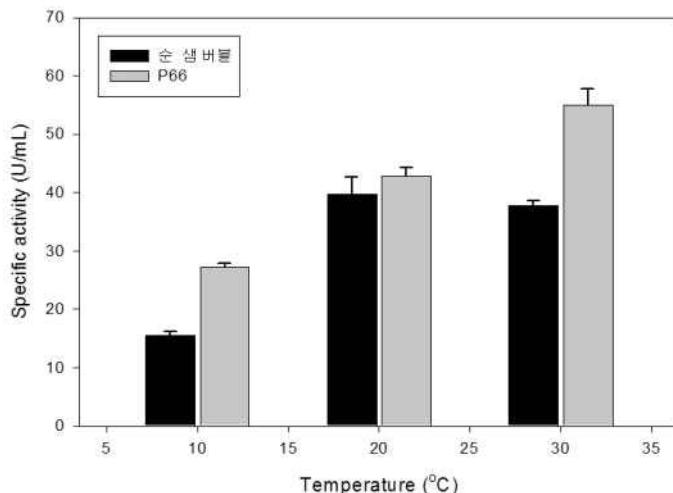


Fig. 3-91. Effects of temperature on 순샘 버블(Aekyung) or P66 activity. P66, produced by 1:20 dilution method, was directly used without concentration. The dishwashing detergent was undiluted.

P66을 가축 사료 첨가제로의 적용을 위해 옥수수와 대두를 원재료로 하는 부형제와 함께 건조하였다 (Fig. 3-92). 일반적으로 사료 첨가제는 옥수수/대두 또는 whey를 부형제로 사용하고, 부형제에 가축의 소화를 돋는 효소와 비타민 등을 첨가하여 제조된다. 제조된 사료 첨가제와 사료를 혼합하여 가축의 최종 사료로 이용한다. Air-drying과 drying oven에서 모든 부형제+첨가액들은 42시간 내에 건조되었다. D.W.를 첨가하여 건조된 고형물 내 첨가액을 추출하였고, 추출된 첨가액의 활성을 4°C 보관 첨가액과 비교하였다. 흥미롭게도, Savinase는 부형제와의 건조로 대부분의 단백질 분해 활성을 잃었지만, P66은 air-drying과 drying oven에서 활성이 잔존했다. 특히, 보존제가 첨가되면 두 종류의 건조 방법에서 보존제가 첨가되지 않았을 때 보다 잔존 효소 활성이 높았으며, 보존제가 첨가된 P66을 air-drying 방법으로 부형제와 함께 건조하면 약 75%의 활성 (4°C 보관 활성=11.7U/ml; air drying 후 활성=8.7U/ml)이 보존되었다.

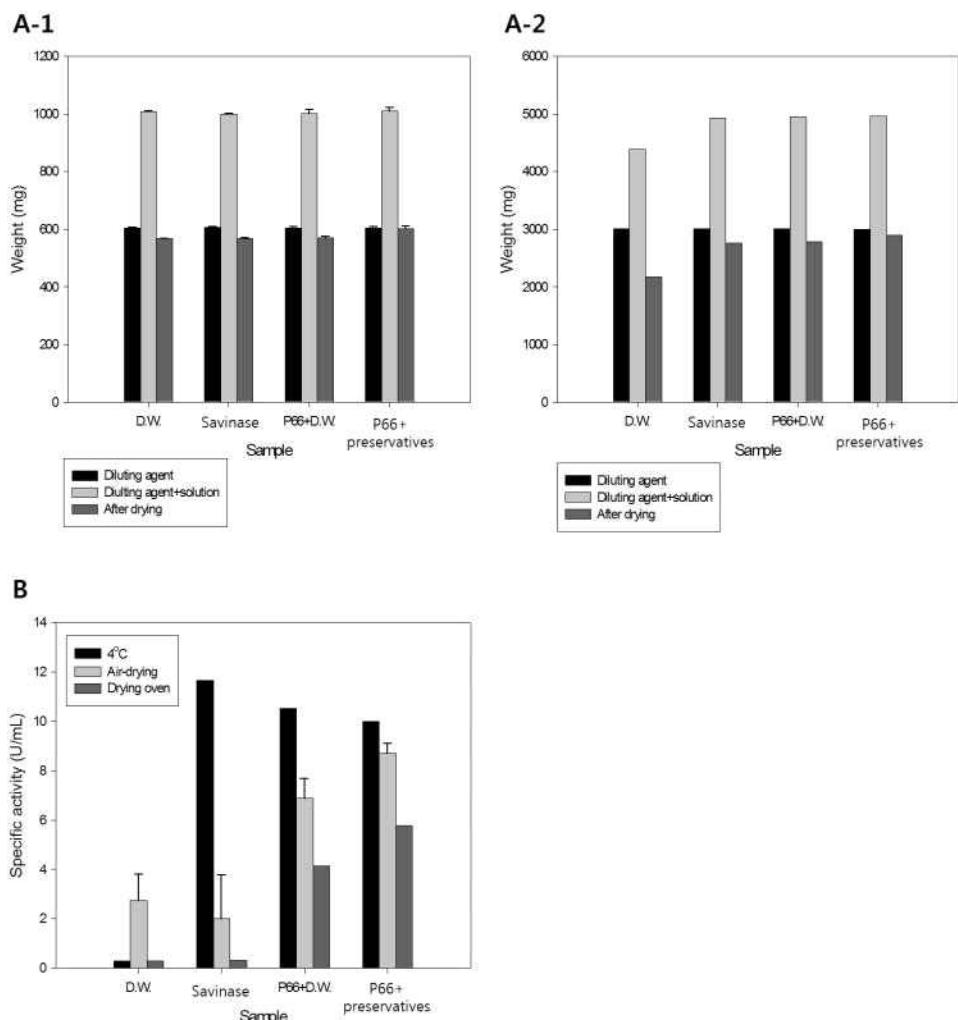


Fig. 3-92. Drying of P66 in diluting agent. Adding solutions containing D.W., Savinase, P66+D.W., or P66+preservatives were mixed with diluting agent and then, the mixtures were dried (A-1) to air-drying or (A-2) in drying oven (33°C). Weight of samples was measured in each steps. (B) Proteolytic activity of supernatant was determined after resuspending of dried samples and compared to one, stored at 4°C.

#### 라. 결론 및 제언

세계적으로 효소 산업은 급속히 증가하고 있고, 이에 따라 저온 효소 사용 요구가 증가하고 있지만, 현재까지 상품화된 저온 효소 제품은 극히 드물다. 산업적으로 가장 많이 사용되고 있는 serine protease의 경우, 2000년 이후로 저온 활성 효소 연구가 본격적으로 진행되었다. 대표적인 시판 저온 활성 serine protease인 노보자임의 Polozyme<sup>®</sup>의 10-20°C 온도 활성은 가장 널리 알려진 시판 serine protease 중 하나인 Savinase<sup>®</sup>(노보자임) 보다 10-30% 높을 뿐이다. 극지연구소에서는 남극 유래 세균인 *Pseudoalteromonas antarctica* PAMC 21717 유래 저온 활성의 알칼리성 serine protease(P66)를 *E. coli*에서 대량 생산하여 단백질 구조를 밝혔고, 효소 특성 규명이 수

행되었다. 흥미롭게도, 재조합 세균 생산 P66은 Savinase<sup>®</sup> 보다 5 및 30°C에서 각각 1.6 및 2.3배 높은 활성을 나타냈다. 또한, P66은 세탁 세제 첨가 serine protease인 노보자임의 Alcalase<sup>®</sup> 보다 5-25°C에서 3.7-4.6배 높은 활성을 나타내어 현재까지의 시판 protease들 보다 저온 및 중온 활성이 높은 것을 확인하였다. 이러한 활성 특징은 P66의 큰 substrate pocket size, 기질 유입이 용의한 disulfied bond 및 구조적 flexibility와 관련된 것으로 판단되고 있다. Substrate pocket size를 줄인 P66 mutant(T326L, S421L 및 T326L+S421L) 보다 P66이 1.31-1.40 배 높은 활성을 갖는 것을 본 연구에서 확인하였다.

높은 저온 활성으로 산업적 가치를 갖는 이량체 이상의 P66은 *E. coli*에서 inclusion body로 생산되고 refolding을 통해 활성형 단백질로 전환되는데, 이 효소의 산업 적용을 위한 P66 대량 생산 시스템을 본 연구를 통해 확보하였다. Fermentor에서 생산된 P66 I.B.는 lysozyme/DNaseI 세포 파쇄 시스템의 도입으로 쉽게 *E. coli* 세포에서부터 분리가 가능하였다. 생산된 P66 I.B.는 flask 배양의 경우 보다 57배 많았고, 1:20 회석법의 적용으로 활성 P66 회수율이 2.8배 증가하였다. 결국, 구축한 생산 시스템에서 생산되는 P66은 기존의 방법 보다 약 160배의 생산 증가를 보였다. P66 생산의 마지막 과정은 단백질 농축인데, 5kDa cut-off membrane을 이용하면 P66 용액은 최소 50배 농축이 가능한 것으로 산출되었다. 이러한 연구 결과들을 합쳐서 최종적인 P66 대량 생산 시스템을 다음과 같이 구축하였다:

- 1) Initial 배지와 feed 배지로 구성된 fed-batch를 통해 재조합 *E. coli* 배양
- 2) Lysozyme/DNaseI 세포 파쇄 시스템을 이용한 P66 I.B. 추출 후, 세척
- 3) P66 I.B. unfolding 후, 1:20 회석법으로 효소 refolding
- 4) 5kDa cut-off filter membrane을 통한 P66 농축
- 5) P66 보존제 첨가

생산된 P66은 의료 기기 세척제의 protease, 세탁과 주방 세제의 protease 보다 좋은 활성을 나타냈고, 사료 첨가제로의 사용을 위한 부형제와의 견조에서도 안정하였다. 따라서, 본 연구에서 구축된 대량 생산 시스템에서 생산된 P66은 다양한 효소 산업 영역에서 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

### 3. 항동결물질 p-CY01의 줄기세포 동결보존 기작 규명

#### 가. 연구 목표

전 세계적으로 줄기세포를 이용한 세포치료제에 대한 관심이 집중되고 있으며, 아직은 시작단계에 불과하다고 평가받고 있지만 2009년 이미 약 3,000여건의 줄기 세포 임상연구가 진행 중으로 알려져 있고 사회적으로도 줄기세포의 효용성에 관한 관심이 집중되고 있으며, 의학적으로도 현재까지 일반 의학으로 치료가 힘들었던 난치성 질환의 치료에

줄기세포가 크게 기여할 것으로 기대하고 있다. 이러한 세포치료제의 개발을 위해서는 줄기세포의 기원과 무관하게 세포치료제의 원료세포의 안전하고 효율적인 냉동보존이 필수적이다. 면역학적 부작용이 없는 자신의 줄기세포를 보관하였다가 필요시 사용하고자 할 경우에는 특히 세포의 안전한 보관이 더욱 중요하나, 현재까지 치료목적으로 바로 사용할 수 있을 정도의 줄기세포를 다량으로 안전하게 보관할 수 있는 방법이 명확히 확립되어 있지 않다고 볼 수 있다.

현재 줄기세포 뿐 아니라 배아를 포함한 대부분의 세포의 냉동보존방법은 주 냉동보존액의 원료로 이미 수십년전 부터 사용되어 오던 DMSO로 대표되는 cryoprotectant를 사용하는 방법은 양쪽성을 가져 세포막을 통과할 수 있으며, 과냉각이 가능하여 세포내 수분을 제거하므로 얼음결정에 의한 세포의 파괴를 막는 성질을 이용하고 있으며, 부재료로는 각 조직유래 세포를 보호할 수 있는 기능의 첨가물 및 세포내 소기관을 보호하거나 기능회복이 가능하게 하는 물질들 (예: sucrose, egg yolk, vitamin 등)을 사용하고 있다. 따라서 현재까지의 냉동보존방법에서 벗어나 새로운 방법의 개발이 시급함이 인식되어 많은 사람들이 좀 더 효율적인 방법을 연구해 왔으며, 근래 극지유래생물이 만드는 물질들이 세포의 냉동보존에 매우 효율적일 수 있음이 확인되고 있다 (Kim and Yim, 2007, Liu et al., 2013). 이에 본 연구에서는 항동결능을 가진 바이오플리머인 P-CY01을 이용한 줄기세포의 동결보존능과 이에 관여하는 동결보존 기작을 탐색하기 위해 본 연구를 수행하였다.

#### 나. 연구 수행방법

##### (1) 폴리머 생산균주 배양

*Pseudoalteromonas* sp. Strain CY01 균주의 seed culture는 20 g/L glucose가 첨가된 zobell (ZB) 배지 (SZB; 1.0 g/L yeast extract, 5.0 g/L peptone, 0.01g/L FeSO<sub>4</sub>, 750 mL 숙성해수, 250 mL 증류수 그리고 pH 7.0)에서 120 rpm, 15°C에서 16시간 배양하였다. 배양된 seed는 OD<sub>600</sub>에서 0.3이 되게 보정하고, 본 배양 배지에 5 % (v/v)가 되게 접종하였다. 배양 volume은 400mL이고, baffle flask를 이용하였다. 본 배양은 20 Liter 용량 발효조에서 최적생산 배지를 이용하여 15°C에서에서 3일간 배양하였고 이후 연속 원심분리를 실시하여 cell을 제거하고 배양 상등액을 얻었다.

##### (2) P-CY01 폴리머의 생산

세포가 분리된 배양 상등액을 연속투석시스템(Viva flow, VF20PA, Sartorius, Germany)에 100K cut off 투석막을 이용하여 4배 볼륨 이상 투석하였다. 염이 제거된 상등액에 2배의 cold 100% Et · OH을 첨가하고 4°C, 24시간 냉침하여 생성된 조다당

(crude) P-CY01을 분리하였다.

Crude P-CY01에서 정제시료를 얻기 위하여 P-CY01를 증류수에 녹이고 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)을 최종 0.3% (v/v)되게 첨가하여 혼합한 후 침전시켰다. 침전된 혼합물을 다시 원심분리기, 12,000 x g, 4°C의 조건으로 30분간 원심분리하여 상등액은 제거하고 침전물을 다시 10% NaCl에 용해하였다. 이를 다시 2 배의 100% cold ethanol을 첨가하고 4°C, 24시간 냉침하여 P-CY01을 침전시킨 후 12,000 x g로 30분간 원심분리하여 ethanol을 제거하였다. P-CY01을 재 회수한 후 증류수로 녹이고 연속투석시스템(Viva flow, VF20PA, Sartorius, Germany)에 100K cut off 투석막을 이용하여 염을 제거하고 농축한 후 동결 건조하여 얻은 P-CY01을 줄기세포 동결보존 실험에 사용하였다.

(3) 저분자 P-CY01(p-CY01 LM) 과 세포 침투형 동결보존제의 농도에 의한 Human stem cell의 동결보호 특성.

폴리머가 가지는 높은 점성과 낮은 용해성을 줄기세포의 냉동보존에 적용하는 장애가 되므로, 폴리머의 분해를 통해 평균 분자량의 감소가 점성을 낮추고 가용성을 증가시킬 수 있다. 폴리머가 가지는 이러한 단점을 극복하기 위하여, P-CY01의 분자량을 약산 분해를 통하여 조절하였다. P-CY01을 0.1M의 TFA(Trifluoroacetic acid)와 함께 121°C에서 1시간 가열하여 산분된 p-CY01 LM을 확보하고 p-CY01 LM 폴리머의 Human stem cell에 대한 항동결 능력을 확인하기 위하여 Human stem cell에 p-CY01 LM과 침투형 동결 보존제인 DMSO를 농도별(DMSO:1~5%, p-CY01 LM 1~4%)로 처리하여 -80°C에 다른 전처리 없이 바로 동결한 후 해동하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 4일 간 배양하여 proliferation 되는 형태를 비교 관찰하였다.

(4) p-CY01 LM의 Antifreezing activity(icecrystal growth inhibition) 분석

p-CY01 LM 폴리머의 Antifreezing activity는 nanoliter osmometer를 이용하여 현미경 관찰을 통해 Icecrystal growth morphology를 기초로 분석하였다. 1 μl의 각처리구 샘플을 osmometer mount에 loading 후 급속 동결하고 single icecrystal이 남을 때 까지 천천히 해동한 후 재동결하여 Icecrystal growth pattern을 관찰하고 기록하여 p-CY01 LM의 Antifreezing activity를 측정하였다.

(5) RBC morphology 관찰을 통한 p-CY01 LM의 dehydration 효과

p-CY01 LM이 가지는 dehydration 효과를 확인하기 위하여 Red blood cell(RBC)을 모델로 하여 동결전, p-CY01 LM 처리 유무에 따른 cell 형태의 변화와 동결 및 해동 후,

p-CY01 LM 처리 유무에 따른 cell 형태의 변화를 관찰 하였다.

(6) p-CY01 LM의 enthalpy change level을 측정을 위한 Differential Scanning Calorimetry(DSC) 분석

p-CY01 LM의 supercolling point 및 enthalpy change level을 측정하기 위하여 DSC 분석을 실시하였다. 세포침투형 동결보존제인 glycerol과 DMSO만 1%(V/V)만 ADSOL solution에 녹인 것을 negative control로 하였으며 여기에 0.5와 2.5%(W/V)의 p-CY01 LM을 첨가한 처리구를 비교 분석하였다. 각 처리구는 5°C에서 -78°C까지 분당 40°C의 속도로 냉각시켰으며 -78°C까지 냉각된 샘플은 분당 2°C의 속도로 실온까지 천천히 해동하였다. 이때 heat flow (mW)는 endothermic or exothermic으로 분석하였다.

#### 다. 연구 결과

(1) 저분자 P-CY01(p-CY01 LM) 과 세포 침투형 동결보존제의 농도에 의한 Human stem cell의 동결보호 특성.

p-CY01 LM 폴리머의 항동결능을 이용해 Human stem cell의 냉동보존 시에 10% 고농도 DMSO의 세포독성을 줄일 수 있는 제형을 개발을 위해 DMSO를 1%의 저농도로 고정하고 p-CY01 LM을 1%에서 4%까지 조절한 처리구. p-CY01 LM을 3%로 고정하고 DMSO를 2%에서 5%까지 조절한 처리구 그리고 p-CY01 LM의 단독효과를 확인하기 위해 p-CY01 LM을 1%에서 4%까지 조절한 처리구에 Human stem cell을 접종하여 -80°C에 다른 전처리 없이 바로 동결한 후 해동하여 CO<sub>2</sub> incubator에서 4일간 배양하여 proliferation 되는 형태를 비교 관찰하였다.

각 처리구의 proliferation을 확인하기 위해 해동 후 계대하여 CO<sup>2</sup> 배양기에서 4일간 배양하여 현미경 검증한 결과, 아무것도 처리하지 않고 FBS만 처리구에서는 stem cell의 proliferation이 거의 확인되지 않았고(Fig. 3-93a) 10% DMSO를 처리한 처리구와 1% p-CY01 LM과 1% DMSO를 섞어 처리한 처리구의 proliferation이 거의 유사함을 관찰 하였다 (Fig. 3-93b,c). 이러한 결과는 1%의 저농도로 p-CY01 LM을 stem cell 냉동보존제로 첨가하였을 때, 기존의 10%를 사용하는 고농도 DMSO의 사용농도를 1% 까지 낮추어 사용하는 것이 가능하게 한다. 따라서 향후 Human stem cell 냉동보존에 따른 DMSO의 세포독성을 줄일 수 있는 새로운 제형개발에 중요한 요소가 될 것으로 예상하였다.

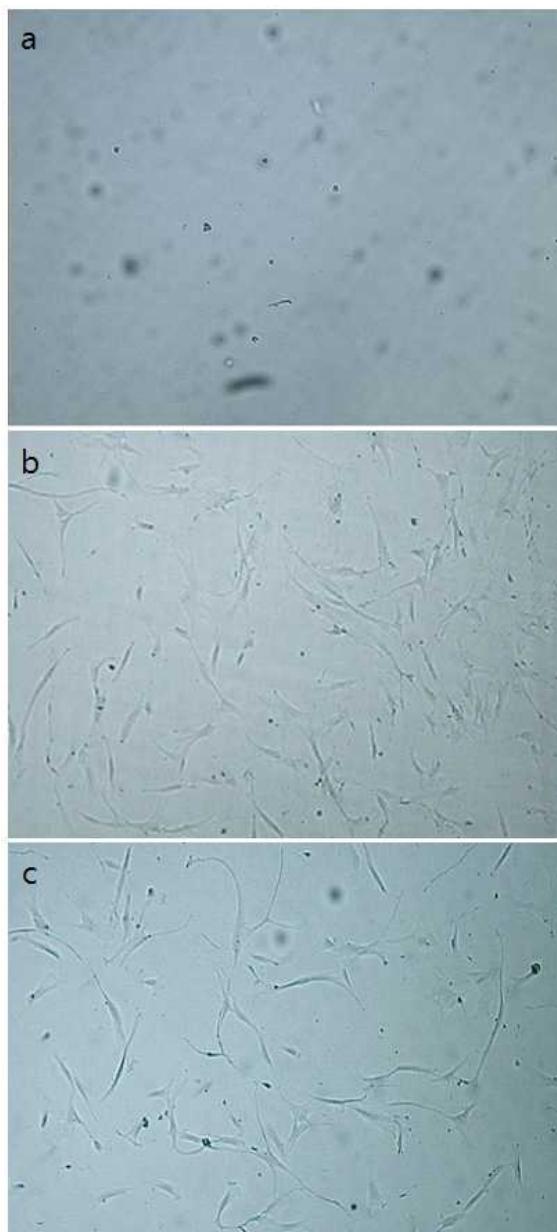


Fig. 3-93. The proliferation efficiency of cryopreserved human stem cells. Three day after seeding, the growth status of cells after various treatments is shown(a; FBS only, b; 10% DMSO, c; 1% DMSO and 1% p-CY01 LM in FBS).

## (2) p-CY01 LM의 Antifreezing activity(icecrystal growth inhibition) 분석

p-CY01 LM 폴리머의 Antifreezing activity는 nanoliter osmometer를 이용하여 현미경 관찰을 통해 Icecrystal growth morphology를 기초로 분석한 결과, glycerol과 DMSO 1%(V/V)를 처리한 실험구에서는 어떠한 Icecrystal growth inhibition 없이 모든 방향으로 Ice crystal growth가 관찰되었고 (Fig. 3-94. A-1, A-2), 반면 2.5%(W/V)의 p-CY01 LM이 처리 된 실험구의 경우 single ice crystal의 형태에서 천천히 동결하였을 때 Icecrystal growth inhibition 효과에 의해 Ice growth가 저해되는 현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 3-95. B-1, B-2). 이러한 현상은 일반적으로 Antifreeze protein이 Ice-interaction 했을 때 나타나는 현상으로서 알려져 있으며 (Gwak et al., 2015) 일반적인 세포보호형 동결보호제로 사용되는 바이오파리미에서는 알려져 있지 않은 현상이다. 따라서 p-CY01 LM의 경우 매우 독특한 동결보호 기작을 가지고 있으며 이러한 특징이 Human stem cell의 냉동보존에 중요한 역할을 할 것으로 예상된다.

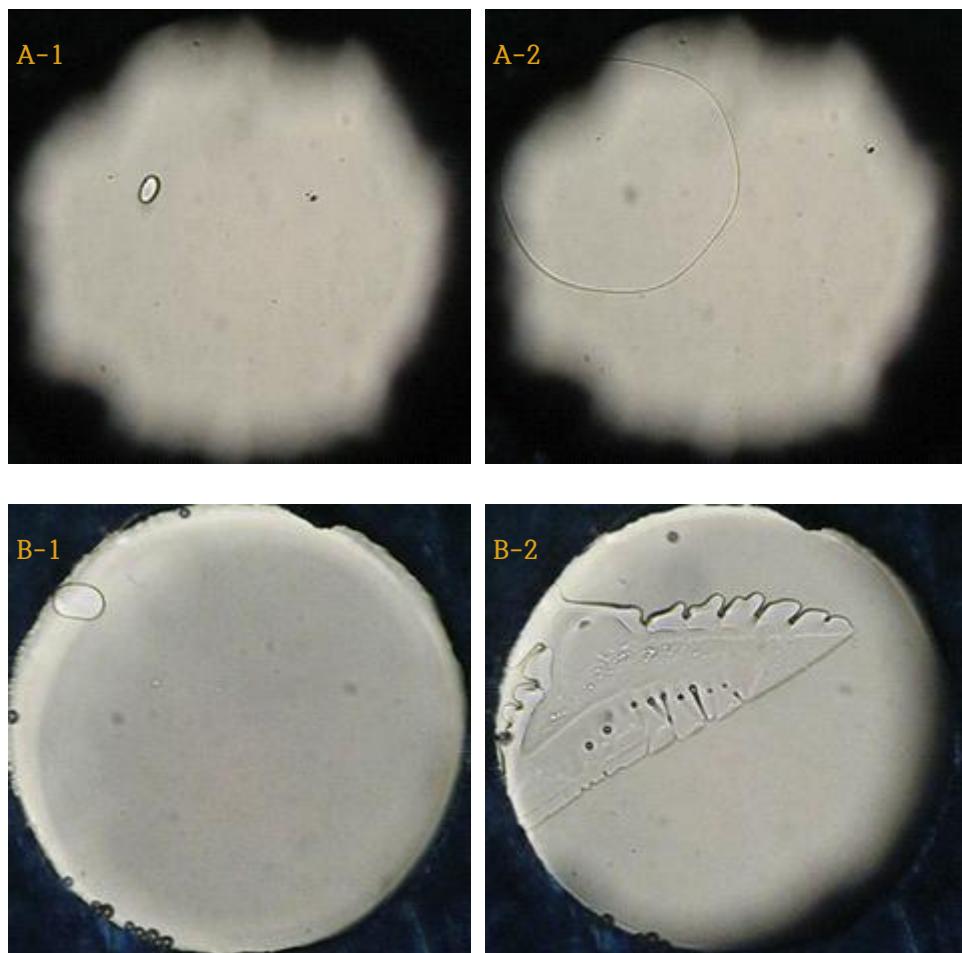


Fig. 3-94. Image of ice crystal growth. No antifreeze activity was observed for the control (1% (v/v) glycerol, DMSO in Saline solution) as evidenced by round, flat icecrystals (A-1 and A-2). Single ice-crystals in p-CY01 LM solution initially grew as hexagons, and developed into wide flat shape (B-1 and B-2) as the temperature

was cooled and warmed in very slow cycles.

### (3) RBC morphology 관찰을 통한 p-CY01 LM의 dehydration 효과

Red blood cell(RBC)을 모델로 하여 동결전, p-CY01 LM 처리 유무에 따른 cell 형태의 변화와 동결 및 해동 후, p-CY01 LM 처리 유무에 따른 cell 형태의 변화를 관찰하여 p-CY01 LM이 가지는 dehydration 효과의 유무를 확인하였다.

RBC에 2.5% p-CY01 LM을 처리한 직후에는 수분의 membrane 이동이 정상적인 Isotonic type의 별다른 cell의 형태변화가 관찰되지 않았으나(Fig. 3-95A) 처리 5min 이후, RBC의 형태가 수분이 빠져나간 Hypertonic type의 cell 형태변화가 관찰되었다 (Fig. 3-95B) 이는 RBC 외부에 존재하는 p-CY01 LM의 dehydration 효과에 의한 것으로 예상된다. 해동 후, 회수한 RBC에 ADSOL buffer를 처리하고 각 실험구를 관찰한 결과 2.5% p-CY01 LM을 처리한 처리구의 RBC는 온전한 형태의 세포가 다수 존재하는 것을 확인하였으나 saline solution만 처리한 실험구에서는 거의 모든 RBC가 hemolysis되어 융혈된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3-95C, D).

DMSO나 glycerol같은 세포 침투형 냉동보존제의 경우 세포막을 투과하여 세포내 형성되는 ice crystal의 형성을 억제하여 세포의 손상을 막는 기작이 주요하다면 물질이 세포내로 침투하지 않는 trehalose, sucrose, raffinose, HES 같은 당이나 다당류 같은 세포보호형 동결 보존제의 경우, 본격적인 동결과정 전에 dehydration을 통해 세포내 수분 함량을 감소시켜 세포의 손상을 막는 기작을 가지는 것으로 알려져 있다 (Sui et al., 2007). 실험결과를 통해 p-CY01 LM의 경우에도 유사한 동결보호 기작을 가질 것으로 확인하였다.

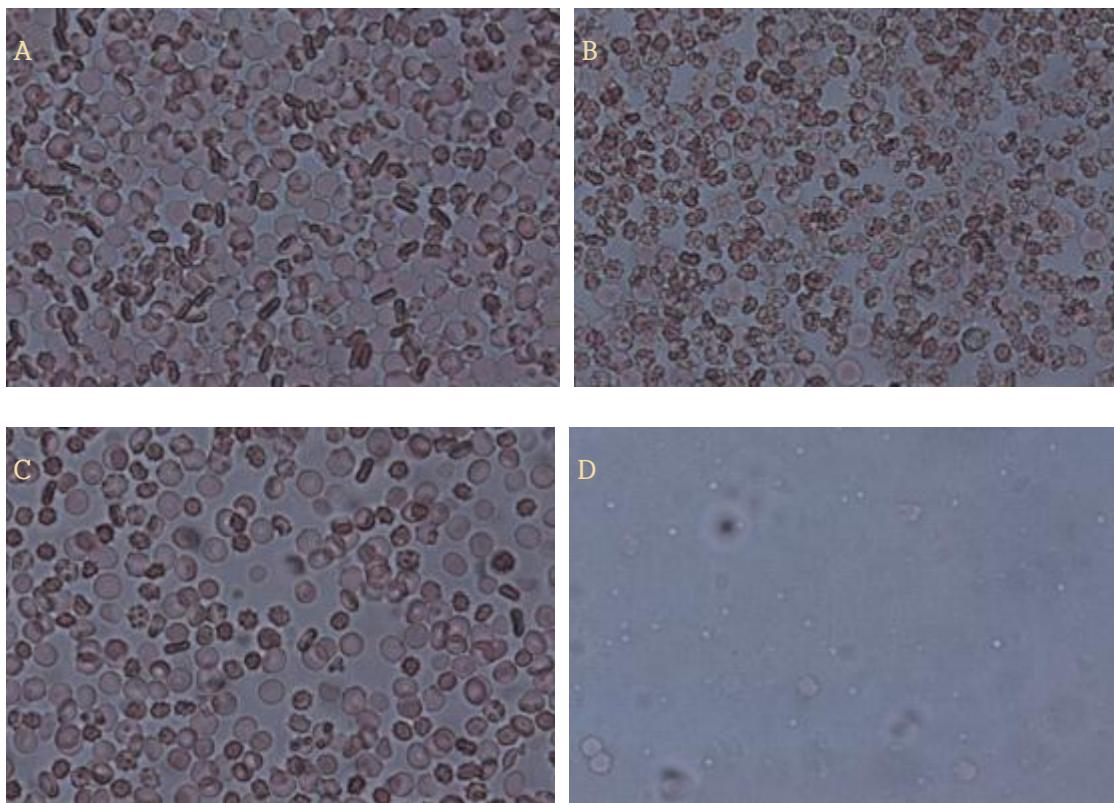


Fig. 3-95. Freezing images of RBC. Before freezing, images of RBC in presence of (A) 2.5% p-CY01 LM at 0min, (B) 2.5% p-CY01 LM at 5min. After freezing, images of RBC in presence of (C) 2.5% p-CY01 LM and (D) saline solution only. Samples were cooled to  $-80^{\circ}\text{C}$  and then warmed to  $38^{\circ}\text{C}$ .

#### (4) p-CY01 LM의 enthalpy change level을 측정을 위한 Differential Scanning Calorimetry(DSC) 분석

p-CY01 LM의 super-cooling point 및 enthalpy change level을 측정하기 위하여 DSC 분석을 실시하였다. 세포 침투형 동결보존제인 glycerol과 DMSO만 1%(V/V)만 ADSOL solution에 녹인 것을 negative control로 하였으며 여기에 0.5와 2.5%(W/V)의 p-CY01 LM을 첨가한 처리구를 비교 분석하였다. Table 3-17의 결과에서와 같이 glycerol과 DMSO만 첨가 되었을 때의 Freezing point는  $-14.2 \pm 1.2^{\circ}\text{C}$ 였고 0.5%에서 2.5% 까지 p-CY01 LM을 첨가하였을 때  $-32.1 \pm 3.1^{\circ}\text{C}$ 까지 떨어졌다. 또한 enthalpy change level 값이 감소하였는데 이는 냉동 및 해동 cycle 내에서 Ice crystallization될 수 있는 수분의 총량이 감소하였음을 의미한다. 이는 앞서 확인한 dehydration을 통해 세포내 수분 함량을 감소시켜 세포의 손상을 막는 기작과도 관련이 있을 것으로 예상된다. glycerol과 DMSO 1%(V/V)를 ADSOL에 섞었을 때 enthalpy change level 값은  $212.0 \pm 3.8 \Delta\text{H}(\text{J/g})$ 였고 p-CY01 LM 2.5%(W/V)를 첨가하였을 때 enthalpy change level 값은  $52.81 \pm 8.7 \Delta\text{H}(\text{J/g})$ 로 DSC 분석을 통해 p-CY01 LM 폴리머가 세포의 냉

동보존에 관여하는 새로운 메카니즘을 추측할 수 있었다. 이전 연구에 따르면 냉동보존제로 HES, dextran, DMSO 그리고 glycerol을 사용하고 여기에 biochemical stabilizers로 nicotinamide, nifedipine, flurbiprofen을 섞어 적혈구 냉동보존을 위해 제작한 LC-V solution의 경우  $164 \Delta H(J/g)$ 의 enthalpy change level을 보였다고 발표하였고 40% glycerol의 enthalpic change level 값은  $92 \Delta H(J/g)$ 로 알려져 있다 (Wagner et al., 2000 and 2002).

Table 3-17. DSC analysis of p-CY01 LM solution.

Condition	Freezing( $^{\circ}$ C)	Thawing( $^{\circ}$ C)	$\Delta H(J/g)$
$^aG, ^\beta D 1\%$	-14.2 $\pm$ 1.2	-2.2 $\pm$ 0.5	212.0 $\pm$ 3.8
$^aG, ^\beta D 1\% + LM CY01 0.5\%$	-13.9 $\pm$ 2.2	-6.1 $\pm$ 1.0	139.3 $\pm$ 6.7
$^aG, ^\beta D 1\% + LM CY01 2.5\%$	-32.1 $\pm$ 3.1	-8.7 $\pm$ 0.6	52.81 $\pm$ 8.7

$^aG, ^\beta D$  are expressed as Glycerol and DMSO. All experiments are dissolved in ADSOL. Values represent means  $\pm$  SD for three experimental repeats.

#### 라. 결론 및 제언

이상의 p-CY01 LM의 동결보존 기작을 확립하기 위하여 다양한 실험결과를 분석한 결과, Fig. 3-96 에서와 같이 동결과정 중 하나 이상의 복합적인 동결보호기작을 가질 것으로 예상하였다. 동결과정이 진행되면 세포내의 수분은 ice crystal로 변환되며 ice crystal growth 현상에 의해 세포내 기관 등이 손상을 입으며 물분자의 부피증가와 함께 용혈 되기 시작 한다 (Fig. 3-96a). 이때 세포외에서 생성되는 ice crystal 의해 세포막 수준의 손상도 함께 일어난다 (Fig. 3-96b). p-CY01 LM의 경우 세포외부에 존재하면서 먼저 세포외에 존재하는 수분과 결합하여 ice crystal growth inhibition을 유도하여 일차적으로 세포막 수준의 손상을 감소시키고 (Fig. 3-96c) 동시에 dehydration을 통해 세포내 수분 함량을 감소시켜 세포막내에서 형성될 수분의 ice crystal 함량을 감소시킬 것이다 (Fig. 3-96d, e). 이는 enthalpy change level 값을 감소시켜 냉동 및 해동 cycle 내에서 Ice crystallization될 수 있는 수분의 총량이 감소하였음을 의미한다. 종합적으로 p-CY01 LM의 동결보호기작은 일반적으로 알려진 당이나 폴리머의 동결보호 기작 외에 Antifreeze protein이 가지는 동결보호 기작 까지 여러 각도로 작용하여 우수한 동결보호능을 가지게 되는 것으로 예상하였다.

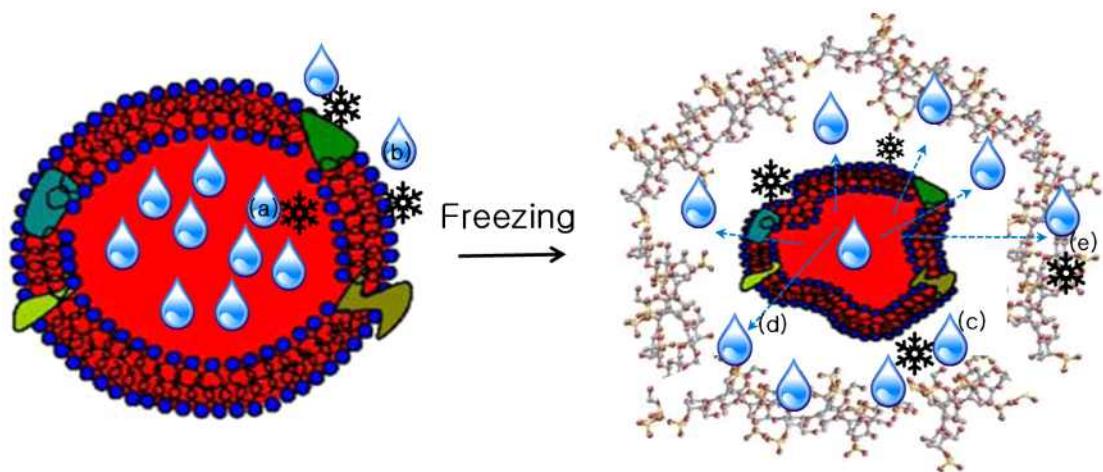


Fig. 3-96. Cryo-protection mechanism of p-CY01. Upon cryopreservation, Intracellular (a) water crystallises to ice which can lead to damage including to membranes (b). p-CY01 LM in turn binds extracellular water (c) and establishes a concentration gradient which removes water from the cell (d), and can thereby confine ice formation away from the cell (e). In addition, p-CY01 LM inhibited ice crystal growth of extracellular membrane(c) and it is considered to stabilize the cell membrane.

#### 4. 항치매치료제 라말린의 치매억제 기작 규명

##### 가. 연구 목표

###### (1) 항치매 치료제 라말린의 치매억제 기작 규명을 위한 라말린 시료 합성

항치매 치료기작에 영향을 주는 2가 양이온인 주석을 제거하여 순수한 라말린의 활성을 확인하기 위한 주석 제거실험을 수행하였다. 기존 합성법으로 합성된 라말린은 약 4800ppb 수준의 농도로 주석(Sn) 이 검출된다. 최종 합성단계인 재결정 과정에서도 제거가 되지 않는다. 다른 정제과정인 레진(Silica, C18) 등을 이용한 정제과정은 활성이 높은 라말린의 구조가 변형되는 문제가 있다. 합성과정중 주석이 사용되는 하이드라진 부분 합성 단계에서부터 주석이 흡착되어 최종 라말린 합성까지 제거가 되지 않는다. 이에 기존 합성된 라말린으로 부터 주석을 제거하는 실험과 주석을 사용하지 않고 합성하는 새로운 합성법을 개발하였다.

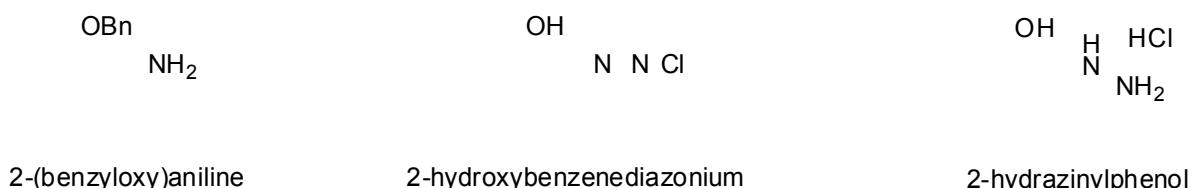


Fig. 3-97. 기존 라말린 합성중 하이드라진 부분 합성법

## (2) 라말린의 항치매 활성기작 규명

알츠하이머병 치료제 개발에 있어서 가장 좋은 target은 A $\beta$  생산 효소인 BACE1과  $\gamma$ -secretase이다. 이들 효소의 발현을 조절하는 극지유래 물질인 ramalin에 대한 연구를 바탕으로 ramalin 대사체, 극지유래 유사체 및 변형체의 확보와 이들의 항치매 효능 및 활성기작에 대한 연구를 수행하였다.

### 나. 연구 수행방법

#### (1) 유기용매와 물층의 층 분리를 통한 주석 제거 실험

라말린은 기본 골격인 Glutamic acid 구조에 페닐 하이드라진이 붙어있는 구조를 가지고 있다. 주석은 라말린의 아미노산형태의 구조와 하이드라진 부분에 흡착될 가능성이 높다. 물에 잘 녹는 라말린의 성질을 이용하여 라말린을 물에 녹이고 유기용매와의 층 분리를 통해 주석 성분을 유기용매로 이동시키는 방법을 적용하였다.

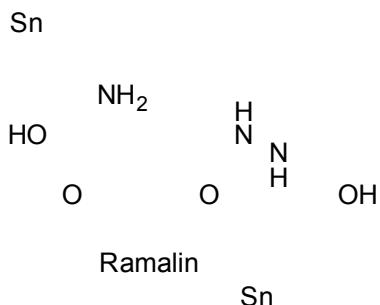


Fig. 3-98. 라말린의 구조적 특징

주석성분이 검출된 기준 합성된 라말린을 물에 100ppm (1mg/10ml) 농도로 녹인다. 이 때 사용되는 물은 산소가 제거된 물을 이용한다. 사용된 물과 동일한 양의 유기용매를 첨가하고 상온에서 약 3시간동안 충분히 섞일 수 있도록 빠르게 교반한다. 교반 후 층이 나뉠 수 있도록 정치한다. 물층을 회수하여 ICP-MS 원소 분석을 수행한다.

#### (2) 산을 이용한 주석 제거 실험

2가 양이온의 형태인 주석을 대체할 수 있는 수소이온을 가지는 HCl을 이용하여 주석과의 연결을 약하게 한다. 이 때 물에 녹아있는 형태가 되면 언제든 다시 주석이 붙을 수 있으므로 물이 전혀 없는 유기용매를 이용한다. 라말린 최종 정제과정에 사용되는 ACN, THF등의 용매를 이용하여 라말린의 분해를 예방한다.

주석이 포함된 라말린에 ACN 용매를 상온에서 첨가한다. 농도는 100ppm으로 하며 용매 안의 산소를 충분히 제거한 후 사용한다. Magnetic bar를 이용 교반하며 HCl gas

를 약 1시간 첨가한다. 밀봉한 상태로 12시간 교반을 진행한 후 필터하여 라말린을 회수한다.

### (3) 주석을 사용하지 않는 새로운 합성법 개발

주석이 사용되지 않는 합성법을 개발하여 주석으로 인한 치매억제 규명의 어려움을 해소한다. Tin(II) chloride를 대신하여 CuI를 사용하며 하이드라진 부분이 합성된 후의 반응은 기존 방법을 적용한다.

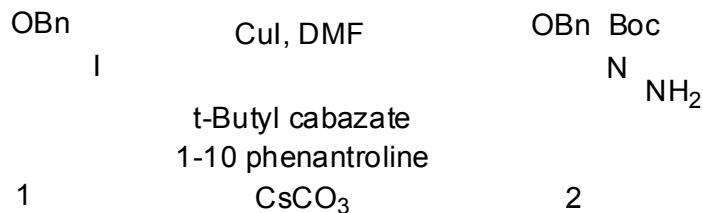


Fig. 3-99. CuI를 이용한 새로운 하이드라진 부분 합성법

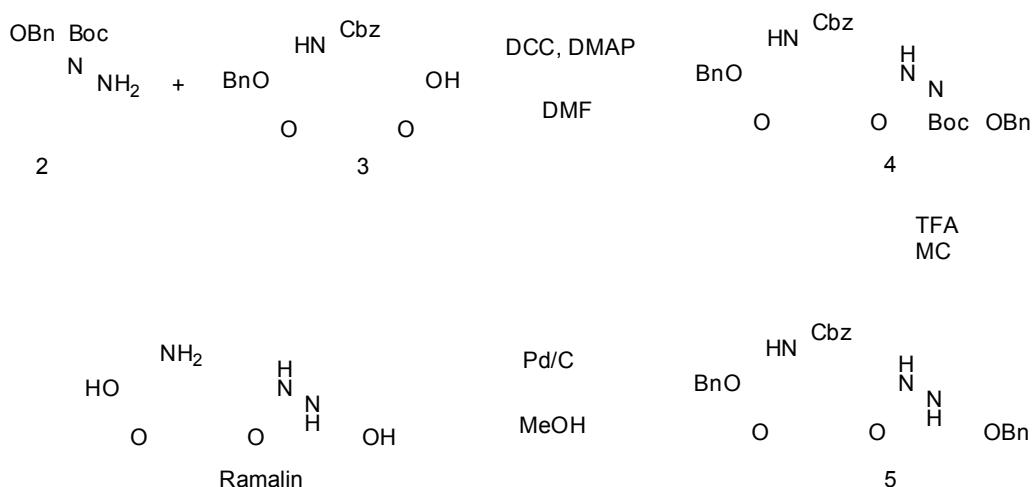


Fig. 3-100. 주석을 사용하지 않는 새로운 합성법

### (가) 2번 물질 (tert-butyl 1-(2-(benzyloxy)phenyl)hydrazinecarboxylate)의 합성

압력 반응용기에 1번 물질을 넣고 t-Butyl carbazate 1.2당량, CuI 0.1당량, 1,10-phenanthrolin 0.2당량 Cesium carbonate 1.4 당량을 첨가하고 DMF 용매에 녹인다. 감압하여 용매에 잔존하는 산소를 제거하고 압력용기를 밀봉한다. 80도 온도에서 12시간 교반 반응시킨다. Silicagel로 필터한 후 감압 농축한 후 C18 래진을 이용하여 정제한다. 수율은 80%이다.

(나) 4번 물질 (tert-butyl 2-(5-(benzyloxy)-4-(((benzyloxy) carbonyl) amino)-5-oxopentanoyl)- 1-(2-(benzyloxy)phenyl)hydrazinecarboxylate )의 합성

등근 플라스크에 3번물질을 첨가하고 DCC 1.5당량, DMAP 1.5당량을 첨가한 후 toluene 용매에 녹인 후 온도를 0도로 낮춘다. 합성된 2번 물질을 toluene에 녹인 후 3번물질이 녹아있는 반응용기에 천천히 첨가한다. 0도를 유지하면서 2시간 교반을 진행 한다. 반응여부를 TLC를 이용하여 확인한 후 1N HCl을 첨가하여 반응을 종결시킨다. Ethyl acetate를 이용하여 층 분리하고 유기층을 회수한 후 감압 농축한다. Silica gel을 이용하여 정제를 진행하여 4번 물질을 얻는다. 수율은 74%이다.

(다) 5번 물질 (benzyl 2-((benzyloxy) carbonyl)amino) -5- (2-(2-(benzyloxy) phenyl) hydrazinyl)- 5-oxopentanoate )의 합성

등근 플라스크에 4번 물질을 첨가하고 MC 용매에 녹인다. TFA 1.2당량을 상온에서 천천히 첨가한다. 1시간 교반 반응 후 감압 농축하여 TFA와 MC를 제거한다. 농축물을 EA에 녹인 후 물과의 층분리를 통해 잔존 TFA를 제거한다. Silica gel을 이용한 정제를 수행하여 5번 물질을 얻는다. 수율은 90%이다.

(라) 라말린의 합성

등근 플라스크에 5번 물질을 첨가하고 MeOH에 녹인다. Palladium on carbon을 무개 대비 10%의 양을 첨가하고 10~20 psi 압력을 가하여 탈벤질화 반응을 24시간 교반 진행한다. 반응 완료 확인 후 촉매를 여과하여 제거하고, 여액은 감압 농축한다. 농축된 합성물은 MeOH와 ACN을 이용하여 재결정을 수행하고 ACN으로 충분히 씻어준다. 수율은 90%이다.

## 다. 연구 결과

(1) 유기용매와 물층의 층분리를 통한 주석 제거방법 결과

(가) 잔존 주석 성분 검사

Ethyl acetate(EA), Ethyl ether, Methylenec chloride(MC) chloroform등의 유기용매와 물에 녹인 라말린의 교반 및 층분리를 수행 후 라말린이 녹아있는 물층의 주석 성분 변화량을 검사하였다.

Table 3-18. ICP-MS 분석결과 (ppb = ug/Kg)

Sample	Sn	Na
EA + Ramalin	1241.5	2464699

Sample	Sn	Na
Ether + Ramalin	1571.1	2323610
MC + Ramalin	3539.1	2654962
CHCl <sub>3</sub> + Ramalin Citric A	2790.5	1526092
CHCl <sub>3</sub> + Ramalin HCl	562.1	1963616
CHCl <sub>3</sub> + Ramalin CaCO <sub>3</sub>	861.1	1709479
CHCl <sub>3</sub> + Ramalin resin	1592.9	2579528
CHCl <sub>3</sub> + Ramalin NaHCO <sub>3</sub>	411.6	1687612

기준 라말린이 가지고 있는 약 4800 ppb의 농도보다는 모든 유기용매가 수치를 줄이는 효과를 보였다. 하지만 모든 주석이 제거되는 조건은 찾지 못하였다. 물과의 총 분리가 가장 잘 이루어지는 용매인 chloroform에 산이나 염기물질을 추가 투입한 결과, 산 성분중에는 HCl을 첨가한 경우가 가장 낮게 측정되었다. 이는 강한 산의 수소 양이온이 주석을 대체함으로 판단된다. 염기를 첨가한 경우 주석 양이온을 염기성분이 잡아줄 수 있는 것으로 보이나 라말린이 염기에 불안정하여 라말린이 분해되는 문제가 있다.

## (2) 산을 이용한 주석 제거 실험 결과

### (가) 잔존 주석 성분 검사

라말린을 녹이지 않으며 물에 섞일 정도의 극성을 가지는 용매를 대상으로 용매를 선정하였다. ACN과 THF는 라말린을 전혀 녹이지 않아 적합하였으나, MeOH는 라말린이 조금씩 녹아들어 부적합한 용매이다. HCl 가스를 첨가한 이후에 THF용매는 라말린을 녹이며 라말린이 변형됨을 확인하였다. ACN이 가장 적합한 용매로 선정되었고 HCl 가스를 1시간 동안 첨가하고 12시간 교반한 후 잔존 주석 성분을 검사하였다.

Table 3-19. 산을 이용한 주석제거 실험의 ICP-MS 분석결과 (ppb = ug/Kg)

Sample	Sn	Na
ACN + Ramalin + HCl	ND	2669900
THF + Ramalin + HCl	fail	fail
MeOH + Ramalin + HCl	fail	fail

### (나) 농도 및 반응시간의 결정

ACN의 농도결정은 ACN에 녹지 않는 라말린과 HCl과의 반응확률의 결정이다. 너무 낮은 농도의 경우 충분한 HCl이 녹아들지 않은 상태에서의 불 완전한 반응이 일어날

수 있으며 높은 농도의 경우는 HCl이 많이 녹아들어 라말린의 안정성이 저해된다. 라말린이 분해되지 않으면 주석이 모두 제거되는 농도는 100ppm 농도이며 HCl gas를 1시간 적당하며 2시간 이상 투입할 경우 라말린이 분해되기 시작한다. 밀봉 후 상온에서 12시간 교반하여 충분히 주석을 잡아내면 주석이 검출되지 않는 라말린을 얻을 수 있다.

### (3) 주석을 사용하지 않는 새로운 합성법 개발실험 결과

### (가) 합성수율

총 4단계의 합성단계를 거쳐 합성된다. 하이드라진 형성단계 80% 수율, 하이드라진과 글루탐산 연결반응 74%, Boc 보호기 이탈반응 90%, 벤질기 제거반응 90% 이다. 총 합성단계 수율은 약 48% 이다.

(나) 새로운 합성법으로 합성된 라말린의 ICP-MS 분석 결과

기존 합성법으로 합성된 라말린과 주석을 사용하지 않는 새로운 합성법으로 합성된 라말린을 ICP-MS를 이용하여 중금속 분석을 실시하였다. 새로운 합성법으로 합성된 라말린에서는 주석이 전혀 검출되지 않았으며 대체 반응물인 CuI의 구리 성분도 검출되지 않았다.

Table 3-19. 신규 합성법에 의한 라말린의 ICP-MS 분석 결과 (ppb = ug/Kg)

Sample	Sn	Cu	Na
Ramalin standard	4852	ND	1057389
Ramalin New syn	ND	ND	2008000

#### (다) NMR 분석

기준 합성법으로 합성된 라말린과 CuI를 이용한 라말린 모두 NMR 상 일치함을 확인하였다. 이는 또한 천연물 라말린 NMR 데이터와도 일치한다.

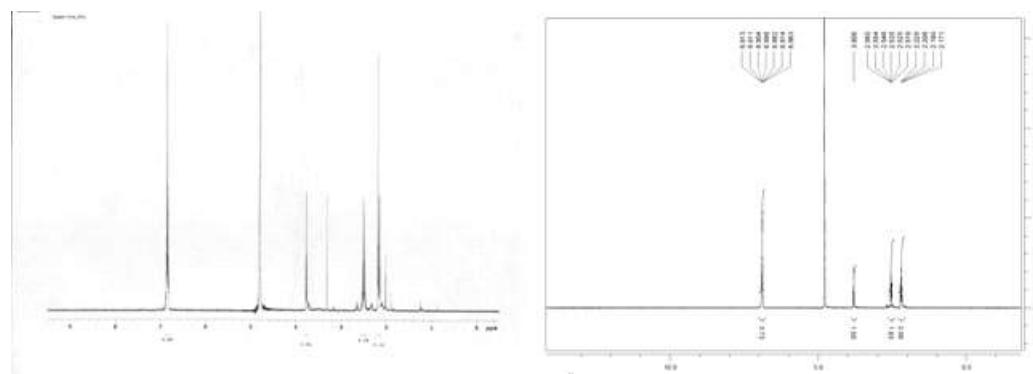


Fig. 3-101. 기존 합성법 및 주석제거 합성법으로 합성된 라말린 NMR 데이터

#### (4) 라말린의 항치매 활성기작 규명

##### (가) BACE1 promoter 연구를 통한 라말린 target 검증

BACE1 promoter를 full sequence, -1150, -815, -731, -619 부분부터 coding sequence까지 각각 cloning하여 luciferase vector의 5' region에 sub-cloning을 완료하였다. Full promoter를 가지고 있는 luciferase vector를 transformation 후 Ramalin의 효과를 확인한 결과, Ramalin은 luciferase의 activity를 변화시키지 못하였다 (Fig. 3-102).

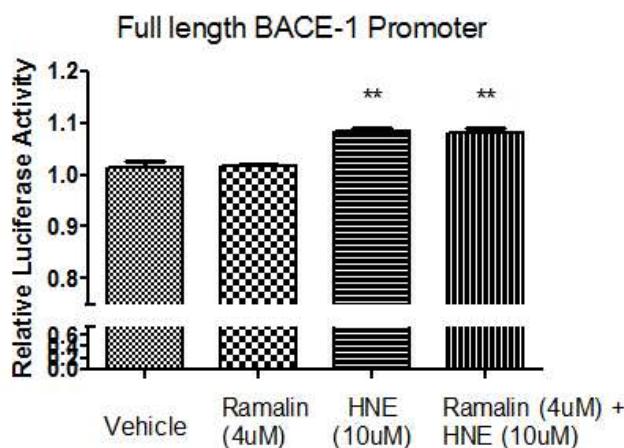


Fig. 3-102. Ramalin does not affect BACE1 full length promoter

순차적으로 절단된 promoter들도 luciferase의 activity가 Ramalin에 의해 조절되지 않음을 확인하였다 (Fig. 3-103).

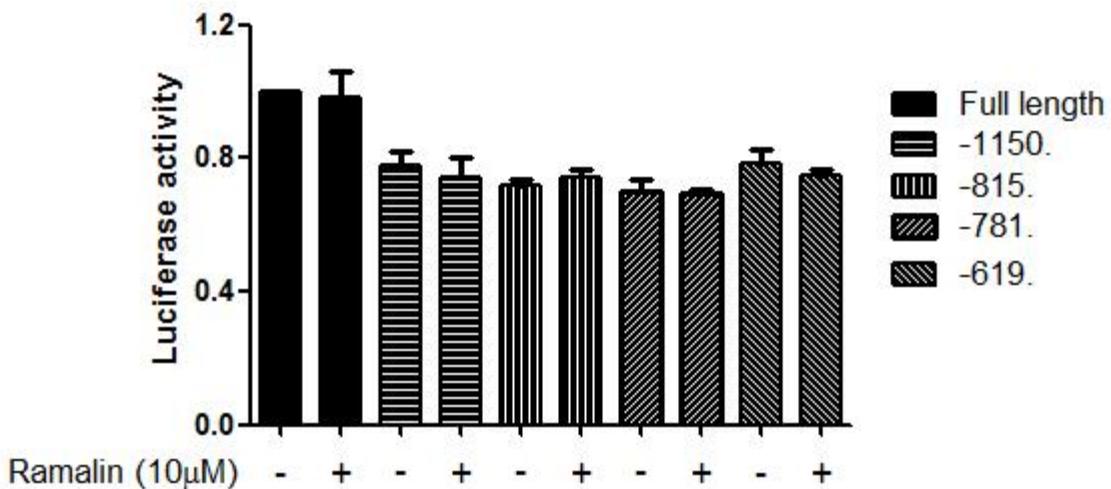


Fig. 3-103. Ramalin does not affect BACE1 promoter variants

라말린은 BACE1 mRNA의 조절능력이 없음을 확인하였고 (Fig. 3-104), 동일 시료를 western의 방법으로 단백질 변화량을 측정했을 때, 라말린에 의해 BACE1 단백질의 감소를 확인하였다 (Fig. 3-105).

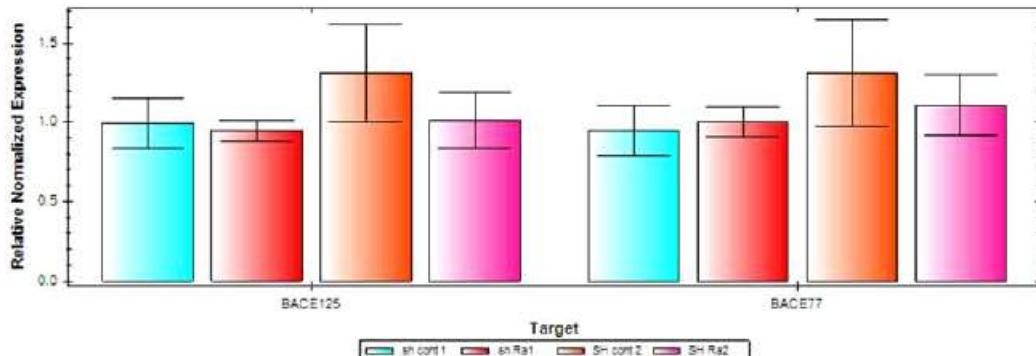


Fig. 3-104. qPCR result with ramalin in neuronal cell line

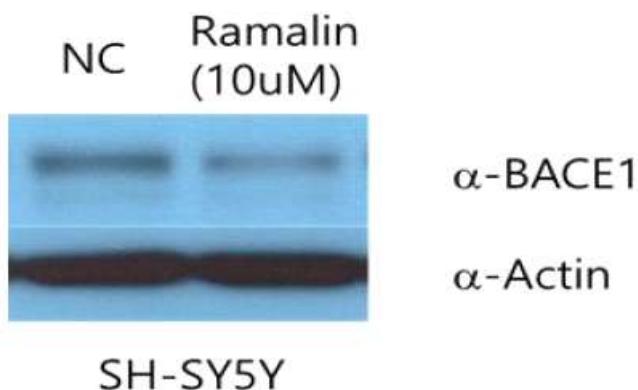


Fig. 3-105. Ramalin decreases BACE1 protein expression in neuronal cell

#### (나) 라말린의 BACE1 조절 검증 및 target 검증

라말린은 BACE1 단백질 분해효소를 10% 정도 유의하게 저해함을 확인하였다 (Fig. 3-106).

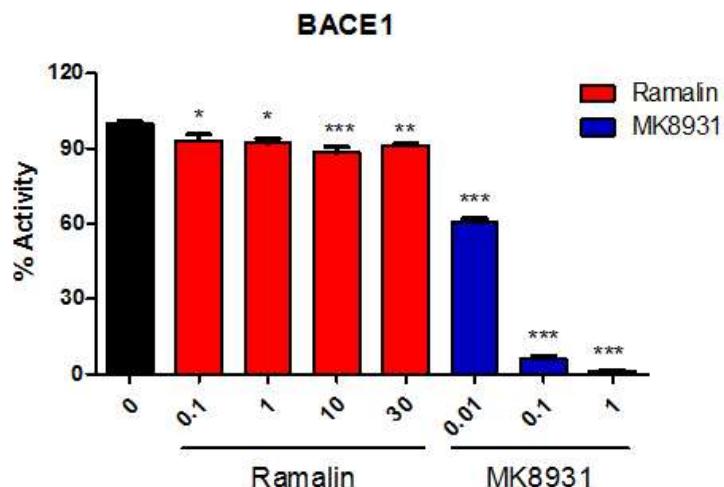


Fig. 3-106. Ramalin decreases BACE1 enzyme activity

최대 저해능력이 10%정도이며, IC<sub>50</sub>를 산출했을 때 204 μM로 산출되어 potency는 매우 낮음을 확인하였다. 이때 MK8931은 문헌에 보고된 바와 같이 13.2 nM의 IC<sub>50</sub>값이 산출되었다 (Fig. 3-107).

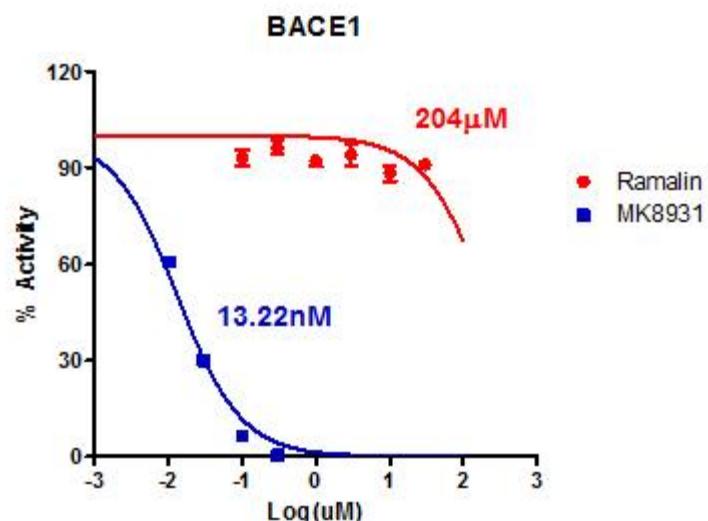


Fig. 3-107. IC<sub>50</sub> calculation with Ramalin against BACE-1

Ramalin에 의하여 각각의 construct들에 의한 BACE1의 감소효과를 유의적으로 확인하였다 (Fig. 3-108).

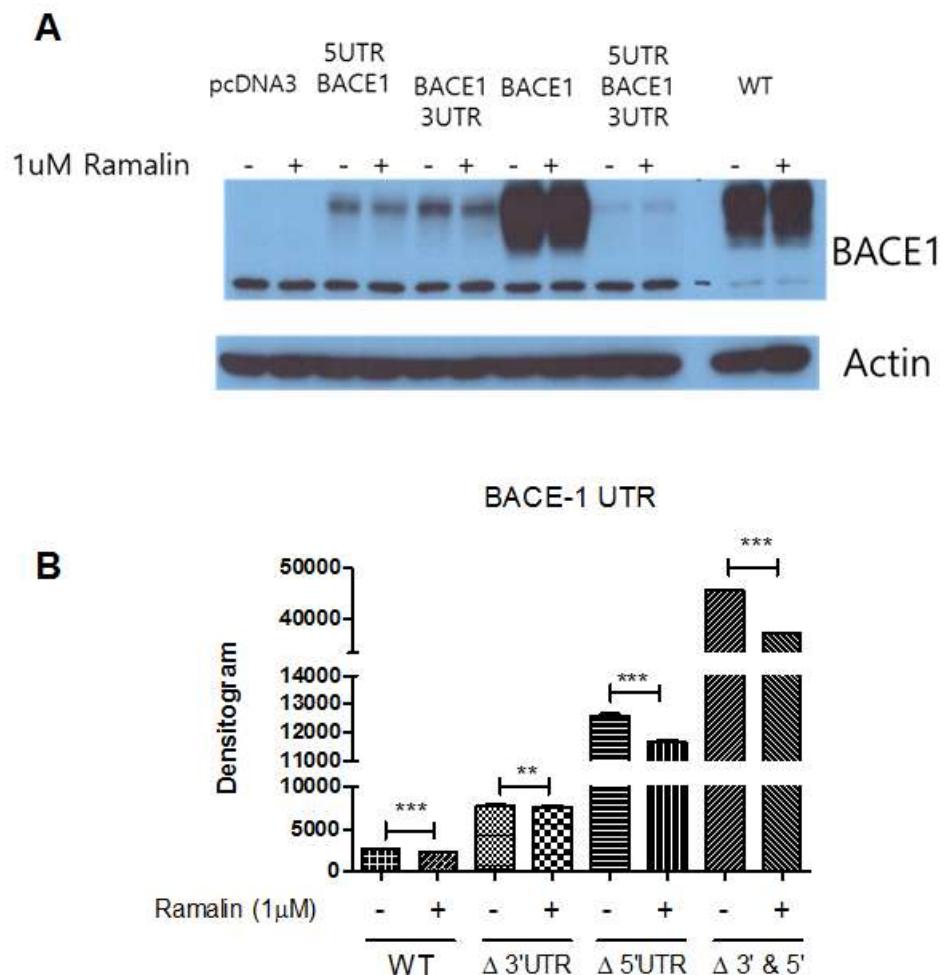


Fig. 3-108. Effect of BACE-1 expression with Ramalin according to BACE-1 UTR

Ramalin에 의한 BACE1 감소효과를 확인하였지만, UTR에 의한 조절은 아님을 확인하였다 (Fig. 3-109). BACE1의 UTR부분은 BACE1 단백질 발현양에 큰 영향을 줌을 확인하였다.

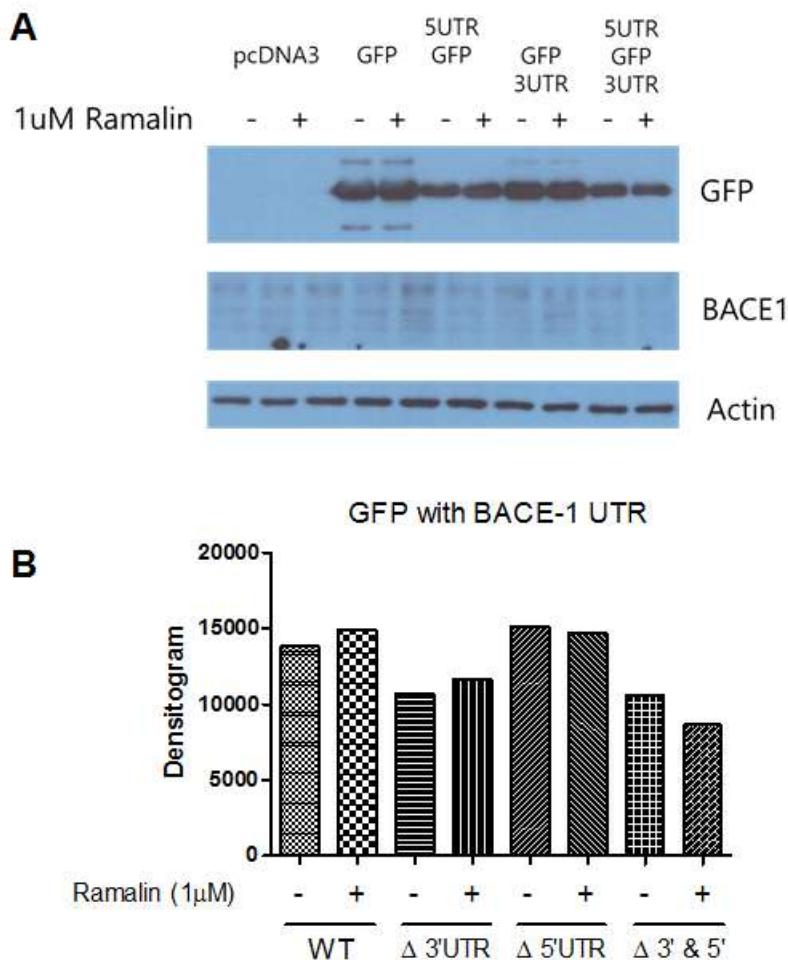


Fig. 3-309. Effect of GFP expression by Ramalin on BACE-1 UTR

(다) 라말린의 타겟 발굴을 위한 추가 연구

VPS16, CWC15, MSL1, MSL2, ELF4E 중 CWC15에 의해 BACE1의 감소를 확인하였 다 (Fig. 3-310).

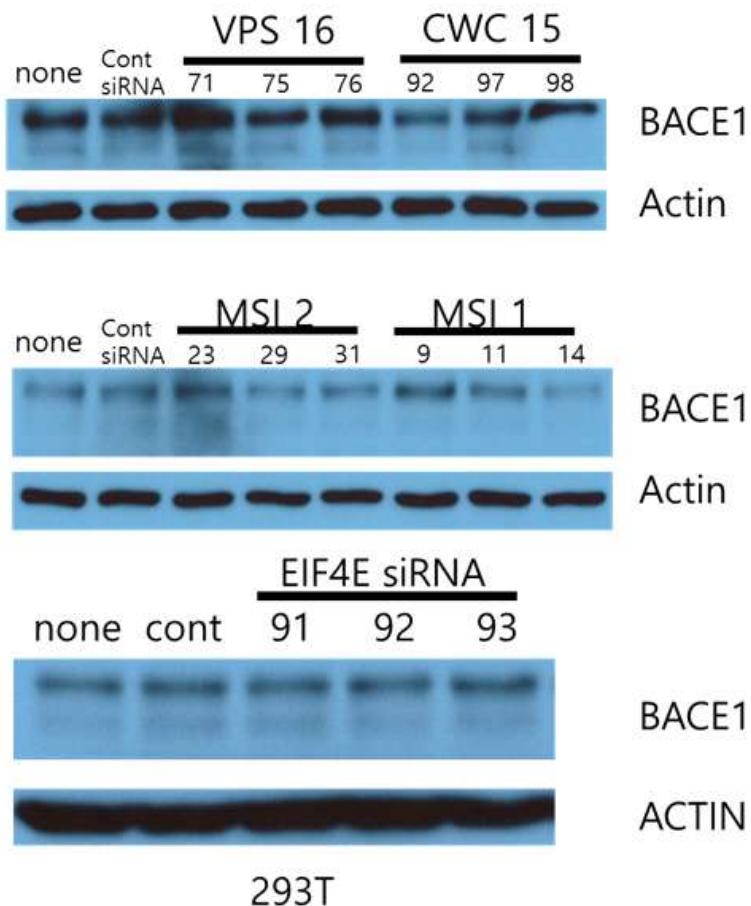


Fig. 3-310. Evaluation of BACE-1 expression level using VPS16, CWC15, MSI1, MSI2 and EIF4E siRNAs

SCD의 선택적 저해제인 MK8245에 의하여 BACE1 단백질 감소효과를 확인할 수 없었다 (Fig. 3-311).

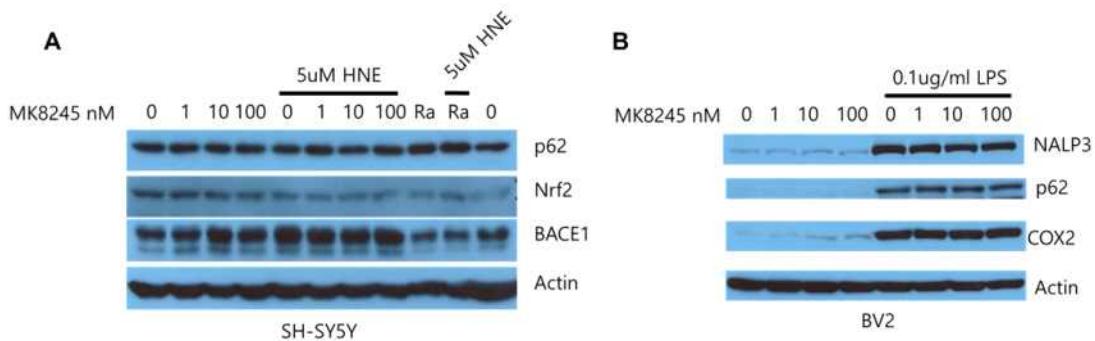


Fig. 3-311. Evaluation of BACE-1 expression level and anti-inflammatory effect using SCD inhibitor MK8245

Ramalin은 in-house 실험을 통하여 HDAC1, 2, 4, 6에 대해 39.6μM, 10μM, 11.4μM, 15.4μM의 IC<sub>50</sub> 값으로 각각 저해함을 확인하였다 (Fig. 3-112).

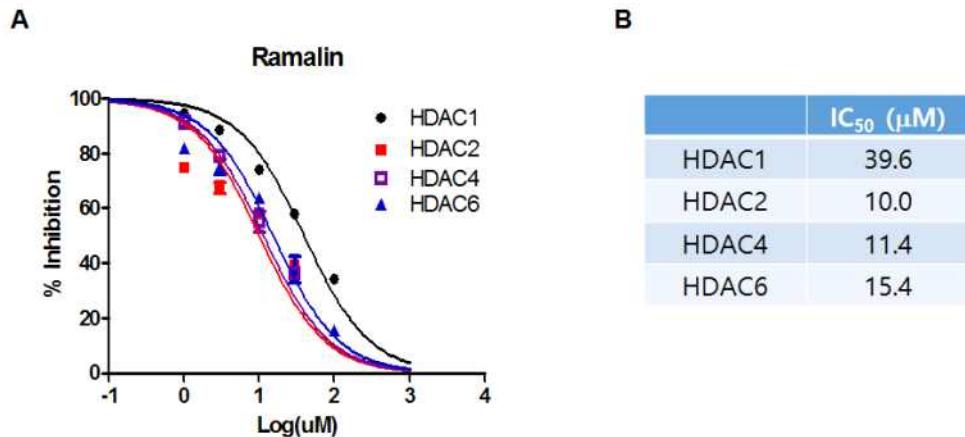


Fig. 3-112. Ramalin inhibits HDAC1, HDAC2, HDAC4 and HDAC6

Reaction Biology에서 추가 확인을 통하여 HDAC6에 대해서 25uM의 IC<sub>50</sub>값을 가지고, HDAC8에 대해서 84uM의 IC50 값을 가짐을 확인하였다 (Fig. 3-113).



Fig. 3-113. Panal assay against 11 isotype of HDACs by reaction biology

Ramalin은 HDAC6 저해제가 나타내는 항염증 효과를 확인하기 위한 TNFα 분비능 감소효과를 유의적으로 확인하였다 (Fig. 3-114).

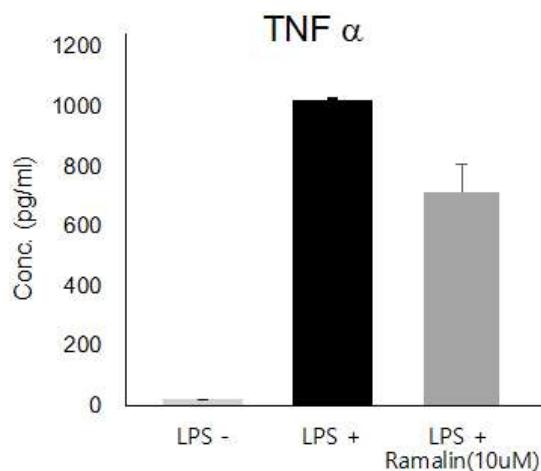


Fig. 3-114. Ramalin has anti-inflammatory effect

Ramalin은 HDAC6의 기질인  $\alpha$ -tubulin의 acetylation을 농도 상관성 있게 증가함을 확인하였고, 다른 HDAC들의 기질인 histone의 acetylation 변화가 없음을 확인하였다. 이러한 효과는 Ramalin이 HDAC6의 선택적인 저해제임을 확인하였다 (Fig. 3-115).

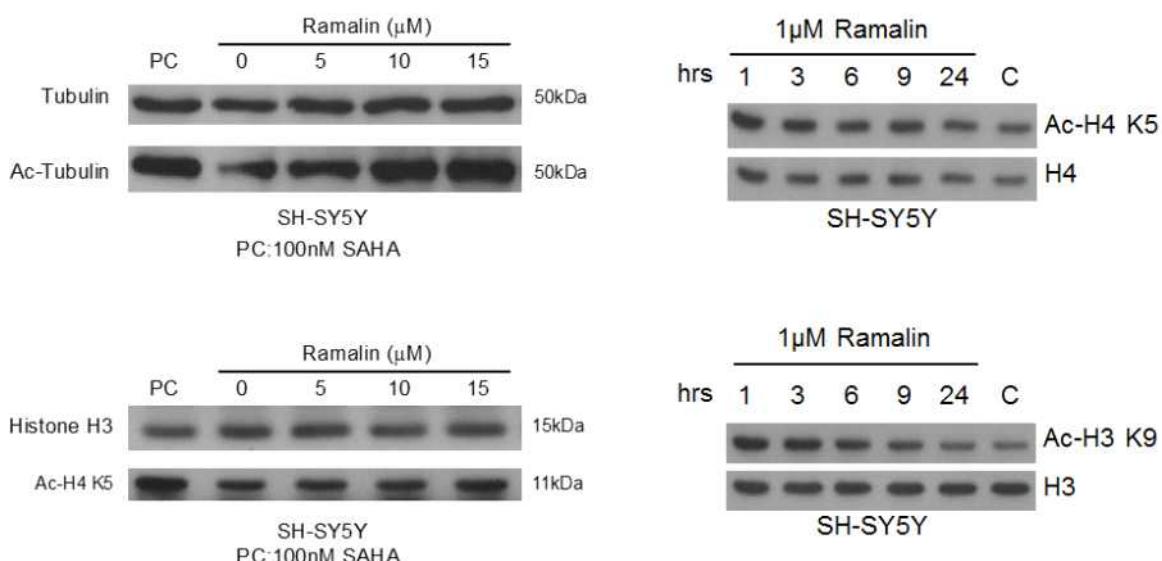


Fig. 3-115. Acetylated histones and tubulin level under Ramalin treatment

Ramalin은 A $\beta$ 를 처리하여 세포내 mitochondria의 움직임을 저해한 조건에서 mitochondria의 움직임을 개선하는 효과가 있음을 입증하였다 (Fig. 3-116).

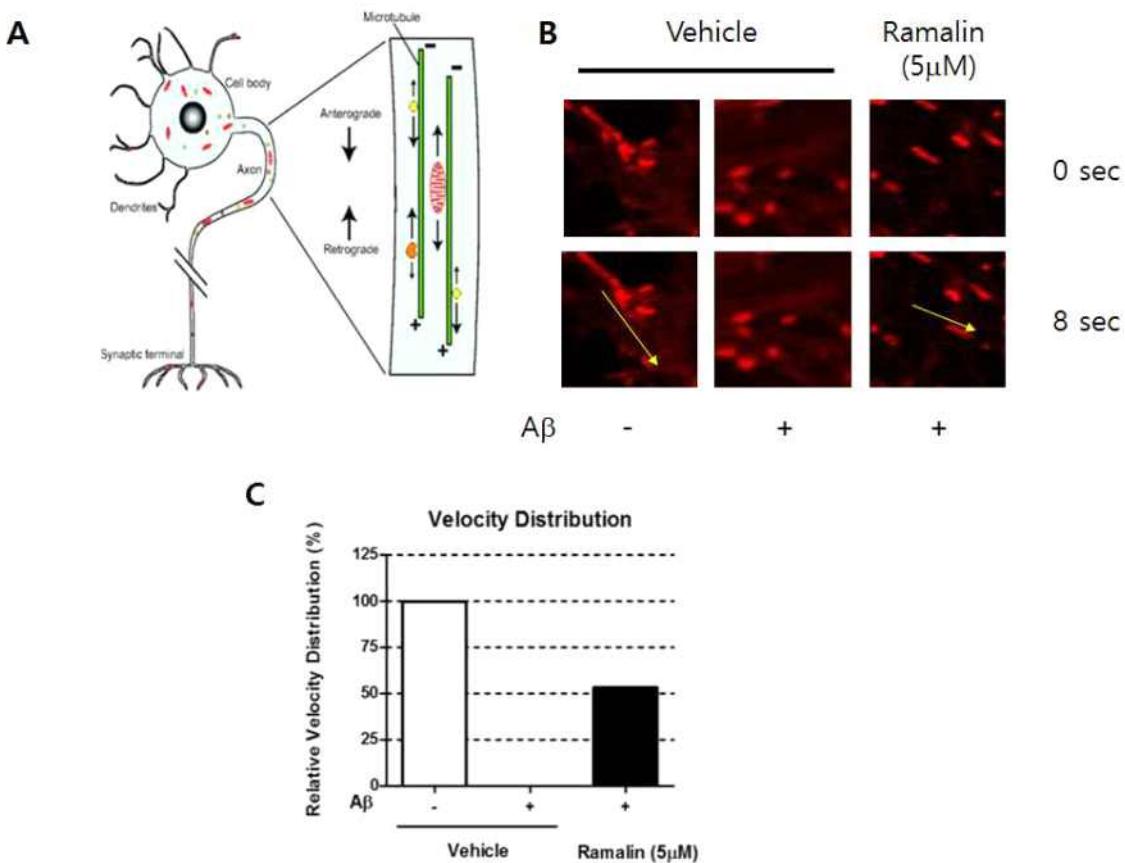


Fig. 3-116. Ramalin improve mitochondria movement which deteriorated by A $\beta$  in primary hippocampal neuron

#### 라. 결론 및 제언

산인 HCl gas를 이용하여 ACN 용매 하에서 주석을 제거하는 실험과 주석을 사용하지 않는 합성법에서 모두 주석이 검출되지 않았다. 기존 합성법으로 이미 합성된 라말린은 산을 이용해 주석을 제거한 후 치매 억제 기작 규명 실험의 시료로 사용 할 수 있다. 또한 추가로 시료확보가 필요할 경우에는 새로운 합성법으로 합성하면 주석제거 단계 없이 바로 시료를 사용 할 수 있다.

주석이 대체된 새로운 합성법의 적용에 하이드라진 부분을 합성하는 첫 단계의 시약비용이 기존 주석을 사용하는 단계보다 시약비용이 많이 소요된다. 두 합성법의 차이도 첫 번째 하이드라진 생성과정에서 사용되는 시약의 차이다. 합성에 사용되는 촉매량의 조절과 시약의 당량 조절, 최적온도, 최적 반응시간의 변수들을 조절하는 실험이 추가 필요하다.

Ramalin은 BACE1 promoter 조절 능력이 없음을 luciferase assay를 통하여 간접적으로 확인하였다. Ramalin은 BACE1 단백질 조절능력은 Promoter에 의한 mRNA 변화에 의한 효과가 아님을 증명하였다. Ramalin은 BACE1 단백질 분해효소 저해능력은 낮음을 확인하였고, Ramalin은 UTR에 stability 조절에 관여하지 않음을 확인하였다. Ramalin은

mRNA에 영향을 주지 않음을 3가지 실험을 통하여 확인하였고, 추후 UTR 조절능을 이용한 신규 drug screening 가능성이 있음을 확인하였다.

CWC15의 감소에 의해 BACE1의 감소효과에 대한 추후 연구가 필요하다. 또한 이 경우 Ramalin과의 상관관계에 대한 후속연구가 필요하다. SCD의 경우 Ramalin의 타겟이 아님을 증명하였다.

Ramalin은 in-house와 Reaction Biology의 의뢰시험을 통하여 HDAC6의 저해 효과가 15.4uM ~ 25 uM 정도의 IC50 값을 가지면서 저해함을 확인하였다. Ramalin의 경우 동물 실험의 PK 결과를 볼 때 충분한 노출을 확인하였고, 그 노출시에 HDAC6의 저해 효과를 가질 수 있다고 판단된다. Ramalin은 HDAC6 저해제의 효과를 가짐을 확인하였고, HDAC6 저해제가 가지는 항염증 효과 및 microtubule 안정 효과를 통한 신경세포 보호 효과를 Ramalin도 보유하고 있는 것으로 판단된다.

## 5. 리파아제 효소 발굴

### 가. 연구 목표

극지 유래의 미생물로부터 신규 특수기능 리파아제를 발굴하고 재조합 리파아제를 대량으로 생산한다. 재조합 리파아제의 클로닝 및 활성 효소의 대량 생산을 수행하고 리파아제의 활성측정과 기능성 지질 합성을 위한 반응특성을 규명한다.

### 나. 연구 수행방법

극지에서 분리한 미생물로부터 리파이제 생산성을 측정하였다. 총 46개 저온성 미생물을 TBN plate에 접종하여 활성을 보이는 균주를 선별하였다. 리파아제 유전자를 클로닝하기 위해서 다음과 같이 실험을 진행하였다. 분리균의 리파아제 활성을 3가지 방법으로 측정하였다. 1차로 Tributyrin agar plate에서 배양하면서 halo 형성능을 조사하였다. 콜로니 주변에 halo를 크게 형성하는 24개 균을 선발하고 이 균들을 20°C에서 48시간 동안 Marine broth 배지에서 액체 배양하였다. 배양액과 균체 추출액을 대상으로 pNPC assay 와 olive oil/pH stat assay를 수행하여 0.8U/mL 이상의 활성을 보이는 균주를 다시 선별하였다.

리파아제의 신규성 및 기능성 조사를 위하여 기존 문헌과 비교하여 신규한 유전자를 조사하였고, 재조합 대장균에서 리파아제 효소발현시험을 수행하였다. 재조합 플라스미드를 *E. coli* BL21 (DE3) 균에 형질전환하고 IPTG (0.1 mM) induction 실험을 진행하였다. 미생물 배양(20°C, 20시간) 이 끝난 후에 균체를 sonication 방법으로 파쇄하고 SDS-PAGE를 통해서 단백질 발현을 분석하였다.

Shotgun cloning 수행을 위해 각 균주의 chromosomal DNA를 제한 효소 EcoRI 혹은 HindIII로 절단하였고, agarose gel 전기영동을 통해 2~9 kb의 DNA 단편을 추출하였다.

추출된 DNA를 동일 제한 효소로 절단된 pUC19 vector에 삽입한 후, 이를 *E. coli* XL1-Blue에 도입하였다. 얻은 형질전환주를 1% tributyrin 함유 LB 평판배지에 옮겨 배양하였다. 48 시간 배양 후, 콜로니 주변 halo 형성 유무를 관찰함으로써 리파아제 활성을 보이는 형질전환주를 선별하였다.

## 다. 연구 결과

### (1) 저온성 리파아제의 발굴

극지 유래 리파아제 생산균 46 균주의 번호, 분리장소의 위도, 경도, 균주 동정 결과를 정리하면 다음과 같다 (Table 3-21). 분양받은 균주는 *Acinetobacter*, *Alcalnivoras*, *Brevundimonas*, *Croceibacter*, *Erythrobacter*, *Hypomonas*, *Marinobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter*, *Rhodococcus*, *Salinimicrobium*, *Sulfitobacter* 등 다양한 세균으로 구성되어 있음을 확인하였다.

Table 3-21. 극지유래 리파아제 생산 균주 목록

Stock No.	Latitude	Longitude	Dept hs	Identification	Stock No.	Latitude	Longitude	Depths	Identification
#69-A9	69,49.325 4'S	170,20.216 9'E	2734	<i>Acinetobacter oryzae</i>	#27-D6	74,02.254 8'S	170,01.961 9'E	0	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>
#32-B4	75,44.855 3'S	176,57.175 6'W	120	<i>Alcanivoras borkumensis</i>	#27-A9	73,29.788 7'S	172,00.603 4'E	20	<i>Marinobacter lipolyticus</i>
#10-B4	75,00.003 3'S	165,59.993 0'E	100	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	#28-C8	74,28.915 5'S	168,05.364 1'E	10	<i>Marinobacter lipolyticus</i>
#30-E4	75,22.851 5'S	178,22.696 6'W	100	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	#41-F2	60,12.369 0'S	161,21.217 8'E	250	<i>Marinobacter lipolyticus</i>
#53-D12	74,37.532 0'S	178,30.002 2'E	200	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	#29-B9	77,05.177 6'S	168,26.218 0'E	100	<i>Marinobacter lipolyticus</i>
#30-A2	73,30.049 0'S	174,00.173 2'E	120	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	#31-A11	77,05.177 6'S	168,26.218 0'E	100	<i>Marinobacter lipolyticus</i>
#15-A3	77,45.174 6'S	178,26.237 9'W	0	<i>Alcanivorax jadensis</i>	#33-H5	74,37.532 0'S	178,30.002 2'E	60	<i>Marinobacter maritimus</i>
#31-F4	77,41.577 2'S	178,20.541 4'E	100	<i>Alteromonas stellipolaris</i>	#32-F6	74,02.254 8'S	170,01.961 9'E	75	<i>Marinobacter salsarius</i>
#33-B6	75,49.223 6'S	165,41.131 7'E	300	<i>Brevundimonas nasdae</i>	#15-A1	77,45.174 6'S	178,26.237 9'W	0	<i>Marinobacter salsarius</i>
#40-F12	75,44.855 3'S	176,57.175 6'W	320	<i>Croceibacter atlanticus</i>	#63-H12	77,41.577 2'S	178,20.541 4'E	20	<i>Marinobacter lipolyticus</i>
#34-D1	75,22.851 5'S	178,22.696 6'W	200	<i>Croceibacter atlanticus</i>	#31-A1	75,01.238 6'S	179,54.111 2'W	75	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>
#40-G5	75,22.851 5'S	178,22.696 6'W	200	<i>Erythrobacter citreus</i>	#60-A6	77,05.177 6'S	168,26.218 0'E	964	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>
#15-B9	77,41.577 2'S	178,20.541 4'E	20	<i>Erythrobacter flavus</i>	#31-H6	76,00.878 0'S	164,59.494 0'E	870	<i>Pseudoalteromonas shioyasakiensis</i>
#39-F2	73,29.788 7'S	172,00.603 4'E	544	<i>Erythrobacter vulgaris</i>	#73-C7	71,32.433 5'S	170,15.738 5'E	93	<i>Psychrobacter nivalmaris</i>
#37-E7	72,39.361 5'S	170,11.799 3'E	70	<i>Hypomonas atlantica</i>	#17-F1	75,00.003 3'S	165,59.993 0'E	150	<i>Rhodococcus cerastii</i>
#27-A7	73,29.788 7'S	172,00.603 4'E	50	<i>Marinobacter algicola</i>	#15-B7	77,41.577 2'S	178,20.541 4'E	70	<i>Rhodococcus cerastii</i>
#29-G5	74,15.002 0'S	177,00.014 1'W	150	<i>Marinobacter algicola</i>	#19-F8	75,49.223 6'S	165,41.131 7'E	0	<i>Rhodococcus cerastii</i>
#32-D9	73,08.262 4'S	172,36.427 9'E	477	<i>Marinobacter algicola</i>	#5-D9	71,19.247 4'S	178,19.385 2'E	100	<i>Rhodococcus cerastii</i>
#2-E12	73,14.487 0'S	169,28.401 5'E	644	<i>Marinobacter algicola</i>	#19-E6	73,00.005 4'S	173,59.987 0'E	75	<i>Rhodococcus cerastii</i>
#27-G3	73,00.005 4'S	173,59.987 0'E	210	<i>Marinobacter algicola</i>	#19-H6	73,00.005 4'S	173,59.987 0'E	150	<i>Rhodococcus cerastii</i>
#32-H2	77,45.174 6'S	178,26.237 9'W	400	<i>Marinobacter goseongensis</i>	#17-E4	77,41.577 2'S	178,20.541 4'E	400	<i>Rhodococcus cercidiphylli</i>
#30-G8	75,01.238 6'S	179,54.111 2'W	20	<i>Marinobacter goseongensis</i>	#39-D12	73,29.788 7'S	172,00.603 4'E	150	<i>Salinimicrobium marinum</i>
#53-F8	74,15.002 0'S	177,00.014 1'W	30	<i>Marinobacter goseongensis</i>	#32-F7	75,44.855 3'S	176,57.175 6'W	320	<i>Sulfitobacter porphyrae</i>

pNPC assay 결과로부터, *Alteromonas*, *Marinobacter*, *Pseudoalteromonas* 균들이 높은 활성을 보이는 것으로 판명되었다. 특히, *Alteromonas* 균이 매우 높은 활성을 보이는 것으로 나타났다. 하지만, olive oil/pH stat assay에서 활성이 거의 나타나지 않음을 통해서 lipase가 아닌 esterase 활성임을 알게 되었다. 반면에 *Marinobacter*, *Pseudoalteromonas* 균들과 *Psychrobacter*, *Brevundimonas*, *Croceibacter* 균들이 olive oil/pH stat assay에서 높은 활성을 보였고 이를 통해서 lipase 생산균임을 최종적으로 확인하였다.

Table 3-22. 극지 미생물의 리파아제 활성 측정 결과

Strain No.	Strain name	Lipase activity				Lipase gene reported	
		TBN plate (halo size)	pNPC (U/ml)		pH STAT (U/ml)		
			Sup.	CFE	Sup.	CFE	
33-H5	<i>Marinobacter maritimus</i>	(++)	0.048	0.186	0.000	3.300	No
27-A9	<i>Marinobacter lipolyticus</i>	(++)	0.006	0.930	0.000	3.225	Yes (LipBL)
73-C7	<i>Psychrobacter nivimaris</i>	(++++)	0.097	0.063	0.000	3.222	No
28-C8	<i>Marinobacter lipolyticus</i>	(++)	0.020	1.044	0.000	3.220	Yes (LipBL)
31-A11	<i>Marinobacter lipolyticus</i>	(++)	0.021	1.094	0.000	3.185	Yes (LipBL)
31-A1	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	(+++)	0.023	1.067	0.000	3.180	Yes
39-D12	<i>Salinimicrobium marinum</i>	(+++)	0.000	0.489	0.000	1.935	No
33-B6	<i>Brevundimonas nasdae</i>	(++++)	0.013	0.161	0.000	1.675	Yes
34-D1	<i>Croceibacter atlanticus</i>	(+++)	0.015	0.275	0.000	0.829	Probable
63-H12	<i>Marinobacter lipolyticus</i>	(++)	0.048	0.036	0.000	0.075	Yes (LipBL)
31-F4	<i>Alteromonas stellipolaris</i>	(++++)	0.436	15.541	0.000	0.045	Yes
40-F12	<i>Croceibacter atlanticus</i>	(++++)	0.013	0.139	0.000	0.030	Probable
37-E7	<i>Hyphomonas atlantica</i>	(++)	0.000	0.300	0.000	0.030	Yes
53-F8	<i>Marinobacter goseongensis</i>	(++)	0.006	0.016	0.000	0.015	Not yet
41-F2	<i>Marinobacter lipolyticus</i>	(++)	0.021	0.862	0.000	0.005	Yes (LipBL)
17-E4	<i>Rhodococcus ceridiphylli</i>	(++++)	0.005	0.019	0.000	0.005	No
15-B7	<i>Rhodococcus cerastii</i>	(++++)	0.003	0.145	0.000	0.005	No
69-A9	<i>Acinetobacter oryzae</i>	(++++)	0.035	0.108	0.000	0.000	Not yet
29-B9	<i>Marinobacter lipolyticus</i>	(++++)	0.019	0.978	0.000	0.000	Yes (LipBL)
32-H2	<i>Marinobacter goseongensis</i>	(++)	0.013	0.003	0.000	0.000	Not yet
40-G5	<i>Erythrobacter citreus</i>	(++++)	0.010	0.214	0.000	0.000	Yes
17-F1	<i>Rhodococcus cerastii</i>	(++++)	0.006	0.072	0.000	0.000	No
39-F2	<i>Erythrobacter vulgaris</i>	(++++)	0.000	0.499	0.000	0.000	Not yet
10-B4	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	(++++)	0.000	0.070	0.000	0.000	Yes
30-E4	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	(+)					
53-D12	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	(+)					
2-E12	<i>Marinobacter algicola</i>	(+)					
27-A7	<i>Marinobacter algicola</i>	(+)					
27-G3	<i>Marinobacter algicola</i>	(+)					
29-G5	<i>Marinobacter algicola</i>	(+)					
32-D9	<i>Marinobacter algicola</i>	(+)					
30-G8	<i>Marinobacter goseongensis</i>	(+)					Not yet
27-D6	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	(+)					Yes
15-A1	<i>Marinobacter salarius</i>	(+)					
32-F6	<i>Marinobacter salarius</i>	(+)					
31-H6	<i>Pseudoalteromonas shioyasakienensis</i>	(+)					Yes
5-D9	<i>Rhodococcus cerastii</i>	(+)					No
19-E6	<i>Rhodococcus cerastii</i>	(+)					No
19-F8	<i>Rhodococcus cerastii</i>	(+)					No
19-H6	<i>Rhodococcus cerastii</i>	(+)					No
60-A6	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	(-)					Yes
32-F7	<i>Sulfitobacter porphyrae</i>	(-)					No

리파아제 활성이 높은 균주들에 대해서 정보분석을 통해 리파아제 유전자 정보를 조사하였다. *Marinobacter lipolyticus* SM19, *Pseudoalteromonas atlantica* ACTC BAA-1087, *Brevundimonas nasdae*, *Croceibacter atlanticus* KCTC12090 균으로부터 리파아제 유전자가 보고되었음을 확인했다. 반면에 *Marinobacter maritimus*, *Psychrobacter nivimaris*, *Salinimicrobium marinum* 균에 대해서는 리파아제 유전자가 보고되지 않았다. 본 과제에서는 유전자가 보고된 4가지 균에 대해서 우선적으로 PCR 클로닝을 수행하였다.

Table 3-23. 리파아제 유전자 정보 분석

Strain name	lipase name	gene ID
<i>Marinobacter maritimus</i>	X (have not been reported yet)	
<i>Marinobacter lipolyticus</i> SM19	Triacylglycerol lipase	MARLIPOL_15672
	Lipolytic enzyme	lipBL
	GDSL family lipase	MARLIPOL_15869
	Acylglycerol lipase	MARLIPOL_02075
	Lipase/esterase	MARLIPOL_10801
<i>Psychrobacter nivimaris</i>	X (have not been reported yet)	
<i>Pseudoalteromonas atlantica</i> ACTC BAA-1087	Lipase, class 2	Patl_1057
	Lipase, class 3	Patl_1267
	Lipolytic enzyme, G-D-S-L	Patl_0828
	Lipolytic enzyme, G-D-S-L	Patl_0498
	Lipolytic enzyme, G-D-S-L	Patl_3780
	Lipase, putative	Patl_2975
	Putative lipase/esterase	Patl_2922
	Carboxylic ester hydrolase	Patl_0510
	Carboxylic ester hydrolase	Patl_0874
<i>Salinimicrobium marinum</i>	X (have not been reported yet)	
<i>Brevundimonas nasdae</i>	Lipase	RM53_06800
	GDSL family lipase	RM53_06435
	GDSL family lipolytic protein	RM53_16195
	Carboxylic ester hydrolase	RM53_12490
	Carboxylic ester hydrolase	RM53_14900
<i>Croceibacter atlanticus</i> KCTC12090	Probable lipase	CA2559_11223

본 연구에서 사용한 균주 중에서 리파아제 활성이 높고 리파아제 유전자 염기서열이 보고된 균이 총 6개 인데 분리균 3개가 모두 *Marinobacter lipolyticus*에 속하는 것으로 판명되었다. 본 과제에서는 총 4종의 균에 대해 리파아제 유전자 클로닝 실험을 수행하였다.

Table 3-24. 극지 미생물 중에서 리파아제 활성이 확인되고 유전자가 보고된 균주

Strain No.	Strain name	Lipase activity						lipase gene Reported	
		TBN plate (Halo size)	pNPC		pH STAT				
			Sup.	CFE	Sup.	CFE			
27-A9	<i>Marinobacter lipolyticus</i>	(++)	0.006	0.930	0.000	3.225	Yes		
28-C8	<i>Marinobacter lipolyticus</i>	(++)	0.020	1.044	0.000	3.220	Yes		
31-A11	<i>Marinobacter lipolyticus</i>	(++)	0.021	1.094	0.000	3.185	Yes		

Strain No.	Strain name	Lipase activity					lipase gene Reported	
		TBN plate (Halo size)	pNPC		pH STAT			
			Sup.	CFE	Sup.	CFE		
31-A1	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	(+++)	0.023	1.067	0.000	3.180	Yes	
33-B6	<i>Brevundimonas nasdae</i>	(++++)	0.013	0.161	0.000	1.675	Yes	
34-D1	<i>Croceibacter atlanticus</i>	(+++)	0.015	0.275	0.000	0.829	Probable	

리파아제 유전자를 클로닝하기 위해서 보고된 유전자의 염기서열을 근거로 다음과 같이 클로닝 primer를 디자인하였다. 발현벡터로써 pET22를 사용할 계획이기 때문에 5'말단에 NdeI/NcoI 제한효소를 넣었고 유전자의 염기서열에 따라서 3'말단에 *HindIII/BamHI* 제한효소를 삽입하였다. 이후 PCR 반응을 수행한 결과, *C. atlanticus\_11223* probable lipase, *M. lipolyticus\_02075* acylglycerol lipase, *M. lipolyticus\_15672* triacylglycerol lipase, *M. lipolyticus\_LipBL* lipolytic enzyme 등 4개의 PCR product를 얻게 되었다. 이후에 리파아제 효소의 대량 발현을 위해서 T벡터 클로닝과 pET22벡터 클로닝을 수행하였다.

Table 3-25. PCR 클로닝을 위한 Primer

Lipase gene name	Lipase info.	Restriction enzymes	Forward and reverse primers
<i>Brevundimonas nasdae_06435</i>	GDSL family lipase	<i>NdeI/HindIII</i>	5'-GATCATATGTCACGCCATCAC-3' 5'-GATAAGCTTAAGCAGGGCTTCAG-3'
<i>Brevundimonas nasdae_06800</i>	Lipase	<i>NdeI/HindIII</i>	5'-GATCATATGTC CATTATAGACAAG-3' 5'-GATAAGCTTGATCGGCAGGATCGC-3'
<i>Brevundimonas nasdae_12490</i>	Carboxylic ester hydrolase	<i>NdeI/HindIII</i>	5'-GATCATATGATCACGCCAGCTAAG-3' 5'-GATAAGCTTGGTTCCCGGCTGGAT-3'
<i>Brevundimonas nasdae_14900</i>	Carboxylic ester hydrolase	<i>NdeI/HindIII</i>	5'-GATCATATGACAATGCCCGGGCGTT-3' 5'-GATAAGCTTGGGCCTCGGCCGCTC-3'
<i>Brevundimonas nasdae_16195</i>	GDSL family lipolytic protein	<i>NdeI/BamHI</i>	5'-GATCATATGGACGCTGAGCAGGTC-3' 5'-GATGGATCCAACGGCGTCCGCAGGGC-3'
<i>Croceibacter atlanticus_11223</i>	Probable lipase	<i>NcoI/BamHI</i>	5'-GATCCATGGAAATGACCATTATAAAATCTATA-3' 5'-GATGGATCCA AAAAGATGCTCATTAATAAATAT-3'
<i>Marinobacter lipolyticus_02075</i>	Acylglycerol lipase	<i>NdeI/HindIII</i>	5'-GATCATATGCTGGACCGGCTTGAA-3' 5'-GATAAGCTTGAGTCGGCTGTGACAG-3'
<i>Marinobacter lipolyticus_10801</i>	Lipase/esterase	<i>NdeI/HindIII</i>	5'-GATCATATGTC CATTCCATTCCGC-3' 5'-GATAAGCTTGGACCCGCTGTGCAGC-3'
<i>Marinobacter lipolyticus_15672</i>	Triacylglycerol lipase	<i>NdeI/HindIII</i>	5'-GATCATATGAAACAATGGCTCAA-3' 5'-GATAAGCTTGAGTCGGCGTTTT-3'
<i>Marinobacter lipolyticus_15869</i>	GDSL family lipase	<i>NdeI/HindIII</i>	5'-GATCATATGCACCTGCCCTCTGG-3' 5'-GATAAGCTTAATATGTCGACGTAGCGG-3'
<i>Marinobacter lipolyticus_LipBL</i>	Lipolytic enzyme	<i>NcoI/HindIII</i>	5'-GATCCATGGAAATGAGGAAATCGAACAG-3' 5'-GATAAGCTTCACCAACGCGCCATT-3'
<i>Pseudoalteromonas atlantica_0498</i>	Lipolytic enzyme, G-D-S-L	<i>NdeI/HindIII</i>	5'-GATCATATGCTCTATCACCTTGCT-3' 5'-GATAAGCTTGCATGTCGAATGAGTTT-3'
<i>Pseudoalteromonas atlantica_0510</i>	Carboxylic ester hydrolase	<i>NdeI/EcoRI</i>	5'-GATCATATGCAATTCCGCCTTAGTC-3' 5'-GATGAATTCAACTGGGGTGTGCTGCT-3'
<i>Pseudoalteromonas atlantica_0828</i>	Lipolytic enzyme, G-D-S-L	<i>NdeI/BamHI</i>	5'-GATCATATGATTAATTCACACATG-3' 5'-GATGGATCCAATTCCACGCCAACAAACT-3'
<i>Pseudoalteromonas atlantica_0874</i>	Carboxylic ester hydrolase	<i>NdeI/BamHI</i>	5'-GATCATATGACCAAGTTCTTATTAAC-3' 5'-GATGGATCCAAGAACGAATAGTTCTGCCA-3'
<i>Pseudoalteromonas atlantica_1057</i>	Lipase, class 2	<i>NdeI/BamHI</i>	5'-GATCATATGAATATAATAAGAATGT-3' 5'-GATGGATCCAACTGAATTAGCTCGTATTG-3'
<i>Pseudoalteromonas atlantica_1267</i>	Lipase, class 3	<i>NdeI/HindIII</i>	5'-GATCATATGAAAAACTCAAACGC-3' 5'-GATAAGCTTGTGCTTATCAAAAAGTC-3'
<i>Pseudoalteromonas atlantica_2922</i>	Putative lipase/esterase	<i>NcoI/HindIII</i>	5'-GATCCATGGAAATGAAAATTTCGTACAGC-3' 5'-GATAAGCTTTCACTGACCCGTTG-3'

Lipase gene name	Lipase info.	Restriction enzymes	Forward and reverse primers
Pseudoalteromonas atlantica_2975	Lipase, putative	NdeI/HindIII	5'-GATCATATGCGTGAAAAATTAGAG-3' 5'-GATAAGCTTATGCTAACATTCCTT-3'
Pseudoalteromonas atlantica_3780	Lipolytic enzyme, G-D-S-L	NdeI/HindIII	5'-GATCATATGACTGATTGGAAAAAG-3' 5'-GATAAGCTTGCCTAACACTGGC-3'

PCR product 4가지 (*M. lipolyticus*\_15672 triacylglycerol lipase, *M. lipolyticus*\_LipBL lipolytic enzyme, *M. lipolyticus*\_02075 acylglycerol lipase, *Croceibacter atlanticus*\_11223 lipase)에 대해서 T벡터 클로닝과 pET22벡터 클로닝에 성공하였다. 각각 417, 318, 324, 318개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 서로간의 homology가 전혀 없는 것으로 밝혀졌다.

Table 3-26. Sequence of LipBL (*Marinobacter lipolyticus*) (L)

1	ATGAGGGAATCGAAACAGGTACCCGCCCTTCATCAGGCCACCTTACTCACATGAAAGACCATCTTGACCCGCCCTATATCCAGCCGGGG M R E S K Q V T G L S S G H L T H I E D H L D R R Y I Q P G	90 30
91	AAATTGCCGGGGCGCTGACTCTGGTGGCCCGACGTGGGGAAAATTGCTTATCTGAAAGCTCAGGGCCGATGGATGGATGGAGCGCAACAAG K L P G A L T L V A R R G E I A Y L K A Q G P M D V E R N K	180 60
181	CGGGCTCTGCCGGGATACGGTGTCCGCATTATTCCATGACCAAGCCTTACCGTCCATGCCATGATGCGAGCTCTATGAGCAGGGGG P V C R D T V F R I Y S M T K P I T S I A M M Q L Y E Q G R	270 90
271	TTTTGTGGATGATCCGGTACACAAGTACATCCGGCTTGAAGAACCTGGGGTTTACAACAGTGGTGTCTATCCAACTTCCGACC F L L D D P V H K Y I P A W K N L R V Y N S G V Y P N F L T	360 120
361	ACACCTGCAACCAAGCACCATTGACCAATTCCGGCTGGTGTCCACCCACATGTCAGGCCCTGACCTATGGGTTCATGAACCCGACCAACGG T P A T S T M T I R D L F T H M S G L T Y G F M N R T N V D	450 150
451	GCGGCTATCGGGAGCTGAAGCTGGATGGCAGCCGAATCTGACACTGGAAAGCCGCTGGTCGGTCATCTGGCGGAAACTGCCGTGGAGITC A A Y R E L K L D G S R N L T L E A L V G H L A E L P L E F	540 180
541	TCACCGGGTACCGCTGGAAACTTCCGGTCAGCACGGATGTCAGCTGGGTATCTGGTCAGTTGCTGGCTGATCAGCCGTTGGATGAGTAT S P G T A W N Y S V S T D V L G Y L V Q L L A D Q P F D E Y	630 210
631	CTGCCGAGCATATCTTGAACCATTGGGCATGTCCGACACCGGCTTCCATGTCAGCTGACGATCAGCTGCCGTTTCGGCTGCTAT L R E H I F E P L A M S D T G F H V R D D Q L D R F A A C Y	720 240
721	CAGTACGATCCGGTGGACCACTGTCAGCTGAGCGATCCGAGACCTCCCGTTCCGGACAAAGAGGAGTTCTGTCAGCTGGCGGC Q Y D P V D Q F K L Q D D P Q T S P F R D K R R F L S G G G	810 270
811	GGGCTGGTTCCACCATGACGATTATTCCACTTGGCCAGGCACTCTGTCAGGGTGGCGAGTTGGCGGGCGGCGATTATTGGCCGA G L V S T I D D Y F H F A Q A L C Q G G E F G G R R I I G R	900 300
901	AAGACTCTGGAATTCATGCGTCGCAATCATCTACCCGGCAATCAGGACCTGCGCTGGCCCTTCCGGCTGGCTCCGGTCAAGCGAAACACCTTAT K T L E F M R R N H L P G N Q D L P G L S V G P F S E T P Y	990 330
991	GCGGGGACCGGCTTGGCTGGCTAAAGACTGAGCTGCGCAAATCCCAGATCAACGGCTGGTCGGCGAGTATGGTTGGGGT A G T G F G L G F S V K T D V A K S Q I N G S V G E Y G W G	1080 360
1081	GGCCTGGCCAGCACCAACTTATTATCGATCCGGTGGAGGAACCTGGTGTGATTTCTGACGCCAATCTGACGCCACTGATCCCTCTCGACCTACCG G L A S T N F I I D P V E E L V V I F M T Q L I P S S T Y P	1170 390
1171	ATCCGTAGGAATTGGCGGGCGATTTGTGAAGCTTGCGCGTGGTGAAGCTTGCGGGCCACTCGAGCACCAACCAACCAACCAACTGA I R Q E L R A I V N G A L V K L A A A L E H H H H H ***	1254 417

Table 3-27. Sequence of Triacylglycerol lipase (*Marinobacter lipolyticus*) (T)

1	ATGAAACAATGGCTCAAAGCAGCAACCATGCTGTGCATTCTGGCATGGTCGGCGCGACCCCTGGCGTGGTGAAACTCTACCCCATCCGAC	90
1	M K Q W L K A A T M L C I L A W S A P T L A W W N S T P S D	30
91	TATACCGATACCGCTACCCGGTTGTTCTGGTACACGGTATGTCGGTTTIGACTCCATAGCCCGTGTGATTACTGTACCGTGTGGCT	180
31	Y T D T R Y P V V V L V H G M F G F D S I A G V D Y W Y G V A	60
181	GAAGATTTCGCTAAATACGGTGTCTACACCACGCAAGTACCGGCCCTGGACAGCACCATTCGCCGTGGTAAGCAACTACTGCCT	270
61	E D L R K Y G A D V Y T T Q V P A L D S T I A R G E A L L P	90
271	CAGGTGAGGCCATTGCGCAGTCATGCCAAGGTCATCTGGTCCGGCACAGCCACGCCAGGACCAACCCGACAGATACTGCGCCGTGTA	360
91	Q V E A I A A V H G K V N L V G H S H G G P T A R Y V A R V	120
361	CGACCGGATCTGGTGCCTCGTCACTTCTGTGGCTCGCCCCATAAGGATCTCCGGTGTGGCATCTGATTGTGGCTCCCGGCCAG	450
121	R P D L V A S V T S V G S P H K G S P V A D L I V G S P A E	150
451	GGCCCTGGTGCAACTCTGGCAATGCCCTGGGGACTCTGATCTGTGTCAGGCCGCGCTACGACAGAACATGAGGCCAGCATG	540
151	G L G A T L G N A L G G L I D L L S G G G Y D Q N M S A S M	180
541	TATTCACTGACATCCCAGGGCAGTGTGAAATTCAACAATTTCACCCGGCGGTGTCCTCCACCGCCTGCGGCCAGGGCGCTATTCC	630
181	Y S L T S Q G S A E F N N F A P A G V P S T A C G E G A Y S	210
631	GACACCGGAGTGGCTTCTATTCGGGCTGGCACAGGGCTCTGACCAATCTGGACGTGTCGATGCCCTACTCGCACCCAGC	720
211	D N G V R F Y S W G G T T G V L T N A L D V S D A L L G T T S	240
721	CTCGCTTGGATTCACTGCCAACGATGTCCTGGTAGGCCGCTGCAGCAATCTGGGAAAGTCATCGGATAATTACTCATGAAC	810
241	L A F G F S A N D G L V G R C S N H F G K V I R D N Y F M N	270
811	CATCGGATGAAGTCACAGACCTGGGCTGCACAGCCCTGTCAGAGACTGACCGAAGGGCTATTCAACACGCCAACCGGTG	900
271	H L D E V N Q T L G L H S L F E T D P K A V F Q Q H A N R L	300
901	AAAAACGCCGACTCAAGCTTGCCTGCACCGACCAACACCACCAACTGA	957
301	K N A G L K L A A A L E H H H H H H ***	318

Table 3-28. Sequence of Acylglycerol lipase (*Marinobacter lipolyticus*) (A)

1	ATGCTGGACCGCTTGAAACCGTTGATCCGGCTTCCCCCGGGAACTGGGGAAAGAGATGGTGGCTTATTGCCCTTACGGCTGGAT	90
1	M L D R L E P F D P A S P R E L G E E E M V A Y C R F Y G L D	30
91	CTCTGGGTGGAGCACCCAGGGCTGAGCTACCATCAGGGTTATGTCAGTCAGGCCGGCGACCAGGCTATGGTGCATTACTCCGGTCACCG	180
31	L W V E H P E V S Y H Q G Y Y V S A G R H Q V M V H Y F R S P	60
181	GAGAGCACCGGATCGAACGGGAAAGGGTACCGGTTATCCATGGGTACTTGTGACCACTGGGCTGTACGCCAGTGTGATCGACCCGCTG	270
61	E S T G S K G T V F I L H G Y F D H V G L Y S Q L I D R C L	90
271	GGGGCAGGGTTGATGTCGTCTATGATCAACCAAGGCCACGGACTGTGACGGTACCGCACACCGGGCCATTGGCAGTTCTGGAGTAC	360
91	G A G F D V L S Y D Q P G H G L S S G T P A A I G S F L E Y	120
361	CAGGGCGGTGCTGAGGTGATAGCCGGATGAAAGGTAAGGTGAGGGGCCCTGGTAGTCAGTCGGGAGACGCCAGGGGCTATC	450
121	Q A V L S E V I A R M K G K V R G P W Y A V G Q S T G G A I	150
451	CTGATCGATTACCTGCTGCGAACAGCACGATCAGCAGACGGCTGGAAATTTCGCTGGATCGTGTGTTGGCGGATTGATCACGCCATG	540
151	L I D Y L L S N Q H D Q Q T S E F R R I V V L L A P L I R P M	180
541	GGATGGCTGGTCAAAGTTACTGCATGCCTGGCCACGCCCTCTGGAGCGCTGGCTGGGGGTTGGCATGGGAAATAGCGGAATACG	630
181	G W L G A K L L H S L A R P F L T R W R R V F A E N S G N T	210
631	CGGTTCTGGGTCTCTGAAAGAACACGCCACCGCTTCAGGGCGGGGGCTCATGGGATTGGGTATGGCTCTGAGAAGTTGGTACCC	720
211	R F L R F L K E H D P L Q A R A V H V D W V S A L R S W V P	240
721	CACATTGAATCTGCCAACCGGGTGAATTTCGGTCACGGTGGTCAGGGGAAAAGACCTGACCGTCGATTGGCAGCACAAATTGCG	810
241	H I E S A R P V N F P V T V V Q G E K D L T V D W Q H N L R	270
811	ATTATTCGAAATCAATTTCCTCGGTGGAGGAACCTCGTATCCGGATGGTGTCTCATTTGGTGAACGACAGGATCTGCAATCG	900
271	I I R N K F S S V E E L R I P D G R H H L V N E A Q D L Q S	300
901	ACGGTATTCAATACCAATTGATACCTCTCAACGACCATGCGGTCTCTGTCAGAGGCCATGCAAGCTT	975
301	T V F N T I I D T F S S N D H A G P L S E A C K L	324

Table 3-29. Sequence of Probable lipase (*Croceibacter atlanticus*) (C)

1	ATGACCATTATAAAATCTATATGTATTGCAGTATCTTATGCTGCTTTCATGCAGTTCAAGATAACTCTAGTACCAACAATTCAAGAT M T I I K S I C I A V S L M L S F S C S S D N S S T T I Q D	90 30
91	CCTGTTACAGAAAATCCTAAGAAGAACACAAAACCTTGAGCAGAAGATATTTGATGTAAGCTATGGAGACCATCAACAAACAGGCT P V T E N P Q E E P Q N L E A E D I F D V S Y G D H Q Q Q A	180 60
181	TATGACATTACTTGCCCTGCAAATAGAACTACAGAAGCCACTAAAGTAATATTAAATACATGGTGGTAGCTGGACAGCTGGTATAAA Y D I Y L P A N R T T E A T K V I L L I H G G S W T A G D K	270 90
271	AGTGATATGAATTATTCTACCTATTTACAACCACAACCTTCCGAATATGCAATAGTAAATATGAACTATGTTCTGCTAATGAAACT S D M N Y F L P I L Q P Q L S E Y A I V N M N Y V L A N E T	360 120
361	ACAGCTGCATTCCCTAACAGATAACTGATGTTGGTGCAGTAATAGAACACGTGAAAAAACAAATGCCCTCAGAATACACACATAAACCAACA T A A F P N Q I T D V G A V I E H V K N N A S E Y H I N P T	450 150
451	TTTGAGITATTGGTCCTAGCGCCGGCGCATATTGGATGCACTATACATATGCAAGAGATACTAACCAAGATATTAAATGGCTTGT F G V I G L S A G A H I G L Q Y T Y A E D T N Q D I K M A C	540 180
541	AGCGTTGTGGACCTGTAGATTTCAGATCCTTATTATCTGAAACCCCTCAATTCAATTGAAACGATTTAGTAGATGAGATGCT S V V G P V D F T D P Y Y S E N P Q F Q F V N D L V D E D A	630 210
631	TATCCTGAAGGTACAAATTGGAGGTTAAAGTCCTGCATTACAAGTCTCCCAACAAAGTGTGCTACTATATTATTATGGAGAA Y P E G T I N F E E V L S P A L Q V S Q Q S V P T I L F Y G E	720 240
721	AGTGATCCTTGGTGCACAAAGCCAAGCTAATGCCATTAAAGATGCTTTAGAAGCAAATAACGTACACACCAATAACAATTATGAA S D P L V P L S Q A N A I N D A L E A N N V T H Q L T T Y E	810 270
811	GGTGGTCATGCCAATTGGAGTTAGCAAGCTATGCAGATTACAATCTAAGCTTCAATATTATTAATGAGCATTTGGATCCGAAAT G G H A N W S L A S Y A D L Q S K L S I F I N E H L L D P N	900 300
901	TCGAGCTCGTCGACAAGCTTGCAGCCACTCGAGCACCAACCACCAACTGAA S S S V D K L A A A L E H H H H H H *	957 318

이상 4가지 리파아제 유전자에 대해 효소 발현 실험을 수행하였다. 3가지 유전자 발현 실험에서 예상된 단백질 랜드를 확인할 수 없었으며, 1가지 (A, *M. lipolyticus*\_02075의 acylglycerol lipase) 유전자 발현에서 예상된 단백질 랜드를 확인할 수 있었다. 4가지 유전자의 발현 결과를 확인하기 위해서 cell pellet과 cee-free extract를 대상으로 lipase assay (pNPC)를 수행하였다.

실험 수행 결과, 4가지 유전자를 pET22 vector에 클로닝하고 *E. coli* BL21(DE3)를 이용하여 IPTG 0.1mM, 20°C, 20h 조건에서 발현을 하였으나, 4가지 모두 TBN plate에서 halo를 형성하지 않았고 pNPC assay에서도 pellet과 CFE 모두에서 낮은 효소활성을 보였다.

T: *M. lipolyticus\_15672 triacylglycerol lipase*(33.7kDa),  
 L: *M. lipolyticus\_LipBL lipolytic enzyme*(46.7kDa),  
 A: *M. lipolyticus\_02075 acylglycerol lipase*(37.97kDa),  
 C: *C. atlanticus\_11223 probable lipase*(35kDa)  
 1: pellet of *E. coli* cell, 2: Cell-free extract of *E. coli* cell

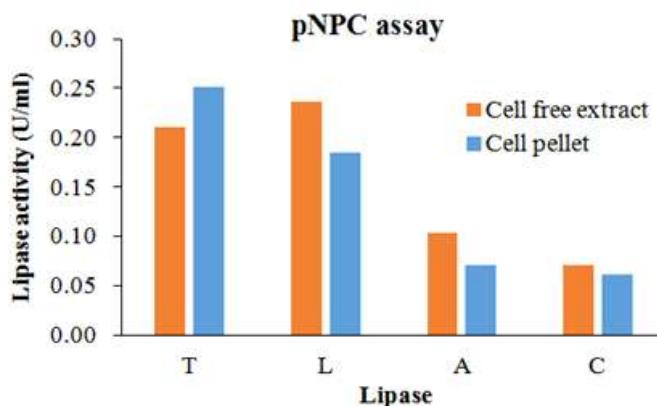
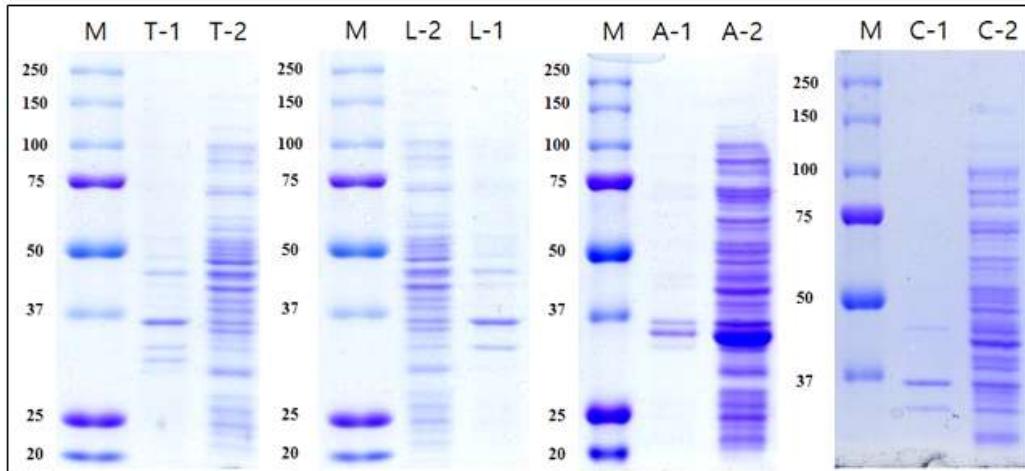


Fig. 3-117. 재조합 리파아제 발현 실험 결과

Table 3-30. 재조합 리파아제 효소활성 시험 결과

Lipase gene name	Lipase information	Lipase activity		
		TBN plate (Halo size)	pNPC assay	
			pellet	CFE
<i>Marinobacter lipolyticus_15672</i>	Triacylglycerol lipase	(-)	0.251	0.211
<i>Marinobacter lipolyticus_LipBL</i>	Lipolytic enzyme	(-)	0.185	0.236
<i>Marinobacter lipolyticus_02075</i>	Acylglycerol lipase	(-)	0.071	0.104
<i>Croceibacter atlanticus_11223</i>	Probable lipase	(-)	0.063	0.071

## (2) Shotgun cloning 실험

PCR product를 얻지 못한 균주 (*Marinobacter lipolyticus* 27-A9, *Pseudoalteromonas*

*atlantica* 31-A1, *Brevundimonas nasdae* 33-B6) 를 대상으로 shotgun cloning을 수행하였다. 세 종의 균주 중 *M. lipolyticus*의 경우, *HindIII*를 사용하여 만든 clone library의 4,150개 콜로니 중 4개가 콜로니 주변에 halo를 형성하였다. 이들을 선별하여 재조합 플라스미드를 분리하고 insert DNA 염기서열을 분석한 결과, 모든 플라스미드에서 LipBL 유전자를 포함한 7,115 bp 크기의 염기서열이 확인되었다.

Table 3-31. 재조합 플라스미드 내 LipBL 유전자 염기 서열 (*Marinobacter lipolyticus*)

1	ATGACGGAATCGAAACAGGTCACCGGCCTTCACTCAGGCCACCTTACTCACATGAAAGACCATTCTGACCCGCCTATATCCAGCCGGGG	90
1	M T E S K Q V T G L S S G H L T H I E D H L D R R Y I Q P G	30
91	AAATTGCCCCGGGGCGCTGACTCTGGTGGCCGACGTGGGGAAATTGCTATCTGAAAGCTCAGGGCTGATGGATGTTGGAGCGCAACAAG	180
31	K L P G A L T L V A R R G E I A Y L K A Q G L M D V E R N K	60
181	CCGGTCTGCCGGGATACCGTGTTCCGCATTATTCCATGACCAAGCCTTACCGTCATGCCATGATGCGAGCTCATGAGCAGGGGG	270
61	P V C R D T V F R I Y S M T K P I T S I A M M Q L Y E Q G R	90
271	TTTTGCTGGATGATCCGGTACACAAGTACATCCGGCTTGAAGAACCTGGGGTTTACAACAGTGGTGTCTATCCAACTTCCGAC	360
91	F L L D D P V H K Y I P A W K N L R V Y N S G V Y P N F L T	120
361	ACACCTGCAACCAAGCACCATTGACCAATTCCGGCTGACCTGTTACCCACATGTCAGGCCATGACCTATGGGTCATGAACCCGACCAACGTTGAC	450
121	T P A T S T M T I R D L F T H M S G L T Y G F M M N R T N V D	150
451	GCGCGCTATCGGGAGCTGAAGCTGGATGGCAGCCGAATCTGACACTGGAAAGCCGCTGGTCGGTCATCTGGCGGAACTGCCGCTGGAGTTC	540
151	A A Y R E L K L D G S R N L T L E A L V G H L A E L P L E F	180
541	TCACCGGGTACCGCCTGGAACTATTCCGGTCAGCACGGATGTCAGGGTATCTGGTCAGCTGGCTGATCAGCGTTGGATGAGTAT	630
181	S P G T A W N Y S V S T D V L G Y L V Q L L A D Q P F D E Y	210
631	CTGCCGAGCATATCTTGAACCATTGGGCATGTCCGACACCGGCTTCCATGTCGACGATCAGCTGCCGTTGCCGCTTGCTAT	720
211	L R E H I F E P L A M S D T G F H V R D D Q L D R F A A C Y	240
721	CAGTACGATCCGGTCGACCGAGTCAGCTGCAAGGACGATCCGCAAGACCTCCCCTTCCGGGACAAAAGGAGGTTCTGTCAGGGC	810
241	Q Y D P V D Q F K L Q D D P Q T S P F R D K R R F L S G G G	270
811	GGGCTGGTTCCACCATGACGATTATTCCACTTGGCCAGGGCACTCTGTCAGGGTGGCGAGTTGGCGGGCGGAGTTATTGGCCGA	900
271	G L V S T I D D Y F H F A Q A L C Q G G E F G G R R I I G R	300
901	AAGACTCTGAAATTCACTCGCTCGCAATCATCTACCCGGCAATCAGGACCTGCGCTGGCTTCCGTCGGTCCGTTAGCGAAACACCTTAT	990
301	K T L E F M R R N H L P G N Q D L P G L S V G P F S E T P Y	330
991	GCCGGGACCGGCTTGGCTGGCTAAAGACTGACGCTGCCAATCCAGATCAACGCTCGTCGGCGAGTATGGITGGGGT	1080
331	A G T G F G L G F S V K T D V A K S Q I N G S V G E Y G W G	360
1081	GGCCTGGCAGCACCAACTTATTATCGATCCGGTGGAGGAACCTGGTGGTGAATTTCATGACGCAACTGATCCCTCCGACCTACCG	1170
361	G L A S T N F I I D P V E E L V V I F M T Q L I P S S T Y P	390
1171	ATCCGTAGGAATTGGCCGGCGATTGTGAATGGGGCGTTGGCTAG	1215
391	I R Q E L R A I V N G A L V .	404

Shotgun cloning 결과 발견된 LipBL은 본 과제에서 앞서 PCR cloning을 수행하였던 LipBL과 아미노산 서열이 99% 유사한 리파아제로, 2개의 아미노산 서열의 차이가 존재하였다.

Table 3-32. 재조합 LipBL 아미노산 서열 비교

Query * 1	<b>MTESKQVTGLSSGHLTIEDHLDRRYIOPGKLPGALTIVARRGEIAYLKAQCLMDVERNK</b>	60
Sbjct** 1	<b>MRESKQVTGLSSGHLTIEDHLDRRYIOPGKLPGALTIVARRGEIAYLKAQGMDVERNK</b>	60
Query 61	PVCRDTVFRIYSMTKPIITSIAMMQLYEQGRFLLDDPVHKYI PAWKNLRVYNSGVYPNFLT	120
Sbjct 61	PVCRDTVFRIYSMTKPIITSIAMMQLYEQGRFLLDDPVHKYI PAWKNLRVYNSGVYPNFLT	120
Query 121	TPATSTMTRIDLFTHMSGLTYGFMNRINVDAAYRELKLDGSRLNLTLEALVGHLAELPLEF	180
Sbjct 121	TPATSTMTRIDLFTHMSGLTYGFMNRINVDAAYRELKLDGSRLNLTLEALVGHLAELPLEF	180
Query 181	SPGTAWNYSVSTDVLGYLVQLLADQPFDEYLREHIFEPLAMSDTGFHVRDDQLDRFAACY	240
Sbjct 181	SPGTAWNYSVSTDVLGYLVQLLADQPFDEYLREHIFEPLAMSDTGFHVRDDQLDRFAACY	240
Query 241	QYDPVDQFKLQDDPQTSPFRDKRRFLSGGGGVSTIDDYFHFAQALCQGGFEGGRRIIIGR	300
Sbjct 241	QYDPVDQFKLQDDPQTSPFRDKRRFLSGGGGVSTIDDYFHFAQALCQGGFEGGRRIIIGR	300
Query 301	KTLEFMRRNHLPGNQDLPGLSVGPFSETPYAGTGRGLGFSVKTDVAKSQINGSVGEYGWG	360
Sbjct 301	KTLEFMRRNHLPGNQDLPGLSVGPFSETPYAGTGRGLGFSVKTDVAKSQINGSVGEYGWG	360
Query 361	GLASTNFIDPVEELVVIFMTQLIPSSTYPIRQELRAIVNGALV	404
Sbjct 361	GLASTNFIDPVEELVVIFMTQLIPSSTYPIRQELRAIVNGALV <b>KLAAALEHHHHHH</b>	417

\*Query : shotgun cloning 결과 LipBL, \*\* Sbjct : PCR cloning 결과 LipBL

Shotgun cloning을 통해 발견한 LipBL은 대장균 내에서 대량 발현을 하지 않았음에도 불구하고, 기존 PCR cloning 결과와 달리 TBN 배지에서 halo를 형성하였다. 또한, 균체 추출액을 대상으로 pNPC assay를 수행한 결과, 7.6 U/mL의 활성을 나타냈다. 따라서 본 과제에서는 shotgun cloning으로 발견한 LipBL을 대장균에서 대량 발현하기 위해 T벡터 클로닝 및 pET22벡터 클로닝을 수행하였다. 이를 위해 상기 염기 서열 결과를 근거로 아래와 같이 primer를 디자인하였는데, 기존에 수행하였던 PCR cloning과는 다르게 C-terminal 6X-histidine tag 유도 서열을 포함하지 않도록 primer를 디자인하였다.

Table 3-33. LipBL의 PCR cloning을 위한 primer

Strain name	Lipase info.	Restriction enzymes	Forward and reverse primers
<i>Marinobacter lipolyticus</i>	LipBL	NdeI/HindIII	5'-GATCATATGACGGAATCGAACAGGTC-3' 5'-GATAAGCTCTAGACCAACGCCCAATTCA-3'

상기 primer을 이용하여 PCR을 수행하였고, 이를 통해 얻은 PCR product로 T벡터 클로닝 및 pET22벡터 클로닝을 수행하였다. 클로닝을 통해 얻은 재조합 플라스미드를 E. coli BL21(DE3)에 도입하였고, 형질전환된 균주를 TBN plate에 streak한 결과 콜로니 주변에 halo를 형성하는 것을 확인하였다.



Fig. 3-118. pET vector에 삽입된 LipBL의 TBN 배지에서의 halo 형성

LipBL의 대량 발현을 위해 상기 형질전환주 배양시 1 mM IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside)를 첨가하여 대량 발현을 유도하였다. 균체 추출액의 pNPC 활성 확인 결과, 활성이 923 U/mL로 확인되었다.

#### 라. 결론 및 제언

LipBL을 *E. coli* 균에서 생산하고 활성을 측정한 결과, 923 U/mL로 밝혀졌다. LipBL의 순수분리 및 단백질의 분자량 확인을 위해 SDS-PAGE zymogram 연구를 수행중이다. SDS-PAGE zymogram으로 단백질을 확인한 후에는, LipBL의 효소 반응 특성을 규명하고자 한다. 다른 균주 *Pseudoalteromonas atlantica* 31-A1, *Brevundimonas nasdae* 33-B6에 대해서는 아직 shotgun cloning을 진행하고 있다.

### 6. 유용 미생물 분리 및 활성 검증

#### 가. 연구 목표

##### (1) 극지 유래 균주의 EPS 생산성 향상

극지 겨울에, 해수 (sea water) 표면 온도가 어는 점 (freezing point) 이하로 수온이 내려가면 frazil ice 라 불리는 지름이 약 3-4mm 되는 ice crystal이 형성되기 시작되며, frazil ice가 계속 형성, 성장 그리고 뭉치면서 sea ice를 형성하게 된다 (Horner et al., 1992). Ice crystal이 성장 할 때 brine이라 작은 물방이 같이 형성되는데, brine이 형성될 때 여러 생물 (bacteria, algae, protist, flatworms, small crustacean)들이 갇히게 된다 (Thomas and Dieckmann, 2002). 이렇게 형성된 Brine는 주위에 있는 ice crystal에 의해 여러 이온 (ion)들이 농축되어 염도 (salinity)가 해수 표층 보다 높아지게 된다 (Horner et al., 1992). 그래서 brine에 갇힌 생물체들은 고농도의 염분과 초저온 환경에 노출이 되어 심한 스트레스를 받게 되게 되지만, 이런 환경 스트레스에 대해 극지 생물들은 대부분 당 (saccharide) 을 이용한 회피 (avoidance), 보호 (protection), 생활형 유대 관계 (partnerships) 전략으로 극한 환경 스트레스 대한 내성을 가지게 진화했고 (Kang et al., 2007), 주위에 있는 다른 미생물까지 영향을 주워 그

것들의 생존율을 높여준다 (Poli et al., 2010). 이러한 EPS의 특성을 이용해 새로운 냉동 보존제 (cryoprotectant)를 개발 하려는 연구가 많이 수행되어 왔다 (Fuller, 2004, Kang et al., 2007). 그리고 해양 환경에서 EPS는 해양에 녹아있는 중금속 또는 영양분을 응집 (flocculation) 시키는 유기 리간드 (Organic ligand) 역할을 한다 (Nichols et al., 2005). 유기 리간드 역할 때문에 해수에 녹아 있는 중금속의 농도를 줄일 수 있고, 영양공급을 용이하게 할 수 있다 (Nichols et al., 2005, Lee et al., 2014). 이 현상의 기작은 EPS에 함유된 많은 기능기와 그로 인한 전하 (charge)량과 분자량 때문이다 (Nichols et al., 2005, Lee et al., 2014). 그래서 EPS의 고유한 특성을 이용하여 산업폐수 처리에 접목시키려는 연구가 진행되고 있다 (Lee et al., 2014).

이러한 활성을 가진 EPS는 냉동 보존제, 응집 활성 및 많은 생리 활성 효과를 가지고 있어 많은 연구가 진행되고 있다 (Liu, Chen et al. 2013, Kim and Yim 2007, Nichols, Guezennec et al. 2005, Poli, Anzelmo et al. 2010, Lee et al., 2014). 하지만, 해양미생물은 육상 미생물과 비교하여 생리적 요인에 적합한 조건을 규명하기가 어렵기 때문에 기존의 해양미생물의 배양은 해수를 배지에 첨가하여 사용하였고, 이 후 생산 최적화에도 해수의 화학적 조성은 무시하고 그 외 배양첨가물에 대하여 조사하고 최적화하였다. 그러나 해수는 유동적이므로 채취 지역 및 시기에 따라 배지 조성에 미량적인 차이가 있으며, 기존에 인공해수에 대한 연구가 진행되어 있으나, 배지조성이 복잡하고 염 농도가 높아 이온평형을 조정하기가 어려워 배지의 염들이 cheating되고 이로 인하여 미생물이 대사활성에 필요한 물질흡수가 어려워 성장저해 및 물질생산이 교란될 수 있다.

따라서 기존의 인공해수의 화학조건을 기준으로 Plackett-Burman design에 의하여 EPS 생산에 필수적인 요인물질을 규명하고 Box-Behnken design을 이용하여 최적 농도를 조사하고자 하였다.

## (2) 극지해 유래 산호 공생 미생물의 분리

산호초가 이루고 있는 생태계는 해양 생태계 중 가장 큰 다양성을 가지며 이에 대해 아직 연구되지 않은 것이 많다 (Rohwer et al., 2002). 산호초를 이루는 산호는 미세조류, 곰팡이, 세균, 고세균 등과 밀접한 관계를 맺으며 공생하며 살아간다 (Pantos and Bythell, 2010). 남극 Ross 해에서 채취한 붉은 산호와 공생하는 생물 중 세균을 분리하여 이들의 다양성과 특성을 알아보고, 유용하게 활용할 수 있는 미생물이 있는지 탐색하고자 하였다.

### 나. 연구 수행방법

## (1) 극지 유래 균주의 EPS 생산성 향상

### (가) 배양 조건

2013년 로스해에서 분리된 폴리머 생산 균주종 *Pseudoalteromonas* sp. RosPo-2에서 생산된 exopolysaccharide (EPS; p-RosPo-2)가 냉동보존 효과와 응집력 활성이 높아 p-RosPo-2 생산량을 증가시키기 위해 배양 조건 실험 균주로 선정했다. *Pseudoalteromonas* sp. RosPo-2 균주의 seed culture는 20.0 g/L glucose가 첨가된 zobell (ZB) 배지 (SZB; 1.0 g/L yeast extract, 5.0 g/L peptone, 0.01g/L FeSO<sub>4</sub>, 750 mL 숙성해수, 250 mL 증류수 그리고 pH 7.0)에서 120 rpm, 25°C에서 16시간 배양하였다. 배양된 seed는 OD<sub>600</sub>에서 0.3이 되게 보정하고, 본 배양 배지에 5 % (v/v)가 되게 접종하였다. 배양 volume은 25mL이고, baffle flask를 이용하였다. 본 배양은 동일 조건에서 3일간 배양하였다.

### (나) Crude p-RosPo-2 추출 및 함량 측정

20 mL 배양액은 80°C에서 30분간 반응하여 cell 표면에 부착된 EPS를 용출시킨 후, 9000 rpm, 40°C에서 10분간 원심분리 하였다. 상등액은 새 50 mL 튜브에 옮겨 넣고, cell에 10mL 3차 증류수 첨가하고 재 부유 시켰다. 재 부유된 cell은 다시 80°C에서 30분간 반응하여 cell 표면에 부착된 EPS를 용출시킨 후, 9000 rpm, 40°C에서 10분간 원심분리 하였고, 이 상등액은 첫 번째 원심분리에서 얻어진 상등액과 합쳤다 (이 과정은 2회 실시). 회수된 40 mL 배양액은 10 KDa dialysis tubing을 이용하여 14 ~ 26시간동안 배지성분을 제거하였고, 이 시료에 2배 되는 부피의 cold ethanol과 혼합하여 crude p-RosPo-2를 추출하였다. 추출된 crude p-RosPo-2는 anthrone assay method와 glucose 표준곡선을 이용하여 함량을 측정하였고, cell은 동결건조 하여 건조 중량을 측정 하였다.

### (다) p-RosPo-2 생산에 최적인 탄소원 선정 및 농도 선정

Base medium, ZB medium에 다양한 탄소원 (glucose, galactose, sucrose, fructose, manitol)이 첨가된 배지를 만들고 동일 조건으로 배양 후 세포 성장과 p-RosPo-2의 생산량을 비교하였다. 각각 첨가된 탄소원의 농도는 2.0 % (w/v)로 하였다.

선정된 sucrose의 최적 농도를 선정하기 위해 ZB medium 에 0 ~ 3.0 % (w/v) sucrose가 첨가된 배지를 만들고 동일 조건으로 배양 후 세포 성장과 p-RosPo-2의 생산량을 비교하였다.

### (라) p-RosPo-2 생산에 최적인 질소원 선정 및 농도 선정

Base medium (20.0 g/L sucrose, 0.01g/L FeSO<sub>4</sub>, 750 mL 숙성해수, 250 mL 중류수 그리고 pH 7.0)에 다양한 질소원 (1.0 g/L yeast extract + 5.0 g/L peptone, 6.0 g/L yeast extract, 6.0 g/L peptone, 6.0 g/L tryptone)이 첨가된 배지를 만들고 동일 조건으로 배양 후 세포 성장과 p-RosPo-2의 생산량을 비교 하였다.

선정된 yeast extract의 최적 농도를 선정하기 탄소원 대비 질소원 첨가 비율 (C/N ratio) 0.5, 1.0, 2.0, 3.3, 5.0, 10이 되도록 배지를 만들고 동일 조건으로 배양 후 세포 성장과 p-RosPo-2의 생산량을 비교 하였다.

(마) Plackett-Burman design을 이용하여 p-RosPo-2의 생산량을 억제하는 성분 선별실험 (1차 Plackett-Burman design)

앞선 실험 결과들 (탄소원, 질소원 그리고 탄소원과 질소원의 비율)을 고정하고 해수 (sea water) 성분을 최적화하기 위해 통계학적 분석 방법 (Plackett-Burman design)을 이용하였다. Plackett-Burman design은 two-factorial design을 이용하여 N개의 실험에 대한 N-1의 실험변이를 조사 할 수 있으며, 통계수준의 신뢰도에 의한 생산 최적화 및 요인분석이 가능하다. 해수 (sea water) 성분은 Difco & BBL 사 (社) marine broth의 14개 무기물 성분과 농도를 기본으로 하였고 (Table 3-34), 이 성분 중 p-RosPo-2의 생산에 방해가 되는 물질을 선별하기 위해 low level은 전부 0.0 g/L로 하였다.

또한 Plackett-Burman design은 1차원 모델로 다음과 같다.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i$$

where Y is the predicted response (EPS production),  $\beta_0$  is the model intercept,  $\beta_i$  is the linear coefficient, and  $X_i$  is the level of the independent variable.

Table 3-34. Statistical analysis of medium components using the initial Plackett-Burman design

Variables	Component (g/L)	Low level (-1)	High level (+1)	Effect	t-Statistics	p-Value
X <sub>1</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> FeO <sub>7</sub>	0.0	0.1	-0.16260	-11.28	0.000
X <sub>2</sub>	NaCl	0.0	19.45	0.22540	15.64	0.000
X <sub>3</sub>	MgCl <sub>2</sub>	0.0	59	-0.04740	-3.29	0.003
X <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.0	3.24	0.13100	9.09	0.000
X <sub>5</sub>	CaCl <sub>2</sub>	0.0	1.8	0.05300	3.68	0.001

Variables	Component (g/L)	Low level (-1)	High level (+1)	Effect	t-Statistics	p-Value
X <sub>6</sub>	KCl	0.0	0.55	0.09500	6.59	0.000
X <sub>7</sub>	NaHCO <sub>3</sub>	0.0	0.16	-0.08740	-6.07	0.000
X <sub>8</sub>	KBr	0.0	0.08	0.09460	6.57	0.000
X <sub>9</sub>	SrCl <sub>2</sub>	0.0	0.034	-0.00220	-0.15	0.880
X <sub>10</sub>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.0	0.022	-0.12140	-8.42	0.000
X <sub>11</sub>	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	0.0	0.004	-0.10180	-7.06	0.000
X <sub>12</sub>	NaF	0.0	0.0024	0.06380	4.43	0.000
X <sub>13</sub>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.0	0.0016	0.07100	4.93	0.000
X <sub>14</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.0	0.008	0.06980	484	0.000

(부) Plackett-Burman design을 이용하여 p-RosPo-2의 생산량을 증가시키는 성분 선별  
(2차 Plackett-Burman design)

1차 Plackett-Burman design에서 선별된 9개의 무기물 성분 중 p-RosPo-2의 생산량을 증가시키는 성분을 선별하기 위해 2차 Plackett-Burman design을 실시하였다 (Table 3-35).

Table 3-35. Statistical analysis of selected medium components using the secondary Plackett-Burman design

Variables	Component (g/L)	Low level (-1)	High level (+1)	Effect	t-Statistics	p-Value
X <sub>1</sub>	NaCl	5.0	25.0	0.08600	4.80	0.000
X <sub>2</sub>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.0	10.0	0.07667	4.27	0.001
X <sub>3</sub>	KCl	0.2	2.0	0.03800	2.12	0.050
X <sub>4</sub>	KBr	0.05	1.0	0.08333	4.65	0.000
X <sub>5</sub>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.001	0.02	-0.03467	-1.93	0.071
X <sub>6</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.005	0.1	0.09867	5.50	0.000
X <sub>7</sub>	NaF	0.001	0.05	0.12733	7.10	0.000
X <sub>8</sub>	CaCl <sub>2</sub>	1.0	3.0	-0.04067	-2.27	0.038

Variables	Component (g/L)	Low level (-1)	High level (+1)	Effect	t-Statistics	p-Value
X <sub>9</sub>	SrCl <sub>2</sub>	0.005	0.05	-0.09200	-5.13	0.000

(사) Box-Behnken design을 이용하여 p-RosPo-2의 생산량을 증가시키는 성분 농도 최적화 실험

2차 Plackett-Burman design에서 negative effect를 보였던 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, SrCl<sub>2</sub>와 KCl은 Difco & BBL사(社) marine broth의 농도와 동일하게 첨가하였고, 선별된 5개의 무기물 성분 중 p-RosPo-2의 생산량을 증가시키는 성분 농도를 결정하기 위해 성분 농도 범위를 정하였다 (Table 3-36). 예상 최적치 (prediction of optimal point)는 요인 변수 및 반응에 의한 상관관계를 이용하여 2차 함수로 표시한다. 예상 최적치에 대한 방정식은 다음과 같이 표현된다.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_j^2$$

Where Y is the predicted response (EPS production), and  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ij}$  and  $\beta_{ii}$  are the constant and regression coefficients of the model, with  $X_i$  and  $X_j$  representing the independent nutrient components.

Table 3-36. Box-Behnken optimization of selected significant medium components

Variables	Component (g/L)	Low level (-1)	Center level (0)	High level (+1)
X <sub>1</sub>	NaCl	10.0	17.5	25.0
X <sub>2</sub>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7.0	13.5	20.0
X <sub>3</sub>	KBr	0.1	1.55	3.0
X <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.01	0.055	0.1
X <sub>5</sub>	NaF	0.0005	0.00275	0.05

## (2) 극지해 유래 산호 공생 미생물의 분리

(가) 2016 남극 Ross 해 붉은 산호에서 공생미생물을 분리 및 동정

남극 Ross 해 지역에서 dredge 방법으로 채취한 붉은 산호에서 공생미생물을 분리하기 위해 산호의 부위를 임의로 정하여 약 1 cm 길이의 조각을 얻는다. 이를 멸균수로 표면을 세척하여 표면에 오염으로 인한 미생물을 최대한 제거한다. 산호의 각 조각을

멸균한 막자사발로 갈고 멸균수를 첨가하여 이를 ZB, SZB, R2A, YPG, ISP4, MB, NB, PDB의 다양한 고체배지에 도말한다. 15°C에서 균주가 성장하여 분리 할 수 있을 때까지 배양한다. 콜로니를 텁 끝으로 채취하여 멸균한 튜브에 배지와 함께 15°C에서 배양한다. 성장한 균주에 대해 16S sequencing을 통해 동정을 실시한다. 518F, 800R 프라이머를 이용하여 16S rRNA 유전자 sequencing을 수행하며, contig sequence를 EzTaxon 데이터베이스의 type strain과 비교 동정을 실시한다.

#### (나) 붉은 산호 공생미생물의 시간과 온도별 성장

붉은 산호에서 분리한 미생물들의 최적 성장의 시간과 온도를 알기 위한 실험을 위해 먼저 seed 배양을 실시한다. 50 mL tube에 5 mL씩 각 배지를 채우고 균주의 stock을 첨가한다. 15°C에서 균의 성장을 눈으로 확인 할 수 있을 때 까지 배양하며 먼저 자란 균주에 대해서는 4°C에서 보관한다. Seed 배양을 마친 균주들에 대해 각각 OD를 흡광도 600nm에서 측정하고, 본 배양의 cell OD가 0.01이 되도록 접종한다. 균주 성장의 최적 온도를 찾기 위해 4°C, 15°C, 25°C에서 각각 배양하며 3 일, 7 일, 18 일 후 배양액의 OD<sub>600</sub>을 측정한다.

### 다. 연구 결과

#### (1) 극지 유래 균주의 EPS 생산성 향상

##### (가) p-RosPo-2 생산에 최적인 탄소원 선정 및 농도 선정

각 처리구 (ZB, glucose, galactose, sucrose, fructose, mannose)와 비교 했을 때, 균주 생장에는  $1.61 \pm 0.10$  g/L로 glucose가 제일 높게 측정되었지만, p-RosPo-2 생산량에서는  $86.54 \pm 7.83$  mg/L로 sucrose가 제일 높게 측정되었다. 이 결과에 의해 EPS 생산량이 제일 높은 탄소원인 sucrose를 선정했다 (Fig. 3-119).

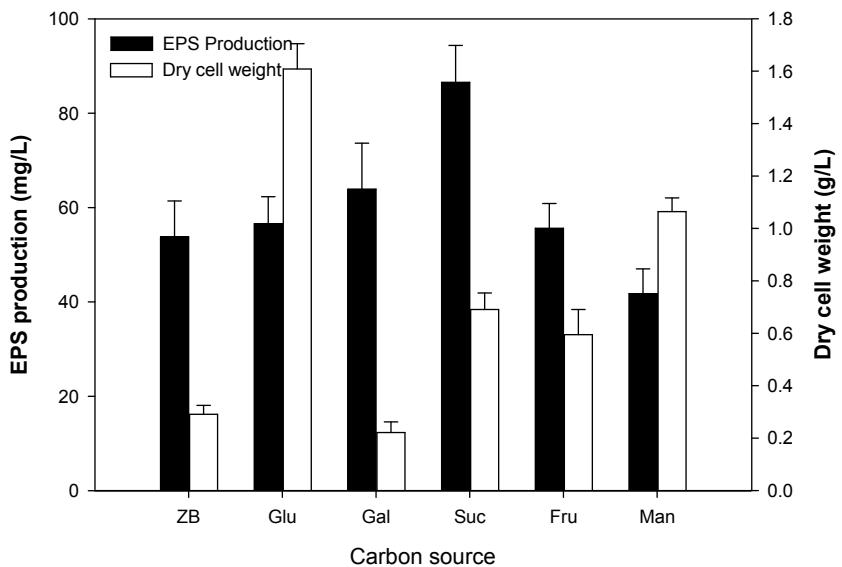


Fig. 3-119. Effect of carbon sources on EPS production and growth of *Pseudoalteromonas* sp. RosPo-2. All experimental data were mean  $\pm$  SD of three determinations.

선정된 sucrose의 최적 농도를 선정하기 위해 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0%의 농도로 첨가하여 동일 조건으로 배양 한 후 세포 생장과 p-RosPo-2의 생산량을 비교하였다. 각 처리구와 비교 했을 때, 생장과 p-RosPo-2의 생산량은 각각 차이를 보였다. p-RosPo-2 생산량은 2.0% sucrose일 때  $85.16 \pm 7.86$  mg/L로 제일 높은 p-RosPo-2 생산량으로 측정되었다. 그래서 이결과에 의해 sucrose의 농도를 2.0% (w/v)로 선정하였다 (Fig. 3-120).

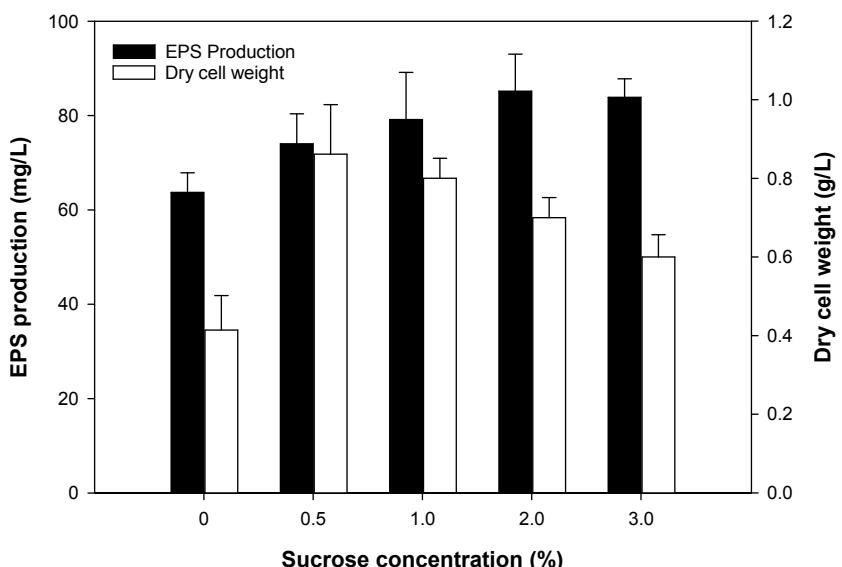


Fig. 3-120. Effect of sucrose concentrations on EPS production and growth of

*Pseudoalteromonas* sp. RosPo-2. All experimental data were mean  $\pm$  SD of three determinations.

(나) p-RosPo-2 생산에 최적인 질소원 선정 및 농도 선정

다양한 질소원을 RosPo-2 균주 배양 시 첨가하여 EPS 생산을 증가시키는 질소원을 선정하였다. 각 처리구와 비교 했을 때, 생장과 p-RosPo-2의 생산량은 각각 차이를 보였다. Yeast extract에서 세포 생장량과 p-RosPo-2 생산량이 제일 높게 측정되었고, 측정값은 각각  $1.64 \pm 0.24$  g/L,  $110.57 \pm 10.21$  mg/L이다. 이 결과에 의해 EPS 생산량이 제일 높은 질소원인 yeast extract를 선정했다 (Fig. 3-121).

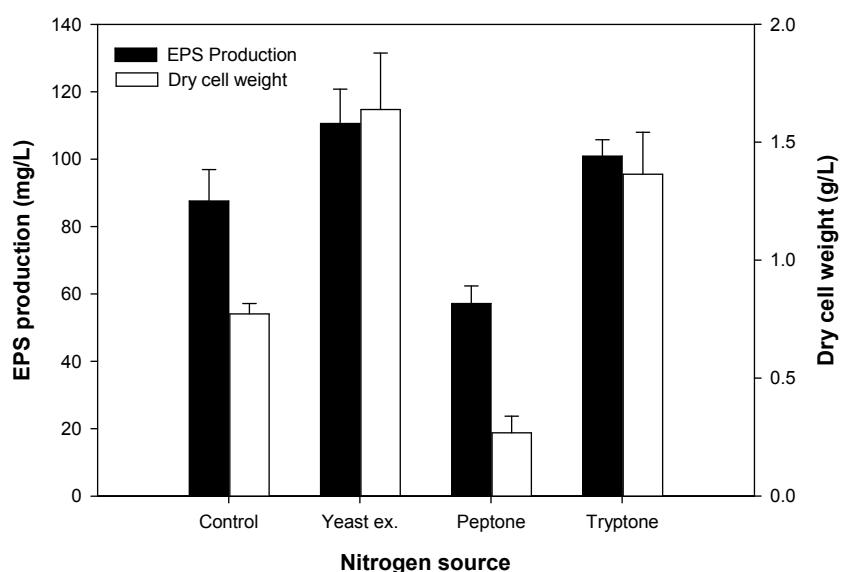


Fig. 3-121. Effect of Nitrogen sources on EPS production and growth of *Pseudoalteromonas* sp. RosPo-2. All experimental data were mean  $\pm$  SD of three determinations.

선정된 yeast extract와 sucrose의 비율을 조사하기 위하여 sucrose를 2.0%으로 고정하고 yeast extract의 양을 탄소원과 질소원의 비율 (C/N ratio) 0.5, 1.0, 2.0, 3.3 (대조구), 5.0, 10이 되도록 배지를 만들고 동일 조건으로 배양 후 세포 생장과 p-RosPo-2의 생산량을 비교하였다. 각 처리구와 비교 했을 때, 생장과 p-RosPo-2의 생산량은 각각 차이를 보였다. p-RosPo-2 생산량은 C/N ratio 값이 3.3 일 때  $110.57 \pm 10.21$  g/L로 제일 높게 측정되었다. 이와 같은 결과를 바탕으로 질소원의 첨가 비율을 3.3으로 선정하였다 (Fig. 3-122).

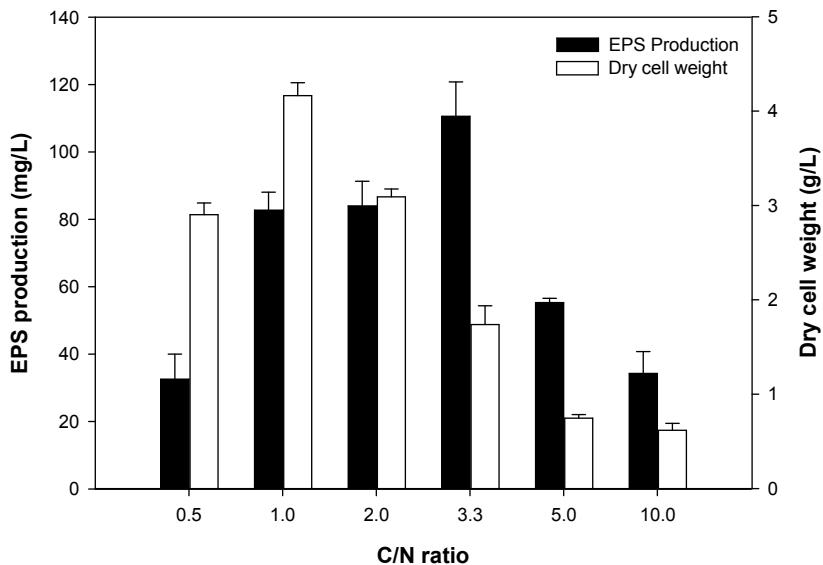


Fig. 3-122. Effect of carbon / nitrogen ratio on EPS production and growth of *Pseudoalteromonas* sp. RosPo-2. All experimental data were mean  $\pm$  SD of three determinations.

(다) Plackett-Burman design을 이용하여 p-RosPo-2의 생산량을 억제하는 성분 선별실험 (1차 Plackett-Burman design)

앞선 실험 결과들 (온도, 탄소원, 질소원 그리고 탄소원과 질소원의 비율)을 기초로 하 고 해수 성분을 최적화하기 위해 통계학적 분석 방법 (Plackett-Burman design)을 이용하였다. 해수 성분은 Difco & BBL사(社) marine broth의 14개 무기물 성분을 기본 으로 하였다. 측정된 p-RosPo-2 함량을 Plackett-Burman design method를 이용하여 14개 요인간의 상관관계를 polynomial model로 표시하면 다음과 같다.

$$\begin{aligned}
 Y_{(production)} = & 0.52050 - 0.08130X_1 + 0.11270X_2 - 0.02370X_3 + 0.06550X_4 + 0.02650X_5 \\
 & + 0.04750X_6 - 0.04370X_7 + 0.04730X_8 - 0.00110X_9 - 0.06070X_{10} - 0.05090X_{11} \\
 & + 0.03190X_{12} + 0.03550X_{13} + 0.03490X_{14}
 \end{aligned}$$

Where Y is predicted response (EPS production),  $X_1 - X_{14}$  are the coded values of  $C_6H_5FeO_7$ ,  $NaCl$ ,  $MgCl_2$ ,  $Na_2SO_4$ ,  $CaCl_2$ ,  $KCl$ ,  $NaHCO_3$ ,  $KBr$ ,  $SrCl_2$ ,  $H_3BO_3$ ,  $Na_2SiO_3$ ,  $NaF$ ,  $NH_4NO_3$  and  $Na_2HPO_4$ , respectively

통계처리 한 결과, 먼저 p-RosPo-2 생산에 대한 잔차의 normal probability plot의 직 선상에 유지되는 것으로 보아 Plackett-Burman design에 의한 조사가 적정함을 알 수 있었고 (Fig. 3-123), standardized effect의 normal probability plot (Fig. 3-124) 과

Table 3-33에서 p-RosPo-2의 생산효과에 대한 조성을 선별 할 수 있었다.  $C_6H_5FeO_7$ ,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $NaHCO_3$ ,  $SrCl_2$ ,  $H_3BO_3$ ,  $Na_2SiO_3$  가 p-RosPo-2 생산에 역제 효과(negative effect)를 보여 다음 실험에는 첨가하지 않았다. Positive effect를 보인 8개 성분은 2차 Plackett-Burman design에 이용하였다. 하지만  $SrCl_2$ 은  $p$ -value가 0.880으로 유의성이 없게 나와 2차 Plackett-Burman design에 포함시켰다.

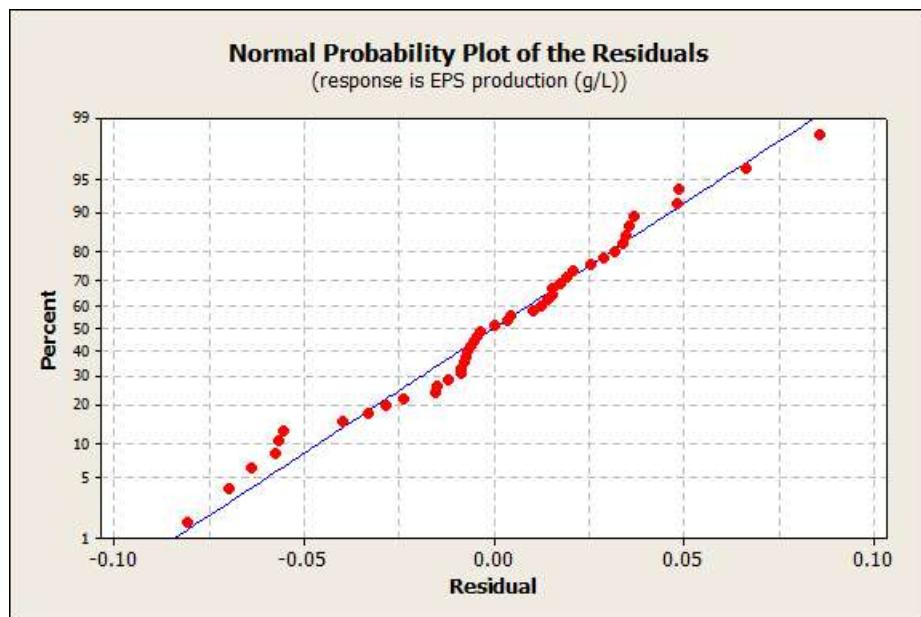


Fig. 3-123. Normal Probability Plot of the Residuals for the response of p-RosPo-2 production.

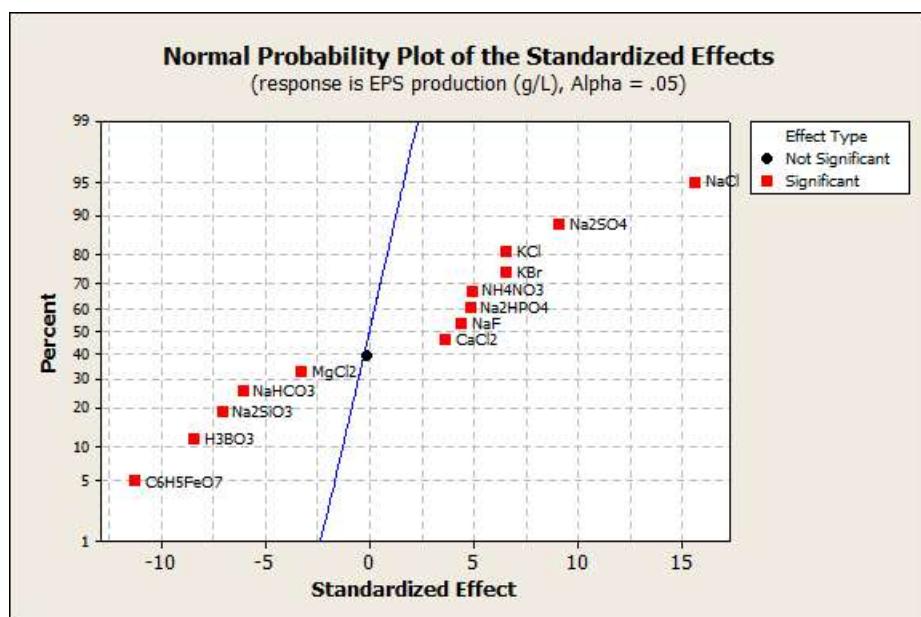


Fig. 3-124. Normal Probability Plot of the standardized effects for the response of p-RosPo-2 production.

(라) Plackett-Burman design을 이용하여 p-RosPo-2의 생산량을 증가시키는 성분 선별  
(2차 Plackett-Burman design)

1차 Plackett-Burman design에서 선별된 9개의 무기물 성분 중 p-RosPo-2의 생산량을 증가시키는 성분을 선별하기 위해 2차 Plackett-Burman design 실시했다. 측정된 p-RosPo-2 함량을 Plackett-Burman design method를 이용하여 9개 요인간의 상관관계를 polynomial model로 표시하면 다음과 같다.

$$Y_{(production)} = 0.85133 - 0.04300X_1 + 0.03833X_2 + 0.01900X_3 + 0.04167X_4 - 0.01733X_5 \\ + 0.04933X_6 + 0.06367X_7 - 0.02033X_8 - 0.04600X_9$$

Where Y is predicted response (EPS production),  $X_1 - X_9$  are the coded values of NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KCl, KBr, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaF, CaCl<sub>2</sub>, and SrCl<sub>2</sub>, respectively.

통계처리 한 결과, 먼저 p-RosPo-2 생산에 대한 잔차의 normal probability plot이 직선상에 유지되는 것으로 보아 Plackett-Burman design에 의한 조사가 적정함을 알 수 있었고 (Fig. 3-125), standardized effect의 normal probability plot (Fig. 3-126) 과 Table 3-34에서 p-RosPo-2의 생산효과에 대한 조성을 선별 할 수 있었다. NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>와 SrCl<sub>2</sub>가 p-RosPo-2 생산에 negative effect를 보여, p-RosPo-2 생산에 크게 관여 되지 않는 성분으로 판단된다. Positive effect를 보인 6개 성분은 p-RosPo-2 생산에 크게 관여 되는 성분으로 판단되어, Box-Behnken design에 이용하였다. 하지만 KCl은 *p*-value가 0.05 이상으로 유의성이 없게 나와 Box-Behnken design에 포함시키지 않았다.

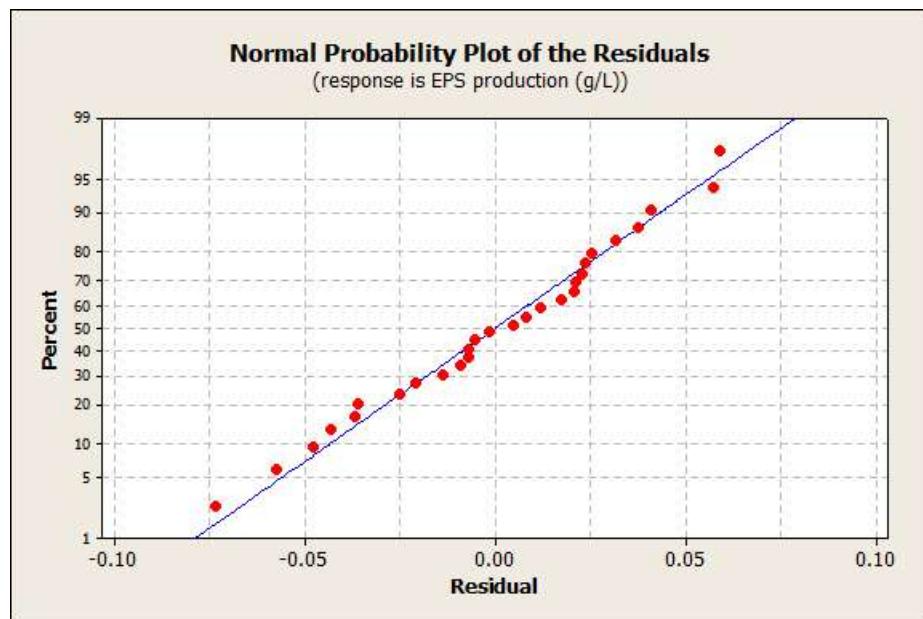


Fig. 3-125. Normal Probability Plot of the Residuals for the response of p-RosPo-2 production.

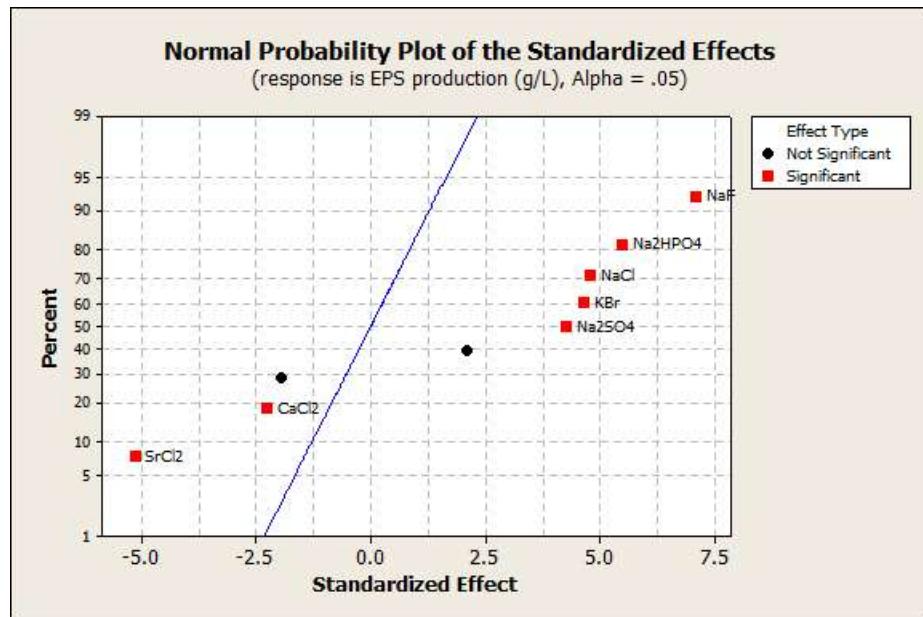


Fig. 3-126. Normal Probability Plot of the standardized effects for the response of p-RosPo-2 production.

(마) Box-Behnken design을 이용하여 p-RosPo-2의 생산량을 증가시키는 성분 농도 최적화 실험

2차 Plackett-Burman design에서 negative effect를 보였던 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, SrCl<sub>2</sub> 와 KCl은 Difco & BBL사(社) marine broth의 농도와 동일하게 첨가하였고, 선별된 5개의 무기물 성분중 p-RosPo-2의 생산량을 증가시키는 성분 농도를 결정하기 위해 Table

3-36 같이 성분 농도 범위를 정하였고, 이 측정된 함량을 Box-Behnken design method를 이용하여 통계처리 하였다 (Table 3-37). 또한 조건 범위안에서 최적조건을 계산하기 위하여 second-order polynominal function에 의한 p-RosPo-2의 생산 예상수치에 대한 식은 다음과 같다.

$$\begin{aligned} Y = & 1.30300 - 0.09010X_1 - 0.05750X_2 + 0.03275X_3 - 0.00425X_4 - 0.02860X_5 - 0.21568X_1^2 \\ & - 0.23888X_2^2 - 0.28333X_3^2 - 0.21588X_4^2 - 0.28902X_5^2 - 0.03400X_1X_2 + 0.00700X_1X_3 \\ & + 0.04300X_1X_4 - 0.04240X_1X_5 - 0.06100X_2X_3 - 0.03300X_2X_4 + 0.01200X_2X_5 \\ & - 0.07500X_3X_4 - 0.02000X_3X_5 - 0.02000X_4X_5 \end{aligned}$$

Where Y is predicted response (EPS production),  $X_1$  –  $X_5$  are the coded values of NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KBr, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and NaF, respectively.

통계 분석 결과  $R^2$  (90.7%), adjust  $R^2$  (81.8%) 값은 p-RosPo-2의 생산에 대해 실측과 예측 값 사이에 연관성이 높음을 가리킨다. 이 휘귀 모델의 F 값은 10.68 그리고 P 값은 0.05 이하로 계산이 되어 이 Box-Behnken design은 높은 신뢰도를 보였고, 적합성 결여 (lack of fit)의 P 값이 0.05 이상으로 계산되어 신뢰성이 없음을 보였다. Lack of fit의 P 값이 높은 의미는 이 결과가 이 모델에서 적합함을 가리킨다. 각 성분간의 상호 작용에 대한 3 dimensional response surface plots 그래프는 Fig. 3-127이다.

반응표면분석 (Response surface plot)과 Box-Behnken design을 통하여 각 성분의 최적 농도를 분석했다. 그 결과, NaCl은 16.0 g/L, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>는 12.7 g/L, KBr은 1.66 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>는 0.052 g/L, NaF는 0.0025 g/L이다. 최적화된 농도로 만들어진 배지 (optimized medium (OM); 20.0 g/L sucrose, 6.0 g/L yeast extract, 16.0 g/L NaCl, 12.7 g/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.8 g/L CaCl<sub>2</sub>, 1.66 g/L KBr, 0.55 g/L KCl, 0.034 g/L SrCl<sub>2</sub>, 0.0016 g/L NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0.052 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.0025 g/L NaF)와 SZB 배지에서 p-RosPo-2의 생산량 값, 세포 생장량 그리고 pH 변화를 시간 별로 체집을 해 비교 하였다 (Fig. 3-128). SZB에서의 pH 변화는 36시간 동안 pH가 1.5 감소된 pH 5.4로 측정 되었고 이 pH는 72시간까지 유사하게 유지되었다. OM에서의 pH 변화는 18시간 동안 pH가 1.6 감소된 pH 5.3로 측정 되었고, 다시 18시간 후 pH는 5.8로 증가 하였다가 다시 서서히 감소하여 72시간에는 pH 5.5로 측정되었다. 두 배지에서 3일간 RosPo-2 균주는 계속 성장 하였지만, SZB 배지에서 p-RosPo-2 생산량은 36시간에 최대 량 ( $0.36 \pm 0.00$  g/L)에 도달하여 72시간 까지 유사하게 유지되었고, OM 배지에서 p-RosPo-2 생산량은 48시간에 최대 량 ( $1.15 \pm 0.03$  g/L)에 도달하여 72시간 까지 유사하게 유지되었다. 반응표면분석에서는 p-RosPo-2의 생산량이 1.3 g/L로 예측되었고, 실측된 p-RosPo-2의 생산량은  $1.11 \pm 0.05$  g/L로 예측값과 유사하게 측정되었다. 이 실측값은 SZB 배지

에서 생산된 p-RosPo-2 ( $0.36 \pm 0.01$  g/L)의 약 3배 증가된 생산량이다.

Table 3-37. Analysis of variance for predictive equation for EPS production by *Pseudoalteromonas* sp. RosPo-2.  $X_1 - X_5$  are the coded values of NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KBr, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and NaF, respectively.

Source	Sum of squares	df	Mean square	F-values	P-values
Model	1.24118	22	0.059104	10.19	0.000
Blocks	0.00197	1	0.001970	0.34	0.566
$X_1$	0.12989	1	0.129888	22.39	0.000
$X_2$	0.05290	1	0.052900	9.12	0.006
$X_3$	0.01716	1	0.017161	2.96	0.100
$X_4$	0.00029	1	0.000289	0.05	0.825
$X_5$	0.01309	1	0.013087	2.26	0.147
$X_1^2$	0.34353	1	0.343527	59.21	0.000
$X_2^2$	0.42140	1	0.421405	72.63	0.000
$X_3^2$	0.59512	1	0.595124	102.57	0.000
$X_4^2$	0.34416	1	0.344165	59.32	0.000
$X_5^2$	0.61684	1	0.616842	106.32	0.000
$X_1X_2$	0.00462	1	0.004624	0.80	0.382
$X_1X_3$	0.00020	1	0.000196	0.03	0.856
$X_1X_4$	0.00740	1	0.007396	1.27	0.271
$X_1X_5$	0.00719	1	0.007191	1.24	0.278
$X_2X_3$	0.01488	1	0.014884	2.57	0.123
$X_2X_4$	0.00436	1	0.004356	0.75	0.396
$X_2X_5$	0.00058	1	0.000576	0.10	0.756
$X_3X_4$	0.02250	1	0.022500	3.88	0.062
$X_3X_5$	0.00160	1	0.001600	0.28	0.605
$X_4X_5$	0.00160	1	0.001600	0.28	0.605
Residual	0.12764	22	0.005802		
Lack of fit	0.12504	20	0.006252	4.81	0.186
Pure error	0.00260	2	0.001300		
Cor total	1.36882	43			

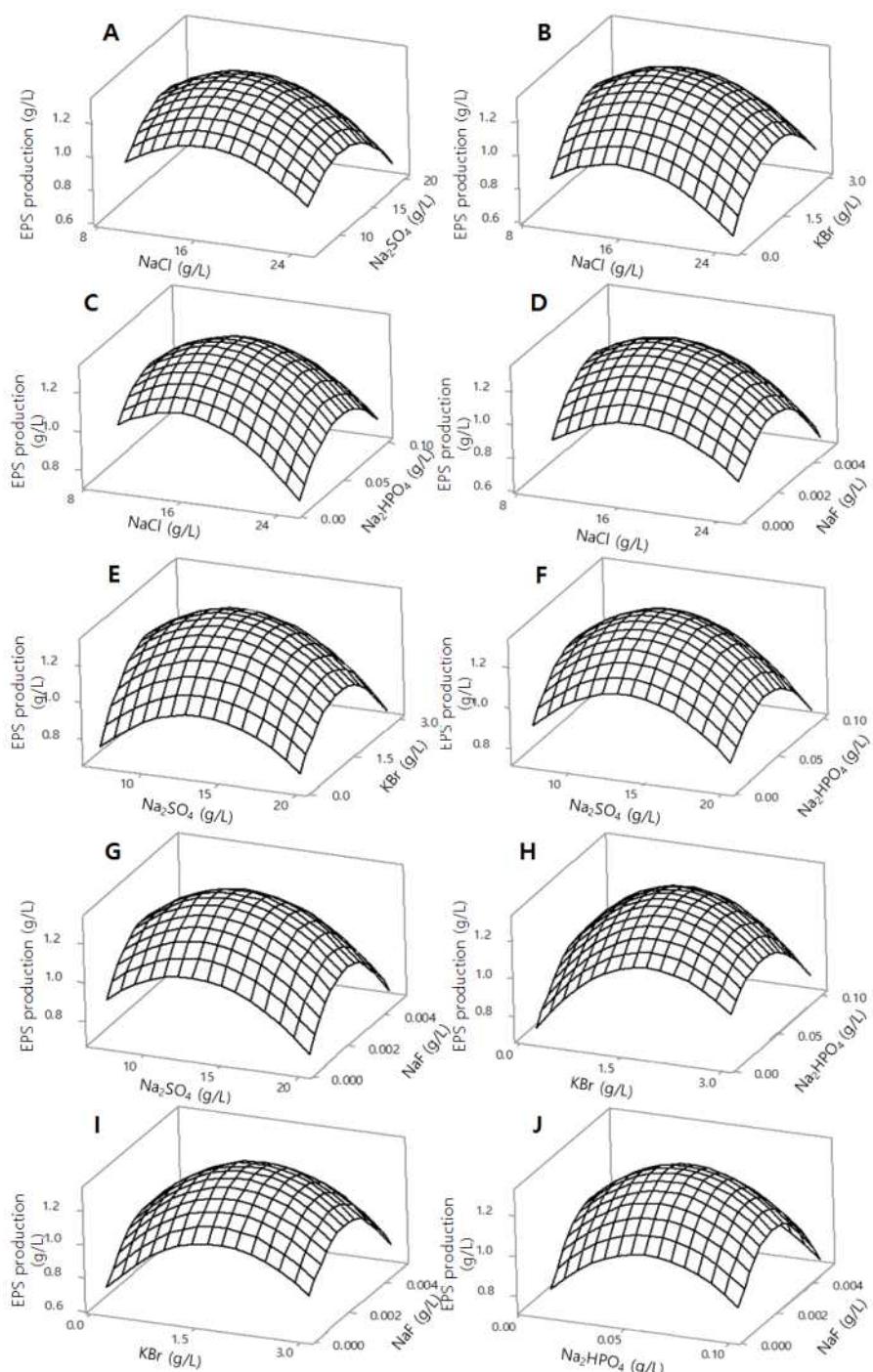


Fig. 3-127. Three-dimensional response surface plot for the effect of A) NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; (B) NaCl, KBr; (C) NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; (D) NaCl, NaF; (E) Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KBr; (F) Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; (G) Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaF; (H) KBr, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; (I) KBr, NaF; (J) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaF on EPS production (g/L).

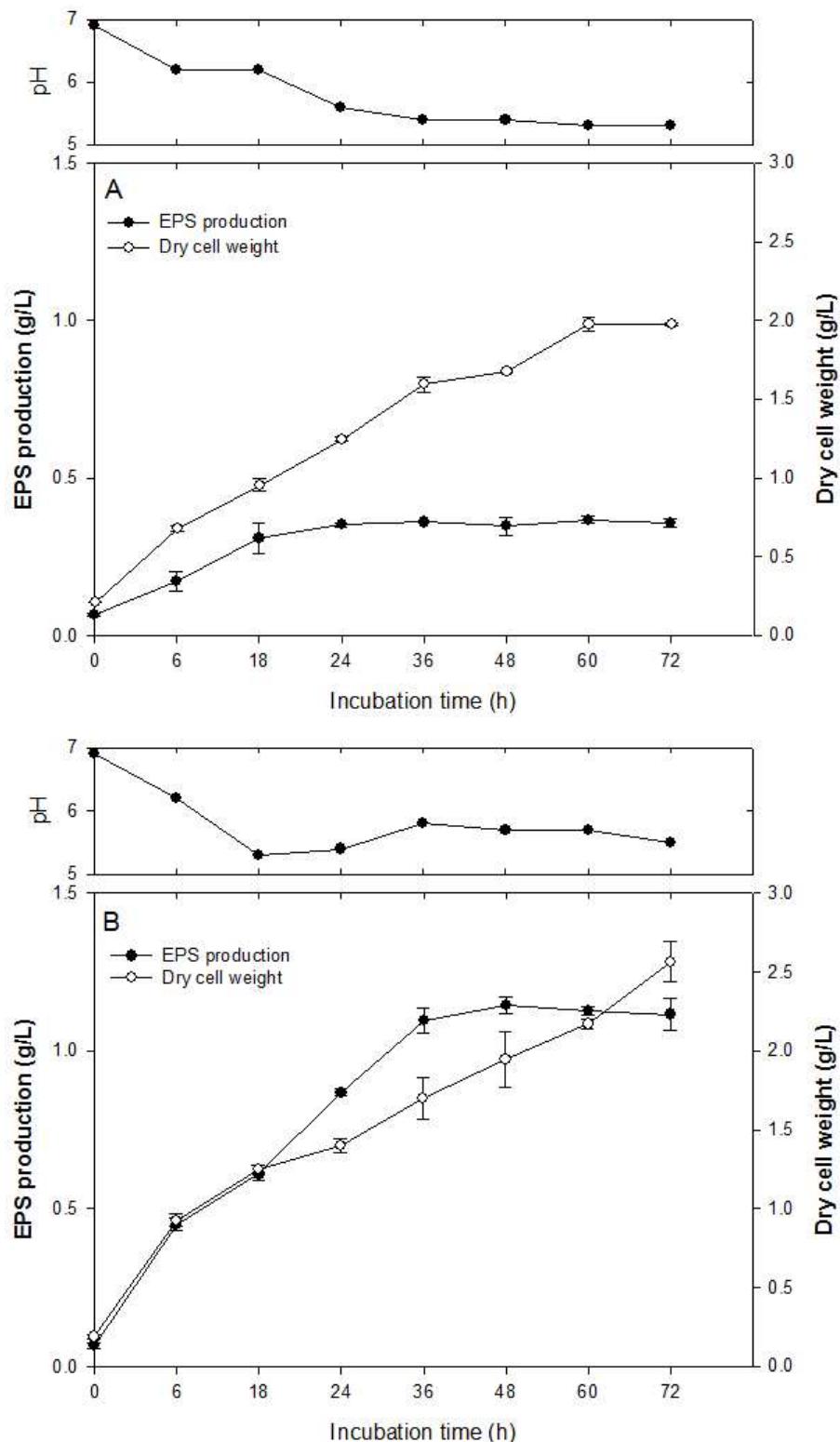


Fig. 3-128. The p-RosPo-2 production from SZB (A) and optimized medium (B).

## (2) 극지해 유래 산호 공생 미생물의 분리

2016년 Ross 해 (73,23.1187 S, 173,20.6802 E) 수심 330 m에서 dredge로 붉은 산호를 채취하였다. 멀균한 막자사발에 같은 붉은 산호를 고체배지에 도말하여 배양 후 올라

온 콜로니들을 채취하였다. 총 56개의 콜로니를 분리하였으며 각각에 대해 콜로니의 색, 모양, 점도를 확인하였다.



Fig. 3-129. 남극 Ross 해에서 채취한 붉은 산호

콜로니 색은 노랑, 베이지, 분홍 등 다양한 색을 띤 콜로니들이 있었고, 모양과 점도에 대해서는 대부분이 둥근 모양이었으며 점도를 띠지 않았다. 콜로니들의 동정은 16S 서열을 sequencing 하여 일치도가 가장 큰 종으로 동정하였을 때, 같은 종으로 동정된 결과들을 취합하면 붉은 산호의 공생미생물이 23 종으로 동정됨을 알 수 있다. 속으로 분리 하였을 경우, 19개의 속으로 분류된다. 또한, 일치도가 97% 이하인 7개의 균주, 즉 2-12, 1-12, 4-14, 1-7, 3-5, 4-5, 4-8은 기존에 알려지지 않은 신종이라고 사려할 수 있다.

Table 3-38. 붉은 산호에서 분리한 공생 미생물의 특성과 동정

No.	Stock No.	Sample name	Latitude	Longitude	Depths	Collecting method	Media	색	모양	점도	Identification	Similarity (%)
1	2-12	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	SZB	Orange	Round	X	<i>Altererythrobacter marenensis</i>	96.39
2	4-7	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	NB	Yellow	Round	X	<i>Arthrobacter subterraneus</i>	99.93
3	1-12	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	ZB	Yellow	Round	X	<i>Aurantimonas coralicida</i>	97.18
4	1-1	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	ZB	Yellow	Round	X	<i>Bacillus aerophilus</i>	99.34
5	1-3	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	SZB	Yellow	Round	X	<i>Bacillus aerophilus</i>	99.2
6	1-6	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	MB	Yellow	Round	X	<i>Bacillus aerophilus</i>	99.93
7	1-9	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	NB	Yellow	Round	X	<i>Bacillus aerophilus</i>	100
8	1-10	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	PDB	Yellow	Round	O	<i>Bacillus aerophilus</i>	99.93
9	1-4	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	R2A	Yellow	Irregular	X	<i>Bacillus altitudinis</i>	99.93
10	2-1	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	NB	Beige	Round	X	<i>Bacillus safensis</i>	99.53
11	3-1	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	SZB	Yellow	Round	X	<i>Bacillus safensis</i>	99.93
12	4-3	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	R2A	Pink	Round	X	<i>Bacillus safensis</i>	99.4
13	4-6	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	NB	Yellow	Round	O	<i>Bacillus safensis</i>	99.73
14	5-1	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	PDB	Beige	Round	O	<i>Bacillus safensis</i>	100
15	4-4	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	MB	Yellow	Round	X	<i>Croceicoccus marinus</i>	100
16	3-2	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	SZB	살구	Round	X	<i>Cryptococcus fonsecae</i>	99
17	1-11	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	SZB	Orange	Round	X	<i>Dietzia maris</i>	99.79
18	1-13	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	ZB	Orange	Round	X	<i>Dietzia maris</i>	99.86

No.	Stock No.	Sample name	Latitude	Longitude	Depths	Collecting method	Media	색	모양	점도	Identification	Similarity (%)
19	4-23	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	SZB	Orange	Round	X	<i>Dietzia maris</i>	99.72
20	4-14	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	ZB	Yellow	Irregular	X	<i>Erythrobacter pelagi</i>	96.57
21	1-7	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	MB	Orange	Round	X	<i>Erythrobacter pelagi</i>	97.4
22	3-5	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	MB	Orange	Round	X	<i>Erythrobacter pelagi</i>	97.41
23	4-5	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	MB	Orange	Round	X	<i>Erythrobacter pelagi</i>	97.34
24	4-8	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	NB	Orange	Round	X	<i>Erythrobacter pelagi</i>	97.34
25	4-17	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	MB	Lemon	Round	X	<i>Georgenia muralis</i>	99.86
26	4-18	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	MB	다홍	Round	X	<i>Kirrobacter mercurialis</i>	99
27	2-2	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	NB	Lemon	Round	X	<i>Microbacterium lacus</i>	98.97
28	4-2	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	ZB	Lemon	Round	X	<i>Microbacterium lacus</i>	99.11
29	3-10	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	R2A	Lemon	Round	X	<i>Microbacterium lacus</i>	98.9
30	3-7	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	SZB	연한살구	Irregular	X	<i>Modestobacter marinus</i>	99.59
31	3-9	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	NB	Orange	Round	X	<i>Modestobacter marinus</i>	99.52
32	2-5	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	ZB	살구	Irregular	X	<i>Modestobacter marinus</i>	99.65
33	2-13	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	SZB	연한살구	Irregular	X	<i>Modestobacter marinus</i>	99.65
34	4-20	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	SZB	연한살구	Irregular	X	<i>Modestobacter marinus</i>	99.52
35	5-3	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	NB	연한살구	Round	X	<i>Modestobacter marinus</i>	99.65
36	2-4	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	NB	Beige	Round	X	<i>Moraxella osloensis</i>	99.73
37	1-5	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	R2A	Orange	Round	X	<i>Nesterenkonia jeotgali</i>	99.73
38	1-8	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	MB	Yellow	Round	X	<i>Nesterenkonia jeotgali</i>	99.73
39	4-1	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	ZB	Orange	Round	X	<i>Nesterenkonia jeotgali</i>	99.73
40	2-11	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	ISP4	Lemon	Round	X	<i>Nesterenkonia jeotgali</i>	99.25
41	4-11	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	PDB	Yellow	Round	X	<i>Nesterenkonia lutea</i>	99.41
42	4-12	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	ZB	Yellow	Round	X	<i>Ornithinimicrobium kibberense</i>	100
43	1-2	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	ZB	Beige	Round	X	<i>Psychrobacter marincola</i>	99.23
44	3-4	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	MB	Yellow	Round	X	<i>Rhodococcus fascians</i>	99.86
45	4-16	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	NB	White	Irregular	X	<i>Rhodococcus marinonascens</i>	99.52
46	4-15	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	R2A	White	Irregular	X	<i>Rhodococcus marinonascens</i>	99.93
47	3-6	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	NB	Pink	Round	X	<i>Sakaguchia dacryoidea</i>	99
48	4-9	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	NB	Pink	Round	X	<i>Sakaguchia dacryoidea</i>	100
49	4-10	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	PDB	Pink	Round	X	<i>Sakaguchia dacryoidea</i>	99
50	2-6	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	ZB	Pink	Round	X	<i>Sakaguchia dacryoidea</i>	100
51	3-11	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	R2A	Pink	Round	X	<i>Sakaguchia dacryoidea</i>	99
52	3-12	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	ZB	다홍	Round	X	<i>Sakaguchia dacryoidea</i>	99
53	3-13	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	PDB	다홍	Round	X	<i>Sakaguchia dacryoidea</i>	100
54	5-2	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	ZB	다홍	Round	X	<i>Sakaguchia dacryoidea</i>	99
55	2-3	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	NB	Yellow	Round	X	<i>Staphylococcus warneri</i>	100
56	2-7	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	73,23.1187 S	173,20.6802 E	330	Dredge	ZB	White	Round	X	<i>Staphylococcus warneri</i>	100

Table 3-39. 같은 종으로 묶어 정리한 공생 미생물

No.	Stock No.	Identification	Similarity(%)
1	2-12	<i>Altererythrobacter marenensis</i>	96.39
2	4-7	<i>Arthrobacter subterraneus</i>	99.93
3	1-12	<i>Aurantimonas coralicida</i>	97.18
4	1-1	<i>Bacillus aerophilus</i>	99.34
	1-3		99.2
	1-6		99.93
	1-9		100
	1-10		99.93
	1-4		99.93
5	2-1	<i>Bacillus altitudinis</i>	99.53
	3-1		99.93
	4-3		99.4
	4-6		99.73
	5-1		100
	4-4		100
6	4-4	<i>Croceicoccus marinus</i>	100
	3-7	<i>Modestobacter marinus</i>	99.59
	3-9		99.52
	2-5		99.65
	2-13		99.65
16	4-20	<i>Nesterenkonia jeotgali</i>	99.52
	5-3		99.65
	2-4		99.73
	1-5		99.73
	1-8		99.73
17	4-11	<i>Nesterenkonia lutea</i>	99.41
	4-12		100
	4-1		99.73
	2-11		99.25
18	4-12	<i>Ornithinimicrobium kibberense</i>	100
19	1-2	<i>Psychrobacter marincola</i>	99.23
20	3-4	<i>Rhodococcus fascians</i>	99.86

No.	Stock No.	Identification	Similarity(%)
8	3-2	<i>Cryptococcus fonscae</i>	99
	1-11		99.79
9	1-13	<i>Dietzia maris</i>	99.86
	4-23		99.72
10	4-14		<b>96.57</b>
	1-7		<b>97.4</b>
11	3-5	<i>Erythrobacter pelagi</i>	<b>97.41</b>
	4-5		<b>97.34</b>
12	4-8		<b>97.34</b>
	4-17	<i>Georgenia muralis</i>	99.86
13	4-18	<i>Kirrobacter mercurialis</i>	99
	2-2		98.97
14	4-2	<i>Microbacterium lacus</i>	99.11
	3-10		98.9

No.	Stock No.	Identification	Similarity(%)
21	4-16	<i>Rhodococcus marinonascens</i>	99.52
	4-15		99.93
22	3-6	<i>Sakaguchia dacryoidea</i>	99
	4-9		100
23	4-10	<i>Staphylococcus warneri</i>	99
	2-6		100
24	3-11		99
	3-12		99
25	3-13		100
	5-2		99
26	2-3	<i>Staphylococcus warneri</i>	100
	2-7		100

붉은 산호에서 분리한 공생미생물의 성장 측정온도를 알기 위해 각 균주를 먼저 seed 배양하여 온도별로 배양하였다. 56개 균주 중 seed 배양이 가능했던 47개의 균주에 대해 각 온도에서 3 일, 7 일, 18 일간 배양한 결과는 다음과 같았다.

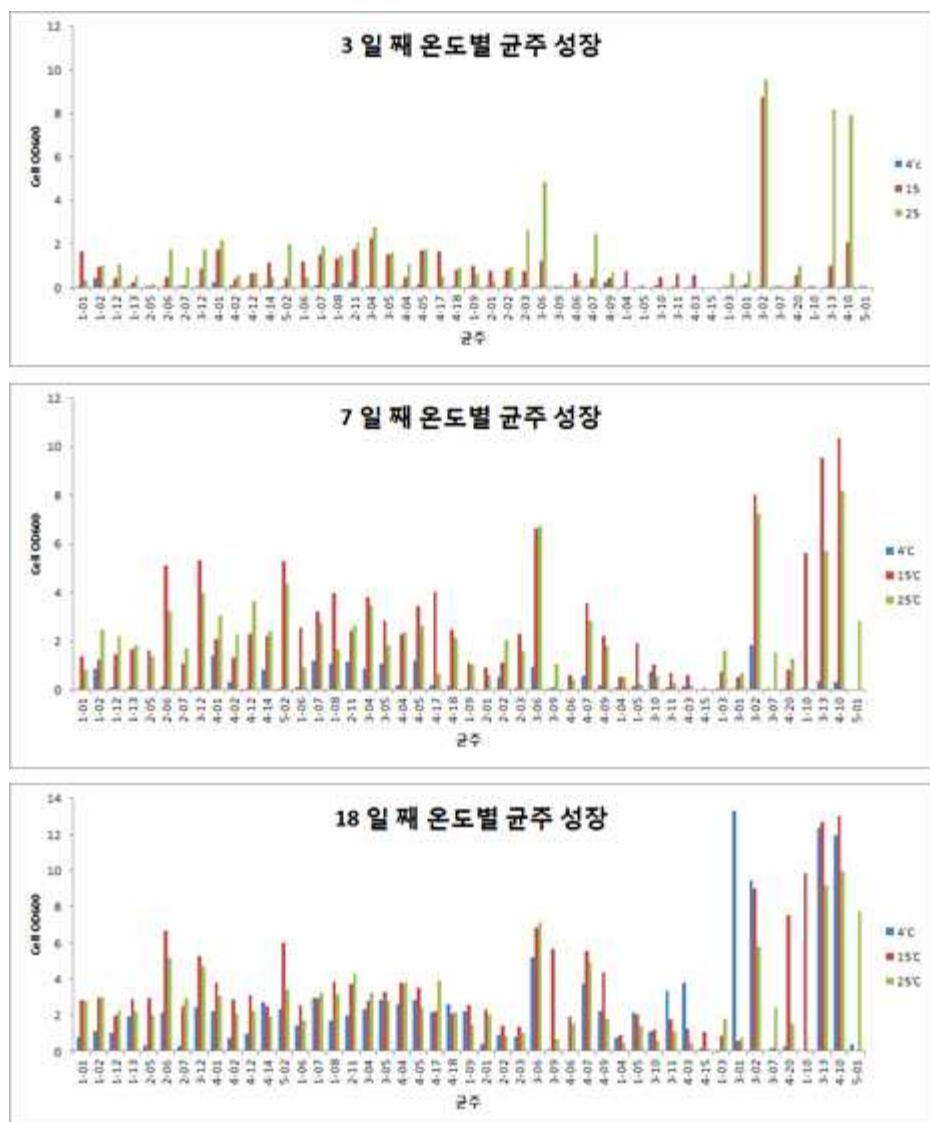


Fig. 3-130. 공생미생물의 온도별 균주 성장 (3일, 7일, 18일)

3 일 배양한 균주들의 성장을 확인하였을 때, 3 일 만에 월등히 성장한 균주가 4 균주 (3-06, 3-02, 3-13, 4-10) 있었다. 세 가지 다른 온도 중 25°C에서 가장 성장을 많이 하였는데, 3-02 균주에 대해서는 15°C에서도 큰 성장을 보였다. 3 일째에 25°C 보다 1 5°C에서 더 큰 성장을 보인 균주들도 있다. 1-01, 4-14, 1-06, 4-17, 1-09, 2-01, 4-06, 1-04, 3-10, 3-11, 4-03 균주에 대해서는 저온인 15°C에서 더 빠른 성장을 보였다. 7 일째에는 균주들의 성장을 3 일째보다 증가한 것을 확인할 수 있었다. 저온인 4°C에서 세포 밀도가 높아졌다. 3 일 만에 세포 성장이 우수했던 4 균주에 대해서는 7 일째에는 25°C 보다 15°C의 세포 OD가 더 큰 값을 나타냈다. 또한 다른 균주들에 대해서도 25°C 보다 15°C에서 성장이 큰 균주들이 많아졌다. 18 일 째 균주의 온도별 성장을 측정하였을 때, 7 일째의 성장보다 대체로 크게 줄거나 증가하지 않았지만, 4°C에서 배양한 균주들의 성장은 크게 증가한 것을 확인 할 수 있었다. 특히, 3-1 균주에 대해서는 17 일째에 4°C에서 최고 cell OD를 나타냈다. 이 균주는 2주 이상 4°C에서 배양 했을 때 일주일 이후에 세포 수가 급격히 증가함을 확인할 수 있었다. 3-06, 3-02, 3-13, 4-10, 4-03, 3-11 등의 균주에 대해서도 비슷한 양상을 나타냈다. 3-02 균주에 대해서는 3일 째 가장 높은 cell OD를 나타냈고 점점 감소하였지만, 다른 균주들에 대해서는 3일 이후 더욱 증가하였다.

#### 라. 결론 및 제언

생산모델링을 통하여 해수를 사용하는 생산방식에서 벗어나 좀 더 재현성이 있는 생산조건을 규명할 수 있었다. 해양 미생물유래 세포외 다당류 생산에 Plackett-Burman design 과 Box-Behnken design을 이용한 생산최적화 보고는 적다. 따라서 좀 더 다양한 생산모델 기법을 응용하여 더 많은 요인에 대한 탐색이 필요하며, 이 최적화 생산 배지 조건을 기준에 조사된 생산조건과 대체하고자한다.

남극에서 채취한 붉은 산호에서 공생미생물을 채취하였을 때, 총 56 균주를 확보 하였다. 이들의 종을 분류하기 위해 16S rRNA를 sequencing 하여 가장 일치도가 높은 종으로 동정하였다. 7 균주를 제외한 49 균주에 대해서는 기존의 동정된 종들과 98% 이상의 일치도를 보이는 것을 확인할 수 있었다. 97% 이하의 일치도를 보인 7 균주에 대해서는 지금까지 알려지지 않은 신종이라고 볼 수 있다. 또한 배양한 공생미생물들의 특성을 알기위하여 온도별 성장을 균주별로 확인하였다.

3 일, 7 일, 18 째에 세포 OD를 측정하였을 때, 균주 별로 15°C 혹은 25°C에서 성장이 크게 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 3일 째에는 25°C에서의 성장이 컸던 반면, 7일

째 까지는 그래도 4°C보다 15°C와 25°C에서 세포의 성장이 더 활발한 것을 확인할 수 있었다. 그 중에서도 특히 15°C에서 균주들의 높은 성장을 확인 할 수 있었는데, 이것이 3일 째와 7일 째 사이에 25°C에서 배양한 균주들의 성장이 증가 하였다가 감소하였을 수 있는 가능성도 있을 수 있다. 18 일째에 4°C에서 균주들의 성장이 급격히 증가함을 확인 할 수 있었다. 균주가 가장 높은 cell OD를 갖는 날짜는 3, 7, 18 일 중에 18 일에 51 균주로 가장 많이 분포하였고, 온도는 15°C에서 26 균주로 가장 많았다.

남극의 붉은 산호와 공생하는 미생물 중 세균을 분리 하여 세균의 다양성을 확인하고 신종 세균을 확보 할 수 있었으며, 분리한 균주들의 최적 성장온도를 실험을 통해 각 균주의 특성을 확인할 수 있었다.

## 7. 극지 요각류의 단백질체 변화 양상

### 가. 연구 목표

극지역의 환경 변화가 생태계 및 생물체에 미치는 영향을 확인하기 위하여 이들 극지 생물 종이 환경변화 및 환경스트레스에 대한 생태생리학적 및 생화학적 반응에 대한 연구는 매우 중요하다. 이를 통해 특정 생물체 내에서 생태·생리학적 변화들에 우선되어 나타나는 문자신호를 바탕으로 환경 변화를 조기에 진단할 수 있다. 또한, 극지의 환경변화에 따른 스트레스에 의한 서식 생물체의 변화를 문자수준에서 이해하기 위해 대상 생물들의 유전체 및 단백체 정보가 필요하다. 이를 통해 다수의 유전자를 이용한 transcriptomics 및 proteomics, 대사체를 이용한 metabolomics 적 접근법을 충분히 활용한다면 환경 변화 및 스트레스로 인해 나타날 수 있는 생물체에 직간접적인 영향을 이해 할 수 있으리라 사료된다.

극지생물로 부터 유전체 정보 및 대사체를 확보하여 극지생화학 및 분자생물학 분야 내 우수 경쟁력 확보 국내 기술력을 이용한 극지생물의 유전체 및 대사체 정보의 생화학 및 분자생물학적 활용법을 개발할 수 있다.

극지생물들의 유전체 및 대사체 정보를 선점함으로써 국내 연구진의 위상 확보 및 동종 분야 내 국제적 경쟁력 확보 극지생물들 내 특이 유전체와 대사체 발견 및 활용을 통한 경제·산업적 이득 예상된다.

본 연구에서는 극지생물을 이용하여 염분 및 자외선에 의해 유도되는 해양생물의 단백질 체 변화를 분석하고자 한다.

### 나. 연구 수행방법

극지요각류의 RNA-seq 정보 중 NCBI NR Blast에서 hit된 23,918개의 유전자 정보에서 protein DB를 구축하고 이를 I-TRAQ을 활용하여 약 5,000개 이상의 protein spot의 발

현 양상을 분석한다 (Fig. 3-131).



Fig. 3-131. 극지요각류 RNA-seq 분석 논문

극지 요각류의 단백질체 변화 양상은 자외선 및 염분에 따라 LD50 또는 EC10 값을 기준으로 분석하고 세포내 분자 기작에 대한 연구를 수행한다.

### (1) 자외선과 다양한 염분 노출

자외선과 다양한 농도의 염분 노출 실험은 요각류 *Tigriopus japonicus*와 *Paracyclopsina nana*의 결과를 바탕으로 극지요각류 서식환경을 고려하여 실험을 진행한다 (Fig. 3-132).

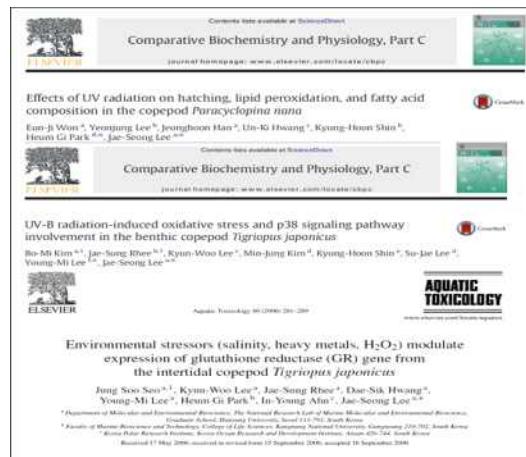


Fig. 3-132. 요각류에서의 자외선 및 염분에 따른 영향 연구 논문

남극의 염분은 계절별로 평균 34psu 으로 나타나며 큰 변화가 없다 (Fig. 3-133).

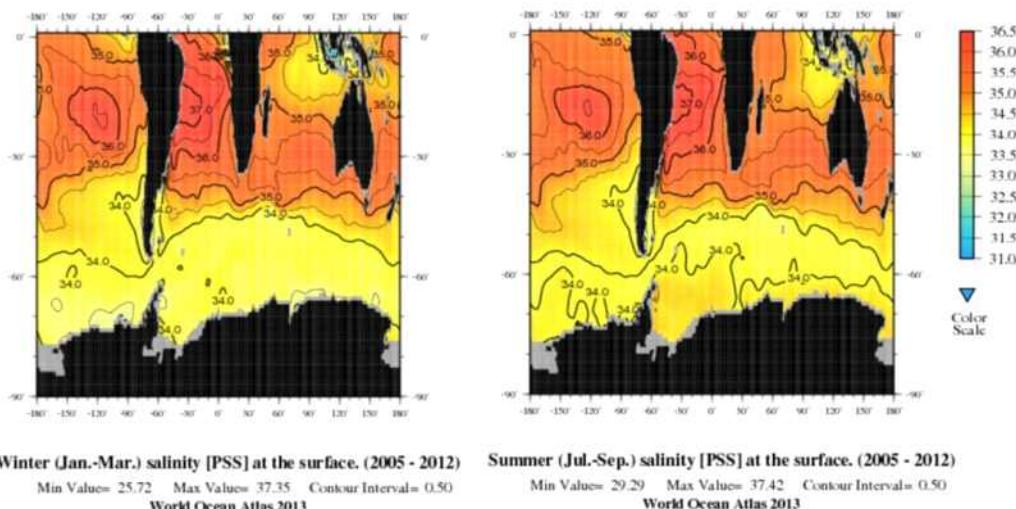


Fig. 3-133. 남빙해 계절별 염분도(NODC; <http://www.nodc.noaa.gov/>)

하지만 요각류 생활사를 고려한 해빙이 녹으면서 일어나는 다양한 염분변화에 따른 영향을 고려하여 34psu 이하의 조건에서의 영향을 확인한다. 남극해의 자외선은 오존층의 영향으로 다른 지역에 비해 매우 높은 것으로 보고되고 있으며, 향후 기후 변화로 인해 자외선의 증가 할 것으로 예측되고 있다 (Fig. 3-134). 따라서 이를 고려하여 극지요각류 자외선 노출 값을 선정하여 EC<sub>50</sub> 값을 구하고, 이에 따른 영향을 관찰한다. 수조의 수온 및 염분은 매일 측정하여 그 변화를 점검하며 8°C, 32psu을 유지하고, 실험기간 동안 먹이 급여는 하지 않는다.

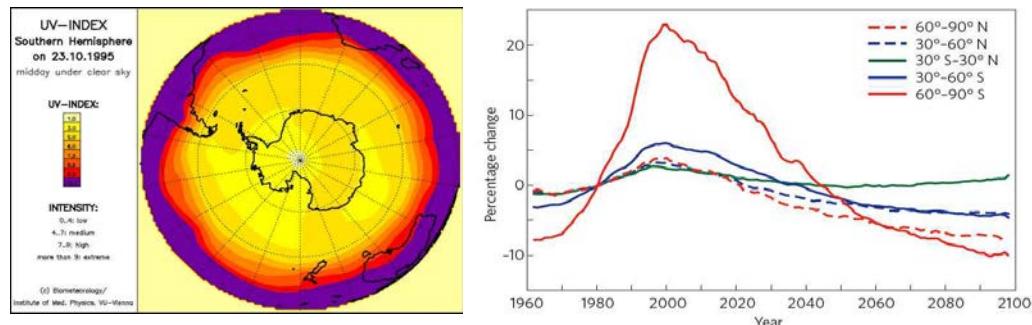


Fig. 3-134. 남극지역 UV-index 및 기후변화를 고려한 UV 변화예측도(Williamson CE et al., 2014)

(2) RNA sequencing data base를 활용한 지표 유전자군 검색

Proteome DB를 확보한 후 database 내에서 DNA replication이나 DNA-repair mechanism에 관련된 유전자의 sequence들을 선별한다. 자외선과 이들 유전자의 상관관계를 알아보기 위해 다양한 기작들에 포함된 유전자들을 선별하여 annotation을 한다. 생물체에 대한 radiation의 가장 큰 문제점이 DNA damage와 DNA mutation으로 알려져 있기에 DNA와 직접적으로 관련이 있으며, radiation에 영향을 받는 DNA 손상 관련된 유전자를 선별한다. 그 중 DNA 손상과 관련된 기작 및 유전자의 예를 정리하였다 (Fig. 3-135)..

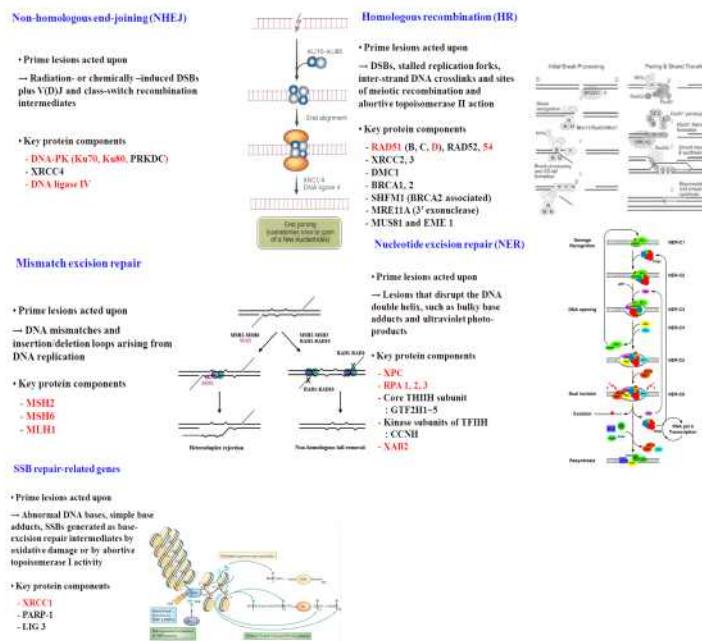


Fig. 3-135. 자외선 및 염분에 따른 영향 연구 논문

또한, Heat shock protein (*Hsp*) 은 다양한 스트레스 원으로부터 (고열, 저열, 약물, 환경오염물질, UV 등) 세포를 보호하기 위한 molecular chaperone 기능을 지닌 단백질로서, 세포가 스트레스를 받을 때 세포 내 단백질과 기관을 보호하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 Heat shock protein은 UV나 gamma irradiation에 의한 세포 내 damage를 완화시켜주는 것으로 알려져 있는데, 이에 관한 연구가 1990년대 후반부터 현재까지 진행되고 있으며, *in vivo* 또는 *in vitro* 연구에서 heat shock protein<sup>o]</sup> 세포가 받는 damage를 감소시킨다는 연구결과가 꾸준하게 논문을 통해 발표되었다. 이와 관련하여, 극지 요각류 *T.*

*kingsejongensis* 에서 총 5개의 *Hsp* 유전자 (*Hsp10*, *Hsp20*, *Hsp40*, *Hsp70*, *Hsp90*)를 확보하였다.

(3) 자외선과 염분도 변화에 따른 극지 요각류 *Tigriopus kingsejongensis*의 biomarker gene 및 단백질 분석

자외선과 염분도 변화로 인한 해독기작과 관련된 potential biomarker 유전자의 발현양상을 분석을 위하여 본 연구팀에서 수행한 바 있는 요각류 *Tigriopus japonicus*와 *Paracyclopsina nana*의 결과를 바탕으로 자외선과 염분도 대하여 time-course 및 dose-response 실험을 수행한다.

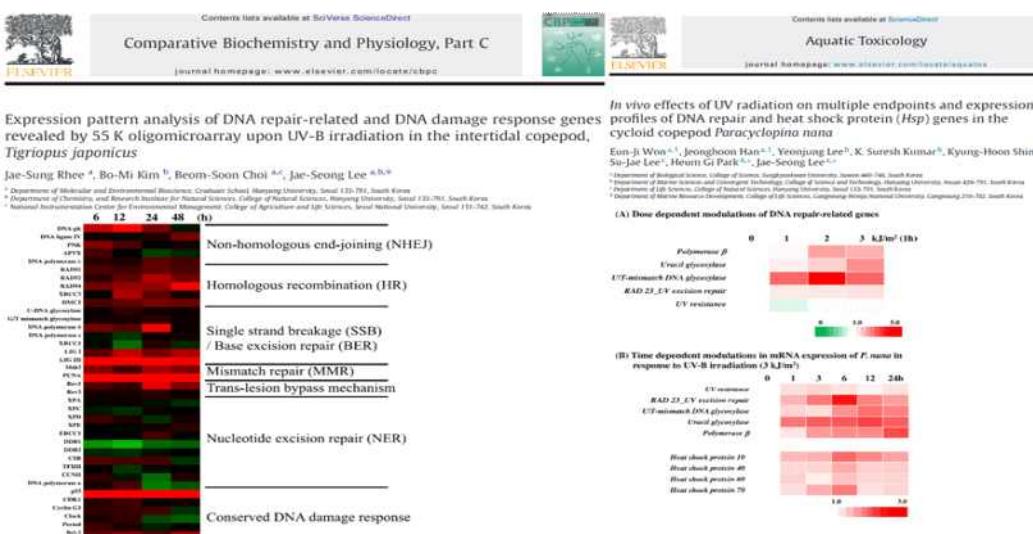


Fig. 3-136. 요각류에서의 자외선에 반응하는 유전체 연구 논문

자외선과 다양한 염분에 노출 시킨 뒤 total RNA를 추출하고, 각각의 자외선과 다양한 염분의 노출에 의한 생물체 내의 특정 유전자의 time-course 및 dose-response 영향을 측정하기 위하여 proteome 분석 및 real-time RT-PCR을 수행한다. 이를 위하여 우선적으로 각 시간대별 및 농도별로 total RNA를 추출하고 추출된 total RNA를 정량하여 각 구간별 동일 농도 당 1차 cDNA를 superscript reverse transcriptase III를 이용하여 RT를 실시한 후, real-time RT-PCR을 수행한다. 최종 데이터의 분석은  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  방법으로 하며, one-way ANOVA test와 Student's t-test를 사용하여 통계 분석을 수행한다.

## 다. 연구 결과

### (1) 자외선 변화에 따른 단백질 변화 분석

자외선 변화에 따른 단백질 변화 분석을 위해, 아래 논문의 분석 방법을 바탕으로 하

여, 극지 요각류 *T. kingsejongensis*에 12 kJ/m<sup>2</sup>의 자외선에 노출후 (Control, 0, 6, 12, 24, 48h), Proteomics 결과의 비교 연구를 위해 먼저, 자외선에 대한 극지요각류의 독성 평가와 중요 기작에 대한 유전자 발굴 및 유전자 발현 변화 실험을 실시하였다 (Fig. 3-137).

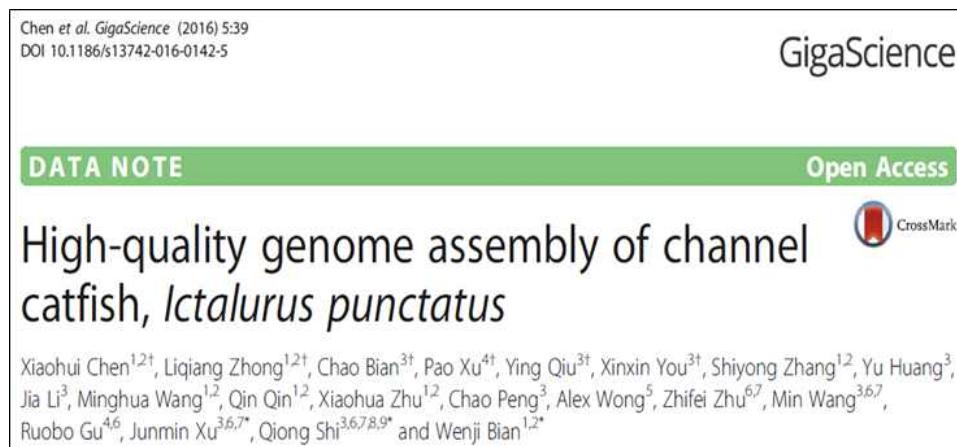


Fig. 3-137. 실험 방법 참고 논문의 예

## (2) 극지요각류에 미치는 자외선의 영향에 대한 독성검사

자외선에 대한 급성독성 실험은 극지요각류의 성체를 사용하였고, 12 wells tissue culture plate의 각 well당 4 ml의 인공 해수 내 10마리를 수용하여 32‰, 8 ± 1°C에서 생존율 및 독성영향을 조사하였다. 자외선의 노출 dose는 0, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36 kJ/m<sup>2</sup>로 설정하였으며, 급성독성실험은 노출 뒤 96시간 방치 후 광학현미경 하에서 생존유무를 확인하였다. 실험 결과는 probit분석법에 의해 LD10 및 LD50을 얻었고 Dunnett's test에 의해 NOED (no observed effect dose)를 계산하였다. 그 결과, 자외선의 노출 세기가 커질수록 *T. kingsejongensis*의 생존율이 낮아지는 것을 확인 할 수 있었으며, 유사종에서 관찰되는 자외선의 영향으로 요각류 *Tigriopus japonicus*를 이용한 노출 실험을 통해 동일한 요각류에서 보여지는 민감도의 차이를 비교 한 결과 *T. kingsejongensis*가 *T. japonicus*에 비해 낮은 dose에 대해서 치사율이 관찰되는 결과를 확인함으로써 극지 환경에서 서식하는 요각류가 자외선 노출에 대해 더 민감한 결과를 확인 할 수 있었다 (Fig. 3-138).

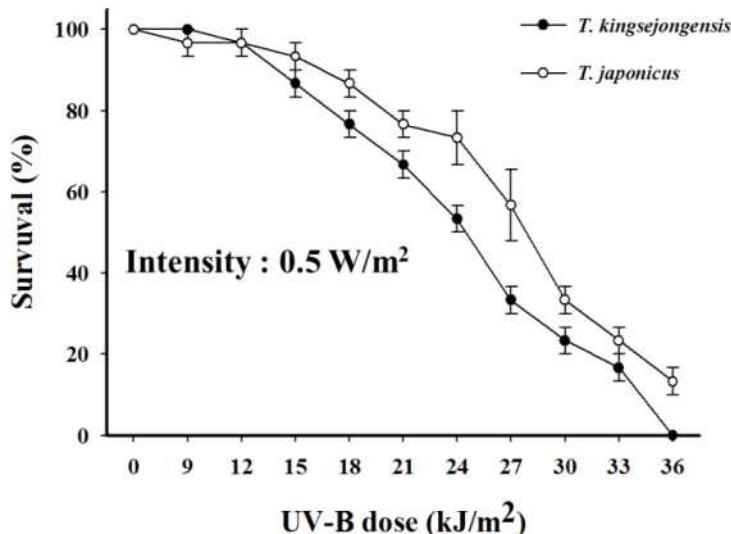


Fig. 3-138. *T. kingsejongensis*의 자외선 노출에 대한 치사율

### (3) 극지요각류의 자외선 노출에 따른 유전자 발현 변화

#### (가) 극지요각류의 자외선 노출

자외선 노출 실험에 사용한 극지요각류는 실험군 당 약 30 개체를 사용하였으며, 50 ml tube에서 자외선 12 kJ/m<sup>2</sup> 노출 후 (Control, 1, 3, 6 h)의 sample군을 수확하여 total RNA를 추출하였다.

#### (나) Total RNA 추출 및 First-stand cDNA의 합성

Total RNA 추출은 Trizol (Invitrogen)을 이용하여 제조사 manual에 따라 추출하였으며, 역전사 효소를 이용하여 first-strand cDNA를 합성하였다. 역전사 반응을 1.5시간 동안 42°C에서 최종 반응액 총량 20 μl로 하여 실시하였으며, 이때 반응액은 정제된 RNA 2 μg, 5X 반응 완충용액 (Promega, Madison, WI, USA) 4μl, dNTP (각각 2 mM) 5μl, 10 uM dT-ACAP1 (5'CTGTGAATGCTGCGACTACGAT-A(18)-3') 2 μl, RNasin® RNase Inhibitor (40 U/μl; Promega) 0.5 μl, Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (200 U/μl; Promega) 1 μl로 제조되었다. First-strand cDNA는 GeneFishingTM PCR 을 위해 80 μl의 3차 중류수로 희석한 다음, 사용 전까지 -20°C에 보관하였다.

#### (다) Real-time RT-PCR

자외선 노출에 의한 antioxidant defense mechanism 및 molecular chaperone 관련 유전자들의 발현변화를 측정하기 위하여 Real-time RT-PCR을 수행하였다. 이를 위하여

우선적으로 각 농도별 및 시간대별로 total RNA를 측정하였으며, total RNA 2  $\mu$ g을 이용하여 cDNA를 합성하였다. Real-time PCR은 Bio-Rad CFX96 multiplex real-time RT-PCR과 Bio-Rad의 MyIQ™ single color real-time RT-PCR detection system에서 수행하였으며, SYBR의 증감을 실시간으로 detection 하였다. Internal control 유전자는 18S ribosomal DNA를 이용하였고, 각 실험은 3회 반복하였다. 도출된 결과로부터 Anova 및 unpaired Student's t-test를 이용하여 유의성을 조사하였다 (Fig. 3-139).

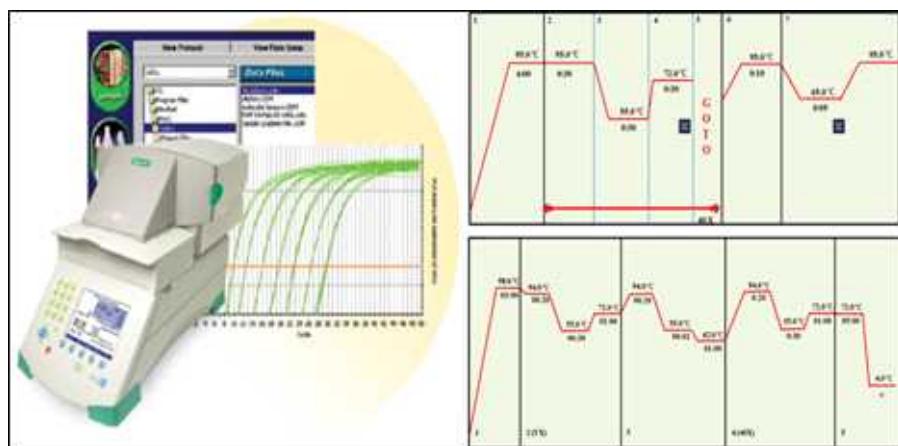


Fig. 3-139. Real-time RT-PCR

#### (라) 중요 유전자 발굴

자외선이 극지 요각류에 미치는 영향 및 적응하는 기작을 알아보기 위하여, 발현 유전체 database를 이용하여 많은 수의 biomarker 후보 유전자군을 발굴함. 관련 유전자는 요각류 *T. kingsejongensis*의 genome DB 내에서 손쉽게 그 sequence를 retrieve 할 수 있어 유전자군을 확보하였다.

Radiation에 의한 세포 내 ROS (reactive oxygen species) 생성이나 oxidative stress 발생에 관한 연구는 최근에 들어서 세포나 어류의 조직 등을 이용해 ROS를 측정하는 수준에 있다. 대부분의 연구 결과는 radiation에 의해 ROS가 생성되며, 이들이 oxidative stress를 일으켜 antioxidant defense mechanism을 유도한다고 보고하였으나, 명확하게 radiation에 의해 ROS가 직접적으로 생성되는 것을 증명한 연구 보고는 미미하다. 따라서 본 연구진은 극지요각류에 자외선 stress를 가한 후 antioxidant defense mechanism에 관련된 유전자들의 mRNA 발현을 확인하여 자외선 노출에 의한 oxidative stress 유발을 확인하였다. 그 결과, 전반적으로 자외선 12 kJ/m<sup>2</sup>에 노출시켰을 때, 대부분의 oxidative stress 관련 유전자들의 발현이 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 3-140).

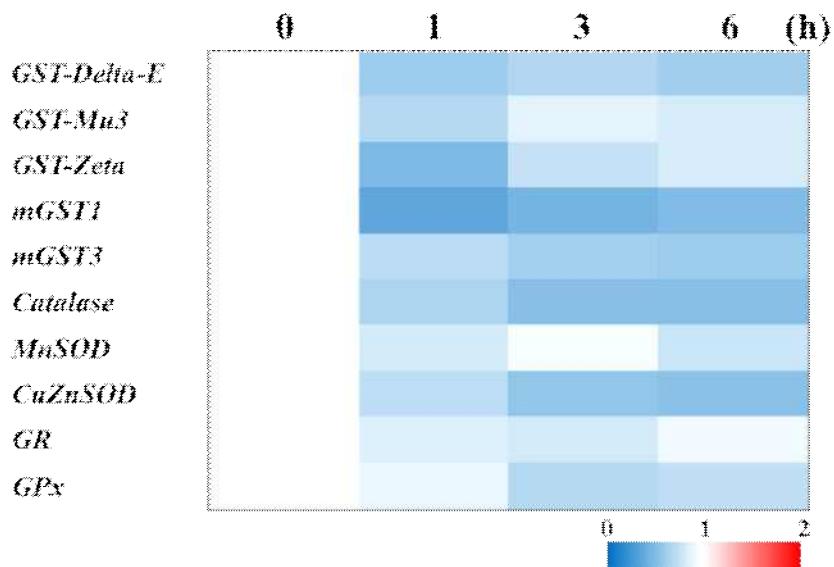


Fig. 3-140. 산화스트레스 관련 유전자들의 mRNA 발현양상 분석

Heat shock protein은 다양한 스트레스 원으로부터 (고열, 저열, 약물, 환경오염물질, UV 등) 세포를 보호하기 위한 molecular chaperone 기능을 지닌 단백질로서, 세포가 스트레스를 받을 때 세포 내 단백질과 기관을 보호하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 Heat shock protein은 UV나 gamma irradiation에 의한 세포 내 damage를 완화시켜주는 것으로 알려져 있는데, 이에 관한 연구가 1990년대 후반부터 현재까지 진행되고 있으며, *in vivo* 또는 *in vitro* 연구에서 heat shock protein이 세포가 받는 damage를 감소시킨다는 연구결과가 꾸준하게 논문을 통해 발표되었다. Molecular chaperone 및 cell stress 관련 유전자들은 Heat shock protein family을 대상으로 하였으며, 자외선 12 kJ/m<sup>2</sup>의 dose에 노출시킨 뒤 시간대별 (control, 1, 3, 6 h) mRNA의 발현변화를 측정하였다. 자외선 12 kJ/m<sup>2</sup>의 dose에 노출시켰을 때, 작은 분자량의 heat shock protein (hsp10, hsp20)들을 제외하고 발현 빈도가 낮은 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3-141). 이 결과를 통해 자외선 노출에 의한 극지요각류의 세포 내 단백질들에 데미지가 일어날 수 있다는 것을 간접적으로 알 수 있었으며, 자외선 노출에 의해 생성된 데미지로부터 세포 내 단백질이나 소기관을 보호하기 위해 heat shock protein들의 발현이 증가하였음을 유추할 수 있었다. 또한 발현양상 결과를 바탕으로 극지요각류 heat shock protein들이 자외선 영향에 대한 potential biomarker로 사용될 수 있으리라 사료된다.

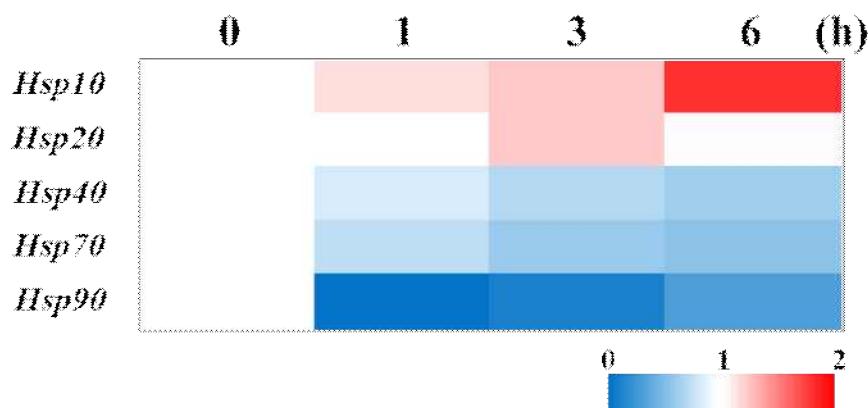


Fig. 3-141. Heat shock protein 유전자들의 mRNA 발현 양상 분석

## (마) 극지 요각류의 자외선 노출에 의한 항산화효소 변화

## ① 극지요각류의 자외선 노출

자외선 노출 실험에 사용한 극지요각류는 실험군 당 약 30 개체를 사용하였으며, 50 ml tube에서 자외선 12 kJ/m<sup>2</sup> 노출 후 (Control, 1, 3, 6 h)의 sample군을 수확하여 ROS 및 항산화 효소 활성을 측정하였다.

## ② ROS 및 효소 활성 분석

2'7'-dichlorodihydro- fluorescein diacetate (H2DCFDA, molecular probes, Eugene, OR, USA) method를 이용하였다. 이는 세포내 ROS level을 측정을 가장 정확하고 빠르게 정량화 할 수 있는 가장 보편적인 방법으로 형광 probe인 H2DCFDA가 ROS 의해 DCF로 산화되면서 형광을 내는 원리를 이용한 방법이다. 자외선에 노출 시킨 극지요각류를 균질화 buffer (0.32mM sucrose, 20mM HEPES, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM PMSF (pH 7.4))를 넣고 테프론 균질기를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 균질화 된 용액은 4°C에서 20분 동안 10,000g로 원심분리하고, 상등액을 취하여 96-well black plate에 PBS(phosphate-buffered saline) buffer, 시료(원심분리 후 분리해 낸 상등액) 그리고 최종농도가 40μM이 되도록 형광물질(H2DCFDA)을 넣어 200μl로 맞춘 후 37°C에서 5분 동안 배양 후 3회 반복실험을 통해 결과를 얻었다. 형광(DCF)측정은 여기 파장 485nm, 방출파장 520nm에서 형광분광기(ThermoTM VARIOSKAN FLASH)를 이용하여 측정하였다. ROS level은 DCF의 형광 %로 나타내었다. 항산화 효소 활성은 Superoxide dismutase (SOD; EC 1.11.1.9) assay kit and Glutathione Peroxidase cellular activity assay kit (GPx; EC 1.11.1.9) (Sigma - Aldrich Co)를 사용하여 측정하였다. 시료 내의 총 단백질은 균질화된 상등액을 취하여 Bradford 방법

을 따라 측정하였으며, standard는 BSA(bovine serum albumin)를 사용하였다 (Bradford, 1976).

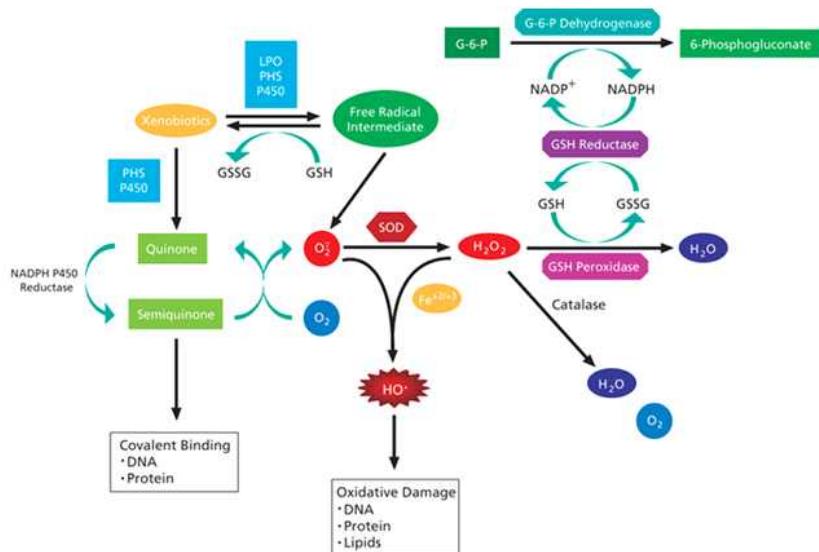


Fig. 3-142. 항산화 방어기작 모식도

환경오염 및 환경스트레스 노출에 대한 체내 활성산소종과 항산화효소 활성의 증가는 이미 다양한 생물 및 농도에 대해서 확인된 바 있는 개체 및 세포 영향 연구의 지표로 활용되어 왔다 (Fig. 3-142). 윤충류 *Brachionus koreanus*에서의 자외선 노출에 대한 활성산소종(ROS)의 증가와 이를 방어하기 위한 기작으로의 효소의 활성도 증가(Kim et al., 2013), 유류 추출물에 노출된 요각류 *Tigriopus japonicus*의 활성산소종의 증가와 함께 관찰되는 개체 수준에서의 성장 저해 (Han et al., 2014)의 결과를 통해 ROS의 세포 내 활성도 역시 민감한 생리지표로서 활용될 수 있음이 발표된 바 있다. 자외선 노출에 의해 노출에 의해 극지요각류 *T. kingsejongensis*의 활성 산소종과 항산화 방어기작으로의 항산화효소들이 증가하는 것을 알 수 있다 (Fig. 3-143). 이와 같은 결과는 자외선 노출에 의해 산화스트레스와 이를 방어하기 위한 세포내 항산화 효소의 활성을 유도하는 것으로 볼 수 있다.

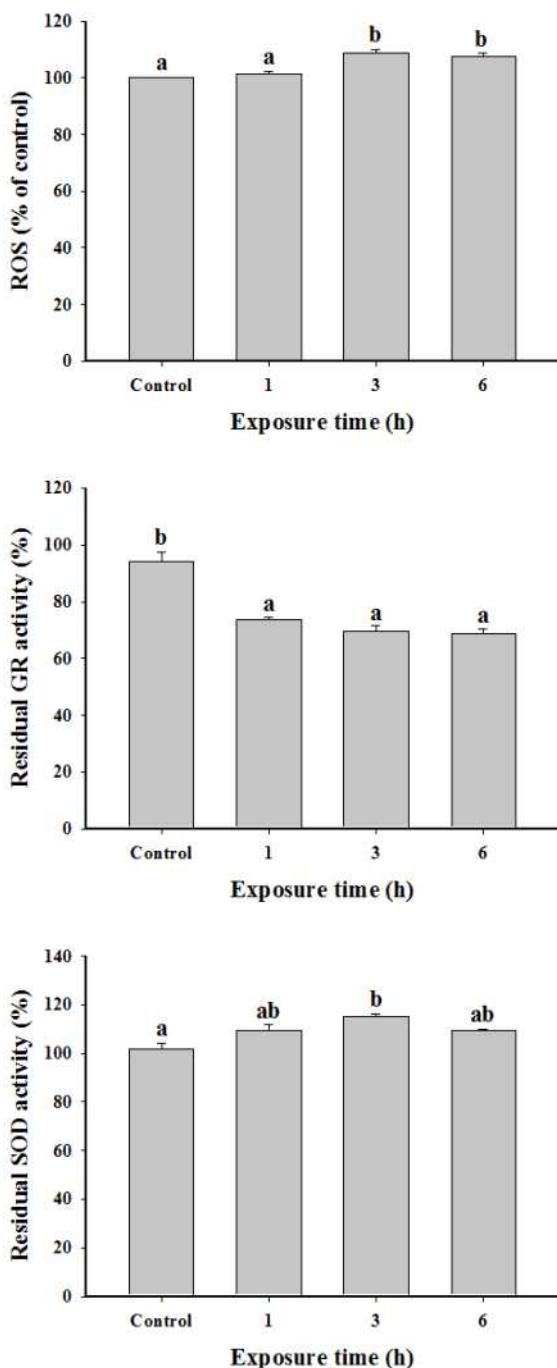


Fig. 3-143. 활성산소종 및 황산화 효소 활성 분석

#### 라. 결론 및 제언

자외선변화에 의한 극지요각류에서의 급성독성 영향과 분자적수준에서의 Stress response 및 antioxidant defense 기작과 관련하여 극지요각류 *T. kingsejongensis*에서 glutathione S-transferase family (GST $\Delta$ -E1, GST-Mu3, GST-Zeta, mGST1, mGST3) Catalase, MnSOD, CuZnSOD, glutathione reductase, glutathione peroxidase와 heat shock proteins (hsp10, hsp20, hsp40, hsp70, hsp90)를 확보 및 자외선에 반응하는 기작을 분석하고, 이 결과를 통해 국제 학회지 Marine Ecology Progress Series에 논문 1편

을 출판하였다 (Fig. 3-144).

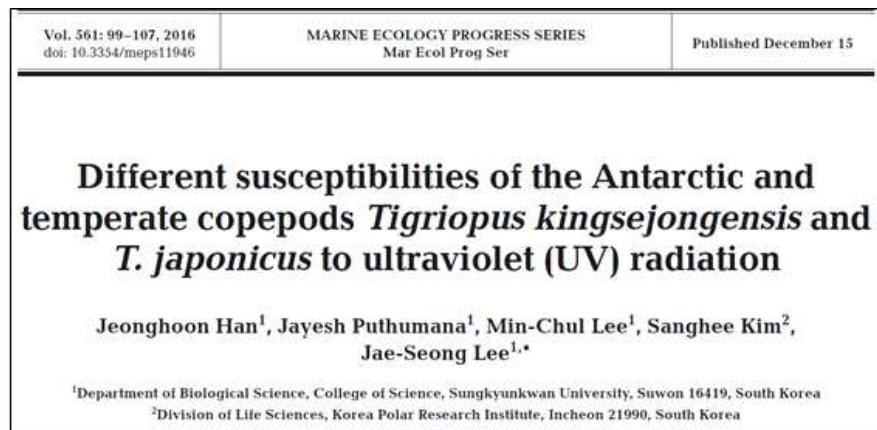


Fig. 3-144. 극지 요각류의 자외선 노출에 대한 영향연구 논문

## 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

### 제1절 연구개발목표 달성도

총연구기간내 연차별 목표 대비 달성을(%)					
구분	연차별 달성내용			연차별 계획대비 연구실적 달성을(B) (%)	
	세부연구목표	연구내용	가중치 (A)	달성실적	
1년차 (2016)	1. 극지 고유생물 유래 대사체 확보	1-1. 남극 로스해 해양생물 추출물 확보	0.1	· 154점 추출물 및 진균 추출물 52점 확보	100
		1-2. 극지 고유생물 유래 MS-라이브러리 확보	0.1	· 600개 라이브러리 정보 입력 완료	100
		1-3. 대사체 분석 및 구조 규명	0.1	· <i>Preussia</i> sp. 유래 대사체 7종 구조 결정 · 진균 유래 대사체 3종 구조 분석 완료	100
	2. 유용 대사체 활용화 기반연구	2-1. 신규 대사체 유용성 확보	0.1	· 극지 생물 유래 대사체의 항아토피, 항암 활성 조사 · 항염증/세포보호 성분 작용기전 규명	100
		2-2. 저온성 단백질분해효소 P66의 대량생산 시스템 확보	0.15	· 생산원료단가 1/4수준으로 절감	100
		2-3. 항동결물질 p-CY01의 줄기세포 동결보존 기작 규명	0.15	· p-CY01의 동결보존 기작 규명: dehydration 및 icecrystal growth inhibition 등 다각적인 활성 검증	100
		2-4. 항치매치료제 라말린의 치매억제 기작 규명	0.15	· 라말린의 HDAC6 저해시 나타나는 TNF-α 분비감소 효과, Tubulin 탈인산화 감소, Mitochondria movement 개선 효과 확인	100
		2-5. 리파아제 효소 발굴	0.05	· 극지 미생물 유래 리파아제 LipBL를 생산하는 형질전환 대장균 제조 (활성 923 U/mL)	100
		2-6. 유용 미생물 분리 및 활성 검증	0.05	· 모델링을 통한 EPS 생산 최적화 및 붉은 산호 공생미생물 56점 확보	100
		2-7. 극지 요각류 단백질체 기작 규명	0.05	· 극지요각류의 자외선 변화에 따른 독성 평가 및 단백체 변화 분석	100
	계		1.0		100

## 제2절 대외기여도

본 연구 수행결과 (1) 극지생물 유래 미생물 SF6796V로부터 분리한 대사체의 항염증 활성 규명 (2) 저온성 단백질 분해효소 P66의 대량생산 시스템 확보 (3) 항동결물질 p-CY01의 줄기세포 동결보존 기작 규명의 우수한 연구 성과를 얻었다.

1. 극지생물 유래 미생물 SF6796V로부터 분리한 대사체의 항염증 활성 규명																																														
성과 내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 극지생물 유래 미생물 SF6796V로부터 분리한 화합물 가운데 구조가 확인된 6796V-53 외 2 종의 대사체의 다양한 생리 활성을 검색하였음. 그 결과 6796V-53은 항염 효과가 우수하게 나타났으며, 뇌에 존재하는 면역세포인 미세아교세포(microglia)에서 항염증 관련 기전 연구를 수행하였음.</li> <li>○ 6796V-53 (compound 1), 6796V-552-1-2 (compound 2), 6796V-552-4 (compound 3)가 BV2 세포에서 HO-1의 과발현에 관여하는지 실험한 결과 6796V-53 (compound 1)에서 농도 의존적으로 HO-1 단백질을 과발현시키는 것을 확인함.</li> <li>○ 6796V-53 (compound 1)는 BV2 세포에서 HO-1의 발현을 조절하는 것으로 알려진 상위 전사인자인 nuclear translocation of nuclear transcription factor-E2-related factor 2 (Nrf2)를 핵 내로 전사시키는 효과가 있었음.</li> <li>○ 6796V-53 (compound 1)는 BV2 세포에서 HO-1의 발현을 조절하는 것으로 알려진 상위 신호전달 경로인 MAPK 경로 중 p38 단백질의 인산화에 관여하는 것을 확인함.</li> <li>○ 6796V-53 (compound 1)는 BV2 세포에서 LPS로 유발한 nitrite와 PGE2 생성을 현저하게 감소시키는 효과가 있었음. 또한 LPS로 유발된 iNOS와 COX-2 단백질의 발현을 감소시켰음.</li> <li>○ 6796V-53 (compound 1)는 항염증 효과 기전을 탐색하기 위하여 다음 연구를 진행하였음. 먼저 iNOS, COX-2 발현을 시키는 상위 signal에 해당되는 nuclear factor κB (NF-κB) pathways를 억제하는 효과가 있었음.</li> <li>○ 6796V-53 (compound 1)의 HO-1에 의한 항염증 효과를 확인하기 위해서 HO의 활성 억제제인 SnPP를 전처리 시에 6796V-53 (compound 1)에 의한 항염증 효과가 역전되는 것을 확인하여 HO-1의 발현이 6796V-53 (compound 1)의 항염증 효과에 관여할 것으로 예상함.</li> </ul>																																													
성과의 우수성	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 6796V-53 (compound 1)이 마우스 microglial 유래의 BV2 세포에서 MAPK, NF-κB 경로를 억제함으로써 우수한 항염증 활성을 갖는다는 것을 확인하였고, PI3K/Akt와 Nrf2 기전을 통한 HO-1의 발현이 항염증 활성에 관여하는 것도 밝혀 낼 수 있었음. 또한 쥐의 뇌에서 분리한 미세아교세포의 초대 배양 세포에서 HO-1의 발현도 확인하여 HO-1에 의한 항염증 활성이 미세아교세포의 초대 배양 세포에서도 작용할 수 있음을 제시하였다.</li> </ul>																																													
<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">CoPP (10 μM)</th> <th style="text-align: center;">-</th> <th style="text-align: center;">+</th> <th style="text-align: center;">-</th> </tr> <tr> <th style="text-align: left;">1 (μM)</th> <th style="text-align: center;">-</th> <th style="text-align: center;">-</th> <th style="text-align: center;">1.25</th> <th style="text-align: center;">2.5</th> <th style="text-align: center;">5</th> <th style="text-align: center;">10</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: left;">HO-1</td> <td style="text-align: center;"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: left;"></td> <td style="text-align: center;">1.00</td> <td style="text-align: center;">7.34</td> <td style="text-align: center;">1.29</td> <td style="text-align: center;">1.31</td> <td style="text-align: center;">1.66</td> <td style="text-align: center;">2.20</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: left;">Actin</td> <td style="text-align: center;"></td> </tr> </tbody> </table>							CoPP (10 μM)	-	+	-	-	-	-	-	1 (μM)	-	-	1.25	2.5	5	10		HO-1									1.00	7.34	1.29	1.31	1.66	2.20		Actin							
CoPP (10 μM)	-	+	-	-	-	-	-																																							
1 (μM)	-	-	1.25	2.5	5	10																																								
HO-1																																														
	1.00	7.34	1.29	1.31	1.66	2.20																																								
Actin																																														

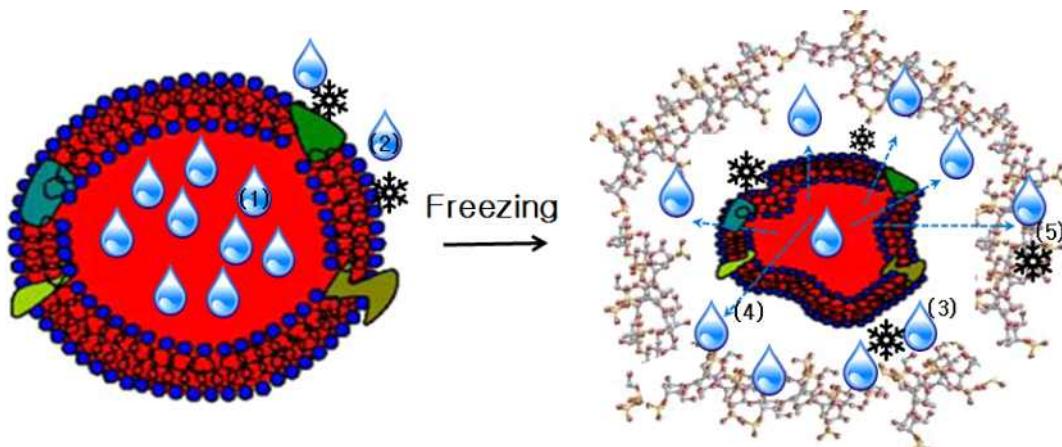
Effects of compound 1 on expression of HO-1 protein in primary microglia cells.

## 2. 저온성 단백질 분해효소 P66의 대량생산 시스템 확보

<p><b>성과 내용</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ P66 inclusion body 대량생산 시스템 구축 IPTG가 첨가된 시점부터 P66 inclusion body(최종 140g/L)를 생산함. 기존의 LB 배지 배양에서 1.2-1.4g/L 생산을 감안하면, 약 10배의 생산증가가 이루어진 것을 확인함</li> <li>○ P66 농축 시스템 개발 Reframing이 완료된 P66 용액을 glass fiber membrane (막 면적=0.0155m<sup>2</sup>; cut-off size=5kDa)으로 농축한 결과 P66은 약 91%의 회수율로 15배 농축(부피 당 활성 13배 증가)되었으며, 10LHM 기준으로 약 50배 농축(9시간 소요)이 가능한 것으로 산출되었음</li> </ul>
<p><b>성과의 우수성</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ P66 대량생산 시스템 제안 비활성 P66 inclusion body 생산량 증대 및 회수 방법 개선, refolding된 단백질의 농축 방법을 구축한 것을 종합하여 효율적인 P66 대량생산 시스템을 확보하였으며, P66 생산 g 당 단가를 3,823원에서 838원으로 절감하였음</li> </ul>
<p>P66 대량생산 공정 제안</p>

### 3. 항동결물질 p-CY01의 줄기세포 동결보존 기작 규명

<p><b>성과 내용</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 항동결 특성을 가진 p-CY01 폴리머의 저분자 제형인 p-CY01 LM의 동결보존 기작규명을 위하여 다양한 분석을 실시 함.</li> <li>- 일반적으로 항동결 단백질(Antifreezing protein)의 동결보존 기작으로 알려진 IRI(icecrystal growth inhibition) activity를 측정한 결과 2.5%(W/V)의 p-CY01 LM이 처리 된 실험구의 single ice-crystal의 성장이 억제되는 것을 확인 함.</li> <li>- IRI(icecrystal growth inhibition) activity는 항동결 단백질이 Ice-intraction 했을 때 나타나는 현상으로서 일반적인 세포보호형 동결보호제로 사용되는 바이오플리머에서는 알려져 있지 않은 현상이다. 따라서 p-CY01 LM의 경우 매우 독특한 동결보존 기작을 가지고 있으며 이러한 특징이 적혈구의 냉동보존에 중요한 역할을 할 것으로 예상 됨.</li> <li>- Hydroxyethylstarch(HES)와 같은 폴리머와 각종 이당류 및 단당류들은 세포의 동결과정에서 extracellular membrane과 결합하여 cell을 Dehydration 시켜 cell이 과도하게 팽윤되어 lysis가 일어나는 것을 방지하거나 osmotic shock을 완화시키는 것으로 알려져 있다. p-CY01 LM이 이러한 특성을 가지는지 확인하고자 Red blood cell(RBC)을 모델로 하여 실험을 실시하였고 cell morphology를 관찰한 결과 우수한 Dehydration effect를 가지는 것을 확인 함.</li> </ul>	<p><b>성과의 우수성</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ p-CY01 LM 폴리머의 동결보존 기작은 일반적인 다당류가 가질 것으로 예측되는 dehydration 하나의 메카니즘에 의존하지 않고 항동결 단백질의 동결보존 기작인 IRI에 의한 역할도 하는 것으로 확인하였음. 즉, p-CY01 LM의 세포에 대한 동결보존 기작은 multi-functional한 특성을 가지는 것으로 예측됨.</li> </ul>
---	--



p-CY01 LM 폴리머의 동결보존 기작

## 제 5 장 연구개발 결과 활용 계획

세계적으로 생명자원 확보경쟁이 치열해지는 상황에서 극지생물자원의 확보 및 보존  $\Leftrightarrow$  가치 발굴 및 정보화  $\Leftrightarrow$  활용 및 산업화의 운영체계 구축”이라는 극지생명자원의 선순환 구조를 위한 거시적 단계를 촉진시키는 촉매의 역할을 할 것으로 기대된다. 극지 유래 생물의 대사체 분석 결과를 통해 대사체를 미리 예측하여 신규 물질 또는 유용 활성 물질을 탐색하여 효용성 높은 균주를 선택하는데 도움을 주며, 추후 극지 생물 분리 정제 연구를 위한 발판으로 활용이 가능하다. 또한 극지 생물 자원들의 연구를 위한 기초 자료로써 기여한다.

- 극지 생물자원의 분리 및 보존을 통하여 다양한 국내외 연구팀 및 연구분야의 정보를 제공함으로서 생명공학연구를 활성화한다.
- 추출물의 확보 및 생리활성검색의 DB화를 통하여 기초연구 및 산업화 연구개발기간 단축, 연구비용 절감 등을 위한 극적인 효과를 제공한다.
- 공동연구팀과의 연계를 통하여 대사체의 생리활성을 기초로 하여 미지의 생명현상 규명 또는 질병현상 규명과 관련된 연구 분야에 chemical probe 으로도 활용이 가능하다.
  - 공동연구팀과의 질병현상규명 및 산업화 연계를 진행 중
- 새로운 물질의 제조나 생산에 대한 관련 특허의 확보가 가능하여 물질특허 외에도 이의 활용도 가능하다.
- 국내에서 최종 상품화에 성공하면 관련 식품의약산업이나 제약산업의 성장과 활성화에 획기적인 전기를 마련할 수 있다.
- 최종 상업화에 성공하는 경우는 앞서 기술한 연구의 필요성 중 경제 산업적 측면에서 밝힌 구체적인 시장성을 감안하여 국내시장 및 수출에 의한 상당한 경제적 가치를 창출 할 수 있다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

세계 의약품 산업은 전 세계적으로 어려운 경제상황에도 불구하고 꾸준히 성장하고 있는데 미국은 지속적으로 높은 성장세를 나타내었으며 유럽과 아시아 역시 높은 성장률을 기록하였다. 현재 제약업계의 동향은 합성 의약품에서 이제는 근본적인 유전적 요인을 이용한 바이오 의약품이나 식물과 같은 천연물 원료를 이용한 의약품들이 주목받고 있다.

특히 새로운 사이토카인의 발견과 기능규명, 면역억제제, 백신의 개발이 두드러진다. 특히 면역억제제에 대하여는 현재 장기이식거부반응과 자가 면역질환을 치료할 수 있는 대표적인 면역억제제는 전 세계적으로 스위스의 노바티스사가 만든 사이클로스포린 A가 가장 많이 사용되고 있고, 일본의 후지사와 Fujisawa사가 만든 FK506이 다음으로 많이 사용되고 있다. 그러나, 기존의 약물들은 부작용이 많아 다국적 제약회사들은 면역억제효과를 가지는 치료용 항체의 실용화에 박차를 가하고 있다. 관절염의 경우 이미 많은 치료제들이 시판되고 상용되어지고 있다. 현재 TNF 길항제 (휴미라, 레미케이드, 엔브렐), IL-1 수용체 길항제 (악템라), 항 IL-6 제제, Rituximab CTLA-5 Ig 등을 류마티스 관절염 치료에 시도하고 있다. 최근에는 이 밖에 다양한 항체 치료제들이 개발되고 있다.

비만 및 비만으로 유발되는 다양한 합병증들에 관한 위험성 문제는 전 세계적으로 관심의 대상이 되고 있지만, 효과적인 비만치료제 개발은 미비한 상태이다. 비만치료제로서 에너지 흡수 감소 약물 (Amphetamines, Rimonabant, Sibutramine 및 Orlistat) 등이 사용되었으나 부작용이 심해 시판을 중단하였고 Orlistat가 미국에서 장기요법으로 허가 받은 유일한 비만 치료제이며 이 약물 또한 위장관 심장의 부작용으로 인하여 제한적으로 사용되고 있다. 최근 미국 FDA는 Belvig (Locaserin)과 Qsymia (Phentermine + Toiramide)라는 2개의 새로운 식욕 억제제를 허가하였다. 에너지 소모증가 약물로서 전임상 단계에 있는 Ember 사의 Irisin 관련 웨타이드, Zafgen사의 Belorinib과 MD Anderson 암센터에서 개발 중인 합성 웨타이드인 Adipotide, Obetat에서 개발 중인 웨타이드인 GST-TatdMt 등이 있다. 이밖에 기존의 약물작용과는 새로운 작용기전을 갖는 약물들이 개발되고 있다.

동맥경화 또는 고지혈증의 예방 및 치료제인 스타틴계 약물, 피브레이트계 약물 등 고지혈증 치료제는 아직까지 다국적 제약기업들이 신약 개발 등으로 관련 치료제 시장을 주도하고 있다. 제품 개발에 어려움을 겪는 국내 기업들은 심혈관계 질환에 대한 인지도를 제고시켜 시장을 확대하기 위해 외국 제약사와 라이선스 계약을 체결하거나, 특히 만료 제품 출시를 통해 경쟁하고 있는 실정이다.

## 제 7 장 참고문헌

- Aalberse Rob C. 1996. Atopy and the ectopic immune response. *Immunology & Cell Biology* Vol. 74 Issue 2, 201–205.
- Acuna UM, Atha DE, Ma J, Nee MH, Kennelly EJ. 2002. Antioxidant capacities of ten edible North American plants. *Phytother Res* 16, 63–65.
- Ailhaud G, Grimaldi P, Negrel R. 1992. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr* 12, 207–233.
- Altschul SF, Miller GW, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Ando I, Tsukumo Y, Wakabayashi T, Akashi S, Miyake K, Kataoka T, Nagai K. 2002. Safflower polysaccharides activate the transcription factor NF- $\kappa$ B via Toll-like receptor 4 and induce cytokine production by macrophages. *Int Immunopharmacol*. 2, 1155–1162.
- Angle SR, Kim M. 2007. A general approach to 3-n-butyl-5-alkylindolizidines: total synthesis of (–)-indolizidine 195B. *The Journal of organic chemistry*, 72(23), 8791–8796.
- Antranikian G, Egorova K. 2007. Extremophiles, a unique resource of biocatalysts for industrial biotechnology, pp. 361–406. In Gerday C and Glansdorff N (eds.), *Physiology and biochemistry of extremophiles*. ASM Press, Washington, D.C., USA.
- Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, Munro MH, Prinsep MR. 2014. Marine natural products. *Nat Prod Rep.* 31(2), 160–258.
- Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, Munro MH, Prinsep MR. 2015. Marine natural products. *Nat Prod Rep.* 32(2); 116–211.
- Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, Munro MH, Prinsep MR. 2016. Marine natural products. *Nat Prod Rep.* 33(3); 382–431.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-gram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 7, 248–254.
- Cavicchioli R, Siddiqui KS, Andrews D, Sowers KR. 2002. Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr Opin Biotechnol* 13, 253–261.
- Chen XL, Xie BB, Lu JT, He HL, Zhang Y. 2007. A novel type of subtilase from the psychrotolerant bacterium *Pseudoalteromonas* sp. SM9913: catalytic and structural properties of desein MCP-01. *Microbiology* 153, 2116–2125.
- Chen SH, Farina V, Vyas DM, Doyle TW, Long BH, Fairchild C. 1996. Synthesis and Biological Evaluation of C-13 Amide-Linked Paclitaxel (Taxol $\ddagger$ ) Analogs. *The Journal of Organic Chemistry*, 61(6), 2065–2070.
- Cheung RC, Ng TB, Wong JH, Chen Y, Chan WY. 2016. Marine natural products with

- anti-inflammatory activity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 100(4), 1645–1666.
- Cho SJ, Kang NS, Park SY, Kim BO, Rhee DK, Pyo S. 2003. Induction of apoptosis and expression of apoptosis related genes in human epithelial carcinoma cells by *Helicobacter pylori* VacA toxin. *Toxicon* 42(6), 601–11.
- Choi HS, Yim JH, Lee HK, Pyo S. 2009. Immunomodulatory effects of polar lichens on the function of macrophages in vitro. *Mar Biotechnol (NY)*. 11(1), 90–98.
- Cragg GM, Newman DJ. 2013. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1830(6), 3670–3695.
- Cutignano A, Moles J, Avila C, Fontana A. 2015. Granuloside, A Unique Linear Homosesterterpene from the Antarctic Nudibranch *Charcotia granulosa*. *J Nat Prod.* 78(7), 1761–1764.
- Deretic V. 2006. Autophagy as an immune defense mechanism. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 375–382.
- Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. 1988, Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen inter mediates from mouse peritoneal macrophages. Comparision of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol.* 141, 2407–2412
- Perez D, Martin S, Fernandez-Lorente G, Filice M, Guisan JM, Ventosa A, Teresa Garcia M, Mellado E. 2011. A Novel halophilic lipase, LipBL, showing high efficiency in the production of eicosapentaenoic acid (EPA). *PLoS ONE* 6 (8) e23325.
- Perez D, Kovacic F, Wilhelm S, Jaeger KE, Teresa Garcia M, Ventosa A, Mellado E. 2012. Identification of amino acids involved in the hydrolytic activity of lipase LipBL from Marinobacter lipolyticus. *Microbiology* 158, 2192 - 2203.
- Felsenstein J. 1985. confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791
- Felsenstein J. 1993. PHYLIP (phylogenetic interference package), version 3.2. University of Washington, Seattle.
- Figueroa L, Jimenez C, Rodriguez J, Areche C, Chavez R, Henriquez M, de la Cruz M, Diaz C, Segade Y, Vaca I. 2015. 3-Nitroasterric Acid Derivatives from an Antarctic Sponge-Derived *Pseudogymnoascus* sp. Fungus. *J Nat Prod.* 78(4), 919–923.
- Fuller BJ. 2004. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *CryoLetters* 25, 375–388.
- Garand View Research Group 2016. Enzymes Market By Type (Industrial, Specialty), By product (carbohydrases, proteases, lipases, polymerases & nucleases), by application (food & beverages, detergents, animal feed, textile, paper & pulp, nutraceutical, personal care & cosmetics, wastewater, research & biotechnology, diagnostics, biocatalyst) and segment forecasts to 2024. Report ID: 978-1-68038-022-4, Grand View Research, USA.
- Gerday C, Aittaleb M, Bentahir M, Chessa JP, Claverie P, Collins T, D'Amico S, Dumont J,

- Garsoux G, Georlette D. 2000. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnol* 18, 103–107.
- Gerwick WH, Fenner AM. 2013. Drug discovery from marine microbes. *Microb Ecol* 65(4), 800–806.
- Gerwick WH, Moore BS. 2012. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. *Chem Biol*. 19(1), 85–98.
- Giovannoni SJ. 1991. The polymerase chain reaction. In Stackebrandt, E. and M. Goodfellow(Ed.), *Nucleic acid technique in bacterial systematics*. pp. 177–201. John Wiley & Sons, New York.
- Godfrey T, West SI. 1996. Introduction to industrial enzymology, pp. 1–8 *In* Godfrey T and West S (2nd eds.), *Industrial Enzymology*. London: Macmillan Press.
- Gökhan S, Hotamisligil 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 444, 860–867
- Goomber S, Kumar A, Singh R, Kaur J. 2016. Point Mutation Ile137-Met Near Surface Conferred Psychrophilic Behaviour and Improved Catalytic Efficiency to *Bacillus* Lipase of 1.4 Subfamily. *Appl Biochem Biotechnol*. 178, 753–65.
- Gwak Y, Park J, Kim M, Kim HS, Kwon JK, Oh SJ, Kim Y-P, Jin E. 2015. Creating anti-icing surfaces via the direct immobilization of antifreeze proteins on aluminium. *Sci Rep* 5.
- Han J, Puthumana J, Lee MC, Kim S, Lee JS, 2016. Different susceptibilities of the Antarctic and temperate copepods *Tigriopus kingsejongensis* and *Tigriopus japonicus* to ultraviolet B (UV-B) radiation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 561, 99 - 107.
- Han J, Won EJ, Hwang DS, Shin KH, Lee YS, Leung KM, Lee SJ, Lee JS, 2014. Crude oil exposure results in oxidative stress-mediated dysfunctional development and reproduction in the copepod *Tigriopus japonicus* and modulates expression of cytochrome P450 (CYP) genes. *Aquat. Toxicol*. 152, 308–317.
- Horner R, Ackley SF, Dieckmann GS, Gulliksen B, Hoshiai T, Legendre L, Melnikov LA, Reeburgh WS, Spindler M, Sullivan CW. 1992. Ecology of sea ice biota. *Polar Bio*. 12, 417–427.
- Huh JE, Yim JH, Lee HK, Moon EY, Rhee DK, Pyo S. 2007. Prodigiosin isolated from *Hahella chejuensis* suppresses lipopolysaccharide-induced NO production by inhibiting p38 MAPK, JNK and NF- $\kappa$ B activation in murine peritoneal macrophages. *Int Immunopharmacol*. 7(13), 1825–33.
- Huston AL. 2008. Biotechnological aspects of cold-adapted enzymes, pp. 347–363. *In* Margesin R, Schinner F, Marx J, Gerday C (eds.), *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany.
- Huston AL, Methé B, Deming JW. 2004. Purification, characterization, and sequencing of an extracellular cold-active aminopeptidase produced by marine psychrophile *Colwellia psychrerythraea* strain 34H. *Appl Environ Microbiol* 70, 3321–3328.
- Institoris L, Siroki O, Desi I. 1995. Immunotoxicity study of repeated small doses of dimethoate and methylparathion administered to rats over three generations.

- Human Exp. Toxicol. 14, 879–883.
- Jakob A, Stucki S, Struis WJ. 1996. Complete heavy metal removal from fly ash by heat treatment: influence of chlorides on evaporation rates. Environmental science & technology, 30(11), 3275–3283.
- Jukes TH, Cander CR. 1969. Evolution of protein molecules. In Mammalian Protein Metabolism, Vol. 3, pp 21–132. Edited by H.N. Munro. New York: Academic Press.
- Kang SH, Joo HM, Park SI, Jung WS, Hong SS, Seo KW, Jeon MS, Choi HG, Kim HJ. 2007. Cryobiological perspectives on the cold adaptation of polar organisms. Ocean and Polar Research 29, 263–271.
- Kasana RC. 2010. Proteases from psychrotrophs: An overview. Crit Rev Microbiol 36, 134–145.
- Kasana RC, Gulati A. 2011. Cellulases from psychrophilic microorganisms: a review. J Basic Microbiol 51, 572–579.
- Kate Schroder, Rongbin Zhou, Jurg Tschopp. 2010. The NLRP3 Inflammasome: A Sensor for Metabolic Danger?. Science 327(5963), 296–300.
- Kim SJ, Yim JH. 2007. Cryoprotective properties of exopolysaccharide (P-21653) produced by the Antarctic bacterium, *Pseudoalteromonas arctica* KOPRI 21653. J Microbiol 45, 510–514.
- Kim RO, Rhee JS, Won EJ, Lee KW, Kang CM, Lee YM, Lee JS. 2011. Ultraviolet B retards growth, induces oxidative stress, and modulates DNA repair-related gene and heat shock protein gene expression in the monogonont rotifer, *Brachionus sp.* Aquat. Toxicol. 101, 529–539.
- Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC. 2002. Industrial enzyme applications. Curr Opin Biotechnol 13, 345–351.
- Klimetzek V, Remold HG. 1980. The murine bone marrow macrophage, a sensitive indicator cell for murine migration inhibitory factor and a new method for their harvest. Cell Immunol 53, 237–266
- Kulakova L, Galkin A, Kurihara T, Yoshimura T, Esaki N. 1999. Cold-active serine alkaline protease from the psychrotrophic bacterium *Shewanella* strain ac10: gene cloning and enzyme purification and characterization. Appl Environ Microbiol 65, 611–617.
- Lee CS, Robinson J, Chong MF. 2014. A review on application of flocculants in wastewater treatment. Process Saf Environ. Protect 92, 489–508.
- Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr, Libby P. 1993. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit endothelium. Arterioscler. Thromb. 13, 197–204.
- Lim YK, Lee KS, Cho CG. 2003. Novel route to azobenzenes via Pd-catalyzed coupling reactions of aryl hydrazides with aryl halides, followed by direct oxidations. Organic letters, 5(7), 979–982.
- Liu SB, Chen XL, He HL, Zhang XY, Xie BB, Yu Y, Chen B, Zhou BC, Zhang YZ. 2013.

- Structure and ecological roles of a novel exopolysaccharide from the Arctic sea ice bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain SM20310. *Appl Environ. Microbiol* 79, 224–230.
- Mand HM, Vogel SN. 1991. Measurement of mouse and human TNF: In current protocols in Immunology eds. pp6.10.1–6.10.5 Greene Publishing and Wiley-Interscience New York
- Margesin R, Schinner F. 1994. Properties of cold adapted microorganism and their potential role in biotechnology. *J Biotechnol* 33, 1–14.
- Maria de Lourdes Moreno, Dolores Perez, Maria Teresa Garcia, Encarnacion Mellado. 2013. Halophilic Bacteria as a Source of Novel Hydrolytic Enzymes. *Life* 3, 38–51.
- McCoy M. 2000. Novozymes emerges. *Chem Eng News* 19, 23–25.
- Nichols CM, Guezennec J, Bowman JP. 2005. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the southern ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents: a review. *Mar Biotechnol* 7, 253–271.
- Nichols D, Bowman J, Sanderson K, Nichols CM, Lewis T, McMeekin T, Nichols PD. 1999. Developments with Antarctic microorganisms: culture collections, bioactivity screening, taxonomy, PUFA production and cold-adapted enzymes. *Curr Opin Biotechnol* 10, 240–246.
- Nyan OA, Walraven GEL, Banya WAS, Milligan P, Van Der Sande M, Ceesay SM, Del Prete G, McAdam KPWJ. 2001. Atopy, intestinal helminth infection and total serum IgE in rural and urban adult Gambian communities, Clinical and Experimental Allergy, 31, 1672–1678.
- Pantos O, Bythell J. 2010. A novel reef coral symbiosis. *Coral Reefs*, 29(3), 761–770.
- Libby P, Ridker PM, Maseri A. 2002. Inflammation and Atherosclerosis. American Heart Association. 105, 1135–1143.
- Libby P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420(6917), 868–874 .
- Poli A, Anzelmo G, Nicolaus B. 2010. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine habitats: production, characterization and biological activities. *Mar Drugs* 8, 1779–1802.
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 597–635.
- Rasol R, Rashidah AR, Nazuha RS, Smykla J, Maznah WO, Alias SA. 2014. Psychrotrophic lipase producers from Arctic soil and sediment samples. *Pol J Microbiol*. 63, 75–82.
- Rateb ME, Ebel R. 2011. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. *Nat Prod Rep.* 28(2), 290–344.
- Roby MH, Allouche A, Dahdou L, De Castro VC, da Silva PH, Targino BN, Huguet M, Paris C, Chrétien F, Guéant RM, Desobry S, Oster T, Humeau C. 2015. Enzymatic production of bioactive docosahexaenoic acid phenolic ester. *Food Chem.* 171, 397–404.

- Roby MH, De Castro VC, Targino BN, Alves Da Silva PH, Mangavel C, Chretien F, Humeau C, Desobry S. 2015. Oxidative stability of DHA phenolic ester. *Food Chem.* 169, 41–48.
- Rohwer F, Seguritan V, Azam F, and Knowlton N. 2002. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Marine Ecology Progress Series*, 243, 1–10.
- Roullier C, Chollet-Krugler M, Van de Weghe P, Lohézic-Le Devehat F, Boustie J. 2010. A novel aryl-hydrazide from the marine lichen *Lichina pygmaea*: Isolation, synthesis of derivatives, and cytotoxicity assays. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20(15), 4582–4586.
- Russell L, Holman Henry C, McGill Jr, Jack P. 1960. Strong, Jack C.,Geer Arteriosclerosis – The Lesion. *Am. J. Clinical Nutrition*, Vol 8, 85–94.
- Shao C, Wang C, Wei M, Li S, She Z, Gu Y, Lin Y. 2008. Structural and spectral assignments of six anthraquinone derivatives from the mangrove fungus (ZSUH-36). *Magn Reson Chem.* 46(9), 886–889.
- Shendage DM, Fröhlich R, Haufe G. 2004. Highly efficient stereoconservative amidation and deamidation of α-amino acids. *Organic letters*, 6(21), 3675–3678.
- Singh P, Singh SM, Roy U. 2016. Taxonomic characterization and the bio-potential of bacteria isolated from glacier ice cores in the High Arctic. *J Basic Microbiol.* 56, 275–285.
- Stitou N, Nei M. 1987. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4, 406–425.
- Sui L, Nomura R, Dong Y, Yamaguchi F, Izumori K, Tokuda M. 2007. Cryoprotective effects of D-allose on mammalian cells. *Cryobiol* 55, 87 - 92.
- Thomas DN, Dieckmann GS. 2002. Antarctic sea ice – a habitat for extremophiles. *Science* 295, 641–644.
- Trepos R, Cervin G, Hellio C, Pavia H, Stensen W, Stensvag K, Svendsen JS, Haug T, Svenson J. 2014. Antifouling Compounds from the Sub-Arctic Ascidian *Synoicum pulmonaria*: Synoxazolidinones A and C, Pulmonarins A and B, and Synthetic Analogues. *J Nat Prod.* 77(9), 2105–2113.
- Um SH, Rhee DK, Pyo S. 2002. Involvement of protein kinase C and tyrosin kinase in tumorcidal activation of macrophage induced by *Streptoccus pneumoniae* type II capsular polysaccharide. *Int Immunopharmacol.* 2, 129–137.
- Veeken AHM, Hamelers HVM. 1999. Removal of heavy metals from sewage sludge by extraction with organic acids. *Water Science and Technology*, 40(1), 129–136.
- Rathinam VAK, Vanaja SK, Fitzgerald KA. 2012. Regulation of inflammasome signaling. *Nature Immunology* 13, 333 - 342.
- Petrilli V, Papin S, Tschoopp J. 2005. The inflammasome. *Cell* 15, R581.
- Völkert M, Koul S, Müller GH, Lehnig M, Waldmann H. 2002. Phenylhydrazide as an enzyme-labile protecting group in peptide synthesis. *The Journal of organic chemistry*, 67(20), 6902–6910.

- von Salm JL, Witowski CG, Fleeman RM, McClintock JB, Amsler CD, Shaw LN, Baker BJ. 2016. Darwinolide, a New Diterpene Scaffold That Inhibits Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Biofilm from the Antarctic Sponge *Dendrilla membranosa*. Org Lett. 18(11), 2596–2599.
- Wagner CT, Burnett MB, Livesey SA, Connor J. 2000. Red blood cell stabilization reduces the effect of cell density on recovery following cryopreservation. Cryobiol 41, 178–194.
- Wagner CT, Martowicz ML, Livesey SA, Connor J. 2002. Biochemical stabilization enhances red blood cell recovery and stability following cryopreservation. Cryobiol 45, 153–166.
- Wang J, Wei X, Qin X, Tian X, Liao L, Li K, Zhou X, Yang X, Wang F, Zhang T, Tu Z, Chen B, Liu Y. 2016. Antiviral Merosesquiterpenoids Produced by the Antarctic Fungus *Aspergillus ochraceopetaliformis* SCSIO 05702. J Nat Prod. 79(1), 59–65.
- Wang QF, Miao JL, Hou YH, Ding Y, Wang GD, Li GY. 2005. Purification and characterization of an extracellular cold-active serine protease from the psychrophilic bacterium *Colwellia* sp. NJ341. Biotechnol Lett 27, 1195–1198.
- Williams RM, Sinclair PJ, DeMong DE, Chen D, Zhai D. 2003. 4-Morpholinecarboxylic acid, 6-oxo-2, 3-diphenyl-, 1, 1-dimethylethyl ester,(2S, 3R)-. Org. Synth, 80, 18.
- Williamson CE, Brentrup JA, Zhang J, Renwick WH, Hargreaves BR, Knoll LB, Overholt EP, Rose KC. 2014. Lakes as sensors in the landscape: Optical metrics as scalable sentinel responses to climate change. Limnol. Oceanogr., 59, 840 - 850.
- Zhou H, Li L, Wang W, Che Q, Li D, Gu Q, Zhu T. 2015. Chrodrimanins I and J from the Antarctic Moss-Derived Fungus *Penicillium funiculosum* GWT2-24. J Nat Prod. 78(6), 1442–1445.
- Zhu F, Lin Y. 2007. Three xanthones from a marine-derived mangrove endophytic fungus. Chem Nat Compd. 43(2), 132–135.

## 주               의

1. 이 보고서는 극지연구소에서 수행한 기본연구사업의 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 수행한 기본연구사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여 서는 안 됩니다.