

BSPE99273-10608-4



# 해양생물로부터 항노화 바이오소재 개발 연구

A study on the development  
of anti-aging biomaterials from marine organisms

2014. 12

해양생물로부터  
항노화 바이오소재 개발 연구



## 주 의

1. 이 보고서는 한국해양과학기술원에서 수행한 주요사업의 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 한국해양과학기술원에서 수행한 주요사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용을 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.

BSPE99273-10608-4

해양생물로부터 항노화 바이오소재 개발 연구

2014. 12

한국해양과학기술원





# 해양생물로부터 항노화 바이오소재 개발 연구

A study on the development  
of anti-aging biomaterials from marine organisms

2014. 12

# 제 출 문

한국해양과학기술원장 귀하

본 보고서를 “해양생물로부터 항노화 바이오소재 개발 연구” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

2014년 12월 31일

총괄연구책임자 : 신 희 재

참 여 연 구 원 : 이희승, 이종석, 이연주,  
김지혜, 이민아, 이화선,  
Tareq, Chien Fang,  
최병규, 박승일, 이정우,  
유수정, 한샘, 유수정,  
신준호, 박솔, 이재형,  
김혜경, 정송화, 김예은

위탁연구기관명 :

위탁연구책임자 :



## 보고서 초록

과제고유 번호	BSPE99273- 10608-4	해당단계 연구기간	2012.03.01 ~ 2014.12.31	단계 구분	통합
연구사업명	중사업명	기관역량강화사업			
	세부사업명				
연구과제명	대과제명				
	세부과제명	해양생물로부터 항노화 바이오소재 개발 연구			
연구책임자	신희재	해당단계 참여연구원수	총 :     명 내부:     명 외부:     명	해당단계 연구비	정부:     천원 기업:     천원 계 :     천원
		총연구기간 참여연구원수	총 : 20 명 내부:  4 명 외부: 16 명	총 연구비	정부: 579,000 천원 기업:     천원 계 : 579,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국해양과학기술원 해외생물자원연구센터		참여기업명		
국제공동연구					
위탁연구					
요 약				보고서 면수	320쪽
<p>○ <b>해양생물의 추출물 조제 및 항노화 활성 검색</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 다양한 해양환경에서 채집/확보된 해양생물 및 해양미생물 189점에 대하여 추출물을 조제하고, 항산화 및 미백활성 등의 항노화 활성을 검색.</li> </ul> <p>○ <b>유용 생물의 선정 및 시료 확보/배양</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 10여종의 해양미생물과 10여점의 해양생물이 유의미한 항노화 활성을 보였으며, 활성을 바탕으로 유용 생물을 선정하고 이들의 시료 확보 및 대량배양 실험 진행.</li> </ul> <p>○ <b>항노화 활성을 가지는 물질의 분리 및 구조결정</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 유용 생물로 선정된 균주들로부터 신물질 30여종 분리 및 구조결정</li> <li>- 본 연구에서 분리된 신물질들을 독특한 구조를 가지고 있는 novel compound들이 많아 다양한 활성과 용도를 가질 것으로 기대됨.</li> </ul> <p>○ <b>항노화 물질 및 이들의 유도체 합성</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 항노화 작용, 미백, 보습, 발모촉진, 피부염증 억제 등의 다양한 생리활성을 가지는 판테테인과 구조적으로 유사성을 보이는 신물질에 대한 유도체들 합성.</li> </ul> <p>○ <b>대량배양을 통한 신규 물질의 대량확보 방안 연구</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Stappia sp.</i>에서 분리된 신규 crotonic acid의 dimer의 경우, crotonic acid를 배양배지에 첨가하면 이 신규 물질을 대량확보 할 수 있을 것으로 예상하였으나, crotonic acid가 이 물질의 전구체가 아닌 것으로 판단하여 유기합성법을 통해 crotonic acid의 신규 dimer를 합성함.</li> </ul>					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	해양생물, 항노화, 항산화, 항염, 항균,			
	영 어	Marine organisms, anti-aging, anti-oxidant, anti-inflammatory, anti-microbial			



# 요 약 문

## I. 제 목

해양생물로부터 항노화 바이오 소재 개발 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

전 세계적으로 인구 고령화가 급속히 진행되고 건강과 아름답게 나이 드는 것에 대한 관심이 높아지면서 항노화 산업과 시장이 급속히 성장하고 있다. Global Industry Analysts 社의 보고서 “Anti-Aging Products”에 의하면, 2015년 항노화 산업 시장규모가 2,919억불에 이를 것으로 전망하고 있다. 또한 세계적으로 천연물 성분에 대한 요구가 가장 빨리 늘고 있는 분야 중의 하나이다. Kline & Company에 의하면, 천연물 퍼스널 케어 시장은 2015년에 미국에서만 67억불에 이를 것으로 전망되며, Mintel 社의 항노화에 대한 최근 조사에 의하면 76%의 응답자들이 천연물 성분에 대하여 관심이 높은 것으로 나타났다. 이러한 여건에 비추어 볼 때 부작용이 적으면서 효과적인 항노화 물질의 개발은 매우 시급한 실정이다. 항노화 물질은 노화와 연관된 생물학적인 과정에 작용하여 노화와 관련된 동맥경화증이나 노화와 관련된 다른 질병의 진행이나 발병을 줄여주어 건강하게 수명을 늘려주는 물질을 말한다. 현재 사용되고 있는 의약품의 40% 이상이 천연자원에서 유래되었다고 하는 것은 중요한 의미를 가진다. 식물이나 해양생물, 미생물과 같은 천연자원 유래된 천연물들은 인간의 여러 질병을 치료하는 선도물질의 발견에 있어서 아주 중요한 역할을 해왔고 앞으로도 그러한 역할을 할 것으로 기대되고 있다. 특히 해양천연물에 관한 연구는 학술적인 면과 산업적인 면에서 대단히 중요성이 크다. 또한 해양천연물에 대한 과학지식의 발전은 생물학, 화학, 의약학 등 여러 관련분야에 필수적인 정보와 연구재료를 제공하여 해당분야의 기초 및 응용연구의 발전에 크게 기여하고 있다.

미국이나 일본과 같은 선진국에서는 해양천연물연구의 중요성을 인식하고, 이 분야를 21세기 생명공학분야의 중점분야로 선정하고 해양천연물에 대한 연구개발에 막대한 노력을 기울여왔다. 지금까지 22,000 이상의 신물질이 여러 종류의 해양생물로부터 발견되었다. 현재 미국 식약청(FDA) 혹은 유럽 의약품 기구(EMEA; European Medicines Agency)로부터 허가를 받아 시판 중에 있는 의약품들은 Vira-A, Cytosar-U, Prialt, Halaven, Yondelis, Carragelose, Lovaza, Adcetris 등 8개가 있다. 이외에도 상당수의 물질이 현재 의약품, 화장품첨가제, 건강보조제 등으로 개발 중에 있어 가까운 시일에 제품화가 될 것으로 추측되고 있다.

그러나 지금까지 해양생물을 대상으로 한 해양천연물 연구 결과, 뛰어난 활성을 가

진 많은 물질들이 분리되었으나, 해양천연물이 임상에 적용되기에는 많은 시간이 소요되며 여러 가지 어려움이 많았다. 해양천연물 개발을 지연시키는 가장 중요한 요인 중의 하나는 임상에 많은 양의 물질이 요구되고 있어 해양천연물의 공급에 대한 어려움이다. 일반적으로 천연으로부터 채집에 의해서 해양천연물을 공급하기에는 경제적이지 못하며, 양식이나 전합성에 의한 방법 또한 매우 어렵거나 너무 비용이 비싸다. 또한, 최근의 많은 연구에서 해양 무척추동물로부터 분리된 많은 생리활성 물질들이 공생 미생물들에 의해 생산된다는 것이 많이 보고되면서 이제는 해양미생물이 해양천연물 개발에 있어서 새로운 지평을 열고 해양천연물의 공급의 문제를 해결할 수 있는 중요한 생물로서 자리매김을 하였다.

이러한 추세에 따라, 본 연구의 궁극적인 연구목표는 해양생물, 특히 해양미생물이 생산하는 유용 항노화 물질의 발굴에 초점을 두었다.

본 연구개발사업의 3년간의 연구는 천연물연구의 대부분의 과정, 즉 다양한 해양환경으로부터 해양생물 및 해양미생물의 채집 및 체계적인 확보에서 선택된 균주로부터 천연물의 분리정제 및 구조결정에 이르는 일련의 과정과 함께 천연물유래의 유도체의 합성과 생리활성물질의 전합성을 통한 효과적 대량확보 방안연구, 항노화 활성의 검증 등의 과정을 중점적으로 다루었다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 한국 연근해와 마이크로네시아 등의 열대지방의 다양한 해양환경에 서식하는 해양 동·식물, 해양퇴적토 등의 해양시료를 채집하고 이들에서 해양미생물을 분리하였으며, 이들의 조추출물에 대한 화학적 분석과 항노화 활성검색을 통하여 일차적인 연구대상 시료를 선정하였다.

2. 연구대상 균주로 선정된 균주의 배양액으로부터 유기물질을 추출하였으며 각종 크로마토그래피 기술을 이용하여 다양한 항노화 활성을 나타내는 활성물질을 분리, 정제하였다. 활성물질의 구조는 화학반응과 분광자료 해석을 통해 결정하였다.

3. 개발 후보 천연물에 대하여 전합성을 수행하여 이 물질의 대량확보를 위한 효율적인 합성 방법을 개발하였다.

4. 개발후보물질에 대한 화학적 구조변환에 의하여 강력한 항노화 활성을 나타내며 전합성이 용이한 신규 유도체가 얻어졌다. 이 과정에서 천연물의 구조와 활성간의 상관관계를 규명하였다.

5. 항노화 활성이 우수한 신물질을 산업화 후보물질로 선정하고 이 물질의 대량확보를 위한 효율적 합성방법을 개발하였다.

#### IV. 연구개발 결과

1. 한국 근해와 열대지방 마이크로네시아 등의 다양한 해양환경에 서식하는 해양 동·식물, 해양퇴적토 등에서 189종의 해양생물 및 해양미생물을 채집 및 분리하여, 순수배양 및 체계적으로 보존하였다.

2. 채집/분리된 해양생물 및 해양미생물 중에서 189종을 추출하여 추출물 library 를 구축하였고, 항노화 활성 검색을 통하여 우수한 활성을 보인 10여종의 항노화 활성 균주를 선별하였다.

3. 항노화 활성 검색결과와 NMR을 통한 화학적 분석, 배양학적 특성 등을 종합적으로 고려하여 연구대상 균주로 선정된 해양미생물 시료로부터 각종 크로마토그래피를 이용하여 30여종의 신물질들을 분리, 정제하였다.

4. 분리된 물질들의 구조는 NMR 등의 각종 분광학적 방법과 화학적 방법에 의하여 규명하였고, 이들 천연물들의 항노화 활성을 검색하였다. 이들 물질은 인돌알칼로이드, 펩타이드, 이소프레노이드, 터핀노이드, 다이키토피페라진 등의 구조적으로 여러 가지 부류에 속하였다. 이들 중에서 많은 물질이 항산화, 항염 등의 항노화 활성을 나타내었다.

5. 이들 항노화 물질 중에서 마이크로네시아에서 분리한 해양미생물 *Bacillus* sp. 102CH635-3 균주가 생성하는 pantetheine계 신규물질을 개발 후보물질로 선정하였다.

6. 항노화 활성이 뛰어난 pantetheine계 신규물질을 용이하게 얻기 위하여 간단한 단계의 합성반응으로 pantetheine계 신규물질을 전합성할 수 있는 효과적인 대량합성법을 개발하였다.

7. 유기반응을 통하여 pantetheine계 신규물질의 유도체를 합성하였다. 또한 신규 유도체에 대한 항염활성을 검색하여 구조-활성 상관관계를 파악하였다.

이러한 연구결과를 통하여 해양생물로부터 항노화 물질 개발 가능성을 입증하였으며 해양신물질 개발을 위한 기술적 기반을 확립하고 향후의 산업화를 위한 해양방선균 및 천연물 소재를 확보하였다.

## V. 연구개발 결과의 활용계획

본 연구는 우리나라 근해와 열대지방 등에서 채집한 해양생물 및 해양미생물에서 항노화 물질 개발의 가능성을 입증하였다. 특히 마이크로네시아 및 우리나라 근해에서 분리된 많은 해양미생물이 다양한 구조의 생리활성 천연물을 함유하고 있다는 사실이 드러났다. 본 연구에 의하여 얻어진 많은 이차대사물질과 해양미생물은 향후의 해양생명공학 및 생의학 연구를 위한 가치 있는 소재로 활용될 것이다. 본 연구를 통하여 분리된 몇몇의 항노화 물질은 여러 가지 제품개발의 선도물질로 활용될 가능성을 충분히 보여주었다. 아울러 본 연구개발로 해양생물 및 해양미생물에 대한 화학 및 생화학적 연구와 유용물질의 개발을 위한 연구역량을 구축하였으며 해양천연물 연구의 기술적 측면에서 많은 진보가 있었다.

결론적으로 본 연구는 국내에서의 항노화 물질 개발의 성공가능성을 보여주었으며, 연구결과로 획득한 다양한 해양미생물의 대사물질과 해양미생물 균주들 그리고 개발된 기술은 향후의 관련 연구사업 및 기타 해양생물에서 다양한 산업적 소재의 개발에 널리 활용될 것이다.

# SUMMARY

## I. Title

A study on the development of anti-aging biomaterials from marine organisms

## II. Objective and Significance of the Study

In active-aging and beauty trends, the anti-aging industry and market are rapidly growing worldwide as the increase of the older population. Spending on anti-aging products is expected to reach \$291.9 billion by 2015, according to a Global Industry Analysts report (Anti-aging Products, 2009). The needs for more natural ingredients are one of the fastest growing around the world. According to Kline & Company, the natural personal care market is predicted to reach \$6.7 billion in 2015 in the U.S. alone, and according to a recent anti-aging survey by Mintel, 76% of respondents who are concerned with aging report being interested in products with natural ingredients. So it is very urgent to develop new anti-aging agents with potent activity and having less side effects. Anti-aging compound is the branch of molecule which aims to reduce the chance of developing aging-related arteriosclerosis and other aging-related diseases by intervening in the biological process of aging, and thereby contributing to the extension of a healthy life span. It is significant that over 40% of currently used drugs are derived from natural sources. Natural products, the molecules derived from natural sources including plants, marine organisms and micro-organisms, have played and continue to play a dominant role in the discovery of leads for the development of conventional drugs for the treatment of most human diseases. Particularly, study on marine natural products has significant importance on both academic and industrial aspects. Development in scientific knowledges on marine natural products also contributes tremendously to the progress of many related fields including biological, chemical, and biomedical sciences by providing valuable information and research tools for both basic and applied researches.

Developed countries such as USA and Japan regard the study on this field as one of the major part of biotechnology in 21st century, and have put tremendous efforts into the research and development of marine natural

products by full awareness of the potential of marine natural products. Until now the numbers of compounds isolated from marine organisms have reached 22,000. Currently, 8 Food and Drug Administration(FDA) or European Medicines Agency(EMA) approved drugs, such as vira-A, Cytosar-U, prialt, halaven, yondelis, carragelose, lovaza, and adcetris are on the market. Beside these drugs, as quite a lot of compounds are currently in the process of development for industrial uses such as drugs, additive for cosmetics, and health-care products, many of them are expected to be appeared in the market in the near future. Despite the promise of marine natural products and their unique structures and bioactivities, the application of marine natural products to clinical use has been slow and difficult. One of the major factors retarding the use of marine natural products is the supply issue. It is often not economical to supply drugs by collection from the environment, and even aquaculture and total synthesis are difficult to develop and can be expensive. Recently, many studies revealed that marine bacteria can produce many natural products previously attributed to marine invertebrates. This and related researches opened up new avenues of marine microorganisms for the development of marine natural products and addressing the supply issue.

Based on these research trends, the ultimate objective of this study is the isolation and structure determination of anti-aging compounds from marine organisms, especially from marine microorganisms. Particularly, the discovery of potent anti-aging compounds is the main focus of this research project.

During the 3 years of this research, effort is focussed on the initial part of natural product research. That goes to the systematic collection of marine organisms and marine microorganisms from various marine environments as well as the isolation and structure determination of natural products from selected strains. In addition, emphasis goes to the synthesis of novel bioactive analogs from natural products, development of efficient methods for total synthesis of the candidate compounds to have large amounts of the compounds, and the evaluation of the anti-aging activity.

### **III. Contents and Scope of the Study**

1. Various marine samples such as marine invertebrates, plants, and sediments have been collected at various locations of Korea and the tropical region of Micronesia and marine microorganisms have been isolated from the samples. Primary target strains for further studies have been selected by

combined results of chemical analysis and anti-aging screening of the crude extracts from each strain and sample.

2. Bioactive compounds which have various anti-aging activities have been extracted and purified from the culture broth of selected strains by utilizing various chromatographic techniques. The structures of bioactive compounds have been determined by combined chemical and spectroscopic methods.

3. Efficient total synthetic method for the candidate compounds have been developed to get a large amount of the compounds easily.

4. The candidate compounds have been chemically modified to several analogs possessing potent anti-aging activity and synthetically accessible structures. In the meanwhile, structure-activity relationship of the natural product has been defined.

5. The new compounds possessing potent anti-aging activity was selected as the candidate compounds for the industrial development and efficient synthetic method has been developed to have large amounts of the compound easily.

#### **IV. Results of the Study**

1. Various marine invertebrates, plants, and sediments have been collected at various locations of Korea and Micronesia, and marine microorganisms have been isolated, pure cultured, and systematically preserved from the samples. Totally 189 marine organisms including 168 microbial strains have been collected or isolated from the marine environments.

2. Among the samples and strains, 189 marine organisms have been extracted to build extracts library. These extracts have been screened for anti-aging activities and more than 10 strains showing good activities were selected for further studies.

3. From the selected strains, on the basis of combined results of bioactivity test, chemical analysis of crude extracts by NMR and cultural characteristics, more than 30 new compounds were purified by utilizing various chromatographic techniques.

4. The structures of these compounds have been elucidated by combined analysis of chemical methods and NMR spectral data. These compounds belonged to various structural classes such as indole alkaloids, peptides, isoprenoids, terpenoids, and diketopiperazines. Lots of these compounds showed significant anti-aging activities such as anti-oxidant and anti-inflammatory activities.

5. From these compounds, the new pantetheine derivatives isolated from *Bacillus* sp. 102CH635-3 has been selected as the candidate compounds for further development.

6. Efficient synthetic method using very easy steps of reactions to synthesize the new pantetheine derivatives showing potent anti-aging activities has been developed.

7. New pantetheine analogs have been made by chemical reactions and the structure-activity relationship of these compounds have been defined.

These results have successfully demonstrated the possibility of the development of anti-aging compounds from marine organisms. A great progress in technical aspects for the development of marine natural products has been achieved, and both compounds and marine microorganisms which can be available for industrial development were obtained during this research.

## V. Conclusions and Discussion

This study has unambiguously demonstrated the potential of marine organisms and marine microorganisms for the development of anti-aging agents. In particular, many marine microorganisms isolated from Micronesia and nearby seas of Korea have been proved to be the prolific sources of structurally-unique bioactive secondary metabolites. Both many secondary metabolites and marine organisms obtained from this research will be utilized as valuable sources for the marine biotechnology and biomedical studies. Some anti-aging compounds isolated from this study have potential to be available for the bioprobes in drug development. Furthermore, this research has built research capacity for extensive chemical and biochemical investigation of marine actinomycetes and marine microorganisms and the

development of bioactive compounds. During this study, a great progress has been achieved in technical aspects of marine natural products.

In conclusion, this study has successfully demonstrated the possibility of marine natural products in Korea. Both secondary metabolites isolated from marine microorganisms and lots of strains obtained from this study as well as techniques developed in this research will be utilized as valuable assets for related research works in the development of bioactive materials and other industrially available substances from the marine organisms.



# 목 차

제출문 .....	1
보고서 초록 .....	3
요약문 (국문) .....	5
요약문 (영문) .....	9
그림목차 .....	20
표목차 .....	29
제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	31
제 1 절 연구개발의 필요성 .....	33
제 2 절 연구의 목표 및 범위 .....	36
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	39
제 1 절 항노화 연구의 최근 연구 동향 .....	41
제 2 절 주요 국가의 연구현황 .....	47
제 3 절 국내의 연구개발 동향 .....	50
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과 .....	53
제 1 절 해양생물의 채집, 추출물 조제 및 항노화 활성검색 .....	55
1. 해양생물 및 해양미생물의 채집 및 분리 .....	55
제 2 절 해양생물의 항노화 활성검색 .....	63
1. 해양생물 추출물의 항산화 활성 .....	63
2. 해양생물 추출물의 미백 활성 .....	64
3. 해양미생물 추출물의 항산화 활성 .....	64
4. 해양미생물 추출물의 미백 활성 .....	66
5. 유용 생물의 선정 및 시료 확보/배양 .....	67
제 3 절 <i>Streptomyces</i> sp. 112CH148 균주로부터 $\alpha$ -pyrone계 신물질의 분리 및 구조결정 .....	68
제 4 절 <i>Mycosphaerella</i> sp. 135PIL286 균주로부터 지방산계열의 신물질의 분리 및 구조결정 .....	87
제 5 절 신규 해양곰팡이 1210CH-42 균주로부터 항노화 물질 분리 및 구조결정 .....	101
1. 신규 해양곰팡이 1210CH-42 균주 분리 및 동정 .....	101
2. 배양 추출물의 항산화 활성 .....	102
3. 배양 최적 조건 확립 .....	103
4. 대량 배양, 신물질 분리 및 구조결정 .....	106

제 6 절 <i>Bacillus</i> sp. 102CH635-3로부터 항노화 물질 분리 및 구조결정 .....	177
1. <i>Bacillus</i> sp. 102CH635-3 균주의 분리 및 동정 .....	177
2. 배양 최적 조건 확립 .....	178
3. 대량 배양, 신물질 분리 및 구조결정 .....	180
제 7 절 D-Pantatheine계 신규 천연물의 합성 .....	193
1. 신물질 합성법 확립 .....	193
2. 신규 유도체의 합성 .....	198
3. 합성물질에 대한 활성 측정 .....	207
제 8 절 <i>Stappia</i> sp. 102CH-429 균주로부터 신물질의 분리 및 구조결정 .....	214
1. <i>Stappia</i> sp. 102CH-429의 분리 및 동정 .....	214
2. <i>Stappia</i> sp. 102CH-429의 대사물질 분리 및 구조결정 .....	214
3. 신규 화합물 429-1의 합성 .....	217
제 9 절 <i>Penicillium citrinum</i> 1310CH-032의 대사물질 분리 및 구조결정 .....	227
1. <i>Penicillium citrinum</i> 1310CH-032의 분리, 동정 및 배양 .....	227
2. <i>Penicillium citrinum</i> 1310CH-032의 대사물질 분리 및 구조결정 .....	227
제 10 절 해양방선균 <i>Streptomyces</i> sp. 133VN028 균주로부터 신물질 분리 및 구조결정 .....	245
1. <i>Streptomyces</i> sp. 133VN028 균주의 배양학적 특성과 16S rRNA 유전자 염기서열 분석에 의한 동정 .....	245
2. <i>Streptomyces</i> sp. 133VN028으로부터 신물질 분리 및 구조결정 .....	245
제 11 절 해양곰팡이 <i>Penicillium</i> sp. 108YD020 균주로부터 신물질 분리 및 구조결정 .....	286
1. <i>Penicillium</i> sp. 108YD020 균주의 배양학적 특성과 18S rRNA 유전자 염기서열 분석에 의한 동정 .....	286
2. <i>Penicillium</i> sp. 108YD020로부터 신물질 분리 및 구조결정 .....	286
제 12 절 결론 .....	304
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	307
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	315
제 6 장 참고문헌 .....	321

## CONTENTS

Report Abstract. ....	3
Summary (Korean). ....	5
Summary (English). ....	9
List of Figures. ....	20
List of Tables. ....	29
Chapter 1. Outline of the Study. ....	31
Section 1. Importance of the Study. ....	33
Section 2. Objective and Scope of the Study. ....	36
Chapter 2. Research Status in Korea and Foreign Countries. ....	39
Section 1. Current Research Status of Anti-aging. ....	41
Section 2. Research Activity in Foreign Countries. ....	47
Section 3. Research Activity in Korea. ....	50
Chapter 3. Contents and Results of the Study. ....	53
Section 1. Collection, Extraction, and Screening of Marine Organisms. ....	55
1. Collection of Marine Organisms and Isolation of Microorganisms. ....	55
Section 2. Screening of Marine organisms for Anti-aging Activity. ....	63
1. Antioxidant Activity of Marine Organisms. ....	63
2. Skin Whitening Activity of Marine Organisms. ....	64
3. Antioxidant Activity of Marine Microorganisms. ....	64
4. Skin Whitening Activity of Marine Microorganisms. ....	66
5. Selection of Useful Marine Microorganisms. ....	67
Section 3. Isolation and Structure Determination of $\alpha$ -pyrone Type New Compounds from <i>Streptomyces</i> sp. 112CH148. ....	68
Section 4. Isolation and Structure Determination of New Fatty Acids from <i>Mycosphaerella</i> sp. 135PIL286. ....	87
Section 5. Isolation of Anti-aging Compounds from a Novel Marine Fungus. ....	101
1. Isolation and Identification of a Novel Marine Fungus 1210CH-42. ....	101
2. Antioxidant Activity of the Culture Extract. ....	102
3. Optimization of Culture Conditions. ....	103
4. Mass Culture, Isolation of New Compounds, and Structure Determination. ....	106

Section 6. Isolation and Structure Determination of	
Anti-aging compounds from <i>Bacillus</i> sp. 102CH635-3. ....	177
1. Isolation and Identification of <i>Bacillus</i> sp. 102CH635-3. ...	177
2. Optimization of Culture Conditions. ....	178
3. Mass Culture, Isolation of New Compounds, and	
Structure Determination. ....	180
Section 7. Synthesis of New Natural Derivatives of	
D-patetheine. ....	193
1. Optimization of Synthetic Methods	
of the New Compounds. ....	193
2. Synthesis of New Derivatives. ....	198
3. Screening for the Activity of Synthetic Compounds. ....	207
Section 8. Isolation and Structure Determination of	
New Compounds from <i>Stappia</i> sp. 102CH-429. ....	214
1. Isolation and Identification of <i>Stappia</i> sp. 102CH-429. ....	214
2. Isolation and Structure Determination of	
Secondary Metabolites from <i>Stappia</i> sp. 102CH-429. ....	214
3. Synthesis of a New Compound 429-1. ....	217
Section 9. Isolation and Structure Determination of Secondary	
Metabolites from <i>Penicillium citrinum</i> 1310CH-032. ....	227
1. Isolation, Identification, and Mass Culture of <i>Penicillium</i>	
<i>citrinum</i> 1310CH-032. ....	227
2. Isolation and Structure Determination of Secondary	
Metabolites from <i>Penicillium citrinum</i> 1310CH-032. ....	227
Section 10. Isolation and Structure Determination of	
New Compounds from <i>Streptomyces</i> sp. 133VN028. ....	245
1. Cultural Properties and Identification of the Strain. ....	245
2. Isolation and Structure Determination of New Compounds	
from <i>Streptomyces</i> sp. 133VN028. ....	245
Section 11. Isolation and Structure Determination of New	
Compounds from a Marine Fungus <i>Penicillium</i> sp. 108YD020. ...	286
1. Cultural Properties and Identification of the Strain. ....	286
2. Isolation and Structure Determination of New Compounds	
from <i>Penicillium</i> sp. 108YD020. ....	286
Section 12. Conclusion and Summary	304

Chapter 4. Achievement of the Study and Contribution to Related Fields .....	307
Chapter 5. Application of the Results of the Study .....	315
Chapter 6. References .....	321

## List of Figures

Fig. 2-3-1. Photo of a Wrinkle Cream, Marine Wrinkle-Toxin™. .....	51
Fig. 2-3-2. Photos of a Brown Alga <i>Ecklonia cava</i> and Skin Creams containing the algal extract .....	52
Fig. 3-1-1. Sampling area and photos of marine samples collected from the Chuuk islands in Micronesia. ....	55
Fig. 3-1-2. Photo of marine samples extracted with 80% MeOH and methylene chloride (MC) .....	59
Fig. 3-1-3. Antioxidant activity of the MeOH extracts of marine organisms. ....	63
Fig. 3-1-4. Tyrosinase inhibitory activity of the MeOH extracts of marine organisms. ....	64
Fig. 3-1-5. Selected strains for further study. ....	67
Fig. 3-1. $\alpha$ -pyrones <b>148-1~4</b> isolated from the culture broth of the strain 112CH148. ....	68
Fig. 3-2. Key HMBC and COSY correlations of <b>148-2</b> and <b>148-4</b> . ....	70
Fig. 3-3. Anti-inflammatory activity of <b>148-1</b> and <b>148-3</b> . ....	72
Fig. 3-4. <sup>1</sup> H NMR spectrum of <b>148-1</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	73
Fig. 3-5. <sup>13</sup> C NMR spectrum of <b>148-1</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	73
Fig. 3-6. HR-ESIMS spectrum of <b>148-1</b> . ....	74
Fig. 3-7. <sup>1</sup> H NMR spectrum of <b>148-2</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	75
Fig. 3-8. <sup>13</sup> C NMR spectrum of <b>148-2</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	75
Fig. 3-9. gHSQC spectrum of <b>148-2</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	76
Fig. 3-10. gCOSY spectrum of <b>148-2</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	77
Fig. 3-11. gHMBC spectrum of <b>148-2</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	78
Fig. 3-12. HR-ESIMS spectrum of <b>148-2</b> . ....	79
Fig. 3-13. <sup>1</sup> H NMR spectrum of <b>148-3</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	80
Fig. 3-14. <sup>13</sup> C NMR spectrum of <b>148-3</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	80
Fig. 3-15. HR-ESIMS spectrum of <b>148-3</b> . ....	81
Fig. 3-16. <sup>1</sup> H NMR spectrum of <b>148-4</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	82
Fig. 3-17. <sup>13</sup> C NMR spectrum of <b>148-4</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	82
Fig. 3-18. gHSQC spectrum of <b>148-4</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	83
Fig. 3-19. gCOSY spectrum of <b>148-4</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	84

Fig. 3-20. gHMBC spectrum of <b>148-4</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	85
Fig. 3-21. HR-ESIMS spectrum of <b>148-4</b> . ....	86
Fig. 3-22. Fatty acids <b>286-1</b> and <b>286-2</b> isolated from the culture broth of the strain 135PIL286. ....	87
Fig. 3-23. Key HMBC and COSY correlations of <b>286-1</b> and <b>286-2</b> . ....	89
Fig. 3-24. <sup>1</sup> H NMR spectrum of <b>286-1</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	91
Fig. 3-25. <sup>13</sup> C NMR spectrum of <b>286-1</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	91
Fig. 3-26. gHSQC spectrum of <b>286-1</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	92
Fig. 3-27. gCOSY spectrum of <b>286-1</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	93
Fig. 3-28. gHMBC spectrum of <b>286-1</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	94
Fig. 3-29. HR-ESIMS spectrum of <b>286-1</b> . ....	95
Fig. 3-30. <sup>1</sup> H NMR spectrum of compound <b>286-2</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	96
Fig. 3-31. <sup>13</sup> C NMR spectrum of compound <b>286-2</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	96
Fig. 3-32. gHSQC spectrum of <b>286-2</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	97
Fig. 3-33. gCOSY spectrum of <b>286-2</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	98
Fig. 3-34. gHMBC spectrum of <b>286-2</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	99
Fig. 3-35. HR-ESIMS spectrum of <b>286-2</b> . ....	100
Fig. 3-36. Photo of the seashore near the Korea South Pacific Ocean Research Center(KSORC) in Chuuk, Micronesia. ....	101
Fig. 3-37. Photos of the novel marine fungus 1210CH-42. ....	101
Fig. 3-38. Antioxidant activity of the crude extract of the strain 1210CH-42. ....	102
Fig. 3-39. <sup>1</sup> H-NMR data of the culture extracts by salinity change. ....	104
Fig. 3-40. <sup>1</sup> H-NMR data of the culture extracts by pH change. ....	105
Fig. 3-41. Isolation scheme of the new compounds from the mass culture broth of the strain 1210CH-42. ....	106
Fig. 3-42. The new compounds <b>A1</b> and <b>A2</b> from the strain 1210CH-42. ....	108
Fig. 3-43. <sup>1</sup> H NMR and <sup>13</sup> C NMR spectrum of <b>A1</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	109
Fig. 3-44. <sup>1</sup> H NMR and <sup>13</sup> C NMR spectra of <b>A2</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	110
Fig. 3-45. COSY spectrum of <b>A2</b> . ....	111
Fig. 3-46. HSQC spectrum of <b>A2</b> . ....	112
Fig. 3-47. HMBC spectrum of <b>A2</b> . ....	113

Fig. 3-48. LR-APCI mass spectrum of <b>A1</b> . .....	114
Fig. 3-49. LR-APCI mass spectrum of <b>A2</b> . .....	114
Fig. 3-50. Key $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY and HMBC data for compounds <b>B1</b> and <b>B2</b> from the strain 1210CH-42. ....	116
Fig. 3-51. $^1\text{H}$ NMR and $^{13}\text{C}$ NMR spectra of <b>B1</b> in $\text{CD}_3\text{OD}$ . ....	117
Fig. 3-52. COSY spectrum of <b>B1</b> . .....	118
Fig. 3-53. HSQC spectrum of <b>B1</b> . .....	119
Fig. 3-54. HMBC spectrum of <b>B1</b> . .....	120
Fig. 3-55. LR-APCI mass spectrum of <b>B1</b> . .....	121
Fig. 3-56. $^1\text{H}$ NMR and $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of <b>B2</b> in $\text{CD}_3\text{OD}$ . ....	122
Fig. 3-57. COSY spectrum of <b>B2</b> . .....	123
Fig. 3-58. HSQC spectrum of <b>B2</b> . .....	124
Fig. 3-59. HMBC spectrum of <b>B2</b> . .....	125
Fig. 3-60. LR-APCI mass spectrum of <b>B2</b> . .....	126
Fig. 3-61. Key $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY and HMBC correlations for compounds <b>C1</b> and <b>C2</b> from the strain 1210CH-42. ....	128
Fig. 3-62. $^1\text{H}$ NMR and $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of <b>C1</b> in $\text{CD}_3\text{OD}$ . ....	130
Fig. 3-63. COSY spectrum of <b>C1</b> . .....	131
Fig. 3-64. HSQC spectrum of <b>C1</b> . .....	132
Fig. 3-65. HMBC spectrum of <b>C1</b> . .....	133
Fig. 3-66. HR-ESI mass spectrum of <b>C1</b> . .....	134
Fig. 3-67. $^1\text{H}$ NMR and $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of <b>C2</b> in $\text{CD}_3\text{OD}$ . ....	135
Fig. 3-68. COSY spectrum of <b>C2</b> . .....	136
Fig. 3-69. HSQC spectrum of <b>C2</b> . .....	137
Fig. 3-70. HMBC spectrum of <b>C2</b> . .....	138
Fig. 3-71. HR-ESI mass spectrum of <b>C2</b> . .....	139
Fig. 3-72. Key $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY and HMBC correlations for compounds <b>D1</b> , <b>D2</b> , <b>D3</b> , <b>D4</b> and <b>D5</b> from the strain 1210CH-42. ....	142
Fig. 3-73. $^1\text{H}$ NMR and $^{13}\text{C}$ NMR spectra of <b>D1</b> in $\text{CD}_3\text{OD}$ . ....	146
Fig. 3-74. COSY spectrum of <b>D1</b> . .....	147
Fig. 3-75. HSQC spectrum of <b>D1</b> . .....	148
Fig. 3-76. HMBC spectrum of <b>D1</b> . .....	149
Fig. 3-77. HR-ESI mass spectrum of <b>D1</b> . .....	150
Fig. 3-78. $^1\text{H}$ NMR and $^{13}\text{C}$ NMR spectra of <b>D2</b> in $\text{CD}_3\text{OD}$ . ....	151
Fig. 3-79. COSY spectrum of <b>D2</b> . .....	152

Fig. 3-80. HSQC spectrum of <b>D2</b> . .....	153
Fig. 3-81. HMBC spectrum of <b>D2</b> . .....	154
Fig. 3-82. HR-ESI mass spectrum of <b>D2</b> . .....	155
Fig. 3-83. $^1\text{H}$ NMR and $^{13}\text{C}$ NMR spectra of <b>D3</b> in $\text{CD}_3\text{OD}$ . .....	156
Fig. 3-84. COSY spectrum of <b>D3</b> . .....	157
Fig. 3-85. HSQC spectrum of <b>D3</b> . .....	158
Fig. 3-86. HMBC spectrum of <b>D3</b> . .....	159
Fig. 3-87. HR-ESI mass spectrum of <b>D3</b> . .....	160
Fig. 3-88. $^1\text{H}$ NMR and $^{13}\text{C}$ NMR spectra of <b>D4</b> in $\text{CD}_3\text{OD}$ . .....	161
Fig. 3-89. COSY spectrum of <b>D4</b> . .....	162
Fig. 3-90. HSQC spectrum of <b>D4</b> . .....	163
Fig. 3-91. HMBC spectrum of <b>D4</b> . .....	164
Fig. 3-92. HR-ESI mass spectrum of <b>D4</b> . .....	165
Fig. 3-93. $^1\text{H}$ NMR and $^{13}\text{C}$ NMR spectra of <b>D5</b> in $\text{CD}_3\text{OD}$ . .....	166
Fig. 3-94. COSY spectrum of <b>D5</b> . .....	167
Fig. 3-95. HSQC spectrum of <b>D5</b> . .....	168
Fig. 3-96. HMBC spectrum of <b>D5</b> . .....	169
Fig. 3-97. HR-ESI mass spectrum of <b>D5</b> . .....	170
Fig. 3-98. The structures of <b>E1</b> and <b>E2</b> isolated from the strain 1210CH-42. ....	171
Fig. 3-99. $^1\text{H}$ NMR and $^{13}\text{C}$ NMR spectra of <b>E1</b> in $\text{CD}_3\text{OD}$ . .....	173
Fig. 3-100. LR-APCI mass spectrum of <b>E1</b> . .....	174
Fig. 3-101. $^1\text{H}$ NMR and $^{13}\text{C}$ NMR spectra of <b>E2</b> in $\text{CD}_3\text{OD}$ . .....	175
Fig. 3-102. LR-APCI mass spectrum of <b>E2</b> . .....	176
Fig. 3-103. Compounds isolated from the culture broth of the novel marine fungus 1210CH-42. ....	176
Fig. 3-104. <i>Bacillus</i> sp. 102CH635-3. ....	177
Fig. 3-105. $^1\text{H}$ -NMR data of the culture extracts by the medium composition change. ....	179
Fig. 3-106. Isolation scheme of the new pantetheine derivatives from the strain 102CH635-3. ....	180
Fig. 3-107. Key $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY and HMBC correlations for the new pantetheine derivatives from the strain 102CH635-3. ....	181
Fig. 3-108. $^1\text{H}$ NMR and $^{13}\text{C}$ NMR spectra of <b>rp26</b> in $\text{CD}_3\text{OD}$ . ....	183

Fig. 3-109. COSY spectrum of <b>rp26</b> . .....	184
Fig. 3-110. HSQC spectrum of <b>rp26</b> . .....	185
Fig. 3-111. HMBC spectrum of <b>rp26</b> . .....	186
Fig. 3-112. HMBC HR-ESI mass spectrum of <b>rp26</b> . .....	187
Fig. 3-113. <sup>1</sup> H NMR and <sup>13</sup> C NMR spectra of <b>rp27</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	188
Fig. 3-114. COSY spectrum of <b>rp27</b> . .....	189
Fig. 3-115. HSQC spectrum of <b>rp27</b> . .....	190
Fig. 3-116. HMBC spectrum of <b>rp27</b> . .....	191
Fig. 3-117. HR-ESI mass spectrum of <b>rp27</b> . .....	192
Fig. 3-118. The scheme for the synthesis of the new pantetheine derivatives. ....	193
Fig. 3-119. Synthesis of the new pantetheine derivatives. ....	194
Fig. 3-120. NMR data comparison between synthetic compound and natural compound <b>rp26</b> from the strain 102CH635-3. ....	196
Fig. 3-121. NMR data comparison between synthetic compound and natural compound <b>rp27</b> from the strain 102CH635-3. ....	197
Fig. 3-122. <sup>1</sup> H NMR and <sup>13</sup> C NMR spectra of geranyl-D-pantetheine in CD <sub>3</sub> OD. ....	200
Fig. 3-123. <sup>1</sup> H NMR and <sup>13</sup> C NMR spectra of 10-undecenoyl-D-pantetheine in CD <sub>3</sub> OD. ....	201
Fig. 3-124. <sup>1</sup> H NMR and <sup>13</sup> C NMR spectra of isobutyl formate-D-pantetheine in CD <sub>3</sub> OD. ....	202
Fig. 3-125. <sup>1</sup> H NMR and <sup>13</sup> C NMR spectra of cinnamoyl-D-pantetheine in CD <sub>3</sub> OD. ....	203
Fig. 3-126. <sup>1</sup> H NMR and <sup>13</sup> C NMR spectra of 4-pentenoyl-D-pantetheine in CD <sub>3</sub> OD. ....	204
Fig. 3-127. <sup>1</sup> H NMR and <sup>13</sup> C NMR spectra of 2',4'-dihydroxyacetophenone-2 -D-pantetheine in CD <sub>3</sub> OD. ....	205
Fig. 3-128. Potential functional groups for the synthesis of the new pantetheine derivatives. ....	206
Fig. 3-129. Anti-inflammatory activity of 3-methylbutyryl-D- pantetheine. ....	208

Fig. 3-130. Anti-inflammatory activity of geranyl-D-pantetheine. ....	209
Fig. 3-131. Anti-inflammatory activity of 10-undecenoyl-D-pantetheine. ....	210
Fig. 3-132. Anti-inflammatory activity of isobutyl formate-D-pantetheine. ....	211
Fig. 3-133. Anti-inflammatory activity of cinnamoyl-D-pantetheine. ..	212
Fig. 3-134. Anti-inflammatory activity of 4-Pentenoyl-D-pantetheine. ....	213
Fig. 3-135. Isolation scheme of <b>429-1</b> . ....	214
Fig. 3-136. The structure of <b>429-1</b> . ....	215
Fig. 3-137. Key $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY and HMBC data for <b>429-1</b> . ....	216
Fig. 3-138. Synthesis scheme of ( <i>E</i> )-3-(but-2-enoyloxy)butanoic acid. ....	217
Fig. 3-139. $^1\text{H}$ NMR spectrum of <b>429-1</b> . ....	218
Fig. 3-140. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of <b>429-1</b> . ....	219
Fig. 3-141. gCOSY spectrum of <b>429-1</b> . ....	220
Fig. 3-142. gHSQC spectrum of <b>429-1</b> . ....	221
Fig. 3-143. gHMBC spectrum of <b>429-1</b> . ....	222
Fig. 3-144. APCI mass spectrum of <b>429-1</b> (negative mode). ....	223
Fig. 3-145. ESI-HRMS spectrum of <b>429-1</b> . ....	224
Fig. 3-146. $^1\text{H}$ NMR spectrum of ( <i>E</i> )-3-(but-2-enoyloxy)butanoic acid. ....	225
Fig. 3-147. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of ( <i>E</i> )-3-(but-2-enoyloxy)butanoic acid. ....	226
Fig. 3-148. Isolation scheme of <b>032-1</b> and <b>032-2</b> . ....	227
Fig. 3-149. The structure of <b>032-1</b> . ....	228
Fig. 3-150. Key $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY, and HMBC data for <b>032-1</b> . ....	230
Fig. 3-151. $^1\text{H}$ NMR spectrum of <b>032-1</b> . ....	231
Fig. 3-152. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of <b>032-1</b> . ....	232
Fig. 3-153. gCOSY spectrum of <b>032-1</b> . ....	233
Fig. 3-154. gHSQC spectrum of <b>032-1</b> . ....	234
Fig. 3-155. gHMBC spectrum of <b>032-1</b> . ....	235
Fig. 3-156. APCI mass spectrum of <b>032-1</b> (negative mode). ....	236
Fig. 3-157. The structure of <b>032-2</b> . ....	238
Fig. 3-158. Key $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY and HMBC correlations for <b>032-2</b> . ....	238

Fig. 3-159. <sup>1</sup> H NMR spectrum of <b>032-2</b> . .....	239
Fig. 3-160. <sup>13</sup> C NMR spectrum of <b>032-2</b> . .....	240
Fig. 3-161. gCOSY spectrum of <b>032-2</b> . .....	241
Fig. 3-162. gHSQC spectrum of <b>032-2</b> . .....	242
Fig. 3-163. gHMBC spectrum of <b>032-2</b> . .....	243
Fig. 3-164. APCI mass spectrum of <b>032-2</b> (positive mode). .....	244
Fig. 3-165. Isolation scheme for <b>028-1~5</b> from the 1 <sup>st</sup> culture broth of the strain 133VN028. ....	246
Fig. 3-166. Isolation scheme for <b>028-1~5</b> from the 2 <sup>nd</sup> culture broth of the strain 133VN028. ....	246
Fig. 3-167. The structures of <b>028-1~5</b> from the strain 133VN028. ....	247
Fig. 3-168. The structure of <b>028-1</b> . .....	249
Fig. 3-169. Key COSY and HMBC correlations for <b>028-1</b> . .....	249
Fig. 3-170. HR-ESIMS spectrum of <b>028-1</b> (positive mode). .....	250
Fig. 3-171. <sup>1</sup> H NMR spectrum of <b>028-1</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	251
Fig. 3-172. <sup>13</sup> C NMR spectrum of <b>028-1</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	252
Fig. 3-173. COSY spectrum of <b>028-1</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	253
Fig. 3-174. HSQC spectrum of <b>028-1</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	254
Fig. 3-175. 3-175. HMBC spectrum of <b>028-1</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	255
Fig. 3-176. Inhibition of protein expression by <b>028-1</b> . .....	256
Fig. 3-177. The structure of <b>028-2</b> . .....	257
Fig. 3-178. Key COSY and HMBC correlations for <b>028-2</b> . .....	258
Fig. 3-179. HR-ESIMS spectrum of <b>028-2</b> (positive mode). .....	258
Fig. 3-180. <sup>1</sup> H NMR spectrum of <b>028-2</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	259
Fig. 3-181. <sup>13</sup> C NMR spectrum of <b>028-2</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	260
Fig. 3-182. COSY spectrum of <b>028-2</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	261
Fig. 3-183. HSQC spectrum of <b>028-2</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	262
Fig. 3-184. HMBC spectrum of <b>028-2</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	263
Fig. 3-185. The structure of <b>028-3</b> . .....	265
Fig. 3-186. Key COSY correlations for <b>028-3</b> . .....	265
Fig. 3-187. HR-ESIMS spectrum of <b>028-3</b> (negative mode). .....	266
Fig. 3-188. <sup>1</sup> H NMR spectrum of <b>028-3</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	267
Fig. 3-189. <sup>13</sup> C NMR spectrum of <b>028-3</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	268

Fig. 3-190. COSY spectrum of <b>028-3</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	269
Fig. 3-191. The structure of <b>028-4</b> . ....	271
Fig. 3-192. Key COSY and HMBC correlations for <b>028-4</b> . ....	271
Fig. 3-193. HR-ESIMS spectrum of <b>028-4</b> (positive mode). ....	272
Fig. 3-194. <sup>1</sup> H NMR spectrum of <b>028-4</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	273
Fig. 3-195. <sup>13</sup> C NMR spectrum of <b>028-4</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	274
Fig. 3-196. COSY spectrum of <b>028-4</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	275
Fig. 3-197. HSQC spectrum of <b>028-4</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	276
Fig. 3-198. HMBC spectrum of <b>028-4</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	277
Fig. 3-199. The structure of <b>028-5</b> . ....	279
Fig. 3-200. Key COSY and HMBC correlations for <b>028-5</b> . ....	279
Fig. 3-201. HR-ESIMS spectrum of <b>028-5</b> (positive mode). ....	280
Fig. 3-202. <sup>1</sup> H NMR spectrum of <b>028-5</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	281
Fig. 3-203. <sup>13</sup> C NMR spectrum of <b>028-5</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	282
Fig. 3-204. COSY spectrum of <b>028-5</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	283
Fig. 3-205. HSQC spectrum of <b>028-5</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	284
Fig. 3-206. HMBC spectrum of <b>028-5</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	285
Fig. 3-207. Isolated <b>020-1~2</b> from the culture broth of the strain 108YD020. ....	287
Fig. 3-208. Isolated <b>020-1~2</b> from strain 108YD020. ....	287
Fig. 3-209. The structure of <b>020-1</b> . ....	289
Fig. 3-210. Key COSY, NOESY and HMBC correlations for <b>020-1</b> . ....	289
Fig. 3-211. HR-ESIMS spectrum of <b>020-1</b> (positive mode). ....	290
Fig. 3-212. <sup>1</sup> H NMR spectrum of <b>020-1</b> in CDCl <sub>3</sub> . ....	291
Fig. 3-213. <sup>13</sup> C NMR spectrum of <b>020-1</b> in CDCl <sub>3</sub> . ....	292
Fig. 3-214. COSY spectrum of <b>020-1</b> in CDCl <sub>3</sub> . ....	293
Fig. 3-215. HSQC spectrum of <b>020-1</b> in CDCl <sub>3</sub> . ....	294
Fig. 3-216. HMBC spectrum of <b>020-1</b> in CDCl <sub>3</sub> . ....	295
Fig. 3-217. The structure of <b>020-2</b> . ....	297
Fig. 3-218. Key COSY, NOESY and HMBC correlations for <b>020-2</b> . ....	297
Fig. 3-219. HR-ESIMS spectrum of <b>020-2</b> (negative mode). ....	298
Fig. 3-220. <sup>1</sup> H NMR spectrum of <b>020-2</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	299
Fig. 3-221. <sup>13</sup> C NMR spectrum of <b>020-2</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	300

Fig. 3-222. COSY spectrum of <b>020-2</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	301
Fig. 3-223. HSQC spectrum of <b>020-2</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	302
Fig. 3-224. HMBC spectrum of <b>020-2</b> in CD <sub>3</sub> OD. ....	303

## List of Tables

Table 2-1-1. World market for health maintenance and appearance enhancement anti-aging products. ....	41
Table 2-1-2. World recent past, current and future analysis for anti-aging products by product segment. ....	42
Table 3-1-1. Sampling sites and the number of isolated and extracted strains. ....	56
Table 3-1-2. Extracts from marine organisms with 80% MeOH and MC. ....	59
Table 3-1-3. Antioxidant activity of marine microbial extracts .....	65
Table 3-1-4. Tyrosinase inhibitory activity of marine microbial extracts .....	66
Table 3-1. Physico-chemical properties of <b>148-1~4</b> .....	70
Table 3-2. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR data of <b>148-2</b> and <b>148-4</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	70
Table 3-3. Cytotoxicity of <b>148-1~4</b> against a pannel of human cancer cell lines .....	72
Table 3-4. Physico-chemical properties of fatty acids <b>286-1</b> and <b>286-2</b> .....	89
Table 3-5. <sup>1</sup> H and <sup>13</sup> C NMR data of <b>286-1</b> and <b>286-2</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	90
Table 3-6. Optimal medium conditions of the strain 1210CH-42 .....	103
Table 3-7. NMR data for the new compounds <b>A1</b> and <b>A2</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	108
Table 3-8. NMR data for the new compounds <b>B1</b> and <b>B2</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	116
Table 3-9. NMR data for the new compounds <b>C1</b> and <b>C2</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	129
Table 3-10. NMR data for the new compound <b>D1</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	143
Table 3-11. NMR data for the new compounds <b>D2</b> and <b>D3</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	144
Table 3-12. NMR data for the new compounds <b>D4</b> and <b>D5</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	145

Table 3-13. Comparison of physicochemical properties between the known compound 30129A and the steroids <b>E1</b> and <b>E2</b> isolated from the strain 1210CH-42 .....	172
Table 3-14. Optimal medium conditions for the strain 102CH635-3 .....	178
Table 3-15. NMR data for <b>rp26</b> and <b>rp27</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	182
Table 3-16. New pantetheine derivatives synthesized from this study .....	199
Table 3-17. NMR data for <b>429-1</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	215
Table 3-18. NMR Spectral data for <b>032-1</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	229
Table 3-19. NMR Spectral data for <b>032-2</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	237
Table 3-20. NMR Data for <b>028-1</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	249
Table 3-21. NMR Data for <b>028-2</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	258
Table 3-22. NMR Data for <b>028-3</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	265
Table 3-23. NMR Data for <b>028-4</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	271
Table 3-24. NMR Data for <b>028-5</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	280
Table 3-25. NMR Data for <b>020-1</b> in CDCl <sub>3</sub> .....	289
Table 3-26. NMR Data for <b>020-2</b> in CD <sub>3</sub> OD .....	297

# 제 1 장

## 연구개발과제의 개요





# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 필요성

전 세계적으로 인구 고령화가 급속히 진행되고 건강에 대한 관심이 높아지면서 항노화산업이 급속히 부상하고 있다. 항노화 바이오산업은 의생명분야 뿐만 아니라 바이오(BT)와 정보(IT), 나노기술(NT) 등 첨단 의·과학이 얽혀있는 융·복합 신산업이다. BCC Research에 의하면 항노화산업의 글로벌 시장 규모는 2006년 1,325억 달러에서 2013년 2,745억 달러로 11.1%의 높은 연평균 성장률을 보일 것으로 전망한 바 있다. 현재 국내 항노화 시장은 약 11.9조원 규모로 연평균 10.1%씩 성장하고 있다. 항노화 시장의 약 75%를 화장품 소비자가 차지하며 성장을 주도하고 있고, 의료가 18%, 서비스가 7%를 차지하고 있다 (강찬구, 2013). 항노화산업은 노화 및 노인성 질환을 예방·치료하거나 개선을 위한 의약품과 바이오소재 및 건강프로그램 등의 제품이나 서비스와 관련된 산업으로 의약품, 의료기기, 식품, 화장품 등이 주요 분야에 해당된다. 항노화산업은 고령화 시대에 따라 급성장하여, 2020년에는 27조 원 규모로 전망되면서 미래 블루오션으로 손꼽힌다. 이와 같은 급속한 성장의 배경에는 인구 고령화가 진행되면서 구매력이 높은 고령층이 확대되고 있으며, 이들을 중심으로 건강한 노년을 보내기 위한 고가의 항노화 제품 및 서비스 시장이 형성되고 있는 것을 들 수 있다. 또한 경제적 수준이 향상되고 건강 및 외모에 대한 관심이 높아지면서 젊은 층에서도 항노화산업에 대한 수요가 증가하고 있다 (문혜선 등, 2013). 국제연합(United Nation)에서는 65세 이상 노인이 전체 인구에서 차지하는 비율이 7% 이상인 사회를 ‘고령화 사회’ (aging society), 14% 이상인 경우 ‘고령사회’ (aged society), 20% 이상이면 ‘초고령 사회’ (post-aged society)로 규정하고 있다. 우리나라는 2000년에 UN이 정한 고령화 사회에 진입 하였고, 2018년에 고령사회, 2026년에 초고령 사회로 진입할 것으로 예상된다 (김무웅, 2009). 국내의 65세 이상 노인인구의 비율은 급속하게 증가하여 2015년 이후에는 미국, EU 5개국, BRICs(브라질, 러시아, 인도, 중국) 국가의 비율을 넘어설 것으로 전망되어 항노화 바이오소재의 개발이 절실한 시점이다. 이와 같이 고령화 사회로의 진입 및 항노화 산업의 부상은 경제사회적 관점에서 볼 때 사전적인 건강관리 및 노화 예방 등을 통해 질병을 사전에 방지함으로써 사회적인 의료비용을 절감하는 효과가 있으며, 다른 한편으로는 고령화의 진행에 따라 새롭게 부상하는 수요를 바탕으로 하여 경제 성장을 이끌어 갈 수 있는 성장동력이 될 수 있다는 측면에서 중요성이 높다. 고령화 사회로의 진입으로 고령인구의 건강한 삶의 유지와 경제적 활동 참여를 가능케 하는 노화 관련 연구 및 삶의 질 향상 기술 개발에 대한 요구가 꾸준히 증대되고 있다.

해양은 생명탄생의 기원이며 수많은 생명체가 서식하는 생명의 보고로서 셀 수도 없을 정도로 다양한 종류의 유전정보와 그들이 생산하는 생리활성물질들을 품고 있는 지구상의 최대의 생명정보 라이브러리라고도 할 수 있다. 또한 육상의 각종 생물유래의 생리

활성성분들은 그 접근의 용이성으로 인하여 이미 수많은 연구가 진행되어진 반면, 상대적으로 접근이 제한적인 해양생물들이 생산하는 생리활성 성분에 대한 연구는 아직도 미미한 수준이라고 할 수 있다. 특히, 해양미생물에 대한 연구는 거의 진행되지 않아 해양에 존재하는 미생물의 1%이하가 분리되고 있으며, 이들이 생산하는 생리활성물질에 대한 연구는 더더욱 연구개발이 안된 상태이다. 해양생태계는 육지와는 달리 염분의 농도가 높고, 산소공급이 제한적이며 수심에 따른 압력의 증가로 인한 특수한 환경적 특성 때문에 해양생물들의 생체 방어기작 자체가 육상 생물들과 다를 수밖에 없으며, 이러한 특성 때문에 해양생물들이 생산하는 다양한 생리활성 물질들이 다양한 분야에서 새로운 소재로서 관심의 대상이 되고 있다.

해양은 지구 전체의 약 70%를 차지하며, 해양에는 지구 생물종의 80%이상이 서식하고 있어 생물 다양성의 보고이다. 해양은 극한 환경이면서도 복잡하고도 다양한 환경을 가진다. 즉, 높은 압력(1 ~ 1,100 기압), 높은 염분 농도(흑해의 18 % ~ 홍해의 42 %), 넓은 온도영역(북극해의 -2℃부터 심해 열수분출공의 약 350℃까지), 다양한 영양범위(빈영양에서 부영양까지), 그리고 넓은 광영역(햇빛이 잘 들거나 얕은 해역에서 전혀 들지 않는 영역)을 모두 포함하고 있다(Allen, 1941; Andersen, *et al*, 1986).

해양 환경의 특수성과 천연물개발의 원천으로서의 해양생물의 뛰어난 가치로 말미암아, 육상생물 유래의 생리활성 물질과는 다른 독특한 구조를 가진 22,000여 이상의 생리 활성물질이 해양생물로부터 분리되었으며 이들 물질은 생리활성 면에서도 뛰어난 모습을 보여주었다(McCarthy, 2004). 이러한 특수한 환경에 살고 있는 해양생물 자원은 경제적 가치가 매우 높아 첨단 바이오 기술을 접목시 그 개발 가능성은 무한하다. 또한 생물소재 상품화 성공률에서도 해양생물이 1/6,000로서 육상생물 1/13,000보다 높다고 보고되고 있어, 해양생물은 항노화 바이오소재의 개발에 좋은 소재로서 각광을 받고 있다. 항노화 바이오소재는 경제적 수준의 향상과 노령인구의 증가 및 삶의 질에 대한 사회적 욕구를 충족시킬 수 있는 소재로 인식되고 있다. 최근 웰빙 개념이 접목된 천연소재 및 생명공학 기술이 접목된 고기능성 바이오소재들은 생체친화적 소재로 인식되면서 시장에서 큰 호응을 얻고 있다. 바야흐로 해양 바이오소재의 전성시대 도래하였다고 볼 수 있으며, 레티놀, 비타민C, 호르몬 성분에 이어 해양유래 항노화 소재가 주목받으면서 해양자원의 추출물을 기본으로 하는 제품 개발경쟁이 치열해지고 있다. 해양생물로부터 유효한 바이오소재를 탐색하여 항노화 소재로 개발한다면 국내에서도 관련 분야의 산업적, 학문적 발전뿐만 아니라 해양생명공학의 중요성을 재인식하고 새로운 고부가가치 산업의 창출과 국민의 소득증대에 크게 기여할 것이다. 더욱이 고령화 사회에 있어서 여러 가지 관점에서의 quality of life(삶의 질)에 관심이 높아지고 있는 가운데 successful aging(아름답게 나이를 먹는 것)의 실현에 중책을 맡고 있는 항노화 소재의 역할은 앞으로 점점 더 중요해지고 있다.

지금까지 22,000여종의 해양천연물이 분리가 되었고, 현재 미국 식약청(FDA) 혹은 유럽 의약품 기구(EMA; European Medicines Agency)로부터 허가를 받아 시판 중에 있는 의약품들은 Vira-A, Cytosar-U, Prialt, Halaven, Yondelis, Carragelose, Lovaza, Adcetris 등 8개가 있다(Martins, *et al*, 2014). 원색동물 *Aplidium*

*albicans*에서 분리된 Aplidin<sup>TM</sup>(plitidepsin)은 cyclic depsipeptide로서, 혈관내피성장인자(VEGF)의 분비를 억제하며, 세포 주기의 G1-G2기의 진행을 막는다. 현재 골수종을 대상으로 한 임상 2상이 완료되어 3상에 진입한(Martins, *et al*, 2014; Sakai, *et al*, 1996; Brogini, *et al*, 2003; Cuadrado, *et al*, 2003; Taraboletti, *et al*, 2004) 상태이다. 연체동물 *Elysia rufescens*로부터 분리된 lubinectedin는 항암제 platinum에 저항성을 나타내는 난소암에 뛰어난 항암활성을 가지며, 현재 임상 2상이 진행 중이다(Poveda, *et al*, 2014). Marizomib(salinosporamide A)는 해양방선균 *Salinispora tropica*에서 분리된 proteasome inhibitor로서 3년 만에 임상시험에 진입한 획기적인 항암제로서 현재 임상 2상을 진행 중에 있다. 이외에도 다양한 해양생물에서 분리된 많은 해양천연물들이 임상시험 진행 중에 있다.

그러나 해양생물을 대상으로 하는 천연물 연구는 활성물질의 양 확보의 어려움 때문에 개발에 있어서 어려운 점이 많다. 예를 들면, 현재 항암제로 개발된 강력한 항암제인 온텔리스(Ecteinascidin 743, ET-743)의 경우, 이 물질을 생성하는 균체명계 *Ecteinascidia turbinata*에서 1g을 얻기 위해서는 1톤의 균체명계가 필요하다. 또한 뛰어난 항암활성을 보이는 halichondrin B의 경우 1톤의 해면동물(*Lissodendoryx* sp.)로부터, 단지 300mg의 halichondrin B의 2가지 유도체의 혼합물을 얻을 수 있다. 임상 실험을 진행하기 위해 halichondrin B가 1년간 1~5 kg이 필요하기 때문에, 임상에 필요한 양의 물질을 공급하기 위해서는 매년 약 3,000~16,000 톤의 해면동물이 채집되어야 가능한 수치이다 (Proksch, *et al*, 2002; Mendola, 2000; Hart, *et al*, 2000; Mutter, *et al*, 2000). 채집할 수 있는 해면동물의 양은 극히 제한적이며 환경파괴와 종의 멸종을 가져올 수도 있으므로 이처럼 많은 양의 해면동물을 채집하기는 불가능한 일이라 할 수 있다. 이들 물질공급에 대한 대안으로 많은 화학자들이 이 물질들의 합성을 연구한 결과, 전합성에는 성공했지만 이들 물질의 구조가 매우 복잡하여 합성과정도 매우 복잡하며 길고, 수득률이 매우 낮은 문제가 발생하였다(Olivera, 2000 and references cited therein). 온텔리스의 경우에는 미생물이 생산하는 전구체를 이용한 반합성법으로, 할리콘드린의 경우는 구조 단순화 연구를 통하여 원료수급의 문제를 해결하였으며, 이 두 가지 물질은 현재 항암제로서 시판되고 있다.

해양생물에서 분리된 많은 화합물들이 다양하고도 강력한 생리활성과 독특한 활성기작을 나타내어 상당수의 물질이 현재 의약품, 화장품첨가제, 건강보조제 등으로 개발 중에 있으며, 해양생물은 미래의 해양천연물 연구를 이끌어갈 중요한 생물자원으로서 부각되고 있다. 부작용이 없는 항노화 물질을 개발하기 위해서는 비교적 안전하다고 알려진 천연물로부터 탐색하는 것이 필요하며, 본 연구에서는 마이크로네시아와 같은 열대지방 뿐만 아니라 국내의 이어도, 가거초 등과 같은 다양한 해양환경에서 채집/분리한 해양생물 및 해양미생물을 대상으로 하여 항노화 물질의 개발에 관한 연구를 수행하고자 하였다. 특히, 뛰어난 항노화 물질을 발굴시 산업적인 이용에 있어 대량배양을 통하여 활성 물질을 충분히 공급할 수 있는 해양미생물에 중점을 두어 연구를 진행하였다.

## 제 2 절 연구의 목표 및 범위

본 연구의 목표는 해양생물 및 해양미생물을 채집/분리하고 이들의 추출물 library 를 구축하여, 조추출물에 대한 항노화 활성을 검색하여 유용 생물을 선정하고, 선정된 생물로부터 활성물질을 분리, 정제, 구조결정하여 신규의 항노화 물질을 발굴 하는 것이다.

본 연구과제는 국내에서의 독자적인 해양신물질 개발역량을 확보하기 위하여, 해양생물을 채집하고, 해양미생물의 분리 및 체계적인 보존, 배양, 항노화 물질 및 생리활성 해양천연물의 분리정제, 신물질의 구조결정, 생리활성의 검색, 신규 활성유도체의 합성 등의 기술수준을 선진국 수준으로 향상시키려는 기술적 목표(해양생물의 확보 및 해양천연물개발의 기술적 기반구축)와 항노화 물질의 산업적 활용을 위한 활성물질의 발굴 및 이를 효율적으로 공급하기 위한 대량생산 방법을 강구하는 연구를 함께 추구하고 있다.

본 연구에서 해양생물 및 해양미생물을 채집/분리하기 위하여 해양생물을 채집한 지역은 우리나라의 이어도와 가거초 등과 남태평양의 마이크로네시아 축주와 통가 등의 열대지역 등 다양한 해양환경의 생물 및 퇴적토를 포함하고 있다. 먼저 이어도와 가거초 같은 국내 연근해의 해양미생물은 천연물화학적으로 연구가 거의 이루어지지 않아 신물질 발견의 가능성이 매우 높으며, 국내의 해양미생물 연구의 기반을 확립하고자 하였다. 또한 열대지역의 생물이 기타 지역의 생물에 비하여 생리활성물질의 출현빈도와 물질의 농도에 있어서 탁월하다는 점은 널리 알려져 있다(Fautin, 1988). 따라서 본 연구사업에서는 마이크로네시아 주변의 열대지역의 해양생물 및 해양미생물과 같이 생태학적 측면에서 우수한 시료를 연구대상으로 하였다. 본 연구사업에서는 국내연안 및 열대지방의 해양생물의 확보 및 신물질을 화학적으로 규명함과 동시에 다양한 시료에 대한 독자적인 분석기술의 향상을 함께 도모하였다.

2012년의 1차년도 연구에서는 해양생물 및 퇴적토 시료의 확보, 해양미생물의 분리 및 배양, 추출물 library의 구축, 항노화 활성의 검색, 후보균주의 선정, 활성물질의 분리정제와 구조결정 등 연구기반의 확립과 항노화 물질의 탐색에 주력하였다. 먼저 생물시료의 채집에서는 이어도, 가거초 등 우리나라 연근해에서 채집된 해양시료로부터 분리된 미생물과 열대지역 등에서 채집된 189종의 시료를 연구대상으로 하였다. 해양생물 및 해양미생물의 조추출물에 대한 항노화 활성을 검색하여 12종의 해양생물을 일차적인 연구대상 균주로 선정되었으며 이들로부터 각종 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 항노화 물질을 분리하고 그들의 구조를 결정하였다.

2013년의 2차년도의 연구에서는 1차년도에 선정된 유용 생물들 중에서 물질들 중에서 항노화 활성이 뛰어나고 구조가 간단하여 합성이 용이한 물질을 개발후보물질로 선정하였다. 또한 개발후보물질로 선정된 물질들의 신규 활성유도체를 확보하기 위하여 유도체를 합성하였다. 항노화 작용, 염증 억제 등의 다양한 생리활성을 가지는 판테테인과 구조적으로 유사성을 보이는 신물질에 대한 유도체를 합성하였다.

2014년의 3년차 연구에서는 신규 항노화 물질에 대하여 효과적인 대량확보 방법을 연구하였다. 본 연구를 통하여 *Stappia sp.*에서 분리된 신규 crotonic acid의 dimer

의 경우, crotonic acid를 배양배지에 첨가하면 이 신규 물질을 대량확보 할 수 있을 것으로 예상하고 crotonic acid를 배양배지에 첨가하였으나, crotonic acid의 신규 dimer의 생산량이 증가하지 않았다. 따라서 이 물질의 전구체가 crotonic acid가 아닌 것으로 판단하여 유기합성법을 통해 crotonic acid의 신규 dimer를 합성하였다. 또한 개발후보 물질로 선정된 판테테인 신규 유도체의 효율적인 전합성 연구를 수행하였다.

제 2장 국내외 기술개발 현황에서는 항노화 관련 국내외 연구개발 및 특허동향과 시장 동향 등에 대한 내용을 체계적으로 정리하였다.

해양생물 및 해양미생물의 채집과 분리에 대한 상세한 결과는 제 3 장의 제 1절에 정리하였으며, 항노화 물질의 분리정제와 구조결정에 관한 연구결과는 생물종류에 따라 제 3장의 2-11절에 요약되어 있으며, 항노화 물질의 전합성 및 신규 유도체의 합성은 제 7,8절에 요약되어 있다. 제 3장의 마지막 부분인 제 12절 결론에서는 본 연구사업에서 획득한 여러 가지 연구결과를 정리하였다.

이 밖에 제 4장 연구개발목표 달성도 및 관련분야에의 기여도에서는 목표대비 실적에 대한 비교와 미흡한 점에 대한 분석, 본 연구사업의 결과로 발표한 논문 및 기타 학술활동과 특허의 출원/등록 현황을 요약하였고, 제 5장에서는 본 연구사업에서 획득한 연구결과를 분석하고 향후 관련 사업에의 활용계획 및 방향을 제시하였다.

해양생물 및 해양미생물 시료, 분리된 천연물 등의 본 연구사업 통해 얻어진 결과물과 획득한 기술적 정보는 향후의 관련분야의 연구사업을 통하여 지속적으로 이용되어질 것이며 궁극적으로 국내에서의 해양천연물 화학의 발전에 크게 기여할 것이다.



## 제 2 장

# 국내외 기술개발 현황





## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 항노화 연구의 최근 동향

UN에서는 고령화 문제를 보다 적극적으로 대처하기 위해 2002년 마드리드 선언문(Madrid International Plan of Action on Aging, MIPAA)을 발표하였다. 이는 2002년에 지구상에 60세 이상 노인이 6억 명이나 2050년에 20억 명으로 증가(세계인구의 21%)할 것으로 전망하여 스페인 마드리드에서 제2차 세계 고령화 회의를 개최하고 “마드리드 고령화 국제행동계획”을 채택 하였다. 이는 향후 각 국가가 고령화 관련 정책을 수립하고 시행 평가하는데 지침서로서의 역할을 하고 있으며 특히 행동권고 부분에서 노인과 발전, 노년까지의 건강과 안녕증진, 능력을 부여하고 지원하는 환경확보를 설정하고 그 아래 18개 분야의 과제를 제시하면서 분야별로 다양한 행동지침을 권고하고 있다.

세계보건기구(World Health Organization, WHO)에서도 2002년도에 “Active Aging” 정책을 발표한바 있고 노년기의 삶의 질을 높이기 위하여 건강과 사회활동 및 안전에 대한 사회적 안전망을 구축해나가는 과정을 개념으로 삼고 있다. 이를 위해서 노년기의 장애, 만성병 및 조기사망에 대한 부담 완화 및 방지, 생애과정 동안 나타나는 주요 질병 및 위험인자 감소, 지속적인 노인 건강관리와 노인 권리에 대한 사회적 배려, 노년기의 경제활동에 대한 참여, 노인의 능력 및 선호에 따른 일자리 창출 등을 주요 정책 과제로 삼고 있다.

항노화 산업은 최근 급성장하고 있는 분야로 노화의 예방과 방지에 초점을 맞춘 의약품, 기능성 식품, 의료기기 및 화장품 등을 포함한다. Global Industry Analysts社의 “Anti-Aging Products” (2009.1)에 의하면, 건강 유지(health maintenance)와 외모 관리(Appearance Enhancement)로 구분하여 2015년 항노화 산업 시장규모가 2,919억 불에 이를 것으로 전망하고 있다(Table 2-1-1).

Table 2-1-1. World market for health maintenance and appearance enhancement anti-aging products(1 billion \$)

지역/국가	2006년	2008년	2010년	2012년	2014년	2015년	연평균성장률(%)
미국	46.2	55.3	65.0	77.5	92.6	10.2	9.1
캐나다	6.3	7.4	8.7	10.2	12.1	13.2	8.6
일본	13.9	16.7	19.7	23.5	28.2	31.0	9.3
유럽	40.4	48.0	56.3	66.4	78.8	86.0	8.8
아시아-태평양	11.4	13.8	16.3	19.5	23.5	25.8	9.5
중동/아프리카	6.3	7.3	8.4	9.7	11.3	12.1	7.6
남아프리카	10.7	12.7	14.8	17.4	20.5	22.3	8.5
합계	135.2	161.2	189.5	224.3	267	291.9	9.9

참고자료: Global Industry Analysts, "Anti-Aging Products" (2009.1).

출처: 생명공학정책연구센터, “노화연구 및 활용기술” (2009.4).

□ 항노화제품 세계시장을 제품별로 분류하여 살펴보면(Table 2-1-2), 건강유지를 위한 항노화제품 시장은 연평균 8.9%로 성장하여 2006년 1,226억달러에서 2015년 2,634억 달러(90.2% 점유)의 시장을 형성할 것으로 예상된다.

- 노화관련 건강 유지용 의약품은 2006년 1,158억 달러에서 연평균 9.0%로 성장하여 2015년 2,520억 달러로 전체시장의 87%를 차지하는 반면, 노화관련 건강 유지용 보조식품은 비교적 저조한 5.9%의 연평균 성장률로 성장할 것으로 보인다.

- 외모향상을 위한 항노화제품 시장은 연평균 9.4%로 성장하여 2006년 126억달러에서 2015년 285억 달러(9.8% 점유)의 시장을 형성할 것으로 예상되고 있다. 피부관리용 항노화제품 시장은 제품군 중에서 9.97%라는 가장 빠른 성장률을 보이며 2006년 88억 달러에서 2015년 207억 달러로 전체시장의 7.1%를 차지할 것으로 예상된다.

- 모발관리용 항노화제품 시장은 연평균 8.4%의 성장률로 2015년 72억 달러 시장을 형성할 것으로 전망되고 있다.

- 건강관리를 위한 항노화제품 시장은 연평균 8.9%로 성장할 것으로 예측하며, 외모향상을 위한 항노화 제품 시장은 연평균 9.4%로 성장하여 상대적으로 높은 성장속도를 보이며, 그중에서도 특히 피부관리에 대한 항노화제품 시장의 성장률이 가장 높은 것으로 예측된다.

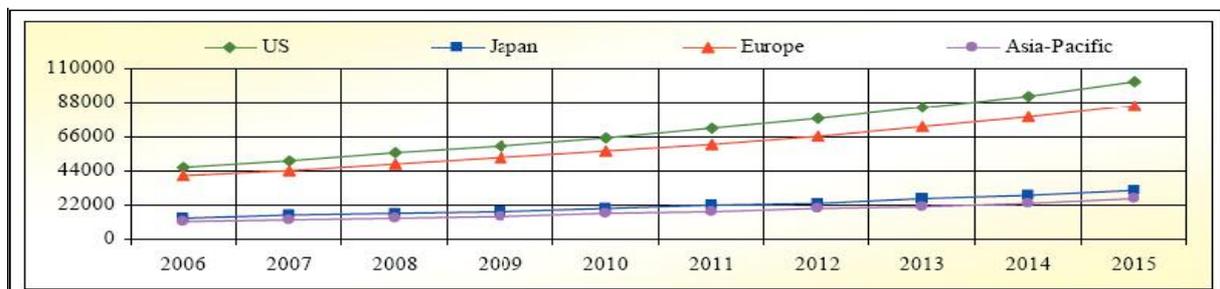
Table 2-1-2. World recent past, current and future analysis for anti-aging products by product segment(1 billion \$)

항목/년도	2006년	2009년	2012년	2015년	연평균 성장률(%)
건강유지를 위한 항노화 제품	122.6	158.1	202.9	263.4	8.87
노화관련 건강유지를 위한 항노화 제품	115.8	150.0	193.4	252.0	9.03
노화관련 건강유지를 위한 보조식품	6.8	8.1	9.5	11.4	5.86
외모향상을 위한 항노화 제품	12.6	16.5	21.4	28.5	9.44
스킨케어 제품	8.8	11.7	15.3	20.7	9.97
모발관리 제품	3.5	4.4	5.6	7.2	8.42
기타	0.3	0.4	0.5	0.6	5.33
합계	135.2	174.6	224.3	291.9	8.92

참고자료: Global Industry Analysts, "Anti-Aging Products" (2009.1).

출처: 생명공학정책연구센터, "노화연구 및 활용기술" (2009.4).

□ 항노화 제품의 지역별 세계시장 현황 및 전망(단위: 백만달러)



○ 항노화 관련 대표적인 제품 및 서비스는 다음과 같으며, 삼성경제연구소(2013년)에 따르면 국내시장은 소비재 분야(주로 화장품)가 75%로 성장을 주도하고 있고, 그 뒤로 의료분야가 약 18%, 서비스분야가 약 7%를 점유할 것으로 예상했다.

- 제품 : 페이스케어, 스킨케어, 헤어케어, 의약품과 보조식품, 기능성식품, 화장품장비 및 피트니스장비 등
- 서비스 : 침습 및 비침습 화장서비스, 보완 및 대체의학요법, 생체재생서비스, 스파, 마사지, 헬스장서비스 등

○ 국내 항노화 산업은 새로운 원료의 개발과 고기능성을 갖춘 제품개발, 소비자 계층의 다양화, 유통구조의 변화 등으로 활발한 연구개발을 하고 있다. 국내의 항노화 연구 개발동향을 특허출원 분야로 분석하여 볼 때, 노화분야의 국내특허는 특허등고선 상에서 어느 한 분야로 치우쳐 있지 않고 노화제어 및 노화기전 분야에 특허들이 위치한다. 노화 관련 특허는 분야별로 노화예방, 노화치료제, 노화조직 재생을 포함한 노화제어 분야의 특허가 총 36%로 가장 많은 비중을 차지한다. 한국특허청에 출원 및 등록된 노화 관련 특허는 노인질환 분야의 특허가 전체의 36%로 가장 큰 비중을 차지하며, 노화제어 분야의 특허가 34%, 노화기전 분야의 특허가 7%를 차지한다.

□ 노화분야의 해외 특허 등고선

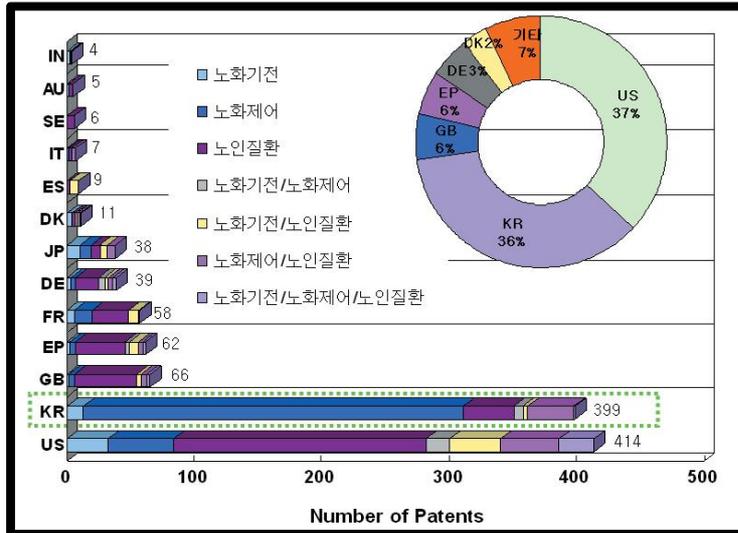


출처: 생명공학정책연구센터, “노화연구 및 활용기술” (2009.4).

Priority country가 한국인 특허는 특허등고선 상에서 빨간색 점으로 표시함.

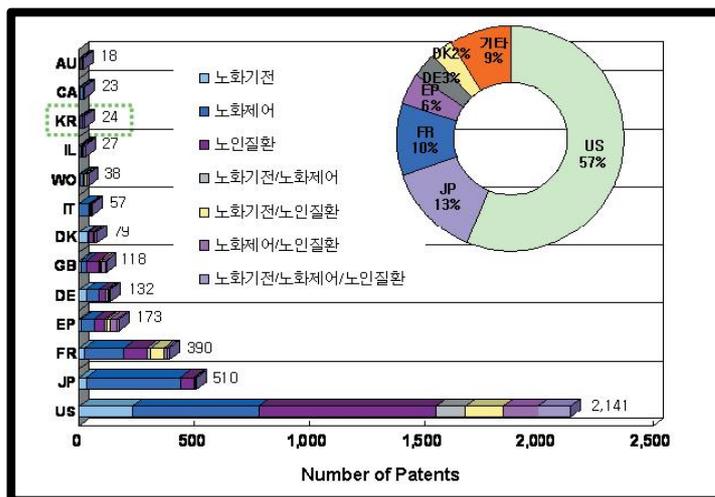
○ 우선권주장국가로 살펴본 국내 노화분야 기술보유 주요 국가는 미국과 우리나라로 각각 414건(37%)과 399건(36%)의 특허를 보유하고 있다.

□ 한국 특허청에 출원된 노화분야 특허 현황



○ 노화분야의 경우, 미국의 국내 진입이 적극적임을 알 수 있으며 영국, 프랑스, 독일, 일본 등 해외기술의 국내진입이 시도되고 있다. 미국의 노화분야 기술개발은 노인질환 분야로 집중되어 있는 것으로 나타나며 미국 외에 영국, 프랑스, 독일 등에서도 노인질환에 대한 기술개발이 보다 활발한 것으로 보인다.

□ 노화분야 특허의 주요 출원 국가

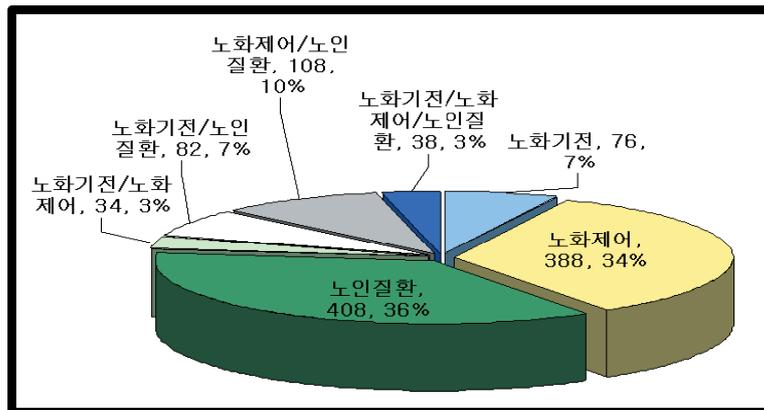


○ 노화분야의 각 국가별 특허현황을 분야별로 살펴보면, 미국은 노인질환, 노화제어 분야 위주로 특허를 출원하고 있다.

○ 일본은 노화제어 분야로의 특허출원이 가장 활발하며 우리나라 또한 노화제어와 노인질환 분야로 75%의 특허를 보유한 상황이다.

○ 반면 국내의 노화 관련 기술개발은 의약품 개발 보다는 피부노화 방지를 위한 화장품 개발 분야에 많이 집중되어 있는 것으로 나타나고 있다.

□ 한국 특허청에 출원된 노화분야 특허 분야별 분포도



○ 우리나라의 노화분야 연구활동은 1990년대 중반부터 시작되어 최근까지 논문발표가 빠르게 증가하고 있으며, 2008년 한 해에 가장 많은 70편의 논문을 발표되었다.

○ 항노화 산업계에서는 소비자에게 신뢰를 주는 원료를 얻기 위하여 ‘청정 이미지’를 가지고 있는 해양생물이나 해양 신소재의 개발에 지대한 관심을 가지고 있다. 해양생물을 대상으로 하는 해양천연물에 대한 연구는 1950년대에 태동되었으나 1960년대 말에 이르러 본격적으로 시작되었으므로 해양천연물화학은 50여년의 짧은 역사를 갖고 있다. 1960년대에 들어서 실용화되기 시작한 핵자기공명장치(NMR)의 등장과 함께, 다이빙 기술의 발달로 해양천연물에 대한 본격적인 연구가 미국, 일본 등의 선진국에서 시작되었다. 최근 해양천연물 연구의 가장 큰 특징은 분석기기의 성능의 향상으로 아주 미량의 천연물까지도 구조를 규명할 수 있으며, 저분자 물질 위주의 연구에서 효소, 단백질, 다당류 등의 고분자 물질까지 연구범위를 넓혔다는 것이다. 또한 해면동물이나 해조류와 같은 해양생물은 물론 심해나 극한 해양환경에 서식하는 해양방선균이나 해양미생물에 이르기까지 해양천연물 연구의 폭이 넓어지고 있다. 해양미생물은 미래의 해양신물질의 보고로 불려 질 만큼 큰 관심을 모으고 있으며, 해양미생물에서 보고되는 신물질의 수도 지속적으로 증가하고 있다. 최근의 해양천연물연구는 내용면에서도 단순한 신물질의 분리 및 구조결정에서 벗어나 천연물의 대량생산법의 개발, 고속 생리활성 검색방법의 개발, 활성물질의 작용기작의 규명, 천연물의 유도체의 합성 등 연구의 방향이 더욱 다양화되고 있다. 또한 해양천연물의 산업적 개발을 어렵게 하는 가장 중요한 요인인 “원료물질의 대량확보 문제”를 해결하기 위한 연구가 많이 이루어지고 있다. 원료공급

의 문제를 해결하기 위하여, 해면동물이나 무척추동물의 대량양식, 공생미생물의 대량배양, 유전공학적 기법의 응용 등 다양한 시도가 이루어지고 있다. 해양천연물 연구개발의 목적도 항암제와 같은 의약품 개발 이외에 항노화 물질, 건강보조제, 기능성화장품, 농약, 방오제 등의 개발로 다양화되고 있다.

## 제 2 절 주요 국가의 연구 현황

### 1. 미국

○ 미국은 고령화 대응을 위한 노인대상의 연구지원 관련한 법으로 Older American Act(1965년 제정)가 있으며 이 법에 의해 국립보건원(National Institutes of Health, NIH) 산하에 국립노화연구소(National Institutes of Aging, NIA)를 설립하여 노화관련 연구를 수행하고 있다. 국립노화연구소는 1974년 설립되었는데 노화관련 연구를 전담하여 연구결과를 보급하고 관련 산업 발전의 핵심적 역할을 수행하고 있다. NIA는 연구소내의 자체 연구 및 대학, 관련 연구소와의 공동연구를 통하여, 노화의 기전 연구 및 과학적 기반 마련에 역점을 둔 연구를 수행하며, 이 기관에서 수행된 연구 결과는 노화 관련 정보의 보급이나 관련 프로그램을 통한 관리 및 교육 형태로 사회에 제공하고 있다. 또한 알츠하이머병을 포함하여 다양한 노인성 질환의 연구를 수행하고 있으며, 노화의 문제를 사회학, 행동학 등 다양한 분야와 접목하여 다루고 있다. 항노화 연구의 수행을 위해 미국 정부는 매년 1조원 이상의 연구비를 지원하며, 연구원 규모도 780명에 달하는 등 활발한 연구활동이 이루어지고 있다. NIA는 Action Plan for Aging Research를 통해 ①노인의 건강과 삶의 질 향상, ②건강한 노화과정의 이해, ③고령자와 인구 사이의 건강 불균형 감소, ④노화연구 지원 자원 확대를 4대 목표로 제시하고 있다.

○ NIA의 예산은 연간 10억 달러 수준을 유지[2013년 예산: 11억불(약 1조2천억원, 2013년5월 기준)]하고 있으며, 예산의 70% 정도가 연구프로젝트에 사용되고 있고, 연구프로젝트 예산은 대부분 비경쟁 분야의 연구프로젝트 예산의 대부분을 사용하고 있다.

○ 미국의 항노화 물질 시장은 주로 건강유지 및 외모 관련 항노화 제품 제조에 사용되는 의약 활성물질, 비타민·항산화물질, 허브 추출물, 콘드로이틴과 기타로 구분할 수 있다. 이중 의약 활성물질은 비호르몬 항관절염제가, 비타민·항산화물질로는 비타민 E, 코엔자임 Q10 등이 중요한 비중을 차지하고 있으며, 허브추출물의 경우 은행, 콩, 인삼 등이 중요한 위치를 차지하고 있다.

○ 미국에서 해양생물유래 항노화 물질 개발 연구는 NIH(National Institute of Health)와 National Sea Grant College Program 등 두 기관에 의하여 주로 지원되고 있으며, 거대 연구기관과 무수한 기업들, 여러 거대 제약회사들도 독자적 혹은 산·학·연 공동연구를 통하여 해양생물유래의 항노화 물질 개발 및 산업화 연구를 활발히 수행하고 있다.

### 2. 일본

○ 일본은 국립장수의료센터 산하에 NILS(National Institute for Longevity

Science)를 1995년 설립함으로써 다양한 항노화 연구 및 관련 의료의 중추적 기능을 수행하고 있으며, 관련 연구에 연간 2,000억원 규모의 연구비를 투입해오고 있다. 아울러 2010년에는 국립장수의료센터가 독립행정법인이 되면서 항노화 관련 병원과 연구소, 치매관련 연구센터, 사회과학 연구센터의 부문으로 체계를 구축하고 관련된 연구개발을 진행해오고 있다. 주요 기능으로는 노화 관련 연구개발 활동의 수행뿐만 아니라, 의료·산업·학계가 연계되는 클러스터의 형성으로 산업발전의 기반을 마련하고, 고령자와 가족의 연계지원 및 고령자에게 가 요양 지원 활동 등을 수행하고 있다. 또한 고령층에게 주요 질환의 원인이 되는 ‘내장지방 증후군’의 사전진단 및 관리를 위해 국가 차원에서 진단 및 관리가 이루어지고 있으며, 이는 비만 관련 기능성 식품 및 생활체육 서비스시장 등에 대한 잠재적 수요를 반영하고 있다.

일본에서의 해양천연물을 비롯한 해양생명공학 연구는 상당부분 경제산업성, 과학기술청, 농림수산업성 등의 정부 주도하에 연구가 수행되고 있으며, 일본의 노화 관련 시장 규모는 세계 시장의 9.7%를 차지하고 있다.

### 3. 유럽

○ 영국은 고령화에 대응하여 2001년 제정된 「노인을 위한 국가 서비스 협약(NSF: National Service Framework for Older People)은 10개년 중장기 계획으로 노인들을 위한 보건 및 복지 서비스 제공에 공정성과 질 향상을 위한 지침을 마련하였다.

○ 영국의 국가보건서비스 증진을 위한 중장기적인 전략지침서인 NSF에 노인을 포함하여 심장질환, 암, 소아집중치료, 정신보건, 당뇨, 장기요양치료, 신장 등의 8개 분야를 지정하였다. NSF의 성공적인 실시와 개발 및 평가를 위해 조사연구 지침 및 주요 과제를 제시하여 조사연구 과제는 노화에 대한 장기적 연구, 치료서비스 제공에 대한 평가, 지속적인 치료서비스에 대한 연구 등이 있다.

○ 영국의 보건복지를 담당하는 기관인 DoH(Department of Health) 산하 국립연구기관으로는 NIHR(National Institute for Health Research), NICE(National Institute for Clinical Excellence), NHS(National Health Service) 등이 있으나, 노화 종합 관련 전문 연구기관은 아직 설립되어 있지 않은 실정이다. 따라서 국립연구기관, 개별 연구위원회, 민간재단 등의 전국적 네트워크를 중심으로 노화연구가 수행되며, 노인 관련 연구에 관한 기금을 지원하는 연구 위원회는 MRC(Medical Research Council), BBSRC(British Science Research Council), EPSRC(Engineering and Physical Science Research Council)등이 있으며 민간재단으로서는 Wellcome Trust가 대표적이다(김현영, 2013).

○ 노화와 관련된 질환 중 하나인 골다공증에 대한 EU 5개국(영국, 프랑스, 독일, 이탈리아, 스페인)의 2006년~2016년 동안 연평균 치료제 시장 성장률은 8.1%로 미국과 일본 시장보다 더 빠르게 성장하는 것으로 조사되었다(보건산업동향, 2014).

○ 항노화 연구의 경우 유럽연합의 공동 기획연구인 FP7 프로젝트를 통해 노화 관

런 연구가 수행되고있 으며, 그 주요 내용은 다음과 같다(보건산업동향, 2014).

- Healthy Food for Life (2009.3.1~2013.2.28) : EU 지역의 장수식품 연구.
- Do-Health (2012.1.1~2017.6.30) : 비타민-D3, 오메가-3, 가정 내 운동과 장수 및 건강한 노화 관련 연구.
- Best Aging (2013.2.1~2017.1.31) : EU 고령인구의 심장질환 진단을 위한 바이오마커 개발 연구.

### 제 3 절 국내의 연구개발 동향

최근 고령화의 빠른 진행과 건강한 삶에 대한 소비자들의 요구의 증가로 국내에서도 ‘Anti-aging’ 이 새로운 소비 트렌드로 부각돼 신시장을 형성하고 있으며, 항노화산업이 미래 먹거리 창출을 위한 산업의 하나로서 그 중요성이 증가되고 있어 항노화 소재에 대한 연구개발도 꾸준히 증가하고 있는 추세이다. 이러한 트렌드의 배경에는 웰빙 개념이 접목된 천연소재 및 생명공학 기술이 접목된 고기능성 소재들이 생체친화적 소재로 인식되면서 시장에서 큰 호응을 얻고 있으며, 2000년대 이후 원료의 효능과 효과를 과학적으로 밝힐 수 있는 바이오기술 및 생명공학 기술의 발전과, 물질적인 만족보다 정신적인 만족을 추구하는 새로운 트렌드인 웰빙(well-being) 및 웰에이징(well-ageing)의 개념이 확대되고 있기 때문이다. 우리나라의 항노화산업 시장도 글로벌 시장의 성장세와 유사하게 급속한 성장을 보일 것으로 전망되고 있는데, 2010년 약 11조원의 규모였던 항노화 시장은 2020년에는 27조원 규모로서 연평균 9.5%의 성장을 보일 것으로 예상된다. 항노화제품 분야에 대해 세부적으로 시장 전망을 살펴보면, 항노화 의약품의 경우 2005년 2조 641억원 규모에서 2015년에는 6조 6,672억원으로 12.4%의 연평균 성장률을 보일 것으로 예상되어 글로벌 시장의 평균적 성장률을 상회할 것으로 보인다(문혜선, 2014). 또한 우리나라의 항노화 화장품 시장은 항노화제품 분야 중 성장성이 매우 높은 분야로서 2011년의 시장 규모가 24억 달러로 세계 시장에서 6위 수준에 달하고 있다. 특히 우리나라는 화장품 시장에서 항노화 화장품이 차지하는 비중이 높아 향후 항노화 화장품을 중심으로 한 시장의 성장이 두드러질 것으로 예상된다. 따라서 국내의 항노화 소재의 연구개발도 항노화 화장품의 개발에 대한 연구가 중점적으로 이루어지고 있는 실정이다. 기능성 화장품은 화장품 기술에 의약 기술을 접목시켜 미용 뿐 만 아니라 치료와 예방작용을 하는 화장품군으로, 경제적 수준의 향상과 노령인구의 증가 및 삶의 질에 대한 사회적 욕구를 충족시킬 수 있는 제품으로 인식되고 있다. 특히 노화방지용 기능성화장품에 대한 요구는 이러한 시대적 배경과 젊고 탄력 있는 피부에 대한 미적 욕구와의 상승작용으로 천연물 유래의 기능성소재 및 이를 활용한 제품 및 기능성 화장품 수요가 폭발적으로 증가하고 있다. 그러나 국내 화장품의 주요 원료는 수입의존도가 80% 이상이며, 국내시장 30대 브랜드에 4개 화장품만이 포함되고 있을 뿐만 아니라, 해외수출기반 역시 취약한 상태이다.

항노화 식품의 경우 가장 주요한 부문인 기능성 식품 시장을 중심으로 할 때, 국내시장 규모는 2008년 이후 연평균 15.1% 씩 성장하여 2012년에는 약 1조 4,000억원 규모로 성장하였으며, 건강 및 웰빙을 중심으로 한 기능성 식품의 비중이 높다. 항노화 의료기기 분야는 2004년 약 2조 3,000억원에서 연평균 9%의 빠른 성장을 보임으로써 2012년에는 약 4조 6,000억원 규모에 달하는 시장이 형성되어 있다.

국내의 해양천연물 분야의 연구수준은 선진국에 비하여 전반적으로 제법 뒤떨어져 있으며, 해양생물로부터 항노화 물질의 개발에 관한 연구는 아주 적다. 전통적으로 국내 천연물 연구진의 주된 연구대상은 약용식물이나 자생식물, 토양방선균 등 육상생물이었으

며, 해양생물을 대상으로 하는 해양천연물을 연구하는 연구 자체가 많지 않았다. 그러나 지난 수년 사이에 정부 및 학계와 연구계를 중심으로 해양천연물에 대한 관심이 점차 고조되고 있다. 2000년 천연물신약연구개발촉진법의 시행과 2004년 마린바이오21 사업의 시작 등과 함께 해양생물 유래의 신규 천연물의 탐색 및 개발에 대한 국내의 연구노력은 최근 점차로 활성화되는 경향을 보이고 있다. 서울대, 부산대, 부경대, 제주대, 한국해양대, 한밭대, 군산대 등의 대학과 한국해양과학기술원을 중심으로 한 정부출연연구원이 국내연안의 해양생물 유래의 신물질 탐색 및 개발이 활기를 띄고 있다. 연구의 대상 및 목표도 다변화되고 있어 해양 무척추동물과 해조류를 중심으로 한 연구에서 미세조류 및 불가사리와 같은 저이용 해양생물로 확대되고 있으며, 연구의 목적도 해양천연물로부터 신의약품의 개발 및 극한유전체 및 유용효소를 이용하려는 연구까지 다양하다. 아직 전반적인 기술수준은 생리활성의 검색과 활성물질의 탐색 및 기능성 화장품이나 건강식품 개발의 수준에 그치고 있으나, 기술적으로 의약품 개발을 위한 선도물질의 도출 수준에 이른 연구도 드물지 않아 가까운 장래에 국내의 해양천연물연구도 상당한 수준에 이를 것으로 기대되며, 항노화 바이오소재 개발 분야의 연구에서도 상당한 진전이 있을 것으로 예상된다.

○ 국내 항노화 산업 가운데 화장품은 아모레퍼시픽(매출 2조5,500억원, 2011년 기준), LG생활건강(매출 3조 4,500억원, 2011년 기준) 등 대규모 소비재 기업이 이끄는 반면, 의료 및 미용 서비스는 개인 사업자 위주여서 화장품이 항노화 산업을 주도하는 구조이다.

○ 아모레퍼시픽에서는 바다 달팽이의 독성분의 모사체를 함유하는 항노화 성분인 마린 링클 독신(Marine Wrinkle-Toxin™)을 개발하여 시판 중에 있다(Fig. 2-3-1). 이 성분은 노화 주름은 물론, 잦은 표정 변화로 생기는 미세 주름까지 완화시키는 효과를 나타낸다고 한다.



Fig. 2-3-1. Photo of a Wrinkle Cream, Marine Wrinkle-Toxin™.

○ 한국식품개발연구원은 전통적으로 노화억제에 사용된 식물을 대상으로 체내 단백질의 당화억제를 이용한 항노화 식품소재 및 국산 특용작물로부터 골다공증 억제식품 개

발을 추진하였다.

○ 경상남도는 미래 50년 먹거리의 주력산업으로 항노화 바이오산업을 선정하고 집중 육성하기 위해 2022년까지 국비 1,961억원, 지방비 2,187억 원, 민자 1,431억 원 총 5,579억 원을 투입해서 항노화 바이오산업의 거점으로 육성할 계획이다.

○ 제주도는 지난 2011년 항노화 산업 제품화 기술사업과 2012년 항노화 산업 지원을 위한 인프라 구축과 제품 개발 과제에 국비 160억원 등 총 260억원의 사업비를 투입하였으며, 제주도의 해조류에서 추출한 씨놀(Seanol) 성분을 이용하여 건강기능식품으로 출시한 바 있다.

○ 부산대 최원철 교수(생물학과) 연구팀은 1999년부터 해양수산부 연구개발(R&D)사업(해조류 및 해면으로부터 노화억제제 개발)으로 6년간 과제를 수행하였으며, 해조류 곰피로부터 항노화 물질의 개발을 추진하였다. 본 연구팀은 미백효과와 주름살 제거에 효과가 있는 기능성 화장품인 “Ecklonia”를 개발하는데 성공하였다.



Fig. 2-3-2. Photos of a Brown Alga *Ecklonia cava*(left) and Skin Creams containing the algal extract(right).

(사진출처: 연합뉴스)

요약하면 국내에서 해양생물유래의 항노화 물질에 대한 연구개발은 아직 활성화 되지 못하고 있다. 그러나 최근 국내에서 학계와 연구계를 중심으로 해양생물은 물론 해양방선균 및 해양미생물 유래의 항노화 천연물 연구에 대한 관심이 고조되고 있으며, 기술축적도 빠르게 진행되고 있어서 멀지 않은 시일에 이 분야의 연구개발이 활성화될 것으로 예상된다.

# 제 3 장

## 연구개발 수행 내용 및 결과





## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제 1 절 해양생물의 채집, 추출물 조제 및 항노화 활성 검색

#### 1. 해양생물 및 해양미생물의 채집 및 분리

해양생물로부터 항노화 활성을 가지는 바이오 소재의 발굴을 위하여 1차년도(2012년)에 채집한 해양생물과 최근 몇 년간 국내 및 국외에서 분리한 해양미생물(Table 3-1-1)을 연구대상으로 하였다. 해양미생물을 분리하기 위한 대상 지역은 국내 연근해 및 축, 통가와 같은 열대지역을 대상으로 하였으며, 본 연구의 추출물 조제에 사용된 해양생물은 1차년도에 마이크로네시아의 축주에서 채집한 해양생물을 대상으로 하였다(Fig. 3-1-1). 샘플들은 대부분 스킨스쿠버나 스노클링에 의해 채집되었으며, 수심에 따라서는 core sampler나 직접 손으로 채집된 시료도 있다.

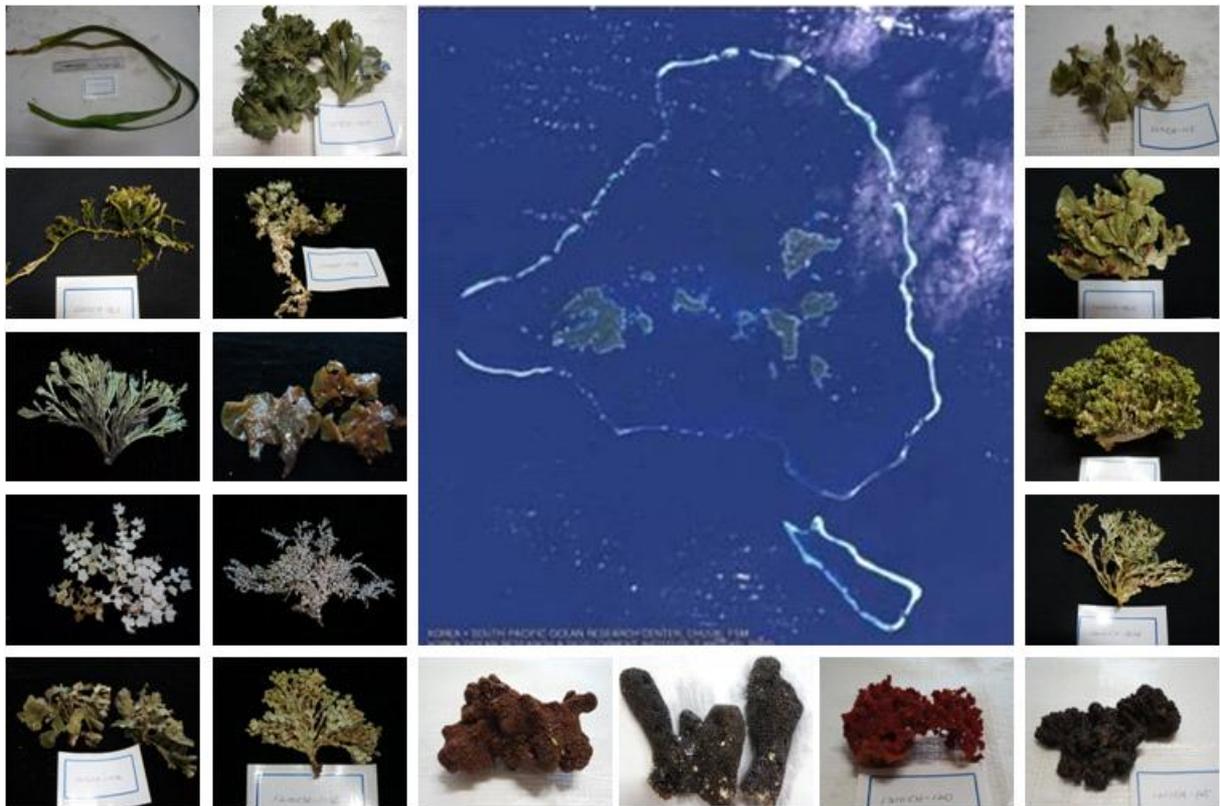


Fig. 3-1-1. Sampling area and photos of marine samples collected from the Chuuk islands in Micronesia.

해양미생물 분리를 위한 해양생물 및 샘플은 해조류 및 해면동물, 연체동물, 연산호 등의 해양무척추동물과 해양퇴적토, 해수 등을 주된 대상으로 하였다. 즉, 해양생물에 공생하는 해양방선균 및 해양미생물과 해양퇴적토(sediments)와 해수에 서식하고 해양미생물들이 주요한 타겟이었으며, 생물다양성이 아주 풍부한 열대지역의 마이크로네시아와 국내에서는 이어도와 가거초 등에서 해양미생물을 분리하였다(Table 3-1-1).

Table 3-1-1. Sampling sites and the number of isolated and extracted strains

Strains ID	Date	Site	Total Strains	Extract of culture
09GGC	2009.	Gageocho	197	11
108KO	2010.	Kosrae	90	6
109GGC	2010.	Gageocho	20	4
1110CH	2011.	Chuuk	782	4
09IDYM	2009.	Ieodo	34	29
09ID	2009.	Ieodo	213	31
102CH	2010.	Chuuk	665	14
112CH	2011.	Chuuk	356	49
114TG	2011.	Tonga	318	20
<b>Total</b>			<b>2,675</b>	<b>168</b>

#### 가. 해양미생물의 분리, 보존

채집된 해양생물 및 시료는 현장에서 멸균된 가위나 칼, 스푼, 피펫 등으로 시료의 일부분을 취한 후에 멸균된 비닐 봉지나 파우치백, 혹은 튜브에 넣고 미리 준비한 멸균 해수를 넣고, 시료를 잘게 부수거나 잘 희석한 후에 순차적으로 희석하였다. 이렇게 준비된 희석액을 해양미생물 분리용 평판배지에 접종하여 도말하는 방법으로 시료에 함유된 해양미생물들을 분리하였다. 해양미생물의 분리는 주로 Marine Agar 2216(Difco)나 Bennett's 배지를 사용하였으며 해수와 증류수의 비율을 70%/30%(v/v)로 하였다. 해양미생물의 분리는 시료를 도말한 배지를 28~30℃에서 4~7일 동안 배양하여 형성된 colony(집락)을 분리하였다. 형성된 집락들을 육안으로 형태를 관찰하여 특성에 따라 새로운 고체배지에 접종하여 동일 형태의 순수한 집락을 형성하도록 30℃에서 재차 배양한 후 순수하게 분리하였다. 순수 분리된 해양미생물의 보존은 멸균 해수와 glycerol 혼합용액(80%/20%)에 현탁시킨 다음 -70℃에서 보관하였다. 이와 같은 방법으로 2,675종의 해양미생물 및 해양방선균을 분리하여 보존하였다(Table 3-1-1).

해양방선균의 경우에는 전처리를 실시하여 분리를 하였다. 시료의 적당량(약 1g 정도)을 멸균된 해수 9ml이 채워진 vial에 넣고 미생물이 희석액에 잘 빠져 나오도록 5분 동

안 sonification 한 후에, 일반적인 미생물의 증식을 억제하기 위하여 60°C oven에서 50분간 처리(Voelskow, 1989) 해 주었다. 열처리를 마친 시료를 다시  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  배 등으로 순차적으로 희석하여 미리 준비해 놓은 변형된 Bennett's agar, Humic acid Vitamin agar(Nonomura, *et al*, 1971), Marine Agar 2216(Difco), actinomycetes isolation agar 등의 배지에 각각 0.1ml씩 넣고 spreader를 이용하여 골고루 도말하여 30°C incubator에 배양하였다. 보통 7일에서 30일 정도 동안 배양 후에 형성된 균체들의 집락(colony) 형태를 관찰하여 특징에 따라 Bennett's 배지에 단일 colony를 접종하여 동일 형태의 순수한 집락을 형성하도록 30°C incubator에 배양하였다. 이런 과정을 몇 번을 거쳐 순수 분리된 해양방선균을 멸균 해수와 glycerol 혼합용액(80%/20%)이 담긴 튜브에 현탁시켜 하루 동안 실온에 방치한 후 vortex하여 -70°C에서 보관하였다(Williams, *et al*, 1982; Okami, *et al*, 1988; Berdy, 1989; Gray, *et al*, 1968).

해양미생물 및 해양방선균의 분리, 보존에 사용된 배지의 조성은 아래와 같다.

1) Bennett's agar medium

1.0g	Bacto Yeast extract
1.0g	Beef extract
2.0g	Tryptone
10g	Glucose
18g	Bacto Agar
1L	Sea Water : Distilled water(7:3)
pH	7.2

2) Modified Bennett's agar medium

0.5g	Bacto Yeast extract
0.5g	Beef extract
2.0g	Tryptone
5g	Glucose
18g	Bacto Agar
1L	Sea Water : Distilled water(7:3)
pH	7.2

3) Humic-acid vitamin(HV) agar

1.0g	Humic acid*
0.5g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1.71g	KCL
0.05g	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O

0.01g FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O  
 0.02g CaCO<sub>3</sub>  
 18g Bacto Agar  
 1L Sea Water : Distilled water(7:3)  
 pH 7.2  
 Vitamin \*\*  
 50 ppm Cycloheximide  
 10 ppm Nalidixic acid

\*0.2N NaOH 10ml에 녹임. \*\*Thimine-HCl, riboflavin, niacin, pyridoxine-HCl, inositol, Ca-pantothenate, Ca-aminobenzoic acid 각각 0.5mg과 biotin 0.25mg을 넣어 만듦.

4) Actinomycetes isolation agar

2.0g Sodium Casinate  
 0.1g Asparagine  
 4.0g Sodium Propionate  
 0.5g Dipotassium Sulfate  
 1L Sea Water : Distilled water(7:3)  
 pH 8.1

4) Marine Agar 2216

5.0g Peptone  
 1.0g Yeast Extract  
 0.1g Ferric Citrate  
 19.45g NaCl  
 8.8g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 3.24g MgSO<sub>4</sub>  
 1.8g CaCl<sub>2</sub>  
 0.55g KCl  
 0.16g NaHCO<sub>3</sub>  
 0.08g KBr  
 34.0mg SrCl<sub>2</sub>  
 22.0mg B(OH)<sub>3</sub>  
 4.0mg Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>  
 2.4mg NaF  
 1.6mg NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>  
 8.0mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 15.0g Agar  
 1L Sea water : Distilled water(7:3)  
 pH 7.6

#### 나. 해양생물의 추출물 조제

채집된 해양생물은 멸균해수로 세척 후 동결 건조 후에 운송하였으며, 80% MeOH과 메틸렌클로라이드(MC)를 사용하여 추출하였다(Fig. 3-1-2, Table 3-1-2). 해양생물 추출물은 감압농축 후 냉동보관하며 항노화 활성 측정을 위한 시료로 사용하였다.



Fig. 3-1-2. Photo of marine samples extracted with 80% MeOH and methylene chloride(MC).

Table 3-1-2. Extracts from marine organisms with 80% MeOH and MC

No.	Sample ID	80%MeOH Ext.(mg/g)	MC Ext.(mg/g)
1	1210CH-301	114.8	4.5
2	1210CH-302	52.6	1.2
3	1210CH-303	22.4	0.9
4	1210CH-304	68.2	1.2
5	1210CH-101	122.5	4.9
6	1210CH-102	87.7	2.1
7	1210CH-103	40.6	0.8
8	1210CH-104	54.2	0.4
9	1210CH-105	85.2	0.6
10	1210CH-108	469.8	3.9
11	1210CH-109	41	0.2
12	1210CH-110	57.3	0.1
13	1210CH-111	166.1	2.5
14	1210CH-112	38.3	1.3
15	1210CH-114	55.1	0.9
16	1210CH-115	77	4.8
17	1210CH-120	101.2	18.2
18	1210CH-123	51	1.1
19	1210CH-124	177.8	8.7
20	1210CH-125	122.1	11.7
21	1210CH-127	159.2	11.7

#### 다. 해양미생물의 추출물 조제

분리, 보존된 해양미생물들 중에서 콜로니의 형태가 특이하거나 배양학적으로 특이한 성상을 나타내는 168 종의 해양미생물들을 먼저 BN배지에 접종하여 28℃에서 7일간 교반하며 소량 배양하였다. 균주의 배양액을 에틸아세테이트를 용매로 사용하여 추출하였으며 감압농축하여 추출물을 얻었으며, 이들 추출물은 -20℃에서 냉동보관하며 항노화 활성 측정을 위한 시료로 사용하였다.

#### 라. 해양생물 및 미생물 추출물의 항노화 활성 검색

다양한 해양환경에서 채집 및 확보된 해양미생물과 해양생물 추출물 189점에 대한 항노화 활성을 검색하기 위하여 다양한 활성을 측정하였다.

##### 가) 항산화 활성 측정

활성산소는 생리계에서 생체 방어 작용을 하는 장점도 있지만 일반적으로 생체내에서 산화를 일으켜 노화, 각종 성인병질환, 암 등 질병을 유발하는 유해 작용을 한다는 연구가 많이 보고되고 있으므로 해양생물의 항산화 활성을 측정하여 해양생물의 항노화 활성을 탐색하고자 하였다.

항산화 활성은 DPPH radical 소거 효과를 측정하였다. 0.2 mM DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) 에탄올 용액을 제조하여 1 mg/ml 농도로 희석된 추출물과 혼합하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 515 nm에서 흡광도를 측정하였으며 negative control엔 에탄올, positive control로는 kojic acid와 arbutine을 사용하여 활성의 유무를 확인하였다. DPPH radical 소거능은 아래 식으로부터 계산되었다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = [1 - (\text{sample/negative control})] \times 100$$

##### 나) 미백 활성 측정

또한 미백, 자외선 차단 등을 통해 피부 노화 방지와 피부 건강 유지 및 보호를 위한 건강기능성화장품 시장이 방대하게 형성됨에 따라 미백활성을 측정함으로써 해양생물들의 항노화 활성 기능소재로서의 가능성을 검증하고자 하였다.

미백 활성은 L-tyrosine에 대한 tyrosinase 저해 활성으로 확인하였다. 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5) 220  $\mu\text{l}$ , 1 mg/ml 농도의 추출물 20  $\mu\text{l}$ , 1500 U/ml mushroom tyrosinase 20 $\mu\text{l}$ 를 혼합한 반응액에 1.5 mM L-tyrosine 40  $\mu\text{l}$ 를 처리하여 37℃에서 10분간 반응시켰다. 반응액은 ELISA reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였으며 negative control엔 buffer, positive control에는 kojic acid와 arbutine을 사용하여 활성을 확인하였다. Tyrosinase 저해 활성은 아래 식으로부터 계산되었다.

$$\text{Tyrosinase inhibition activity (\%)} = [1 - (\text{sample/negative control})] \times 100$$

## 다) B16F10 Murine Melanoma 세포를 이용한 멜라닌 생성 억제능 측정

### (1) 세포독성 측정

B16F10 cell suspension 을  $1 \times 10^5$  cells/ml의 농도로 96 well plate 의 well 에 100  $\mu$ L 를 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 시료를 농도별로 처리하여 48시간 동안 배양한 후, MTT 용액을 well 당 50  $\mu$ L 씩 넣어 4시간 동안 배양하여 상층액을 제거하고 DMSO를 well당 100  $\mu$ L씩 넣어 가볍게 흔든 후, 암실에 15분 동안 방치하였고 그 후, ELISA plate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### (2) Melanin 생성 억제 실험

B16F10 cell suspension을 well당  $1 \times 10^5$  cells로 6 well plate에 첨가하여 24 시간 동안 배양하였다. 배지를 교체한 후, 농도별로 시료를 처리하고 48시간 동안 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후, 배지를 제거하고 PBS로 세척하고 Trypsin-EDTA를 이용하여 cell을 회수하여 세포수를 측정하였다. 그 후, 10,000 rpm으로 원심분리 한 후, pellet을 얻어 60°C에서 건조시킨 후, 10% DMSO가 함유된 1M 수산화나트륨 용액 100  $\mu$ L를 넣어 60°C 항온조에서 세포내의 멜라닌을 얻어 ELISA plate reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 표준품(Sigma Co. USA)으로 얻은 표준 검량선을 이용하여 각 well에서 얻은 멜라닌 양을 계산하였다. 멜라닌은 단위세포( $10^4$  cells)에서의 멜라닌 생성량을 비교하였다.

## 라) 항염활성 측정

### (1) 세포배양

마우스의 대식세포주인 Raw 264.7 cell은 한국세포주은행 (KCLB)에서 분양 받았으며, 세포배양을 위해 10% FBS과 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM 배지를 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.

### (2) MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

Raw 264.7 cell  $5 \times 10^4$  cells/ml를 96 well plate에 분주하고 시료를 농도 별 (6.25, 12.5, 25, 50  $\mu$ M/ml)로 24시간 동안 처리하였다. Well당 20  $\mu$ L의 MTT용액을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 4시간 동안 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다.

### (3) Nitric Oxide 생성량 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 griess reagent를 이용하여 측정하였다. Raw 264.7 cell은 DMEM배지를 이용하여  $5 \times 10^5$  cells/ml로 조절한 후 6 well plate에 접종하고, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 전 배양하였다. 세포에 1  $\mu$ g/ml의 LPS를 처리하고 1시간 뒤에 농도별로 시료를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양액의

상층액을 얻은 후 griess 시약과 반응 시킨 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO 생성율을 백분율로 표시하였다.

#### (4) iNOS 발현량 측정

NO의 생성을 유도하는 효소인 iNOS의 단백질 발현량에 미치는 시료의 영향을 조사하기 위해 western blotting을 실시하였다. Raw 264.7 세포를 60 mm tissue culture dish에  $2 \times 10^4$  cells/well에 되도록 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 후 시료를 농도별로 처리한 배지로 교환하고 24시간 배양한 후 PBS로 세척하였다. Lysis buffer 100  $\mu$ L을 첨가하여 세포를 용해시키고 원심분리하여(4°C, 12,000 rpm, 20 min) 세포막 성분들을 제거하였다. 원심 분리하여 얻은 단백질은 bradford assay로 정량하였으며, 60  $\mu$ L의 단백질을 10%의 SDS-PAGE를 이용하여 전기 영동한 후, 항체의 비특이적 결합을 억제시키기 위해 PVDF membrane에 옮긴 다음 30~40 V에서 2시간 이상 transfer하였다. Transfer가 끝나면 ponceau에 담근 후 band를 확인하고 TBST로 2회 이상 씻은 후 꺼내서 5% skim milk로 overnight 시켜 background는 제거시켰다. 3회 washing 후 1차 antibody(1:1000)를 1시간 동안 붙인 후 다시 2차 antibody(1:1000)를 붙이고 ECL-kit(Amersham Pharmacia, England)를 이용하여 film에 옮겨 측정하였다. Band density는 Gel doc(Bid-rad, America)으로 확인하였다.

#### (4) COX-2 발현량 측정

시료의 COX-2의 단백질 발현량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 iNOS 측정과 같은 방법으로 western blotting을 실시하였다. 시료를 처리한 세포를 모아 PBS로 2회 씻어낸 후 Pro-prep 시약 100  $\mu$ L를 가하여 -20°C에서 10분간 방치한 뒤 4°C에서 12,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 얻어진 세포 내 단백질 용액을 Pro-measure 시약을 사용해 단백질 농도를 정량하고, 50 $\mu$ g의 단백질을 취하여 샘플 버퍼와 혼합하여 95°C에서 5분간 가열한 후 -20°C에서 보관하였다. 완성된 샘플은 10% SDS-PAGE를 이용하여 전기영동 시킨 후 PVDF membrane으로 단백질을 transfer시켰다. Transfer가 끝난 membrane은 iNOS primary antibody를 5% skim milk 용액에 정해진 비율대로 희석하여 4°C에서 overnight 하였다. 다음날 TBST로 5분씩 3회 세척한 후 2차 antibody를 1시간 동안 상온에서 배양시켰다. 다시 TBST로 10분씩 3회 세척한 후 ECL-kit(Amersham Pharmacia, England)를 이용하여 film에 옮겨 측정하였다. Band density는 Gel doc(Bid-rad, America)으로 확인하였다.

#### 마) Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) 저해활성 측정

세포를  $1 \times 10^4$  cells/well 농도로 96 well plate에 접종한 후, 각 well에 시료를 첨가하여 CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양하였다. MMP-1의 활성을 높이기 위하여 TNF- $\alpha$ 를 10 ng/ml의 농도로 첨가하였다. 세포의 배양액을 수거하여 실험에 사용하였으며 Gross의 방법(Gross, *et al*, 1962)에 따라 MMP-1 biotrack activity assay을 이용하여 측정하였다.

## 제 2 절 해양생물의 항산화 활성

### 1. 해양생물 추출물의 항산화 활성

2012년도에 마이크로네시아 측주에서 채집된 21점의 해양생물은 해조류와 해초류 등과 같은 해양 저서식물들과 해면동물 등을 포함하고 있으며 이들 해양생물은 채집지에서 멸균해수로 세척한 뒤 동결 건조하여 국내로 반입하였다. 마이크로네시아의 경우 년중 높은 기온과 일사량으로 인해 해양생물들이 광산화 조건에 항상 노출되어 있기 때문에 진화과정 동안 항산화 물질을 생산하는 해양생물들이 많을 것으로 사료되어 항산화 물질의 발굴을 위한 샘플로 적당할 것으로 판단하였다. 동결건조하여 반입된 해양생물들은 80% MeOH을 용매로 사용하여 추출하였으며, 용매를 감압농축하여 추출물을 조제하였으며, 냉동 보관하며 항산화 활성 분석을 위한 시료로 사용하였다.

해양생물의 메탄올 추출물에 대한 항산화 활성을 측정한 결과, 10여점의 추출물에서 약 39% 이상의 활성을 보여 positive control로 사용된 kojic acid(37.9%)보다 항산화 활성이 좋았다. 그리고 활성 검증에 사용된 해양생물들 중에서 1210CH-101(80%), 1210CH-108(78.3%), 1210CH-115(84.3%)의 경우 positive control로 사용된 arbutin(80.0%)과 유사하거나 더 우수한 항산화 활성을 가지고 있음을 확인하였다(Fig. 3-1-3).

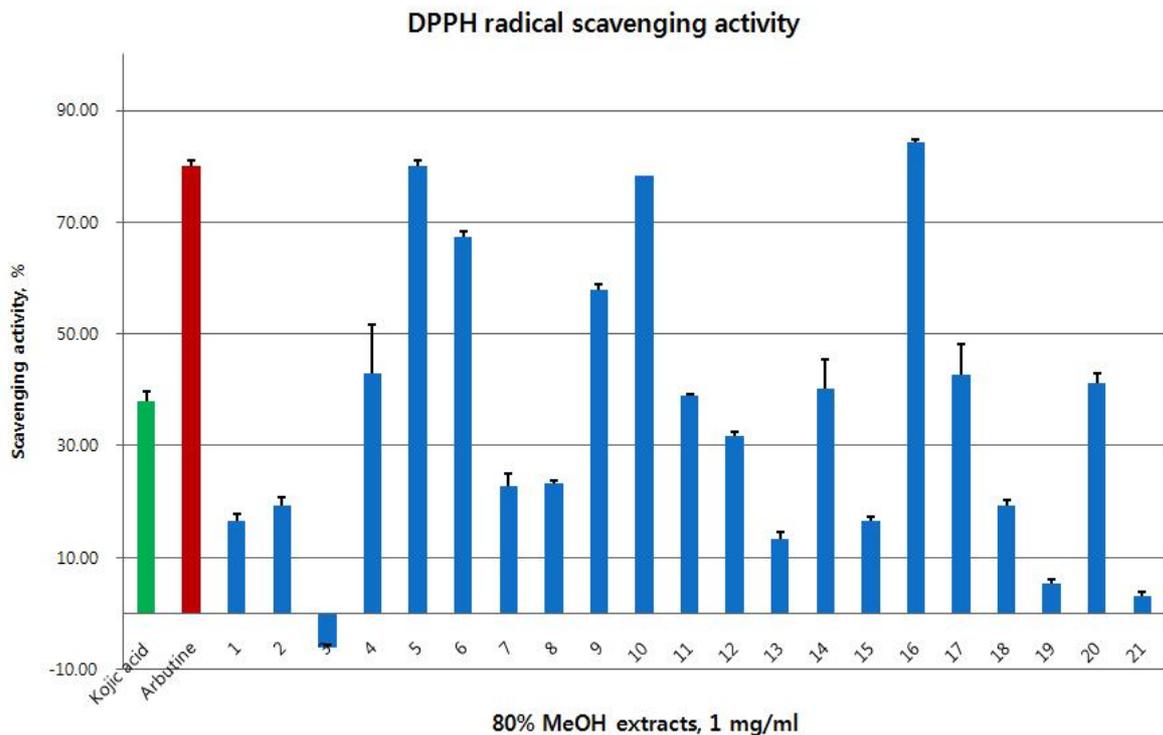


Fig. 3-1-3. Antioxidant activity of the MeOH extracts of marine organisms.

## 2. 해양생물 추출물의 미백 활성

해양생물 추출물 21점의 미백활성 확인을 위한 tyrosinase 저해 활성을 측정한 결과는 Fig. 3-1-4와 같았으며, 1 mg/ml 동일 농도에서 저해 활성이 약 12~68%로 측정되어 해양생물의 추출물이 유의미한 미백 활성을 가지고 있음을 알 수 있었다. 1210CH-115 추출물의 경우 68.3%의 저해활성을 가지고 있어 대조군으로 사용된 kojic acid(89%)보다는 낮지만 arbutin(68.5%)과 유사한 정도의 미백 활성을 가지는 것으로 확인되어 해양생물 추출물이 우수한 미백 활성을 가지고 있음이 검증되었다.

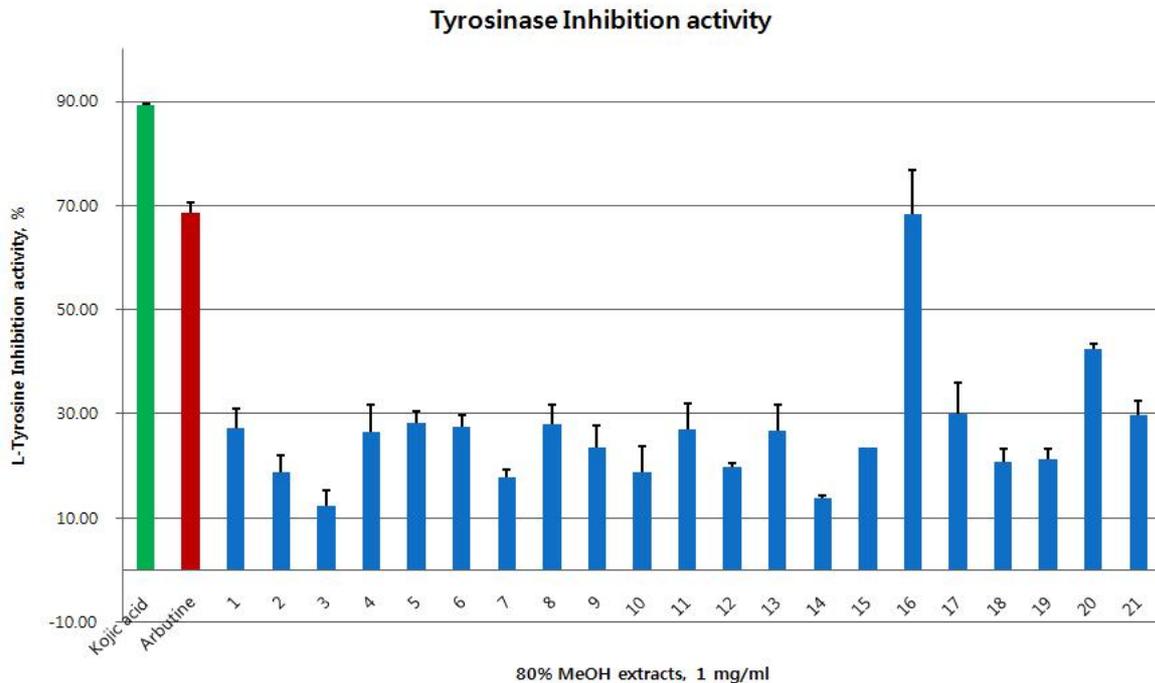


Fig. 3-1-4. Tyrosinase inhibitory activity of the MeOH extracts of marine organisms.

## 3. 해양미생물 추출물의 항산화 활성

분리된 해양미생물들 중에서 배지상에서 특이한 배양학적 성상을 보이는 균주들을 먼저 소량배양하여 이들의 배양액을 에틸아세테이트를 용매 사용하여 추출, 감압하여 얻어진 추출물을 항산화 활성의 검증에 사용하였다. 해양균주 에틸아세테이트 추출물 168점의 항산화 활성은 Table 3-1-3과 같이 확인되었으며, 16점 이상의 추출물들이 1 mg/ml 농도에서 DPPH radical 소거능이 30%이상의 활성을 가지는 것으로 확인되었다. 동일 농도에서 positive control로 사용한 kojic acid(37.9%)와 arbutin(80.0%)의 활성과 비교하였을 때, 이들 해양미생물들이 유의미한 항산화 활성을 가지고 있음을 알 수 있었다. 또한 12점의 균주는 약 38%이상의 DPPH radical 소거능을 나타내어 kojic acid 보다 높은 활성을 보였으며, 108YDC-142와 112CH-166 균주의 경우 약 64% 이상의 우수한 활성이 확인되어 해양미생물로부터 항노화 활성을 가지는 기능성 물질의 발굴 가능성을 확인 할 수 있다.

Table 3-1-3. Antioxidant activity of marine microbial extracts

Sample	%	Sample	%	Sample	%	Sample	%
09GGC-30	17.54	09ID-YM-20	4.15	09ID-126	21.08	112CH-230	22.92
09GGC-56	8.92	09ID-YM-21	6.62	102CH-69	4.15	112CH-234	8.15
09GGC-57	6.77	09ID-YM-22	10.00	102CH-243	7.85	112CH-256	17.54
09GGC-67	3.54	09ID-YM-25	3.85	102CH-248	3.23	112CH-258	8.46
09GGC-68	12.92	09ID-YM-26	16.77	102CH-265	10.31	112CH-259	1.69
09GGC-71	4.00	09ID-YM-27	2.15	102CH-438	4.00	112CH-276	10.15
09GGC-81	8.92	09ID-YM-28	11.85	102CH-446	4.92	112CH-280	8.00
09GGC-86	5.23	09ID-YM-29	6.15	102CH-520	6.62	112CH-281	14.15
09GGC-89	13.54	09ID-YM-30	2.77	108YDC-142	64.22	112CH-285	7.69
09GGC-130	6.92	09ID-YM-31	8.31	102CH-635-1	3.23	112CH-293	11.85
09GGC-157	8.46	09ID-YM-33	48.62	102CH-635-2	0.77	112CH-298	13.23
108KO-7	1.85	09ID-YM-34	6.15	102CH-635-3	10.92	112CH-331	16.77
108KO-22	8.31	09ID-22	2.92	102CH-635-4	4.62	112CH-334	32.31
108KO-29	8.62	09ID-36	39.08	102CH-635-5	6.77	112CH-336	37.54
108KO-44	11.08	09ID-48	3.54	102CH-635-6	14.77	112CH-337	35.69
108KO-63	4.15	09ID-56	10.77	112CH-14	5.08	112CH-338	25.38
108KO-64	2.62	09ID-76	4.15	112CH-16	13.38	112CH-339	11.54
109GGC-10	14.46	09ID-79	2.92	112CH-17	12.31	112CH-340	5.38
109GGC-14	5.85	09ID-89	13.38	112CH-69	3.08	112CH-341	5.85
109GGC-15	6.77	09ID-90	7.54	112CH-70	13.54	112CH-342-1	24.46
109GGC-18	4.15	09ID-92	3.23	112CH-75	7.08	112CH-342-2	27.23
110CH-455	3.54	09ID-93	49.53	112CH-106	7.54	112CH-350	5.54
110CH-456	14.31	09ID-94	43.54	112CH-108	0.92	114TG-14	3.85
110CH-458	4.92	09ID-95	12.62	112CH-130	7.08	114TG-38	8.15
110CH-462	18.92	09ID-96	2.00	112CH-133	17.23	114TG-41	11.54
09ID-YM-1	3.85	09ID-97	3.23	112CH-135	4.00	114TG-49	7.54
09ID-YM-2	3.38	09ID-98	14.46	112CH-140	4.00	114TG-53	14.00
09ID-YM-3	2.15	09ID-99	6.31	112CH-143	13.85	114TG-67	3.85
09ID-YM-4	2.92	09ID-100	6.77	112CH-146	41.54	114TG-69	0.77
09ID-YM-5	0.62	09ID-103	12.77	112CH-147	6.15	114TG-83	28.15
09ID-YM-6	9.85	09ID-104	17.69	112CH-148	22.62	114TG-93	3.85
09ID-YM-7	13.08	09ID-105	3.54	112CH-149	12.31	114TG-103	6.00
09ID-YM-9	5.54	09ID-106	8.62	112CH-150	9.85	114TG-141	7.23
09ID-YM-10	6.00	09ID-111	7.85	112CH-154	13.85	114TG-158	3.54
09ID-YM-11	1.85	09ID-116	12.31	112CH-166	68.62	114TG-159	8.31
09ID-YM-12	3.54	09ID-117	3.08	112CH-166-1	30.46	114TG-162	15.96
09ID-YM-13	5.38	09ID-120	2.46	112CH-166-2	15.54	114TG-178	4.15
09ID-YM-14	12.77	09ID-121	12.92	112CH-174	41.85	114TG-190	16.15
09ID-YM-15	3.69	09ID-123	6.31	112CH-174-1	40.00	114TG-221	3.08
09ID-YM-17	18.46	09ID-124	7.38	112CH-174-2	38.46	114TG-237	9.85
09ID-YM-18	5.38	09ID-125-1	5.69	112CH-189	6.15	114TG-238	4.15
09ID-YM-19	14.77	09ID-125-2	5.85	112CH-190	32.15	114TG-310	10.62

#### 4. 해양미생물 추출물의 미백 활성

해양미생물의 에틸아세테이트 추출물 168점에 대한 미백활성 확인을 위한 tyrosinase 저해 활성을 측정한 결과, 1 mg/ml의 농도에서 저해 활성이 대조군으로 사용한 kojic acid(89.3%), arbutin(68.5%)에 비하여, 동일 농도에서의 해양미생물 추출물들의 활성이 미약하여 미백 활성은 확인되지 않았다(Table 3-1-4).

기타 검색된 항노화 활성에 대하여서는 각 절의 화합물별로 활성에 대하여 논하였다.

Table 3-1-4. Tyrosinase inhibitory activity of marine microbial extracts

Sample	%	Sample	%	Sample	%	Sample	%
09GGC-30	-3.55	09ID-YM-20	-2.13	09ID-126	-5.86	112CH-230	2.48
09GGC-56	-2.49	09ID-YM-21	-3.37	102CH-69	-4.80	112CH-234	-6.10
09GGC-57	0.18	09ID-YM-22	-14.92	102CH-243	-3.02	112CH-256	-3.24
09GGC-67	-3.02	09ID-YM-25	1.07	102CH-248	-1.60	112CH-258	-4.38
09GGC-68	3.20	09ID-YM-26	1.95	102CH-265	-4.09	112CH-259	2.48
09GGC-71	0.18	09ID-YM-27	-3.73	102CH-438	-2.66	112CH-276	-3.62
09GGC-81	1.07	09ID-YM-28	-3.02	102CH-446	-6.04	112CH-280	-2.48
09GGC-86	0.89	09ID-YM-29	-0.36	102CH-520	-4.09	112CH-281	-4.38
09GGC-89	5.33	09ID-YM-30	-1.95	102CH-635	-1.95	112CH-285	-6.29
09GGC-130	-4.26	09ID-YM-31	-2.49	102CH-635-1	1.78	112CH-293	-6.48
09GGC-157	-6.22	09ID-YM-33	-0.36	102CH-635-2	-2.31	112CH-298	-2.67
108KO-7	-1.60	09ID-YM-34	-3.55	102CH-635-3	2.10	112CH-331	0.76
108KO-22	0.71	09ID-22	-4.26	102CH-635-4	-0.57	112CH-334	-2.48
108KO-29	1.60	09ID-36	-6.39	102CH-635-5	4.19	112CH-336	-4.00
108KO-44	2.31	09ID-48	-1.78	102CH-635-6	-2.86	112CH-337	-2.48
108KO-63	-0.18	09ID-56	-0.71	112CH-14	-4.19	112CH-338	-0.38
108KO-64	-5.68	09ID-76	5.33	112CH-16	-2.86	112CH-339	2.48
109GGC-10	-1.07	09ID-79	-1.42	112CH-17	-0.76	112CH-340	0.57
109GGC-14	-2.66	09ID-89	-2.84	112CH-69	-1.33	112CH-341	-3.24
109GGC-15	-3.73	09ID-90	-0.53	112CH-70	-3.24	112CH-342-1	0.38
109GGC-18	3.73	09ID-92	-0.18	112CH-75	-4.95	112CH-342-2	-3.62
110CH-455	0.89	09ID-93	-2.31	112CH-106	-8.76	112CH-350	-3.43
110CH-456	7.64	09ID-94	-1.60	112CH-108	-5.90	114TG-14	-2.86
110CH-458	0.00	09ID-95	-1.24	112CH-130	-4.19	114TG-38	-1.52
110CH-462	4.97	09ID-96	-1.78	112CH-133	-2.10	114TG-41	-5.33
09ID-YM-1	-2.31	09ID-97	-3.91	112CH-135	-1.52	114TG-49	-4.95
09ID-YM-2	5.33	09ID-98	3.55	112CH-140	-3.24	114TG-53	-22.67
09ID-YM-3	0.53	09ID-99	0.36	112CH-143	-6.67	114TG-67	-3.81
09ID-YM-4	0.53	09ID-100	-2.13	112CH-146	-5.90	114TG-69	-1.71
09ID-YM-5	0.18	09ID-103	-0.71	112CH-147	-2.86	114TG-83	-5.71
09ID-YM-6	4.97	09ID-104	-1.24	112CH-148	0.19	114TG-93	-2.86
09ID-YM-7	0.18	09ID-105	-2.84	112CH-149	-4.57	114TG-103	-0.76
09ID-YM-9	-1.60	09ID-106	0.00	112CH-150	-1.71	114TG-141	3.24
09ID-YM-10	1.07	09ID-111	0.00	112CH-154	1.71	114TG-158	-5.33
09ID-YM-11	-0.53	09ID-116	-1.42	112CH-166	0.19	114TG-159	6.10
09ID-YM-12	-3.20	09ID-117	-3.55	112CH-166-1	1.33	114TG-162	-2.48
09ID-YM-13	-3.20	09ID-120	-4.09	112CH-166-2	-4.00	114TG-178	-3.62
09ID-YM-14	-1.24	09ID-121	-3.73	112CH-174	0.19	114TG-190	-1.71
09ID-YM-15	-1.07	09ID-123	-3.20	112CH-174-1	4.38	114TG-221	-0.38
09ID-YM-17	-7.82	09ID-124	-1.60	112CH-174-2	-5.52	114TG-237	-5.71
09ID-YM-18	1.95	09ID-125-1	-0.71	112CH-189	4.95	114TG-238	-3.24
09ID-YM-19	5.15	09ID-125-2	-1.78	112CH-190	0.38	114TG-310	3.81

## 5. 유용 생물의 선정 및 시료 확보/배양

해양생물 및 해양미생물 추출물 189점의 항산화 및 미백 활성 등의 항노화 활성을 확인한 결과, 15여점의 해양미생물과 10여점의 해양생물에서 유의미한 항노화 활성이 확인되었다. 이에 활성을 바탕으로 항노화 활성을 가진 유용 생물을 선정하고 이들의 시료 확보 및 배양 실험을 진행하였다.

### 가. 유용 해양미생물의 선정

유의미한 항산화 활성을 가진 09IDYM-33, 09ID-36, 09ID-93 등과 추출물에 대한  $^1\text{H}$  MR data 등의 분광학적 분석을 통하여 12종의 해양미생물을 유용 균주 및 대량배양 균주로 선정하였다(Fig. 3-1-5). 이들 유용균주에 16s rRNA 염기서열 분석을 통하여 균주를 동정하였다.

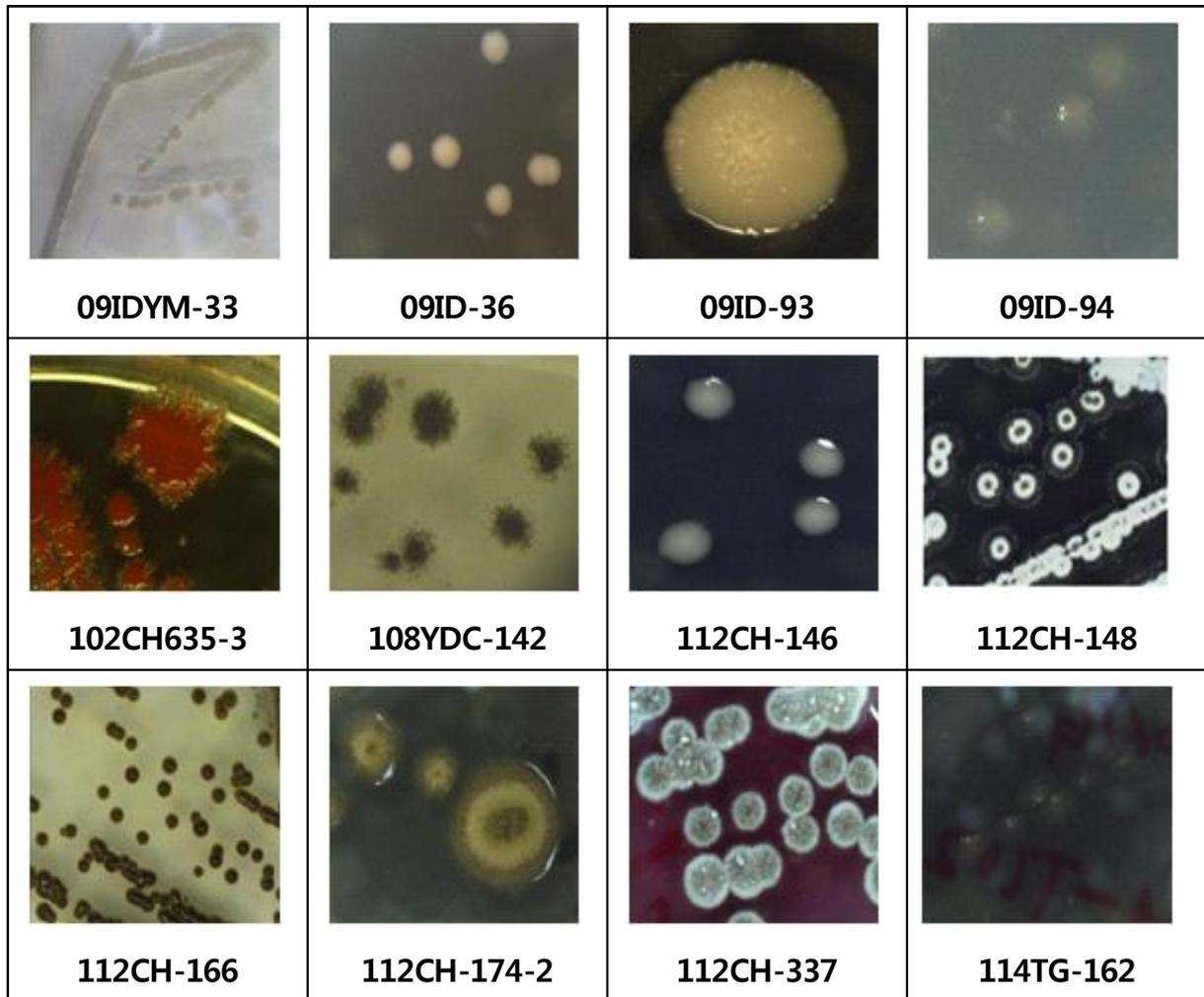


Fig. 3-1-5. Selected strains for further study.

### 제 3 절 *Streptomyces* sp. 112CH148 균주로부터 $\alpha$ -pyrone계 신물질의 분리 및 구조결정

112CH148 균주는 마이크로네시아 축주에서 채집된 가시면류관 불가사리에서 분리되었다. 이 균주는 16s rRNA 염기서열 분석결과 *Streptomyces* sp.으로 동정되었고, 이를 NCBI GeneBank에 등록하였다(Accession no. KJ419328). 또한 한국생명공학연구원 한국미생물보존센터에 기탁하였다(기탁번호: KTCC12556BP).

112CH148 균주를 120rpm, 28℃, 7일간 대량 배양하여 얻어진 배양액(150 L)을 고속원심분리기를 사용하여 균체와 배양액을 각각 분리하였다. 분리된 배양액을 동량의 에틸아세테이트(150 L)로 2회 추출한 뒤, 이를 감압 농축하여 배양액 추출물(bEA)을 얻었다. 이 추출물을 역상 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 메탄올-물(1:4, 2:3, 3:2, 4:1, 5:0, v/v)의 용매조건으로 단계적으로 용출하여 분획하였다. 이 중 80% 메탄올 분획물을 다시 한번 역상 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 분획하였고, 이 중 70% 메탄올과 80% 메탄올 분획물을 역상 HPLC(Column: YMC-ODS-A, 5  $\mu$ m, 10×250 mm, 용매 조건: 68% MeOH 및 72% MeOH, 용출 속도: 2.0 ml/min, 검출기: RI)를 이용한 정제과정을 통해 단일 물질 148-1~4를 얻었다(Fig. 3-1).

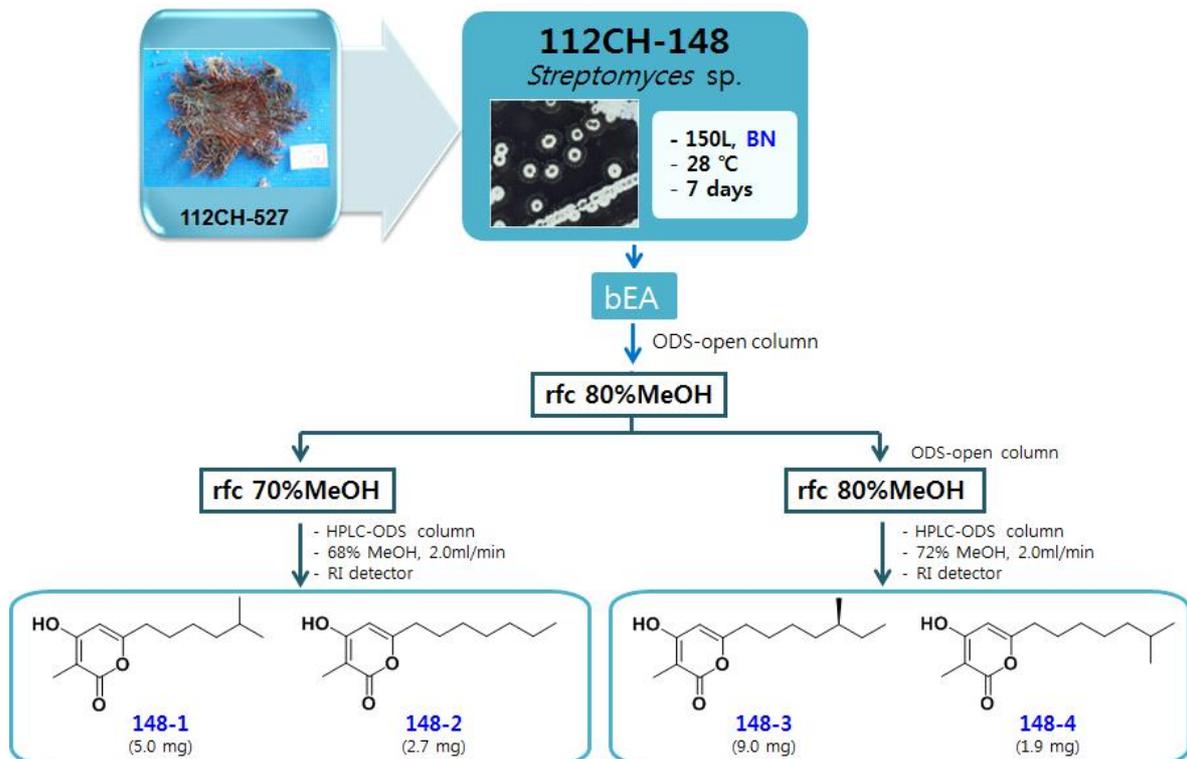


Fig. 3-1.  $\alpha$ -pyrones 148-1~4 isolated from the culture broth of the strain 112CH148.

화합물 148-4는 황색의 무정형으로 분리되었으며, UV, IR, MS 등의 물리화학적 특징은 Table 3-1에 나타내었다. 148-4의 분자식은  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR과 HR-ESIMS 데이터 분석을 통하여  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_3$  으로 결정하였고, 불포화도는 4임을 알 수 있었다.  $^{13}\text{C}$  NMR 및 HSQC 스펙트럼 분석을 통하여, 3개의 산소와 연결된 사차탄소( $\delta_{\text{C}}$  164.8-169.9), 1개의 올레핀 메틴 탄소( $\delta_{\text{C}}$  102.0), 1개의  $\text{sp}^2$  사차탄소( $\delta_{\text{C}}$  98.7), 5개의 메틸렌 탄소( $\delta_{\text{C}}$  28.1-40.1), 1개의  $\text{sp}^3$  메틴 탄소( $\delta_{\text{C}}$  29.7), 1개의 메틴 탄소( $\delta_{\text{C}}$  8.4), 그리고 1개의 이소 메틸 탄소( $\delta_{\text{C}}$  23.1)를 확인하였다. COSY 스펙트럼 분석을 통하여 2개의 부분구조(H-7~H-8, H-9~H-13)의 존재를 확인하였고, HMBC 스펙트럼 분석을 통하여 두 개의 부분구조가 연결됨을 확인하였다(Fig. 3-2). HMBC 스펙트럼 분석에서, 메틸 수소(H-3-Me,  $\delta$  1.84)가 C-2, C-3, C-4와 correlation peak를 보여, 이들이 서로 연결됨을 확인하였다. 올레핀 메틴 수소(H-5,  $\delta$  5.96)는 C-3, C-4, C-6와 correlation peak를 보임으로써  $\alpha$ -pyrone 고리를 형성함을 알 수 있었고, 또한 C-7과 상관관계를 보여  $\alpha$ -pyrone 고리와 사슬이 서로 연결됨을 알 수 있었으며, 화합물 148-4의 구조를 결정할 수 있었다(Fig. 3-2). 문헌조사 결과, 화합물 148-4는 violapyrone계통의 화합물과 구조적으로 유사한 것을 알 수 있었으나 기존에 보고된 적이 없는 신규 화합물임을 확인 하였고, violapyrone H라고 명명하였다.

화합물 148-2는 황색의 무정형의 화합물로 분리되었고, UV, IR, MS등의 물리화학적 특징은 Table 3-1에 나타내었다. 148-2의 분자식은  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR과 HR-ESIMS 데이터 분석을 통하여  $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_3$  으로 결정하였고, 불포화도가 4임을 알 수 있었다.  $^{13}\text{C}$  NMR과 HSQC 스펙트럼 분석을 통하여, 3개의 산소와 연결된 사차탄소( $\delta_{\text{C}}$  164.9-169.4), 1개의 올레핀 메틴 탄소 ( $\delta_{\text{C}}$  101.6), 1개의  $\text{sp}^2$  사차탄소( $\delta_{\text{C}}$  98.9), 6개의 메틸렌 탄소( $\delta_{\text{C}}$  23.8-34.4) 그리고 2개의 메틸 탄소( $\delta_{\text{C}}$  14.5, 8.4)을 확인하였다. 화합물 148-2는 2D NMR 데이터를 분석한 결과, 앞서 구조 결정한 화합물 148-4와 거의 유사한 구조를 가지고 있음을 알 수 있었으며, 148-4에 비하여 사슬의 말단부분에 메틸기가 하나 없는 것을 알 수 있었다. 문헌조사 결과, 화합물 148-2 또한 신규 화합물임을 알 수 있었으며 violapyrone I라 명명하였다.

화합물 148-1과 148-3은 앞서 구조 결정한 화합물 148-2, 148-4와 유사한 물리화학적 특성(Table 3-1)과 분자량, 그리고  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR 스펙트럼을 보였다. 148-1과 148-3은 분자식은 각각  $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_3$ 과  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_3$  으로 결정되었고, 불포화도 역시 4로 동일하였다. 2D NMR 데이터를 분석한 결과, 화합물 148-2는 148-4 보다 메틸렌이 하나 더 적었고, 화합물 148-3은 148-2보다 사슬의 말단에 메틸기가 하나 더 많았다. 문헌조사 결과, 화합물 148-1과 148-3은 최근 발표된 violapyrone B 와 C인 것으로 확인되었다(Zhang *et al.*, 2013).

Table 3-1. Physico-chemical properties of 148-1~4

	148-1	148-2	148-3	148-4
Appearance	Yellowish amorphous	Yellowish amorphous	Yellowish amorphous	Yellowish amorphous
Molecular formula	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>
Molecular weight	224	224	238	238
HR-ESIMS ( <i>m/z</i> )	225.1485 [M+H] <sup>+</sup> (calcd for 225.1491)	247.1313 [M+Na] <sup>+</sup> (calcd for 247.1310)	261.1461 [M+Na] <sup>+</sup> (calcd for 261.1467)	261.1466 [M+Na] <sup>+</sup> (calcd for 261.1467)
UV(MeOH) $\lambda_{\max}$ nm (log $\epsilon$ )	286 (1.34)	289 (0.70)	288 (0.91)	290 (0.52)
IR(MeOH) $\nu_{\max}$ cm <sup>-1</sup>	3347, 2943, 1674	3345, 2926, 1670	3343, 2925, 1674 +50°	3341, 2935, 1674
$[\alpha]_{\text{D}}^{27}$			( <i>c</i> 0.1, MeOH)	

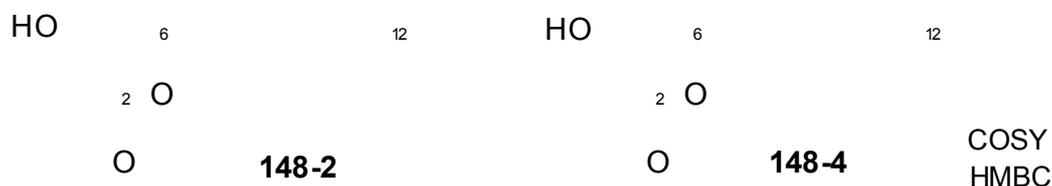


Fig. 3-2. Key HMBC and COSY correlations of 148-2 and 148-4.

Table 3-2. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data of 148-2 and 148-4 in CD<sub>3</sub>OD

No.	148-2		148-4	
	$\delta_{\text{C}}$ , Type	$\delta_{\text{H}}$ , Mult. ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_{\text{C}}$ , Type	$\delta_{\text{H}}$ , Mult. ( <i>J</i> in Hz)
2	169.4, C		169.9, C	
3	98.9, C		98.7, C	
4	168.9, C		169.5, C	
5	101.6, CH	5.97, s	102.0, CH	5.96, s
6	164.9, C		164.8, C	
7	34.4, CH <sub>2</sub>	2.46, t (7.5)	34.4, CH <sub>2</sub>	2.46, t (7.5)
8	28.1, CH <sub>2</sub>	1.64, m	28.1, CH <sub>2</sub>	1.64, m
9	30.3, CH <sub>2</sub>	1.33	30.4, CH <sub>2</sub>	1.34
10	30.2, CH <sub>2</sub>	1.35	28.3, CH <sub>2</sub>	1.34
11	33.0, CH <sub>2</sub>	1.30, m	40.1, CH <sub>2</sub>	1.19, m
12	23.8, CH <sub>2</sub>	1.31, m	29.7, CH	1.53, m
13	14.5, CH <sub>3</sub>	0.90, t (6.5)	23.1, CH <sub>3</sub> (x2)	0.88, d (6.5)
3-Me	8.4, CH <sub>3</sub>	1.85, s	8.4, CH <sub>3</sub>	1.84, s

### 화합물 148-1(violapyrone B)

$^1\text{H}$  NMR(500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ ; 5.97(1H, s, H-5), 2.45(2H, t,  $J=7.5$  Hz, H-7), 1.85(3H, s, Me-3), 1.62(2H, m, H-8), 1.54(1H, m, H-11), 1.35(2H, m, H-9), 1.23(2H, m, H-10), 0.88 (6H, d,  $J=7.0$  Hz, H-12);  $^{13}\text{C}$  NMR(125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$ ; 169.4(C-2), 168.8(C-4), 164.9(C-6), 101.5(C-5), 98.9(C-3), 39.9(C-10), 34.4(C-7), 29.2(C-11), 28.3(C-8), 27.9(C-9), 23.1(C-12), 8.4(Me-3).

### 화합물 148-3(violapyrone C)

$^1\text{H}$  NMR(500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{H}}$ ; 5.98(1H, s, H-5), 2.47(2H, t,  $J=7.5$  Hz, H-7), 1.85(3H, s, Me-3), 1.62(2H, m, H-8), 1.36(2H, H-9), 1.34(1H,  $\text{H}_a$ -12), 1.13(1H,  $\text{H}_b$ -12), 1.33(1H,  $\text{H}_a$ -10), 1.17(1H,  $\text{H}_b$ -10), 1.32(1H, H-11), 0.88(3H, t,  $J=6.5$  Hz, H-13), 0.87(3H, d,  $J=6.0$  Hz, Me-11);  $^{13}\text{C}$  NMR(125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta_{\text{C}}$ ; 169.5(C-4), 169.2(C-2), 164.9(C-6), 101.8(C-5), 98.8(C-3), 37.5(C-12), 35.7(C-11), 34.4(C-7), 30.7(C-10), 28.4(C-8), 27.6(C-9), 19.7(Me-11), 11.9(C-13), 8.4(Me-3).

본 연구를 통해 얻어진 신규 화합물 **148-2**(violapyrone I) 및 **148-4**(violapyrone H), 기지화합물 **148-1**(violapyrone B)과 **148-3**(violapyrone C)에 대한 인간유래의 암세포(ACHN, HCT-15, MDA-MB-231, NCI-H23, NUGC-3)의 성장저해 활성을 SRB 방법으로 확인한 결과, 4개의 화합물에서 비슷한 활성을 보였으나, 화합물 **148-4**(violapyrone H)에서 HCT-15(대장암)에 대해  $\text{GI}_{50} = 1.10 \mu\text{g/mL}$ 로 가장 좋은 활성을 보였다(Table 3-3). 최근의 문헌(Zhang, *et al.*, 2013)에 의하면, violapyrone 계열의 화합물들이 항균활성은 있으나, 항암활성은 없는 것으로 보고되었다. 그러나 본 연구에서의 재현성 있는 실험을 통하여, violapyrone 계열의 화합물들이 항암활성을 가지고 있음을 알 수 있었다. 이와 같은 결과의 차이는 항암활성에 대한 측정방법(MTT방법과 SRB방법)에 대한 차이로 사료된다.

Table 3-3. Cytotoxicity of 148-1~4 against a pannel of human cancer cell lines

Cell Lines	GI <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μg/mL)				
	148-1	148-2	148-3	148-4	ADR <sup>b</sup>
HeLa(자궁암)	18.12	5.54	9.91	25.05	0.09
ACHN(신장암)	1.18	5.42	1.55	1.79	0.04
HCT-15(대장암)	2.01	3.38	5.22	1.10	0.08
HCT-116(대장암)	15.83	18.08	26.12	8.99	0.09
MDA-MB-231(유방암)	1.80	6.29	4.94	1.51	0.99
NCI-H23(폐암)	1.90	3.47	3.24	1.24	0.04
NCI-H460(폐암)	6.37	21.04	10.80	4.45	0.07
NUGC-3(위암)	2.24	3.36	4.02	1.27	0.12
Hep-G2(간암)	2.04	14.60	3.96	2.30	0.08
PC-3(전립선암)	1.40	5.44	2.06	1.37	0.06

<sup>a</sup>GI<sub>50</sub> values are the concentration corresponding to 50% growth inhibition; <sup>b</sup>ADR: adriamycin as standard.

구조적으로 매우 유사한 네 화합물 중, 양이 비교적 많았던 화합물 148-1 및 148-3에 대한 항염활성을 평가하였다. 두 화합물 모두 실험세포에 대한 독성은 거의 나타내지 않으면서, 농도 의존적으로 니트릭 옥사이드의 생성을 저해하였다(Fig. 3-3). 따라서, 신규 화합물 148-2 및 148-4 또한 이들 화합물과 구조적으로 아주 유사하기 때문에, 이들 화합물과 유사한 활성을 보일 것으로 예상되어진다.

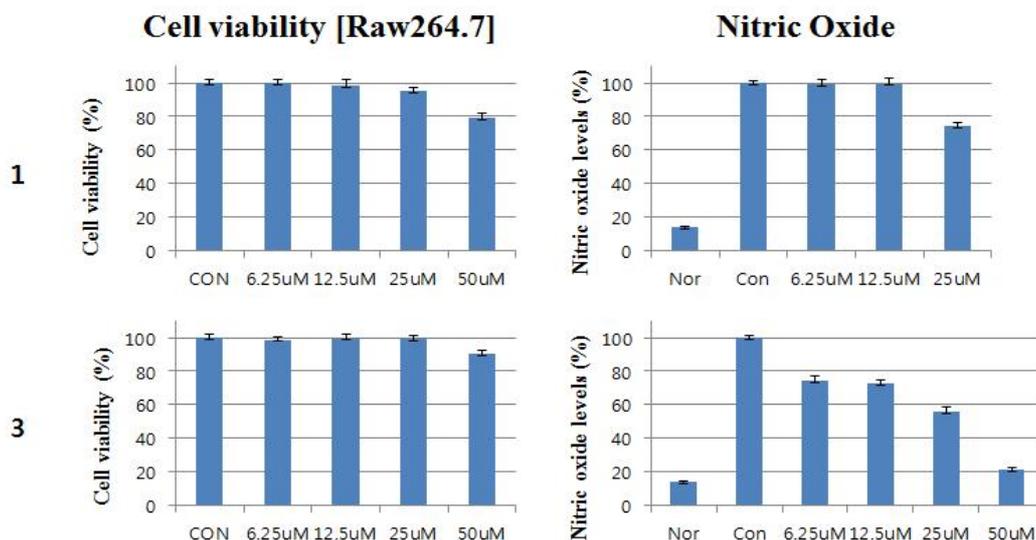


Fig. 3-3. Anti-inflammatory activity of 148-1 and 148-3.

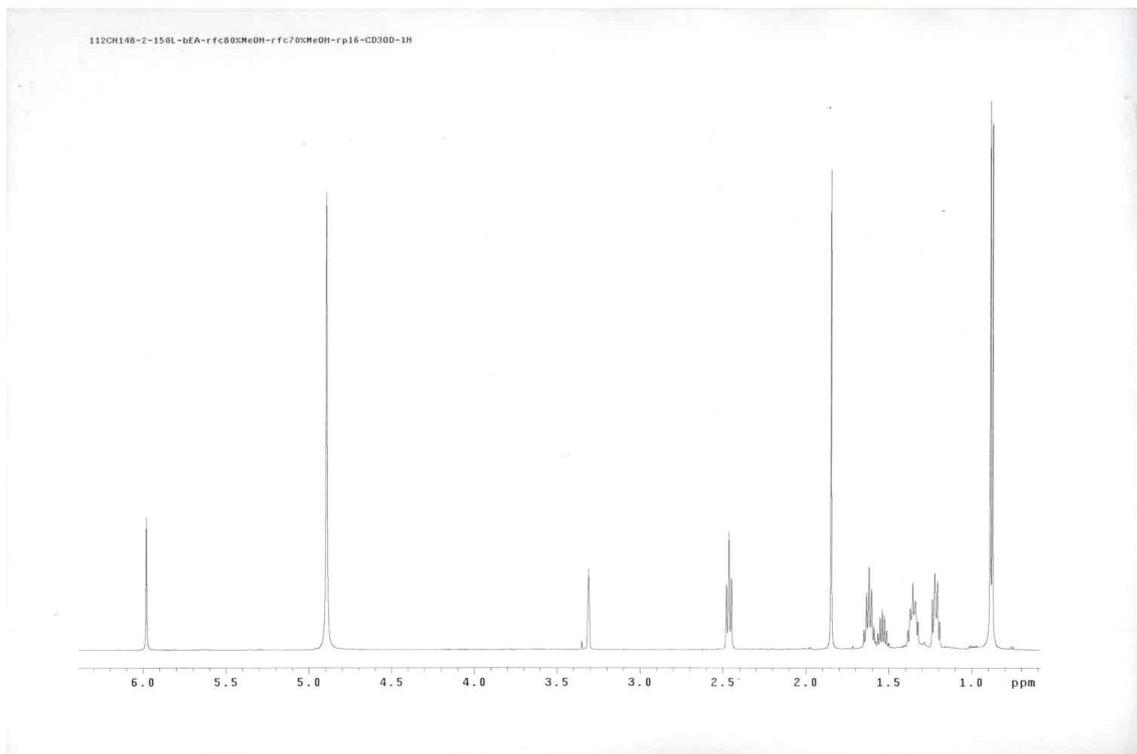


Fig. 3-4.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 148-1 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

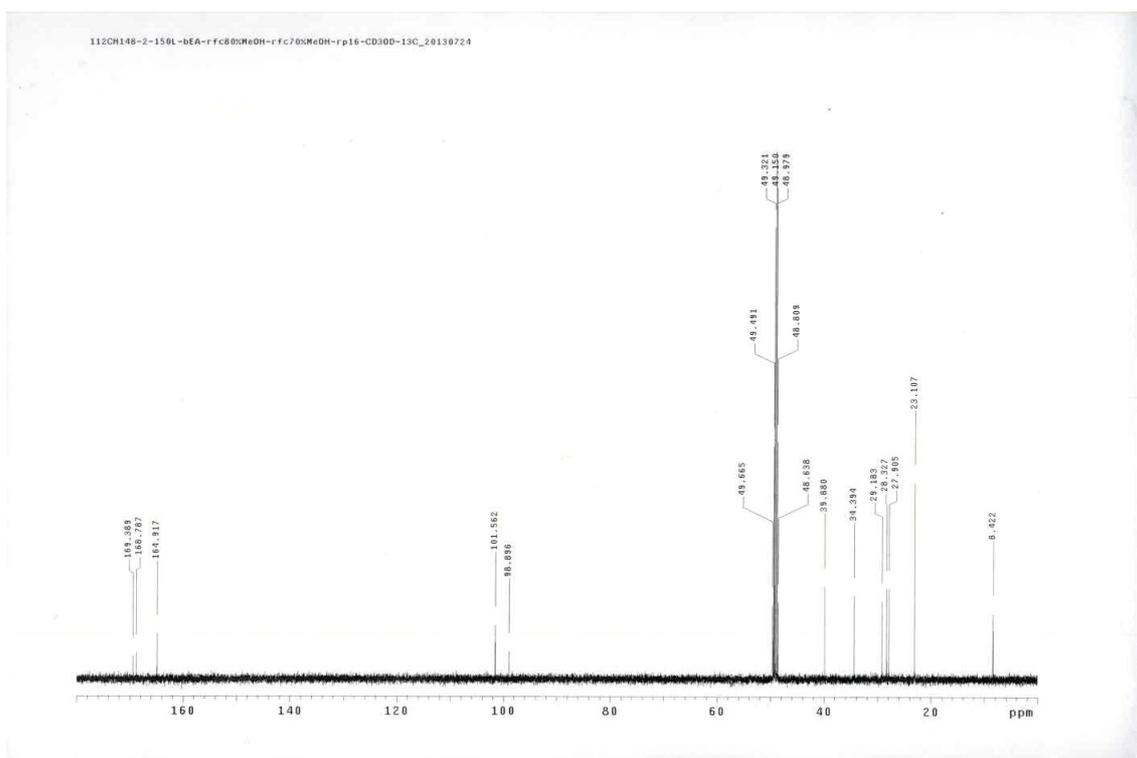


Fig. 3-5.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 148-1 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

**HR-ESI-MS Data Result**  
**Sample : KIOST-3**  
 Elemental Composition Report

Single Mass Analysis  
 Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0  
 Element prediction: OF  
 Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions  
 34 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 50 best isotopic matches for each mass)  
 Elements Used:

C: 0-500 H: 0-1000 O: 0-200

Minimum: -1.5  
 Maximum: 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf(%)	Formula
225.1485	225.1491	-0.6	-2.7	3.5	1116.2	n/a	n/a	C13 H21 O3

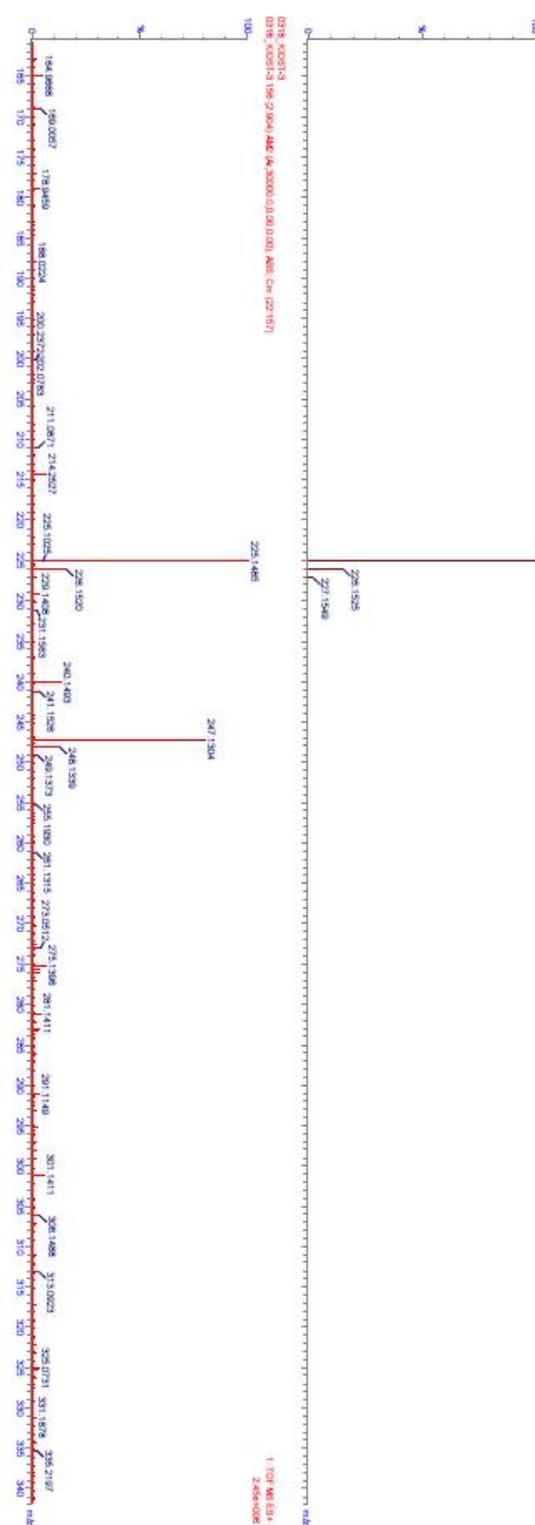


Fig. 3-6. HR-ESIMS spectrum of 148-1.

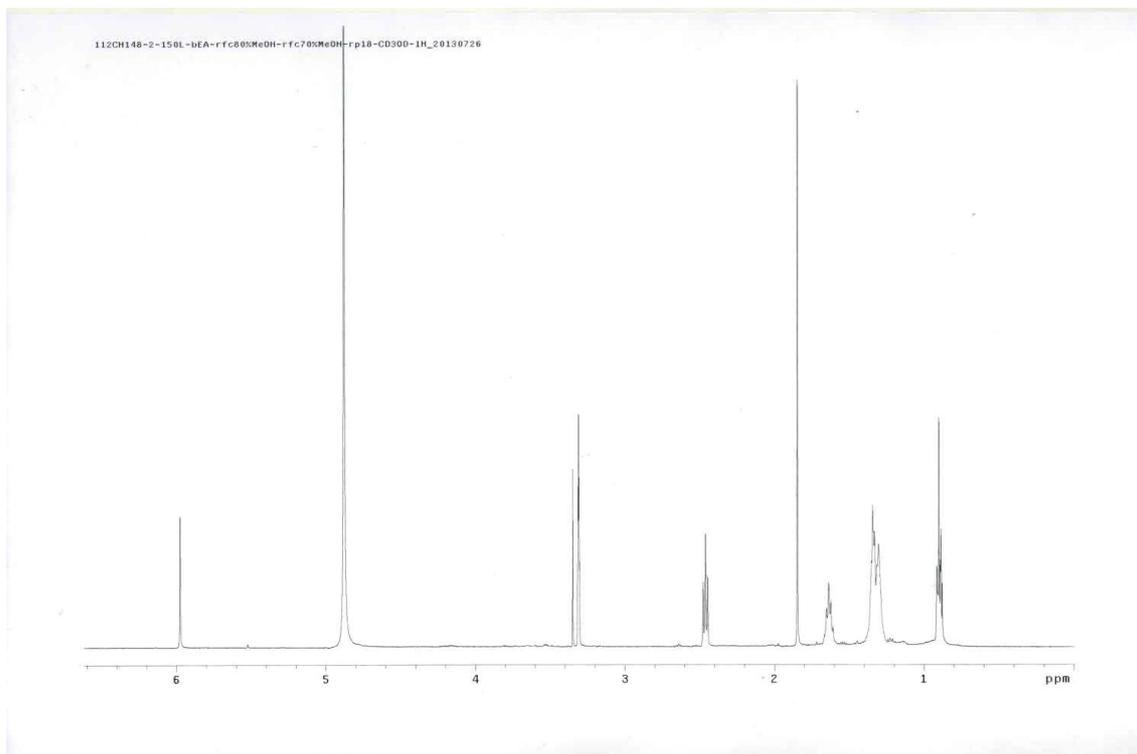


Fig. 3-7.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 148-2 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

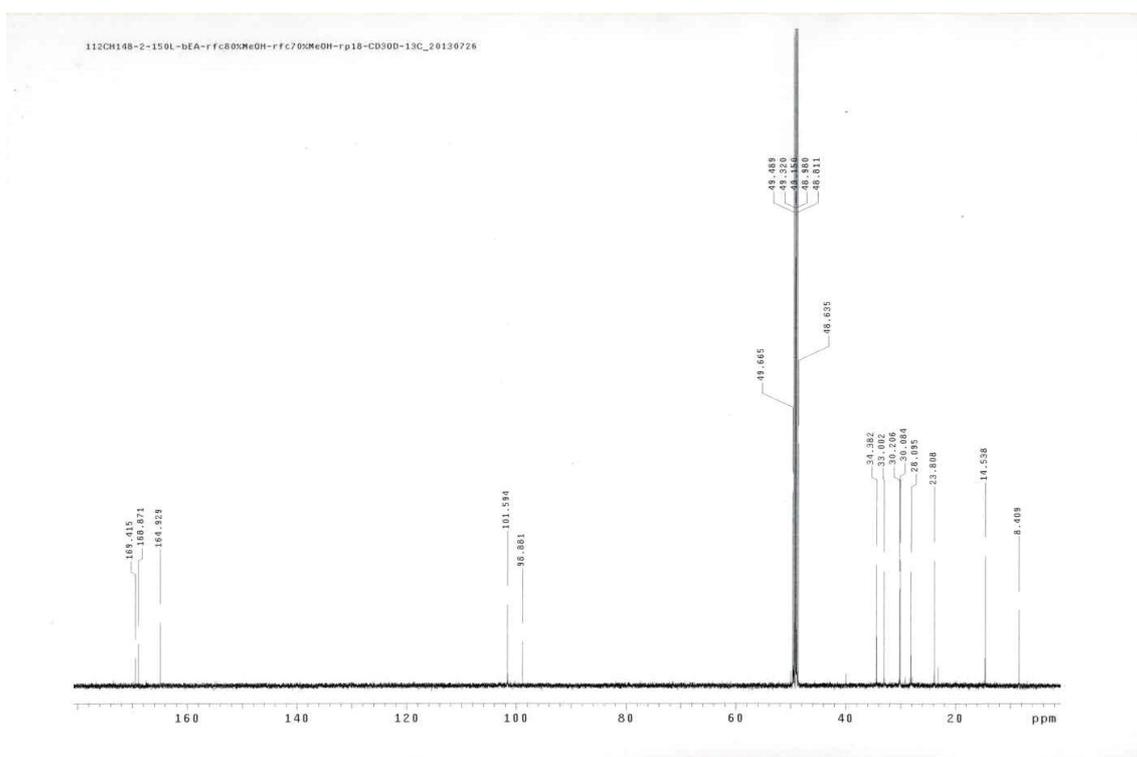


Fig. 3-8.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 148-2 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

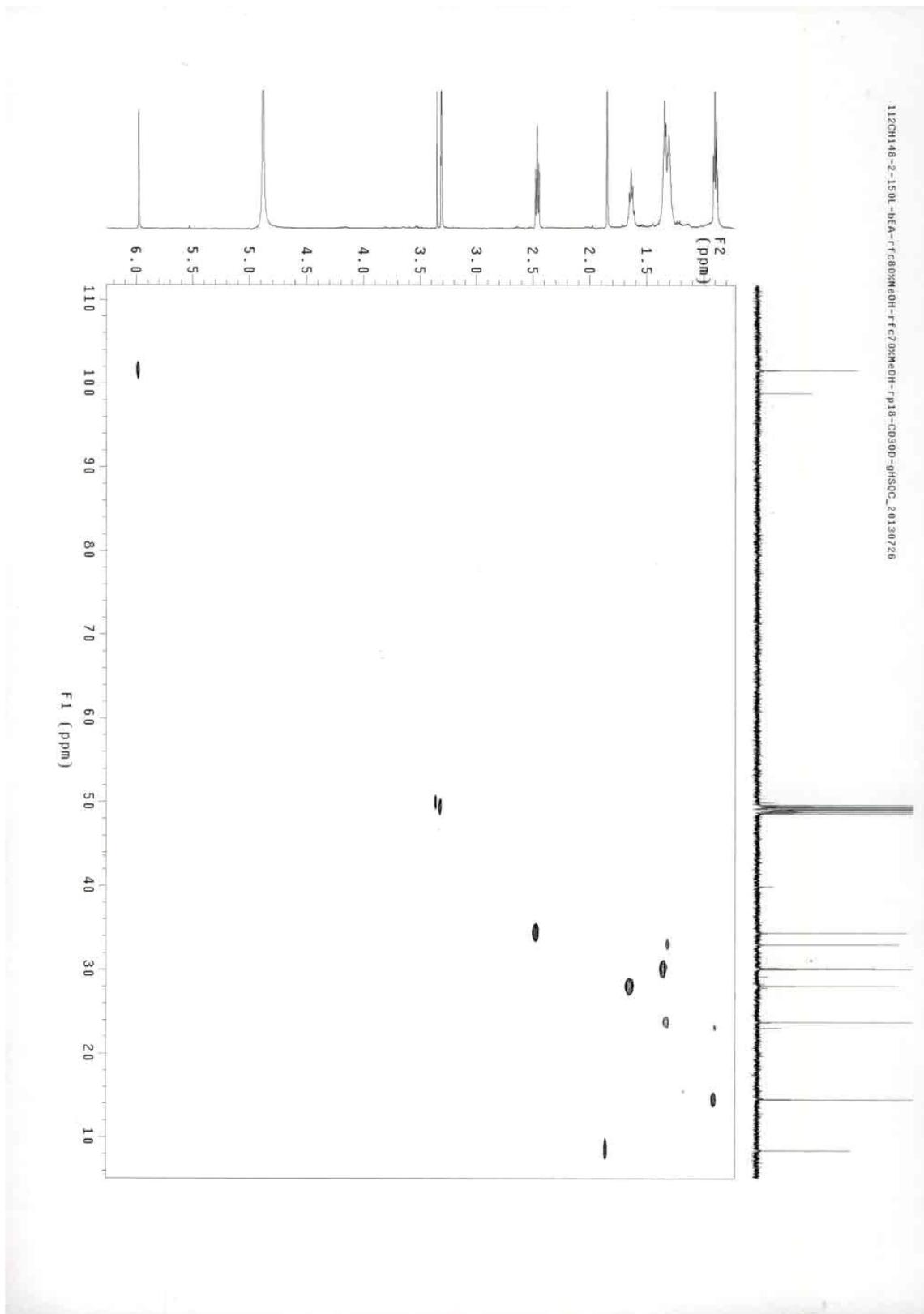


Fig. 3-9. gHSQC spectrum of 148-2 in CD<sub>3</sub>OD.

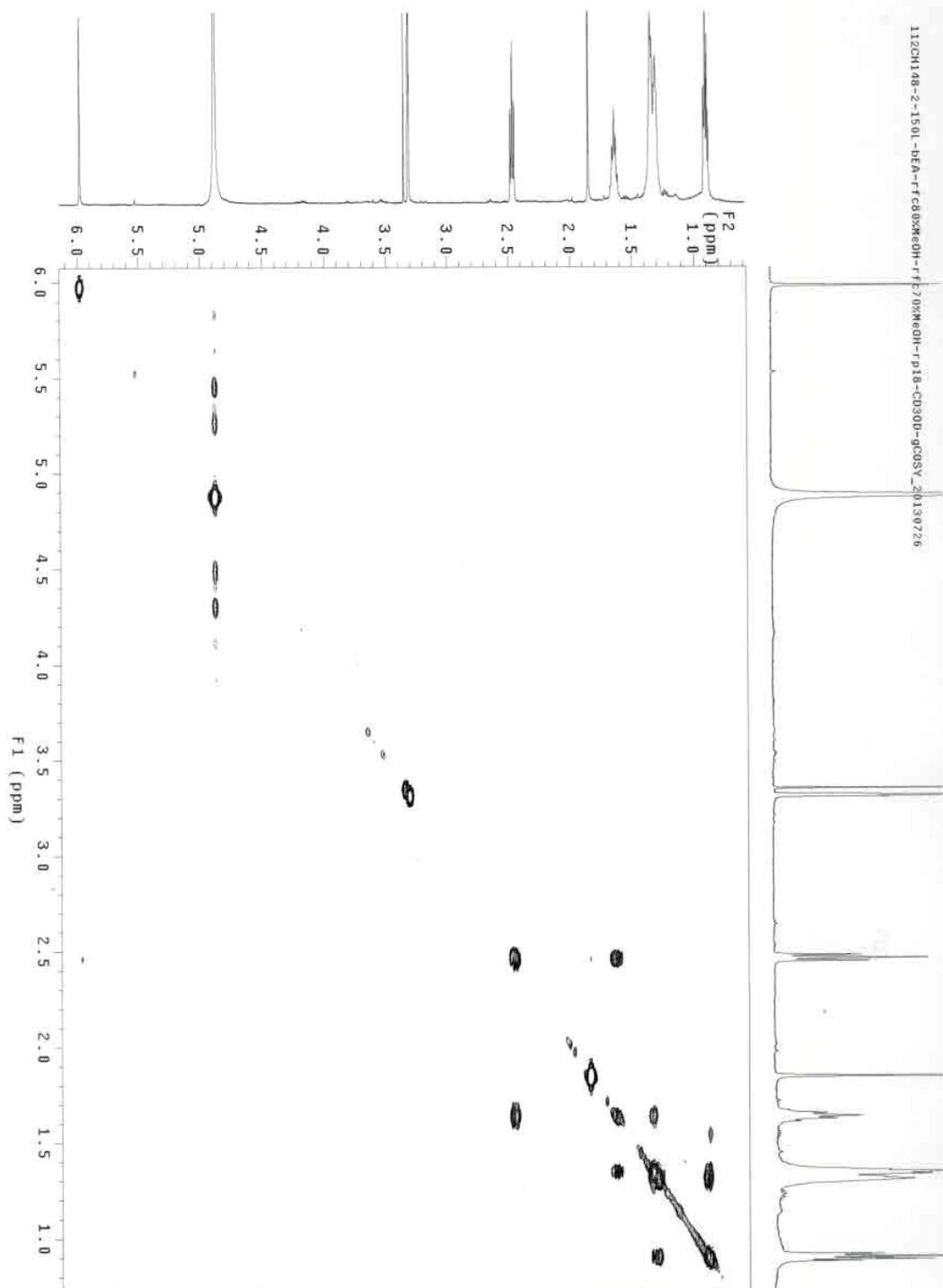


Fig. 3-10. gCOSY spectrum of 148-2 in CD<sub>3</sub>OD.

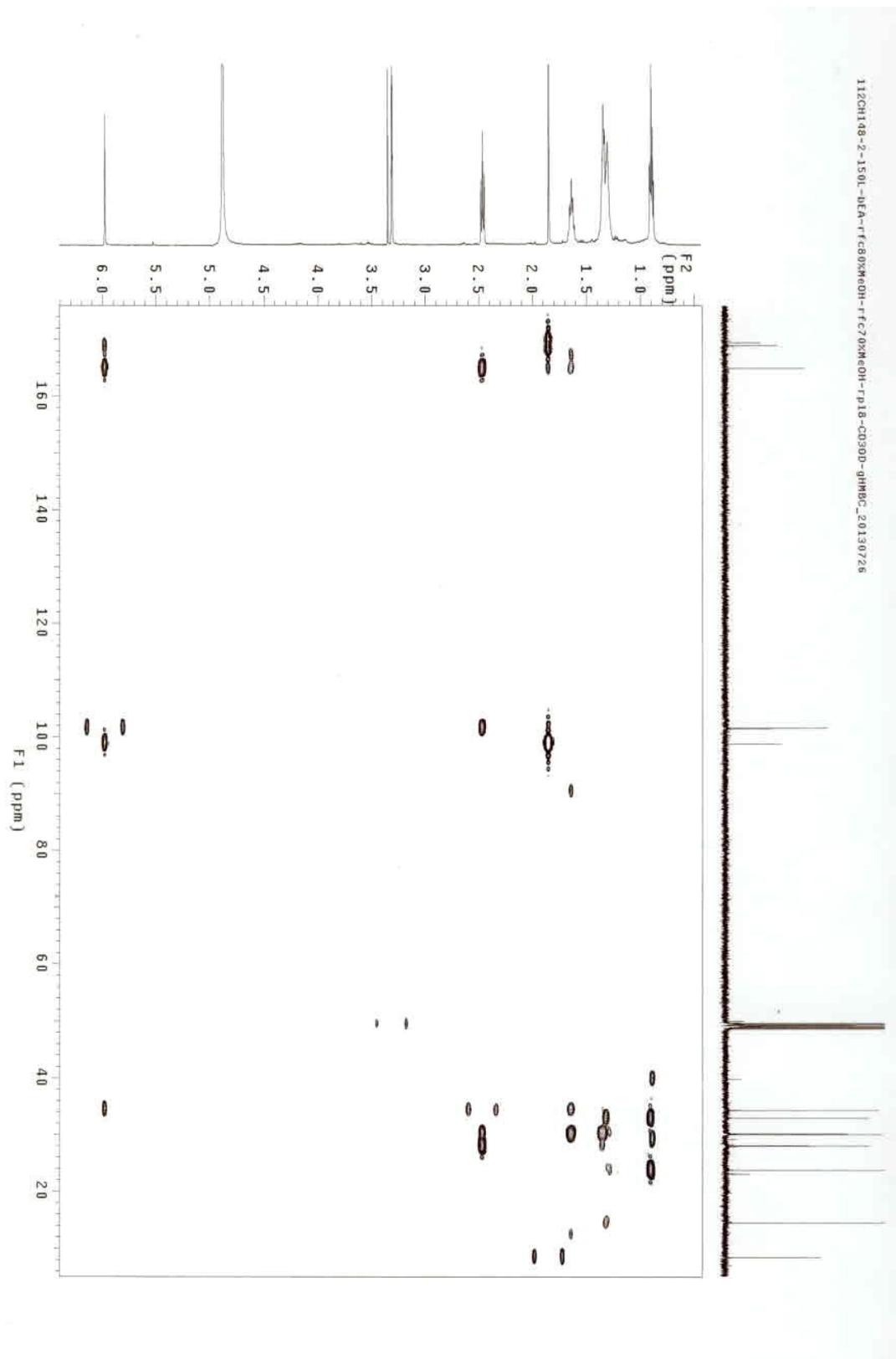


Fig. 3-11. gHMBC spectrum of 148-2 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

### Elemental Composition Report

Single Mass Analysis / DBE: min = -1.5, max = 50.0  
 Tolerance = 50.0 PPM  
 Element Prediction: Off  
 Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf(%)	Formula
247.1313	247.1310	0.3	1.2	3.5	1028.8	n/a	n/a	C13 H20 O3 Na

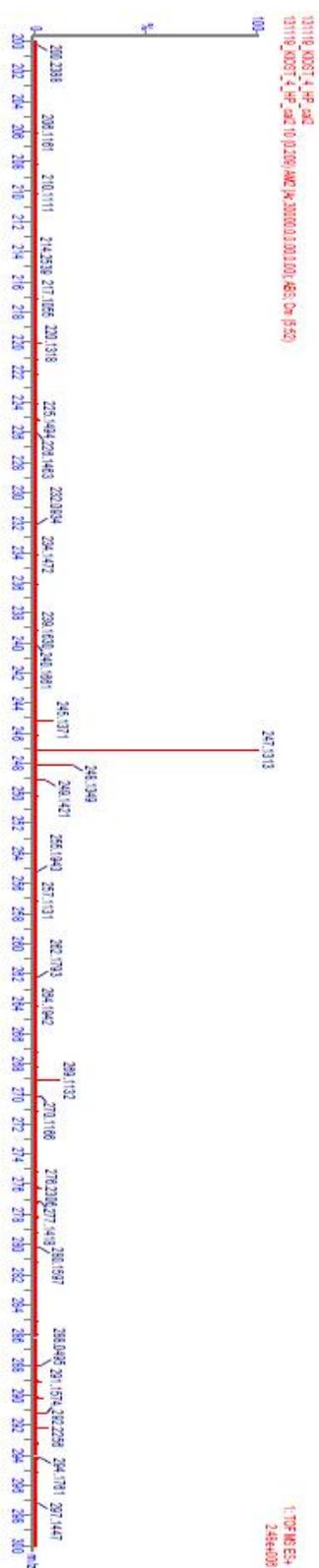


Fig. 3-12. HR-ESIMS spectrum of 148-2.

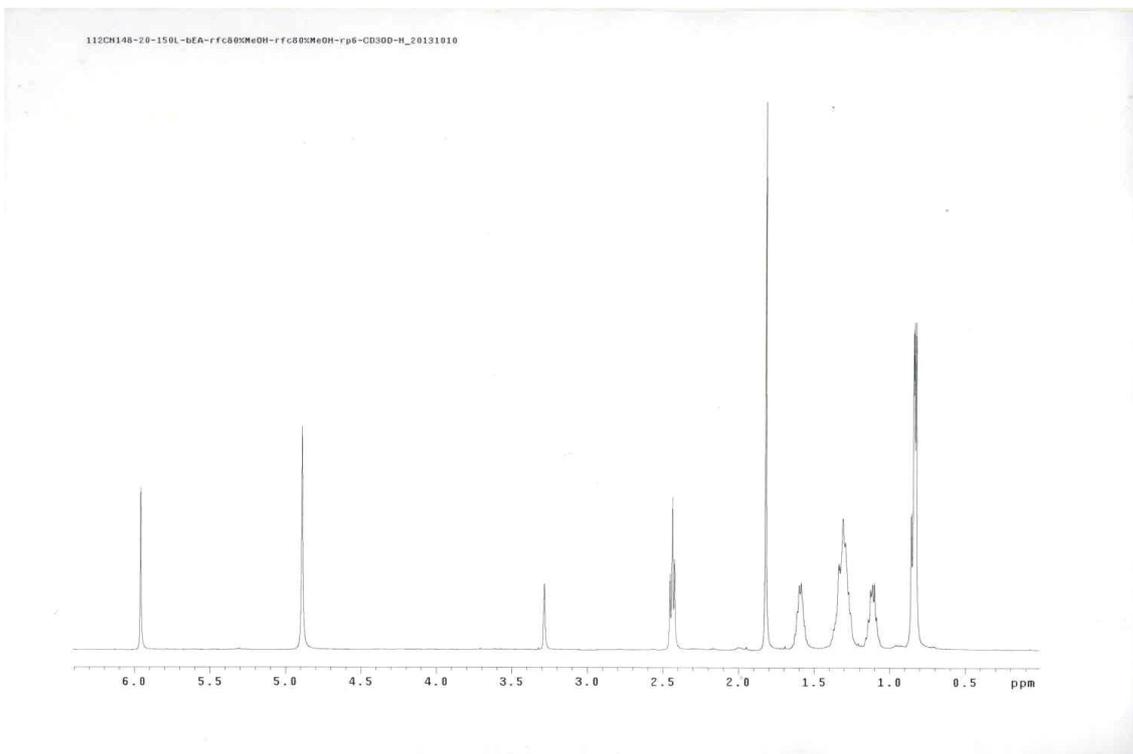


Fig. 3-13.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 148-3 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

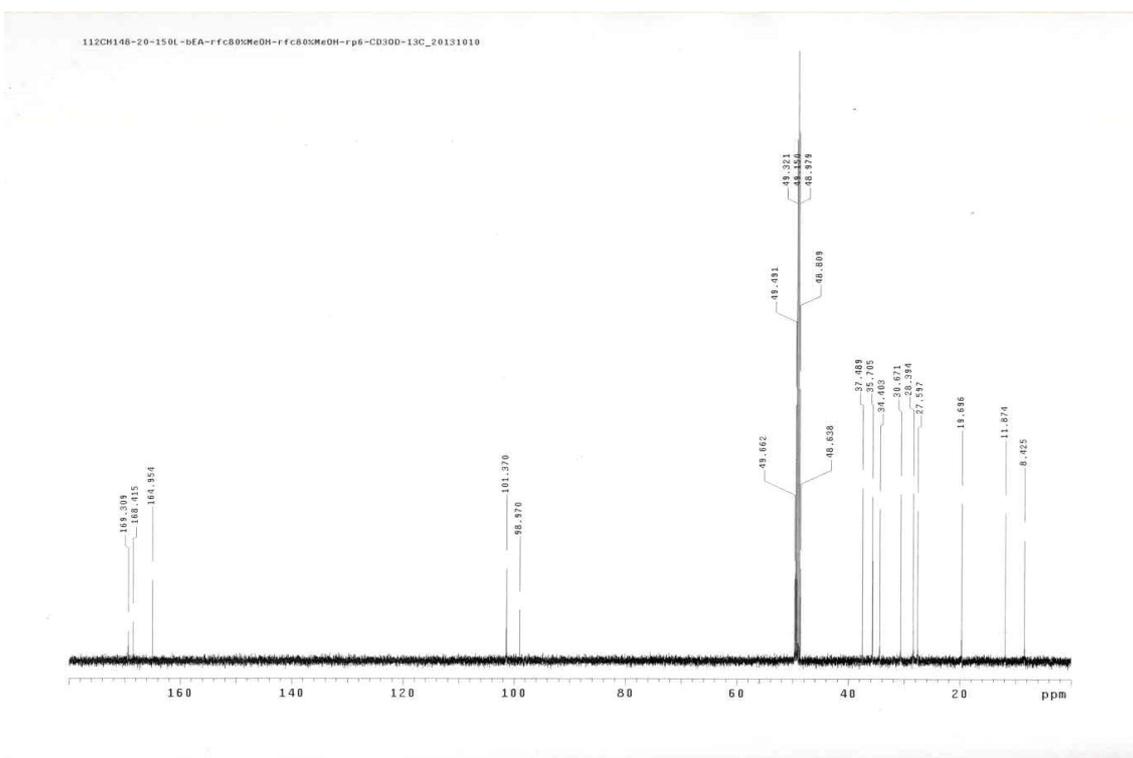


Fig. 3-14.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 148-3 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

# HR-ESI-MS Data Result

Sample : KIOST-4

Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

34 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 50 best isotopic matches for each mass)

Elements Used:

C: 0-500 H: 0-1000 O: 0-200 Na: 1-1

Minimum:

Maximum:

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf(%)	Formula
261.1461	261.1467	-0.6	-2.3	3.5	1149.4	n/a	n/a	C14 H22 O3 Na

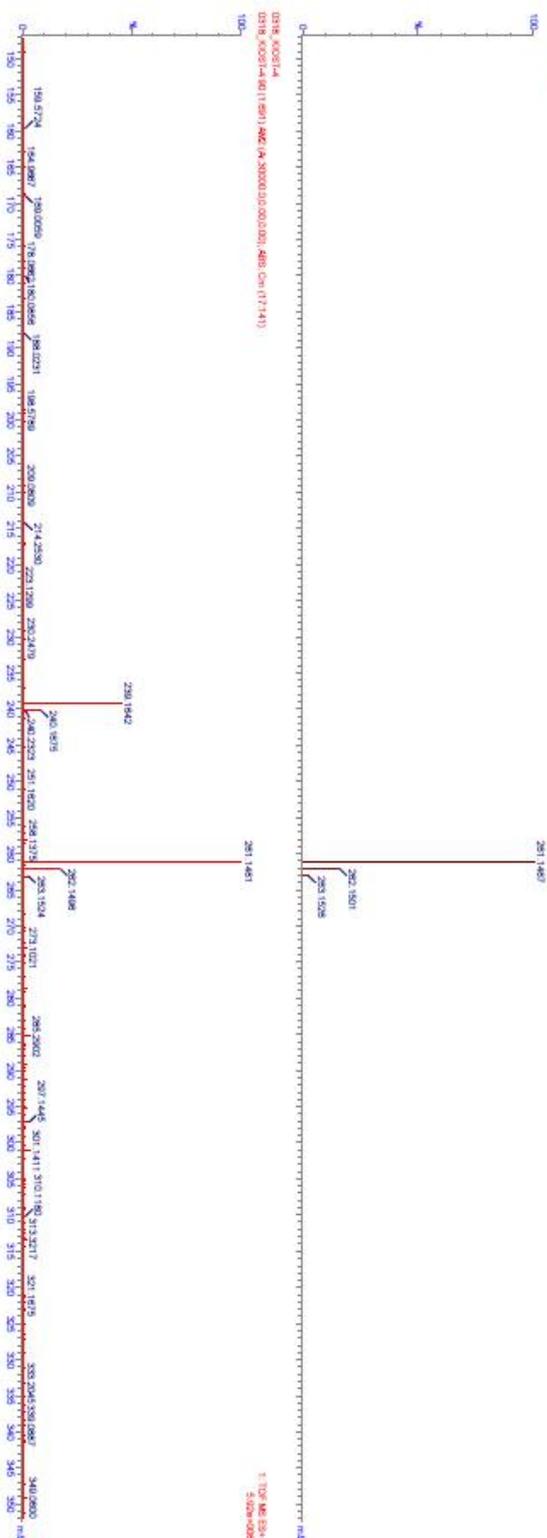


Fig. 3-15. HR-ESIMS spectrum of 148-3.

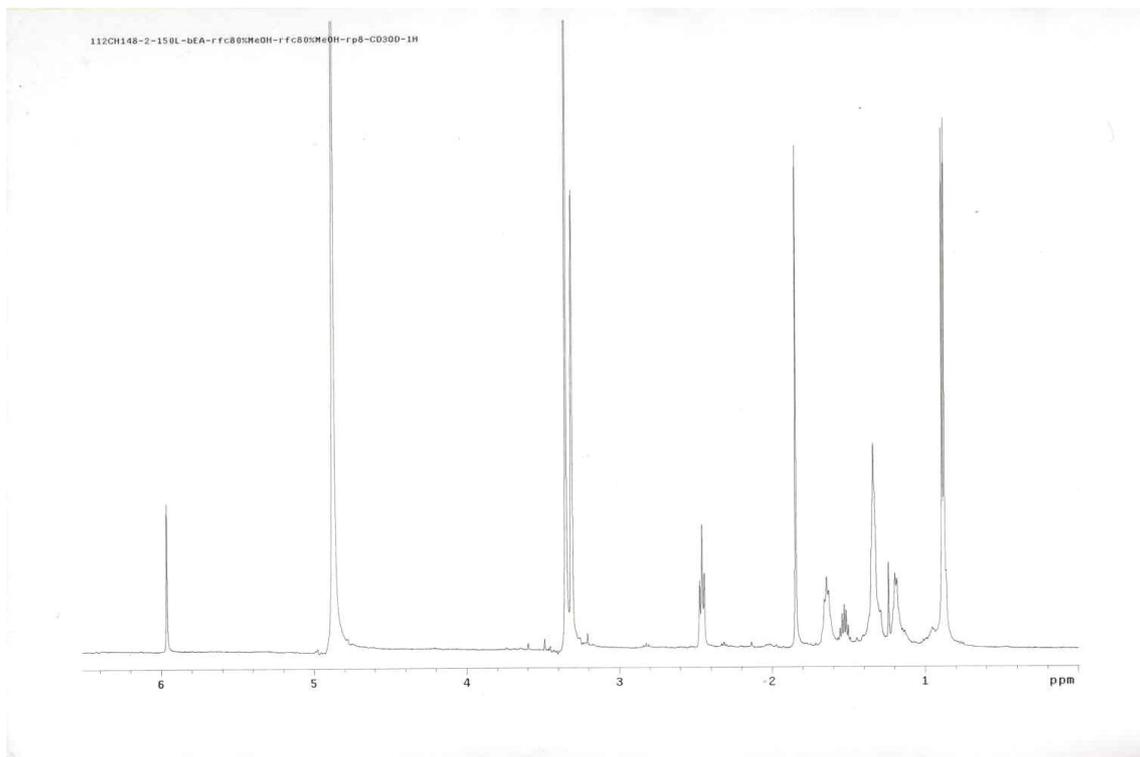


Fig. 3-16.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 148-4 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

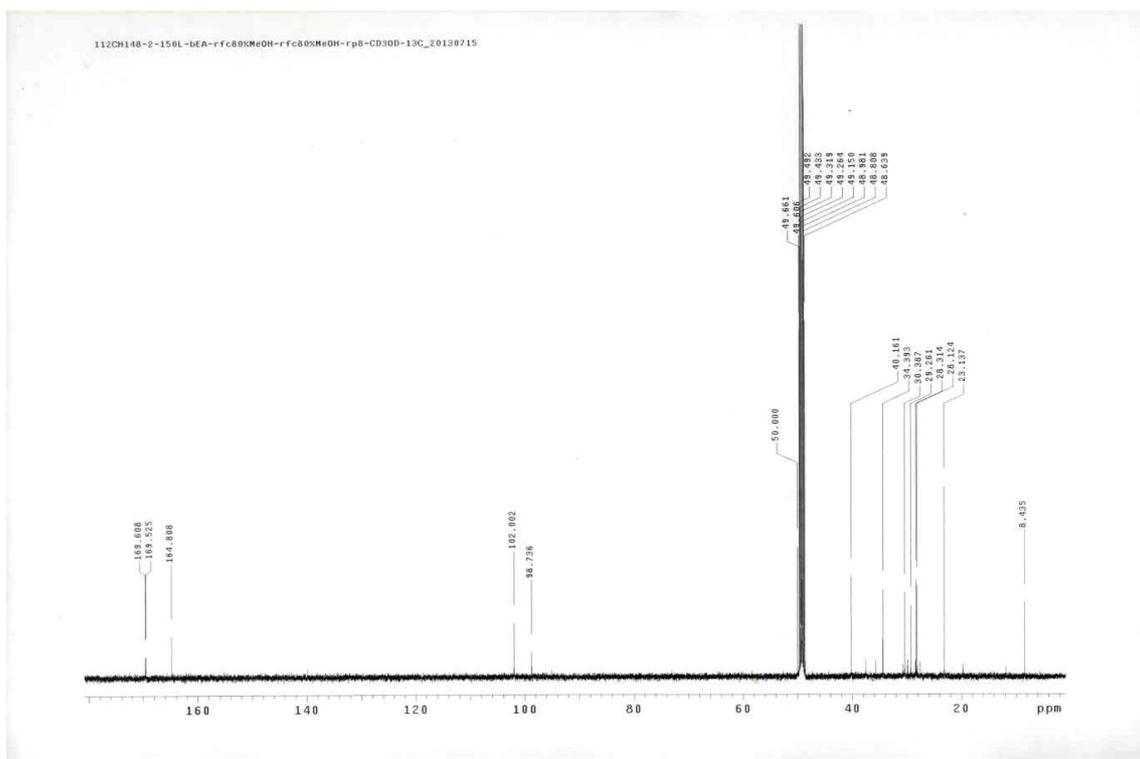


Fig. 3-17.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 148-4 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

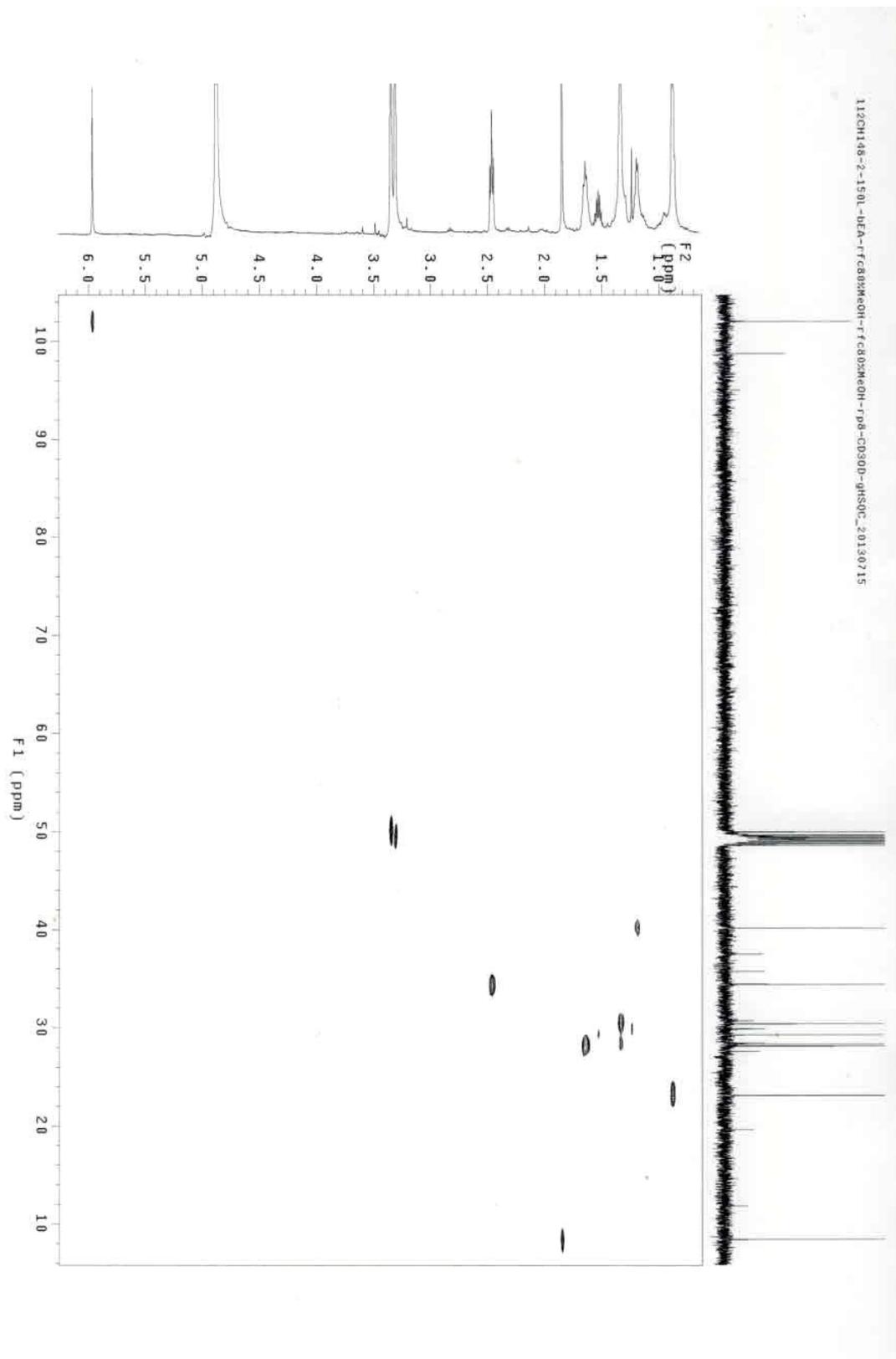


Fig. 3-18. gHSQC spectrum of 148-4 in CD<sub>3</sub>OD.

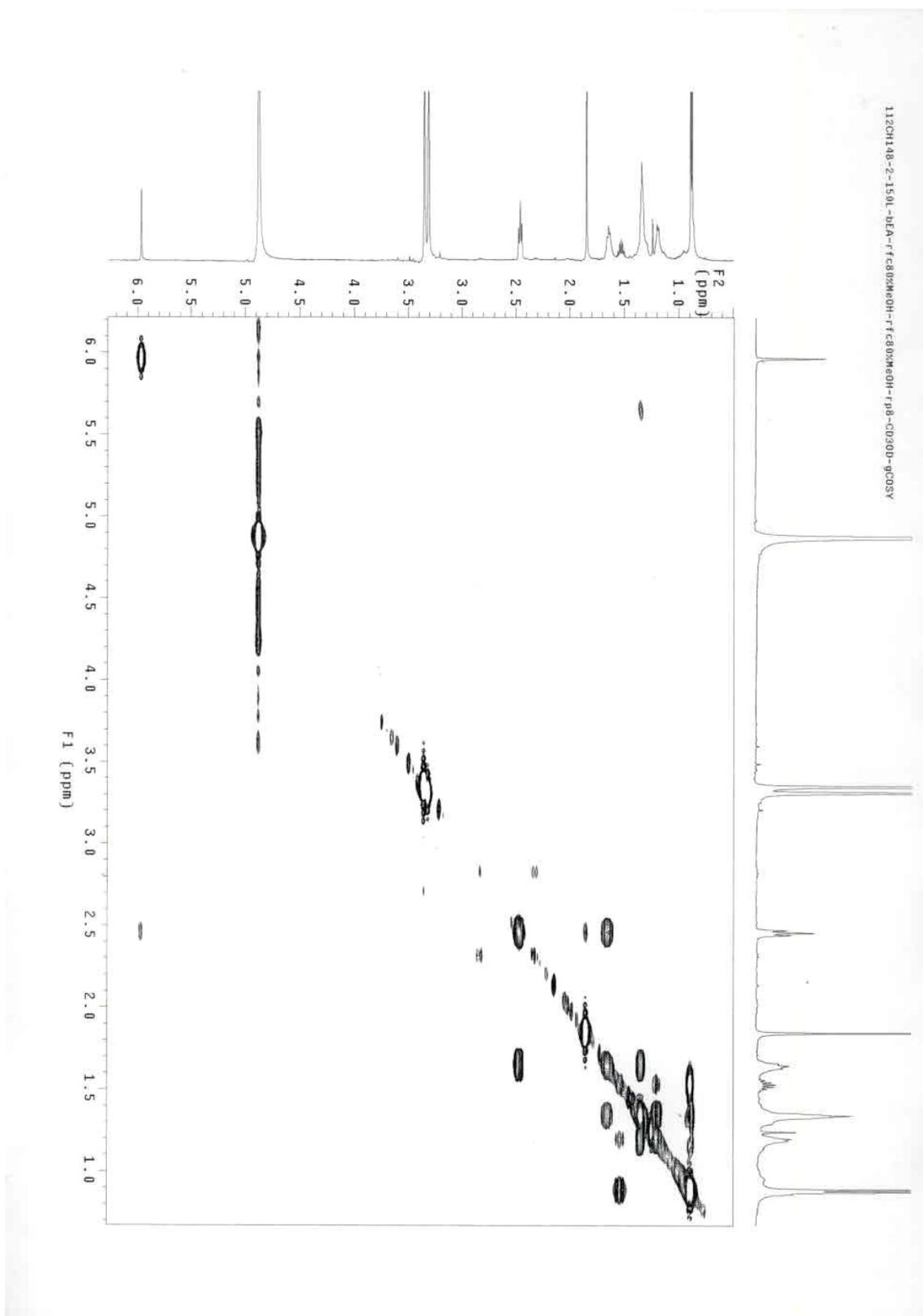


Fig. 3-19. gCOSY spectrum of 148-4 in CD<sub>3</sub>OD.

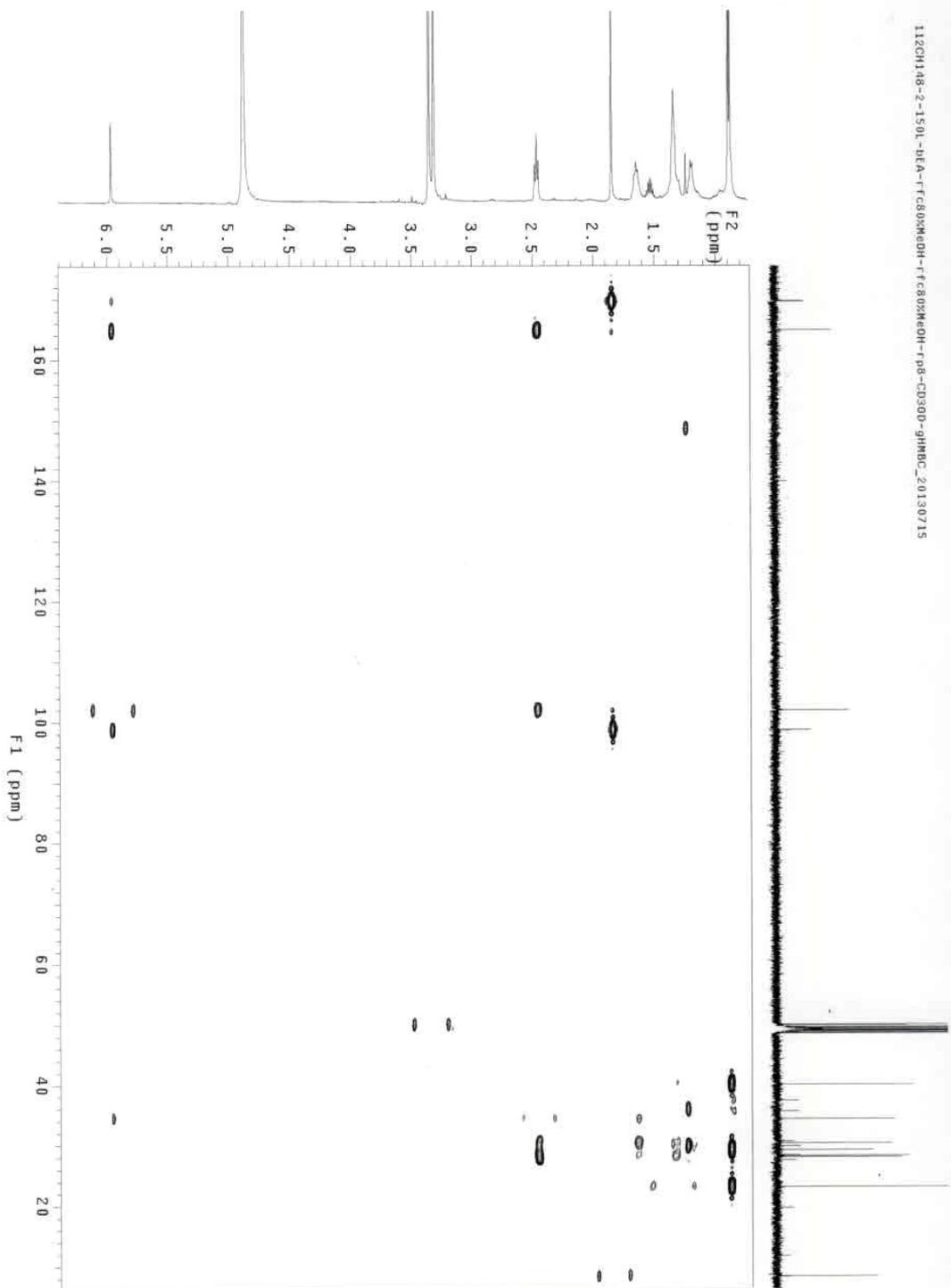


Fig. 3-20. gHMBC spectrum of 148-4 in CD<sub>3</sub>OD.

### Elemental Composition Report

#### Single Mass Analysis

Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for I-FIT = 3

#### Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

31 formula(e) evaluated with 1 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used: C: 1-500 H: 1-1000 O: 1-100 Na: 1-1

#### Minimum:

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	I-FIT	Norm	Conf(%)	Formula
261.1466	261.1467	-0.1	-0.4	3.5	900.0	n/a	n/a	C14 H22 O3 Na

#### Maximum:

131119\_KIOST\_5\_HP  
131119\_KIOST\_5\_HP 39 (0.739) AM2 (A:30000.0,0.00,0.00); ABS: Cm (2:51)

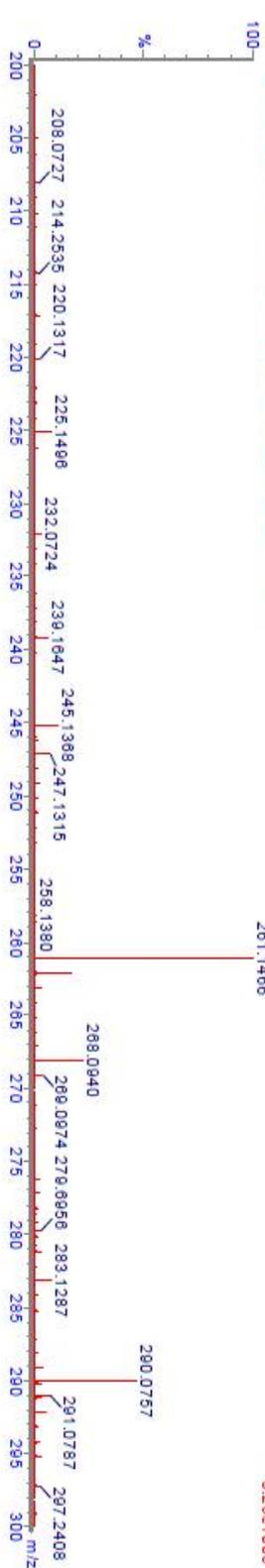


Fig. 3-21. HR-ESIMS spectrum of 148-4.

## 제 4 절 *Mycosphaerella* sp. 135PIL286 균주로부터 지방산계열의 신물질의 분리 및 구조결정

필리핀에서 채집된 해면으로부터 분리된 135PIL286 균주는 18s rRNA 염기서열 분석을 통하여 *Mycosphaerella* sp.으로 동정되었다. 이 곰팡이는 BN 한천 배지에서 별 모양의 특이한 형태를 띠며 성장하는 것을 관찰할 수 있었고, 소량배양 추출물을 통한 <sup>1</sup>H NMR 스펙트럼을 분석한 결과 기존의 패턴과는 다른 특이함을 보여, 대량배양을 통해 물질분리 연구를 진행하였다.

135PIL286 균주를 1 L의 BN 액체배지가 들어 있는 2 L 삼각플라스크에 접종한 후에, 28 °C에서 120 rpm으로 7일간 중균배양 하였다. 이를 동일한 조성의 50 L의 BN 배지를 포함한 100 L 대용량 발효기에 접종하여 28 °C, 55 rpm의 조건으로 10일간 대량배양을 진행하였다. 이렇게 얻어진 배양액 50 L를 연속원심분리기를 사용하여 균체와 배양액을 분리하였다. 분리된 배양액은 동량의 에틸아세테이트로 2회 추출하였으며, 감압 농축하여 조추출물을 얻었다.

배양액의 에틸아세테이트 추출물을 역상 크로마토그래피를 통해 분획하였다. 용리용매는 물과 메탄올을 혼합하여 20% 메탄올에서부터 시작하여 100% 메탄올까지 사용하였다. 이 중 80% 메탄올 분획물을 감압 농축하여, 다시 역상 크로마토그래피를 실시하였고, 70%, 80%, 90%, 100% 메탄올 순으로 용리하였다. 이를 통하여 얻어진 80% 메탄올 분획을 역상 HPLC (Column: YMC-ODS-A, 5 μm, 10 × 250 mm, 용매 조건: 72% MeOH, 용출 속도: 2.0 ml/min, 검출기: RI)로 정제하여 2개의 신규 화합물 **286-1**과 **286-2**를 순수하게 분리하였다 (Fig. 3-22).

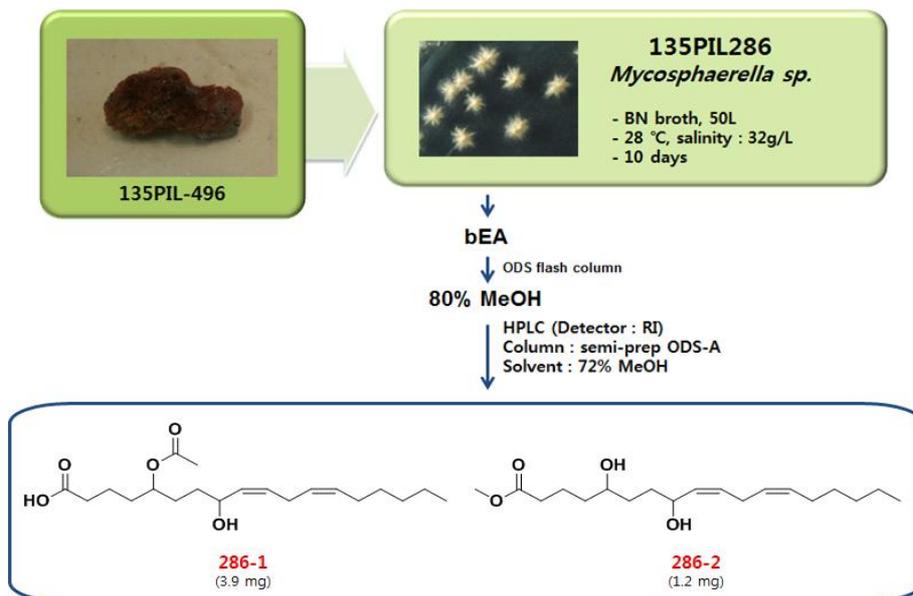


Fig. 3-22. Fatty acids **286-1** and **286-2** isolated from the culture broth of the strain 135PIL286.

신규 화합물 **286-1**은 황색 오일의 형태로 분리되었으며, UV, IR, MS,  $[\alpha]_D$  등의 물리화학적 특징은 Table 3-4에 나타내었다.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR 및 HR-ESIMS 데이터 분석을 통하여 분자식  $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_5$ 으로 결정되었으며, 4개의 불포화도를 가지는 것을 알 수 있었다.  $^{13}\text{C}$  및 HSQC 스펙트럼 분석을 통해 2개의 카르보닐 탄소( $\delta_{\text{C}}$  177.3, 172.9), 4개의  $\text{sp}^2$  메틴 탄소( $\delta_{\text{C}}$  134.0, 131.6, 130.7, 128.6), 2개의 산소와 연결된 메틴 탄소( $\delta_{\text{C}}$  75.0, 67.9), 10개의 메틸렌 탄소( $\delta_{\text{C}}$  34.8-22.0), 1개의 아세톡시 탄소( $\delta_{\text{C}}$  21.2), 1개의 메틸 탄소( $\delta_{\text{C}}$  14.6)를 확인하였다. COSY 스펙트럼 분석을 통하여 H-11( $\delta_{\text{H}}$  2.84, t)가 H-10( $\delta_{\text{H}}$  5.41, q)과 H-12( $\delta_{\text{H}}$  5.32)와 연관관계를 나타내는 것으로 보아, 두 이중결합 사이에 하나의 메틸렌이 존재함을 알 수 있었다. 또한 화학적 이동값으로 보아 산소와 연결되어 있는 H-8( $\delta_{\text{H}}$  4.41, q, 7.0, 13.75 Hz)이 H-7( $\delta_{\text{H}}$  1.56, 1.42)과 H-9( $\delta_{\text{H}}$  5.34, m)과의 COSY correlation을 보여 이중결합 바로 옆에 하이드록실기가 위치함을 알 수 있었다. 그리고, HMBC 스펙트럼의 상세한 해석 결과, H-20( $\delta_{\text{H}}$  2.04, s)과 H-5( $\delta_{\text{H}}$  4.92, m)가 C-19( $\delta_{\text{C}}$  21.2)와 long-range correlation을 보여 아세톡시기가 C-5에 위치하고 있음을 알 수 있었다. 카르복실기(C-1,  $\delta_{\text{C}}$  177.3)와 메틸기(C-18,  $\delta_{\text{C}}$  14.6)의 위치는 COSY 및 HMBC 스펙트럼 분석을 통해 결정할 수 있었다(Fig. 3-23). C-9와 C-10, C-12와 C-13 사이의 이중결합의 배열은 기존 문헌에 보고된  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C}$  NMR 데이터와의 비교 및 coupling constant (Table 3-5)의 해석을 통하여, *Z* 배열을 가짐을 알 수 있었다(Mazur, *et al.*, 1990). 이와 같이 상세한 1D 및 2D NMR 데이터의 해석을 통하여 신규 화합물 **286-1**의 평면구조를 결정할 수 있었다.

신규 화합물 **286-2**는 황색 오일의 형태로 분리되었으며, UV, IR, MS,  $[\alpha]_D$  등의 물리화학적 특징은 Table 3-4에 나타내었다.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR 및 HR-ESIMS 데이터 분석을 통하여 분자식은  $\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{O}_4$ 로 결정되었으며, 3개의 불포화도를 가지는 것을 알 수 있었다. 화합물 **286-1**과 비교하였을 때, 탄소는 1개 더 적고, 산소는 1개 더 많이 가지고 있는 것을 알 수 있었다.  $^{13}\text{C}$  및 HSQC 스펙트럼 분석을 통해 1개의 카르복실 탄소( $\delta_{\text{C}}$  176.0), 4개의  $\text{sp}^2$  메틴 탄소( $\delta_{\text{C}}$  134.2, 131.6, 130.6, 128.6), 2개의 산소와 연결된 메틴 탄소( $\delta_{\text{C}}$  72.1, 68.5), 10개의 메틸렌 탄소( $\delta_{\text{C}}$  37.8-22.5), 1개의 메톡시 탄소( $\delta_{\text{C}}$  52.1), 1개의 메틸 탄소( $\delta_{\text{C}}$  14.6)를 확인하였다. 이를 통하여, 화합물 **286-2**가 화합물 **286-1**과 유사한 구조를 가지고 있으나, C-5에 아세톡시기가 아닌 하이드록시기가 치환되어 있으며, C-1에는 메톡시기가 결합되어 있음을 알 수 있었다. COSY 및 HMBC 스펙트럼 분석을 통하여, C-6부터 C-18까지는 **286-1**과 동일한 구조를 가지고 있음을 확인하였다. 다만, H-19( $\delta_{\text{H}}$  3.65, s)의 메톡시 피크와 C-1( $\delta_{\text{C}}$  176.0) 사이에 HMBC correlation이 관측되어, 카르복실 그룹의 하이드록시기가 메톡시기로 되었음을 알 수 있었다(Fig. 3-23). C-9/C-10과 C-12/C-13의 이중결합의 배열은  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C}$  NMR 데이터 상에서 화합물 **286-1**과 동일한 화학적 이동값을 보여 *Z* 배열임을 알 수 있었으며, 신규 화합물 **286-2**의 평면구조를 결정할 수 있었다.

화합물 **286-1**과 **286-2**는 천연자원에서는 아직 보고되지 않은 신규물질로 확인되었으며, 추가적인 양 확보 및 다른 신규 화합물들의 탐색과 절대구조 규명을 위하여 100L 대용량 발효기를 이용하여 대량배양을 진행하고 있다.

Table 3-4. Physico-chemical properties of fatty acids **286-1** and **286-2**

	<b>286-1</b>	<b>286-2</b>
Appearance	Yellowish oil	Yellowish oil
Molecular formula	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>
Molecular weight	354	326
HR-ESIMS ( <i>m/z</i> )	353.2329 [M-H] <sup>-</sup> (calcd for 353.2328)	325.2384 [M-H] <sup>-</sup> (calcd for 325.2379)
UV(MeOH) λ <sub>max</sub> nm (log ε)	222 (3.2)	221 (4.2)
IR(MeOH) ν <sub>max</sub> cm <sup>-1</sup> [α] <sub>D</sub> <sup>24</sup>	2936, 2322, 1720, 1518 +106° ( <i>c</i> 0.1, MeOH)	3448, 2928, 1728 -161° ( <i>c</i> 0.1, MeOH)

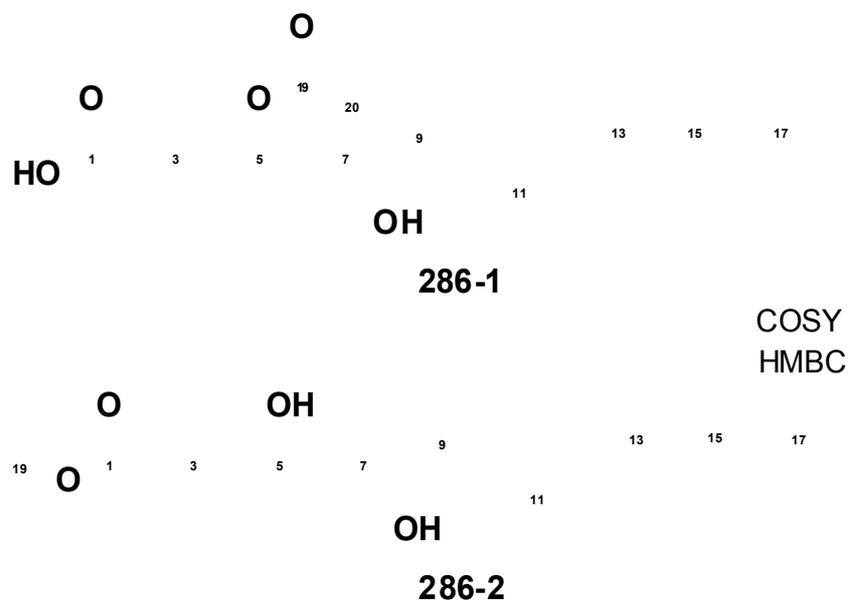


Fig. 3-23. Key HMBC and COSY correlations of **286-1** and **286-2**.

Table 3-5.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of **286-1** and **286-2** in  $\text{CD}_3\text{OD}$ 

No.	286-1		286-2	
	$\delta_{\text{C}}$ , Type	$\delta_{\text{H}}$ , Mult. ( $J$ in Hz)	$\delta_{\text{C}}$ , Type	$\delta_{\text{H}}$ , Mult. ( $J$ in Hz)
1	177.3, C		176.0, C	
2	34.8, $\text{CH}_2$	2.33, m	34.9, $\text{CH}_2$	2.34, td(1.5, 7.5)
3	22.0, $\text{CH}_2$	1.61	22.5, $\text{CH}_2$	1.75, m 1.66, m
4	34.7, $\text{CH}_2$	1.58	37.8, $\text{CH}_2$	1.45, m
5	75.0, CH	4.92, m	72.1, CH	3.53, m
6	31.1, $\text{CH}_2$	1.58	34.4, $\text{CH}_2$	1.46, m
7	34.3, $\text{CH}_2$	1.56 1.42	35.0, $\text{CH}_2$	1.72, m
8	67.9, CH	4.41, q(7.0, 13.75)	68.5, CH	4.41, q(8.5, 14.0)
9	134.0, CH	5.34, m	134.2, CH	5.36, m
10	130.7, CH	5.41, q(7.25, 14.5)	130.6, CH	5.41, m
11	27.1, $\text{CH}_2$	2.84, t(7.0)	27.1, $\text{CH}_2$	2.85, t(7.25)
12	128.6, CH	5.32, m	128.6, CH	5.33, m
13	131.6, CH	5.39, q(7.5, 15.5)	131.6, CH	5.40, m
14	28.3, $\text{CH}_2$	2.07, q(7.25, 14.25)	28.3, $\text{CH}_2$	2.07, t(7.0, 14.0)
15	30.6, $\text{CH}_2$	1.38	30.6, $\text{CH}_2$	1.38, m
16	32.8, $\text{CH}_2$	1.31	32.8, $\text{CH}_2$	1.31, m
17	23.8, $\text{CH}_2$	1.32	23.8, $\text{CH}_2$	1.33, m
18	14.6, $\text{CH}_3$	0.91 t(6.75)	14.6, $\text{CH}_3$	0.91, t(7.0)
19	172.9, C		52.1, $\text{CH}_3$	3.65, s
20	21.2, $\text{CH}_3$	2.04, s		

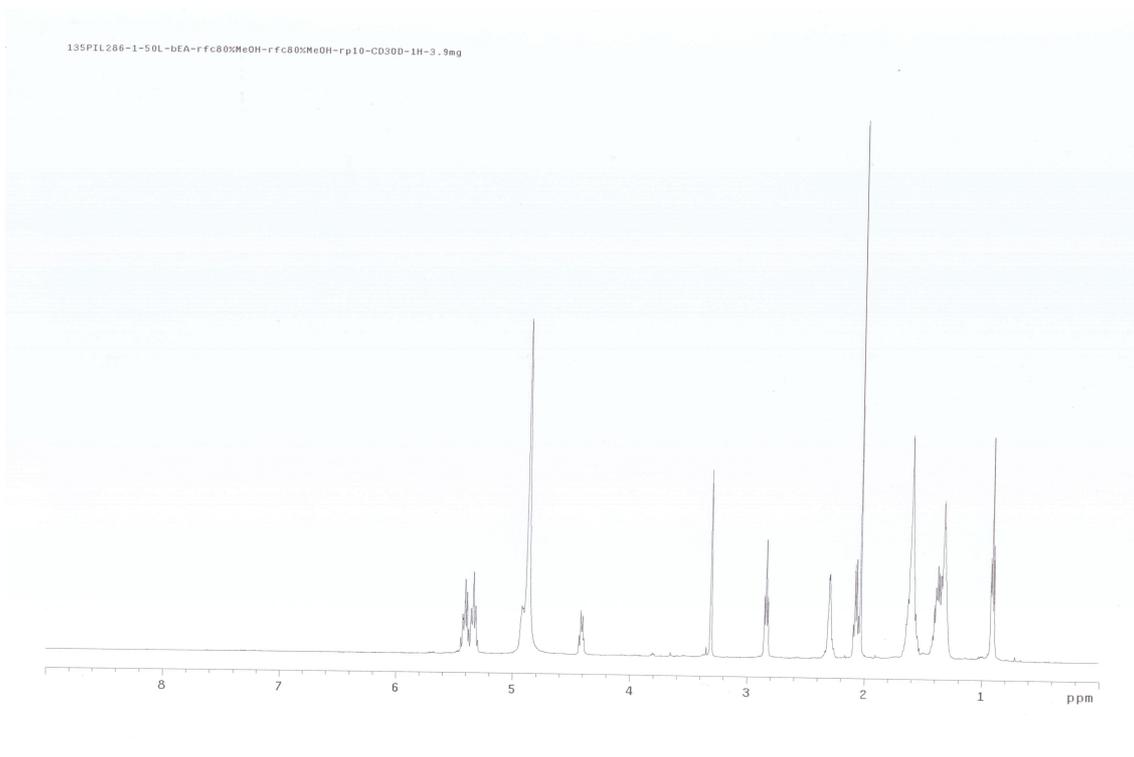


Fig. 3-24.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **286-1** in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

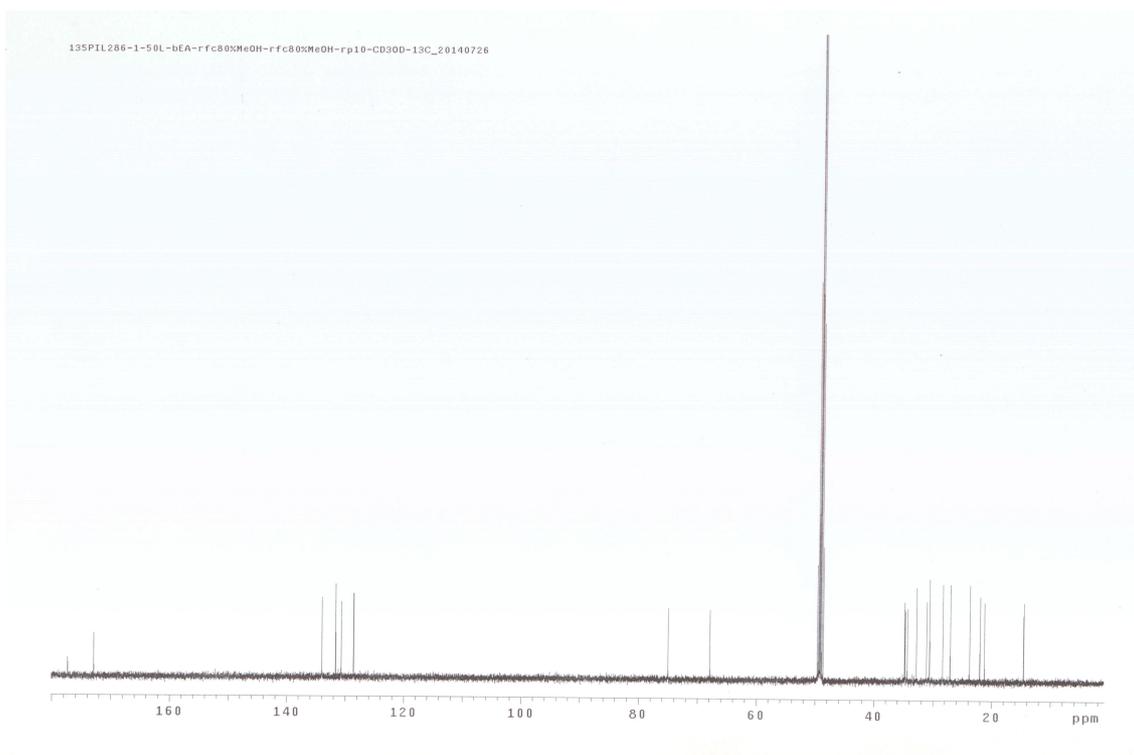


Fig. 3-25.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **286-1** in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

135PIL286-1-50L-HEA-rf-c80xmeOH-rf-c80xmeOH-r-p10-CD3OD-gHSQC\_20140728

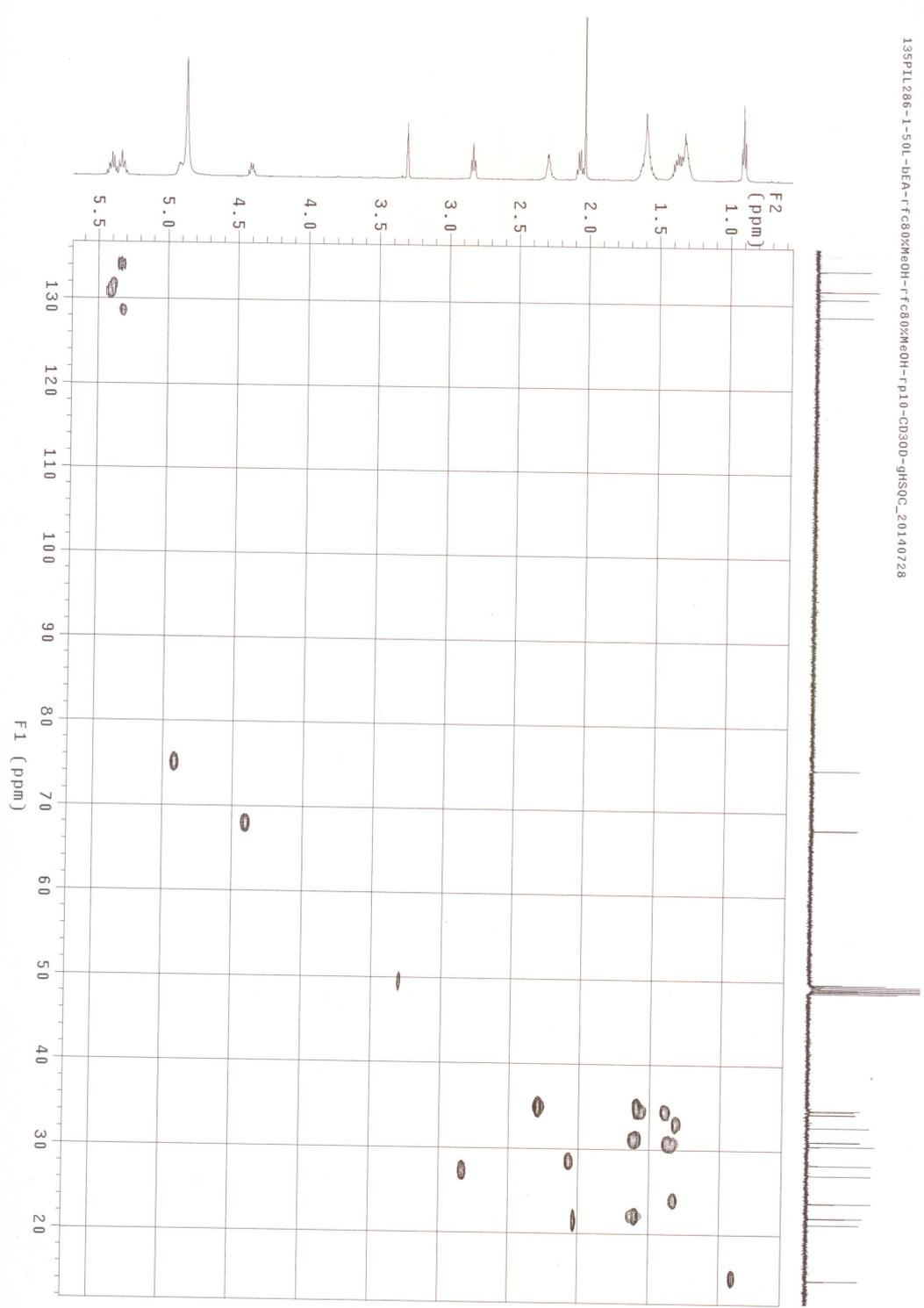


Fig. 3-26. gHSQC spectrum of 286-1 in CD<sub>3</sub>OD.

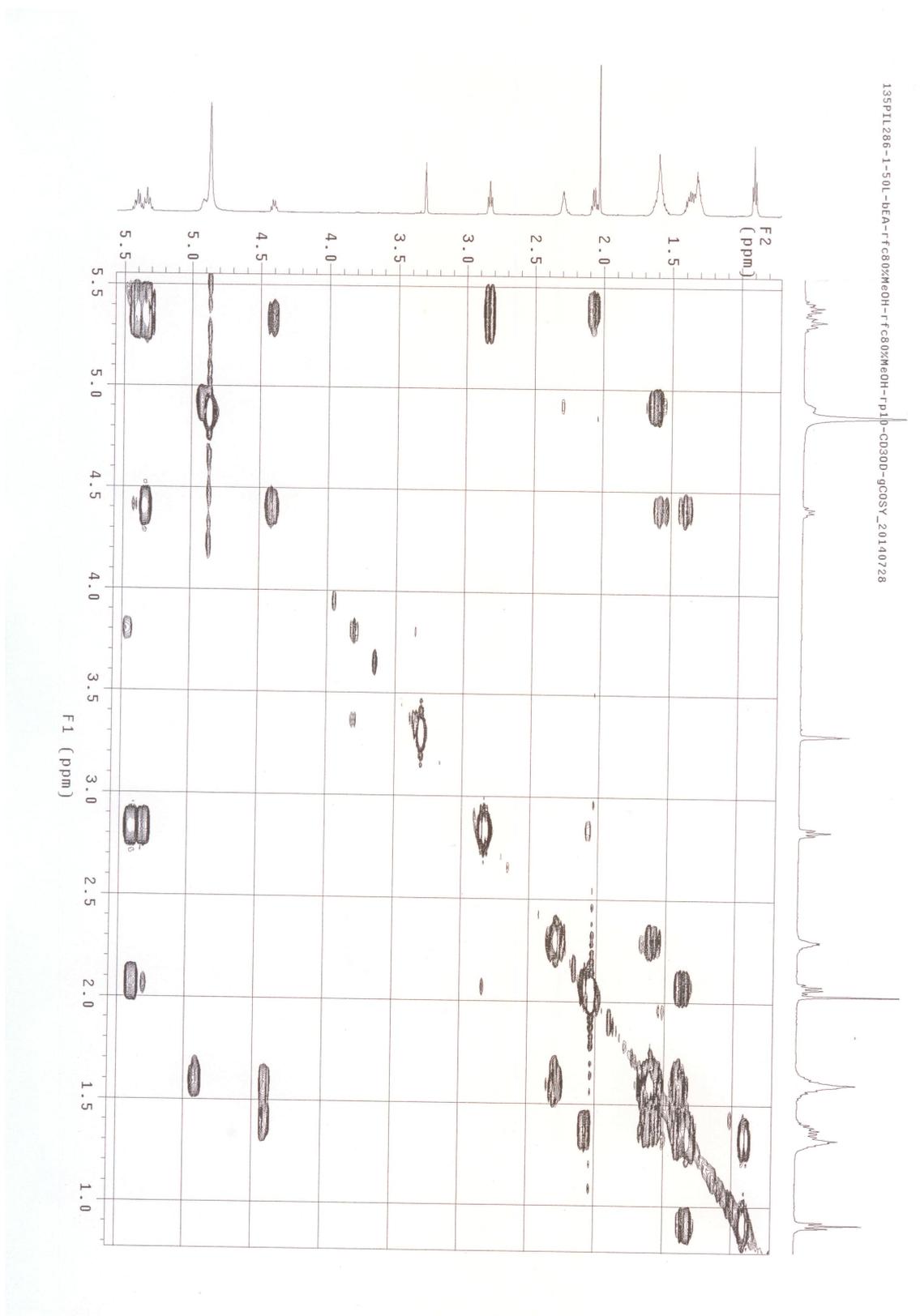


Fig. 3-27. gCOSY spectrum of 286-1 in CD<sub>3</sub>OD.

135PIL286-1-50L-bea-fc802MeOH-fc802MeOH-fp10-C030D-gHMBC\_20140728

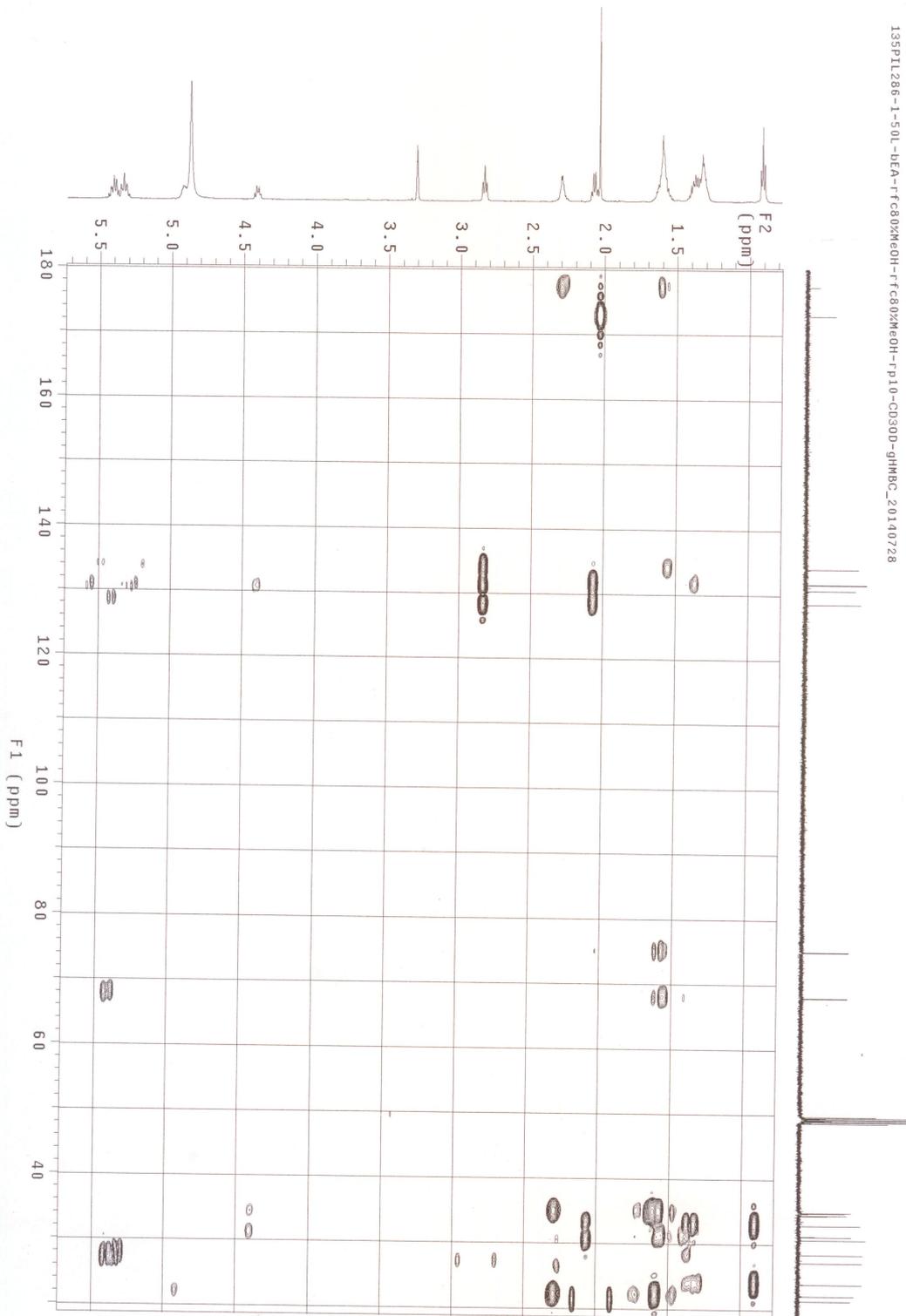


Fig. 3-28. gHMBC spectrum of 286-1 in CD<sub>3</sub>OD.

Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

17 formula(e) evaluated with 1 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 1-30 H: 1-40 O: 1-5

Minimum:

Maximum: 5.0 5.0 -1.5

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf(%)	Formula
353.2329	353.2328	0.1	0.3	4.5	891.4	n/a	n/a	C20 H33 O5

20141007\_K00ST\_H3\_HP2

20141007\_K00ST\_H3\_HP2 69 (1.20) AM2 (Ac.30000 0.0 00.0 00): ABS: Cm (19.71)

1: TOP MS ES: 1.0348

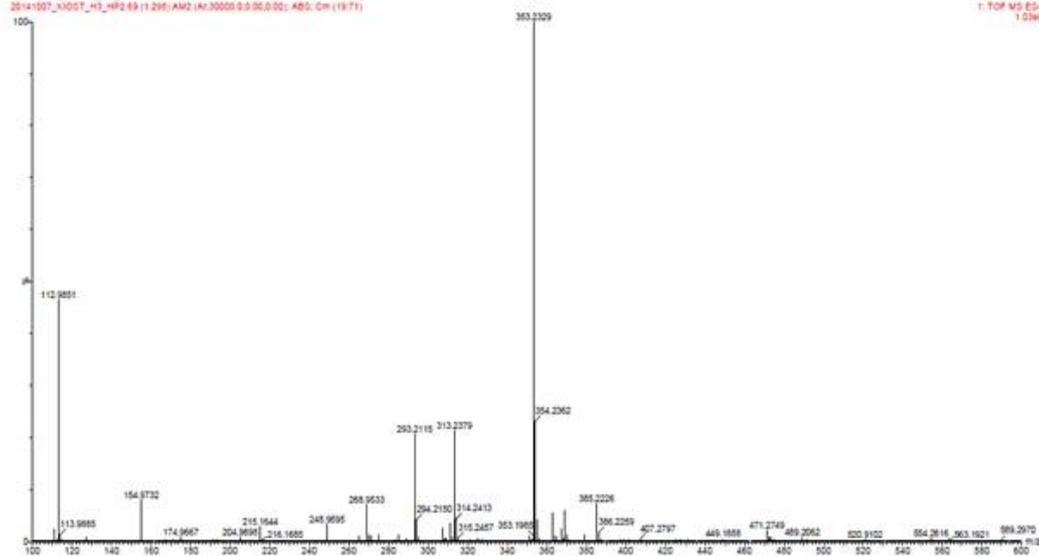


Fig. 3-29. HR-ESIMS spectrum of 286-1.

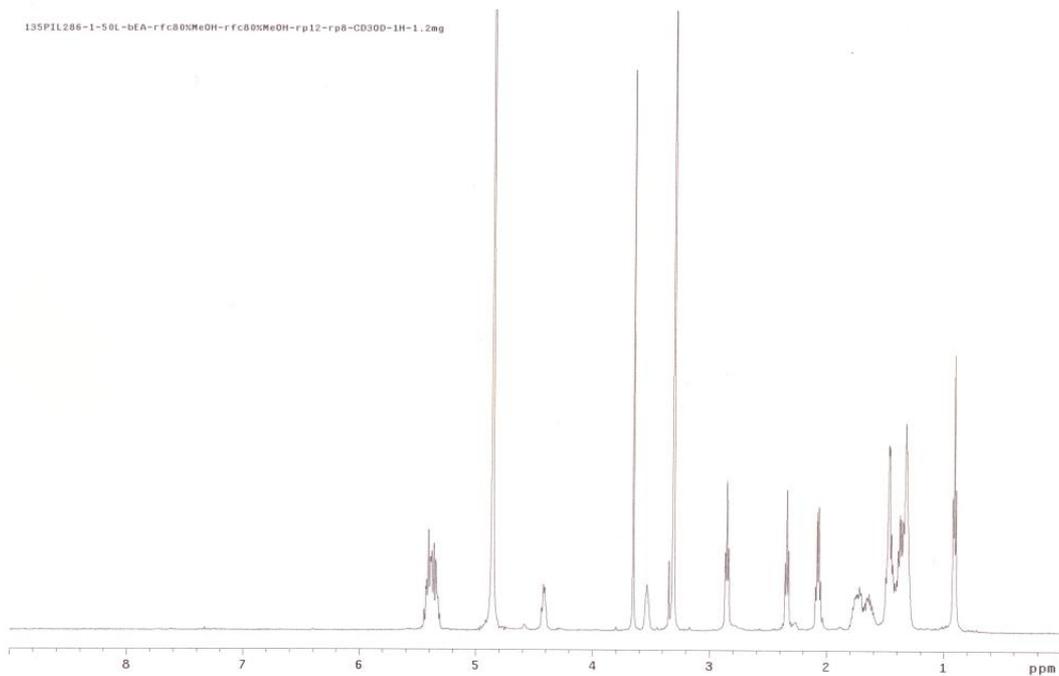


Fig. 3-30.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound **286-2** in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

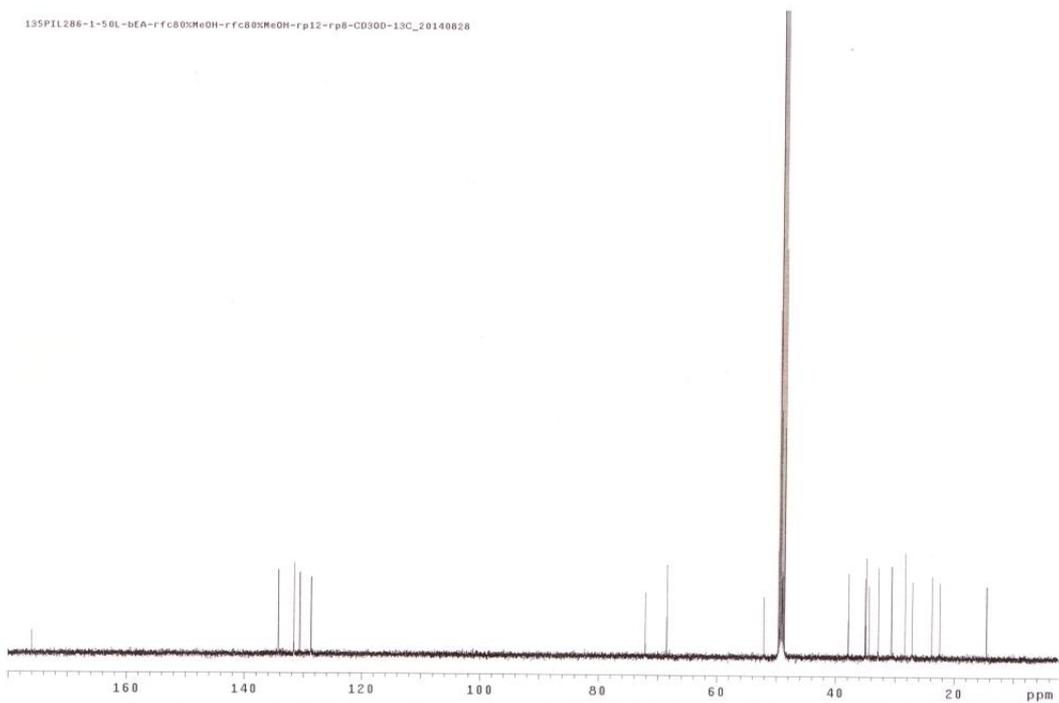


Fig. 3-31.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound **286-2** in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

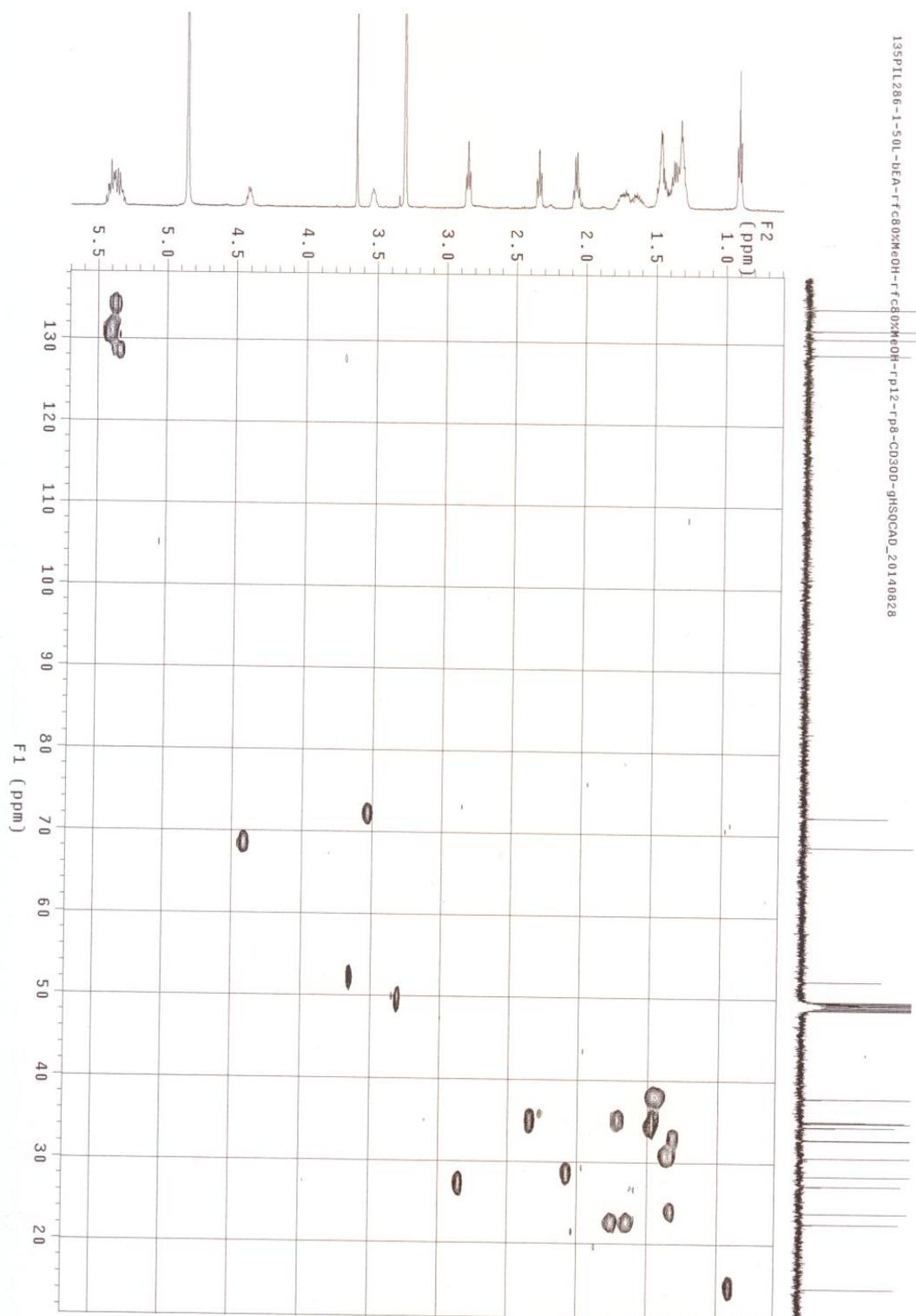


Fig. 3-32. gHSQC spectrum of 286-2 in CD<sub>3</sub>OD.

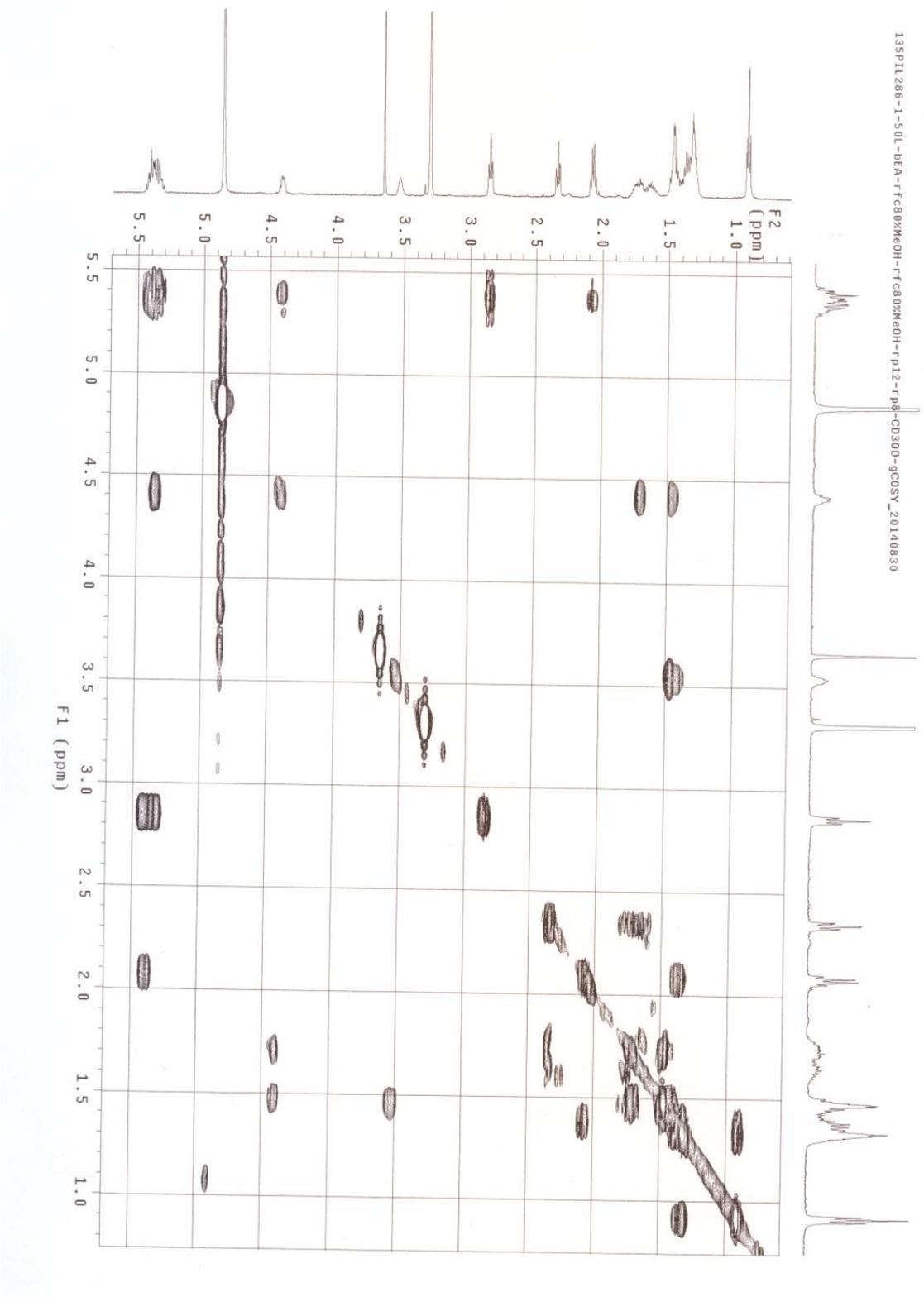


Fig. 3-33. gCOSY spectrum of 286-2 in CD<sub>3</sub>OD.

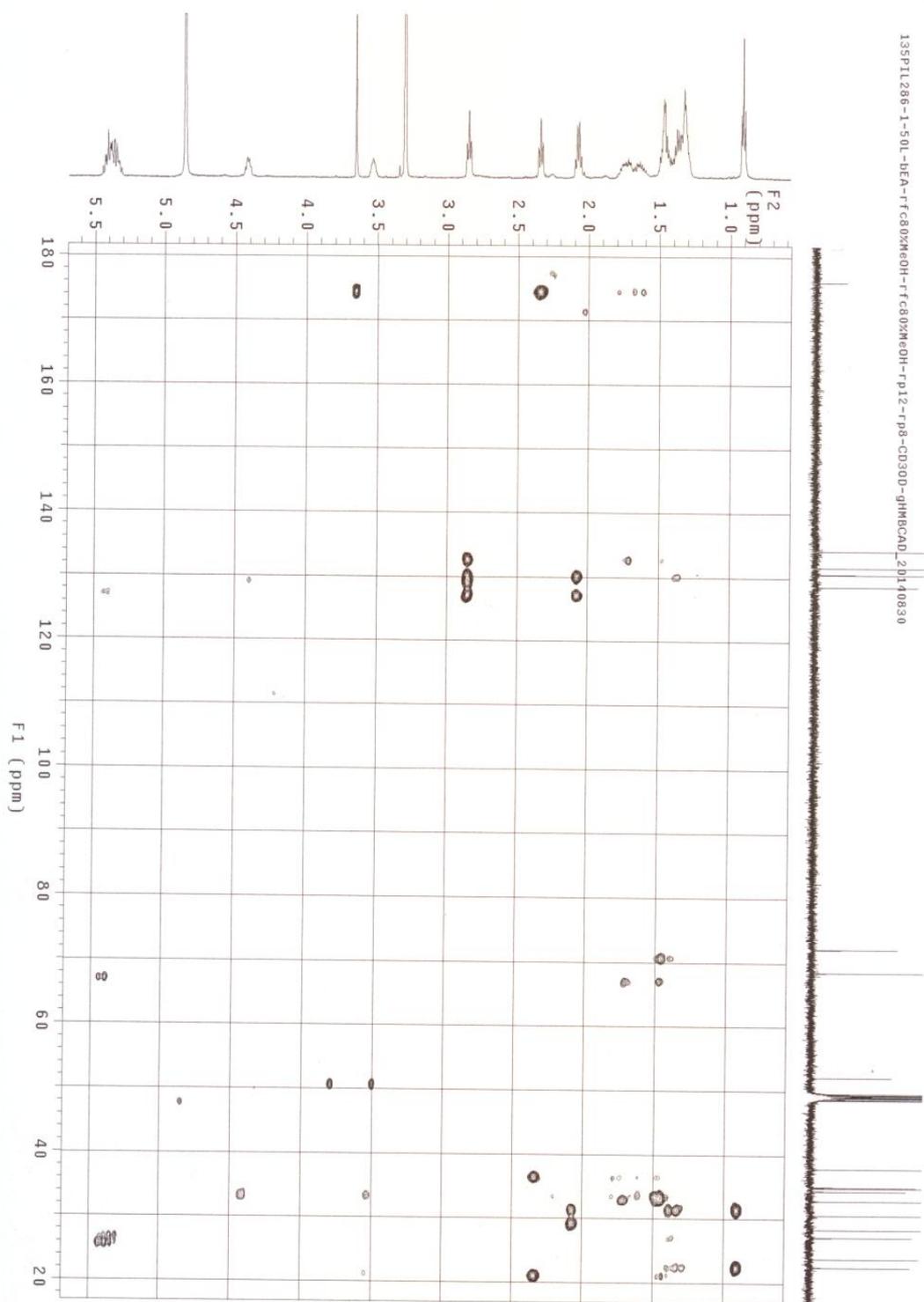


Fig. 3-34. gHMBC spectrum of 286-2 in CD<sub>3</sub>OD.

Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

16 formula(e) evaluated with 1 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 1-30 H: 1-40 O: 1-5

Minimum: -1.5

Maximum: 5.0 5.0 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf(%)	Formula
325.2384	325.2379	0.5	1.5	3.5	671.6	n/a	n/a	C19H33O4

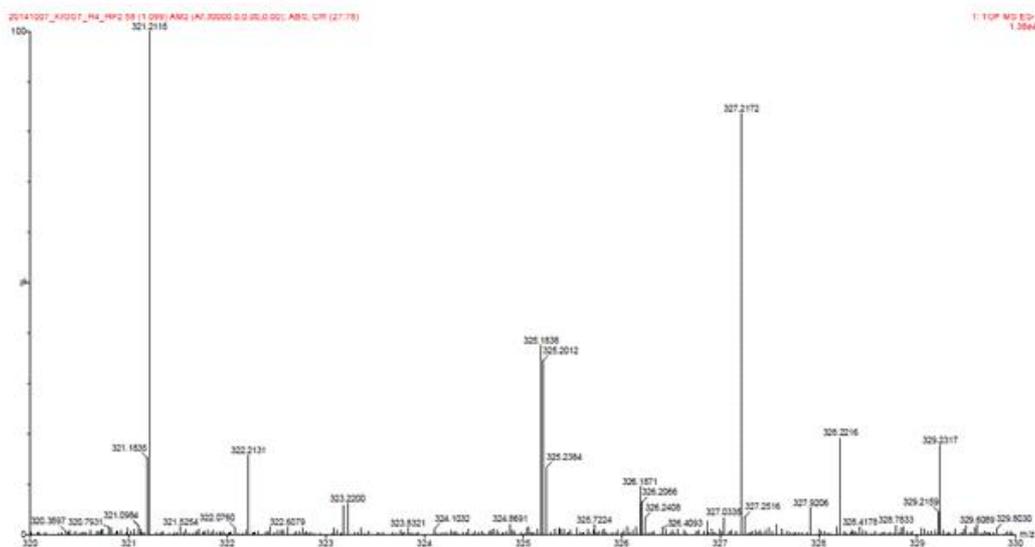


Fig. 3-35. HR-ESIMS spectrum of 286-2.

## 제 5 절 신규 해양곰팡이 1210CH-42 균주로부터 항노화 물질 분리 및 구조결정

### 1. 신규 해양곰팡이 1210CH-42 균주의 분리 및 동정

2012년 10월 마이크로네시아 측주에 위치한 한남태평양연구센터 인근 바닷가에서 채집된 해수 샘플을 paper filter하였다(Fig. 3-36). Paper filter를 회수하여 멸균해수로 희석하고 BN 한천배지(tryptone 2 g, yeast extract 1 g, beef extract 1g, D-glucose 10 g, glycerol 5 g, sea salt 32 g, agar 17 g / distilled water 1 L)에 도말하여 28℃, 7일간 배양하며 single colony를 분리하였다. 1210CH-42 균주는 흰색의 작은 colony가 배양시간이 지날수록 짙은 갈색으로 변하며 흰색과 회색의 포자를 형성하였고, BN agar 배지를 진갈색으로 염색시켰다(Fig. 3-37).



Fig. 3-36. Photo of the seashore near the Korea South Pacific Ocean Research Center(KSORC) in Chuuk, Micronesia.

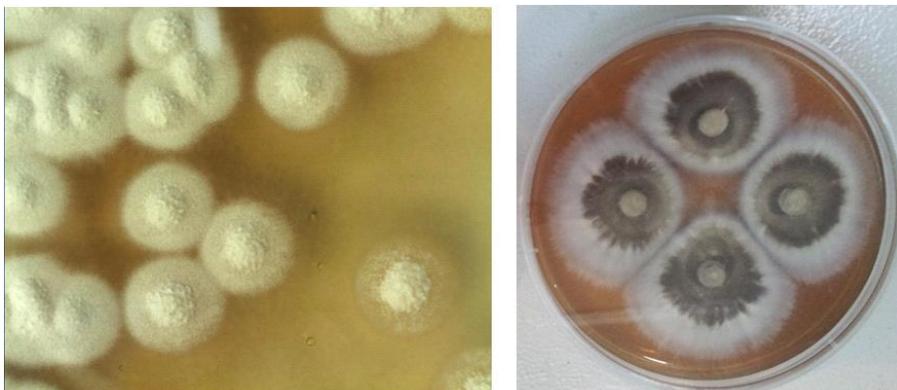


Fig. 3-37. Photos of the novel marine fungus 1210CH-42.

1210CH-42 곰팡이 균주 동정을 위해 18s rRNA 및 ITS+26s rRNA(D1/D2 region) 염기서열을 분석하였다. 18S rRNA 염기서열 분석은 18 rRNA primer, ITS1 5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G)3' 와 ITS4 5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC)3' 를 사용하여 PCR에 의해 genomic DNA로부터 증폭하였다. 증폭된 DNA로부터 673 bp와 1216 bp의 염기서열을 얻었고 ABI prism 3730XL DNA analyzer(Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용하여 분석하였다. 확보된 해양 미생물들의 염기서열 값은 NCBI에 등록된 균주들과 Blast search를 통하여 homology 상동성을 확인하였다. 검색한 결과 *Bacidiomycota* sp.와 *Meira* sp., *Exobasidium* sp.에 대한 18s rRNA 및 ITS+26s rRNA(D1/D2 region) 염기서열 상동성이 94%, 87~96%, 92%로 나타나 *Basidiomycota* phylum에 속하는 것을 확인하였으며, novel class 해양곰팡이 인 것으로 동정되었다. 지금까지 보고된 적이 없었던 이 해양 곰팡이는 colony 형태, 포자 형성 및 배양학적 특이성 분석을 진행 중이며, 국내·외 곰팡이 전문가들의 조언을 통해 신규 해양 곰팡이로서의 정확한 동정을 진행 중에 있다.

## 2. 배양 추출물의 항산화 활성

1210CH-42 colony를 BN broth가 첨가된 100 mL flask에 접종하여 28°C에서 120 rpm으로 7일간 액체배양을 하여 소량배양 추출물을 얻었다. 배양액 에틸아세테이트 추출물의 항산화 활성을 측정하기 위해 DPPH radical 소거능 method를 사용하였다.

항산화 활성 측정 결과 1210CH-42 균주의 배양액 조추출물은 1 mg/mL 농도에서 DPPH radical 소거능이 77%이상의 우수한 활성을 가지는 것으로 확인되었다. 동일 농도에서 positive control로 사용한 kojic acid 보다 뛰어난 활성을 보였으며, 항노화 물질로 사용 중인 arbutin과는 유사한 항산화 활성을 가지고 있음을 알 수 있었다(Fig. 3-38).

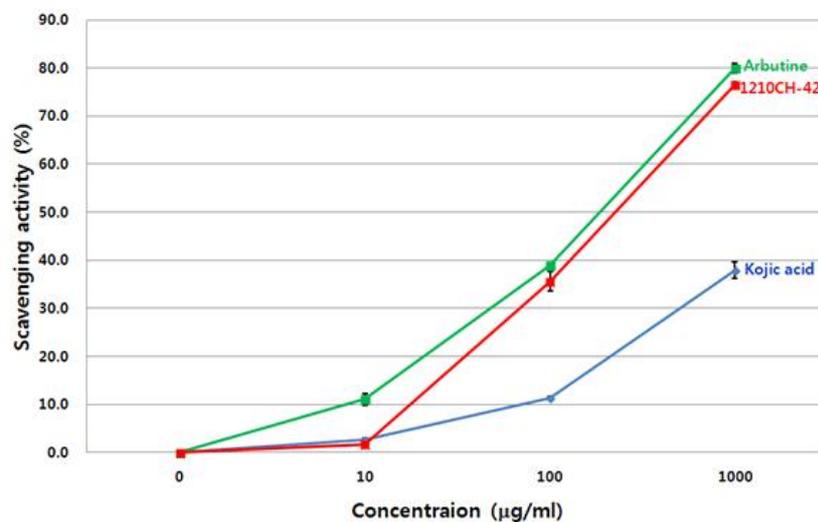


Fig. 3-38. Antioxidant activity of the crude extract of the strain 1210CH-42.

신규 해양 곰팡이 1210CH-42는 배양액 조추출물에서 우수한 항산화 활성이 확인되어 신규 해양 곰팡이 1210CH-42 균주로부터 기능성 물질의 발굴 가능성을 확인 할 수 있었다. 또한 1210CH-42 배양액 조추출물을  $^1\text{H-NMR}$  data로 분석한 결과, 이 균주가 생성하는 물질들이 아주 특이한 구조를 가지고 있을 것으로 예상되었으므로 활성물질 분리를 위한 유용 균주로 선정하고 최적배양 조건 확립 및 대량배양을 통한 물질 분리 연구를 진행하였다.

### 3. 배양 최적 조건 확립

1210CH-42 균주로부터 활성물질을 얻기 위한 최적 배양 조건 실험을 진행하였다. 이 균주가 분리된 BN broth 배지를 기본으로 하여 Table 3-6과 같이 다양한 염도와 pH 조건으로 배지 조성을 바꾸어 배양하였다. 배양액은 에틸아세테이트로 추출하여 조추출물을 얻고  $^1\text{H-NMR}$  분석을 통하여 다양한 활성 물질이 생성되는 배양 최적 조건을 확인하였다.

200 mL의 BN broth 배지에 sea salt를 0~30 g/L로 첨가하여 배양하였다. 배양 전 pH는 7.0이었으며, 7일 배양 후 0, 10, 20과 30 g/L의 조건에서 pH는 각각 5.5, 5.0, 6.0와 6.5로 측정되었다. 그리고 pH 조건변화에 따른 물질생성을 확인하기 위해 200 mL의 BN broth 배지에 1M의 NaOH와 HCl을 사용하여 pH 4, 5, 6, 7과 8로 조정하고 배양하였다. 배양 전 pH 4~8로 조절했던 배지는 배양 후 pH 4.2~5.6으로 측정되었다. 각각의 배양액은 에틸아세테이트로 추출하고 감압 농축하여 조추출물을 얻었다. 이들 조추출물에 대한  $^1\text{H-NMR}$  분석은  $\text{CD}_3\text{OD}$  용매를 사용하여 측정하였다. 그 결과 10 g/L의 sea salt를 사용하였을 때 다양한 물질들이 생성되었으며(Fig. 3-39), pH 7.0 조건 하에서 배양하였을 때 활성 신물질이 생성된 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 3-40).

Table 3-6. Optimal medium conditions of the strain 1210CH-42

Components	Salinity test	pH test
	g/L	
D-glucose	10	10
Tryptone	2	2
Yeast extract	1	1
Beef extract	1	1
Glucose	5	5
Temperature(°C)	28	28
Shaking speed(rpm)	140	140
Sea salt	0, 10, 20, 30	10
pH	7.0	4, 5, 6, 7, 8
Culture duration(days)	7	7



Fig. 3-39.  $^1\text{H-NMR}$  data of the culture extracts by salinity change.

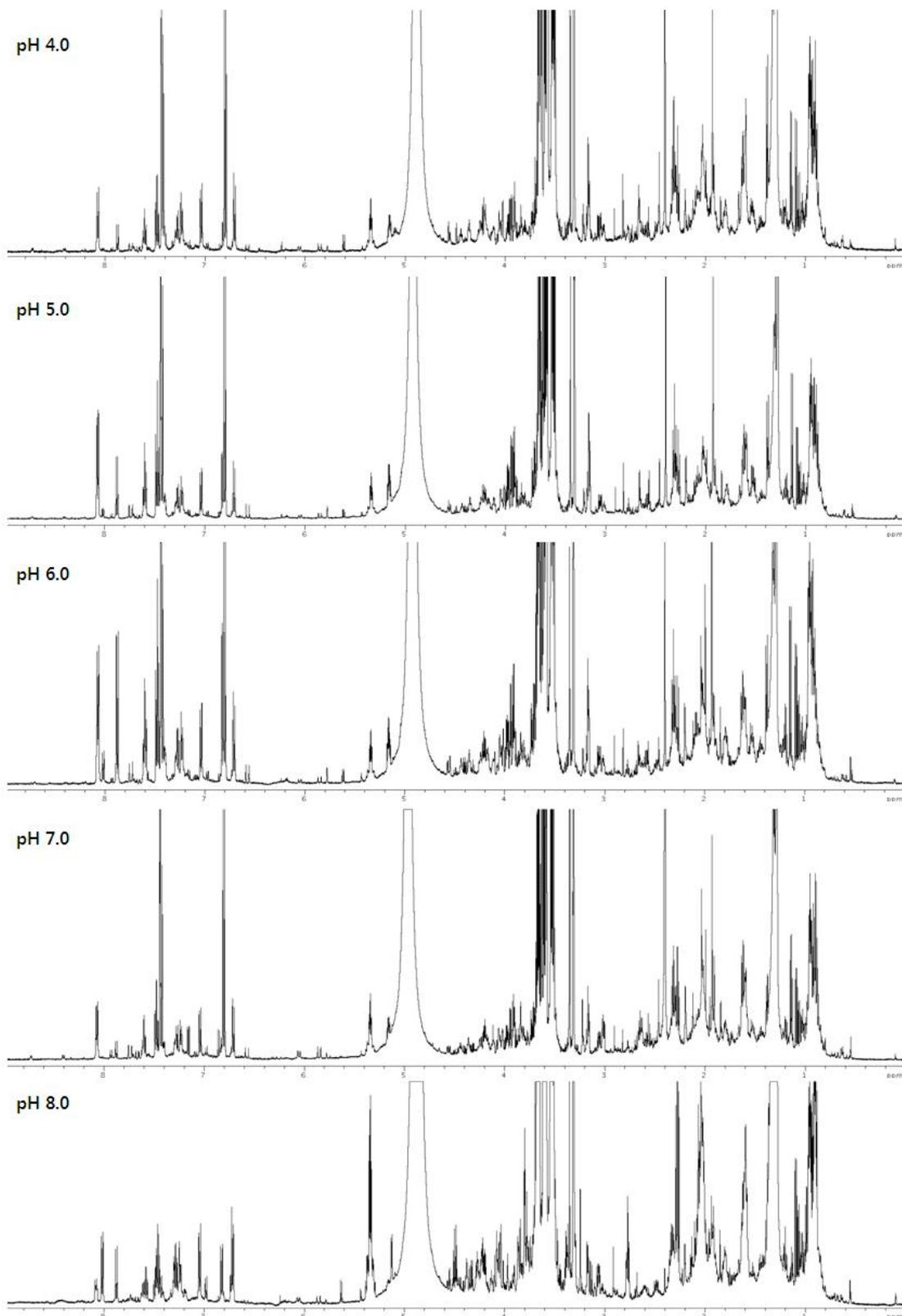


Fig. 3-40.  $^1\text{H-NMR}$  data of the culture extracts by pH change.

#### 4. 대량 배양, 신물질 분리 및 구조결정

-70°C, 40% glycerol 보존 중인 1210CH-42 균주를 BN 한천배지에서 배양한 후에, single colony를 BN broth가 첨가된 500 mL flask에 접종하여 28°C에서 120 rpm으로 7일간 종균배양 하였다. 이 종균 배양액은 대량 배양을 위해 sea salt 10 g/L, pH 7.0의 50 L BN broth 배지로 조성된 대용량 발효조에 접종하여 28°C로 8일간 배양하였다. 이렇게 얻어진 배양액 50 L 를 연속원심분리기를 사용하여 균사체와 배양여액으로 분리하였다. 배양여액은 동일한 양의 에틸아세테이트로 균사체는 메탄올로 각각 2회씩 용매 추출하였으며, 감압 농축기를 통해 농축하여 얻어진 조추출물은 -20°C에 보관하며 분리를 위한 시료로 사용하였다.

배양여액의 에틸아세테이트 조추출물은 역상 크로마토그래피로 사용하여 분획하였다. 용리용매는 물과 메탄올 혼합하여 20%메탄올에서 시작하여 100%메탄올까지 5 분획으로 분리 하였다. 각각 분획물을 감압 하에 농축하여 분획 농축물을 얻었다. 각 분획 농축물은 C18 역상 HPLC(C18 reversed-phase HPLC, Column: YMC-ODS-A, 5 μm, 10×250 mm, 용출 속도: 1.5 mL/min, RI detector)를 사용하여 최적 분리 조건을 찾아 단일 물질로 정제하였다(Fig. 3-41).

이들 물질은 1D, 2D NMR 및 MS 등의 체계적인 분광학적 분석을 통하여 구조를 규명하였다. 그 결과 신규 해양 곰팡이 1210CH-42의 50 L 배양액 추출물로부터 5가지 type으로 13점의 신물질과 천연물에서는 처음으로 분리된 항산화 활성이 알려진 물질들을 포함하여 38점의 물질들을 얻을 수 있었다(Fig. 3-41).

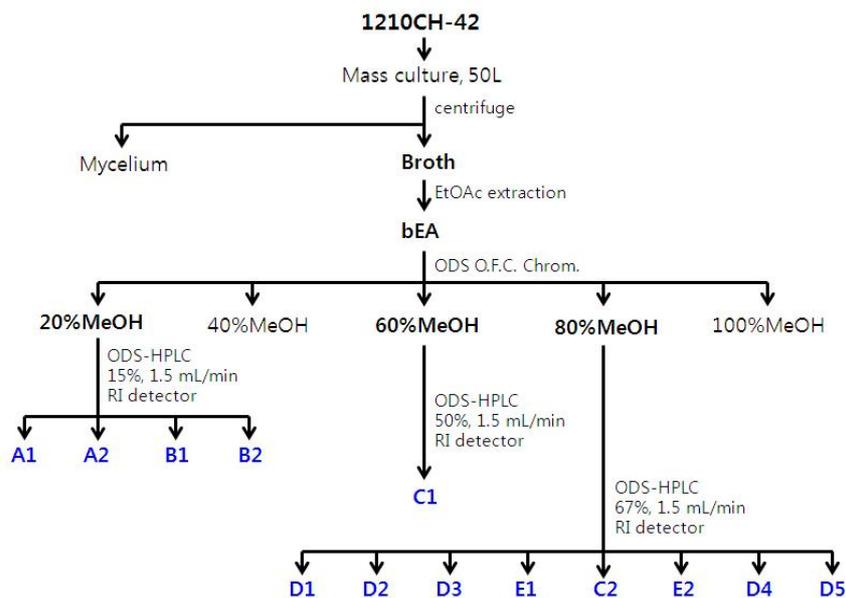


Fig. 3-41. Isolation scheme of the new compounds from the mass culture broth of the strain 1210CH-42.

A type의 저분자 신물질들은 1.7 g의 20% MeOH 분획으로부터 분리되었다. C18 역상 HPLC(C18 reversed-phase HPLC, Column: YMC-ODS-A, 5  $\mu$ m, 10 $\times$ 250 mm, 용출 용매: 15%MeOH, 용출 속도: 1.5 mL/min, RI detector)로부터 rp2 fraction을 분리하고, C18 역상 HPLC(C18 reversed-phase HPLC, Column: YMC-ODS-A, 5  $\mu$ m, 10 $\times$ 250 mm, 용출 용매: 5%MeOH, 용출 속도: 1.5 mL/min, RI detector)로 재정제하여 **A1**(0.4 mg)과 **A2**(0.6 mg)을 얻었다(Fig. 3-41).

**A1**의  $^1\text{H}$  NMR(Fig. 3-43)에서 확인된  $\delta$  1.36(d,  $J=5.0$ ,  $\text{CH}_3$ )의 H-3 methyl기는 H-2( $\delta$  4.10, q)와 COSY(Fig. 3-45)연결을 가지고, C-2( $\delta$  55.7)과 amide carbon C-1( $\delta$  179.1)과 HMBC(Fig. 3-47)연결이 나타났다. LRAPCI-MS(Fig. 3-48)분석을 통해  $m/z$  113.04  $[\text{M}-\text{H}]^-$  peak를 확인하였고 분자식  $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$ 로 결정되었다. **A2**는  $\delta$  2.91(s,  $\text{CH}_3$ )의 methyl기 peak가 COSY(Fig. 3-45)연결이 확인되지 않았지만, 이 proton은 C-2( $\delta$  54.1)의 methylene carbon 및 C-4( $\delta$  159.5)와, 그리고 H-2는  $\delta$  174.0의 amide carbon과의 HMBC(Fig. 3-47) correlation을 보였다. LR-APCIMS(Fig. 3-49)분석을 통해  $m/z$  113.08  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 114.91  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 에서 강한 peak를 확인하였고 분자식  $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$ 로 결정되었다(Fig. 3-42). 분자량이 114로 동일하며 작은 구조를 가지는 이 신물질들은 공명이 가능한 구조와 -OH기를 가지고 있어 항노화 및 항염 활성이 있을 것으로 기대된다.

**A1**:  $^1\text{H}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) 1.36(d,  $J=5.0$ ,  $\text{CH}_3$ ), 4.10(q, CH),  $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) 17.7, 55.7, 159.5, 179.1, LRAPCIMS  $m/z$  113.04  $[\text{M}-\text{H}]^-$ ,  $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$ .

**A2**:  $^1\text{H}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) 2.91(s,  $\text{CH}_3$ ), 3.96(s,  $\text{CH}_2$ ),  $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) 29.4, 54.1, 159.5, 174.0, LRAPCIMS  $m/z$  113.08  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 114.91  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$ .

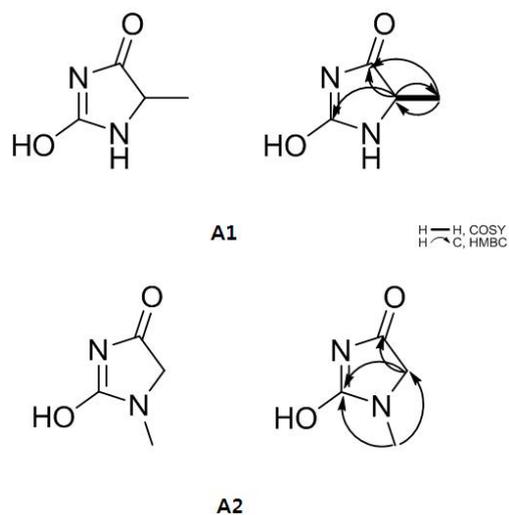


Fig. 3-42. The new compounds **A1** and **A2** from the strain 1210CH-42.

Table 3-7. NMR data for the new compounds **A1** and **A2** in CD<sub>3</sub>OD

No.	<b>A1</b>			<b>A2</b>		
	$\delta_C$	$\delta_H$ , mult. ( $J$ in Hz)	HMBC	$\delta_C$	$\delta_H$ , mult. ( $J$ in Hz)	HMBC
1	179.1			174.0		
2	17.7	4.10, q	C1,C3,C4	54.1	3.96, s	C1,C4
3	55.7	1.36, d ( $J=5.0$ )	C1,C2	29.4	2.91, s	C2,C4
4	159.5			159.5		

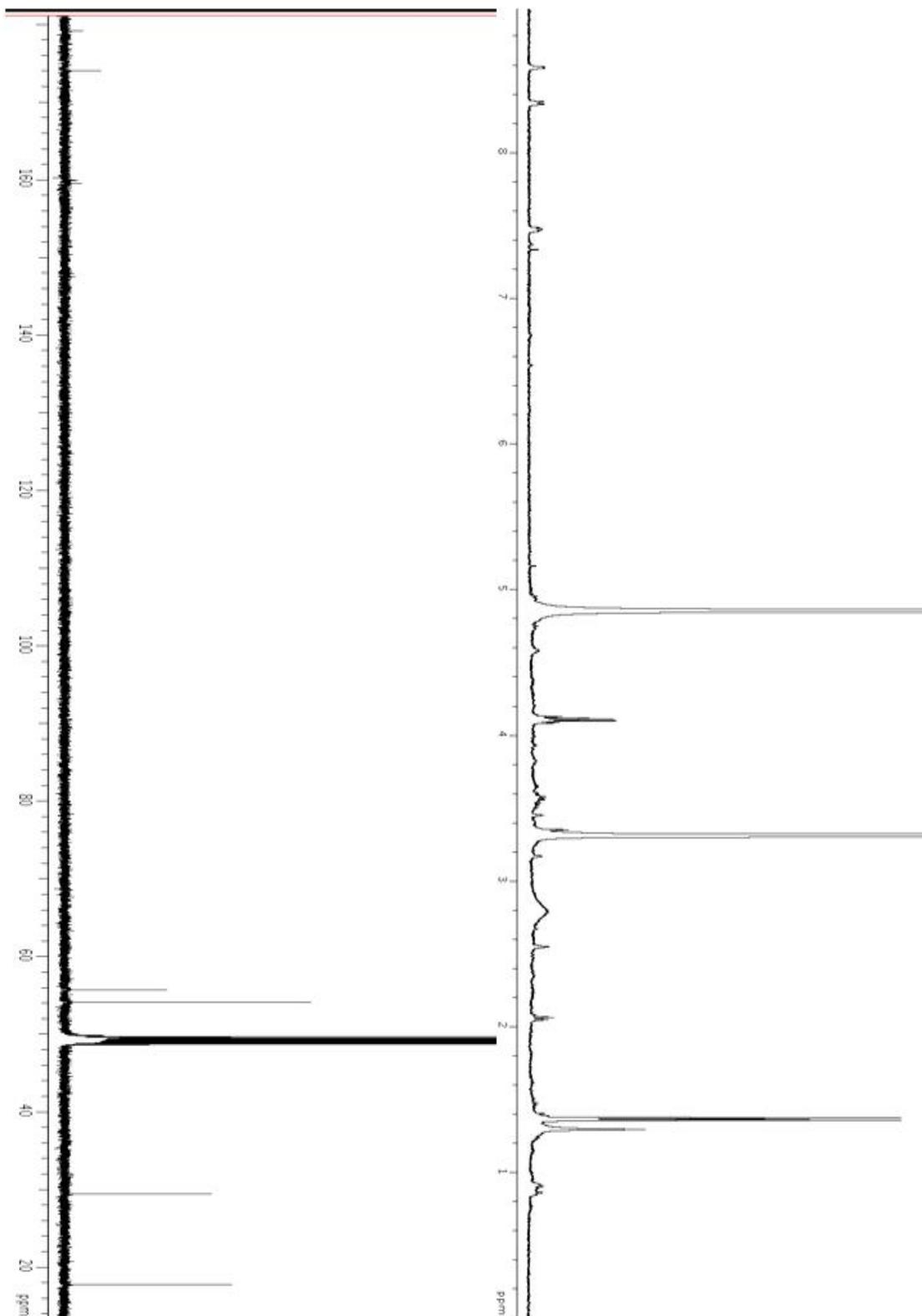


Fig. 3-43. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectrum of A1 in CD<sub>3</sub>OD.

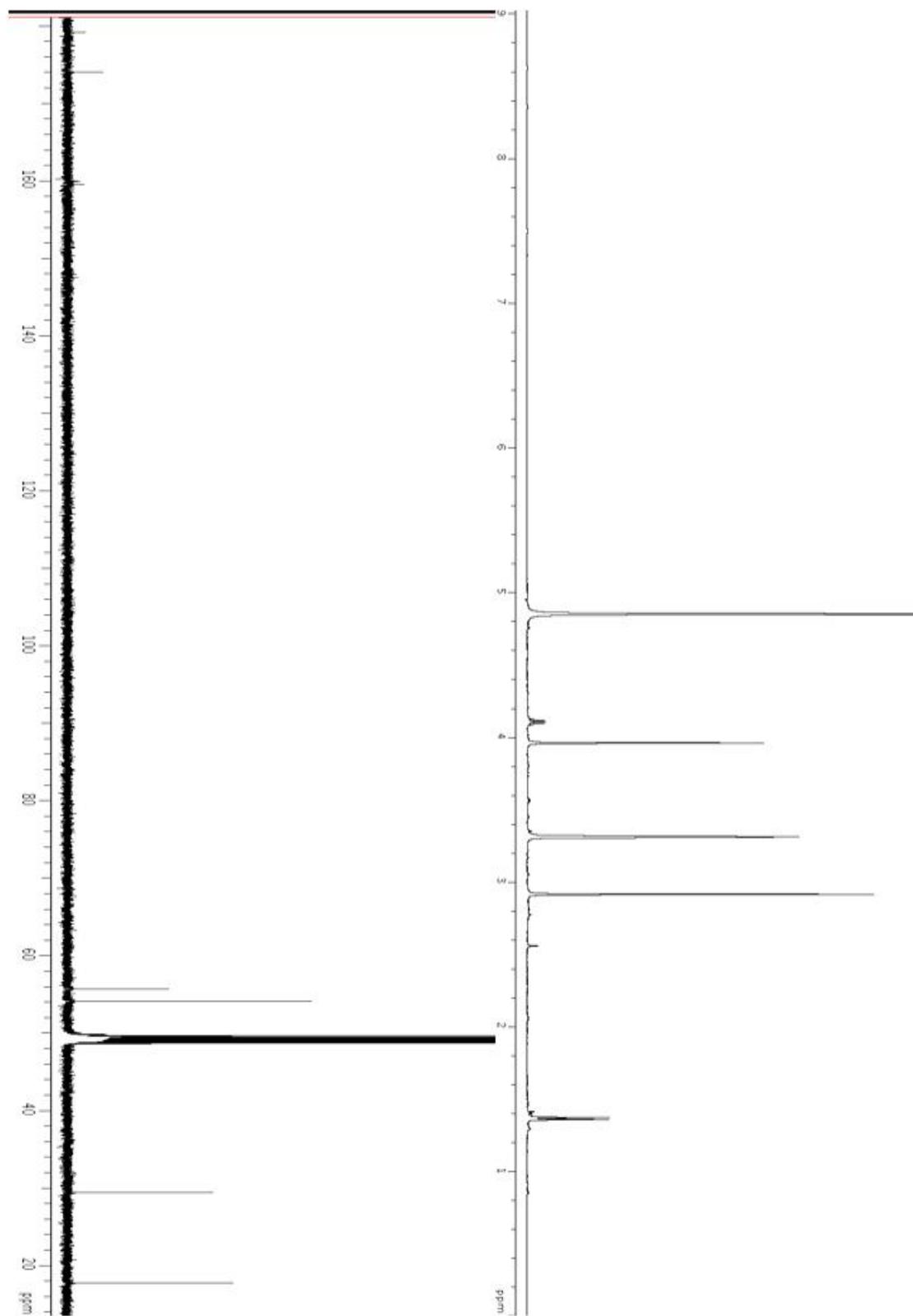


Fig. 3-44. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra of **A2** in CD<sub>3</sub>OD.

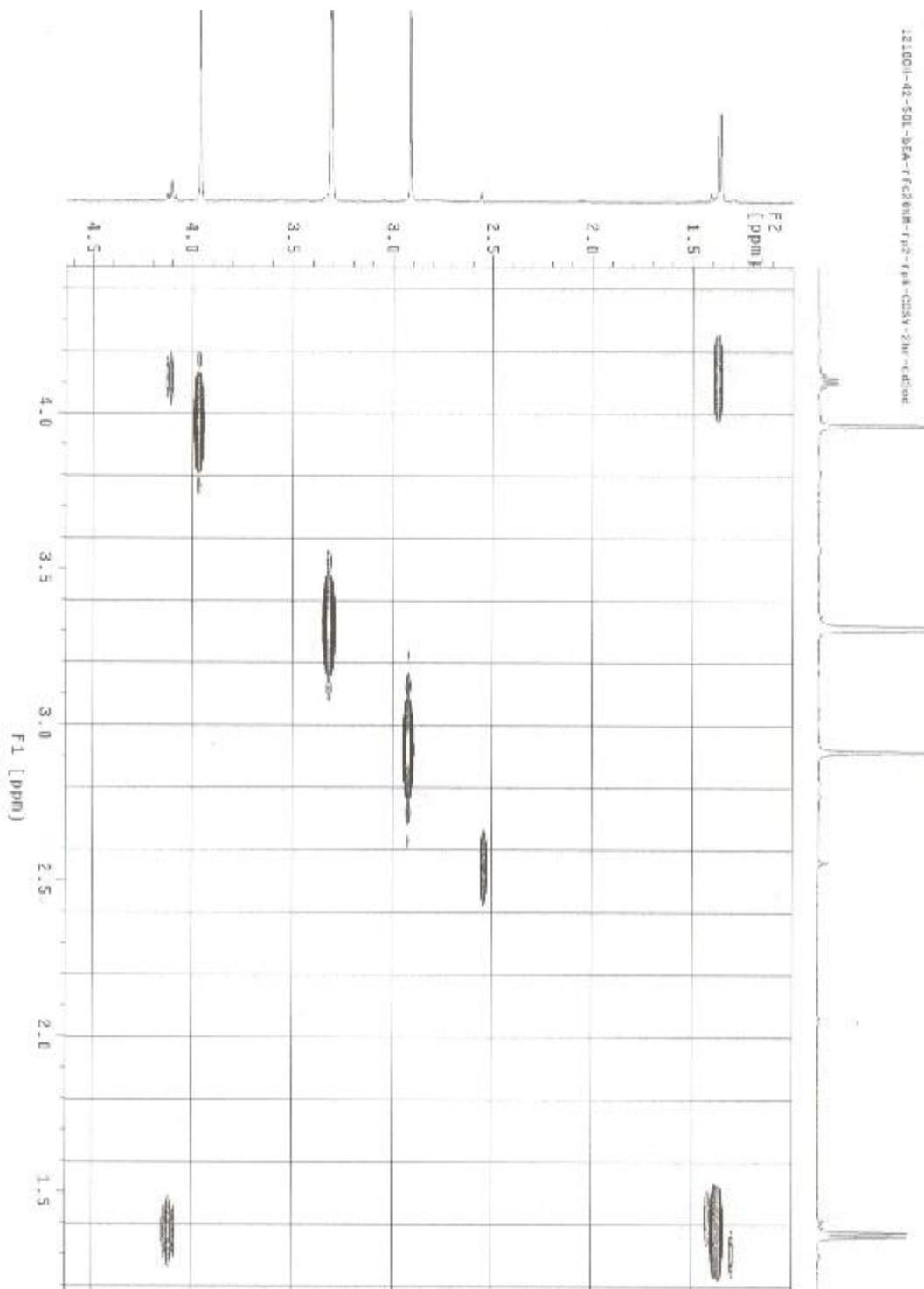


Fig. 3-45. COSY spectrum of A2.

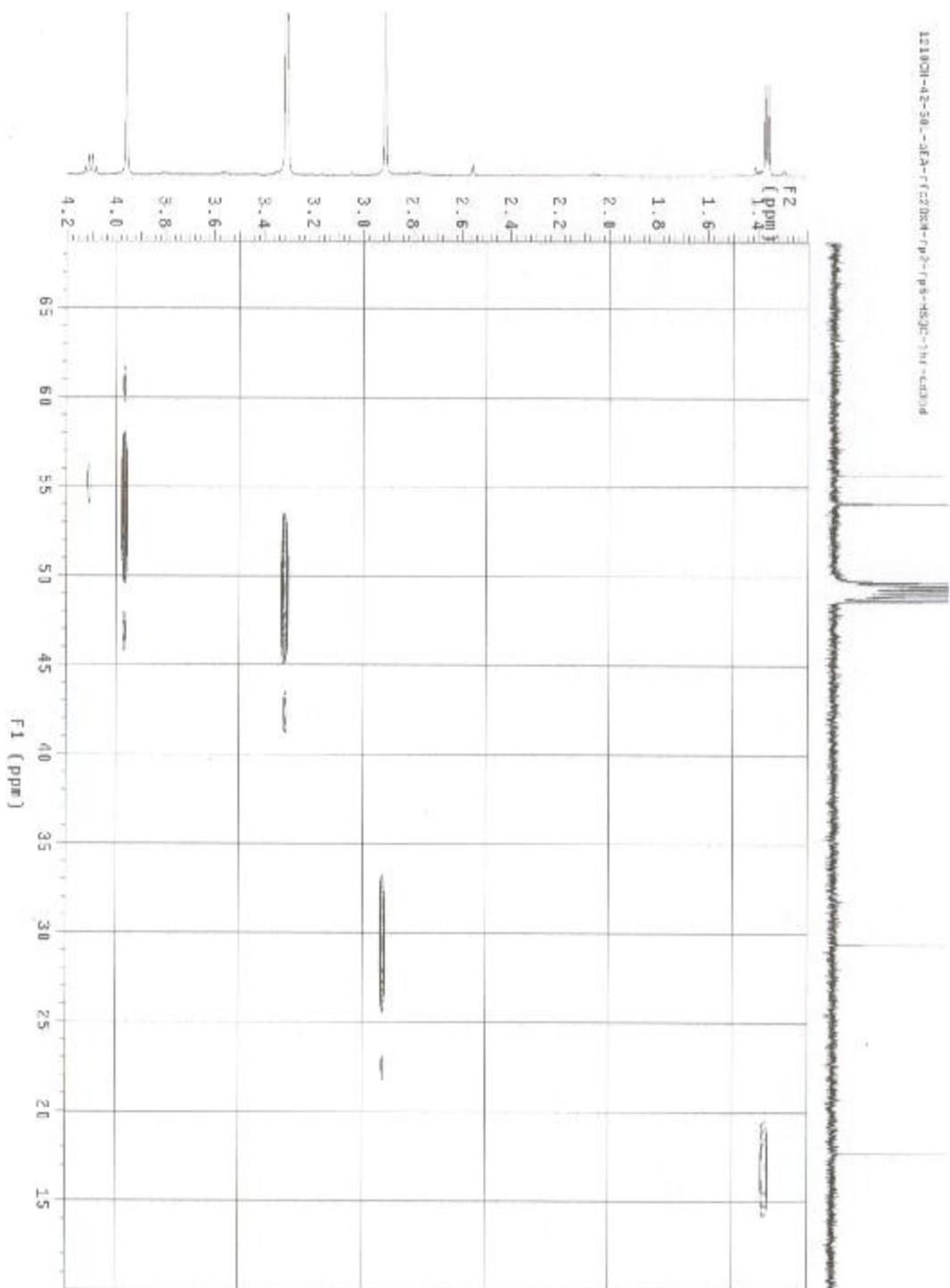


Fig. 3-46. HSQC spectrum of A2.

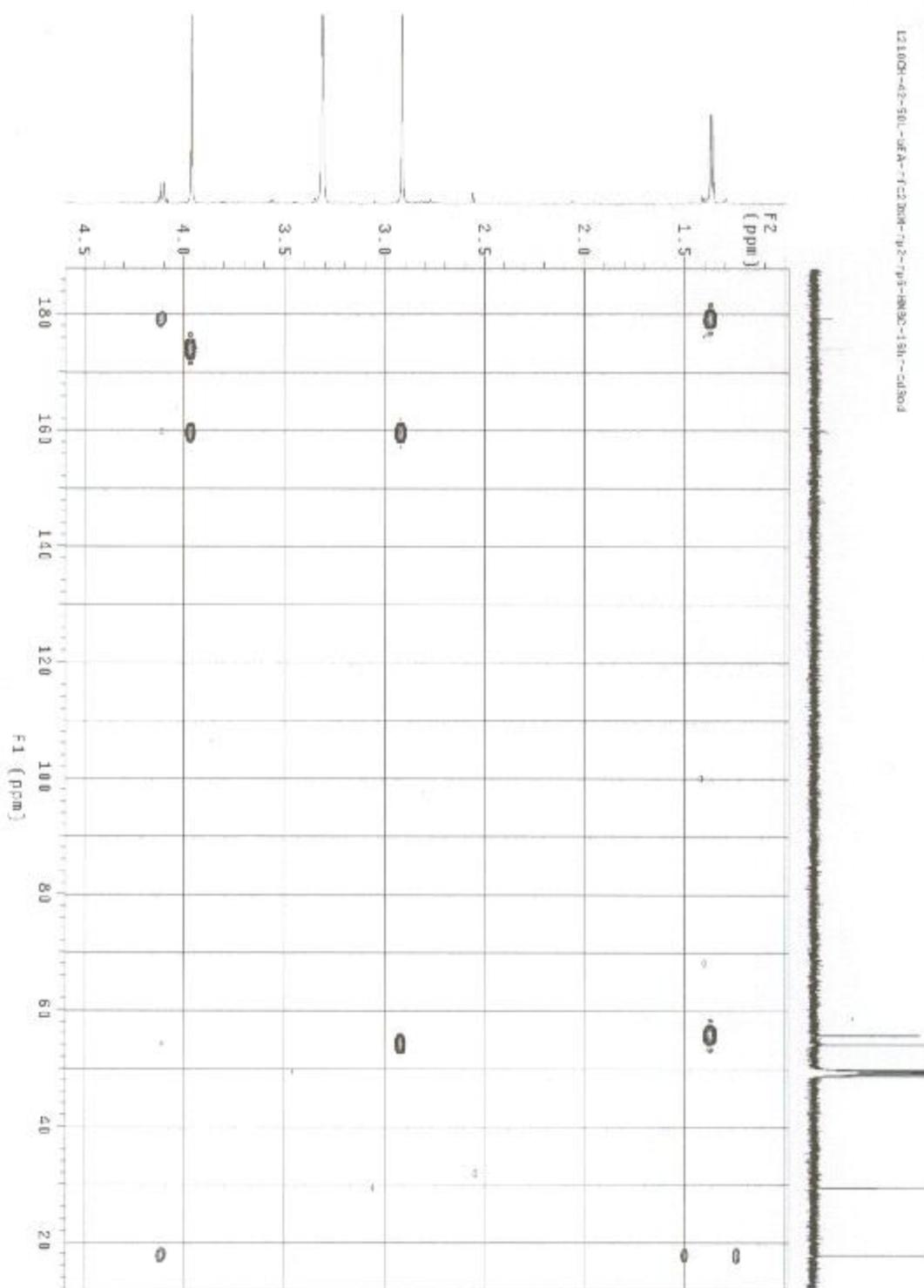


Fig. 3-47. HMBC spectrum of A2.

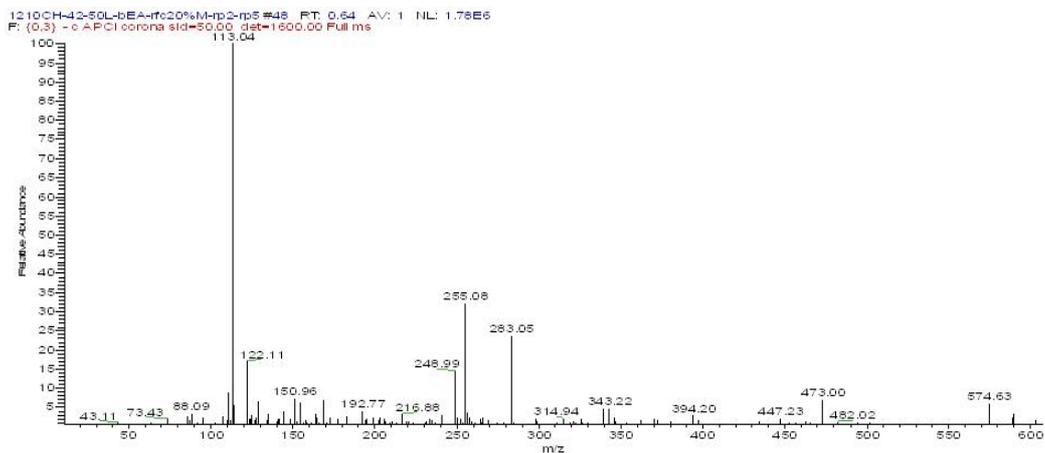


Fig. 3-48. LR-APCI mass spectrum of A1.

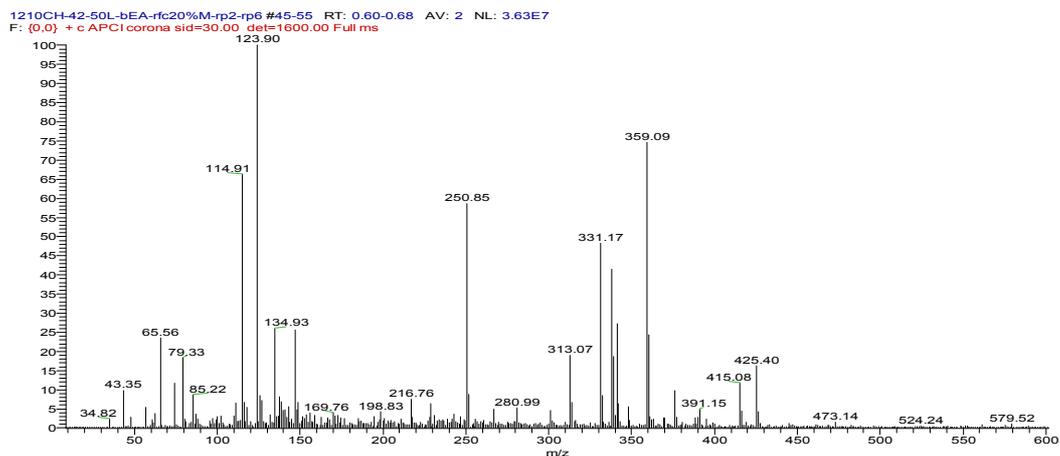
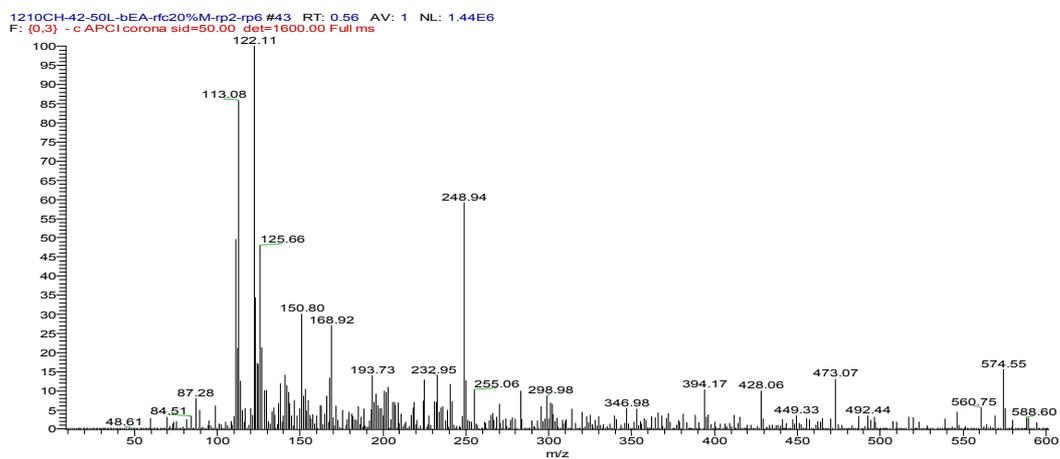


Fig. 3-49. LR-APCI mass spectrum of A2.

B type의 diketopiperazine계 신물질은 1.7 g의 20%MeOH 분획으로부터 분리되었다. C18 역상 HPLC(C18 reversed-phase HPLC, Column: YMC-ODS-A, 5  $\mu$ m, 10 $\times$ 250 mm, 용출 용매: 15%MeOH, 용출 속도: 1.5 mL/min, RI detector)로부터 rp3과 rp6 fraction을 분리하고, C18 역상 HPLC(C18 reversed-phase HPLC, Column: YMC-ODS-A, 5  $\mu$ m, 10 $\times$ 250 mm, 용출 용매: 5%MeOH, 용출 속도: 1.5 mL/min, RI detector)로 재정제하여 **B1**(4.2 mg)과 **B2**(20.5 mg)을 얻었다(Fig. 3-41).

**B1**은  $^1\text{H}$  NMR spectrum(Fig. 3-51)을 통해 2개의  $\alpha$ -proton( $\delta$  3.98,  $\delta$  4.32)과 5개의 methyl proton( $\delta$  1.94 -  $\delta$  3.60)을 확인하였고, COSY(Fig. 3-52)연결을 통해 부분 사슬 구조를 확인하였다.  $\delta$  2.67(s,  $\text{CH}_3$ )의 methyl은 HMBC spectrum(Fig. 3-54)을 통해 C-2와의 연결을 확인 할 수 있었다.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum(Fig. 3-51)에서 나타난  $\delta$  167.4와  $\delta$  171.3은 2개의 amide carbonyl을 나타내며 H-4와 H-9의 HMBC 연결을 통해 cyclic diketopiperazine의 구조를 확인하였다. LRAPCI-MS(Fig. 3-55)분석을 통해  $m/z$  242.94  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 487.18  $[2\text{M}-\text{H}]^-$ , 244.81  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 489.13  $[2\text{M}+\text{H}]^+$  peak를 확인하였고 분자식  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ 로 결정되었다(Fig. 3-50). **B2**는  $^1\text{H}$  NMR spectrum(Fig. 56)을 통해 2개의  $\alpha$ -proton( $\delta$  4.36,  $\delta$  4.27)들과 5개의 methyl proton( $\delta$  1.94 ~  $\delta$  3.53)을 확인 하였으며,  $\alpha$ -proton의  $^1\text{H}$  NMR spectrum으로 입체 이성질체임을 확인 하였다. LRAPCI-MS(Fig. 3-60)분석을 통해  $m/z$  242.89  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 487.17  $[2\text{M}-\text{H}]^-$ , 244.84  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 489.24  $[2\text{M}+\text{H}]^+$  peak를 확인하였고 분자식  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ 로 결정 되었다(Fig. 3-50).

동일한 분자식과 분자량을 가진 **B1**과 **B2**는  $\alpha$ -proton의  $^1\text{H}$  NMR data와 +42.0( $c$  0.1, MeOH), -30.0( $c$  0.1, MeOH)으로 측정 된  $[\alpha]_D$  값을 문헌치(Ding, Zhong-Tao *et al*, *NPR*, 2013)를 비교함으로써 *cyclo*-(L-Pro-D-OMet)와 *cyclo*-(L-Pro-L-OMet)의 구조적 차이를 가진 것으로 구명하였다.

**B1**:  $[\alpha]_D$  +42.0( $c$  0.1, MeOH),  $^1\text{H}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) 1.94-2.35(m,  $\text{CH}_2$ ), 1.95-2.04(m,  $\text{CH}_2$ ), 2.22(m,  $\text{CH}_2$ ), 2.67(s,  $\text{CH}_3$ ), 2.87-2.98(m,  $\text{CH}_2$ ), 3.52-3.60(m,  $\text{CH}_2$ ), 3.98(q, CH), 4.32(t, CH),  $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) 23.1, 28.2, 30.1, 38.3, 46.9, 50.7, 57.8, 59.5, 167.4, 171.3, LRAPCIMS  $m/z$  242.94  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 487.18  $[2\text{M}-\text{H}]^-$ , 244.81  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 489.13  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ .

**B2**:  $[\alpha]_D$  -30.0( $c$  0.1, MeOH),  $^1\text{H}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) 1.94(m,  $\text{CH}_2$ ), 1.99-2.32(m,  $\text{CH}_2$ ), 2.28(m,  $\text{CH}_2$ ), 2.68(s,  $\text{CH}_3$ ), 2.94(m,  $\text{CH}_2$ ), 3.53(m,  $\text{CH}_2$ ), 4.27(t, CH), 4.36(q, CH),  $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) 23.7, 23.9, 29.4, 38.1, 46.6, 49.9, 55.3, 60.5, 167.3, 172.8, LRAPCIMS  $m/z$  242.89  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 487.17  $[2\text{M}-\text{H}]^-$ , 244.84  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 489.24  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ .

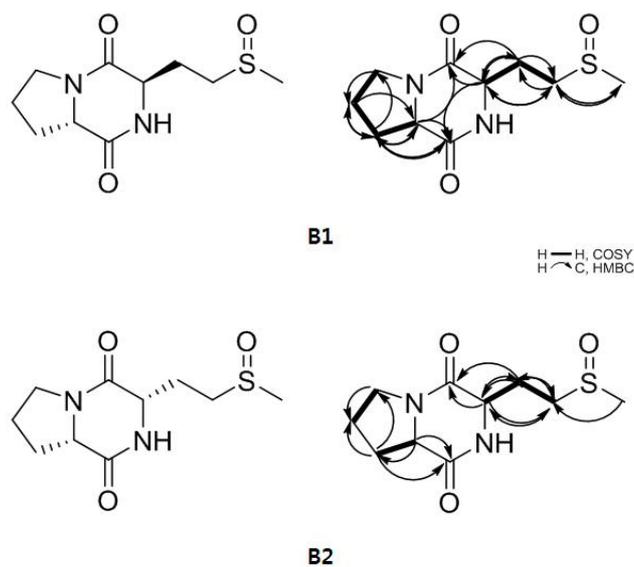


Fig. 3-50. Key  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and HMBC data for compounds **B1** and **B2** from the strain 1210CH-42.

Table 3-8. NMR data for the new compounds **B1** and **B2** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

No.	B1			B2		
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult. ( $J$ in Hz)	HMBC	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult. ( $J$ in Hz)	HMBC
1	38.3	2.67, s	C2	38.1	2.68, s	C2
2	50.7	2.87, 2.98, m	C1,C3,C4	49.9	2.94, m	C3,C4
3	28.2	2.22, m	C2,C4,C5	23.9	2.28, m	C2,C4,C5
4	57.8	3.98, q	C3,C5, C10	55.3	4.36, q	C2,C3,C5
5	167.4			167.3		
6	46.9	3.52, 3.60, m	C7	46.6	3.53, m	C7
7	23.1	1.95, 2.04, m	C8,C9	23.7	1.94, m	
8	30.1	1.94, 2.35, m	C6,C7, C9,C10	29.4	1.99, 2.32, m	C6,C7
9	59.5	4.32, q	C5,C8, C10	60.5	4.27, t	C8,C10
10	171.3			172.8		

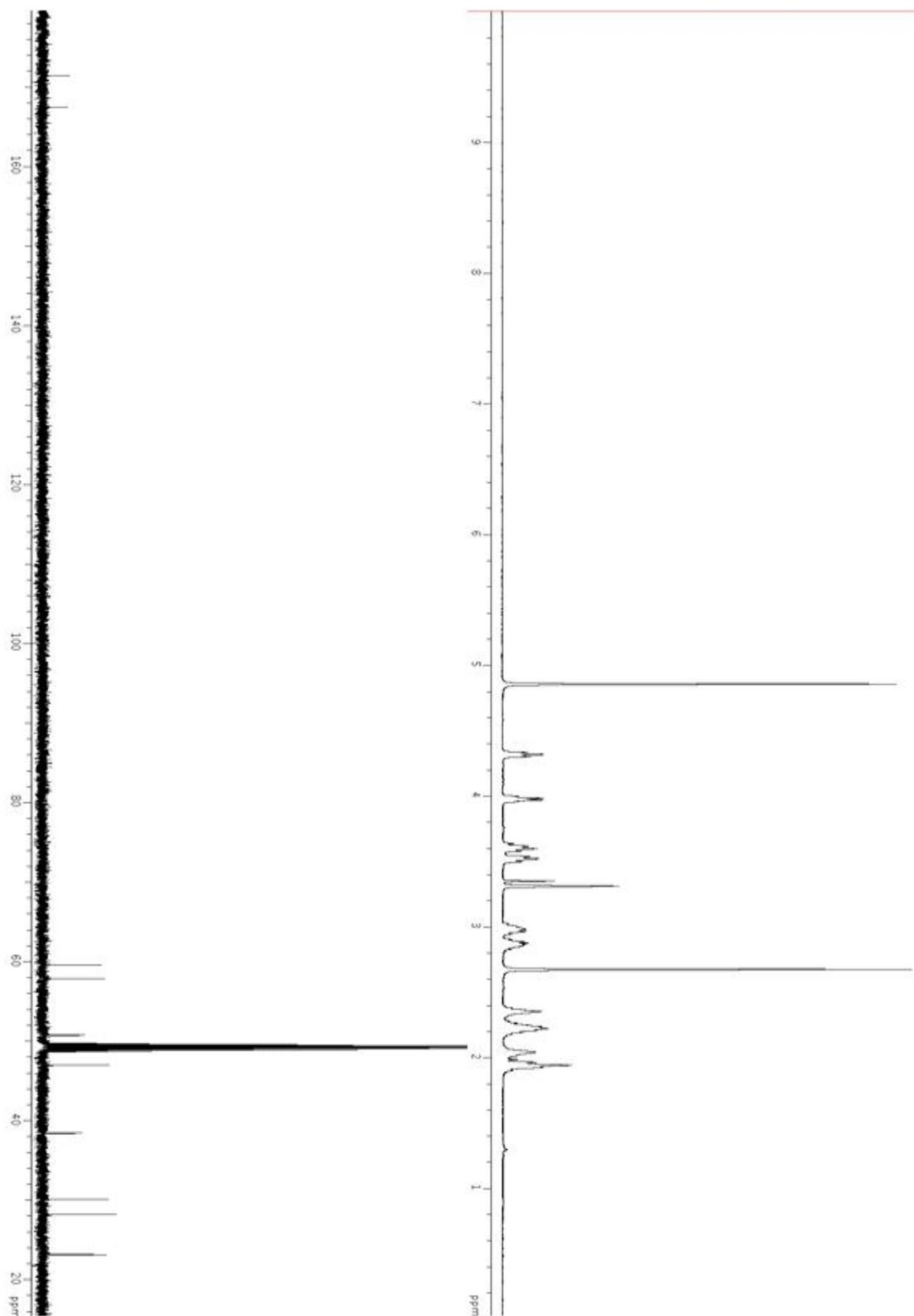


Fig. 3-51. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra of **B1** in CD<sub>3</sub>OD.

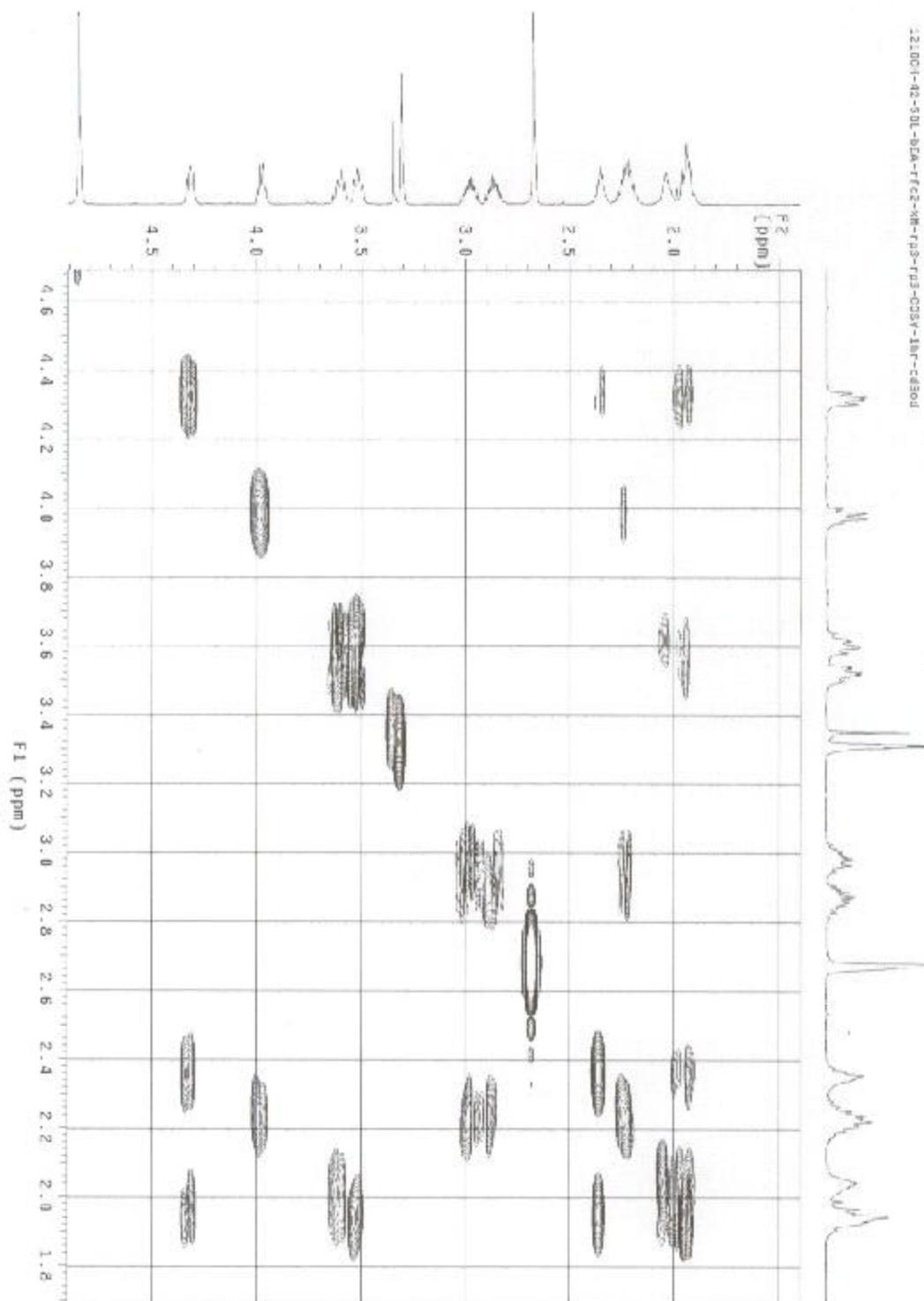


Fig. 3-52. COSY spectrum of B1.

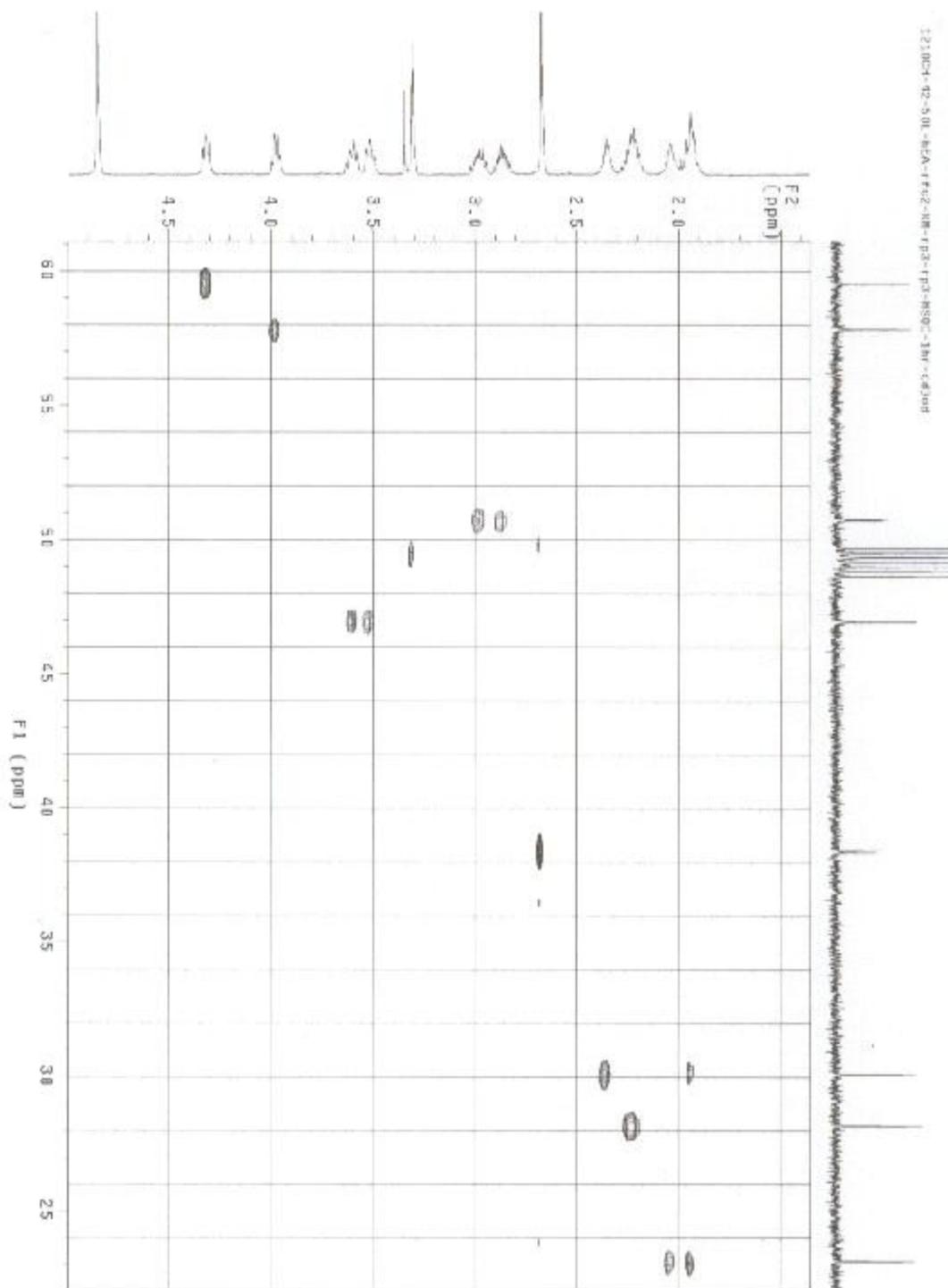


Fig. 3-53. HSQC spectrum of B1.

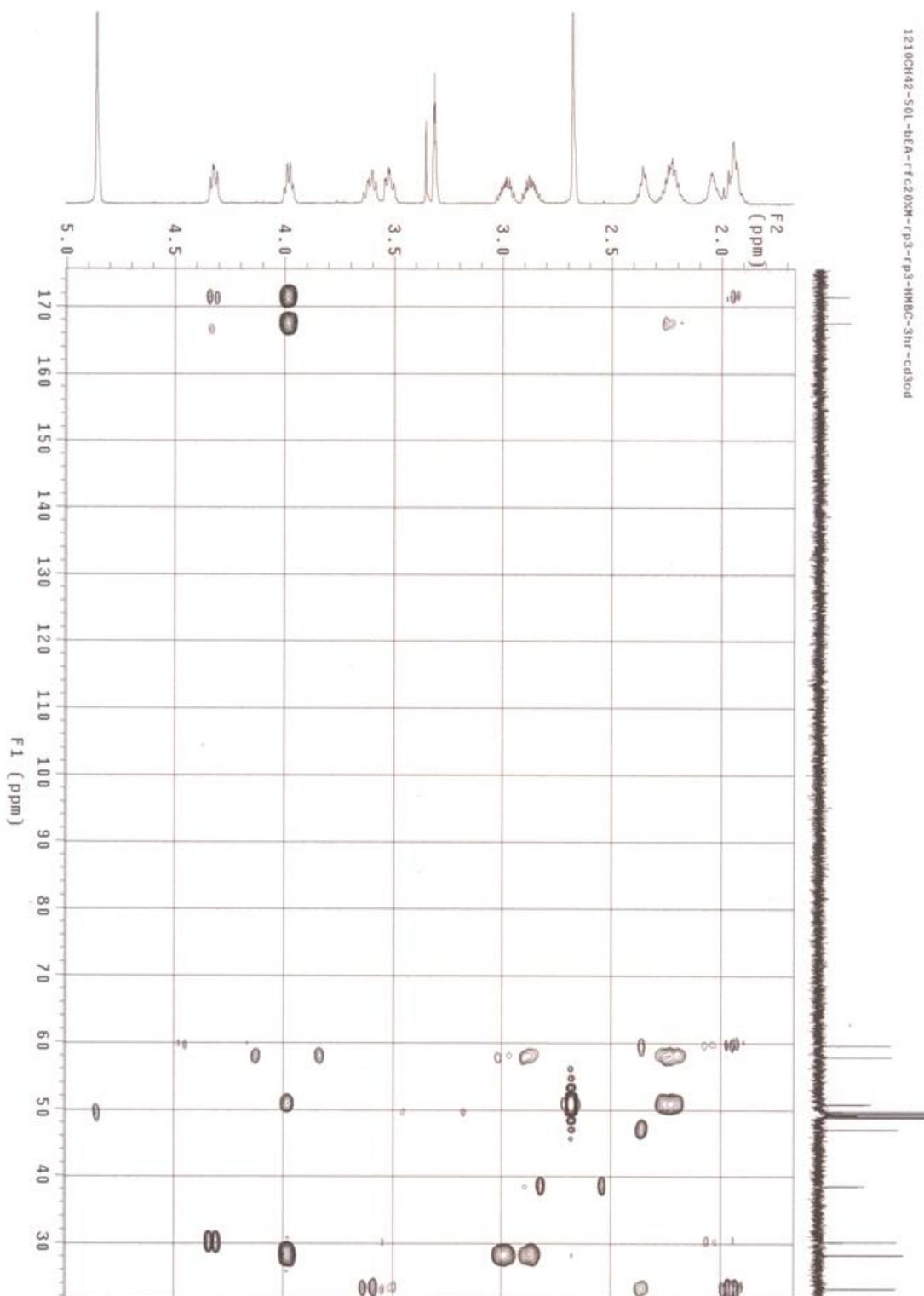


Fig. 3-54. HMBC spectrum of B1.

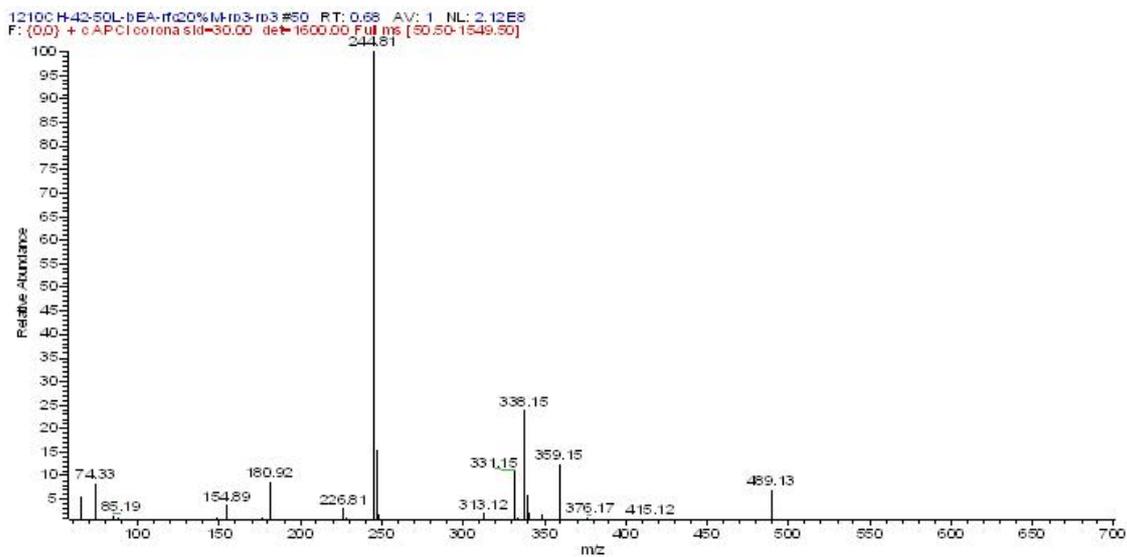
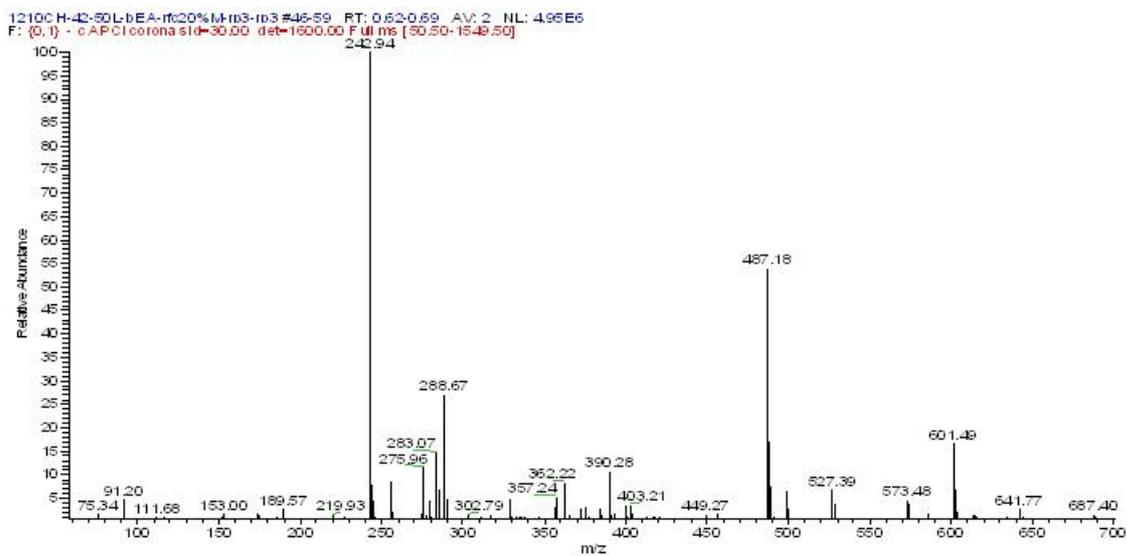


Fig. 3-55. LR-APCI mass spectrum of B1.

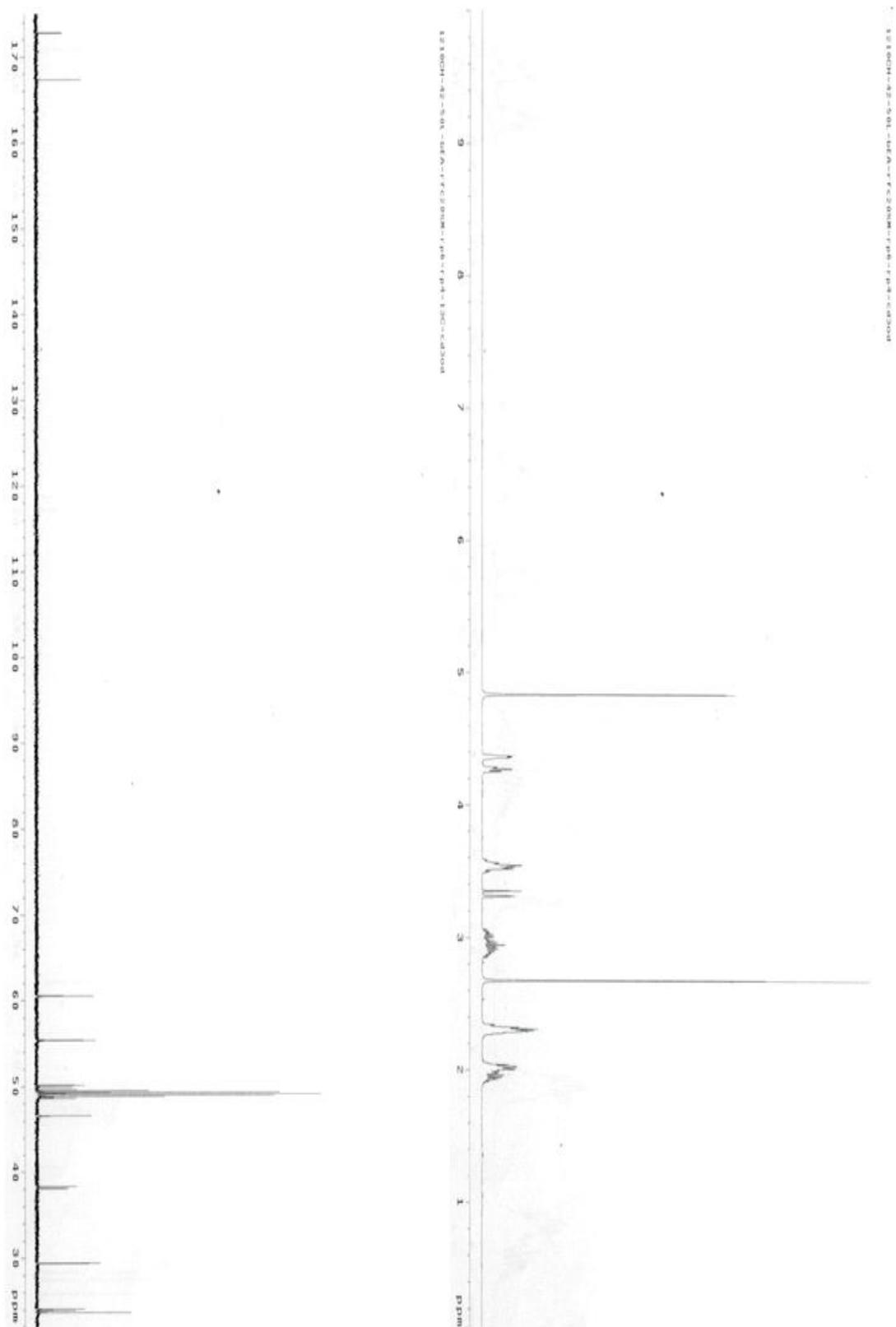


Fig. 3-56.  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **B2** in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

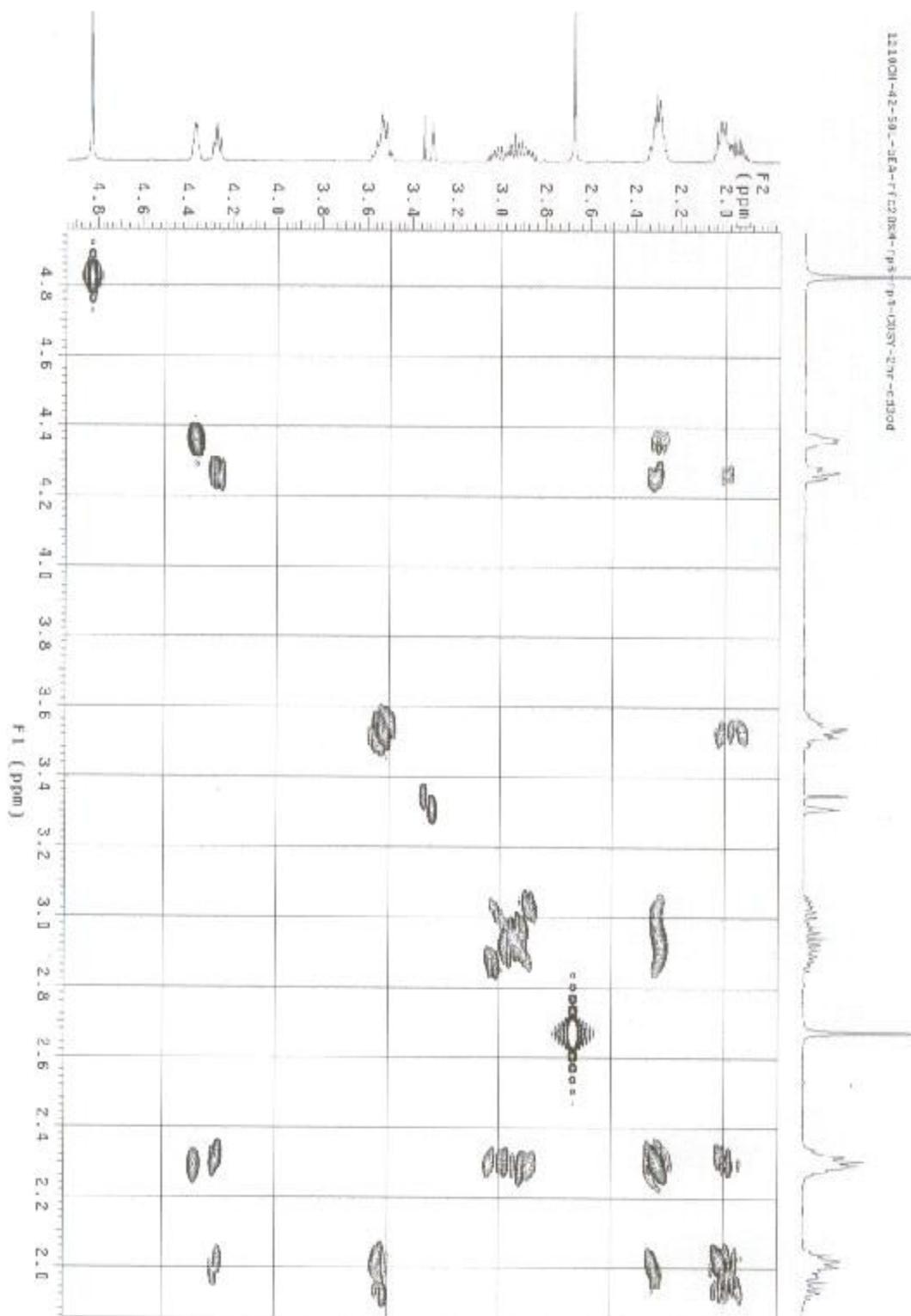


Fig. 3-57. COSY spectrum of B2.

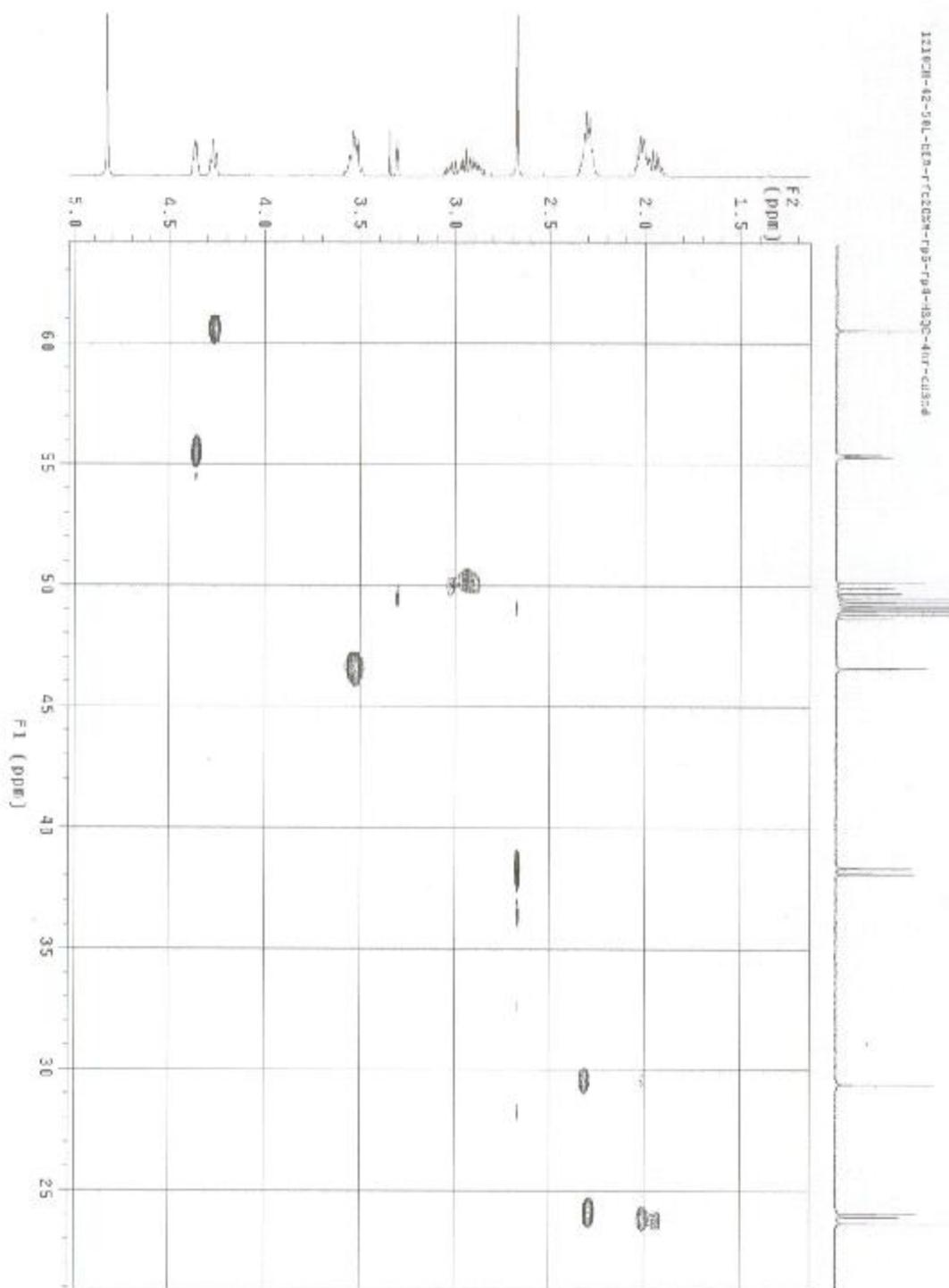


Fig. 3-58. HSQC spectrum of B2.

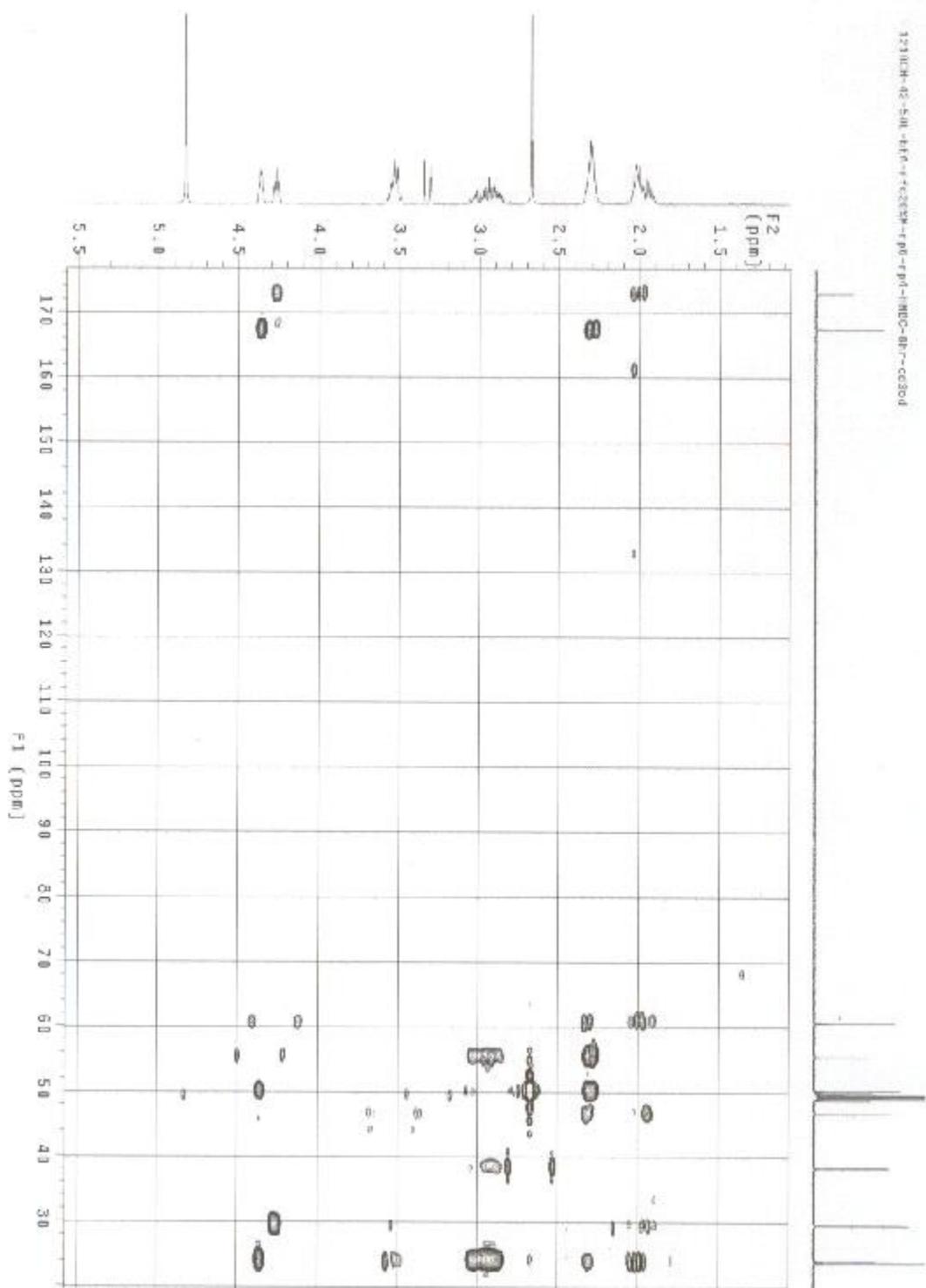


Fig. 3-59. HMBC spectrum of B2.

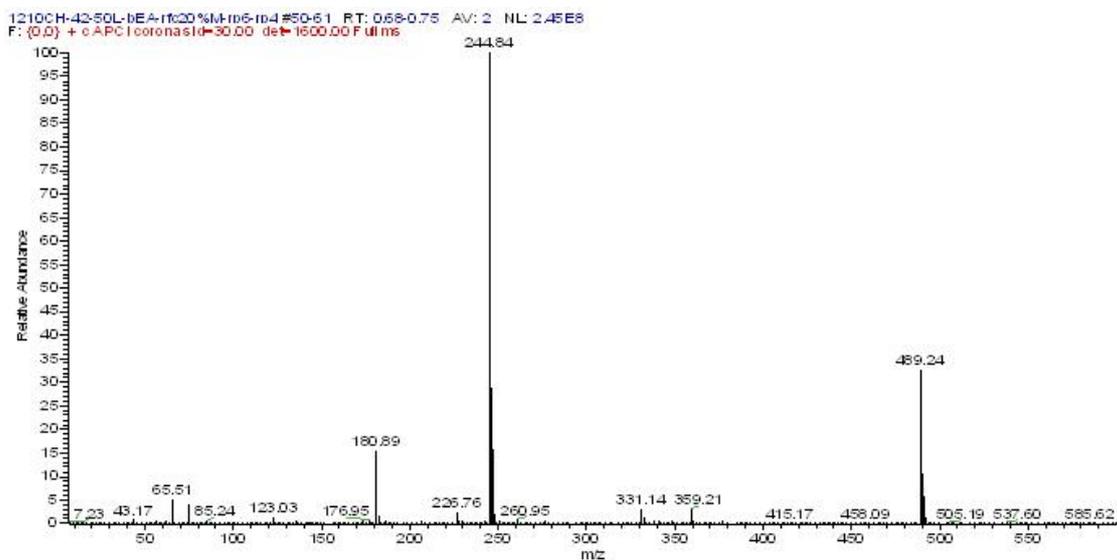
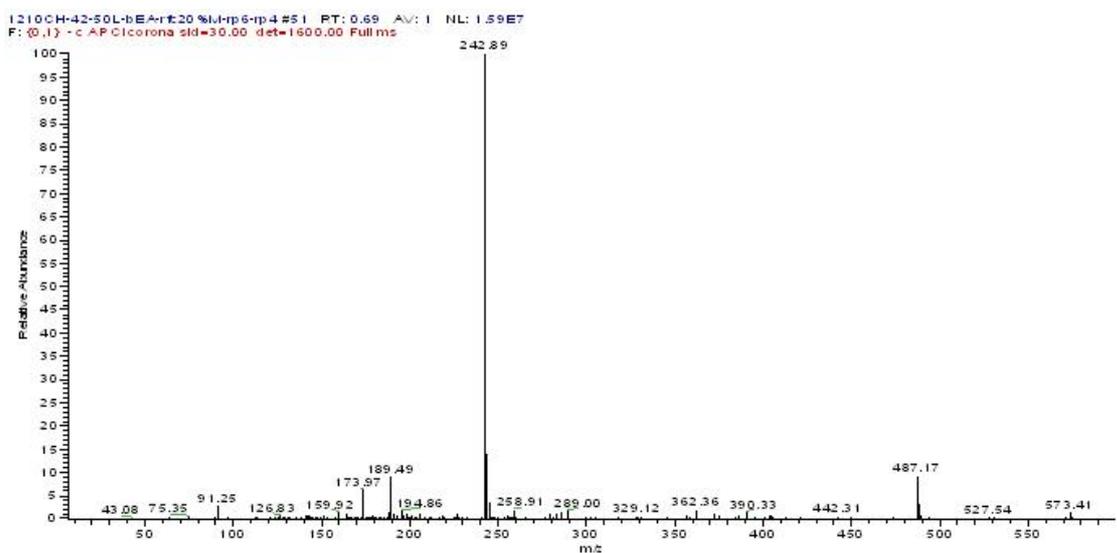


Fig. 3-60. LR-APCI mass spectrum of B2.

C type의 phenolic계 신물질들은 200 mg의 60%MeOH 분획으로부터 분리되었다. C18 역상 HPLC(C18 reversed-phase HPLC, Column: YMC-ODS-A, 5  $\mu$ m, 10 $\times$ 250 mm, 용출 용매: 50%MeOH, 용출 속도: 1.5 mL/min, RI detector)로부터 **C1**(2.8 mg)을 분리하였고, 40 mg의 80%MeOH 분획으로부터 C18 역상 HPLC(C18 reversed-phase HPLC, Column: YMC-ODS-A, 5  $\mu$ m, 10 $\times$ 250 mm, 용출 용매: 67%MeOH, 용출 속도: 1.5 mL/min, RI detector)로 정제하여 **C2**(0.9 mg)을 분리하였다(Fig. 3-41).

**C1**은  $^1\text{H}$  NMR spectrum(Fig. 3-62)를 통해 1개의 methyl기( $\delta$  1.19, d,  $J=10.0$ )와 1개의 methoxy( $\delta$  3.84, s), 2개의 methylene기( $\delta$  1.70-2.65), 3개의 double bonded methine( $\delta$  6.79-7.76) proton을 가진 것으로 나타났다. COSY spectrum(Fig.3-63)를 통해 H-9에서 H-13까지의 correlation을 확인하였으며, HMBC spectrum(Fig. 3-65)를 통해 H-3에서 H-8까지 ring 구조를 이루었다.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum(Fig. 3-62)를 통해 ester carbonyl( $\delta$  169.1)과 carboxyl carbon( $\delta$  181.2)을 확인했다. 이들은 HMBC spectrum를 통해 C-2/C-1, C-8과 C-12/C10, C11과의 연결이 나타나 구조의 말단에 각각 위치하였다. 3개의 quaternary carbon은  $\delta$  122.2,  $\delta$  129.8과 -OH로 치환된  $\delta$  161.6에서 확인 되었고, HRESIMS(Fig. 3-66)에서  $m/z$  275.0898  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  peak가 확인되어 분자식이  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_3$ 인 것으로 결정되었다(Fig. 3-61). **C2**는 **C1**과 양쪽 말단의 구조는 동일 한 것으로 확인되었으나, 사슬 중앙에 isoprenoid unit이 포함되어 구조적 차이를 가졌다.  $^1\text{H}$  NMR spectrum(Fig. 3-67)를 통해 2개의 methyl기( $\delta$  1.12, d,  $J=10.0$ ,  $\delta$  1.70, s)가 나타났고,  $\delta$  5.34의 H-10과 H-17의 연결을 통해 isoprenoid unit을 확인하였다. COSY spectrum(Fig. 3-68)를 통해 H-12에서 H-14를 연결하였고,  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum(Fig. 3-67)를 통해  $\delta$  16.1의 methyl기로부터 *E*-form을 가진 것으로 결정하였다(A. S. Shashkov. *et al*, 1979). HRESIMS(Fig. 3-71)에서  $m/z$  343.1521  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  peak가 확인되어 분자식이  $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_5$ 인 것으로 결정되었다(Fig. 3-61)

분리된 phenolic계 신물질 **C1**과 **C2**는 구조의 양쪽 말단이 각각 극성과 비극성 부분을 가지고 있어 다양한 용매 친화성이 있으며, 전자 공명이 가능한 phenolic 구조적 특이성을 가진 것을 보아 다양한 활성이 있을 것으로 예측되어 항노화 활성을 검증 중에 있다.

**C1**:  $[\alpha]_{\text{D}}$  +13.7( $c$  0.5, MeOH),  $^1\text{H}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) 1.19(d,  $J=10.0$ ,  $\text{CH}_3$ ), 1.70-1.92(m,  $\text{CH}_2$ ), 2.65(t,  $\text{CH}_2$ ), 3.84(s,  $\text{CH}_3$ ), 6.79(d,  $J=10.0$ , CH), 7.71(d,  $J=10.0$ , CH), 7.76(s, CH),  $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) 17.9, 29.0, 35.0, 40.8, 52.4, 115.8, 122.2, 129.8, 130.6, 133.0, 161.6, 169.1, 181.2, HRESIMS  $m/z$  275.0898  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{Na}$ , 275.0895).

**C2**:  $[\alpha]_{\text{D}}$  +10.0( $c$  0.5, MeOH),  $^1\text{H}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) 1.12(d,  $J=10.0$ ,  $\text{CH}_3$ ), 1.47(m,  $\text{CH}_2$ ), 1.62(d,  $J=15.0$ ,  $\text{CH}_2$ ), 1.70(s,  $\text{CH}_3$ ), 2.07(t,  $\text{CH}_2$ ), 2.40(m, CH), 3.31(t,  $\text{CH}_2$ ), 3.84(s,  $\text{CH}_3$ ), 5.34(t, CH), 6.78(d,  $J=10.0$ , CH), 7.70(d,  $J=10.0$ , CH), 7.74(s, CH),  $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) 16.1, 17.9, 26.8, 29.0,

34.7, 40.8, 41.0, 52.4, 115.5, 122.2, 123.6, 129.5, 130.3, 132.4, 137.5, 161.4, 169.2, 181.2, HRESIMS  $m/z$  343.1521  $[M+Na]^+$  (calcd for  $C_{18}H_{24}O_5Na$ , 343.1521).

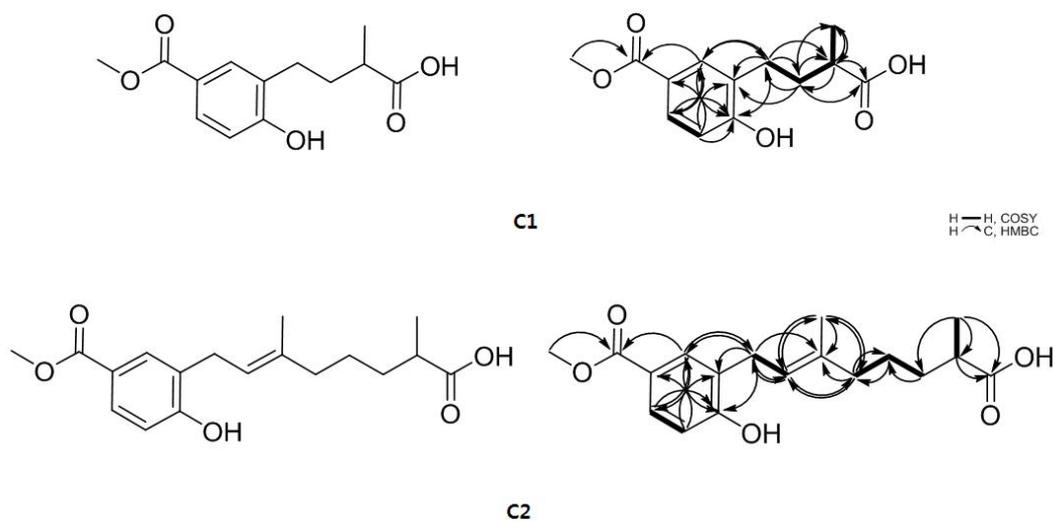


Fig. 3-61. Key  $^1H-^1H$  COSY and HMBC correlations for compounds **C1** and **C2** from the strain 1210CH-42.

Table 3–9. NMR data for the new compounds **C1** and **C2** in CD<sub>3</sub>OD

No.	C1			C2		
	$\delta_C$	$\delta_H$ , mult.( <i>J</i> in Hz)	HMBC	$\delta_C$	$\delta_H$ , mult.( <i>J</i> in Hz)	HMBC
1	52.4	3.84, s	C2	52.4	3.84, s	C2
2	169.1			169.2		
3	122.2			122.2		
4	130.6	7.71, d( <i>J</i> =10.0)	C6,C8	130.3	7.70, d( <i>J</i> =10.0)	C6,C8
5	115.8	6.79, d( <i>J</i> =10.0)	C3,C6,C7	115.5	6.78, d( <i>J</i> =10.0)	C3,C7
6	161.6			161.4		
7	129.8			129.5		
8	133.0	7.76, s	C2,C4,C6	132.4	7.74, s	C2,C4,C6,C9
9	29.0	2.65, t	C6,C7,C8, C10,C11	29.0	3.31, t	C6,C7,C8, C10,C11
10	35.0	1.70, 1.92, m	C7,C9,C11, C12,C13	123.6	5.34, t	C9,C12, C17
11	40.8	2.41, m	C10,C12, C13	137.5		
12	181.2			40.8	2.07, t	C10,C11, C13,C17
13	17.9	1.19, d( <i>J</i> =10.0)	C11	26.8	1.47, m	C12
14				34.7	1.62, d( <i>J</i> =15.0)	C13
15				41.0	2.40, m	C16
16				181.2		
17				16.1	1.70, s	C10,C11, C12
18				17.9	1.12, d( <i>J</i> =10.0)	C14,C15, C16

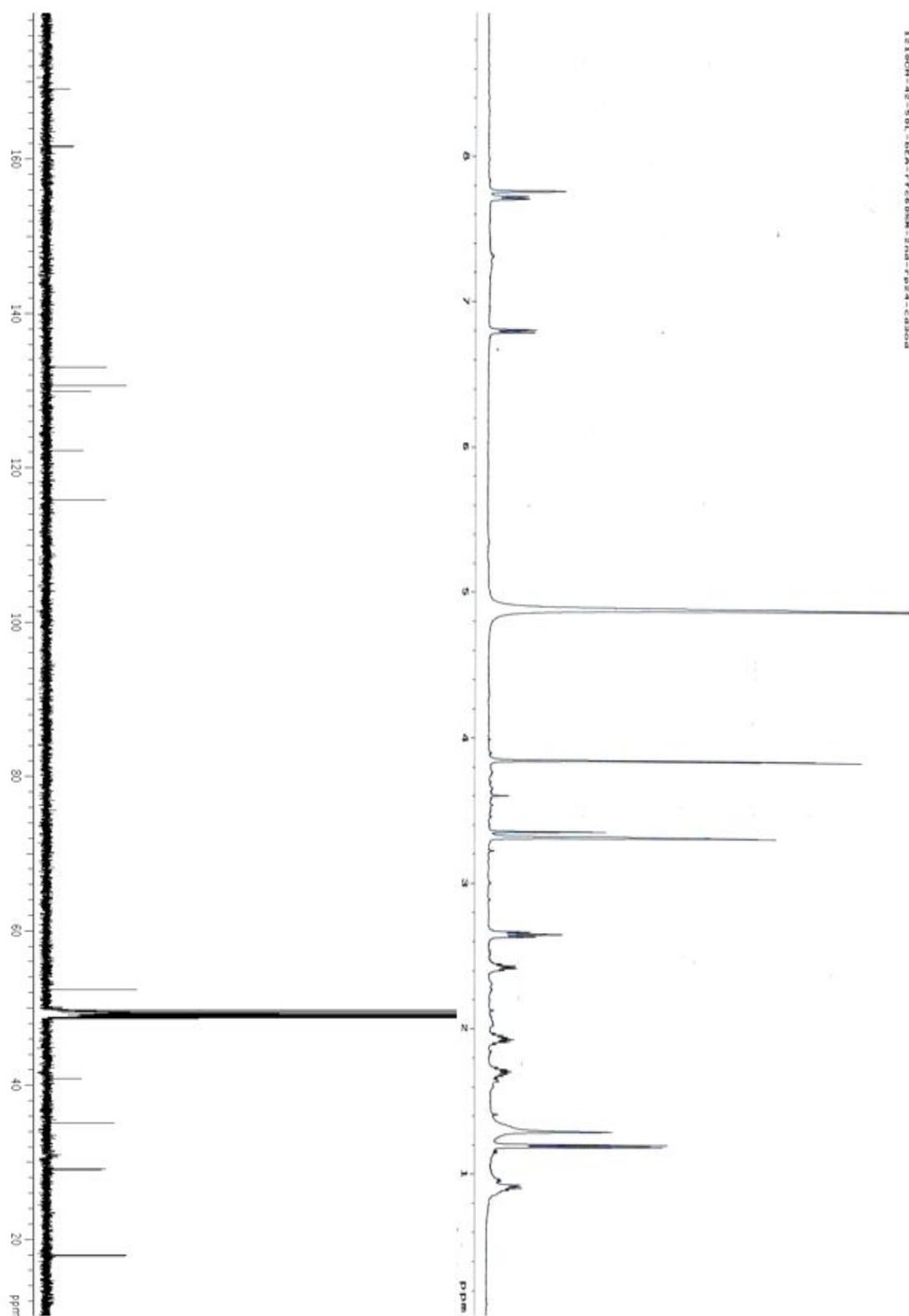


Fig. 3-62. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectrum of C1 in CD<sub>3</sub>OD.

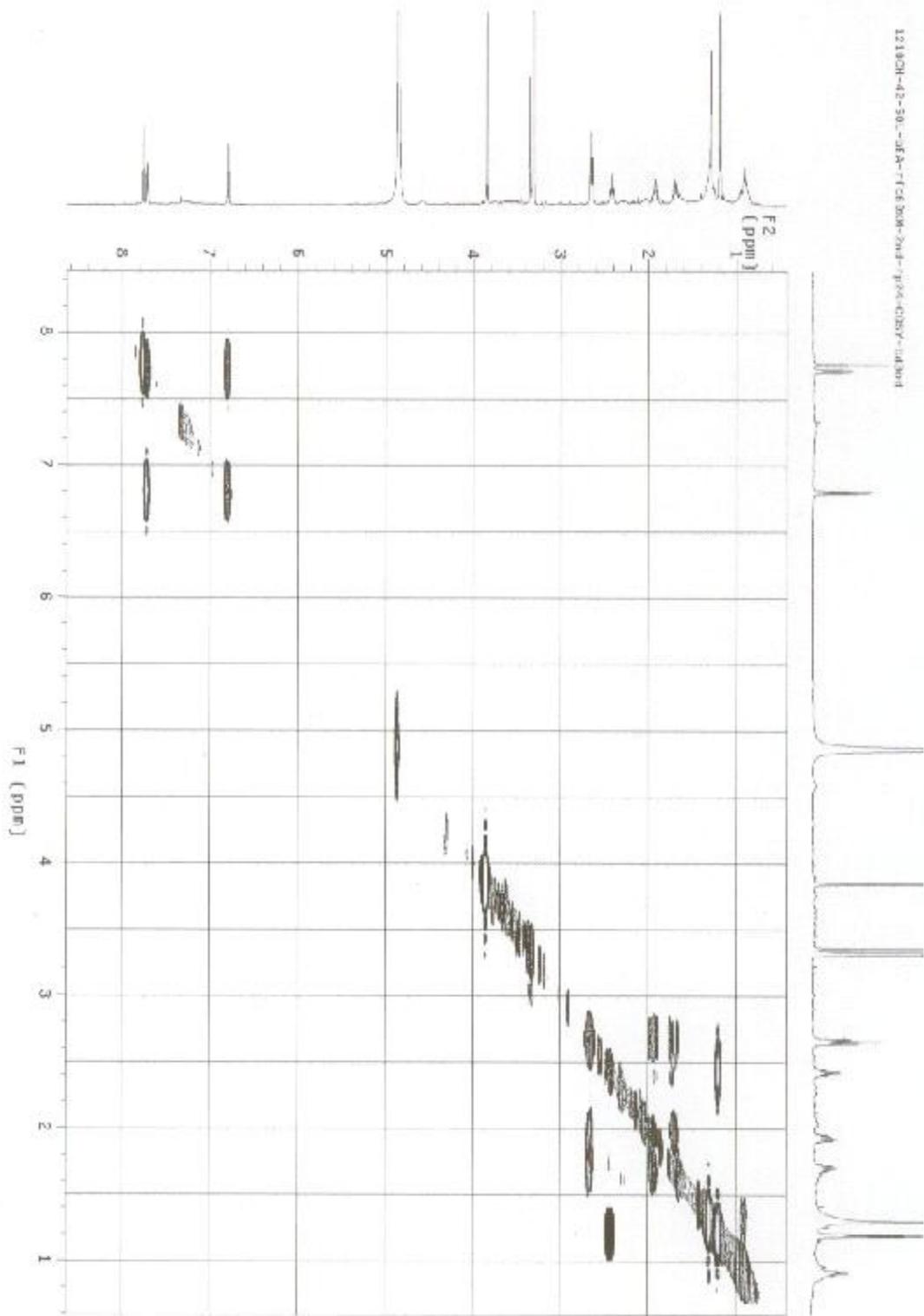


Fig. 3-63. COSY spectrum of C1.

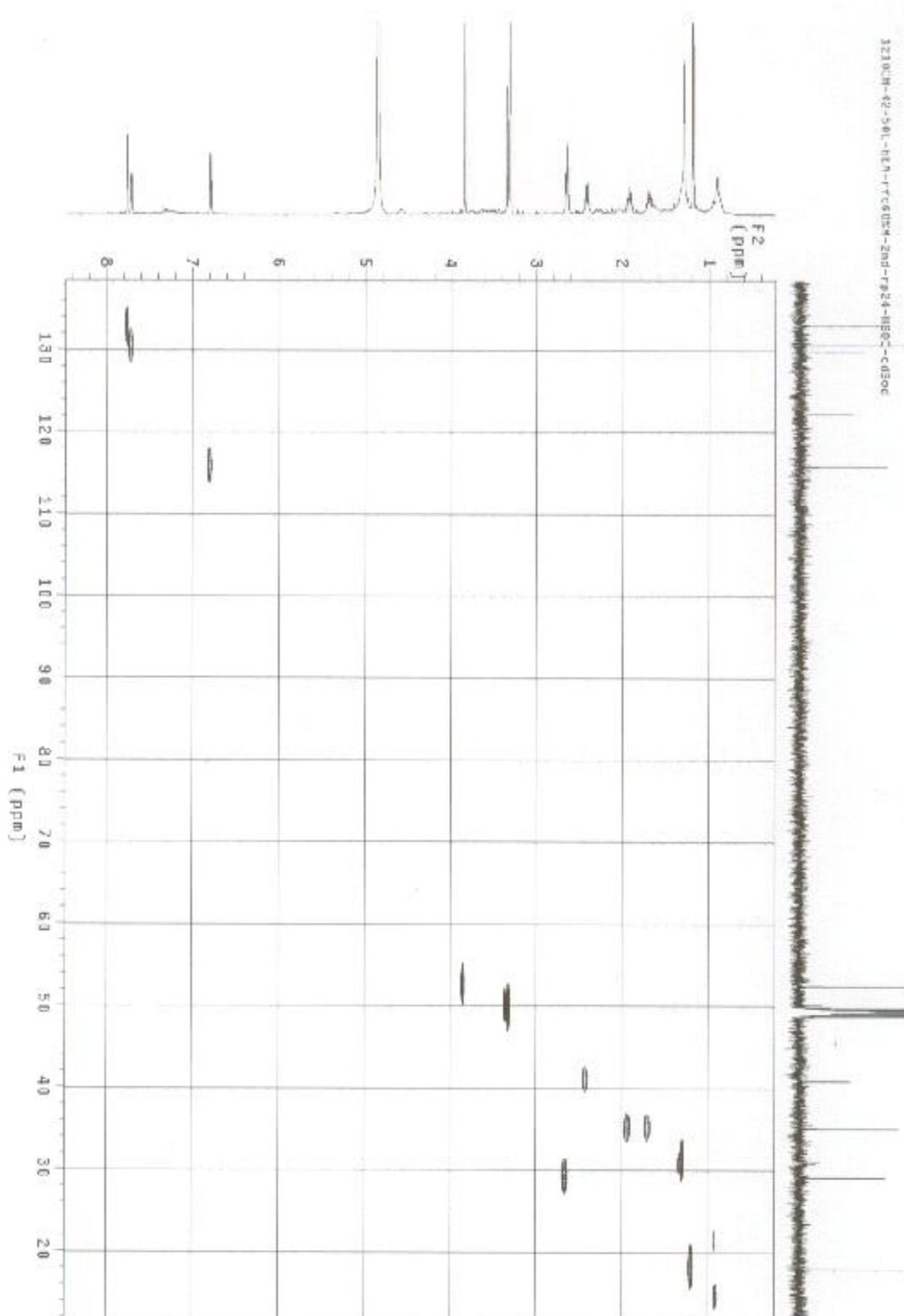


Fig. 3-64. HSQC spectrum of C1.

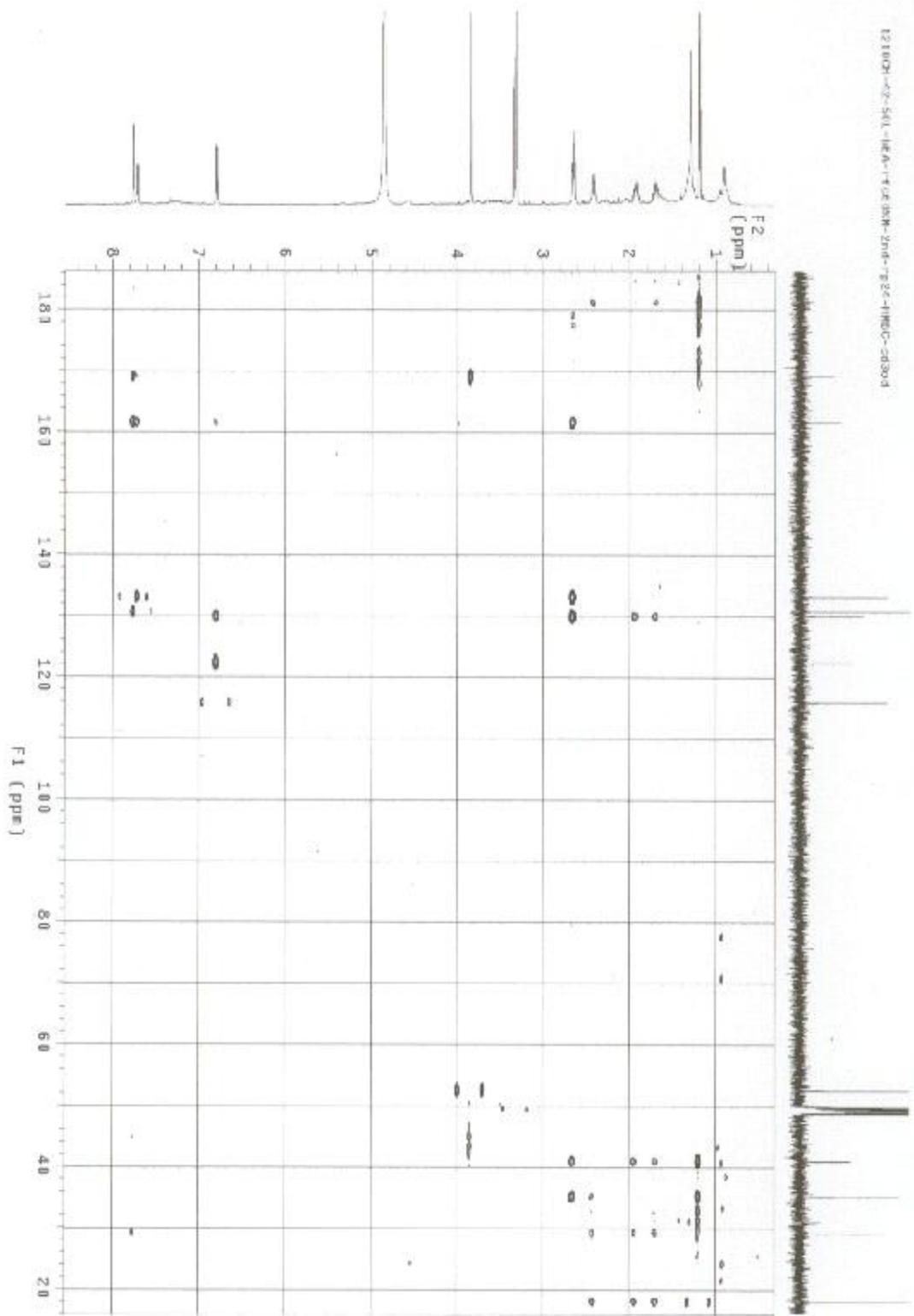


Fig. 3-65. HMBC spectrum of C1.

### Elemental Composition Report

Single Mass Analysis / DBE: min = -1.5, max = 50.0  
 Tolerance = 10.0 PPM /  
 Element prediction: Off  
 Number of isotope peaks used for i-FIT = 3  
 Monoisotopic Mass, Even Electron Ions  
 Mass Calc. Mass mDa PPM DBE i-FIT Norm Conf(%) Formula  
 275.0898 275.0895 0.3 1.1 5.5 824.8 n/a 100% C13H16O5Na

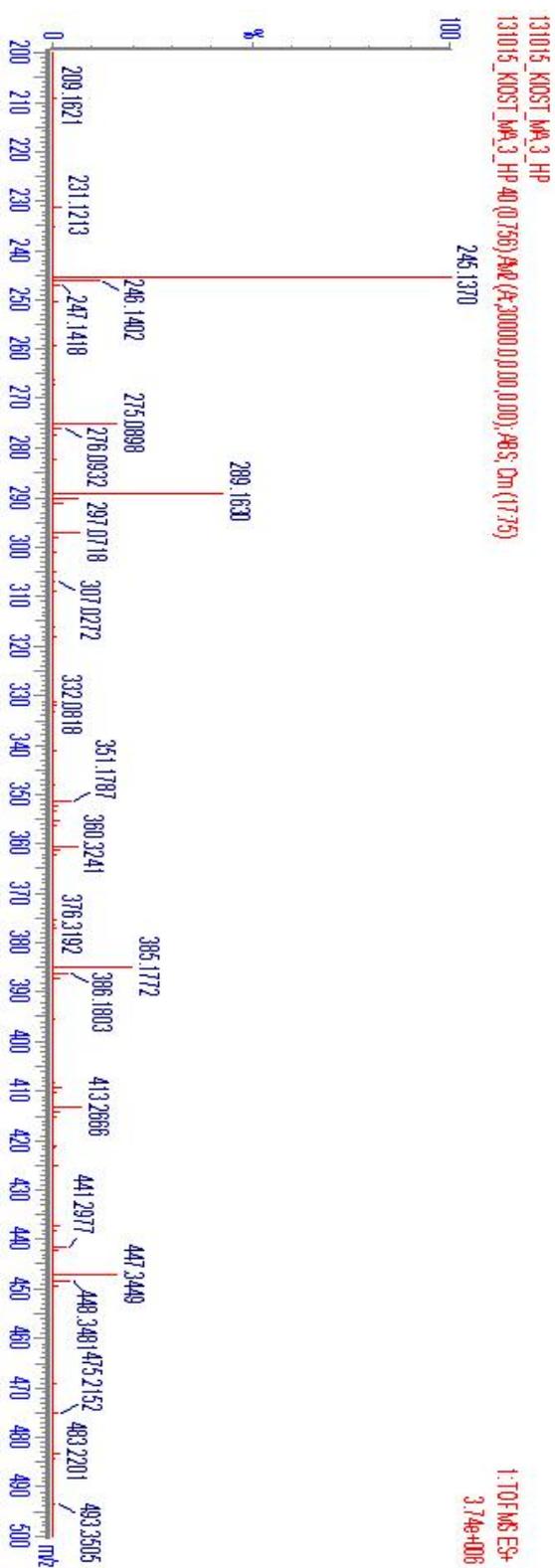


Fig. 3-66. HR-ESI mass spectrum of C1.

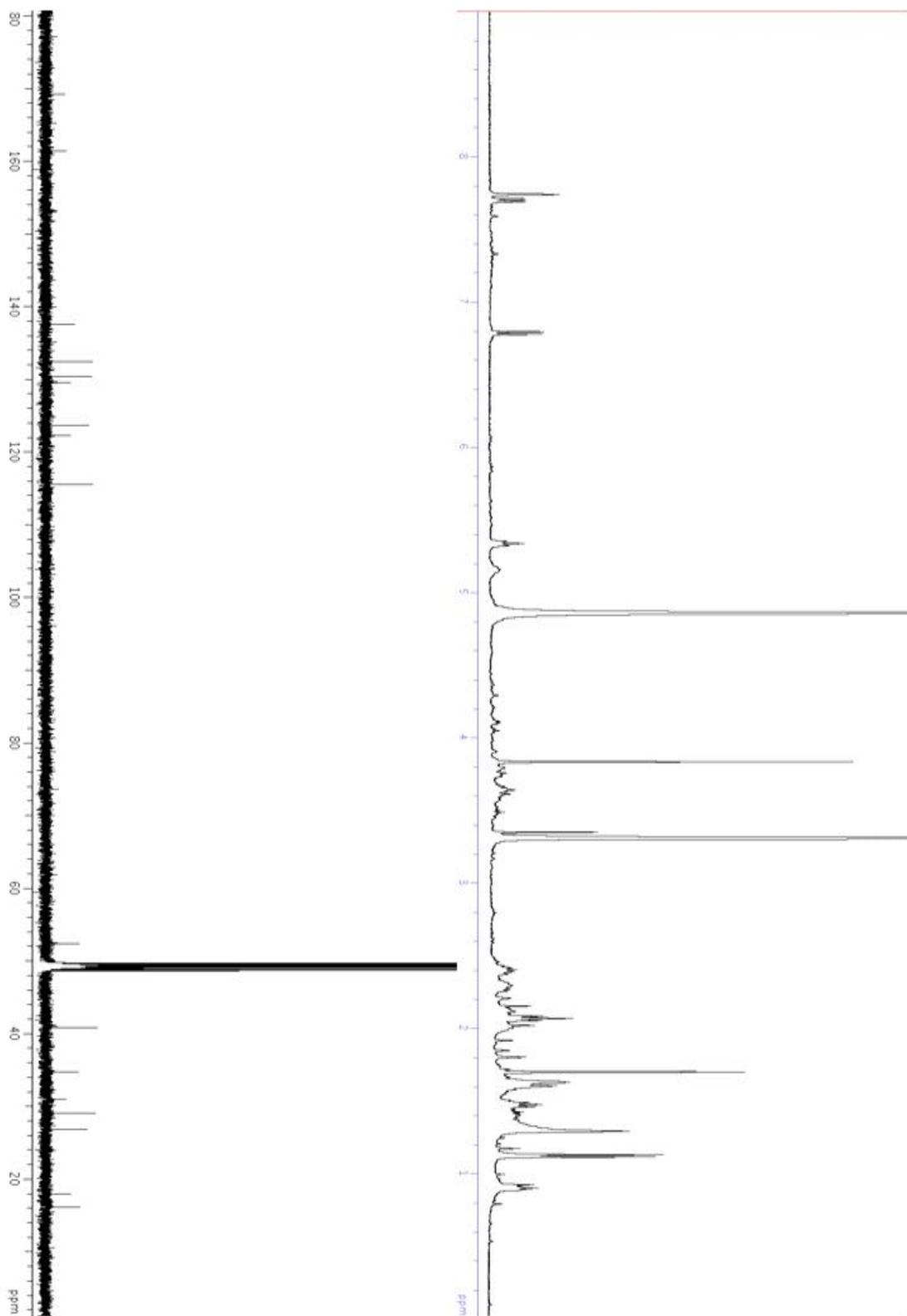


Fig. 3-67. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectrum of C2 in CD<sub>3</sub>OD.

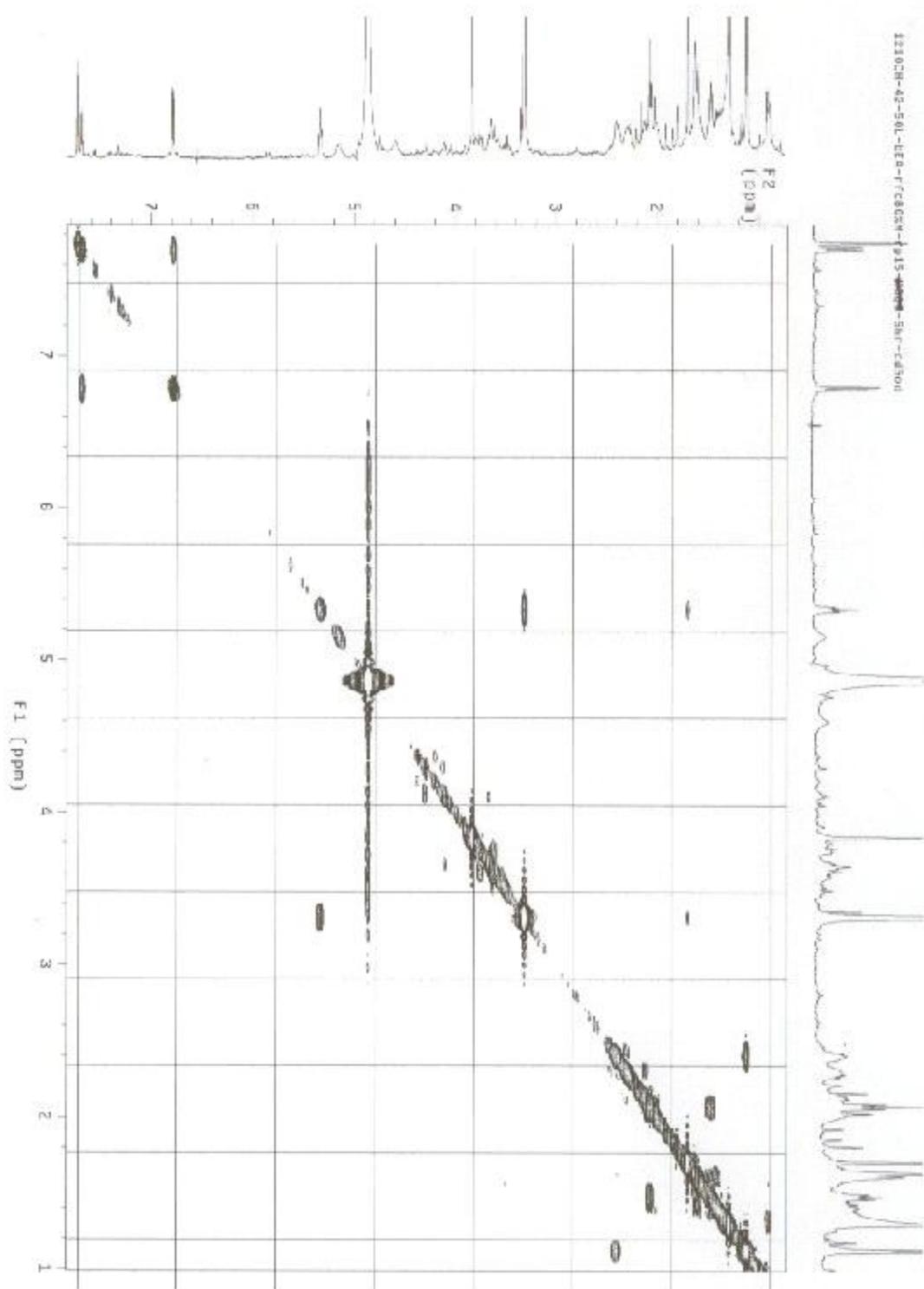


Fig. 3-68. COSY spectrum of C2.

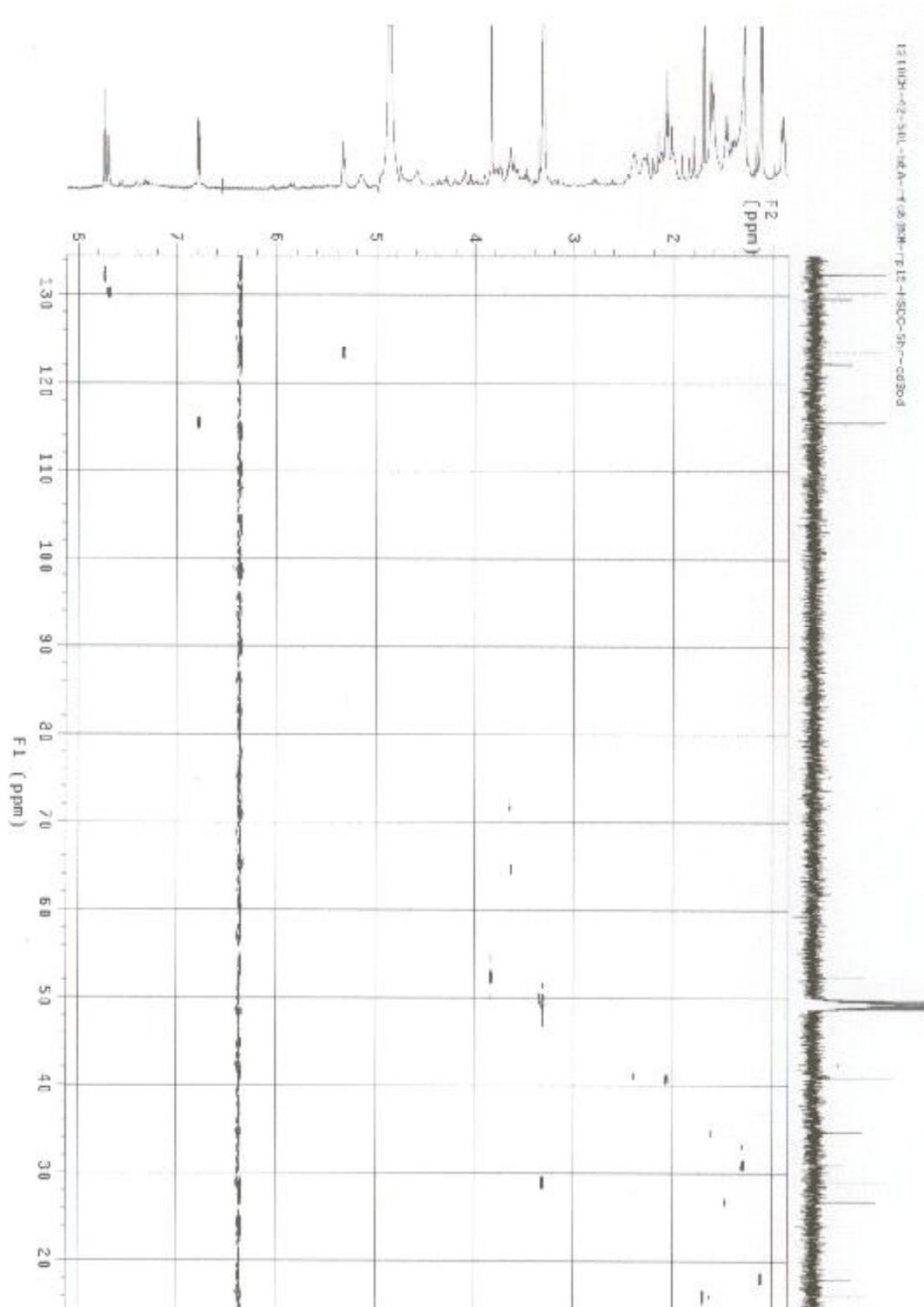


Fig. 3-69. HSQC spectrum of C2.

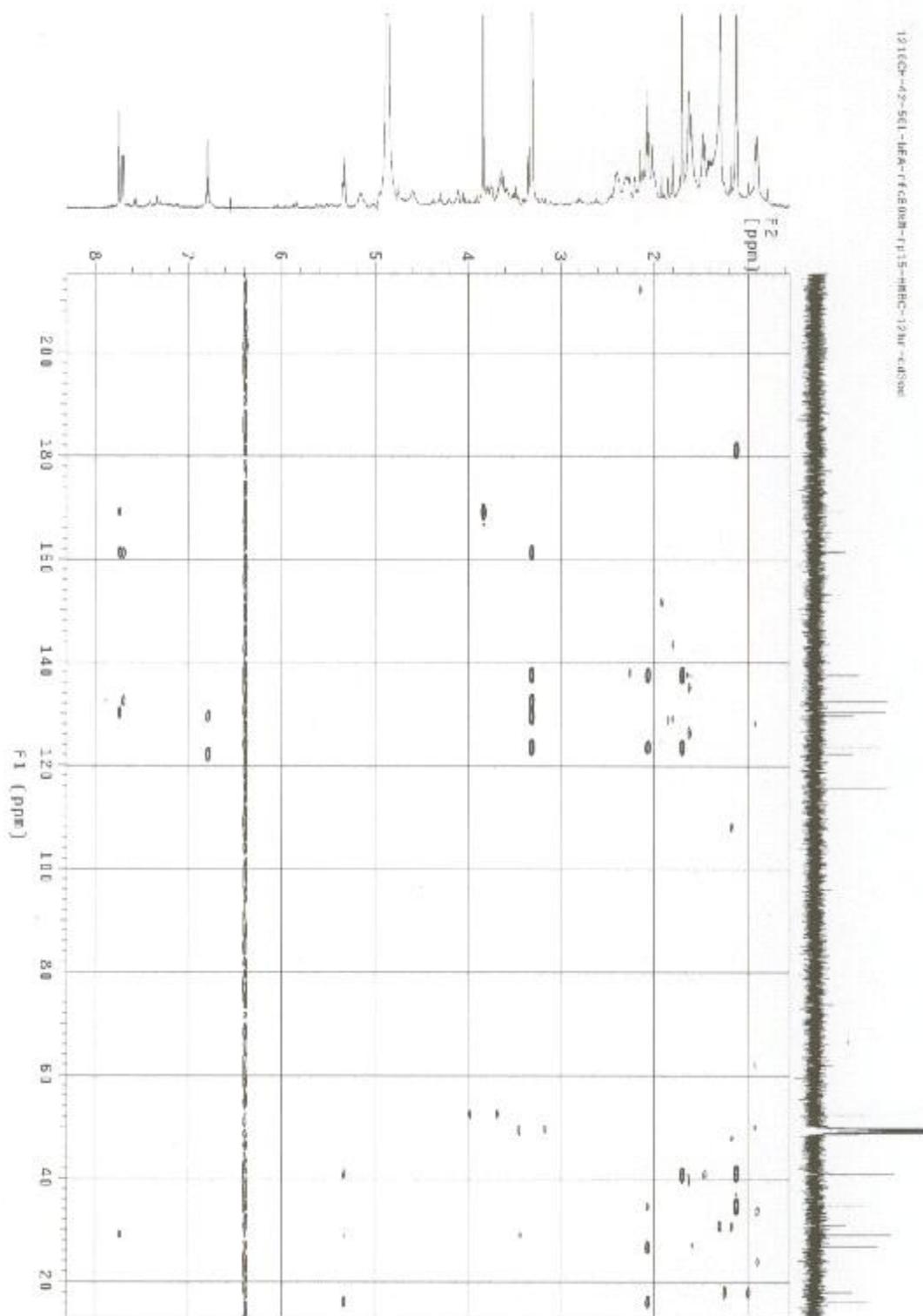


Fig. 3-70. HMBC spectrum of C2.

**Elemental Composition Report**  
**Single Mass Analysis**  
Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0  
Element prediction: Off  
Number of isotope peaks used for i-FIT = 3  
Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf(%)	Formula
275.0898	275.0895	0.3	1.1	5.5	824.8	n/a	100%	C13H16O5Na

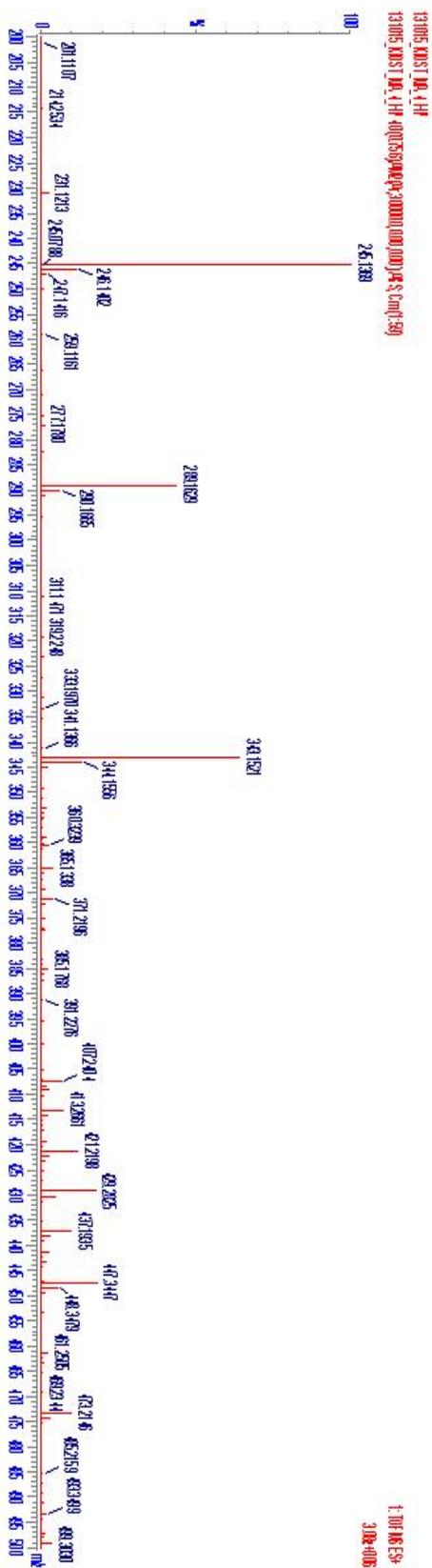


Fig. 3-71. HR-ESI mass spectrum of C2.

D type의 terpenoid계 신물질들은 40 mg의 80%MeOH 분획으로부터 C18 역상 HPLC(C18 reversed-phase HPLC, Column: YMC-ODS-A, 5  $\mu$ m, 10 $\times$ 250 mm, 용출 용매: 67%MeOH, 용출 속도: 1.5 mL/min, RI detector)로 정제하여 **D1**(1.8 mg), **D2**(1.5 mg), **D3**(1.7 mg), **D4**(0.4 mg)와 **D5**(0.3 mg)를 분리하였다(Fig. 3-41).

**D1**은  $^1\text{H}$  NMR spectrum(Fig. 3-73)를 통해 1개의 methyl, 9개의 methylene, 2개의 oxymethylene과 3개의 oxymethine을 확인하였다. 이들은 COSY spectrum(Fig. 3-74)를 통해 부분구조의 연결을 확인하였다.  $^{13}\text{C}$  NMR(Fig. 3-73)을 통해 1개의 ester carbonyl carbon( $\delta$  175.9)이 확인되었고, HMBC spectrum(Fig. 3-76)에서 C-5는 C-4( $\delta$  67.3), C-6( $\delta$  35.1)과 C-7( $\delta$  26.1)로부터 fatty acid 부분구조들과 연결되어있음이 나타났다. HRESIMS(Fig. 3-77)  $m/z$  343.2103  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  peak로부터 이 물질의 분자식은  $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_6$ 로 결정되었다(Fig. 3-72). **D2**는  $^1\text{H}$  NMR spectrum(Fig. 3-78)을 통해 3개의 methyl, 4개의 methylene, 3개의 oxymethylene, 2개의 oxymethine과 5개의 olefinic proton을 확인하였다. **D2**는 3개의 isoprenoid unit을 가지면서 **D1**의 fatty acid부분과 구조적 차이를 가졌다.  $^{13}\text{C}$  NMR(Fig. 3-78)을 통해 3개의 methyl기( $\delta$  13.9,  $\delta$  16.3과  $\delta$  17.5)가 확인되어 *E*-form의 isoprenoid 형태를 가지며, C-6/C-7의 double bond는 proton coupling constant가 15.0으로 *E*-form인 것으로 확인되었다. 각각의 부분구조는 COSY(Fig. 3-79)의  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ 연결과, HMBC(Fig. 3-81)의  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ 을 통해 연결되었다. 이 물질의 분자식은 HRESIMS(Fig. 3-82)  $m/z$  405.2252  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 로  $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_6$  인 것으로 결정되었다(Fig. 3-72). **D3**은  $^1\text{H}$  NMR(Fig. 3-83)과  $^{13}\text{C}$  NMR(Fig. 3-83)분석 결과 **D2**와 동일한 구조를 가진 것으로 확인되었으나, 말단의 ester carbonyl carbon과 alcohol기의 연결에서 차이를 보였다. HMBC spectrum(Fig. 3-86)을 통해 **D2**의 경우 C-5와 C-3이 연결되었으나, **D3**의 경우 C-5와 C-4가 연결된 것을 확인 할 수 있었다. HRESIMS(Fig. 3-87)  $m/z$  405.2253  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 의 peak를 통해  $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_6$ 로 분자식을 결정하였다(Fig. 3-72). **D4**는 **D2**와 동일한 구조를 가지고 있으나 말단의 oxymethylene이 ester carbonyl로 구조적 차이를 보였다.  $^1\text{H}$  NMR spectrum(Fig. 3-88)를 통해  $\delta$  2.04(s) methyl기를 확인하였으며 C-19의  $\delta$  172.9 carbonyl carbon은 HMBC spectrum(Fig. 3-91)에서 C-18( $\delta$  71.4), C-20( $\delta$  21.0)과 연결된 것이 나타났다. 이 물질은 HRESIMS(Fig. 3-92)  $m/z$  447.2359  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 에서 높은 peak가 확인되어  $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{O}_7$ 분자식으로 결정되었다(Fig. 3-72). **D5**는 **D3**과 동일한 구조를 가졌으나  $^1\text{H}$  NMR(Fig. 3-93)와  $^{13}\text{C}$  NMR(Fig. 3-93)분석 결과 **D4**와 같이 말단이 ester carbonyl기를 가진 것으로 확인되었다. 이 물질의 분자식은 HRESIMS(Fig. 3-97)  $m/z$  447.2362  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 으로  $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{O}_7\text{Na}$ 인 것으로 결정되었다(Fig. 3-72). 최종적으로 분리된 신물질 5점은 사슬의 양쪽 말단이 각각 극성과 비극성 부분을 가지고 있어 다양한 용매 친화성을 가진다. 그리고(*E*)-form의 isoprenoid unit을 세 개 가지고 있으며, 반응성이 높은 OH기와 함께 전자 공명이 가능한 구조적 특이성을 가진 것으로 규명되었다(Fig. 3-72).

Isoprenoid unit의 경우 현재 시판 중인 활성 물질들에서도 구조 특이성으로 나타난다. 항산화력, 암, 당뇨, 면역세포에도 활성을 가진다고 알려진 Coenzyme Q10, 지용성 비타민 A의 전구체로 세포의 성장 및 세포분화, 증식에 관여하는  $\beta$ -carotin, triterpenoid계 물질로 항산화력과 콜레스테롤 저하에 효과적인 squalene과 carotenoid계의 항산화, 노화방지 활성물질 lycopene 등의 물질은 대표적인 isoprenoid unit을 가지는 활성 물질로 널리 사용되고 있다.

따라서 1210CH-42균주에서 분리된 D type의 terpenoid계 신물질들의 항노화 활성 또한 기대되어지며 다양한 검색을 통해 활성을 검증 중에 있다.

**D1:**  $[\alpha]_D +0.0$  (*c* 0.5, MeOH),  $^1\text{H}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) 0.92(t,  $\text{CH}_3$ ), 1.32–1.45(m,  $\text{CH}_{14}$ ), 1.63(m,  $\text{CH}_2$ ), 2.37(t,  $\text{CH}_2$ ), 3.50(m, CH), 3.57(m, CH), 3.61–3.75(dd,  $J=6.0, 10.0$ ,  $\text{CH}_2$ ), 3.74(m, CH), 4.13–4.30(dd,  $J=7.0, 10.0$ ,  $\text{CH}_2$ ),  $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) 14.6, 24.0, 26.1, 26.8, 29.2, 30.4, 30.6, 35.1, 38.3, 38.5, 64.7, 67.3, 71.4, 72.5, 73.6, 175.9, HRESIMS  $m/z$  343.2103  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_6\text{Na}$ , 343.2097).

**D2:**  $[\alpha]_D +6.7$  (*c* 0.5, MeOH),  $^1\text{H}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) 1.63(s,  $\text{CH}_3$ ), 1.64(s,  $\text{CH}_3$ ), 1.92(s,  $\text{CH}_3$ ), 2.02(t,  $\text{CH}_2$ ), 2.13(t,  $\text{CH}_2$ ), 2.20(bs,  $\text{CH}_2$ ), 2.21(bs,  $\text{CH}_2$ ), 3.51–3.53(dd,  $J=5.0, 10.0$ ,  $\text{CH}_2$ ), 3.77–3.80(dd,  $J=5.0, 10.0$ ,  $\text{CH}_2$ ), 3.84(m, CH), 3.90(s,  $\text{CH}_2$ ), 4.95(q, CH), 5.13(bt, CH), 5.37(t, CH), 5.85(d,  $J=15.0$ , CH), 6.06(d,  $J=10.0$ , CH), 7.65–7.67(dd,  $J=10.0, 15.0$ , CH),  $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) 13.9, 16.3, 17.5, 27.3, 27.5, 40.6, 41.4, 61.8, 64.3, 69.1, 72.3, 76.2, 119.8, 124.8, 125.0, 126.6, 136.1, 136.8, 143.0, 143.0, 151.8, 169.0, HRESIMS  $m/z$  405.2252  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_6\text{Na}$ , 405.2253).

**D3:**  $[\alpha]_D +0.0$  (*c* 0.5, MeOH),  $^1\text{H}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) 1.63(s,  $\text{CH}_3$ ), 1.64(s,  $\text{CH}_3$ ), 1.92(s,  $\text{CH}_3$ ), 2.02(t,  $\text{CH}_2$ ), 2.12(t,  $\text{CH}_2$ ), 2.21(bs,  $\text{CH}_2$ ), 2.21(bs,  $\text{CH}_2$ ), 3.61(m, CH), 3.62–3.77(dd,  $J=5.0, 15.0$ ,  $\text{CH}_2$ ), 3.77(m, CH), 3.90(s,  $\text{CH}_2$ ), 5.13(t, CH), 5.37(t, CH), 5.85(d,  $J=15.0$ , CH), 6.06(d,  $J=10.0$ , CH), 7.66(dd,  $J=10.0, 15.0$ , CH),  $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) 13.9, 16.3, 17.5, 27.3, 27.5, 40.6, 41.4, 64.7, 67.3, 69.1, 71.5, 73.6, 119.7, 124.8, 125.0, 126.6, 136.1, 136.8, 142.9, 151.8, 169.7, HRESIMS  $m/z$  405.2253  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{O}_6\text{Na}$ , 405.2253).

**D4:**  $[\alpha]_D +6.8$  (*c* 0.5, MeOH),  $^1\text{H}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) 1.63(s,  $\text{CH}_3$ ), 1.64(s,  $\text{CH}_3$ ), 1.92(s,  $\text{CH}_3$ ), 2.03(t,  $\text{CH}_2$ ), 2.04(s,  $\text{CH}_3$ ), 2.14(bt,  $\text{CH}_2$ ), 2.20(bs,  $\text{CH}_2$ ), 2.21(bs,  $\text{CH}_2$ ), 3.52–3.68(dd,  $J=5.0, 10.0$ ,  $\text{CH}_2$ ), 3.79–3.83(dd,  $J=5.0, 15.0$ ,  $\text{CH}_2$ ), 3.85(m, CH), 4.43(s,  $\text{CH}_2$ ), 4.95(m, CH), 5.13(bt, CH), 5.43(t, CH), 5.86(d,  $J=15.0$ , CH), 6.06(d,  $J=10.0$ , CH), 7.66(dd,  $J=10.0, 15.0$ , CH),  $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) 14.2, 16.2, 17.5, 21.0, 27.3, 27.4, 40.3, 41.4, 61.8, 64.3, 71.4, 72.3, 76.2, 119.9, 124.8, 125.2, 130.4, 131.6, 136.5, 143.0, 151.8, 169.0, 172.9, HRESIMS  $m/z$  447.2359  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{O}_7\text{Na}$ ,

447.2359).

**D5:**  $[\alpha]_D +6.3$  ( $c$  0.5, MeOH),  $^1\text{H}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) 1.63(s,  $\text{CH}_3$ ), 1.64(s,  $\text{CH}_3$ ), 1.92(s,  $\text{CH}_3$ ), 2.03(t,  $\text{CH}_2$ ), 2.04(s,  $\text{CH}_3$ ), 2.15(q,  $\text{CH}_2$ ), 2.20(bs,  $\text{CH}_2$ ), 2.21(bs,  $\text{CH}_2$ ), 3.61(m, CH), 3.62–3.76(dd,  $J=5.0, 15.0$ ,  $\text{CH}_2$ ), 3.79(m, CH), 4.20–4.38(dd,  $J=5.0, 10.0$ ,  $\text{CH}_2$ ), 4.43(s,  $\text{CH}_2$ ), 5.13(bt, CH), 5.44(t, CH), 5.85(d,  $J=15.0$ , CH), 6.06(d,  $J=10.0$ , CH), 7.66(dd,  $J=10.0, 15.0$ , CH),  $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) 14.2, 16.2, 17.5, 21.0, 27.3, 27.4, 40.3, 41.4, 64.7, 67.3, 71.4, 71.5, 73.6, 119.7, 124.7, 125.2, 130.4, 131.6, 136.5, 142.9, 151.7, 169.7, 172.9, HRESIMS  $m/z$  447.2362  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{O}_7\text{Na}$ , 447.2359).

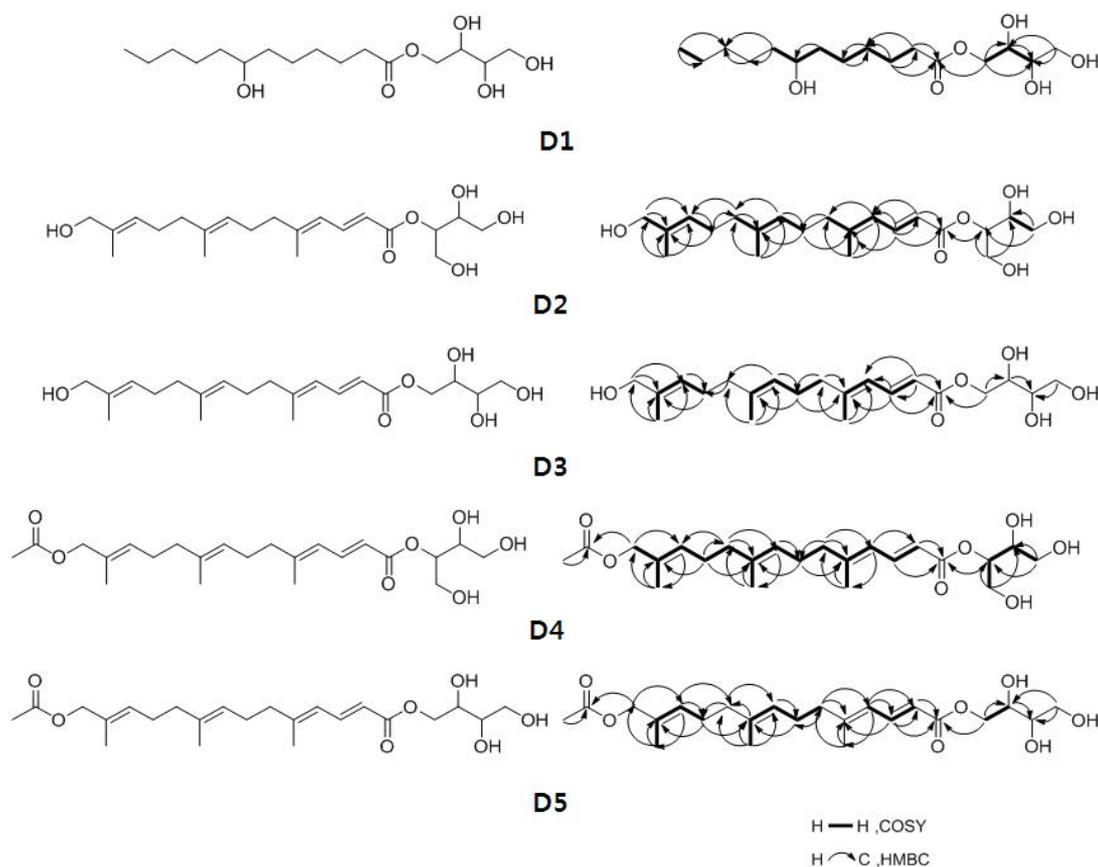


Fig. 3–72. Key  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  COSY and HMBC correlations for compounds **D1**, **D2**, **D3**, **D4** and **D5** from the strain 1210CH–42.

Table 3-10. NMR data for the new compound **D1** in CD<sub>3</sub>OD

No.	D1			
	$\delta_C$	$\delta_H$ , mult. ( $J$ in Hz)	HMBC	COSY
1	64.7	3.61, 3.75, dd( $J=6.0, 10.0$ )	C2,C3	
2	73.6	3.57, m		H3
3	71.4	3.74, m	C2	H2,H4
4	67.3	4.13, 4.30, dd( $J=7.0, 10.0$ )	C2,C3,C5	H3
5	175.9			
6	35.1	2.37, t	C5,C8	H7
7	26.1	1.63, m	C6,C8	H6,H8
8	30.4	1.35, m	C9	H7,H9
9	30.6	1.35, m	C8	H8,H10
10	38.5	1.38, m	C11	H9,H11
11	72.5	3.50, m	C13,C14	H10,H12
12	38.3	1.43, m	C13,C14	H11
13	26.8	1.24, 1.45, m	C14	
14	29.2	1.32, 1.43, m		
15	24.0	1.32, m		H16
16	14.6	0.92, t	C14,C15	H15

Table 3-11. NMR data for the new compounds **D2** and **D3** in CD<sub>3</sub>OD

No.	D2			D3		
	$\delta_C$	$\delta_H$ , mult. ( $J$ in Hz)	HMBC	$\delta_C$	$\delta_H$ , mult. ( $J$ in Hz)	HMBC
1	64.3	3.51, 3.53, dd( $J=5.0$ , 10.0)	C2,C3	64.7	3.62, 3.77, dd( $J=5.0$ , 15.0)	C2
2	72.3	3.84, m		73.6	3.61, m	
3	76.2	4.95, q	C5	71.5	3.77, m	C2
4	61.8	3.77, 3.80, dd( $J=5.0$ , 10.0)	C2,C3	67.3	4.20, 4.37, dd( $J=5.0$ , 10.0)	C3,C5
5	169.1			169.7		
6	119.8	5.85, d( $J=15.0$ )	C5,C8	119.7	5.85, d( $J=15.0$ )	C5,C7,C8
7	143.0	7.65, 7.67, dd( $J=10.0$ , 15.0)	C5,C6,C8, C9	143.0	7.66, dd( $J=10.0$ , 15.0)	C5,C8,C9
8	124.8	6.06, d( $J=10.0$ )	C10	124.8	6.06, d( $J=10.0$ )	
9	151.8			151.8		
10	41.4	2.21, bs	C11	41.4	2.21, bs	C9,C11
11	27.3	2.20, bs	C9,C13	27.3	2.21, bs	C9,C13
12	125.0	5.13, bt	C11,C14	125.0	5.13, t	C11,C14
13	136.8			136.8		
14	40.6	2.02, t	C13,C16	40.6	2.02, t	C15
15	27.5	2.13, t	C14,C17	27.5	2.12, t	C17
16	126.6	5.37, t	C15	126.6	5.37, t	C15
17	136.1			136.1		
18	69.1	3.90, s	C16,C17	69.2	3.90, s	C16,C17
19	13.9	1.64, s	C16,C17, 18	13.9	1.64, s	C16,C17, C18
20	16.3	1.63, s	C12,C13, C14	16.3	1.63, s	C12,C13, C14
21	17.5	1.92, s	C8,C9,C10	17.5	1.92, s	C8,C9,C10

Table 3-12. NMR data for the new compounds **D4** and **D5** in CD<sub>3</sub>OD

No.	D4			D5		
	$\delta_C$	$\delta_H$ , mult. ( $J$ in Hz)	HMBC	$\delta_C$	$\delta_H$ , mult. ( $J$ in Hz)	HMBC
1	61.8	3.79, 3.83 dd( $J=5.0, 15.0$ )	C2,C3	64.7	3.62, 3.76 dd( $J=5.0, 15.0$ )	C2,C3
2	76.2	4.95, m		73.6	3.61, m	
3	72.3	3.85, m	C5	71.5	3.79, m	C2
4	64.3	3.52, 3.68 dd( $J=5.0, 10.0$ )	C2,C3	67.4	4.20, 4.38 dd( $J=5.0, 10.0$ )	C3,C5
5	169.9			169.7		
6	119.9	5.86, d( $J=15.0$ )	C5	119.7	5.85, d( $J=15.0$ )	C5
7	143.0	7.66, dd( $J=10.0, 15.0$ )	C5	142.9	7.66, dd( $J=10.0, 15.0$ )	C5,C6, C9
8	124.8	6.06, d( $J=10.0$ )	C6	124.8	6.06, d( $J=10.0$ )	C6,C7, C23
9	151.8			151.7		
10	41.4	2.21, bs	C8,C9, C11	41.4	2.21, bs	C8,C9,C11
11	27.4	2.20, bs	C9,C13	27.4	2.20, bs	C13
12	125.2	5.13, bt	C11,C22	125.2	5.13, bt	C11
13	136.5			136.5		
14	40.3	2.03, t	C12,C13, C16	40.3	2.03, t	C12,C15
15	27.3	2.14, t	C13,C14, C17	27.3	2.15, t	C13,C17
16	130.5	5.43, t	C21	130.5	5.44, t	C14,C15, C21
17	131.6			131.6		
18	71.4	4.43, s	C16,C19	71.4	4.43, s	C16,C19
19	173.0			172.9		
20	21.0	2.04, s	C19	21.0	2.04, s	C19
21	14.2	1.64, s	C17,C18	14.2	1.64, s	C17,C18
22	16.2	1.63, s	C13,C14	16.2	1.63, s	C12,C13, C14
23	17.5	1.92, s	C9,C10	17.5	1.92, s	C9,C10

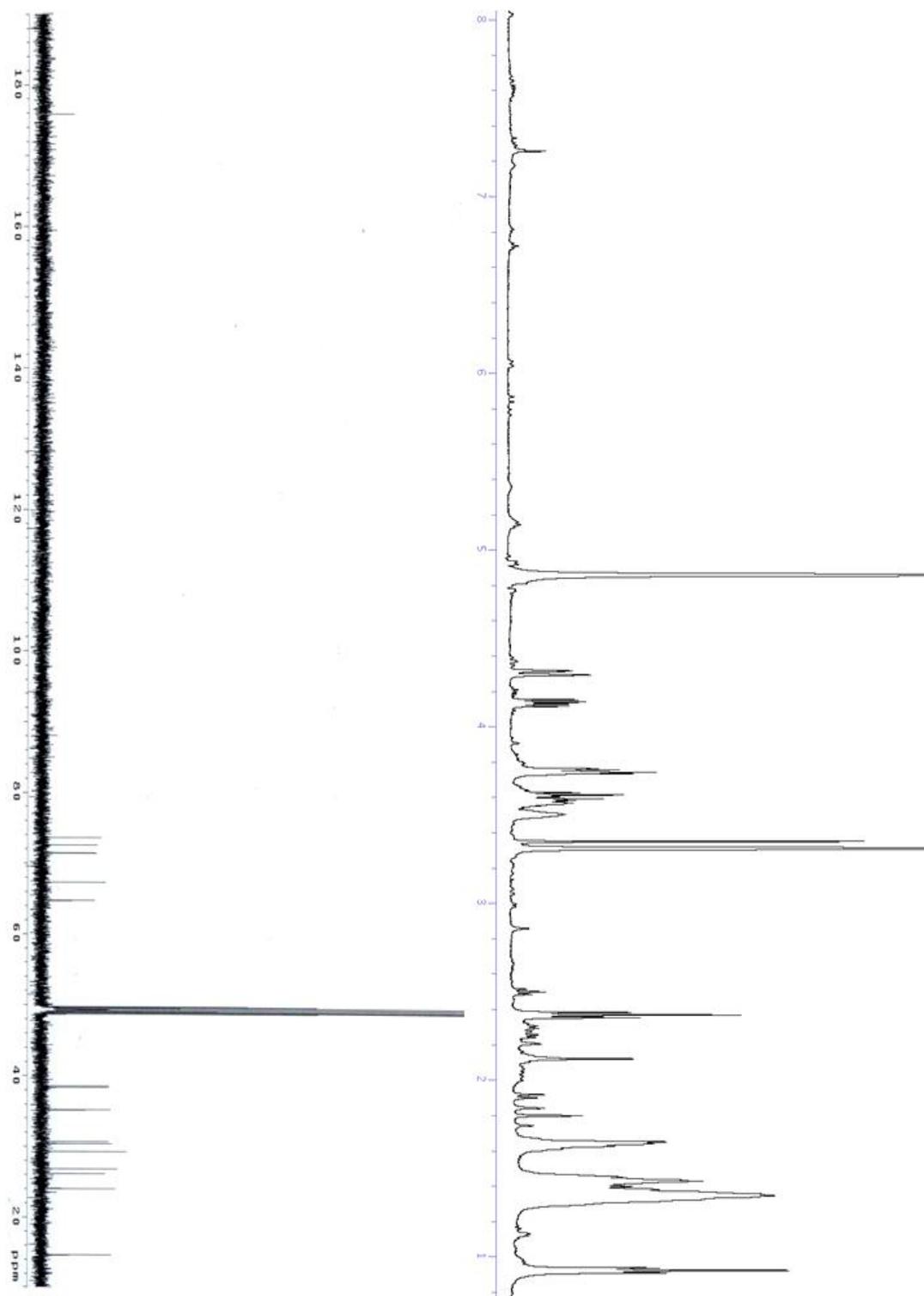


Fig. 3-73. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra of D1 in CD<sub>3</sub>OD.

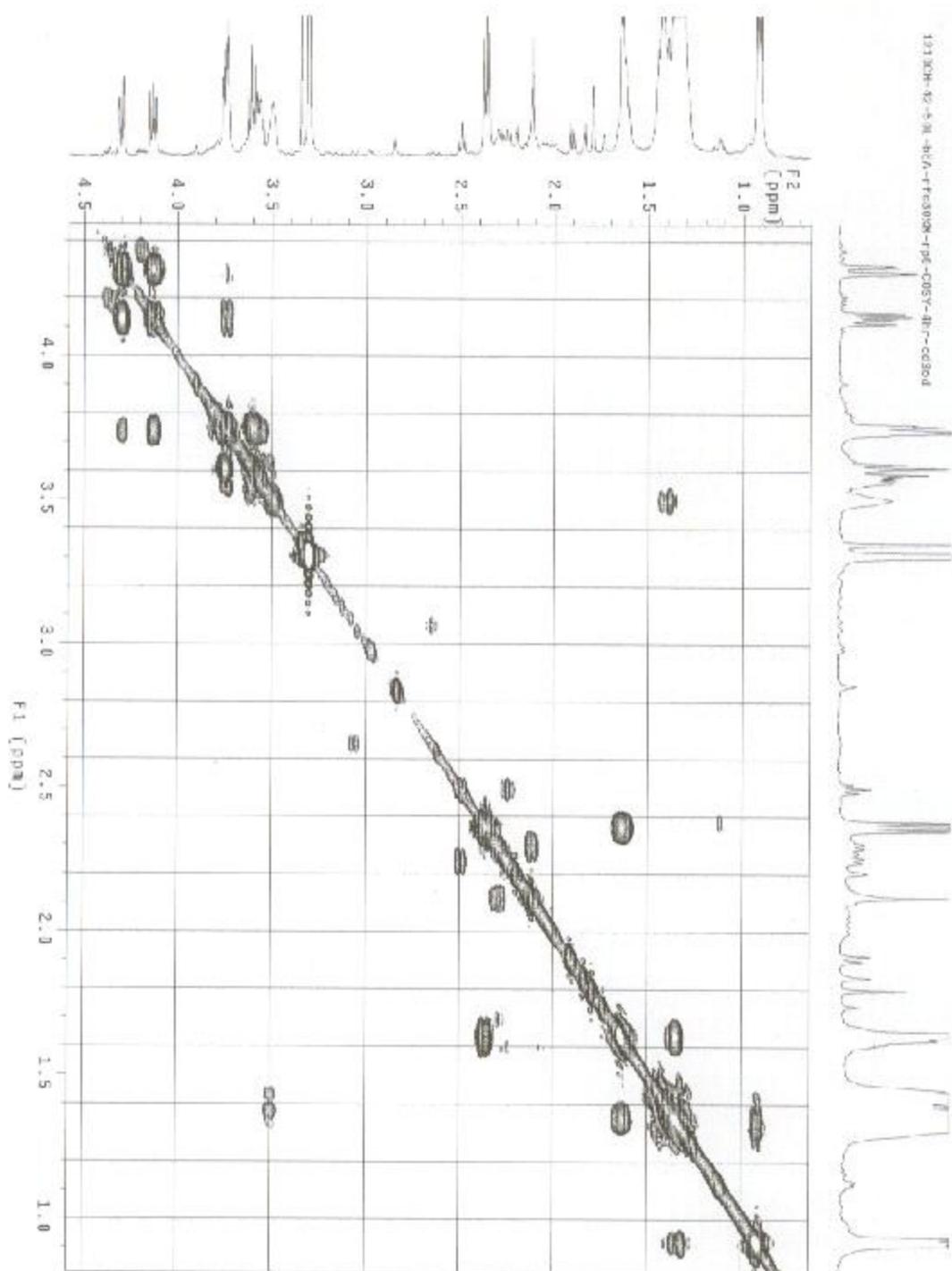


Fig. 3-74. COSY spectrum of D1.

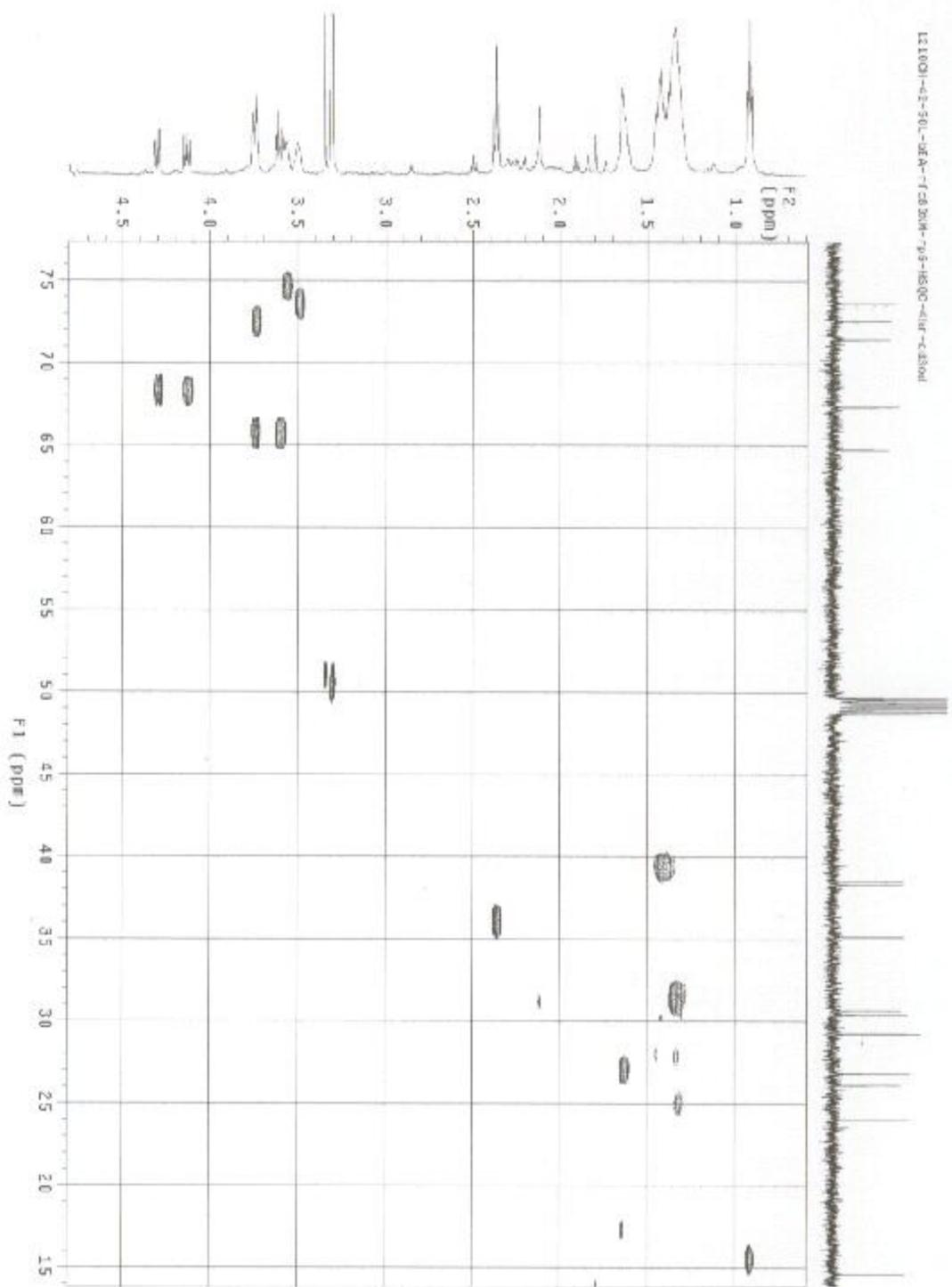


Fig. 3-75. HSQC spectrum of D1.

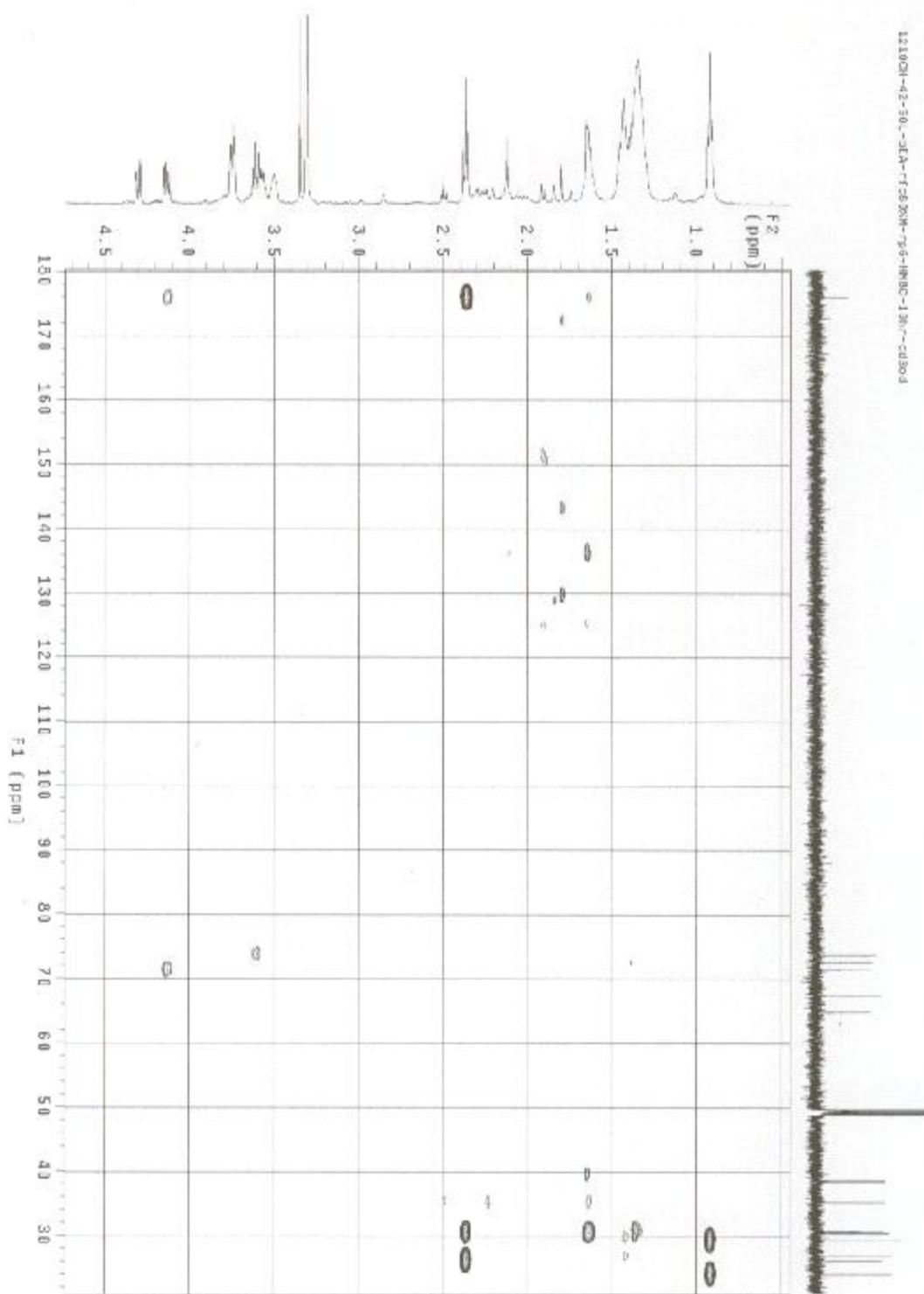


Fig. 3-76. HMBC spectrum of D1.

Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

50 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 3 closest results for each mass)

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf(%)	Formula
343.2103	343.2097	0.6	1.7	0.5	1080.0	n/a	n/a	C16H32O6Na

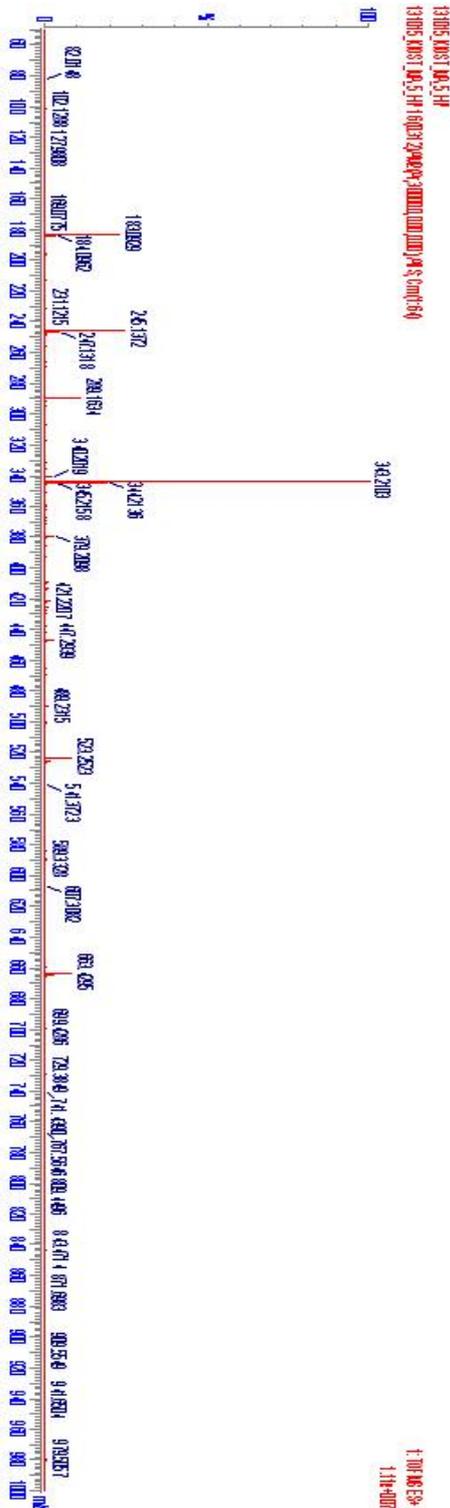


Fig. 3-77. HR-ESI mass spectrum of D1.

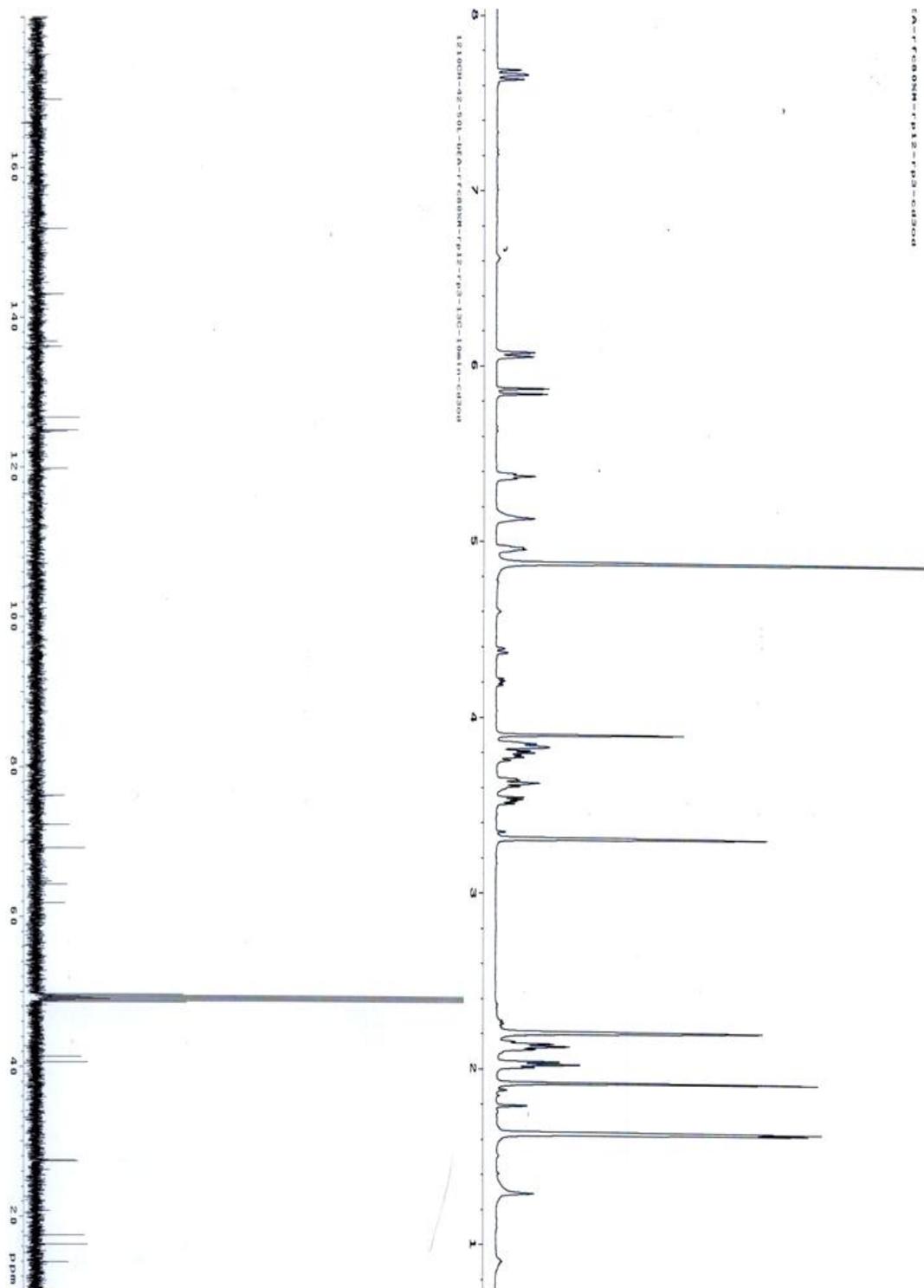


Fig. 3-78. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra of D2 in CD<sub>3</sub>OD.

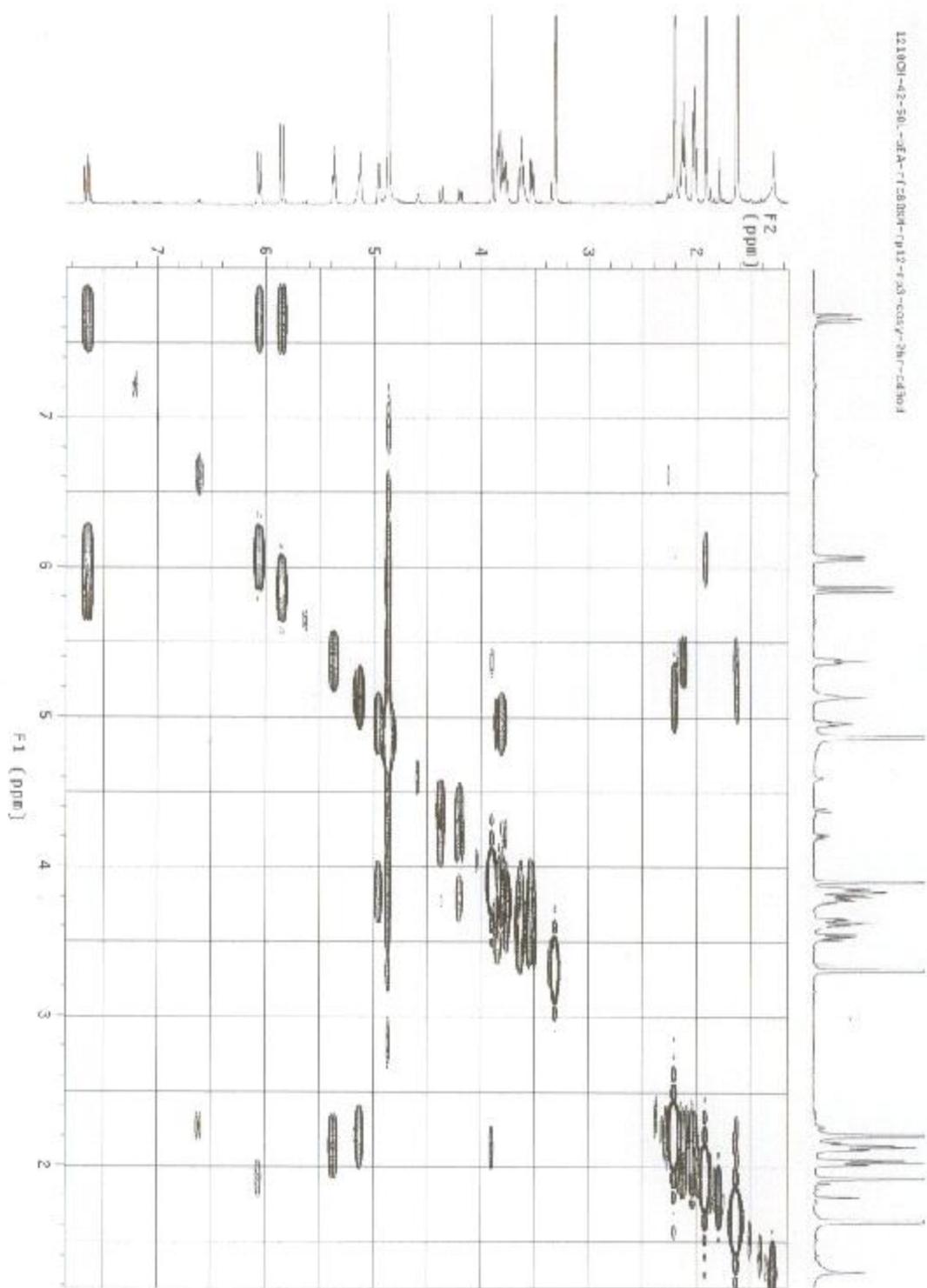


Fig. 3-79. COSY spectrum of D2.

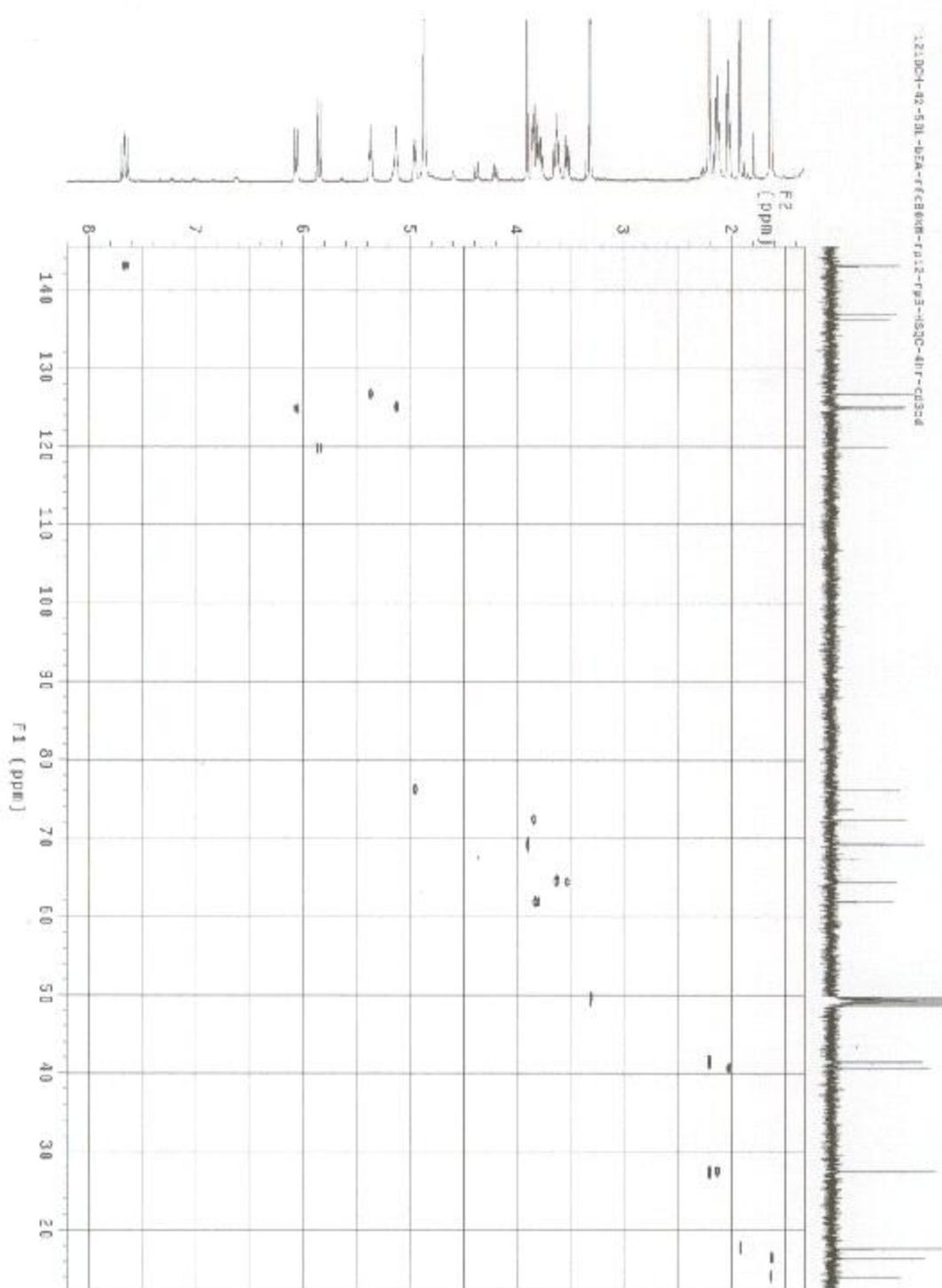


Fig. 3-80. HSQC spectrum of D2.

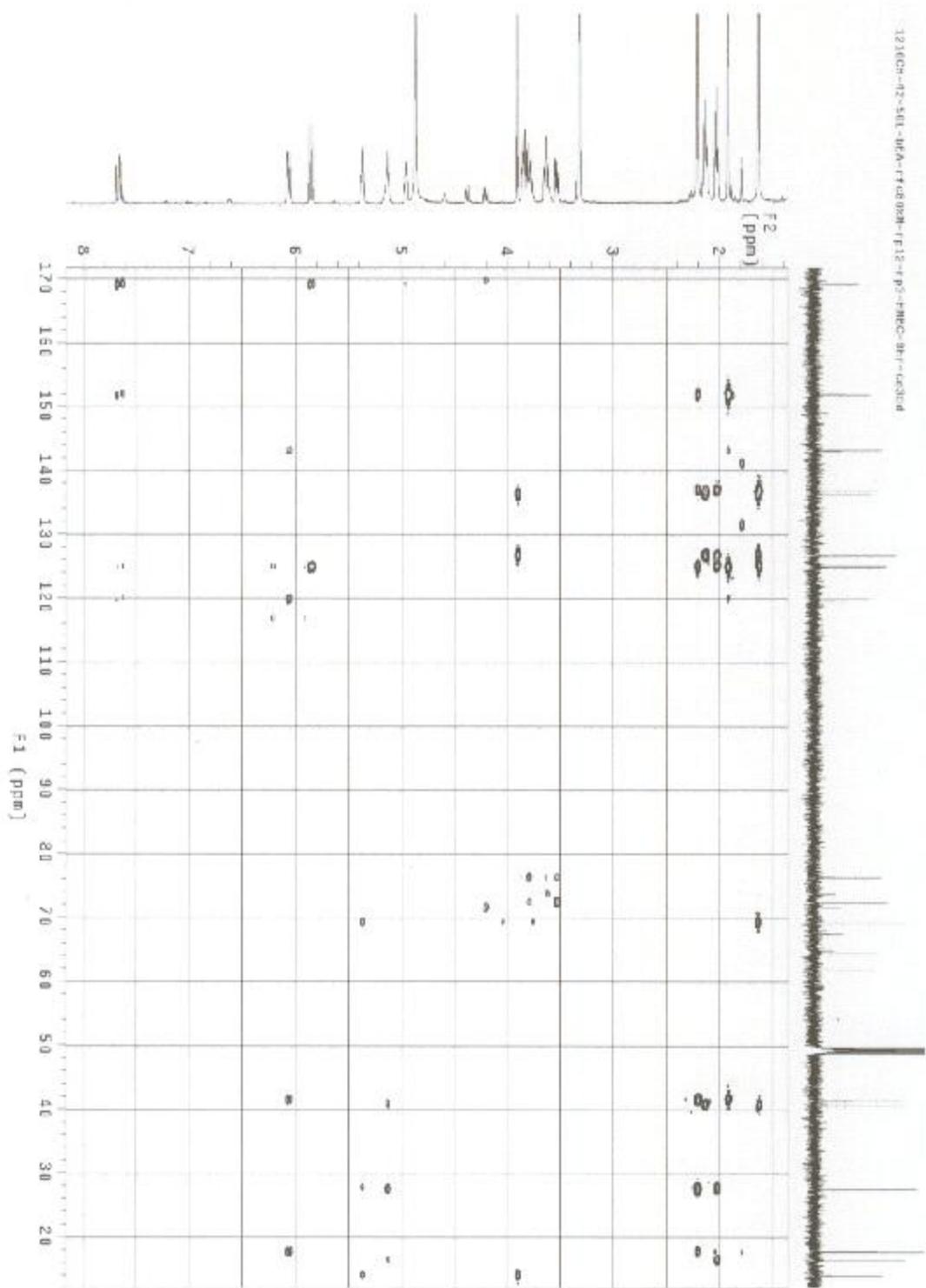


Fig. 3-81. HMBC spectrum of D2.

Elemental Composition Report  
 Single Mass Analysis  
 Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0  
 Element prediction: Off  
 Number of isotope peaks used for i-FIT = 3  
 Monoisotopic Mass, Even Electron Ions  
 70 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 3 closest results for each mass)

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf(%)	Formula
405.2252	405.2253	-0.1	-0.2		4.5	1065.4	n/a	C21H34O6Na

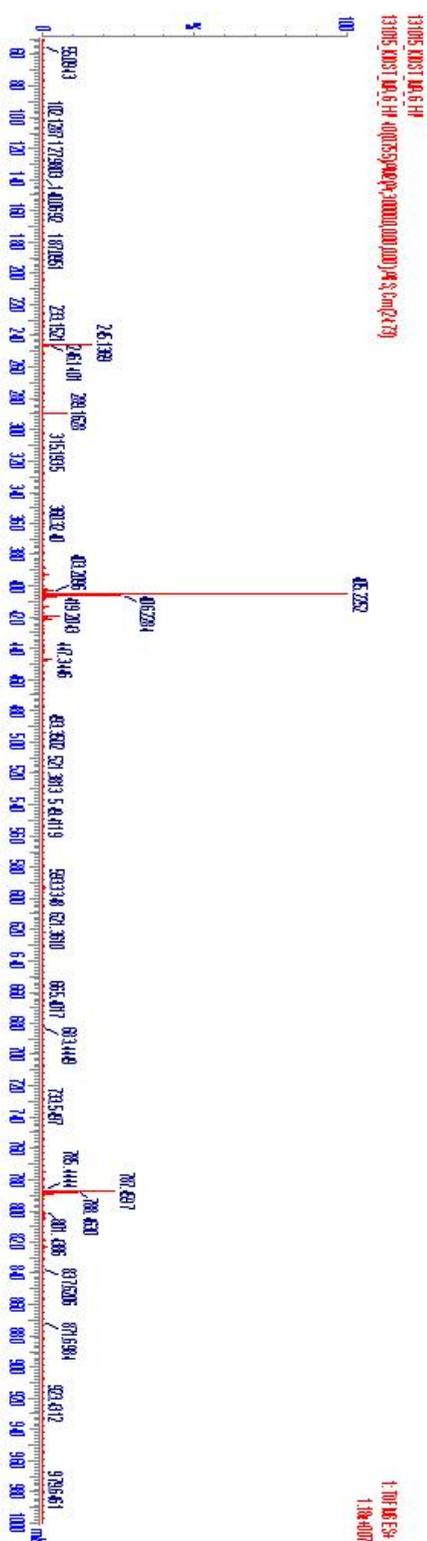


Fig. 3-82. HR-ESI mass spectrum of D2.

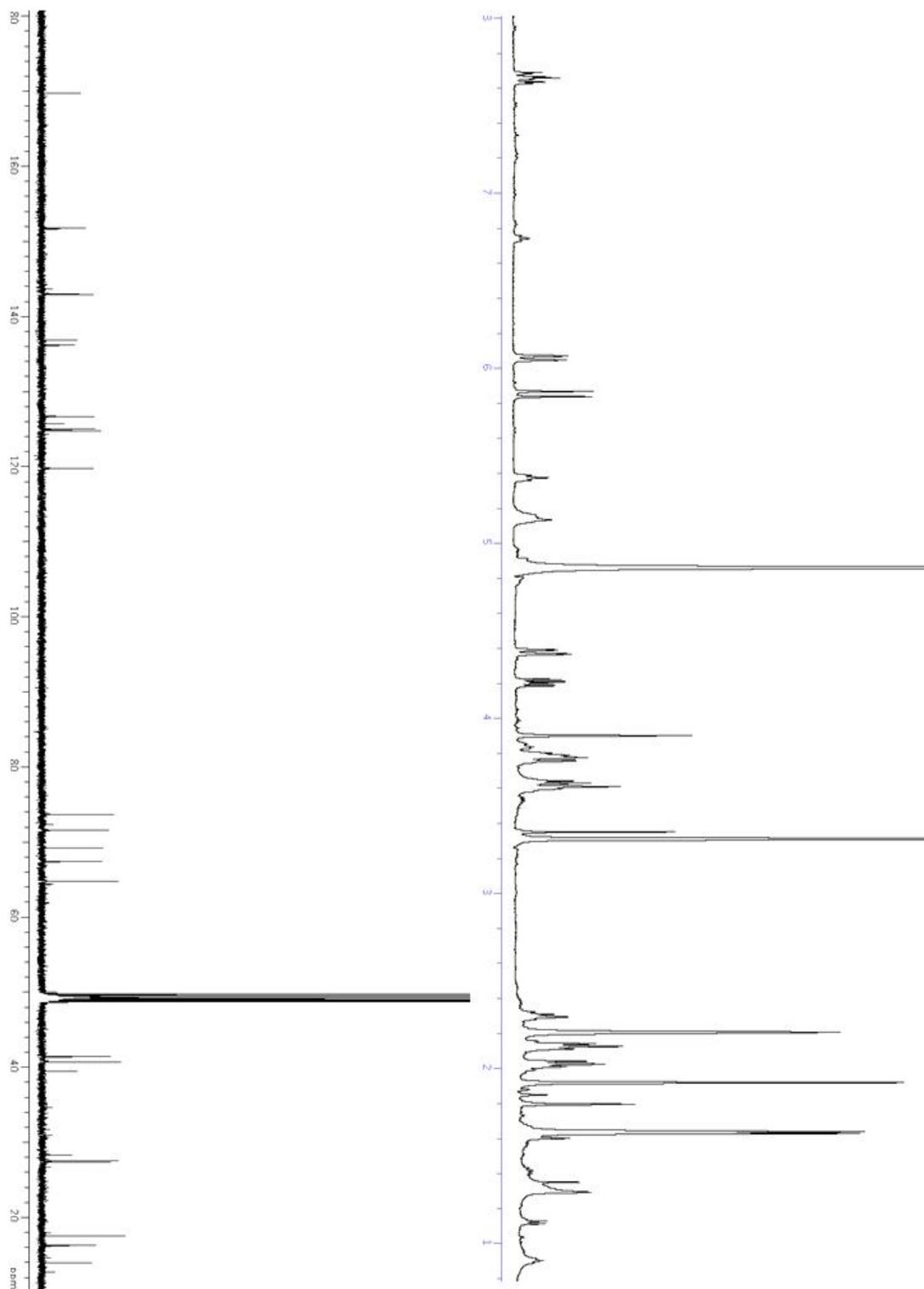


Fig. 3-83. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra of **D3** in CD<sub>3</sub>OD.

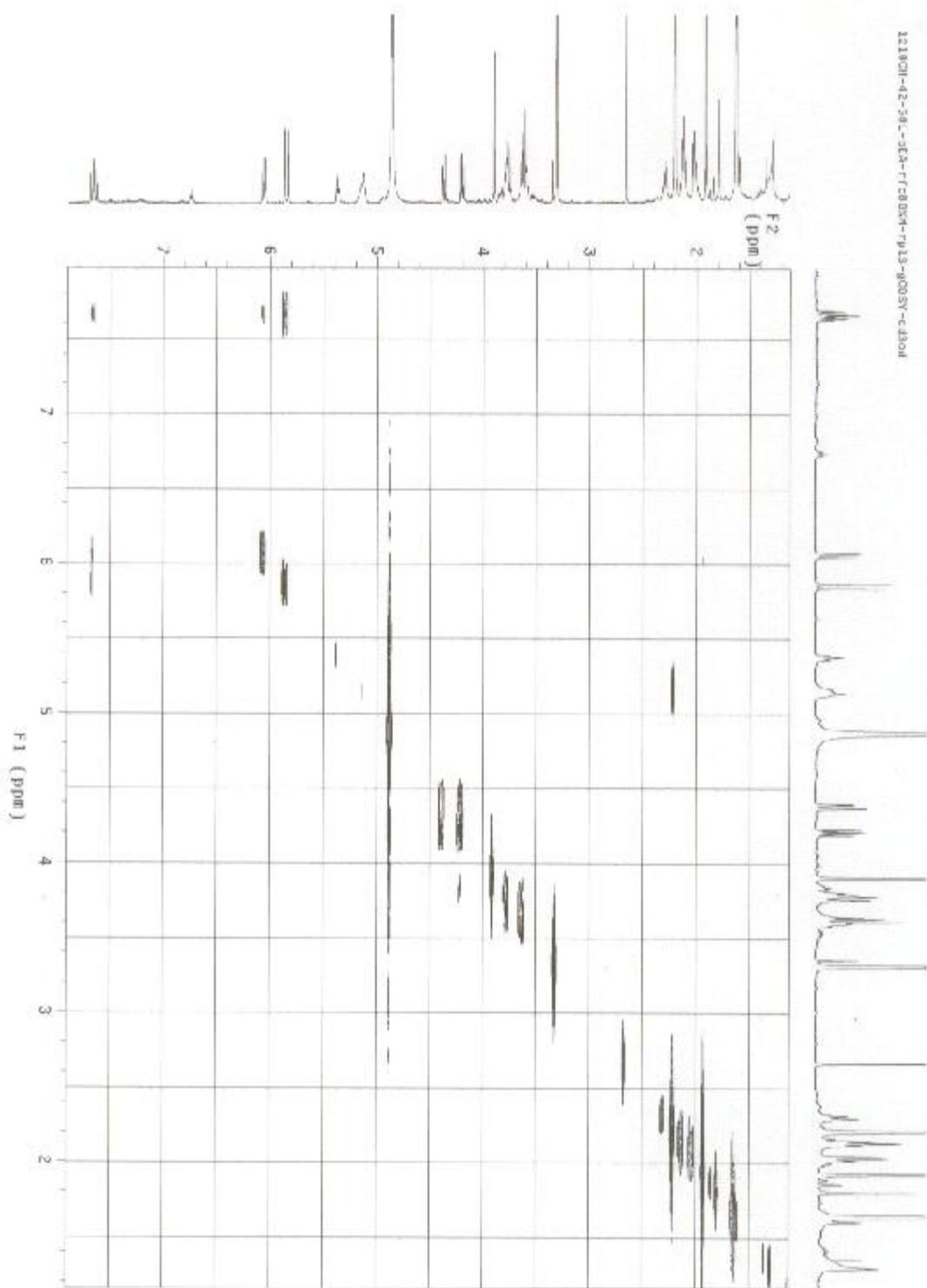


Fig. 3-84. COSY spectrum of D3.

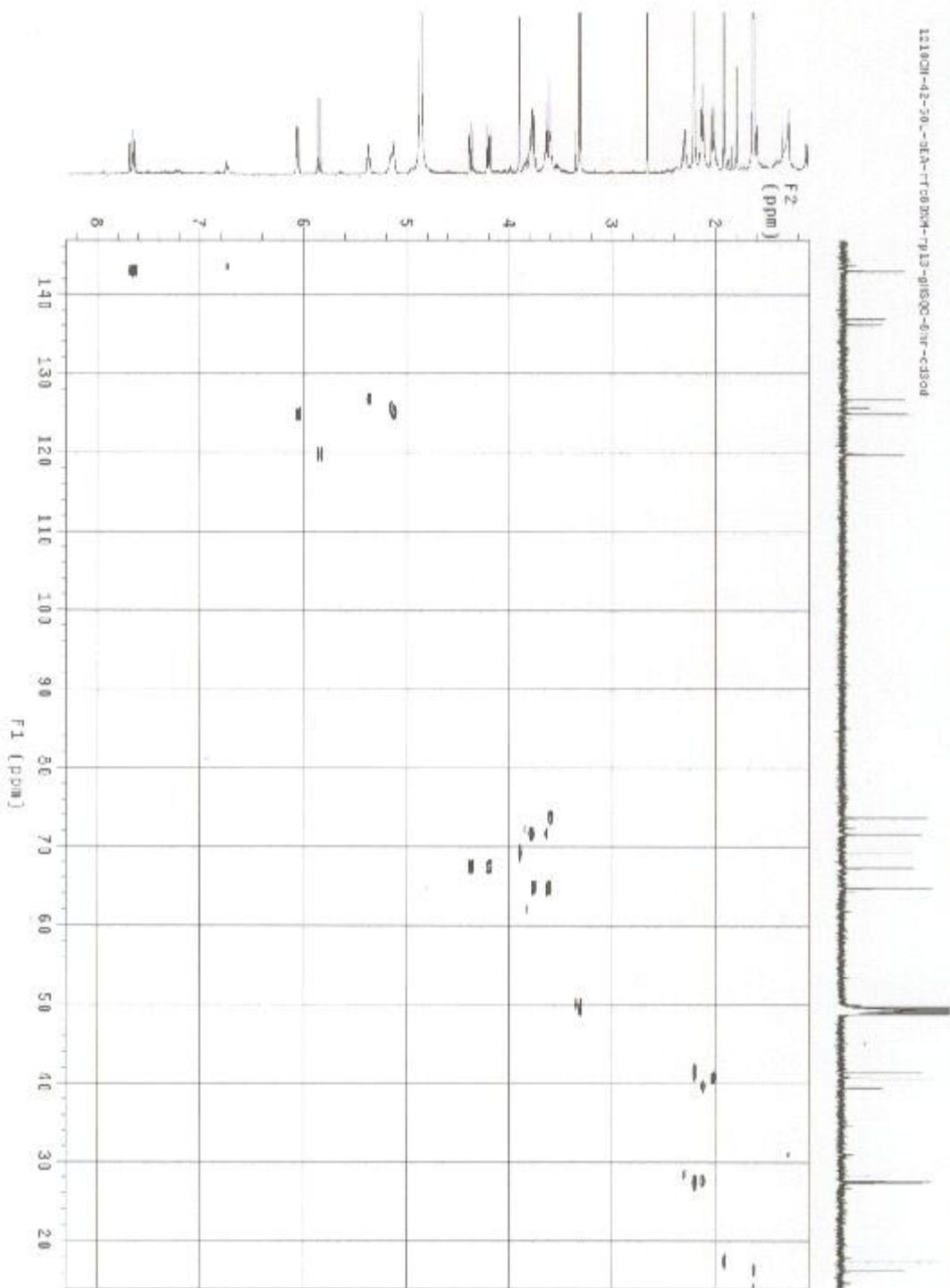


Fig. 3-85. HSQC spectrum of D3.

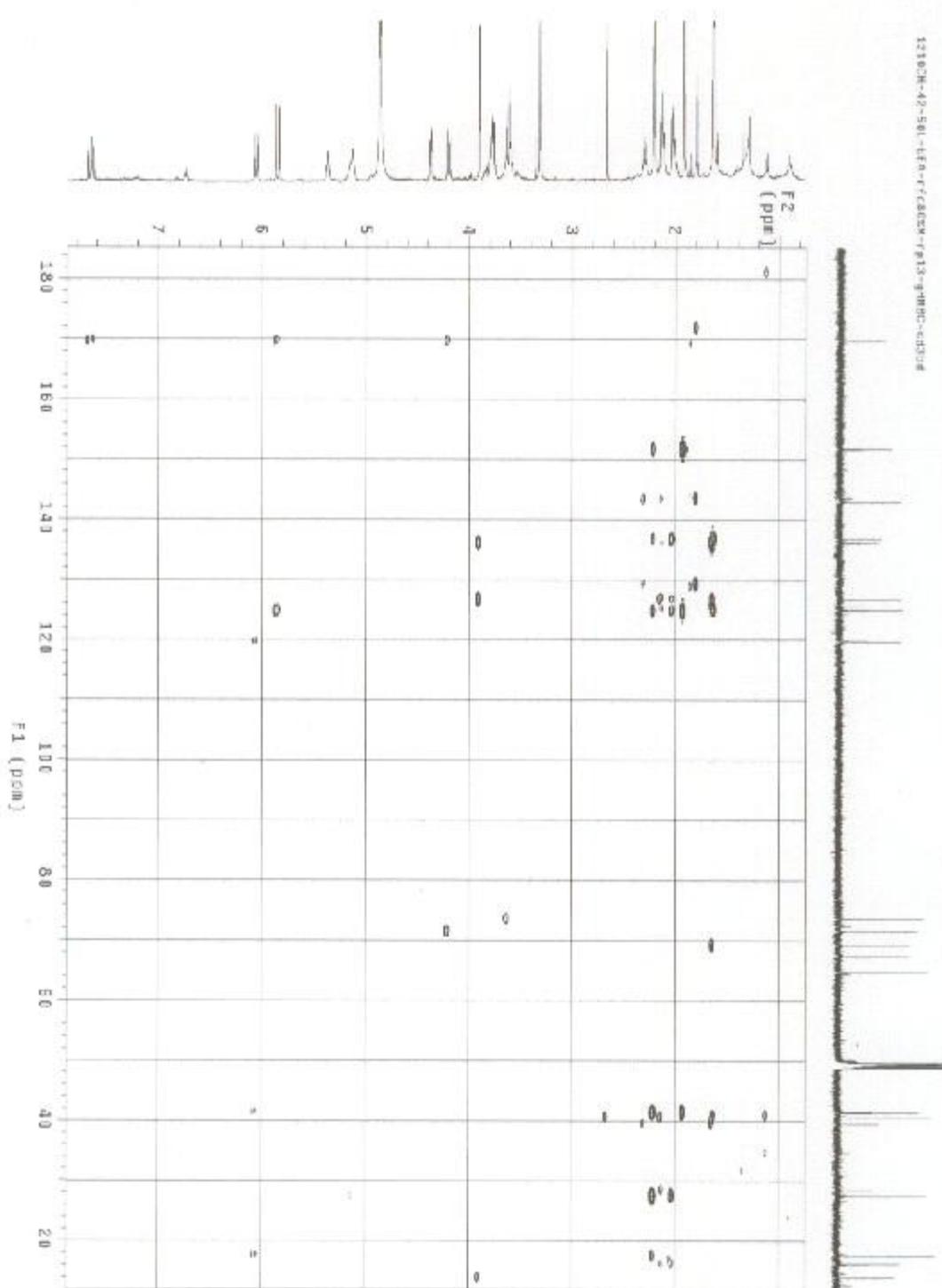


Fig. 3-86. HMBC spectrum of D3.

Elemental Composition Report

Single Mass Analysis  
Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0  
Element prediction: Off  
Number of Isotope peaks used for i-FIT = 3  
Monoisotopic Mass, Even Electron Ions  
70 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 3 closest results for each mass)

Elements Used:

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm Conf(%)	Formula
405.2253	405.2253	0.0	0.0	0.0	4.5	897.9	n/a
							C21H34O6Na

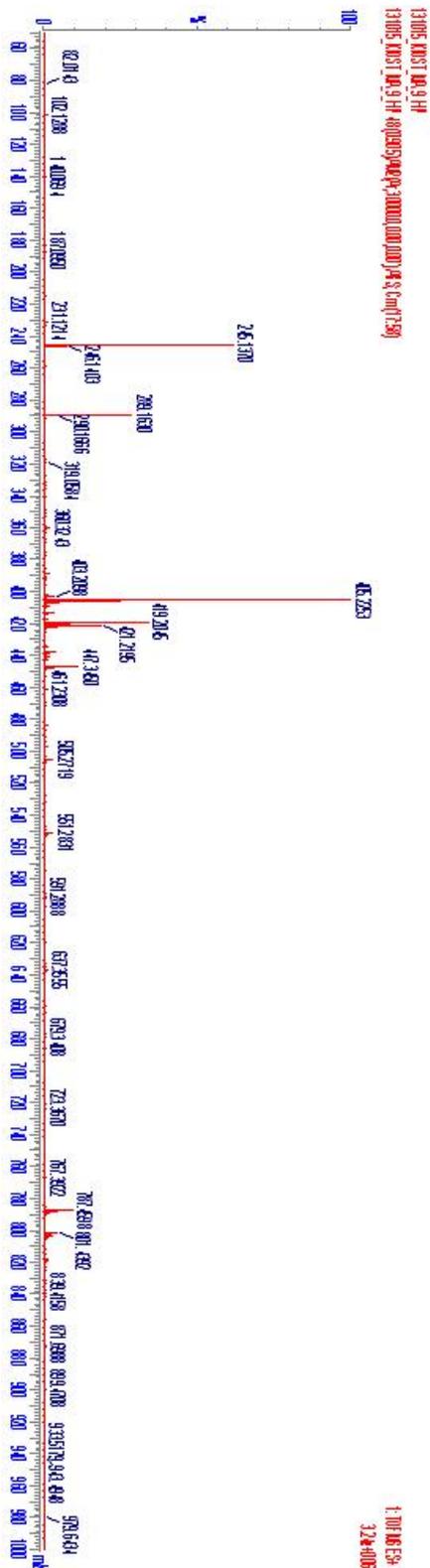


Fig. 3-87. HR-ESI mass spectrum of D3.

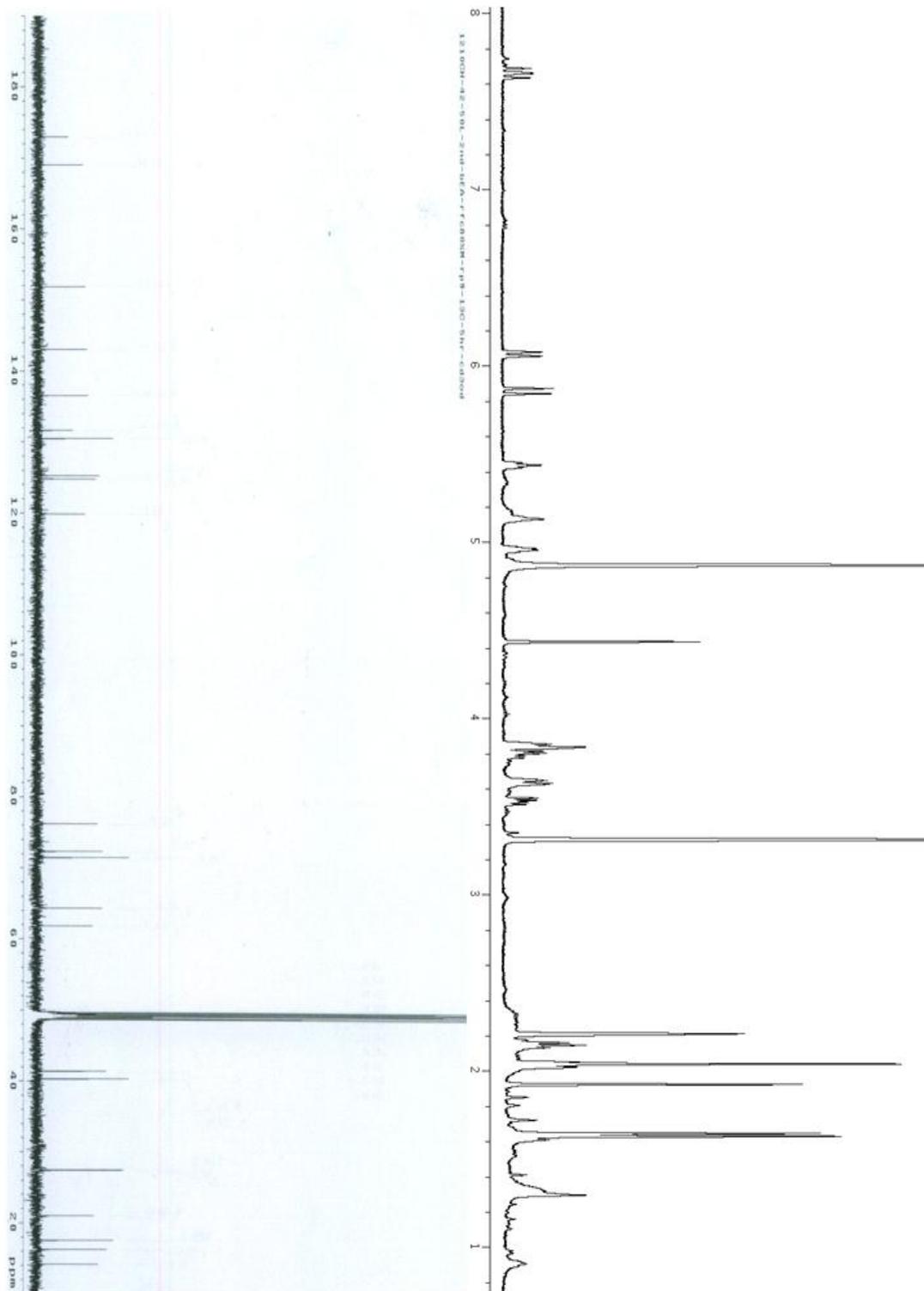


Fig. 3-88. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra of D4 in CD<sub>3</sub>OD.

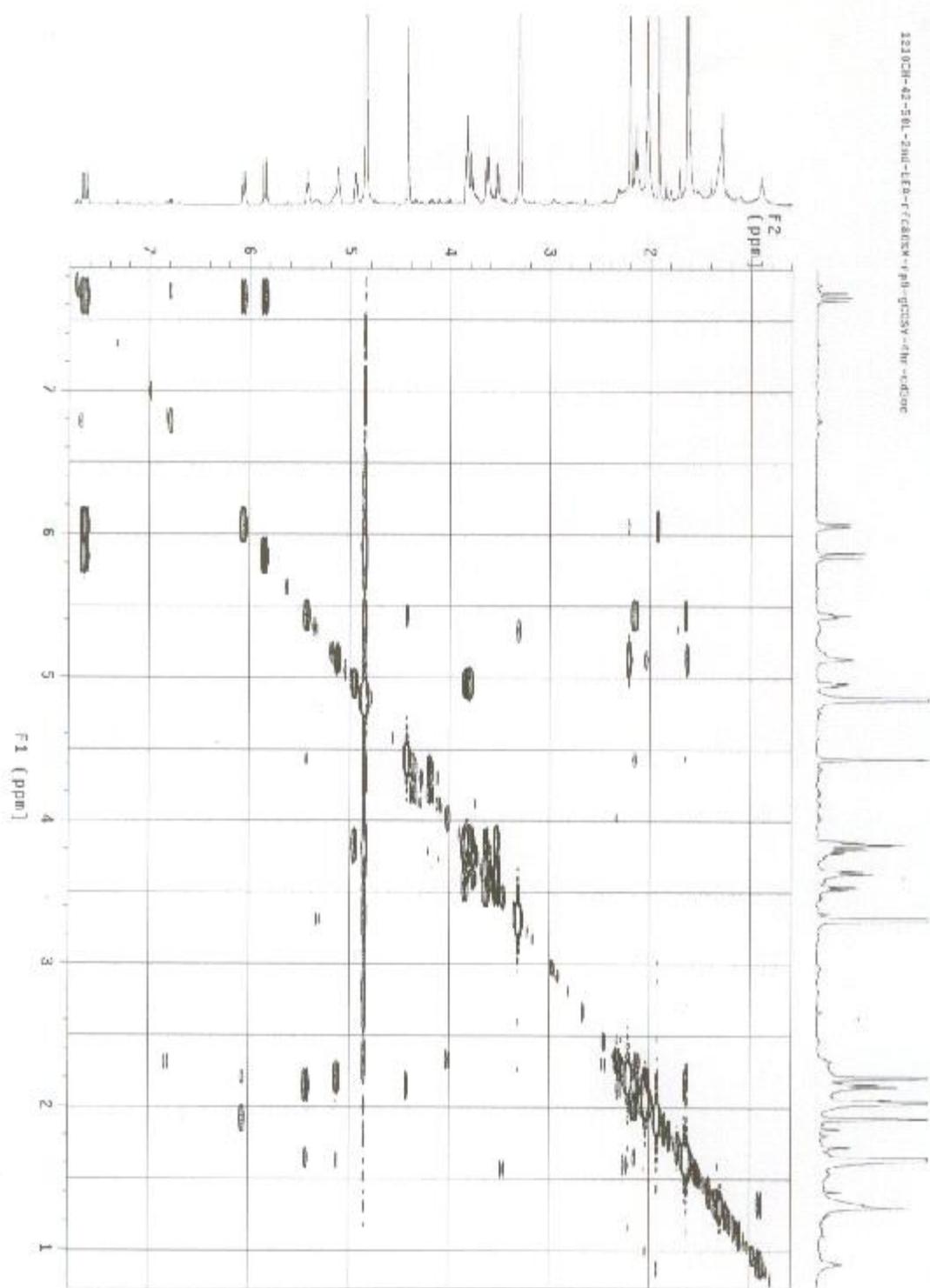


Fig. 3-89. COSY spectrum of D4.

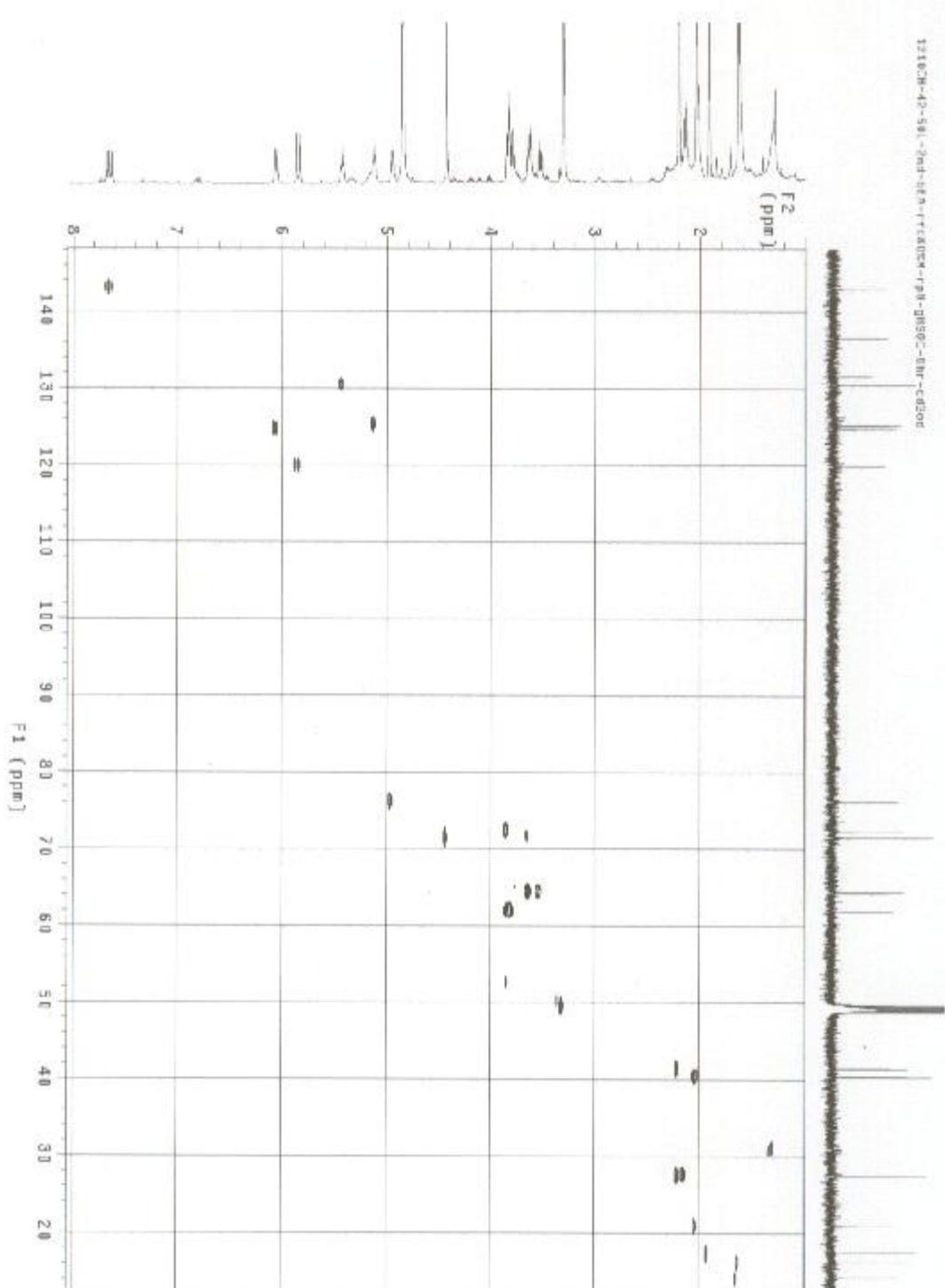


Fig. 3-90. HSQC spectrum of D4.

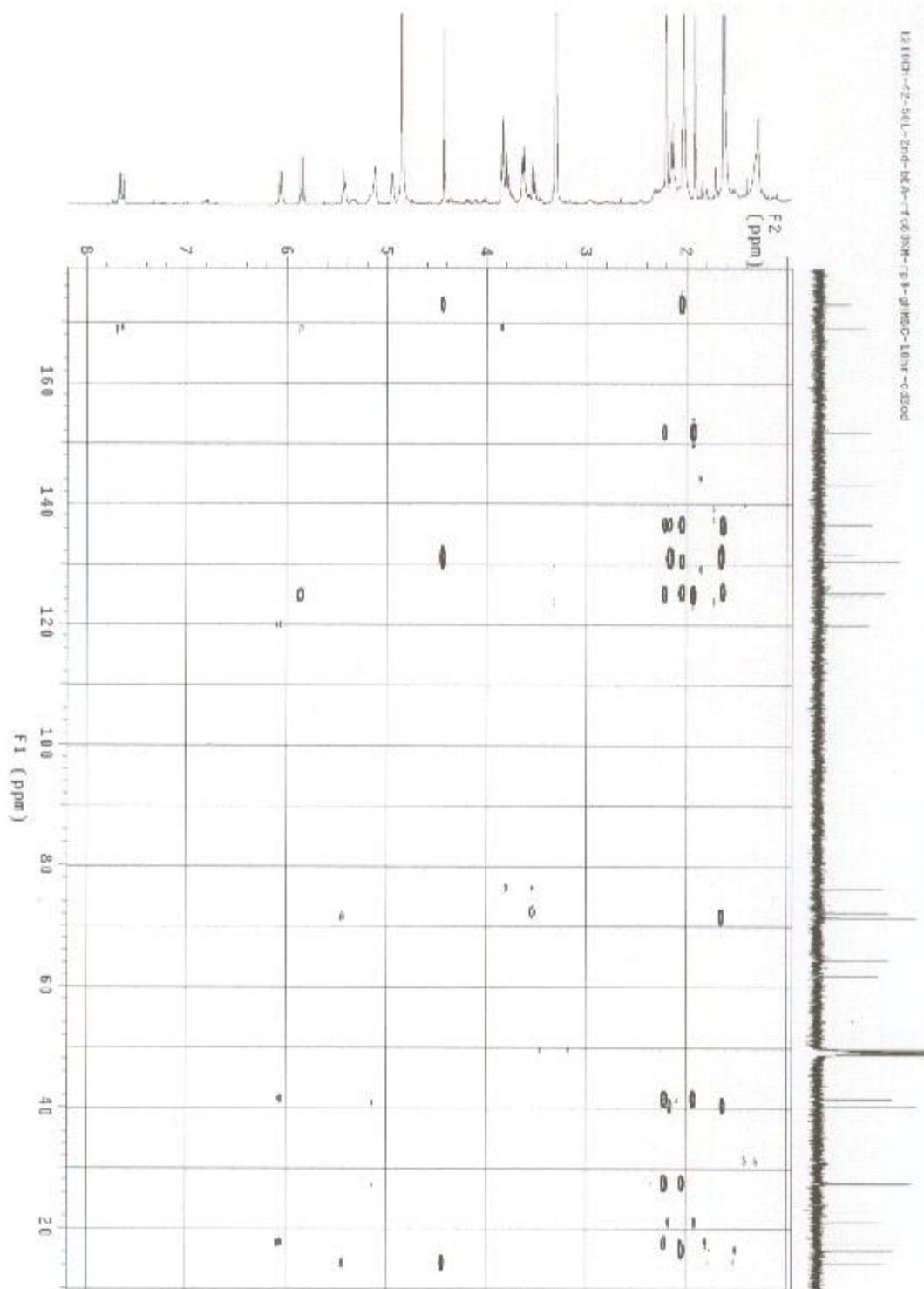


Fig. 3-91. HMBC spectrum of D4.

### Elemental Composition Report

#### Single Mass Analysis

Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

79 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 3 closest results for each mass)								
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf(%)	Formula
447.2359	447.2359	0.0	0.0	5.5	940.7	n/a	n/a	C23H36 O7 Na

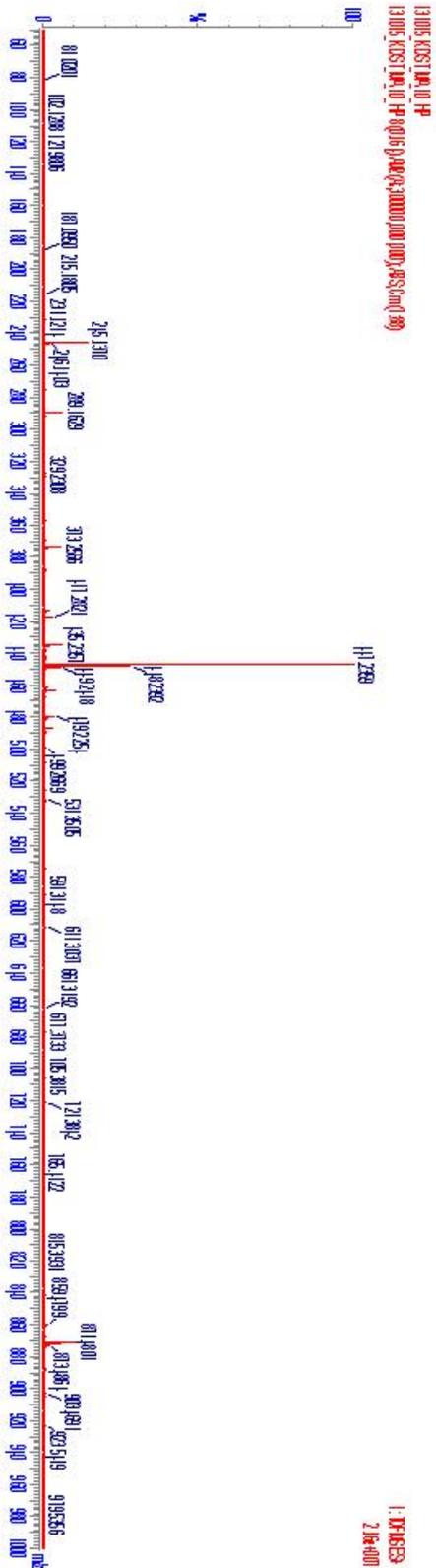


Fig. 3-92. HR-ESI mass spectrum of D4.

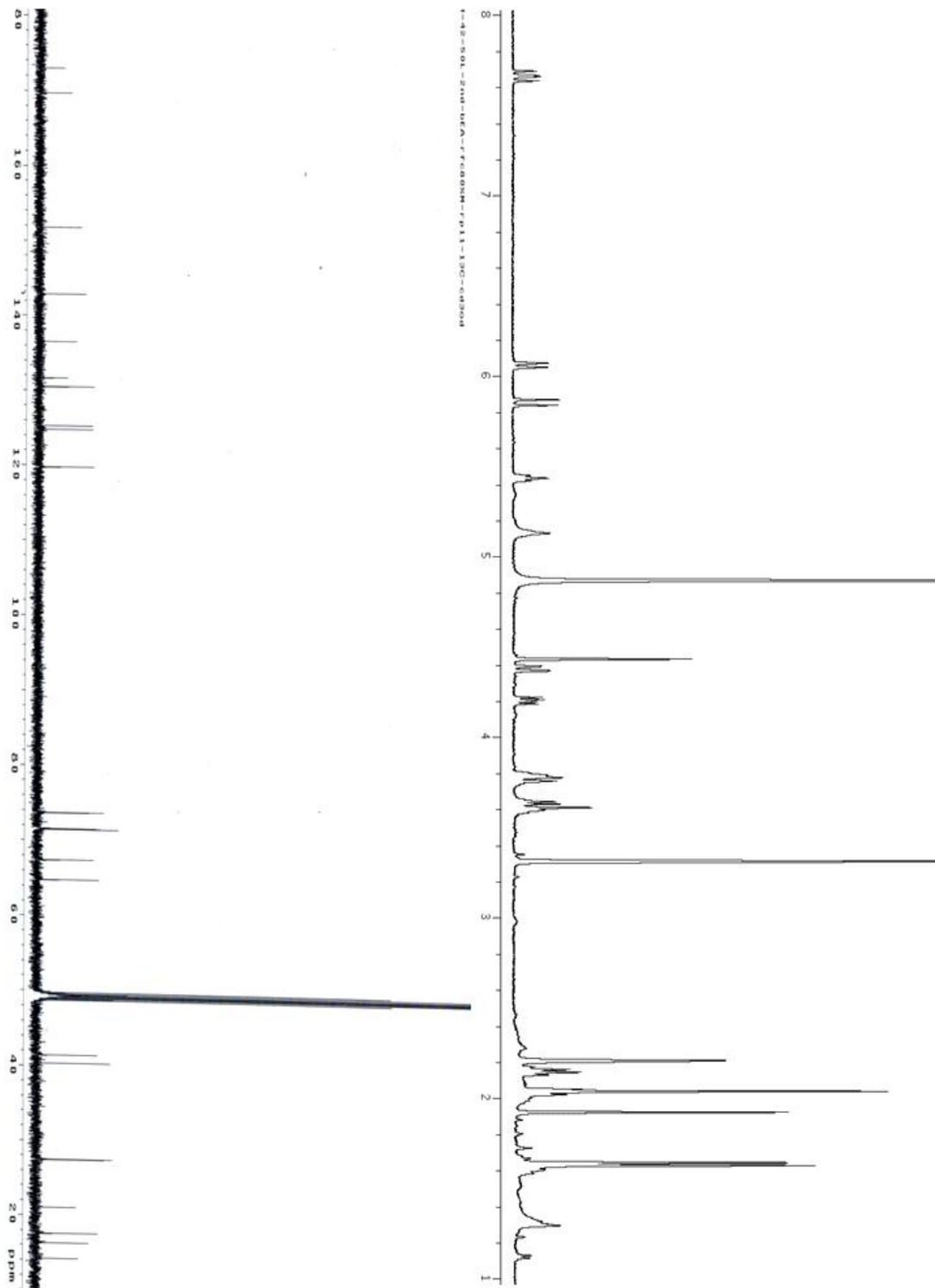


Fig. 3-93. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra of D5 in CD<sub>3</sub>OD.

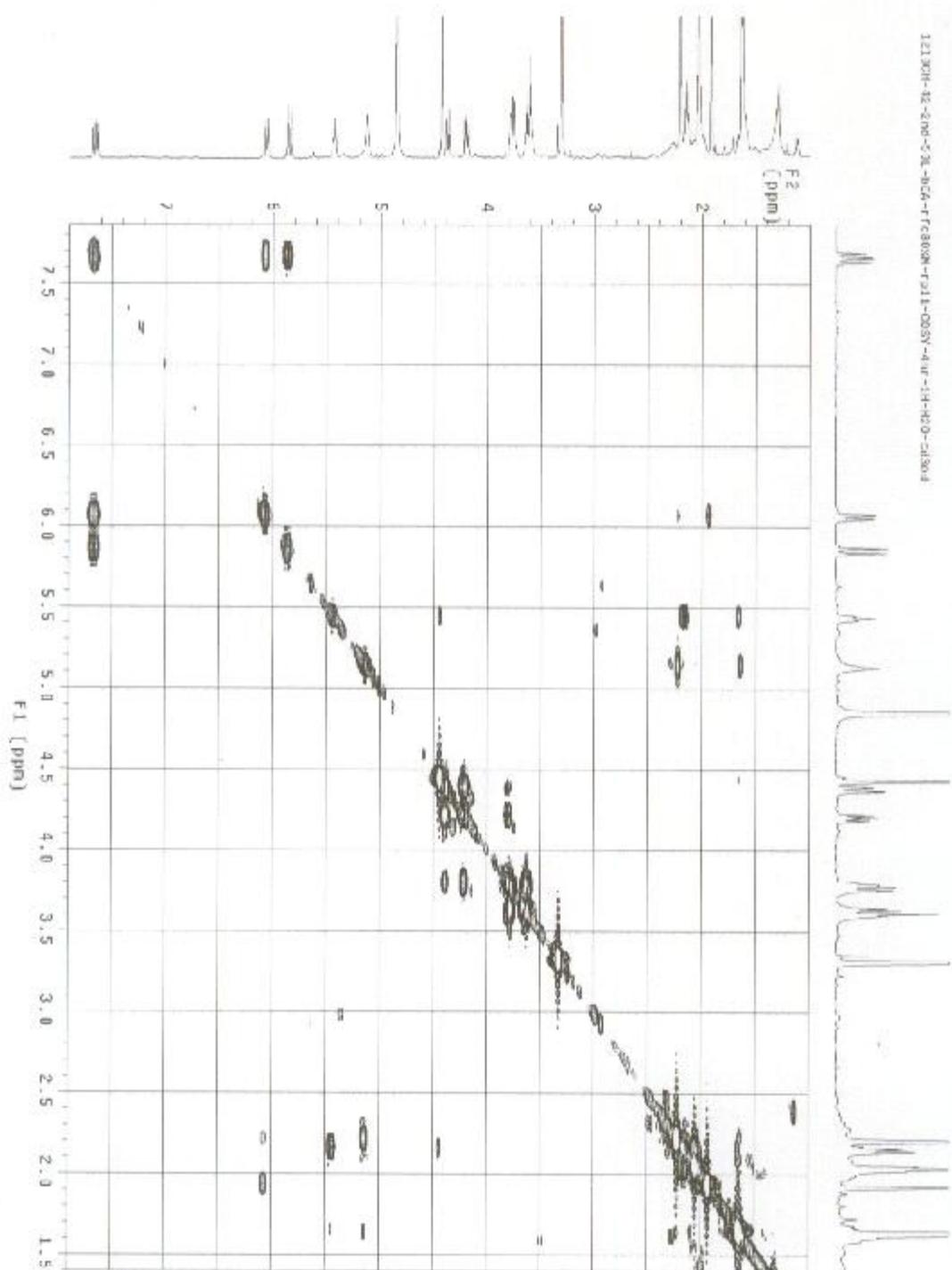


Fig. 3-94. COSY spectrum of D5.

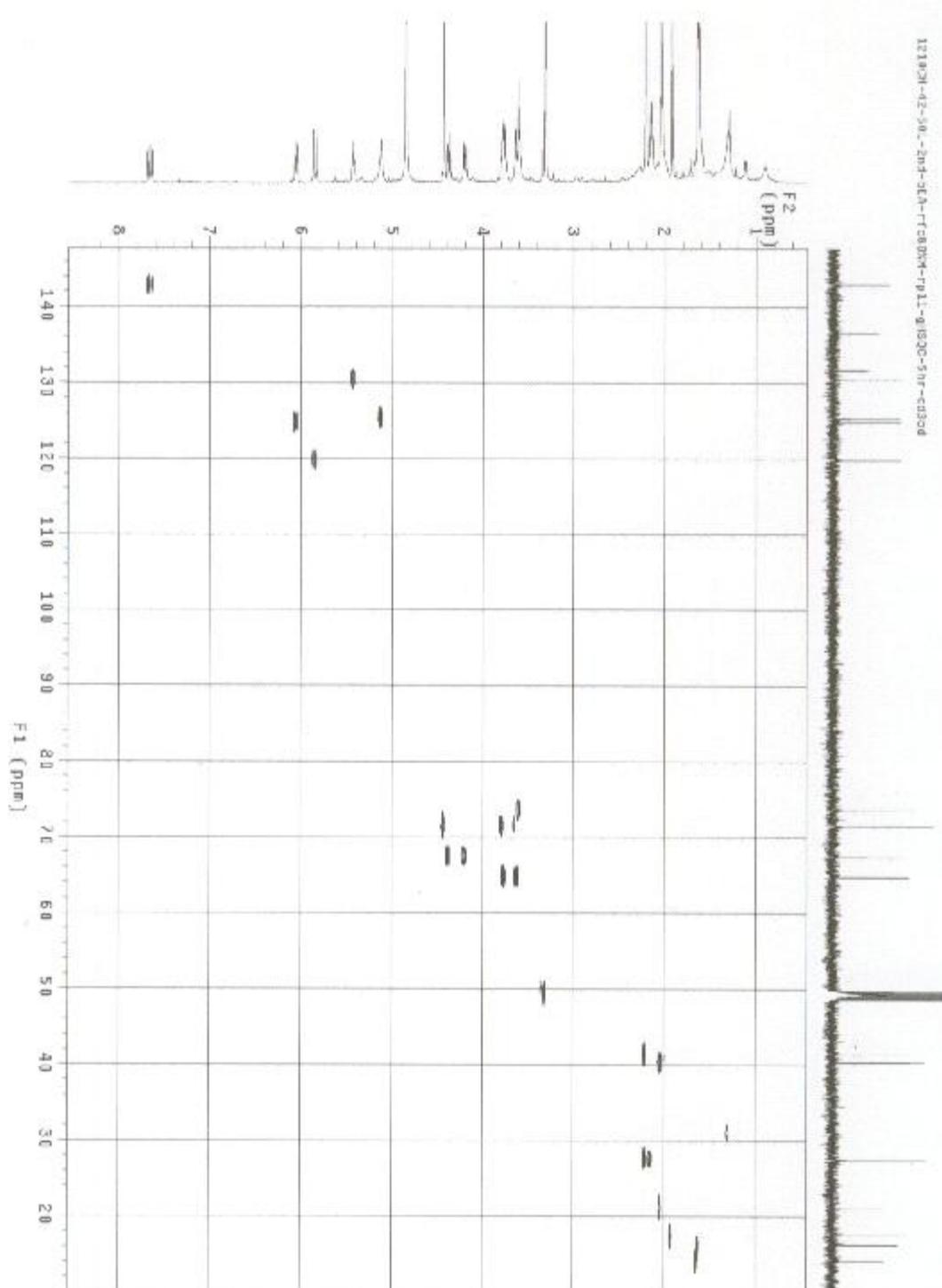


Fig. 3-95. HSQC spectrum of D5.

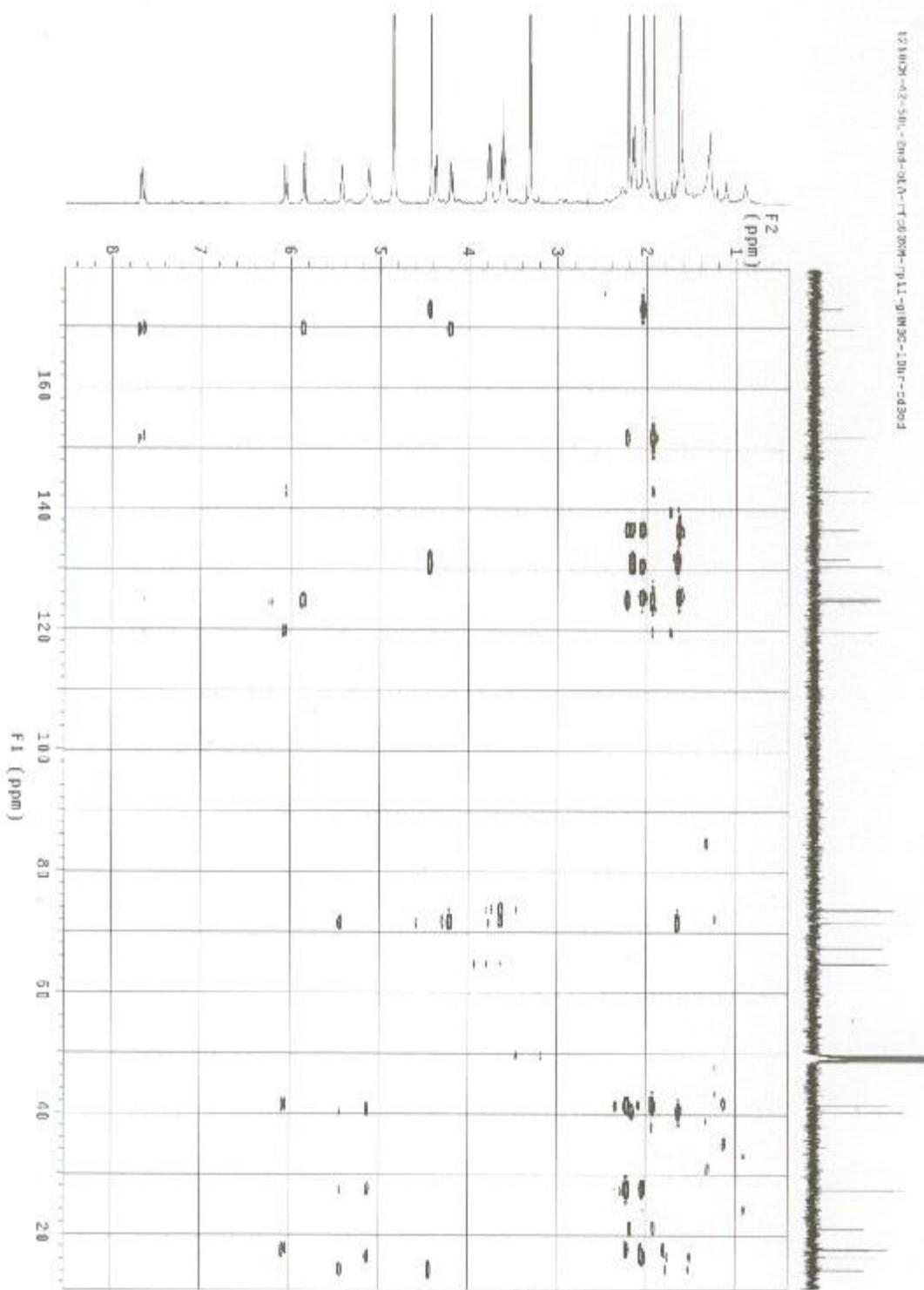


Fig. 3-96. HMBC spectrum of D5.

### Elemental Composition Report

#### Single Mass Analysis

Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

79 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 3 closest results for each mass)

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf(%)	Formula
447.2362	447.2359	0.3	0.7	5.5	913.0	n/a	n/a	C23H36O7Na

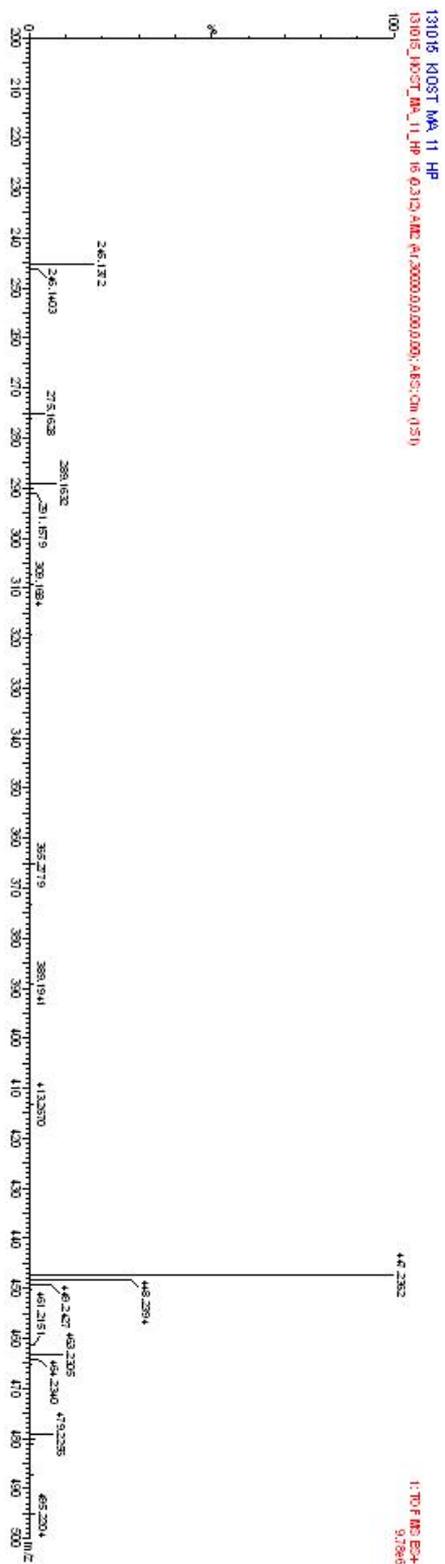


Fig. 3-97. HR-ESI mass spectrum of D5.

E type의 steroid계열 신물질들은 40 mg의 80%MeOH 분획으로부터 분리되었다. C18 역상 HPLC(C18 reversed-phase HPLC, Column: YMC-ODS-A, 5  $\mu$ m, 10 $\times$ 250 mm, 용출 용매: 67%MeOH, 용출 속도: 1.5 mL/min, RI detector)로부터 **E1**(0.6 mg)와 **E2**(2.1 mg)을 분리하였다(Fig. 3-41). 분리된 신물질 **E1**의 C-8( $\delta$  130.1)/C-9( $\delta$  135.6), **E2**의 C-8( $\delta$  129.0)/C-9( $\delta$  137.2)와 HMBC spectrum를 통해 이중결합의 위치를 결정하였으며, 일반적인 steroid계 물질들과 구조적 차이를 가지는 것을 확인하였다. 그리고  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum(Fig. 3-99, 101)에서 C-3에서 **E1**은  $\delta$  214.5의 ketone carbon, **E2**는  $\delta$  67.2의 hydroxy carbon을 가지는 것으로 확인하였고, MS data(Fig. 100, 102)를 통해 구조를 규명하였으며, 측정된  $[\alpha]_D$ 와  $^1\text{H}$  NMR spectrum(Fig. 3-99, 101)와 문헌 값을 비교하여 입체구조를 확인하였다(Fig. 3-98).

**E1**:  $[\alpha]_D +97.3$ (*c* 0.1, MeOH),  $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) 13.2, 17.2, 24.1, 24.3, 25.3, 26.7, 28.4, 31.7, 37.2, 37.3, 38.0, 39.1, 44.4, 45.0, 53.2, 63.5, 130.1, 135.6, 212.4, 214.6, LRAPCIMS  $m/z$  312.83  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 314.94  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**E2**:  $[\alpha]_D +63.3$ (*c* 0.1, MeOH),  $^1\text{H}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) 0.57(s,  $\text{CH}_3$ ), 0.94(s,  $\text{CH}_3$ ), 1.32-1.46(m,  $\text{CH}_2$ ), 1.42-1.73(m,  $\text{CH}_2$ ), 1.48-1.54(m,  $\text{CH}_2$ ), 1.53(m,  $\text{CH}_2$ ), 1.68(m,  $\text{CH}_2$ ), 1.71-2.06(m,  $\text{CH}_2$ ), 1.72-2.21(m,  $\text{CH}_2$ ), 1.86(m, CH), 2.02(m,  $\text{CH}_2$ ), 2.12-2.28(m,  $\text{CH}_2$ ), 2.13(s,  $\text{CH}_3$ ), 2.30(m, CH), 2.70(t, CH), 3.97(t,  $\text{CH}_2$ ),  $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) 13.2, 17.3, 23.6, 24.2, 25.3, 26.6, 28.4, 30.0, 31.7, 32.0, 36.4, 37.1, 37.3, 37.6, 45.1, 53.4, 63.5, 67.2, 128.9, 137.2, 212.5, LRAPCIMS  $m/z$  316.92  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 633.30  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ .

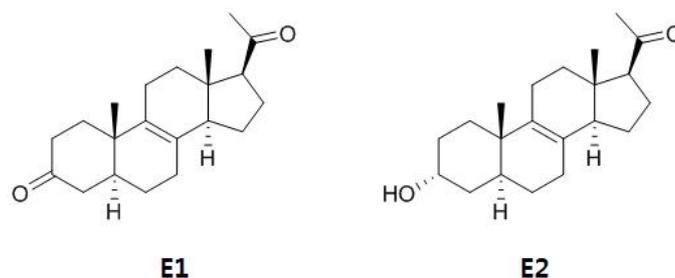
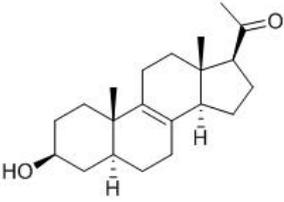
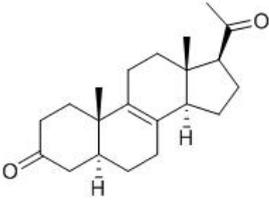
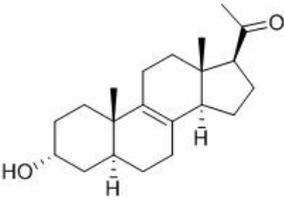


Fig. 3-98. The structures of **E1** and **E2** isolated from the strain 1210CH-42.

Table 3–13. Comparison of physicochemical properties between the known compound 30129A and the steroids **E1** and **E2** isolated from the strain 1210CH–42

		
<i>Streptomyces</i> sp. <sup>1)</sup>	Novel fungus 1210CH-42	
<b>03129A</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>
$\Delta^{8,9}$ -pregnene	Novel	Novel
$C_{21}H_{32}O_2$	$C_{21}H_{30}O_2$	$C_{21}H_{32}O_2$
$[M+H]^+$ 317.2464	$[M+H]^+$ 314.94	$[M+H]^+$ 316.98
White crystalline needles	Yellowish powder	White powder
$[\alpha]^{20}_D$ +108 ( $c=0.22$ , MeOH)	$[\alpha]^{27}_D$ +63.3 ( $c=0.1$ , MeOH)	$[\alpha]^{27}_D$ +97.3 ( $c=0.1$ , MeOH)

<sup>1)</sup> Yun Zhang, et al., (2013) *The Journal of Antibiotics* 66, 327-331.

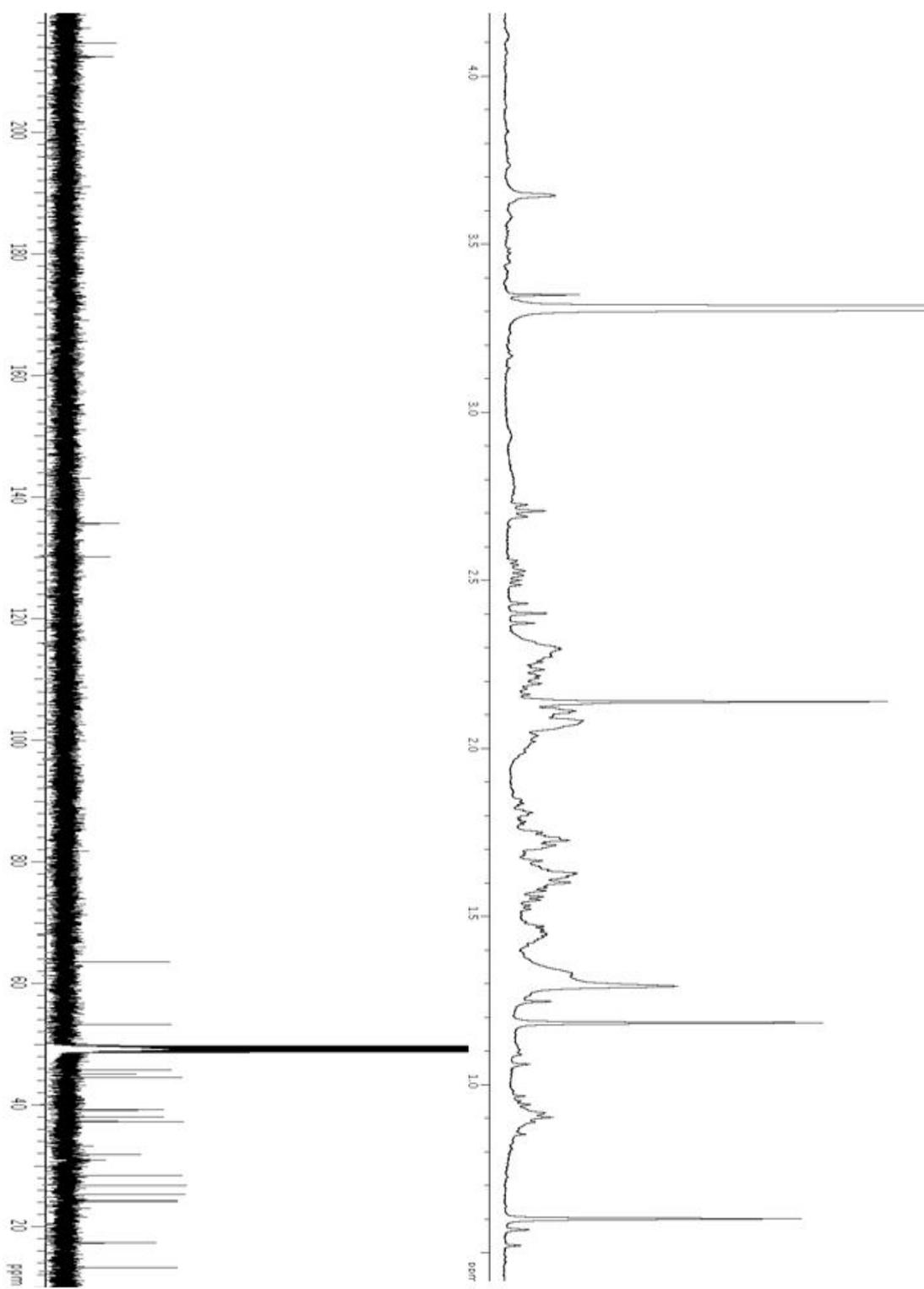
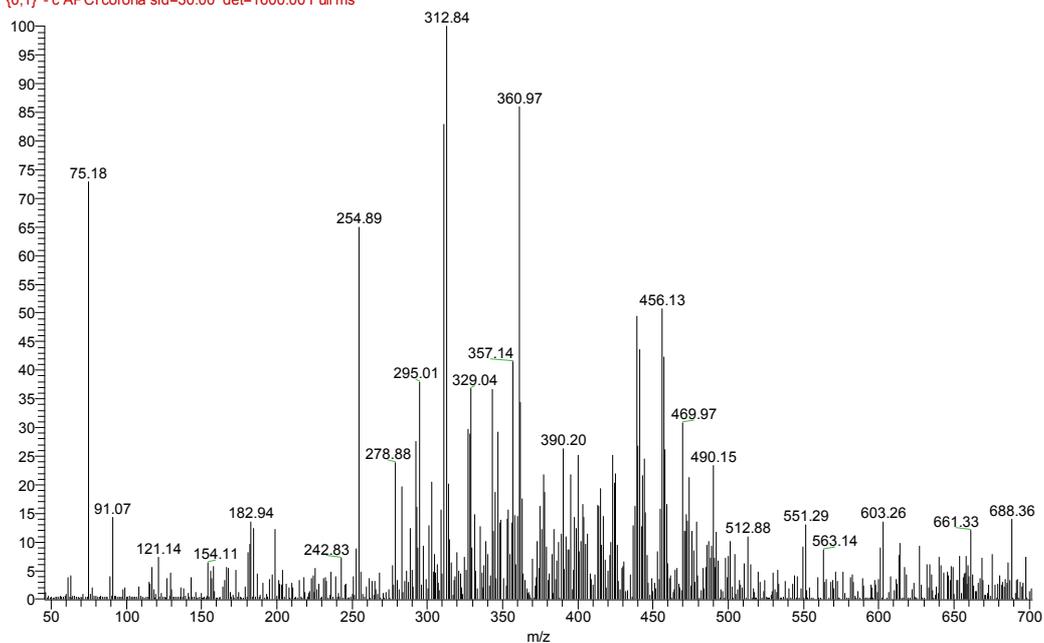


Fig. 3-99. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra of **E1** in CD<sub>3</sub>OD.

1210CH-42-50L-2nd-bEA-rc80%M-rp13 #37 RT: 0.46 AV: 1 NL: 4.93E5  
F: {0,1} -c APCI corona sid=30.00 det=1600.00 Full ms



1210CH-42-50L-2nd-bEA-rc80%M-rp13 #41 RT: 0.53 AV: 1 NL: 8.13E7  
F: {0,0} +c APCI corona sid=30.00 det=1600.00 Full ms

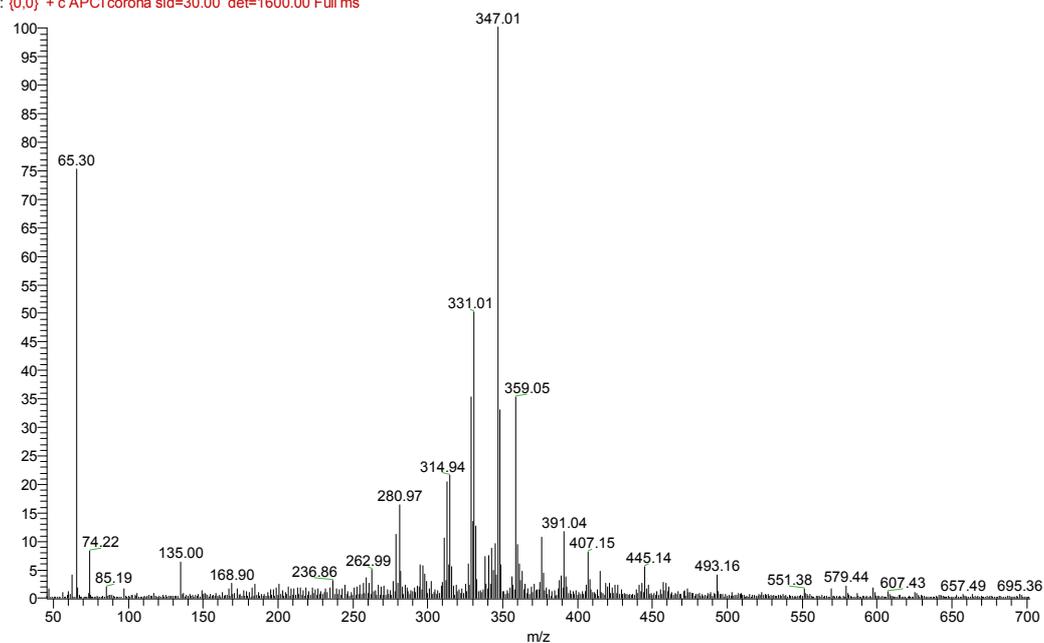


Fig. 3-100. LR-APCI mass spectrum of E1.

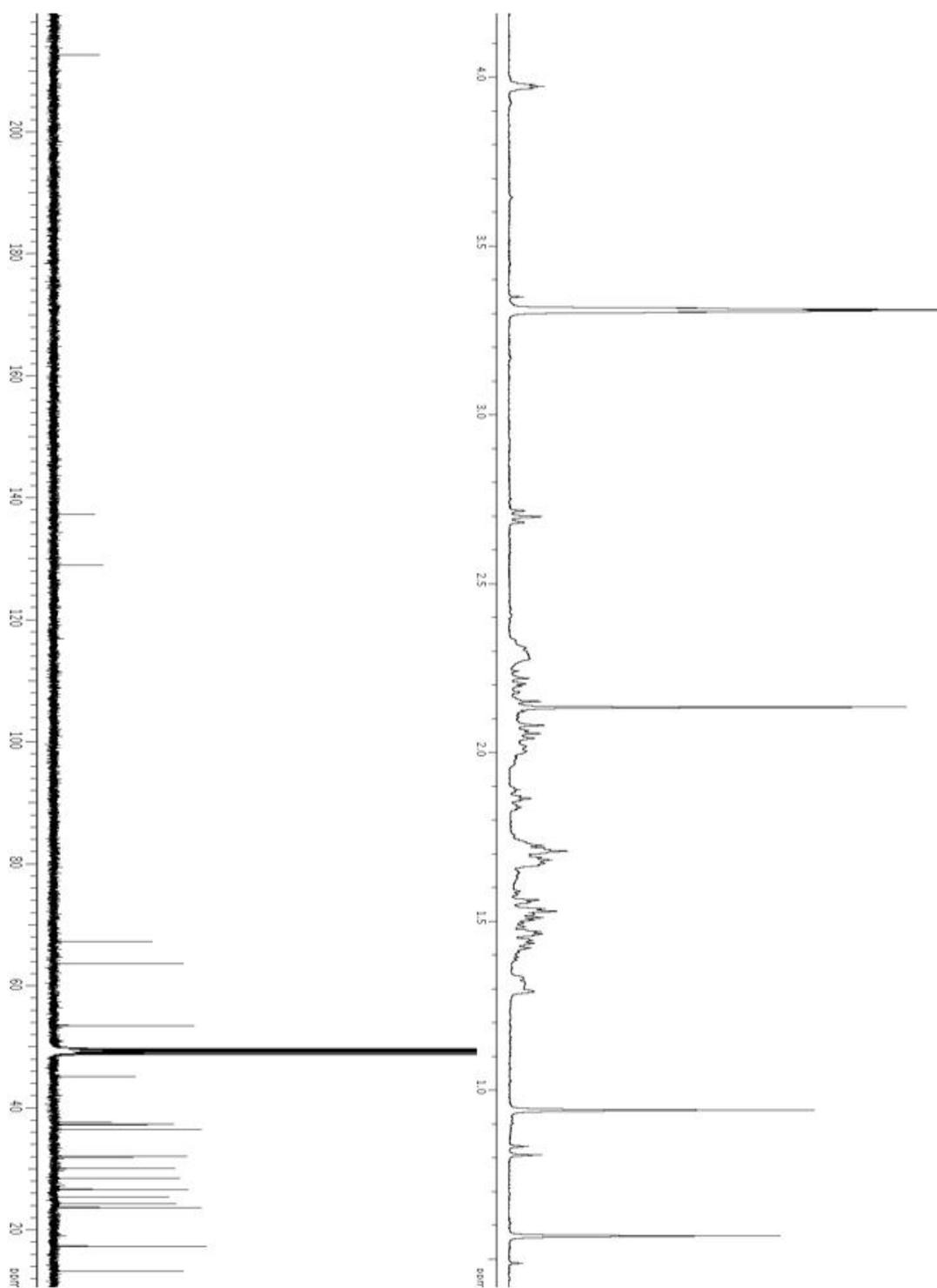


Fig. 3-101. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra of **E2** in CD<sub>3</sub>OD.

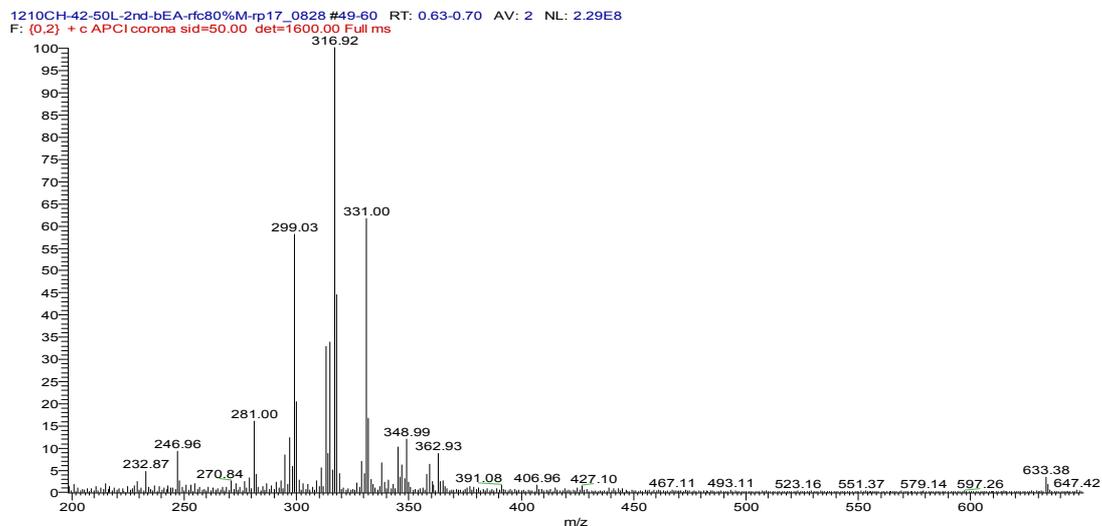


Fig. 3-102. LR-APCI mass spectrum of **E2**.

이 외에도 1210CH-42 균주 배양액으로부터 분리, 분석된 물질들 중에는 구조와 활성이 이미 보고된 활성 물질들도 분리 되었으며, 이들 중에는 천연물 또는 곰팡이로부터는 처음 분리된 활성 물질들도 다수 포함되어 있었다(Fig. 3-103). 다양한 신규 물질 및 활성 물질들을 생성하는 것으로 보아 신규 해양 곰팡이 1210CH-42는 정제된 단일 물질 뿐만 아니라 배양 추출물로도 항노화 기능성 물질로도 다양한 활용이 가능 할 것으로 기대된다.

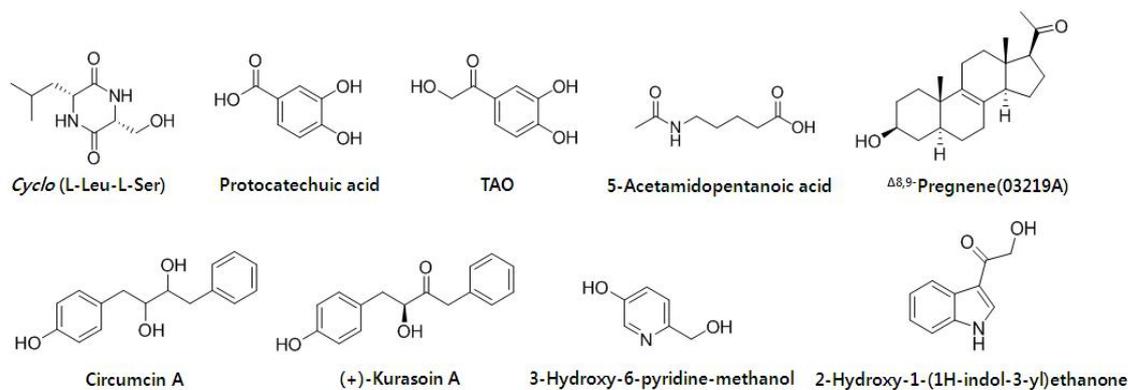


Fig. 3-103. Compounds isolated from the culture broth of the novel marine fungus 1210CH-42.

## 제 6 절 *Bacillus* sp. 102CH635-3로부터 항노화 물질 분리 및 구조결정

### 1. *Bacillus* sp. 102CH635-3 균주의 분리 및 동정

2010년 2월 마이크로네시아 축주 인근에서 채집된 해양 퇴적토로부터 해양 미생물을 분리하였다. 1 g의 해양 퇴적토를 60°C에서 20분간 열처리 한 후에 BN agar plate에 흩뿌리기 하였다. 28°C, 7일간 배양하면서 균을 관찰하였고, 주황색의 납작하게 퍼지며 자라는 102CH635-3 균주의 single colony를 얻었다(Fig. 3-104). 102CH635-3 균주는 40% glycerol에 보존하여 -70°C에 보관하였다.

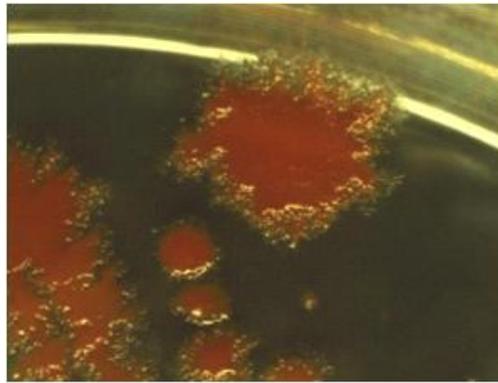


Fig. 3-104. *Bacillus* sp. 102CH635-3.

102CH635-3의 16S rRNA 염기서열 분석을 위해 16S rRNA proimer, 27F 5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG)3' 와 1492R 5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T)3' 를 사용하여 PCR에 의해 genomic DNA로부터 증폭하였다. 20 ng의 genomin DNA과 EF-Taq(SolGent, Korea) 반응용액 30  $\mu$ l을 혼합하여 35 cycle 반응 시켰다. PCR의 반응 조건은 95°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1분간 primer annealing, 72°C에서 1분 chain extention 시켰으며 35 cycle 후 최종적으로 72°C에서 10분간 chain을 extention 시켰다. 증폭된 DNA로부터 1,380 bp 이상의 염기 서열을 얻었고 ABI prism 3730XL DNA analyzer(Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용하여 분석하였다. 확보된 해양 미생물들의 염기서열 값은 NCBI에 등록된 균주들과 Blast search를 통하여 homology 유사성을 확인한 결과 *Bacillus subtilis* 99%, *Bacillus amyloliquefaciens* 99%로 나타나 102CH635-3 균주는 *Bacillus* sp. 로 동정되었다.

## 2. 배양 최적 조건 확립

*Bacillus* sp. 102CH635-3의 single colony를 BN broth, 50 mL에 접종하여 28°C, 7일간 배양한 후 에틸아세테이트로 추출하고 감압 하에 농축하여 조추출물을 얻었다. 조추출물에 대한 <sup>1</sup>H NMR data를 분석한 결과 흥미로운 물질을 생성하는 것이 확인되어 활성 물질분리를 위한 유용 균주로 선정하였다. 균주를 대량배양하기 앞서 활성 물질을 생성하는 최적 배양조건 확립을 위한 실험을 진행 하였다. Table 3-14와 같이 이 균주가 분리되었던 BN 배지와 일반적으로 *Bacillus* sp.를 배양하는 NB 배지 조건에 sea salt를 첨가하여 조성한 SWNB 배지를 사용하였다.

Table 3-14. Optimal medium conditions for the strain 102CH635-3

Components	BN	SWNB
	g/L	
D-glucose	10	—
Tryptone	2	—
Peptone	—	5
Yeast extract	1	—
Beef extract	1	3
Glucose	5	—
Temperature (°C)	28	28
Shaking speed (rpm)	140	140
Sea salt	32	32
pH	7.0	7.0
Culture duration (day)	7	7

배지 조성에 변화를 준 각각의 broth 200 mL에 102CH635-3 균주를 접종하고 28°C, 7일간 배양한 후 에틸아세테이트로 추출하고 감압 하에 농축하여 조추출물을 얻었다. 배지 조성 변화에 따른 배양액 조추출물의 <sup>1</sup>H NMR data를 분석한 결과 SWNB 배지를 사용하였을 때 유의한 물질의 생성에 효과적인 것을 확인 할 수 있었고, 이에 대량 배양을 위한 최적 배양조건으로 사용하였다(Fig. 3-105).

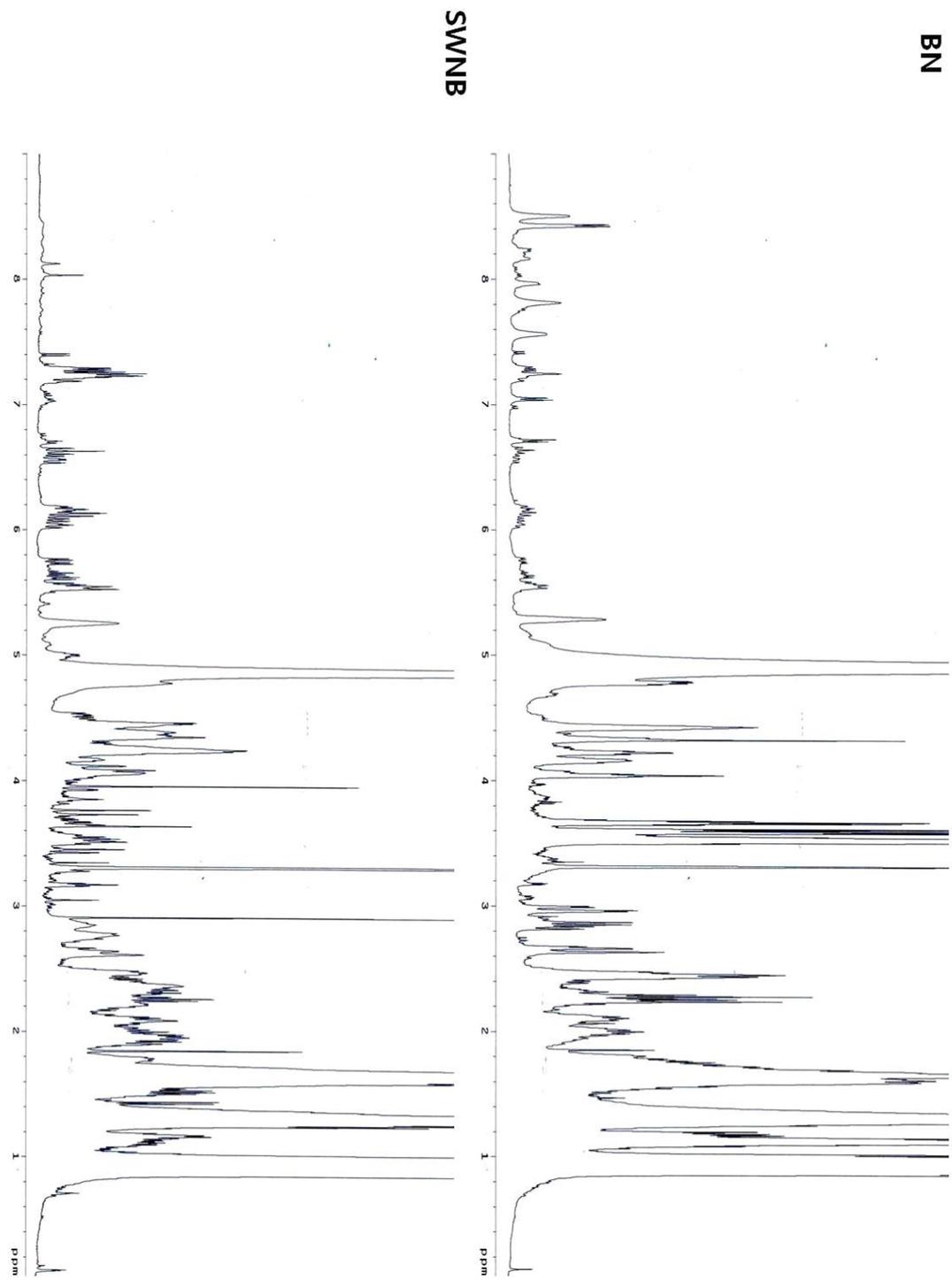


Fig. 3-105. <sup>1</sup>H-NMR data of the culture extracts by the medium composition change.

### 3. 대량 배양, 신물질 분리 및 구조결정

*Bacillus* sp. 102CH635-3 균주의 single colony를 접종하여 28℃에서 120 rpm으로 7일간 종균배양을 하였다. 이 종균은 대량배양을 위해 30 L SWNB 배지를 넣은 대용량 발효기에 접종하여 28℃에서 13일간 배양하였다. 이렇게 하여 얻어진 배양액 30 L를 연속원심분리기로 분리하여 배양여액은 동일한 양의 에틸아세테이트로 균사체는 메탄올로 각각 2회씩 추출하였다. 이 추출액은 감압 농축기를 통해 농축하여 조추출물을 얻고 -20℃에 보관하며 분리를 위한 시료로 사용하였다.

배양여액 에틸아세테이트 추출물을 역상 크로마토그래피로 분획하였다. 용리용매는 물과 메탄올을 혼합하여 20%메탄올에서 시작하여 100%메탄올까지 5 분획으로 분리하였다. 60%메탄올 분획물을 감압 하에 농축하여 건조시킨 후 분획물을 얻었다. 이 분획물은 C18 역상 HPLC(C18 reversed-phase HPLC, Column: YMC-ODS-A, 5  $\mu$ m, 10×250 mm, 용매: 45% MeOH, 용출 속도: 1.5 mL/min, RI detector)로 정제하여 2개의 단일 물질을 분리하였으며, 최종적으로 분리된 신규 물질의 수득량은 **rp26** 0.5 mg, **rp27** 1.9 mg이었다(Fig. 3-106).

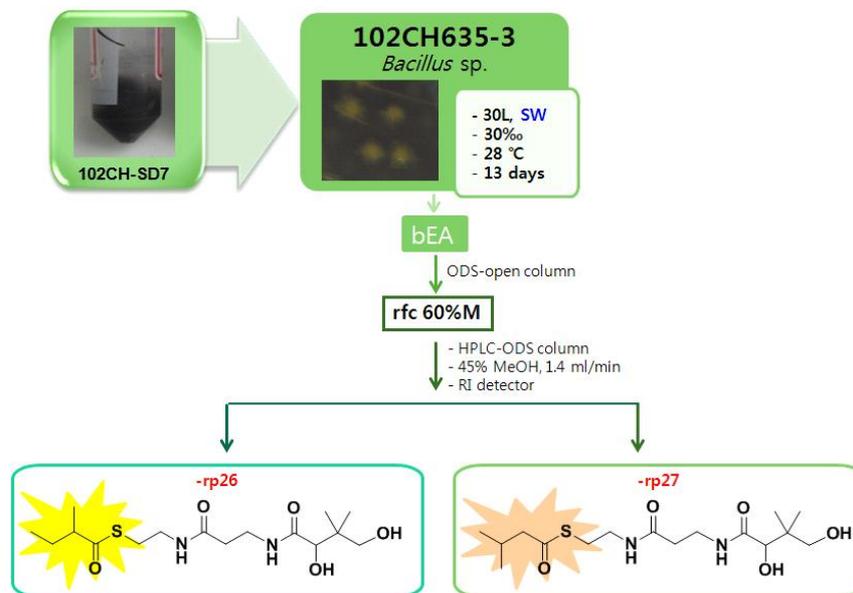


Fig. 3-106. Isolation scheme of the new pantetheine derivatives from the strain 102CH635-3.

1D, 2D NMR과 HRESIMS 등의 분광학적 data를 통해 구조를 규명한 결과 정제된 두 물질은 D-pantetheine계 신물질 인 것으로 확인되었다. **rp26**은  $^1\text{H}$  NMR spectrum(Fig. 3-108)를 통해 4개의 methyl기와 6개의 methylene을 가진 것으로 나타났다. 문헌치와 비교하여 D-pantetheine의 구조를 가진 것이 확인되었으며, 말단의 sulfur에 C-10( $\delta$  205.0)의 carbonyl carbon이 C-9( $\delta$  29.0), C-12( $\delta$  28.4)와 C-14( $\delta$  17.8)와 HMBC 연결을 나타내어 2-methylbutyl 작용기를 가진 신규 물질로

동정되었다. 4개의 methylene은 H-5/H-6과 H-8/H-9로 COSY(Fig. 3-109)연결이 확인되었고, HMBC spectrum(Fig. 3-111)를 통해 amide carbon인 C-4( $\delta$  176.2), C-7( $\delta$  174.0)과 연결되어 부분구조가 연결되었다. 그리고 C-3의 stereocenter를 확인하기 위해 D-pantetheine의  $[\alpha]_D$  문헌의 수치와 분리된 신규 물질의  $[\alpha]_D$ 의 수치를 비교한 결과  $+12.2(c$  3.45,  $H_2O)$ 와  $+23.7(c$  0.5,  $H_2O)$ 로 측정되어 2-methylbutyryl-D-pantetheine로 결정되었다. 이 물질의 분자식은 HRESIMS(Fig. 3-112)  $m/z$  385.1778  $[M+Na]^+$ 로  $C_{16}H_{30}N_2O_5S$ 이다. 동일한 분자량을 가지는 **rp26**과 **rp27**은  $^1H$  NMR(Fig. 3-113),  $^{13}C$  NMR(Fig. 3-113)과 HMBC data(Fig. 3-116)를 분석한 결과 이 두 신물질은 동일한 구조를 가졌으나  $\delta$  0.95(d,  $J=5.0$ ) methyl기가 COSY(Fig. 3-114)와 HMBC 분석 결과 3-methylbutyl의 구조를 가진 것으로 확인되어 3-methylbutyryl-D-pantetheine로 결정되었다. 분자식은 HRESIMS(Fig. 3-117)  $m/z$  385.1779  $[M+Na]^+$ 로  $C_{16}H_{30}N_2O_5S$ 로 확인되었다(Fig. 3-107).

**rp26**:  $[\alpha]_D$   $+23.7(c$  0.5,  $H_2O)$ ,  $^1H$  NMR( $CD_3OD$ , 500 MHz) 0.92(s,  $CH_3$ ), 0.92(s,  $CH_3$ ), 0.92(t,  $CH_3$ ), 1.15(d,  $J=5.0$ ,  $CH_3$ ), 1.48–1.71(m,  $CH_2$ ), 2.41(t,  $CH_2$ ), 2.59(m, CH), 3.00(t,  $CH_2$ ), 3.32(t,  $CH_2$ ), 3.38–3.46(d,  $J=10.0$ ,  $CH_2$ ), 3.47(m,  $CH_2$ ), 3.89(s, CH),  $^{13}C$  NMR( $CD_3OD$ , 125 MHz) 12.1, 17.8, 21.1, 21.5, 28.4, 29.0, 36.5, 36.6, 40.3, 40.5, 51.5, 70.5, 77.4, 174.0, 176.2, 205.0, HRESIMS  $m/z$  385.1778  $[M+Na]^+$ (calcd for  $C_{16}H_{30}N_2O_5NaS$ , 385.1773).

**rp27**:  $[\alpha]_D$   $+7.7(c$  0.5,  $H_2O)$ ,  $^1H$  NMR( $CD_3OD$ , 500 MHz) 0.92(s,  $CH_3$ ), 0.92(s,  $CH_3$ ), 0.95(d,  $J=5.0$ ,  $CH_3$ ), 0.95(d,  $J=5.0$ ,  $CH_3$ ), 2.13(m, CH), 2.41(t,  $CH_2$ ), 2.46(d,  $J=5.0$ ,  $CH_2$ ), 3.00(t,  $CH_2$ ), 3.32(t,  $CH_2$ ), 3.38–3.46(d,  $J=10.0$ ,  $CH_2$ ), 3.47(m,  $CH_2$ ), 3.89(s, CH),  $^{13}C$  NMR( $CD_3OD$ , 125 MHz) 21.1, 21.5, 22.7, 22.7, 27.8, 29.3, 36.5, 36.6, 40.3, 40.5, 53.8, 70.5, 77.4, 174.0, 176.2, 200.2, HRESIMS  $m/z$  385.1779  $[M+Na]^+$ (calcd for  $C_{16}H_{30}N_2O_5NaS$ , 385.1773).

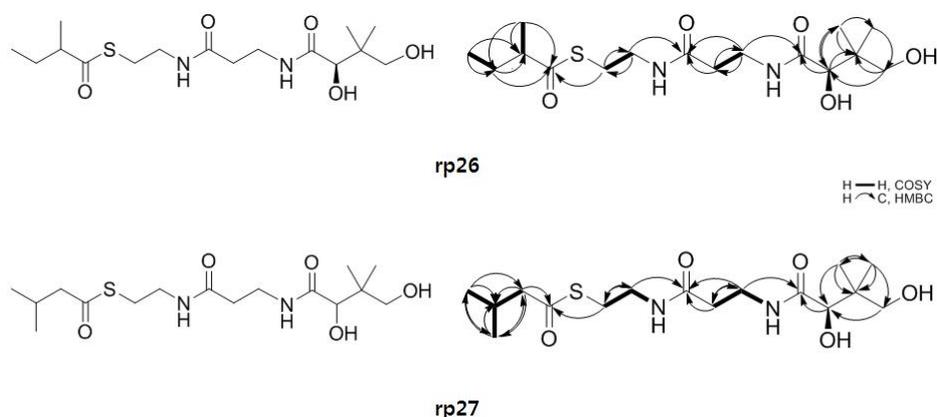


Fig. 3-107. Key  $^1H$ - $^1H$  COSY and HMBC correlations for the new pantetheine derivatives from the strain 102CH635-3.

Table 3–15. NMR data for **rp26** and **rp27** in CD<sub>3</sub>OD

No	rp26			rp27		
	$\delta_C$	$\delta_H$ , mult.( $J$ in Hz)	HMBC	$\delta_C$	$\delta_H$ , mult.( $J$ in Hz)	HMBC
1	70.5	3.38, 3.46 d( $J=10.0$ )	C2,C3	70.5	3.38, 3.46 d( $J=10.0$ )	C3
2	40.5			40.5		
3	77.4	3.89, s	C2,C4,C15	77.4	3.89, s	C4
4	176.2			176.2		
5	36.5	3.47, m	C4,C6,C7	36.5	3.47, m	C4,C6,C7
6	36.6	2.41, t	C5,C7	36.6	2.41, t	C5,C7
7	174.0			174.0		
8	40.3	3.32, t	C7,C8	40.3	3.32, t	C7,C9
9	29.0	3.00, t	C8,C10	29.3	3.00, t	C8,C10
10	205.0			200.2		
11	51.5	2.59, m	C12	53.8	2.46, d( $J=5.0$ )	C10,C12, C14
12	28.4	1.48, 1.71, m	C10,C11	27.8	2.13, m	
13	12.1	0.92, t	C11,C12	22.7	0.95, d( $J=5.0$ )	C11,C12, C14
14	17.8	1.15, d( $J=5.0$ )	C10,C11, C12	22.7	0.95, d( $J=5.0$ )	C11,C12, C13
15	21.1	0.92, s	C2,C3, C16	21.1	0.92, s	C2,C3, C16
16	21.5	0.92, s	C1,C15	21.5	0.92, s	C1,C2, C15

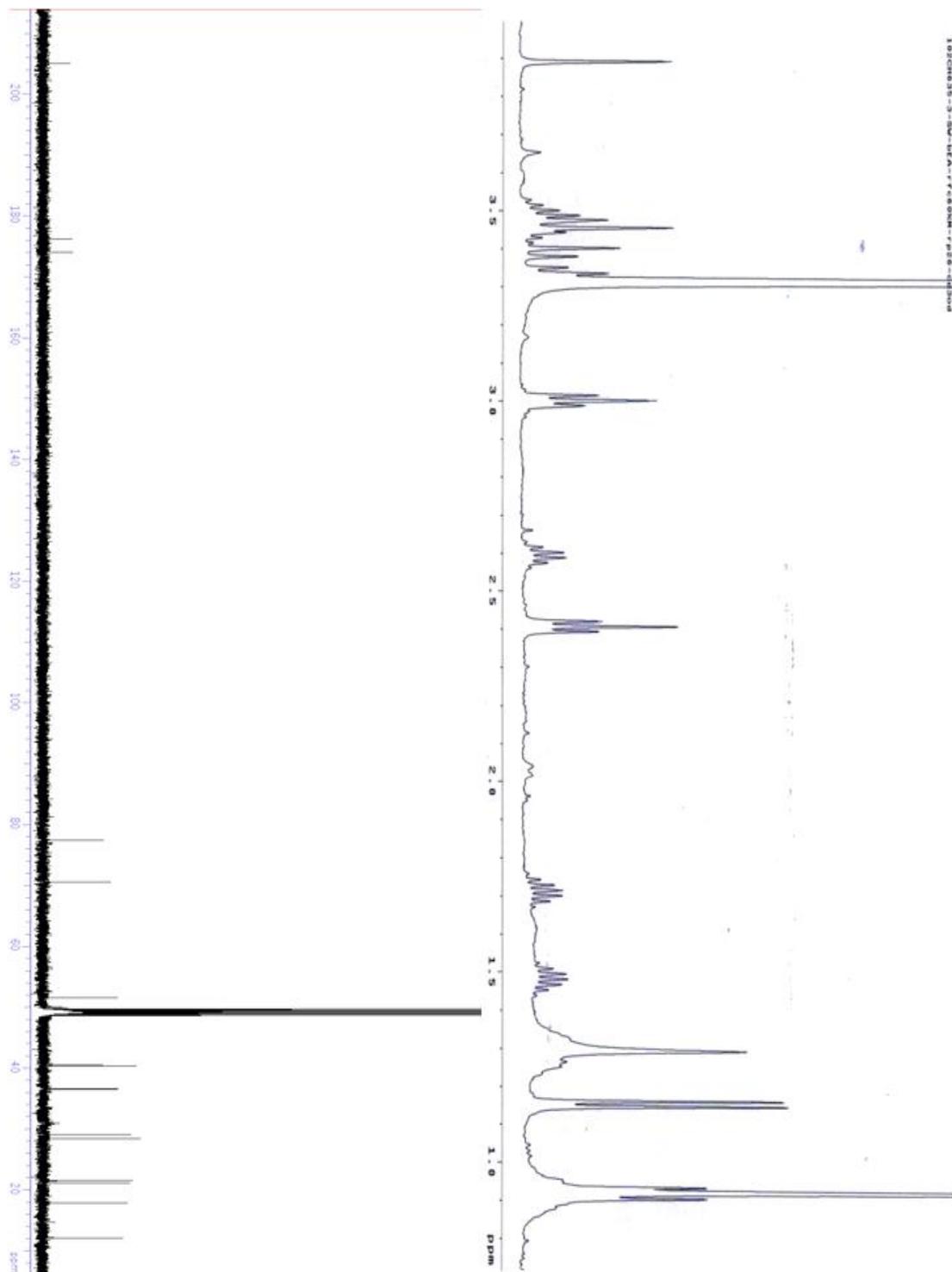


Fig. 3-108.  $^1H$  NMR and  $^{13}C$  NMR spectra of **rp26** in  $CD_3OD$ .

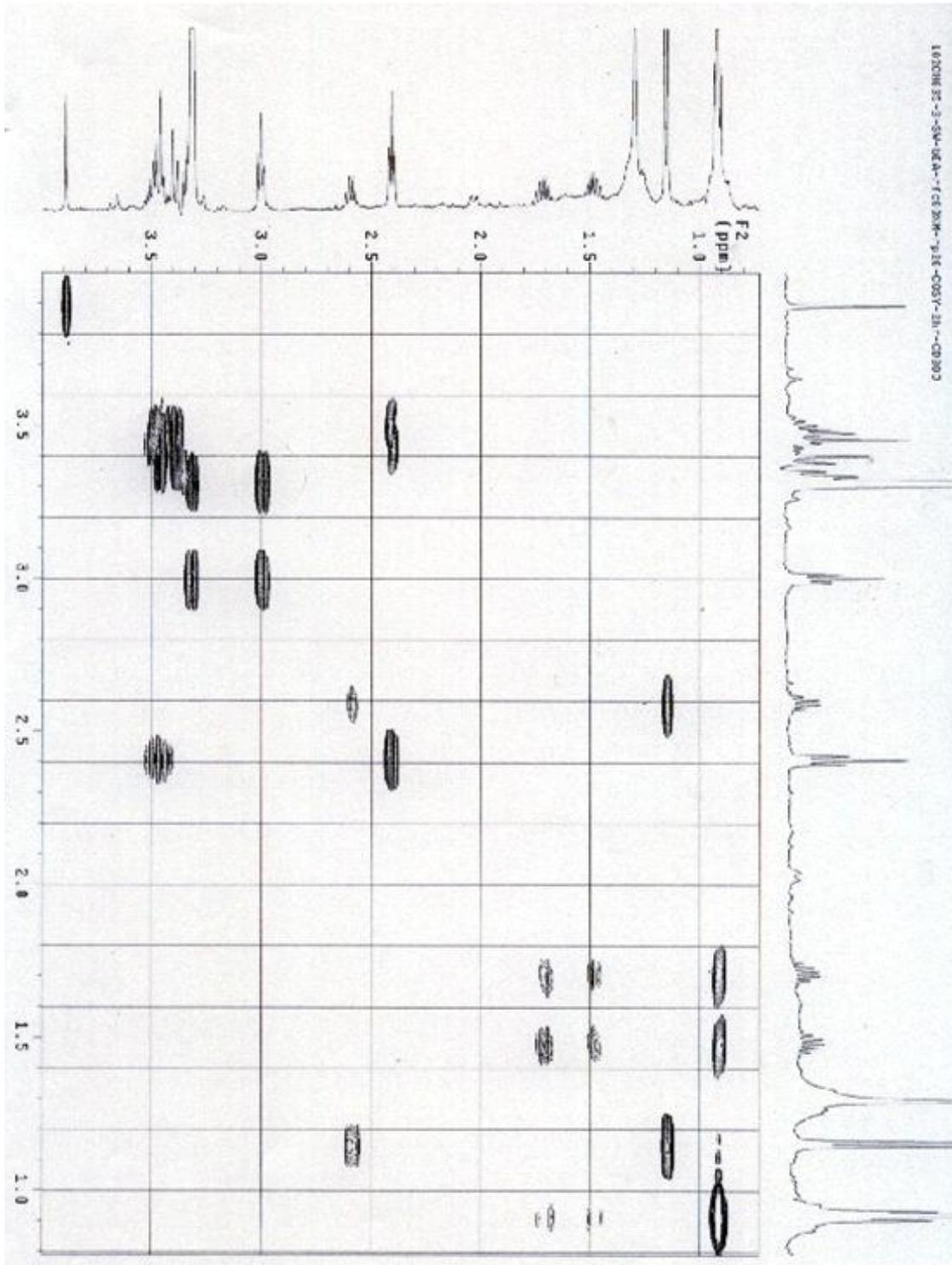


Fig. 3-109. COSY spectrum of **rp26**.

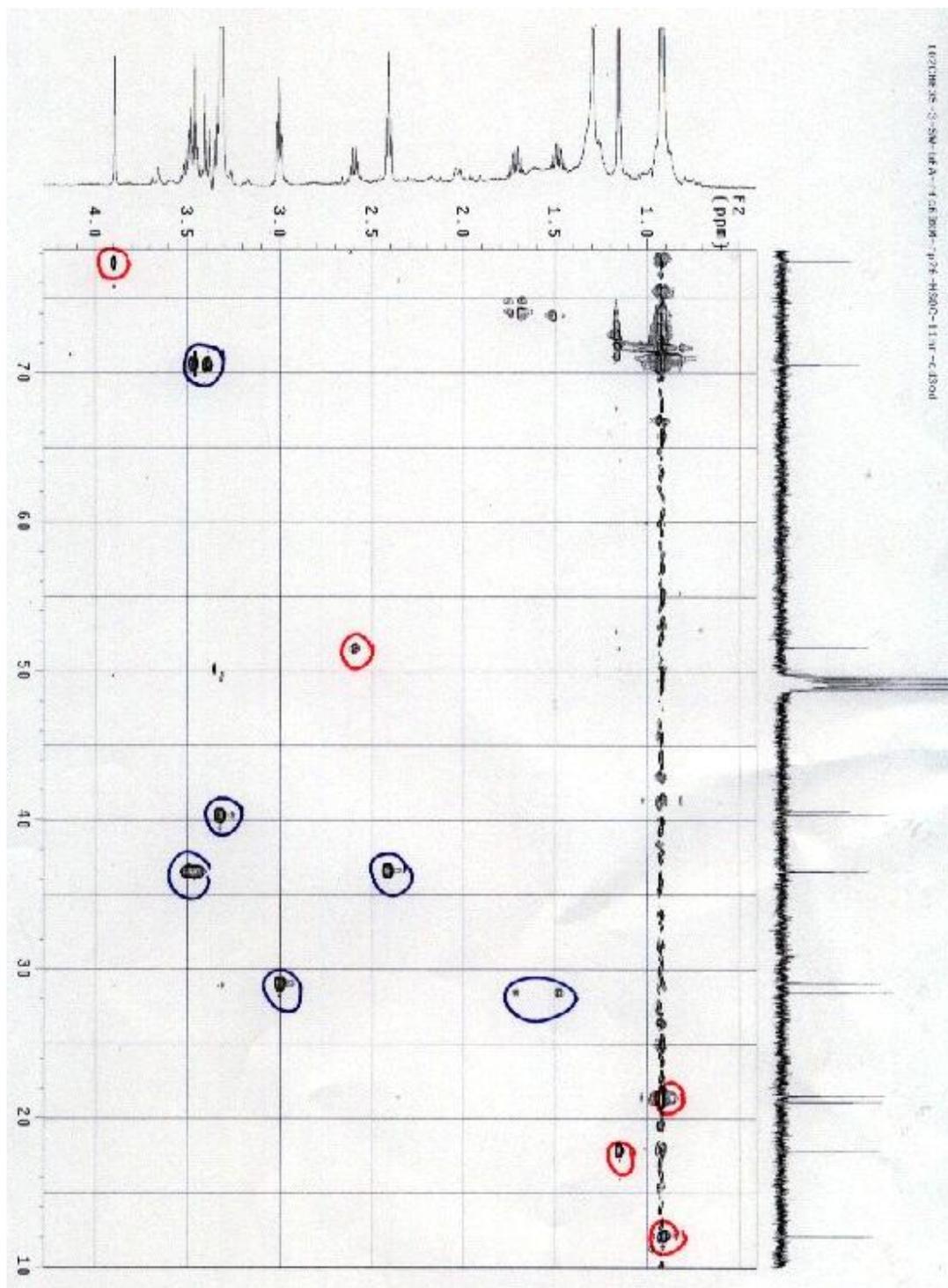


Fig. 3-110. HSQC spectrum of rp26.

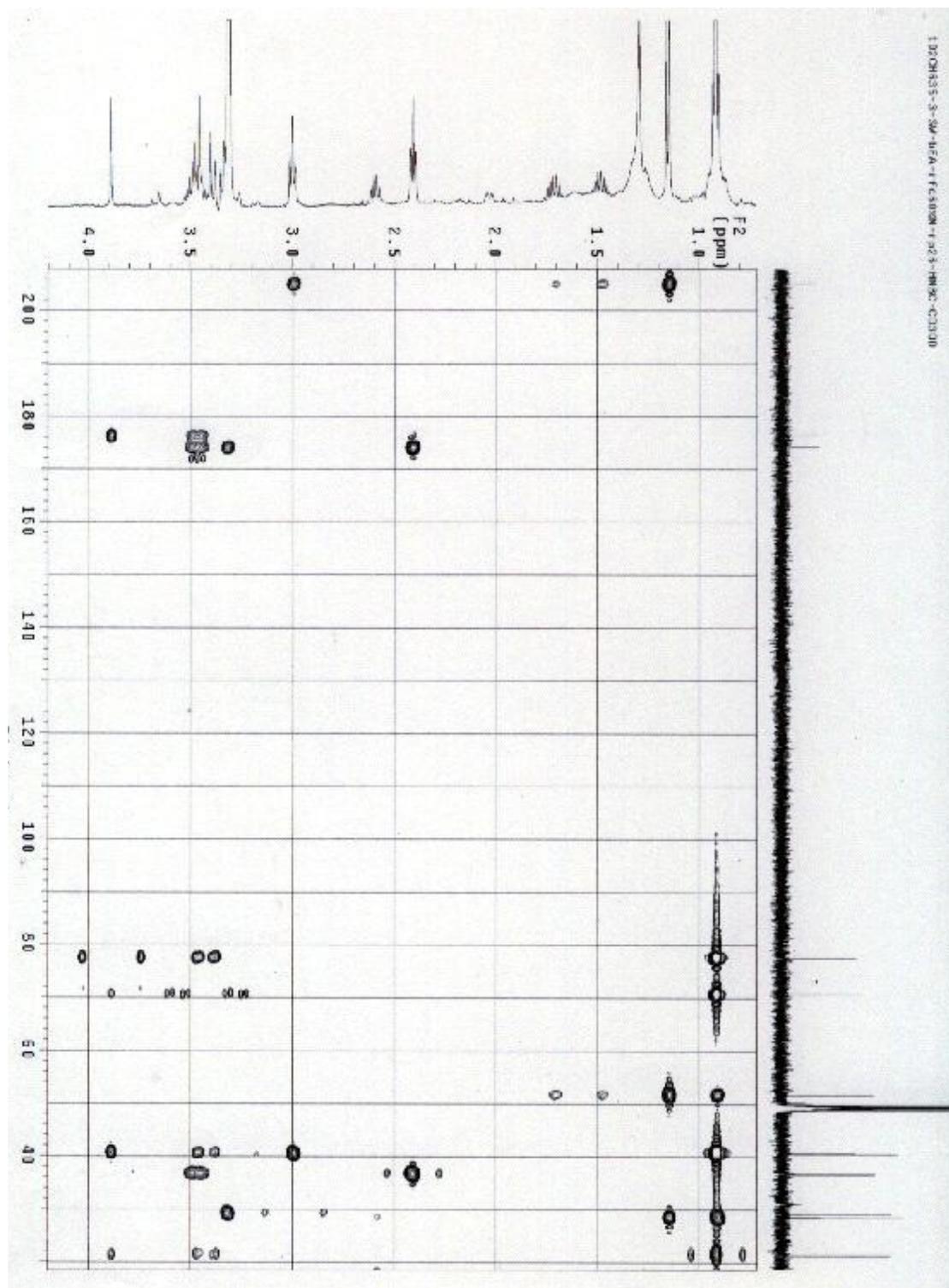


Fig. 3-111. HMBC spectrum of rp26.

Elemental Composition Report

Single Mass Analysis  
Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0  
Element prediction: Off  
Number of isotope peaks used for I-FIT = 3  
Monoisotopic Mass, Even Electron Ions  
2282 formulake(s) evaluated with 13 results within limits (up to 2 closest results for each mass)

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	I-FIT	Norm	Conf(%)	Formula
385.1778	385.1773	0.5	1.3	1.3	2.5	534.3	0.000	100.00
								C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> Na <sub>5</sub> S

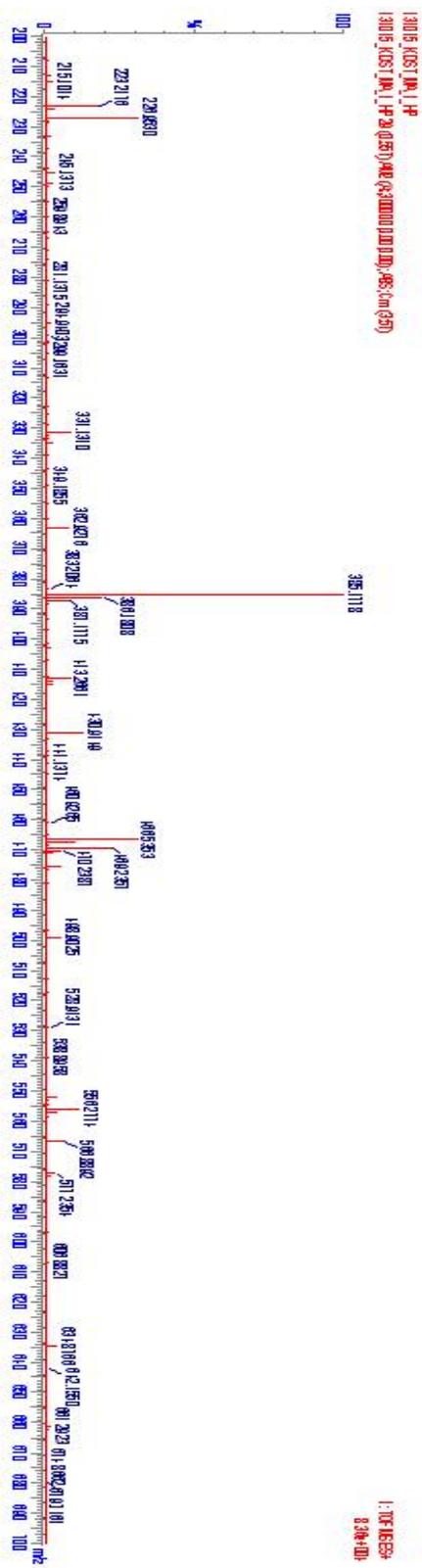


Fig. 3-112. HR-ESI mass spectrum of **rp26**.

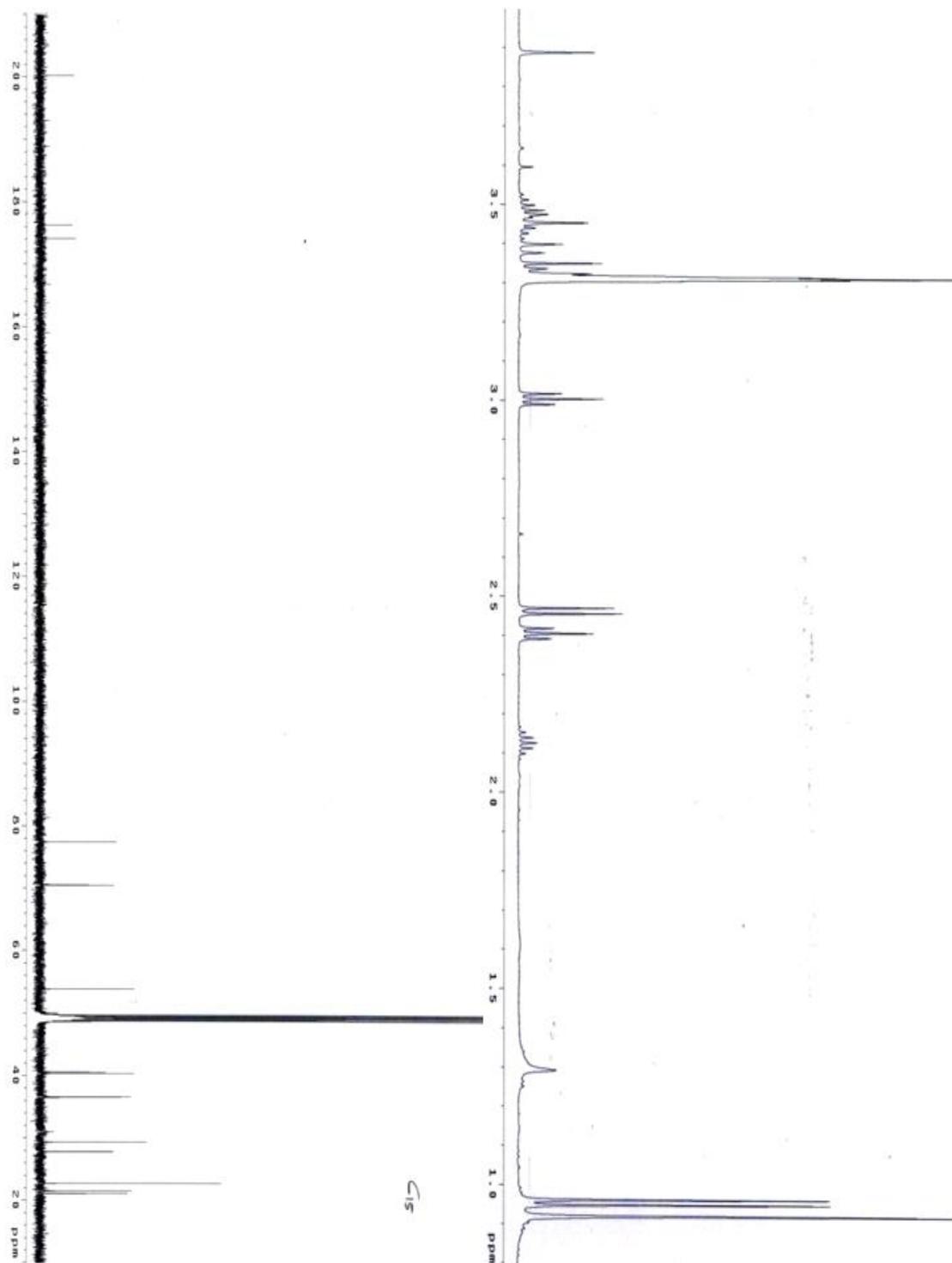


Fig. 3-113.  $^1H$  NMR and  $^{13}C$  NMR spectra of **rp27** in  $CD_3OD$ .

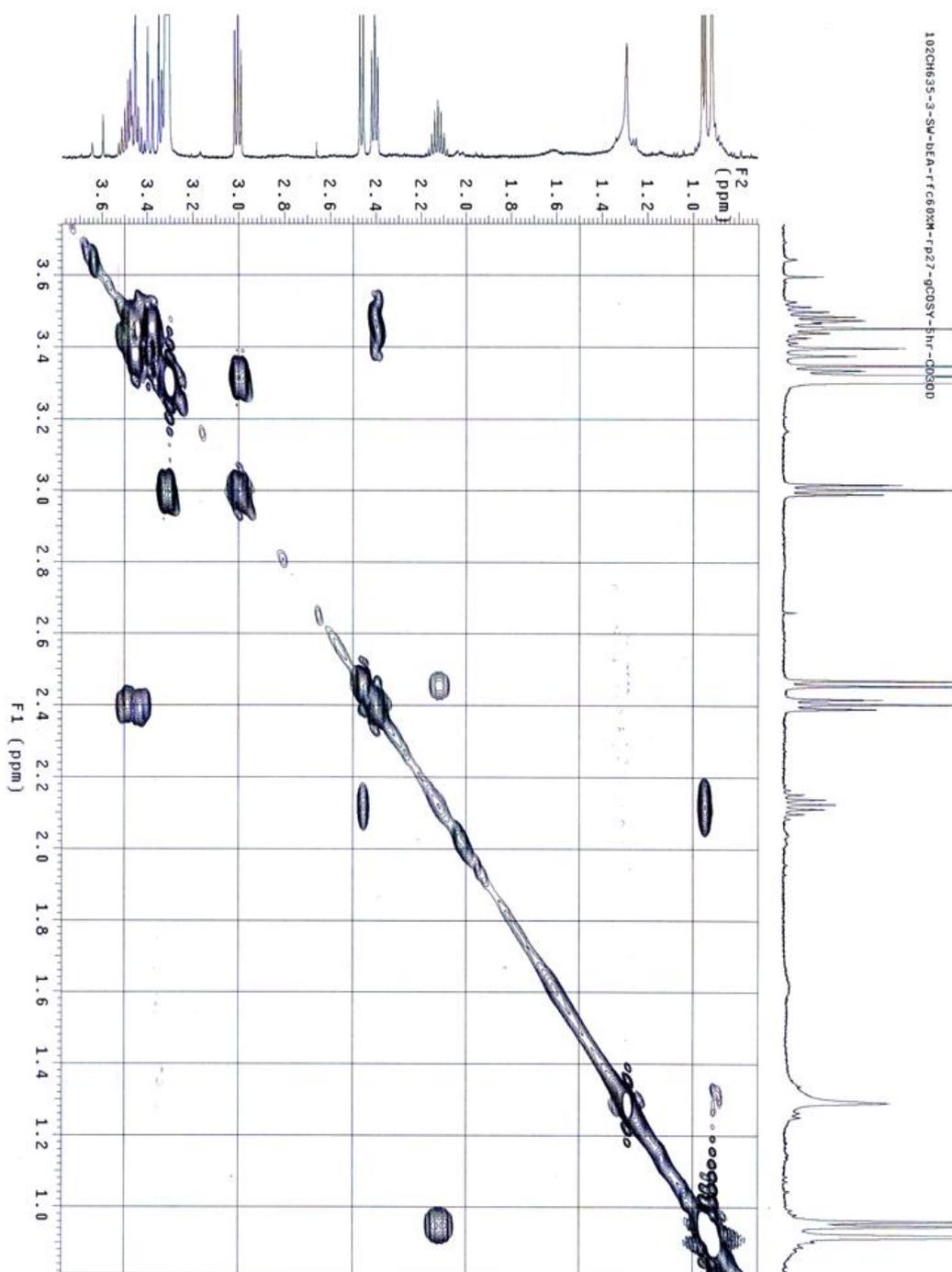


Fig. 3-114. COSY spectrum of **rp27**.

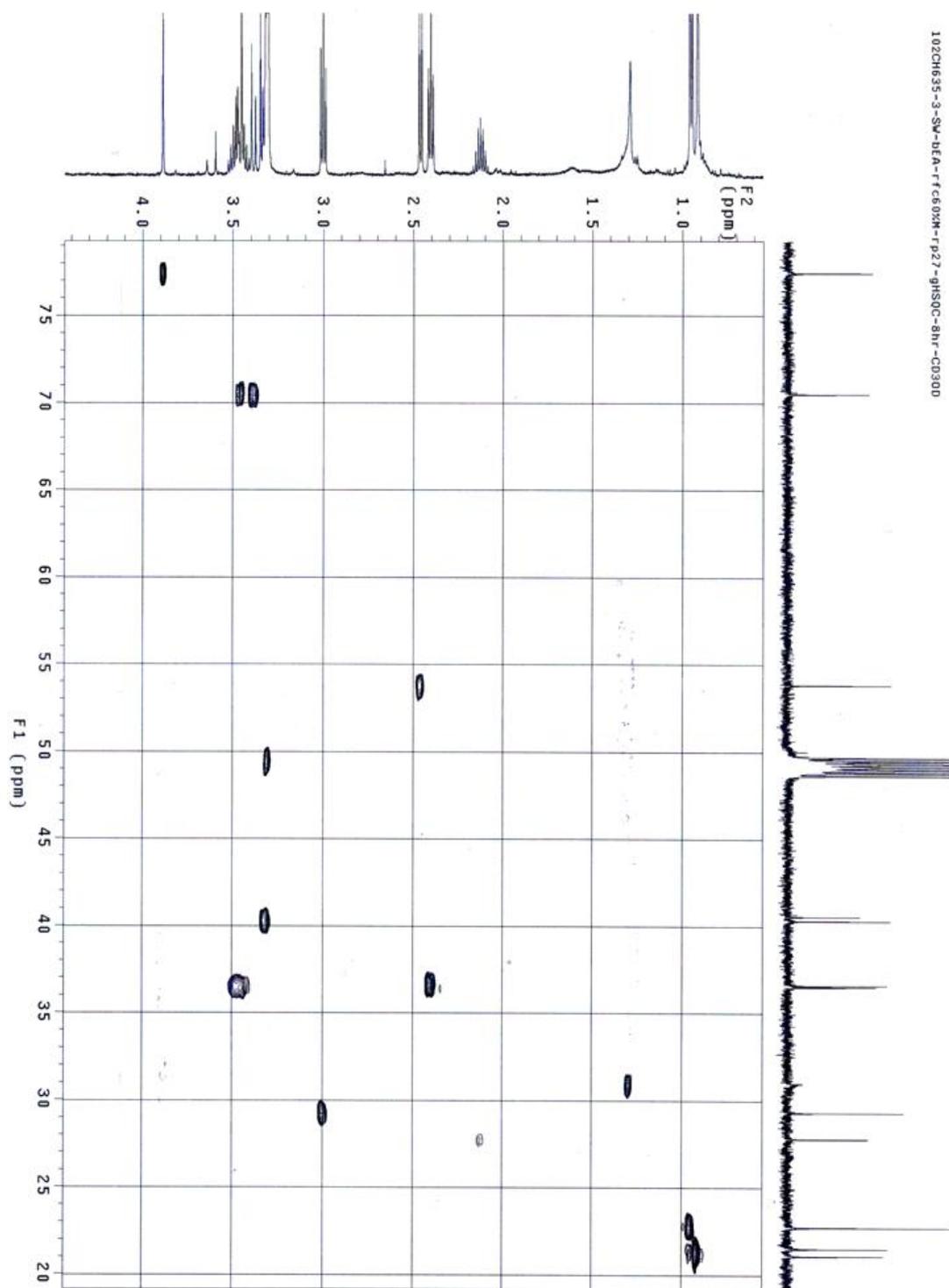


Fig. 3-115. HSQC spectrum of rp27.

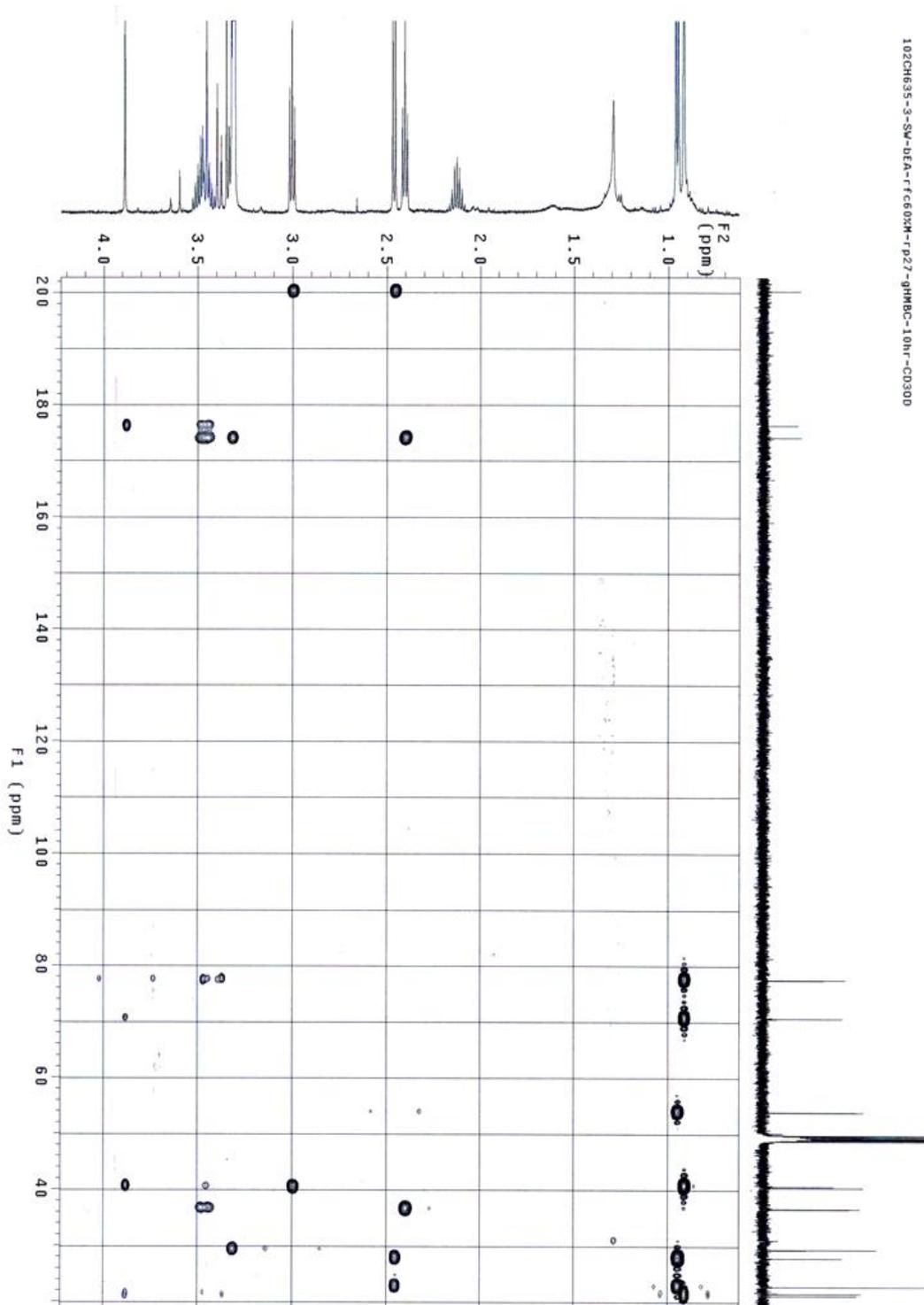


Fig. 3-116. HMBC spectrum of **rp27**.

### Elemental Composition Report

#### Single Mass Analysis

Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf(%)	Formula
385.1779	385.1773	0.6	1.6	2.5	1117.2	0.000	99.99	C16H30N2O5NaS

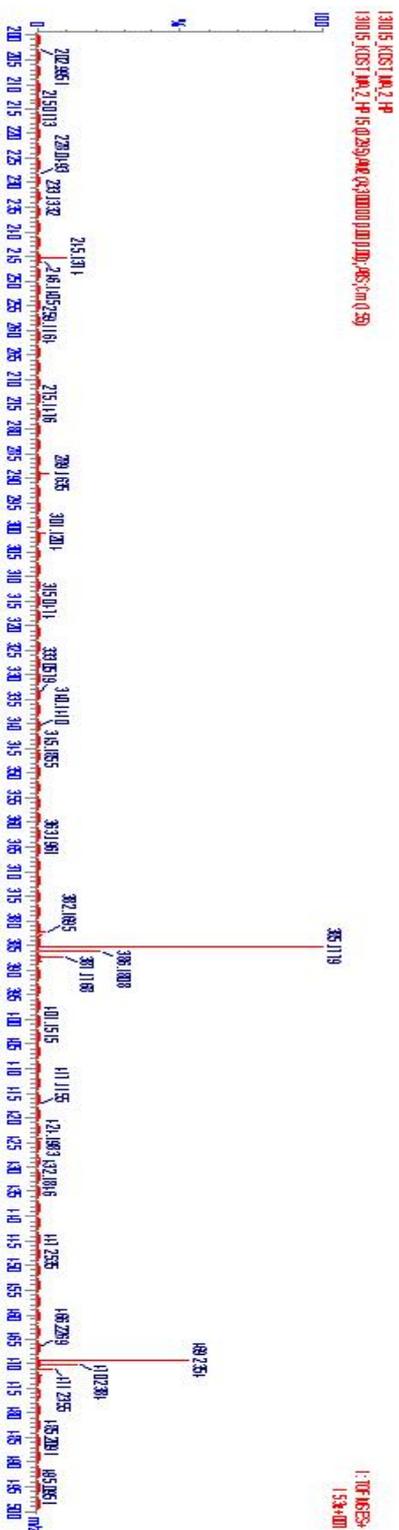


Fig. 3-117. HR-ESI mass spectrum of rp27.

## 제 7 절 D-Pantatheine계 신규 천연물의 합성

Pantethine과 pantetheine은 CoA(coenzyme A)와 ACP(acyl carrier protein)의 구성 성분이며 가수분해 후 지방산과 탄수화물 대사에 관여한다고 알려졌다. 이들은 지방산의 산화, 아미노산 분해, 콜레스테롤 합성 등의 대사반응에 역할을 하며 고지혈증, 혈액질환, 신장질환, 동맥경화와 당뇨병 등에 효능이 있다고 보고되고 있다. Calcium-D-pantetheine-S-sulfonate는 미백, 보습, 멜라닌 생성 억제와 피부염증 억제 활성 등 항노화 작용을 가진 것으로 알려져 국내·외 유명 화장품의 첨가제로 사용되고 있다. 따라서 102CH635-3 균주로부터 분리된 D-pantetheine계 신규물질들의 다양한 활성이 예측되며, 활성 관련 실험이 추가적으로 진행되고 있다. 또한 시중에 판매 중인 D-pantethine을 사용하여 D-pantetheine계 물질에 대한 합성 연구를 통해 신규물질의 양을 확보하고 나아가 새로운 유도체들을 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

### 1. 신물질 합성법 확립

102CH635-3 균주로부터 분리된 D-pantetheine계 신규물질 2종에 대한 다양한 항노화 관련 활성이 기대됨에 따라, 시중에 판매 중인 D-pantethine을 사용하여 D-pantetheine계 신규물질에 대한 합성 연구를 진행하였다. 합성을 통해 102CH635-3 균주로부터 분리된 D-pantetheine계 신규물질 2종의 양을 확보하고, 나아가 다양한 활성 신물질 유도체들을 얻기 위한 합성을 설계하였다(Fig. 3-118).

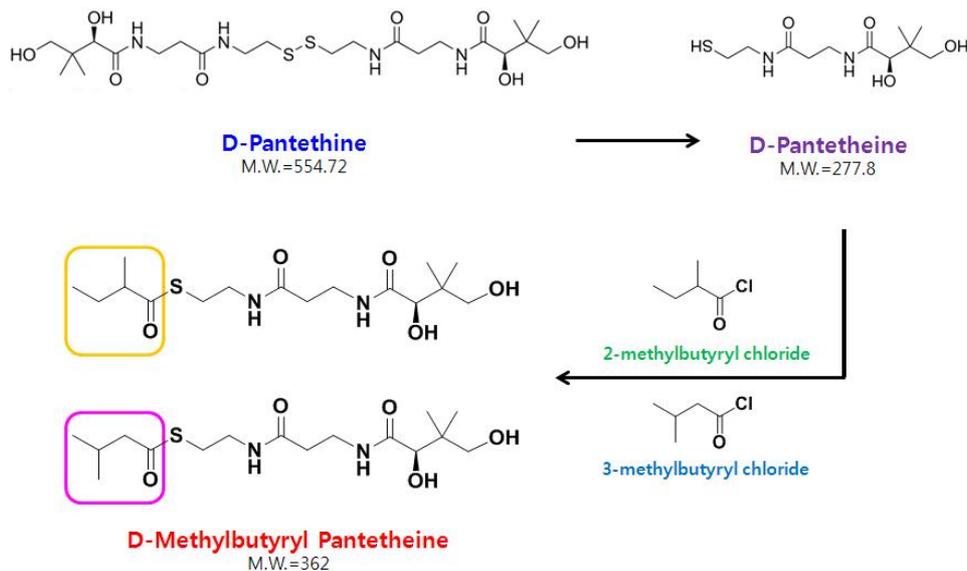


Fig. 3-118. The scheme for the synthesis of the new pantetheine derivatives.

시판 중인 D-pantetheine(P2125, SIGMA)을 이용하여 설계된 합성법(Fig. 3-119)에 따라 102CH635-3 균주로부터 분리된 D-pantetheine계 신규 물질인 2-methylbutyryl-D-pantetheine과 3-methylbutyryl-D-pantetheine을 합성하였다. D-Pantetheine과 DTT에 H<sub>2</sub>O:MeOH(1:1, V/V)를 넣어 N<sub>2</sub> 하에 4℃에서 16시간 반응하였다. TLC로 D-pantetheine이 사라진 것을 확인 한 후 반응을 종료하고 용매를 제거하였다. 용매가 제거된 반응 중간 생성물에 dry THF, triethylamine을 넣고 시약을 첨가한 후 0℃에서 2시간, 상온에서 3시간 반응하였다. 반응 용매를 완전히 제거한 후 H<sub>2</sub>O:EtOAc(1:1, V/V)를 넣어 용매 분획하고, 에틸아세테이트 층을 회수하여 MgSO<sub>4</sub> 처리 후 농축하여 반응 생성물을 얻었다. LRAPCIMS를 통해 원하는 물질이 합성된 것을 확인하였고 HPLC를 사용하여 생성물을 분리하였다. C18 역상 HPLC(C18 reversed-phase HPLC, Column: YMC-ODS-A, 5 μm, 10×250 mm, 용매: 60% MeOH, 용출 속도: 1.5 mL/min, RI detector)로 정제하여 2-methylbutyryl-D-pantetheine과 3-methylbutyryl-D-pantetheine을 분리하였다.

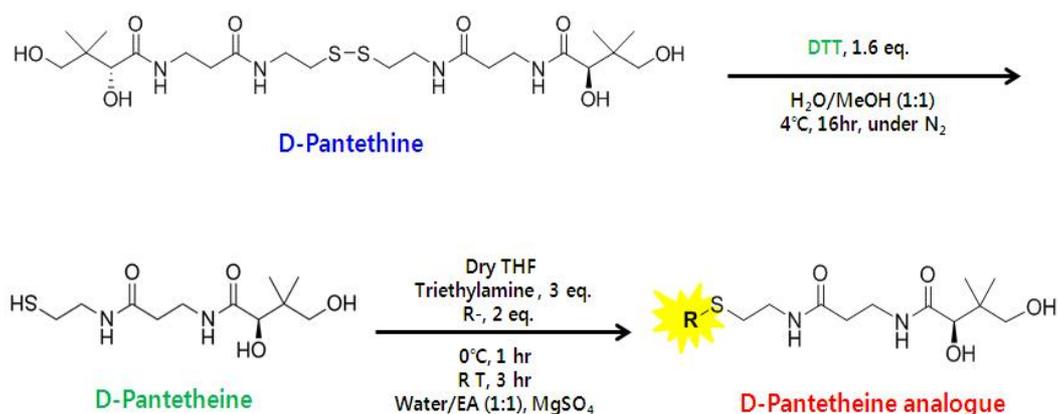


Fig. 3-119. Synthesis of the new pantetheine derivatives.

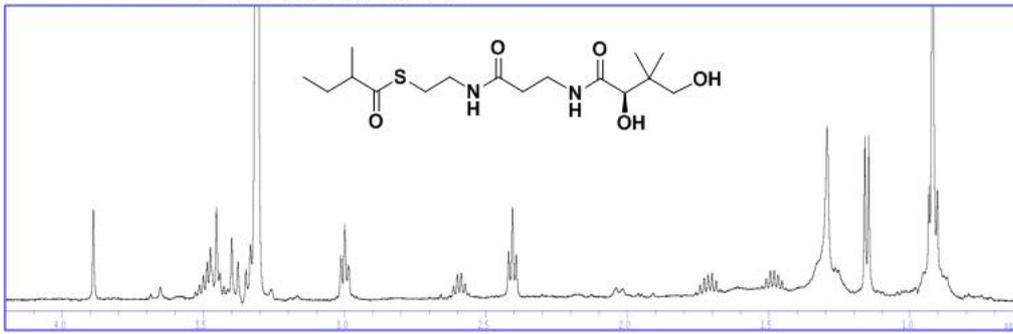
<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR, MS와 [α]<sub>D</sub> data 분석 등을 통해 102CH635-3 균주에서 분리된 신규물질 **rp26**, **rp27**과 합성된 물질 2-methylbutyryl-D-pantetheine, 3-methylbutyryl-D-pantetheine의 data가 일치하는 것을 확인하였고, 합성이 성공적으로 이루어졌음을 알 수 있었다(Fig. 3-120, 121). 합성을 통해 확보된 신규 물질에 대한 향노화 활성을 분석 중이다.

**2-methylbutyryl-D-pantetheine:** [α]<sub>D</sub> +9.9(c 1.0, H<sub>2</sub>O), <sup>1</sup>H NMR(CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) 0.92(s, CH<sub>3</sub>), 0.92(s, CH<sub>3</sub>), 0.92(t, CH<sub>3</sub>), 1.15(d, J=5.0, CH<sub>3</sub>), 1.48-1.71(m, CH<sub>2</sub>), 2.41(t, CH<sub>2</sub>), 2.59(m, CH), 3.00(t, CH<sub>2</sub>), 3.32(t, CH<sub>2</sub>), 3.38-3.46(d, J=10.0, CH<sub>2</sub>), 3.47(m, CH<sub>2</sub>), 3.89(s, CH), <sup>13</sup>C NMR(CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz) 12.1, 17.8, 21.1, 21.5, 28.4, 29.0, 36.5, 36.6, 40.3, 40.5, 51.5, 70.5, 77.4, 174.0, 176.2, 205.0, LRAPCIMS m/z 360.99 [M-H]<sup>-</sup>, 362.87 [M+H]<sup>+</sup>,

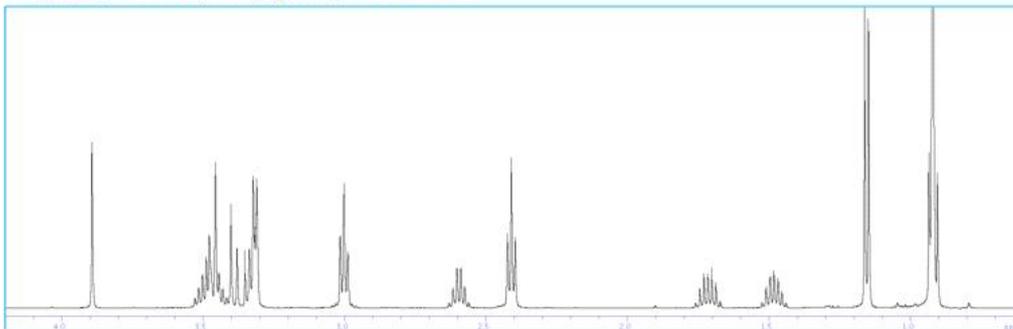
C<sub>16</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S.

**3-methylbutyryl-D-pantetheine:**  $[\alpha]_D +5.9$  (*c* 1.0, H<sub>2</sub>O), <sup>1</sup>H NMR(CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz) 0.92(s, CH<sub>3</sub>), 0.92(s, CH<sub>3</sub>), 0.95(d, *J*=5.0, CH<sub>3</sub>), 0.95(d, *J*=5.0, CH<sub>3</sub>), 2.13(m, CH), 2.41(t, CH<sub>2</sub>), 2.46(d, *J*=5.0, CH<sub>2</sub>), 3.00(t, CH<sub>2</sub>), 3.32(t, CH<sub>2</sub>), 3.38–3.46(d, *J*=10.0, CH<sub>2</sub>), 3.47(m, CH<sub>2</sub>), 3.89(s, CH), <sup>13</sup>C NMR(CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz) 21.1, 21.5, 22.7, 22.7, 27.8, 29.3, 36.5, 36.6, 40.3, 40.5, 53.8, 70.5, 77.4, 174.0, 176.2, 200.2, LRAPCIMS *m/z* 363.14 [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>16</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S.

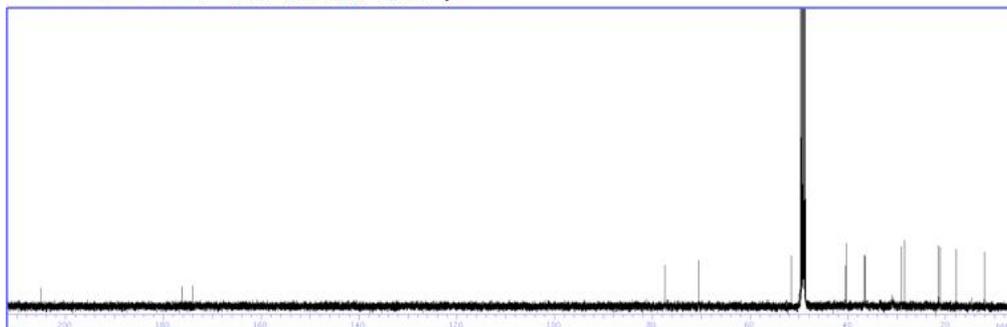
• 102CH635-3로부터 분리된 신규 물질 rp26



• 합성 된 2-methylbutyryl-D-pantetheine



• 102CH635-3로부터 분리된 신규 물질 rp26



• 합성 된 2-methylbutyryl-D-pantetheine

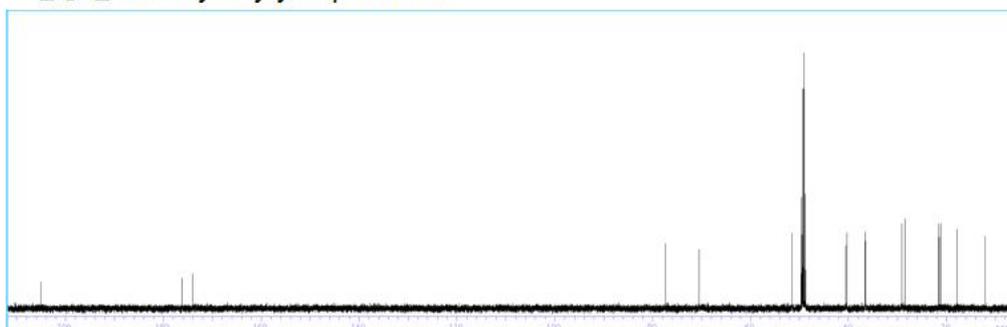
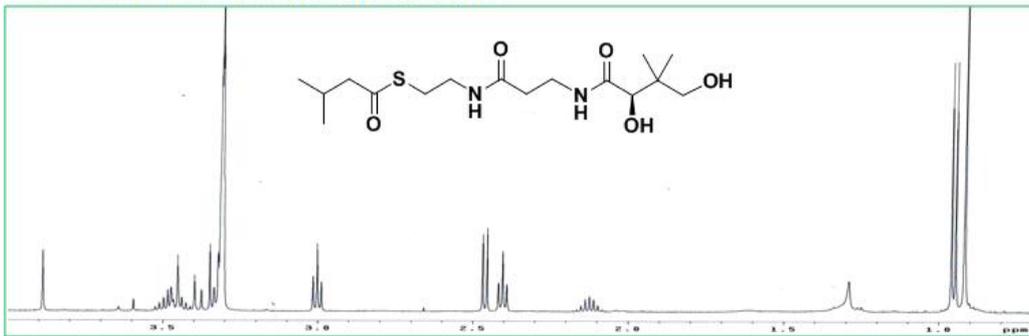
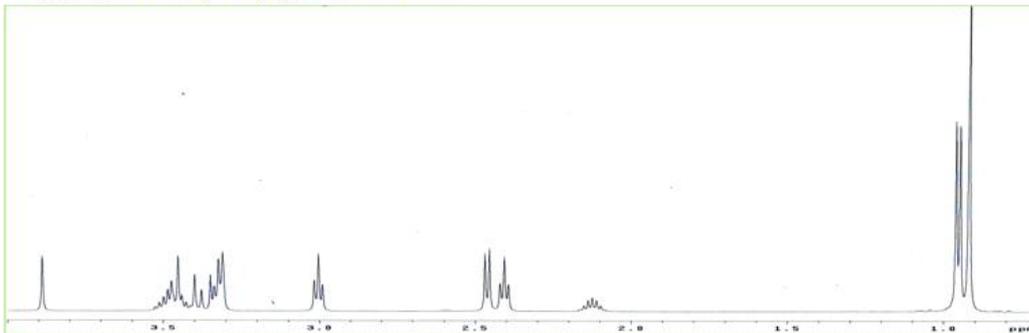


Fig. 3-120. NMR data comparison between synthetic compound and natural compound **rp26** from the strain 102CH635-3.

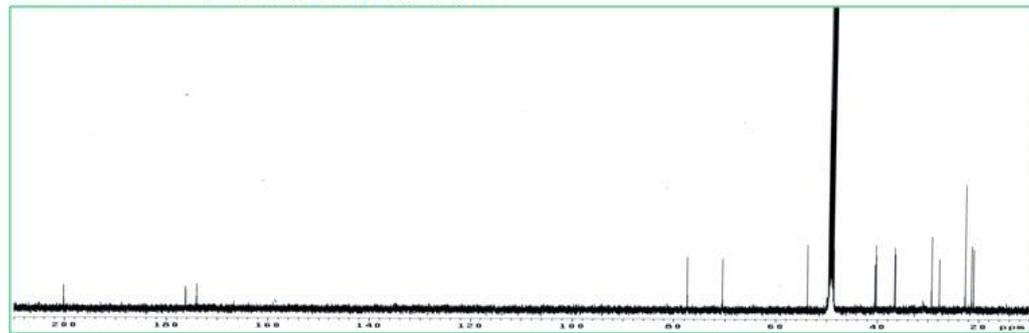
• 102CH635-3로부터 분리된 신규 물질 rp27



• 합성 된 3-methylbutyryl-D-pantetheine



• 102CH635-3로부터 분리된 신규 물질 rp27



• 합성 된 3-methylbutyryl-D-pantetheine

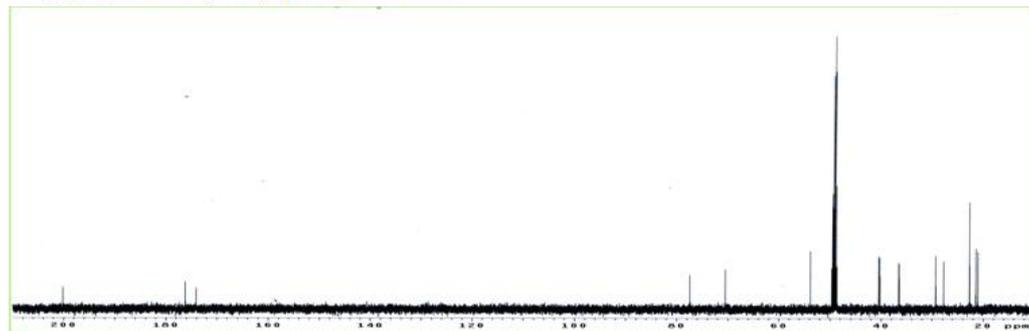


Fig. 3-121. NMR data comparison between synthetic compound and natural compound **rp27** from the strain 102CH635-3.

## 2. 신규 유도체의 합성

확립된 D-pantetheine계 신규 유도체의 합성법(Fig. 3-119)을 사용하여 102CH635-3으로부터 분리된 2점의 신물질들을 포함하여 D-pantetheine계 유도체 8점을 합성하였다. 합성된 신규 유도체는 geranyl-D-pantetheine, 10-undecenoyl-D-pantetheine, isobutyl formate-D-pantetheine, cinnamoyl-D-pantetheine, 4-pentenoyl-D-pantetheine과 2',4-dihydroxyacetophenone-2-D-pantetheine이다(Table 3-16). 신규 유도체들은  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR 및 MS 분석 결과를 통해 합성된 구조를 확인하였으며(Fig. 3-122 ~ 127), 이 물질들의 항노화 활성 검증 실험과 합성 수득률을 높이기 위한 실험을 진행 중에 있다.

**Geranyl-D-pantetheine, 10-undecenoyl-D-pantetheine:**  $^1\text{H}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) 0.92(s), 1.61(s), 1.67(s), 1.68(s), 2.05(t), 2.12(q), 2.42(t), 2.57(t), 3.18(d,  $J=8.0$ ), 3.34-3.53(m), 3.89(s), 5.10(t), 5.23(t)  $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) 16.3, 17.9, 21.1, 21.5, 26.1, 27.7, 29.9, 31.3, 36.5, 36.6, 40.2, 40.5, 40.8, 70.5, 77.4, 122.1, 125.3, 132.6, 140.1, 173.9, 176.2, LRAPCIMS  $m/z$  413.09  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 414.84  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ .

**10-undecenoyl-D-pantetheine:**  $^1\text{H}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) 0.92(s), 1.38(t), 1.64(m), 2.04(q), 2.41(t), 2.58(t), 3.00(t), 3.32-3.50(m), 3.90(s), 4.90-4.92(dd), 4.96-5.00(m), 5.77-5.81(m)  $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) 21.1, 21.4, 26.8, 29.2, 30.1, 30.2, 30.2, 30.4, 30.5, 35.0, 36.4, 36.5, 40.2, 40.5, 44.9, 70.5, 77.3, 114.9, 140.2, 173.9, 176.1, 200.7, LRAPCIMS  $m/z$  443.10  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 415.10  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ .

**Isobutyl formate-D-pantetheine:**  $^1\text{H}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) 0.92(s), 0.94(d,  $J=10.0$ ), 1.95(m), 2.42(t), 2.98(t), 3.38-3.50(m), 3.89(s), 4.01(d,  $J=5.0$ ),  $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) 19.3, 21.0, 21.5, 29.2, 31.3, 36.4, 36.5, 40.4, 40.5, 70.5, 74.6, 77.3, 172.1, 174.0, 176.1, LRAPCIMS  $m/z$  376.95  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 378.90  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ .

**Cinnamoyl-D-pantetheine:**  $^1\text{H}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) 0.92(s), 2.42(t), 3.15(t), 3.35-3.51(m), 3.89(s), 6.86(d,  $J=15.0$ ), 7.41-7.42(m), 7.62-7.66(m),  $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) 21.1, 21.5, 29.4, 36.5, 36.6, 40.3, 40.5, 50.0, 70.5, 77.4, 125.9, 129.8, 130.3, 132.0, 135.6, 142.3, 176.2, 191.2, LRAPCIMS  $m/z$  408.15  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 409.02  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ .

**4-pentenoyl-D-pantetheine:**  $^1\text{H}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) 0.92(s), 2.36-2.42(m), 2.68(t), 3.01(t), 3.32(t), 3.33-3.53(m), 3.89(s), 4.98(d,  $J=10.0$ ), 5.05(d,  $J=15.0$ ), 5.78-5.84(m),  $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) 21.1, 21.5, 29.3, 30.6, 36.4, 36.5, 40.2, 40.5, 44.1, 70.5, 77.4, 116.3, 137.6, 174.0, 176.1, 199.9, LRAPCIMS  $m/z$  360.90  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 721.25  $[2\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ .

**2',4-dihydroxyacetophenone-2-D-pantetheine:**  $^1\text{H}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) 0.91(s), 2.43(t), 2.72(t), 3.35-3.51(m), 3.85(s), 3.89(s), 6.27(d,  $J=2.5$ ),

6.36(dd,  $J=2.0, 10.0$ ), 7.72(d,  $J=10.0$ ),  $^{13}\text{C}$  NMR( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz) 21.0, 21.5, 32.8, 36.5, 36.6, 37.3, 39.6, 40.5, 70.5, 77.4, 103.9, 109.5, 112.7, 134.5, 166.9, 167.1, 174.0, 176.2, 201.0, LRAPCIMS  $m/z$  427.13  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 429.13  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$ .

Table 3–16. New pantetheine derivatives synthesized from this study

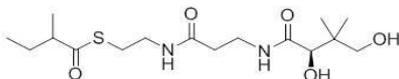
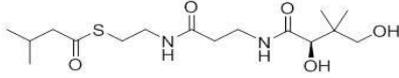
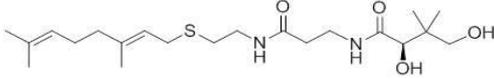
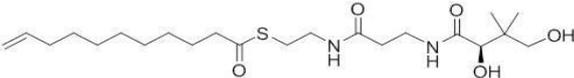
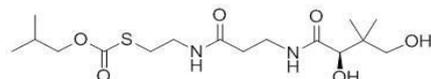
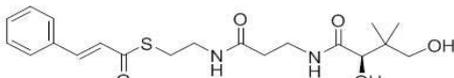
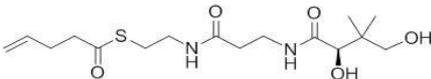
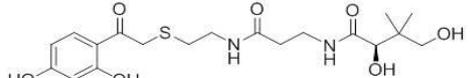
D-Pantetheine Analogues	Chemical Formula Molecular Weight	Yield
 2-methylbutyryl-D-pantetheine	$\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ 362.4848	20.6 %
 3-methylbutyryl-D-pantetheine	$\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ 362.4848	39.8 %
 Geranyl-D-pantetheine	$\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ 414.6024	6.4 %
 10-undecenoyl-D-pantetheine	$\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ 444.6284	75.7 %
 Isobutyl formate-D-pantetheine	$\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$ 378.4842	49.15 %
 Cinnamoyl-D-Pantetheine	$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ 408.5117	24.7 %
 4-Pentenoyl-D-pantetheine	$\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ 360.4689	57.9 %
 2',4'-Dihydroxyacetophenone-2-D-pantetheine	$\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}$ 428.4998	40.2 %



Fig. 3-122. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra of geranyl-D-pantetheine in CD<sub>3</sub>OD.

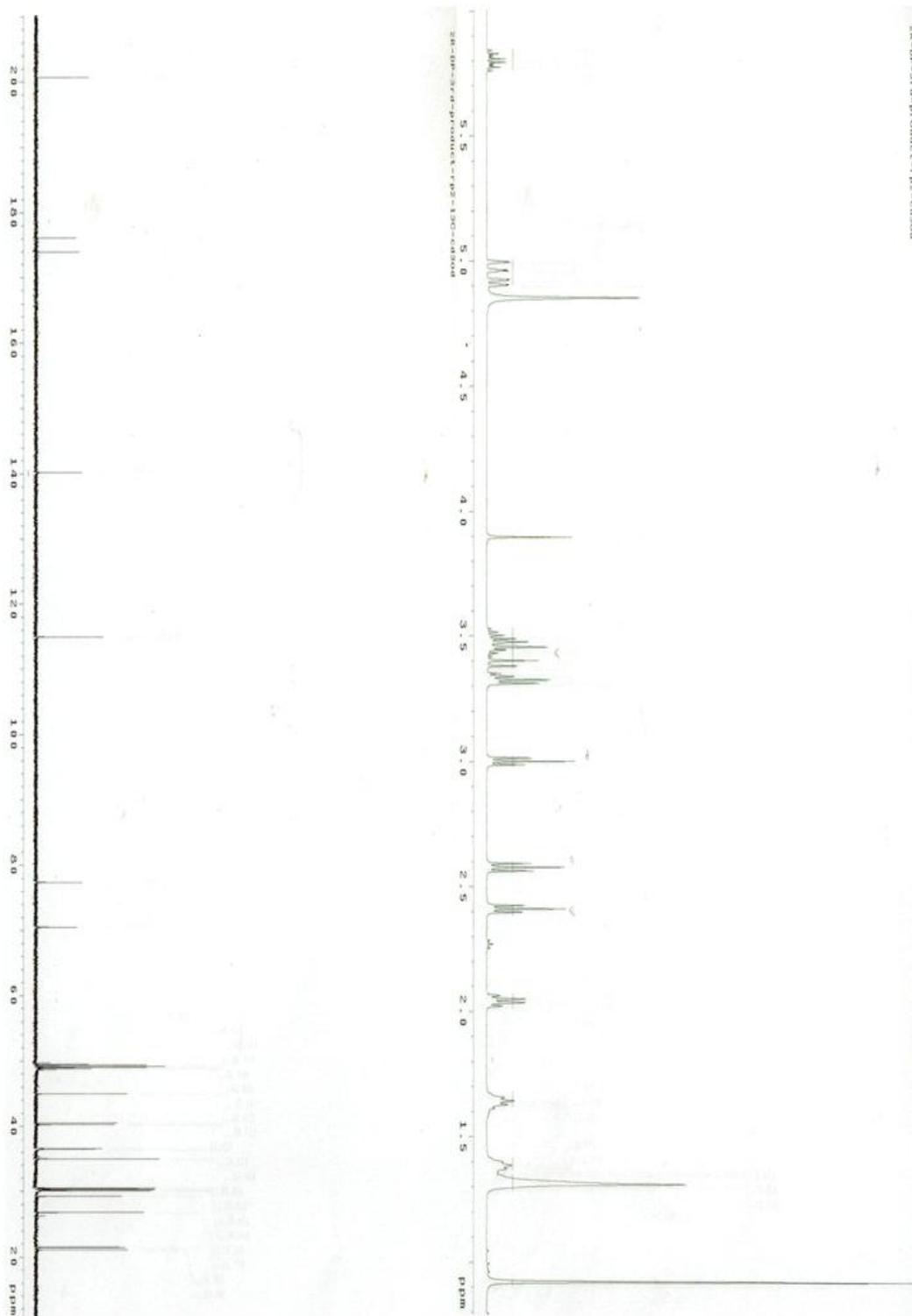


Fig. 3-123. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra of 10-undecenoyl-D-pantetheine in CD<sub>3</sub>OD.

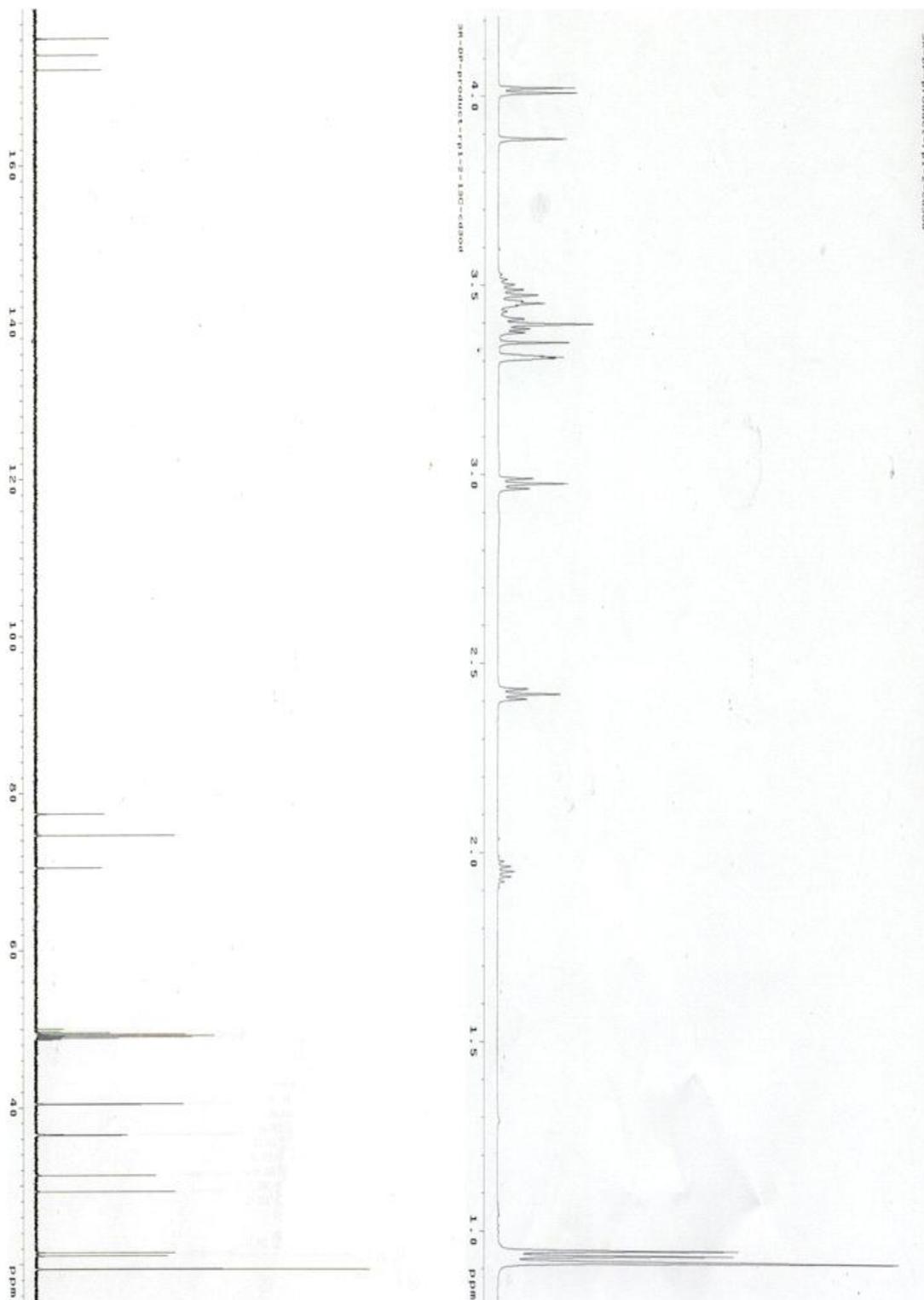


Fig. 3-124. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra of isobutyl formate-D-pantetheine in CD<sub>3</sub>OD.

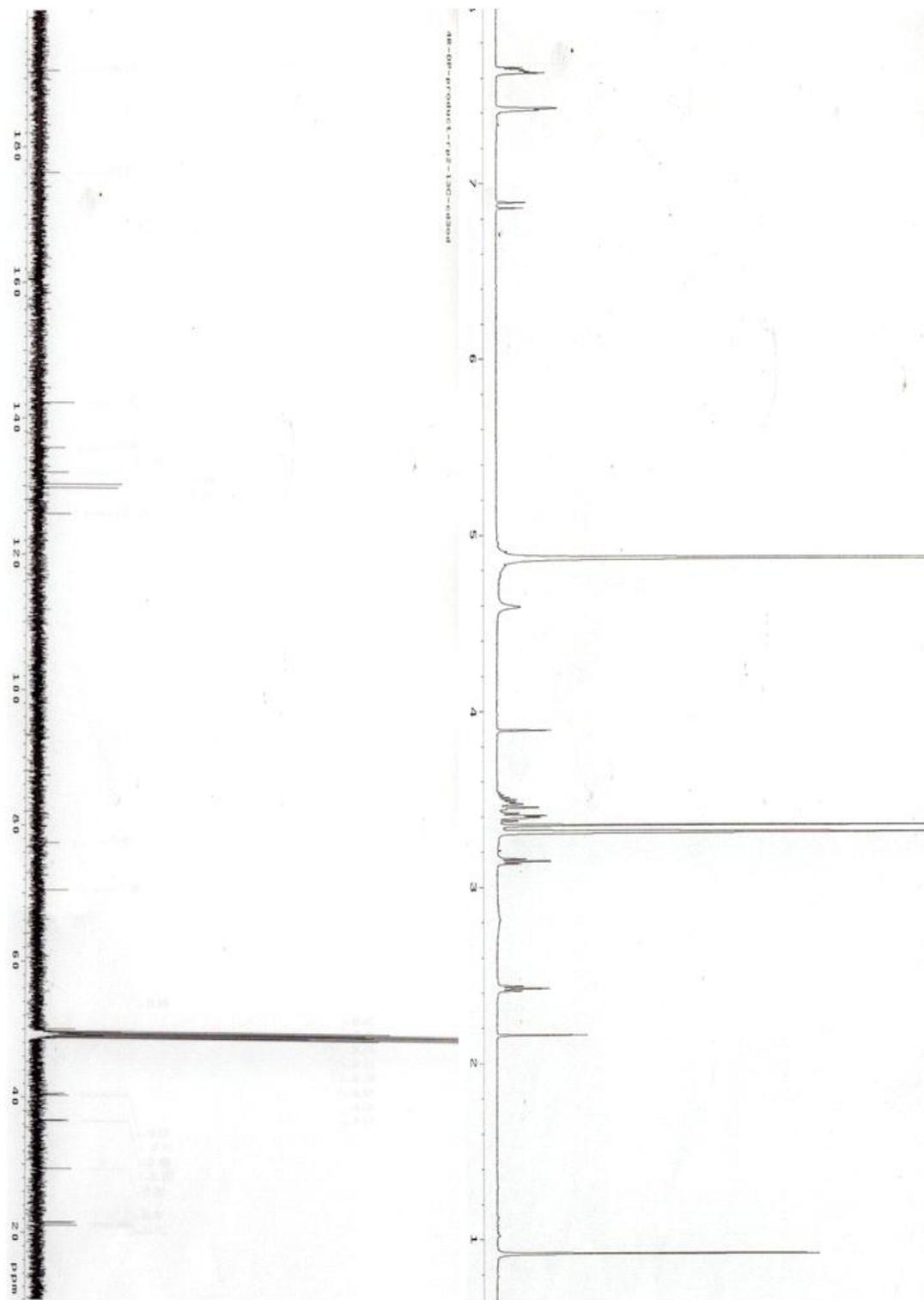


Fig. 3-125. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra of cinnamoyl-D-pantetheine in CD<sub>3</sub>OD.

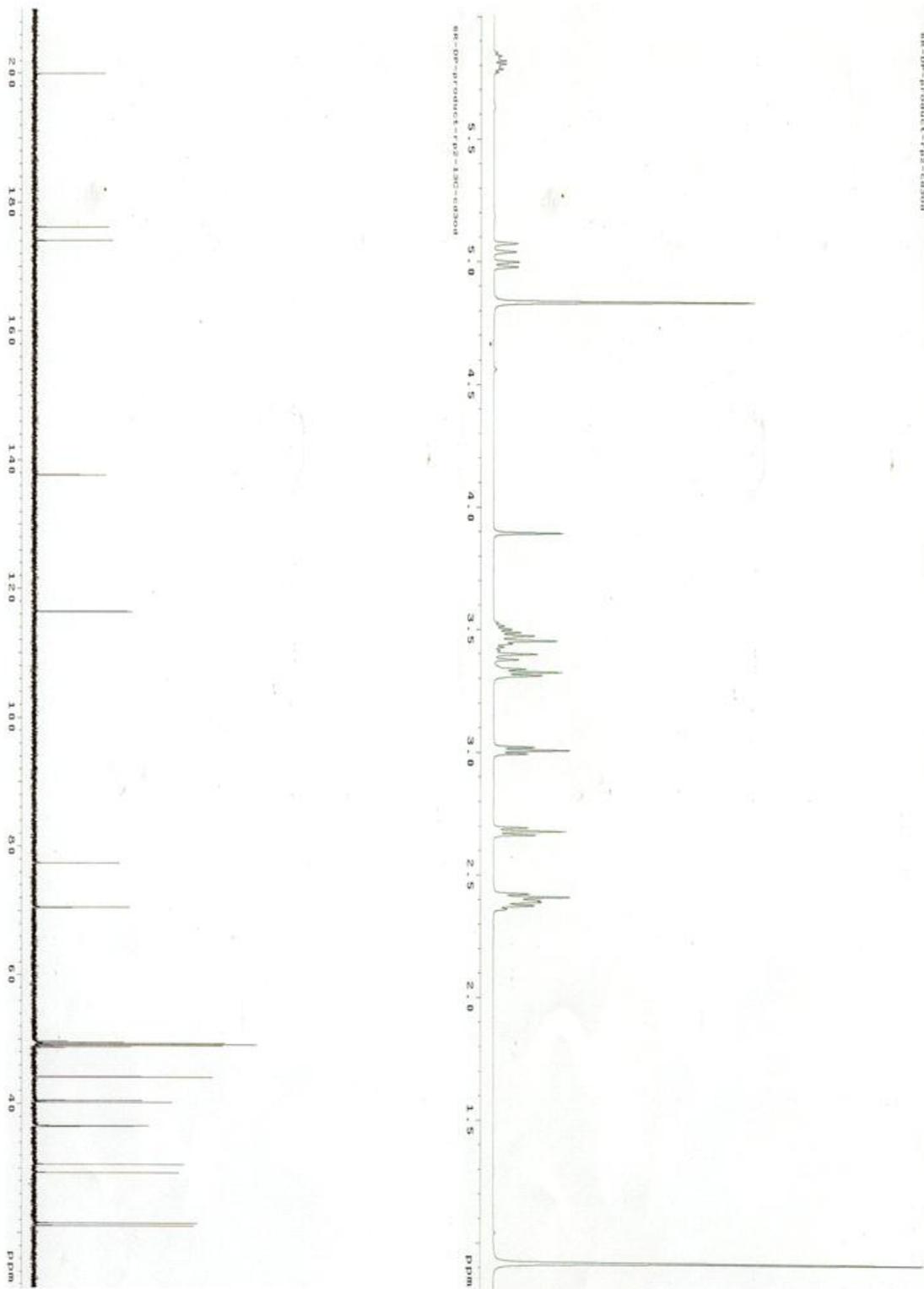


Fig. 3-126.  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of 4-pentenyl-D-pantetheine in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

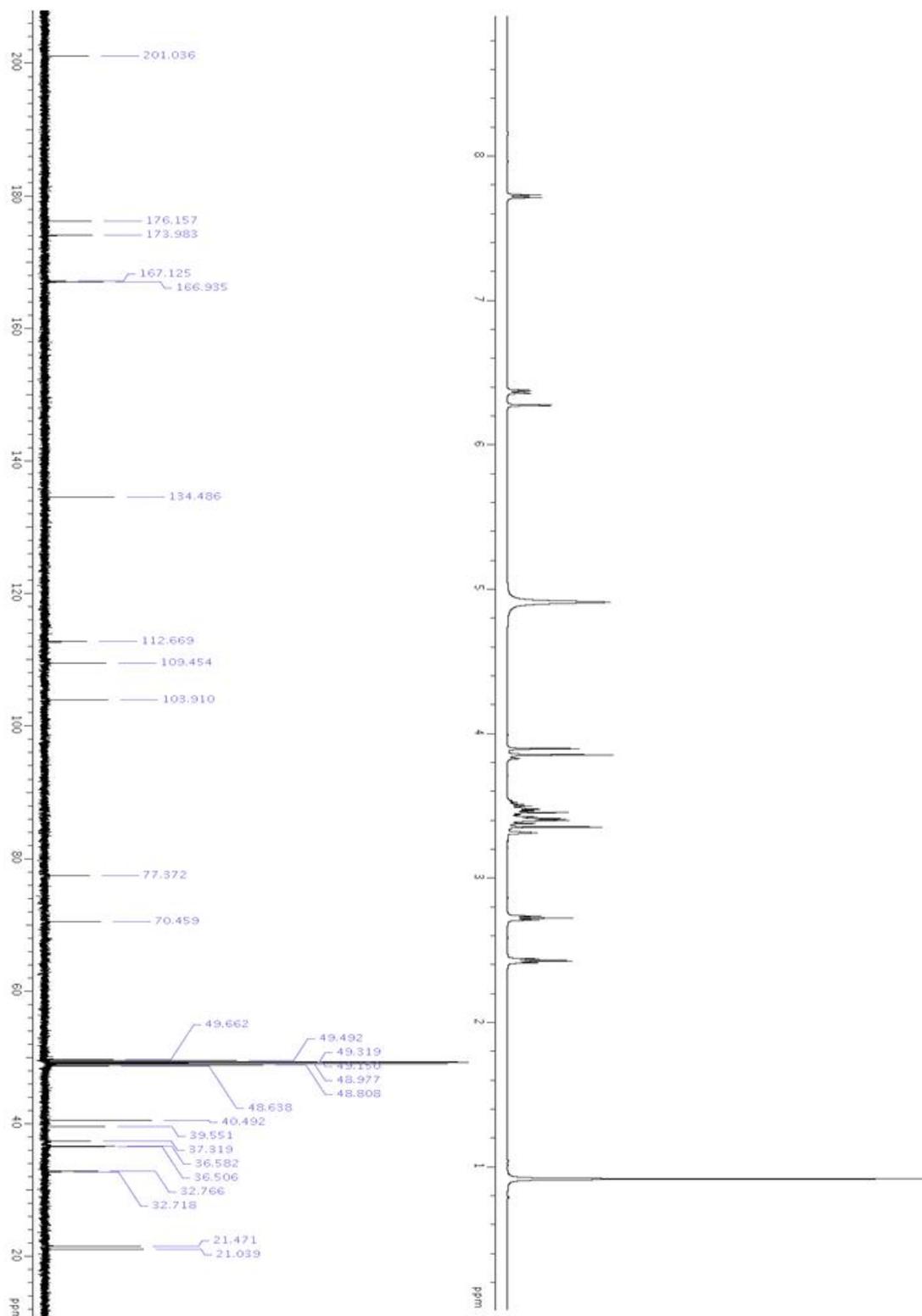


Fig. 3-127. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra of 2',4'-dihydroxyacetophenone-2-D-pantetheine in CD<sub>3</sub>OD.

또한 동일한 합성법을 사용하여 다양한 작용기를 가지는 D-pantetheine계 활성 신물질들을 확보하기 위한 합성 연구를 진행 중이다. 반응에 사용할 작용기는 탄소 체인의 길이, hydroxyl group의 여부와 위치, isoprenoid units 및 링 화합물 등 다수의 후보 물질들을 선정하였다(Fig. 3-128). 선정된 후보 물질들은 현재 항노화 물질로 판매 중이거나 활성의 우수함이 검증된  $\beta$ -carotene, squalene,  $\alpha$ -tocopherol, retinol, arbutin, butylated hydroxyanisole 및 butylated hydroxytoluene 등의 활성 작용기를 참고하여 선정되었다. 이들 후보 물질들은 확립된 합성법으로 반응이 가능한지 확인하면서 신물질 유도체를 확보하기 위한 연구를 진행 중이다.

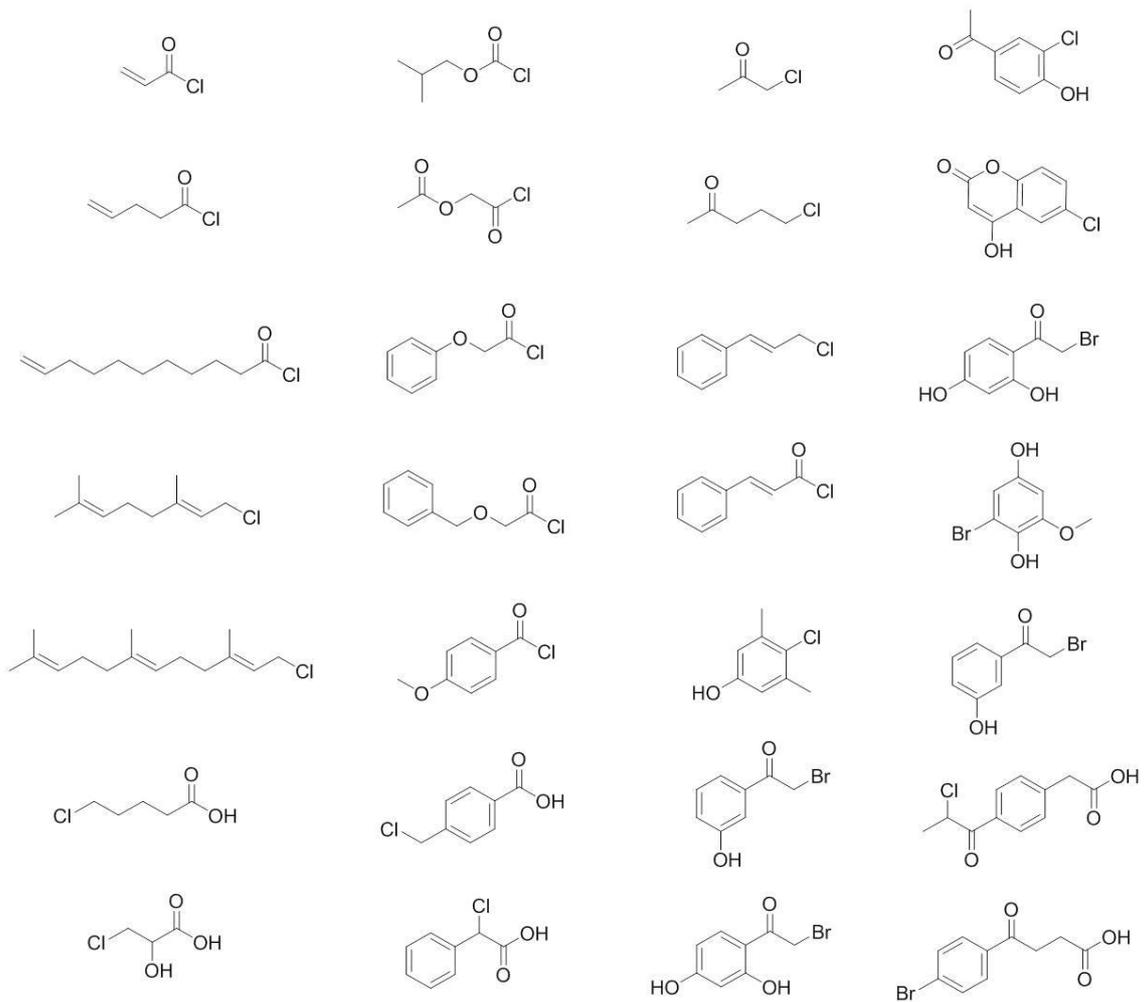


Fig. 3-128. Potential functional groups for the synthesis of the new pantetheine derivatives.

### 3. 합성물질에 대한 활성 측정

인체는 산화촉진물질(prooxidant)과 산화억제물질(antioxidant)의 균형을 이루고 있으나 여러 가지 요인들에 의하여 불균형을 이루게 되면 산화촉진이 과하게 되어 산화적 스트레스(oxidative stress)가 유발되고 잠재적인 세포손상 및 병리적 질환을 일으키게 된다(Videla, Br. *et al*, 1988). 이러한 산화적 스트레스의 직접적인 원인이 되는 것이 활성 산소종(reactive oxygen species)이다. •NO, HNO<sub>2</sub>, ONOO<sup>-</sup>와 같은 활성 질소종(reactive nitrogen species)은 염증 반응 시 대식세포 호중구 및 다른 면역 세포들의 면역반응으로 인해 다량 생성되며, 이때 활성 산소종도 과잉 생성된다(Brune, B. *et al*, 2003, Delanty, N. *et al*, 1998). 활성 산소종과 활성 질소종은 생체 내 여러 세포의 작용을 조절하는 염증 반응과 깊이 관련되어있으며, iNOS와 COX-2의 발현과 NO, PGE<sub>2</sub>(prostaglandin E<sub>2</sub>)는 면역세포의 대표적인 염증인자로 급성, 만성 염증 반응 조절에 관여한다(Yun, H. *et al*, 2008). 이에 합성된 D-pantetheine계 신물질들의 항염증 활성을 측정하여 항노화 활성 물질로의 가능성을 확인하고자하였다.

세포 실험을 위해 한국세포주은행(KCLB)에서 분양받은 Raw 264.7 cell을 사용하였으며, MTT assay에 의해 세포 생존율을 측정함으로써 활성측정 농도의 범위를 설정하였다. Raw 264.7 cell 5 x 10<sup>4</sup> cells/mL를 96 well plate에 분주하고 시료를 각 농도(6.25, 12.5, 25, 50 μM/mL)로 첨가하여 24시간 동안 처리하였다. Well당 20 μL의 MTT용액을 첨가하여 37° C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 4시간 동안 반응시킨 후, microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다.

Nitric oxide 생성량은 배양액 내의 nitrite 농도를 griess reagent를 이용하여 측정하였다. Raw 264.7 cell은 DMEM배지를 이용하여 5 x 10<sup>5</sup> cells/mL로 조절한 후 6 well plate에 접종하고, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 전 배양하였다. 세포에 1 μg/mL의 LPS를 처리하고 1시간 뒤에 농도별로 시료를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양액의 상층액을 얻은 후 griess 시약과 반응 시킨 후 ELISA reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO 생성율을 백분율로 표시하였다.

그리고 LPS로 유도된 Raw 264.7 cell에서 NO 생성 저해기전을 확인하기 위해 western blot을 실시하여 iNOS의 단백질 발현을 측정하고, PGE<sub>2</sub>의 형성 저해 기전을 확인하기 위해 western blot을 실시하여 COX-2의 발현을 측정하였다.

그 결과 합성된 D-pantetheine계 신물질들은 전반적으로 Raw 264.7 cell에서 세포 독성이 없는 범위 내에서 농도 의존적으로 nitric oxide 생성량을 억제하거나, iNOS와 COX-2 단백질 발현을 억제함으로써 항염증 활성이 우수하게 측정되었다(Fig. 3-129~134). 해양 *Bacillus* sp. 102CH635-3 균주에서 분리된 신물질들에 대해서는 2-methylbutyryl-D-pantetheine보다 3-methylbutyryl-D-pantetheine에서 유의한 항염증 활성을 가진 것으로 측정되었다. 또한 isoprenoid units을 가진 geranyl-D-pantetheine, 말단이 이중 결합인 긴 사슬을 가진 10-undecenoyl-D-pantetheine과 말단에 benzene이 이중 결합으로 연결된 cinnamoyl-D-pantetheine의 경우 저농도에서 nitric oxide 생성량 억제와 iNOS와

COX-2 단백질 발현 억제 활성이 모두 우수하게 측정되어 강력한 항염증 물질로의 활용 가능성을 나타냈다.

따라서 이들 물질에 대한 추가적인 항노화 활성을 검색 중이며, 다양한 작용기를 가진 D-pantetheine계 유도체들을 합성하여 우수한 항노화 활성 물질을 확보하는 연구를 진행 중이다. 지속적인 연구를 통해 D-pantetheine계 합성법을 사용하여 다양한 유도체를 합성하고, 확보된 활성이 우수한 유도체들은 항노화 기능성 화장품 및 다양한 제품에 산업적으로도 널리 활용이 가능 할 것으로 기대된다.

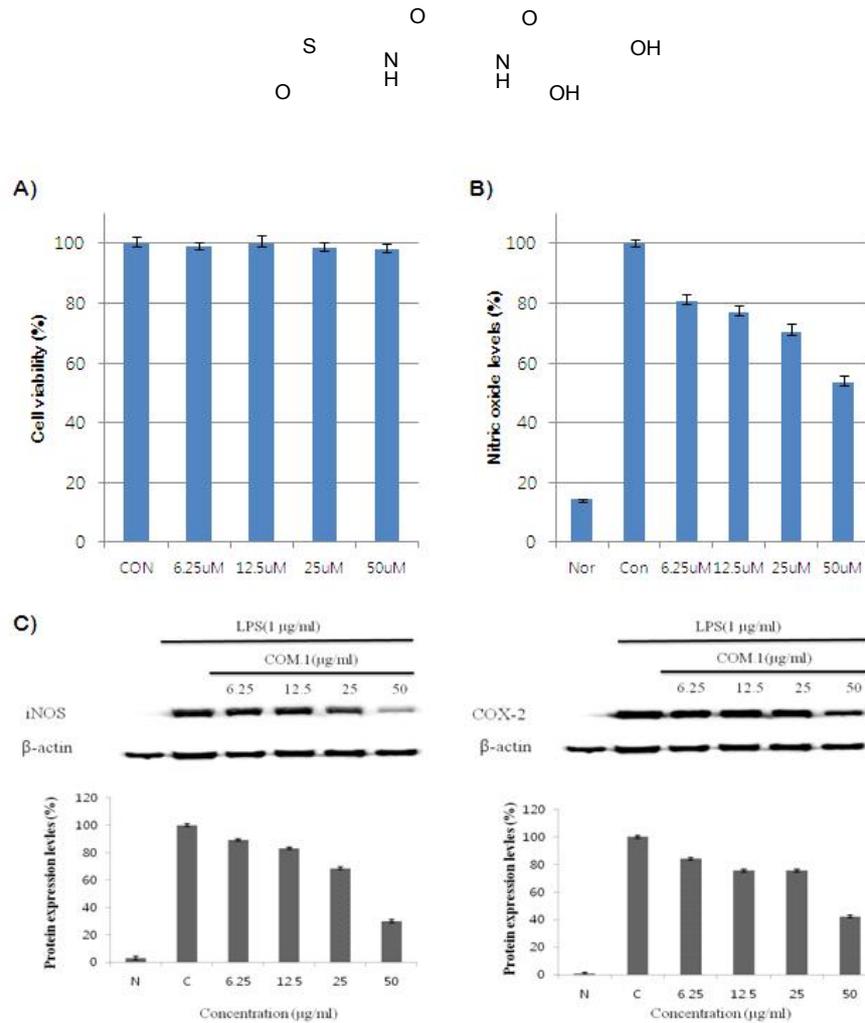


Fig. 3-129. Anti-inflammatory activity of 3-methylbutyryl-D-pantetheine.  
 A) Cytotoxicity against Raw 264.7 cells, B) Inhibitory Effect on the production of Nitric oxide(NO), C) Inhibitory effect on the expression of iNOS and COX-2.

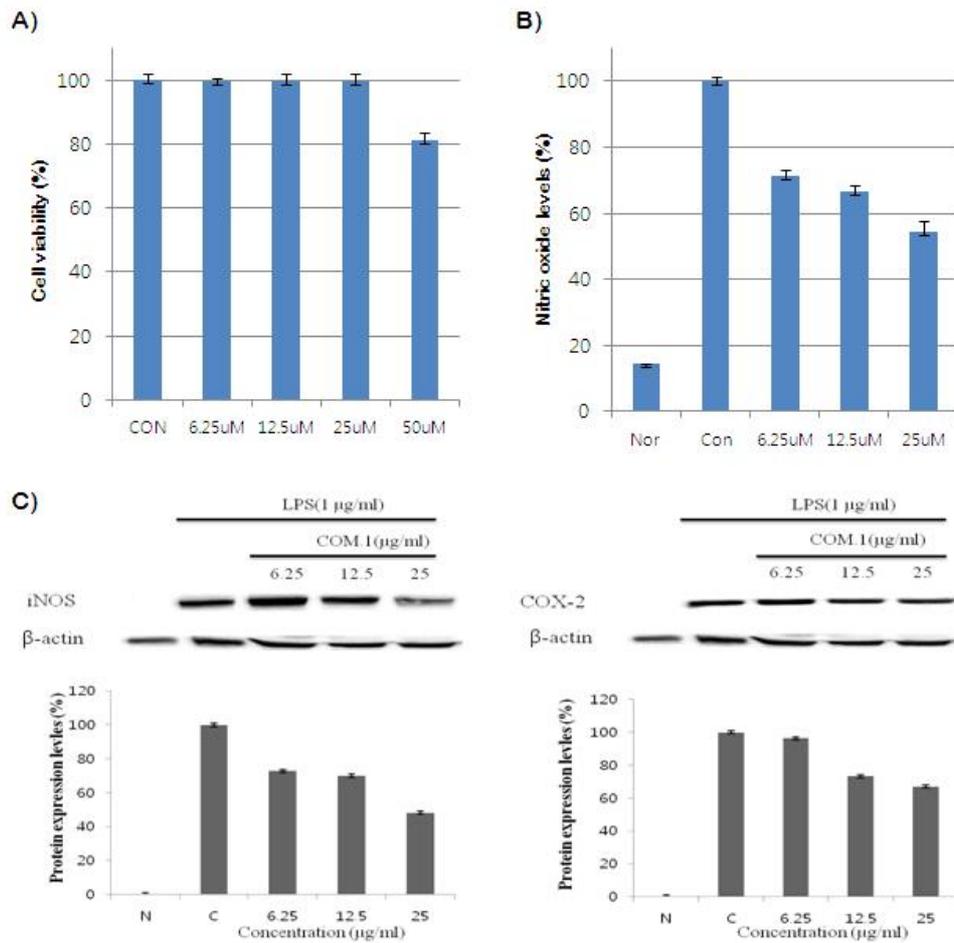
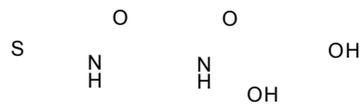


Fig. 3-130. Anti-inflammatory activity of geranyl-D-pantetheine.

A) Cytotoxicity against Raw 264.7 cells, B) Inhibitory Effect on the production of Nitric oxide(NO), C) Inhibitory effect on the expression of iNOS and COX-2.

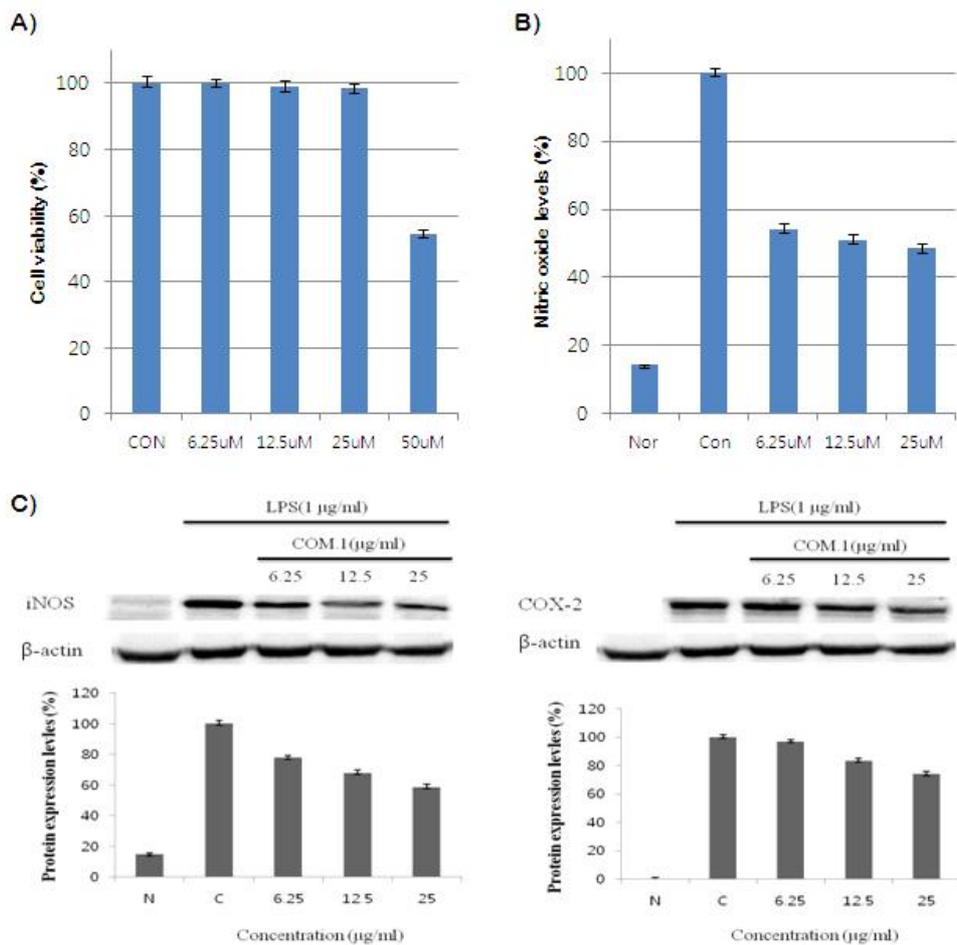
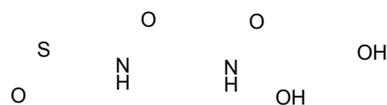


Fig. 3-131. Anti-inflammatory activity of 10-undecenoyl-D-pantetheine. A) Cytotoxicity against Raw 264.7 cells, B) Inhibitory Effect on the production of Nitric oxide(NO), C) Inhibitory effect on the expression of iNOS and COX-2.

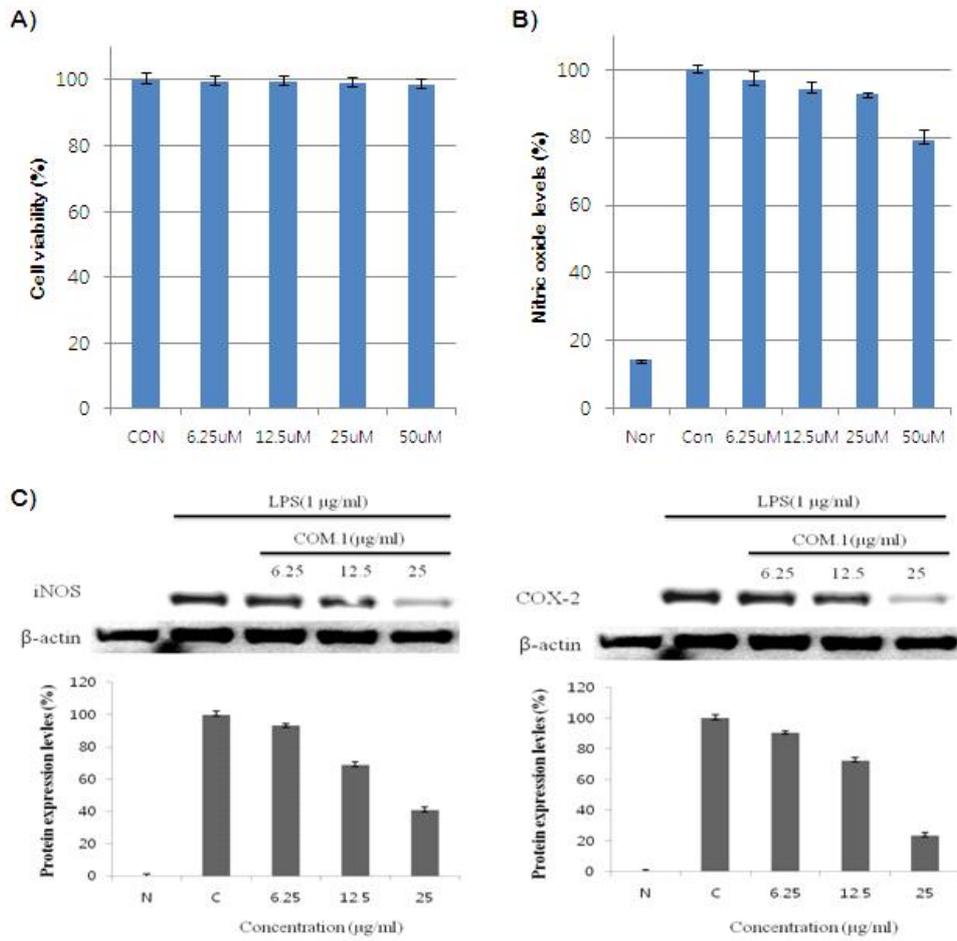
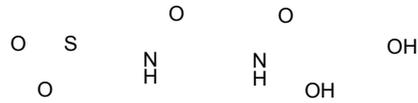


Fig. 3-132. Anti-inflammatory activity of isobutyl formate-D-pantetheine.  
 A) Cytotoxicity against Raw 264.7 cells, B) Inhibitory Effect on the production of Nitric oxide(NO), C) Inhibitory effect on the expression of iNOS and COX-2.

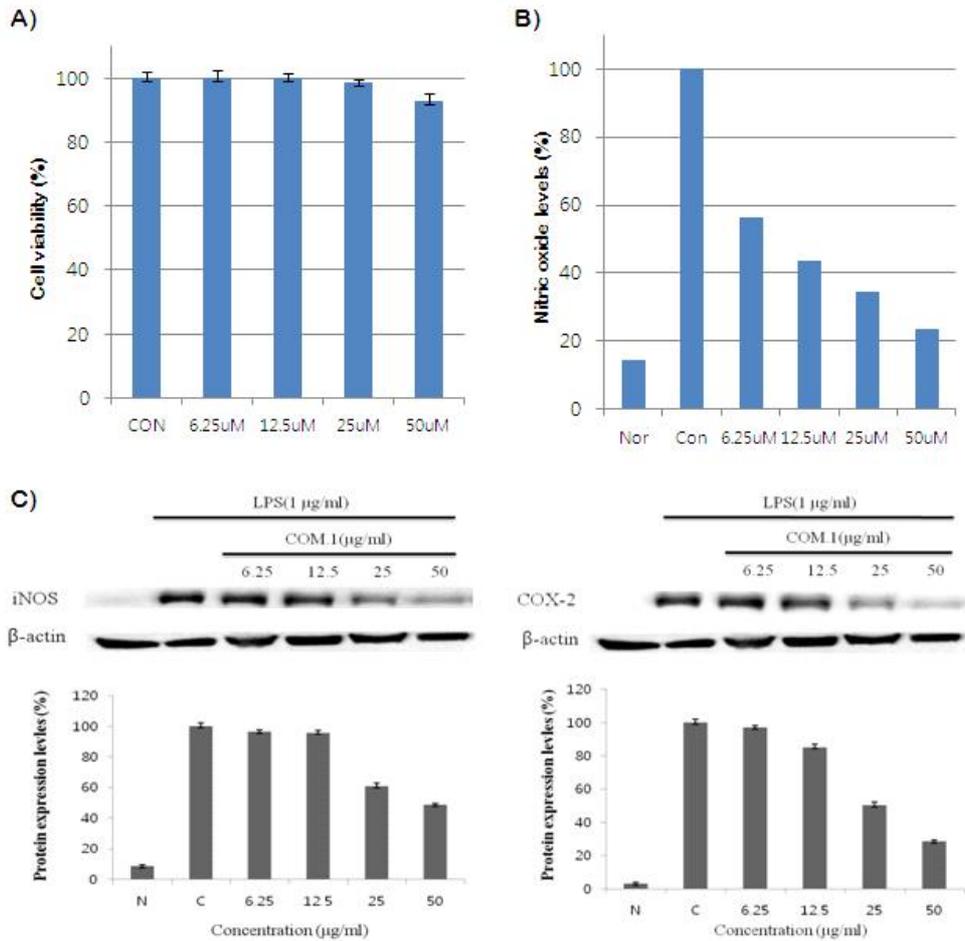
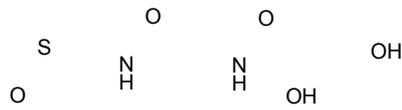


Fig. 3-133. Anti-inflammatory activity of cinnamoyl-D-pantetheine.

A) Cytotoxicity against Raw 264.7 cells, B) Inhibitory Effect on the production of Nitric oxide(NO), C) Inhibitory effect on the expression of iNOS and COX-2.

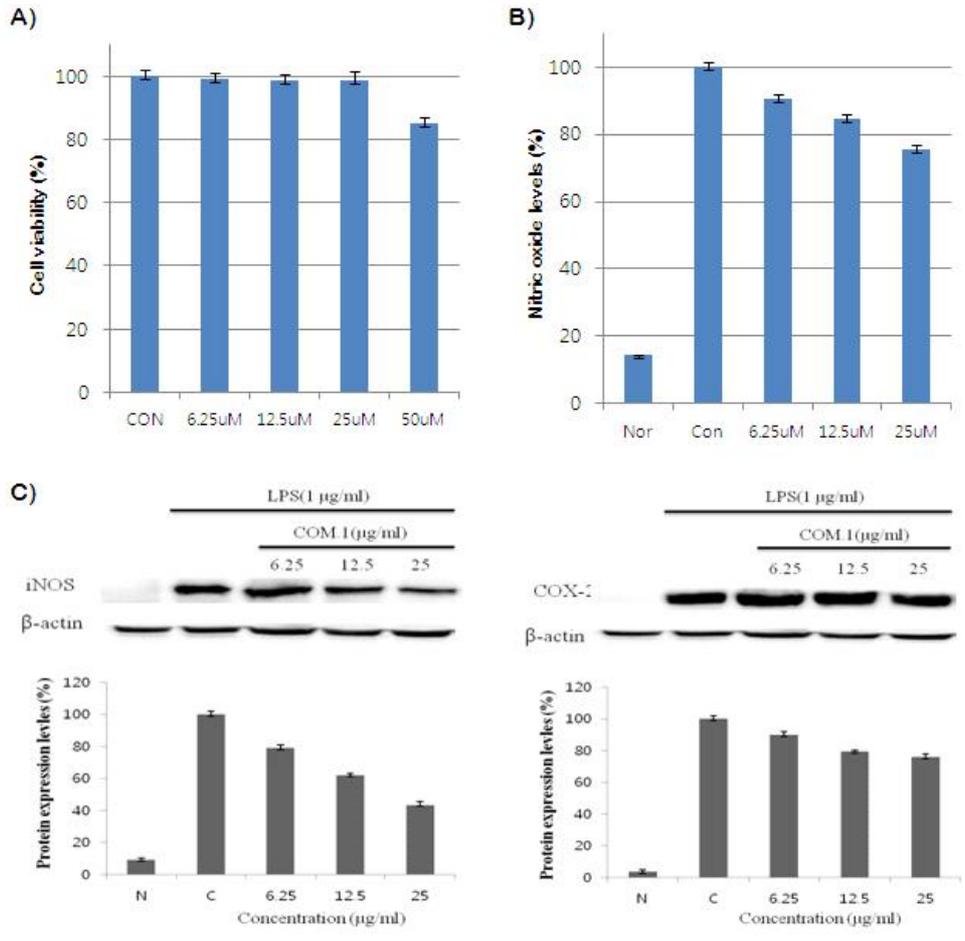
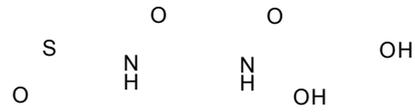


Fig. 3-134. Anti-inflammatory activity of 4-Pentenyl-D-pantetheine. A) Cytotoxicity against Raw 264.7 cells, B) Inhibitory Effect on the production of Nitric oxide(NO), C) Inhibitory effect on the expression of iNOS and COX-2.

## 제 8 절 *Stappia sp.* 102CH-429 균주로부터 신물질의 분리 및 구조결정

### 1. *Stappia sp.* 102CH-429의 분리 및 동정

마이크로네시아 축주 인근 맹그로브 나무 조각 샘플에서 분리된 102CH-429 균주는 16s rRNA 염기서열 분석 결과 *Stappia sp.*로 동정 되었다. 102CH-429 균주는 Bennett's medium를 사용하여 20L fermentor(17L, 28°C, 110rpm)와 2L Erlenmeyer flask(1L × 8, 28°C, 110rpm)에 배양하였으며, 배양액(총 25L)은 연속원심분리기(6,000rpm)를 사용하여 배양여액과 균사체로 분리하였다. 분리된 배양 여액은 동일한 양(25L)의 EtOAc(EA)로 2번 추출하였다. 이 broth extract(bEA)을 감압 하에서 농축하여 추출물 13.95g을 얻었다.

### 2. *Stappia sp.* 102CH-429의 대사물질 분리 및 구조결정

EtOAc 추출물(13.95g)을 flash ODS column chromatography를 이용하여 20% MeOH로부터 20%씩 MeOH의 농도를 단계적으로 증가시키면서 극성에 따라 분획을 하였다. 이 중 40% MeOH 분획물을 세 부분으로 나누어 ODS-open chromatography를 이용하여 다시 한 번 세 개의 sub-fraction으로 나누었고, 그 중 <sup>1</sup>H NMR 상에서 특이한 peak들을 보였던 두 번째와 세 번째의 분획에서 대사물질을 분리, 정제하였다. 두 번째와 세 번째 분획을 C18 역상 HPLC(C18 reversed-phase HPLC, Column: YMC-ODS-A, 5 μm, 10×250 mm, 용매: 35% MeOH, 용출 속도: 1.5 ml/min, RI detector)로 정제하여 단일 물질 429-1을 얻었다(Fig. 3-135).

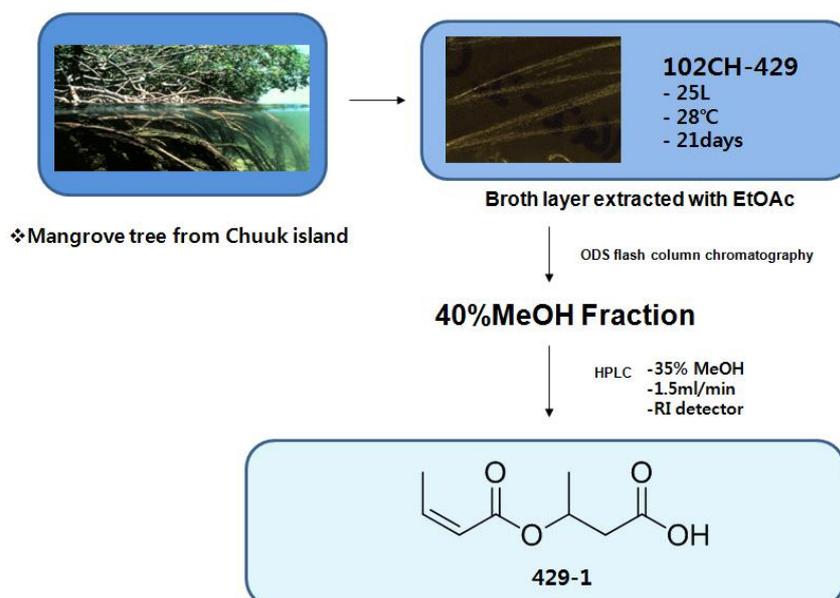


Fig. 3-135. Isolation scheme of 429-1.

Table 3-17. NMR data for 429-1 in CD<sub>3</sub>OD

No.	$\delta_c$	$\delta_H$ (mult, J = Hz)	COSY	HMBC
1	174.6			
2	41.9	2.53, 2.62(2H, ddd, 7.5 )	H-3	C-3, C-4
3	68.6	5.28(1H, m)	H-2, H-4	C-1, C-2, C-5
4	20.1	1.31(3H, d, 6.5)	H-3	
5	167.3			
6	121.6	5.75(1H, dd, 11.5)	H-7	C-5, C-8
7	146.3	6.37(1H, qd, 11.5, 7.0)	H-6, H-8	C-8
8	15.5	2.10(3H, d, 7.0)	H-7	C-6, C-7

화합물 429-1는 연한 갈색의 무정형의 화합물로 분리되었으며, <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C NMR과 APCI-LCMS(Fig. 3-144), ESI-HRMS(Fig. 3-145) 등의 데이터 해석을 통하여 분자식이 C<sub>8</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>임을 알 수 있었다. <sup>13</sup>C NMR spectrum(Fig. 3-140)에서 1개의 carboxyl carbon( $\delta_c$  174.6), 1개의 ester carbonyl carbon( $\delta_c$  167.3), 2개의 olefinic carbon( $\delta_c$  121.6, 146.3)과 1개의 oxygenated carbon( $\delta_c$  68.6)가 존재함을 알 수 있었다. 또한 <sup>1</sup>H NMR spectrum(Fig. 3-139)에서  $\delta_H$  5.75(H-6, d,  $J=11.5\text{Hz}$ )와  $\delta_H$  6.37(H-7, m,  $J=11.5\text{Hz}$ )의 olefinic proton들이 11.5Hz의 coupling constant를 가지는 것으로 보아 cis 형태의 구조로 존재하는 것을 알 수 있었다. 429-1의 부분구조 및 전체적인 평면구조는 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY(Fig. 3-141), gHSQC(Fig. 3-142), gHMBC(Fig. 3-143)와 같은 2D NMR의 상세한 해석을 통하여 규명하였다(Fig. 3-136). <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spectrum의 상세한 해석을 통하여 2개의 부분구조를 알 수 있었다. 먼저 H-2( $\delta_H$  2.53, 2.62)와 oxygenated proton인 H-3( $\delta_H$  5.28)가 correlation peak을 보여 서로 이웃하고 있음을 알 수 있었고, 또한 H-3는 H-4( $\delta_H$  1.31)와 correlation을 보여 H-2~H-4까지의 부분구조를 밝힐 수 있었다. 같은 방법으로, H-6( $\delta_H$  5.75)에서 H-8( $\delta_H$  2.10)까지의 부분구조도 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY correlation들의 면밀한 해석을 통하여 규명할 수 있었다.

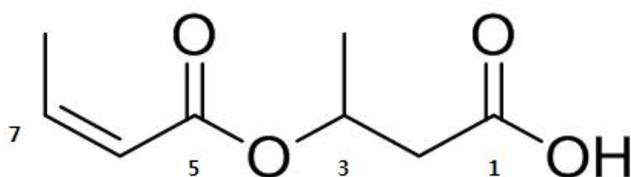


Fig. 3-136. The structure of 429-1.

gHMBC spectrum(Fig. 3-143)의 해석을 통하여 2개의 부분구조를 연결할 수 있었으며 **429-1**의 평면구조를 결정 할 수 있었다(Fig. 3-137). gHMBC spectrum에서 H-8( $\delta_H$  2.10)이 두 olefinic methine carbon( $\delta_C$  121.6, 146.3)들과 correlation을 하며, H-6( $\delta_H$  5.75)가 ester carbonyl carbon인 C-5( $\delta$  167.3)와 correlation을 통해 ester carbonyl 부분과 두 olefin 부분의 연결을 확인하였다. 그리고 산소와 연결된 H-3( $\delta_H$  5.28)가 C-2( $\delta_C$  41.9) 및 carboxyl carbon C-1( $\delta_C$  174.6)와 ester carbonyl carbon인 C-5( $\delta$  167.3)와 long-range correlation을 하는 것으로 보아 이들 부분구조를 연결 할 수 있었다. **429-1**의 구조를 1D, 2D NMR 및 MS 등의 체계적인 분광학적 분석을 통하여 밝힌 결과, 이 물질의 trans olefin의 형태는 합성으로 만들어 졌지만(Hocking, 1969), cis olefin을 가지고 있는 **429-1**는 천연자원에서는 지금까지 보고된 적이 없는 신규 천연물임을 알 수 있었다.

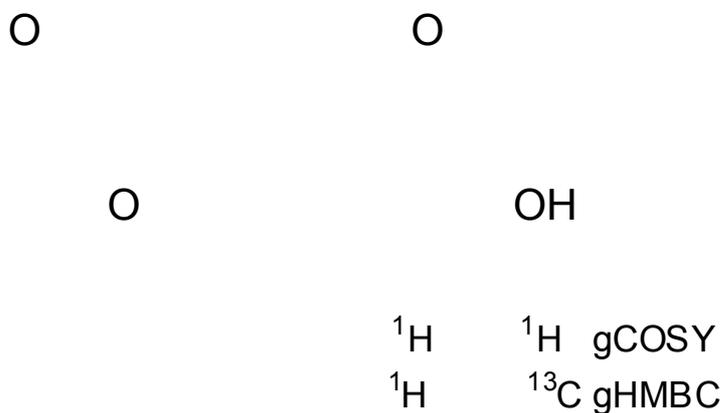


Fig. 3-137. Key  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and HMBC data for **429-1**.

### 3. 신규 화합물 429-1의 합성

화합물 429-1은 crotonic acid의 dimer 형태를 가지고 있는데 dimer의 형태로 합성을 하는 것은 논문에서 보고 된 바 있으나(Hocking, 1969), 화합물 429-1의 생리활성이 보고된 적이 없기 때문에 (*E*)-429-1 및 본 연구에서 천연물로서 분리한 (*Z*)-429-1의 활성연구와 이 물질의 효율적인 합성법을 개발하기 위하여 합성을 진행하였다. 429-1의 합성은 monomer 형태인 crotonic acid를 이용하여 dimer의 형태인 429-1을 합성하고자 하였다. 먼저, crotonic acid를 toluene에 녹여 130°C로 가열하여 72시간 동안 반응(Fig. 3-138)한 후에, EtOAc를 이용하여 work-up을 하여 EtOAc 층을 감압 하에서 농축하였다. 농축 후에 반응이 이루어 지지 않은 crotonic acid를 제외한 노란색 액체부분만을 보아 NMR로 반응을 확인하였다. 합성된 물질의 <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C NMR spectrum(Fig. 3-146, 147)을 확인한 결과, 분리된 (*Z*)-form의 429-1과는 다른 (*E*)-form의 429-1인 (*E*)-3-(but-2-enoyloxy)butanoic acid를 얻을 수 있었다(Fig. 3-138). 향후에 (*Z*)-429-1의 합성을 통해 천연물과 합성물의 다양한 활성을 알아보고 dimer 형태뿐 만 아니라 trimer 등의 다양한 형태의 유도체를 합성하여 활성을 알아 볼 계획이다.

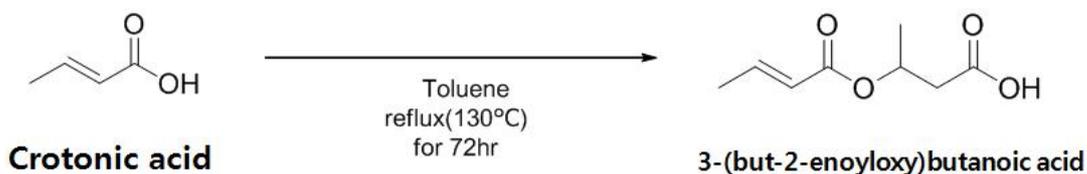


Fig. 3-138. Synthesis scheme of (*E*)-3-(but-2-enoyloxy)butanoic acid.

102CH-429-25I-b2R-rf408-3-rp13-1H-cd3od

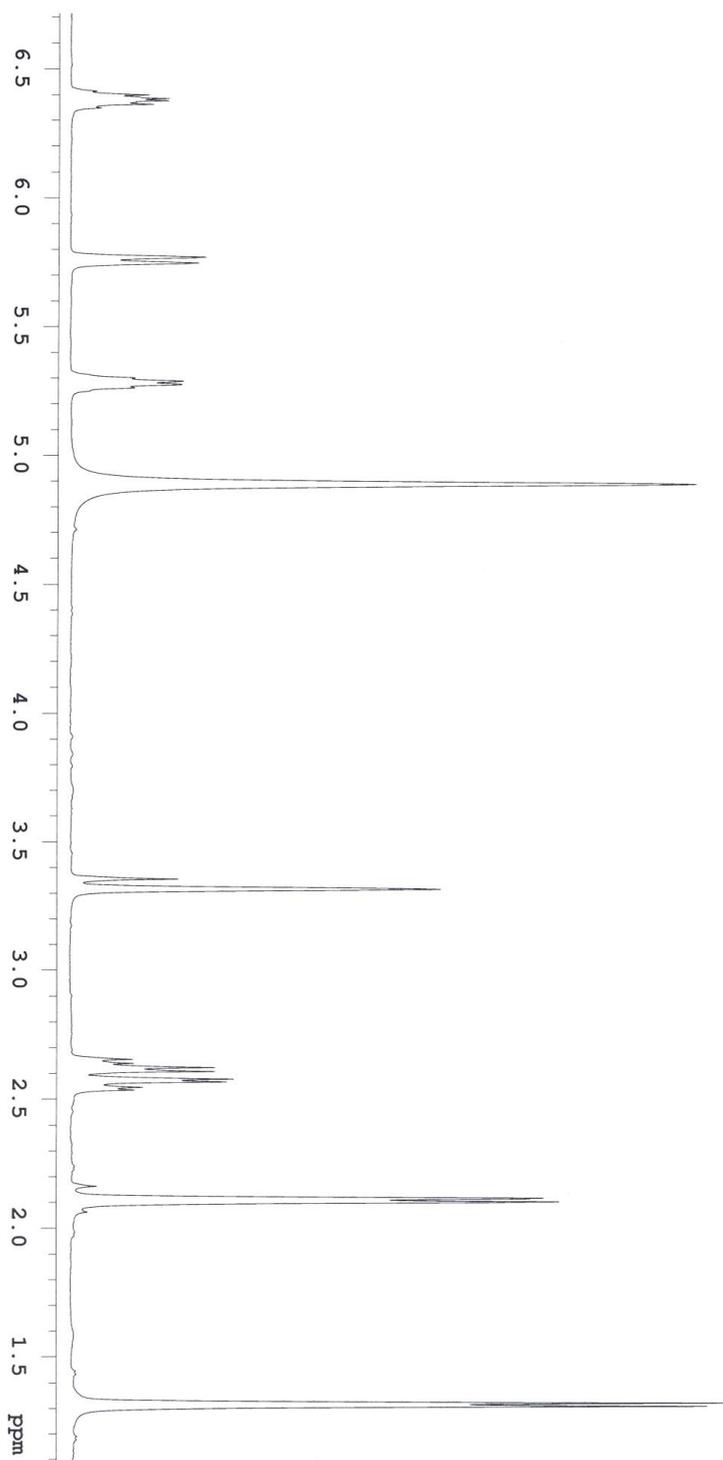


Fig. 3-139.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 429-1.

102CH-429-25L-DBA-rfC40%-3-rp13-13C-CD3OD

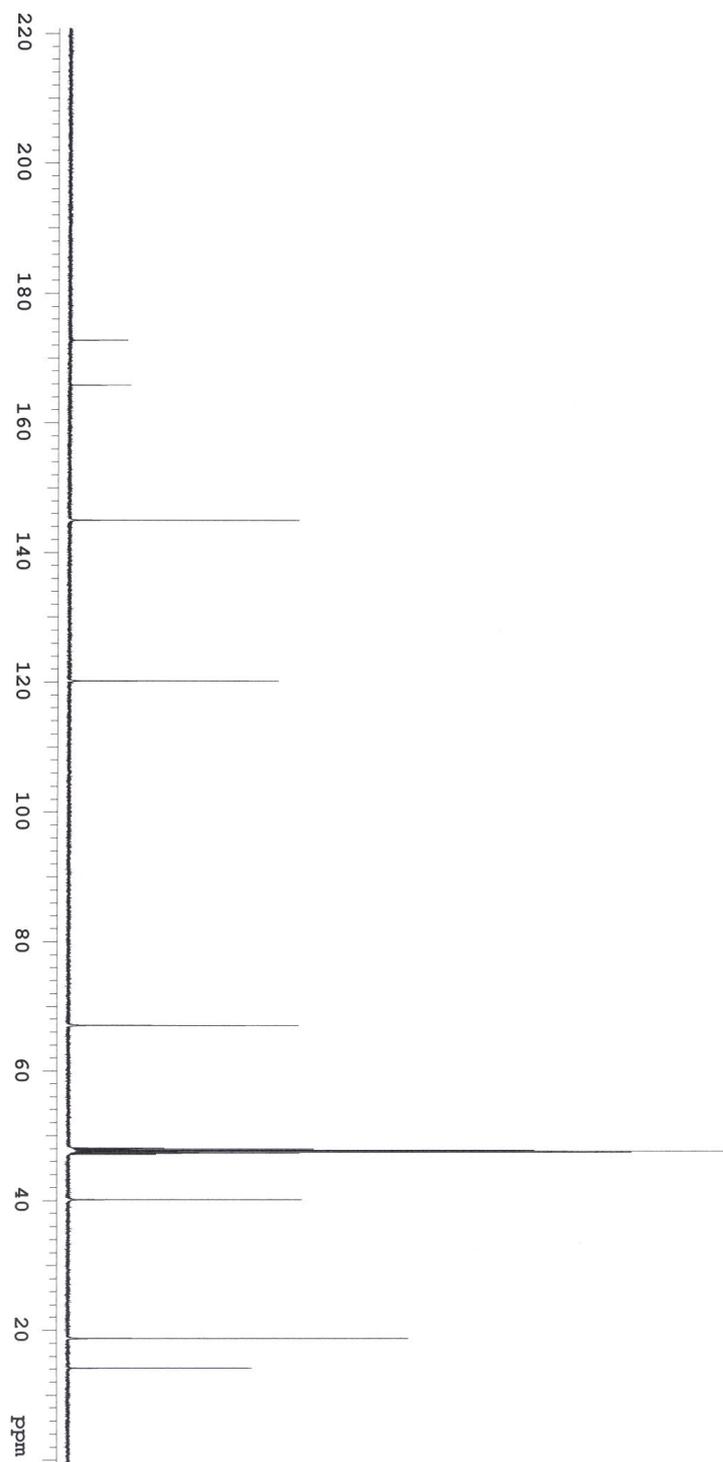


Fig. 3-140.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 429-1.

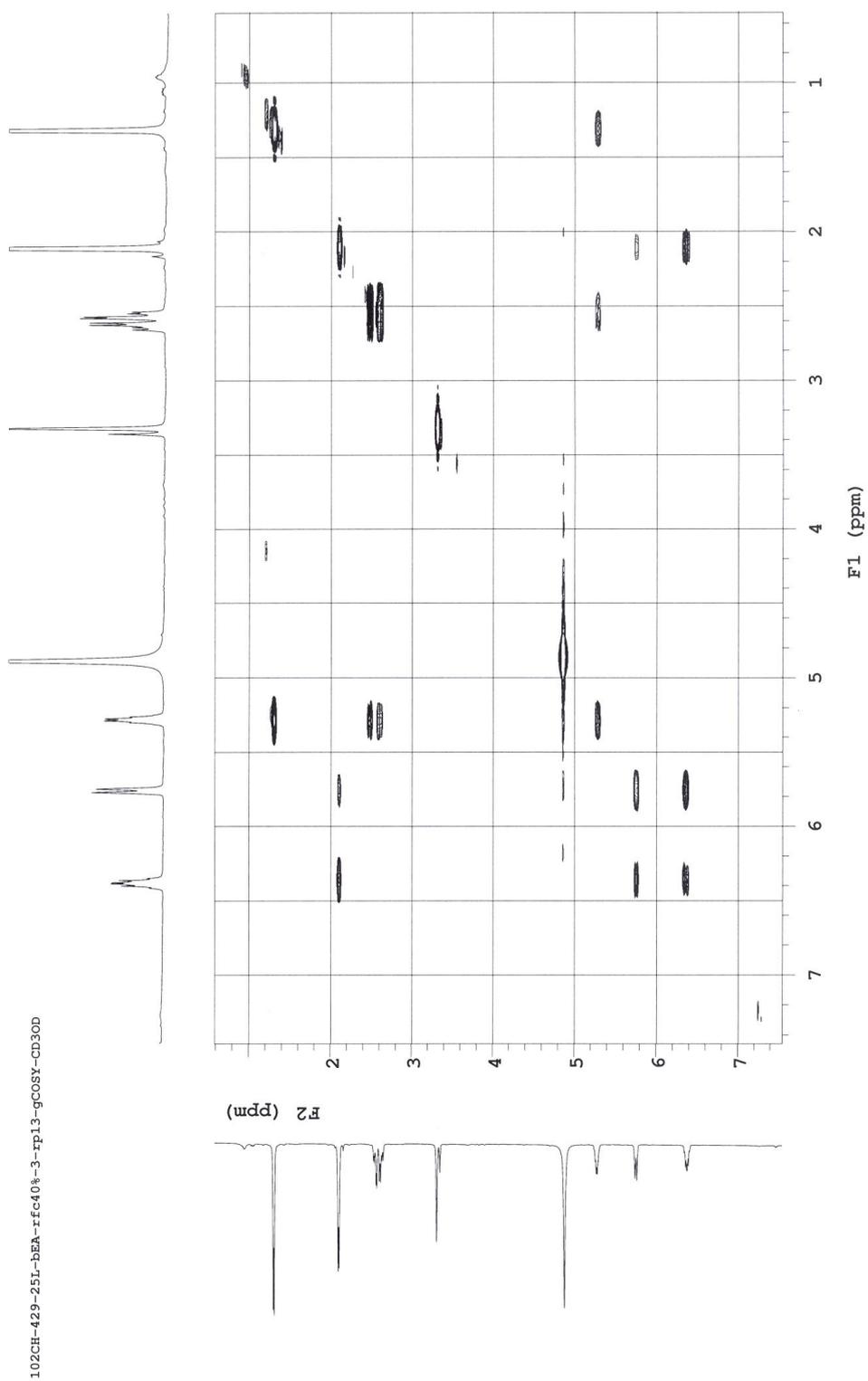


Fig. 3-141. gCOSY spectrum of 429-1.

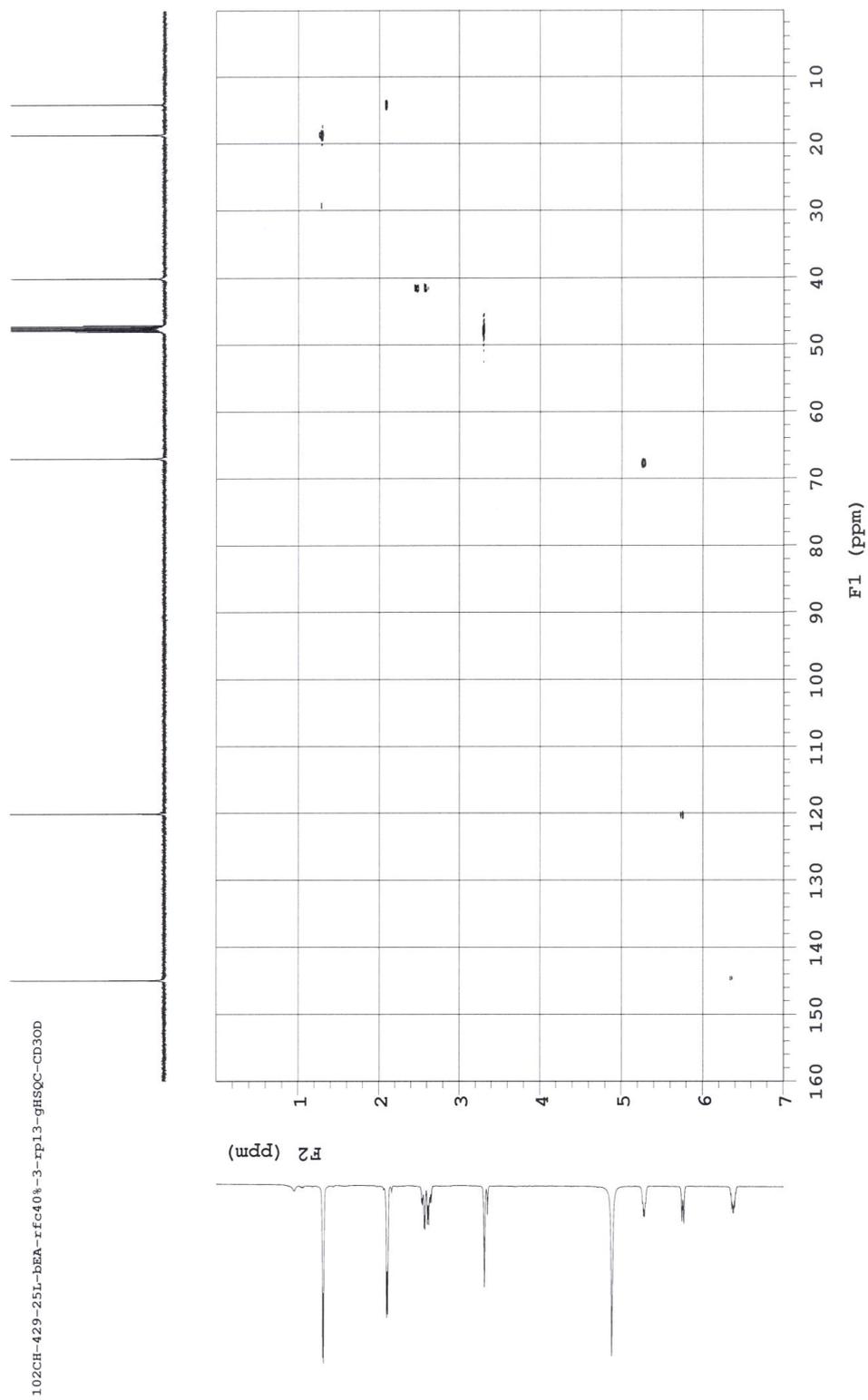


Fig. 3-142. gHSQC spectrum of 429-1.

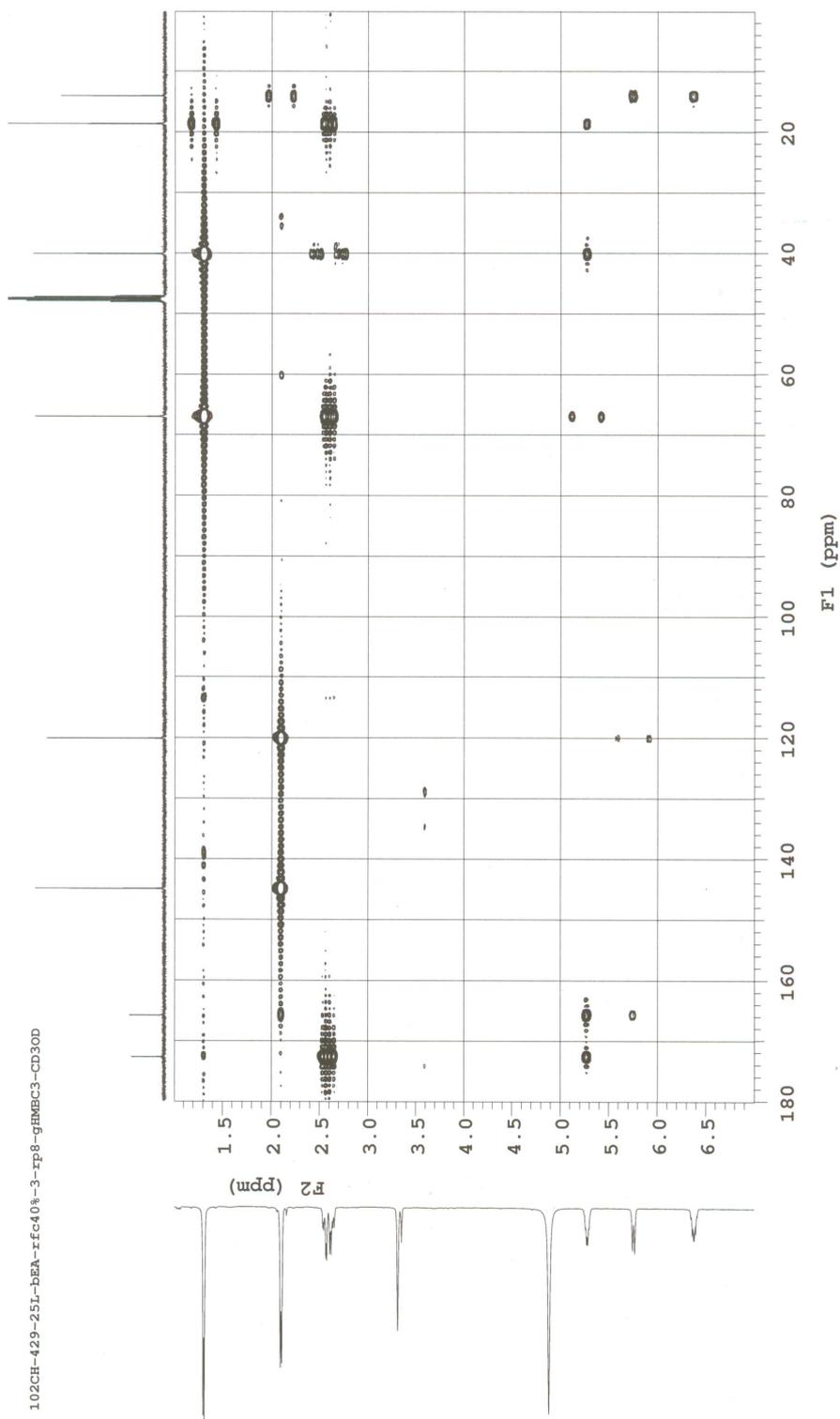


Fig. 3-143. gHMBC spectrum of 429-1.

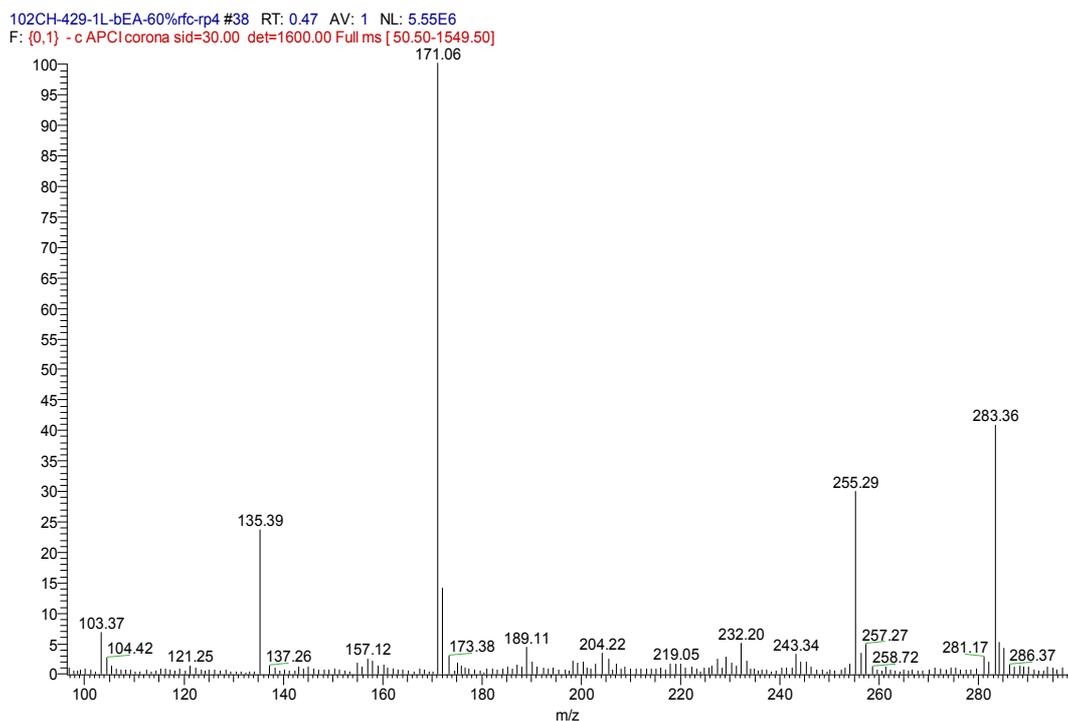
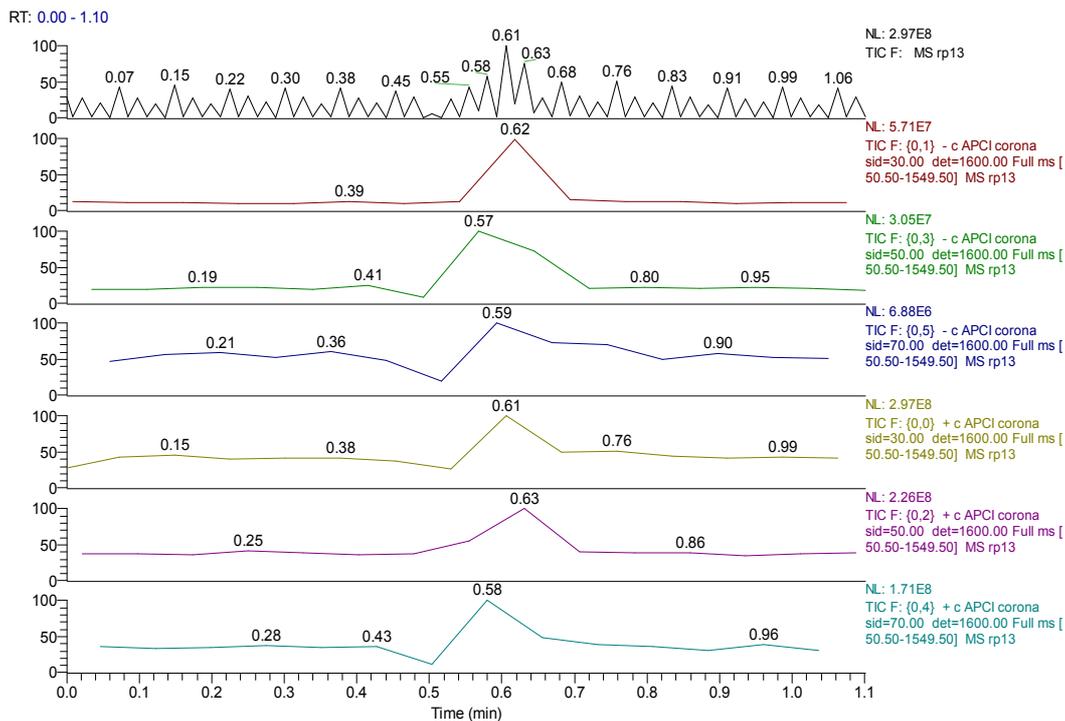


Fig. 3-144. APCI mass spectrum of 429-1 (negative mode).

## Elemental Composition Report

### Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

### Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

16 formula(e) evaluated with 1 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 1-100 H: 1-100 O: 1-100

Minimum: -1.5

Maximum: 5.0 5.0 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf(%)	Formula
171.0662	171.0657	0.5	2.9	3.5	366.3	n/a	n/a	C8 H11 O4

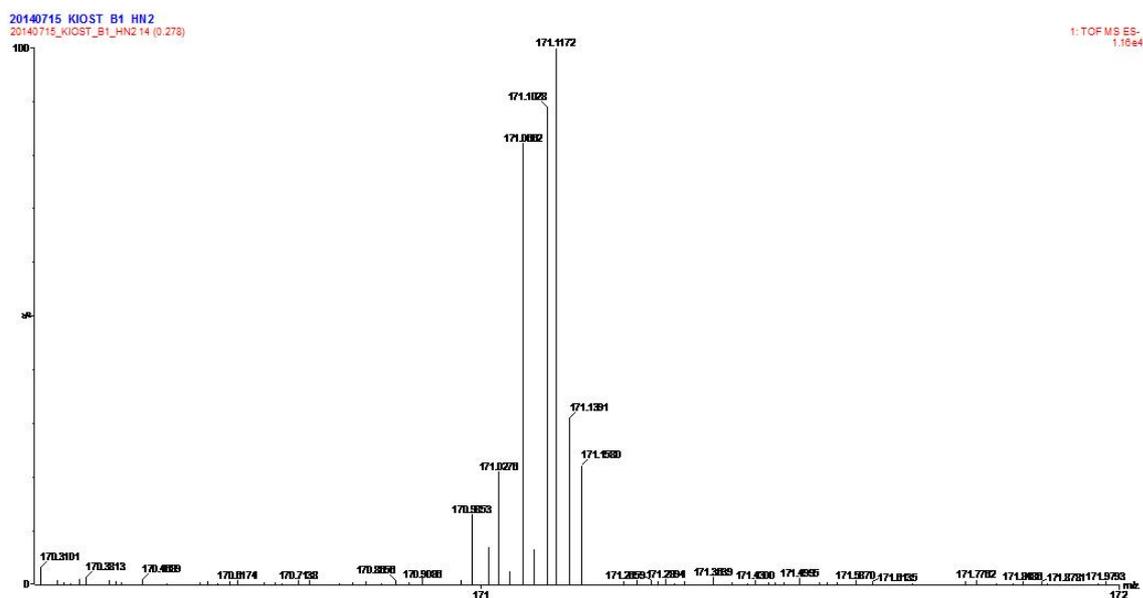


Fig. 3-145. ESI-HRMS spectrum of 429-1.

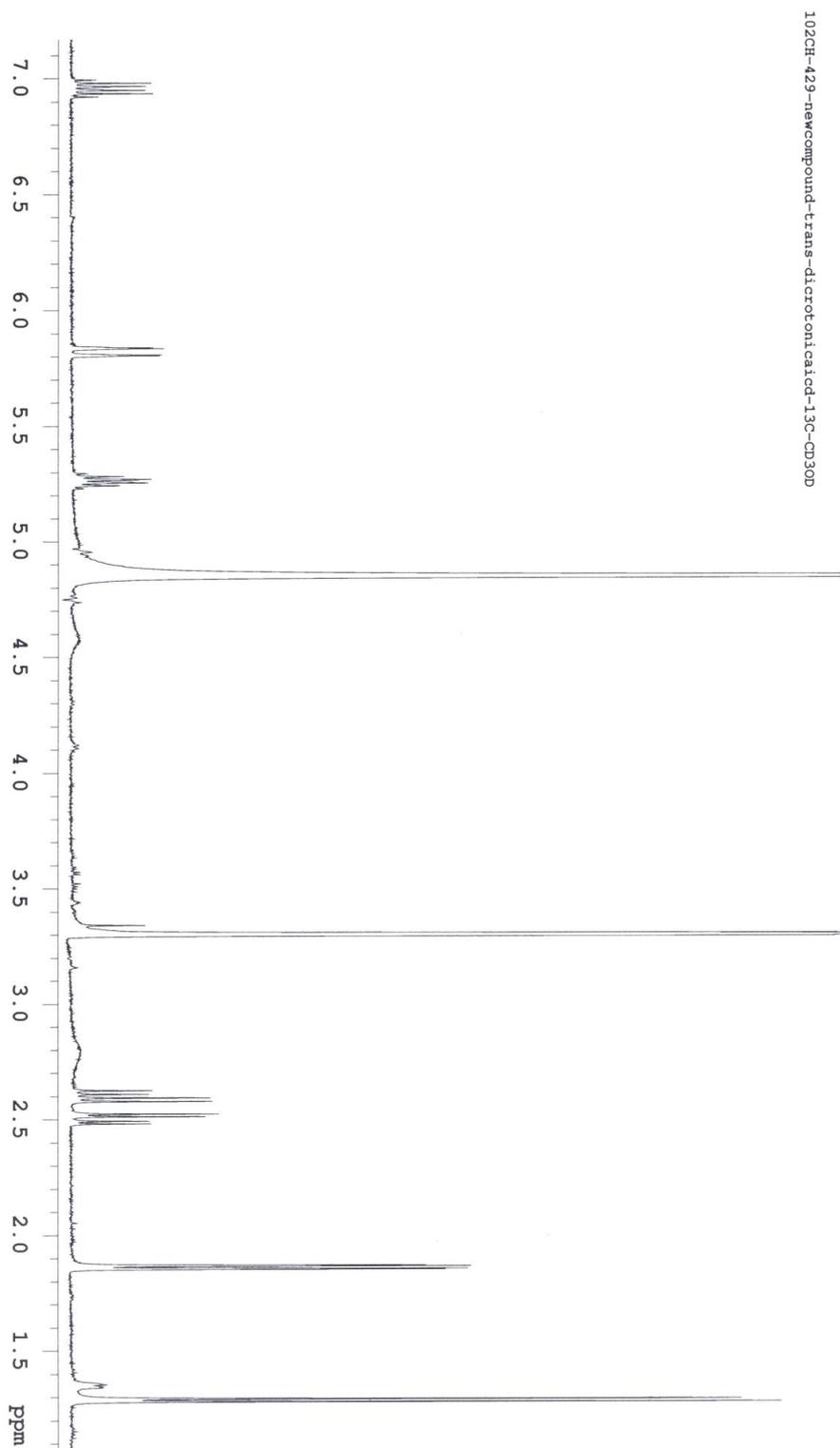


Fig. 3-146.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of (*E*)-3-(but-2-enoyloxy)butanoic acid.

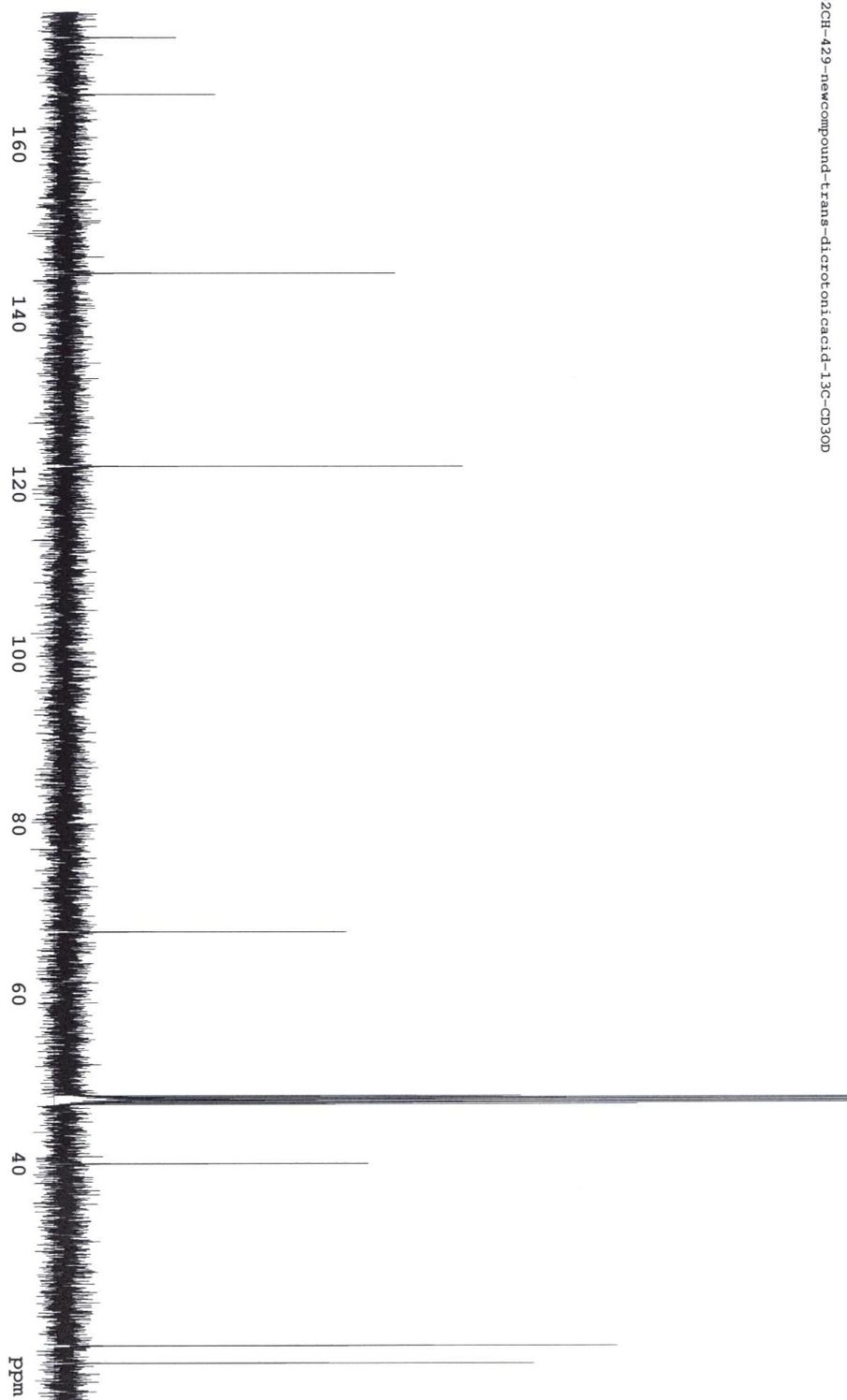


Fig. 3-147.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of (*E*)-3-(but-2-enyloxy)butanoic acid.

## 제 9 절. *Penicillium citrinum* 1310CH-032의 대사물질 분리 및 구조결정

### 1. *Penicillium citrinum* 1310CH-032의 분리, 동정 및 배양

마이크로네시아 축주 인근에서 채집된 해면동물로부터 분리된 1310CH-032 균주는 18s rRNA 염기서열 동정 결과, *Penicillium citrinum*로 확인되었다. 1310CH-032 균주의 single colony를 BN 한천배지에서 배양한 후에, BN broth가 첨가된 500 mL flask에 접종하여 28°C에서 120 rpm으로 7일간 중균배양을 하였다. 대량배양은 2L Erlenmeyer flask 사용하여 실시하였으며, 1.25L씩의 배지를 담은 20개의 플라스크에 중균배양액을 접종하여 28°C, 120rpm의 조건으로 8일간 배양하여 총 25L의 배양액을 얻었다. 얻어진 배양액을 연속원심분리기(6,000rpm)를 사용하여 균체를 배양액으로부터 분리하였다. 분리된 배양 여액은 동일한 양(25L)의 EtOAc(EA)로 2회 추출하여 감압하에서 농축하여 추출물 2.5g을 얻었다.

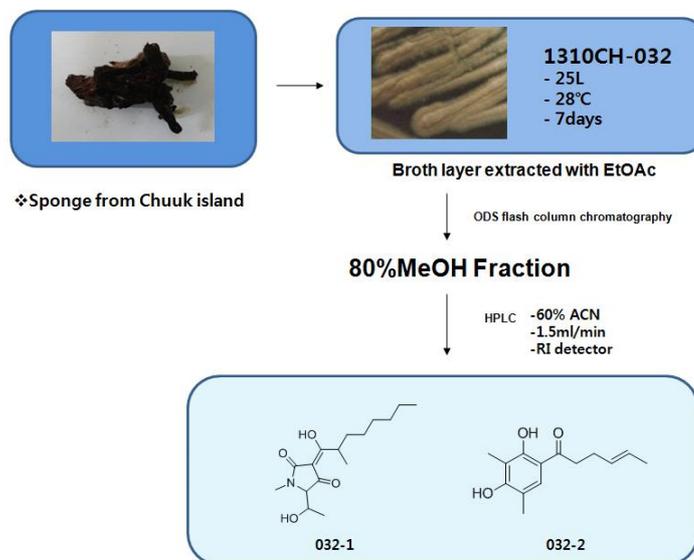


Fig. 3-148. Isolation scheme of 032-1 and 032-2.

### 2. *Penicillium citrinum* 1310CH-032의 대사물질 분리 및 구조결정

EtOAc 추출물(2.5g)을 flash ODS column chromatography를 이용하여 20% MeOH로부터 20%씩 MeOH의 농도를 단계적으로 증가 시키면서 극성에 따라 분획을 하였다. 이 중 80% MeOH 분획물을 다시 ODS-open chromatography를 실시하여 70%, 75%, 80% MeOH 분획으로 나누었고, 세 분획 중에서 75% MeOH 분획물을 C18 역상 HPLC(C18 reversed-phase HPLC, Column: YMC-ODS-A, 5  $\mu$ m, 10×250 mm, 용매: 75% MeOH, 용출 속도: 1.5 ml/min, RI detector)로 정제하여 보유시간 45분에 나

오는 피크 rp9를 얻었다.  $^1\text{H}$  NMR spectrum(Fig. 3-151)을 확인해 본 결과, 이 피크는 두 개의 물질이 섞여 있음을 알 수 있었다. rp9를 다시 C18 역상 HPLC(C18 reversed-phase HPLC, Column: YMC-ODS-A, 5  $\mu\text{m}$ , 4.6 $\times$ 250 mm, 용매: 60%  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 용출 속도: 1.5 ml/min, RI detector)로 정제하여 화합물 **032-1**(10.6 mg, 보유시간 42분)과 **032-2**(1.5mg, 보유시간 47분)을 순수하게 분리 하였다(Fig. 3-148).

**032-1**은 연한 갈색의 무정형의 화합물로 분리 되었으며,  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C}$  NMR과 APCI-LCMS (Fig. 3-156)등의 데이터 해석을 통하여 분자식이  $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{NO}_4$ 임을 알 수 있었다.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum(Fig. 3-152)에서  $\delta_{\text{C}}$  194.7에 ketone이 1개 존재하고  $\delta_{\text{C}}$  174.1에 amide carbonyl group이 1개 존재 하는 것을 알 수 있었다. 또한  $\delta_{\text{C}}$  101.0,  $\delta_{\text{C}}$  192.9에 각각 1개씩의 quaternary carbon이 존재하고  $\delta_{\text{C}}$  66.6에 oxygenated carbon이 존재하는 것을 알 수 있었다. 그리고 spectrum 상에서 up-field 부분에 다수의 methyl 및 methylene group이 존재하는 것을 알 수 있었다. gHSQC spectrum(Fig. 3-154)을 통해 각각의 carbon에 연결된 proton을 알 수 있었는데, 3개의 methine proton들( $\delta_{\text{H}}$  3.53, 3.77, 4.17)과 5개의 methylene proton들과 4개의 methyl proton들( $\delta_{\text{H}}$  0.84, 1.12, 1.15, 2.97)이 있음을 확인 할 수 있었고, 그 중  $\delta_{\text{H}}$  2.97은  $-\text{NCH}_3$ 임을 알 수 있었다. **032-1**의 부분구조 및 전체적인 평면구조를  $^1\text{H}-^1\text{H}$  COSY(Fig. 3-153), gHSQC(Fig. 3-154), gHMBC(Fig. 3-155)와 같은 2D NMR의 상세한 해석을 통하여 규명하였다(Fig. 3-149). 먼저,  $^1\text{H}-^1\text{H}$  COSY spectrum(Fig. 3-153)을 통해 2개의 부분구조를 알 수 있었는데, 그 중에 methine proton인 H-5( $\delta_{\text{H}}$  3.77)와 methine proton인 H-6( $\delta_{\text{H}}$  4.17)가 correlation이 되고 methine proton인 H-6( $\delta_{\text{H}}$  4.17)가 methyl proton인 H-7( $\delta_{\text{H}}$  1.12)와 correlation peak를 확인하였다. 그리고 또 다른 methine proton인 H-9( $\delta_{\text{H}}$  3.53)이 H-16( $\delta_{\text{H}}$  1.15)의 methyl proton과의 연결을 확인하였고 H-9( $\delta_{\text{H}}$  3.53)부터 H-15( $\delta_{\text{H}}$  0.84)까지의 correlation peak들을 통해 나머지 부분구조를 결정하였다.

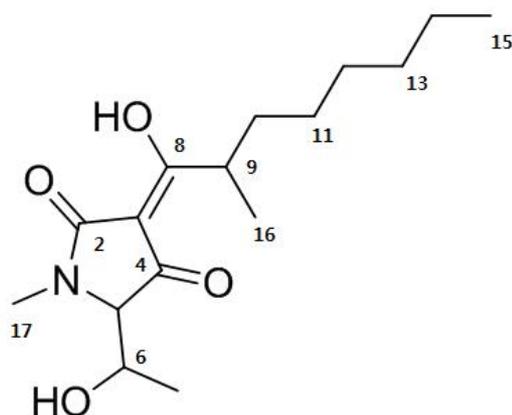


Fig. 3-149. The structure of **032-1**.

Table 3-18. NMR Spectral data for **032-1** in CDCl<sub>3</sub>

No.	$\delta_C$	$\delta_H$ (mult, $J = \text{Hz}$ )	COSY	HMBC
N				
2	174.1			
3	101.0			
4	194.7			
5	68.6	3.77(1H, d, 4.0)	H-6	C-4, C-6, C-7
6	66.6	4.17(1H, qd, 4.0, 6.5)	H-5, H-7	C-3, C-4, C-5
7	17.7	1.12(3H, d, 6.5)	H-6	
8	192.9			
9	36.5	3.53(1H, m)	H-16	C-3, C-8, C-10 C-16
10a		1.44(1H, m)		
10b	33.5	1.66(1H, m)	H-9, H-11	C-9, C-11, C-16
11	27.2	1.21-1.32(2H, m)	H-10, H-12	
12	29.2	1.21-1.32(2H, m)	H-11, H-13	
13	22.5	1.21-1.32(2H, m)	H-12, H-14	
14	31.6	1.21-1.32(2H, m)	H-13, H-15	
15	14.0	0.84(3H, t, 7.0)	H-14	C-13, C-14
16	17.1	1.15(3H, d, 7.0)	H-9	C-8, C-9
17	27.2	2.97(3H, s)		C-2, C-5

gHMBC spectrum(Fig. 3-155)의 해석을 통하여 3개의 부분구조 및 overlapping으로 COSY correlation의 해석이 어려웠던 H-10에서 H-14까지의 연결을 할 수 있었으며 **032-1**의 평면 구조를 결정 할 수 있었다(Fig. 3-150). gHMBC spectrum에서 H-9( $\delta_H$  3.53)은 oxygenated carbon인 C-8( $\delta_C$  192.9)과  $sp^2$  quaternary carbon인 C-3( $\delta_C$  101.0)와 correlation을 보여 이들 부분의 구조를 연결할 수 있었다. H-10( $\delta_H$  1.44, 1.66)은 C-9( $\delta_C$  36.5), C-11( $\delta_C$  27.2), C-16( $\delta_C$  17.1)과 long-range correlation을 보였으며, 이들 상관관계의 해석을 통하여 이들 사이의 부분 구조를 연결할 수 있었다. 또한 H-17( $\delta_H$  2.97)은 amide carbonyl carbon인 C-2( $\delta_C$  174.1)와 methine carbon C-5( $\delta_C$  68.6)와 correlation을 보였으며, 또 다른 methine proton인 H-5( $\delta_H$  3.77)는 oxygenated methine C-6( $\delta_C$  66.6) 및 C-7( $\delta_C$  17.7)과 correlation이 확인되었으며, 이들 상관관계를 통하여 C-5와 C-6가 연결되어 있음을 알 수가 있었다. 그리고 H-5( $\delta_H$  3.77)가 C-4( $\delta_C$  194.7)와 correlation함으로써 tetramic acid 구조를 가진 물질이라는 것을 예상 할 수 있었다. 결정적으로 H-6( $\delta_H$  4.17)가 C-5( $\delta_C$  68.6), C-4( $\delta_C$  194.7)와 correlation을 하고, C-3( $\delta_C$  101.0)와 4 bond의 long-range correlation을 보임으로써 tetramic acid 구조에 side chain이 붙어 있는 형태의 구조임을 알 수 있었다. Tetramic acid 구조를 가진 화합물에

대하여 문헌(Mo, *et al*, 2014)을 조사해 본 결과, tetramic acid 구조는 C-3를 기준으로 amide carbonyl group인  $\delta_C$  174.1와 ketone으로 예상되었던 C-8( $\delta_C$  194.7)이 keto-enol form으로 존재한다는 것을 알게 되었으며, 보통의 oxygenated  $sp^2$  quaternary carbon과는 조금 다른 화학적 이동값을 가지게 되었고 이를 바탕으로 **032-1**의 평면구조를 완성하게 되었다.

각종 2D NMR의 해석을 통해서 결정된 **032-1**의 평면구조를 바탕으로 문헌을 조사해 본 결과, 인간 백혈병 세포주인 HL-60에 세포독성 활성이 있는 것으로 알려진 penicillenol A<sub>1</sub>(Lin, *et al*, 2008)과 동일한 구조임을 알 수 있었다. 이 물질은 항암활성 이외에는 아직 보고가 되지 않았으나 구조가 매우 특이한 점으로 미루어 보아 다양한 활성을 가지고 있을 것으로 기대된다.

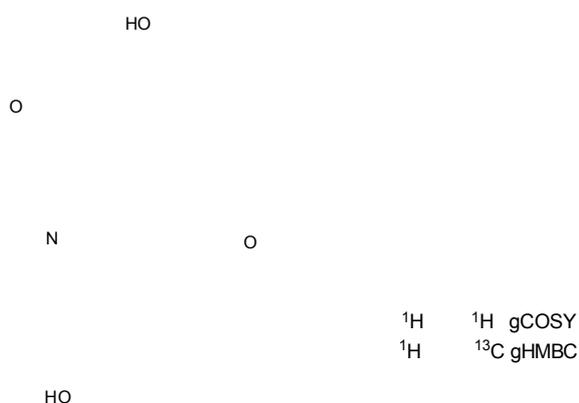


Fig. 3-150. Key  $^1\text{H}-^1\text{H}$  COSY, and HMBC data for **032-1**.

1310CH-032-25L-BEA-FC80MM-FC75MM-HPIC-PP9-ACN-IPI-1H-CDCL3

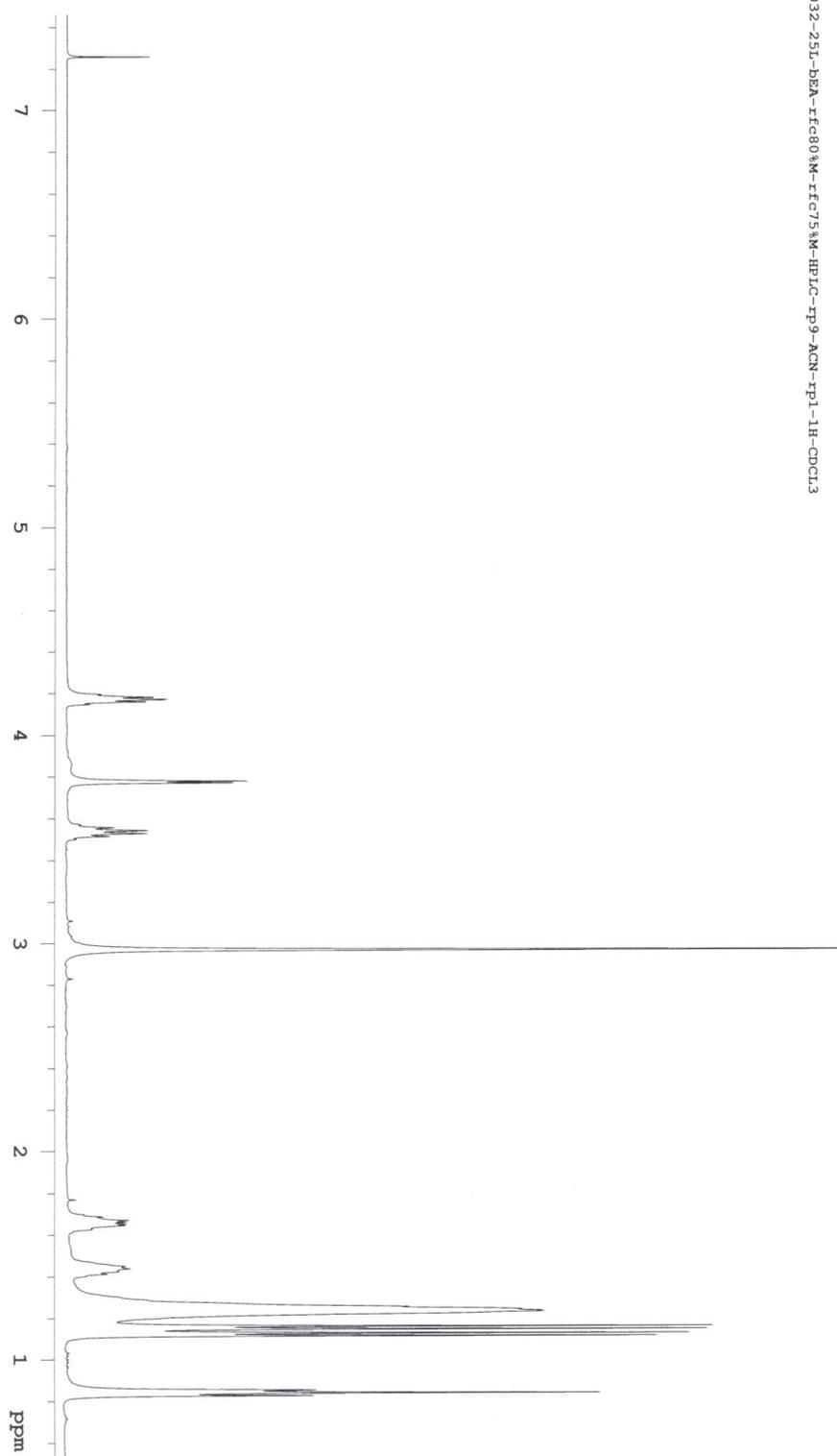


Fig. 3-151.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 032-1.

1310CH-032-25I-bRA-rfG80\M-rfG75\M-HPLC-rp9-ACN-rp1-13C-GDCL3

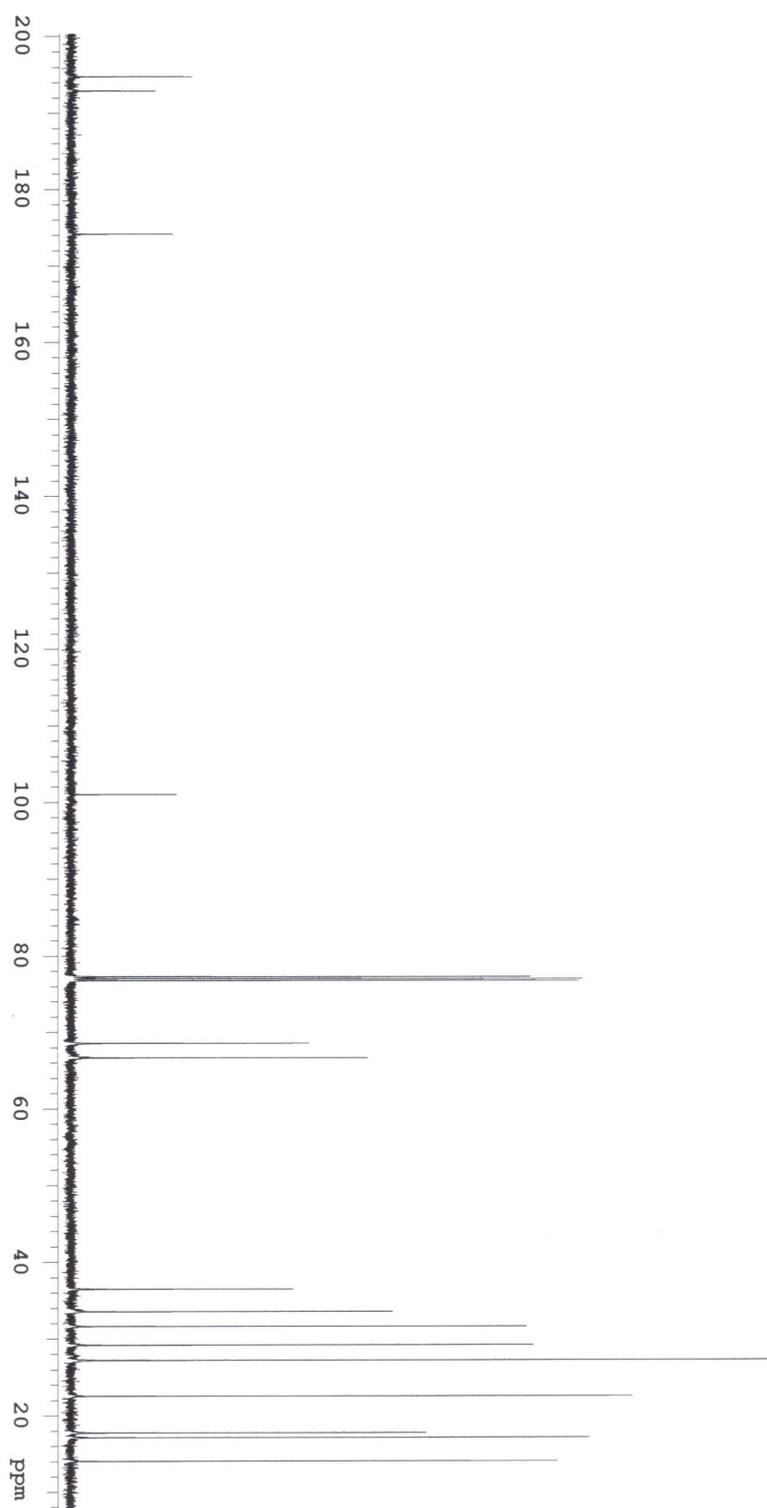


Fig. 3-152. <sup>13</sup>C NMR spectrum of 032-1.

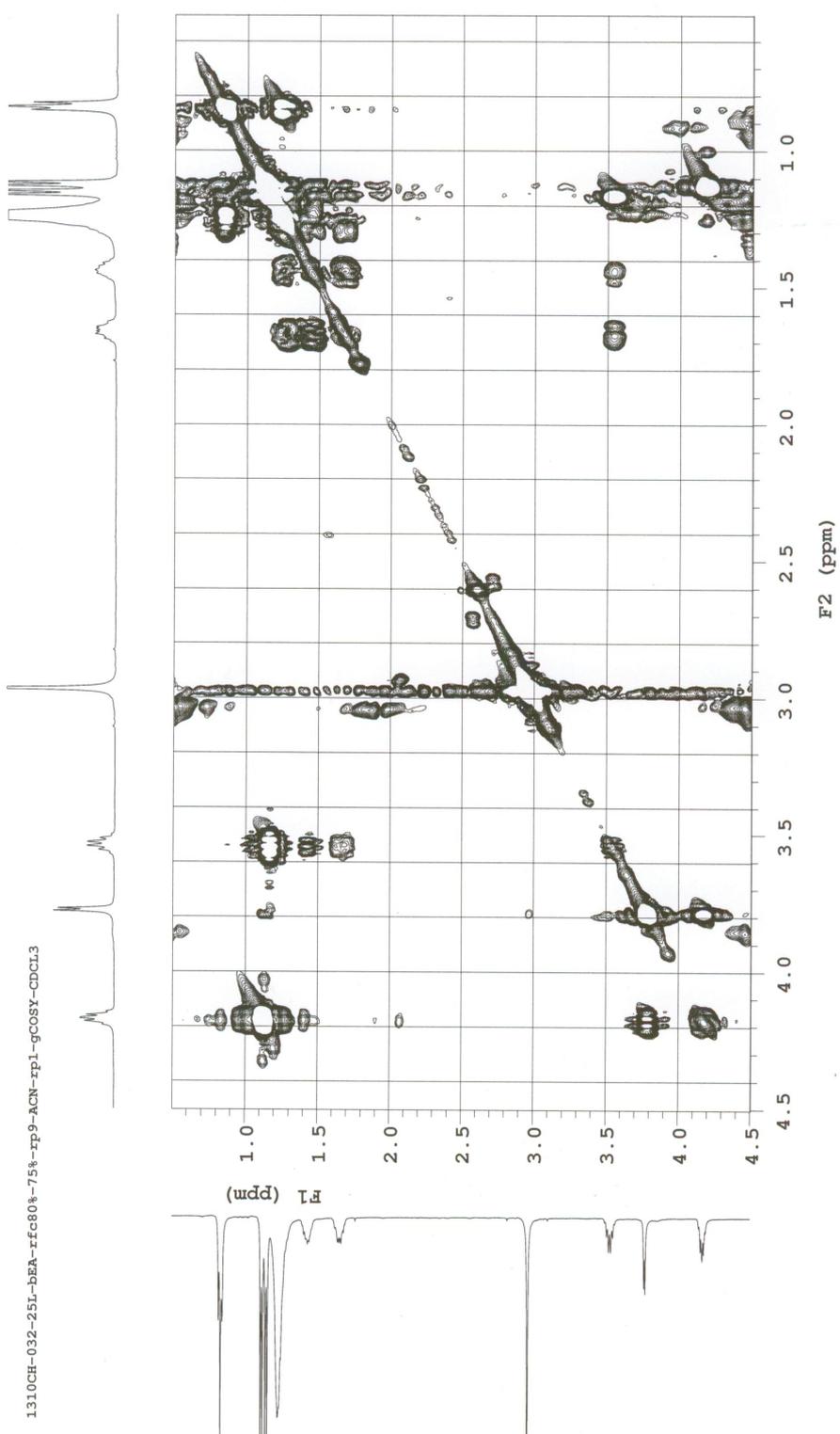


Fig. 3-153. gCOSY spectrum of 032-1.

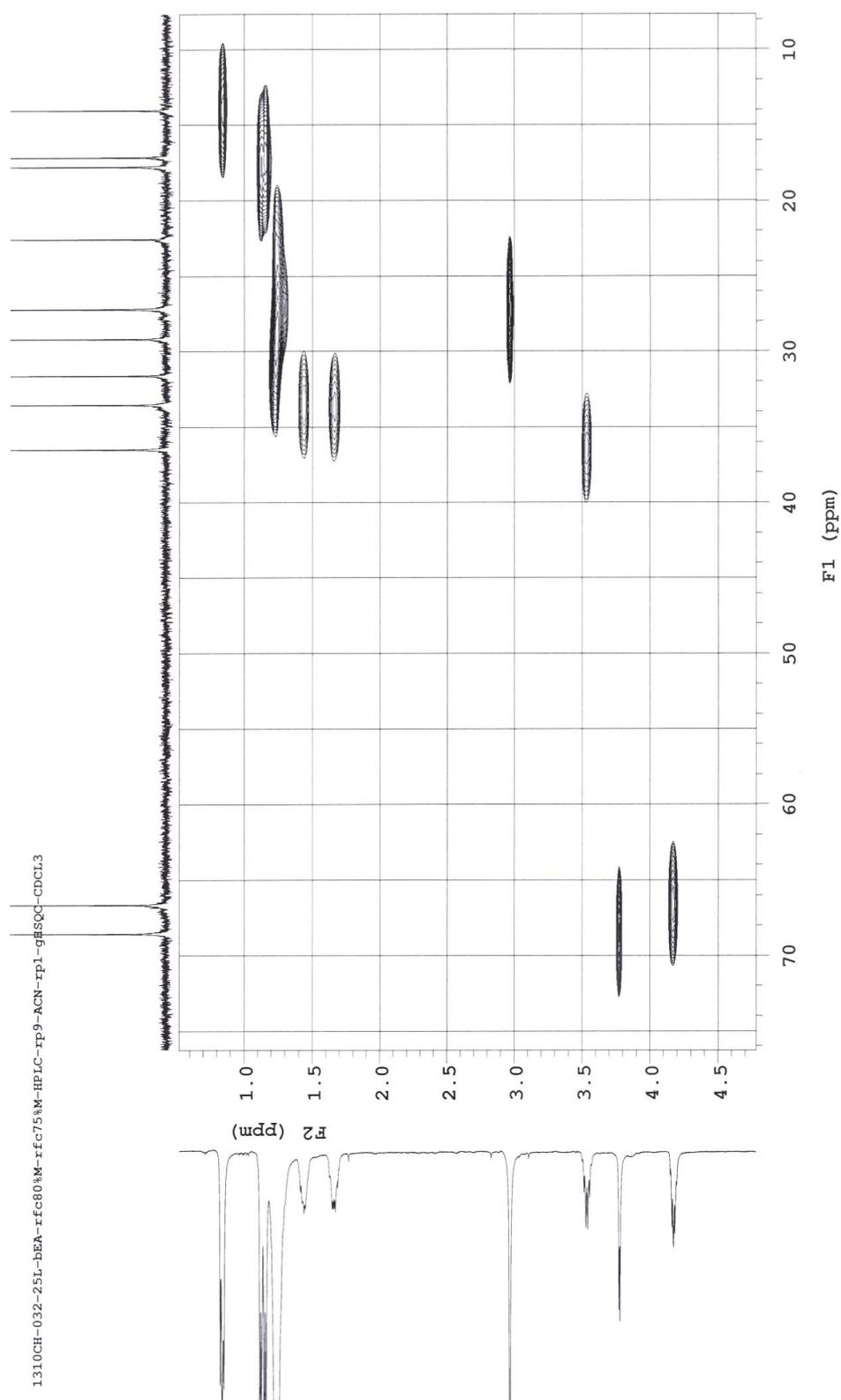


Fig. 3-154. gHSQC spectrum of 032-1.

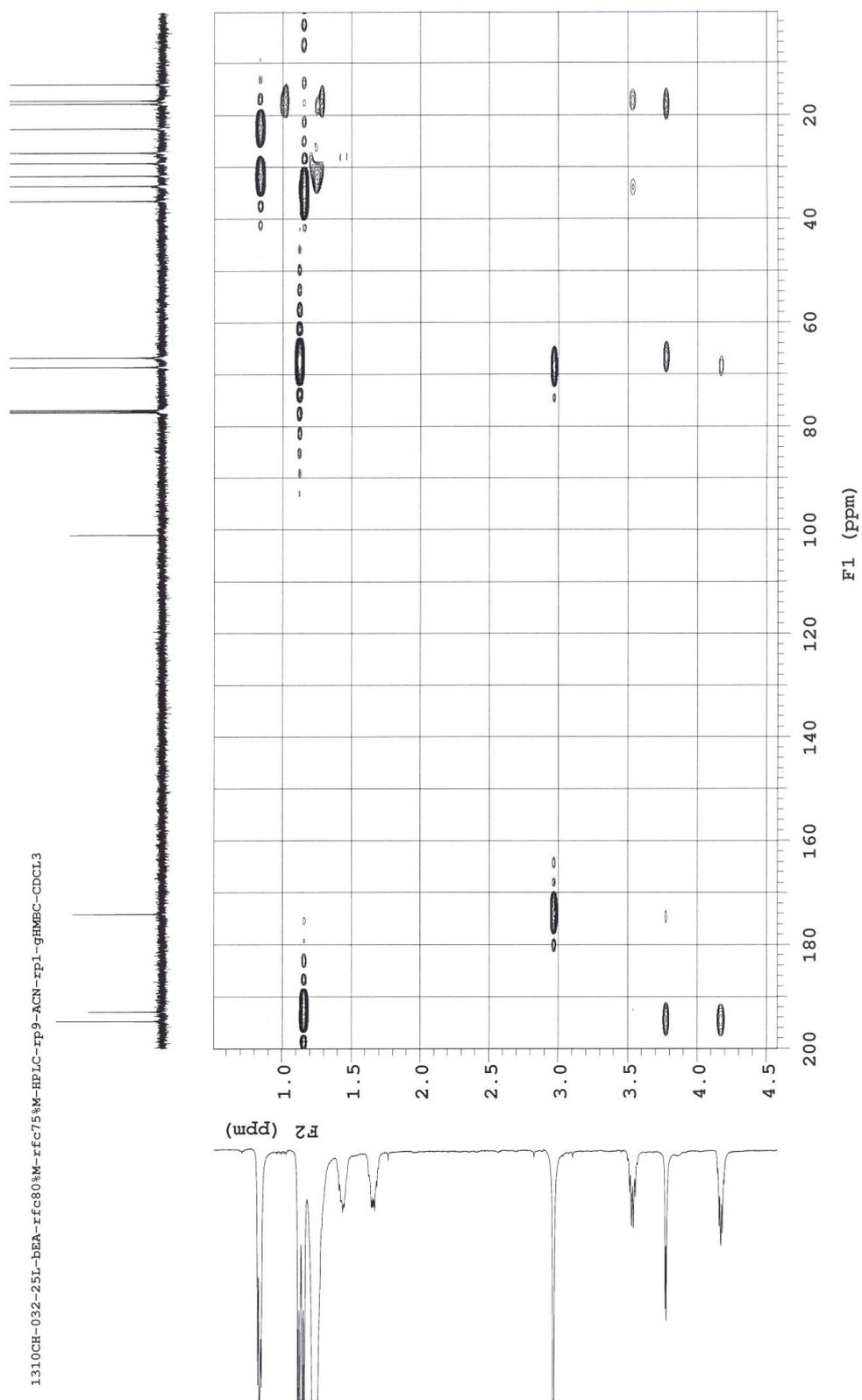


Fig. 3-155. gHMBC spectrum of 032-1.

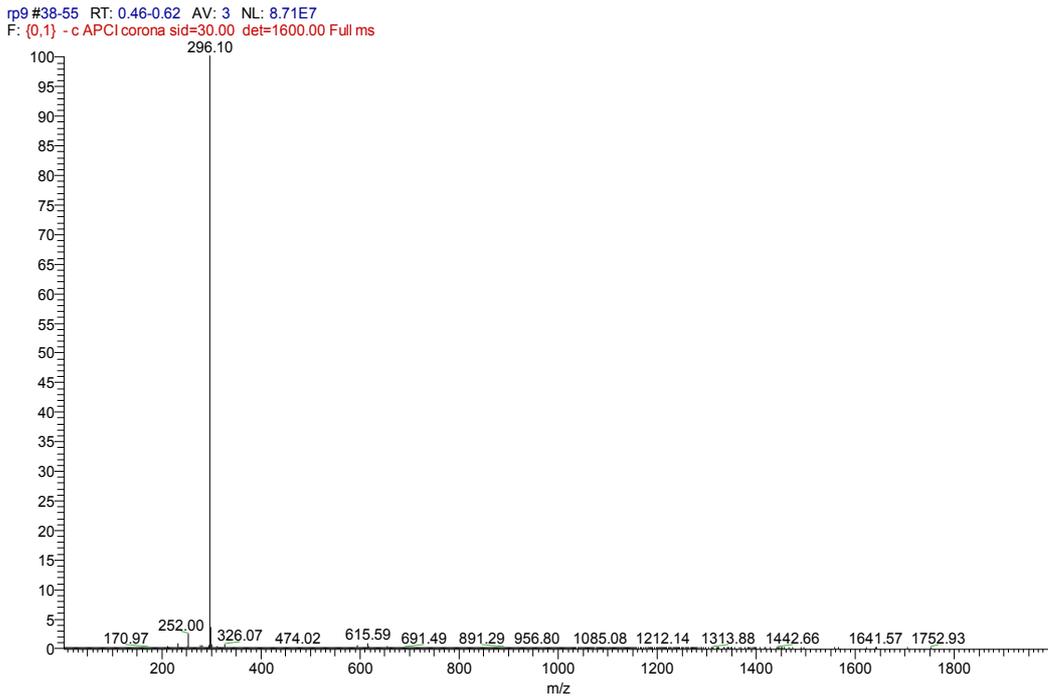
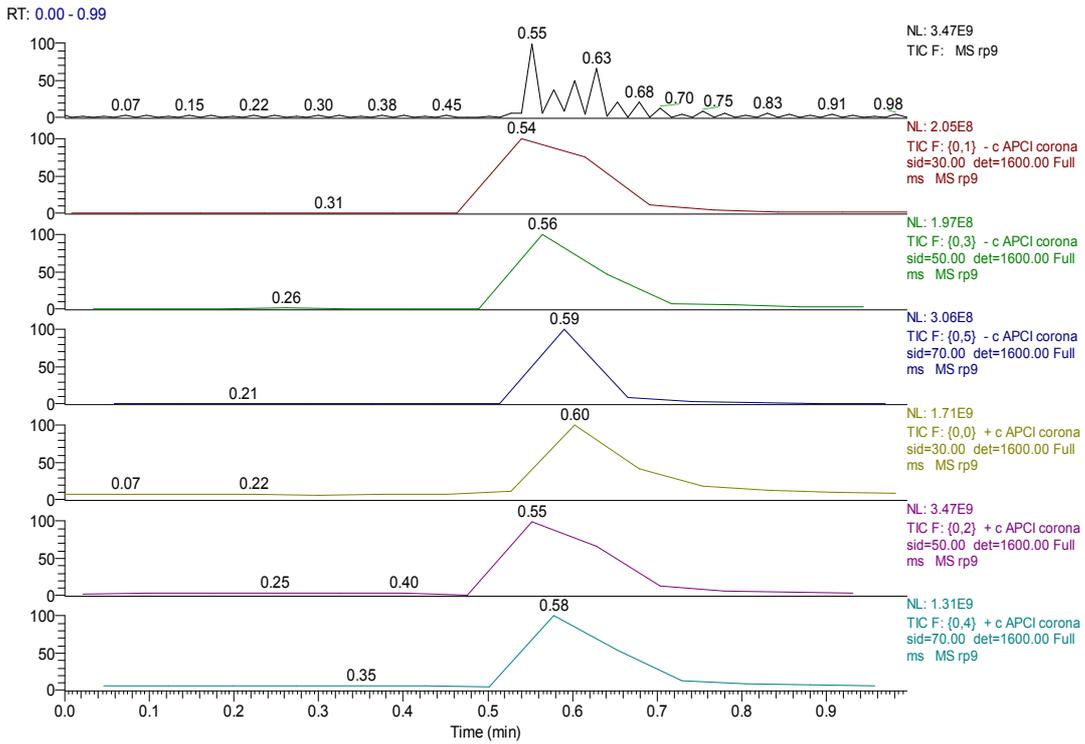


Fig. 3-156. APCI mass spectrum of 032-1 (negative mode).

**032-2**는 노란색의 무정형의 화합물로 분리 되었으며,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR과 APCI-LCMS(Fig. 3-164) 등의 데이터 해석을 통하여 분자식이  $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{O}_3$  임을 알 수 있었다(Fig. 3-157).  $^1\text{H}$  NMR spectrum(Fig. 3-159)에서 1개의 방향족 수소( $\delta_{\text{H}}$  7.45)가 존재하고 그 형태가 singlet peak인 것으로 보아 주위가 모두 치환되어 있는 구조를 가진 proton임을 알 수 있었다. 그리고  $\delta_{\text{H}}$  5.50은 하나의 proton으로 보였지만 integration 값을 통해 2개(H-10, H-11)의 olefinic proton임을 알 수 있었다.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum(Fig. 3-160)에서 1개의 ketone( $\delta_{\text{C}}$  204.5)과 8개의 olefinic methine carbon이 존재하는 것을 알 수 있었다. 그 중 3개( $\delta_{\text{C}}$  125.4, 129.0, 129.6)는  $\text{sp}^2$  methine이고 나머지 5개( $\delta_{\text{C}}$  110.4, 111.9, 115.7, 160.5, 161.7)는  $\text{sp}^2$  quaternary carbon들 임을 알 수 있었다. **032-2**의 부분구조 및 전체적인 평면구조를  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY(Fig. 3-161), gHSQC(Fig. 3-162), gHMBC(Fig. 3-163)와 같은 2D NMR 등의 상세한 해석을 통하여 규명하였다.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum을 통해 2개의 부분구조를 알 수 있었다. 먼저 H-8( $\delta_{\text{H}}$  2.95)에서 H-10( $\delta_{\text{H}}$  5.50)까지는 vicinal correlation을 통하여 연결을 알 수 있었으며, 또한 H-10과 overlap된 H-11( $\delta_{\text{H}}$  5.50)은 H-12( $\delta_{\text{H}}$  1.63)와의 correlation을 보여 side chain의 구조를 완성할 수 있었다. 앞서  $^1\text{H}$  NMR spectrum에서 1개의 peak로 보였던  $\delta_{\text{H}}$  5.50(H-10, H-11)의 수소는 gHSQC spectrum에서 C-10( $\delta_{\text{C}}$  129.6)과 C-11( $\delta_{\text{C}}$  125.4)과 각각 correlation을 보여 동일한 화학적 이동값을 가지는 2개의 수소가 각각 다른 탄소에 결합하고 있음을 확인할 수 있었다.

Table 3-19. NMR Spectral data for **032-2** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

No.	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult, J = Hz)	COSY	HMBC
1	161.7			
2	110.4			
3	129.0	7.45(1H, s)		C-2, C-4, C-5, C-6, C-7
4	115.7			
5	160.5			
6	111.9			
7	204.5			
8	37.2	2.95(t, 7.5)	H-9	C-7, C-10
9	27.5	2.35(2H, brt, 2.5)	H-8, H-10	C-7, C-10, C-11
10	129.6	5.50(1H, td, 2.5)	H-9	C-8
11	125.4	5.50(1H, qd, 4.5)	H-12	C-12
12	16.6	1.63(3H, d, 4.5)	H-11	C-10, C-11
13	6.5	2.06(3H, s)		C-1, C-6
14	14.9	2.16(3H, s)		C-4, C-5

또한 gHMBC spectrum(Fig. 3-163)의 면밀한 해석을 통하여 2개의 부분구조의 연결을 할 수 있었으며, 이로써 **032-2**의 평면 구조를 결정할 수 있었다(Fig. 3-158). gHMBC spectrum에서 H-9( $\delta_H$  2.35)은 ketone인 C-7( $\delta_C$  204.5) 및 olefinic carbon들인 C-10( $\delta_C$  129.6)과 C-11( $\delta_C$  125.4)과 correlation을 보였다. 이들 상관관계의 해석을 통해서 2개의 부분구조와 ketone 및 olefinic carbon이 연결 되는 것을 확인하여 side chain 부분의 구조를 결정 할 수 있었다. 또한 methyl proton인 H-13( $\delta_H$  2.06)이 quaternary carbon인 C-6( $\delta_C$  111.9), oxygenated quaternary carbon인 C-1( $\delta_C$  161.7)과 correlation을 보였으며, 또 다른 methyl proton H-14( $\delta_H$  2.16)이 quaternary carbon C-4( $\delta_C$  115.7) 및 oxygenated quaternary carbon C-5( $\delta_C$  160.5)와 correlation을 보임으로써 aromatic ring에 존재하는 2개의 hydroxyl group의 위치를 결정 할 수 있었다. **032-2**의 평면구조를 결정하는데 방향족 수소인 H-3( $\delta_H$  7.45)의 gHMBC correlation들이 가장 중요했는데, H-3가 C-2( $\delta_C$  110.4), C-4( $\delta_C$  115.7)와 correlation하고 또한 C-14( $\delta_C$  14.9), C-5( $\delta_C$  160.5)와 long-range correlation 하는 것을 면밀히 해석함으로써 Fig. 와 같이 aromatic ring의 치환기들을 결정할 수 있었다. 마지막으로 H-3( $\delta_H$  7.45)가 C-7( $\delta_C$  204.5)와 correlation을 보여 aromatic ring과 side chain을 연결할 수 있었으며, **032-2**의 평면 구조를 규명할 수 있었다. 이와같이 1D 및 2D NMR의 상세한 해석을 통해서 결정된 **032-2**의 평면구조를 바탕으로 문헌을 조사해 본 결과, 인간 백혈병 세포주인 HL-60에 세포독성 활성이 있는 것으로 알려진 2,3-dihydrosorbicillin(Du, *et al*, 2009)과 동일한 구조임을 알 수 있었다.

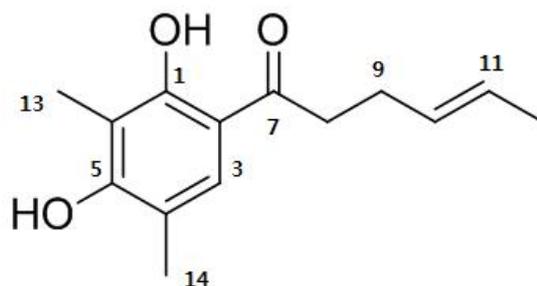


Fig. 3-157. The structure of **032-2**.

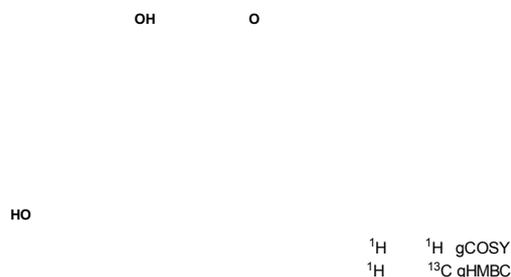


Fig. 3-158. Key  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and HMBC correlations for **032-2**.

1310CH-032-251-bEA-rfcs80%-75%-rp9-ACN-rp2-1H-CD3OD

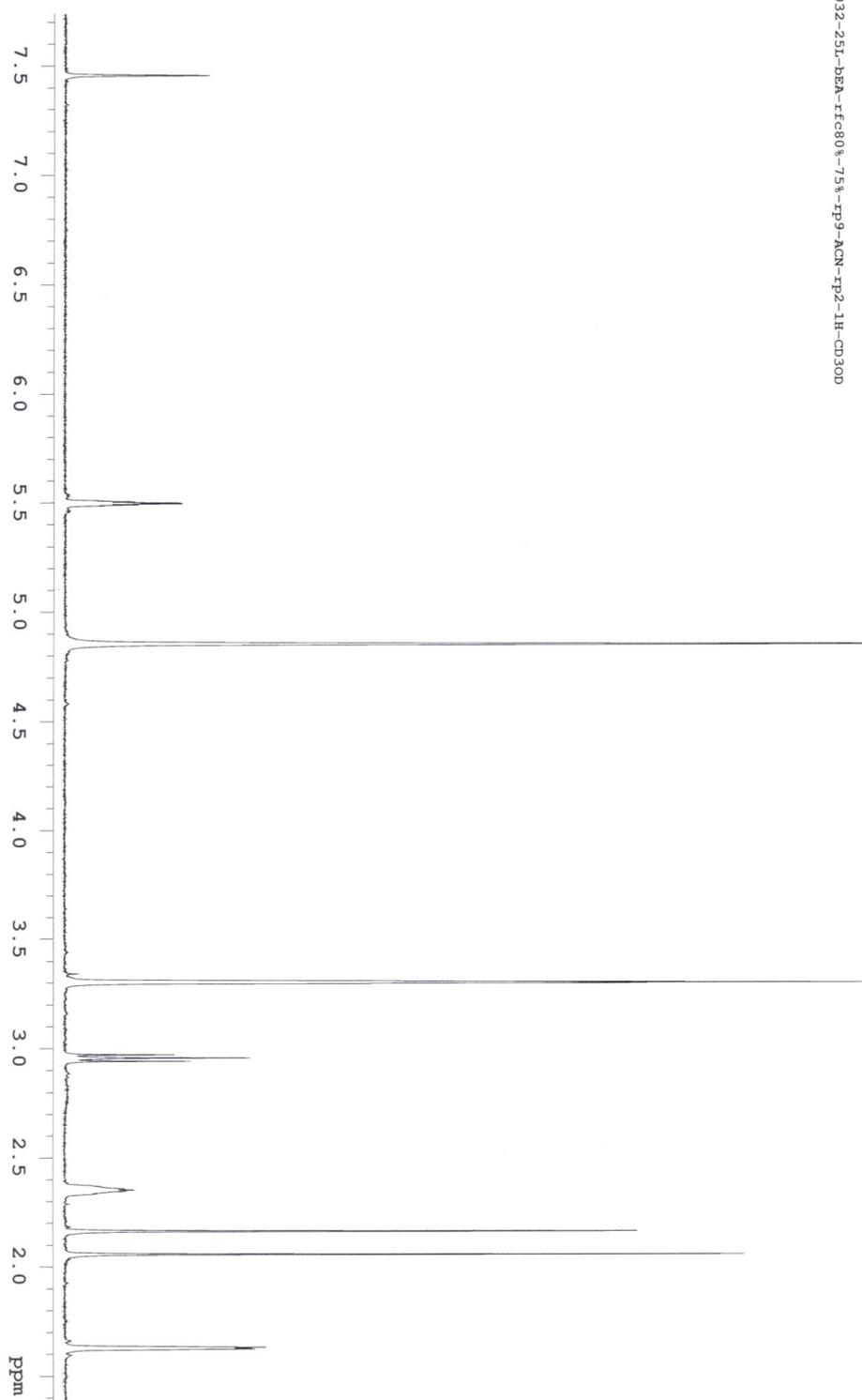


Fig. 3-159.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 032-2.

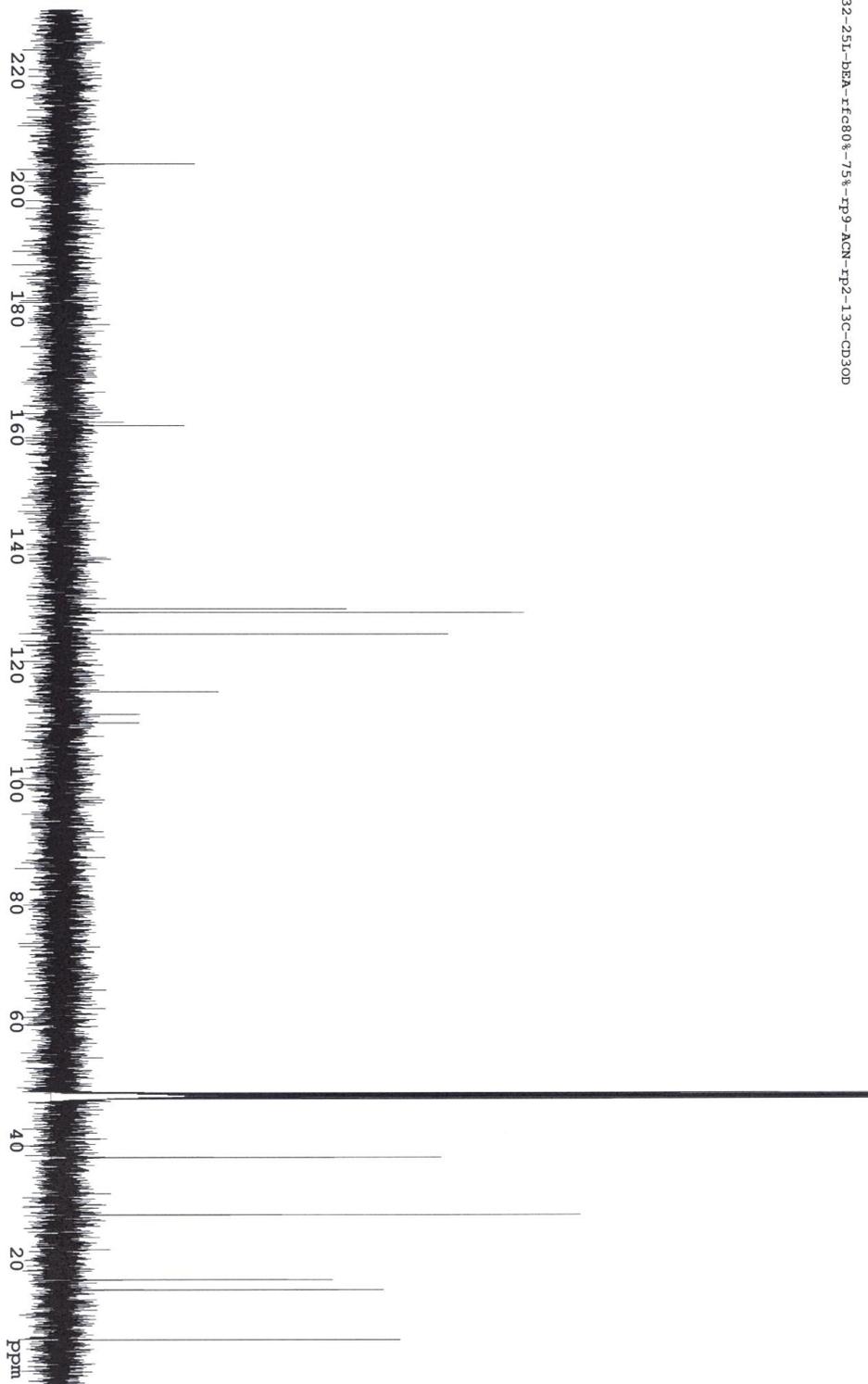


Fig. 3-160.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 032-2.

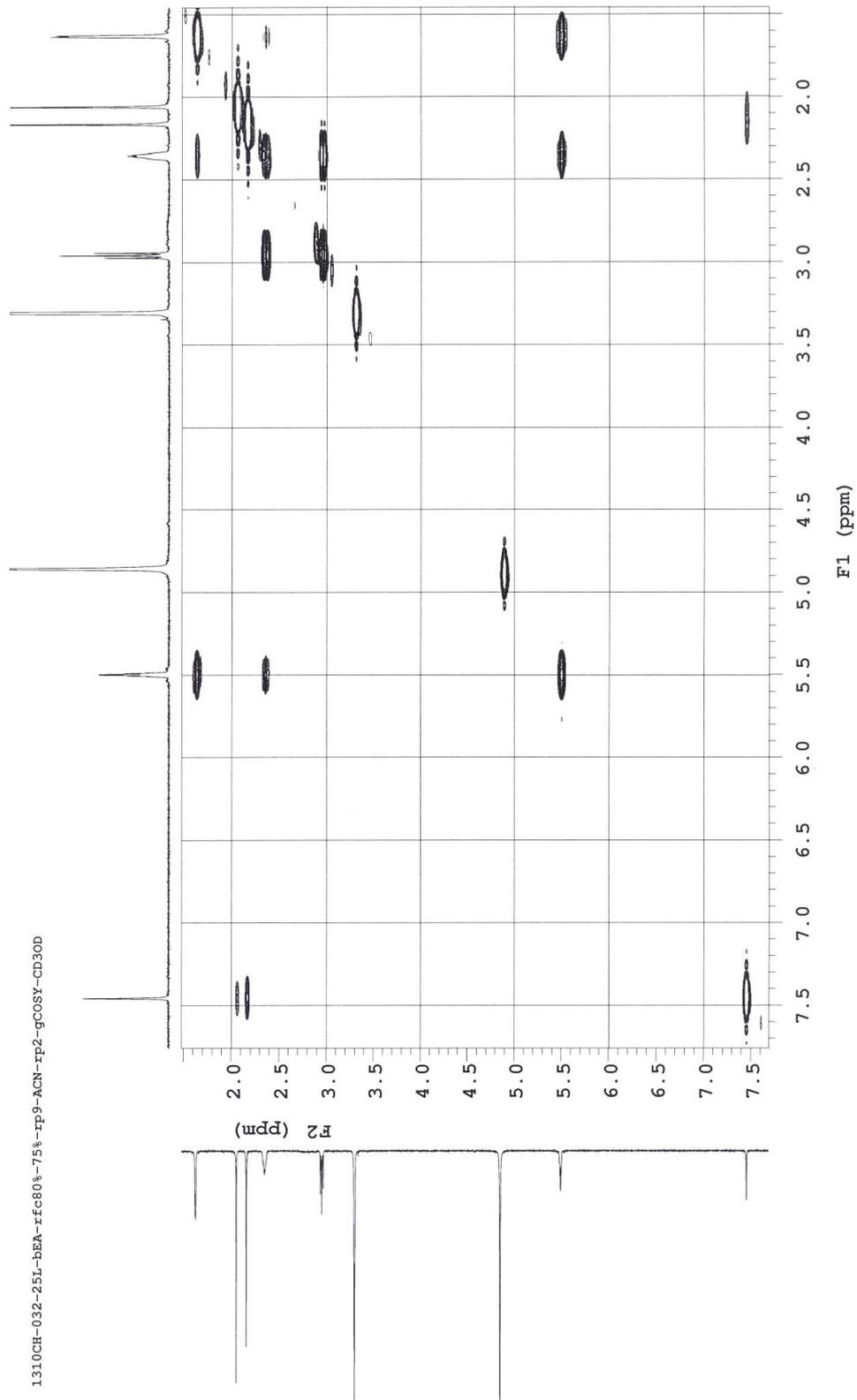


Fig. 3-161. gCOSY spectrum of 032-2.

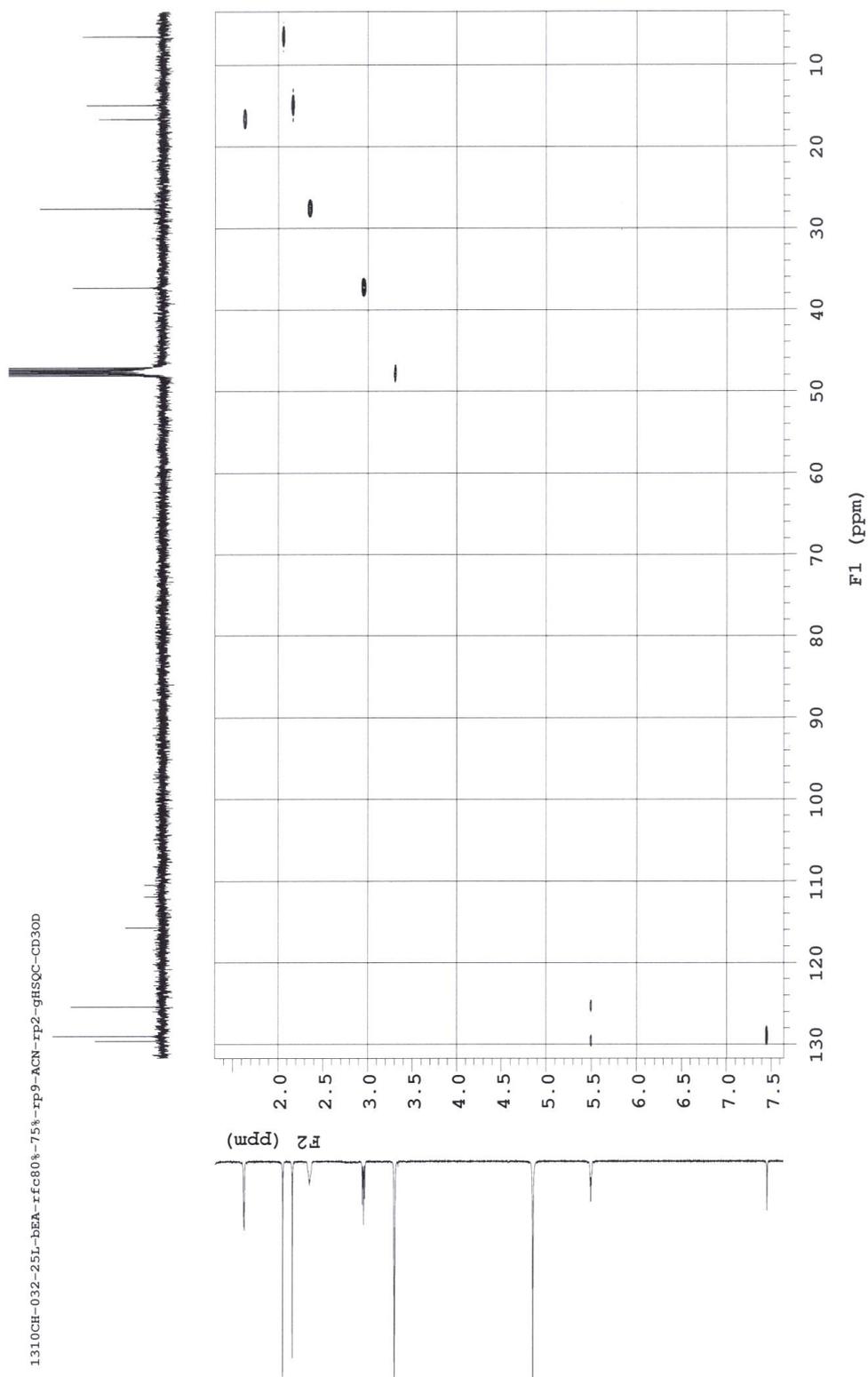


Fig. 3-162. gHSQC spectrum of 032-2.

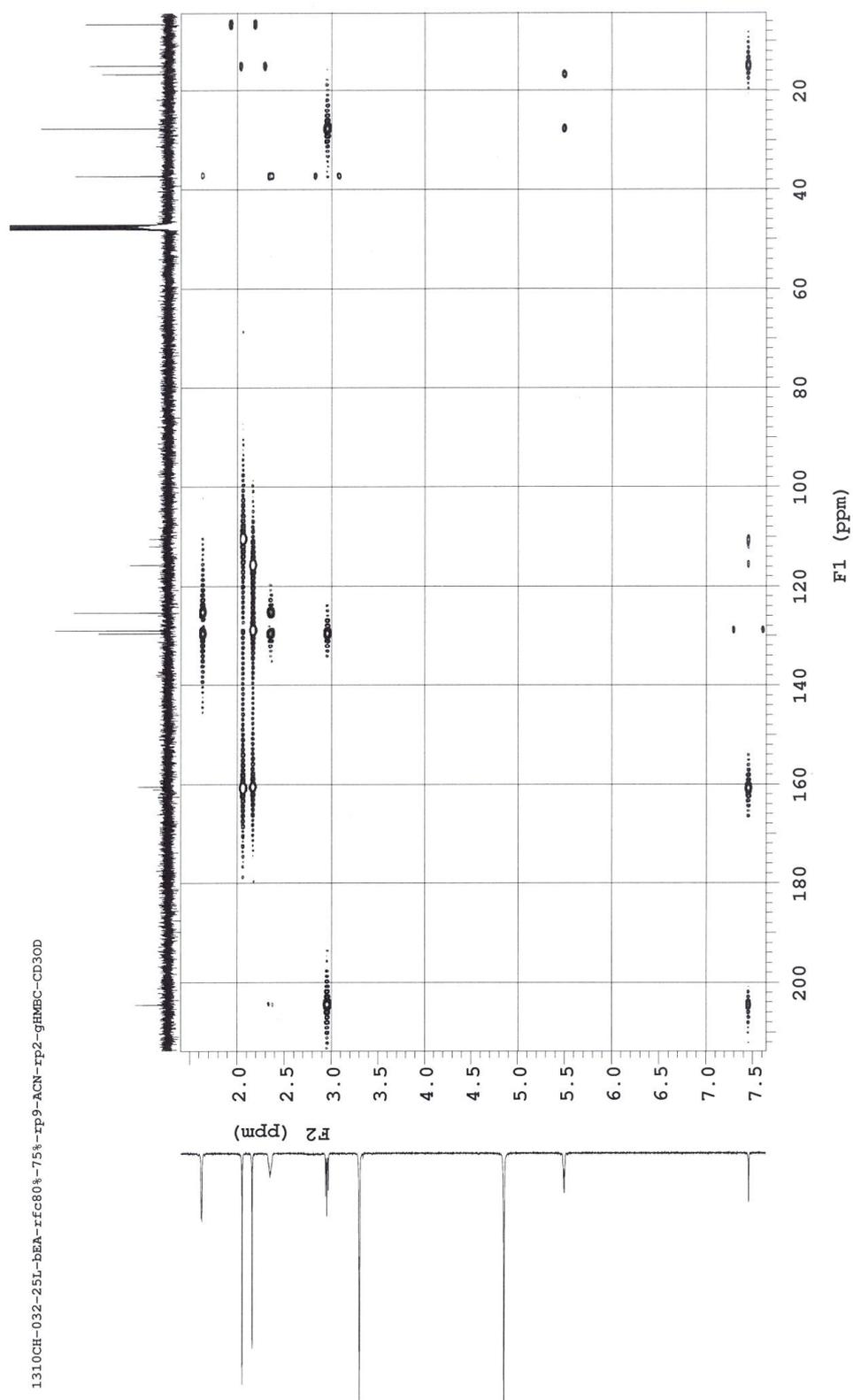
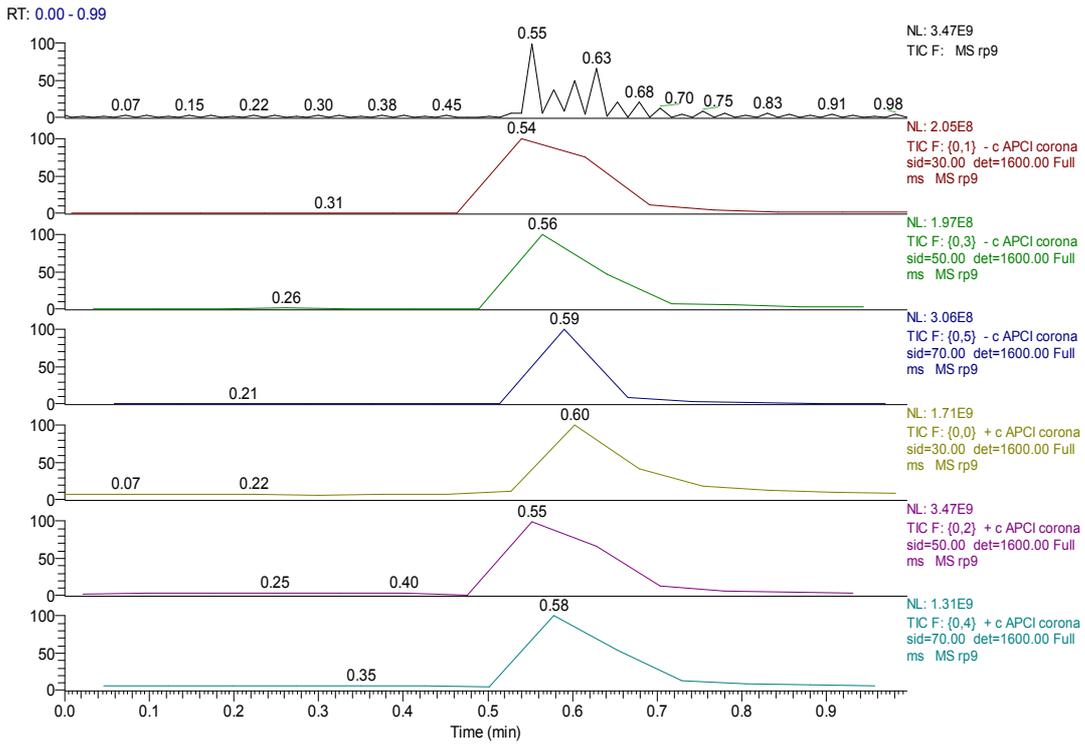


Fig. 3-163. gHMBC spectrum of 032-2.



rp9 #49 RT: 0.60 AV: 1 NL: 3.31E8  
 F: {0,0} + c APCI corona sid=30.00 det=1600.00 Full ms

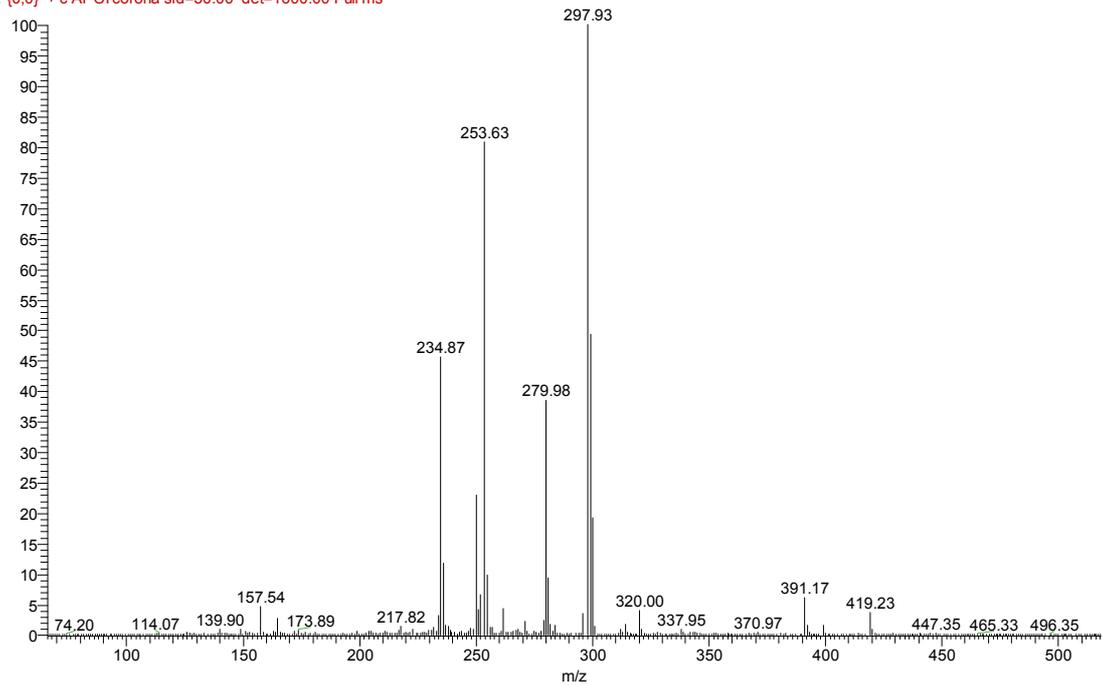


Fig. 3-164. APCI mass spectrum of 032-2(positive mode).

## 제 10 절 해양방선균 *Streptomyces* sp. 133VN028 균주로부터 신물질 분리 및 구조결정

133VN028 균주는 2013년 3월 베트남에서 채취한 해양 퇴적토(sediment)에서 분리하였다. 채취한 퇴적토 약 1g을 멸균된 해수 9ml가 채워진 falcon tube에 넣고 5분 동안 sonification한 후, 60°C dry oven에서 30분간 열처리하여 일반세균의 증식을 억제하였다. 열처리를 마친 시료를 방선균 분리용 배지 Actinomycetes isolation agar(AI A), Humic acid Vitamin agar(HV), Bennett's agar(BN)에 각 0.1ml을 접종하여 골고루 도말하고, 28°C 배양기에서 7일 동안 배양한 후, 형성된 방선균 집락을 2차 분리용 배지에 재차 streaking하여 분리한 균주의 집락형태를 관찰하고 순수 분리하여, -70°C에 보존하였다.

### 1. *Streptomyces* sp. 133VN028 균주의 배양학적 특성과 16S rRNA 유전자 염기서열 분석에 의한 동정

133VN028 균주는 BN 배지에서 가장 성장이 양호하였으며, 최적 성장 온도는 28°C 이었다. 133VN028의 BN 배지 상에서 배양 4일째의 형태학적 특징은 둥글고 규칙적이며 매트한 타입의 균체를 형성하였으며, 배지를 파고들어 성장하며 배면색은 주로 베이지색이었다. 액체 배양 시에 염의 농도가 32 g/L의 인공해수에서 생육이 가장 좋았다. 133VN028 균주의 동정 및 계통분류학적인 위치를 확인하기 위하여 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통해 확인한 결과, *Streptomyces* sp. 로 동정 되었다.

### 2. *Streptomyces* sp. 133VN028으로부터 신물질 분리 및 구조결정

분리, 보존된 방선균을 백금이에 묻혀 종균용 배지(BN)에 접종하여 4일간 배양하였다. 이 종균(seed culture)을 대량배양을 위해 종균과 동일한 배지(BN)을 사용하여 발효기 18 L 와 2 L 플라스크를 사용한 24 L (배지 1 L x 24)에 각 10%씩 접종하였다. 발효기 18 L 는 30rpm의 회전속도로 에어를 주입하여 7일간 배양하였고, 2 L 플라스크는 shaking incubator를 이용하여 28°C에서 100rpm의 회전속도로 7일간 배양하였다. 대량 배양은 총 42 L 로 1, 2차 진행되었고, 수확된 배양액을 고속원심분리기(ultracentrifuge, 6,000rpm)을 사용하여 배양 상등액과 균사체로 분리하였다. 분리된 배양 상등액을 동일한 양의 EtOAc로 2번 추출하였다. EtOAc추출액을 감압하에서 농축, 건조하여 EtOAc 추출물을 1차 배양에서는 2.34 g 을, 2차 배양에서 2.89 g 을 얻었다.

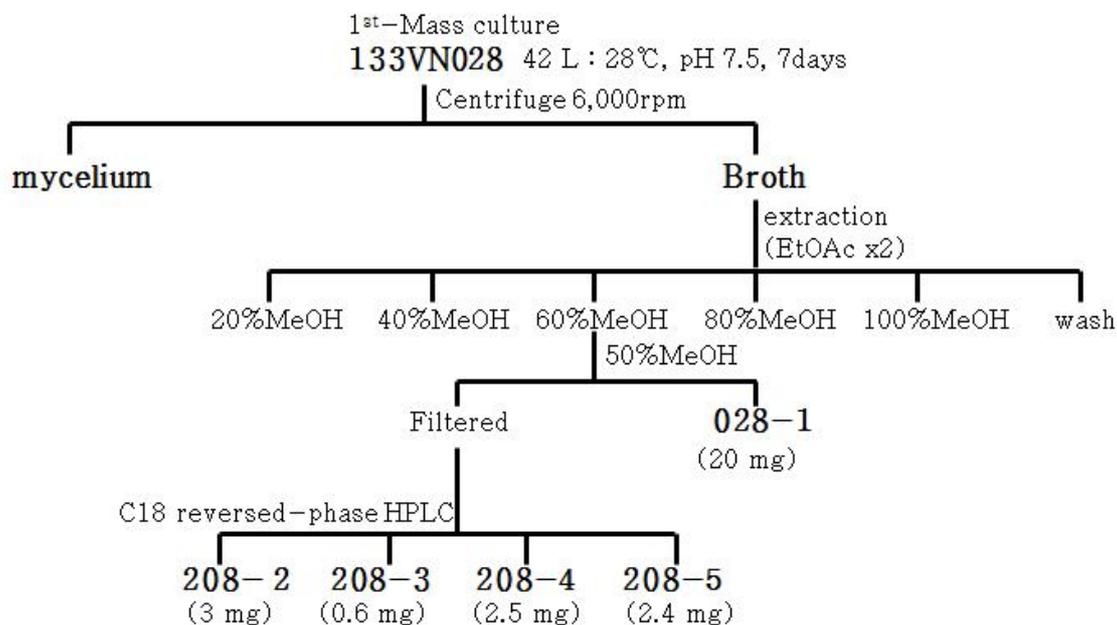


Fig. 3-165. Isolation scheme for 028-1~5 from the 1<sup>st</sup> culture broth of the strain 133VN028.

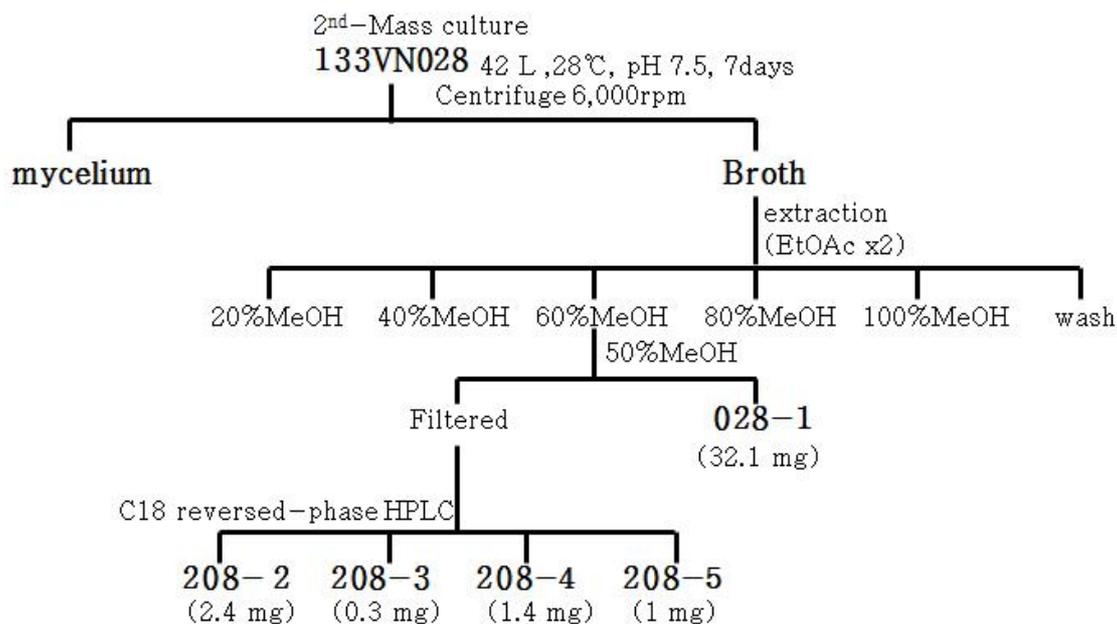


Fig. 3-166. Isolation scheme for 028-1~5 from the 2<sup>nd</sup> culture broth of the strain 133VN028.

각각의 추출물은 역상 플래쉬 크로마토그래피 (reversed-phase flash chromatography)를 이용하여 극성별로 분획하였다. 용출용매는 H<sub>2</sub>O : MeOH(80:20)으로 시작하여 MeOH를 20%씩 증가시켰으며, 마지막은 100% MeOH로 잔류물질을 세척하였다. 60% MeOH 층을 1차 배양을 통해 191.4 mg, 2차 배양을 통해 217.2 mg 을 얻을 수 있었다. 각 추출물을 C18 역상 HPLC(C18 reversed-phase HPLC, Column: YMC-ODS-A, 입사직경 5um, 10x250mm(내경x길이), 이동상: H<sub>2</sub>O/MeOH(5:5), 용출속도 1.5 ml/min, RI detector)의 같은 조건으로 분리 정제하여 화합물 028-(1-5) 을 얻었다. 1차, 2차 배양에서 화합물 028-(1-5)은 동일한 물질이 얻어진 것으로 예상하였고, 이는 NMR과 MS data로 확인하였다. 그리하여 각 물질을 합하여 신규물질 (1) 52.1 mg (2) 5.4 mg, (3) 0.9 mg, (4) 3.9 mg, (5) 3.4 mg 얻어졌음을 확인하였다.

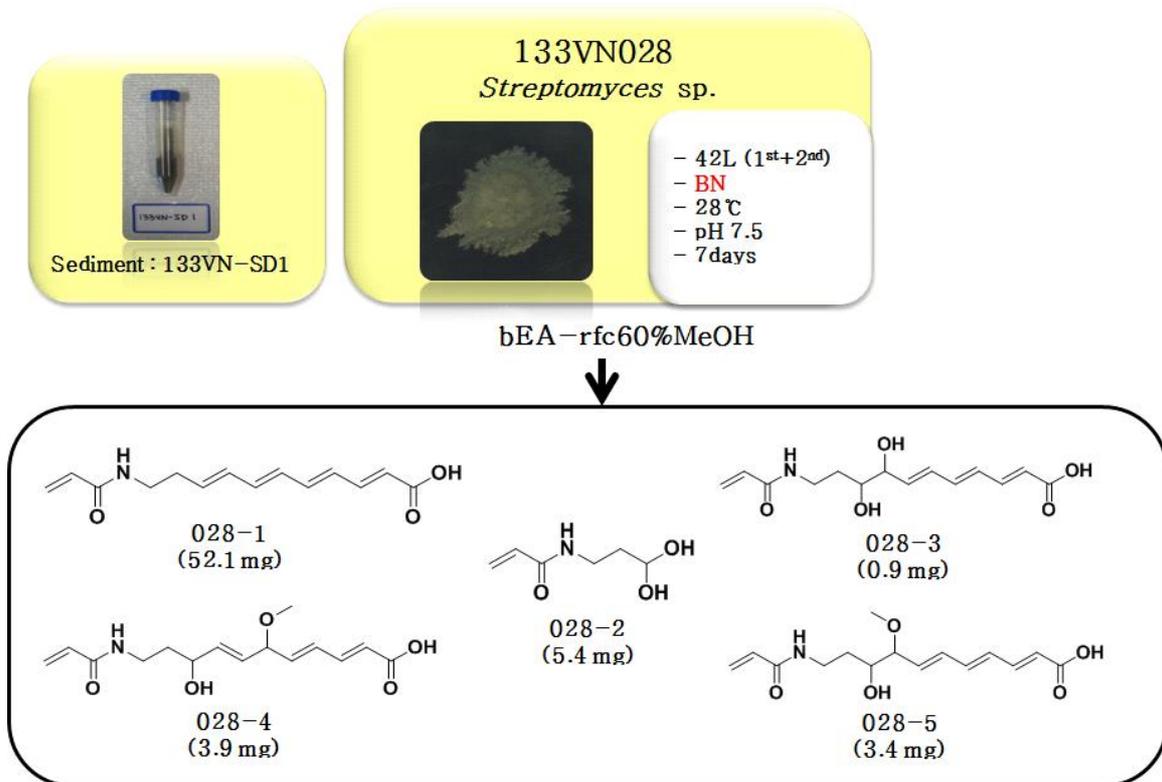


Fig. 3-167. The structures of 028-1~5 from the strain 133VN028.

### 가. 신규 항염물질 028-1의 구조 결정

신규 항염물질 028-1(Fig. 3-168)은 갈색의 무정형 고체(brown amorphous solid)로 분리되었고, HR-ESIMS와  $^{13}\text{C}$  NMR을 통해 분자식은  $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_3$ 로 결정되었다.  $^1\text{H}$  NMR(Fig. 3-171)에서 11개의 olefinic proton들 [H-2( $\delta_{\text{H}}$  5.85), H-3( $\delta_{\text{H}}$  7.31), H-4( $\delta_{\text{H}}$  6.38), H-5( $\delta_{\text{H}}$  6.65), H-6( $\delta_{\text{H}}$  6.28), H-7( $\delta_{\text{H}}$  6.44), H-8( $\delta_{\text{H}}$  6.22), H-9( $\delta_{\text{H}}$  5.84), H-14( $\delta_{\text{H}}$  6.21), H-15a( $\delta_{\text{H}}$  5.64), H-15b( $\delta_{\text{H}}$  6.23)]과 2개의  $\text{sp}^3$  methylene proton들 [H-10( $\delta_{\text{H}}$  2.37), H-11( $\delta_{\text{H}}$  3.33)]을 확인할 수 있었다. H-11( $\delta_{\text{H}}$  3.33)은 화학적 이동값으로 보아 전기음성도가 큰 NH와 연결되어 있을 것으로 예상하였다. H-2( $\delta_{\text{H}}$  5.85)부터 H-9( $\delta_{\text{H}}$  5.84)까지의 olefinic proton들이 큰 coupling constant 값( $J=15$  Hz)을 갖는 것으로 보아 *trans* form으로 된 polyene계열의 화합물이라고 예상하였다.  $^{13}\text{C}$  NMR(Fig. 3-172)에서 11개의 olefinic carbon들 [C-2( $\delta_{\text{C}}$  121.6), C-3( $\delta_{\text{C}}$  146.6), C-4( $\delta_{\text{C}}$  130.9), C-5( $\delta_{\text{C}}$  142.5), C-6( $\delta_{\text{C}}$  132.0), C-7( $\delta_{\text{C}}$  138.6), C-8( $\delta_{\text{C}}$  133.7), C-9( $\delta_{\text{C}}$  135.3), C-14( $\delta_{\text{C}}$  132.2), C-15( $\delta_{\text{C}}$  126.8)]와 2개의 carbonyl carbon들 [C-1( $\delta_{\text{C}}$  170.8), C-13( $\delta_{\text{C}}$  168.3)]과 2개의  $\text{sp}^3$  methylene carbon들 [C-10( $\delta_{\text{C}}$  34.0), C-11( $\delta_{\text{C}}$  40.1)]의 존재를 확인할 수 있었다.(Table 3-20). gCOSY 스펙트럼(Fig. 3-173)에서는 H-2( $\delta_{\text{H}}$  5.85)부터 H-6( $\delta_{\text{H}}$  6.28), H-7( $\delta_{\text{H}}$  6.44)부터 H-11( $\delta_{\text{H}}$  3.33), H-14( $\delta_{\text{H}}$  6.21)과 H-15( $\delta_{\text{H}}$  5.64/6.23)의 correlation을 통해 proton들이 서로 인접해 있음을 알 수 있었다. gHSQC 스펙트럼(Fig. 3-174)을 통해  $^1\text{H}$ 과  $^{13}\text{C}$ 의 correlation을 확인할 수 있었는데, 11개의 olefinic group들 C-2/H-2( $\delta$  121.6/5.85), C-3/H-3( $\delta$  146.6/7.31), C-4/H-4( $\delta$  130.9/6.38), C-5/H-5( $\delta$  142.5/6.65), C-6/H-6( $\delta$  132.0/6.28), C-7/H-7( $\delta$  138.6/6.44), C-8/H-8( $\delta$  133.7/6.22), C-9/H-9( $\delta$  135.3/5.84), C-14/H-14( $\delta$  132.2/6.21), C-15/H-15( $\delta$  126.8/5.64, 6.23)을 확인할 수 있었고, 2개의  $\text{sp}^3$  methylene group들 C-10/H-10 ( $\delta$  34.0/2.37), C-11/H-11( $\delta$  41.0/3.33)을 확인하였다. gHMBC(Fig. 3-175)에서 carboxylic carbon C-1( $\delta_{\text{C}}$  170.8)은 H-2( $\delta_{\text{H}}$  5.85), H-3( $\delta_{\text{H}}$  7.21)과 correlation peak를 보여 말단에 위치한 것을 예상할 수 있었다. C-4( $\delta_{\text{C}}$  130.9)/H-2( $\delta_{\text{H}}$  5.85), C-3( $\delta_{\text{C}}$  146.6)/H-5( $\delta_{\text{H}}$  6.65), H-7( $\delta_{\text{H}}$  6.44)/C-5( $\delta_{\text{C}}$  142.5), H-7/C-6( $\delta_{\text{C}}$  132.0), C-7( $\delta_{\text{C}}$  138.6)/H-8( $\delta_{\text{H}}$  6.22), C-7/H-9( $\delta_{\text{H}}$  5.84) 등의 long-range correlation을 통하여 H-2( $\delta_{\text{H}}$  5.85)부터 H-9( $\delta_{\text{H}}$  5.84)까지의 polyene의 부분구조를 확인할 수 있었다. 또한 amide carbon C-13( $\delta_{\text{C}}$  168.3)은 H-11( $\delta_{\text{H}}$  3.33), H-14( $\delta_{\text{H}}$  6.21), H-15( $\delta_{\text{H}}$  5.64/6.23)와 correlation을 보임으로써 acrylamide moiety의 존재를 확인할 수 있었다. H-9( $\delta_{\text{H}}$  5.84)와 C-10( $\delta_{\text{C}}$  34.0)의 HMBC correlation을 통해 polyene의 부분구조와 acrylamide moiety가 연결됨을 확인할 수 있었으며, 신규 항염물질 028-1의 구조를 결정할 수 있었다.(Fig. 3-169). IR 측정에서  $1678\text{cm}^{-1}$ (CONH, amide carbonyl),  $2965\text{cm}^{-1}$ ( $\text{sp}^3$  C-H),  $3287\text{cm}^{-1}$ (O-H)등의 functional group들이 존재함을 확인할 수 있었다. UV spectrum에서 신규 화합물 028-1는 302 nm, 315 nm에서 각각  $\log \epsilon$  (4.75), (4.74)의 최대 흡광값을 갖는 것을 알 수 있었다.

이러한 분광학적 data와 HR-ESIMS  $m/z$  270.1100  $[M+Na]^+$  (calcd  $m/z$  270.1106  $[M+Na]^+$ ) (Fig. 3-170)를 바탕으로 028-1은 분자량 247인 polyene 계열의 물질로 확인하였고, 문헌 조사 결과 *Streptomyces* sp.에서 분리된 적이 없는 신규물질로 확인하였다.



Fig. 3-168. The structure of 028-1.



Fig. 3-169. Key COSY and HMBC correlations for 028-1.

Table. 3-20. NMR Data for 028-1 in CD<sub>3</sub>OD

Position	$\delta_c^a$	$\delta_H$ , mult. ( $J$ in Hz) <sup>b</sup>	COSY	HMBC
1	170.8			
2	121.6	5.85, d (15)	3	1, 4
3	146.6	7.31, dd (15, 11)	4	1
4	130.9	6.38, dd (15, 11)	5	
5	142.5	6.65, dd (15, 11)	6	3
6	132.0	6.28, dd (15, 11)		
7	138.6	6.44, dd (15, 11)	8	5, 6
8	133.7	6.22, dd (15, 11)	9	7
9	135.3	5.84, m	10	7
10	34.0	2.37, m	11	9
11	40.1	3.33, m		9, 10, 13
13	168.3			
14	132.2	6.21, t (7)	15	13
15a		5.64, m		
15b	126.8	6.23, dd (7.5, 3.5)		13

<sup>a</sup>Measured at 125MHz. <sup>b</sup>Measured at 500MHz.

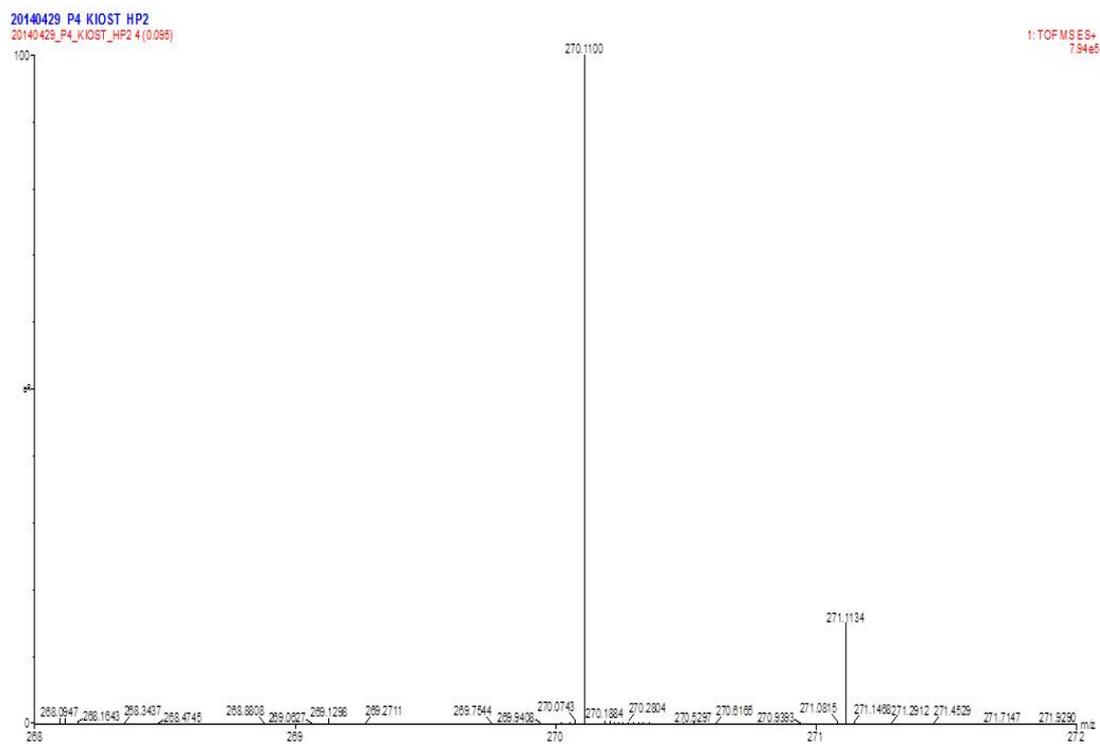


Fig. 3-170. HR-ESIMS spectrum of **028-1** (positive mode).

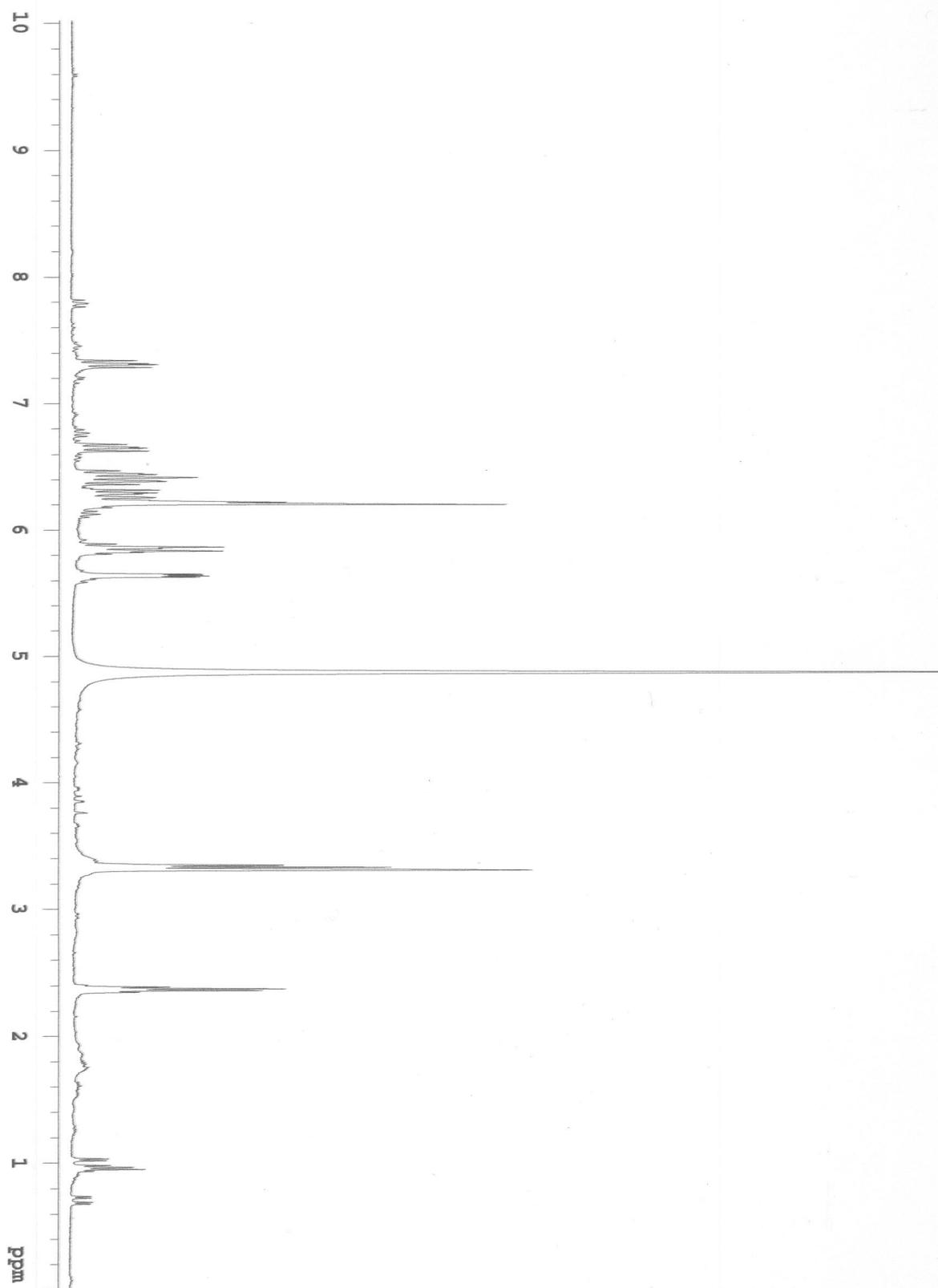


Fig. 3-171.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **028-1** in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

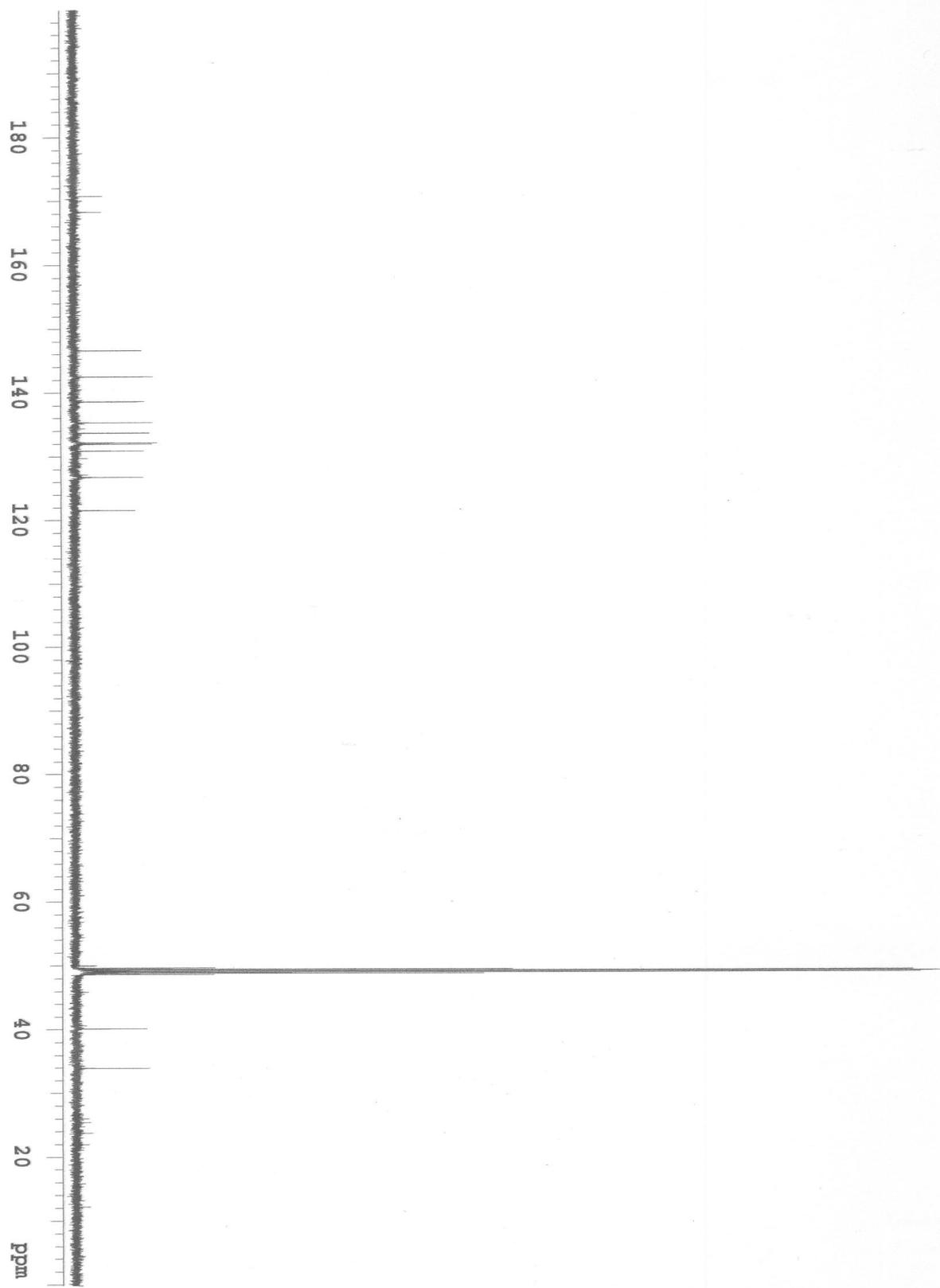


Fig. 3-172.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 028-1 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

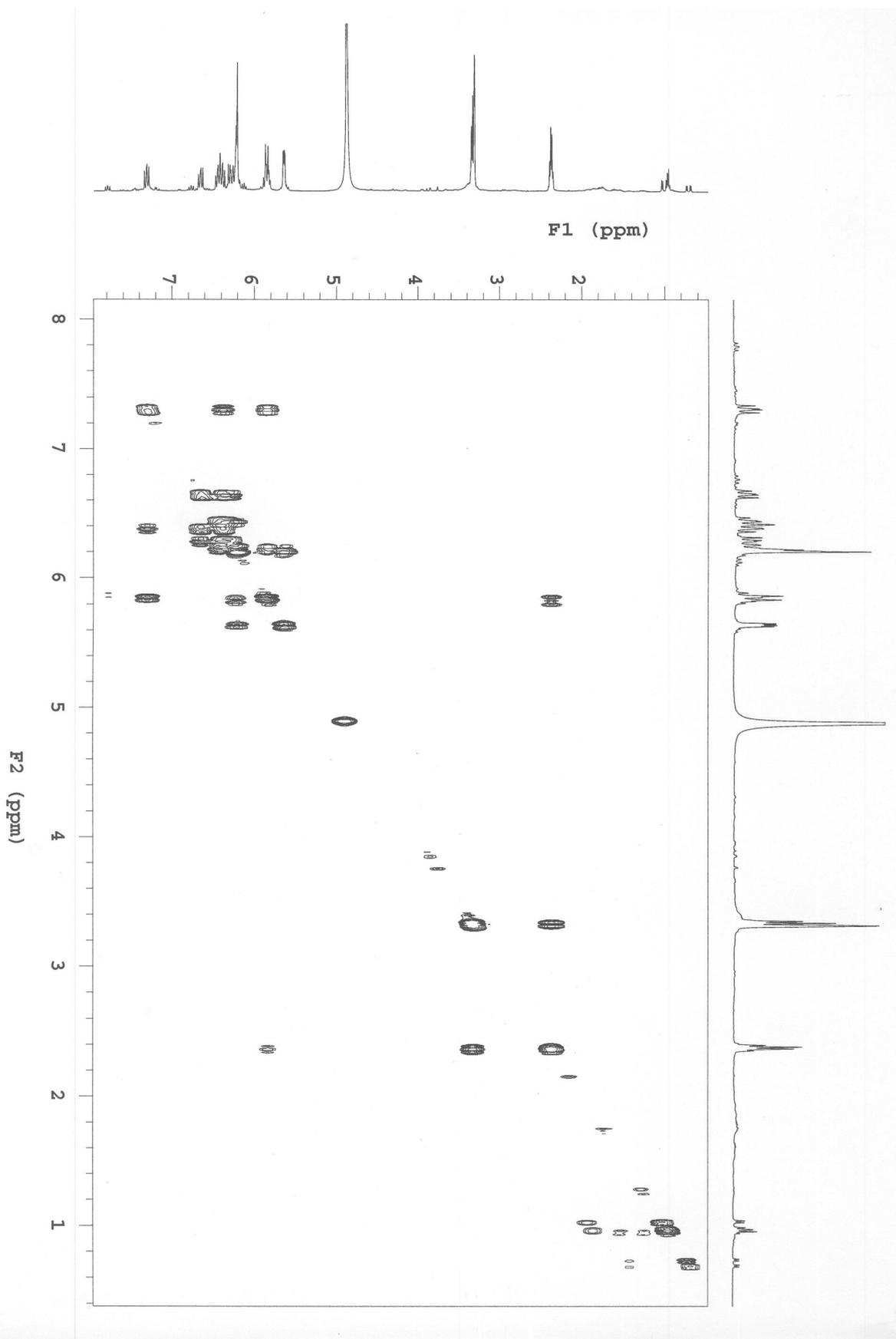


Fig. 3-173. COSY spectrum of 028-1 in CD<sub>3</sub>OD.

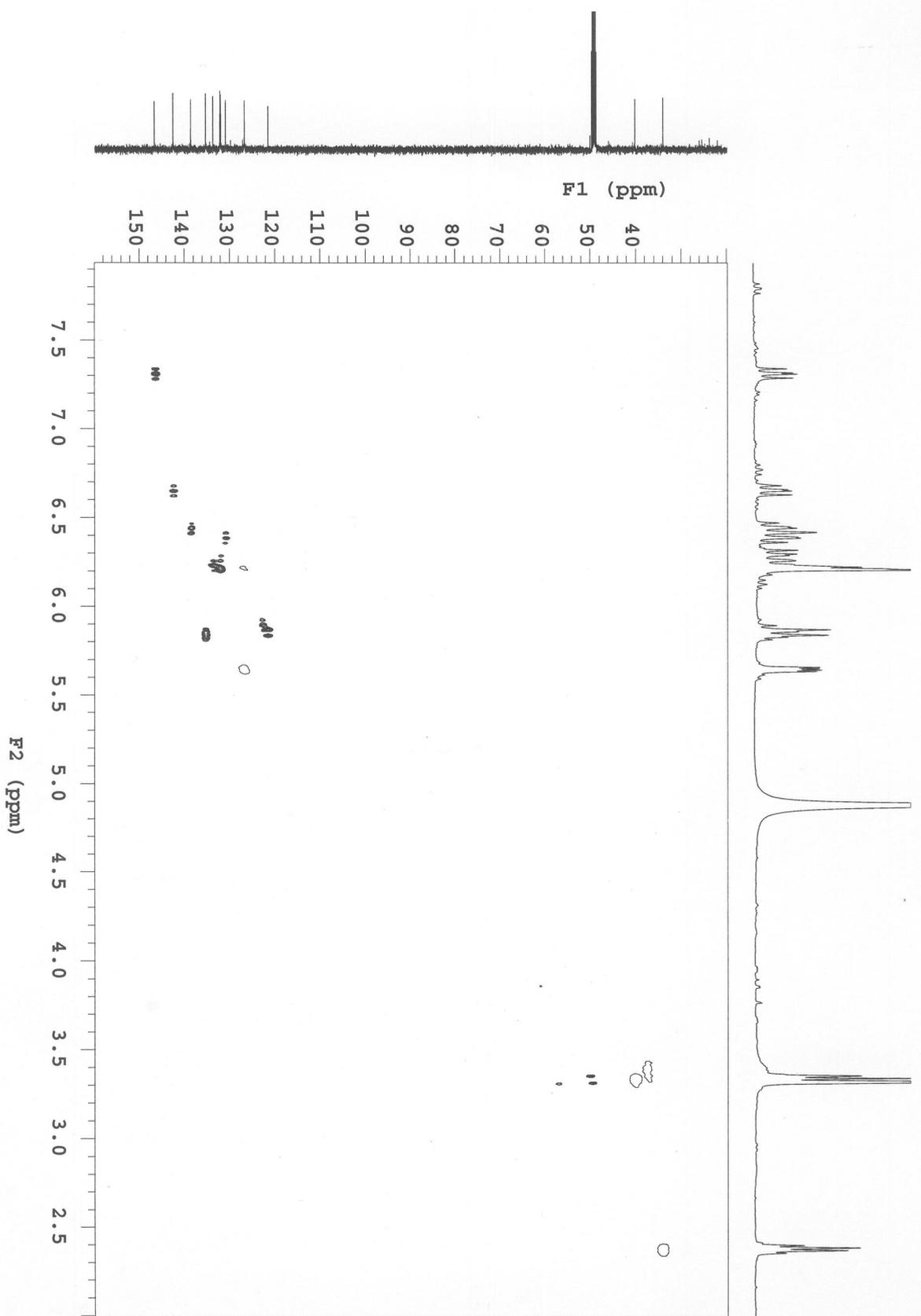


Fig. 3-174. HSQC spectrum of 028-1 in CD<sub>3</sub>OD.

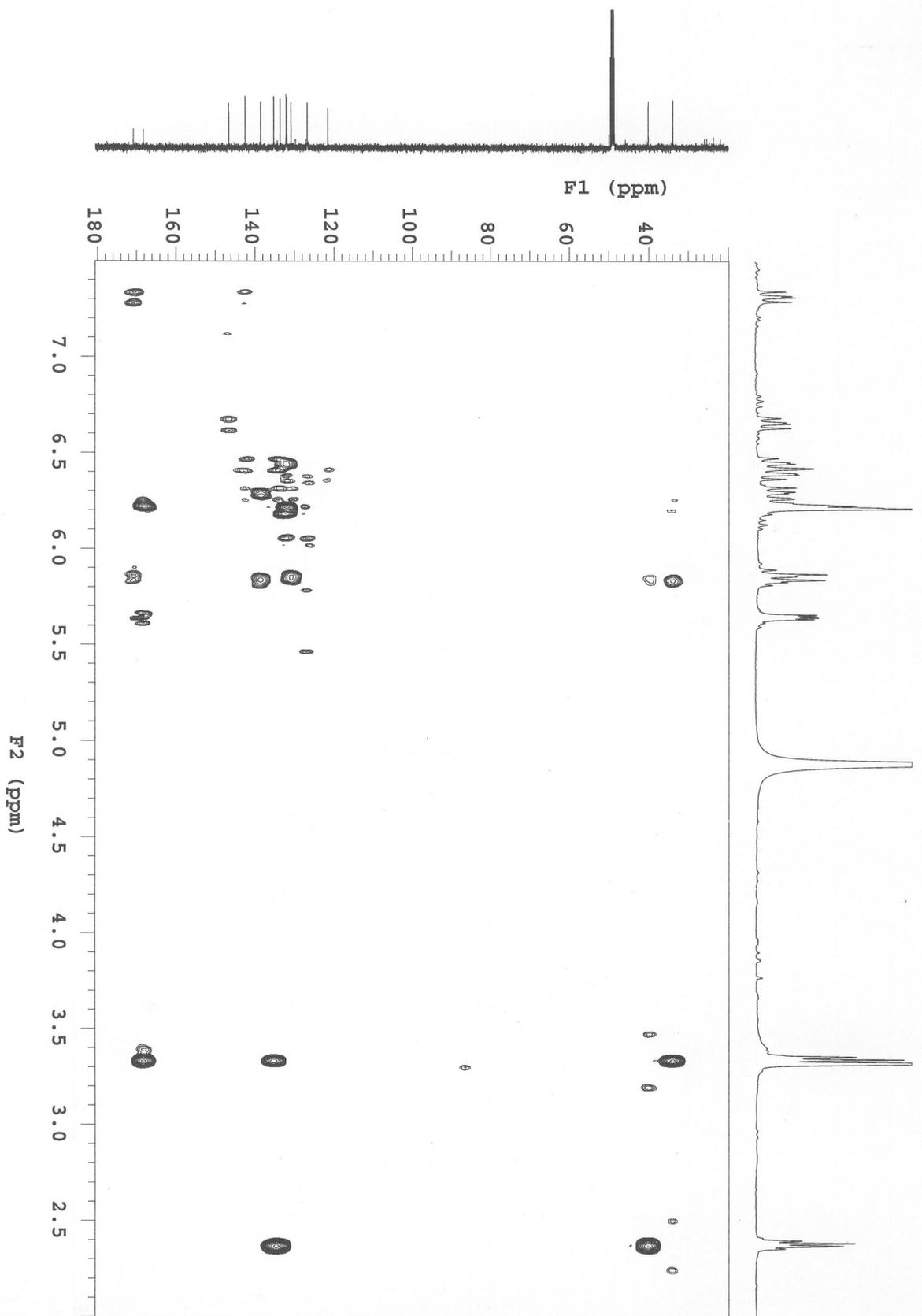


Fig. 3-175. HMBC spectrum of 028-1 in CD<sub>3</sub>OD.

### 나. 신규 화합물 028-1의 항염활성

133VN028 균주에서 분리된 신규 화합물 028-1를 마우스의 대식세포주인 Raw 264.7 cell에 농도 별(6.25, 12.5, 25, 50  $\mu$ M/ml)로 처리하였다. LPS(lipopolysaccharide)로 활성화된 Raw 264.7 cell에서의 염증 매개물질 억제효과를 관찰하였다. LPS로 유도된 대식세포는 염증을 일으키게 되는데, 염증유발 단백질로 알려진 iNOS 단백질과 COX-2 단백질의 발현이 증가하게 되며, NO의 생성이 증가하게 된다. 신규 화합물 028-1은 농도 의존적으로 iNOS와 COX-2와 같은 염증유발 단백질의 발현을 강력하게 억제시키는 것으로 보아, 뛰어난 항염 활성을 가지고 있는 것을 알 수 있었다.

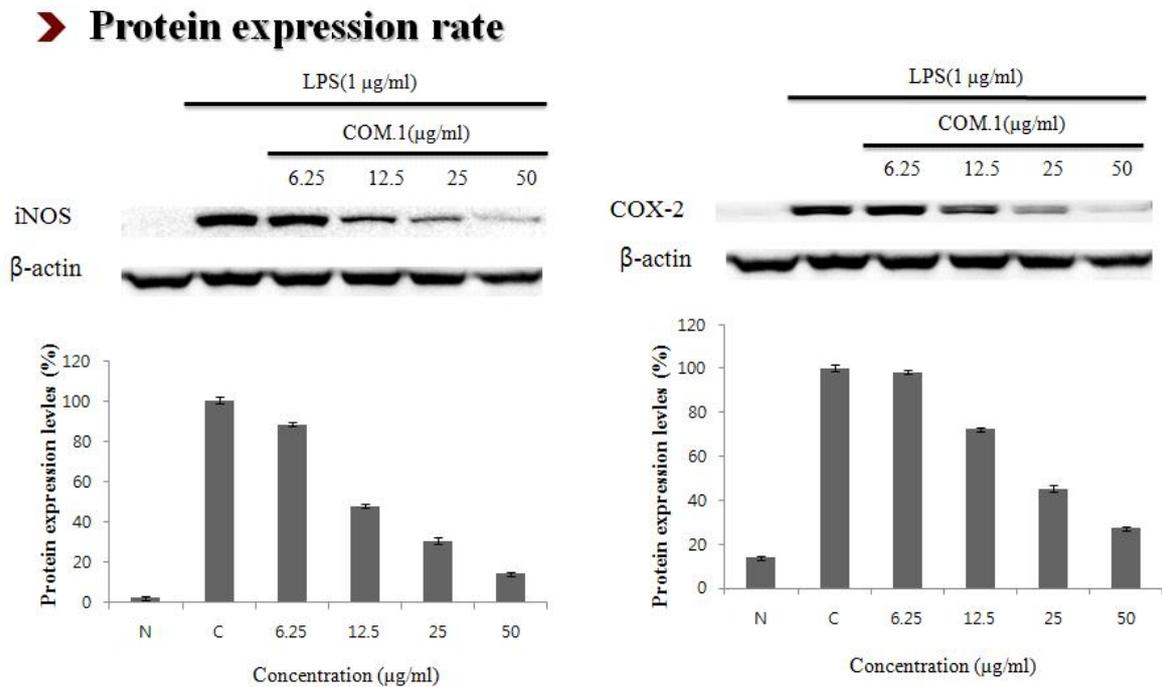


Fig. 3-176. Raw 264.7 cells ( $5 \times 10^5$  cells/ml) were pre-incubated for 24hr, and the cells were stimulated with lipopolysaccharide (1  $\mu$ g/ml) in the presence of complex extracts sample(1, 10, 100  $\mu$ g/ml) for 24 hr. nor : LPS not induced group, con : LPS induced group. Data represent the mean  $\pm$  S.D. with three separate experiments. One-way ANOVA was used for comparisons of multiple group means followed by t-test (significant as compared to control. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

#### 다. 신규 화합물 028-2의 구조 결정

신규 화합물 028-2(Fig. 3-177)은 갈색의 무정형 고체(brown amorphous solid)로 분리되었고, HR-ESIMS와  $^{13}\text{C}$  NMR을 통해 분자식은  $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_3$ 로 결정되었다.  $^1\text{H}$  NMR(Fig. 3-180)에서 3개의 olefinic proton들 [H-6( $\delta_{\text{H}}$  6.20), H-7a( $\delta_{\text{H}}$  5.64), H-7b( $\delta_{\text{H}}$  6.21)]와 2개의  $\text{sp}^3$  methylene proton들 [H-2( $\delta_{\text{H}}$  1.79), H-3( $\delta_{\text{H}}$  3.33)]과 oxygenated proton H-1( $\delta_{\text{H}}$  4.58)peak를 통해 hydroxyl group의 존재를 예상하였다. H-3( $\delta_{\text{H}}$  3.33)은 화학적 이동값으로 보아 전기음성도가 큰 NH와 연결되어 있을 것으로 예상하였다.  $^{13}\text{C}$  NMR(Fig. 3-181)에서 2개의 olefinic carbon들 [C-6( $\delta_{\text{C}}$  132.2), C-7( $\delta_{\text{C}}$  126.6)]과 carbonyl carbon C-5( $\delta_{\text{C}}$  168.3), 2개의  $\text{sp}^3$  methylene carbon들 [C-2( $\delta_{\text{C}}$  37.5), C-3( $\delta_{\text{C}}$  36.7)]의 존재를 확인할 수 있었고, C-1( $\delta_{\text{C}}$  98.1)은 일반적인 oxygenated carbon의 화학적 이동값보다 down field로 이동한 것으로 보아 C-1에 diol이 결합되어 있음을 예상 할 수 있었다. gCOSY 스펙트럼(Fig. 3-182)에서는 H-1( $\delta_{\text{H}}$  4.58)부터 H-3( $\delta_{\text{H}}$  3.33), H-6( $\delta_{\text{H}}$  6.20)과 H-7( $\delta_{\text{H}}$  5.64/6.21)의 correlation을 통해 proton들이 서로 인접해 있음을 알 수 있었다. gHSQC 스펙트럼(Fig. 3-183)을 통해  $^1\text{H}$ 과  $^{13}\text{C}$ 의 correlation을 확인할 수 있었는데, diol이 연결된 C-1/H-1( $\delta$  98.1/4.58), 2개의 olefinic group들 [C-6/H-6( $\delta$  132.2/6.20), C-7/H-7( $\delta$  126.6/5.64, 6.21)]을 확인할 수 있었고, 2개의  $\text{sp}^3$  methylene group들 [C-2/H-2( $\delta$  37.5/1.79), C-3/H-3( $\delta$  36.7/3.33)]의 연결을 알 수 있었다. gHMBC(Fig. 3-184)에서 diol carbon C-1( $\delta_{\text{C}}$  98.1)은 H-2( $\delta_{\text{H}}$  1.79), H-3( $\delta_{\text{H}}$  3.33)과 correlation하고 말단에 위치한 것을 예상할 수 있었고, amide carbon C-5( $\delta_{\text{C}}$  168.3)이 H-3( $\delta_{\text{H}}$  3.33), H-6( $\delta_{\text{H}}$  6.20), H-7( $\delta_{\text{H}}$  5.64/6.21)과 correlation 하는 것으로 보아 acrylamide moiety의 존재를 확인할 수 있었다. H-3( $\delta_{\text{H}}$  3.33)/C-3( $\delta_{\text{C}}$  36.7)의 HMBC correlation을 통해 C-1에서 C-3의 부분구조와 acrylamide moiety가 연결되는 것을 알 수 있었으며, 028-2의 구조를 결정할 수 있었다(Fig. 3-178). IR 측정 결과,  $1657\text{cm}^{-1}$ (CONH, amide carbonyl),  $2969\text{cm}^{-1}$ ( $\text{sp}^3$  C-H),  $3295\text{cm}^{-1}$  (O-H) 등의 functional group들이 존재함을 확인할 수 있었다. UV spectrum에서 신규 화합물 028-2는 204 nm에서  $\log \epsilon$  (4.64)의 최대 흡광값을 갖는 것을 알 수 있었다. 이러한 분광학적 data와 HR-ESIMS  $m/z$  168.0642  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd  $m/z$  168.0637  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ) (Fig. 3-179)를 바탕으로 028-2는 분자량 145이며 문헌조사 결과, 신규물질로 확인하였다.

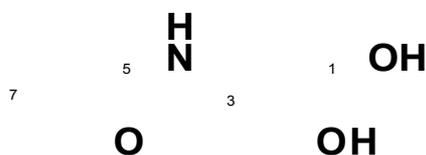


Fig. 3-177. The structure of 028-2.

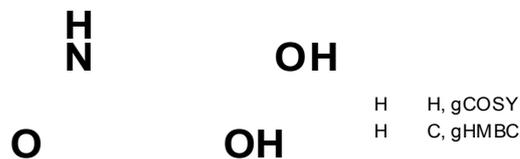


Fig. 3-178. Key COSY and HMBC correlations for **028-2**.

Table 3-21. NMR Data for **028-2** in CD<sub>3</sub>OD

Position	$\delta_C^a$	$\delta_H$ , mult. ( $J$ in Hz) <sup>b</sup>	COSY	HMBC
1	98.1	4.58, t (5.5)	2	
2	37.5	1.79, m	3	1, 3
3	36.7	3.33, m		1, 2, 3
5	168.3			
6	132.2	6.20, overlapped	7	5
7a	126.6	5.64, d (7.5)		5
7b		6.21, overlapped		

<sup>a</sup>Measured at 125MHz. <sup>b</sup>Measured at 500MHz.

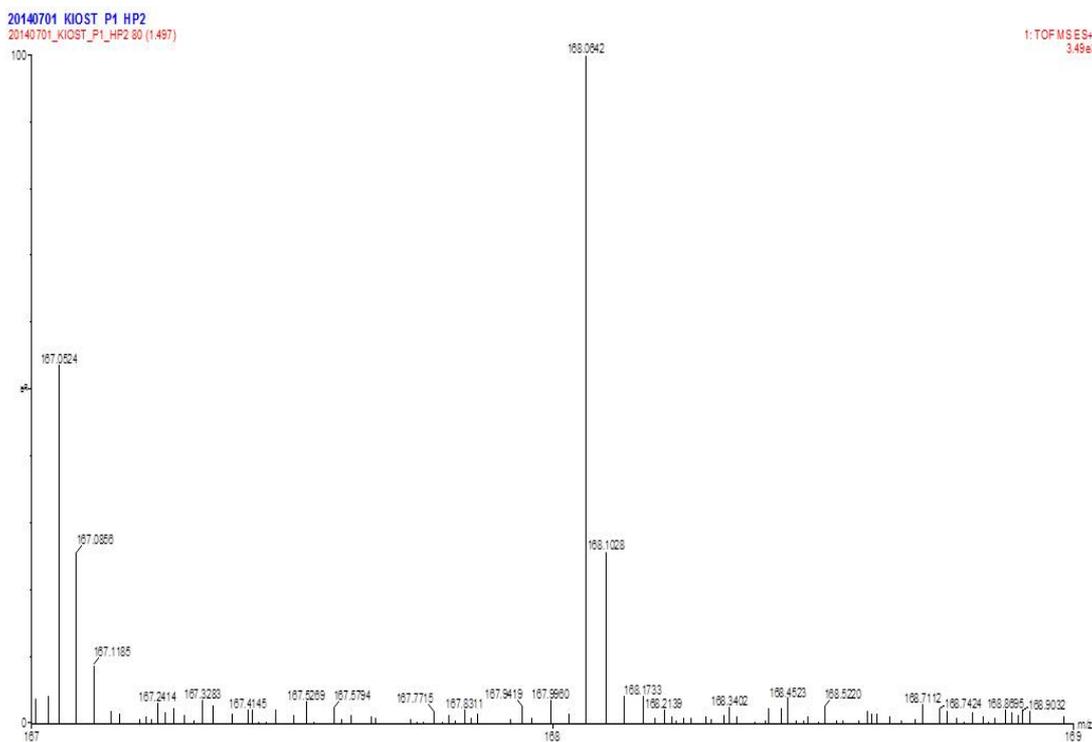


Fig. 3-179. HR-ESIMS spectrum of **028-2**(positive mode).

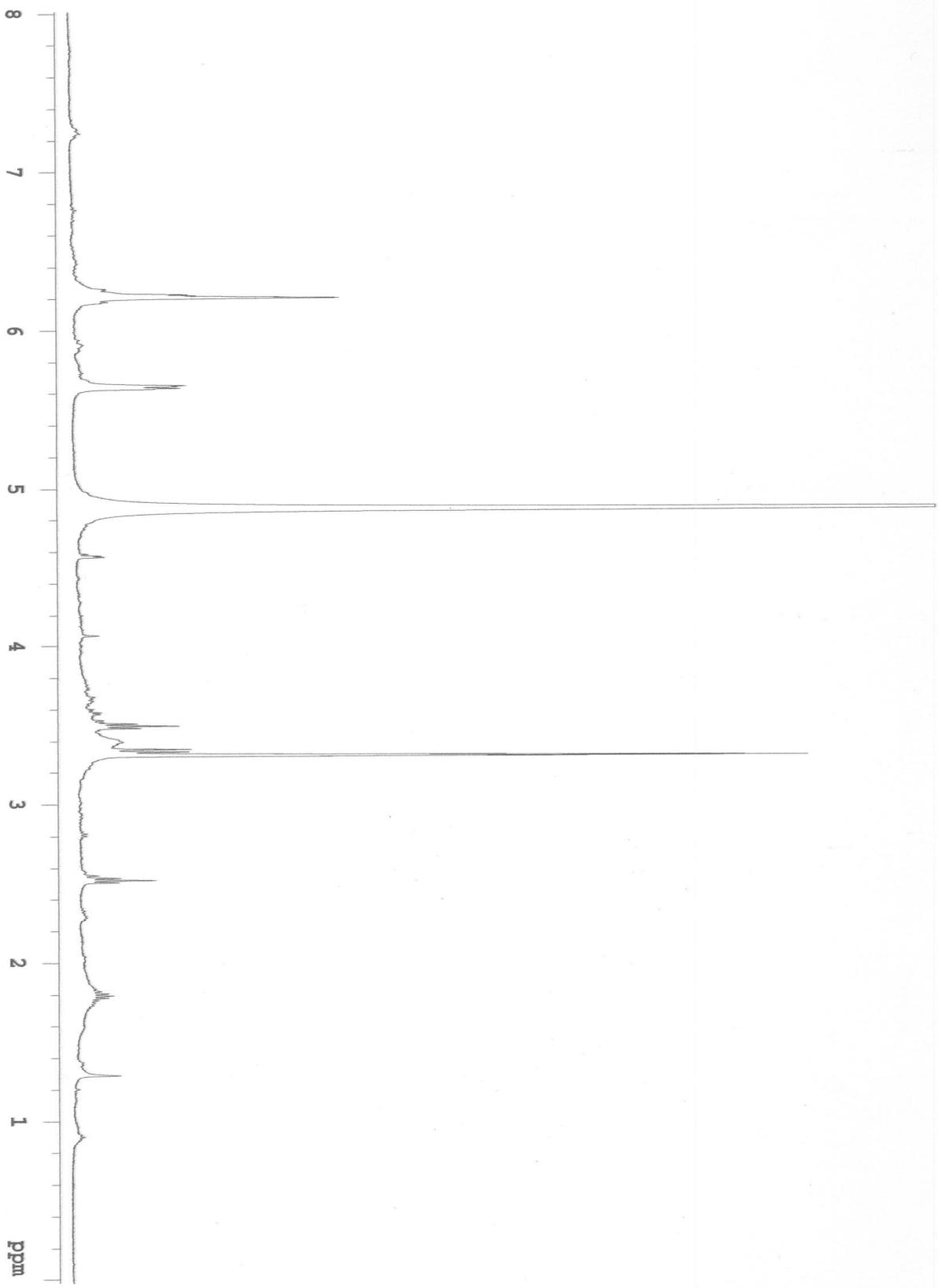


Fig. 3-180.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 028-2 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

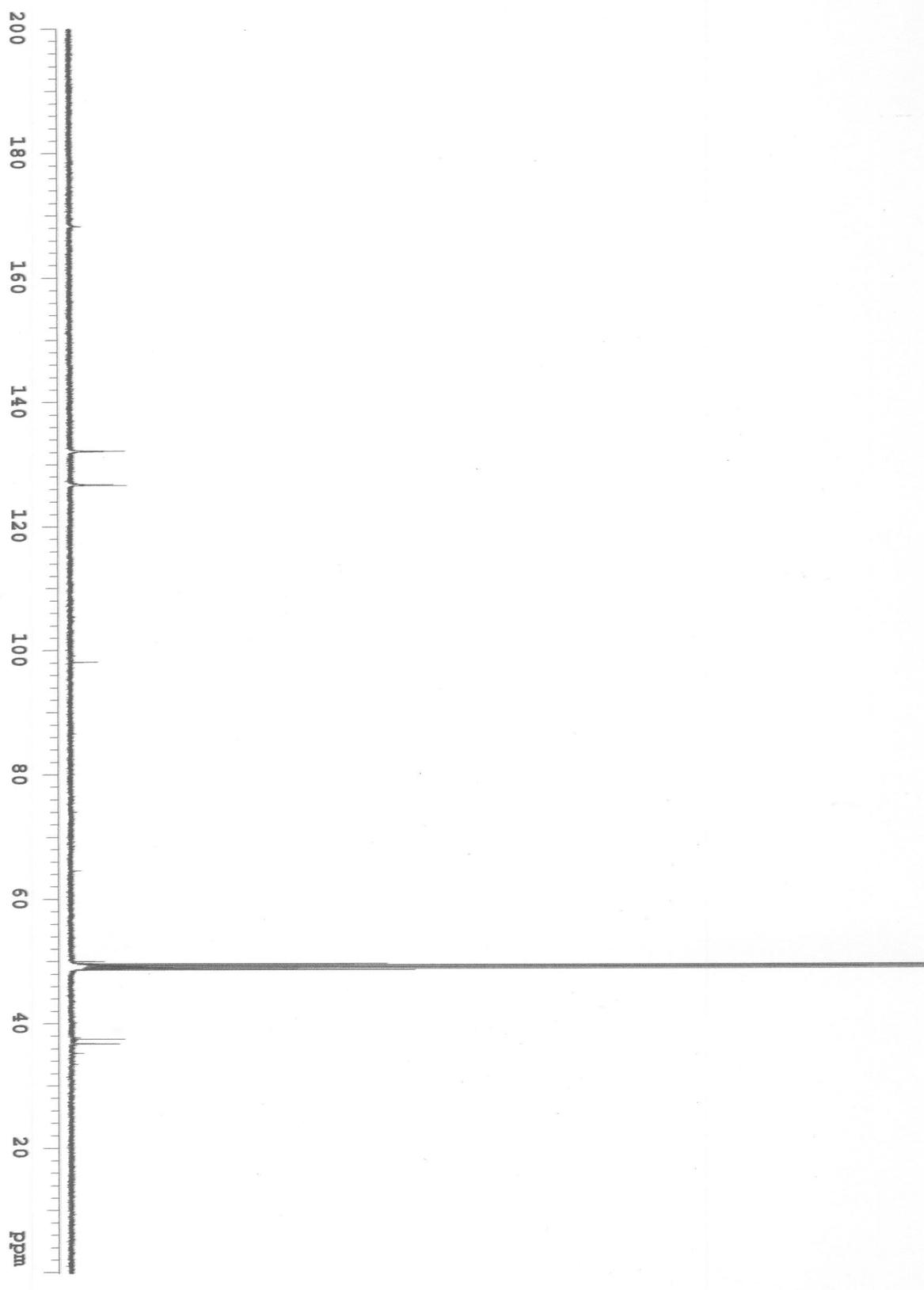


Fig. 3-181.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 028-2 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

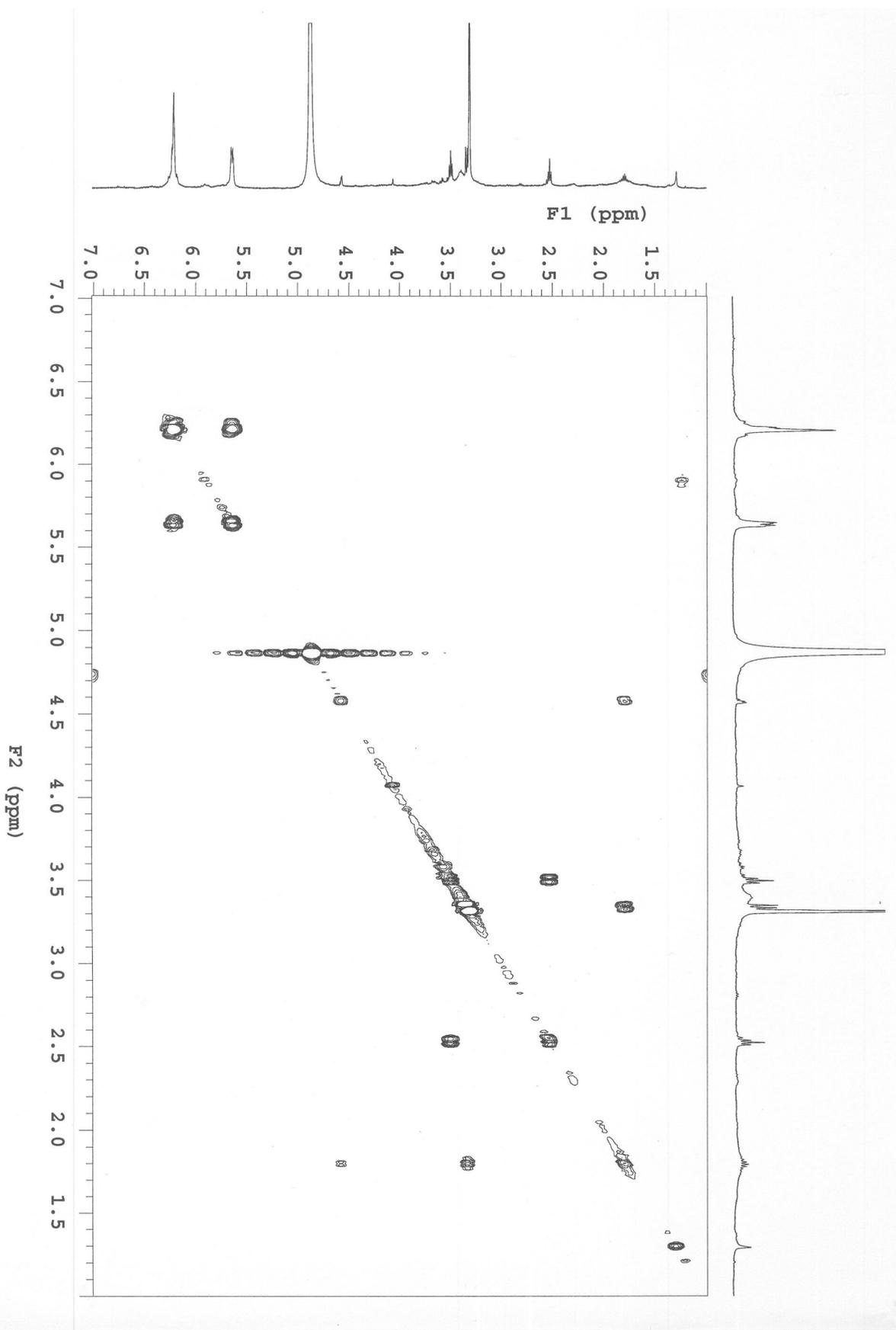


Fig. 3-182. COSY spectrum of 028-2 in CD<sub>3</sub>OD.

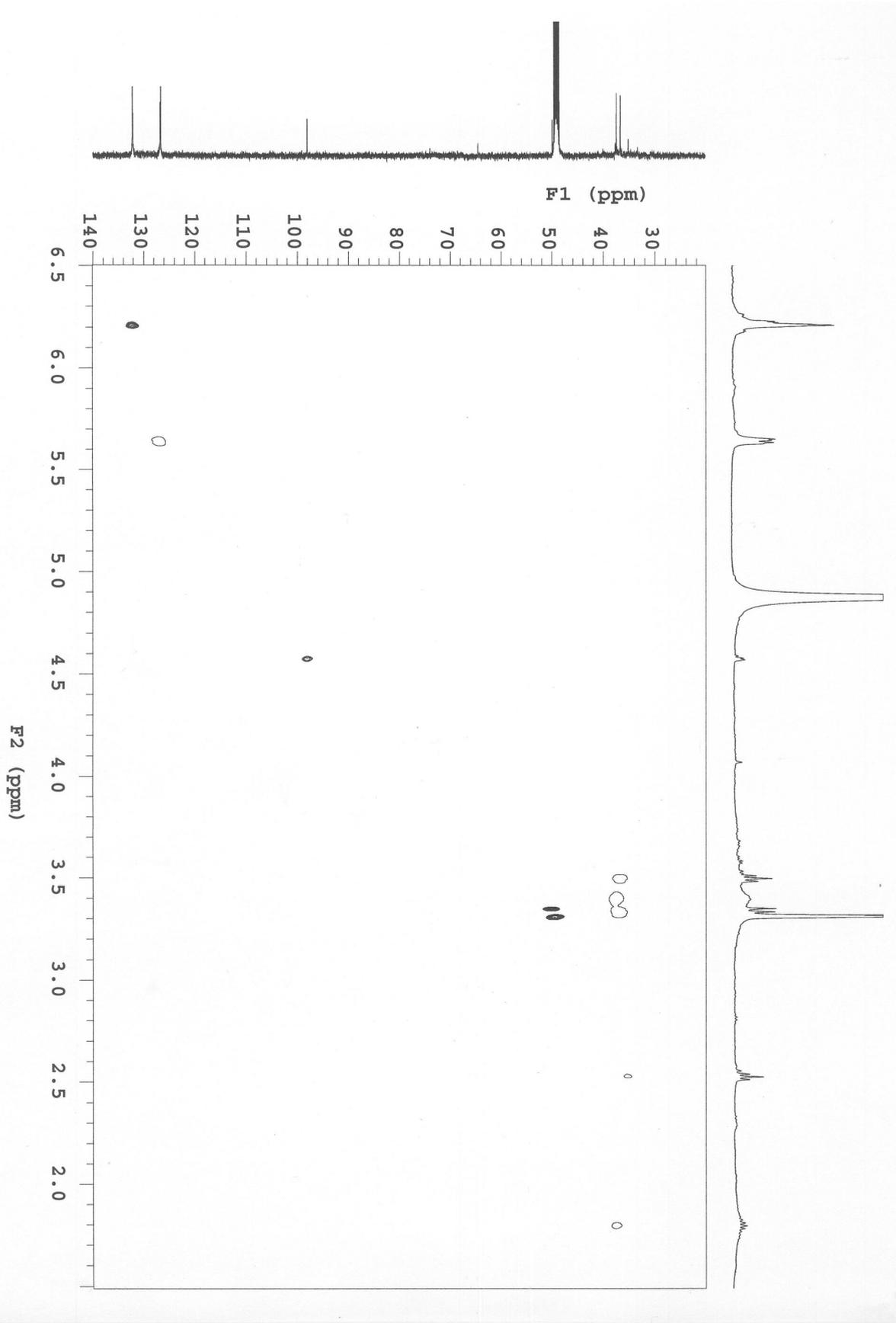


Fig. 3-183. HSQC spectrum of 028-2 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

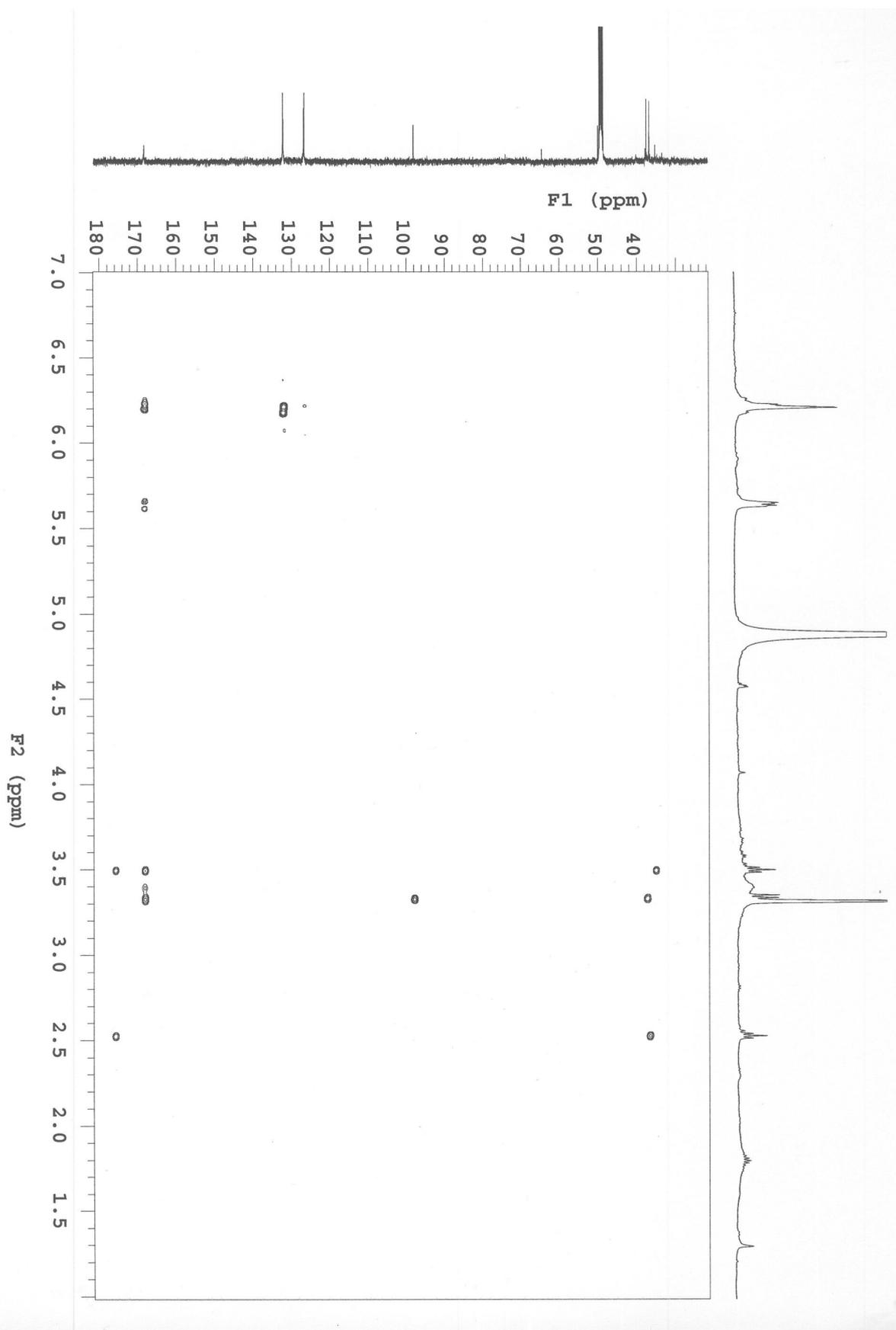


Fig. 3-184. HMBC spectrum of 028-2 in CD<sub>3</sub>OD.

## 라. 신규 화합물 028-3의 구조 결정

신규 화합물 028-3(Fig. 3-185)은 갈색의 무정형 고체(brown amorphous solid)로 분리되었고, HR-ESIMS와  $^{13}\text{C}$  NMR을 통해 분자식은  $\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{NO}_5$ 로 결정되었다.  $^1\text{H}$  NMR(Fig. 3-188) 스펙트럼에서 7개의 olefinic proton들[H-2( $\delta_{\text{H}}$  5.90), H-3( $\delta_{\text{H}}$  7.23), H-4( $\delta_{\text{H}}$  6.40), H-5( $\delta_{\text{H}}$  6.61), H-6( $\delta_{\text{H}}$  6.22), H-7( $\delta_{\text{H}}$  6.02), H-14( $\delta_{\text{H}}$  6.21), H-15a( $\delta_{\text{H}}$  5.64), H-15b( $\delta_{\text{H}}$  6.20)]과 3개의  $\text{sp}^3$  methylene proton들[H-10a( $\delta_{\text{H}}$  1.58), H-10b( $\delta_{\text{H}}$  1.82), H-11( $\delta_{\text{H}}$  3.40)]을 확인할 수 있었다. H-11( $\delta_{\text{H}}$  3.33)은 화학적 이동값으로 보아 전기음성도가 큰 NH와 연결되어 있을 것으로 예상하였다. 028-3은 028-1과 비슷한  $^1\text{H}$  NMR 스펙트럼을 보였지만, 028-1에서는 보이지 않았던 2개의 oxygenated proton H-8( $\delta_{\text{H}}$  4.03), H-9( $\delta_{\text{H}}$  3.56)이 관찰됨으로써 028-1의 골격에서 olefinic proton H-8, H-9들이 dihydroxylation된 구조임을 예상할 수 있었다. H-2( $\delta_{\text{H}}$  5.90)부터 H-7( $\delta_{\text{H}}$  6.02)까지의 olefinic proton들이 15 Hz의 큰 coupling constant 값을 갖는 것으로 보아 모두 *trans* form으로 이루어진 polyene 계열의 화합물이라고 예상하였다.  $^{13}\text{C}$  NMR(Fig. 3-189)에서 6개의 olefinic carbon들[C-3( $\delta_{\text{C}}$  140.8), C-4( $\delta_{\text{C}}$  132.2), C-5( $\delta_{\text{C}}$  139.1), C-7( $\delta_{\text{C}}$  137.4), C-14( $\delta_{\text{C}}$  132.7), C-15( $\delta_{\text{C}}$  126.7)]와 carbonyl carbon C-13( $\delta_{\text{C}}$  168.4), 2개의  $\text{sp}^3$  methylene carbon들 [C-10( $\delta_{\text{C}}$  37.8), C-11( $\delta_{\text{C}}$  33.4)]과 2개의 oxygenated carbon [C-8( $\delta_{\text{C}}$  76.7), C-9( $\delta_{\text{C}}$  73.6)]의 존재를 확인할 수 있었다. gCOSY 스펙트럼(Fig. 3-190)에서는 H-2( $\delta_{\text{H}}$  5.85)부터 H-6( $\delta_{\text{H}}$  6.28), H-7( $\delta_{\text{H}}$  6.44)부터 H-11( $\delta_{\text{H}}$  3.33), H-14( $\delta_{\text{H}}$  6.21)과 H-15( $\delta_{\text{H}}$  5.64/6.23)의 correlation을 통해 이들 proton들이 서로 인접해 있음을 알 수 있었다. gHSQC 스펙트럼(Table 3-22)을 통해  $^1\text{H}$ 과  $^{13}\text{C}$ 의 직접적인 연결을 확인할 수 있었는데, 6개의 olefinic group들 [C-3/H-3( $\delta$  140.8/7.23), C-4/H-4( $\delta$  132.2/6.40), C-5/H-5( $\delta$  139.1/6.61), C-7/H-7( $\delta$  137.4/6.02), C-14/H-14( $\delta$  132.7/6.21), C-15/H-15( $\delta$  126.7/5.64, 6.20)]과 2개의  $\text{sp}^3$  methylene들 [C-10/H-10 ( $\delta$  37.8/1.58, 1.82), C-11/H-11( $\delta$  33.4/3.40)]과 dihydroxylic group [C-8/H-8( $\delta$  76.7/4.03), C-9/H-9( $\delta$  73.6/3.56)]을 확인하였다. 화합물 028-3는 소량 분리되었기 때문에 1D, COSY NMR data를 통해 구조를 밝혔고(Fig. 3-186), 재배양을 통하여 양을 더 확보하여  $^{13}\text{C}$  과 2D NMR data를 확보하는 중에 있다. IR 실험 결과,  $\nu_{\text{max}}$   $1533\text{cm}^{-1}$ (CONH, amide carbonyl),  $2954\text{cm}^{-1}$ ( $\text{sp}^3$  C-H),  $3274\text{cm}^{-1}$ (O-H) 등의 functional group들을 확인하였고, UV 실험 결과, 028-3은 232 nm, 286 nm에서 각각  $\log \epsilon$  (4.40), (4.22)의 최대흡광도 값을 갖는 것을 알 수 있었다. 이러한 분광학적 data와 HR-ESIMS  $m/z$  280.1184  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (calcd  $m/z$  280.1185  $[\text{M}-\text{H}]^-$ )을 바탕으로 028-3은 분자량이 281이며 dihydroxyl group을 갖는 polyene 계열의 물질임을 알 수 있었다. 문헌 검색 결과, 028-3은 *Streptomyces* sp.에서 최초로 분리된 신규물질임을 알 수 있었다.

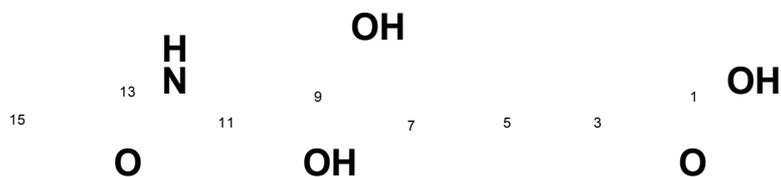


Fig. 3-185. The structure of 028-3.



Fig. 3-186. Key COSY correlations for 028-3.

Table 3-22. NMR Data for 028-3 in CD<sub>3</sub>OD

Position	$\delta_C^a$	$\delta_H$ , mult. ( $J$ in Hz) <sup>b</sup>	COSY
1			
2		5.90, d (15)	3
3	140.8	7.23, dd (15, 11)	4
4	132.2	6.40, m	5
5	139.1	6.61, dd (15, 11)	
6		6.22, overlapped	
7	137.4	6.02, dd (15, 11)	8
8	76.7	4.03, t (5)	9
9	73.6	3.56, brt	10
10a		1.58, m	
10b	37.8	1.82, m	11
11	33.4	3.40, t (7)	
13	168.4		
14	132.7	6.21, overlapped	15
15a		5.64, m	
15b	126.7	6.20, overlapped	

<sup>a</sup>Measured at 125MHz. <sup>b</sup>Measured at 500MHz.

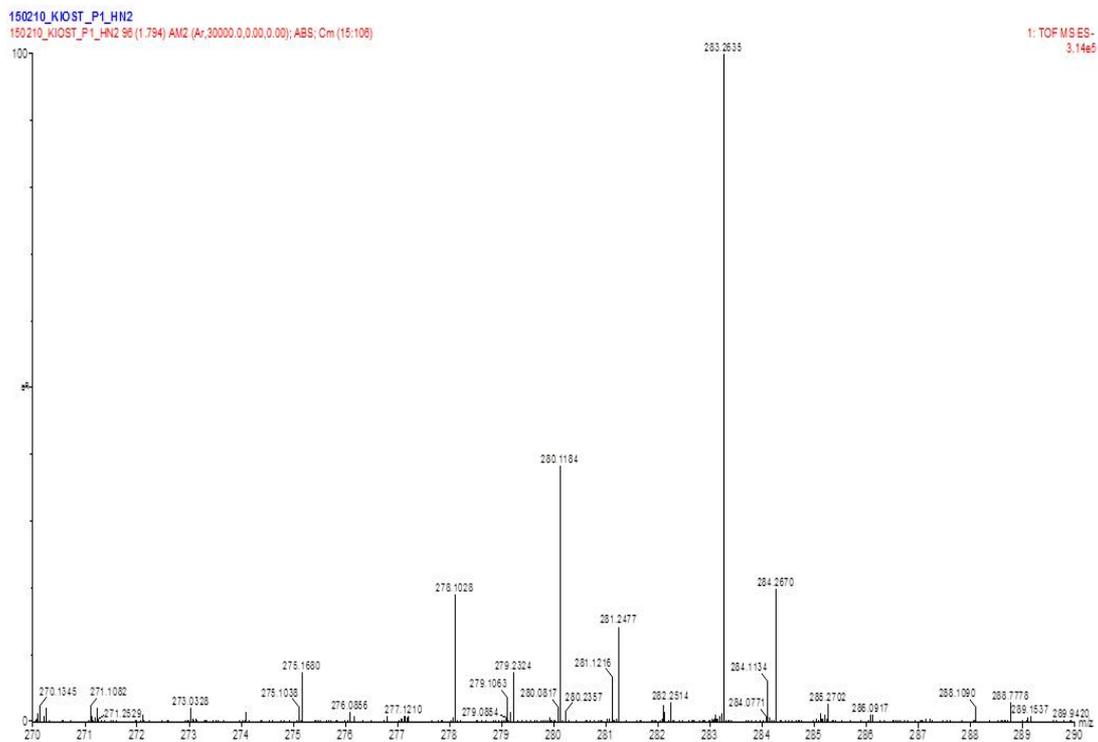


Fig. 3-187. HR-ESIMS spectrum of 028-3 (negative mode).

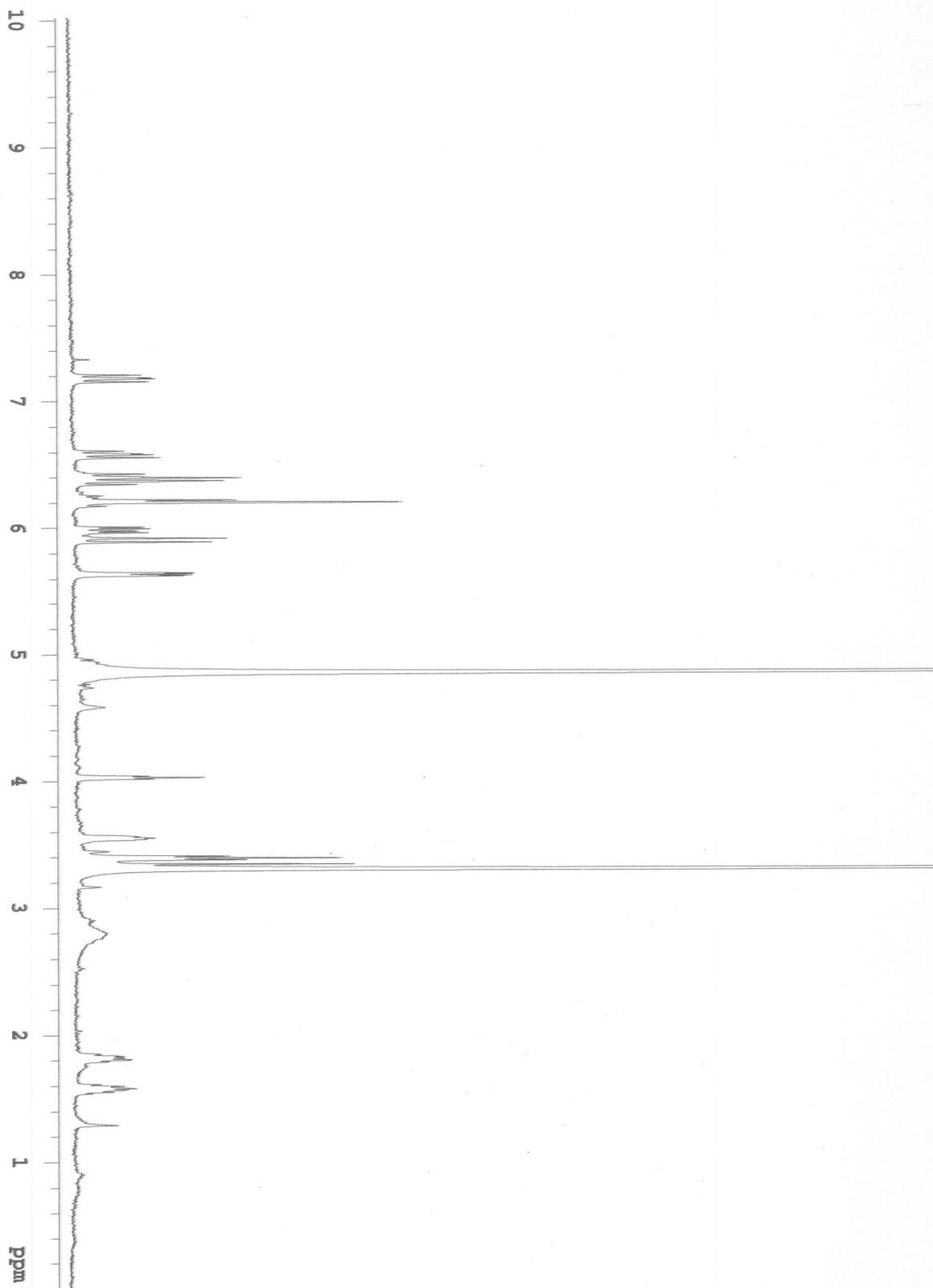


Fig. 3-188.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **028-3** in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

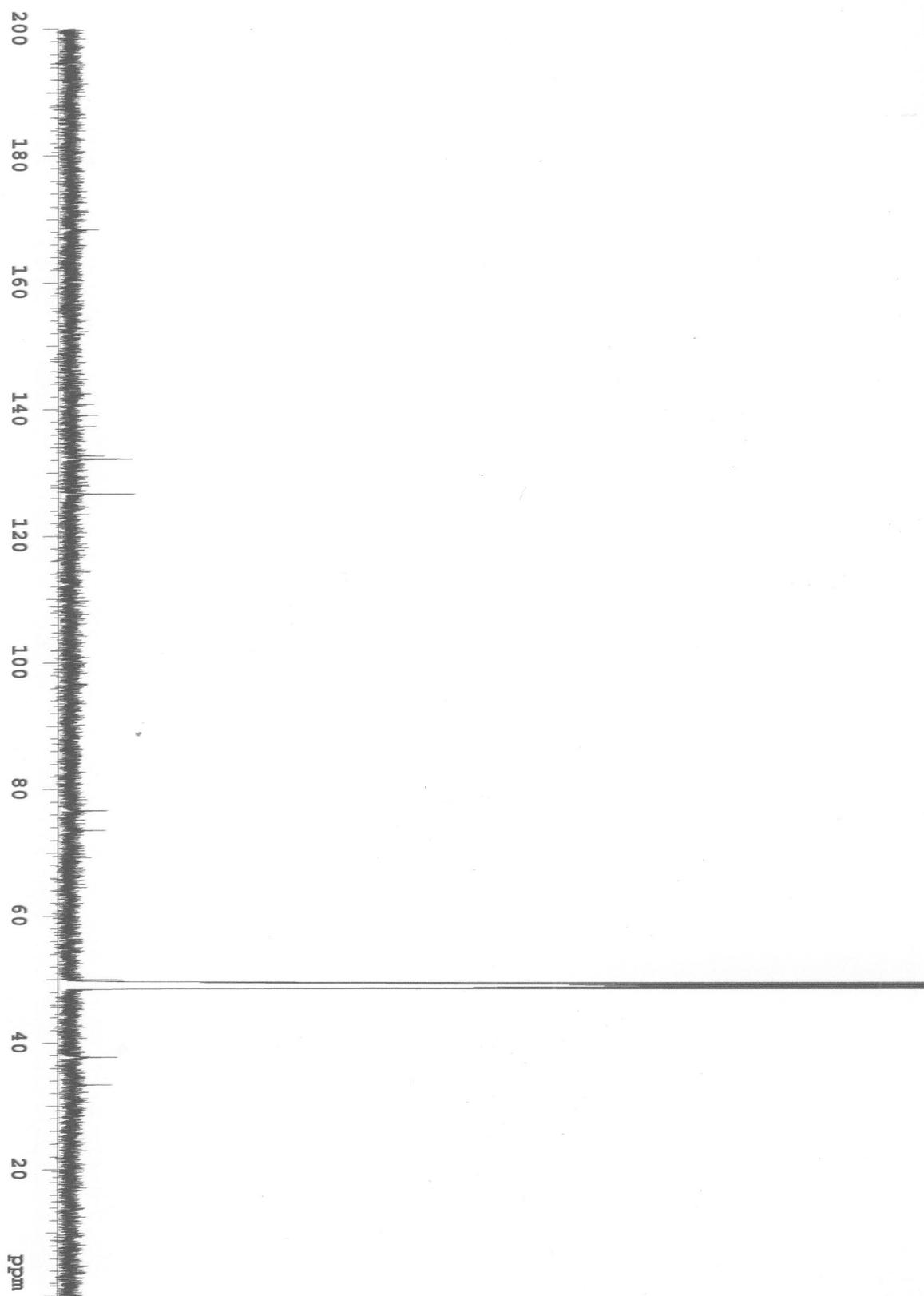


Fig. 3-189.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 028-3 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

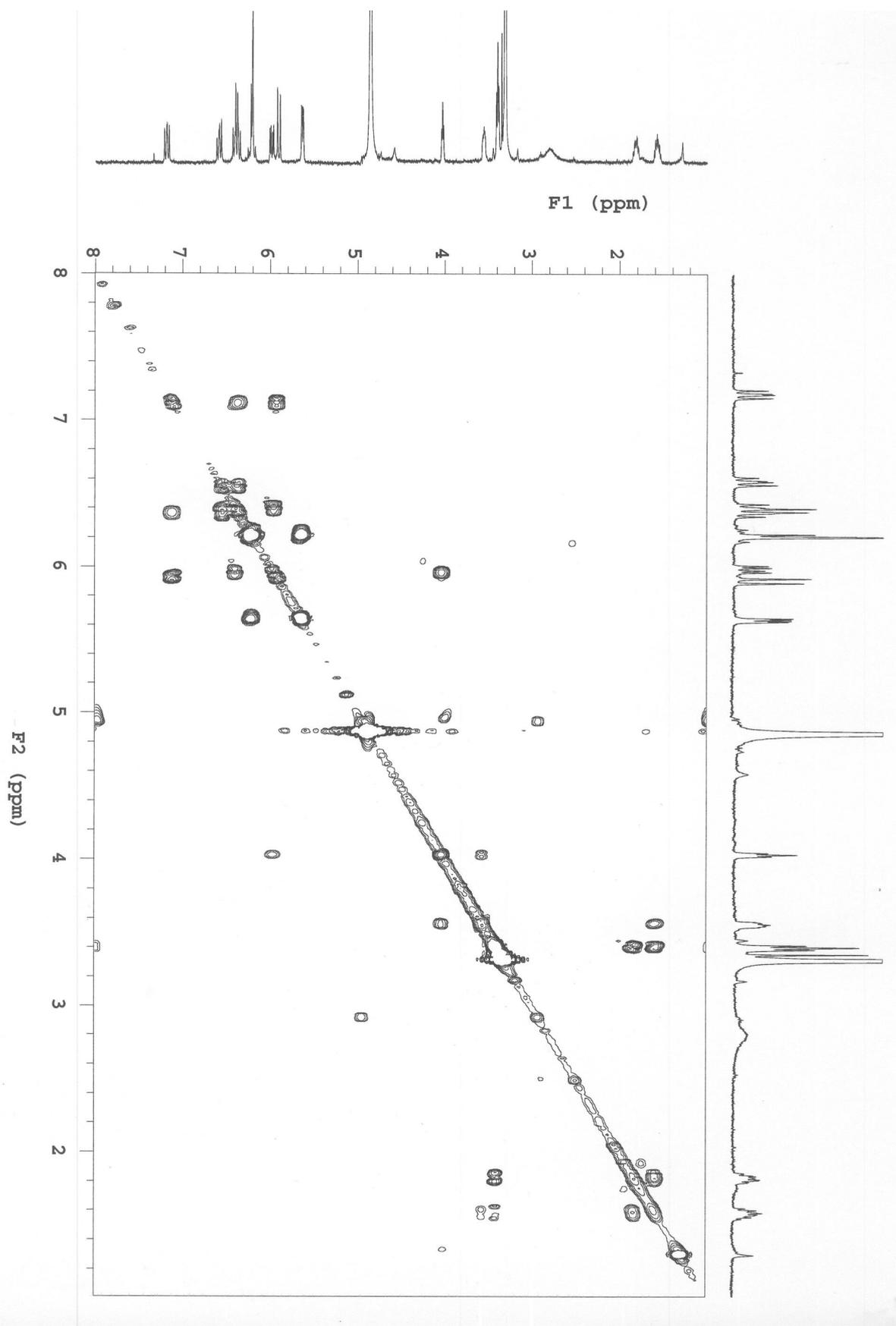


Fig. 3-190. COSY spectrum of 028-3 in CD<sub>3</sub>OD.

#### 마. 신규 화합물 028-4의 구조 결정

신규 화합물 028-4(Fig. 3-191)은 갈색의 무정형 고체(brown amorphous solid)로 분리되었고, HR-ESIMS와  $^{13}\text{C}$  NMR을 통해 분자식은  $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_5$ 로 결정되었다.  $^1\text{H}$  NMR(Fig. 3-194)스펙트럼에서 9개의 olefinic proton들 [H-2( $\delta_{\text{H}}$  5.91), H-3( $\delta_{\text{H}}$  7.26), H-4( $\delta_{\text{H}}$  6.43), H-5( $\delta_{\text{H}}$  6.05), H-7( $\delta_{\text{H}}$  5.61), H-8( $\delta_{\text{H}}$  5.79), H-14( $\delta_{\text{H}}$  6.21), H-15a( $\delta_{\text{H}}$  5.64), H-15b( $\delta_{\text{H}}$  6.20)], 2개의  $\text{sp}^3$  methylene proton들 [H-10( $\delta_{\text{H}}$  1.74), H-11( $\delta_{\text{H}}$  3.33)]의 존재를 확인할 수 있었다. H-11( $\delta_{\text{H}}$  3.33)은 화학적 이동 값으로 보아 전기음성도가 큰 NH와 연결되어 있을 것으로 예상하였다. H-2( $\delta_{\text{H}}$  5.91)부터 H-5( $\delta_{\text{H}}$  6.05)까지의 olefinic proton들과 H-7( $\delta_{\text{H}}$  5.61)과 H-8( $\delta_{\text{H}}$  5.79)의 olefinic proton들이 모두 15 Hz의 큰 coupling constant 값을 갖는 것으로 보아 olefine들이 모두 *trans* form으로 이루어진 polyene계열의 화합물임을 알 수 있었다. Oxygenated proton들 [H-6( $\delta_{\text{H}}$  4.26)과 H-9( $\delta_{\text{H}}$  4.15), H-1'( $\delta_{\text{H}}$  3.30)]의 존재를 통하여 028-4는 028-1 골격에서 H-6/H-7의 double bond가 migration된 후 oxidation되어 methoxyl group과 hydroxyl group이 도입된 구조임을 예상할 수 있었다.  $^{13}\text{C}$  NMR(Fig. 3-195)에서 8개의 olefinic carbon들 [C-2( $\delta_{\text{C}}$  123.7), C-3( $\delta_{\text{C}}$  145.4), C-4( $\delta_{\text{C}}$  130.5), C-5( $\delta_{\text{C}}$  142.5), C-7( $\delta_{\text{C}}$  130.0), C-8( $\delta_{\text{C}}$  137.7), C-14( $\delta_{\text{C}}$  132.2), C-15( $\delta_{\text{C}}$  126.7)], 2개의 carbonyl carbon들 [C-1( $\delta_{\text{C}}$  171), C-13( $\delta_{\text{C}}$  168.4)], 2개의  $\text{sp}^3$  methylene carbon들 [C-10( $\delta_{\text{C}}$  37.7), C-11( $\delta_{\text{C}}$  37.4)], 2개의 oxygenated carbon들 [C-6( $\delta_{\text{C}}$  82.8), C-9( $\delta_{\text{C}}$  70.6)], 1개의 methoxyl carbon C-1'( $\delta_{\text{C}}$  56.6)의 존재를 알 수 있었다. gCOSY 스펙트럼(Fig. 3-196)에서, H-2( $\delta_{\text{H}}$  5.91)부터 H-11( $\delta_{\text{H}}$  3.33)까지, H-14( $\delta_{\text{H}}$  6.21)와 H-15( $\delta_{\text{H}}$  5.64/6.20)의 correlation을 통해 이 부분의 부분구조를 알 수 있었다. gHSQC 스펙트럼(Fig. 3-197)을 통해  $^1\text{H}$ 과  $^{13}\text{C}$ 의 직접적인 연결을 확인할 수 있었는데, 8개의 olefinic group들 [C-2/H-2( $\delta$  123.7/5.91), C-3/H-3( $\delta$  145.4/7.26), C-4/H-4( $\delta$  130.5/6.43), C-5/H-5( $\delta$  142.5/6.05), C-7/H-7( $\delta$  130.0/5.61), C-8/H-8( $\delta$  137.7/5.79), C-14/H-14( $\delta$  132.2/6.21), C-15/H-15( $\delta$  126.7/5.64, 6.20)], 2개의  $\text{sp}^3$  methylene group들 [C-10/H-10( $\delta$  37.7/1.74), C-11/H-11( $\delta$  37.4/3.33)], 2개의 oxygenated group들 [C-6/H-6( $\delta$  82.8/4.26), C-9/H-9( $\delta$  70.6/4.15)], 1개의 methoxyl group [C-1'/H-1'( $\delta$  56.6/3.30)]의 존재를 확인하였다. gHMBC(Fig. 3-197)에서 carboxylic carbon C-1( $\delta_{\text{C}}$  171)은 H-2( $\delta_{\text{H}}$  5.91), H-3( $\delta_{\text{H}}$  7.26)과 correlation 하며, 말단에 위치하는 것을 알 수 있었다. Methoxy group의 위치는 C-6( $\delta_{\text{C}}$  82.8)과 H-1'( $\delta_{\text{H}}$  3.30)의 correlation을 통하여 C-6에 연결되어 있는 것을 알 수 있었으며, 또한 hydroxyl group의 위치는 C-9의 화학적 이동값( $\delta_{\text{C}}$  70.6) 및 C-9과 H-7( $\delta_{\text{H}}$  5.61), H-8( $\delta_{\text{H}}$  5.79), H-10( $\delta_{\text{H}}$  1.74), H-11( $\delta_{\text{H}}$  3.33)의 HMBC correlation을 통하여 C-9에 연결되어 있는 것을 알 수 있었다. Carbonyl carbon C-13( $\delta_{\text{C}}$  168.4)은 H-11( $\delta_{\text{H}}$  3.33), H-14( $\delta_{\text{H}}$  6.21), H-15( $\delta_{\text{H}}$  5.64/6.20)와 long-range correlation을 보였으며, 이로써 acrylamide moiety를 확인할 수 있었다. H-11( $\delta_{\text{H}}$  3.33)의 HMBC correlation들을 통해 acrylamide moiety와 나머지 부분의 부분구조가 연결됨을 확인할 수 있었으며, 028-4의 구조를 결정할 수 있었다(Fig. 3-192).

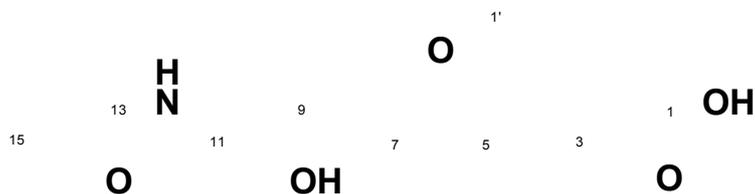


Fig. 3-191. The structure of 028-4.



Fig. 3-192. Key COSY and HMBC correlations for 028-4.

Table 3-23. NMR Data for 028-4 in CD<sub>3</sub>OD

Position	$\delta_c^a$	$\delta_H$ , mult. ( $J$ in Hz) <sup>b</sup>	COSY	HMBC
1	171			
2	123.7	5.91, d (15)	3	1, 4
3	145.4	7.26, dd (15, 11)	4	1, 5
4	130.5	6.43, dd (15, 11)	5	3, 6
5	142.5	6.05, dd (15, 11)	6	3, 6
6	82.8	4.26, t (7)	7	5, 8, 1'
7	130.0	5.61, dd (15, 11)	8	6, 9
8	137.7	5.79, dd (15, 11)	9	6, 7, 9
9	70.6	4.15, m	10	7, 8 10
10	37.7	1.74, m	11	9, 11
11	37.4	3.33, m		9, 10, 13
13	168.4			
14	132.2	6.21, overlapped	15	13
15a		5.64, m		
15b	126.7	6.20, overlapped		13, 14
1'	56.6	3.30, s		6

<sup>a</sup>Measured at 125MHz. <sup>b</sup>Measured at 500MHz.

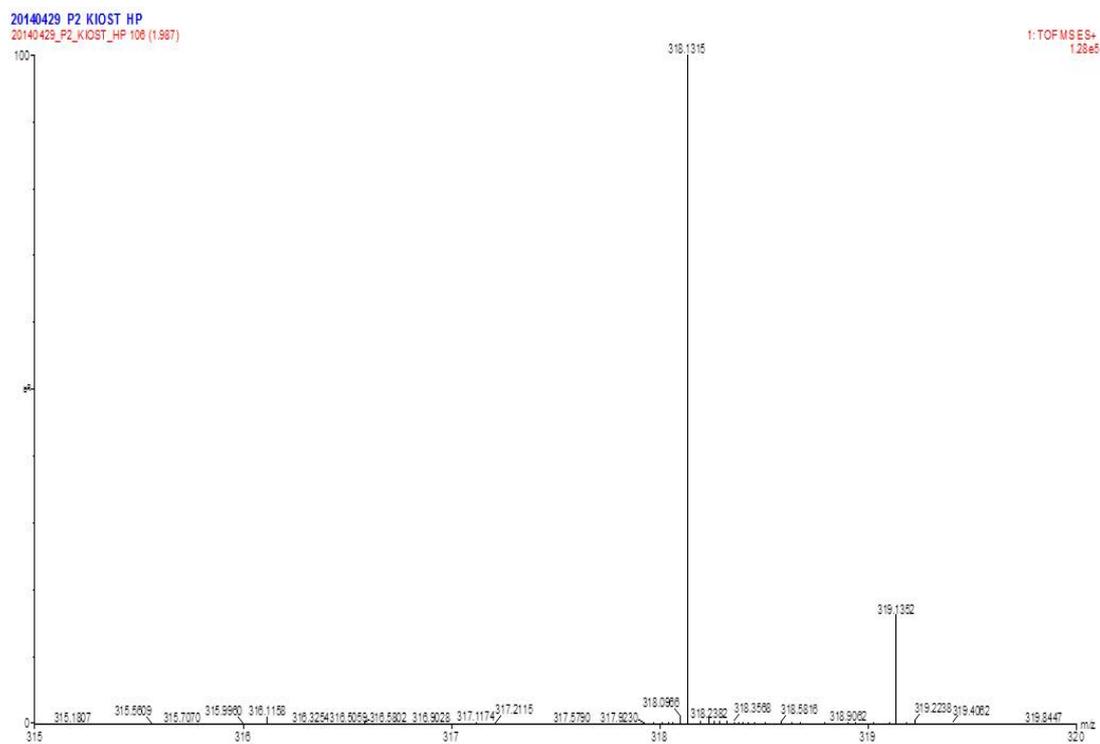


Fig. 3-193. HR-ESIMS spectrum of **028-4**(positive mode).

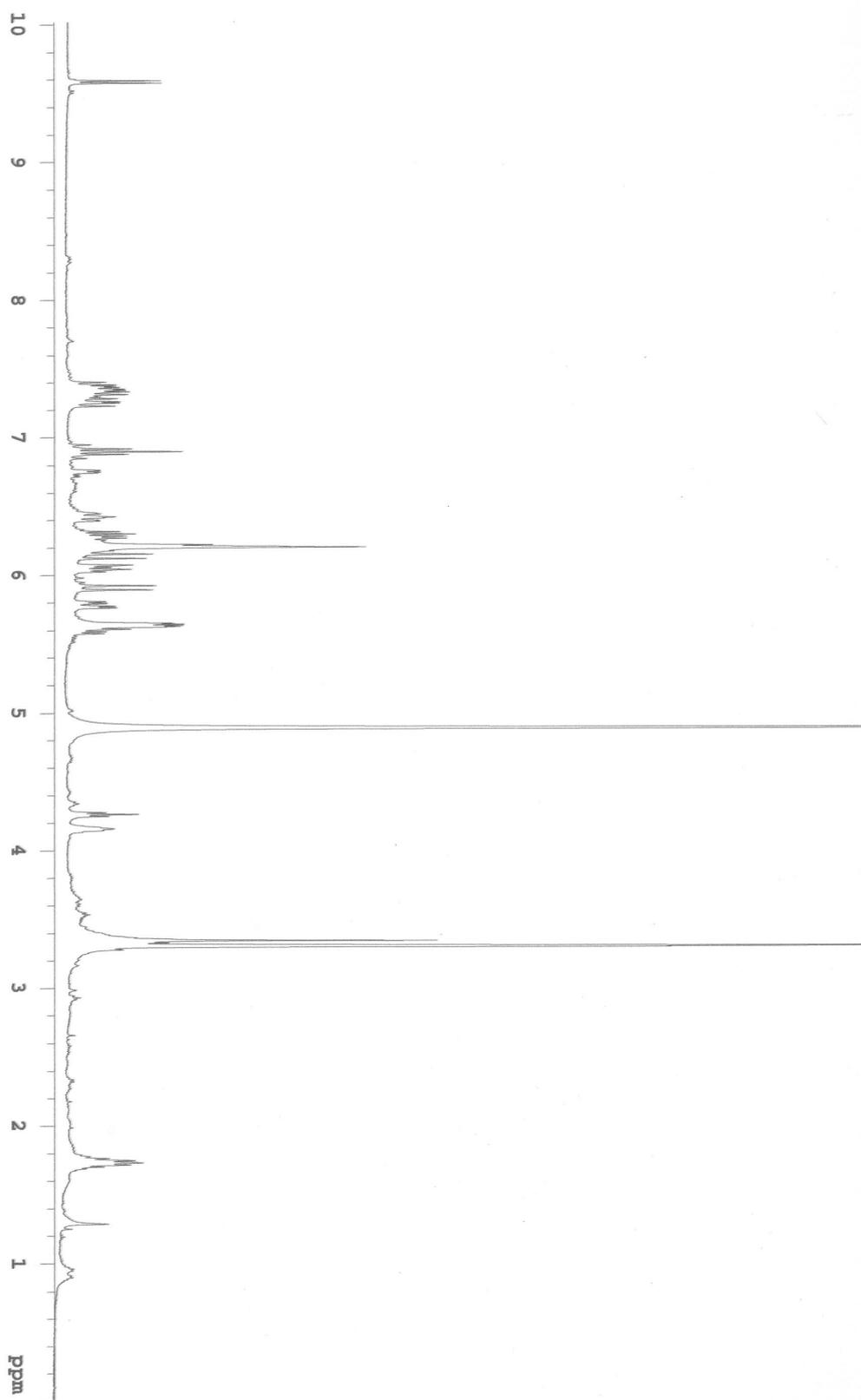


Fig. 3-194.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 028-4 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

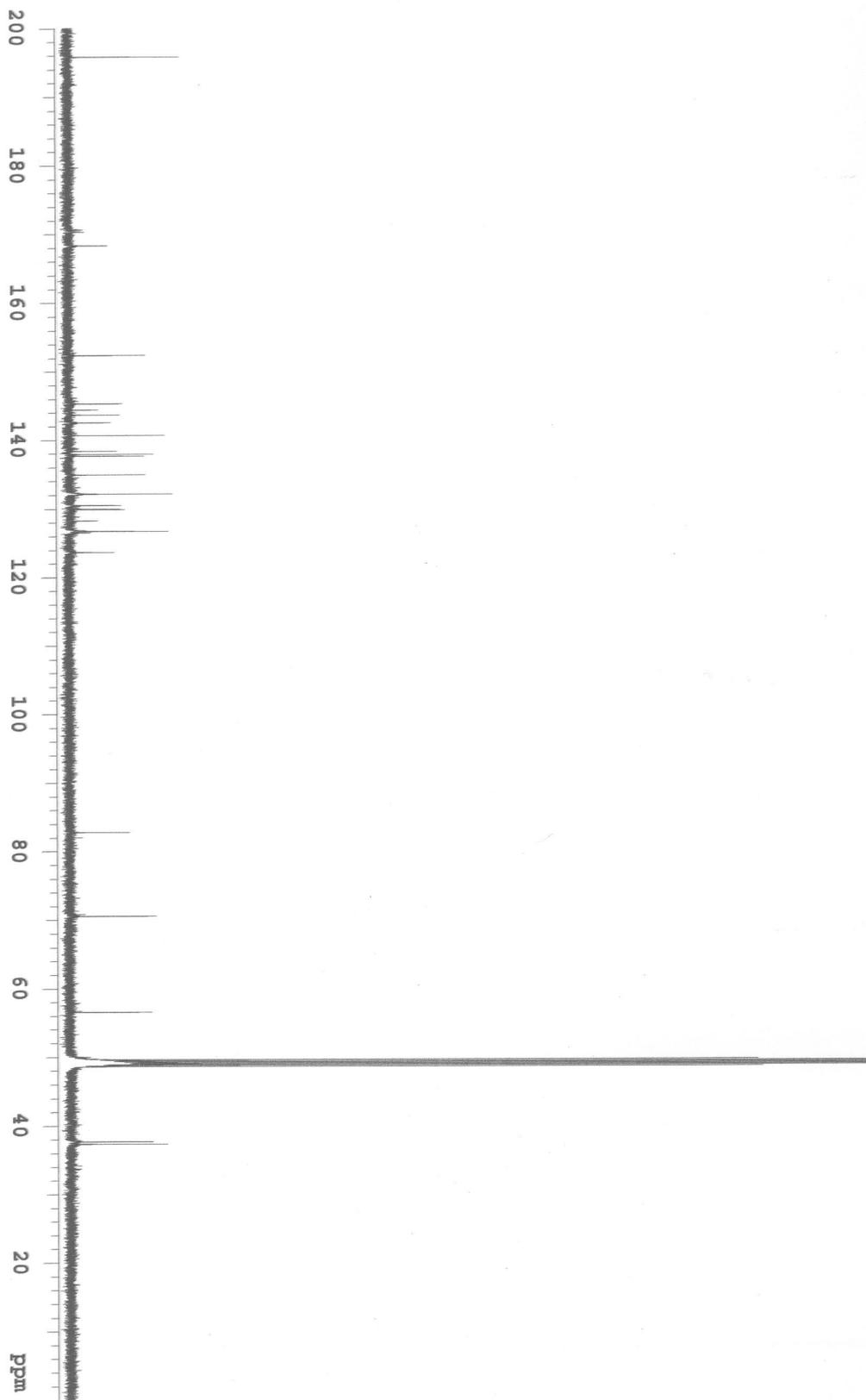


Fig. 3-195.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 028-4 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

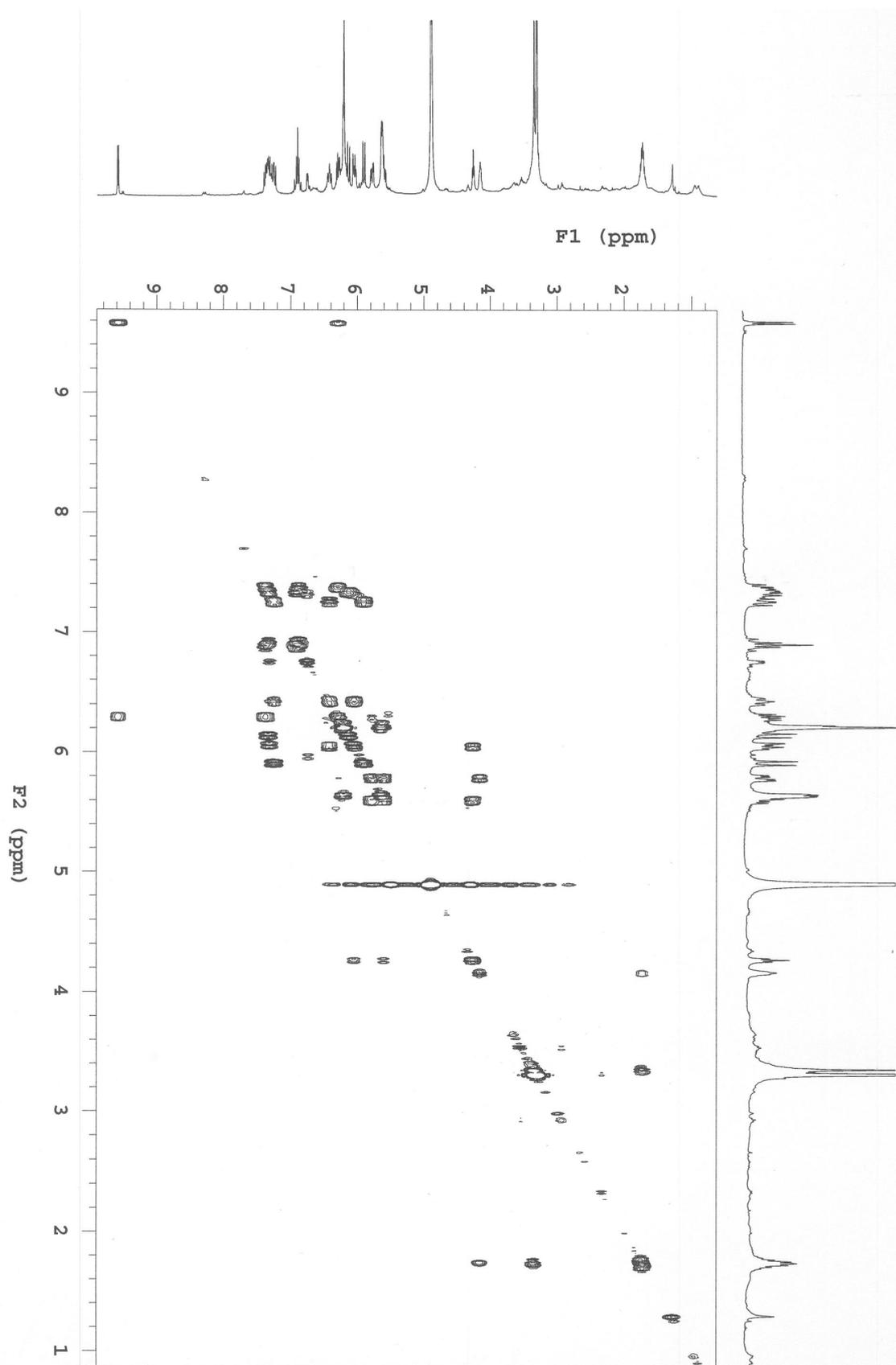


Fig. 3-196. COSY spectrum of 028-4 in CD<sub>3</sub>OD.

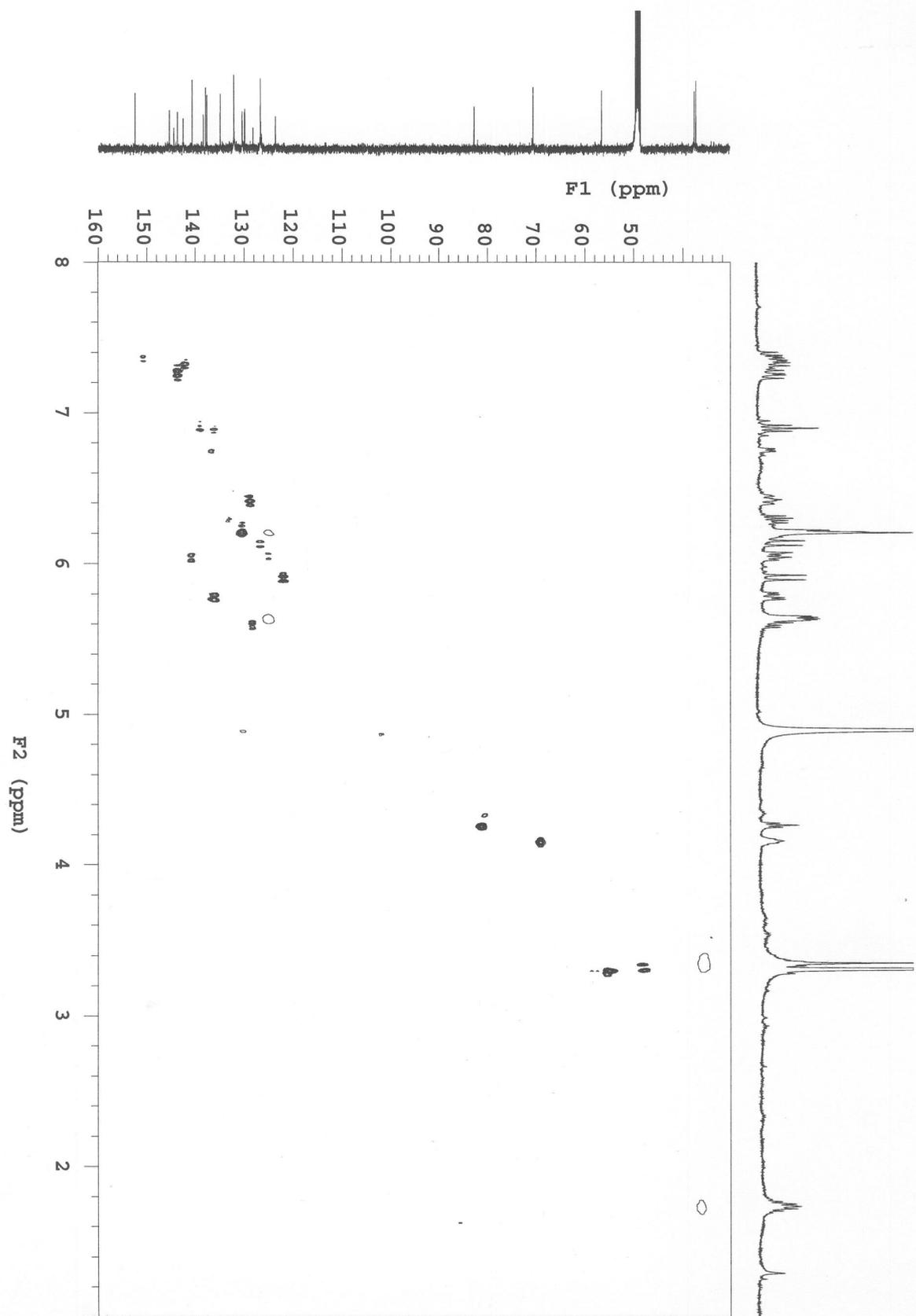


Fig. 3-197. HSQC spectrum of 028-4 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

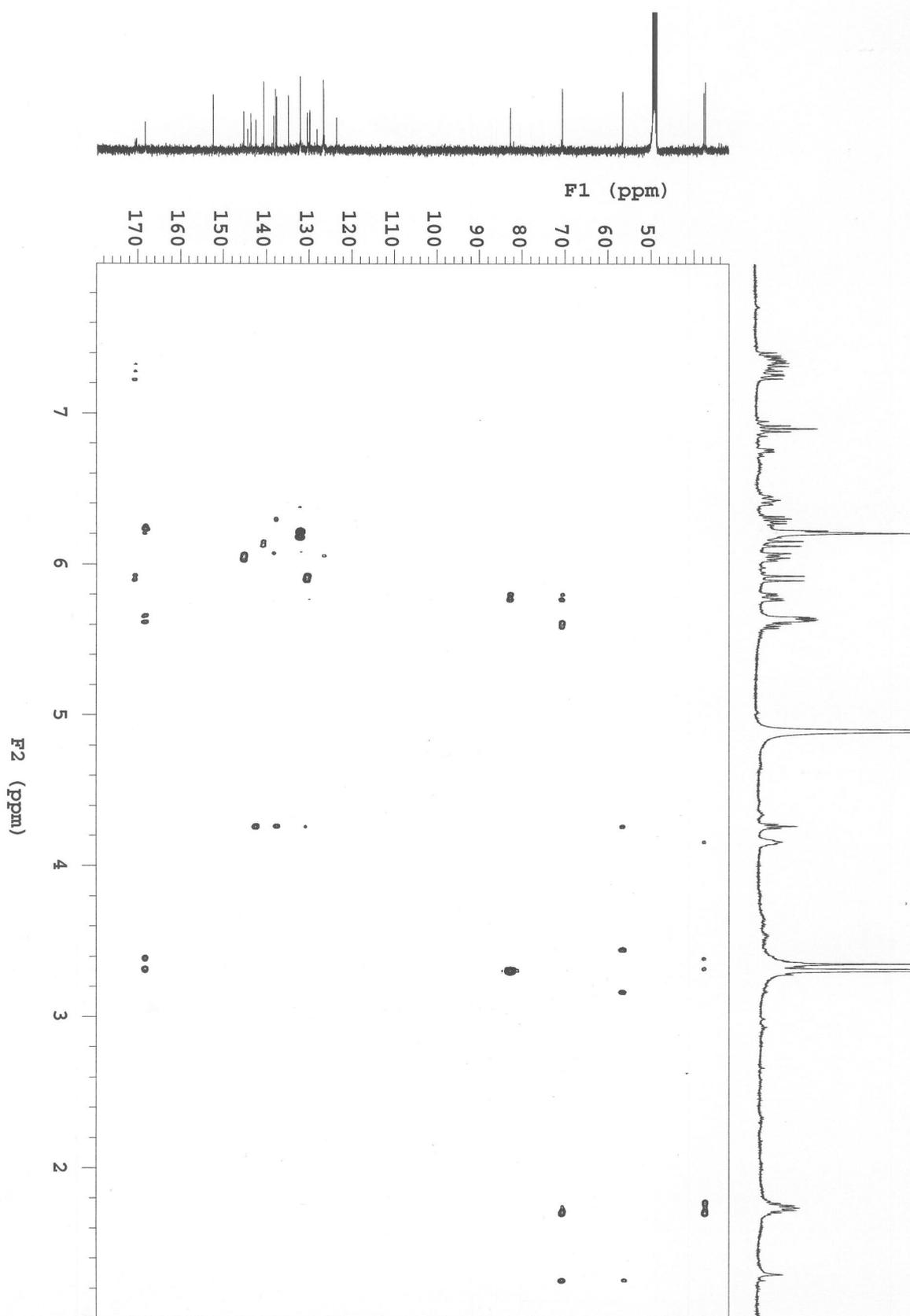


Fig. 3-198. HMBC spectrum of 028-4 in CD<sub>3</sub>OD.

## 바. 신규 화합물 028-5의 구조 결정

신규 화합물 028-5(Fig. 3-199)은 갈색의 무정형 고체(brown amorphous solid)로 분리되었고, HR-ESIMS 와  $^{13}\text{C}$  NMR 을 통해 분자식은  $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_5$ 로 결정되었다.  $^1\text{H}$  NMR(Fig. 3-202)에서 9개의 olefinic proton들 [H-2( $\delta_{\text{H}}$  5.91), H-3( $\delta_{\text{H}}$  7.30), H-4( $\delta_{\text{H}}$  6.43), H-5( $\delta_{\text{H}}$  6.67), H-6( $\delta_{\text{H}}$  6.45), H-7( $\delta_{\text{H}}$  5.86), H-14( $\delta_{\text{H}}$  6.21), H-15a( $\delta_{\text{H}}$  5.64), H-15b( $\delta_{\text{H}}$  6.20)]와 3개의  $\text{sp}^3$  methylene proton들 [H-10a( $\delta_{\text{H}}$  1.56), H-10b( $\delta_{\text{H}}$  1.75), H-11( $\delta_{\text{H}}$  3.37)]의 존재를 알 수 있었다. H-11( $\delta_{\text{H}}$  3.37)은 화학적 이동 값으로 보아 전기음성도가 큰 NH와 연결되어 있을 것으로 예상하였다. H-2( $\delta_{\text{H}}$  5.91)부터 H-7( $\delta_{\text{H}}$  5.86)까지의 olefinic proton들이 15 Hz의 큰 coupling constant 값을 갖는 것으로 보아, 028-5도 역시 *trans* form의 olefin으로 이루어진 polyene계열의 화합물임을 알 수 있었다. 상세한  $^1\text{H}$  NMR data의 해석을 통하여, 028-5는 028-1 골격에서 H-8/H-9의 double bond가 oxydation되고 methoxy group와 hydroxy group이 도입된 구조를 가지고 있는 것을 예상할 수 있었다.  $^{13}\text{C}$  NMR(Fig. 3-203)에서 8개의 olefinic carbon들 [C-2( $\delta_{\text{C}}$  123.4), C-3( $\delta_{\text{C}}$  145.8), C-4( $\delta_{\text{C}}$  130.5), C-5( $\delta_{\text{C}}$  140.9), C-6( $\delta_{\text{C}}$  135.1), C-7( $\delta_{\text{C}}$  136.2), C-14( $\delta_{\text{C}}$  132), C-15( $\delta_{\text{C}}$  126.7)], 2개의 carbonyl carbon들[C-1( $\delta_{\text{C}}$  171), C-13( $\delta_{\text{C}}$  168.4)], 2개의  $\text{sp}^3$  methylene carbon들[C-10( $\delta_{\text{C}}$  33.4), C-11( $\delta_{\text{C}}$  37.7)], 2개의 oxygenated carbon들[C-8( $\delta_{\text{C}}$  86.8), C-9( $\delta_{\text{C}}$  72.4)], 1개의 methoxy carbon C-1'( $\delta_{\text{C}}$  57.3)의 존재를 확인할 수 있었다. gCOSY 스펙트럼(Fig. 3-204)에서는 H-2( $\delta_{\text{H}}$  5.91)부터 H-8( $\delta_{\text{H}}$  3.59)까지, H-9( $\delta_{\text{H}}$  3.63)부터 H-11( $\delta_{\text{H}}$  3.37)의 correlation을 통해 proton들이 서로 인접해 있음을 알 수 있었다. gHSQC 스펙트럼(Fig. 3-205)을 통해  $^1\text{H}$ 과  $^{13}\text{C}$ 의 correlation을 확인할 수 있었는데, 8개의 olefinic group들[C-2/H-2( $\delta$  123.4/5.91), C-3/H-3( $\delta$  145.8/7.30), C-4/H-4( $\delta$  130.5/6.43), C-5/H-5( $\delta$  140.9/6.67), C-6/H-6( $\delta$  135.1/6.45), C-7/H-7( $\delta$  136.2/5.86), C-14/H-14( $\delta$  132/6.21), C-15/H-15( $\delta$  126.7/5.64, 6.20)], 2개의  $\text{sp}^3$  methylene들[C-10/H-10 ( $\delta$  33.4/1.56, 1.74), C-11/H-11( $\delta$  37.7/3.37)], 2개의 oxygenated carbon/proton들[C-8/H-8( $\delta$  86.8/3.59), C-9/H-9( $\delta$  72.4/3.63)], 1개의 methoxy group[C-1'/H-1'( $\delta$  57.3/3.30)]의 존재를 알 수 있었다. gHMBC(Fig. 3-206)에서 carboxylic carbon C-1( $\delta_{\text{C}}$  171)은 H-2( $\delta_{\text{H}}$  5.91), H-3( $\delta_{\text{H}}$  7.30)과 correlation하고 말단에 위치한 것을 예상할 수 있었다. Methoxy group의 위치는 C-8( $\delta_{\text{C}}$  86.8)과 H-1'( $\delta_{\text{H}}$  3.30), H-6( $\delta_{\text{H}}$  6.45), H-9( $\delta_{\text{H}}$  3.63)의 HMBC correlation을 통하여 C-8으로 정할 수 있었고, hydroxyl group의 위치는 C-9( $\delta_{\text{C}}$  72.4)의 화학적 이동값과 C-9과 H-7( $\delta_{\text{H}}$  5.86), H-8( $\delta_{\text{H}}$  3.59), H-10( $\delta_{\text{H}}$  1.56, 1.74), H-11( $\delta_{\text{H}}$  3.37)의 correlation을 통하여 확인할 수 있었다. Carbonyl carbon C-13( $\delta_{\text{C}}$  168.4)은 H-11( $\delta_{\text{H}}$  3.37), H-14( $\delta_{\text{H}}$  6.21), H-15( $\delta_{\text{H}}$  5.64, 6.20)와 correlation을 보였는데, 이로써 acrylamide moiety를 확인할 수 있었다. H-11( $\delta_{\text{H}}$  3.37)의 HMBC correlation들을 acrylamide moiety와 나머지 부분의 부분구조가 연결됨을 확인할 수 있었으며, 028-5의 구조를 결정할 수 있었다(Fig. 3-200). IR 측정 결과,  $2976\text{cm}^{-1}$ ( $\text{sp}^3$  C-H),  $3287\text{cm}^{-1}$ (O-H)와

같은 functional group들의 존재를 확인할 수 있었다. UV 스펙트럼에서, **028-5**는 286 nm 파장에서  $\log \epsilon$  (4.63)의 최대흡광도 값을 갖는 것을 알 수 있었다. 이러한 분광학적 data와  $m/z$  318.1315  $[M+Na]^+$  (calcd  $m/z$  318.1317  $[M+Na]^+$ ) (Fig. 3-201)를 바탕으로 **028-5**은 분자량이 295이며 **028-1**의 C-9에 hydroxyl group이 C-8에 methoxyl group이 도입된 polyene 계열의 물질임을 알 수 있었다. 문헌 조사 결과, **028-4**도 역시 자연계에서 최초로 분리된 신규물질로 확인되었다.

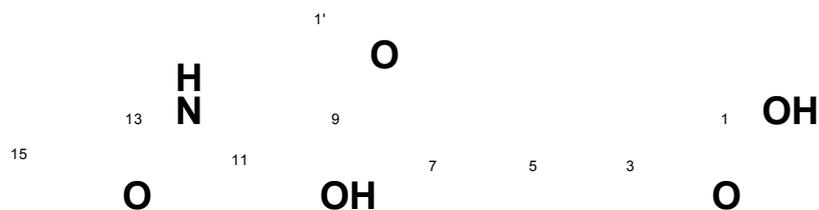


Fig. 3-199. The structure of **028-5**.

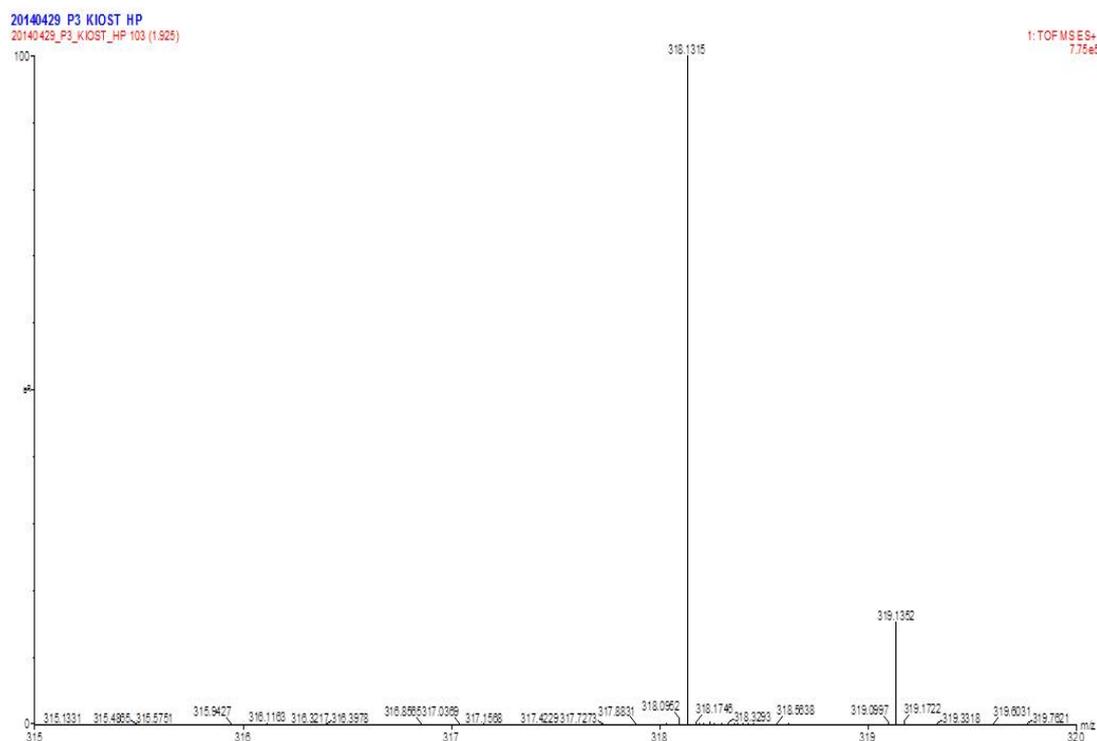


Fig. 3-200. Key COSY and HMBC correlations for **028-5**.

Table 3–24. NMR Data for **028–5** in CD<sub>3</sub>OD

Position	$\delta_C^a$	$\delta_H$ , mult. ( $J$ in Hz) <sup>b</sup>	COSY	HMBC
1	171			
2	123.4	5.91, d (15)	3	1, 4
3	145.8	7.30, dd (15, 11)	4	1, 5
4	130.5	6.43, dd (15, 11)	5	3, 6
5	140.9	6.67, dd (15, 11)	6	3, 6
6	135.1	6.45, dd, (15, 11)	7	5, 8
7	136.2	5.86, dd (15, 11)	8	6, 9
8	86.8	3.59, t (8)	9	6, 7, 9
9	72.4	3.63, m	10	7, 8 10
10a		1.56, m		
10b	33.4	1.75, m	11	9, 11
11	37.7	3.37, t (7)		9, 10, 13
13	168.4			
14	132	6.21, overlapped	15	13
15a		5.64, m		
15b	126.7	6.20, overlapped		13, 14
1'	57.3	3.30, s		8

<sup>a</sup>Measured at 125MHz. <sup>b</sup>Measured at 500MHz.

Fig. 3–201. HR–ESIMS spectrum of **028–5**(positive mode).

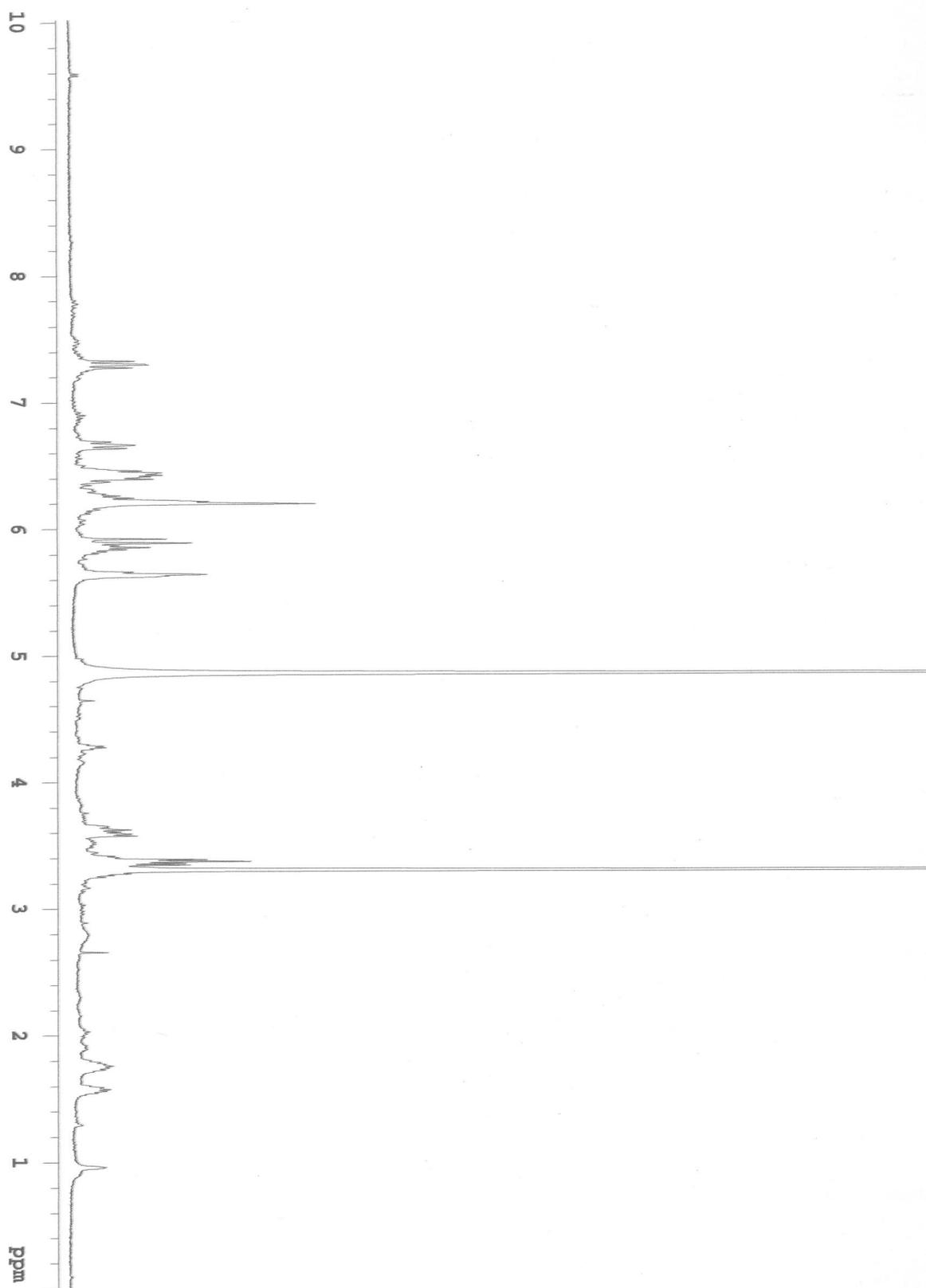


Fig. 3-202.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 028-5 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

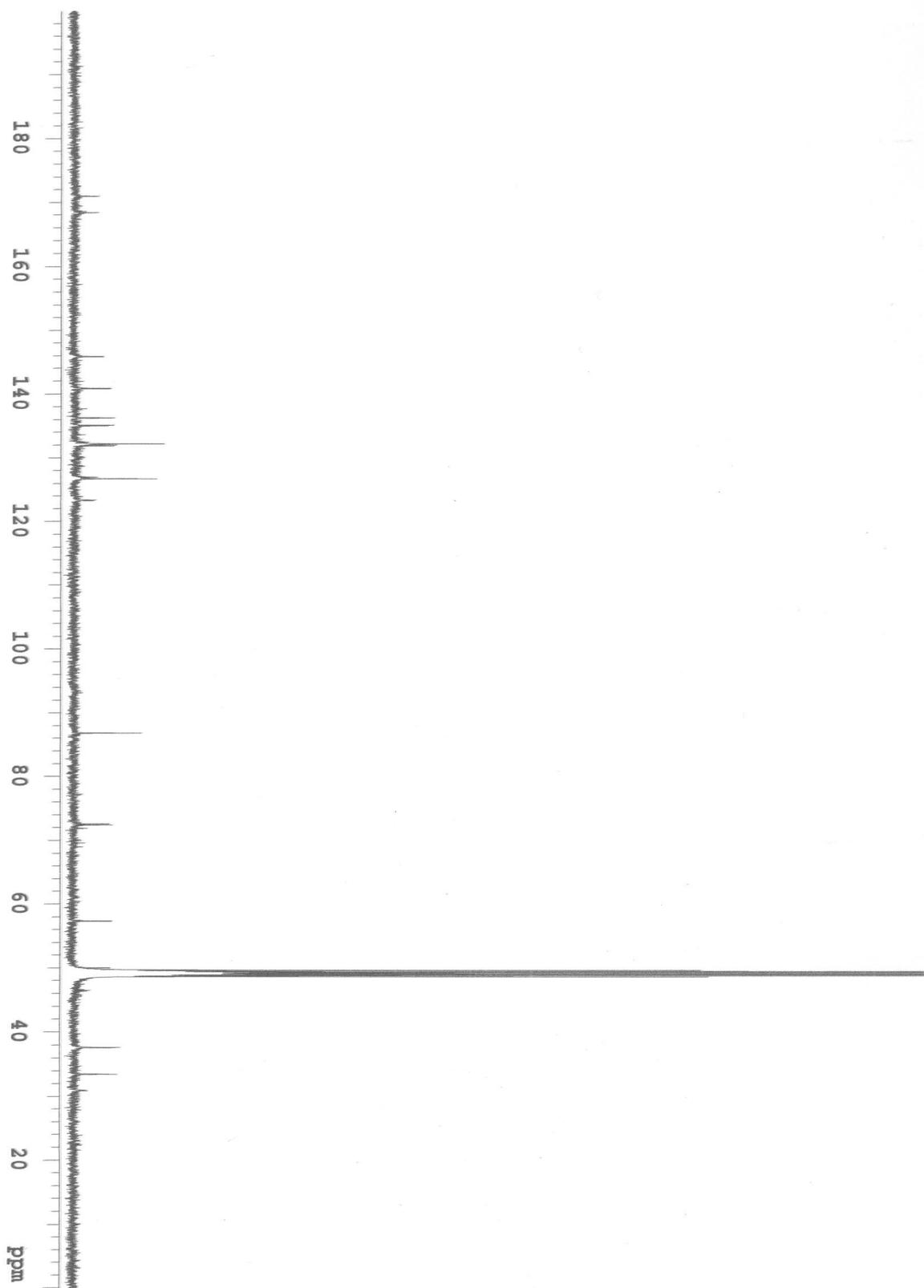


Fig. 3-203.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 028-5 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

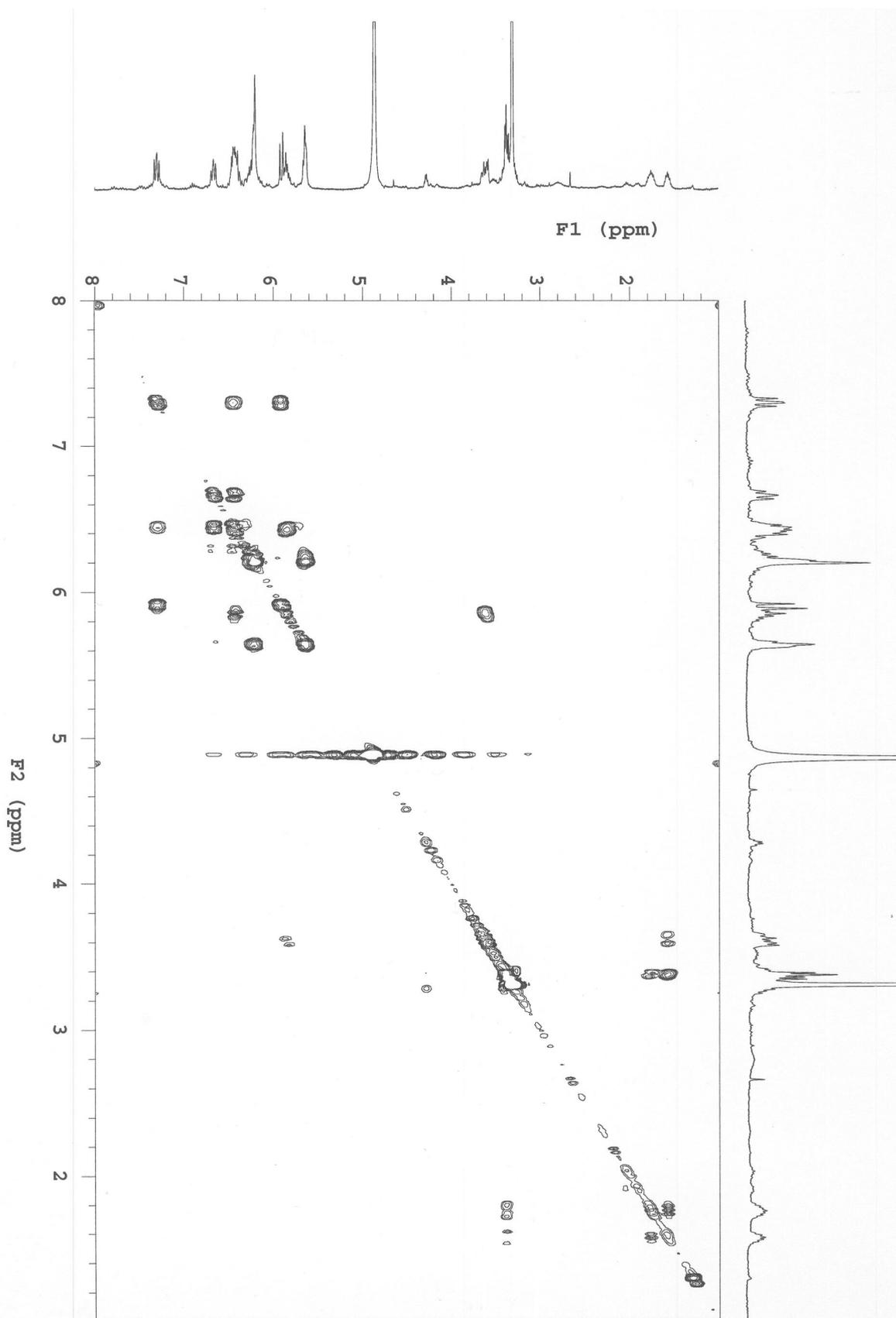


Fig. 3-204. COSY spectrum of 028-5 in CD<sub>3</sub>OD.

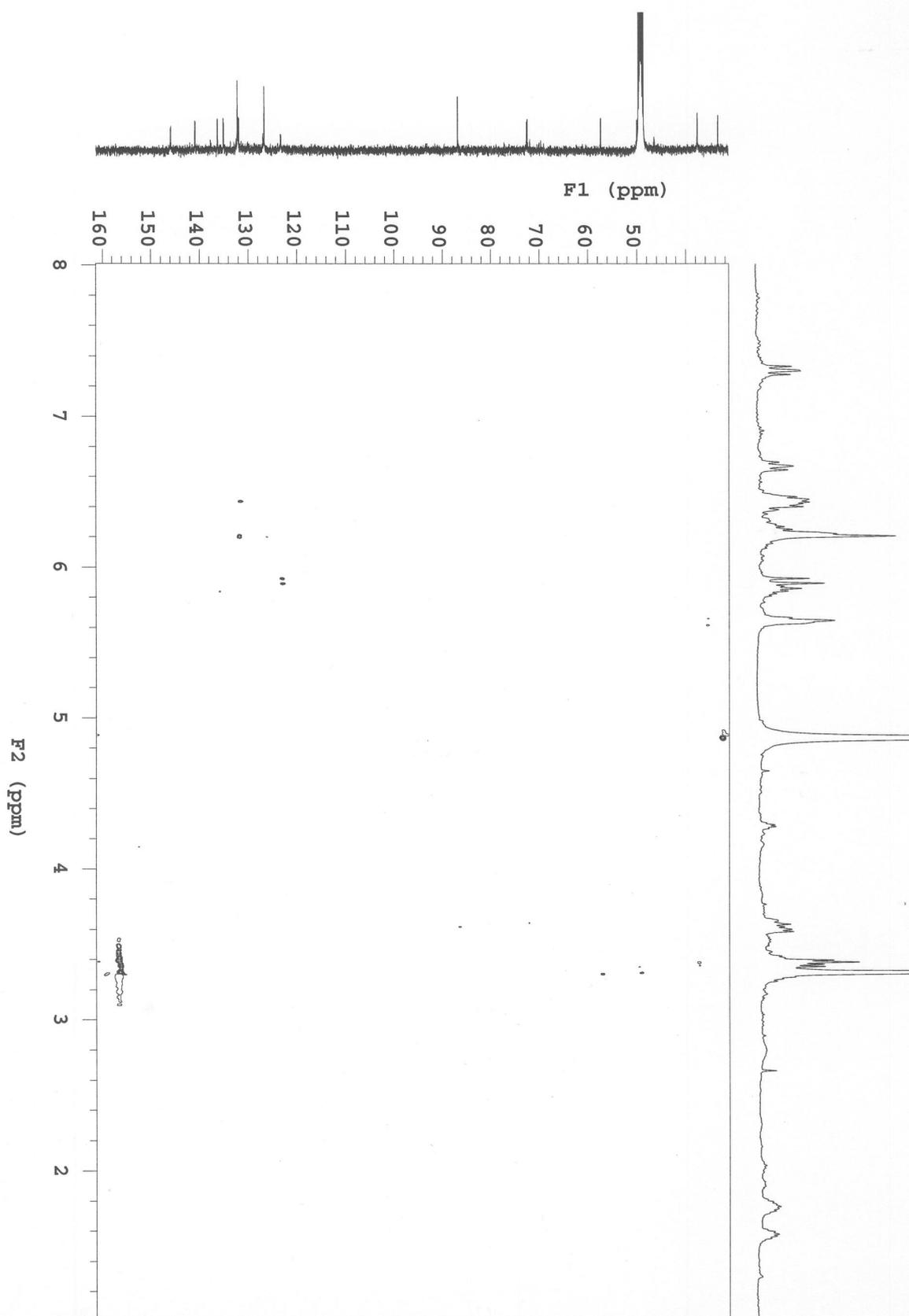


Fig. 3-205. HSQC spectrum of 028-5 in CD<sub>3</sub>OD.

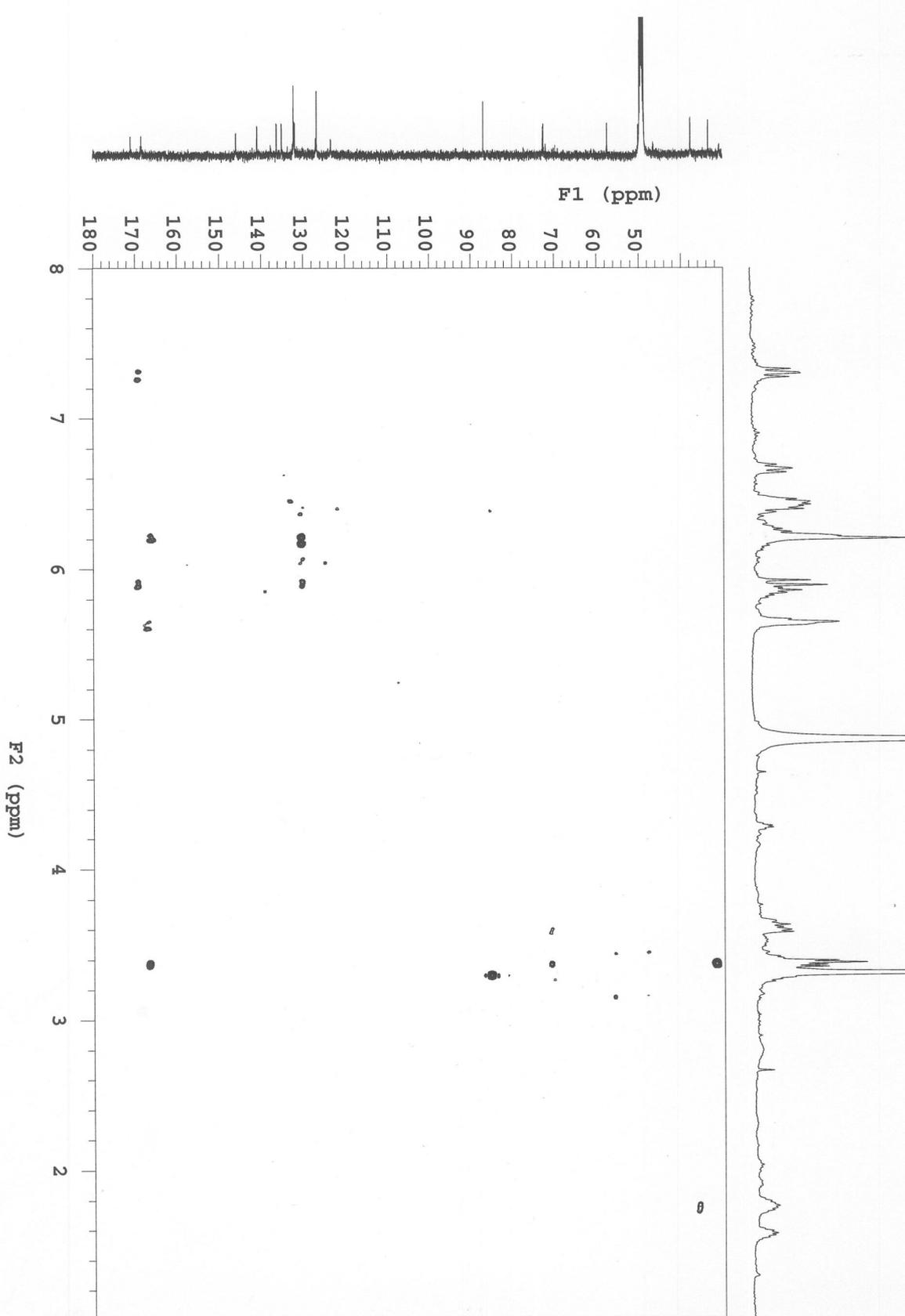


Fig. 3-206. HMBC spectrum of 028-5 in CD<sub>3</sub>OD.

## 제 11 절 해양곰팡이 *Penicillium* sp. 108YD020 균주로부터 신물질 분리 및 구조결정

108YD020 균주는 2010년 8월 동해의 왕돌초에서 채집한 해면동물에서 분리하였다. 채집한 해면 약 1g을 멸균된 해수 9ml가 채워진 falcon tube에 넣고 5분 동안 sonification 후 방선균 분리용 배지 Actinomycetes isolation agar(AIA), Humic acid Vitamin agar(HV), Bennett's agar(BN)에 각 0.1ml을 접종하여 골고루 도말하고, 28℃ 배양기에서 4일 동안 배양한 후, 형성된 곰팡이 집락을 2차 분리용 배지에 재차 streaking하여 분리한 균주의 집락형태를 관찰하여 순수 분리하여, -70℃에 보존하였다.

### 1. *Penicillium* sp. 108YD020 균주의 배양학적 특성과 18S rRNA 유전자 염기서열 분석에 의한 동정

108YD020 균주는 Malt extract배지에서 가장 성장이 양호하였으며, 최적 성장 온도는 28℃이었다. 108YD020의 Malt extract배지 상에서 배양 4일째에 흰 포자와 가운데는 갈색을 띠는 형태적 특징을 보였다. 액체 배양 시에 염의 농도가 32 g/L의 인공해수에서 생육이 가장 좋았다. 108YD020 균주의 동정 및 계통분류학적인 위치를 확인하기 위하여 18S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통해 확인한 결과, *Penicillium* sp. 로 동정되었다.

### 2. *Penicillium* sp. 108YD020로부터 신물질 분리 및 구조결정

분리, 보존된 곰팡이를 백금이에 묻혀 종균용 배지(malt)에 접종하여 4일간 배양하였다. 이 종균(seed culture)을 대량배양을 위해 종균과 동일한 배지(malt)을 사용하여 발효기 18 L와 2 L Fernbach flask (배지 1L x 5)에 각 10%씩 접종하였다. 발효기 18 L는 30rpm의 회전속도로 에어를 주입하여 7일간 배양하였고, 2 L 플라스크는 shaking incubator를 이용하여 28℃에서 100rpm의 회전속도로 7일간 배양하였다. 수확된 배양액을 연속원심분리기(continuouscentrifuge, 6,000rpm)을 사용하여 배양 상등액과 균사체로 분리하였다. 분리된 배양 상등액을 동일한 양의 EtOAc로 2번 추출하였다. EtOAc 추출액을 감압 하에서 농축, 건조하여 EtOAc 추출물 2.70 g 을 얻었다. 이 추출물을 역상 플래쉬 크로마토그래피(reversed-phase flash chromatography)를 이용하여 극성별로 분획하였다. 용출용매는 H<sub>2</sub>O : MeOH(80:20)으로 시작하여 MeOH를 20%씩 증가시켰으며, 마지막은 100% MeOH로 잔류물질을 세척하였다. 60% MeOH 층을 감압 하에서 농축, 건조시킨 후 267.5 mg의 농축물을 얻었고, C18 역상 HPLC(C18 reversed-phase HPLC, Column: YMC-ODS-A, 입자직경 5μm, 10x250mm(내경x길이), 이동상: H<sub>2</sub>O/MeOH(5:5), 용출속도 1.5 ml/min, RI detector)로 분리하여 단일 물질 020-1, 020-2를 얻었으며, 최종적으로 분리된 물질의 양은 각 5.2 mg, 1.8 mg이었다.

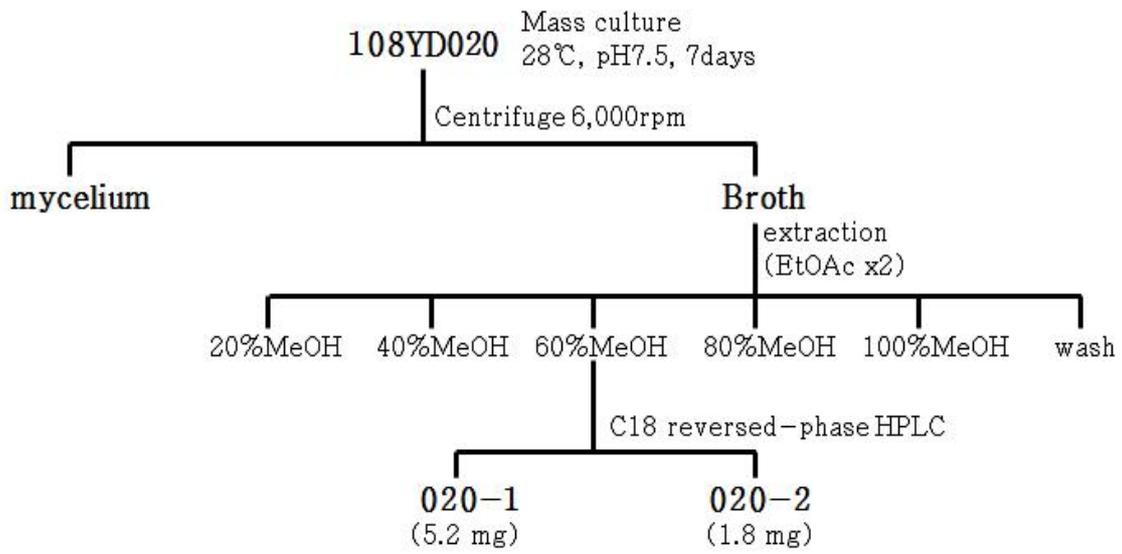


Fig. 3-207. Isolated 020-1~2 from the culture broth of the strain 108YD020.

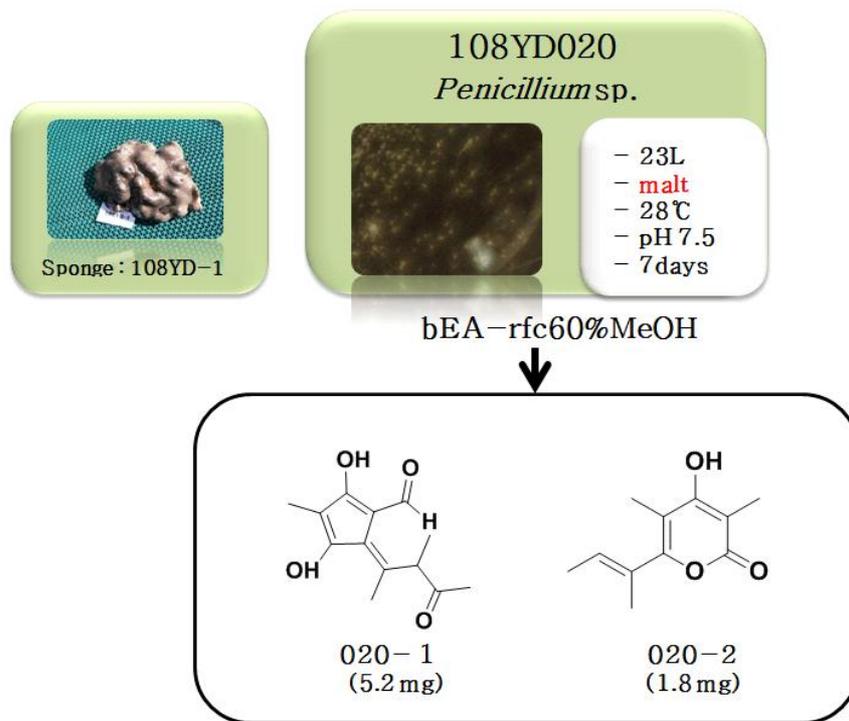


Fig. 3-208. Isolated 020-1~2 from strain 108YD020.

### 가. 신규 화합물 020-1의 구조 결정

신규 화합물 028-1(Fig. 3-209)은 갈색의 무정형 고체(brown amorphous solid)로 분리되었고, HR-ESIMS와  $^{13}\text{C}$  NMR을 통해 분자식은  $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_4$ 로 결정되었다.  $^1\text{H}$  NMR(Fig. 3-212)에서 3개의 methyl proton [H-5'( $\delta_{\text{H}}$  2.16), H-6'( $\delta_{\text{H}}$  1.48), H-1''( $\delta_{\text{H}}$  2.14)], 1개의  $\text{sp}^3$  methine proton[H-2'( $\delta_{\text{H}}$  4.8)], 1개의 acetyl proton[H-4'( $\delta_{\text{H}}$  2.04)], 1개의 aldehyde proton[H-1'''( $\delta_{\text{H}}$  9.91)], 2개의 oxygenated proton 들[H-1-OH( $\delta_{\text{H}}$  13.01), H-4-OH( $\delta_{\text{H}}$  13.01)]의 존재를 확인할 수 있었다.  $\text{sp}^2$  quaternary carbon들[C-2( $\delta_{\text{C}}$  112.5), C-3( $\delta_{\text{C}}$  115.5), C-5( $\delta_{\text{C}}$  109.2), C-1'( $\delta_{\text{C}}$  14 1.9)]와 2개의 oxygenated  $\text{sp}^2$  quaternary carbon들[C-1( $\delta_{\text{C}}$  163.1), C-4( $\delta_{\text{C}}$  16 0.3)], 3개의 methyl carbon들[C-5'( $\delta_{\text{C}}$  11.7), C-6'( $\delta_{\text{C}}$  17.3), C-1''( $\delta_{\text{C}}$  7.4)]와 1개의  $\text{sp}^3$  methine carbon C-2'( $\delta_{\text{C}}$  48.8), 2개의 carbonyl carbon들[C-3'( $\delta_{\text{C}}$  20 8.6), C-1'''( $\delta_{\text{C}}$  193.2)]을 확인할 수 있었다. gCOSY 스펙트럼(Fig. 3-214)에서 H-6'( $\delta_{\text{H}}$  1.48)와 H-2'( $\delta_{\text{H}}$  4.10)의 correlation을 통해 이들 proton들이 서로 연결됨을 알 수 있었고, NOESY 스펙트럼(Fig. 3-210)에서 H-1'''( $\delta_{\text{H}}$  9.91)와 H-2'( $\delta_{\text{H}}$  4.1 0), H-6'( $\delta_{\text{H}}$  1.48)의 correlation을 통해 3차원 구조상 이들 proton들이 서로 인접해 있는 형태를 취하고 있음을 알 수 있었다. gHSQC 스펙트럼(Fig. 3-215)을 통해  $^1\text{H}$ 과  $^{13}\text{C}$ 의 직접적인 연결을 알 수 있었는데, methine group [C-2'/H-2'( $\delta$  48.8/4.10)]와 3개의 methyl group들 [C-5'/H-5'( $\delta$  11.7/2.16), C-6'/H-6'( $\delta$  17.3/1.48), C-1''/H-1''(7.4/2.14)]을 확인하였고, acetyl group [C-4'/H-4'( $\delta$  28.6/2.04)], aldehyde group [C-1'''/H-1'''(193.2/9.91)]을 확인하였다. gHMBC 스펙트럼(Fig. 3-216)에서 H-1-OH( $\delta_{\text{H}}$  13.01)의 위치는 C-1( $\delta_{\text{C}}$  163.1), C-2( $\delta_{\text{C}}$  112.5), C-3( $\delta_{\text{C}}$  115. 5)와 correlation을 통해 확인하였고, H-1''( $\delta_{\text{H}}$  2.14)의 위치는 C-1( $\delta_{\text{C}}$  163.1), C- 4( $\delta_{\text{C}}$  160.3), C-5( $\delta_{\text{C}}$  109.2)와 long-range correlation을 통하여 C-5에 연결되는 것으로 결정할 수 있었다. C-3( $\delta_{\text{C}}$  115.5)이 H-2'( $\delta_{\text{H}}$  4.10), H-5'( $\delta_{\text{H}}$  2.16)와 cor relation됨으로써 cyclopentane과 side chain이 연결된 것을 확인 할 수 있었다. C-3' ( $\delta_{\text{C}}$  208.6)와 H-2'( $\delta_{\text{H}}$  4.8), H-4'( $\delta_{\text{H}}$  2.04), H-6'( $\delta_{\text{H}}$  1.48)의 correlation을 통 해 acetyl group의 위치를 확인 할 수 있었다(Fig. 3-210). IR 측정 결과,  $1607\text{cm}^{-1}$ (C =C),  $2987\text{cm}^{-1}$ ( $\text{sp}^3$  C-H),  $3369\text{cm}^{-1}$ (O-H) 등의 functional group들의 존재를 확인 할 수 있었다. UV 스펙트럼에서 020-1은 299 nm, 352 nm에서  $\log \epsilon$  (4.33), (4.2 0)의 최대 흡광도 값을 갖는 것을 확인하였다. 이러한 분광학적 data의 해석 및 HR-ES IMS  $m/z$  235.0972 [ $\text{M-H}$ ] $^-$  (calcd  $m/z$  235.0970 [ $\text{M-H}$ ] $^-$ ))(Fig. 3-211)를 바탕으로 020-1은 분자량이 236이며 *Penicillium* sp.에서 분리된 신규물질로 확인하였다.

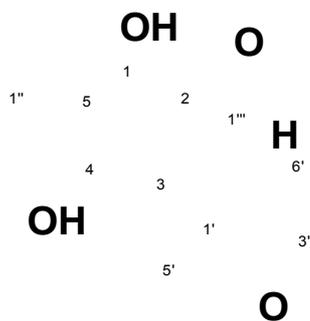


Fig. 3-209. The structure of 020-1.

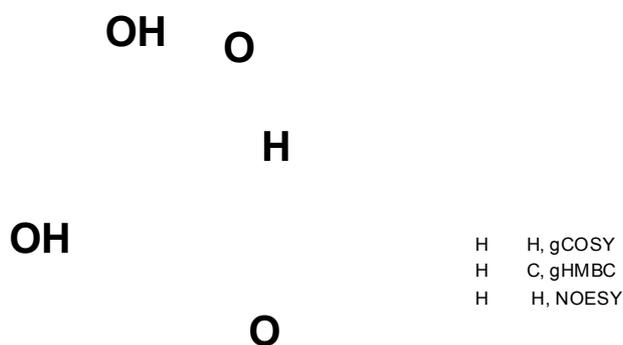


Fig. 3-210. Key COSY, NOESY and HMBC correlations for 020-1.

Table 3-25. NMR Data for 020-1 in CDCl<sub>3</sub>

Position	$\delta_c^a$	$\delta_H$ , mult. ( $J$ in Hz) <sup>b</sup>	COSY	HMBC
1	163.1			
2	112.5			
3	115.5			
4	160.3			
5	109.2			
1'	141.9			
2'	48.8	4.10, m		2, 3, 1', 3', 6'
3'	208.6			
4'	28.6	2.04, s		
5'	11.7	2.16, s		3, 1'
6'	17.3	1.48, d (7)	2'	1', 2', 3'
1''	7.4	2.14, s		1, 4, 5
1'''	193.2	9.91, s		
1-OH		13.01, s, overlapped		1, 2, 5
4-OH		13.01, s, overlapped		

<sup>a</sup>Measured at 125MHz. <sup>b</sup>Measured at 500MHz.

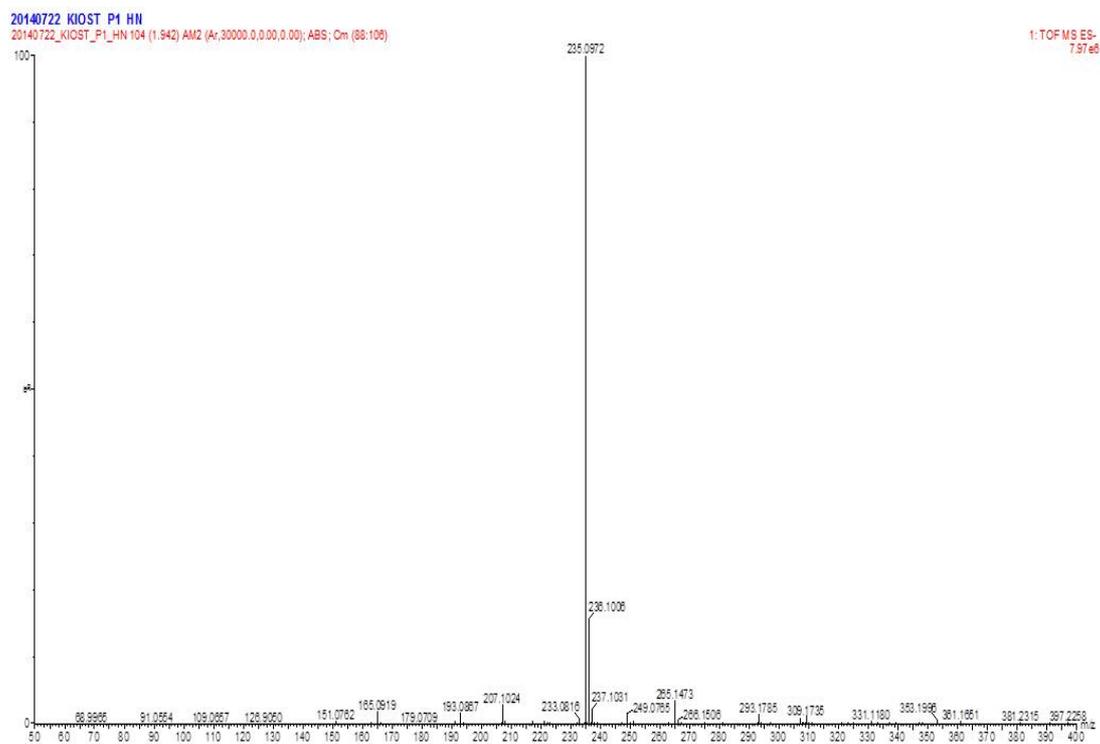


Fig. 3-211. HR-ESIMS spectrum of 020-1 (positive mode).

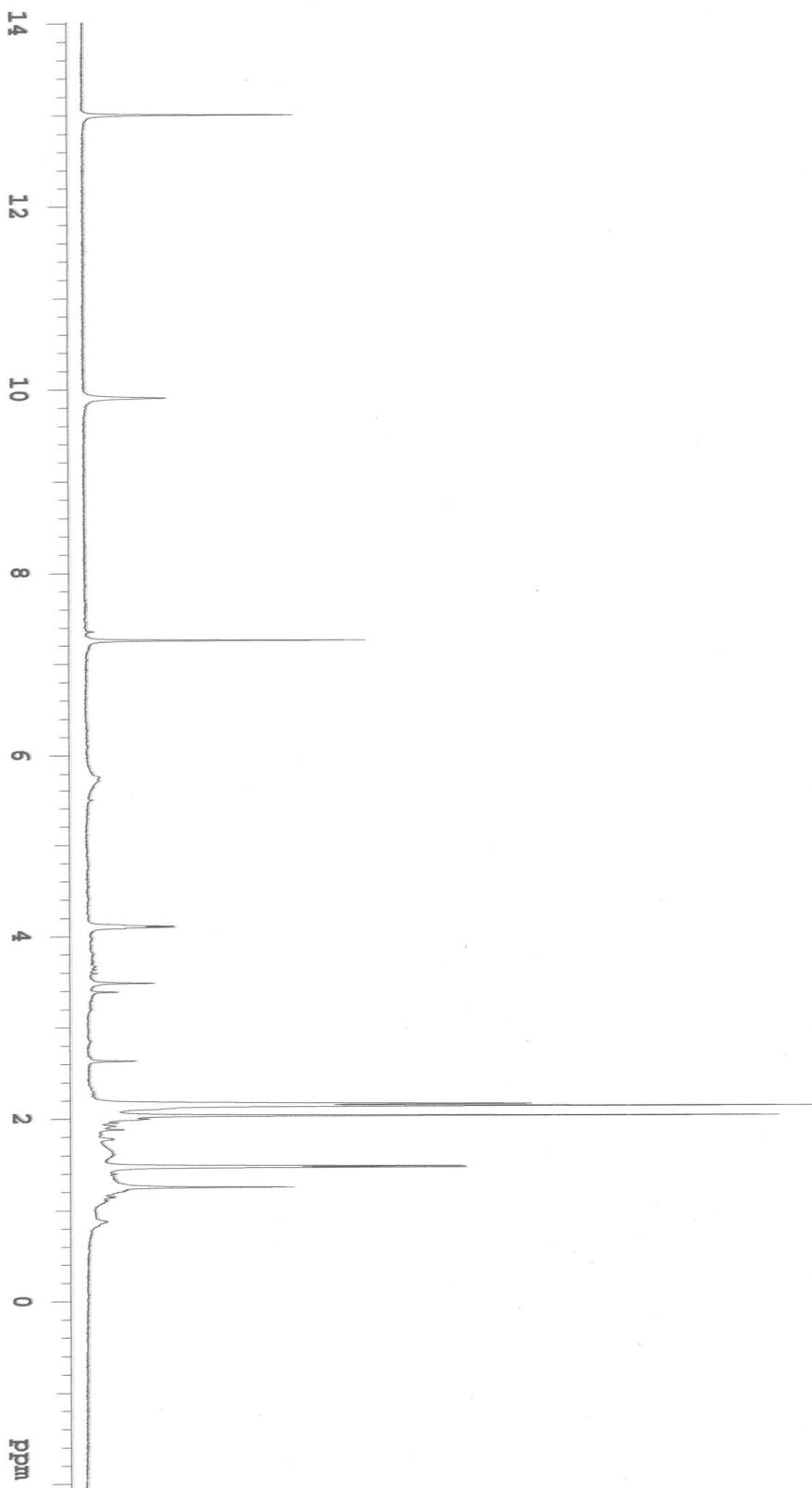


Fig. 3-212.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 020-1 in  $\text{CDCl}_3$ .

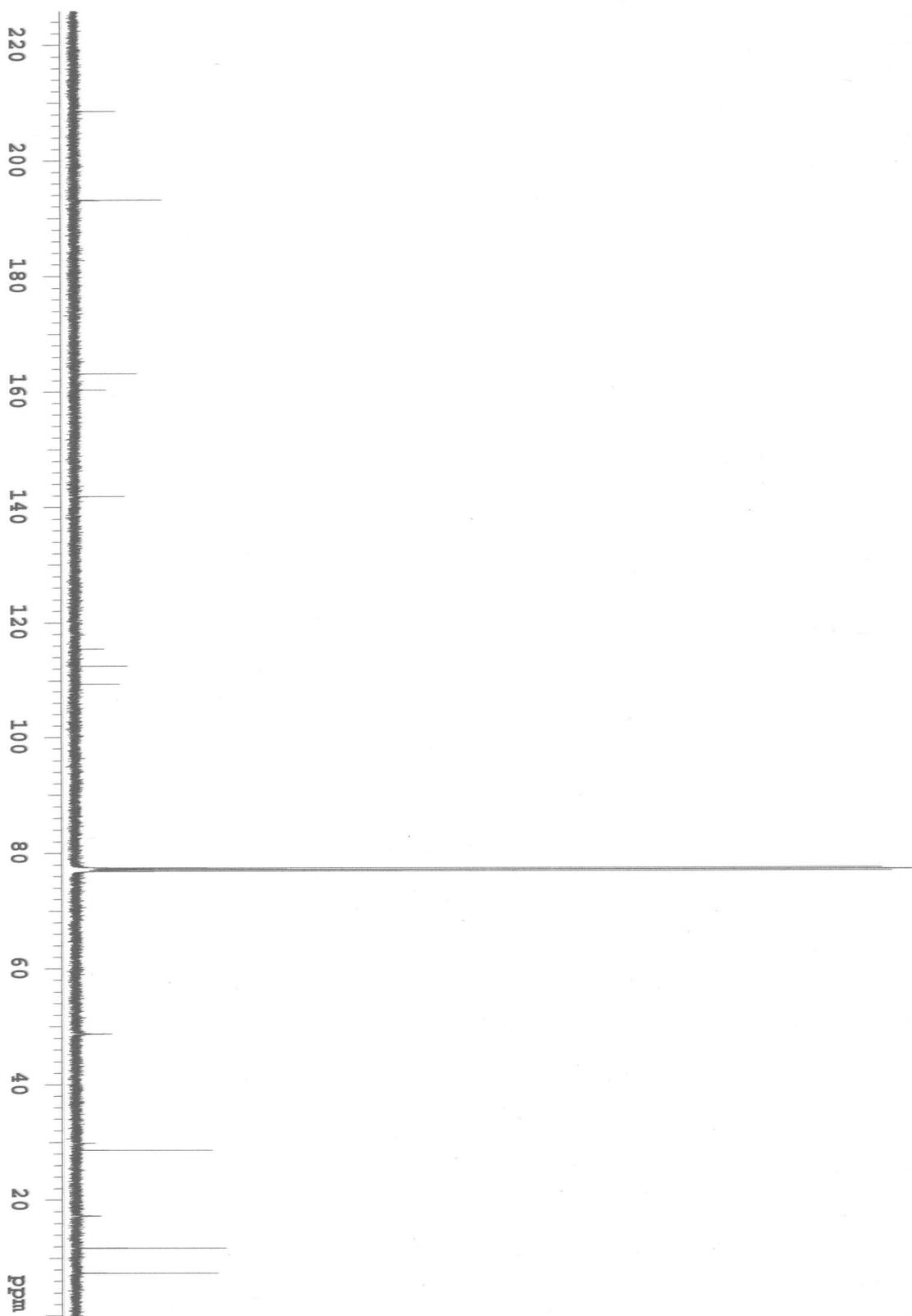


Fig. 3-213.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 020-1 in  $\text{CDCl}_3$ .

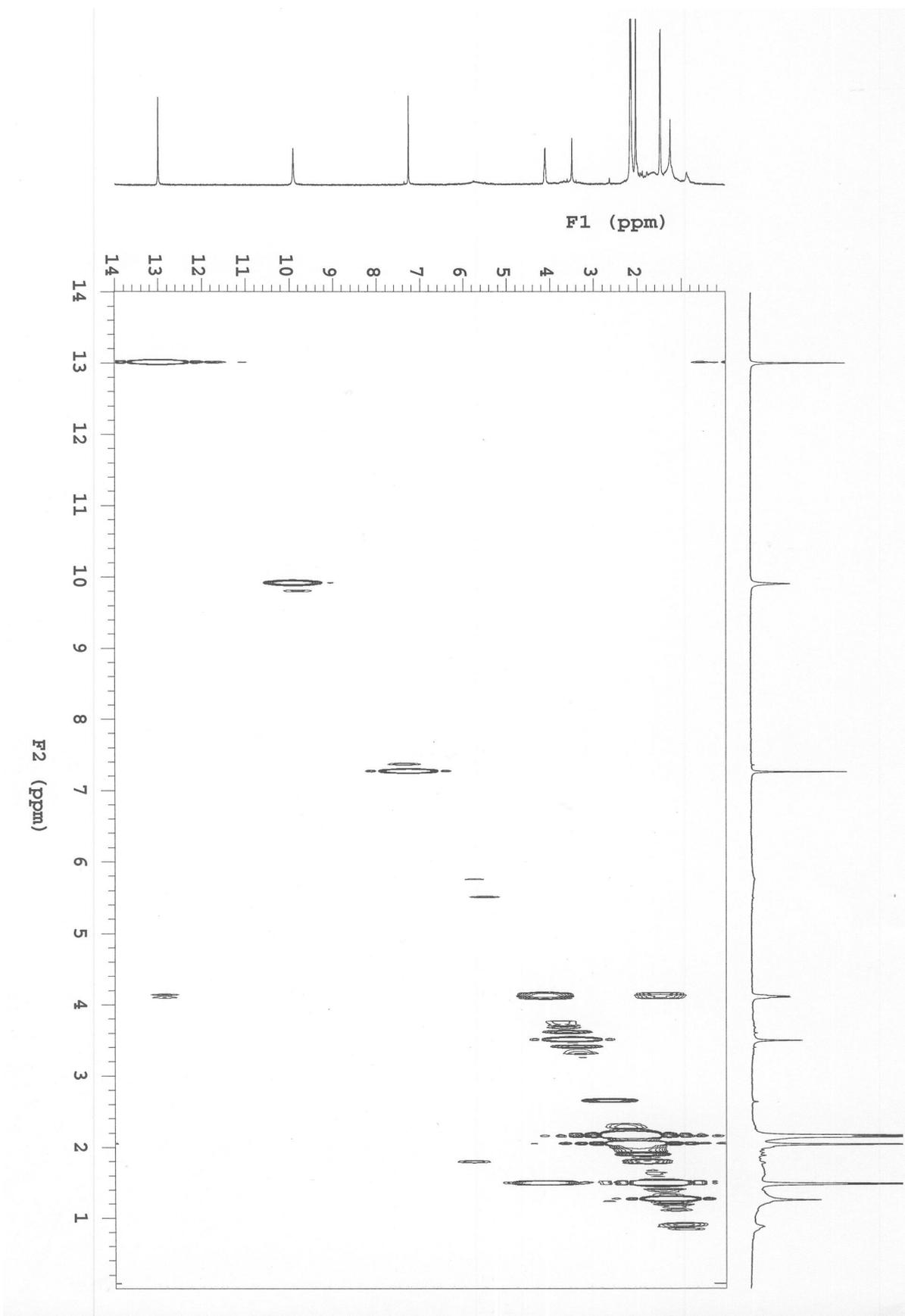


Fig. 3-214. COSY spectrum of 020-1 in CDCl<sub>3</sub>.

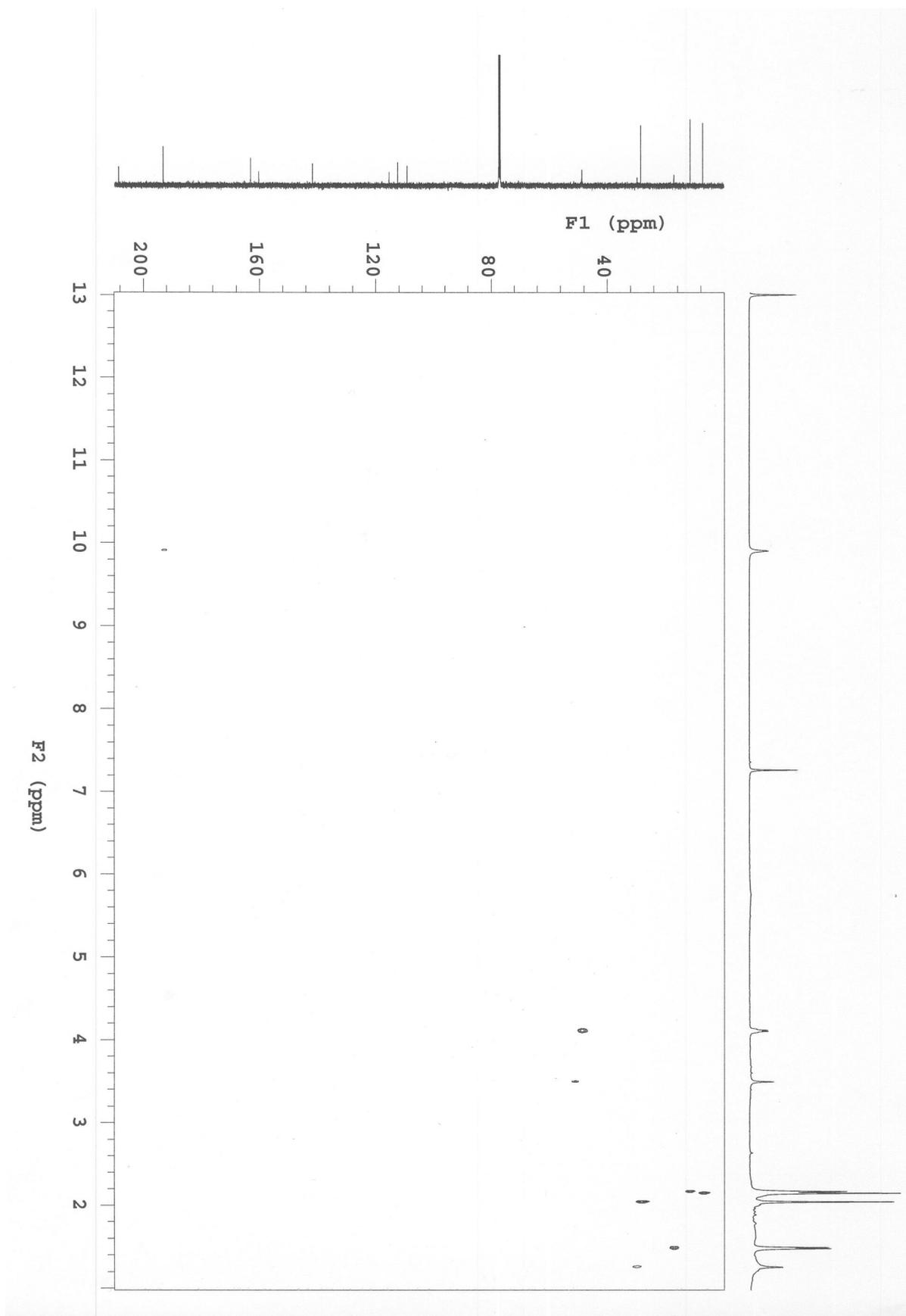


Fig. 3-215. HSQC spectrum of 020-1 in CDCl<sub>3</sub>.

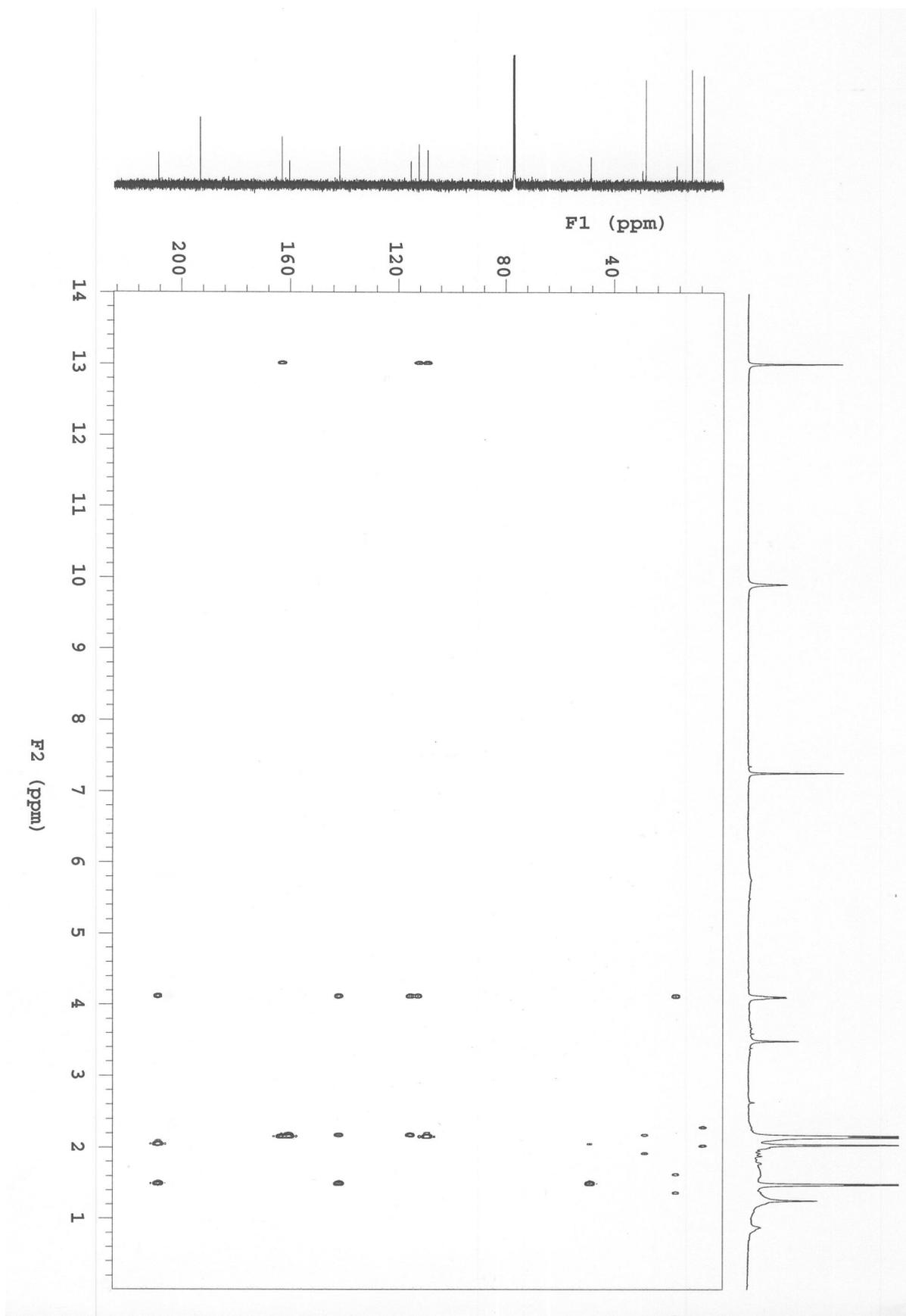


Fig. 3-216. HMBC spectrum of 020-1 in CDCl<sub>3</sub>.

#### 나. 신규 화합물 020-2의 구조 결정

신규 화합물 020-2 (Fig. 3-217)은 갈색의 무정형 고체(brown amorphous solid)로 분리되었고, ESIMS와  $^{13}\text{C}$  NMR을 통해 분자식은  $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3$ 로 결정되었다.  $^1\text{H}$  NMR (Fig. 3-220)에서 1개의 olefinic proton [H-2'( $\delta_{\text{H}}$  5.78)]와 4개의 methyl proton 들 [H-7( $\delta_{\text{H}}$  1.91), H-8( $\delta_{\text{H}}$  1.97), H-3'( $\delta_{\text{H}}$  1.80), H-4'( $\delta_{\text{H}}$  1.88)]의 존재를 알 수 있었다.  $^{13}\text{C}$  NMR(Fig. 3-221)에서 5개의 olefinic carbon들[C-3( $\delta_{\text{C}}$  99.2), C-5( $\delta_{\text{C}}$  109.6), C-6( $\delta_{\text{C}}$  160.2), C-1'( $\delta_{\text{C}}$  130.1), C-2'( $\delta_{\text{C}}$  132.1)], 4개의 methyl carbon들[C-7( $\delta_{\text{C}}$  9.1), C-8( $\delta_{\text{C}}$  12.0), C-3'( $\delta_{\text{C}}$  13.9), C-4'( $\delta_{\text{C}}$  14.7)], 1개의 oxygenated  $\text{sp}^2$  quaternary carbon[C-2( $\delta_{\text{C}}$  168.5)], 1개의 carboxyl carbon[C-4( $\delta_{\text{C}}$  170.0)]의 존재를 알 수 있었다. 상세한 gCOSY 스펙트럼(Fig. 3-222)의 해석을 통하여, H-2'( $\delta_{\text{H}}$  5.78)와 H-3'( $\delta_{\text{H}}$  1.80)의 correlation을 보이는 것으로 보아, 이들 proton들이 공간상으로 서로 인접해 있음을 알 수 있었고, NOESY 스펙트럼(Fig. 3-218)에서 H-8( $\delta_{\text{H}}$  1.97)과 H-2'( $\delta_{\text{H}}$  5.78)의 correlation을 통해 3차원 구조상 proton이 서로 인접해 있음을 확인할 수 있었다. gHSQC 스펙트럼(Fig. 3-223)을 통해  $^1\text{H}$ 과  $^{13}\text{C}$ 의 연결을 확인할 수 있었으며, 4개의 methyl group들[C-7/H-7( $\delta$  9.1/1.91), C-8/H-8( $\delta$  12.0/1.97), C-3'/H-3'( $\delta$  13.9/1.80), C-4'/H-4'( $\delta$  14.7/1.88)], 1개의 olefinic group[C-2'/H-2'( $\delta$  132.1/5.78)]을 확인하였다. gHMBC 스펙트럼(Fig. 3-224)에서 H-7( $\delta_{\text{H}}$  1.91)와 C-2( $\delta_{\text{C}}$  168.5), C-3( $\delta_{\text{C}}$  99.2), C-4( $\delta_{\text{C}}$  170.0)의 correlation과 H-8( $\delta_{\text{H}}$  1.97)와 C-4( $\delta_{\text{C}}$  170.0), C-5( $\delta_{\text{C}}$  109.6), C-6( $\delta_{\text{C}}$  160.2)의 correlation을 통해 pyran ring을 이루고 있는 carbon들의 위치를 알 수 있었다. 또한 C-6( $\delta_{\text{C}}$  160.2)와 H-2'( $\delta_{\text{H}}$  5.78), H-4'( $\delta_{\text{H}}$  1.88)의 correlation을 통해 pyran ring에 side chain이 연결되는 것을 확인할 수 있었으며, 020-2의 구조를 Fig. 3-128와 같이 결정할 수 있었다. 문헌 검색 결과, 020-2는 *Gliocladium vermoesonii*에서 분리된 nectriapyrone(Avent, *et al*, 1992)과 유사한 구조임을 알 수 있었다. 020-2는 nectriapyrone의 구조에서 C-4에 methoxyl group 대신 hydroxyl group이 도입되고, C-5에 methyl group이 도입된 구조임을 확인할 수 있었다. 또한, 인도양에서 채집된 해면동물에서 분리된 곰팡이로부터 분리된 demethyl nectriapyrone A(Abrell, *et al*, 1994)의 구조와도 유사성을 나타내었다. 020-2의 구조는 demethyl nectriapyrone A의 구조에서 C-3와 C-5에 methyl group이 도입되고, C-4에 methoxyl group 대신 hydroxyl group이 도입된 구조임을 알 수 있었다. 그러나 최종적으로 020-2의 구조는 지금까지 자연계에서 분리된 적이 없었으며, *Penicillium* sp.에서 분리된 적이 없는 신규물질로 확인되었다. IR 측정 결과,  $1664\text{cm}^{-1}$ (C=C),  $2944\text{cm}^{-1}$ ( $\text{sp}^3$  C-H)의 functional group들의 존재를 확인할 수 있었다. UV 스펙트럼에서 215 nm, 297 nm에서  $\log \epsilon$  (4.66), (4.15)의 최대 흡광도 값을 갖는 것을 확인하였다. 이와 같은 분광학적 data와 HR-ESIMS  $m/z$  193.0866 [ $\text{M}-\text{H}$ ] $^-$  (calcd  $m/z$  193.0865 [ $\text{M}-\text{H}$ ] $^-$ )(Fig. 3-219)를 바탕으로 020-2은 분자량이 194인 물질임을 알 수 있었다.

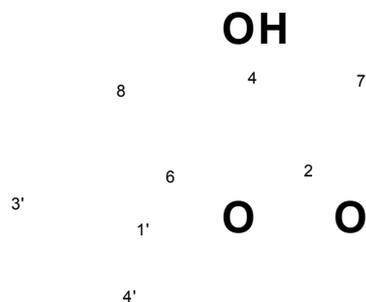


Fig. 3-217. The structure of 020-2.

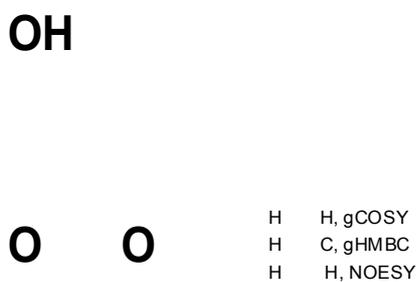


Fig. 3-218. Key COSY, NOESY and HMBC correlations for 020-2.

Table 3-26. NMR Data for 020-2 in CD<sub>3</sub>OD

Position	$\delta_c^a$	$\delta_H$ , mult. ( $J$ in Hz) <sup>b</sup>	COSY	HMBC
1				
2	168.5			
3	99.2			
4	170.0			
5	109.6			
6	160.2			
7	9.1	1.91, s		2, 3, 4
8	12.0	1.97, s		4, 5, 6
1'	130.1			
2'	132.1	5.78, q (7)		6
3'	13.9	1.80, d (7)	4'	1', 2'
4'	14.7	1.88, s		6, 1', 2'

<sup>a</sup>Measured at 125MHz. <sup>b</sup>Measured at 500MHz.

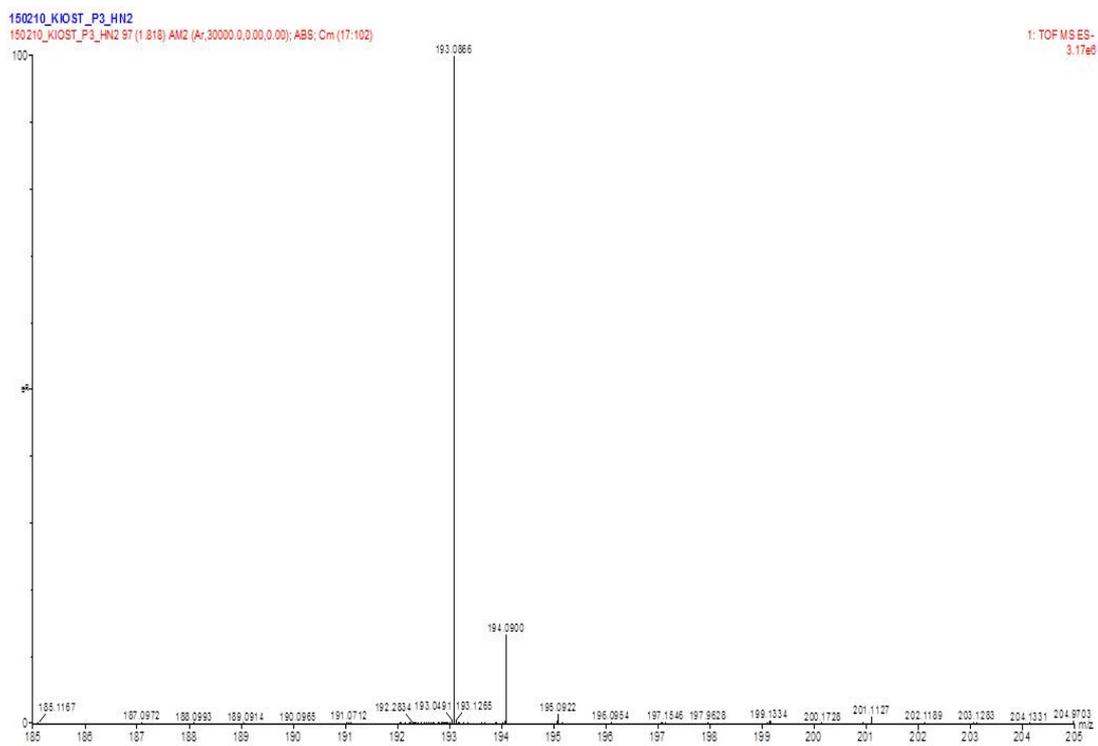


Fig. 3-219. HR-ESIMS spectrum of **020-2**(negative mode).

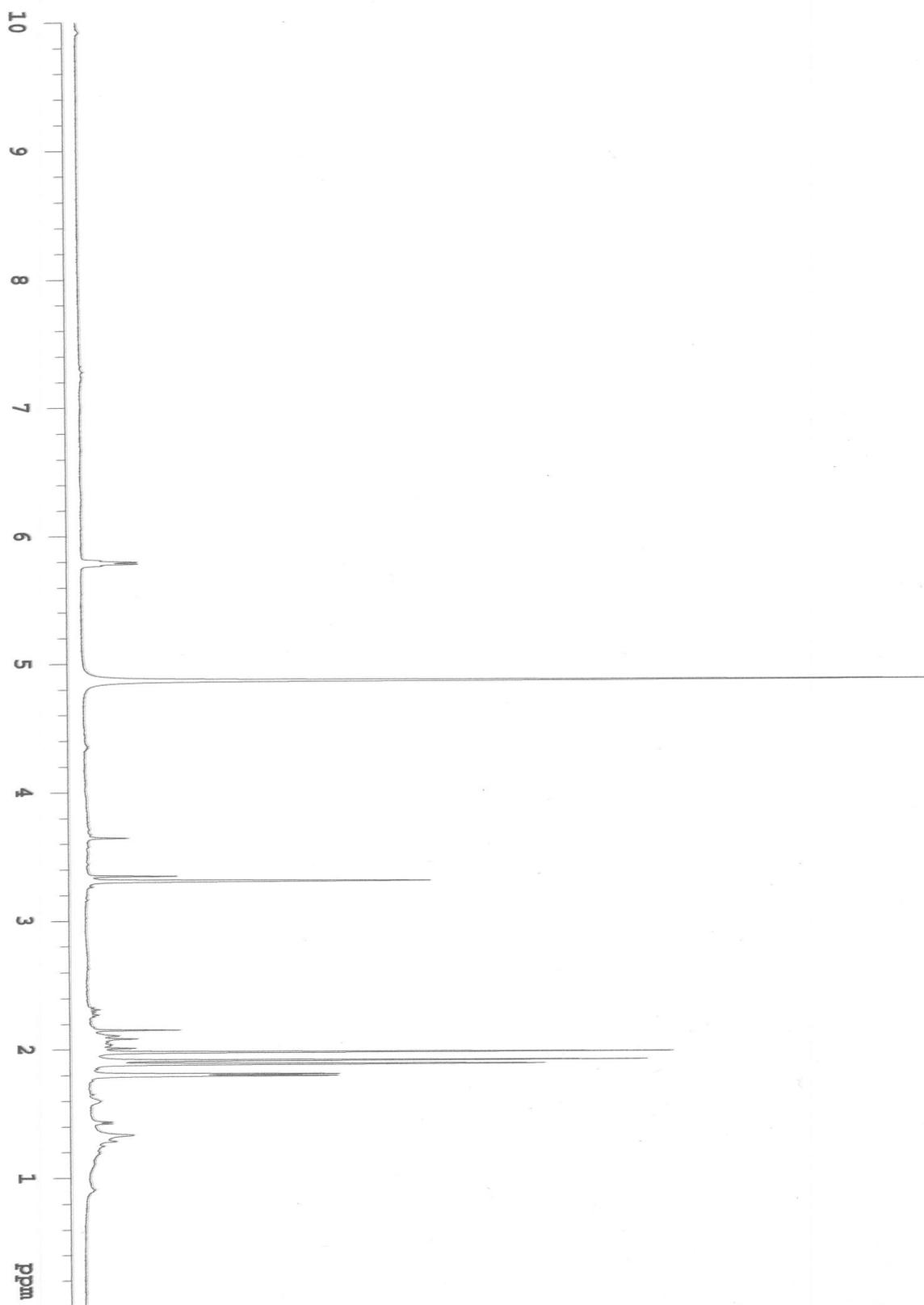


Fig. 3-220.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 020-2 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

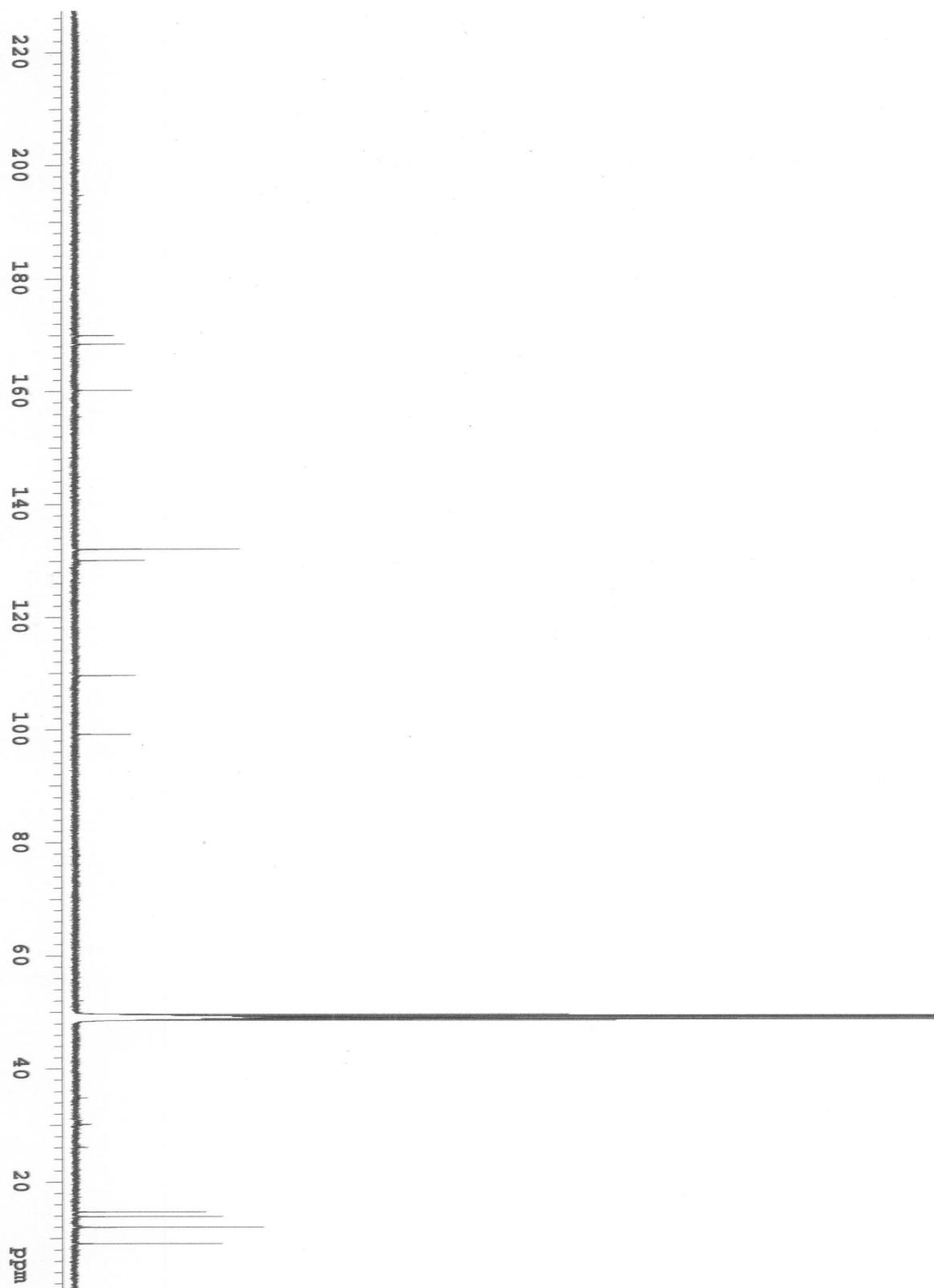


Fig. 3-221.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 020-2 in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

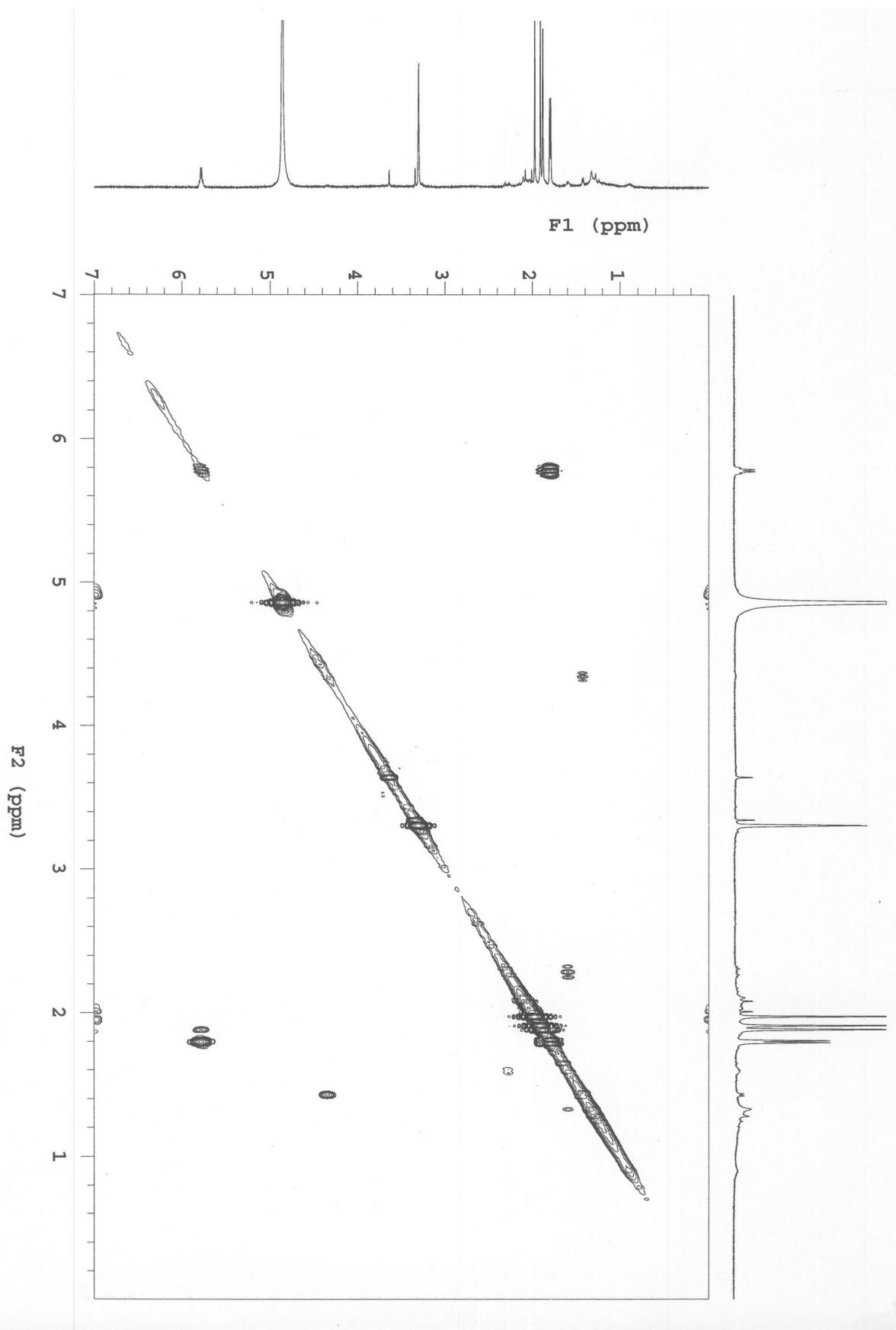


Fig. 3-222. COSY spectrum of 020-2 in CD<sub>3</sub>OD.

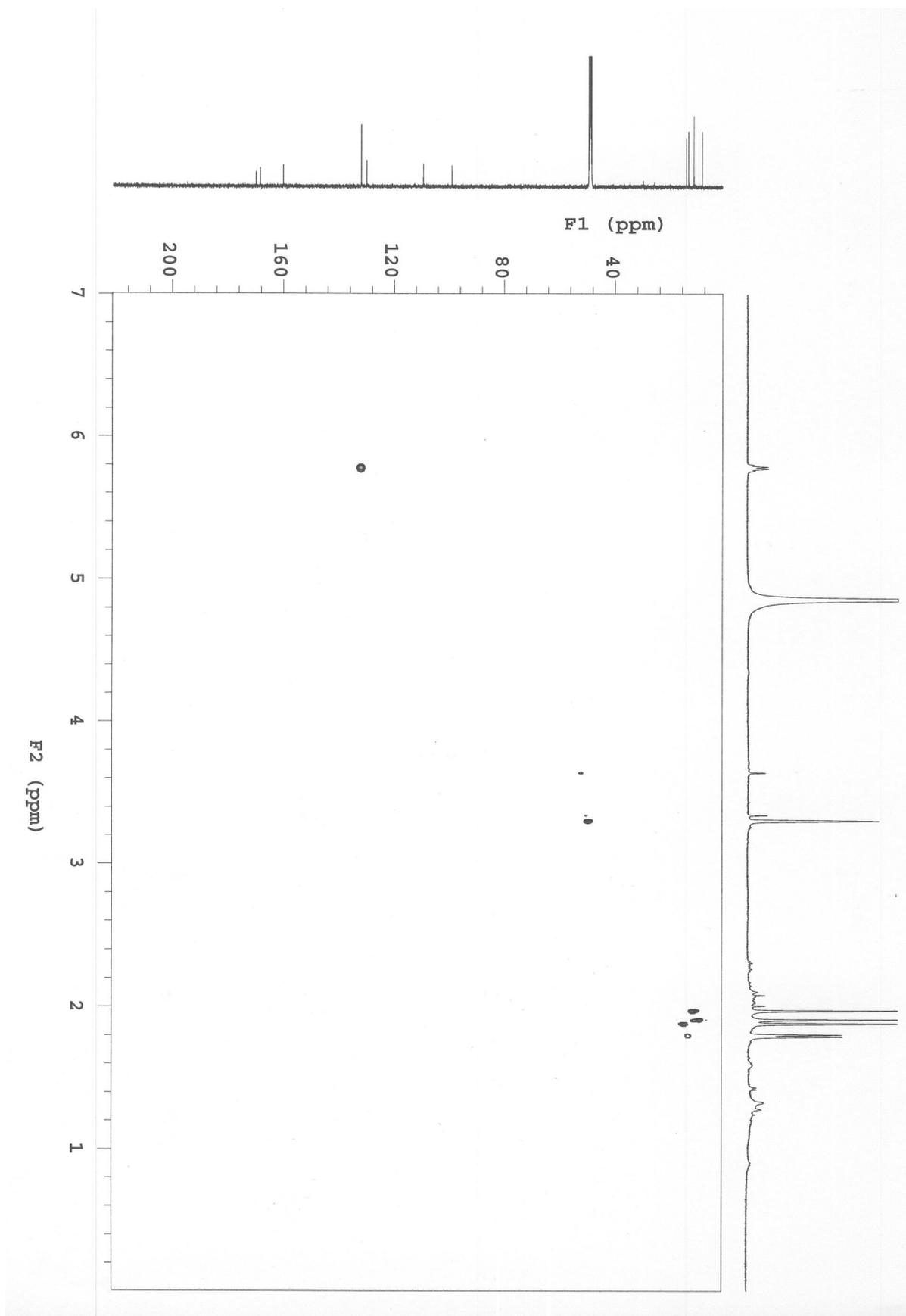


Fig. 3-223. HSQC spectrum of 020-2 in CD<sub>3</sub>OD.

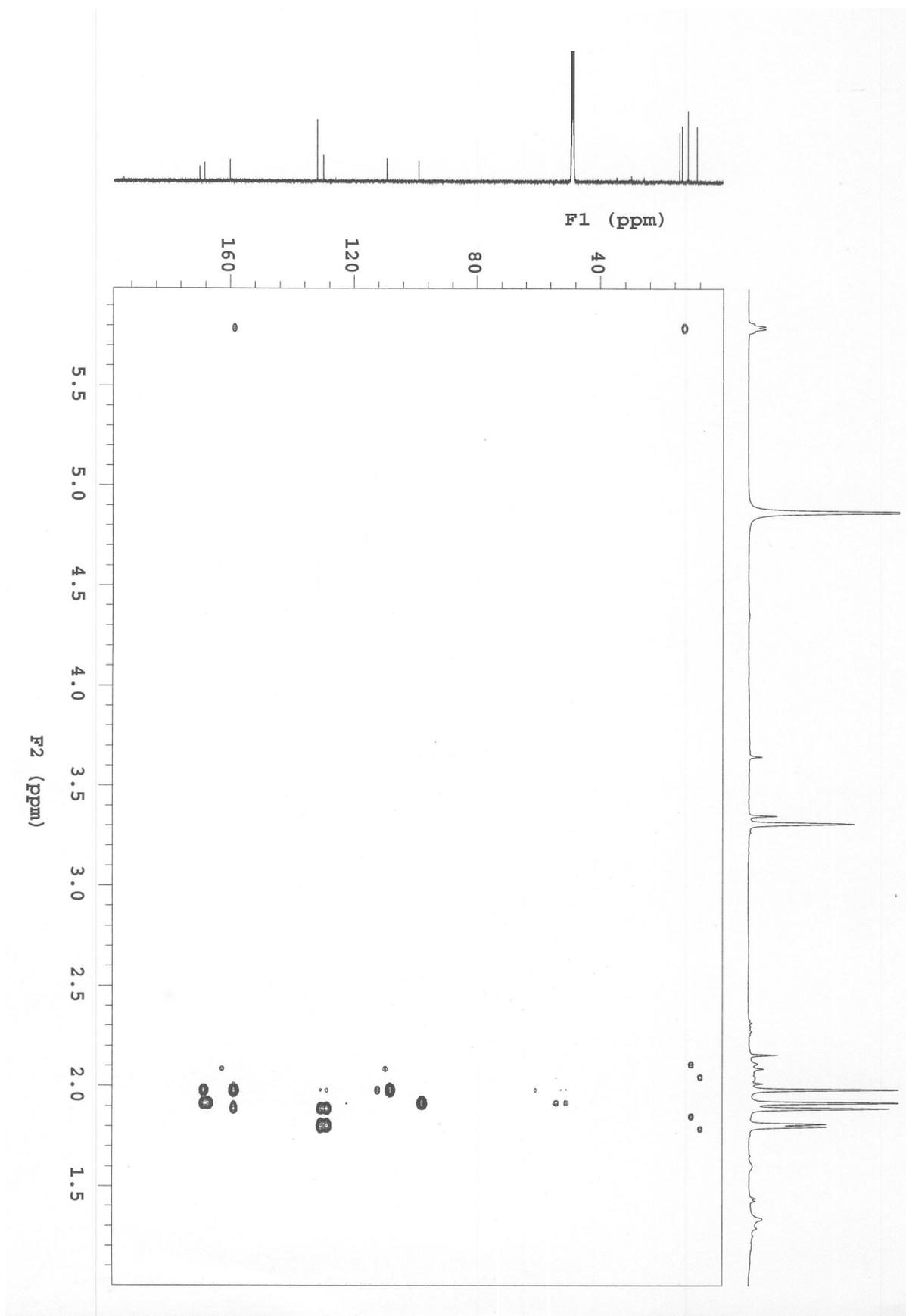


Fig. 3-224. HMBC spectrum of 020-2 in CD<sub>3</sub>OD.

## 제 12 절 결 론

전 세계적으로 인구 고령화가 급속히 진행되고 건강에 대한 관심이 높아지면서 항노화 산업이 급속히 성장하고 있다. Global Industry Analysts 社의 보고에 의하면, 2015년 항노화 산업 시장규모가 2,919억불에 이를 것으로 전망하고 있다.

해양천연물연구의 중요성을 인식 선진국들은 물론 개발도상국에서도 해양천연물에 대한 연구개발에 막대한 노력을 기울여왔다. 지금까지 22,000종 이상의 신물질이 여러 종류의 해양생물로부터 발견되었다. 현재 미국 식약청(FDA) 혹은 유럽 의약품 기구(EMEA; European Medicines Agency)로부터 허가를 받아 시판 중에 있는 의약품들은 Vira-A, Cytosar-U, Prialt, Halaven, Yondelis, Carragelose, Lovaza, Adcetris 등 8개가 있으며, 이외에도 상당수의 물질이 현재 의약품, 화장품첨가제, 건강보조제 등으로 개발 중에 있어 가까운 시일에 제품화가 될 것으로 추측되고 있다.

그러나 지금까지 해양 생물을 대상으로 한 천연물 연구 결과, 뛰어난 활성을 가진 많은 물질들이 분리되었으나, 해양천연물이 임상에 적용되기에는 많은 시간이 소요되며 여러 가지 어려움이 많았다. 해양천연물 개발을 지연시키는 가장 중요한 요인 중의 하나는 임상에 많은 양의 물질이 요구되고 있어 해양천연물의 공급에 대한 어려움이다. 일반적으로 천연물로부터 채집에 의해서 해양천연물을 공급하기에는 경제적이지 못하며, 양식이나 전합성에 의한 방법 또한 매우 어렵거나 너무 비용이 비싸다. 또한, 최근의 많은 연구에서 해양 무척추동물로부터 분리된 많은 생리활성 물질들이 공생 미생물들에 의해 생산된다는 것이 많이 보고되면서 이제는 해양미생물이 해양천연물 개발에 있어서 새로운 지평을 열고 해양천연물의 공급의 문제를 해결할 수 있는 중요한 생물로서 자리매김을 하였다. 따라서 본 연구과제에서는 해양미생물을 중요한 연구대상 생물로 선정하였으며, 항노화 활성 검색에서 의미 있는 활성을 보인 균주를 유용 균주로 선정하여 활성성분 연구를 진행하였다.

Mintel 社의 항노화에 대한 최근 조사에 의하면 76%의 응답자들이 천연물 성분에 대하여 관심이 높은 것으로 나타났다. 이러한 여건에 비추어 볼 때 부작용이 적으면서 효과적인 항노화 물질의 개발은 매우 시급한 실정이다. 항노화 물질은 노화와 연관된 생물학적인 과정에 작용하여 노화와 관련된 질병의 진행이나 발병을 줄여주어 건강하게 수명을 늘려주는 물질을 말한다. 현재 사용되고 있는 의약품의 40% 이상이 천연자원에서 유래되었다고 하는 것은 중요한 의미를 가진다. 식물이나 해양생물, 미생물과 같은 천연자원 유래된 천연물들은 인간의 여러 질병을 치료하는 선도물질의 발견에 있어서 아주 중요한 역할을 해왔고 앞으로도 그러한 역할을 할 것으로 기대되고 있다.

본 연구사업 “해양생물로부터 항노화 바이오소재 개발 연구” 과제는 국내외 연안 및 열대지방 등의 다양한 환경에서 해양생물 및 해양미생물을 확보/분리하고 항노화 활성을 검색하여 산업적으로 응용 가능성이 높은 물질을 발굴하는 것을 주요 목표로 하였다. 본 연구사업에서 얻은 중요한 성과들은 다음과 같다.

1. 한국 근해와 열대지방 마이크로네시아 등의 다양한 해양환경에 서식하는 해양동식물, 해양퇴적토 등에서 189종의 해양생물 및 해양미생물을 채집 및 분리하여, 순수배양 및 체계적으로 보존하였다.

2. 채집/분리된 해양생물 및 해양미생물 중에서 189종을 추출하여 추출물 library를 구축하였고, 향노화 활성 검색을 통하여 우수한 활성을 보인 10여종의 향노화 활성 균주를 유용균주로 선정하였다.

3. 향노화 활성 검색결과와 NMR을 통한 화학적 분석, 배양학적 특성 등을 종합적으로 고려하여 연구대상 균주로 선정된 해양미생물 시료로부터 각종 크로마토그래피를 이용하여 신물질들을 포함하는 30여종의 천연물을 분리, 정제 하였다.

4. 분리된 물질들의 구조는 NMR 등의 각종 분광학적 방법과 화학적 방법에 의하여 규명하였고, 이들 천연물들의 향노화 활성을 검색하였다. 이들 물질은 인돌알칼로이드, 펩타이드, 이소프레노이드, 터핀노이드, 다이키토피페라진 등의 구조적으로 여러 가지 부류에 속하였다. 이들 중에서 많은 물질이 항산화, 항염 등의 향노화 활성을 나타내었다.

5. 이들 향노화 물질 중에서 마이크로네시아에서 분리한 해양미생물 *Bacillus* sp. 102CH635-3 균주가 생성하는 pantetheine계 신규물질을 개발 후보물질로 선정하였다.

6. 향노화 활성이 뛰어난 pantetheine계 신규물질을 용이하게 얻기 위하여 간단한 단계의 합성반응으로 pantetheine계 신규물질을 전합성할 수 있는 효과적인 대량합성법을 개발하였다.

7. 유기반응을 통하여 pantetheine계 신규물질의 유도체를 합성하였다. 또한 신규 유도체에 대한 항염활성을 검색하여 구조-활성 상관관계를 파악하였다.

# 제 4 장

## 연구개발 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도





## 제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

우리나라 뿐만아니라 전 세계적으로 인구의 고령화가 급속히 진행되고 있어 항노화 물질에 대한 수요와 항노화 산업이 급속히 성장하고 있다. 국내의 해양천연물의 연구의 대부분은 비교적 쉽게 채집을 할 수 있는 해조류나 해양무척추동물들을 대상으로 진행이 되었으며, 해양미생물의 경우는 신물질 탐색을 위한 소재로 활용된 예가 많지 않다. 본 연구과제는 국내에서의 독자적인 해양신물질 개발역량을 확보하기 위하여, 국내연구자들이 쉽게 접근할 수 없는 지역에서 해양생물을 채집하고, 해양미생물의 분리 및 체계적인 보존, 배양, 항노화 물질 및 생리활성 해양천연물의 분리정제, 신물질의 구조결정, 생리활성의 검색, 신규 활성유도체의 합성 등의 기술수준을 향상시키려는 기술적 목표와 항노화 물질의 산업적 활용을 위한 활성 신소재의 발굴 및 이를 효율적으로 공급하기 위한 대량생산 방법을 강구하는 연구를 함께 추구하였다.

본 연구에서 해양생물 및 해양미생물을 채집/분리하기 위하여 해양샘플을 채집한 지역은 우리나라의 국내의 이어도와 가거초 등과 남태평양의 마이크로네시아 축주와 통가 등의 열대지역 등 다양한 해양환경의 생물 및 퇴적토를 포함하고 있다. 먼저 이어도와 가거초 같은 국내 연근해의 해양미생물은 천연물화학적으로 연구가 거의 이루어지지 않아 신물질 발견의 가능성이 매우 높아, 국내의 해양미생물 연구의 기반을 확립하고자 하였다. 또한 열대지역의 생물이 기타 지역의 생물에 비하여 생리활성물질의 출현빈도와 물질의 농도에 있어서 탁월한 것이 알려져 있기 때문에 본 연구에서는 마이크로네시아 주변의 열대지역의 해양생물 및 해양미생물과 같이 생태학적 측면에서 우수한 시료를 연구대상으로 하였고, 연구대상물질은 합성이 용이한 분자량 1,000 이하의 소형유기물질로 하였다. 본 연구사업에서는 국내연안 및 열대지방의 해양생물의 확보 및 신물질을 화학적으로 규명함과 동시에 다양한 시료에 대한 독자적인 분석기술의 향상을 함께 도모하였다.

2012년의 1차년도 연구에서는 해양생물 및 퇴적토 시료의 확보, 해양미생물의 분리 및 배양, 추출물 library의 구축, 항노화 활성의 검색, 후보균주의 선정, 활성물질의 분리정제와 구조결정 등 연구기반의 확립과 항노화 물질의 탐색에 주력하였다. 먼저 생물시료의 채집에서는 이어도, 가거초 등 우리나라 연근해에서 채집된 해양시료로부터 분리된 미생물과 열대지역 등에서 채집된 189종의 시료를 연구대상으로 하였다. 이들 시료의 조추출물에 대한 항노화 활성을 검색하여 10여종의 해양생물을 우선연구대상 균주로 선정하였다. 또한 이들로부터 각종 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 항노화 물질을 분리하고, NMR이나 MS 등을 이용한 분광학적 방법 및 화학적 방법에 의하여 이들 물질의 구조를 결정하였다.

2013년의 2차년도의 연구에서는 지금까지 분리된 적이 없는 신규의 해양곰팡이 및 1차년도에 선정된 유용 생물들을 대상으로 하여 배양학적 특이성 및 분광학적인 특성을 고려하여 선정된 우선연구대상 생물을 대량배양하여 30여종의 신물질들을 분리,

정제하고 구조를 결정하였다. 이들 물질들 중에서 항노화 활성이 뛰어나고 구조가 간단하여 합성이 용이한 물질을 개발후보물질로 선정하였다. 또한 개발후보물질로 선정된 patetheine계 신물질들에 대하여 간단하면서도 효율적인 전합성법을 개발하였다. 또한 신규 활성유도체를 확보하기 위하여 유도체를 합성하였다. 항노화 작용, 염증 억제 등의 다양한 생리활성을 가지는 patetheine과 구조적으로 유사성을 보이는 신물질에 대한 다양한 유도체를 합성하였다.

2014년의 3년차 연구에서는 신규 항노화 물질에 대하여 효과적인 대량확보 방법을 연구하였다. 본 연구를 통하여 *Stappia sp.*에서 분리된 신규 crotonic acid의 dimer의 경우, crotonic acid를 배양배지에 첨가하면 이 신규 물질을 대량확보 할 수 있을 것으로 예상하고 crotonic acid를 배양배지에 첨가하였으나, crotonic acid의 신규 dimer의 생산량이 증가하지 않았다. 따라서 이 물질의 전구체가 crotonic acid가 아닌 것으로 판단하여 유기합성법을 통해 crotonic acid의 신규 dimer를 합성하였다. 또한 개발후보물질로 선정된 patetheine 신규 유도체의 효율적인 전합성 연구를 추가로 수행하였다.

최종년도까지의 연구성과를 자체적으로 평가하면 당초의 연구목표를 대부분 성공적으로 달성한 것으로 생각된다(제 3장 제 12절 결론 참조). 본 연구사업을 통해 확보한 해양생물, 구조가 결정된 천연물의 구조적인 다양함, 항노화 활성 및 생리활성의 검색, 항성 물질에 대한 전합성 완료, 신규 활성유도체의 합성 등 당초의 연구목표를 대부분 도달하거나 초과하는 성과를 달성한 것으로 생각된다.

본 연구과제의 연구결과에 의한 관련분야에의 기여도 측면을 살펴보면 다음과 같다. 먼저 본 연구에 의하여 12 편의 논문을 국내외 전문학술지에 투고하여 게재완료 되었다. 또한 5편의 논문이 추가적으로 투고될 예정이다. 게재된 논문의 목록은 아래와 같다.

1. New Antimicrobial Compounds from a Marine-derived *Bacillus sp.* *J. Antibiotics* **2013**, 66, 89-95.
2. Glycosylated methoxy-macrolactins isolated from a marine sediment bacterium *Bacillus subtilis*. *Heterocycles*, **2013**, 87(2), 307-318.
3. A Concise and Rapid Approach to the Marine Natural Product Streptochlorin and its Analogs. *Bull. Kor. Chem. Soc.* **2013**, 34(2), 357-358.
4. Antimicrobial Gageomacrolactins Characterized from the Fermentation of the Marine-Derived Bacterium *Bacillus subtilis* under Optimum Growth Conditions. *J. Agric. Food Chem* **2013**, 61(14), 3428-3434.
5. Diversity of Secondary Metabolites from Marine *Bacillus* Species: Chemistry and Biological Activity. *Mar. Drugs* **2013**, 11(8), 2846-2872.
6. Streptochlorin Suppresses Allergic Dermatitis and Mast Cell Activation via Regulation of Lyn/Fyn and Syk Signaling Pathways in Cellular and Mouse Models.

*PLOS ONE*, **2013**, 8(9), 1-10.

7. Gageotetrins A-C, Noncytotoxic Antimicrobial Linear Lipopeptides from a Marine Bacterium *Bacillus subtilis*. *Org. Lett.* **2014**, 16(3), 928-931.
8. Gageostatins A-C, Antimicrobial Linear Lipopeptides from a Marine *Bacillus subtilis*. *Mar. Drugs* **2014**, 12(2), 871-885.
9. Antibacterial and Antiyeast Compounds from Marine-Derived Bacteria. *Mar. Drugs* **2014**, 12(5), 2913-2921.
10. Violapyrones H and I, New Cytotoxic Compounds Isolated from *Streptomyces* sp. Associated with the Marine Starfish *Acanthaster planci*. *Mar. Drugs* **2014**, 12(6), 3283-3291.
11. Non-cytotoxic Antifungal Agents: Isolation and Structures of Gageopeptides A-D from a *Bacillus* strain 109GGC020. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62(24), 5565-5572.
12. Total Synthesis and Configurational Validation of (+)-Violapyrone C. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 2014(21), 4472-4476.

본 연구사업의 결과를 사업기간인 2012. 3월 ~ 2014. 12월 사이에 국내외의 해당 분야 학술모임 및 세미나에서 23회의 발표를 하였으며 그 구체적인 내용은 다음과 같다.

1. 한남대학교 세미나, 해양미생물자원의 확보 및 유용 물질 탐색. **2012**, 한남대학교.
2. 2012 약학연합국제학술대회, New Macrolactins as Antibiotics Produced by the Marine-derived Bacterium *Bacillus* sp. 102CH635-3. **2012**, 제주(ICC).
3. 13th Tetrahedron Symposium, Novel Glycolipopeptides from a Marine-Derived Bacterium *Bacillus licheniformis*. **2012**, 네덜란드(암스테르담).
4. International Conference on Medicinal Chemistry, ANTIMICROBIAL GLYCOLIPOPEPTIDES, IEODOGLUCOMIDES A AND B FROM A MARINE-DERIVED BACTERIUM BACILLUS LICHENIFORMIS. **2012**, 프랑스(푸아티에).
5. 9th Asia Pacific Marine Biotechnology Conference, Discovery of Bioactive Metabolites from Marine-Derived Microorganisms. **2012**, 일본(코찌).
6. 대한약학회 추계 학술발표대회, New Anti-Inflammatory Compounds Isolated from a Marine-Derived Bacterium *Pseudomonas* sp. **2012**, 서울(AW Convention Center).
7. 대한약학회 춘계 학술발표대회, Marine Microorganisms as an Emerging Resource for the Discovery of Novel Bioactive Compounds. **2013**, 순천(국립순천대학교).

8. 대한약학회 춘계학술대회, Bioactive Secondary Metabolites from a Marine-derived Bacterium, **2013**, 순천(국립순천대학교).
9. 충남대학교 약학대학 세미나, Bioactive Secondary Metabolites from Marine Organisms. **2013**, 충남대학교.
10. 대한약학회 춘계학술대회, Two New  $\alpha$ -Pyrone from a Marine-Derived Bacterium *Streptomyces* sp. **2013**, 순천(국립순천대학교).
11. 충남대학교 세미나, Novel Biomaterials from Marine Organisms. **2013**, 충남대학교.
12. 부산대병원 세미나, 해양생물자원의 확보 및 바이오신소재 탐색. **2013**, 양산(부산대병원).
13. 14th International Symposium on Marine Natural Products, Bioactive Secondary Metabolites from Marine *Bacillus* spp. **2013**, 스페인(라토자).
14. 대한약학회 추계국제학술대회, New Antioxidants produced by a Novel Marine Fungus 1210CH-42. **2013**, 청원(오송첨단의료산업진흥재단).
15. 대한약학회 추계국제학술대회, Butenolides from a Marine-Derived Bacterium *Streptomyces* sp. 112CH-148 . **2013**, 청원(오송첨단의료산업진흥재단).
16. 대한약학회 추계국제학술대회, New Tanzawaic Acids from a Marine-Derived Fungus *Penicillium steckii* 108YDC142. **2013**, 청원(오송첨단의료산업진흥재단).
17. International Marine Biotechnology Conference, Novel Lipopeptides, Kiostostatins A-E from a Marine-Derived Bacterium *Bacillus subtilis*. **2013**, 호주(브리즈번).
18. 한국생물공학회 춘계국제심포지엄,  $\Delta$ 8,9-pregnene steroids produced by a Novel Marine Fungus 1210CH-42. **2014**, 경주(현대호텔).
19. 한국생물공학회 춘계국제심포지엄, Two New  $\alpha$ -Pyrone from a *Streptomyces* sp. Associated with a Marine Starfish . **2014**, 경주(현대호텔).
20. 한국생물공학회 춘계국제심포지엄, Chemical Structures of Piericidins Produced by a Marine *Streptomyces* sp. **2014**, 경주(현대호텔).
21. 대한약학회 추계학술대회, A New Fatty Acid Produced by a Marine Fungus *Mycosphaerella* sp. **2014**, 경주(현대호텔).
22. 대한약학회 추계학술대회, A New Pyrone from a Marine-Derived Fungus *Penicillium* sp. 108YD020. **2014**, 경주(현대호텔).
23. International Symposium: Natural Products and Drug Discovery-Future Perspectives, Anti-fungal and anti-inflammatory linear lipopeptides from a marine derived bacterium *Bacillus subtilis*. **2014**, 오스트리아(비엔나).

본 연구의 결과로 16건의 특허를 출원하였으며, 그중에 6건이 등록되었고, 현재 6건의 추가 특허출원을 준비 중에 있다.

1. 신규한 스트렙토클로린 유도체 및 이를 유효성분으로 하는 암 질환의 예방 및 치료용 약학조성물. 대한민국특허. 출원번호: 10-2012-0114008.
2. 스트렙토클로린을 포함하는 항 알러지 조성물. 대한민국특허. 등록번호: 10-1356750.
3. 항균 활성을 포함한 다양한 생리 활성을 가지는 신규의 화합물, 이 화합물을 생성하는 해양 미생물. 대한민국특허. 등록번호: 10-1370632.
4. 항균활성을 가지는 신규의 마크로락틴류를 생성하는 해양 미생물, 이 해양 미생물로부터 생성된 신규의 마크로락틴류 및 이 마크로락틴의 제조방법. 대한민국특허. 등록번호: 10-1381339.
5. 항균활성을 갖는 신규 화합물 및 이 화합물을 생성하는 해양 바실러스 서브틸리스. 대한민국특허. 출원번호: 10-2013-0072661.
6. 항미생물 활성을 갖는 신규 화합물 및 이 화합물을 생성하는 해양 바실러스속. 대한민국특허. 등록번호: 10-1476325.
7. 해양 바실러스 속 미생물에 의해 생성되는 항미생물 활성을 갖는 신규 화합물. 대한민국특허. 출원번호: 10-2014-0148547.
8. 해양 유래 바실러스 서브틸리스가 생산하는 항균성을 가진 비세포독성의 신규한 선형의 지질펩타이드인 가거테트린. 대한민국특허. 출원번호: 10-2014-0150708.
9. 해양 유래 바실러스 서브틸리스가 생산하는 항균성을 가진 비세포독성의 신규한 선형의 지질펩타이드인 가거테트린. 대한민국특허. 출원번호: 10-2014-0150706.
10. 해양 유래 바실러스 서브틸리스가 생산하는 항균성을 가진 비세포독성의 신규한 선형의 지질펩타이드인 가거테트린. 대한민국특허. 출원번호: 10-2014-0150704.
11. 해양 유래 바실러스 서브틸리스가 생산하는 비세포 독성 항진균 및 항균 활성을 보이는 신규한 선형의 지질테트라펩타이드, 가거펩타이드. 대한민국특허. 출원번호: 10-2014-0150703.
12. 해양 유래 바실러스 서브틸리스가 생산하는 선형의 신규 항균 지질펩타이드, 가거스타틴. 대한민국특허. 출원번호: 10-2014-0150700.
13. 해양 유래 바실러스 서브틸리스가 생산하는 비세포 독성 항진균 및 항균 활성을 보이는 신규한 선형의 지질테트라펩타이드, 가거펩타이드. 대한민국특허. 출원번호: 10-2014-0150697.
14. 금 촉매를 이용한  $\alpha$ -피론 유도체 전합성 방법 및 이해 의해 합성되어 인간 암세포주에 세포독성을 가지는  $\alpha$ -피론 유도체. 대한민국특허. 출원번호: 10-2014-0194039.

15. 항균활성을 가지는 신규의 마크로락틴류를 생성하는 해양 미생물, 이 해양 미생물로부터 생성된 신규의 마크로락틴류 및 이 마크로락틴의 제조방법. 대한민국특허. 등록번호: 10-1381344.
16. 항균활성을 가지는 신규의 마크로락틴류를 생성하는 해양 미생물, 이 해양 미생물로부터 생성된 신규의 마크로락틴류 및 이 마크로락틴의 제조방법. 대한민국특허. 등록번호: 10-1381323.

요약하면, 본 연구는 해양생물의 확보, 해양미생물의 대량배양, 신물질의 구조결정 및 생리활성검색 과정이 원활히 진행되었고, 더욱이 열대해역의 다양한 시료의 채집 및 국내외에서 분리된 해양미생물들에서 유용 균주를 발굴하고 다양한 신물질들을 분리, 구조결정 하였다는 점에서 큰 성과를 거두었다고 생각된다. 또한 지금까지 분리된 적이 없는 신규의 해양곰팡이의 분리 및 동정이 이루어졌으며, 항노화 활성을 가지는 개발후보 물질의 전합성 성공, 천연물 유래 신규 활성유도체의 합성과 구조 및 활성의 상관관계 연구, 항노화 신물질 발굴 등 천연물의 응용연구에 있어서도 상당한 연구결과를 얻었다고 할 수 있다. 본 연구를 통하여 해양천연물연구의 핵심이 되는 요소인 미이용 해양자원의 확보와 신물질 확보의 면에서 다양하고 특수한 해양환경에서의 해양방선균 및 해양미생물의 확보와 활성물질의 분리정제와 구조 결정에 있어서는 이미 국제적인 수준에 거의 근접한 것으로 판단된다. 특히 020-1과 같은 물질은 지금까지 분리된 적이 없는 골격을 가진 신물질들의 발견은 국내에서 해양천연물 개발의 성공 가능성을 보여준 것으로 생각된다. 또한 이러한 신물질들은 기존의 천연물과는 완전히 상이한 화학적 구조를 가지고 있어 다양한 활성을 가질 것으로 기대되어진다.

본 연구과제에 의하여 개발된 기술과 해양생물, 신규 천연물 및 합성유도체 등과 같은 소재들은 향후에 시도될 많은 해양생명공학 사업 및 천연물 개발과제와 산업화 과제를 위한 훌륭한 재료로 활용될 것으로 예상된다.

# 제 5 장

## 연구개발결과의 활용계획





## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

해양에서 분리된 많은 생리활성 천연물들이 생물체내에 아주 낮은 농도로 존재하며, 구조의 복잡성에 의한 합성의 어려움, 독성 등의 문제 및 천연물의 대량확보의 문제 등으로 인해 해양생물유래의 천연물의 개발에 많은 어려움이 있었다. 이러한 해양천연물 개발의 문제점을 해결하기 위한 방법으로서 복잡한 해양천연물을 단순 유도체화 하거나, 해양방선균이나 해양미생물처럼 대량배양을 통해서 원료물질을 쉽게 공급할 수 있는 해양미생물이 차세대 생명자원으로 대두되고 있는데, 본 연구는 이러한 추세에 따라 해양미생물을 주된 연구 대상으로 하였다.

본 연구사업을 통하여 많은 분야에서의 기술적인 발전이 있었다. 즉, 열대지방이나 이어도와 같은 다양한 환경에서 다양한 해양시료의 채집 및 해양미생물의 확보, 보존 및 배양, 천연물의 분리정제, 생리활성의 검색, 활성물질의 구조결정, 천연물유래의 유도체의 합성, 활성 검증 등의 천연물연구의 제반 과정에 있어서 많은 기술적 발전이 있었다. 더욱이 해수로부터 아주 특이한 신종 해양곰팡이의 분리와 이 미생물로부터 다양한 신물질의 분리는 본 연구과제의 아주 큰 연구실적 이라고 볼 수 있다. 또한 본 연구에서 분리된 많은 물질들은 기존의 천연물 연구에서 접해 보지 못하였던 새로운 탄소골격과 작용기를 갖고 있는 물질들이 많아서 향후에 해양천연물의 산업적 개발연구에 있어서 핵심 재료로 크게 활용될 수 있을 것이다.

또한 본 연구사업에 의하여 개발된 여러 가지 기술과 정보 및 생물소재는 아래와 같이 관련분야의 연구에 활용할 수 있을 것으로 판단되며, 현재 이미 활용되고 있거나 구체적인 계획이 수립될 예정이다.

### 1. 산업적 활용을 위한 선도물질로 이용:

본 연구에서 분리된 많은 물질들은 구조적으로 새로운 물질이거나 탄소골격이 특이한 물질들이 많다. 예를 들어, 본 연구에서 분리된 pantetheine계 신규 물질은 분자량이 아주 작으면서도 특이한 화학적인 구조와 항염활성 등의 다양한 항노화 활성을 가지고 있다. Pantetheine은 화장품, 의약품, 샴푸 등 다양한 형태로 제품화가 되어 있으며, 본 연구에서 분리된 신규 pantetheine 유도체도 다양한 활성을 가지고 있어 여러 가지 제품으로의 응용이 충분히 가능할 것으로 사료된다. 이 물질은 천연물 그 자체 혹은 합성 유도체로서 항노화 제품 개발을 위한 선도물질로 이용할 수 있으며, 의약화학적 연구 및 여러 가지 생화학적 시약으로도 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 특히 020-1과 같이 본 연구에서 발견된 물질들은 분자량 1,000 이하의 소형물질들로서 짧은 합성과정으로 대량생산이 가능하여 작용기의 변환이나 구조변환이 용이하다. 따라서 화장품 소재나 기능성 건강식품 등의 산업적인 개발을 위한 선도물질로 활용이 가능할 것으로 사료된다.

### 2. 유기합성 및 약화학적 연구에 이용:

해양천연물은 독특한 화학적 구조와 강력한 생리활성을 가지고 있어서, 유기합성

및 약화학적 연구를 위한 소재로 널리 활용된다. 본 연구과제에서 분리된 많은 물질들이 신규의 골격을 가지며 다양한 작용기들과 활성을 가지고 있어서 유기합성의 좋은 타겟이 될 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 이들 물질들은 전합성 및 새로운 합성법 개발을 위한 훌륭한 목표가 될 수 있으며, 새로운 천연물 유도체의 합성을 위한 소재로도 활용될 수 있을 것이다.

### 3. 관련 분야의 다양한 연구를 위한 재료로 이용:

천연물의 강력한 생리활성, 구조와 활성과의 상관관계, 생체내에서의 독특한 작용기작 등은 생화학 및 생물유기화학, 의약학, 약학 등의 연구를 위한 중요한 재료로 활용된다. 본 연구를 통하여 분리된 여러 가지 향암물질 및 생리활성물질들도 그들의 작용기작에 대한 연구를 위한 훌륭한 재료가 될 수 있다. 이와 같이 본 연구사업을 통하여 분리된 해양천연물의 상당수는 이미 관련 연구자들에게 제공되어 여러 가지 연구의 재료로 이용이 되고 있다.

본 연구사업을 통하여 확보된 많은 신규 천연물과 해양생물 및 해양미생물들은 향후의 해양천연물의 산업적 개발연구, 해양생명공학연구나 관련분야의 연구를 위한 소재로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

#### 1. 본 연구를 통한 발굴된 유용 해양생물 및 해양미생물:

국내 연근해, 남태평양 등의 열대지역 등에서 분리한 유용 해양미생물들은 생물다양성 협약의 발효와 함께 다가오는 생물자원전쟁에 대비할 수 있는 아주 좋은 재료들이 될 것으로 생각된다. 특히 1210CH-42는 신종의 해양곰팡이로서 다양한 골격의 신물질들을 생산하고 있어서 향후의 해양천연물 개발연구를 위한 매우 가치 있는 소재로 이용될 수 있을 것이다. 분리된 해양미생물 균주의 경우는 신물질 탐색 연구 이외에도 해양바이오에너지 개발을 위한 유용균주의 탐색이나 살적조 해양미생물의 탐색과 같은 환경학적 혹은 해양생명공학적 연구개발을 위한 중요한 소재로도 충분히 이용이 가능하며, 이러한 목적의 연구사업도 함께 계획하고 있다.

#### 2. 생리활성 천연물:

본 연구사업에서 분리된 많은 물질들이 항염활성, 항산화 활성, 항균 활성 등의 다양한 생리활성을 나타내었다. 이러한 물질들 중에는 향후 산업적 개발을 위한 선도물질로 이용될 수 있는 구조적인 특성과 강력한 생리활성을 함께 갖고 있는 물질이 적지 않다. 따라서 본 연구에서 발굴된 천연물 그 자체 혹은 합성유도체들은 다양한 제품 개발 및 활용에 있어서 중요한 재료로 활용될 수 있으며, 화학, 생화학, 생물유기화학, 약화학적 연구에도 연구용시약으로 개발이 가능할 것으로 보인다.

요약하여 본 연구과제에서 개발된 여러 가지 기술들은 향후의 본격적인 해양천연물 개발을 위한 중요한 핵심기술로 활용될 것이며, 확보된 해양미생물 균주와 여러 가지 천연물은 산업적 개발연구를 위한 우수한 생물자원 및 소재로 이용될 것이다.

본 연구사업은 당초 추구하였던 연구목표와 세부 연구내용을 충실히 달성한 것으로  
생각된다. 또한 국내에서의 해양천연물을 이용한 항노화 물질의 개발가능성을 입증하였  
으며, 특히 국내 연안 및 열대지방의 해양미생물로부터 다양한 신규 천연물을 확보하고  
이들 신물질의 개발가능성을 입증하고 한 것으로 생각된다.

# 제 6 장 참 고 문 헌





## 제 6 장 참 고 문 헌

강찬구. 2013, 새로운 성장동력으로 부상하는 안티에이징. 삼성경제연구소.

김무웅. 2009, 노화연구 및 활용기술. 생명공학정책연구센터.

김현영. 2013, 국·내외 노화연구 정책 및 연구 트렌드 분석. 국립보건연구원.

문혜선, 2014, 산업창조시리즈. II. 항노화산업의 동향과 발전방향.

문혜선, 이준. 2013, 고령화시대 항노화산업의 부상과 성장전략, 산업연구원.

보건산업동향, 2014, 항노화 산업의 현재와 미래. 한국보건산업진흥원.

Abrell, L. M.; Cheng, X.-C.; Crews, P. New Nectriapyrones by Salt Water Culture of a Fungus Separated from an Indo-Pacific Sponge. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 9159-9160.

Allen, W. E. Depth relationships of plankton diatoms in sea water. *Journal of Marine Research*, **1941**, *4*, 107-111.

Andersen, P.; Sorensen, H. M. Population dynamics and trophic coupling pelagic microorganisms in eutrophic coastal waters. *Marine Ecology-Prog Series*, **1986**, *33*, 99-109.

Avent, A. G.; Hanson, J. R.; Truneh, A. Two Pyrones from *Gliocladium vermoes enii*. *Phytochemistry*, **1992**, *31*, 1065-1066. Cuadrado

Berdy, J. Bioactive metabolites from microorganisms. **1989**, 3-25, Elsevier, Amsterdam.

Broggini, M.; Marchini, S. V.; Galliera, E. Aplidine, a new anticancer agent of marine origin, inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion and blocks VEGF-VEGFR-1 (flt-1) autocrine loop in human leukemia cells MOLT-4. *Leukemia*, **2003**, *17*, 52-9.

Cuadrado, A.; Garcia-Fernandez, L. F.; Gonzalez, L. Aplidin induces apoptosis in human cancer cells via glutathione depletion and sustained activation of the

epidermal growth factor receptor, Src, JNK, and p38 MAPK. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 241–250.

Du, L.; Zhu, T.; Li, L.Y.; Cai, S.; Zhao, B.; Gu, Q. Cytotoxic Sorbicillinoids and Bisorbicillinoids from a Marine-Derived Fungus *Trichoderma* sp. *Chem. Pharm. Bull.* **2009**, *57(2)*, 220–223.

Fautin, D. G. ed. *Biomedical Importance of Marine Organisms*, California Academy of Sciences; San Francisco, **1988**, 159.

Gray, T. R. G.; Parkinson, D. Ed. The ecology of soil bacteria. **1968**, 171–185, Liverpool University Press, Liverpool.

Hart, J. B.; Lill, R. E.; Hickford, S. J. H.; Blunt, J. W.; Munro M. H. G. The halichondrins: Chemistry, biology, supply and delivery. In *Drugs from the sea* Fusetani, N., Ed.; Karger: Basel. **2000**, 134–153.

Hocking, M. B. Structure of crotonic acid dimers and higher polymers with partial stereochemistry of the dimers. *Can. J. Chem.* **1969**, *47*, 821–830.

Lin, Z.-J.; Lu, Z.-Y.; Zhu, T.-J.; Fang, Y.-C.; Gu, Q.-Q.; GU, Zhu, W.-M. Penicillenols from *Penicillium* sp. GQ-7, an Endophytic Fungus Associated with *Aegiceras corniculatum*. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *56(2)*, 217–221.

Martins, A.; Vieira, H.; Gaspar, H.; Santos, S. Marketed Marine Natural Products in the Pharmaceutical and Cosmeceutical Industries: Tips for Success. *Marine drugs* **2014**, *12*, 1066–1101.

Mazur, P.; Meyers, H. V.; Nakanishi, K.; A, A. E. E.-Z.; Champe, S. P., Structural elucidation of sporogenic fatty acid metabolites from *Aspergillus nidulans*. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31 (27)*, 3837–3840.

McCarthy, P. J.; Pomponi, S. A. A search for new Pharmaceutical Drugs from marine organisms. *Marine. Biomed. Res.* **2004**, 1–2.

Mendola, D. Aquacultural production of bryostatin 1 and ecteinascidin 743. In *Drugs from the sea* Fusetani N., Ed.; Karger: Basel, **2000**, 120–133.

Mo, X.; Li, Q.; Ju, J. Naturally occurring tetramic acid products: isolation, structure elucidation and biological activity. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 50566–50593.

Mutter, R.; Wills, M. Chemistry and clinical biology of the bryostatins. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1841–1860.

Nonomura, H.; Ohara, Y. Distribution of soil actinomycetes. IX. New species of the genera *Microbispora* and *Microtetraspora*, and their isolation method. *J. Ferment. Technol.* **1971**, *49*, 887–894.

Okami, Y.; Beppu, T.; Ogawara, H. Biology of actinomycetes 88: Proceedings of seventh International symposium on biology of actinomycetes, Japan scientific societies, **1988**, 265–270, Academic Press, Tokyo.

Olivera, B. M.  $\omega$ -conotoxin MVIIA: From marine snail venom to analgesic drug. In *Drugs from the sea* Fusetani, N., Ed.; Karger: Basel. **2000**, 74–85.

Poveda, A.; Berton-Rigaud, D.; Ray-Coquard, I. L.; Alexandre, J.; Provansal, M.; Soto, A.; Kahatt, C. M.; Szyldergemajn, S. A.; Nieto, A.; Fernandez, C.; Alia, E. G.; Casado, A. Gonzales-Martin, A.; Campo, J. M. D.; Lurbinectedin (PM01183), an active compound in platinum-resistant/refractory ovarian cancer (PRROC) patients: Results of a two-stage, controlled phase II study. *J. Clin. Oncol.* **2014**, *32*, 5s.

Proksch, P.; Edrada, R. A.; Ebel, R. Drugs from the Seas—Current Status and Microbiological Implications. *Appl. Microbiol. Biotech.* **2002**, *59*, 125–134.

Sakai, R.; Rinehart, K. L.; Kishore, V.; Kundu, B.; Faircloth, G.; Gloer, J. B.; Carney, J. R.; Namikoshi, M.; Sun, F.; Hughes, R. G.; Gravalos, D. G.; de Quesada, T. G.; Wilson, G. R.; Heid, R. M. Structure–Activity Relationships of the Didemnins. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 2819–2834.

Taraboletti, G.; Poli, M.; Dossi, R. Antiangiogenic activity of aplidine, a new agent of marine origin. *Br. J. Cancer.* **2004**, *90*, 2418–2424.

Voelskow, H. Methoden der zielorientierten Stammsolierung. in Jahrbuch Biotechnologie, Carl Hanser Verlag, Munchen, **1989**, 343–361.

Williams, S. T.; Wellington, E. M. H. In Bioactive microbial products: search and discovery: Principles and problems of selective isolation of microbes. **1982**, 9–26, Academic press, New York.

Zhang, J.; Jiang, Y.; Cao, Y.; Liu, J.; Zheng, D.; Chen, X.; Han, L.; Jiang, C.; Huang, X., Violapyrones A–G, alpha-pyrone derivatives from *Streptomyces violascens* isolated from *Hylobates hoolock* feces. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76* (11), 2126–30.