

LC-MS 대사체학 분석 기반 극지미생물의
대사체 분석 및 구조

Metabolomic and structure analyses of Antarctic
microorganism based on LC-MS



고려대학교

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “극지적응 고유생물 유래 대사체의 상용화 구축 사업”과제의 위탁 연구 “LC-MS 대사체학 분석 기반 극지미생물의 대사체 분석 및 구조”과제의 최종 보고서로 제출합니다.



(본과제) 총괄연구책임자	: 임정한
위탁연구기관명	: 고려대학교
위탁연구책임자	: 이동호
위탁참여연구원	: 권하은
“	: 연서영

보고서 초록

위탁연구과제명	LC-MS 대사체학 분석 기반 극지미생물의 대사체 분석 및 구조				
위탁연구책임자	이동호	해당단계 참여연구원 수	6	해당단계 연구비	120,000,000 원
연구기관명 및 소속부서명	고려대학교_생명공학부		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	
<p>미생물 유래 대사체는 전통적으로 신약개발에 있어서 중요한 자원으로 이용되어 왔으며 현재 임상에서 사용되는 많은 의약품들이 미생물 유래 대사체이거나 이들의 유도체임.</p> <p>특히, 지구상에서 생명체가 서식하기 어렵다고 생각되는 극한환경 중 하나인 극지에 적응하여 생육하는 극지미생물은 극한 환경에서 생존하기 위하여, 특히 생존 기작을 가짐. 이는 진화론적 발전으로 인한 유전자 변이에 의한 것으로 극지미생물 내 특이 효소와 같은 특이적 대사물질 및 신규활성물질 발현의 무한한 가능성을 지니게 함. 이처럼 신규활성물질의 보고로서 무한한 가능성과 잠재력을 지녔음에도 접근성의 어려움과 국내 연구 조건 미비로 인해 체계적인 연구가 부족함.</p> <p>이에 따라 본 연구팀은 LC-MS를 이용한 대사체학 분석 기법과 가장 최신의 분석 기법인 분자 네트워킹 분석 기법 기반으로 극지미생물 내의 대사체 분석, 분리 및 구조연구를 통해 체계적이고 효율적으로 유용성을 탐색하고자 함.</p> <p>LC-MS를 이용한 극지미생물 추출물의 대사체 분석 및 DB 구축을 통해 유용 극지미생물 추출물을 선정하고, 선정된 유용 극지미생물의 대량배양과 유용물질 분리 및 구조 연구를 통해 극지미생물 유래 의약품 개발의 기반을 마련함.</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한글	극지미생물, 액체크로마토그래피-질량분석기, 대사체학, 분자 네트워킹, 신규활성물질			
	영어	Antarctic-derived fungi, LC-MS, Metabolomics, Molecular networking, New bioactive compound			

요 약 문

I. 제 목

LC-MS 대사체학 분석 기반 극지미생물의 대사체 분석 및 구조

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 미생물 유래 대사체는 전통적으로 신약개발에 있어서 중요한 자원으로 이용되어 왔으며 현재 임상에서 사용되는 많은 의약품들이 미생물 유래 대사체이거나 이들의 유도체임.
- 특히, 극지 유래 미생물은 생명체가 서식하기 어려운 극한환경에 적응하여 생육하면서 특이 생존 기작 (surviving mechanism)을 가짐. 이는 진화론적 발전으로 인한 유전자 변이에 의한 것으로 극지 유래 미생물 내 특이 효소 (specific enzyme)와 같은 특이적 대사물질 및 신규활성물질 발현의 무한한 가능성을 지님.
- 이처럼 극지 유래 미생물은 신규활성물질의 보고로서 무한한 가능성과 잠재력을 지녔음에도 접근성의 어려움과 국내 연구 조건 미비로 체계적인 연구가 부족함.
- 이에 따라 본 연구팀은 LC-MS를 이용한 대사체학 분석 기법을 기반으로 극지미생물 내의 대사체 분석, 분리 및 구조 연구를 통하여 극지 미생물 유래 특이적 대사물질 및 신규활성물질을 효율적으로 탐색하고자 함.

III. 연구개발의 내용 및 범위

성과목표	세부목표		달성 주요 내용
LC-MS를 이용한 극지미생물 대사체 분석 및 분리	1-1	LC-MS를 이용한 극지미생물 추출물의 대사체 분석 및 DB	<ul style="list-style-type: none">• LC-MS의 다양한 분석조건변화를 통하여 대사체 분석• Scifinder, Reaxys 등 chemical DB

		구축	검색을 통한 구조 연구 • MS/MS data를 이용한 molecular networking 실시
1-2	대사체 분석 기반 유용 극지미생물 선정 (prioritizing)		• 대사체 분석 기반 유용 물질 분리용 극지미생물 선정 • Molecular networking 분석 기반 신규활성물 가능성이 있는 극지미생물 선정
1-3	선정된 유용 극지미생물의 대량 배양, 유용 물질 분리 및 구조연구		• 극지미생물의 대량 배양 및 물질 분리 • Molecular networking 기반의 유용물질 구조 연구

IV. 연구개발결과

세부목표	연구내용	연구결과
1-1 LC-MS를 이용한 극지미생물 추출물의 대사체 분석 및 DB 구축	극지미생물 추출물 수령 및 분석 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> • 원광대학교 오현철 교수님으로부터 SF7013, SF7024의 극지미생물을 수령함. (1차년도) • 원광대학교 오현철 교수님으로부터 극지미생물 SF7071, SF7220, SF7228, SF7232, SF7266, SF7277을 수령함. (2차년도) • 원광대학교 오현철 교수님으로부터 102종 (SF7290-SF7422)의 극지미생물 추출물을 수령함. (3차년도) • 극지연구소로부터 총 6종 (ANT-40-6)의 극지미생물 추

		<p>출물을 수령함. (3차년도)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 신라대학교로부터 총 52종의 극지미생물 추출물을 수령함. (3차년도) • 대사체 분석을 위해 3% NaCl 해수조건의 potato dextrose agar 배지에 25 °C 조건에서 10일간 정체 배양하고, 현미경을 통해 포자를 관찰하여 Genus를 예측함.
	<p>확립된 LC-MS 분석조건을 이용한 다양한 극지미생물 추출물 분석 및 DB 구축</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 추출물을 MeOH에 녹여 0.2 μm의 membrane filter로 필터 후 LC-MS Waters UPLC/Ion trap (IT) MS 로 분석하여 metabolite가 충분히 분리되고 검출될 수 있는 최적의 분석 조건을 확립함. • 또한 molecular networking에 기반한 de-replication을 수행하기 위해 표 1과 같이 parameter 조건을 설정. • 확립된 LC-MS 분석 조건으로 수령받은 극지미생물 추출물들을 분석하여 chemical DB 검색 및 molecular networking 분석 결과를 기반으로 대사체 DB를 구축함.
<p>1-2 대사체 분석 기반 유용 극지미생물 선정 (prioritizing)</p>	<p>Chemical DB 기반 de-replication 수행</p>	<ul style="list-style-type: none"> • LC-MS 분석 결과를 바탕으로 Scifinder, Reaxys 등 chemical DB 검색을 통한 de-replication을 수행하여 극지미생물 추출물들의 우선순위를 선정 • MS/MS fragmentaion 기반 molecular networking 분석기법을 이용하여 신규활성물질 가

<p>1-3 선정된 유용 극지미생물의 대량 배양, 유용 물질 분리 및 구조연구</p>	<p>극지미생물의 대량배양 및 분리, 구조 연구</p>	<p>능성이 있는 극지미생물 선정.</p> <ul style="list-style-type: none"> • 1차년도에 선정된 유용 극지미생물 SF7071과 SF7266의 대량 배양, 유용 물질 분리 및 구조 연구를 수행하여 각각 2종과 4종의 known compounds를 분리 및 정제함. SF7266에서 분리된 4종의 화합물에 대해 활성 테스트 진행 중. • 3차년도에 선정된 유용 극지미생물 7237도 위와 같은 방법으로 1개의 known compound를 분리 및 정제함.
---	--	---

V. 연구개발결과의 활용계획

- 극지미생물 유래 신규활성물질 분리에 대한 효율적 접근법을 제시
- 극지미생물에 대한 경제적, 산업적 가치를 높여 활용성을 제시
- 극지미생물 유래 신규물질 및 생리활성물질 규명을 통하여 지적재산권 확보 및 우선권 선점.
- 신규활성물질에 대한 극지미생물 유래 의약품 기술 개발
- Molecular networking 분석기법을 통한 유사 물질들 표적 분리를 통한 structure-activity relationship 연구.

S U M M A R Y

(영 문 요 약 문)

I. Title

Metabolomic and structure analyses of antarctic microorganism
based on LC-MS

II. Purpose and Necessity of R&D

- Fungal-derived metabolites may be important therapeutic sources since ancient times to treat several diseases.
- In particular, antarctic-derived fungi evolving in natural extreme environments have surviving mechanism which comes from the genomic aberration of evolutionary development. It may be of valuable biotechnological potential for the production of specific enzymes, specific metabolites and new bioactive metabolites.
- Although antarctic-derived fungi have infinite potentials for discovery new bioactive compounds, it is challenging to overcome the limited access and the condition of domestic research.
- Therefore, our aim is to analyze the metabolites of antarctic-derived fungi extracts using LC-MS based metabolomics and to isolate and determine the structure of new bioactive compounds efficiently.

III. Contents and Extent of R&D

Objective	Detail objective		Contents
Analysis of antarctic-derived fungi extracts using LC-MS	1-1	Analysis of antarctic-derived fungi extracts using LC-MS and establishment of DB	<ul style="list-style-type: none">• Analysis of antarctic-derived fungi extracts using various LC-MS conditions• Study the structure through researching

			<p>chemical DB using Scifinder, Reaxys.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Analysis of antarctic-derived fungi extracts using M S / M S fragmentation molecular networking.
	1-2	Priority of antarctic-derived fungi extracts based on metabolomics	<ul style="list-style-type: none"> • Selection of the priority of antarctic-derived fungi extracts based on metabolomics. • Selection of the priority of antarctic-derived fungi extracts based on Molecular networking
	1-3	Isolation and determination of target compounds from the selected antarctic-derived fungi extracts.	<ul style="list-style-type: none"> • Isolation of the target compounds using diverse chromatographic method. • Determination of the structure based on molecular networking.

IV. R&D Results

Objective	Detail objective	Contents
1-1 Analysis of antarctic-derived fungi extracts using	Receipt antarctic-derived fungi extracts and establishment	<ul style="list-style-type: none"> • Receipt antarctic-derived fungi SF7013, SF7024 from Professor Hyuncheol Oh Wonkwang university. (First year)

<p>LC-MS and establishment of DB</p>	<p>LC-MS condition</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Receipt antarctic-derived fungi SF7071, SF7220, SF7228, SF7232, SF7266, SF7277 from Professor Hyuncheol Oh Wonkwang university. (Second year) • Receipt 102 antarctic-derived fungi (SF7290-SF7422) from Professor Hyuncheol Oh Wonkwang university. (Third year) • Receipt 6 antarctic-derived fungi extracts from Korea Polar Research Institute. (Third year) • Receipt 52 antarctic-derived fungi from Silla university. (Third year) • Antarctic-derived fungi was cultured in petri dishes on potato dextrose agar media (3% NaCl) at 25 °C in dark. The fungal materials harvested after 10 days and observe spores to determine the Genus.
	<p>Analysis of antarctic-derived fungi extracts using LC-MS and establishment of DB</p>	<ul style="list-style-type: none"> • The MeOH extracts are dissolved in MeOH and filtered with 0.2 µm membrane filter for analysis of LC-MS Waters UPLC/Ion trap (IT) MS. • Establishment of optimized LC-MS condition for analysis of the metabolites.

		<ul style="list-style-type: none"> Establishment of optimized parameters of molecular networking for de-replication. Analysis the metabolites based on research of chemical DB and molecular networking.
1-2 Priority of antarctic-derived fungi extracts based on metabolomics	De-replication based on Chemical DB	<ul style="list-style-type: none"> Prioritizing of antarctic-derived fungi extracts based on LC-MS analysis results through researching chemical DB with Scifinder, Reaxys. Prioritizing of antarctic-derived fungi extracts based on LC-MS analysis results through MS/MS fragmentation molecular networking.
1-3 Isolation and determination of target compounds from the selected antarctic-derived fungi extracts	Isolation and determination of target compounds from the selected antarctic-derived fungi extracts	<ul style="list-style-type: none"> SF7071 and SF7266 extracts were investigated and the structures of 2 and 4 known compounds were determined respectively. and bioactivity of them under evaluation. 7237 extract was isolated and 1 known compound identified.

V. Application Plans of R&D Results

- Suggestion of the efficient approach for the discovery of new bioactive compounds derived from antarctic-derived fungi.
- Suggestion of the usefulness of antarctic-derived fungi through increasing the economic and industrial values.
- Preoccupancy of priority and intellectual property rights of the antarctic-derived fungi through new bioactive compounds.
- Development of antarctic-derived fungi derived drugs.

- Facilitation of the structure-activity relationship (SAR) study of the compounds (derivatives) through molecular networking.



목 차

제 1 장 서론

- * 연구개발의 목적, 필요성 및 범위 등을 기술

제 2 장 국내외 기술개발 현황

- * 국내외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

- * 이론적, 실험적 접근방법, 연구내용, 연구결과를 기술

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

- * 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전의 기여도 등을 기술

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- * 추가연구의 필요성, 타연구에의 응용, 기업화 추진방안을 기술
- * 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능함.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

- * 보고서 작성시 인용된 모든 참고 문헌을 열거한다.

본 문

제 1 장 서론

제 1 절 연구개발 최종 목표

LC-MS 대사체학 분석 기반 극지미생물의 대사체 분석 및 구조

제 2 절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 미생물 유래 대사체는 전통적으로 신약개발에 있어서 중요한 자원으로 이용되어 왔으며 현재 임상에서 사용되는 많은 의약품들이 미생물 유래 대사체이거나 이들의 유도체임.
2. 특히, 극지 유래 미생물은 생명체가 서식하기 어려운 극한환경에 적응하여 생육하면서 특이 생존 기작 (surviving mechanism)을 가짐. 이는 진화론적 발전으로 인한 유전자 변이에 의한 것으로 극지 유래 미생물 내 특이 효소 (specific enzyme)와 같은 특이적 대사물질 및 신규활성물질 발현의 무한한 가능성을 지님.
3. 이처럼 극지 유래 미생물은 신규활성물질의 보고로서 무한한 가능성과 잠재력을 지녔음에도 접근성의 어려움과 국내 연구 조건 미비로 체계적인 연구가 부족함.
4. 이에 따라 본 연구팀은 LC-MS를 이용한 대사체학 분석 기법을 기반으로 극지미생물 내의 대사체 분석, 분리 및 구조 연구를 통하여 극지미생물 유래 특이적 대사물질 및 신규활성물질을 효율적으로 탐색하고자 함.

제 3 절 연구개발의 내용 및 범위

성과목표	세부목표		달성 주요 내용
LC-MS를 이용한 극지미생물 대사체 분석 및 분리	1-1	LC-MS를 이용한 극지미생물 추출물의 대사체 분석 및 DB 구축	<ul style="list-style-type: none">• LC-MS의 다양한 분석조건변화를 통하여 대사체 분석• Scifinder, Reaxys 등 chemical DB 검색을 통한 구조 연구• MS/MS data를 이

			용한 molecular networking 실시
	1-2	대사체 분석 기반 유용 극지미생물 선정 (prioritizing)	<ul style="list-style-type: none"> • 대사체 분석 기반 유용 물질 분리용 극지미생물 선정 • Molecular networking 분석 기반 신규활성물 가능성이 있는 극지미생물 선정
	1-3	선정된 유용 극지미생물의 대량 배양, 유용 물질 분리 및 구조연구	<ul style="list-style-type: none"> • 극지미생물의 대량 배양 및 물질 분리 • Molecular networking 기반의 유용물질 구조 연구

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 기술 현황

1. 대사체학(metabolomics)은 genome, transcriptome, proteome을 거친 최종산물인 대사체(metabolite)의 피드백 조절 및 기능적인 정보들을 담고 있어 생체 내의 대사회로의 총체적인 흐름을 이해하는데 있어서 매우 유용한 방법이며, 대사산물의 타겟을 정하여 분석하는 targeted analysis와 세포내의 전체 대사산물의 프로파일을 분석하는 non-targeted analysis인 metabolite profiling으로 분류함.
2. 대사체학은 상대적으로 신규 기술 분야로 국제적 기술차가 적어 연구개발에 집중 투자할 경우 단시간에 국제적 수준의 연구능력 보유가 가능할 것으로 예상. 국내 여러 연구기관에서 천연물 및 생체, 환경 대사체 분석을 목적으로 다양한 연구가 진행 중임.
3. 또한 천연물로부터 의약품 개발에서 연구자들이 봉착하는 문제점은 추출, 분리 및 정제시, 이미 보고된 물질인 경우가 대부분이라는 것인데, 이러한 반복적인 과정을 피하기 위한 질량분석기를 이용한 de-replication과 대사체 분석기법은 천연물 연구에서 중요한 이슈임.
4. De-replication 분석기법은 추출물 내 대사물질의 분자량을 기반으로 그 구조를 선

행문헌과의 비교를 통하여 구체적으로 프로파일링 하여, 물질분리에 있어 효율적 접근법을 제공함. 하지만 다량의 추출물을 분석하는데 많은 시간과 비용이 소모되며, 또한 대사물질의 구조 규명이 분석자 개인의 역량에 상당 부분 좌우된다는 데 그 한계가 존재함.

5. Molecular networking 분석기법은 대사체 분석 시, MS fragmentation를 기반으로 추출물 내 대사물질의 구조적 연관성에 의한 그룹화를 시키는 방법으로, 시스템을 통하여 대사물질의 분포 및 구조적 연관성이 자동으로 분석되기에 기존의 de-replication과 대사체 분석기법의 한계점을 보완할 수 있어 최근 천연물 연구에서 새로운 기술로 떠오르고 있음.

제 2 절 시장현황

1. 미생물 유래 대사체는 전통적으로 신약개발에 있어서 중요한 자원으로 이용되어 왔음. 특히, 극지 유래 미생물은 생명체가 서식하기 어려운 극한환경에 적응하여 생육하면서 특이 생존 기작 (surviving mechanism)을 가짐. 이는 진화론적 발전으로 인한 유전자 변이에 의한 것으로 극지 유래 미생물 내 특이 효소 (specific enzyme)와 같은 특이적 대사물질 및 신규활성물질 발현의 무한한 가능성을 지님.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 LC/MS를 이용한 극지미생물 대사체 분석 및 분리

1. LC/MS를 이용한 극지미생물 추출물의 대사체 분석 및 대사체 DB 구축

가. 극지미생물 SF7071, SF7220, SF7228, SF7232, SF7266, SF7277을 원광대 오현철 교수님으로부터 수령함 (1차년도). (그림 1)

나. 원광대학교 오현철 교수님으로부터 102종(SF7290-SF7422)의 극지미생물 추출물을 수령함 (2차년도).

다. 극지연구소로부터 총 6종(ANT-40-6 등)의 극지미생물 추출물을 수령함 (3차년도). (표 1)

라. 신라대학교로부터 총 52종의 극지미생물 추출물을 수령함 (3차년도). (표 2)

마. 배양된 극지 미생물을 MeOH를 이용하여 추출하고 여과 후 농축함. 이를 다시 증류수에 현탁시킨 후 같은 양의 EtOAc로 용매 분획을 실시하였고, EtOAc 추출물을 얻음.



그림 1. 극지미생물, PDA+seasalt 배지, 10일

Code (균주명)	활성
ANT-40-6 (<i>Calycina alstrupii</i>)	Antifungal (<i>Candida albicans</i>)
ANT048 (<i>Psoroma</i> sp.)	Anti-inflammatory
ANT100 (Unidentified species)	Antifungal (<i>Candida albicans</i>)
ANT023 (<i>Ramalina</i> sp.)	Antibiotic (<i>Staphylococcus aureus</i>)
ANT55-6 (<i>Cladosporium</i> sp.)	Antifungal (<i>Candida albicans</i>)
ANT032-01 (<i>Thelebolus ellipsoideus</i>)	Antifungal (<i>Candida albicans</i>)

표 1. 극지연구소로부터 받은 총 6종의 극지 미생물 리스트

순번	Code	배양일	추출일	총 배양일	추출물 무게 (mg)
1	7237	190227	190318	19 일	3
2	7238	190321	190402	12 일	4
3	7239	190227	190320	7 일	6.2
4	7240	190222	190228	6 일	10.4
5	7241	190215	190219	4 일	6.8
6	7242	190215	190221	7 일	5.7
7	7243	190222	190304	11 일	4.3
8	7244	190222	190304	11 일	7.1
9	7245	190215	190221	7 일	1.9
10	7246	190215	190221	7 일	1.6
11	7247	190227	190320	7 일	6.7
12	7248	190227	190320	7 일	6.6
13	7249	190215	190219	4 일	0.8
14	7250	190227	190320	7 일	3.9
15	7251	190222	190304	11 일	7.6

16	7252	190222	190228	6 일	10	
17	7253	190311	190320	9 일	3.1	
18	7254	190222	190228	6 일	6.8	
19	7255	190227	190320	7 일	5.6	
20	7256	190215	190219	4 일	2.1	
21	7257	190321	190402	12 일	3.4	
22	7258	190227	190304	7 일	1.5	
23	7259	190227	190320	7 일	2.1	
24	7260	190228	190402	33 일	4	
25	7261	190222	190307	14 일	1.3	
26	7262	190227	190410	40 일	2.2	
27	7263	190227	190402	34 일	0.9	
28	7264	190311	190320	9 일	5.4	
29	7265	190228	190307	8 일	19.7	
30	7266	190228	190307	8 일	11.3	
31	7267	190311	190320	9 일	11.2	
32	7268	190305	190318	13 일	1.5	
33	7269	190305	190320	15 일	6.9	
34	7270	190311	190318	7 일	4.3	
35	7271	190222	190307	14 일	4.8	
36	7272	190311	190320	9 일	11.3	
37	7273	190311	190320	9 일	8.4	
38	7274	190305	190320	15 일	29.1	
39	7275	190311	190320	9 일	15.9	
40	7276	190305	190402	28 일	4.6	
41	7277	190305	190314	9 일	3.5	
42	7278	190305	190320	15 일	8.3	
43	7279	190320	190410	14 일	1.7	
44	7280	190315	190402	21 일	3.8	
45	7281	190305	190318	13 일	3.5	
46	7282	190215	190221	6 일	3.6	
47	7283	190215	190219	4 일	3.1	
48	7284	안자람				
49	7285	190308	190320	12 일	5.9	
50	7286	190215	190219	4 일	1.2	
51	7287	190222	190228	6 일	6.8	
52	7288	190222	190228	6 일	8.8	

표 2. 신라대학교로부터 받은 총 52종의 극지 미생물 리스트

2. 극지 미생물 추출물의 LC-MS 분석조건 확립

가. 분석을 위해 추출물을 MeOH에 녹여 0.2 μ l의 membrane filter로 필터 후 LC-MS (Waters UPLC/Ion trap (IT) MS and quadruple time of flight (Q-ToF) MS system)를 이용하여 metabolite가 충분히 분리되고 MS가 detect 될 수 있는 최적의 분석 조건을 확립함. (그림 2)

나 또한 molecular networking에 기반한 de-replication을 수행하기 위해 그림 3과 같이 parameter 조건을 설정

LC/MS 분석

UPLC		Q-ToF		
<ul style="list-style-type: none"> UPLC system: Waters ACQUITY UPLC™ Column ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 x 100mm, 1.7μm) Mobile phase A: 0.05 % FA in Water B: Acetonitrile Flow rate: 300μl/min Injection volume: 2μl Column temperature: 35°C Gradient condition: 		<ul style="list-style-type: none"> Capillary (V) 2800.0 Sample Cone (V) 28.0 Extraction Cone (V) 0.8 Desolvation Temp (°C) 300.0 Source Temp (°C) 100.0 TOF Flight Tube (V) 5630.0 Reflectron (V) 1730.0 Pusher 860.4 Puller 650.0 Start Mass 100.0 End Mass 1500.0 Start Time (min) 0.0 End Time (min) 5.0 Scan Time (sec) 0.48 InterScan Time (sec) 0.1 		
Time (min)	Flow rate (μ l/min)	% A	% B	Curve
Initial	300	80.0	20.0	
7.00	300	0.0	100.0	6
8.50	300	0.0	100.0	6
8.60	300	80.0	20.0	6
10.00	300	80.0	20.0	6

그림 2. 확립된 LC-MS 분석조건

Parameters	
Precursor Ion Mass Tolerance	2
Fragment Ion Mass Tolerance	0.9
Minimum cosine score	0.5
Minimum Matched Fragment Ions	6
Network TopK	10

그림 3. Parameters for molecular networking

제 2 절 대사체 분석 기반 유용 극지미생물 선정 (prioritizing)

1. SF7071 추출물의 대사체 분석, 구조 연구 및 DB 구축 (1차년도)

가. SF7071 추출물의 대사체 분석에서 나타난 14개의 특징적인 peak에 대해 MS 및 UV spectrum을 분석하여 Reaxys, SciFinder와 같은 문헌 검색 database를 이용한 de-replication을 시행함.

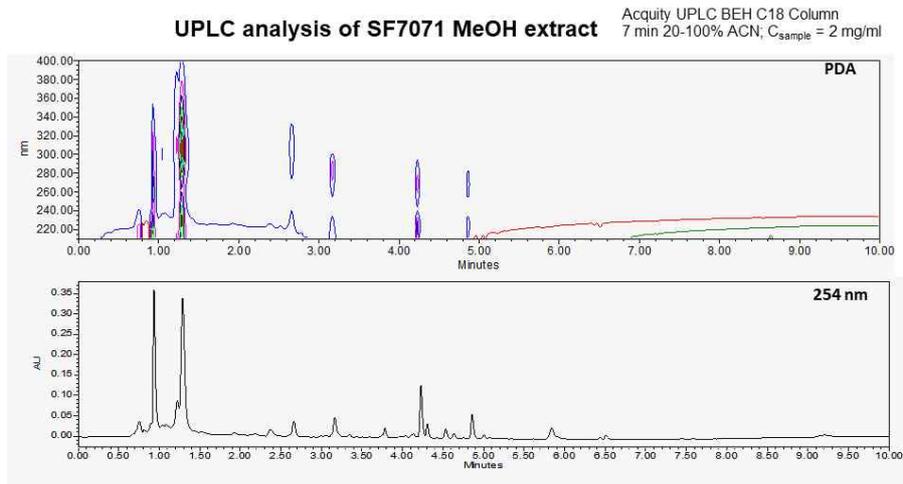


그림 4. SF7071 추출물 UPLC 분석 결과

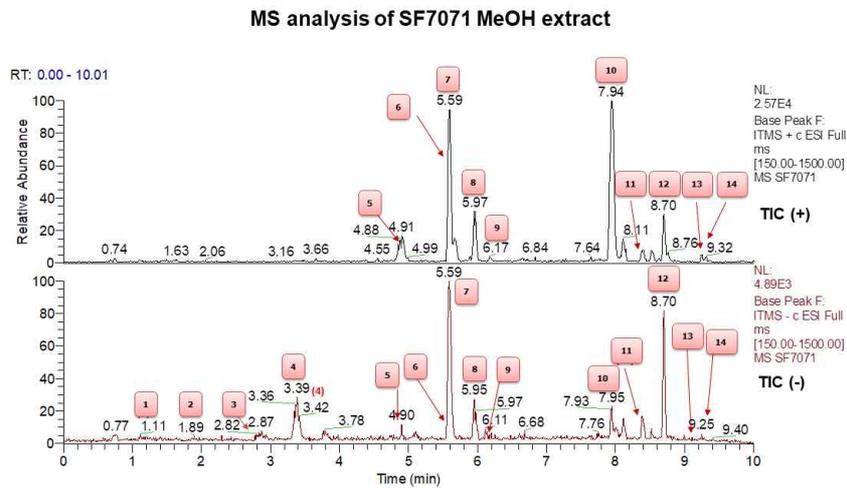


그림 5. SF7071 추출물 MS 분석 결과

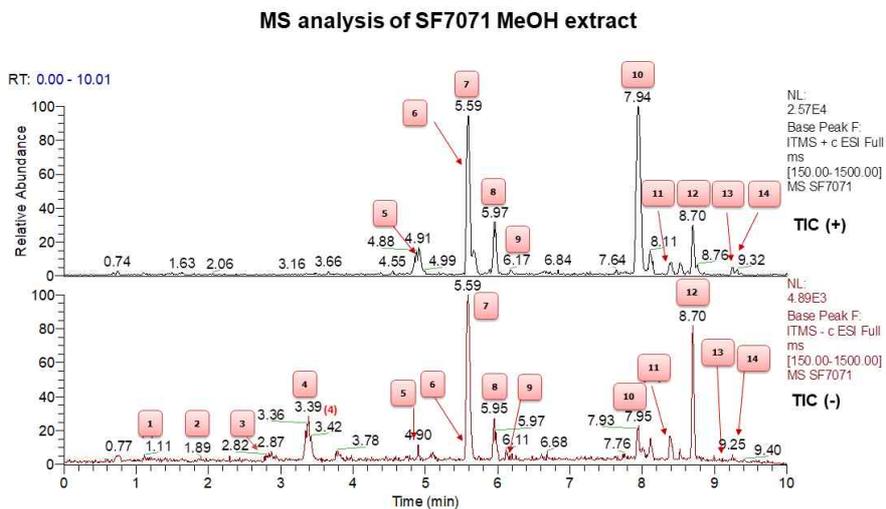


그림 6. SF7071 추출물 MS 분석 결과

나. SF7071 추출물의 14개의 peak의 MS 분석 결과, Peak (1), (4), (7), (9), (13)은 정확한 분자량을 찾을 수 있었고, peak (5)와 (8)은 분자량 452, peak (6)은 339, peak (10)은 460, peak (11)은 348, peak (12)은 444, peak (14)는 428로 예측됨.

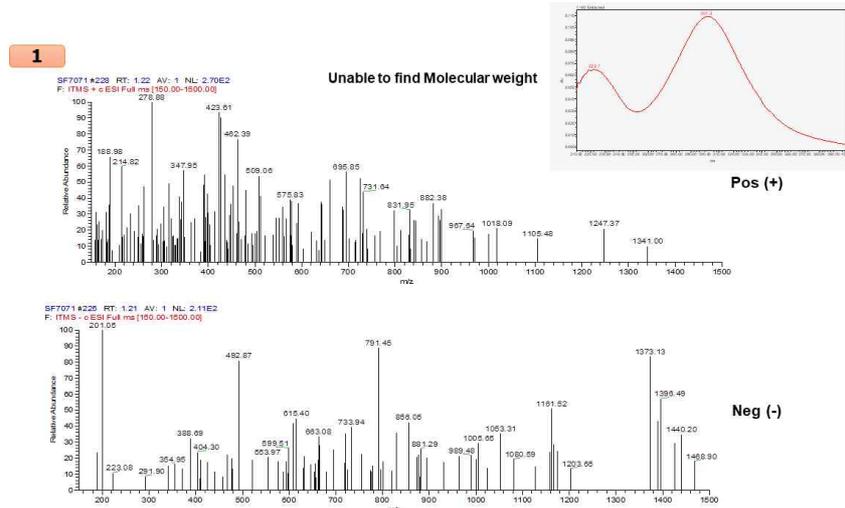


그림 7. Peak (1)의 UV, MS 분석 결과

극지연구소

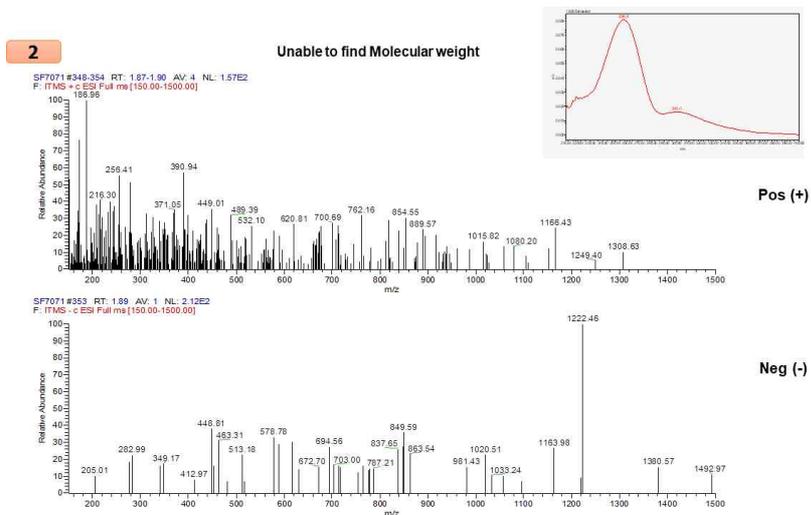


그림 8. Peak (2)의 UV, MS 분석 결과

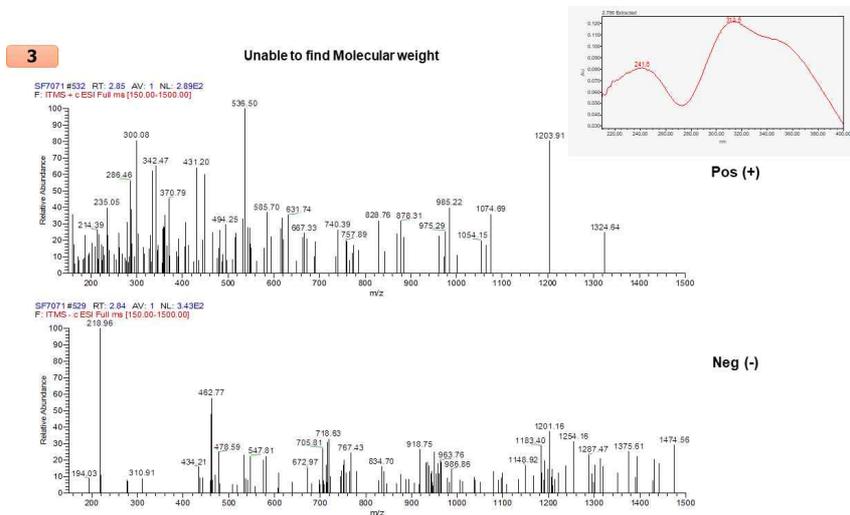


그림 9. Peak (3)의 UV, MS 분석 결과

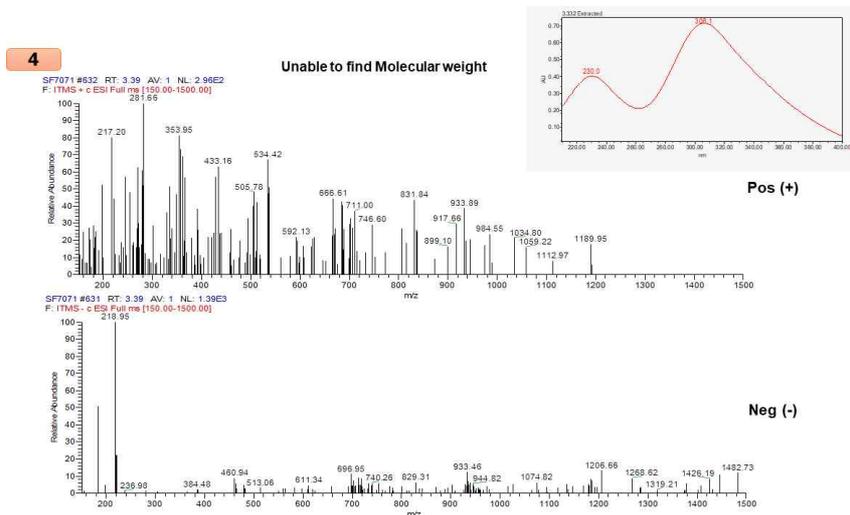


그림 10. Peak (4)의 UV, MS 분석 결과

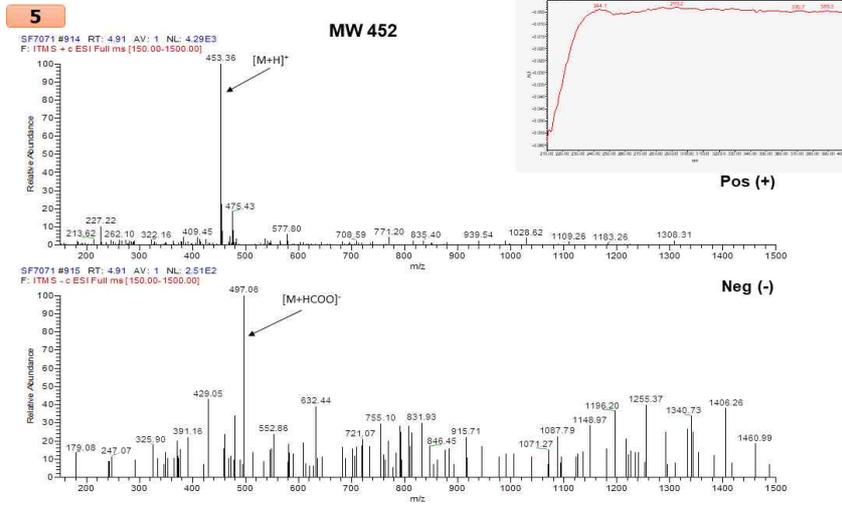


그림 11. Peak (5)의 UV, MS 분석 결과

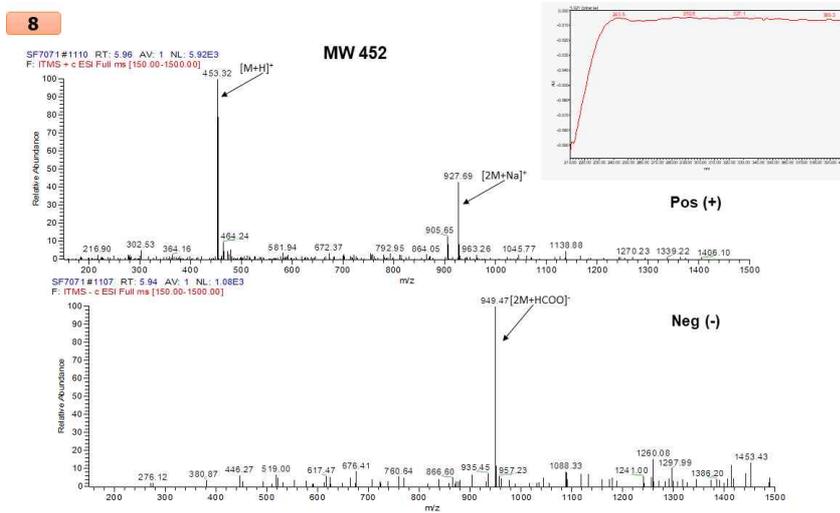


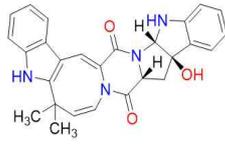
그림 12. Peak (8)의 UV, MS 분석 결과

5 and 8

Chemical Name:
Despentylokaramine A

Molecular Formula: C₂₇H₂₄N₄O₃
Molecular Weight: 452.513

Ref:
Hayashi et al., Okaramines H and I, New Okaramine Congeners, from *Aspergillus aculeatus*, *J. Nat. Prod.*, **1991**, 62, 315-317.

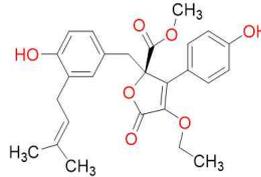


Chemical Formula: C₂₇H₂₄N₄O₃
Exact Mass: 452.1848

Chemical Name:
aspernolide F

Molecular Formula: C₂₆H₂₈O₇
Molecular Weight: 452.504

Ref:
Ibrahim et al., Aspernolides F and G, new butyrolactones from the endophytic fungus *Aspergillus terreus*, *Phytochem. Lett.*, **2015**, 14, 84-90.



Chemical Formula: C₂₆H₂₈O₇
Exact Mass: 452.1835

그림 13. Peak (5)와 Peak (8)의 예측 화합물

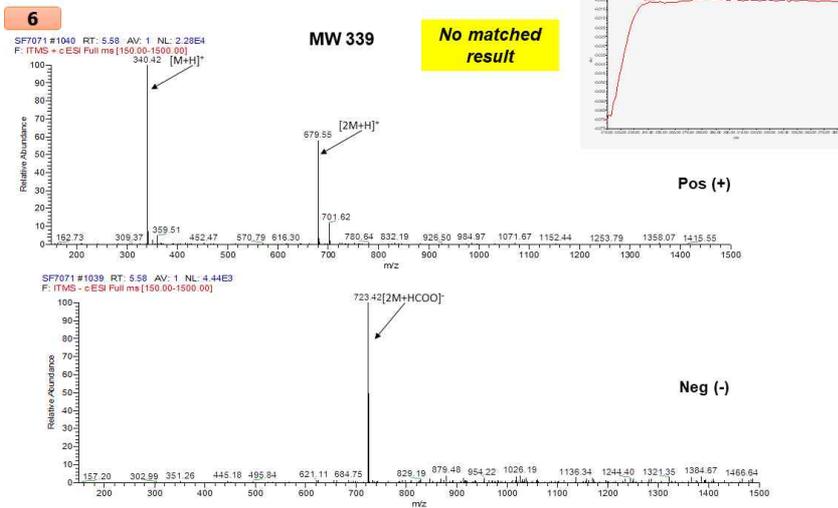


그림 14. Peak (6)의 UV, MS 분석 결과

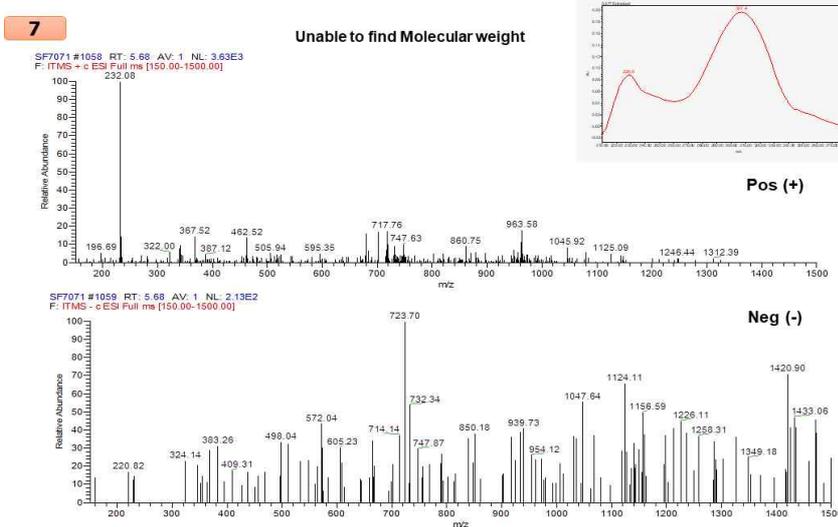


그림 15. Peak (7)의 UV, MS 분석 결과

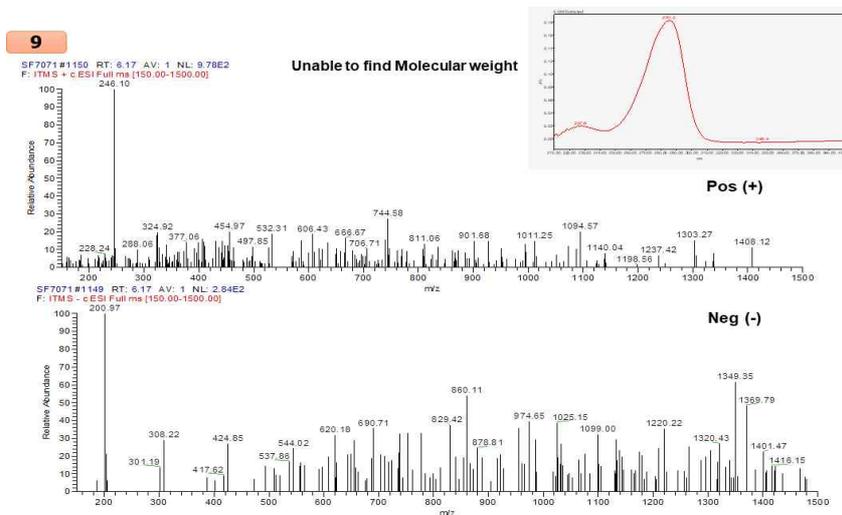


그림 16. Peak (9)의 UV, MS 분석 결과

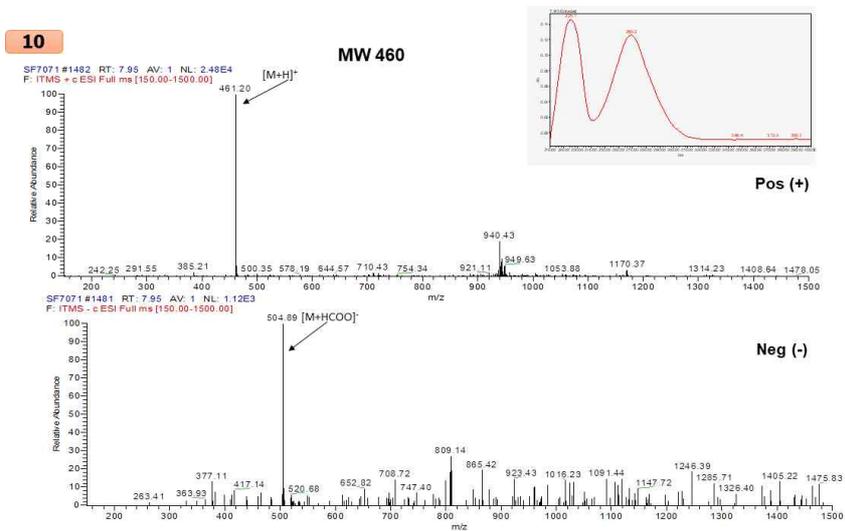


그림 17. Peak (10)의 UV, MS 분석 결과

10

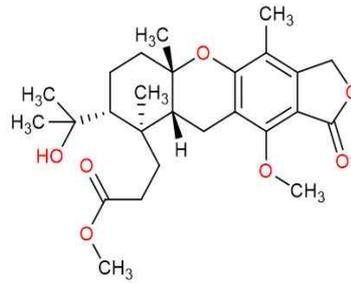
Chemical Name:
Austalide P

Molecular Formula: C₂₆H₃₆O₇
Molecular Weight: 460.568
UV/Vis: 221.7 nm, 270.1 nm

Ref:

[1] Zhou et al., New austalides from the sponge-associated fungus *Aspergillus* sp., *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, 30, 6009 – 6019.

[2] Sobolevskaya et al., New metabolites from the alga-derived fungi *Penicillium thomii* Maire and *Penicillium lividum* Westling, *Phytochem. Lett.*, **2016**, 15, 7-12.



Chemical Formula: C₂₆H₃₆O₇
Exact Mass: 460.2461

그림 18. Peak (9)과 Peak (10)의 예측 화합물

11

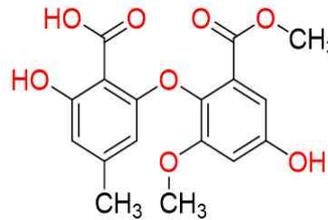
Chemical Name:
Asterric acid

Molecular Formula: C₁₇H₁₆O₈
Molecular Weight: 348.309
UV/Vis: 212 nm, 252 nm, 316 nm

Ref:

[1] Zhang et al., Polyketide butenolide, diphenyl ether, and benzophenone derivatives from the fungus *Aspergillus flavipes* PJ03-11, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2016**, 26, 346-350.

[2] Lin et al., Secondary metabolites of *Aspergillus* sp. F1, a commensal fungal strain of *Trewia nudiflora*, *Nat. Prod. Res.*, **2009**, 23, 77-85.



Chemical Formula: C₁₇H₁₆O₈
Exact Mass: 348.0845

그림 19. Peak (11)의 예측 화합물

12

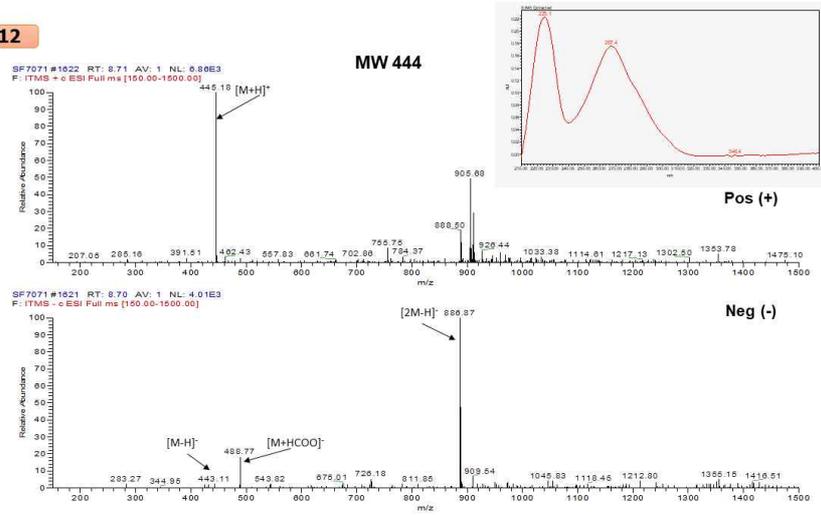


그림 20. Peak (12)의 UV, MS 분석 결과

12

Chemical Name:
2"-oxoasterriquinol D methyl ether

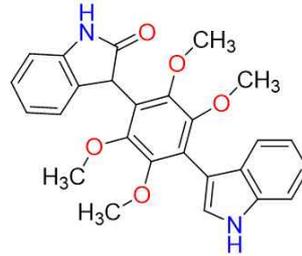
Molecular Formula: C₂₆H₂₄N₂O₅

Molecular Weight: 444.487

UV/Vis: 276 nm, 232 nm

Ref:

Whyte et al., New Cyclic Peptide and Bisindolyl Benzenoid Metabolites from the Sclerotia of *Aspergillus sclerotiorum*, *J. Nat. Prod.*, **2000**, *63*, 1006-1009.



Chemical Formula: C₂₆H₂₄N₂O₅
Exact Mass: 444.1685

그림 21. Peak (12)의 예측 화합물

13

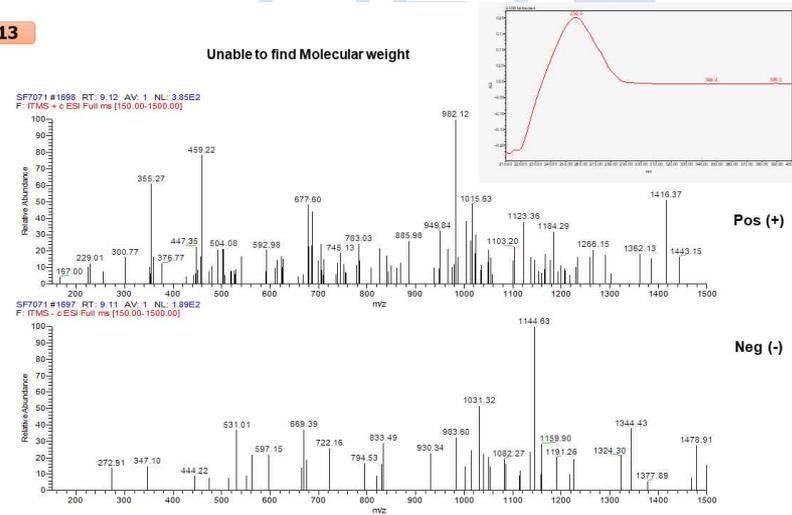


그림 22. Peak (13)의 UV, MS 분석 결과

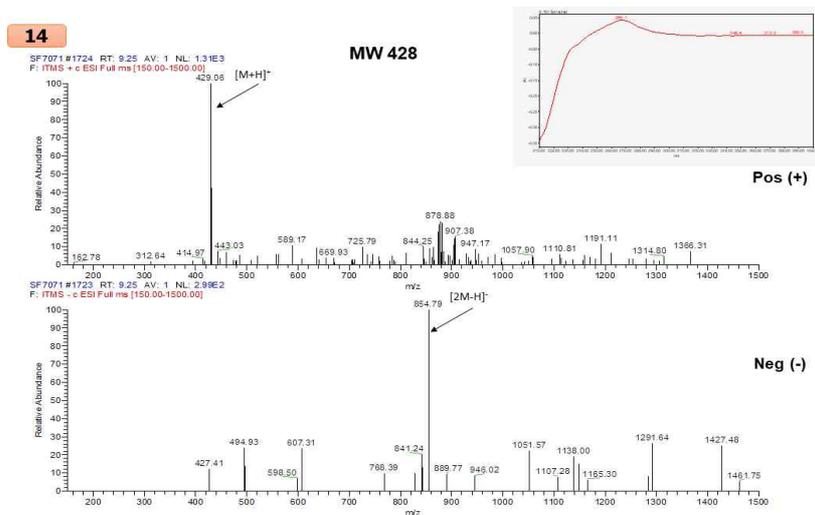


그림 23. Peak (14)의 UV, MS 분석 결과

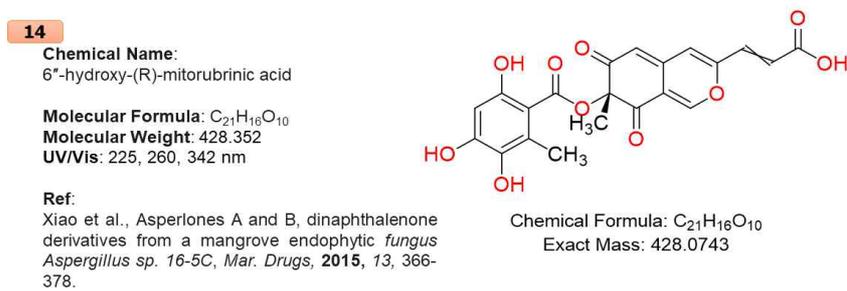


그림 24. Peak (14)의 예측 화합물

다. 해당 분자량과 UV 패턴을 *Aspergillus*속 위주로 문헌을 검색한 결과, peak (6)은 기존 문헌에서 분자량과 UV 패턴을 만족하는 화합물을 찾을 수 없었으며, peak (5)와 (8)은 Despentylokar-amine A와 Aspernolide F, peak (10)은 Austalide P, peak (11)은 Asterric acid, peak (12)는 2''-oxoasterriquinol D methyl ether, peak (14)는 6''-hydroxy-(R)-mitorubric acid로 예상됨.

De-replication Results of SF7071 MeOH extract

(1) to (4), (7), (9), (13)	(6)	(5) and (8)	
		Despentylokaramine A	Aspernolide F
Unable to find Molecular weight	No result	 Chemical Formula: C ₂₂ H ₂₆ N ₄ O ₃ Exact Mass: 452.1848	 Chemical Formula: C ₂₈ H ₃₂ O ₇ Exact Mass: 452.1935
(10)	(11)	(12)	(14)
Austalide P Chemical Formula: C ₂₈ H ₃₂ O ₇ Exact Mass: 460.2461	Asterric acid Chemical Formula: C ₁₇ H ₁₆ O ₉ Exact Mass: 348.0845	2''-oxoasterriquinol D methyl ether Chemical Formula: C ₂₃ H ₂₆ N ₄ O ₃ Exact Mass: 444.1685	6''-hydroxy-(R)-mitorubric acid Chemical Formula: C ₂₁ H ₁₆ O ₁₀ Exact Mass: 428.0743

그림 25. SF7071 추출물 내 대사체 DB

2. SF7220 추출물의 대사체 분석, 구조 연구 및 DB 구축 (1차년도)

가. SF7220 추출물의 대사체 분석에서 나타난 5개의 특징적인 peak에 대해 MS 및 UV spectrum을 분석하여 Reaxys, SciFinder와 같은 문헌 검색 database를 이용한 de-replication을 시행하고 HR/MS 분석으로 molecular formula를 예측함.

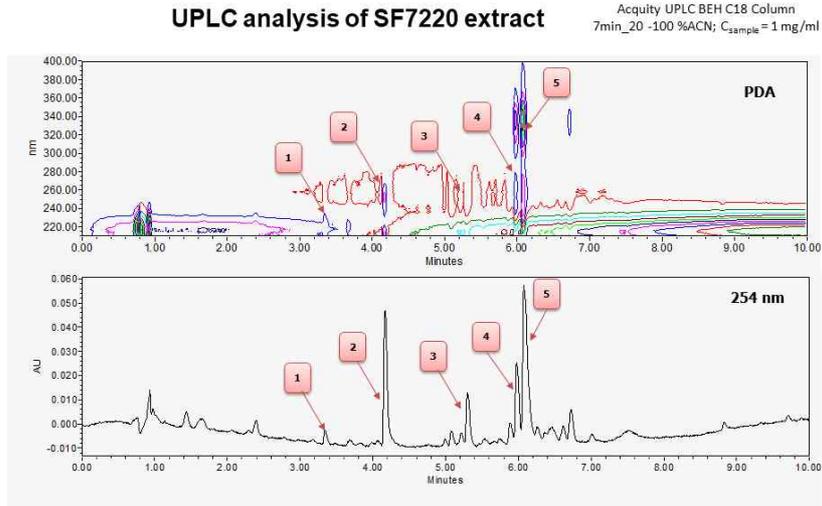


그림 26. SF7220 추출물 UPLC 분석 결과

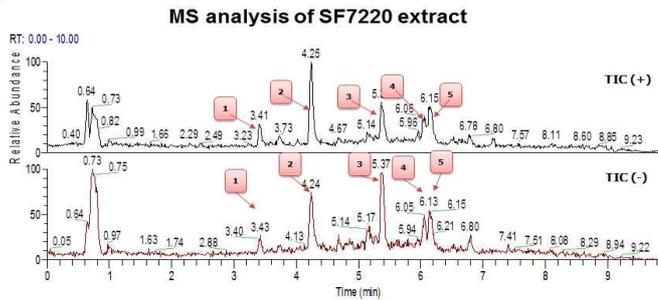


그림 27. SF7220 추출물 MS 분석 결과

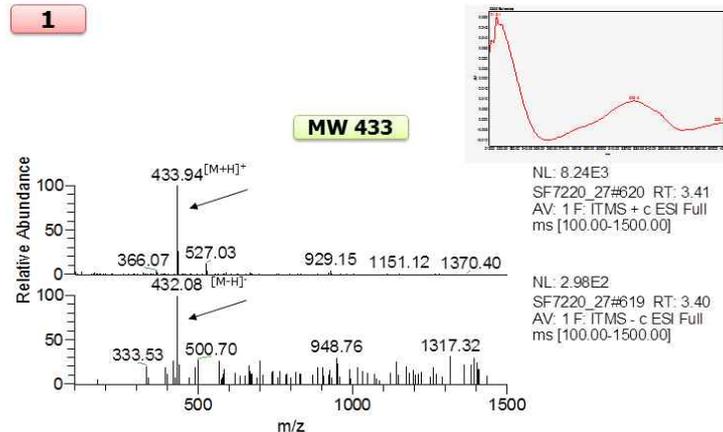


그림 28. Peak (1)의 UV, MS 분석 결과

High Resolution MS
ES (-) mode
 < 5 ppm

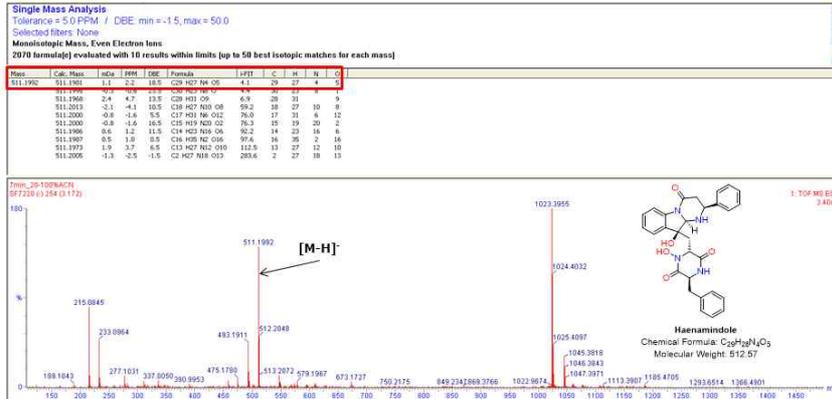


그림 29. Peak (1)의 예측 화합물

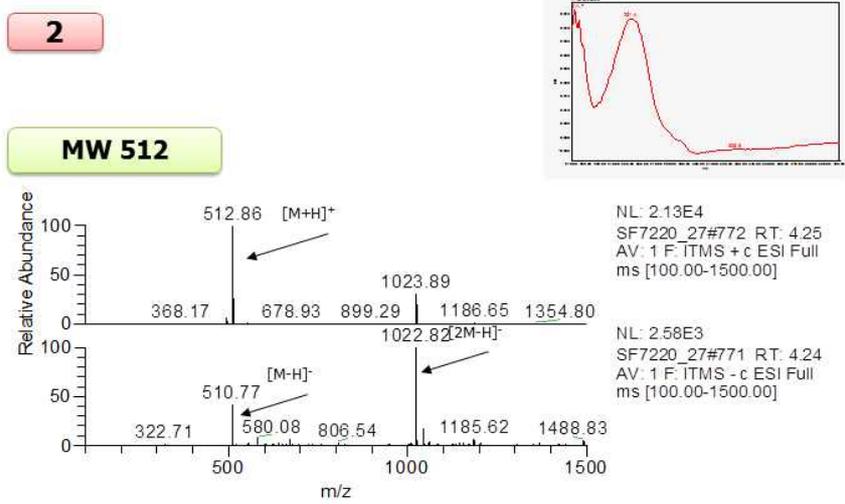


그림 30. Peak (2)의 UV, MS 분석 결과

High Resolution MS
ES (-) mode
 < 5 ppm

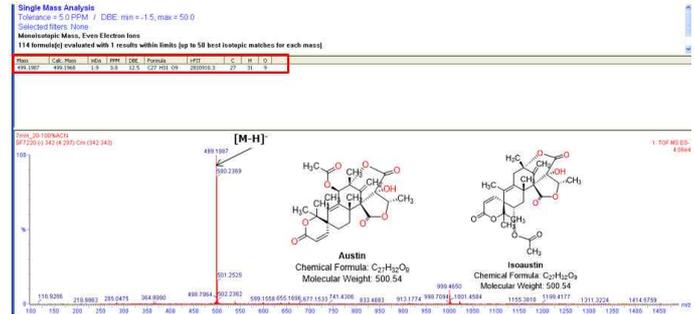


그림 31. Peak (2)의 예측 화합물

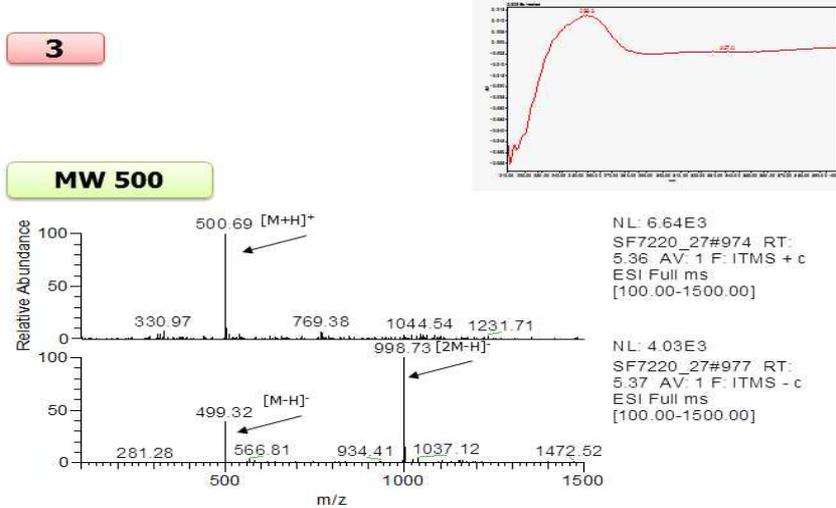


그림 32. Peak (3)의 UV, MS 분석 결과

High Resolution MS
ES (-) mode
< 5 ppm

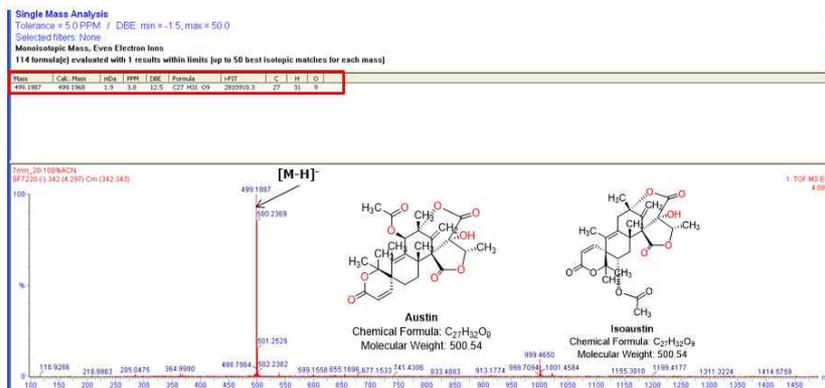


그림 33. Peak (3)의 예측 화합물

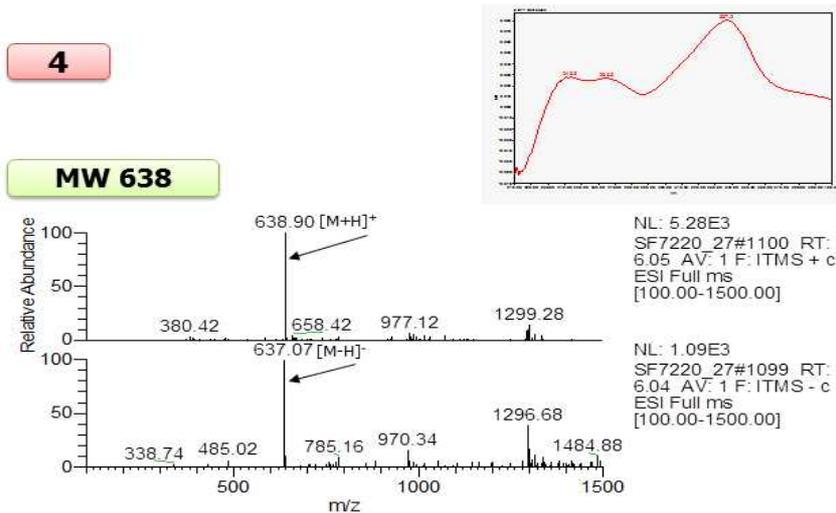


그림 34. Peak (4)의 UV, MS 분석 결과

5

MW 638

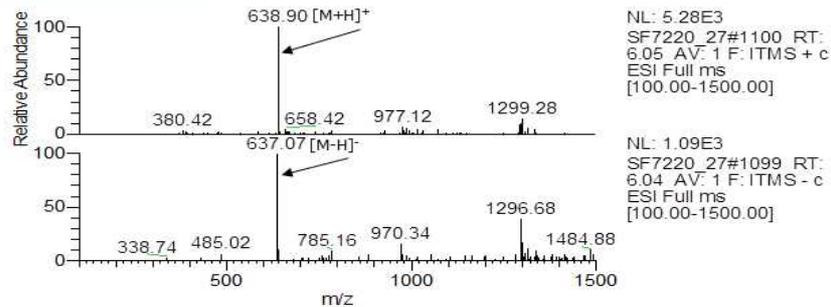


그림 35. Peak (5)의 UV, MS 분석 결과

High Resolution MS
ES (-) mode
< 5 ppm

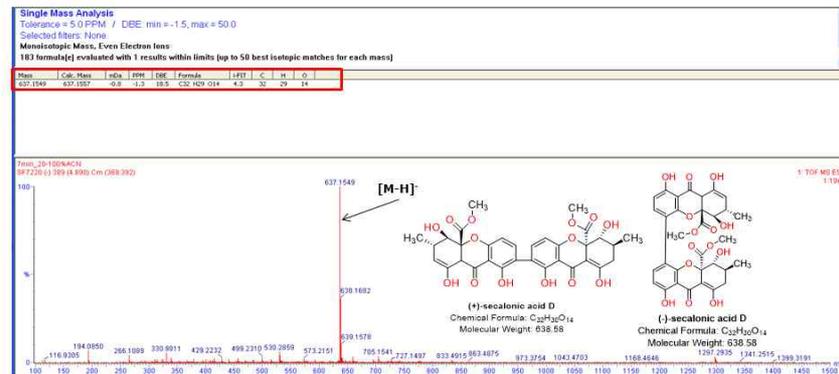


그림 36. Peak (4), (5) 및 예측 화합물

나. 해당 분자량과 UV 패턴을 *Penicillium*속 위주로 문헌을 검색한 결과, peak (1)은 8,9-dehydroneoxaline, peak (2)는 haenamindole로, peak (3)은 austin, iso-austin 중 하나로 예측되었고, peak(4)와 peak (5)는 (+)-secalonic acid D 또는 (-)-secalonic acid D로 예상됨.

3. SF7228 추출물의 대사체 분석, 구조 연구 및 DB 구축 (1차년도)

가. SF7228 추출물의 대사체 분석에서 나타난 5개의 특징적인 peak에 대해 이에 대해 MS 및 UV spectrum을 분석하여 Reaxys, SciFinder와 같은 문헌 검색 database를 이용한 de-replication을 시행하고 HR/MS 분석으로 molecular formula를 예측함.

나. SF7228 추출물의 5개의 peak의 MS와 HR/MS 분석 결과, Peak (1)은 정확한

분자량을 찾지 못하였고, peak (2)는 분자량 382, $C_{23}H_{26}O_5$ 로, peak (3)은 424, $C_{25}H_{28}O_6$ 로, peak (4)는 438, peak (5)는 530, $C_{29}H_{30}N_4O_6$ 로 분석됨.

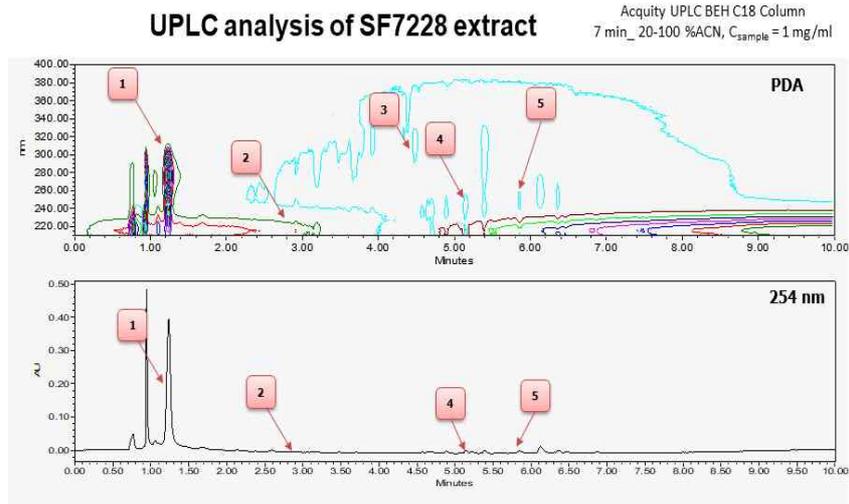


그림 37. SF7228 추출물 UPLC 분석 결과

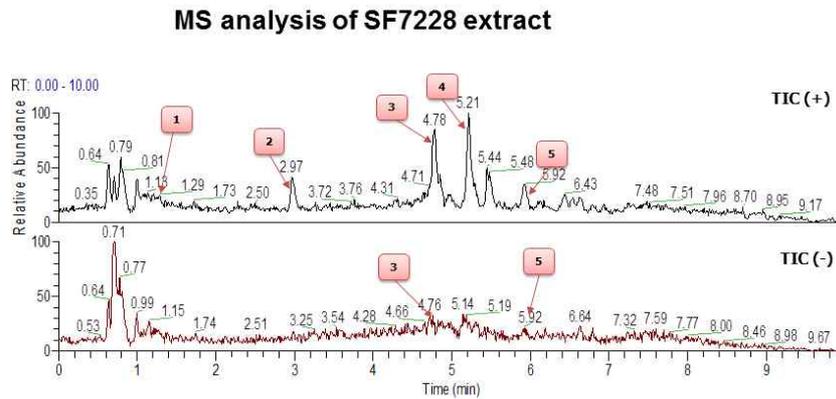


그림 38. SF7228 추출물 MS 분석 결과

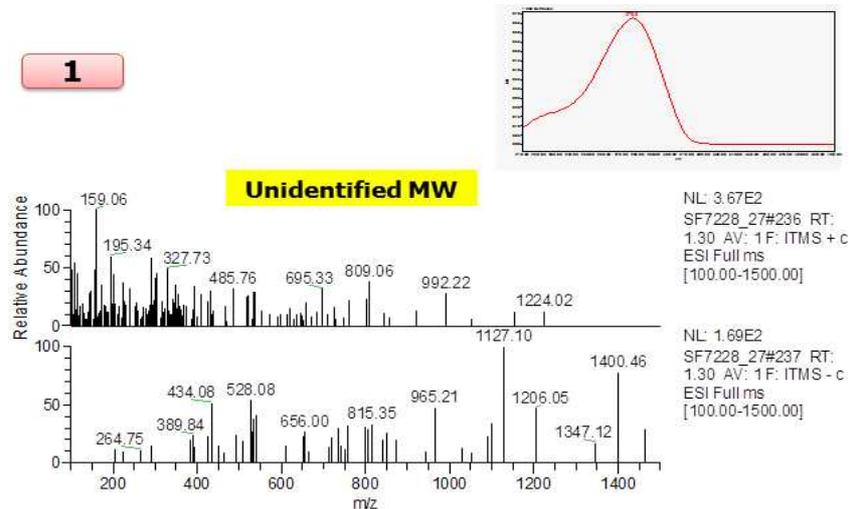


그림 39. Peak (1)의 UV, MS 분석 결과

2

MW 382

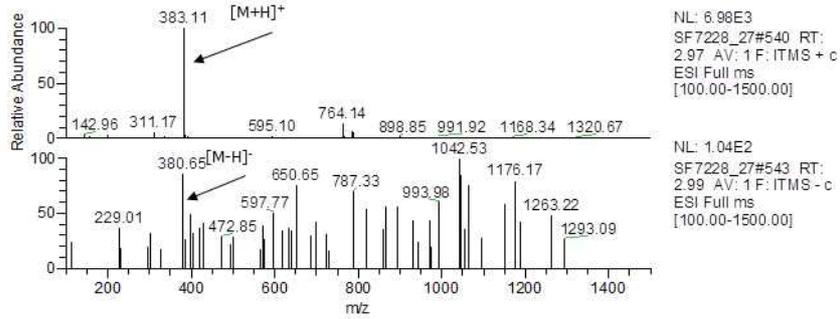
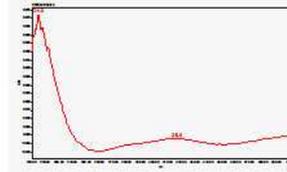


그림 40. Peak (2)의 UV, MS 분석 결과

High Resolution MS
ES (+) mode
< 5 ppm

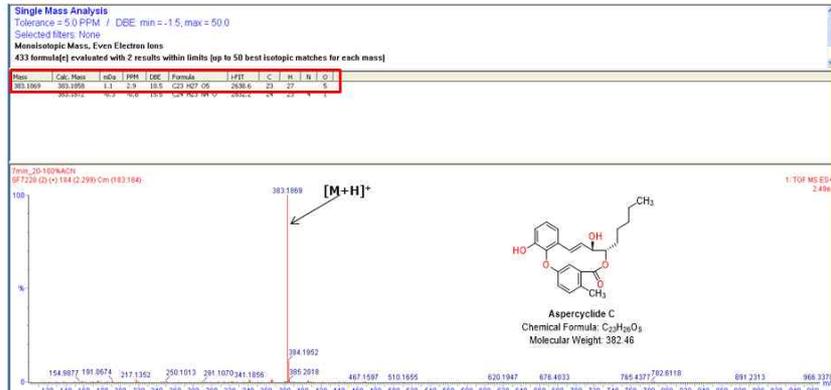


그림 41. Peak (2)의 예측 화합물

3

MW 424

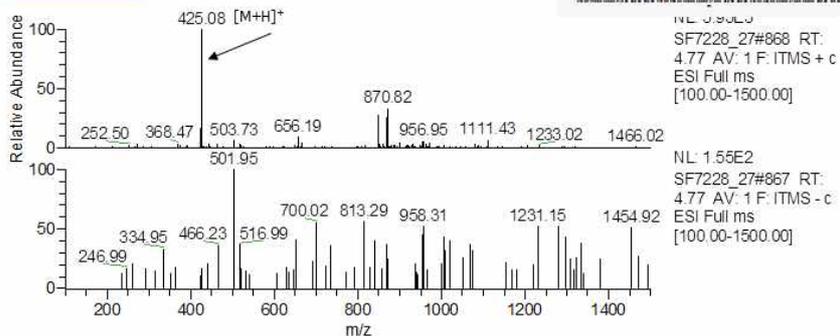
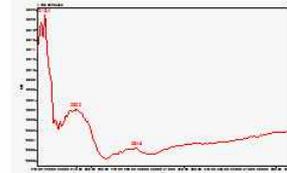


그림 42. Peak (3)의 UV, MS 분석 결과

High Resolution MS
ES (+) mode
 < 5 ppm

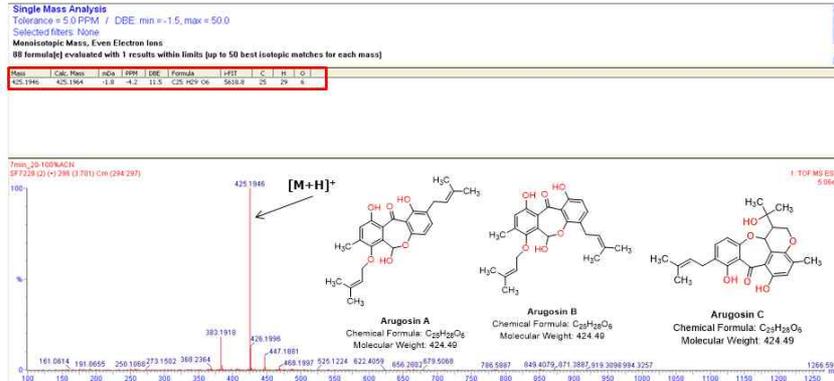


그림 43. Peak (3)의 예측 화합물

4

MW 438

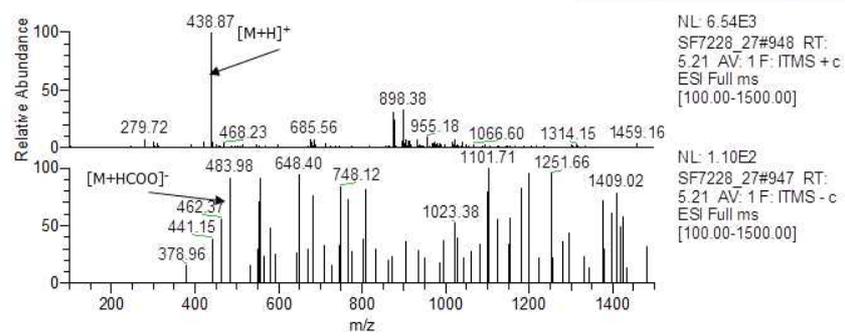
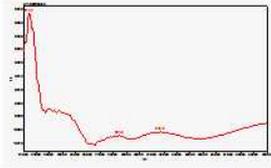


그림 44. Peak (4)의 UV, MS 분석 결과

High Resolution MS
ES (+) mode
 < 5 ppm

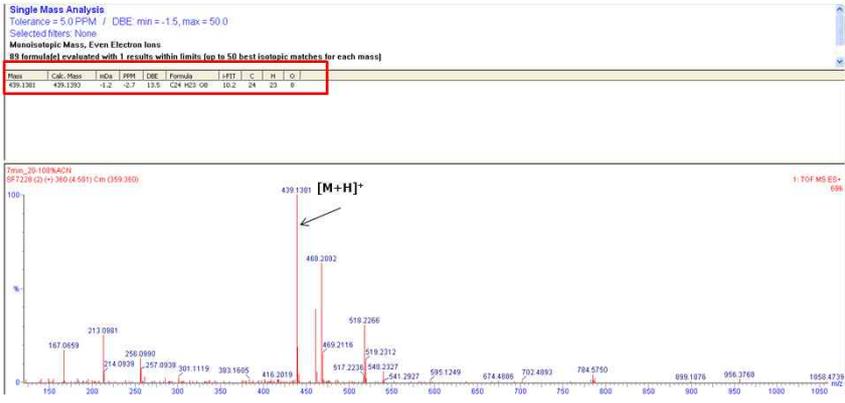


그림 45. Peak (4)의 예측 화합물

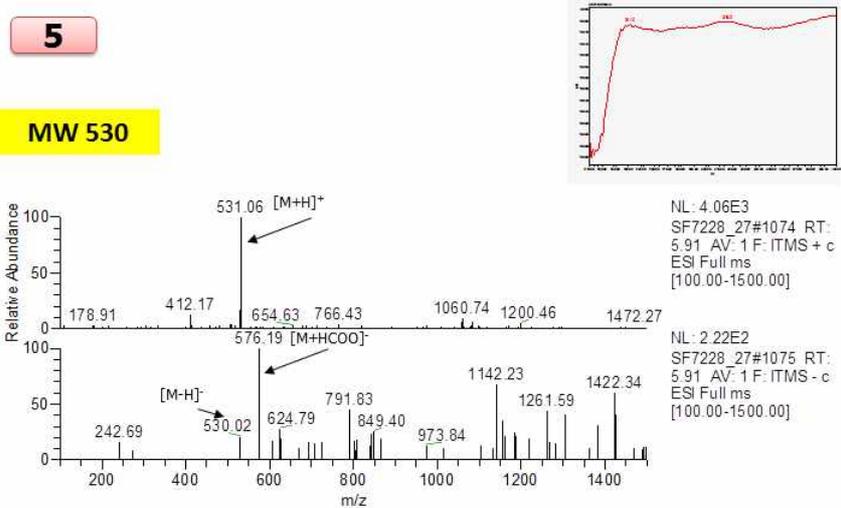


그림 46. Peak (5)의 UV, MS 분석 결과

High Resolution MS
ES (+) mode
< 5 ppm

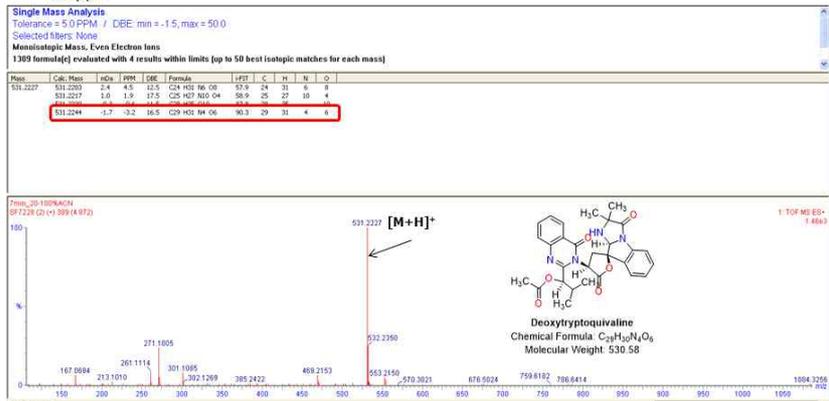


그림 47. Peak (5)의 예측 화합물

다. 해당 분자량과 UV 패턴을 *Aspergillus*속 위주로 문헌을 검색한 결과, peak (1) 정확한 분자량을 찾지 못하였고, peak (2)은 aspercyclide C로, peak (3)은 arugosin A, arugosin B, arugosin C 중 하나로 예측되었고, peak (4)는 기존 문헌에서 분자량과 UV 패턴을 만족하는 화합물 찾지 못하였음.

4. SF7232 추출물의 대사체 분석 및 구조연구 (1차년도)

가. SF7232 추출물의 대사체 분석에서 나타난 1개의 특징적인 peak에 대해 MS 및 UV spectrum을 분석하였음.

나. SF7232 추출물의 1개의 특징적인 peak에 대해 MS 및 UV spectrum을 분석하였으나 정확한 분자량을 찾지 못하여 HR/MS 분석은 시행하지 않음. MS spectrum에 근거하여 분자량을 866 또는 1182로 예상함.

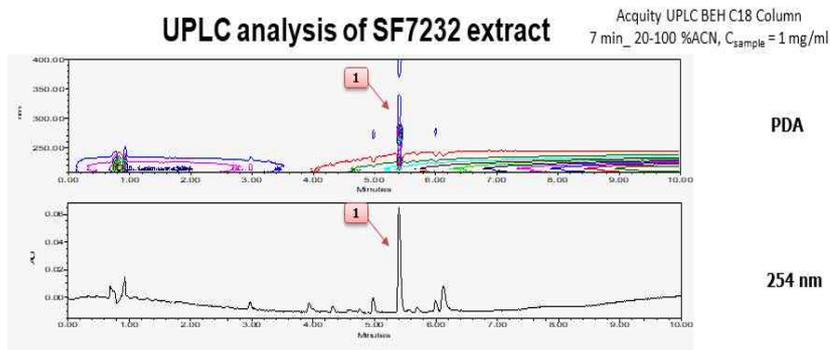


그림 48. SF7232 추출물 UPLC 분석 결과

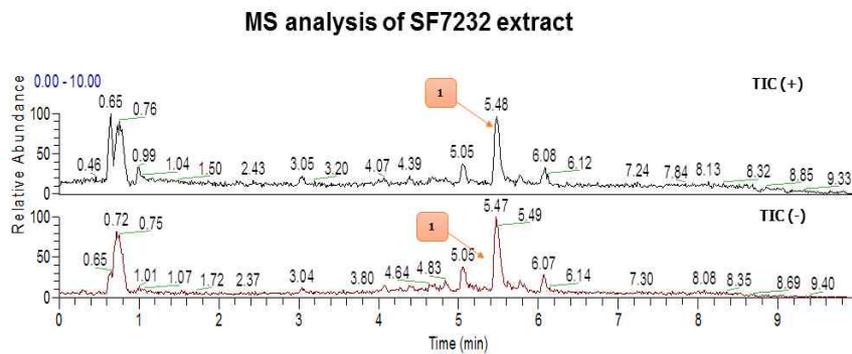


그림 49. SF7232 추출물 MS 분석 결과

다. 예상되는 두 분자량과 UV 패턴으로 Reaxys, SciFinder와 같은 문헌 검색 database를 이용한 de-replication을 시행하였으나 기존 문헌에서 이를 만족하는 화합물을 찾을 수 없었음.

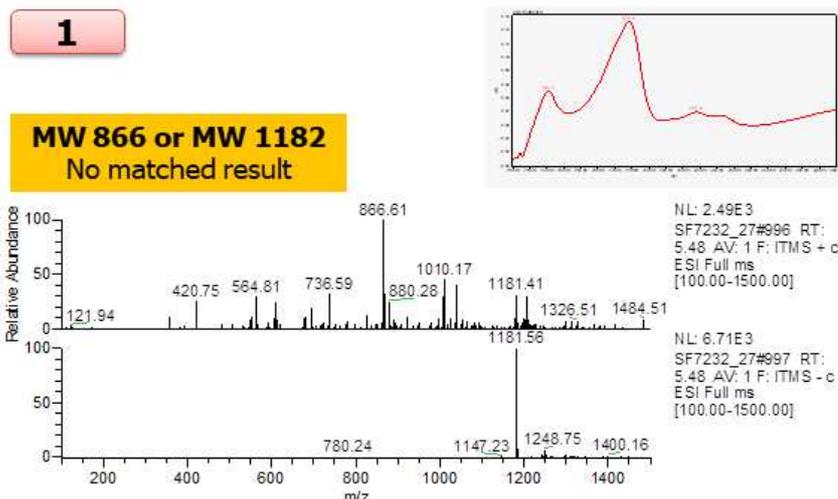


그림 50. Peak (1)의 UV, MS 분석 결과

5. F7266 추출물의 대사체 분석 및 DB 구축 (1차년도)

가. SF7266 추출물의 대사체 분석에서 나타난 4개의 특징적인 peak에 대해 이에 대해 MS 및 UV spectrum을 분석하여 Reaxys, SciFinder와 같은 문헌 검색 database를 이용한 de-replication을 시행하고 HR/MS 분석으로 molecular formula를 예측함.

나. SF7266 추출물의 4개의 peak의 MS 분석 결과, Peak (1)은 정확한 분자량을 찾지 못하였고, peak (2)는 분자량 308, peak (3)은 322, peak (4)는 242로 분석함.

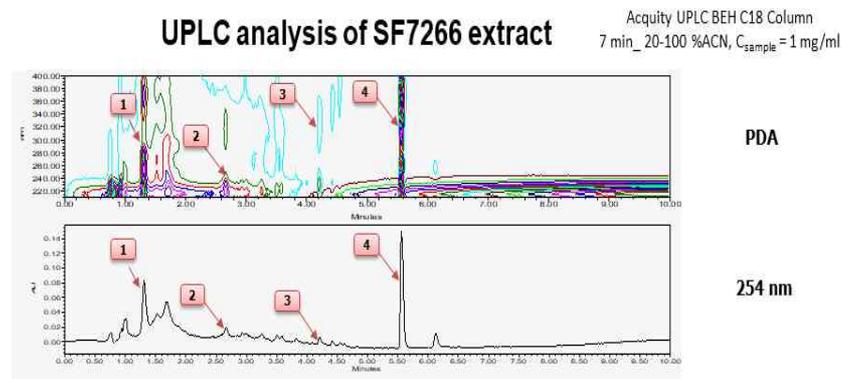


그림 51. SF7266 추출물 UPLC 분석 결과

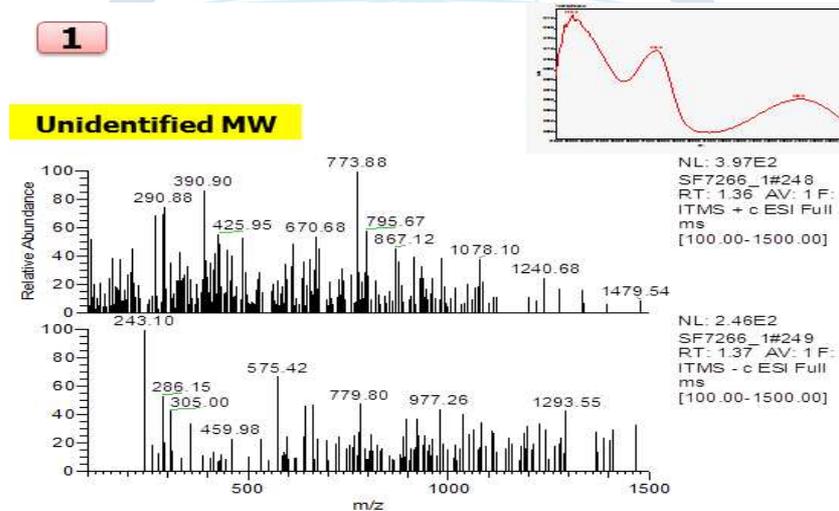
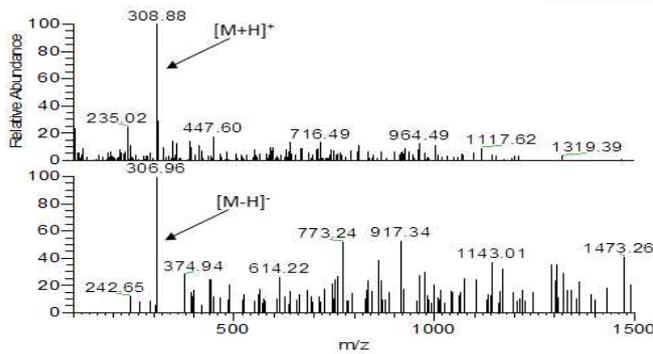
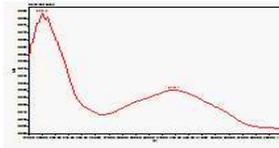


그림 52. Peak (1)의 UV, MS 분석 결과

2

MW 308
No matched result



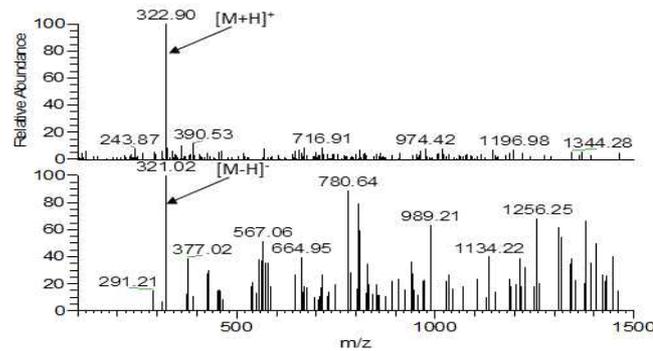
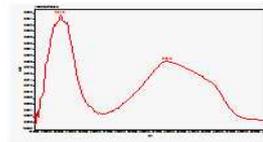
NL: 1.62E3
SF7266_1#494
RT: 2.72 AV: 1 F:
ITMS + c ESI Full
ms
[100.00-1500.00]

NL: 2.76E2
SF7266_1#495
RT: 2.72 AV: 1 F:
ITMS - c ESI Full
ms
[100.00-1500.00]

그림 53. Peak (2)의 UV, MS 분석 결과 및 예측 화합물

3

MW 322
No matched result



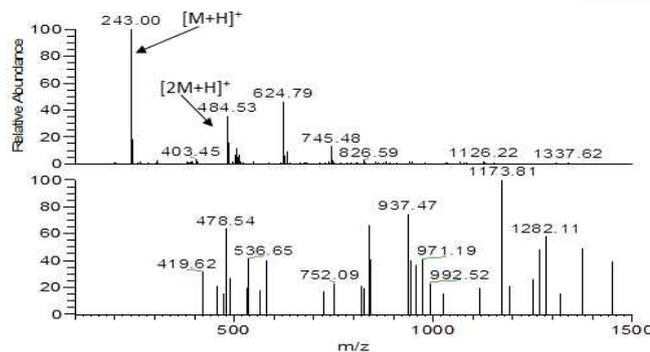
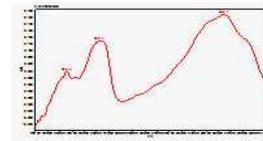
NL: 2.43E3
SF7266_1#778
RT: 4.28 AV: 1 F:
ITMS + c ESI Full
ms
[100.00-1500.00]

NL: 1.75E2
SF7266_1#777
RT: 4.27 AV: 1 F:
ITMS - c ESI Full
ms
[100.00-1500.00]

그림 54. Peak (3)의 UV, MS 분석 결과 및 예측 화합물

4

MW 242
No matched result



NL: 1.14E4
SF7266_1#1022
RT: 5.62 AV: 1 T:
ITMS + c ESI Full
ms
[100.00-1500.00]

NL: 1.06E2
SF7266_1#1023
RT: 5.63 AV: 1 F:
ITMS - c ESI Full
ms
[100.00-1500.00]

그림 55. Peak (4)의 UV, MS 분석 결과 및 예측 화합물

다. 해당 분자량과 UV 패턴을 *Sporothrix*속 위주로 문헌을 검색한 결과, peak (1), (2), (3), (4)는 기존 문헌에서 분자량과 UV 패턴을 만족하는 화합물 찾을 수 없었음.

6. SF7277 추출물의 대사체 분석 및 구조연구 (1차년도)

가. SF7266 추출물의 대사체 분석에서 나타난 4개의 특징적인 peak에 대해 이에 대해 MS 및 UV spectrum을 분석하여 Reaxys, SciFinder와 같은 문헌 검색 database를 이용한 de-replication을 시행하고 HR/MS 분석으로 molecular formula를 예측함.

나. SF7277 추출물의 4개의 peak의 MS 분석 결과, Peak (2)와 (4)는 정확한 분자량을 찾지 못하였으며, peak (1)은 분자량 408, peak (3)은 651로 예측함.

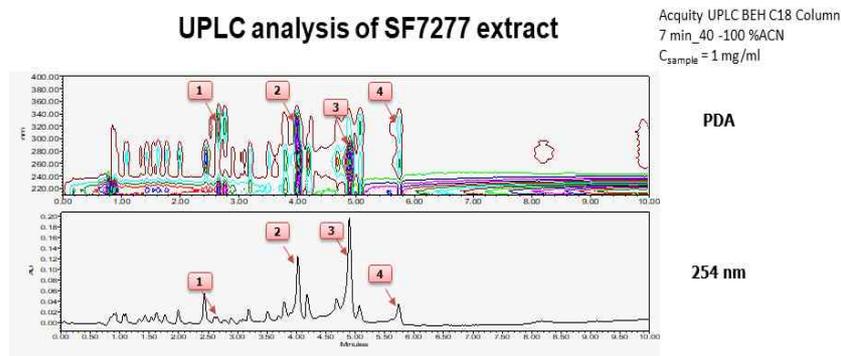


그림 56. SF7277 추출물 UPLC 분석결과

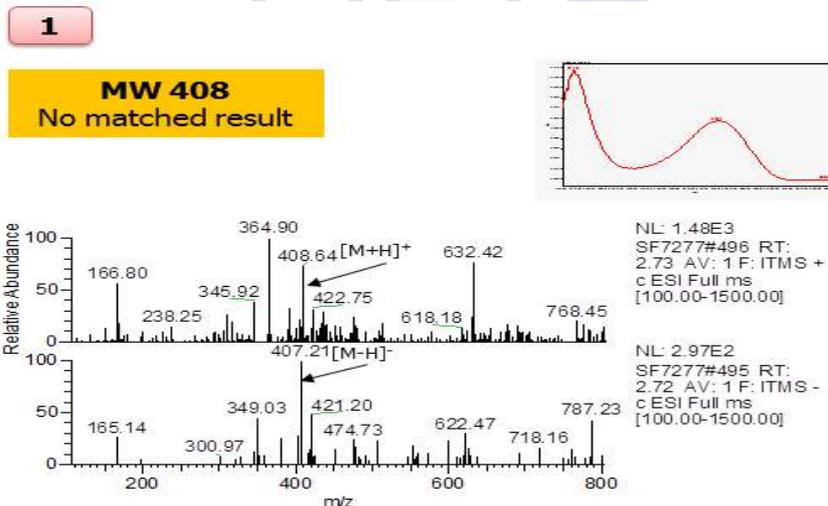


그림 57. Peak (1)의 UV, MS 분석 결과

2

Unidentified MW

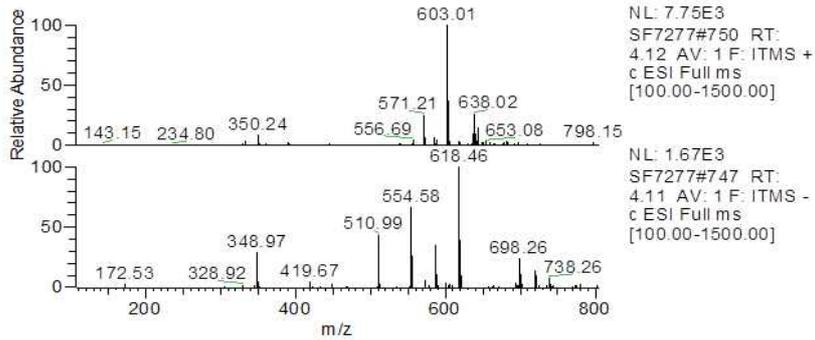
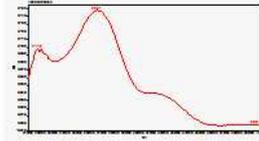


그림 58. Peak (2)의 UV, MS 분석 결과

3

**MW 651
No matched result**

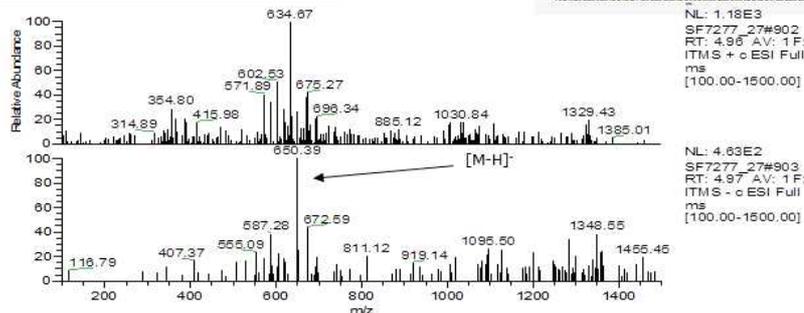
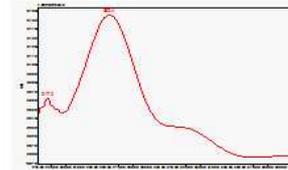


그림 59. Peak (3)의 UV, MS 분석 결과

4

Unidentified MW

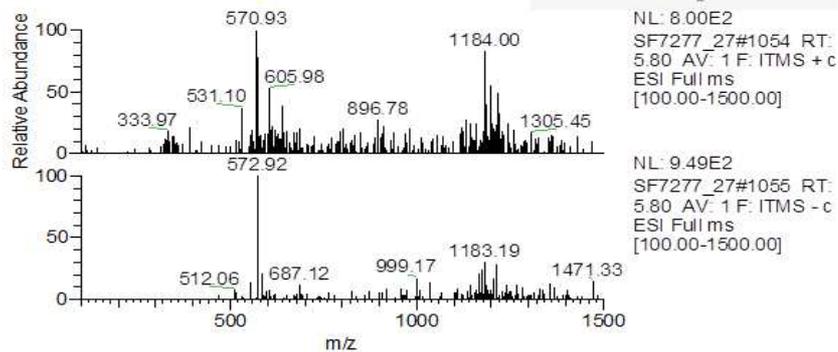
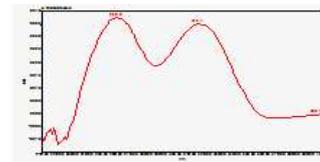


그림 60. Peak (4)의 UV, MS 분석 결과

다. 해당 분자량과 UV 패턴으로 문헌에서 검색한 결과, peak (1), (2), (3), (4)는

모두 기존 문헌에서 분자량과 UV 패턴을 만족하는 화합물을 찾을 수 없었음.

라. 총 6종의 극지 미생물 에 대한 대사체 분석과 문헌 DB를 이용한 de-replication 시행 결과, 신규 대사산물 발견 가능성이 높은 SF7071, SF7232, SF7266, SF7277를 유용 극지미생물로 선정하였음.

마. 유용 물질 분리를 위한 대량배양을 진행하였으며, 추출물 내 대사체 분리 및 구조 연구 진행 중.

7. 유용 극지미생물 선정

가. 신규 물질 발견 가능성이 높은 group 2를 대상으로 UPLC-MS/ELSD 분석을 수행함. ELSD 상에서 특징적인 peak이 나타난 5종의 균주(SF7307, SF7313, SF7386, S7391, SF7410)를 선정함.

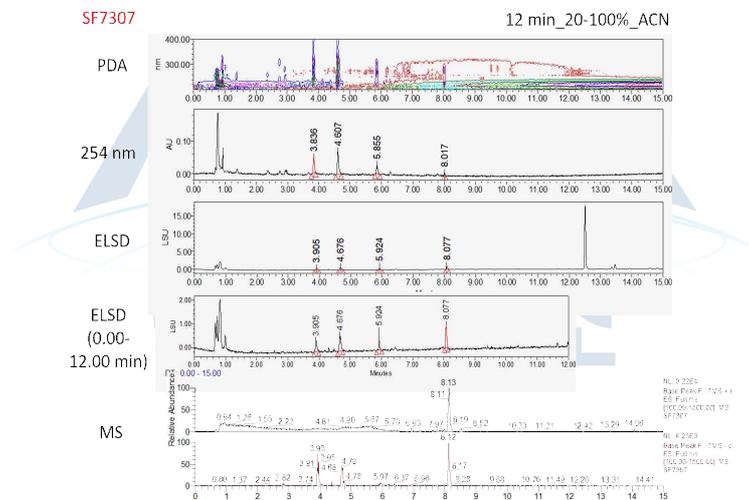


그림 61. SF7307 추출물의 UPLC-MS/ELSD 분석 결과

SF7313

12 min_20-100%_ACN

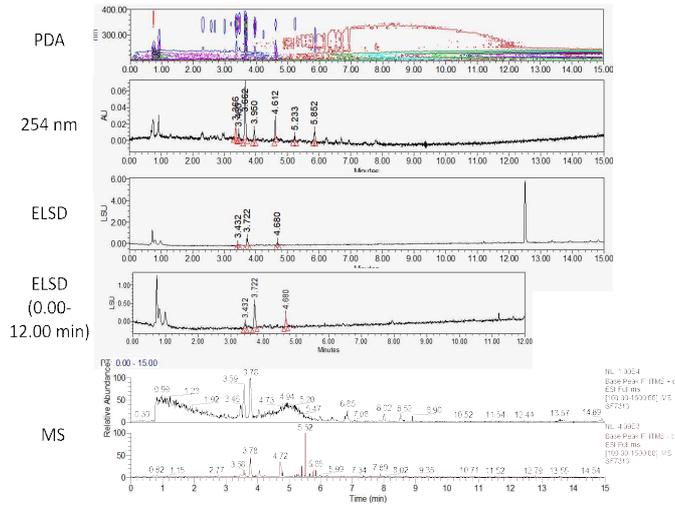


그림 62. SF7313 추출물의 UPLC-MS/ELSD 분석 결과

SF7386

12 min_20-100%_ACN

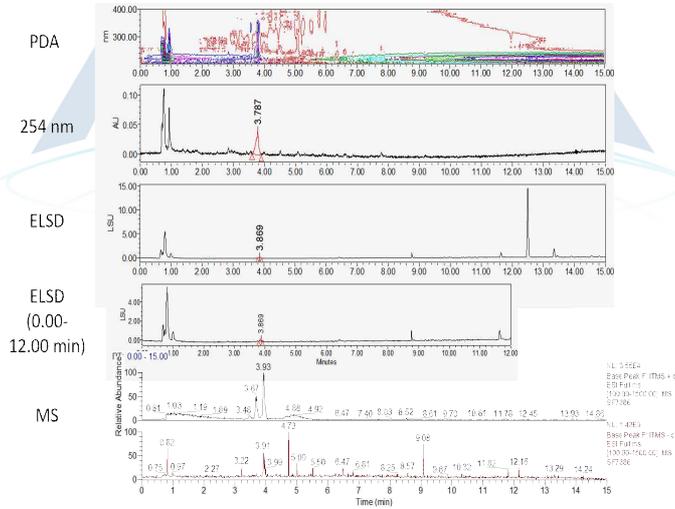


그림 63. SF7386 추출물의 UPLC-MS/ELSD 분석 결과

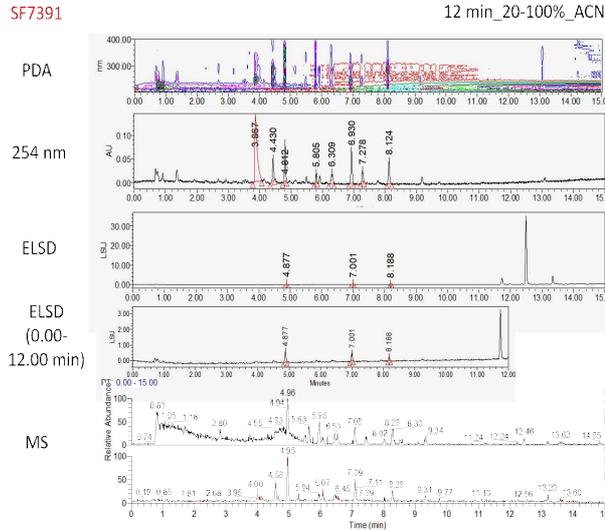


그림 64. SF7391 추출물의 UPLC-MS/ELSD 분석 결과

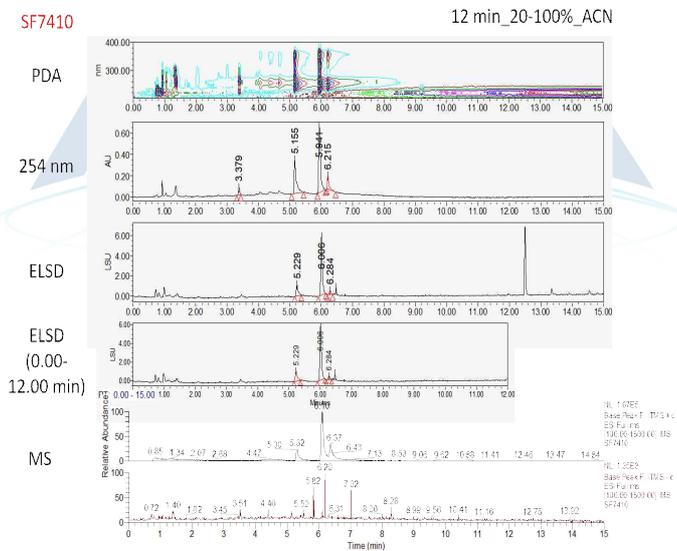


그림 65. SF7410 추출물의 UPLC-MS/ELSD 분석 결과

8. 선정된 극지미생물 수령 및 배양

가 신라대학교 손재학 교수님으로부터 5종의 극지미생물(SF7307, SF7313, SF7386, SF7391 및 SF7410)을 수령함.

나. 대사 물질 분석을 위해 3% NaCl 해수조건의 potato dextrose agar (PDA) 배지에 25°C 조건에서 정체 배양함.

다. 배양된 극지 미생물을 MeOH를 이용하여 추출하고 여과 후 농축함. 이를 다시 증류수에 현탁시킨 후 같은 양의 EtOAc로 용매 분획을 실시하여 EtOAc 추출물을 얻음. (해당 추출물들과 de-replication 과정 분석한 추출물간의 대사체 비교분석)



그림 66. SF7307, PDA-seasalt 배지, 25°C, 22일 배양



그림 67. SF7313, PDA-seasalt 배지, 25°C, 14일 배양



그림 68. SF7386, PDA-seasalt 배지, 25°C, 14일 배양



그림 69. SF7391, PDA-seasalt 배지, 25°C, 22일 배양



그림 70. SF7410, PDA-seasalt 배지, 25°C, 22일 배양

9. 선정된 극지미생물 대사체 분석

가. 5종의 추출물(SF7307, SF7313, SF7386, SF7391 및 SF7410)을 대상으로 UPLC-MS/ELSD를 이용하여 분석함. 분석 결과를 바탕으로 chemical DB와 molecular networking 기반 de-replication을 수행함.

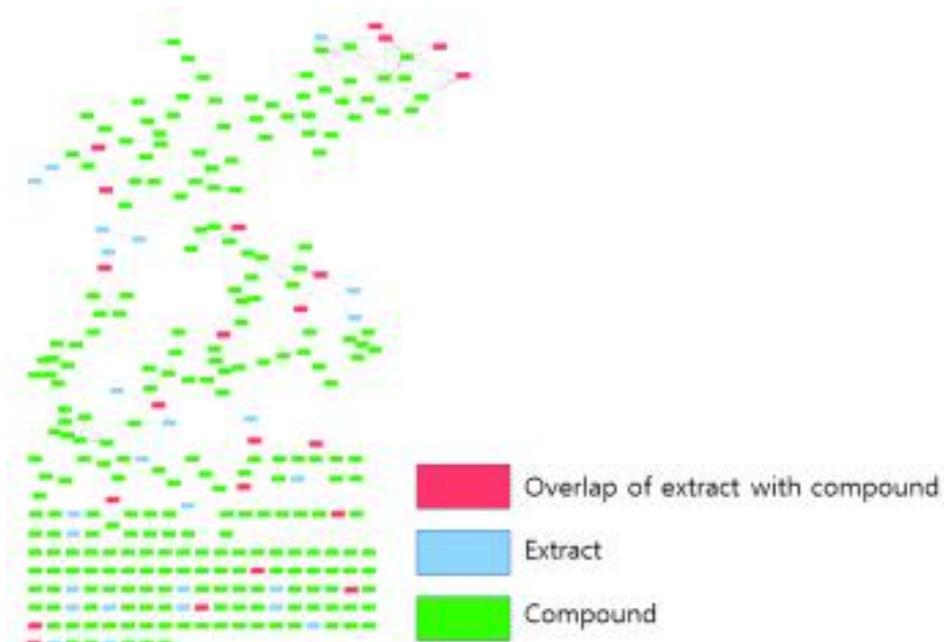


그림 71. 극지미생물 추출물 5종과 천연물 유래 화합물 144종의 molecular networking 결과

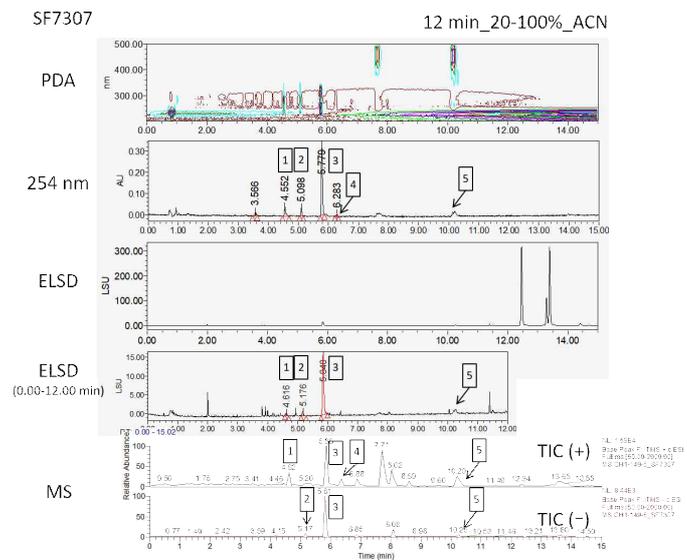


그림 72. SF7307 추출물의 UPLC-MS/ELSD 분석 결과



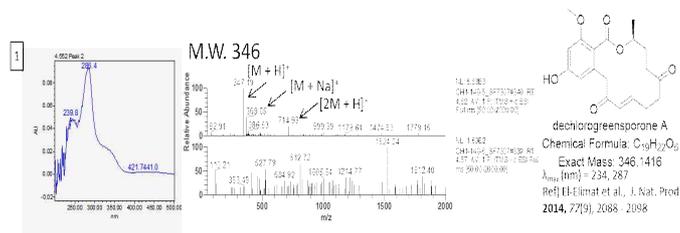


그림 73. Peak 1의 UV, MS 분석 결과 및 예측화합물

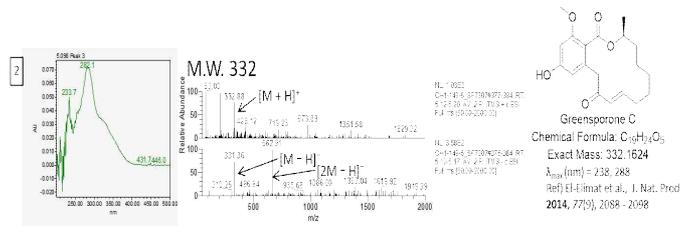


그림 74. Peak 2의 UV, MS 분석 결과 및 예측화합물

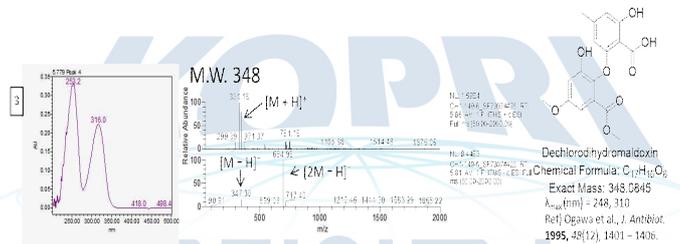


그림 75. Peak 3의 UV, MS 분석 결과 및 예측화합물

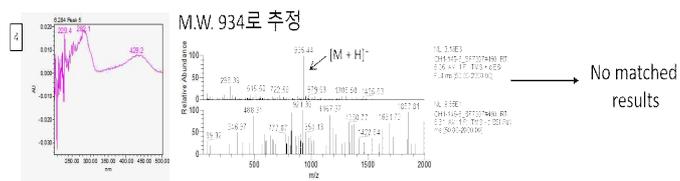


그림 76. Peak 4의 UV, MS 분석 결과 및 예측화합물

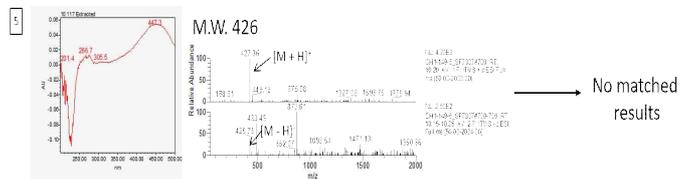
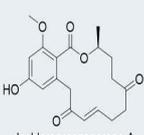
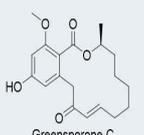
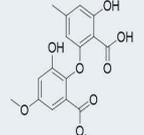


그림 77. Peak 5의 UV, MS 분석 결과 및 예측화합물

해당 분자량과 UV 패턴의 대사체를 chemical DB 상에서 검색한 결과, 아래와 같이 예측되었다.

(1)	(2)	(3)	(4) and (5)
 <p>dechlorogreosporone A Chemical Formula: C₁₉H₂₂O₆ Exact Mass: 346.1416</p>	 <p>Greosporone C Chemical Formula: C₁₉H₂₄O₅ Exact Mass: 332.1624</p>	 <p>Dechlorodihydromaldoxin Chemical Formula: C₁₇H₁₆O₈ Exact Mass: 348.0845</p>	No matched results

나. SF7313 추출물의 LC-MS 분석 결과, UV와 MS상에서 특징적인 peak이 나타나지 않음.

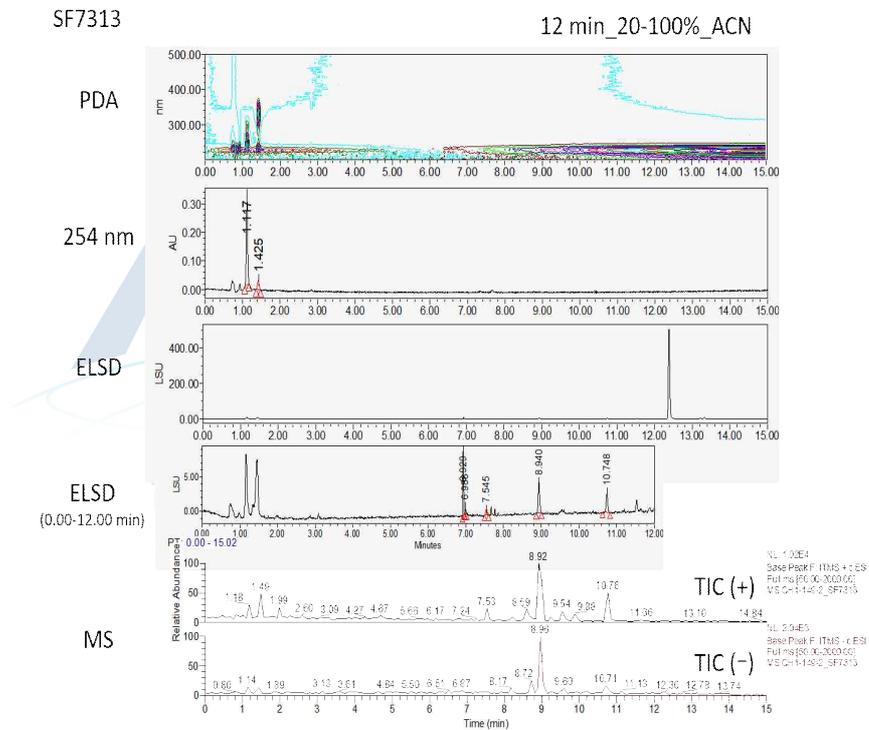


그림 78. SF7313 추출물의 UPLC-MS/ELSD 분석 결과

SF7386

12 min_20-100%_ACN

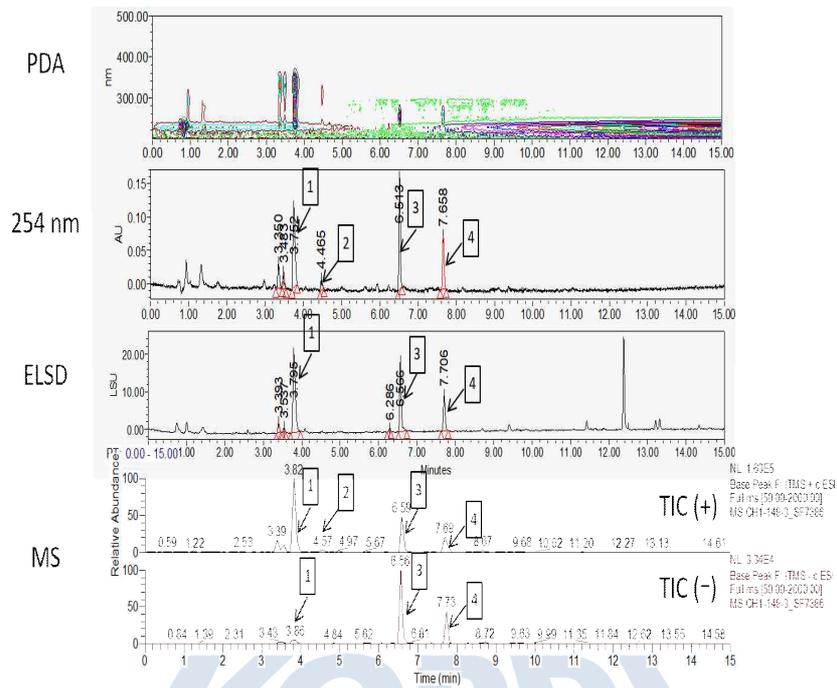


그림 79. SF7386 추출물의 UPLC-MS/ELSD 분석 결과

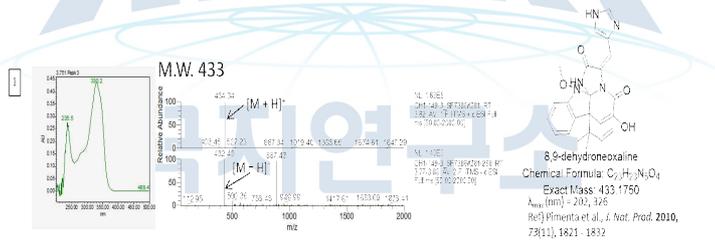


그림 80. Peak 1의 UV, MS 분석 결과 및 예측화합물

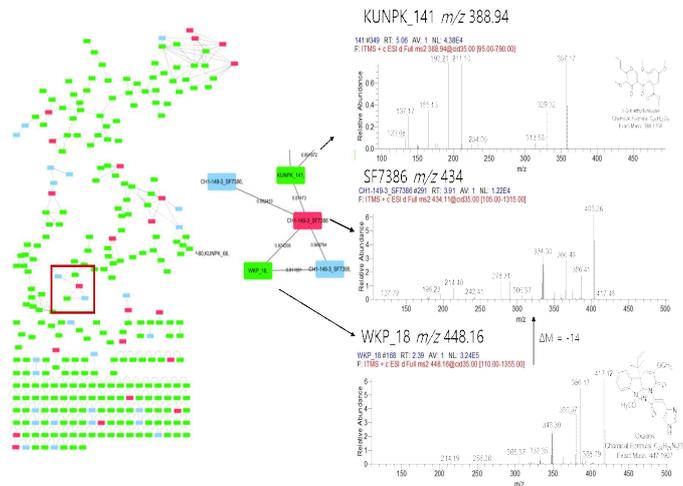


그림 81. Peak 1, KUNPK_141와 WKP_18의 cluster 및 각 ion의 tandem mass spectrum.

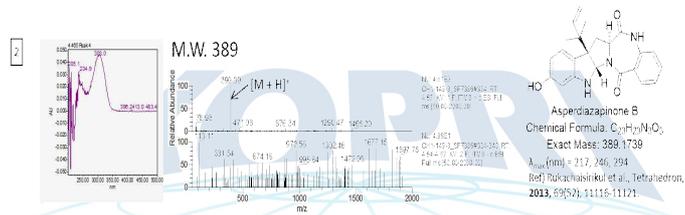
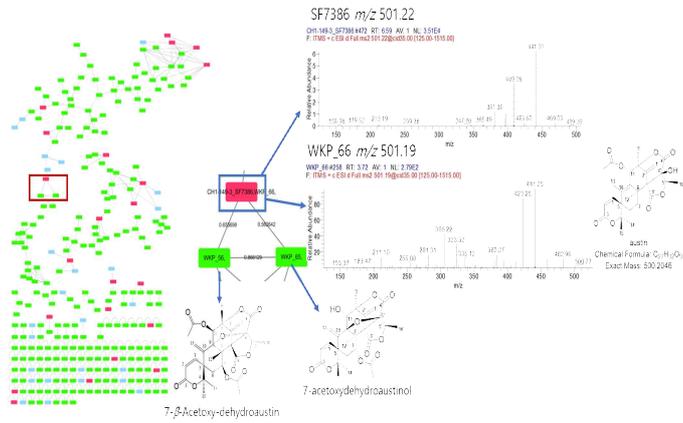


그림 82. Peak 2의 UV, MS 분석 결과 및 예측화합물



SF7391

12 min_20-100%_ACN

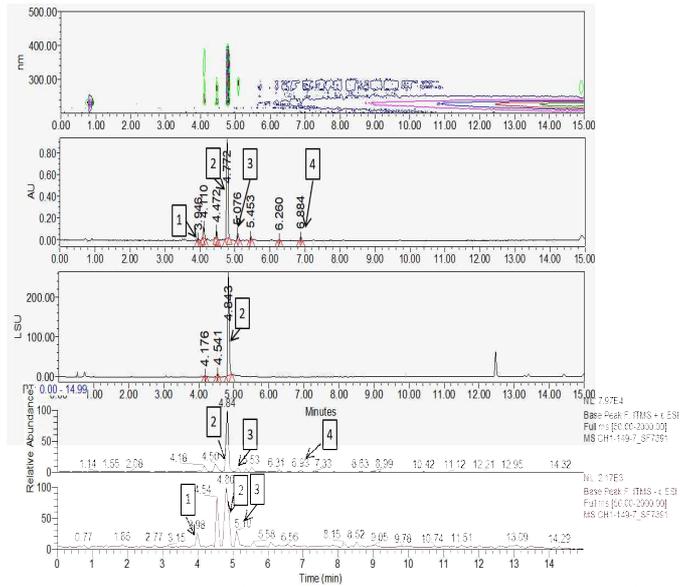


그림 88. SF7391 추출물의 UPLC-MS/ELSD 분석 결과



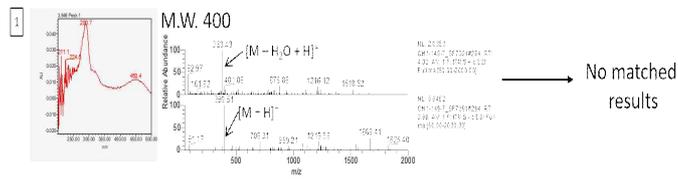


그림 89. Peak 1의 UV, MS 분석 결과

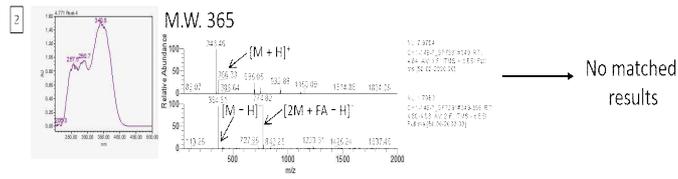


그림 90. Peak 2의 UV, MS 분석 결과

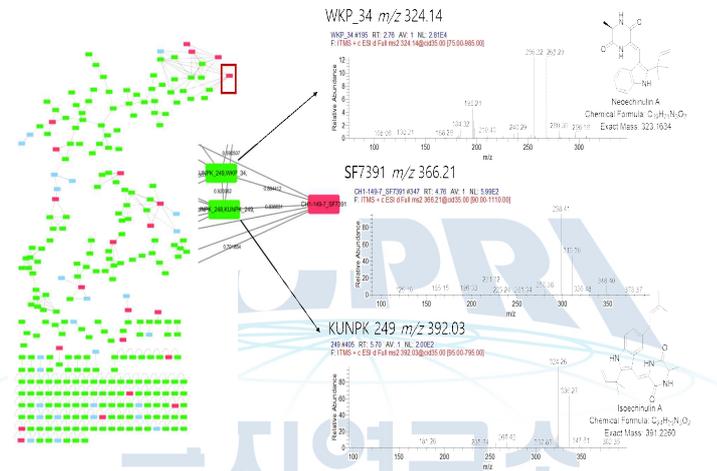


그림 91. Peak 2, WKP_34, KUNPK_249의 cluster 및 각 ion의 tandem mass spectrum.

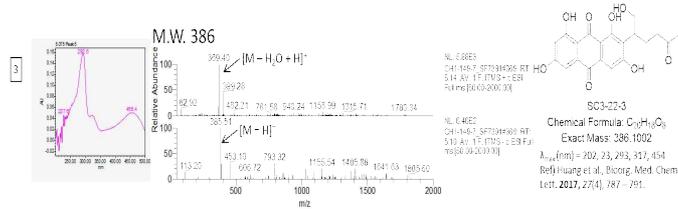


그림 92. Peak 3의 UV, MS 분석 결과 및 예측 화합물

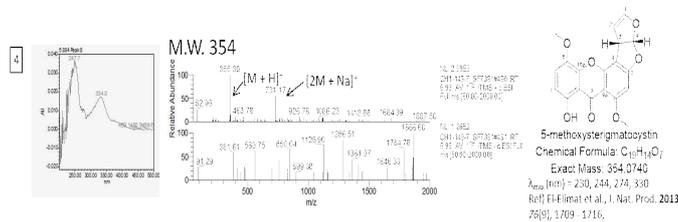


그림 93. Peak 4의 UV, MS 분석 결과 및 예측 화합물

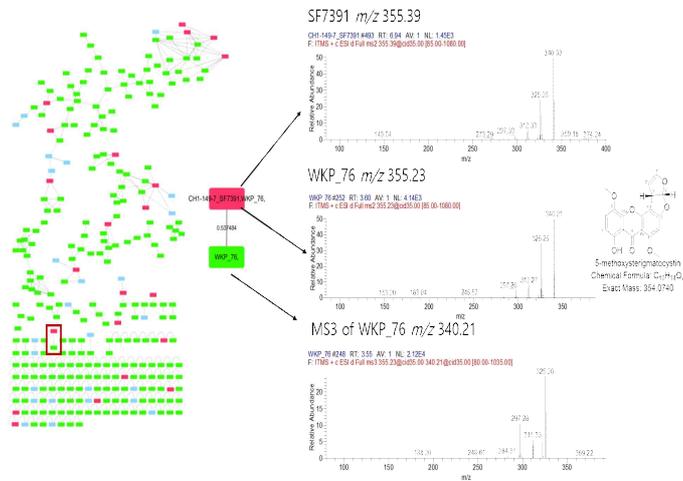


그림 94. Peak 4, WKP_76의 cluster 및 각 ion의 tandem mass spectrum.

다. 해당 분자량과 UV 패턴의 대사체를 chemical DB와 molecular networking을 이용한 결과, 아래와 같이 예측되었다. Peak 2의 경우 chemical DB 상에서 일치하는 화합물을 찾을 수 없었으나 molecular networking 결과를 바탕으로 echinulin 과 유사한 diketopiperazine 계열의 물질로 추정하였다.

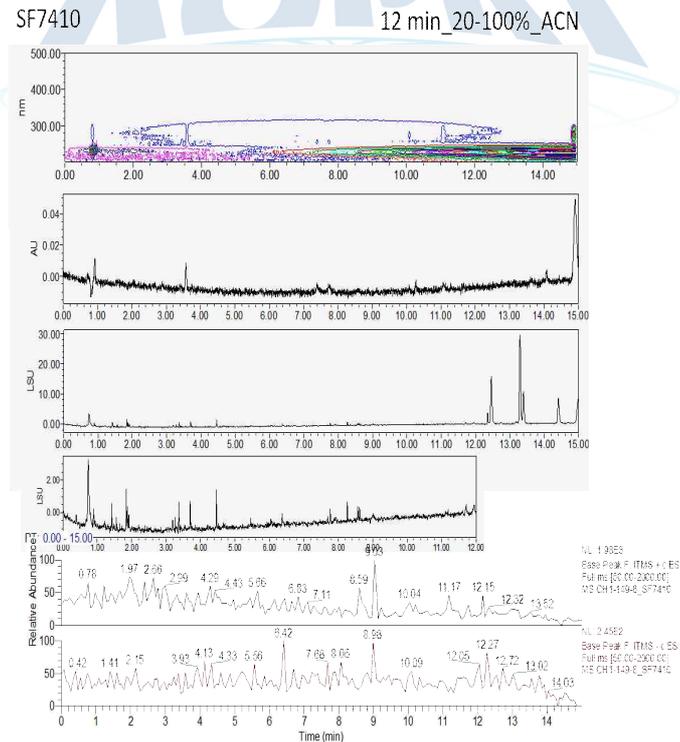


그림 95. SF7410 추출물의 UPLC-MS/ELSD 분석 결과

10. 6종의 추출물을 대상으로 UPLC-MS/ELSD를 이용하여 분석함. 분석 결과를 바탕으로 chemical DB와 molecular networking 기반 de-replication을 수행함. (3차년

도)

- 균주명 : *Calycina alstrupii* (new lichenicolous fungus from Norway, 2017)
- 자낭균문 주발버섯아문 두건버섯강 살갓버섯목

	Scifinder	Reaxys
<i>Calycina alstrupii</i>	0	0
<i>Calycina</i> sp.	0	0

- Antifungal effect (대상 균주 : *Candida albicans*)
- IC₅₀ : 228.34±128.06 (µg/mL)

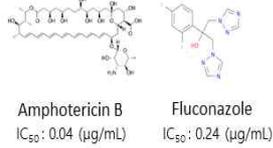


그림 96. ANT-40-6 균주의 선행연구 결과

ANT-40-6 (*Calycina alstrupii*)

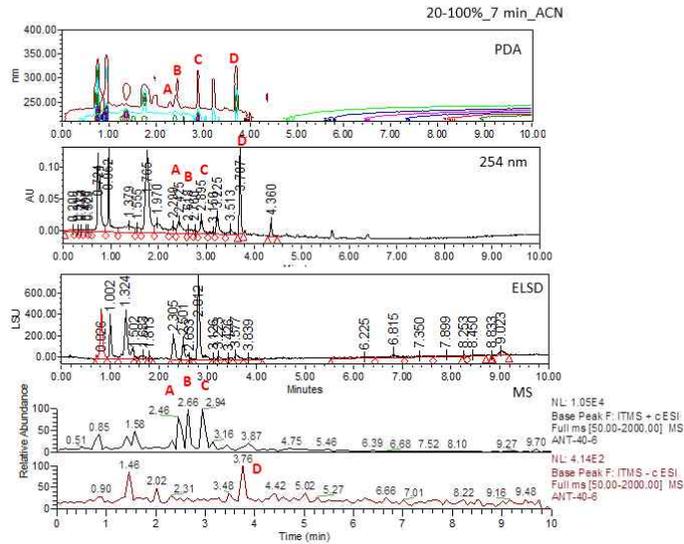


그림 97. ANT-40-6 추출물의 UPLC-MS/ELSD 분석 결과

가. 분석 결과를 기반으로 총 4개의 특징적인 peak을 선정하였고, 각 peak들의 해당 분자량과 UV 패턴을 chemical DB상에서 검색하여 아래와 같은 결과를 얻음. Peak A와 B는 cyclo(L-Pro-L-Leu), peak C는 Pandangolide 1, peak D는 Daidzein으로 예상, 해당 추출물의 활성과 4개의 물질들에 대해 보고된 활성과 차이를 보임, 추출물 내에 미량 성분 또는 검출되지 않는 물질이 활성 물질로 예상됨에 따라, 분리의 우선순위에서 제외됨.

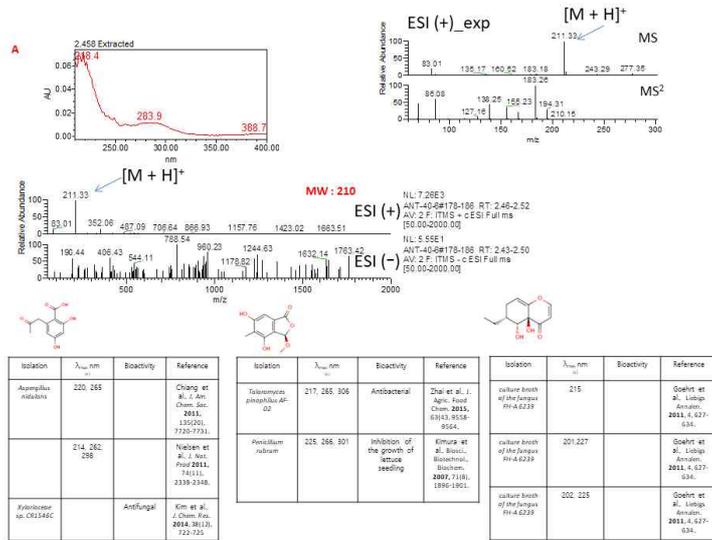


그림 98. Peak A의 UV, MS 분석 결과 및 예측화합물

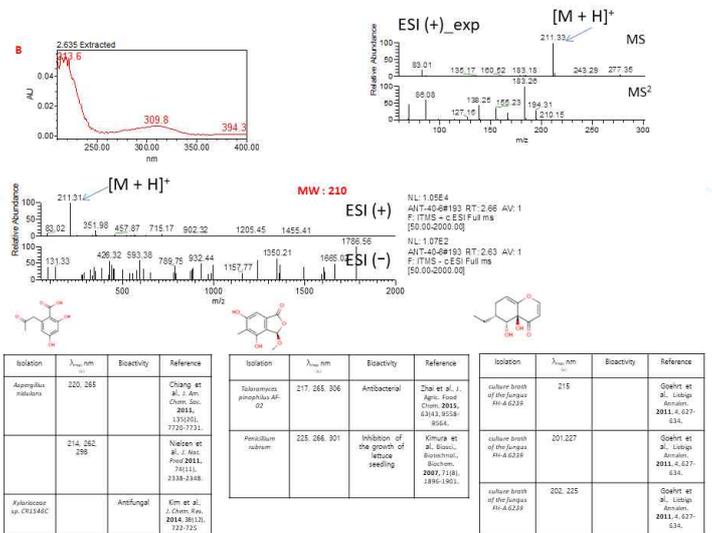


그림 99. Peak B의 UV, MS 분석 결과 및 예측화합물

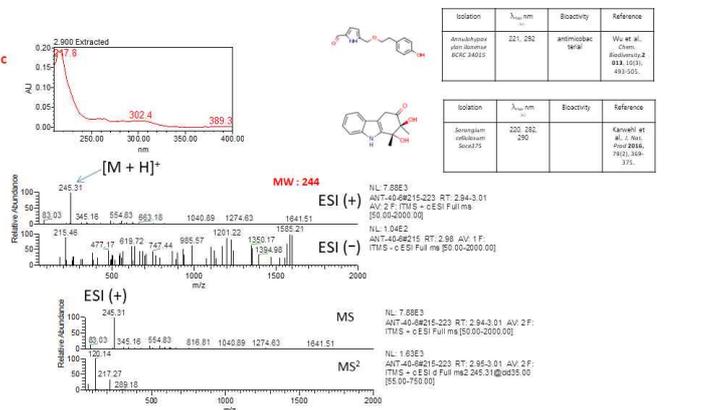


그림 100. Peak C의 UV, MS 분석 결과 및 예측화합물

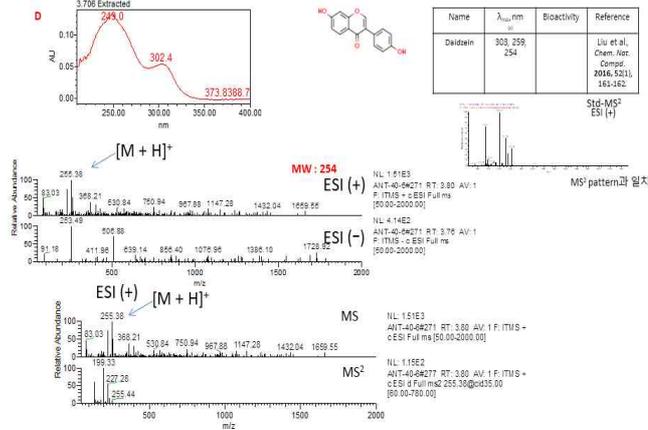


그림 101. Peak D의 UV, MS 분석 결과 및 예측화합물

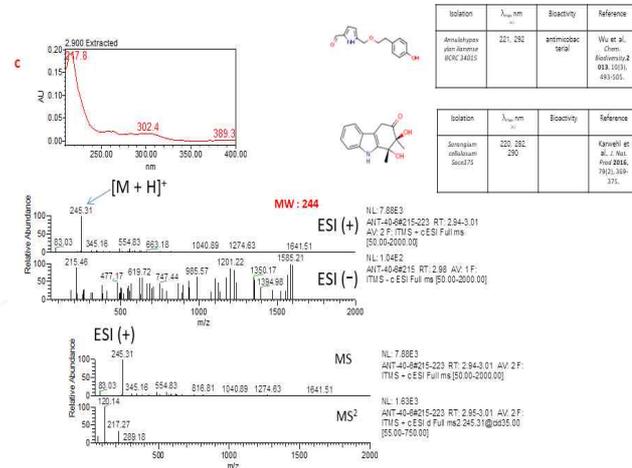


그림 102. Peak E의 UV, MS 분석 결과 및 예측화합물

	Target A	Target B	Target C	Target D
UV				
MW	210	210	244	254
Candidate		Target A와 입체구조차이		
Name	Cyclo-(L-Pro-L-Leu)		Cyclo-(L-Phe-L-Pro)	Daidzein
Candidate information	From: Marine Ascidian-Derived <i>Streptomyces</i> sp. λ_{max} (nm): 277, 329 Bioactivities: Antifungal (candida albicans), 표과 인출 Teponno et al., <i>Molecules</i> 2017, 22(10), 1674-1685. Ref: Larissa et al., <i>Mar. Drugs</i> 2018, 16(189), 1-11.		From: Marine Ascidian-Derived <i>Streptomyces</i> sp. λ_{max} (nm): 216 Bioactivities: Antifungal (candida albicans), 표과 인출 Teponno et al., <i>Molecules</i> 2017, 22(10), 1674-1685. Ref: Larissa et al., <i>Mar. Drugs</i> 2018, 16(189), 1-11.	λ_{max} (nm): 303, 259, 254 Bioactivity: antioxidant Ities

그림 103. ANT-40-6 추출물 내 대사체의 de-replication 결과

나. ANT048 추출물의 LC-MS 분석 결과, UV와 MS상에서 특징적인 peak이 나타나지 않음. 추출물 내에 미량 성분 또는 검출되지 않는 물질이 활성 물질로 예상됨에 따라, 분리의 우선순위에서 제외됨.

ANT-100 (Unidentified species)

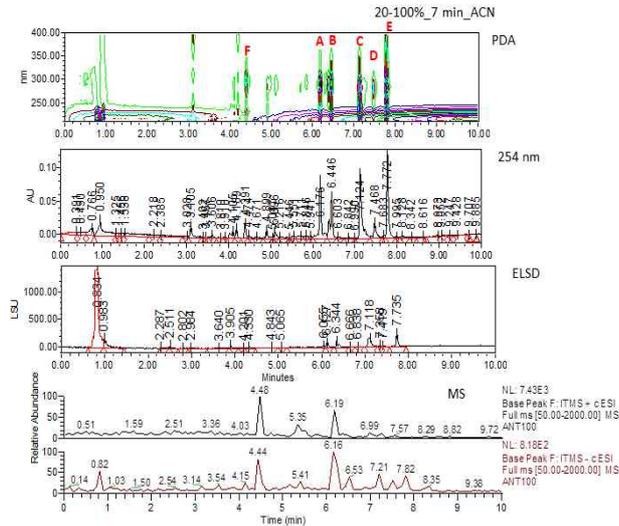


그림 104. ANT-100 추출물의 UPLC-MS/ELSD 분석 결과

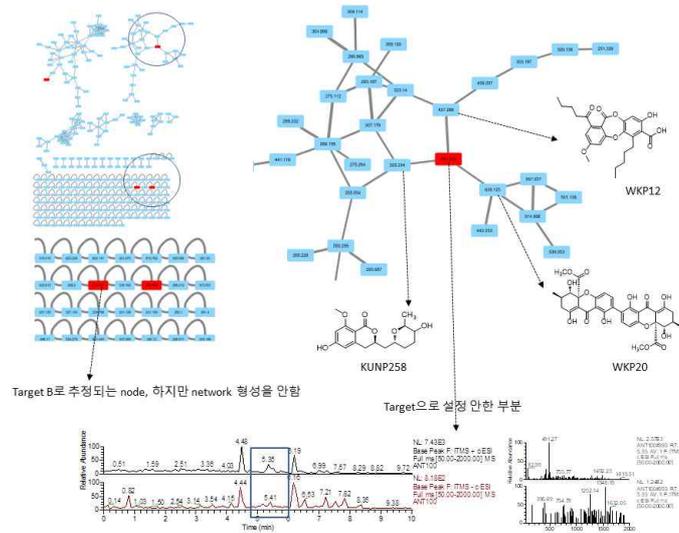


그림 105. ANT-100 추출물의 UPLC-MS/ELSD 분석 결과

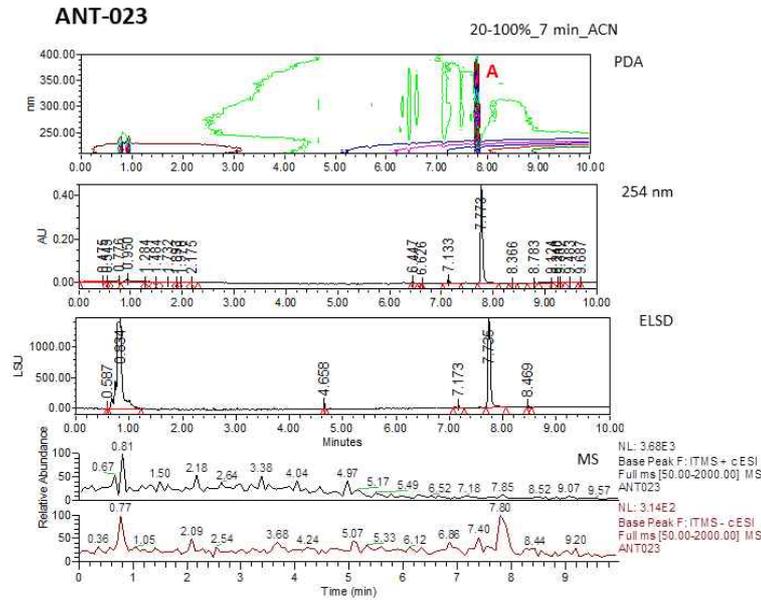


그림 106. ANT-023 균주 추출물의 UPLC-MS/ELSD 분석

다. 위와 같이 추출물 분석을 진행한 결과, usnic acid 물질이 존재하는 것을 예상, 이 물질에 추출물에서 확인된 관련 효능이 보고 되어 있어, 이 시료의 활성물질로 예상됨. 이를 확인하기 위해 분리를 진행하였고, 아래와 같이 NMR 분석을 통해 구조연구 완료. 이를 통해 본 연구팀이 수행한 de-replication 기법의 우수성을 확인함.

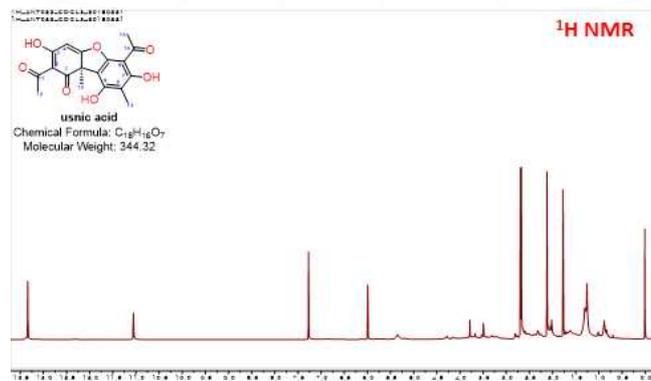


그림 107. 분리한 Usnic acid의 proton NMR

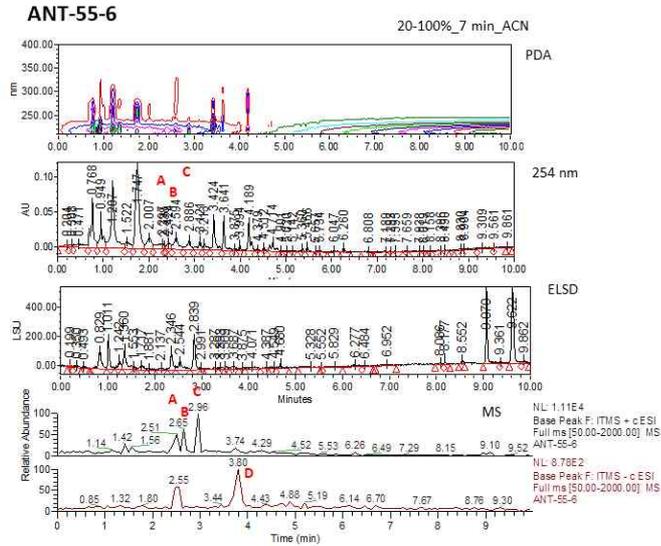


그림 108. ANT-55-6 추출물의 UPLC-MS/ELSD 분석 결과

분석 결과를 기반으로 총 4개의 특징적인 peak을 선정하였고, 각 peak들의 해당 분자량과 UV 패턴을 확인한 결과, ANT-40-6과 같은 결과를 얻음.

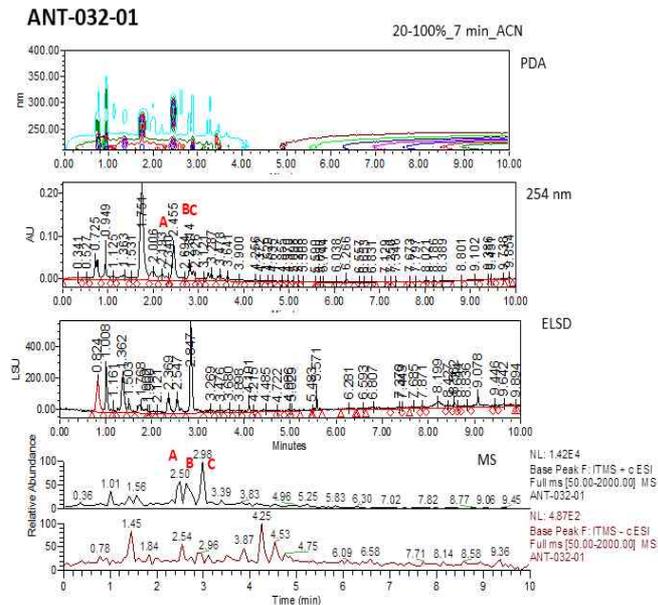


그림 109. ANT-032-01 추출물의 UPLC-MS/ELSD 분석 결과

분석 결과를 기반으로 총 3개의 특징적인 peak을 선정하였고, 각 peak들의 해당 분자량과 UV 패턴을 확인한 결과, ANT-40-6과 같은 결과를 얻음.

최종적으로, ANT-40-6, ANT-032-01과 ANT-55-6 추출물은 유사한 대사체 패턴을 보이는 것을 LC-MS/ELSD 분석을 통해 확인함. 추출물 내에 미량 성분 또는 검출되지 않는 물질이 활성 물질로 예상됨에 따라, 분리의 우선순위에서 제외됨. ANT-100 추출물의 target E와 ANT-023 추출물의 target A가 같은 물질 (usnic

acid)로 예상되며, 이 물질로 보고된 효능을 통해, 두 개의 추출물의 활성물질일 것이라 예상함. 또한 ANT-023 추출물 분리를 통해, 실제 해당 물질을 확인함에 따라 본 연구팀이 수행한 de-replication 기법과 분자 네트워킹 기법의 우수성을 확인함.

최종 결론 및 추후 연구진행 방향

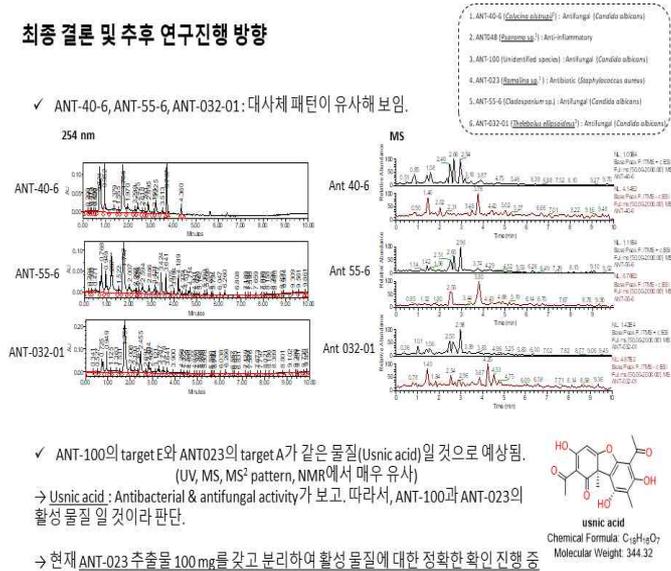


그림 110. 극지 연구소로부터 받은 6종의 극지미생물의 대한 최종 분석 결과

11. 52종의 극지미생물 추출물을 대상으로 UPLC-MS/ELSD를 이용하여 분석함. 분석 결과를 바탕으로 chemical DB와 molecular networking 기반 de-replication을 수행함. (3차년도)

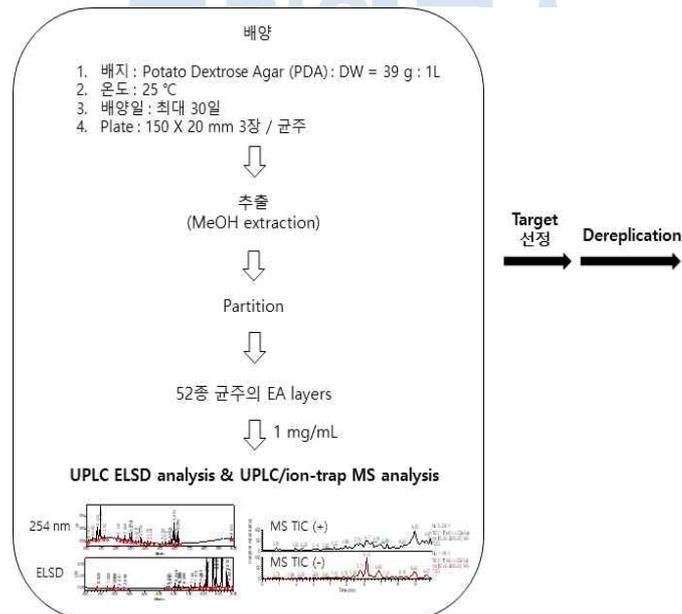


그림 111. 총 52종의 극지미생물에 대한 추출법 및 분석 방법

가. 총 52종의 극지 미생물 추출물의 분석을 실시함. 그 중 48종의 추출물은 아래와 같이 LC-MS상에서 특징적인 peak이 나타나지 않음. 따라서 분리의 우선순위에서

제외됨.

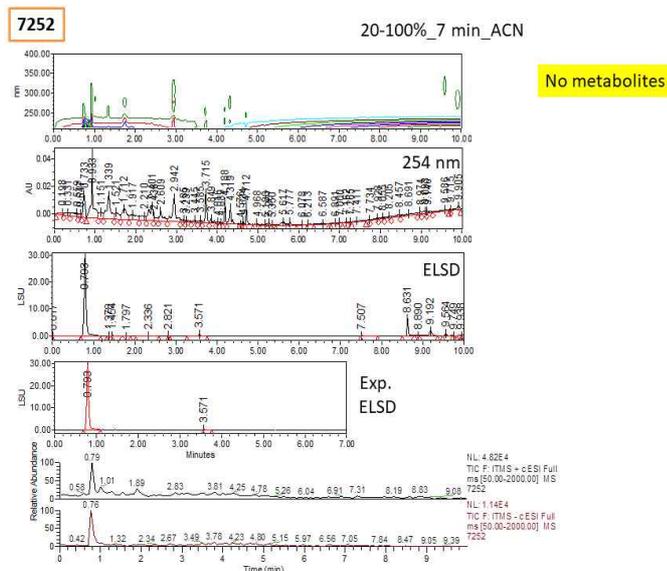


그림 112. 극지 미생물 7252에 대한 UPLC-MS/ELSD 분석 결과
 나. 그 외 4종의 추출물에 대해서는, de-replication과 분자 네트워킹 분석을 실시하여, 신규활성물질 함유의 가능성이 높은 추출물 별로 균주의 우선순위를 아래와 같이 선정함. 유래 분리 물질과 구조적 연관성이 확인 되지 않았음. 또한 이 물질과 비슷한 구조로 보이는 다수의 유도체들이 확인됨에 따라 높은 우선순위로 선정함.

중요도	균주 code명	이유
1.	7253	Target의 UV pattern & MS를 이용한 dereplication 결과, match data 없음, 신규물질일 확률 높음.
2.	7277 (분리 진행 중)	Molecular networking 결과, target compound를 in-house fungal compounds library와 GNPS library에서 match data 못 찾음. 또한, target과 edge로 연결된 다수의 nodes를 확인, 관련 유도체들이 있음을 확인함.
3.	7247	
4.	7237 (분리 진행 중)	

그림 113. 총 52종의 극지미생물에 대한 추출법 및 분석 방법

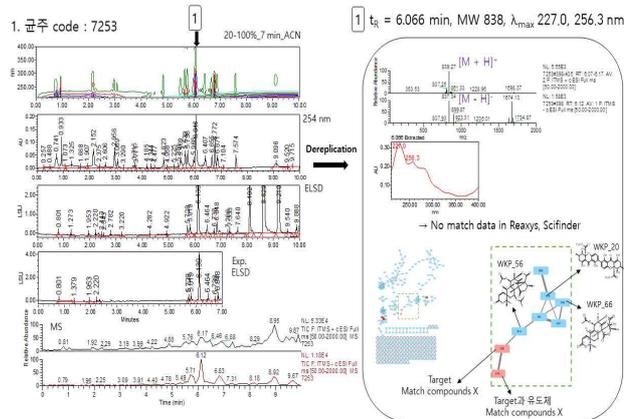


그림 114. 총 52종의 극지미생물에 대한 추출법 및 분석 방법

제 3 절 선정된 유용 극지미생물의 대량 배양, 유용 물질 분리 및 구조연구

1. 1차년도에 선정된 유용 극지미생물 SF7071과 SF7266의 대량 배양, 유용 물질 분리 및 구조연구를 수행하여 각각 2종과 4종의 known compounds를 분리 및 정제함. SF7266에서 분리된 4종의 화합물에 대해 활성 테스트 진행 중.



그림 115. SF7071

SF7071에서 분리된 2종의 화합물

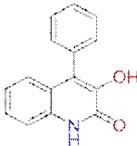
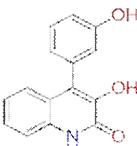
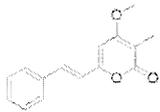
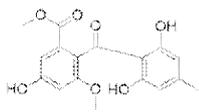
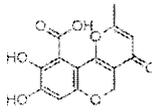
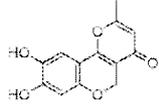
	1. HG1-189-1K (3.5 mg)	2. HG1-167-2K (6.7 mg)
Structure		
Name	Viridicatin Chemical Formula: C ₁₅ H ₁₁ NO ₂ Molecular Weight: 237.26	Viridicatol Chemical Formula: C ₁₆ H ₁₁ NO ₃ Molecular Weight: 253.26
Isolation from natural products	• <i>Penicillium crustosum</i>	• Fungus <i>Penicillium</i> sp
Bioactivities	✓ No Bioactivity present	✓ Cytotoxic
References	• Kobayashi Y. et al., <i>Org. Lett.</i> , 2009 , 11 (7), 1603-1606.	• Y.M Ma et al., <i>Nat. Prod. Res.</i> , 2017 , 31 (8), 951-958.



그림 116. SF7071

SF7266에서 분리된 4종의 화합물

	1. HE1-87-1K (10.5 mg)	2. HE1-50-8K (5.0 mg)	3. HE1-39-4K (63.1 mg)	4. HE1-39-7K (2.8 mg)
Structure				
Name	Panstyrylpyrone (E)-4-methoxy-3-methyl-6-styryl-2H-pyran-2-one	Sulochrin methyl 2-(2,6-dihydroxy-4-methylbenzoyl)-5-hydroxy-3-methoxybenzoate	Citromycetin 8,9-dihydroxy-2-methyl-4-oxo-4,5-dihydropyrano[3,2-c]chromene-10-carboxylic acid	citromycin 8,9-dihydroxy-2-methylpyrano[3,2-c]chromen-4(5H)-one
Isolation	<ul style="list-style-type: none"> Marine-derived fungus <i>Penicillium</i> sp. JP-55 	<ul style="list-style-type: none"> The alga-derived fungi <i>Penicillium thami</i> Mail's and <i>Penicillium lividum</i> Westling <i>Aspergillus terreus</i> ATCC 30542 The endophytic microscopic <i>Dothidea</i> sp. LRUB20 	<ul style="list-style-type: none"> Australian marine-derived and terrestrial <i>Penicillium</i> sp. 	<ul style="list-style-type: none"> Australian marine-derived and terrestrial <i>Penicillium</i> sp. Cultures of two strains of <i>Streptomyces</i>.
Bioactivities	<ul style="list-style-type: none"> ✓ PTP1B inhibitory effect ✓ Anti-inflammatory effect 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ α-glucosidase inhibitor ✓ Antifungal activity ✓ Antibacterial activity 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Antibacterial activity ✓ Cytotoxic activity 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ insecticidal activity ✓ Antibacterial activity
References	<ul style="list-style-type: none"> Lee et al. <i>Mar. Drugs</i> 2013, 11(4), 1409-1426.¹ 	<ul style="list-style-type: none"> Maria et al. <i>Phytochem. Lett</i> 2016, 15, 7-12.² Tomasz et al. <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 2016, 100(7), 3009-3022.³ Pointes et al. <i>Phytochemistry</i> 2003, 70(1), 121-127.⁴ Yoshinico et al. <i>Chem Pharm Bull</i> 1988, 37(12), 4542-4549.⁵ 	<ul style="list-style-type: none"> Jean et al. <i>Fitoquímica</i> 2014, 98, 209-214.⁶ Jean et al. <i>Acta Health</i> 2016, 16(3), 734-743.⁷ Lee et al. <i>Mar. Drugs</i> 2013, 11(4), 1409-1426.¹ 	<ul style="list-style-type: none"> Klayuri et al. <i>Chem Pharm Bull</i> 1981, 29(12), 3727-3730.⁸ Robert et al. <i>J. Nat. Prod.</i> 2007, 70(11), 1746-1752.⁹ Yoko et al. <i>Antibiotics</i> 1968, 2(3), 112-118.¹⁰

2. 극지 미생물 7253 대량배양 및 활성 물질 분리

가. PDA 배지에서 25 °C로 21일간 대량배양 후, 아래와 같이 추출물 UPLC-MS/ELSD 분석을 실시. 특징적인 peak 6개를 선정.

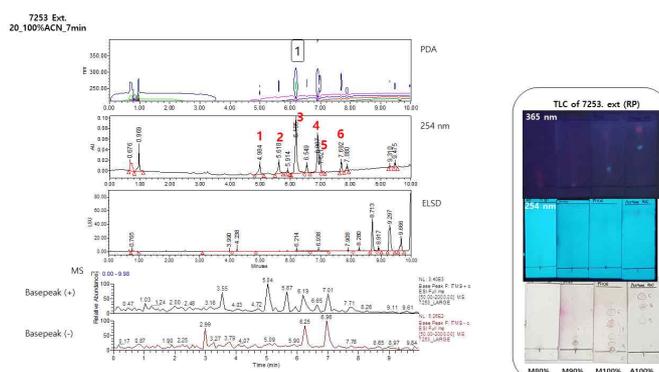


그림 117. 대량배양 후, 극지미생물 7253 추출물의 UPLC-MS/ELSD 분석 및 TLC

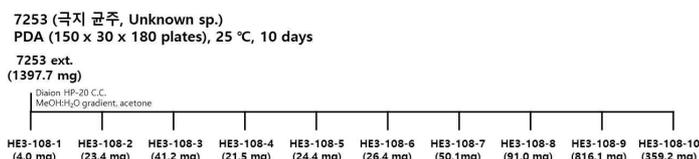


그림 118. 극지 미생물 7253 추출물의 분리 scheme

3. 극지 미생물 7277 대량배양 및 활성 물질 분리

가. PDA 배지에서 25 °C로 21일간 대량배양 후, 아래와 같이 추출물 UPLC-MS/ELSD 분석을 실시. 특징적인 peak 5개를 선정.

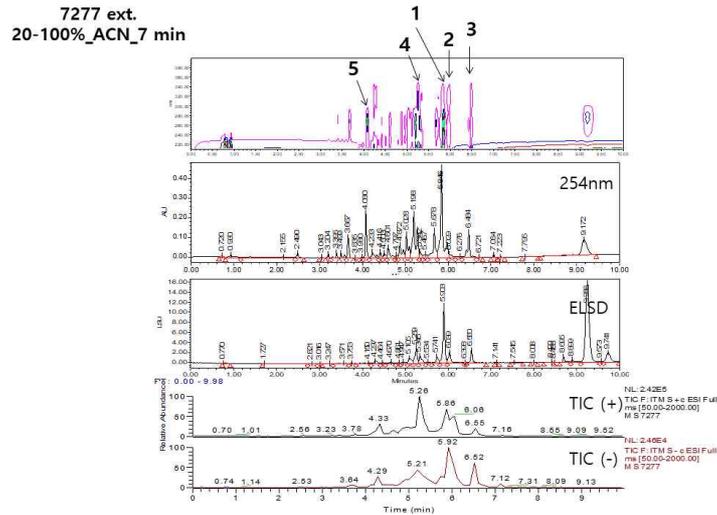


그림 119. 대량배양 후, 극지미생물 7277 추출물의 UPLC-MS/ELSD 분석

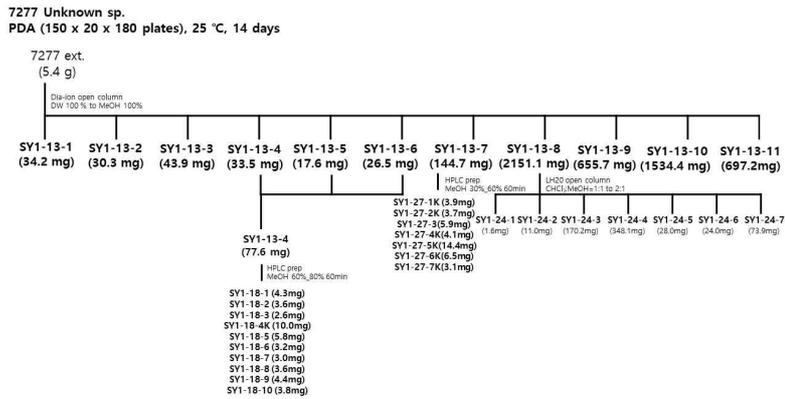


그림 120. 극지 미생물 7277 추출물의 분리 scheme

3. 극지 미생물 7247 대량배양 및 활성 물질 분리

가. PDA 배지에서 25 °C로 46일간 대량배양 후, 추출물 획득중에 있음.

4. 극지 미생물 7237 대량배양 및 활성 물질 분리

가. PDA 배지에서 25 °C로 31일간 대량배양 후, 아래와 같이 추출물 UPLC-MS/ELSD 분석을 실시. 특징적인 peak 1개를 선정

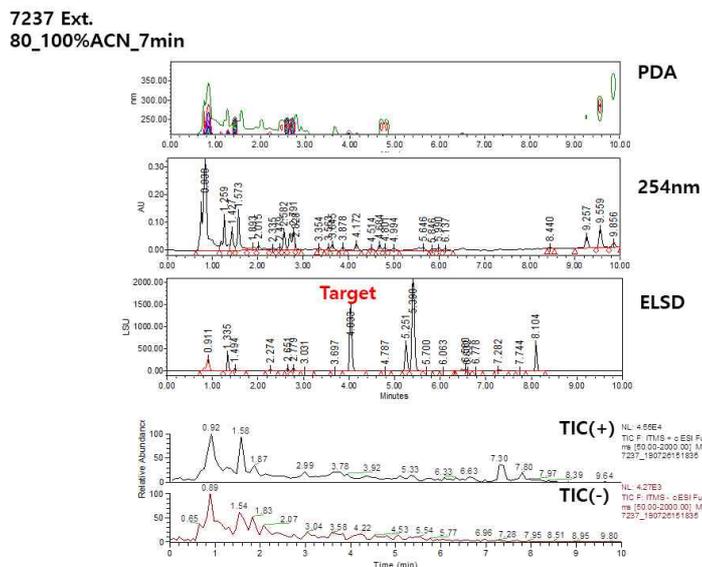


그림 121. 대량배양 후, 극지미생물 7237 추출물의 UPLC-MS/ELSD

7237
PDA (150 x 30 x 180plates), 25 °C

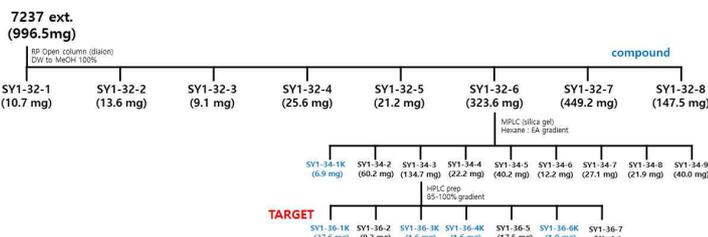


그림 122. 극지 미생물 7237 추출물의 분리 scheme

나. 아래와 같은 scheme에 따라 추출물에서 HPLC를 포함한 다양한 chromatography기법을 이용하여 target 물질을 분리함.

다. 분리된 물질은 (compound 1)은 TLC 및 HPLC를 이용하여 순도를 확인 후 NMR 분석을 실시하여 (6Z, 9Z) - heneicos-6,9-diene 으로 확인함 (참고문헌, Wakamura et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2005, 69(5), 957 - 965.)

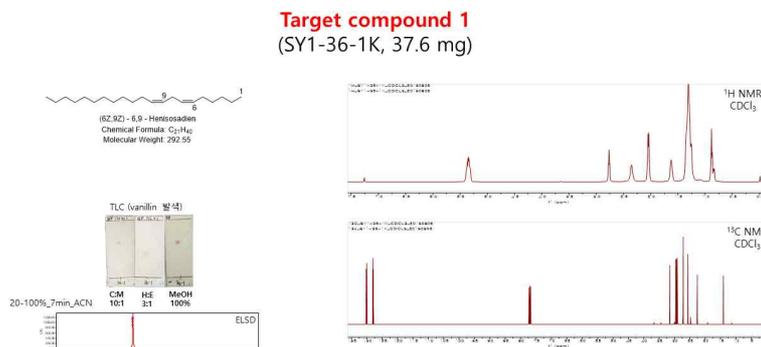


그림 123. 극지 미생물 7237 추출물의 분리 물질 구조 및 정보

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

년도	성과목표	세부목표	가중치	달성도
1차년도 (2017)	LC-MS를 이용한 극지미생물 추출물의 대사체 분석	○LC-MS를 이용한 극지미생물 추출물의 대사체 분석, 구조연구 (profiling 및 dereplication)	50	100
		○대사체 분석 기반 극지미생물 추출물 내의 대사체 DB 구축	30	100
		○대사체 분석 기반 유용 극지미생물 선정 (prioritizing)	20	100
2차년도 (2018)	LC/MS를 이용한 극지미생물 대사체 분석 및 분리	LC/MS를 이용한 극지미생물 추출물의 대사체 분석 및 대사체 DB 구축	50	100
		대사체 분석 기반 유용 극지미생물 선정 (prioritizing)	20	100
		선정된 유용 극지미생물의 대량 배양, 유용 물질 분리 및 구조연구	30	100
3차년도 (2019)	LC/MS를 이용한 극지미생물 대사체 분석 및 분리	LC/MS를 이용한 극지미생물 추출물의 대사체 분석 및 대사체 DB 구축	20	100
		대사체 분석 기반 유용 극지미생물 선정 (prioritizing)	30	100
		선정된 유용 극지미생물의 대량 배양, 유용 물질 분리 및 구조연구	50	100

- 대외기여도 : 대사체 분석기법과 분자네트워킹 분석기법을 융합하여, 특이적 대사물질 및 신규활성물질을 갖는 극지 유래 추출물을 선별함과 동시에 타겟 물질의 구조적 정보를 파악하여, 극지미생물 유래 대사물질 분리에 있어 효율적인 접근법을 제시하는데 기여함. 또한, 미생물 유래 대사체는 전통적으로 신약개발에 있어서 중요한 자원으로 이용되어 왔으며, 특히 극지미생물을 이용한 천연물 신약개발에 있어 선도 물질을 신속히 확보하는데 기여함.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 학술적 파급효과

- Metabolomics 분석 기법은 극지 미생물 추출물 내의 대사 성분을 신속하고 정확하게 탐지할 수 있기 때문에, 활성물질을 확보하는데 있어서 연구 효율을 극

대화하고 분석법을 정립함으로써 신규 활성물질 규명을 위한 기반자료로 사용 가능함.

- 신규 활성물질 확보 및 효용성 높은 균주 선별하는데 있어 효과적인 DB를 제공함.

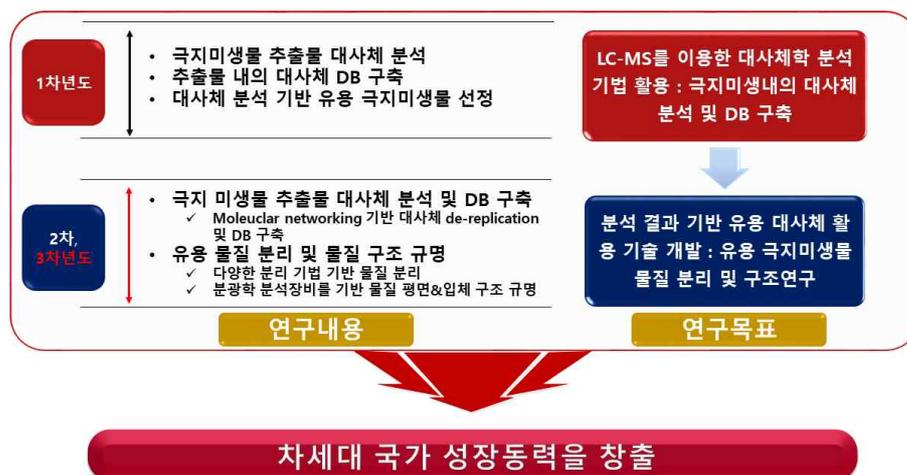


그림 128. 연구개발결과의 활용계획

제 2 절 경제적 파급효과

- 극지미생물 기반 천연물 신약개발에 있어 선도 물질을 신속히 확보하는데 기여하며 이를 통한 우선권 선점.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

1. 미생물 유래 대사체는 전통적으로 신약개발에 있어서~

[Newman, D. J.; Cragg, G. M., Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 311-335]

[Koehn, F. E.; Carter, G. T., The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Rev. Drug discovery.* **2005**, *4*, 206-220]

2. 신규활성물질을 규명하는데 있어~

[Nothias, L. F.; Boutet-Mercey, S. p.; Cachet, X.; De La Torre, E.; Laboureur, L.; Gallard, J. F. o.; Retailleau, P.; Brunelle, A.; Dorrestein, P. C.; Costa, J., Environmentally Friendly Procedure Based on Supercritical Fluid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry Molecular Networking for

the Discovery of Potent Antiviral Compounds from *Euphorbia semiperfoliata*. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 2620-2629]

3. 대사체(Metabolomics) 분석기법은~

[Kim, S.-H.; Yang, S.-O.; Kim, K. H.; Kim, Y.-S.; Liu, K.-H.; Yoon, Y.-R.; Lee, D.; Lee, C. H.; Hwang, G.-S.; Chung, M. W.; Choi, K. H.; Choi, H.-K. Research trends, applications, and domestic research promotion strategies of metabolomics. *KSBB J.* **2009**, *24*, 113-121.]

4. 분자네트워킹(molecular networking) 분석기법은~

[Silva, R.; Wang, M.; Nothias, L.; Liu, X.; Hooft, J.; Caraballo-Rodriguez, A.; Fox, E.; Balunas. M.; Klassen, J.; Lopes, N.; Dorrestein, P., Propagating annotations of molecular networks using *in silico* fragmentation. *PLoS Comput. Biol.* **2018**, *14*(4), 1-26]

[Wang, M.; Carver, J. J.; Phelan, V et al., Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *34*(8), 828-837]

[GNPS, <http://gnps.ucsd.edu/>]

5. 미생물유래 신규물질 규명 및 생리활성 ~

[Ryu, S. M.; Lee, H. M.; Song, E. G.; Seo, Y. H.; Lee, J.; Guo, Y.; Kim, B. S.; Kim, J.-J.; Hong, J. S.; Ryu, K. H., Antiviral Activities of Trichothecenes Isolated from *Trichoderma albolutescens* against Pepper Mottle Virus. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 4273-4279]

[Kwon, J.; Lee, H.; Ko, W.; Kim, D.-C.; Kim, K.-W.; Kwon, H. C.; Guo, Y.; Sohn, J. H.; Yim, J. H.; Kim, Y.-C., Chemical constituents isolated from Antarctic marine-derived *Aspergillus* sp. SF-5976 and their anti-inflammatory effects in LPS-stimulated RAW 264.7 and BV2 cells. *Tetrahedron.* **2017**, *73*, 3905-3912]

[Kwon, J.; Lee, H.; Yoon, Y. D.; Hwang, B. Y.; Guo, Y.; Kang, J. S.; Kim, J.-J.; Lee, D., Lanostane Triterpenes Isolated from *Antrodia heteromorpha* and Their Inhibitory Effects on RANKL-Induced Osteoclastogenesis. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 1689-1693]

주 의

1. 이 보고서는 극지연구소 위탁과제 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 위탁연구과제로 수행한 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.