

# 표지

(뒷면)

(측면)

(앞면)

<p>↑ 7cm ↓</p> <div data-bbox="245 1122 475 1337" style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;"><p>주 의 (편집 순서8) (16 포인트 고딕체)</p></div> <p>↑ 7cm ↓</p>	<p>대사체 분석 및 분자네트워킹 분석기 법 기반 극지미 생물 유래 바이오 소재 발굴</p> <p>고려대 학교 산학협 력단</p> <p>↑ 5cm ↓</p>	<p>↑ 7cm ↓</p> <p>대사체 분석 및 분자네트워킹 분석기법 기반 극지미생물 유래 바이오소재 발굴</p> <p>Metabolomics and molecular networking based discovery of biomaterials derived from antarctic microorganisms</p> <p>극지연구소</p> <p>고려대학교 산학협력단</p> <p>↓ 7cm ↑</p>
--	---	---



# 제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “극지 바이오 대사체 상용화 구축 사업” 과제의 위탁연구 “대사체 분석 및 분자네트워킹 분석기법 기반 극지미생물 유래 바이오소재 발굴” 과제의 단계보고서로 제출합니다.



(본과제) 총괄연구책임자	:	임정한
위탁연구기관명	:	고려대학교 산학협력단
위탁연구책임자	:	이동호
위탁참여연구원	:	권하은
“	:	장유주
“	:	박현서
“	:	유솔이
“	:	이재훈

## 보고서 초록

위탁연구과제명	대사체 분석 및 분자네트워킹 분석기법 기반 극지미생물 유래 바이오소재 발굴				
위탁연구책임자	이동호	해당단계 참여연구원수		해당단계 연구비	1,450 백만원
연구기관명 및 소속부서명	고려대학교 산학협력단		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	30
<p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 다양한 극지 미생물의 추출물을 확보하여 LC-MS(Ion trap)를 이용하여 분석함.</li> <li>- LC-MS 분석결과를 기반으로 PCA, PLS-da와 같은 다변량 통계기법을 실시하여 유용 극지 균주를 선정함.</li> <li>- 추출물 분석을 통해 산출된 UV와 MS spectrum 결과를 바탕으로 chemical DB 검색과 분자 네트워킹(Molecular networking)을 이용한 MS/MS fragment 분석을 수행하여 기존에 보고된 다양한 활성물질에 대한 de-replication, 추출물 내 대사체를 파악하여 DB를 구축함.</li> <li>- 선정된 5종의 유용 극지 미생물을 선정하여, 대량배양을 통한 추출물을 확보하여 다양한 분리기법을 통해 대사체를 분리함.</li> <li>- 다양한 분광학 분석장비를 이용하여 분리된 대사체의 구조를 규명함.</li> </ul> <p>○ 연구결과의 활용</p> <p>이와 같은 연구결과는 극지 미생물 자원 활용연구 및 관련 산업 활성화에 기여할 것임.</p>					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	대사체, 극지 미생물, 추출물, MS 라이브러리, 분자네트워킹			
	영 어	Metabolites, Antarctic microorganisms, Extract, MS-library, Molecular networking			

# 요 약 문

## I. 제 목

대사체 분석 및 분자네트워킹 분석기법 기반 극지미생물 유래 바이오소재 발굴

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 목적은 극지 유래 미생물의 추출물을 제작하고 대사체 라이브러리를 확보하고, 추출물 내 특이적 대사체 구조의 특성을 분석하여 극지 바이오 연구를 활성화하는 데 있다.

## III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구개발의 목적을 달성하기 위하여 아래와 같은 연구가 진행되었다.

### ○ 극지 미생물 유래 대사체 확보

- 극지 미생물 추출물 확보
- 극지 미생물 추출물 LC-MS 분석 및 분자네트워킹 분석
- 극지 미생물 추출물 대량배양, 대사체 분리 정제 및 구조 규명

## IV. 연구개발결과

본 연구개발 결과는 다음과 같다.

### ○ 극지 미생물 유래 대사체 확보

#### 가. 극지 미생물 추출물 확보

극지연구소로부터 수령한 91종의 균주를 배양하여 추출물을 확보하고, 11종의 균주 추출물 및 2종의 지의류 추출물을 확보하였다.

#### 나. 극지 미생물 추출물 LC-MS 분석 및 분자네트워킹 분석

극지 미생물 추출물 시료를 대상으로 LC-MS(Ion trap) 분석을 수행하였고, UV 및 MS spectrum 결과를 바탕으로 chemical DB 검색과 분자네트워킹 분석기법을 수행하여 de-replication 및 추출물 내 유용 대사체 분석을 하였다.

#### 다. 극지 미생물 추출물 대량배양, 대사체 분리 정제 및 구조 규명

확보한 추출물 중 선정된 유용 극지 미생물을 대량배양하여 추출물을 확보하고 다양한 분리기법을 통해 대사체를 분리 정제하였으며, 분리된 대사체에 대한 분광학 분석을 통해 구조를 규명하였다.

## V. 연구개발결과의 활용계획

극지 유래 미생물의 대사체 분석 결과를 통해 대사체를 미리 예측하여 신규 활성물질 또는 유용 활성 물질을 탐색하여 효용성이 높은 균주를 선택하는 데 도움을 준다. 또한 신규 활성 대사체 분리 정제 연구를 위한 토대를 마련할 수 있으며, 극지 미생물 자원들의 연구를 위한 기초 자료로써 기여한다.

# S U M M A R Y

## I. Title

Metabolomics and molecular networking based discovery of biomaterials derived from antarctic microorganism

## II. Purpose and Necessity of R&D

The purpose of this study is to activate the antarctic research by constructing the extracts and library of metabolites from antarctic microorganism and analyzing the characteristics of specific metabolite structures.

## III. Contents and Extent of R&D

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

- Securement of metabolite derived from antarctic microorganisms
  - Acquisition of antarctic microorganisms extracts
  - Analysis of LC-MS and Molecular networking of antarctic microorganisms
  - Isolation of metabolites from antarctic microorganisms and structure elucidation of isolated metabolites by spectroscopic method

## IV. R&D Results

The results of these studies are as follows.

- Securement of metabolite derived from antarctic microorganisms
  - A. Acquisition of antarctic microorganisms extracts
    - Extracts were obtained by culturing 91 microbial strains, and 11 strain extracts and 2 lichen extracts received from KOPRI were secured.
  - B. Analysis of LC-MS and Molecular networking of antarctic microorganisms
    - LC-MS(Ion trap) analysis was performed on the samples of the antarctic microorganisms extracts. Based on the UV and MS spectrum data, chemical DB searching and molecular networking analysis were performed to analyze de-replication and useful metabolites.
  - C. Isolation of metabolites from antarctic microorganisms and structure elucidation of isolated metabolites by spectroscopic method
    - Selected useful antarctic microorganisms were large-cultivated to obtain extracts, and metabolites were isolated through various separation techniques, and the structures of the metabolites were elucidated through spectroscopic analysis.

## V. Application Plans of R&D Results

The results of the analysis of the metabolite derived from antarctic microorganisms can be used to predict the metabolites and to search for novel active substances or useful active materials. It also contributed as a basis for the study of antarctic microbial resources.

# 목 차

제 1 장 서론

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌



# 제 1 장 서론

## 제 1절 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구개발의 목적

- LC-MS를 이용한 추출물의 대사체 분석(metabolomics)을 통한 유용 극지 미생물 추출물 선정(prioritizing) 및 DB화
- MS fragmentation 기반 분자네트워킹(Molecular networking) 분석기법을 통하여 선정된 추출물 내 특이적 대사체 구조 특성 분석 및 표적화(targeting)
- 선정된 유용 극지 미생물의 대량배양 및 표적화된 신규 활성 대사체 분리 및 구조 연구 (targeted isolation)

### 2. 연구개발의 필요성 및 범위

- 극지 미생물은 극한환경에서 생존하기 위해 특이한 적응 관련 유전자, 단백질 및 다양한 대사체를 보유하고 있으며, 특이적 대사체 자원과 신규 활성 대사체 개발의 가능성이 매우 큼.
- 해양 미생물 중 해양 유래 진균에서 얻은 2차 대사물질들이 주목받고 있고, 1990년대 이후 발표된 구조들의 수가 급격히 증가하였으며 많은 물질이 생물학적, 약리학적 특징을 가지고 있음. (Rateb and Ebel, 2011).
- 극지 미생물의 가치와 활용성을 극대화하기 위하여 LC-MS를 이용한 유용 극지 미생물 추출물 DB 구축, 대사체의 다양성 확보가 필요함.
- 신규 활성물질의 대량 표적 분리를 통해 신약 개발의 가능성을 가지는 생물자원의 대량확보를 위한 시스템 구축이 필요함.

극지연구소

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1절 해외 연구현황

- 생물다양성협약에서 생물자원에 대한 국가 주권을 인정하면서 선진국들은 극지 및 해양생물정보은행을 구축하고 있으며, 유전체·단백체·천연물 대사체 탐색에 정부 차원의 대규모 투자를 하고 있다.
- 극지생물다양성, 생물계통·진화, 스트레스반응 등에 관한 연구를 위해 2007/2008 IPY를 통하여 국제 공동연구 체계가 이루어지고 있으며, 이외 저온효소 등의 신규 생물소재 연구를 보고하였다.
- 과학연구를 통해 극지 연구에 대한 영향력 확대를 위해 국제공동연구(북극해 환경변화 관측 공동연구; MOSAiC 프로젝트, 스위트 빙하 붕괴 연구 등)가 활발히 진행되고 있으며, 대규모 인프라 구축 등 국가 차원에서 투자가 강화되고 있다.
- 미국과학재단(National Science Foundation; NSF)에서 남극 연구 프로그램(U.S Antarctic Program; USAP)을 추진하며 매년 약 5,000억 원을 투자하여 남극 해양, 대기, 우주 관측과 생태연구, 인프라 운영을 진행하고 있다.
- 중국 극지연구소(Polar Research Institute of China; PRIC)에서 극지표본 자원 공유 플랫폼 사업을 통해 다양한 극지생물을 확보하고 관련 대사체에 관한 연구를 진행하고 있다.
- 중국 Shandong University 연구진은 남극 유래 해양 균주로부터 tremulane sesquiterpenoid 계열의 신규물질을 분리하였다. (Shi et al., 2021)
- 러시아 극지연구소(Arctic and Antarctic Research Institute of Roshydromet; AARI)에서 남북극 환경 내 기작 및 기작 간 상호작용에 대한 규명, 원거리 탐사 및 빙하시추 기술개발, 북극 생태연구, 남북극 해양활동 자원을 위한 연구 및 실시간 모니터링 활동을 하고 있다.
- 영국 극지연구소(British Antarctic Survey; BAS)에서 남극 환경의 미생물의 DNA를 연구하는 최첨단 유전적 방법을 통해 새로운 항생제 및 기타 화합물의 생산에 관해 연구를 하고 있다.

### 제 2절 국내 연구현황

- 국내에서는 극지연구소(Korea Polar Research Institute; KOPRI)를 2004년 설립하고, 남·북극 과학기지 설치, 2009년 아라온호 건조를 통해 극지역의 대기, 지구물리, 빙하, 해양환경, 생물자원 연구 등 다각도의 연구 활동을 펼치고 있다.
- KOPRI에서 극지 유용유전자원 활용과 극지생물 유전체 특성 규명을 통해 국제적 연구를 선도하고 산업적 고부가가치 창출이 가능한 극지생물 유전자원을 15종을 발굴하는 “극지유전체 101 프로젝트: 극지생물 유전체 정보 분석 및 활용기반 구축” 과제를 진행하였다.
- 현재 극지생물의 새로운 유전자를 이용하여 항생제 내성을 극복할 수 있는 차세대 항생제 후보물질 발굴을 위한 “극지유전자원 기반 신규활성 항생제 후보 물질 발굴” 과제를 진행하고 있다.
- 또한, 미개발된 극지 고유생물 유래 대사체의 생물공학적 활용기반을 구축하기 위해 극지 고유생물 탐사 및 확보, 극지 고유생물 유래 대사체 활용가치 규명을 위한 “극지적응 고유생물 유래 대사체의 상용화 구축사업”을 진행하였다.

# 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

## 제 1절 유용 극지 미생물 선발 및 추출물 확보

### 1. 연구 목표

- ✓ 극지 미생물을 대상으로 추출물을 제작하여 각 추출물의 LC-MS 프로파일링(profiling) 분석을 통해 MS 라이브러리를 확보하고자 함. MS fragmentation 기반 분자네트워킹(Molecular networking) 분석기법을 통하여 선정된 추출물 내 특이적 대사체 구조 특성 분석 및 표적화(targeting)를 할 수 있음.

### 2. 연구 수행방법

#### 가. 시료 확보

- 2020년 극지연구소로부터 72종(strain Code. 7289 등)의 극지 균주 및 11종의 극지 미생물 추출물을 수령함(표 1, 2).

표 1. 2020년 극지연구소로부터 수령한 72종의 극지 균주 리스트

NO.	Strain NO.	Closest relative	36	7374	Alternaria alternata KX926578
1	7289	Antarctomyces psychrotrophicus KU954336	37	7375	Brettanomyces custersianus
2	7292	Penicillium polonicum GU566208	38	7376	Cladosporium pseudocladosporioides AY812 MG250413
3	7293	Phoma crystallifera KY977445	39	7377	Thelebolus microsporus MF120208
4	7294	Penicillium aeneum	40	7378	Cadophora melinii KX444667
5	7295	Mucor plumbeus	41	7380	Penicillium chrysogenum HQ026745
6	7296	Penicillium spathulatum KC427190 AS3.15328	42	7381	Tolyposcladium sp. OTU058 AN-2016 KU556540
7	7298	Cladosporium tenuissimum AJ300331	43	7382	Geomyces sp. F29 JF439476
8	7304	Penicillium corylophilum JQ272469	44	7384	Penicillium dipodomycicola KT151579 JF.6
9	7308	Trichoderma gamsii HM176559	45	7387	Lachnum papyraceum AB267646
10	7312	Phaeosphaeria papayae K5231187	46	7388	Beauveria bassiana KC753398
11	7313	Sepedonium aff. chalcipoi KS928 KT946850	47	7389	Mycosphaella nanae LC121128
12	7315	Geomyces luteus JF311972	48	7391	Aspergillus versicolor AJ937749
13	7319	Tolyposcladium cylindrosporum AB975302	49	7392	Acremonium hyalinulum NR_131321
14	7320	Cladosporium cladosporioides EF577236	50	7393	Acremonium brachytenium NR_077119
15	7321	Aspergillus amoerens	51	7395	Camarosporula personiae CBS 116258 JF770449
16	7322	Toxicocladosporium irritans JN116660	52	7396	Tolyposcladium ophioglossoides EU834213
17	7327	Phaeohelotium epiphyllum KT876976 H.B. 9911	53	7398	Penicillium chloroleucon KP016813
18	7329	Tolyposcladium inflatum AB255606 NBRC 31669	54	7399	Morbiarella gamsii DNA 128 AJ878509
19	7331	Phoma herbarum BLE15 FN868459	55	7400	Penicillium janthinellum KM268715
20	7334	Pluteus leoninus voucher KP004942.1	56	7401	Penicillium maximae KP979776
21	7336	Cladosporium asperulatum LN834357	57	7405	Cladosporium sp. CMSJ-2009a EF105367
22	7338	Ophiocordyceps sinensis KT134097	58	7407	Leptosphaeria sclerotoides IHBF 2251 MF326616
23	7340	Acremonium sclerobgenum KT878352	59	7408	Cladosporium halotolerans KP701958
24	7343	Lophodermium pini-excelsae EU520183	60	7409	Penicillium chermesinum KR261447
25	7350	Hyphodiscus luxulians GU727560	61	7412	Acremonium rutium JCM 23088 NR_077124
26	7355	Pseudogymnoascus verrucosus MF979080	62	7413	Periophora incarnata xs008030 EU919698
27	7357	Orygenales sp. 7R3B-6 GU212404	63	7414	Cladosporium corallicides ATCC 18160 AF393695
28	7358	Cladosporium perangustum KP701968	64	7415	Cladophialophora carrionii NCCPS350006 KM822863
29	7361	Cladosporium gossypicicola AF393702	65	7416	Leptosphaeria microscopica 3814 FN386274
30	7363	Cladosporium herbarum KX811004	66	7417	Talaromyces wortmanni KX657279
31	7366	Aspergillus creber LN899687	67	7418	Aspergillus jensenii UTHSC 10-71 LN898703
32	7367	Aspergillus cvjetkovicii LN898695	68	7420	Aspergillus tubingensis JH01 HQ2728255
33	7368	Pseudogymnoascus roseus JF311969	69	7421	Tolyposcladium pustulatum AF389193
34	7370	Pseudogymnoascus pannorum DQ189228	70	7423	Devriesia pseudoamericana HJS 31.1b GU570527
35	7373	Candida davisiana CBS 9496 KY102044	71	7425	Abrothallus secedens KF816169
			72	7430	Talaromyces radicus JX162599

표 2. 2020년 극지연구소로부터 수령한 11종의 극지 미생물 추출물 리스트

No.	sample name	Amount(mg)
1	3-F4	17.0
2	3-F8	16.0
3	3-F9	16.7
4	3-G7	5.2
5	3-G8	14.1
6	7-B4	8.7
7	7-C5	17.8
8	7-C6	4.6
9	7-D2	17.3
10	7-D3	17.5
11	7-D11	3.7

나. 연구 수행방법

(1) 극지 미생물의 추출물 제조

- 총 72종의 극지 미생물을 Potato dextrose agar 배지에 25 °C 조건에서 약 20일간 배양하고, 배양된 극지 미생물을 MeOH를 이용하여 추출하고 여과 후 농축함. 이를 다시 증류수에 현탁시킨 후 같은 양의 EtOAc로 용매 분획을 실시함.

(2) LC/MS 대사체 분석조건 및 molecular networking 분석조건 확립

- 추출물을 MeOH에 녹여 0.2 μm의 membrane filter로 필터 후 LC/MS Waters UPLC/Ion trap (IT) MS로 분석하여 대사체가 충분히 분리되고 검출될 수 있는 최적의 분석조건을 확립함(그림 1).

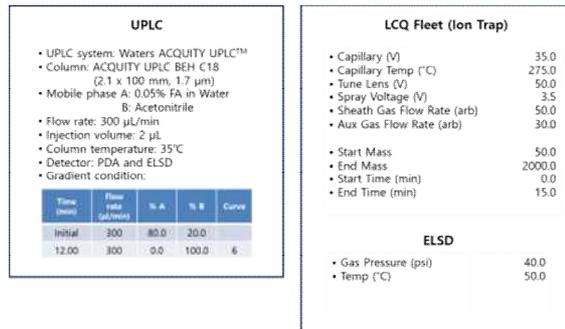


그림 1. 최적의 LC-IT-MS/ELSD 분석 조건

- MS/MS 기반 molecular networking 분석을 위한 최적의 parameter 조건 확립함(그림 2).

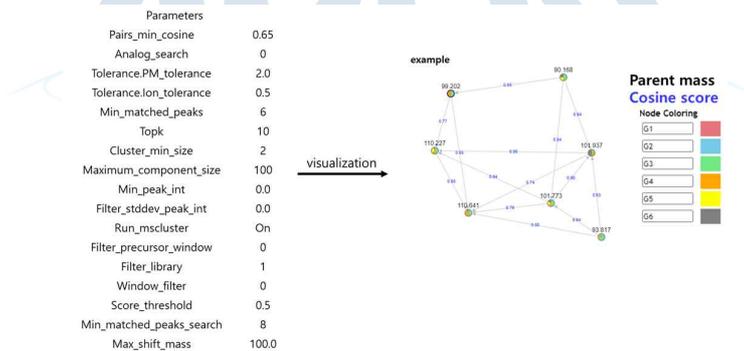


그림 2. Molecular networking 분석을 위한 최적의 parameter 조건

다. 연구 결과

(1) 극지 미생물의 추출물에 대한 MS 분석 결과

- 극지연구소로부터 수령한 총 72종의 균주 중 37종 균주 추출물에 대한 분석을 진행함(그림 3). (나머지 35종의 균주는 잘 자라지 않음.)
- 확립된 LC/MS 분석 조건으로 다변량 통계기법을 이용하여, 대사체 패턴을 확인하여, 9종의 유용 추출물을 선정함(그림 4).

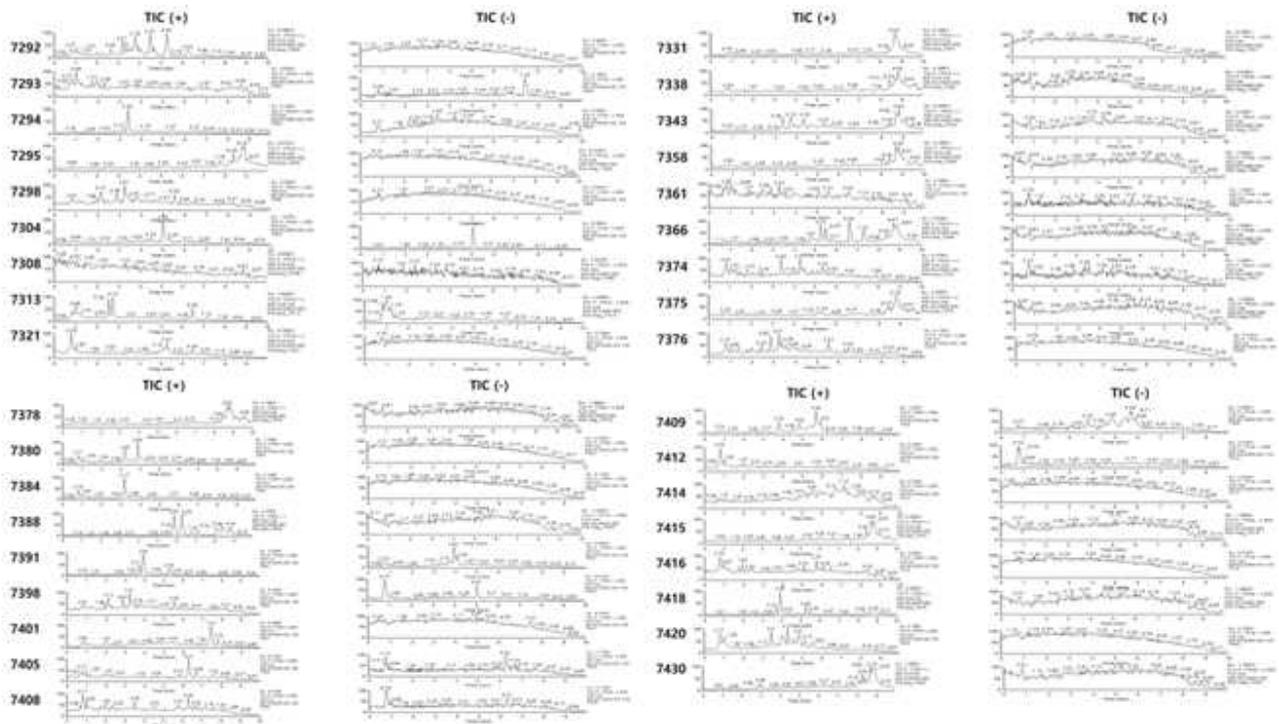


그림 3. 37종의 극지 균주 추출물에 대한 MS 분석 결과

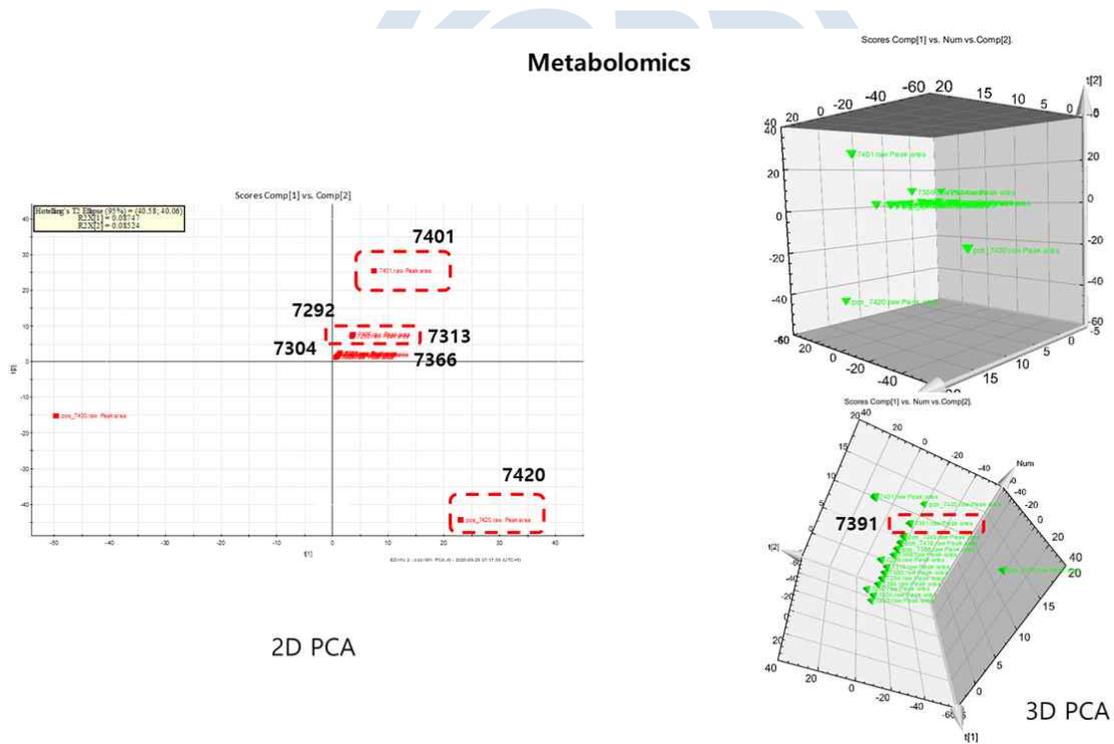


그림 4. 37종의 극지 균주 추출물에 대한 PCA 분석 결과

(2) MS fragmentation 기반 분자네트워킹(Molecular networking) 분석기법을 통하여 선정된 유용 극지 미생물의 대량배양 및 표적화된 신규 활성 대사체 분리 및 구조 연구(targeted isolation)

- 최적의 배지, 온도 및 일수를 고려하여 총 7종의 유용 극지 미생물 대량배양을 수행함.
- 획득한 추출물을 이용하여 표적화된 물질 분리 및 구조 연구를 수행함.

(가) 7420 균주 추출물에 대한 대사체 분리 및 구조 연구

- 추출물의 LC-MS/ELSD 분석을 진행하고 대사체를 표적화함(그림 5).
- 아래와 같은 scheme에 따라 추출물에서 활성물질 및 물질의 분리 정제를 진행함(그림 6).

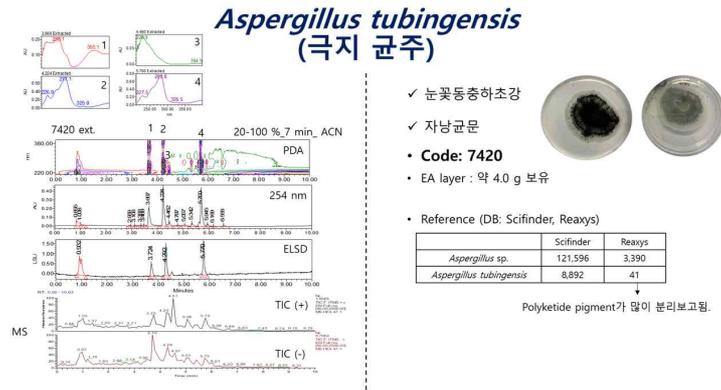


그림 5. 대량배양 완료한 7420 균주 추출물의 LC-MS/ELSD 분석 결과 및 선행 연구 결과

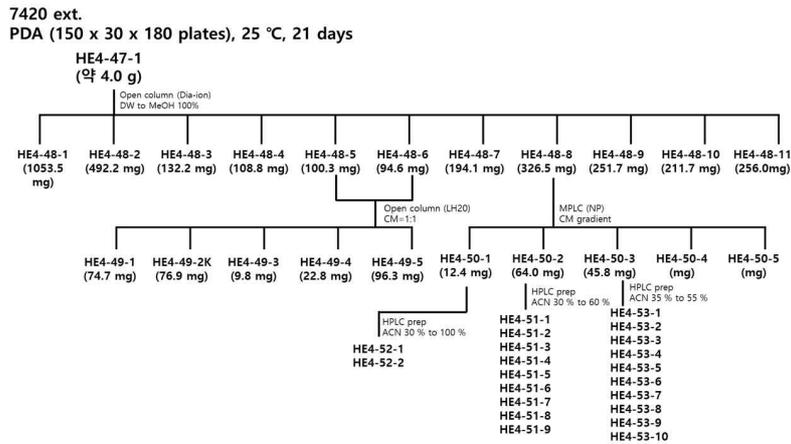


그림 6. 극지 균주 7420 추출물의 분리 scheme

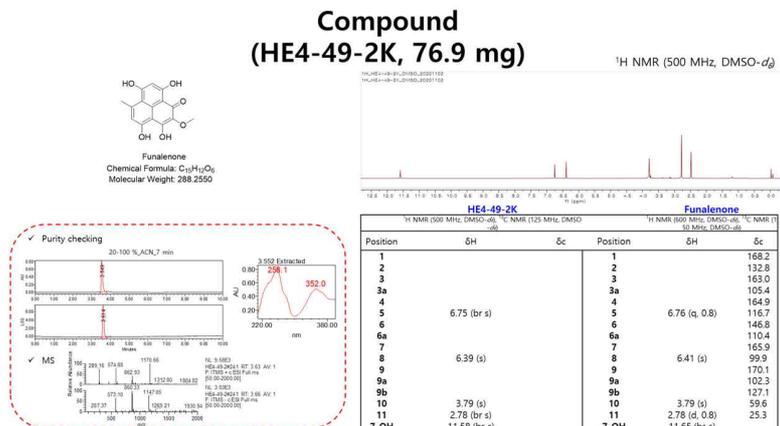


그림 7. 극지 균주 7420 추출물의 분리 물질 구조 및 정보

(나) 7391 균주 추출물에 대한 대사체 분리 및 구조 연구

- 추출물의 LC-MS/ELSD 분석을 진행하고 대사체를 표적화함(그림 8).
- 아래와 같은 scheme에 따라 추출물에서 활성물질 및 물질의 분리 정제를 진행함(그림 9).

### Aspergillus versicolor (7391)

(대량 배양 후 대사체 패턴 변화)

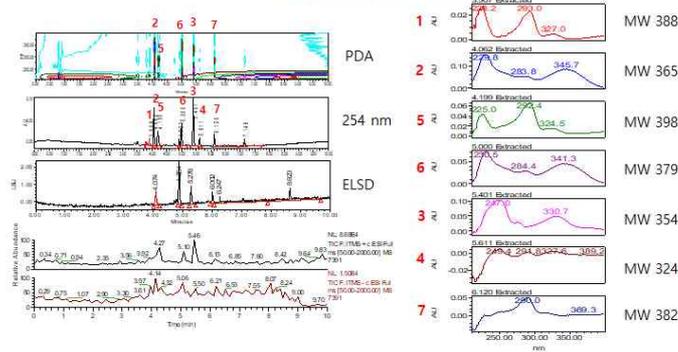


그림 8. 대량배양 완료한 극지 균주 7391 추출물의 LC-MS/ELSD 분석 결과 및 target 선정

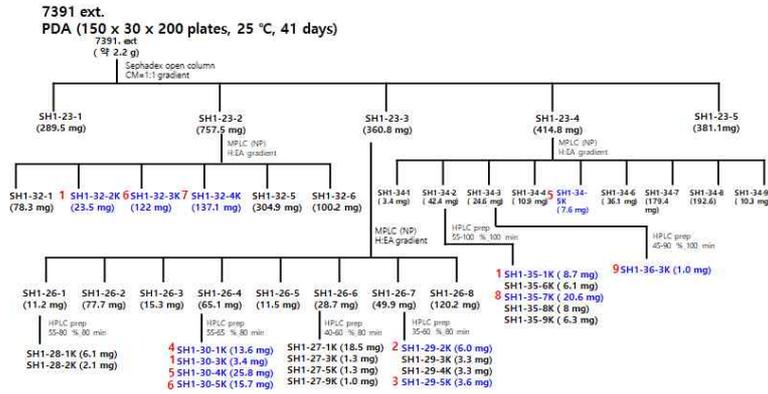


그림 9. 극지 균주 7391 추출물의 분리 scheme

- 9종의 물질 구조를 확인함. (compound 1, 5-methoxysteirgmatocystin; compound 2, 8-*O*-methylnidurufin; compound 3, 2-(2-methylbut-3-en-2-yl)-1*H*-indole-3-carbaldehyde; compound 4, brevianamide R; compound 5, 8-*O*-methylaverufin; compound 6, 6,7,9-trihydroxy-11-methoxy-2-methyl-3,4,5,6-tetrahydro-2*H*-anthra[2,3-*b*]oxocine-8,13-dione; compound 7, brevianamide Q; compound 8, averufin; compound 9, versicolorin B)

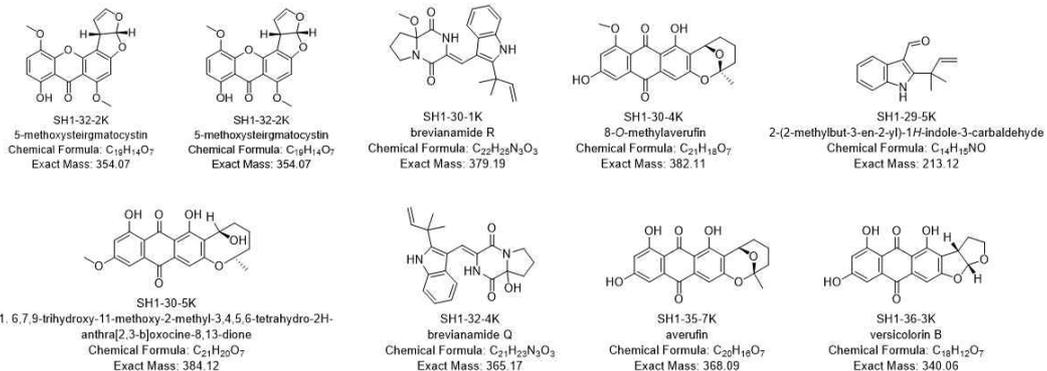


그림 10. 극지 균주 7391 추출물의 분리 물질 구조 및 정보

(다) 7366 균주 추출물에 대한 대사체 분리 및 구조 연구

- 추출물의 LC-MS/ELSD 분석을 진행하고 대사체를 표적화함(그림 11).
- 아래와 같은 scheme에 따라 추출물에서 활성물질 및 물질의 분리 정제를 진행함(그림 12).

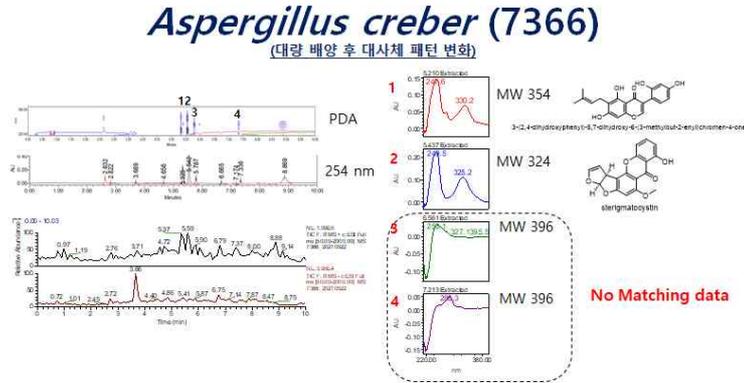


그림 11.. 대량배양 완료한 극지 균주 7366 추출물의 LC-MS/ELSD 분석 결과 및 target 선정

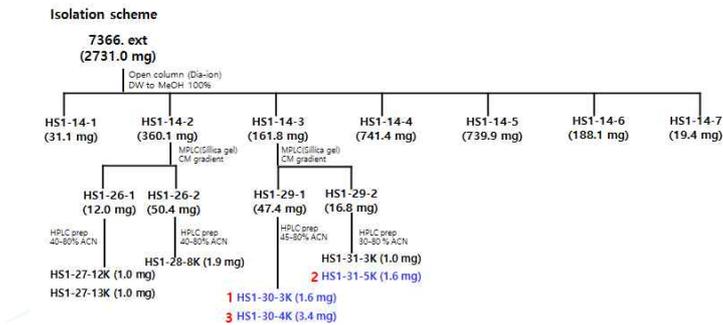


그림 12. 극지 균주 7366 추출물의 분리 scheme

- 2종의 물질 구조를 확인함. (compound 1, sclerotiamide; compound 2, sclerotiamide; compound 3, (+)-vesicolamide B)

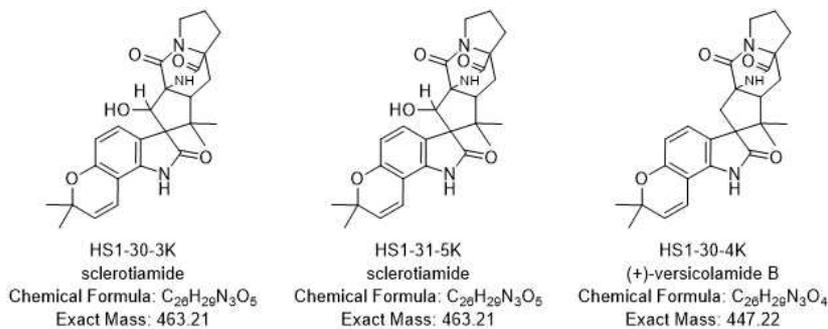


그림 13. 극지 균주 7366 추출물의 분리 물질 구조 및 정보

(라) 7401 균주 추출물에 대한 대사체 분리 및 구조 연구

- 추출물의 LC-MS/ELSD 분석을 진행하고 대사체를 표적화함(그림 14).
- 아래와 같은 scheme에 따라 추출물에서 활성물질 및 물질의 분리 정제를 진행함(그림 15).

## Penicillium maximiæ (7401)

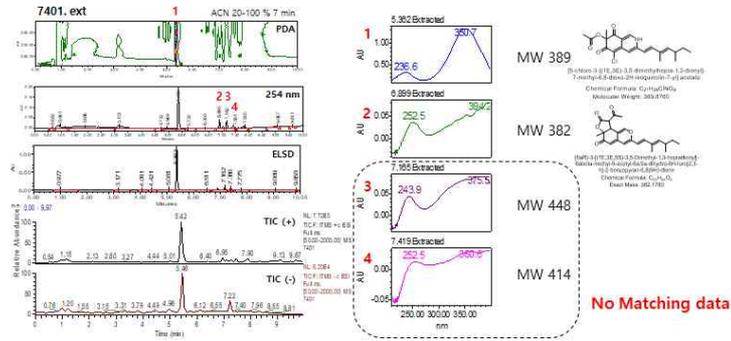


그림 14. 대량배양 완료한 극지 균주 7401 추출물의 LC-MS/ELSD 분석 결과 및 target 선정

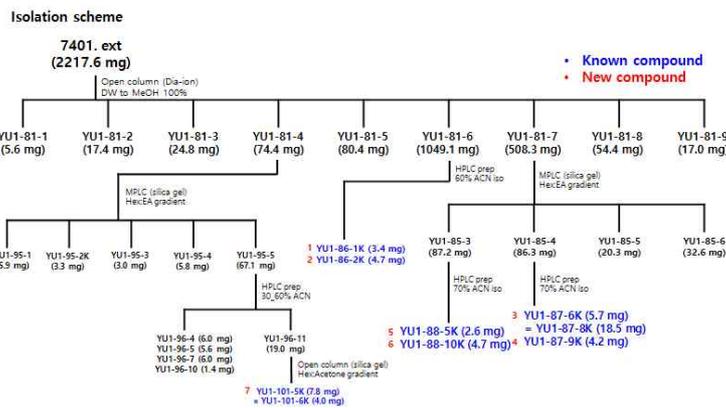


그림 15. 극지 균주 7401 추출물의 분리 scheme

- 7종의 물질 구조를 확인함. (compound 1, isochromophilone VI; ; compound 2, [5-chloro-3-[(1E,3E)-3,5-dimethylhepta-1,3-dienyl]-7-methyl-6,8-dioxo-2H-isoquinolin-7-yl] acetate; compound 3, ochrephilone; compound 4, RP-1551-5; 1-pentyl-8-oxa-3,6-diazabicyclo[3.2.1]octane-2,4,7-trione; compound 5, globosumin; compound 6, 5-chloroisorotiorin; compound 7, 1-pentyl-8-oxa-3,6-diazabicyclo[3.2.1]octane-2,4,7-trione)

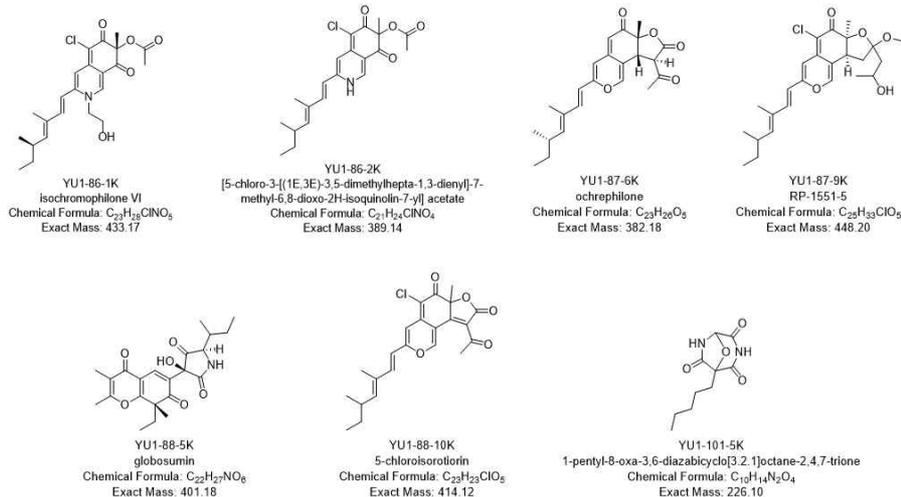


그림 16. 극지 균주 7401 추출물의 분리 물질 구조 및 정보

(바) 7367 균주 추출물에 대한 대사체 분리 및 구조 연구

- 추출물의 LC-MS/ELSD 분석을 진행하고 대사체를 표적화함(그림 17).
- 아래와 같은 scheme에 따라 추출물에서 활성물질 및 물질의 분리 정제를 진행함(그림 18).

### Aspergillus cvjetkovicii (7367)

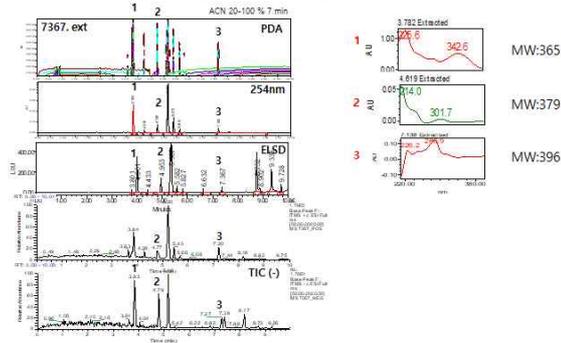


그림 17. 대량배양 완료한 극지 균주 7367 추출물의 LC-MS/ELSD 분석 결과 및 target 선정

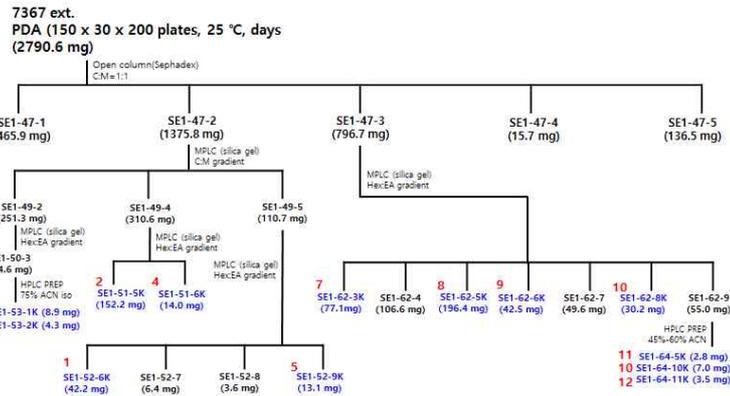


그림 18. 극지 균주 7367 추출물의 분리 scheme

- 12종의 물질 구조를 확인함. (compound 1, brevianamide Q; compound 2, brevianamide R; compound 3, 6,8-di-O-methylaverufin; compound 4, brevianamide K; compound 5, deoxybrevianamide E, compound 6, 6,8-di-O-methylaverufin; compound 7, sterigmatocystin; compound 8, 5-methoxysterigmatocystin; compound 9, aversin; compound 10, sydonic acid, compound 11, brevianamide V; compound 12, 6,8-di-O-methylnidurufin)

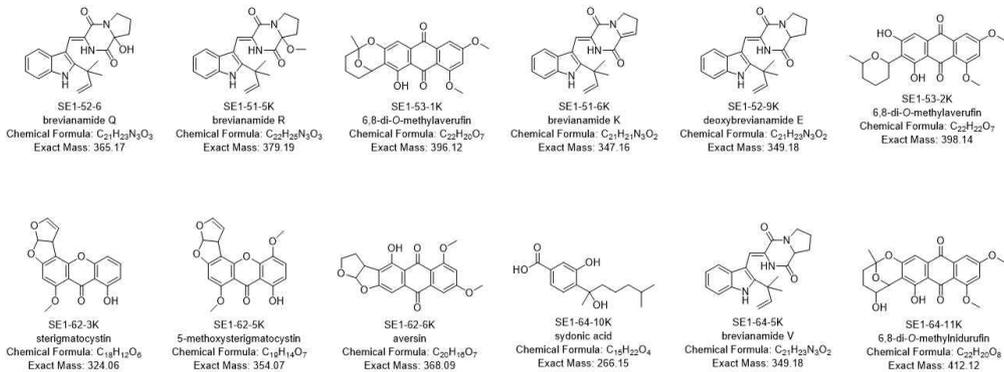


그림 19. 극지 균주 7367 추출물의 분리 물질 구조 및 정보

다. 시료 확보

- 2021년 극지연구소로부터 19종(strain Code. HS1-1-1 등)의 극지 곰팡이, 2종(strain NO. HS1-2-1 등)의 극지 지의류 추출물 및 20종(strain Code. HS1-32-1 등)의 극지 박테리아를 수령함(표 3, 4, 5).

표 3. 2021년 극지연구소로부터 수령한 19종의 극지 곰팡이

Code	Description	Identification
HS1-1-1	2018Arc#01-SW-1/2-04	<i>Verticillium</i> sp.
HS1-1-2	2018Arc#04-SW-1/2-07	<i>Simplicillium aogashimaense</i>
HS1-1-3	2018Arc#04-SW-2/2-07	<i>Simplicillium</i> sp.
HS1-1-4	2018Arc#05-SW-1/2-04	<i>Verticillium</i> sp.
HS1-1-5	2018Arc#05-SW-1/2-08	<i>Simplicillium lamellicola</i>
HS1-1-6	2018Arc#05-SW-1/2-10	<i>Simplicillium lamellicola</i>
HS1-1-7	2018Arc#P01-07	<i>Penicillium chrysogenum</i>
HS1-1-8	2018Arc#P01-08	<i>Aspergillus</i> sp.
HS1-1-9	2018Arc#P03-03	<i>Penicillium corylophilum</i>
HS1-1-10	2018Arc#P04-05	<i>Rhizoscyphus ericae</i>
HS1-1-11	2018Arc#P06-06	<i>Cladosporium colombiae</i>
HS1-1-12	2018Arc#P08-01	<i>Aspergillus</i> sp.
HS1-1-13	2018Arc#P19-02	<i>Uncultured fungus</i>
HS1-1-14	2018Arc#P27-10	Fungal sp.
HS1-1-15	2018Arc#P32-03	<i>Penicillium</i> sp.
HS1-1-16	2018Arc#P34-05	<i>Illosporium carneum</i>
HS1-1-17	2018Arc#P35-09	<i>Cladophialophora minutissima</i>
HS1-1-18	2018Arc#P36-01	<i>Penicillium chrysogenum</i>
HS1-1-19	2018Arc#P36-03	<i>Penicillium chrysogenum</i>

표 4. 2021년 극지연구소로부터 수령한 2종의 극지 유래 지의류 추출물 리스트

1	Description	Identification	Solvent
	2018Arc#P17	<i>Flavocetraria nivalis</i>	MeOH
2	Code	Activity	양
	HS1-2-1	Anticancer, Antifungal	206 mg
2	Description	Identification	Solvent
	2018Arc#P20	<i>Cladonia borealis</i>	MeOH
2	Code	Activity	양
	HS1-2-2	Anticancer, Antifungal	13 mg

표 5. 2021년 극지연구소로부터 수령한 20종의 극지 박테리아

Code	Description	Identification
HS1-32-1	27850	<i>Subtercola</i> sp. NBXE_s
HS1-32-2	27924	<i>Psychrobacter alimentarius</i>
HS1-32-3	27979	<i>Pseudomonas</i> sp. CP025263_s
HS1-32-4	28020	<i>Bacillus infantis</i>
HS1-32-5	FW02-150125-03	<i>Caballeronia</i> sp. CP014505_s
HS1-32-6	FW02-150125-06	<i>Sphingomonas</i> sp. SCIN_s
HS1-32-7	FW02-150125-09	<i>Sphingomonas glacialis</i>
HS1-32-8	FW02-150125-11	<i>Halpernia frigidisoli</i>
HS1-32-9	FW02-150125-12	<i>Mucilaginibacter</i> sp. CP014773_s
HS1-32-10	FW02-150125-14	<i>Halpernia frigidisoli</i>
HS1-32-11	FW02-150125-15	<i>Mucilaginibacter rigui</i>
HS1-32-12	FW02-150125-21	<i>Sphingomonas glacialis</i>

HS1-32-13	FW02-150125-23	<i>Rugamonas rubra</i>
HS1-32-14	FW02-150125-24	<i>Pseudomonas antarctica</i>
HS1-32-15	FW02-150125-26	<i>Halpernia frigidisoli</i>
HS1-32-16	FW02-150125-27	<i>Subtercola</i> sp. NBXE_s
HS1-32-17	FW02-150125-31	<i>Rhodanobacter ginsengisoli</i>
HS1-32-18	FW02-150125-32	<i>Sphingomonas glacialis</i>
HS1-32-19	FW02-150125-40	<i>Halpernia frigidisoli</i>
HS1-32-20	FW02-150125-42	<i>Pedobacter paludis</i>

라. 연구 수행방법

(1) 극지 미생물의 추출물 제조

- 총 19종의 극지 미생물을 Potato dextrose agar 배지에 25 °C 조건에서 약 20일간 배양하고, 배양된 극지 미생물을 MeOH를 이용하여 추출하고 여과 후 농축함. 이를 다시 증류수에 현탁시킨 후 같은 양의 EtOAc로 용매 분획을 실시함.

(2) LC/MS 대사체 분석조건 및 molecular networking 분석조건 확립

- 추출물을 MeOH에 녹여 0.2 μm의 membrane filter로 필터 후 LC/MS Waters UPLC/Ion trap (IT) MS로 분석하여 metabolite가 충분히 분리되고 검출될 수 있는 최적의 분석조건을 확립함(그림 20).

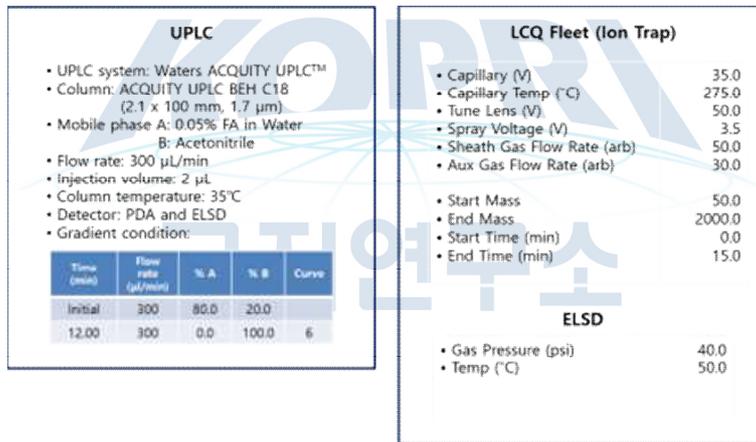


그림 20. 최적의 LC-IT-MS/ELSD 분석조건

- MS/MS 기반 molecular networking 분석을 위한 최적의 parameter 조건을 확립함(그림 21).

✓ 다음과 같은 분석조건을 이용하여 molecular networking 분석을 실시함.

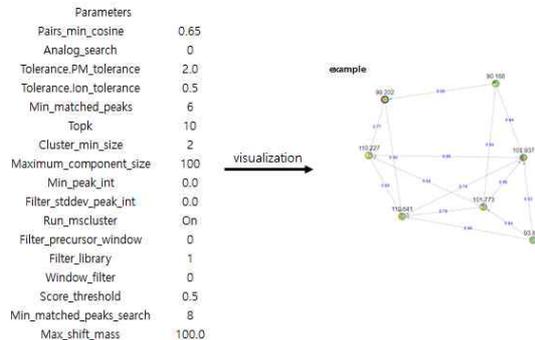


그림 21. Molecular networking 분석을 위한 parameter 조건

마. 연구 결과

(1) 극지 미생물의 추출물에 대한 대사체 분석 결과

- 극지연구소로부터 수령한 총 19종의 균주 중 9종 균주 추출물에 대한 분석을 진행함(나머지 10종의 균주는 잘 자라지 않음.).
- 분석한 9종의 추출물에서 특이적 대사체가 존재하지 않는 것으로 판단하여, 대량배양 및 분리 정제를 진행하지 않음.

(2) 극지 지의류 추출물에 대한 대사체 분석 결과

- 극지연구소로부터 수령한 총 2종의 지의류 추출물에 대한 분석을 진행함.

(가) HS1-2-1 (2018Arc#P17, *Flavocetraria nivalis*)

① 문헌조사 결과

- *Flavocetraria nivalis*(=*Cetraria nivalis*) : associate with green algae as photobionts.
- 분류 : *Cetraria*-Parmeliaceae-Lecanorales-Lecanoromycetes-Ascomycota-Fungi
- DB searching 결과 : *Flavocetraria nivalis*에 대해 40(Scifinder), 0(Reaxys)개, *Cetraria nivalis*에 대해 37(Scifinder), 1(Reaxys)개, *Flavocetraria sp.*에 대해 61(Scifinder), 0(Reaxys)개, *Cetraria sp.*에 대해 701(Scifinder), 58(Reaxys)개의 문헌이 존재함.
- 또한, 물질 분리 연구에 대해서는 지의류에서 많이 발견되는 usnic acid와 anthraquinone 계열의 물질이 보고되었음.

② UPLC-MS/ELSD 분석 결과

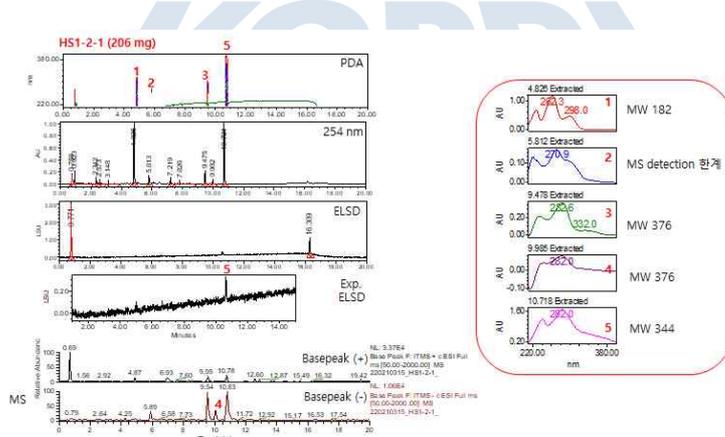


그림 22. HS1-2-1 추출물의 UPLC-MS/ELSD 분석 결과

③ 대사체 de-replication 결과

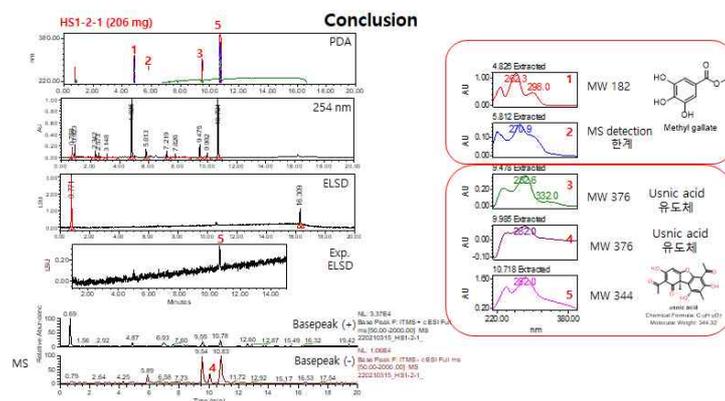


그림 23. HS1-2-1 추출물 내 대사체의 de-replication 결과

④ 추출물 molecular networking 분석 결과

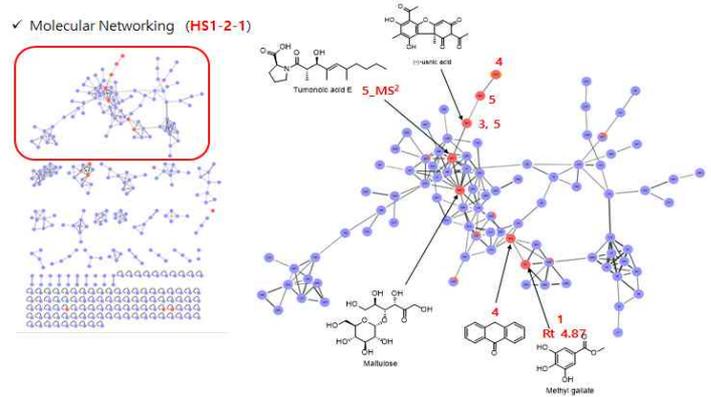


그림 24. HS1-2-1 추출물 molecular networking 분석 결과

(나) HS1-2-2 (2018Arc#P20, *Cladonia borealis*)

① 문헌조사 결과

- *Cladonia borealis* : known as boreal cup lichen.
- 분류 : *Cladonia*-Cladoniaceae-Lecanorales-Lecanoromycetes-Ascomycota-Fungi
- DB searching 결과 : *Cladonia borealis*에 대해 21(Scifinder), 0(Reaxys)개, *Cladonia* sp.에 대해 1,696(Scifinder), 161(Reaxys)개의 문헌이 존재함.
- 극지 지의류 및 DNA sequencing 관련 논문이 다수 존재.
- 또한, 물질 분리 연구에 대해서는 지의류에서 많이 발견되는 usnic acid와 anthraquinone 계열의 물질이 보고되었음.

② UPLC-MS/ELSD 분석 결과

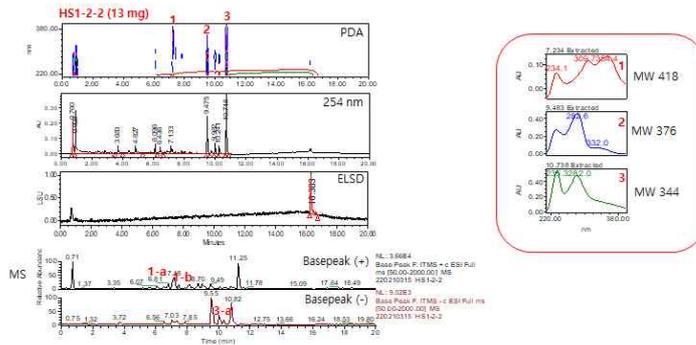


그림 25. HS1-2-2 추출물의 UPLC-MS/ELSD 분석 결과

③ 대사체 de-replication 결과

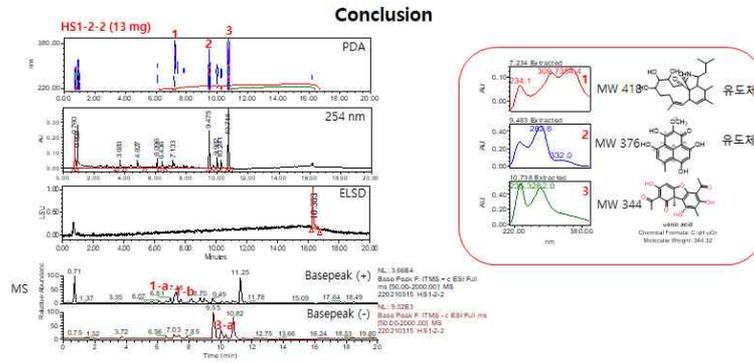


그림 26. HSI-2-2 추출물 내 대사체의 de-replication 결과

④ 추출물 molecular networking 분석 결과

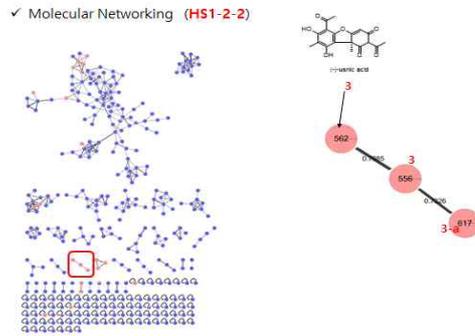


그림 27. HSI-2-2 추출물 molecular networking 분석 결과

(3) 극지 유래 박테리아의 최적 배양조건 탐색결과

- 극지연구소로부터 수령한 총 20종의 균주에 대한 최적 배지 선정을 위해, Reasoner's 2A(R2A), Trypsin Soy Broth(TSB) 액체 배양을 실시하고, 최적 배양 온도 선정을 위해 10 °C, 28 °C 조건에서 배양하였음(그림 28).
- 그 결과, 다양한 배양조건에 따라 박테리아를 배양하였으나, 모든 실험구에서 특이적 대사체가 분석되지 않아 대량배양 및 분리 정제를 진행하지 않음.

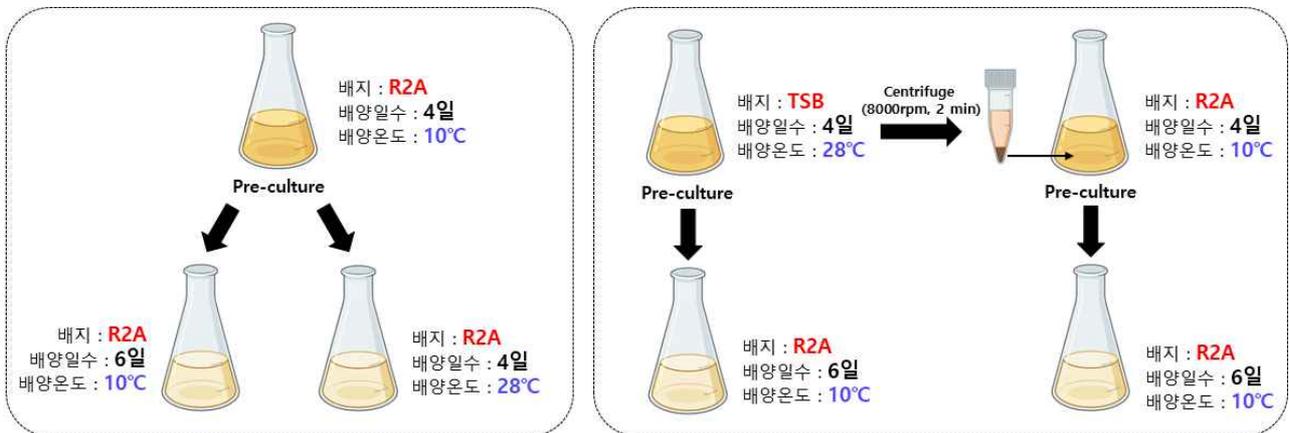


그림 28. 극지 유래 박테리아 최적 배양조건 탐색 모식도

바. 시료 확보

- 2021년 극지연구소로부터 11종(strain Code. SH1-67-1 등)의 극지 균주를 추가 수령함(표 6).

표 6. 2021년 극지연구소로부터 수령한 11종의 극지 균주

Code	Description	Identification
SH1-67-1	2018Arc#P01-04	<i>Aspergillus</i> sp.
SH1-67-2	2018Arc#P27-03	Fungal sp.
SH1-67-3	2018Arc#P03-06	<i>Paecilomyces hepiali</i>
SH1-67-4	2018Arc#P03-04	<i>Penicillium</i> sp.
SH1-67-5	2018Arc#04-SW-2/2-04	<i>Simplicillium lamellicola</i>
SH1-67-6	2018Arc#05-SW-1/2-05	<i>Simplicillium lamellicola</i>
SH1-67-7	2018Arc#P02-05	<i>Trichoderma</i> sp.
SH1-67-8	2018Arc#01-SW-1/2-03	Uncultured Dikarya
SH1-67-9	2018Arc#04-SW-1/2-06	Uncultured Dikarya
SH1-67-10	2021-#KSJ05-01	<i>Cladosporium bruhnei</i>
SH1-67-11	2021-#KSJ02-01	<i>Thelebolus stercoreus</i>

사. 연구 결과

(1) 극지 미생물의 추출물에 대한 대사체 분석 결과

- 극지연구소로부터 수령한 총 11종의 균주 중 8종 균주 추출물에 대한 분석을 진행함(나머지 3종의 균주는 잘 자라지 않음.).
- 분석한 9종의 추출물 중 2종(SH1-67-5, SH1-67-8)의 추출물에서 신규 활성 물질을 함유하고 있을 가능성이 높아, 대량배양하여 물질을 분리할만한 가치가 있다고 판단함.

(2) MS fragmentation 기반 분자네트워크(Molecular networking) 분석기법을 통하여 선정된 유용 극지 미생물의 대량배양 및 표적화된 신규 활성 대사체 분리 및 구조 연구(targeted isolation)

(가) SH1-67-5 균주 추출물에 대한 대사체 분리 및 구조 연구

- 아래와 같은 scheme에 따라 추출물에서 활성물질 및 물질의 분리 정제를 진행함(그림 29).

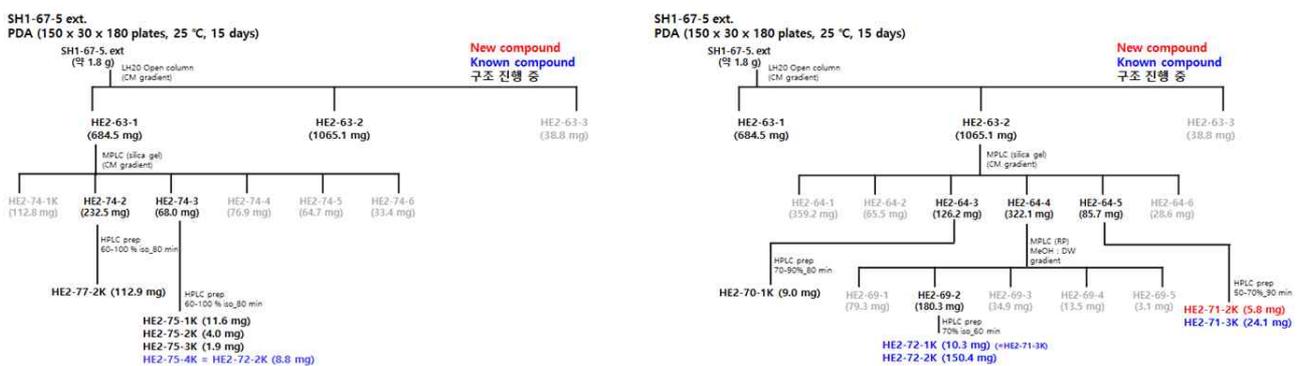


그림 29. 극지 균주 SH1-67-5 추출물의 분리 scheme

- 물질의 분리 정제 결과, 추출물의 주성분인 fusidic acid 분리함(그림 30).

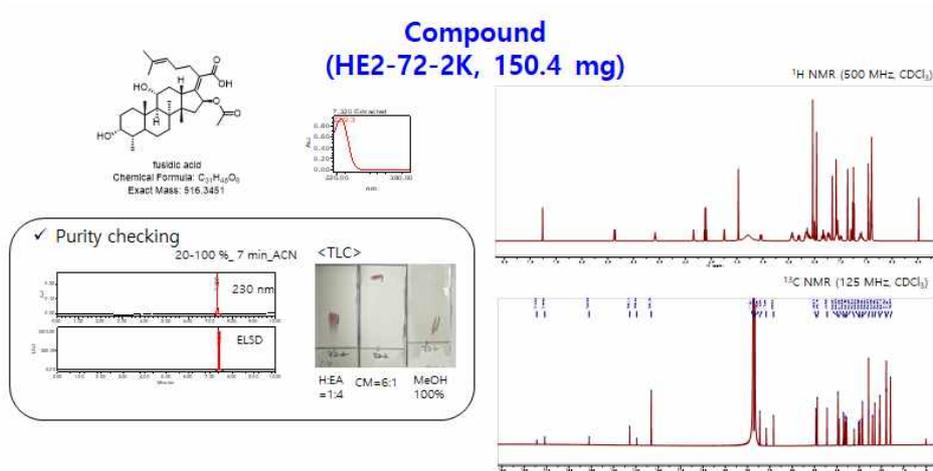


그림 30. 극지 균주 SH1-67-5 추출물의 주성분 분리결과

(나) SH1-67-8 균주 추출물에 대한 대사체 분리 및 구조 연구

- 추출물의 LC-MS/ELSD 분석을 진행하고 대사체를 표적화함(그림 31).
- 아래와 같은 scheme에 따라 추출물에서 활성물질 및 물질의 분리 정제를 진행 중임(그림 32).

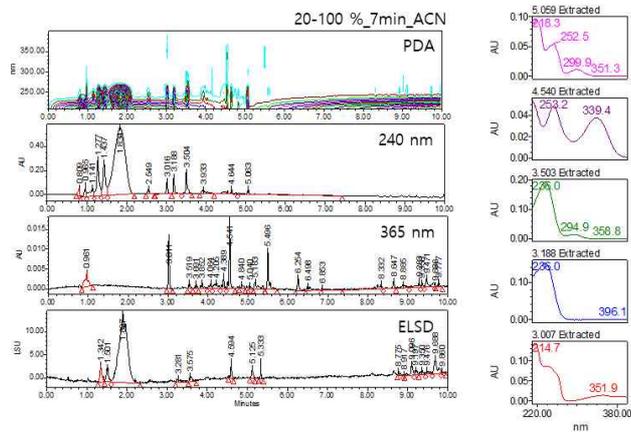


그림 31. SH1-67-8 추출물의 UPLC-MS/ELSD 분석 결과

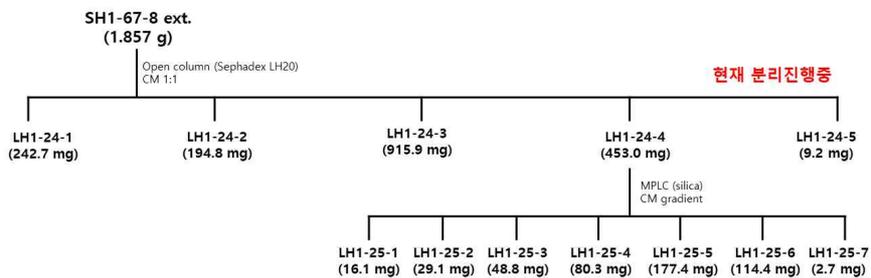


그림 32. SH1-67-8 추출물의 분리 scheme

아. 결론 및 제언

- 극지 유래 미생물 및 지의류를 대상으로 추출물을 제작하여 각 추출물의 LC-MS 프로파일링(profiling) 분석 및 MS fragmentation 기반 분자네트워킹(Molecular networking) 분석기법을 통하여 추출물을 선정하였음.
- 극지 유래 추출물의 UV spectrum, MS spectrum를 확보하였고 기존 문헌과의 비교 및 분자네트워킹(Molecular networking) 분석을 통해 예측된 대사체의 DB를 구축함.
- 선정된 5종의 추출물 내 특이적 대사체 구조 특성 분석 및 표적화(targeting)를 통해 대사체를 분리하였음.
- 분리된 대사체들을 다양한 분광학 분석기법을 이용하여 구조를 규명하였음.



## 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

### 제 1절 연차별 연구개발목표 달성도

년도	성과목표	세부목표	가중치	달성율(%)
1차년도(2020)	1. 대사체 분석 및 분자네트워킹 기법 기반 극지미생물 유래 바이오소재 발굴	LC-MS를 이용한 추출물의 대사체 분석(metabolomics)을 통한 유용 극지 미생물 추출물 선정(prioritizing) 및 DB화	25	100
		MS fragmentation 기반 분자네트워킹(Molecular networking) 분석기법을 통하여 선정된 추출물 내 특이적 대사체 구조 특성 분석 및 표적화(targeting)	25	
		선정된 유용 극지미생물의 대량배양 및 표적화된 신규 활성 대사체 분리 및 구조 연구(targeted isolation)	50	
2차년도(2021)	2. 대사체 분석 및 분자네트워킹 기법 기반 극지미생물 유래 바이오소재 발굴	LC-MS를 이용한 추출물의 대사체 분석(metabolomics)을 통한 유용 극지 미생물 추출물 선정(prioritizing) 및 DB화	25	100
		MS fragmentation 기반 분자네트워킹(Molecular networking) 분석기법을 통하여 선정된 추출물 내 특이적 대사체 구조 특성 분석 및 표적화(targeting)	25	
		선정된 유용 극지미생물의 대량배양 및 표적화된 신규 활성 대사체 분리 및 구조 연구(targeted isolation)	50	
3차년도(2022)	3. 대사체 분석 및 분자네트워킹 기법 기반 극지미생물 유래	LC-MS를 이용한 추출물의 대사체 분석(metabolomics)을 통한 유용 극지 미생물	25	100

	바이오소재 발굴	추출물 선정(prioritizing) 및 DB화		
		MS fragmentation 기반 분자네트워킹(Molecular networking) 분석기법을 통하여 선정된 추출물 내 특이적 대사체 구조 특성 분석 및 표적화(targeting)	25	
		선정된 유용 극지미생물의 대량배양 및 표적화된 신규 활성 대사체 분리 및 구조 연구(targeted isolation)	50	



## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- ✓ 극지 유래 미생물의 LC-MS를 이용한 추출물의 대사체 분석(metabolomics)을 통한 유용 극지 미생물 추출물 선정(prioritizing) 및 DB화와 MS fragmentation 기반 분자네트워킹(Molecular networking) 분석기법을 통하여 선정된 추출물 내 특이적 대사체 구조 특성 분석 및 표적화(targeting)를 통한 분리 결과를 바탕으로 대사체를 미리 예측하여 신규 활성 물질 또는 유용 활성물질을 탐색하여 효용성이 높은 균주를 선택하는 데 도움을 준다.
- ✓ 선정된 유용 극지 미생물의 대량배양 및 표적화된 신규 활성 대사체 분리정제 연구를 위한 토대를 마련할 수 있으며, 극지 미생물 기반 천연물 신약개발에 있어 선도 물질을 신속히 확보하는데 기여하며, 이를 통해 우선권을 선점할 수 있다.



## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

✓ 없음.



## 제 7 장 참고문헌

- David and Gordon, *J. Nat. Prod.* **2007**, 70(3), 461-477.
- Rateb and Ebel, *Nat. Prod. Rep.* **2011**, 28, 290-344.
- Shi et al., *Microbiol.* **2021**, 12, 688202.



## 뒷 면

### 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.

국문 표기

- 이 연구는 극지연구소의 지원을 받아 수행되었습니다.(본과제 계정번호\*)

\* 본과제 계정번호: 극지연구소에서 부여한 과제번호로 연구소 연구관리담당부서에 확인

영문 표기

- This work was supported by the Korea Polar Research Institute (KOPRI, 본과제 계정번호)

\* 연구결과의 발표 내용에 따라 위의 표기방식을 변경할 수 있으나, 밑줄 친 내용이 반드시 포함되어야 함

극지연구소