

## 극지 해양미생물 다양성 및 추출물 DB 확보

Study for the establishment of marine microbial diversity and  
extracts from the polar environments



신라대학교 산학협력단

# 제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “극지생물 유래 유용 대사체 활용기반구축에 관한 연구” 과제의 위탁연구  
“극지 해양미생물 다양성 및 추출물 DB 확보에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.



총괄연구책임자 : 임 정 한

위탁연구기관명 : 신라대학교 산학협력단

위탁연구책임자 : 손 재 학

위탁참여연구원 : 손 재 영

“ : 최 유 리

“ : 오 현 정

“ : 강 민 주

“ : 손 유 진



# 요 약 문

## I. 제 목

극지 해양 미생물 다양성 및 추출물 DB 확보

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구의 목적

생리활성물질 탐색의 미개척 자원인 극지생물자원으로부터 극지 해양 미생물의 확보 및 생리활성물질을 발굴을 통한 신규해양바이오소재개발을 위한 기초 자료 제공

### 2. 필요성

- 신약개발에서 screening을 위한 library 구축에 있어서 보유하고 있는 화합물의 수가 중요한 것이 아니고, 보유하고 있는 화합물의 구조적 특징 및 화학 구조를 형성하는 골격의 다양성이 중요하다는 사실을 시사하고 있음.
- 다양한 골격의 화학적 다양성을 천연자원유래 이차대사물질로부터 제공 받기 위해서는 이미 상대적으로 활발하게 생리활성물질 탐색연구가 진행된 육상생물에 대한 연구보다는 아직까지 많은 연구가 진행되지 않은 자원에 대한 연구가 최근 관심의 대상이 되고 있다.
- 극지 해양유래의 천연물은 그 구조가 육상에서 분리되는 물질과 상이한 경우가 많음으로 신약 스크리닝시 중요한 요소로 인식되는 분자구조의 다양성 구축면에서 장점을 지니고 있다고 판단된다.
- 극한 지역에 서식하는 해양생물은 위에서 언급한 해양생물자원으로서 가지

는 고유의 특징에 추가하여 양극해 지역의 독특한 극한환경 및 생태환경이 이 지역에 서식하는 해양생물의 이차대사물질 생합성 과정에 영향을 유발했을 것으로 예상되므로 매우 독특한 생물자원으로 인식될 수 있다.

- 최근 해양생물로부터 얻어진 활성물질을 극지 미생물에 의해 생산되는 경우가 많고 숙주생물과 공생을 하는 미생물로부터 생리활성물질이 발견되는 기회의 많으며 이는 산업화를 위한 대량생산에 이점을 가지고 있음
- 따라서 본 과제에서는 극지 해양 미생물을 분리·보존하고, 미생물배양체로부터 제작된 추출물로부터 질병치료 및 기능성 소재의 유효한 타겟으로 인식되고 있는 효소 등을 이용하여 생리활성 탐색하여 DB하는 데 목적을 두고 있다.



### III. 연구개발결과

#### 1. 극한 해양미생물의 확보

- 남극 해양자원으로부터 극한 해양미생물인 세균 (73 균주) 및 진균 (52 균주)을 분리·보존하였다.

#### 2. 극지 해양미생물로부터 추출물 구축

- 52종의 진균은 PDA배지에서 배양하였으며 이후 ethyl acetate를 이용하여 추출물을 확보하였다.
- 확보된 추출물은 신규천연물 및 대사체연구를 위한 공동연구팀에게 제공하였다.

#### 3. 극지 해양미생물유래 추출물의 생리활성 검색

- 항당뇨 및 비만 등을 위한 검색법인 PTP1B 저해활성을 검색한 결과 총 52점의 추출물 시료중 6점의 시료에서 농도 의존적으로 강력한 PTP1B 억제 효과를 보였으며 향후 추가적인 연구를 진행할 예정이다.

#### 4. 극지 해양미생물의 특성 및 분류

- 세균과 진균의 온도별 성장특성을 조사한 결과, 진균은 52균주 중 29균주에서 내냉성을 그리고 세균은 73균주 중 16균주에서 저온성 특성을 보였다.
- 분리된 진균인 52균주는 ITS rRNA 및 염기서열분석을 통하여 동정되었으며 그 결과 12개 속(genus)으로 구성되어 있음을 확인하였다.

#### IV. 연구개발결과의 활용계획

- 극지 생물로부터 분리된 극지 해양미생물, 추출물 및 생리활성검색자료를 바탕으로 신규소재발굴을 위한 원천생명자원으로 활용
- 확보된 극지 해양미생물 자원으로부터 생리활성소재의 발굴을 통한 논문투고 및 특허를 확보함으로써 신규자원의 우선권확보
- 극지 해양미생물로부터 얻어진 자료의 DB를 구축하여 국내연구진과 공동연구를 통한 원천기술 및 응용을 통한 산업화 촉진



# SUMMARY

## **Title of project**

Study for the establishment of marine microbial diversity and extracts from the polar environments

## **Goal and necessity of research**

### **1. Goal**

To provide new materials for the development bio-functional products through the investigation of new bioactive compounds from unexplored symbiotic microorganisms isolated from polar marine organisms.

### **2. Necessity**

- It has been recognized that the construction of compounds library with a wide variety of compounds with unique skeletons are for more important that a number of compound in drug discovery program.
- To access a diverse metabolites for druge discovery program, it is necessary to investigated new or rarely studied natural resources rather than reinvestigating traditional bioresources such as plants and soil microbes.
- In a line with the above concept, it could be suggested that marine microorganism from polar oceans are potential resources for novel secondary metabolites because of their little expose to this field.
- In addition, it has been suggested that organisms in polar oceans might develop unique biosynthetic pathways to adapt their extreme environments.

- Moreover, the origin of many secondary metabolites from marine organisms are now being suggested to be microorganisms, suggesting their potential as new sources of biofunctional materials with easy large production.
- Therefore, this project is aiming to
  - isolate and identify microorganisms from marine organisms of polar oceans
  - prepare solvent extracts from the cultures of microorganisms.
  - carry out the screening of solvent extracts using druggable bioassay system

## **Results of the project**

1. Microorganisms such as bacteria (73 strain) and fungi (52 strain) were isolated from the marine organisms of Antarctic ocean.
2. The ethyl acetate extracts of 52 fungal strain were prepared from the cultures, incubated on potato-dextrose agar plate at 10~20°C.
3. In the screening of the 52 extracts for their inhibitory effects against PTP1B activity, 6 extracts displayed strong inhibitory activity, and these extracts will be subjects of further investigation.
4. From the phylogentic analysis based on ITS rRNA gene sequence, 52 fungal strain were tentatively identified.

# CONTENTS

Chapter 1. Introduction -----	11
Chapter 2. Technical status of domestic and foreign states -----	13
Chapter 3. Contents and results of the project -----	18
Chapter 4. Achievement and contribution of the project -----	37
Chapter 5. Application plans of the results -----	39



# 목 차

제 1 장 서론	11
제 2 장 국내외 기술개발 현황	13
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	18
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	37
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	39



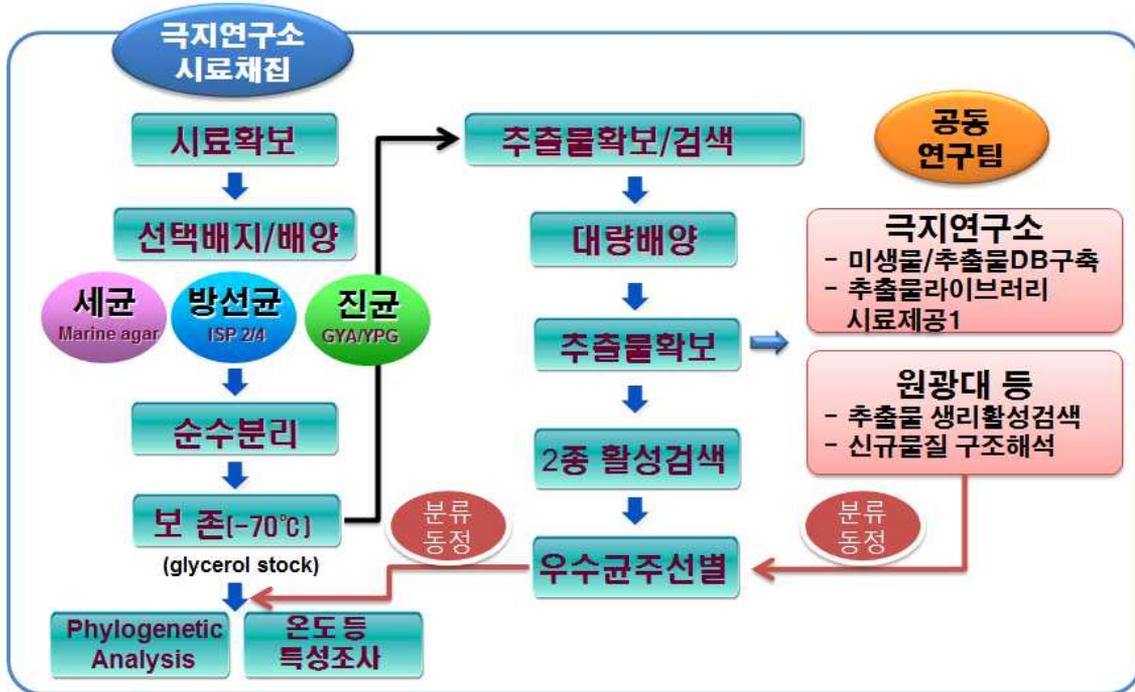
# 제 1 장 서론

## 제 1 절 연구개발의 목적

- 극지 해양미생물의 다양성 확보 및 추출물을 구축하고 대사성 질환을 타겟으로 생리활성을 검증하여 해양자원활용을 위한 DB를 구축하는 것을 목적으로 하고 있음
- 구축된 DB는 본사업의 공동연구기관들에게 추출물 및 생물자원을 제공함으로써 사업의 성과물을 확산하도록 지원

## 제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위

- 해양유래의 천연물은 그 구조가 육상에서 분리되는 물질과 상이한 경우가 많음으로 신약 스크리닝시 중요한 요소로 인식되는 분자구조의 다양성 측면에서 장점을 지니고 있음.
- 양극해 지역의 독특한 극한환경 및 생태환경이 이 지역에 서식하는 해양생물의 이차대사 물질 생합성 과정에 영향을 미치고 있으며 특히, 이러한 대사산물은 공생미생물과 밀접한 상관관계가 밝혀짐으로서 공생미생물에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히, 극한미생물은 고등생물보다 생산성 측면에서 높은 산업적인 활용성을 가지고 있음
- 따라서 본 연구에서는 남극 해양생물로부터 극한 해양미생물자원의 다양성을 확보하고 배양체로부터 얻어진 추출물을 구축하고 그 활용성을 높이기 위한 생리활성검색을 통한 DB를 구축하는데 그 목적이 있다.



○ 연구개발 내용 및 범위

연구개발목표	연구개발내용	연구범위
○ 극지 환경으로부터 미생물(세균, 방선균, 진균)의 분리 및 확보	<ul style="list-style-type: none"> <li>극지 환경으로부터 미생물(세균, 방선균, 진균)의 분리 및 확보</li> <li>-극지 시료로부터 5종의 배지를 이용한 극지미생물 분리 및 순수배양체 확보</li> <li>-미생물 확보목록 (세균, 방선균, 진균) 제시/기탁</li> </ul>	- 50균주 이상의 분리/보존균주 확보 여부
○ 극지 해양미생물 유래 추출물 확보	<ul style="list-style-type: none"> <li>극지 해양미생물 유래 추출물 확보</li> <li>-고체배지를 통한 대량배양체 확보 및 ethyl acetate를 이용한 추출 및 농축</li> <li>-추출물 확보목록(질량 등) 제시/DB 구축</li> <li>-추출물을 대상으로 항당뇨(PTP1B) 저해 활성 탐색</li> <li>-극지연구소 대사체 연구를 위한 시료 제공</li> <li>-원광대 등 천연물 연구를 위한 시료 제공</li> </ul>	- 50점 이상의 추출물 DB 구축 여부
○ 형태/분자생물학적 방법에 의한 우수균주의 분류 동정	<ul style="list-style-type: none"> <li>형태/분자생물학적 방법에 의한 우수균주의 분류 동정</li> <li>-우수 생리활성(자체/공동연구팀 자료 근거) 및 저온미생물 선별</li> <li>-형태/분자생물학적 방법에 의한 우수균주의 분류 동정</li> </ul>	- 우수균주의 분류 동정 여부

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1. 개요

- 바이오 신의약 산업은 차세대 우리나라의 성장 동력산업이며, 특히 해양생물 산업은 국가 경제의 중추적 역할을 할 미래의 성장산업임.
- 천연자원으로부터 분리된 순수 화합물이나 추출물 혹은 부분 정제된 생리활성 분획물을 이용한 기능성 식품 또는 신약개발은 높은 투자 효율성 및 고부가가치 산업으로 평가되고 있음.
- 육상생물로부터의 생리활성물질 탐색은 활발히 이루어져 많은 부분이 제품화되어 있으나, 양극해 해양생물자원에 대해서는 깊은 연구가 이루어지지 않아 미지의 개발요소가 많음.
- 기능성 소재나 신약 개발에 있어서 성패는 질적, 양적으로 우수한 화합물 또는 추출물 라이브러리를 확보했는지의 여부에 달려 있으며, 양극해 해양생물/미생물 유래의 추출물이나 화합물구축은 미래 핵심 산업인 신약후보 물질을 제공 할 수 있는 매우 중요한 자원으로 인식되고 있음.
- 양극해 해양미생물 및 그 추출물 그리고 기타 연구정보에 대한 국내 연구자들의 체계적인 접근은 전무한 실정이며 공동 연구자들이 근접할 수 있는 해양미생물 및 추출물을 구축하고 그 활용성을 극대화하기 위한 system을 구축 할 필요가 있음
- 신약개발의 여러 단계 중 특정 질병에 대한 치료를 위한 분자표적이 정해진 후 분자표적에 작용하는 선도 화합물을 도출하기 위하여 다양한 종류의 화합물 library를 검색 하게 되는 단계 (target selection 및 screening 단계)는 전체적인 신약개발 과정에서 매우 중요한 출발점이라 할 수 있음
- 특히 인간 유전체 연구와 더불어 현대 과학에서는 인간의 질병, 예방 및 진단과 관련된 천~만개 정도의 새로운 표적 단백질이 새로이 규명된 것으로 평가되고 있으며, 고속 혹은 초고속 스크리닝 방법의 발전에 의하여 일회에 수천종의 화합물에 대한 분자표적을 대상으로 한 활성 탐색이 가능 하므로 더 이상 분자 표적을 대상으로 한 탐색 단계 자체는 신약 개발과정에 있어서 많은 시간과 노력이 필요한 속도결정 단계가 아니며 오히려 이러한 스크리닝 시스템에 적용할 화합물 라이브러리의 질 및 양이 신약 개발의 성공에

있어서 중요한 요소로 간주됨

- 다양한 분자표적에 작용하는 생리활성 물질의 창출을 위한 스크리닝 단계에서 필요한 다양한 분자의 확보는 전 세계적으로 관심을 가지고 추구할 분야가 될 것임
- 최근 생명공학기술이 급진적으로 발전하고 생물자원의 활용 방안이 광범위하게 가속화 되면서, 세계 각국은 자국의 생물자원에 대한 network체제 구축을 중요시하고 있음
- 세계 인구의 지속적 증가와 경제수준의 향상으로 건강에 대한 관심이 고조하여 난치병에 대한 치료제 개발 등 의약산업과 건강식품, 기능성 식품산업은 지속적으로 성장 할 것으로 예상 되며 따라서 양극해 해양자원의 활용도 극대화 및 재산권 확보의 측면에서 우리나라도 시급히 구축해야 할 필요가 있다고 판단됨

## 2. 기술동향

### □ 국외기술동향

- 체계적인 해양생물을 대상으로 한 연구는 식물 등 육상 생물계에 대한 연구에 비해 상당히 늦은 1970년대 중반에 시작 되었으며 약 2500여종의 새로운 물질 1977-1987년 사이에 이 해양생물로 부터 분리된바 있으며 이는 해양생물체가 주요한 신물질의 보고로서 가치고 가지고 있음을 보여주는 증거라 볼 수 있다.
- 해양유래의 천연물은 그 구조가 육상에서 분리되는 물질과 상이한 경우가 많음으로 신약 스크리닝시 중요한 요소로 인식되는 분자구조의 다양성 측면에서 장점을 지니고 있다고 판단된다.
- 특히 양극해 지역에 서식하는 해양생물은 위에서 언급한 해양생물자원으로서 가지는 고유의 특징에 추가하여 양극해 지역의 독특한 극한환경 및 생태환경이 이 지역에 서식하는 해양생물의 이차대사물질 생합성 과정에 영향을 유발했을 것으로 예상되므로 매우 독특한 생물자원으로 인식될 수 있다.
- 뉴질랜드의 캔터베리 대학의 연구진은 지난 수년간 남극해양 유래의 해양생물을 대상으로 한 이차대사물질을 지속적으로 수행하고 있으며 대표적으로 강력한 CDK 저해제인 variolins를 발굴한 바 있다.
- 미국 Univ. of South Florida의 연구진은 남극유래의 Tunicate로부터 항암세포 사멸효과를 가지는 palmerolide A라는 신규 macarolide형 대사체를 분리하였다.

○ 기타 국가별 극한해양자원/추출물구축 현황

● 미국

- 1958년부터 NCI (국립암연구소, www.nci.nih.gov)를 주축으로 천연물 유래 항암제 개발을 위한 연구 사업을 본격적으로 추진하여 1986년부터 약 5만 여종의 식물 추출물과 만 여종의 해양생물 유래 추출물 은행을 구축하고 분양사업을 실시하고 있음
- 주목으로부터 개발한 “Taxol”은 연간 12억 달러 이상의 매출을 기록하고 있으며 최근에도 AIDS 바이러스에 대한 치료가능성이 있는 화합물을 발굴
- 미국의 국립암연구소(NCI)에서는 항암제를 생산하는 해면과 이끼벌레를 해저에서 대 규모로 양식하여 해당물질을 대량으로 확보하는 단계에 돌입
- 미국의 제약회사인 Lilly group, Corey group, Merck사 등에서도 천연물을 이용한 신약개발 프로젝트를 진행하고 있음

● 독일

- 독일은 천연물 분야에 집중적인 투자와 연구를 시작하여 버드나무로부터 아스피린을 개발한바 있으며 은행잎으로부터 ginkoflavone glycoside를 분리 개발한 혈액순환 개선제는 연간 약 20억 달러이상의 매출을 기록하고 있으며 최근 정부주도하에 “Natural Product Pool”을 시작하여 천연물 성분물질과 유도체를 수집하여 대단위생리활성 검색을 통하여 신의약품, 신농약 등의 개발 사업을 시작

● 일본

- 1990년 의약품진흥기금설치, 1991년 Human Science 진흥재단 발족, 1992년 Pharma Dream 계획 개시 등 천연물 분야에 적극적인 연구개발 투자 중임
- 현재는 미생물, 해양생물 등의 천연자원으로부터 활성물질분리, 열대식물로부터 활성물질 분리 등에 적극적인 투자 중임

● 호주

- CSIRO, AIMS, New South Wales Univ. 등 연구기관: 자국 및 아세안 국가 연안의 해양생물로부터 항암제 등 신의약품과 신기능성 유용소재 생산연구를 진행 중임
- 특히 AIMS에서는 세계에서 가장 규모가 큰 해양추출물 library를 보유 (2만 여종)하고 있음

● 싱가포르

- 싱가포르의 경제개발청 등이 주관(1993년 발족)하여 Centre for Natural Products Resrarch (CNPR)을 설립 84,000점의 추출물 확보하였으며 2002년 영국의 제약회사 등이 투자한 MerLion Pharmaceuticals로 사명 화하여 운영하고 있으며 현재 세계에

서 가장 다양한 추출물 Library를 보유한 것으로 평가되고 있음

## □ 국내기술동향

- 국내자원을 대상으로 한 신약개발의 소재로서 생리활성 해양천연물에 대한 국내의 연구는 1990년대에 비로소 시작되었다. 출연연구기관인 한국해양연구원을 비롯하여 일부의 대학연구진을 중심으로 이루어진 연구는 우리나라 주변해역의 저서동물과 대형해조류를 주된 연구대상으로 하였으며 1990년대 말부터는 방선균, 진균 등 미생물과 단세포조류도 포함되게 되었다.
- 2004년에 시작된 정부 주도의 장기연구사업인 마린바이오 21사업에서는 국내연안 및 해양을 중심으로 해양생물과 미생물로부터 비만, 당뇨, 골다공증 등 대사성 질환을 주요대상으로 하여 천연물탐색, 유도체 합성 및 전합성, 동물실험이 망라된 종합적인 천연물신약연구가 진행 중이며 in vivo 수준에서의 우수한 활성물질도 보고되고 있다. 그러나 국내 해양천연물 연구의 대체적인 수준은 신물질의 규명과 생리활성의 일차적인 탐색에 머물러있다.
- 1990년대 말부터는 외국의 해양생물자원에 대한 접근도 시도되어 주로 극지 및 열대서부태평양의 생리활성 천연물 탐색이 제한적으로 이루어지고 있다. 특히 2007년 이후에는 정부 주도로 마이크로네시아 Chuk 섬 인근해역에 대한 해양생리활성물질 연구가 진행 중이다.
- 양극해 자원을 이용한 천연물기반 연구는 극지연구소와 대학의 학연을 통하여 일부 진행되어 왔으며 특히, 남극의 지의류 등으로부터 생리활성을 갖는 신규천연물을 확보하였으며 일부는 산업화를 위한 연구가 진행되고 있다.

## 3. 시사점 및 종합결론

- 양극해 해양자원은 극한환경과 생태적 특성으로 인하여 공생미생물 및 2차대사산물에 대한 연구가 아직은 기초단계에 머무르고 있어 집중적인 투자를 경주할 경우 선진국과 대등한 지위를 차지할 수 있음
- 해양생물로부터 신규천연물의 확보는 생물다양성과 성장속도가 낮아 양극해자원의 활용에 있어 산업화측면에서 극히 제한적이며 이에 따라 공생미생물자원의 확보가 무엇보다 중요함

- 신약, 화장품, 식품 등 산업화 촉진을 위해서는 해양미생물의 DB구축과 함께 활용성을 높이기 위한 추출물의 구축과 다양한 생리활성의 검색을 통하여 DB를 구축할 경우 기초연구를 위한 시간과 경비를 줄이고 자원의 활용 극대화를 꾀할 수 있음
- 특히, 대사체 및 신규천연물연구를 위한 공동연구팀간의 자원연계는 활용성 및 산업화 시기뿐만 아니라 자원/특허 주권확보의 시기를 줄일 수 있음



## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제1절 연구개발수행 내용

#### 1. 시료 확보

- 극지연구소 연구팀으로부터 북극 및 남극으로부터 채취된 해양생물을 냉동상태로 보존된 시료를 확보하였다(표 1).

#### 2. 미생물의 분리

- 채취된 해양생물시료는 일정량을 무균적으로 채취하여 멸균된 막자사발을 이용하여 균질화하였으며 멸균된 해수를 이용하여 연속희석(10 fold dilution method)하여 아래의 표와 같이 총 5종의 고형배지에 도말하여 10℃에서 10~30일간 배양하였다.

- 배양된 plate로부터 미생물은 시료별 colony의 형태, 색을 기준으로 순수분리 하였다. 이후 순수배양체는 10% glycerol 용액에 부유하여 -80℃ 초저온냉동고에 보존하였다.

Medium 1	Medium 2	Medium 3
<b>Marine agar</b>	<b>ISP 2(부영양배지)</b>	<b>ISP4(빈영양배지)</b>
Peptone 5g	Yeast extract 3g	soluble starch 10g
Yeast extract 1g	Malt extract 10g	Dipotassium phosphate 1g
FePO4 10mg	Dextrose 4g	MgSO4 1g
Aged seawater 1L	Aged seawater 1L	(NH4)2SO4 1g
Agar 15g	Agar 20g	Calcium carbonate 1g
		Ferrous sulfate 1mg
		MgCl2 1mg
		Zinc sulfate 1mg
		Aged seawater 1L
		Agar 20g
Medium 4	Medium 5	
<b>YPG (부영양배지)</b>	<b>GYA (빈영양배지)</b>	
Yeast extract 5g	Yeast extract 3g	
Peptone 5g	Glucose 1g	
Glucose 10g	Aged seawater 1L	
Aged seawater 1L	Agar 20g	
Agar 20g		

### 3. 해양생물유래 공생미생물의 추출물 제조

- 분리된 미생물중 이차대사산물의 빈도가 높은 진균을 대상으로 대량배양을 진행하였다. 배지는 해수가 첨가된 PDA배지를 이용하여 plate (90mmx15mm) 및 편박플라스크를 이용하여 10℃에서 7~30일 배양하였다(균의 종에 따라 차이가 있음).
- 배양후 ethyl acetate를 이용하여 추출하였으며 이후 여과한 후 진공농축기를 이용하여 용매를 제거하여 조추출물을 확보하였다. 추출과정의 대략적인 흐름은 아래의 그림과 같다.
- 농축된 시료는 계량하여 무게를 기록하였으며 이후 실험에 이용되기 까지 냉장보관하였다.
- 대사체/신규물질연구를 위해 공동연구팀에게 시료를 제공하였으며 대사체 및 신규물질의 가능성이 높은 시료는 대량배양을 통하여 추가적인 추출물을 제작하여 제공하였다.



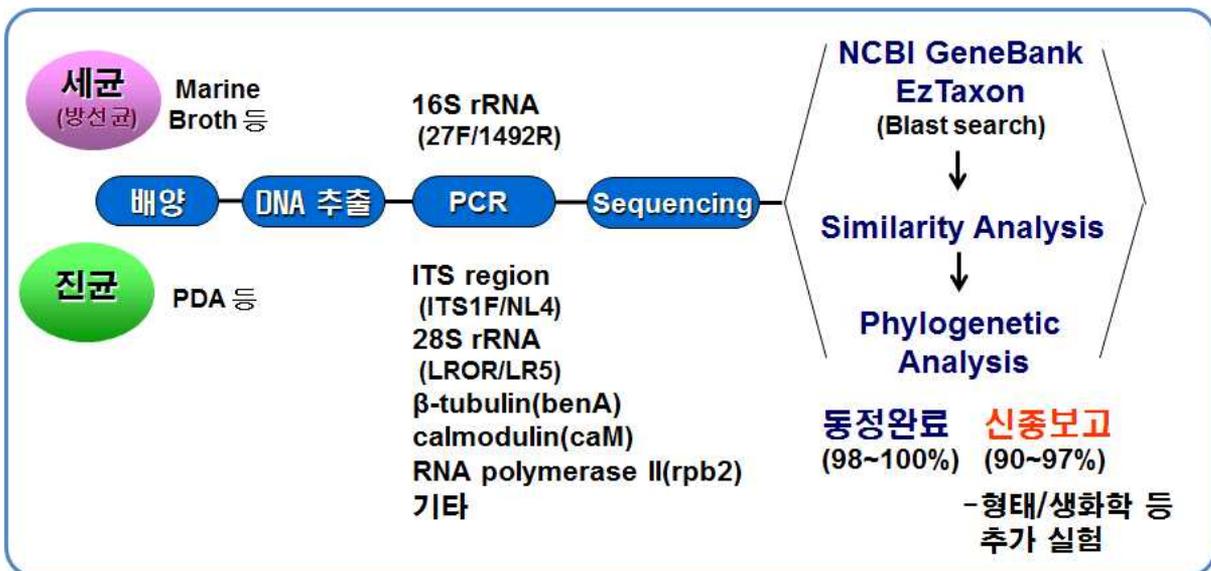
<추출물제작을 위한 흐름도>

#### 4. 조추출물의 생리활성측정

- 생리활성은 각종 질병치료의 분자표적으로 인식되는 탈인산화 효소(PTP1B)를 이용한 항당뇨관련 활성 검색법을 1차 스크리닝의 방법으로 적용하여 각 추출물에 대한 활성을 검토하고 그 결과를 토대로 향후 적용할 생리활성 평가법을 결정 하였다. 또한 얻어진 자료는 추출물과 함께 DB를 구축하였다.
- PTP1B분석: PTP1B는 BIOMOL International LP에서 구입하였다. 효소활성은 p-nitrophenyl phosphate (pNPP)를 사용하여 측정하였다(Na et al., 2007). 각각의 96 well plate에 2 mM pNPP와 50 mM citrate (pH 6.0), 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, and 1 mM dithiothreitol (DTT)를 포함하는 완충용액을 100uL첨가한 후 시료(0.3~30ug/ml)를 첨가하였으며 대조구는 시료대신 시료용해액을 첨가하였다. 이 후 37℃ 배양기에서 30분 동안 반응시킨다. 10M NaOH를 넣어 반응을 종결시켰다. 생산된 p-nitrophenol의 양을 405nm의 흡광도에서 측정하였다.

#### 5. 미생물동정을 위한 분자생물학적 분류

- 분리균주를 대상으로 2개의 온도에서 성장특성  
분리된 세균과 진균은 각각 2장의 Marine agar와 PDA agar 배지에 도말한후 5, 10, 25℃ 배양기에서 배양한 후 일정 기간간격으로 성장여부를 확인하여 기록하였다. 이를 통하여 저온성균주와 내냉성 및 저온균주 여부를 판정하였다.



- 세균 (16S rDNA 염기서열분석): 16S rDNA는 16S rDNA primer, 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'; Escherichia coli nucleotide 8~27) 와 1518R (5'-AAG

GAG GTG ATC CAN CCR CA-3'; *Escherichia coli* nucleotide 1541~1522) (Giovannoni, 1991)을 사용하여 PCR에 의해 genomic DNA로부터 증폭하였다. PCR 산물은 전기영동 (0.8% agarose)에 의해 DNA가 증폭되었음을 확인하였다. 16S rDNA는 자동염기서열장치를 이용하여 염기서열을 결정하였다(마크로젠에 의뢰).

16S rDNA염기서열의 분석은 National Center Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)(Altschul et al., 1990)로부터 얻어진 분류군의 염기서열을 이용하여 서열화하였으며 Phylogenetic Interference Package (PHYLIP) (Felsenstein, 1993)로 서열 데이터를 분석하기 위해 사용되었다. Phylogenetic tree는 neighbour-joining (Saitou & Nei, 1987)방법을 이용하였으며, Evolutionary distances matrices는 Jukes & Cantor (1969)모델에 따라 작성되었다. neighbour-joining tree topology는 1000 resampling에 기초한 bootstrap analysis (Felsenstein, 1985)에 의해 평가되었다.

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

## 제2절 연구개발수행 결과

### 1. 양극해 해양생물유래 공생미생물의 분리 및 보존

- 극지시료(표 1)로부터 5종의 분리배지에 도달하여 배양하였으며 이중 균체의 특성에 따라 1차로 세균과 진균을 분리하였고 필요에 따라 2~3차에 걸쳐 순수배양체를 확보하였다.
- 순수배양체인 세균 73균주와 진균 52균주는 glycerol stock하여  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보존하였다(표 2와 3).
- 순수배양체는 극지연구소에 기탁하였다.



표 1. 극지시료의 좌표 및 시료명

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

표 2. 극지 환경으로부터 진균의 분리

No.	시료명	분리 배지	부여 번호	Stock		No.	시료명	분리 배지	부여 번호	Stock	
				개수	날짜					개수	날짜
1	2016RS3 #ST01-DR-BS-44	YPG	SF-7237	4	16.09.05	27	2016RS3 #ST09-DR-BS-68	PDA	SF-7263	4	16.09.13
2	2016RS3 #ST01-DR-BS-49	PDA	SF-7238	4	16.09.05	28	2016RS3 #ST01-DR-BS-47	PDA	SF-7264	4	16.09.20
3	2016RS3 #ST09-DR-BS-72	PDA	SF-7239	4	16.09.05	29	2016RS3 #ST01-DR-BS-47	PDA	SF-7265	4	16.09.20
4	2016RS3 #ST08-DR-BS-46	Zobell	SF-7240	4	16.09.05	30	2016RS3 #ST06-DR-BS-62	GYA	SF-7266	4	16.09.20
5	2016RS3 #ST09-DR-BS-70	PDA	SF-7241	4	16.09.05	31	2016RS3 #ST01-DR-BS-35	PDA	SF-7267	4	16.09.20
6	2016RS3 #ST09-DR-BS-76	YPG	SF-7242	4	16.09.05	32	2016RS3 #ST01-DR-BS-44	Zobell	SF-7268	4	16.09.20
7	2016RS3 #ST09-DR-BS-80	PDA	SF-7243	4	16.09.05	33	2016RS3 #ST01-DR-BS-35	PDA	SF-7269	4	16.09.20
8	2016RS3 #ST08-DR-BS-46	Zobell	SF-7244	4	16.09.05	34	2016RS3 #ST01-DR-BS-44	Zobell	SF-7270	4	16.09.20
9	2016RS3 #ST01-DR-BS-44	PDA	SF-7245	4	16.09.05	35	2016RS3 #ST09-DR-BS-79	PDA	SF-7271	4	16.09.20
10	2016RS3 #ST01-DR-BS-39	PDA	SF-7246	4	16.09.05	36	2016RS3 #ST01-DR-BS-48	PDA	SF-7272	4	16.09.20
11	2016RS3 #ST01-DR-BS-39	Zobell	SF-7247	4	16.09.05	37	2016RS3 #ST01-DR-BS-47	YPG	SF-7273	4	16.09.20
12	2016RS3 #ST04-DR-BS-5	YPG	SF-7248	4	16.09.05	38	2016RS3 #ST09-DR-BS-72	GYA	SF-7274	4	16.09.20
13	2016RS3 #ST09-DR-BS-76	YPG	SF-7249	4	16.09.06	39	2016RS3 #ST06-DR-BS-62	GYA	SF-7275	4	16.09.22
14	2016RS3 #ST01-DR-BS-35	PDA	SF-7250	4	16.09.06	40	2016RS3 #ST04-DR-BS-41	PDA	SF-7276	4	16.09.22
15	2016RS3 #ST01-DR-BS-44	Zobell	SF-7251	4	16.09.06	41	2016RS3 #ST01-DR-BS-47	YPG	SF-7277	4	16.09.22
16	2016RS3 #ST01-DR-BS-36	PDA	SF-7252	4	16.09.06	42	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	YPG	SF-7278	4	16.09.22
17	2016RS3 #ST01-DR-BS-30	YPG	SF-7253	4	16.09.06	43	2016RS3 #ST07-DR-BS-30	Zobell	SF-7279	4	16.10.07
18	2016RS3 #ST09-DR-BS-70	YPG	SF-7254	4	16.09.06	44	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	PDA	SF-7280	4	16.10.07
19	2016RS3 #ST09-DR-BS-80	YPG	SF-7255	4	16.09.06	45	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	PDA	SF-7281	4	16.10.07
20	2016RS3 #ST01-DR-BS-35	PDA	SF-7256	4	16.09.06	46	2016RS3 #ST07-DR-BS-30	YPG	SF-7282	4	16.10.07
21	2016RS3 #ST01-DR-BS-47	PDA	SF-7257	4	16.09.06	47	2016RS3 #ST01-DR-BS-57	YPG	SF-7283	4	16.10.07
22	2016RS3 #ST01-DR-BS-35	PDA	SF-7258	4	16.09.06	48	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	PDA	SF-7284	4	16.10.07
23	2016RS3 #ST07-DR-BS-30	YPG	SF-7259	4	16.09.13	49	2016RS3 #ST01-DR-BS-57	YPG	SF-7285	4	16.10.07
24	2016RS3 #ST09-DR-BS-71	PDA	SF-7260	4	16.09.13	50	2016RS3 #ST01-DR-BS-55	PDA	SF-7286	4	16.10.07
25	2016RS3 #ST01-DR-BS-30	GYA	SF-7261	4	16.09.13	51	2016RS3 #ST07-DR-BS-31	YPG	SF-7287	4	16.10.07
26	2016RS3 #ST01-DR-BS-47	PDA	SF-7262	4	16.09.13	52	2016RS3 #ST01-DR-BS-48	GYA	SF-7288	4	16.10.07

표 3. 극지 환경으로부터 세균의 분리(1)

No.	시료 No	분리 배지	부여 번호	Stock		No.	시료 No	분리배지	부여 번호	Stock	
				개수	날짜					개수	날짜
1	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	Zobelle	SB-3534	4	16.10.14	26	2016RS3 #ST09-DR-BS-68	GYA	SB-3559	4	16.10.20
2	2016RS3 #ST09-DR-BS-72	Zobelle	SB-3535	4	16.10.14	27	2016RS3 #ST09-DR-BS-72	PDA	SB-3560	4	16.10.21
3	2016RS3 #ST09-DR-BS-72	Zobelle	SB-3536	4	16.10.14	28	2016RS3 #ST06-DR-BS-61	Zobelle	SB-3561	4	16.10.21
4	2016RS3 #ST04-DR-BS-40	YPG	SB-3537	4	16.10.14	29	2016RS3 #ST01-DR-BS-39	Zobelle	SB-3562	4	16.10.21
5	2016RS3 #ST04-DR-BS-40	Zobelle	SB-3538	4	16.10.14	30	2016RS3 #ST01-DR-BS-39	YPG	SB-3563	4	16.10.21
6	2016RS3 #ST04-DR-BS-40	Zobelle	SB-3539	4	16.10.14	31	2016RS3 #ST09-DR-BS-76	PDA	SB-3564	4	16.10.21
7	2016RS3 #ST09-DR-BS-68	YPG	SB-3540	4	16.10.14	32	2016RS3 #ST09-DR-BS-76	Zobelle	SB-3565	4	16.10.21
8	2016RS3 #ST09-DR-BS-68	Zobelle	SB-3541	4	16.10.14	33	2016RS3 #ST09-DR-BS-80	GYA	SB-3566	4	16.10.21
9	2016RS3 #ST09-DR-BS-74	Zobelle	SB-3542	4	16.10.14	34	2016RS3 #ST01-DR-BS-21	Zobelle	SB-3567	4	16.10.21
10	2016RS3 #ST09-DR-BS-74	Zobelle	SB-3543	4	16.10.14	35	2016RS3 #ST01-DR-BS-54	Zobelle	SB-3568	4	16.10.21
11	2016RS3 #ST09-DR-BS-68	PDA	SB-3544	4	16.10.20	36	2016RS3 #ST01-DR-BS-54	GYA	SB-3569	4	16.10.21
12	2016RS3 #ST04-DR-BS-40	YPG	SB-3545	4	16.10.20	37	2016RS3 #ST07-DR-BS-31	GYA	SB-3570	4	16.10.21
13	2016RS3 #ST01-DR-BS-44	GYA	SB-3546	4	16.10.20	38	2016RS3 #ST04-DR-BS-5	GYA	SB-3571	4	16.10.21
14	2016RS3 #ST04-DR-BS-40	Zobelle	SB-3547	4	16.10.20	39	2016RS3 #ST08-DR-BS-46	Zobelle	SB-3572	4	16.10.21
15	2016RS3 #ST04-DR-BS-40	YPG	SB-3548	4	16.10.20	40	2016RS3 #ST09-DR-BS-76	Zobelle	SB-3573	4	16.10.21
16	2016RS3 #ST01-DR-BS-39	YPG	SB-3549	4	16.10.20	41	2016RS3 #ST04-DR-BS-40	PDA	SB-3574	4	16.10.21
17	2016RS3 #ST09-DR-BS-74	PDA	SB-3550	4	16.10.20	42	2016RS3 #ST09-DR-BS-68	Zobelle	SB-3575	4	16.10.21
18	2016RS3 #ST09-DR-BS-74	PDA	SB-3551	4	16.10.20	43	2016RS3 #ST04-DR-BS-5	GYA	SB-3576	4	16.10.21
19	2016RS3 #ST08-DR-BS-46	Zobelle	SB-3552	4	16.10.20	44	2016RS3 #ST08-DR-BS-46	Zobelle	SB-3577	4	16.10.21
20	2016RS3 #ST01-DR-BS-44	PDA	SB-3553	4	16.10.20	45	2016RS3 #ST01-DR-BS-47	Zobelle	SB-3578	4	16.10.21
21	2016RS3 #ST08-DR-BS-46	GYA	SB-3554	4	16.10.20	46	2016RS3 #ST01-DR-BS-47	Zobelle	SB-3579	4	16.10.21
22	2016RS3 #ST07-DR-BS-31	PDA	SB-3555	4	16.10.20	47	2016RS3 #ST09-DR-BS-76	Zobelle	SB-3580	4	16.10.21
23	2016RS3 #ST01-DR-BS-57	Zobelle	SB-3556	4	16.10.20	48	2016RS3 #ST01-DR-BS-21	Zobelle	SB-3581	4	16.10.21
24	2016RS3 #ST01-DR-BS-39	Zobelle	SB-3557	4	16.10.20	49	2016RS3 #ST01-DR-BS-39	Zobelle	SB-3582	4	16.10.21
25	2016RS3 #ST04-DR-BS-41	YPG	SB-3558	4	16.10.20	50	2016RS3 #ST01-DR-BS-39	Zobelle	SB-3583	4	16.10.21



## 2. 극지생물 유래 미생물의 추출물 확보 연구

### 1) 추출물 확보 현황

- 분리된 진균은 대량배양 및 ethyl acetate 용매추출을 통하여 52균주에 대한 추출물 제조를 완료하였음(표 4).

### 2) 추출물의 활용

- 추출물 제조가 완료된 시료는 신규천연물을 연구하는 원광대연구팀에게 일부시료를 지속적으로 제공하였으며
- 일부시료는 극지연구소에서 대사체연구를 위해 시료를 제공하였다.
- 본연구팀이 생리활성검색에 사용된 시료 외에는 자체적으로 DB를 구축하여 보존하고 있음



표 4. 극지생물 유래 미생물(진균)의 추출물제조 결과

	Strain No.	Extracts(mg)		Strain No.	Extracts(mg)
1	SF-7237	2.9	27	SF-7263	3.9
2	SF-7238	5.0	28	SF-7264	2.3
3	SF-7239	2.2	29	SF-7265	3.2
4	SF-7240	2.7	30	SF-7266	32.8
5	SF-7241	11.9	31	SF-7267	2.8
6	SF-7242	3.8	32	SF-7268	13.8
7	SF-7243	3.5	33	SF-7269	4.7
8	SF-7244	3.1	34	SF-7270	41.3
9	SF-7245	3.9	35	SF-7271	1.6
10	SF-7246	3.5	36	SF-7272	4.2
11	SF-7247	2.8	37	SF-7273	49.2
12	SF-7248	15.5	38	SF-7274	0.3
13	SF-7249	6.7	39	SF-7275	20.8
14	SF-7250	0.6	40	SF-7276	7.7
15	SF-7251	2.6	41	SF-7277	17.8
16	SF-7252	4.4	42	SF-7278	77.7
17	SF-7253	3.7	43	SF-7279	5.8
18	SF-7254	5.4	44	SF-7280	4.0
19	SF-7255	5.7	45	SF-7281	6.1
20	SF-7256	8.3	46	SF-7282	6.4
21	SF-7257	5.1	47	SF-7283	6.6
22	SF-7258	9.1	48	SF-7284	3.2
23	SF-7259	6.9	49	SF-7285	6.4
24	SF-7260	16.2	50	SF-7286	6.0
25	SF-7261	5.2	51	SF-7287	5.1
26	SF-7262	1.5	52	SF-7288	7.3

### 3. 생리활성검증

#### 1) PTP1B 저해활성에 의한 항당뇨 검색

- 진균추출물을 대상으로 항당뇨 질병의 분자표적으로 인식되는 탈인산화효소인 PTP1B (Protein tyrosine phosphatase 1B)를 저해하는 *in vitro* assay를 수행하였으며 이를 통하여 진균 추출물의 항당뇨 저해능력을 평가하였다.
- 해양미생물인 진균으로부터 얻어진 추출물에 대한 PTP1B 저해활성은 총 52균주의 시료를 대상으로 조사하였으며 그 중 추출물의 농도를 0.3 ug/ml 수준에서 50%이상 PTP1B 저해활성을 보인 시료는 총 6균주로 나타났다(표 5). 0.3 ug/ml의 농도로 추출물을 처리하였을 때 PTP1B 저해활성은 SF-7278과 SF-7272균주가 78.12%와 70.24%로 가장 높은 활성을 보였다. 그 다음으로 SF-7276균주가 65.07% 그리고 SF-7283, SF-7287, SF-7288균주가 각각 56.82%, 55.70%, 54.15%로 나타났다.
- 3 ug/ml의 농도로 추출물을 처리하였을 때 PTP1B 저해활성이 70%이상을 나타낸 시료는 총 46균주로 나타났다.



표 5. 확보된 EA 추출물에 대한 1차적 항당뇨 활성 검색 목록

(unit: inhibition(%))

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

#### 4. 미생물동정을 위한 분자생물학적 분류

##### 1) 극지미생물의 성장온도 평가

###### ○ 세균

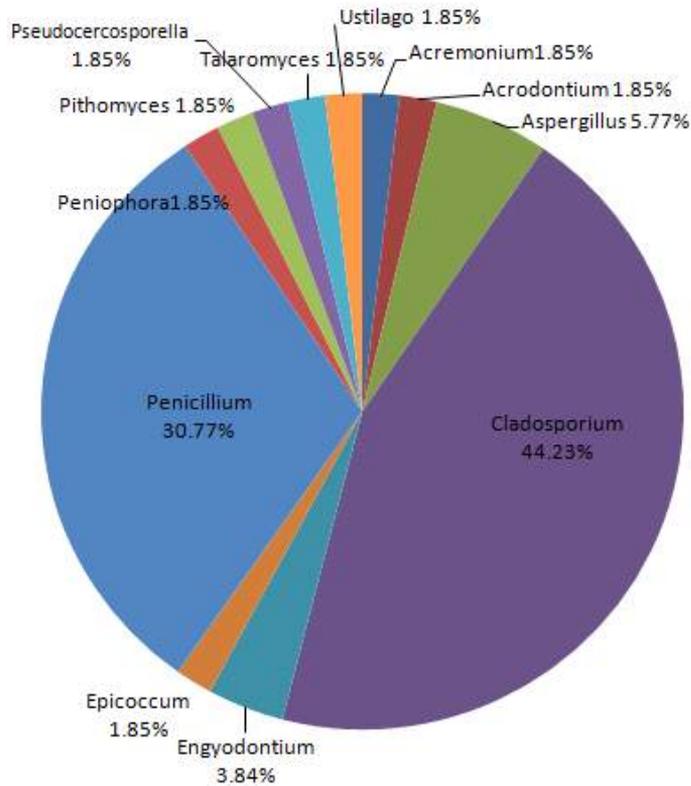
- 극지로부터 분리된 73종의 세균을 대상으로 5, 10, 15°C에서 성장특성을 조사하였으며, 이 중 18균주가 15~5°C에서 성장이 가능한 우수한 내냉성균주로 판단된다(표 6). 또한 16균주는 5°C와 20°C보다는 10°C에서 성장이 뛰어나 저온성균주로 판단되며 성장특성에 대한 추가적인 조사가 필요할 것으로 판단된다.

###### ○ 진균

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

##### 2) 극지 진균의 동정

- 총 52개 분리진균을 대상으로 ITS영역의 염기서열을 결정한 후 NCBI BLAST 및 EzTaxon 프로그램을 이용하여 유사도가 높은 균주를 선발한 후 PHYDIT 프로그램을 이용하여 ClustalW alignment를 수행하여 유사도를 분석하였다.
- 진균은 52종에 대하여 동정을 완료하였으며 그 결과 12개의 genus가 확인되었으며 속내의 분리종은 *Cladosorium* 속(23), *Penicilium* 속(16), *Aspergillus* 속(3), *Engyodontium* 속(2), *Epicoccum* 속(1), *Peniophora* 속(1), *Pseudocercospora* 속(1), *Talaromyces* 속(1), *Acremonium* 속(1), *Acrodontium* 속(1), *Ustilago* 속(1), *Pithomyces* 속(1)의 순으로 나타났다(표 8).
- 대부분의 분리된 진균의 유사도는 기존 보고된 종과 98~100%를 나타냈으며 SF-7282균주의 경우 *Penicillium atosanguineum*과 98.42%의 가장 낮은 유사도를 나타내었다. 또한 일부의 분리종은 ITS영역의 염기서열만으로는 종수준의 동정이 이루어지지 않아 추가적인 프라이머를 이용한 분석이 필요할 것으로 판단된다.



○ 진균의 동정결과와 비교하여

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

표 6. 세균의 온도별 성장특성

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

표 7. 진균의 온도별 성장특성

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

표 8. 추출물 제작된 이용된 진균의 ITS 동정결과(1)

	Strain No	Closest relative	Similarity(%)
1	SF-7237	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100
2	SF-7238	<i>Penicillium rubens</i>	100
3	SF-7239	<i>Cladosporium oxysporum</i>	99.79
4	SF-7240	<i>Ustilago nuda</i>	100
5	SF-7241	<i>Aspergillus awamori</i> (JX500083), <i>Asp. foetidus</i> (FJ537131)	100
6	SF-7242	<i>Penicillium purpurascens</i> (AF033408), <i>P. lapidosum</i> (AF033409)	100
7	SF-7243	<i>Cladosporium tenuissimum</i> (JX310566), <i>Cladosporium lycoperdinum</i> (HM148113)	100
8	SF-7244	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100
9	SF-7245	<i>Cladosporium silenes</i>	100
10	SF-7246	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100
11	SF-7247	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	99.58
12	SF-7248	<i>Cladosporium perangustum</i> (HM148132), <i>Cl. phyllactiniicola</i> (HM148151)	100
13	SF-7249	<i>Penicillium rubens</i>	100
14	SF-7250	<i>Cladosporium oxysporum</i>	100
15	SF-7251	<i>Cladosporium inversicolor</i> (HM148104), <i>Cl. tenuissimum</i> (AY545639), <i>Cl. subuliforme</i> (HM148196)	100
16	SF-7252	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (HM999909), <i>Cl. globisporum</i> (HM148096)	100
17	SF-7253	<i>Cladosporium inversicolor</i>	100
18	SF-7254	<i>Cladosporium inversicolor</i>	100
19	SF-7255	<i>Cladosporium oxysporum</i>	99.79
20	SF-7256	<i>Penicillium rubens</i>	100
21	SF-7257	<i>Pithomyces chartarum</i>	100
22	SF-7258	<i>Cladosporium halotolerans</i>	99.79
23	SF-7259	<i>Acremonium implicatum</i>	100
24	SF-7260	<i>Engyodontium album</i>	100
25	SF-7261	<i>Engyodontium album</i>	100
26	SF-7262	<i>Acrodontium crateriforme</i>	99.77
27	SF-7263	<i>Pseudocercospora fraxini</i>	99.78
28	SF-7264	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	100
29	SF-7265	<i>Penicillium commune</i>	100
30	SF-7266	<i>Penicillium glabrum</i>	100

표 8. 추출물 제작된 이용된 진균의 ITS 동정결과(2)

	Strain No	Closest relative	Similarity(%)
31	SF-7267	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100
32	SF-7268	<i>Penicillium cosmopolitanum</i>	99.6
33	SF-7269	<i>Epicoccum nigrum</i>	99.57
34	SF-7270	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100
35	SF-7271	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100
36	SF-7272	<i>Penicillium rubens</i>	100
37	SF-7273	<i>Penicillium herquei</i>	99.8
38	SF-7274	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100
39	SF-7275	<i>Periconia pseudobyssoides</i>	99.15
40	SF-7276	<i>Penicillium rubens</i>	100
41	SF-7277	<i>Cladosporium oxysporum</i>	100
42	SF-7278	<i>Aspergillus glaucus</i>	100
43	SF-7279	<i>Aspergillus versicolor</i>	100
44	SF-7280	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	100
45	SF-7281	<i>Talaromyces cecidicola</i>	100
46	SF-7282	<i>Penicillium atrosanguineum</i>	98.42
47	SF-7283	<i>Penicillium rubens</i>	100
48	SF-7284	<i>Peniophora incarnata</i>	99.62
49	SF-7285	<i>Penicillium rubens</i>	100
50	SF-7286	<i>Penicillium rubens</i>	100
51	SF-7287	<i>Penicillium rubens</i>	100
52	SF-7288	<i>Penicillium rubens</i>	100

## 제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

### 1. 연구개발 목표의 달성도

목 표	달 성 도 (%)	내 용
○ 극지 환경으로부터 세균, 방선균, 진균의 분리 (50균주 이상)	100	○ 양극해 해양시료(북극시료)로부터 세균과 진균 125균주를 순수분리 및 보존완료
○ 극지 해양미생물 유래 추출물 확보(50점이상 DB구축)	100	○ 고체배지를 통한 배양체 확보, ethyl acetate를 이용한 추출 및 농축 ○ 추출물 확보: 52균주 DB확보 ○ 공동연구팀인 극지연구소(대사체 연구) 및 원광대(신규물질 확보)에 추출물을 제공 ○ 생리활성검색 : 52균주로부터 확보된 추출물을 이용하여 항당뇨 기능 검색
○ 형태/분자생물학적 방법에 의한 우수균주의 분류 동정	100	○ 우수균주 선정을 위한 온도별 성장 특성조사 및 생리활성검색 ○ 진균 52종에 대한 분자생물학적 동정 완료

## 2. 대외 기여도

- 양극해자원은 접근성이 어려워 자원의 확보와 활용성에 극히 제한되어 있어 학계 및 산업계에서 활용성이 제한되어 있음.
- 본 연구를 통하여 극지해생물로부터 극한미생물자원, 추출물제조, 생리활성검색 및 우수활성균주의 분류동정자료의 활용성을 높이기 위해 기초자료(DB구축)를 제공함으로써 학계 및 산업계에서 신규소재의 발굴을 위한 연구활성화 도모
- 공동연구팀과 연계를 통하여 신규천연물 및 대사체 연구를 위한 자원을 제공함으로써 본 과제를 통한 성과활용을 극대화에 기여



## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 세계적으로 생명자원 확보경쟁이 치열해지는 상황에서 “양극해양자원의 확보 및 보존 ⇨ 가치 발굴 및 정보화 ⇨ 활용 및 산업화의 운영체계 구축”이라는 양극유래 해양생명자원의 선순환 구조를 위한 거시적 구도 하에서 양극해 유래 생명자원의 가치 발굴 및 정보화 단계를 촉진시키는 촉매의 역할을 할 것으로 기대된다.
- 양극해 공생미생물자원의 분리 및 보존을 통하여 다양한 국내외 연구팀 및 연구분야의 정보를 제공함으로써 해양생명공학연구 활성화제공
- 추출물의 확보 및 생리활성검색의 DB화를 통하여 기초연구 및 산업화 연구개발기간 단축, 연구비용 절감 등을 위한 극정적인 효과를 제공
- 공동연구팀과의 연계를 통하여 대사체의 생리활성을 기초로 하여 미지의 생명현상 규명 또는 질병현상 규명과 관련된 연구 분야에 chemical probe 으로도 활용이 가능하다.
  - 공동연구팀과의 질병현상규명 및 산업화 연계를 진행 중
- 새로운 물질의 제조나 생산에 대한 관련 특허의 확보가 가능하여 물질특허 외에도 이의 활용에 의한 수입도 가능하다.
- 국내에서 최종 상품화에 성공하면 관련 식품의약산업이나 제약산업의 성장과 활성화에 획기적인 전기를 마련할 수 있다.

## 주 의

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