



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0129285
(43) 공개일자 2016년11월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C09D 5/16 (2006.01) A01N 63/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C09D 5/1625 (2013.01)
A01N 63/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0061156
(22) 출원일자 2015년04월30일
심사청구일자 2015년04월30일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)
(72) 발명자
홍용기
부산광역시 해운대구 해운대해변로 85, 103동 70
3호
신현웅
충청남도 아산시 서부북로 973
조지영
충청남도 아산시 신창면 서부북로 712
(74) 대리인
서장찬, 박병석

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 미세조류 파블로바 루테리로부터 분리된 글리코글리세로리피드성의 방오물질

(57) 요약

본 발명은 방오능을 가지는 미세조류 배양 추출물 및 이로부터 분리된 글리코글리세로리피드 화합물에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 미세조류 파블로바 루테리 배양 추출물 또는 이로부터 분리된 5종의 glycoglycerolipid 성분은 부착 방지에 대해 기존 보고된 지방산 및 불포화지방산 성분의 glycolipid 보다 더 유의적인 방오활성을 나타내며 방오메카니즘의 초기단계에서 생물부착 방지에 우수한 효과가 있다.

(52) CPC특허분류

C09D 5/16 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0029963

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 해양극지 기초원천기술개발사업

연구과제명 방오소재의 산호조류 유전분석 및 사멸물질 탐색

기 여 율 1/1

주관기관 부경대학교 산학협력단

연구기간 2011.08.10 ~ 2016.06.22

명세서

청구범위

청구항 1

파블로바 루테리(*Pavlova lutheri*) 배양 추출물을 포함하는 부착성 해양생물 방오용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 초기 부착성 해양생물의 방오용인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 초기 부착성 해양생물은 초기 부착성 미세조류 또는 초기 부착성 세균인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 초기 부착성 미세조류는 나비쿨라 속(*Navicula* sp.), 니치아 속(*Nitzschia* sp.), 암포라 속(*Amphora* sp.), 실린드로테카(*Cylindrotheca* sp.) 및 고포네마 속(*Gomphonema* sp.)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

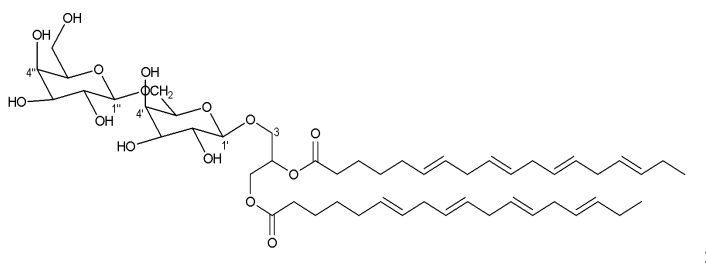
제 3항에 있어서,

상기 초기 부착성 세균은 비브리오 속(*Vibrio* sp.), 스트렙토코커스 속(*Streptococcus* sp.), 알테로모나스 속(*Alteromonas* sp.) 및 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

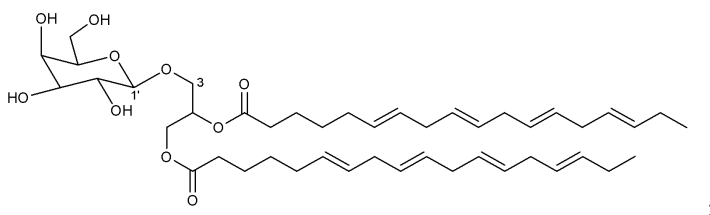
청구항 6

다음의 구조식 1 내지 구조식 5로 이루어지는 군으로부터 선택되는 글리코글리세롤리피드(glycoglycerolipid)를 포함하는 부착성 해양생물 방오용 조성물:

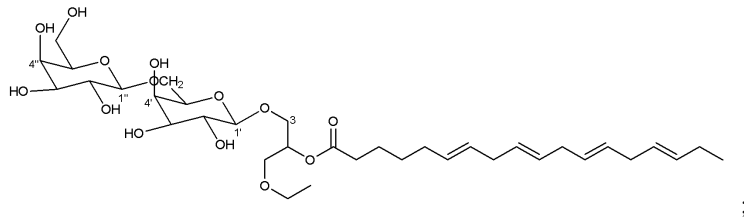
[구조식 1]



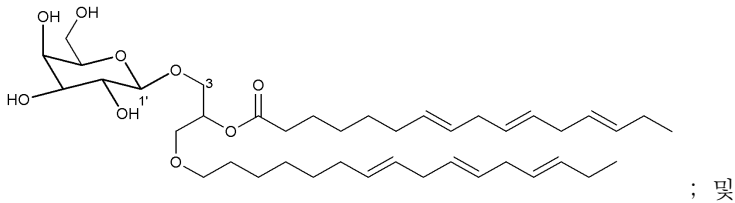
[구조식 2]



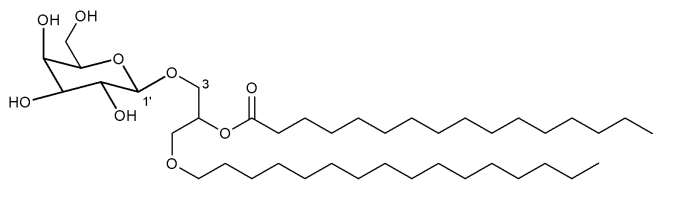
[구조식 3]



[구조식 4]



[구조식 5]



청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 조성물은 초기 부착성 해양생물의 방오용인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 초기 부착성 해양생물은 초기 부착성 미세조류 또는 초기 부착성 세균인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 초기 부착성 미세조류는 나비쿨라 속(*Navicula* sp.), 니치아 속(*Nitzschia* sp.), 암포라 속(*Amphora* sp.), 실린드로테카(*Cylindrotheca* sp.) 및 고포네마 속(*Gomphonema* sp.)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제 8항에 있어서,

상기 초기 부착성 세균은 비브리오 속(*Vibrio* sp.), 스트렙토코커스 속(*Streptococcus* sp.), 알테로모나스 속(*Alteromonas* sp.) 및 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 방오능을 가지는 미세조류 배양 추출물 및 이로부터 분리된 글리코글리세롤리피드 화합물에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 수해양 환경에서 부착생물은 배의 선체와 인공구조물 또는 양식장의 그물 등에 부착하여 기술적 경제적 손실을 야기시키고 있다(Callow and Edyvean, 1990). 부착생물 방지를 위한 대부분의 방오물질은 Irgarol, chlorothalonil 및 diuron과 같은 방오제를 포함하고 있으며, 이러한 방오제들은 해양생물에 독성을 나타내며, 다양한 수중 환경에서 이들 물질의 침전을 경고하는 많은 연구 결과들이 보고되고 있다(Voulvoulis N, Hdb, 2006).
- [0003] 친환경의 방오물질 개발을 위해 많은 해양생물군으로부터 benzoids, steroids, fatty acids와 terpenoids, amino acids 등 다양한 구조의 방오후보물질이 분리되었다고 보고되고 있지만, glycolipid에 대한 개발 및 보고는 부족하다(Fusetani, 2011). Glycolipid는 식물군의 세포막에 존재하며 하나 또는 두 개의 당분자가 glycerol의 sn-3 position에 결합되어 있는 형태로 식물의 종류에 따라 포함하고 있는 당의 형태 및 개수가 다르게 나타나며 연결된 지방산의 종류도 다양하다. 식물에서 분리된 glycolipid의 보고는 대부분이 glycoglyceride의 종류와 지방산 함량에 관한 보고가 주를 이루고 있으며, 지방산과 glycoglyceride의 연결된 형태인 glycoglycerolipis의 보고는 부족하다.
- [0004] 식물군에서 분리된 방오능의 glycolipid에 관한 연구보고 역시 glycoglyceride의 효능과 지방산의 효능에 관한 보고만 이루어졌으며, glycoglycerolipis에 관한 보고는 없었다. 최근, 해양방선균 스트렙토마이세스 (*Streptomyces coelestis* PK206-15)에서 방오능을 가진 4개의 glycoglycerolipis 물질(Cho, 2012)이 보고되었으나, 이는 포화지방산을 포함하는 glycoglycerolipis의 형태로 본 발명에서의 물질과 구조적 차이를 보인다. 지방산 구조의 차이는 방오능의 차이를 나타내며, 포화지방산보다 불포화지방산의 방오능이 더 뛰어난 것으로 보고되어 있다(Goto et al., 1992). 본 연구는 미세조류 파블로바 루테리(*Pavlova lutheri*)에서 분리한 불포화 지방산을 포함하는 5종(PgL1, PgL2, PgL3, PgL4, PgL5)의 glycoglycerolipis의 방오능에 관한 것이며, 특히 PgL4는 파블로바 루테리에서 보고된 적이 없는 신규한 지방산을 포함하고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0005] (특허문헌 0001) KR 10-2013-0117252 A
(특허문헌 0002) KR 10-2014-0118411 A

비특허문헌

- 1) Hellio C, De La Broise D, Dufosse L, Le Gal Y, and Bourgougnon N, *Mar. Environ. Res.*, 52, 231–247 (2001).
- 2) Armstrong E, Yan L, Boyd KG, Wright PC, and Burgess JG, *Hydrobiologia*, 461:37–40 (2001).
- 3) Armstrong E, Rogerson A, and Leftley JW, *Aquat. Microb. Ecol.*, 21, 49–57 (2000).
- 4) Qian PY, Lau SCK, Dahms HU, Dobretsov SV, and Harder T, *Mar. Biotechnol.*, 9, 399–410 (2007).
- 5) Lam C, Stang A, and Harder T, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 63, 283–291 (2008).
- 6) Nedashkovskaya OI, Kim SB, Han SK, Lysenko AM, Rohde M, Zhukova NV, Falsen E, Frolova GM, Mikhailov VV, and Bae KS, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 1967–1971 (2003).
- 7) Nedashkovskaya OI, Kim SB, Han SK, Lysenko AM, Mikhailov VV, and Bae KS, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 1173–1176 (2004).
- 8) Lee HS, Kwon KK, Yang SH, Bae SS, Park CH, Kim SJ, and Lee JH, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58, 2505–2510 (2008).
- 9) Sawabe T, Makino H, Tatsumi M, Nakano K, Tajima K, Iqbal MM, Yumoto I, Ezura Y, and Christen R, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 48, 769–774 (1998).
- 10) Singh RP, Mantri VA, Reddy CRK, and Jha B, *Aquat. Biol.*, 12, 13–21 (2011).
- 11) Egan S, James S, Holmström C, and Kjelleberg S, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 35, 67–73 (2001).
- 12) Boyd KG, Adams DR, and Burgess JD, *Biofouling.*, 14, 227–236 (1999).
- 13) Dobretsov SV, and Qian PY, *Biofouling.*, 18, 217–228 (2002).
- 14) Harder T, Dobretsov S, and Qian PY, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 274, 131–141 (2004).
- 15) Berdy J, *J. Antibiot.*, 58, 1–26 (2005).
- 16) Jensen PR, Mincer TJ, Williams PG, and Fenical W, *Antonie van Leeuwenhoek*, 87, 43–48 (2005).

[0006]

- 17) Silva-Aciaries F and Riquelme C, *Electron. J. Biotechnol.*, 11, 1-11. (2008).
- 18) Decho AW, *Continental Shelf Res.*, 20, 1257-1273 (2000).
- 19) Wiecek SK, and Todd CD, *Biofouling.*, 12, 81-93 (1998).
- 20) Park NH, Hong YK, and Cho JY, *J Kor Fish. Soc.*, 39, 333-337 (2006).
- 21) Guillard RL, and Ryther JH, *Canadian Journal of Microbiology*, 8, 229-239 (1962).
- 22) Clare AS, Rittschof D, Gerhart DJ, and Maki JS, *J. Invert. Reprod. Dev.*, 22, 67-76 (1992).
- 23) Jun WU, Long L, Song Y, Si Zhang S, Li Q, Huang J, and Xiao Z, *Chem. Pharm. Bull.*, 53, 330-332 (2005).
- 24) Kobayashi M, Hayashi K, Kawazoe K, and Kitagawa I, *Chem. Pharm. Bull.*, 40, 1404-1410 (1992).
- 25) Yanagi H, Matsufuji M, Nakata K, Nagamatsu Y, Ohta S, and Yoshimoto A, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 424-427 (2000).
- 26) Evans SM, *Biofouling.*, 14, 117-129 (1999).
- 27) Yebra DM, Kill S, and Dam-Johansen K, *Prog. Org. Coat.*, 50, 75-104 (2004).
- 28) Lamoree MH, and Swart CP, *J. Chromatogr.*, 970, 183-190 (2002).
- 29) Hall Jr. LW, Gidding JM, Solomon KR, and Balcomb R, *Crit. Rev. Toxicol.*, 29, 367-437 (1999).
- 30) Ranke J, and Jastorff B, *Environ. Sci. Poll. Res.*, 7, 109-110 (2000).
- 31) Fernández-Alba AR, Hernando MD, Piedra L, and Chisti Y, *Analytica Chimica Acta*, 456, 303-312 (2002).
- 32) Thomas KV, McHugh M, and Waldock M, *Sci. Total Environ.*, 293, 117-127 (2002).
- 33) Al-Fadhli A, Wahidulla S, and D'Souza L, *Okamura Glycobiology*, 16, 902-915 (2006).
- 34) Hiraga Y, Kaku K, Omoda D, Sugihara K, Hosoya H, and Hino M, *J. Nat. Prod.*, 65, 1494-1496 (2002).
- 35) Takahashi Y, Itoh K, Ishii M, Suzuki M, and Itabashi Y, *Marine Biology*, 140, 763-771 (2002).
- 36) Hölzl G, and Dörmann P, *Progress in Lipid Research*, 46, 225-243 (2007).
- 37) Ramm W, Schatton W, Wagner-Döbler I, Wray V, Nimtz M, Tokuda H, Enjyo F, Nishino H, Beil W, Heckmann R, Lurtz V, and Lang S, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64, 497-504 (2004).
- 38) Fusetani N, *Nat Prod Rep.*, 28, 400-410 (2011).
- 39) Baze A, Silkina A, Douzenel P, Faÿ F, Kervarec N, Morin D, Berge JP, and Bourgougnon N, *J. Appl. Phycol.*, 21, 395-403 (2009).
- 40) Bhattarai HD, Ganti VS, Paudel B, Lee YK, Lee HK, Hong YK, and Shin HW, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 23, 243-249 (2007).
- 41) Cho JY, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76(9), 1746-1751 (2012)
- 42) Rina Goto, Ryusuke Kado, Koji Muramoto & Hisao Kamiya, *Biofouling.*, 6(1), 61-68 (1992)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기 종래 기술의 문제점을 해결하고자 안출된 것으로서, 본 발명에서 해결하고자 하는 과제는 해양 미세조류 파블로바 루테리(*Pavlova lutheri*)의 추출물로부터 분리된 미세생물의 부착을 억제하는 물질을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 파블로바 루테리(*Pavlova lutheri*) 배양 추출물을 포함하는 부착성 해양생물 방오용 조성물을 제공한다.

[0009] 상기 조성물은 초기 부착성 해양생물의 방오용인 것이 바람직하다.

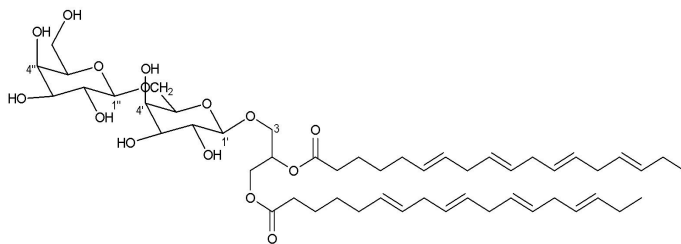
[0010] 상기 초기 부착성 해양생물은 초기 부착성 미세조류 또는 초기 부착성 세균인 것이 바람직하다.

[0011] 상기 초기 부착성 미세조류는 나비쿨라 속(*Navicula* sp.), 니치아 속(*Nitzschia* sp.), 암포라 속(*Amphora* sp.), 실린드로테카(*Cylindrotheca* sp.) 및 고포네마 속(*Gomphonema* sp.)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

[0012] 상기 초기 부착성 세균은 비브리오 속(*Vibrio* sp.), 스트렙토코커스 속(*Streptococcus* sp.), 알테로모나스 속(*Alteromonas* sp.) 및 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

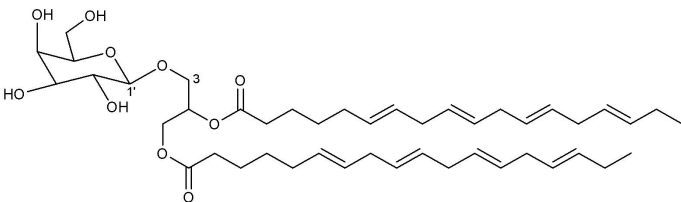
[0013] 또한, 본 발명은 다음의 구조식 1 내지 구조식 5로 이루어지는 군으로부터 선택되는 글리코글리세로리피드(glycoglycerolipid)를 포함하는 부착성 해양생물 방오용 조성물을 제공한다:

[0014] [구조식 1]



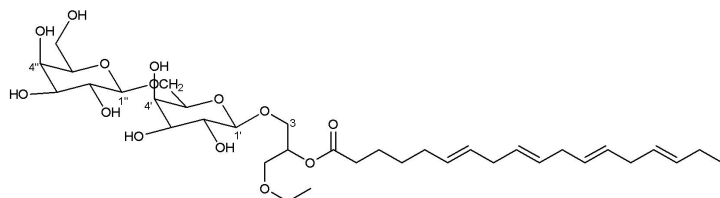
[0015] ;

[0016] [구조식 2]



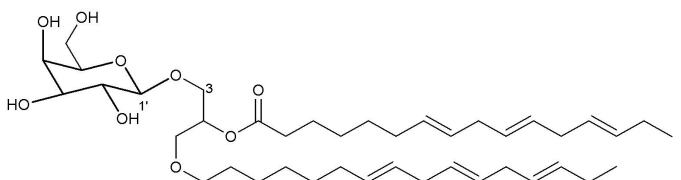
[0017] ;

[0018] [구조식 3]



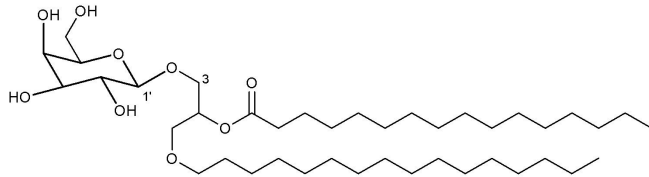
[0019] ;

[0020] [구조식 4]



[0021] ; 및

[0022] [구조식 5]



[0023]

[0024] 상기 조성물은 초기 부착성 해양생물의 방오용인 것이 바람직하다.

[0025] 상기 초기 부착성 해양생물은 초기 부착성 미세조류 또는 초기 부착성 세균인 것이 바람직하다.

[0026] 상기 초기 부착성 미세조류는 나비쿨라 속(*Navicula* sp.), 니치아 속(*Nitzschia* sp.), 암포라 속(*Amphora* sp.), 실린드로테카(*Cylindrotheca* sp.) 및 고포네마 속(*Gomphonema* sp.)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

[0027] 상기 초기 부착성 세균은 비브리오 속(*Vibrio* sp.), 스트렙토코커스 속(*Streptococcus* sp.), 알테로모나스 속(*Alteromonas* sp.) 및 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0028] 본 발명에서 제공하는 미세조류 파블로바 루테리 배양 추출물 또는 이로부터 분리된 5종의 glycoglycerolipid 성분은 부착 방지에 대해 기존 보고된 지방산 및 불포화지방산 성분의 glycolipid 보다 더 유의적인 방오활성을 나타내며 방오메카니즘의 초기단계에서 생물부착 방지에 우수한 효과가 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0030] 친환경적인 신규 방오화합물을 개발하기 위한 노력의 일환으로 본 발명에서는 다양한 미세조류의 추출물을 대상으로 미세생물에 대한 방오능을 확인하였고, 그 결과 파블로바 루테리(*Pavlova lutheri*)의 추출물에서 방오능을 나타내는 물질을 분리 구조분석하였다. 해양에서의 부착은 부착세균, 미세조류 및 포자, 따개비 및 담치류 등의 순서로 이루어지며, 미세생물인 부착세균과 미세조류의 부착은 연성부착성 (soft fouling) 생물과 강성부착성 (soft fouling) 생물의 부착을 순차적으로 유도한다. 초기 미세생물의 부착을 억제하는 것은 연성 및 강성생물의 부착을 억제할 수 있다. 따라서 본 발명에서는 초기 미세생물의 부착을 억제하는 방법을 적용하였다. 본 발명에서는 활성화합물의 분리 및 구조분석을 실시하였고 이들의 활성평가 결과를 효능계수로 나타내었다.

[0031] 따라서, 본 발명은 파블로바 루테리(*Pavlova lutheri*) 배양 추출물을 포함하는 부착성 해양생물 방오용 조성물을 제공한다.

[0032] 상기 조성물은 초기 부착성 해양생물의 방오용인 것이 바람직하다.

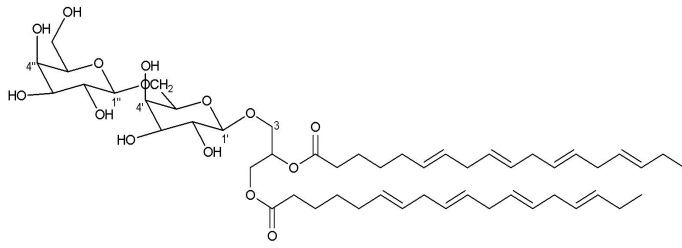
[0033] 상기 초기 부착성 해양생물은 초기 부착성 미세조류 또는 초기 부착성 세균인 것이 바람직하다.

[0034] 상기 초기 부착성 미세조류는 나비쿨라 속(*Navicula* sp.), 니치아 속(*Nitzschia* sp.), 암포라 속(*Amphora* sp.), 실린드로테카(*Cylindrotheca* sp.) 및 고포네마 속(*Gomphonema* sp.)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

[0035] 상기 초기 부착성 세균은 비브리오 속(*Vibrio* sp.), 스트렙토코커스 속(*Streptococcus* sp.), 알테로모나스 속(*Alteromonas* sp.) 및 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

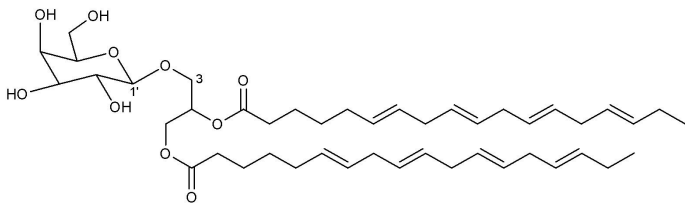
[0036] 또한, 본 발명은 다음의 구조식 1 내지 구조식 5로 이루어지는 군으로부터 선택되는 글리코글리세로리피드 (glycoglycerolipid)를 포함하는 부착성 해양생물 방오용 조성물을 제공한다:

[0037] [구조식 1]



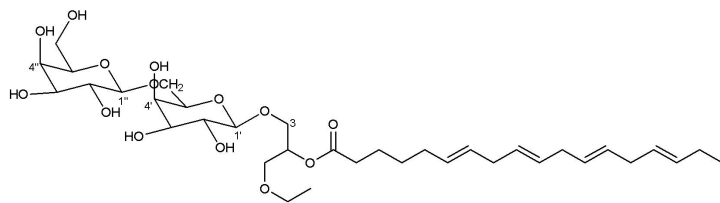
[0038] ;

[0039] [구조식 2]



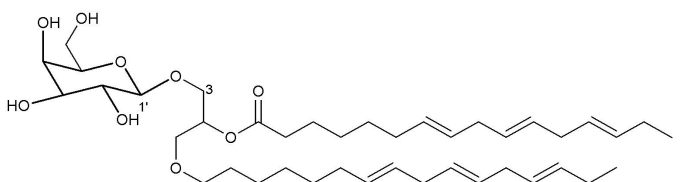
[0040] ;

[0041] [구조식 3]



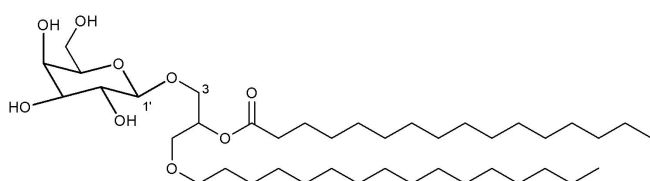
[0042] ;

[0043] [구조식 4]



[0044] ; 및

[0045] [구조식 5]



[0046] .

[0047] 상기 구조식 1의 화합물은 미세조류 파블로바루테리 추출물로부터 분리된 5종의 glycosylated lipid 물질 중 PgL1으로 명명되며, 물질명은 Di-octadeca-6E,9E,12E,15E-tetraenoic acid-O-acyl-3-O-[β-D-galactopyranosyl-(1''-6')-O-β-D-galactopyranosyl]-glycerol이다.

[0048] 상기 구조식 2의 화합물은 PgL2로 명명되며, 물질명은 Di-octadeca-6E,9E,12E,15E-tetraenoic acid-O-acyl-3-O-β-D-galactopyranosyl-glycerol이다.

[0049] 상기 구조식 3의 화합물은 PgL3로 명명되며, 물질명은 Octadeca-6E,9E,12E,15E-tetraenoic acid-ethyl-O-acyl-3-O-[β-D-galactopyranosyl-(1''-6')-O-β-D-galactopyranosyl]-glycerol이다.

[0050] 상기 구조식 4의 화합물은 PgL4로 명명되며, 물질명은 Di-hexadeca-7E,10E,13E-trienoic acid-O-acyl-3-O-β-D-galactopyranosyl-glycerol이다.

[0051] 상기 구조식 5의 화합물은 PgL5로 명명되며, 물질명은 Di-palmitic acid-O-acyl-3-O-β-D-galactopyranosyl-

glycerol이다.

[0052] 상기 조성물은 초기 부착성 해양생물의 방오용인 것이 바람직하다.

[0053] 상기 초기 부착성 해양생물은 초기 부착성 미세조류 또는 초기 부착성 세균인 것이 바람직하다.

[0054] 상기 초기 부착성 미세조류는 나비쿨라 속(*Navicula* sp.), 니치아 속(*Nitzschia* sp.), 암포라 속(*Amphora* sp.), 실린드로테카(*Cylindrotheca* sp.) 및 고포네마 속(*Gomphonema* sp.)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

[0055] 상기 초기 부착성 세균은 비브리오 속(*Vibrio* sp.), 스트렙토코커스 속(*Streptococcus* sp.), 알테로모나스 속(*Alteromonas* sp.) 및 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

[0056] 이하에서는 구체적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

[실시예]

[0058] 1. 재료 및 방법

[0059] 1.1. 해양미세조류 파블로바 루테리(*Pavlova lutheri*)의 배양 및 추출

[0060] 해양미세조류 파블로바 루테리(*Pavlova lutheri*)는 국립수산물학원에서 분양 받아 사용하였고 F/2 배지에 배양하였다. 배양은 20℃, 광도 $70 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 12:12 (명기:암기) 사이클 하에서, 50rpm으로 진탕 배양하였으며, 10일 후 수확하여 80% methanol을 이용하여 12시간 추출하고 진공농축기를 통해 농축하였다.

[0061] 1.2. 활성물질 분리

[0062] 파블로바 루테리(*Pavlova lutheri*)는 3L Sakaguchi flask를 이용하여 대량배양 하였고, 활성검증결과를 토대로 물질을 분리하였고, Cho(2012)의 방법을 변형하여 실리카겔 크로마토그래피와 HPLC를 이용하여 분리를 실시하였다. 실리카겔크로마토그래피는 플래시 컬럼 (100 g; 70-230 mesh) 분리로 클로로포름과 메탄올을 전개용매로 하여 10개의 분획구를 얻었고 활성검증을 통해 선택된 분획구는 메탄올:아세트니트릴 (5:5)에 녹여 HPLC로 분리하였다. HPLC 분리는 YMC-Pack ODS-5-A columns (25 cm × 10 mm i.d., 5 μm ; YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan)을 이용하였다. Agilent 1200 liquid chromatography system을 사용하였고 검출기는 RI detector (Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였다. 용매는 methanol/water (95:5)로 하였고 유속은 분당 2.5mL로 하였다.

[0063] 1.3. 구조분석

[0064] 분리된 물질의 구조분석을 위해 고성능질량분석기 (HRESI-MS), JMS 700; JEOL, Tokyo, Japan)와 핵자기공명분석 (NMR, JNM-ECP 600 NMR spectrometer; JEOL)을 사용하였다. 질량분석은 JMS 700 system (JEOL, Tokyo, Japan)을 이용해 positive ion mode에서 실시하였다. 핵자기공명분석에서의 용매는 methanol-d₄를 이용하여 ¹H, ¹³C, 상관분석법(correlation spectroscopy: COSY), 이중핵 다중 결합 상관관계(heteronuclear multiple bond correlation: HMBC), 이중핵 다중 양자 결합력(heteronuclear multiple quantum coherence: HMQC)등을 측정하였다.

[0065] 지방산의 구조분석을 위하여 가수분해와 메틸화 후 가스크로마토그래피-질량분석기를 통해 스탠다드 지방산과 비교분석을 실시하였다. 분석물질을 메탄올에 녹인 후 1% NaOMe-MeOH를 첨가하였고 5시간 동안 실온에서 섞어주었다. AG50W-X8(H+form; Bio-Rad, Richmond, CA, USA)를 이용하여 중화하였고 클로로포름과 물을 이용하여 수용성부분과 지용성부분으로 나누었다. 지용성부분인 클로로포름 층을 농축하여 가스크로마토그래피로 분석하였다.

[0066] 1.4. 방오활성검증

[0067] 수해양에서 생물부착의 초기는 부착성 세균과 미세조류와 같은 미세생물의 군집 형성으로 이루어진다 (Silva-Aciares and Riquelme 2008). 군집형성과정에서 세포밖으로 방출된 중합체와 생물막을 인식하여 연성(soft-fouling) 및 강성부착 (hard-fouling) 생물의 부착이 일어나게 된다(Wieczorek and Todd 1998; Railkin 2004). 이러한 보고들은 초기 미세생물의 부착억제가 부착방지물질 개발에 있어 중요함을 의미하며 초기 미세 생물의 부착을 억제하는 것은 수중환경에서 생물의 부착을 막을 수 있는 가장 효과적인 방법이 될 것이다(Cho, 2012). 따라서 본 개발은 초기단계의 미세생물을 대상으로 개발을 진행하였다.

- [0068] 미세생물에 대한 방오활성은 부착미세조류 5종과 부착성 세균 5종을 이용하여 효능검증을 실시하였다. 규조에 대한 방오효능은 slide glass를 부착기질로 활용한 Cho (2012)의 방법을 사용하였고 효능계수 (therapeutic ratio)로 나타내었다. 부착 규조는 한국 해양 미세조류은행에서 분양 받았고 F/2 배지에서 20℃, 70 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 광도에서 12:12 (명기:암기)사이클에서, 50 rpm 진탕 배양하였다. 슬라이드 글라스($1 \times 1.5 \text{ cm}^2$)를 12시간 동안 10% HCl에서 세척하고 12시간 증류수에 행구었다. 3개의 슬라이드 글라스를 6 well-plate에 수직으로 두고, $2.5 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ 의 초기 세포밀도는 f/2 medium에 배분하였고, 추출물을 추가하였다. 3일 후, 각 슬라이드($1 \times 1 \text{ cm}^2$)에 부착된 미세조류의 수를 측정하여, 상대값($\text{S/C} \times 100$)을 측정하였다. 물질의 방오효능은 LC_{50} (반수치사농도)와 EC_{50} (반수영향농도)를 구하여 효능계수 (TR: therapeutic ratio)로 나타내었다 (참조: Clare 1992). 효능계수는 독성에 대한 효능의 비율을 나타낸 것으로 값이 15 이상인 경우 친환경의 방오효능을 가진 것으로 판단한다(Fusetani, 2011).
- [0069] 부착성 세균은 국립수산물학원에서 분양받아 생물검증에 사용하였고 세균은 1 % NaCl을 첨가한 brain heart infusion agar를 이용한 25℃에서 $10^3 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 로 배양하였다. 200mL의 세균배양액을 96 well plate에 분주하고 활성물질을 첨가하였다. 활성물질의 효능은 세균의 MIC값으로 나타내었고 24시간 배양 후 600nm 흡광도에서 측정하였다.
- [0070] **1.5. 독성검사**
- [0071] 활성물질의 독성평가는 브라인 쉬림프 *Artemia salina*를 대상으로 실시하였고 실험과정은 US-EPA 기준을 따라 실시하였다. (US Environmental Protection Agency for toxicity tests for aquatic organisms, 2002). Cysts 형태의 *Artemia*는 Westwood industry (Great Salt Lake, UT, USA)의 상품을 구입하여 사용하였고 실험방법은 Rao et al. (2007)의 방법으로 실시하였다. 부화된 *Artemia*는 인공해수에 24시간 배양하였고 nauplii 유생형태의 20개체를 24 well plate에 2mL 인공해수에 넣고 검증물질을 접종하였다. 48시간 후 사망율을 확인하였고 독성결과는 NOEC값과 LC_{50} 값으로 나타냈다. LC_{50} 값은 반수치사농도, NOEC값은 비영향농도로 정의한다.
- [0072] **2. 결 과**
- [0073] **2.1. 활성물질의 분리**
- [0074] 미세조류 파블로바 루테리(*Pavlova lutheri*)를 10일간 배양 후 원심분리를 실시하였고, cells pellet (7.85g)을 80% MeOH로 추출하였다. cell pellet 추출물(2.83 mg)은 에틸아세테이드와 물로 분리하였고 지질층 (1639 mg)은 실리카겔크로마토그래피로 분리하였다. 전개용매인 클로로포름:메탄올의 비율 50 : 50 (v/v), 40 : 60 (v/v)인 2개의 분획구에서 효능을 나타내었고 이 분획구들은 각각 역상 HPLC를 통해 분리하였으며 90%와 95%의 메탄올을 이용하여 YMC-Pack ODS-5-A columns (25 cm $\times$ 10 mm i.d., 5 μm ; YMC Co., Ltd., Kyoto, Japan)에 적용하였다. 그 결과 PgL1 (27 mg), PgL2 (30 mg) PgL3 (28 mg), PgL4 (7 mg), PgL5 (15 mg)의 5개 물질을 분리하였다.
- [0075] **2.2. 활성물질의 구조분석**
- [0076] 파블로바 루테리(*Pavlova lutheri*)로부터 분리된 효능물질은 질량분석기와 핵자기공명분석의 데이터를 해석하여 구조분석을 실시하였다. $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼, $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼, COSY, HMQC, HMBC를 이용하여 구조분석을 실시한 결과 5개의 활성물질(PGL1, PGL2, PGL3, PGL4, PGL5)은 당과 지방산 ester인 glycolglycerolipid인 것으로 확인되었다. 당과 글리세롤의 수소-NMR과 탄소-NMR은 표 1에 나타내었고 물질의 분자량 및 지방산은 표 2에 나타내었다.
- [0077] 물질 PgL1의 탄소 NMR에서 δC 64.1 (C-1), 71.3 (C-2), 68.6 (C-3)와 수소 NMR에서의 dH 4.12, 4.01 (H-1a, b), 5.28 (H-2), 3.81 (H-3)는 glycerol (부분구조1)을 나타내며, 또 다른 그룹의 탄소 δC 105.4 (C-1'), 74.3 (C-2'), 75.2 (C-3'), 68.8 (C-4'), 75.1 (C-5'), 69.2 (C-6'), coupling 상수 값인 J H-2'H-3' (9.6 Hz)와 J H-3'H-4' (3.4 Hz)는 적도-축방향의 배치를 나타내며 이것은 D-galactopyranose를 나타낸다 (부분구조 2). 세 번째 그룹의 탄소 δC 105.3 (C-1''), 71.1 (C-2''), 70.8 (C-3''), 71.4 (C-4''), 73.9 (C-5''), 66.1 (C-6''), 와 coupling 값인 J H-2''H-3'' (9.1 Hz), J H-3''H-4'' (3.8 Hz)는 또 다른 D-galactopyranose moiety를 나타낸다 (부분구조 3). 부분구조 2의 아노머 배치는 coupling 상수 값 J H-1'H-2' (7.9 Hz)과 δC 105.4를 통해 β 형태인 것을 확인하였다. 부분구조 3 역시 coupling 상수 값인 J H-1'H-2' (7.8 Hz) 과 δC 105.3 값을 통해 β 형태인 것으로 확인되었다. 이 결과는 물질이 di-O-acyl-3-O-[β -D-galactopyranosyl-(1'-6')-O- β -D-galactopyranosyl]-glycerol 인 것을 나타낸다. 두 개의 카르보닐 탄소 (δ

C 175.4 와 175.6)는 HMBC 데이터를 통해 글리세롤의 H-1 과 H-2 와 연결되어 있는 것을 알 수 있다. 탄소 NMR 에서의 δC 175.1는 글리세롤의 H-1과 연결되는 것을 HMBC를 통해 확인하였다. PgL1의 지방산 분석을 위해 물질 은 NaOMe-MeOH로 처리하였고 지방산 ester를 GC-MS 분석결과 Octadeca-6E,9E,12E,15E-tetraenoic acid (18:4(n-3)) 두 분자로 확인되었다.

[0078] 물질 PgL2는 구조는 galactose 한 분자로 구성되어 galactopyranosyl-glycerol의 NMR 스펙트럼은 PgL1과 동일 하며 지방산 두 분자가 Octadeca-6E,9E,12E,15E-tetraenoic acid (18:4(n-3))로 확인되었다. 물질 PgL3은 galactopyranosyl-glycerol의 구조는 PgL1과 동일하며 지방산은 Octadeca-6E,9E,12E,15E-tetraenoic acid 한분 자로 구성된다. PgL4는 D-galactopyranose moiety 한분자로 구성되며 지방산은 Hexadeca-7E,10E,13E-trienoic acid 구성되며 이 지방산 조합은 미세조류 파블로바루테리에서 분리된 적 없는 신규한 조합이다. PgL5는 D-galactopyranose moiety 한분자와 Palmitic acid 2분자로 구성된다.

[0079] 5종의 물질은 기존에 보고되지 않은 신규한 구조의 물질이다.

[0080] [표 1] PgL1의 탄소 및 수소 NMR 스펙트럼

C-Position	C-ppm	H-Position	H-ppm	Multiplicities (J in Hz)
1	64.1 (CH ₂)	1a	4.12	dd (11.2, 4.5)
2	71.3 (CH)	1b	4.01	dd (11.2, 6.1)
3	68.6 (CH ₂)	2	5.28	m
Gal-1		3	3.81	dd (10.0, 3.8)
1'	105.4 (CH)		3.95	dd (10.0, 5.2)
2'	74.3 (CH)	Gal-1		
3'	75.2 (CH)	1'	4.42	d (7.9)
4'	68.8 (CH)	2'	3.67	dd (7.9, 9.6)
5'	75.1 (CH)	3'	3.53	dd (3.4, 9.6)
6'	69.2 (CH ₂)	4'	3.92	br d (3.4)
Gal-2		5'	3.81	m
1''	105.3 (CH)	6'a	3.74	dd (10.4, 6.2)
2''	71.1 (CH)	6'b	3.88	dd (10.4, 5.7)
3''	70.8 (CH)	Gal-2		
4''	71.4 (CH)	1''	4.90	d (7.8)
5''	73.9 (CH)	2''	3.86	dd (7.8, 9.1)
6''	66.1 (CH ₂)	3''	3.73	dd (3.8, 9.1)
		4''	3.92	br d (3.8)
		5''	3.70	m
		6' 'a	3.69	dd (11.2, 6.6)
		6' 'b	3.66	dd (11.2, 5.1)

[0081]

[0082] [표 2] 파블로바 루테리(*Pavlova lutheri*)에서 분리된 PgL 물질의 분자량 및 지방산구조

Glycoglycerolipids	Molecular composition	Molecular weight [M+H] ⁺	Fatty acids composition
PgL1	C ₅₁ H ₈₀ O ₁₅	933.5581	Octadeca-6,9,12,15-tetraenoic acid
PgL2	C ₄₅ H ₇₀ O ₁₀	771.5058	Octadeca-6,9,12,15-tetraenoic acid
PgL3	C ₃₅ H ₅₈ O ₁₄	703.3948	Octadeca-6,9,12,15-tetraenoic acid
PgL4	C ₄₁ H ₆₈ O ₉	705.4953	Hexadeca-7,10,13-trienoic acid
PgL5	C ₄₁ H ₈₀ O ₉	717.5894	Palmitic acid

[0083]

[0084] 2.3. Glycoglycerolipids의 방오활성

[0085] 본 발명에서, 5개의 glycolipid는 미세조류 파블로바 루테리부터 분리되었고, 부착성 미세생물에 대해 높은 방오활성이 있으며, 그 결과는 표 3과 표 4에 나타내었다. 5종의 부착성 미세조류(*Navicula annexa*, *Nitzschia* sp, *Amphora* sp, *Cylindrotheca* sp, *Gomphonema* sp)에 대한 물질의 방오활성계수는 79-175의 범위에서 나타났으며, 부착세균(*Vibrio anguillarum*, *Vibrio harvey*, *Streptococcus* sp, *Alteromonas* sp, *Pseudomonas aeruginosa*)에 대한 MIC값은 0.28-1.58 μ g/mL의 범위에서 나타났다. 본 발명에서 분리된 방오물질의 활성계수는 15 이상으로 친환경의 방오제 효능을 나타낸다.

[0086] [표 3] 부착성 미세조류에 대한 glycoglycerolipids의 방오효능계수

Test organism	Compound (μ g/mL)	LC ₅₀	EC ₅₀	EC ₁₀₀	TR
<i>Navicula annexa</i>	PgL1	0.35	0.002	0.01	175
	PgL2	0.08	0.0006	0.003	133
	PgL3	0.51	0.004	0.0184	128
	PgL4	0.10	0.0008	0.004	125
	PgL5	0.6	0.005	0.031	120
<i>Nitzschia</i> sp	PgL1	0.21	0.002	0.012	105
	PgL2	0.06	0.0005	0.003	120
	PgL3	0.31	0.0026	0.018	119
	PgL4	0.13	0.001	0.007	130
	PgL5	0.52	0.0042	0.023	123
<i>Amphora</i> sp	PgL1	4.6	0.032	0.22	144
	PgL2	1.6	0.012	0.085	134
	PgL3	5.2	0.05	0.365	104
	PgL4	2.2	0.02	0.158	110
	PgL5	8.9	0.065	0.39	137
<i>Cylindrotheca</i> sp	PgL1	0.6	0.004	0.024	150
	PgL2	0.10	0.0009	0.005	111
	PgL3	0.3	0.0038	0.019	79
	PgL4	0.3	0.0025	0.012	120
	PgL5	0.8	0.007	0.037	114
<i>Gomphonema</i> sp	PgL1	1.6	0.015	0.103	106
	PgL2	0.8	0.0056	0.04	143
	PgL3	2.8	0.023	0.186	122
	PgL4	1.1	0.01	0.083	111
	PgL5	3.3	0.04	0.21	83

[0087]

[0088] [표 4] 세균에 대한 glycoglycerolipids의 MIC값

Compound (μg/mL)	Sp 1	Sp 2	Sp 3	Sp 4	Sp 5
PgL1	0.91	1.21	0.94	0.82	0.91
PgL2	0.28	0.41	0.31	0.31	0.35
PgL3	0.96	1.29	1.01	1.16	0.99
PgL4	0.36	0.62	0.39	0.53	0.58
PgL5	1.24	1.58	1.48	1.42	1.28

SP1: *Vibrio anguillarum*, SP2: *Vibrio harvey*, SP3: *Streptococcus sp.*

Sp 4: *Alteromonas sp.*, SP5: *Pseudomonas aeruginosa*,

[0089]

[0090] 2.4. 독성검사

[0091] 독성검사 결과 분리된 5종의 방오물질은 *Artemia*에 대한 NOEC 값이 부착생물의 EC100값보다 높은 수치로 나타났다. 이러한 결과는 분리된 방오물질이 부착성미세생물에 효능을 나타내는 농도에서 비표적생물에는 독성이 없음을 보여준다.

[0092] [표 5] *Artemia*에 대한 glycoglycerolipids의 독성

Compound (μg/mL)	NOEC	LC50
PgL1	58.6	126.8
PgL2	38.4	86.4
PgL3	62.1	134.8
PgL4	41.1	115.1
PgL5	70.8	161.8

[0093]

[0094] 오랜 기간 동안 많은 다양한 해양자원이 방오물질 개발의 생물자원으로 사용되어 다양한 물질군의 방오물질이 소개되었다. 그러나 해양자원을 이용한 방오제 개발은 대량생산의 한계를 나타내는 문제가 있으며 본 연구에서 사용된 생물종은 대량배양이 가능한 미세조류로 방오제 개발의 훌륭한 생물자원이 될 것이다. 글리코르라이세로 리피드는 계면활성제, 백신유화제, 의료용으로 활용되고 있으나 방오제로의 개발은 드물다.

[0095] 포화지방산을 포함하는 glycoglycerolipis의 보고가 있으나 본 발명에서의 물질과는 지방산 구조에서 차이를 보이며 본 발명에서 제시하는 불포화지방산을 포함하는 glycoglycerolipis가 더 유의적인 효과를 나타내고 있다.