

(뒷면)

(앞면)

<p data-bbox="199 1153 391 1243">주 의 (편집순서 8)</p> <p data-bbox="183 1299 406 1332">14포인트, 고딕체</p>	<p data-bbox="470 750 518 918">과 제 명</p> <p data-bbox="470 1108 518 1288">2 0 0 4</p> <p data-bbox="470 1332 518 1568">해 양 수 산 부</p>	<p data-bbox="694 492 1316 537">해양한국발전프로그램(KSGP)연구개발사업</p> <p data-bbox="726 548 1284 604">연 구 보 고 서</p> <p data-bbox="566 660 1444 716">양식장 주변해역에서 서식하는 해양생물</p> <p data-bbox="702 739 1308 795">자원의 탐색과 그 유효이용</p> <p data-bbox="566 828 1444 1019">(Screening of marine organisms inhabited around the marine farm, and their effective utilization)</p> <p data-bbox="861 1176 1141 1220">2004. 07. 31.</p> <p data-bbox="718 1422 1284 1478">부경대학(교) SG연구사업단</p> <p data-bbox="805 1601 1204 1668">해 양 수 산 부</p>
---	--	---

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “양식장 주변해역에서 서식하는 해양생물 자원의 탐색과 그 유효
이용에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 7월 31일

대학교명: 부경대학교

사업단장: 김동수

연구팀장: 손병화

참여교수: 최재수, 이훈구

요 약 문

I. 과제명

양식장 주변해역에서 서식하는 해양생물자원의 탐색과 그 유효이용

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 해양 생물 자원 (해조류, 박테리아, 바이러스, 균류)의 개발, 관리 및 보존
2. 양식생물의 성장 혹은 질병과 관련한 해양 미생물의 역할과 그 관련성 탐색
 - (1) 질병양상 파악
 - (2) 분자생물학적 기법을 도입한 어병의 신속진단
 - (3) 항균제 내성과약과 최소억제 농도를 조사하여 효율적 항균제 처치
3. 해양 미생물 자원의 유효이용: 고부가성 신물질 탐색기술 개발

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 양식장 주변해역의 숙주재료 및 양식 어류로부터 균주의 분리, 동정, 인공접종, 보존 및 database 화
2. 질병양상 파악, 어병의 신속 진단 및 처치
 - (1) 양식넙치의 복수증 원인균 탐색 및 병원성검정
 - 1) 원인체 분리
 - 2) 인공감염시험
 - 3) 항균제 내성검사 및 β -lactamase생성균주 유무확인
 - (2) Vibrio 신종확인
3. 정밀화학 소재 선도물질 개발
 - (1) 해양균류의 배양, 수확, 추출 및 표준시료의 조제
 - (2) 해조류의 추출 및 표준시료의 조제
 - (3) 1차 효능검색 (라디칼 소거능, 미백 효능)
 - (4) 연구대상 시료의 도출 및 생물활성 성분의 분리 정제
 - (5) 선도물질 개발: 피부노화 및 미백 효능 물질

IV. 연구개발 결과 및 활용계획

1. 연구개발 결과

(1) 어병 세균, 해양균류 및 해조류의 분리, 보존 및 database 화

- 어병 세균: 3속 7종
- 어병 바이러스: 2 종
- 해양균류: 300 균주
- 해조류: 17 종

(2) 양식 넙치 및 우럭의 출혈성 궤양 및 복수증의 원인균 규명과 처치

- 1) 하절기 복수증의 세균상(microbial flora) 확인
- 2) 복수증 원인체 세균: 기존에 알려지지 않은 *Vibrio harveyi* 외 6종
- 3) 복수증 원인체 바이러스: Marine Birnavirus (MBV) and Lymphocystis virus
- 4) 치료: 항균제 감수성 시험결과 테트라사이클린 계열의 항균제는 복수증 분리균주들에게 약효가 있음

(3) 생물활성 연구대상 시료의 도출

- 1) 라디칼 소거활성
 - 해양 균류: 균주 2 종 도출 (MFA27, MFA212) 및 활성 [27B (IC₅₀: 9 µg/mL), 212B (IC₅₀: 23 µg/mL)].
 - 해조류: 곰피 (*Ecklonia stolonifera*) [EtOAc ext. (% Inhibition: 40)]
- 2) Tyrosinase 억제활성
 - 해조류: 곰피 (*Ecklonia stolonifera*) [EtOAc ext. (IC₅₀: 67.0 µg/mL)]
- 3) 자외선-A 차단작용
 - 해양균류: 1종 (MFA212) [212B (ED₅₀: 160 µg/mL)]

(4) 생물활성 성분의 분리정제 및 구조결정

- 1) 4 종류의 알칼로이드:
 - N-acetyltryptamine, oxaline, dihydroxyisoechinulin A, echinulin.
- 2) 4종의 phlorotannin류: eckstolonol, eckol, phlorofucofuroeckol A, dieckol

(5) 정밀화학 소재 개발

- 1) 라디칼 소거활성 물질 [표준물질: ascorbic acid (IC₅₀: 10 µM/mL)]
 - 1 종류의 알칼로이드: dihydroxyisoechinulin A ((IC₅₀: 10 µM/mL)
 - 4종의 phlorotannin류: eckstolonol (IC₅₀: 8 µM/mL), eckol (IC₅₀: 11 µM/mL), phlorofucofuroeckol A IC₅₀: 4 µM/mL), dieckol (IC₅₀: 6 µM/mL)
- 2) Tyrosinase 억제활성 물질 ([표준물질: kojic acid (IC₅₀: 44 µM/mL)]
 - 4종의 phlorotannin류: eckstolonol (IC₅₀: 341 µM/mL), eckol (IC₅₀: 89 µM/mL), phlorofucofuroeckol A (IC₅₀: 295 µM/mL), dieckol (IC₅₀: 3 µM/mL)
- 3) 자외선-A 차단활성 물질 [표준물질: oxybenzone (ED₅₀: 350 µM/mL)]
 - 1 종류의 알칼로이드: dihydroxyisoechinulin A (ED₅₀: 130 µM/mL)

2. 활용계획

(1) 어병의 신속진단 및 치료

1) *V. harveyi*의 형광발색을 이용한 균주 신속 동정에 활용

2) *V. harveyi*의 분리빈도를 측정함으로써, 양식넙치의 복수증 질병예보제 활용

(2) 지표물질의 대량생산 및 2차 생물활성 검색

(3) 노화억제제 및 피부 미백제 개발을 위한 새로운 선도물질 혹은 후보물질로의 개발.

V. 기대효과

1. 자원의 개발, 보존 및 응용

2. 어병의 간편한 진단 및 통제

(1) 넙치 복수증 예보제 가능

(2) 적정항균제 선정과 투여시기, 투여량의 합리적 결정

3. 고부가성 정밀화학 소재 (의약품, 화장품)의 선도물질 개발

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title

Screening of marine organisms inhabited around the marine farm, and their effective utilization

II. Object and Importance of the Study

1. Development of the resource of marine microorganism: Isolation, stock and database of the marine-derived bacteria and fungus from the mariculture area.
2. Search for the role and relationship between mariculture-organisms and microorganism.
3. Effective utility and application of the marine-derived microorganisms.

III. Contents and Scopes

1. Isolation, stock and database of the marine-derived bacteria and fungus from the mariculture area.
2. Examination of the disease for the cultured organisms, fast diagnosis and development of antibiotic treatment method.
3. Development of the lead compound for fine chemicals
 - (1) Culture, harvest, extraction of the marine-derived microorganisms and preparation of standard sample for assay.
 - (2) Extraction of the marine algi and preparation of standard sample for assay.
 - (3) Primary biological assay: radical scavenging activity and tyrosinase inhibitory activity.
 - (4) Selection of the target strain for research, and assay-guided fractionation and isolation of secondary metabolites.
 - (5) Development of lead compound: anti-aging and skin whitening materials

IV. Results and Utilizing Plan

1. Results

(1) Isolation and stock of the marine-derived bacteria, fungi and algi, and construction of their database.

- 1) Fish pathogenic bacteria: 3 genus and 7 species
virus: 2 species
- 2) Marine-derived fungus: 300 strains
- 3) Marine alga: 17 species

(2) Identification of pathogenic bacteria and virus for the hemorrhagic ulcer and ascites of the flounder in the marine farms.

- 1) Identification of microbial flora for ascites in summer.
- 2) Isolation of *Vibrio harveyi* as a new pathogenic bacteria and marine.
- 3) Isolation of *Birnavirus* and *Lymphocystis virus* as new pathogenic virus.
- 4) Tetracycline antibiotics are effective in the treatment of ascitic disease.

(3) Biological assay and Selection of the target strain and sample for research.

- 1) Radical scavenging activity
 - Marine-derived fungus: two samples (27B, 212M) and their activities [27B (IC₅₀: 9.1 µg/mL), 212B (23.8 µg/mL)].
 - Marine alga: one sample (*Ecklonia stolonifera*) and its activity [EtOAc ext. (% Inhibition: 40)]
- 2) Anti-tyrosinase activity
 - Marine alga: one sample (*Ecklonia stolonifera*) and its activity [EtOAc ext. (IC₅₀: 67.0 µg/mL)]
- 3) Ultraviolet-A protecting activity
 - Marine-derived fungus: one sample (MFA212) and its activity [212B (ED₅₀: 160 µg/mL)]

(4) Isolation-purification of bioactive constituents and structural determination.

- 1) Four alkaloids: N-acetyltryptamine, oxaline, dihydroxyisoechinulin A, echinulin.
- 2) Four phlorotannins: eckstolonol, eckol, phlorofucofuroeckol A, dieckol

(5) Development of fine chemical lead compounds

- 1) Radical scavenging compound [positive control: ascorbic acid (IC₅₀: 10 µM/mL)]
 - one alkaloid: dihydroxyisoechinulin A ((IC₅₀: 10 µM/mL)
 - four phlorotannins: eckstolonol (IC₅₀: 8 µM/mL), eckol (IC₅₀: 11 µM/mL), phlorofucofuroeckol A (IC₅₀: 4 µM/mL), dieckol (IC₅₀: 6 µM/mL)
- 2) Anti-tyrosinase active compound [positive control: kojic acid (IC₅₀: 44 µM/mL)]

- four phlorotannins: eckstolonol (IC₅₀: 341 μM/mL), eckol (IC₅₀: 89 μM/mL), phlorofucofuroeckol A (IC₅₀: 295 μM/mL), dieckol (IC₅₀: 3 μM/mL)
- 3) Ultraviolet-A protecting compound [positive control: oxybenzone (ED₅₀: 350 μM/mL)]
 - one alkaloid: dihydroxyisoechinulin A (ED₅₀: 130 μM/mL)

2. Utilization Plan

- (1) Fast diagnosis of disease for the cultured organisms, and cure or remedy.
 - 1) Identification of the pathogenic strain by the halophilic luminescent bacteria *Vibrio harveyi*.
 - 2) The forecast for ascites of the cultured flounders
- (2) Mass production of target compounds and second state biological screening.
- (3) Development of new lead or candidate for antioxidant and antiaging or skin whitening materials.

V. Expected Effect

1. Development of the marine resource and their application to fine chemical industry.
2. Simple diagnosis of disease for the cultured flounder, and treatment with tetracycline antibiotics.
3. Development of new lead compound for high value-added fine chemicals (drug, cosmetics).

CONTENTS (영 문 목 차)

Submission	1
Abstract	2
Summary	5
Chapter 1. Introduction	10
Paragraph 1. Object of the study	10
Paragraph 2. Importance	10
Chapter 2. Scope of project	11
Paragraph 1. Isolation and identification of the pathogenic bacteria, and treatment	11
Paragraph 2. Development and application of bioactive marine natural product	11
Chapter 3. Experimental contents and results	14
Paragraph 1. Isolation and identification of the pathogenic bacteria, and treatment	14
1. Experimental	14
2. Results	18
3. Discussion	33
Paragraph 2. Development and application of bioactive marine natural product from the marine-derived fungus	37
1. Experimental	37
2. Results and discussion	42
Paragraph 3. Development and application of bioactive marine natural product from the marine alga	48
1. Experimental	48
2. Results and discussion	52
Chapter 4. Achievement of project aim	55
Paragraph 1. Achievements	55
Paragraph 2. Outcomes	56
Paragraph 3. Contribution	59
Chapter 5. Utilization plan of research result	60
Chapter 6. References	61

목 차

제출문	1
요약문	2
Summary	5
Contents	8
목차	9
제1장 서론	10
제1절 연구개발의 목적과 범위	10
제2절 필요성	10
제2장 국내외 연구개발 현황	11
제1절 세균의 분리, 신속한 동정 및 처치	11
제2절 생물활성 해양천연물질의 개발과 유효이용	11
제3장 연구개발 수행내용 및 결과	14
제1절 세균의 분리, 신속한 동정 및 처치	14
1. 연구개발 수행내용	14
2. 결과	18
3. 고찰	33
제2절 해양균류로부터 생물활성 해양천연물질의 개발과 유효이용	37
1. 연구개발 수행내용	37
2. 결과 및 고찰	42
제3절 해조류로부터 생물활성 해양천연물질의 개발과 유효이용	48
1. 연구개발 수행내용	48
2. 결과 및 고찰	52
제4장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도	55
제1절 목표 달성도	55
제2절 연구 성과	56
제3절 대외 기여도	59
제5장 연구개발결과의 활용계획	60
제6장 참고문헌	61

제1장 서론

제1절 연구개발의 목적과 범위

1. 풍부한 해양 미생물 자원 (박테리아, 균류)의 개발, 관리 및 보존
2. 양식생물의 성장 혹은 질병과 관련한 해양 미생물의 역할과 그 관련성 탐색
 - 가. 중요 해산어의 질병양상 파악
 - (1) 계절별 양식 해산어의 주요 질병의 증상파악
 - (2) 분자생물학적 기법을 도입한 어병의 신속진단
 - (가) 병어체로부터 질병원인체의 분리
 - (나) 질병원인체의 분류군 규명 (바이러스, 세균 등)
 - (다) 질병원인체의 종 동정
 - (라) 기존표현형 중심의 분류체계로 동정이 불가능한 경우 분자생물학적 기법 도입)
 - (3) 항균제 내성과약과 최소억제 농도를 조사하여 효율적 항균제 처치
3. 해양 미생물 자원의 유효이용
 - 가. 고부가성 정밀화학소재 (의약, 향장) 개발

제2절 필요성

1. 해양미생물자원의 개발, 보존 및 효율적 이용
2. 중요 양식 어패류의 병원성 미생물의 신속한 진단과 적절한 항균제 투여를 유도
3. 병원성 미생물에 의한 양식 어패류의 피해 예방
4. 양식 산업의 항구적 발전과 어민의 소득 증대
5. 고부가성 신물질 탐색기술 개발
6. 단백질원으로서 양식어패류의 소비 증대와 국민건강 증진

제2장 국내외 연구개발 현황

제1절 세균의 분리, 신속한 동정 및 처치

1. 국내 연구현황

넙치 양식을 비롯한 어류양식분야는 국내기술이 매우 진보된 상태이고 생산량도 자연산을 능가하고 있다. 그러나 현재 국내의 양식산업에서 질병연구는 상대적으로 아주 초기단계에 머물고 있다.¹ 더구나 우리나라에서 많이 양식되고 있는 넙치는 저서성의 어류로서 건강한 魚體도 운동을 잘 하지 않을 뿐 아니라 질병에 걸렸더라도 초기에는 발병현상이 外的으로 잘 관찰되지 않으며, 병의 진행이 빨라 곧 사망해버리기 때문에 질병연구에 많은 어려움이 있다. 현재 국내에서는 부경대를 비롯한 여수수산대학, 수산진흥원 및 기타 몇몇 소수의 연구자들에 의해서 간헐적으로 어류질병 논문들이 보고되고 있을 뿐이며,² 특히 병원성 세균에 관한 보고는 屬 수준까지 동정된 것들이 대부분이었다. 그러나 본 연구팀에서는 본 과제를 통하여 세균의 종 수준의 동정과, 조직학적 연구, 세포주(cell-line)와 魚體를 이용한 인공감염시험 및 Virus 등 각 분야의 전공자들이 입체적으로 협동 연구하여, 국내에서 하절기에 주로 발생하는 넙치의 출혈성 궤양증과 복수증에 대하여 세균 뿐 아니라 Virus 까지를 포함 한 종합적이고 체계적인 연구를 하고 있다. 그 일부가 결과로 얻어져 한국미생물학회가 2003년 5월 3일 강원대학교에서 주최한 “2003 International Meeting of the Microbiological Society of Korea”에 보고하였다.

2 국외 연구현황

국외의 경우, 유럽에서는 양식어종이 매우 제한되어 보리새우, 굴, Channel-Fish, 송어류 등 특정한 몇몇 종에 대한 양식이 이루어지고 있으며 따라서 어병에 대한 연구도 이들 어종에 대하여 활발히 진행되고 있다. 최근의 동향은 세균성 질환에 대한 연구보다도 Virus성 출혈성 궤양에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다.³

제2절 생물활성 해양천연물질의 개발과 유효이용

1. 산업수요 측면

가. 산업수요 측면에서 현재 진행되고 있는 연구현황^{4,5,6}

(1) 생물 다양성 협약에 대비한 자원의 보존 및 확보: 해양생물자원

(해양미생물, 해조, 무척추동물, 어패류)의 개발

(2) 해양생물 자원으로부터 고부가성 천연소재 기능성물질개발 : 식품, 사료, 생비료,

(3) 고부가성 정밀화학 제품의 개발 : 의약품, 화장품, 색소, 향료, 화학제품

나. 바이오 산업의 핵심기술이라고 할 수 있는 신물질 탐색기술에 대한 한국의 위치⁷

	한국	미국	일본
연구개발비(R&D) 투자(1999년도)	\$1.3억	\$163억	\$26억
신물질탐색 기술	60%	100%	90%
안정성평가 기술	20%	100%	75%

다. 산업수요⁸

(1) 해양미생물자원 개발은 생명공학산업의 기초기술로서 그 수요는 대단히 크다.

(2) 신물질 개발은 경제성에 있어서 그 부가가치가 매우 높고, 과학기술전쟁에서 자체 기술의 개발 및 확보는 국가의 존립과 민족(인류)의 지속적인 번영을 위해 매우 중요하기 때문에 그 산업수요 또한 매우 높다.

2. 연구수행 측면

가. 국내외 연구현황

미국의 국립 암연구소(NCI)가 보고한 자료에 의하면, 해양생물의 추출물은 전통적으로 천연약물의 중요한 자원인 육상식물이나 미생물보다도 항종양 선도화합물의 비율이 훨씬 높다.⁹ 지금까지 해양생물을 대상으로 한 연구 program으로 10,000종 이상의 정밀화학 선도화합물이 발견되어, 그 중 생리시약으로 상품화하여 시판되고 있는 manoalide, okadaic acid 및 tetrodotoxin¹⁰과, 그리고 신약후보물질로서 임상시험단계에 있는 화합물 외에, 임상검사를 기다리고 있는 많은 전임상 의약선도화합물들이 보고되고 있어 (Table 1)¹¹, 가까운 장래에 해양천연물유래의 신약탄생에 많은 관심이 집중되고 있다. 이러한 관점에서, 우리나라에서도 해양생물로부터 유전자원, 의약소재를 포함한 정밀화학소재, 기초화합물 연구가 막 시작되고 있는 단계로서, 앞으로의 결과에 많은 기대를 모으고 있다.¹²

Table 1. Anticancer agents from Marine Sources

Compound	Source	Status	Some Modes of Action
Bryostatin 1	bryozoan	Phase I/II	modulates PKC
Dolastatin 10	sea hare(cyanobact.)	Phase I	inhibits tubulin assembly
Ecteinascidin 743	tunicate	Phase II	DNA alkylation
Aplidine	tunicate	Phase II	inhib.macromolecular synth.
Cemadotin	synth.analogue Dold. 15	Phase I	inhibits tubulin assembly
Halichondrin B	sponge	Preclinical	inhibits tubulin assembly
Isohomohalichondrin B	sponge	"	inhibits tubulin assembly
Discodermolide	sponge	"	stabilizes microtubules
Hemiasterlin	sponge	"	inhibits tubulin assembly
Laulimalide	sponge	"	stabilizes microtubules
Isogranulatimide	sponge	"	G2 checkpoint inhibitor
Sarcodictyin A	soft coral	"	stabilizes microtubules
Eleutherobin	soft coral	"	stabilizes microtubules
Curacin A	cyanobacterium	"	inhibits tubulin assembly
Kahalalide F	mollusc/green alga	"	lysosome disturbance
Thiocoraline	marine actinomycete	"	inhibits RNA synth

제3장 연구개발 수행내용 및 결과

제1절 세균의 분리, 신속한 동정 및 처치

1. 연구개발 수행 내용

가. 시료 및 시료검체장소

2002년 6월부터 2003년 11월까지 거제도 넙치양식장에서 사육 중에 복수증 증상을 수반하면서 폐사되어지는 양식산 넙치를 대상으로 간, 복수(체강액), 신장, 비장 등으로부터 세균과 바이러스를 분리하였다.

(1) 세균

(가) 분리 및 동정

양식장 현장에서 적출된 장기 또는 복수액을 vibrio 선택배지인 TCBS agar (thiosulfate-citrate-bile salt-sucrose)와 *Edwardsiella*속의 선택배지인 DSS agar (double Salmonella-Shigella) 배지에 직접 도말하는 방법과, 해당 장기 또는 복수액을 1% 식염이 첨가된 20 ml brain heart infusion broth에 접종하여 30°C에서 17시간 증균시켜 균주를 분리하는 2가지 방법을 사용하였다. 증균액은 10배수로 단계희석하여 TCBS agar와 DSS에 도말하였다. *Vibrio* 균주의 분리는 집락이 형성된 TCBS agar에서 노란색 또는 녹색 집락을 선택하였고, *Edwardsiella*의 경우, DSS agar에서 집락 중앙에 흑색 색소를 생성하는 것을 선택하였다. 동일한 균주의 중복선택을 피하기 위하여 해당 검체로부터 각각 1균주씩 선별하였다. 이후 1.5% 식염과 1.6% agar가 첨가된 BHI agar (brain heart infusion)에서 3회 순수 분리하고 유주 (swarming)하는 균주는 4% agar가 첨가된 BHI agar에서 재 순수분리 하였다.

*Vibrio*속과 *Edwardsiella*속의 생화학적 시험은 일반 분리법을 따랐고, 특히 해양성 호염세균인 *Vibrio* 분리를 위하여 nutrient broth (NB)에 0, 3, 5, 7, 10 퍼센트 농도로 NaCl을 첨가하여 성장유무를 확인하였다. 균주의 발광유무는 신선한 배양체를 암실에서 관찰하였다. 항균제 감수성 시험, 참조균주, 특별히 언급되지 않은 기본배지의 제조 동정방법 등은 모두 전보를 따랐다.¹³

(나) 항균제 내성검사

Vibrio 항균제 검사에 사용된 디스크 (Becton Dickinson사 제품)는 6종으로 ampicillin (AM-10 μ g), ceftriaxone (CRO-30 μ g), doxycycline (D-30 μ g), gentamicin (GM-10 μ g), kanamycin (K-30 μ g), tetracycline (Te-30 μ g) 등이었고 *E. tarda*에 대한 검사는 15종으로 위 6종 외에 nalidixic acid (NA-30 μ g), cefotetan (CTT-30 μ g), ceftazidime (CAZ-30 μ g), cefotaxime (CTX-30 μ g), cefoxithin (FOX-30 μ g), ticacilline/ clavulanic acid (TIM-85 75/10 μ g), cephalothine (CF-30 μ g), colistine (CL-10 μ g), immipenem (IPM-10 μ g)이 더 추가되었다.

약제시험 기준은 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)¹⁴과 Becton Dickinson사¹⁵ 지침을 따랐다.

(다) Extended β -lactamase 생성균주 확인

Extended β -lactamase 생성균주 확인을 위한 double disk synergy 시험은 Mueller-Hinton agar에 시험균주를 면봉으로 고르게 도말한 다음 중앙에 Tim-85를 놓고 15mm 간격을 띄운 다음 제 3세대 cepha계열 항균제인 CTT, CAZ, CTX를 정삼각형이 되게 배열하여 균을 배양한 다음 항균제 간섭효과를 관찰하였다.

대조 균주는 본 연구실에 소장된 참조균주 및 생명공학연구소 등에서 분양받은 *Vibrio* 표준균주로 하였고 그 목록은 아래와 같다. *V. parahaemolyticus* ATCC 33844, *V. carchariae* NCIMB 12705, *V. harveyi* KCTC 2720, *L. damsela* KCTC 2734 였다.

(2) 바이러스

(가) Marine virnavirus (MABV)

바이러스는 2003년 8월 21일 거제도 양식장 (수온 23-25 °C)에서 대량 폐사된 넙치 성어 (체중 148-390 g, 체장 24.8-25.5 cm)로부터 분리하였으며, 분리된 바이러스는 fathead minnow caudal trunk cell line (FHM)을 사용하여 20°C에서 15일간 배양한 후 염기서열 분석과 감염실험에 사용하였다.

1) 염기서열 분석

염기서열 분석은 분리된 바이러스가 MABV임을 동정하기 위해 다음과 같은 방법으로 실시하였다. 버나바이러스 검출 목적으로 Suzuki 등¹⁶에 의하여 제안된 primer (P1/P2, P3/P4)를 이용하여 (Table 2), 분리된 바이러스액을 오 등¹⁷의 방법으로 핵산을 추출하고 역전사시켜 얻어진 cDNA를 주형으로 RT-PCR을 행하였다. Agarose gel 상에서 확인된 PCR 산물에 대해 Gel Extraction Kit (QIAGEN Co.)를 이용하여 회수한 후, primer (P3/P4)를 사용하여 ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Co.)로 분석하였다. 확인된 염기서열에 대해서는 Isshiki 등¹⁸에 의해 sequencing된 다양한 MABV주들과 비교 분석하였으며, 본 연구에 사용된 바이러스를 MABV-F로 명명하였다.

Table 2. Primers used for RT-PCR amplification of birnavirus gene

Primer code	Primer sequence	Product length (bp)
P1	5'-AGA-GAT-CAC-TGA-CTT-CAC-AAG-TGA-C- 3'	359
P2	5'-TGT-GCA-CCA-CAG-GAA-AGA-TGA-CTC-3'	
P3	5'-CAA-CAC-TCT-TCC-CCA-TG-3'	168
P4	5'-AGA-ACC-TCC-CAG-TGT-CT-3'	

(나) Lymphocystis Virus

Lymphocystis cell을 수집하여 HBSS에 1:9 희석하여 homogenizer로 균질화하고, 5000 rpm에서 30분 원심분리 후 상등액을 취해 0.45 μ m filter로 여과하여 얻은 전처리 시료로부터 High pure PCR template preparation kit (Boehringer mannheim Co.)를 사용하여 DNA를 추출하고, PCR primer는 DNA database(see accession number AY303804)에서 Japanese flounder로부터 검출된 LCDV-K1 MCP 유전자를 기초로 design하였다. Primer 는 다음과 같다; forward primer (LCDV-F: 5'-CAAGTGTTACTAGCGCTTT-3'), reverse primer (LCDV-R: 5'-ATCCCATTTGAACCGTTCT-3'). 이 target 부위는 1380bp MCP 유전자중 1347 bp에 속한다.

PCR 증폭 반응은 100 pM의 각 primer와 0.2 mM dNTPs, 1 IU Taq DNA polymerase, 1.5 mM MgCl₂이 포함된 혼합물에 10ng의 template를 첨가하여 실시하였다. 반응조건은 우선 95 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation, 54 $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 extension 시키는 조건으로 40 cycle을 진행하였다. 증폭된 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 분석하였다.

나. 인공접종

(1) 세균

세균은 대량 폐사된 넙치로부터 분리한 *Vibrio harveyi* 와 *Edwardsiella tarda*를 각각 2%, 1.5%의 brain heart infusion (BHI) 배지에서 12시간 배양한 후, 2000 rpm에 10분간 원심하여 상층액을 제거하고 2% NaCl로 2번 수세한 후 부유시켜 감염실험에 사용하였다.

(2) 실험어

실험어는 체중 32.7-39.45 g, 체장 15-17 cm의 당 년생 넙치로서 전남 완도에서 분양받아 실험실로 이동 후 1주일간 순치시켜 실험에 사용하였다. 감염실험은 지수식 사육방법으로 플라스틱 수조에 해수 50 l를 첨가하여 10 마리씩 수용하였고 수온은 23-25 $^{\circ}$ C로 대량 폐사 시기와 유사한 온도를 설정하였으며, 사료 급이를 제한하였다. 사육수는 하루 4 l씩 환수하였으며, 실험어 5마리를 대상으로 한 병원체 분리 결과, MABV, *V. harveyi* 그리고 *E. tarda* 는 분리되지 않았다.

(3) 인공감염실험

(가) 세포주 실험

분리된 균주의 병독성 여부를 일 차적으로 판단하기 위하여 우점종으로 분리된 균주를 선택하고 어류주화세포 CHSE cell line을 사용하여 세포병변(Cytophatic effect)관찰 하였다.

(나) 어체감염시험

감염 실험은 A, B, C, D, E, F 6개의 그룹으로 나누어 다음과 같이 실시하였다 (Table 3).

1) 실험 1.

MABV 복강주사 및 Cytophatic effect를 강하게 나타낸 균주인 *V. harveyi*와 *E. tarda*의 침지법에 의한 혼합 감염 실험으로 실시하였다.

A, B, C 실험구는 10^4 TCID₅₀/ml의 MABV-F를 각각 100 μ l씩 넙치 복강에 접종하였다. 접종 후 11일째, B와 C 실험구의 넙치를 *V. harveyi*와 *E. tarda*가 각각 1×10^5 /ml로 들어있는 20 l 수조에 30분간 침지 감염시킨 후 16일간 폐사량을 관찰하였다. 대조구 F는 HBSS 100 μ l를 복강에 접종하였다.

Table 3. Various pathogen used in infectious test

Group	Pathogen
A	MABV-F
B	MABV-F + <i>V. harveyi</i>
C	MABV-F + <i>E. tarda</i>
D	<i>V. harveyi</i>
E	<i>E. tarda</i>
F	HBSS

2) 실험 2.

MABV 복강주사 및 *V. harveyi*와 *E. tarda*의 복강 주사법에 의한 혼합 감염 실험

A, B, C 실험구는 10^4 TCID₅₀/ml의 MABV-F를 각각 100 μ l씩 넙치 복강에 접종하였다. 접종 후 27일째, B와 C 실험구의 넙치를 *V. harveyi* (1.2×10^7 /ml)와 *E. tarda* (1.84×10^7 /ml)로 각각 복강에 100 μ l 접종하여 15일간 폐사량을 관찰하였다. 그리고 D 실험구는 *V. harveyi* (1.2×10^7 /ml)를 E 실험구는 *E. tarda* (1.84×10^7 /ml)를 복강에 100 μ l 접종하였으며, 대조구 F는 HBSS 100 μ l를 복강에 접종하였다.

(다) 병원체 분리

감염 실험에서 발생하는 빈사상태 및 폐사 개체에 대해서는 해부 후, 신장과 비장조직을 사용

하여 세균과 바이러스를 분리하였다. 세균 분리는 TCBS와 SS 배지를 사용하여 *V. harveyi*와 *E. tarda*를 선택적으로 분리하였으며, 바이러스는 신장과 비장 조직을 9배의 완충용액 (Hank's BSS)를 첨가하여 마쇄한 다음, 원심분리와 여과 (0.45 μm filter)를 통하여 바이러스 분리용 시험액을 제작하였고, FHM 세포를 사용하여 MABV를 분리하였다.

(4) 미동정균주에 대한 분자생물학적 접근

표현형을 중심으로한 생화학적 검사결과 분명히 *Vibrio*속으로 동정이 되지만 종수준까지 구분이 되지 않는 5개 균주를 선별하여 전기영동으로 이들의 16s rDNA를 뽑아낸 다음 유전자 분석을 실시하였고, 비가중평균법에 의하여 분석한 다음 현재 이 서열에 대한 신종여부에 대한 연구 계속중임

2. 연구 결과

가. 2002-2003년 발생한 양식넙치의 주요질병 양태

2002-2003년 2년여에 걸쳐 관찰된 우리나라의 양식넙치 주요 질병은 출혈성 궤양증, 복수증, 및 바이러스 일종인 *Lymphocystis virus* 감염에 의한 피부궤양증이 가장 대표적이었다.

2002년도 하절기 남해안 넙치양식장에서 발생한 어병의 주 증상은 복수증이었으며 이 해에 대란 폐사가 일어나 매우 커다란 경제적 손실이 발생되었다. 일부는 복수와 피부출혈성 궤사가 함께 나타났다. 복수가 심한 경우는 탈장이 수반되어 항문으로 장기가 탈출된 상태였고, 부검시 복수액은 투명하고 맑은 액상 혹은 탁한 상태로 특히 간이 노란색으로 변색된 경우가 많았다. 어체는 10cm 미만의 어린 개체로부터 출하직전의 성체까지 다양하였으며, 특히 성체의 피해가 컸다. 그러나 2003년은 복수증 발생이 거의 없었다 (Fig. 1, 2).

출혈성 궤양증은 조사기간 중 간헐적으로 비교적 고른 상태로 발생되었지만 피해는 별로 크지 않았다.

*Lymphocystis virus*에 의한 피부 궤양증은 2003년 봄에서 여름으로 계절이 바뀌는 4월 하순부터 6월 초순에 걸쳐 집단 발생되어 출하 직전의 어체를 심하게 손상시켰기 때문에 상품성을 떨어뜨렸으나 고수온기로 접어들면서 수온이 상승되는 과정에서 자연치유가 일어나 대량폐사는 발생되지 않았다.



Fig. 1. Olive flounder culture bed in Koe-je island in Korea



(A)



(B)



(C)

(A) : 출혈성 궤양증

(B) : 복수증

(C) : Lymphocystis virus성 궤양

Fig. 2. Epizootic models of cultured-bed Olive flounders during 2002-2003 years in Koe-je island in Korea

나. 동정결과

(1) 세균

(가) 생화학적 결과

TCBS agar상에서 *Vibrio*속으로 추정되는 convex, 또는 flat form의 녹색 또는 노란색의 186 균주(2002년 81균주, 2003년 105주)와 *Edwardsiella* 선별배지인 DSS agar 배지에서 투명한 convex형으로 집락 중앙부위에 흑색 색소가 침착되는 15개의 균집락을 포함한 총 201 균주가 분리되었다. 이중 47 퍼센트인 3속 7종 94균주가 종 수준까지 동정되었다. 우점균은 *Vibrio*속의 세균으로 분리균주는 모두 NaCl이 첨가되지 않은 nutrient broth에서 성장이 불가능하였다. 균종별로 *V. harveyi* (32균주), *V. parahaemolyticus* (23균주), *V. alginolyticus* (10균주), *V. carcariae* (2균주), *V. metschenikovii* (5균주)였다. 그 밖에도 *Listonella damsela* (7균주)와 장내세균인 *Edwardsiella tarda* (15균주)가 분리되었고 이들의 종별 생화학적 성상은 Table 4와 같았다.

*V. harveyi*는 암실에서 발광현상이 관찰되었고 오래 배양하거나, 계대배양하면 발광현상이 소실되었다. KIA배지에서 H₂S가 생성되어 기저부분이 까맣게 변색되었고 indole, methyl-red, lysine decarboxylase 양성반응을 나타내었다. Sucrose, mannitol, maltose, trehalose, cellobiose당을 발효시켰고 그 외의 조사된 당들은 발효시키지 못하였다. Voges-Proskauer, arginine dihydrolase는 음성반응을 나타내었고 ornithine decarboxylase는 대부분이 양성이었지만 부분적으로 음성이 경우도 있었다. 항균제 내성검사를 실시한 25균주 중 AM 25균주, TE 4균주, GM 1균주, K 3균주, D 4균주가 내성을 보였고 나머지 약제들에 대해서는 감수성을 나타내었다.

*V. parahaemolyticus*는 TCBS에서 투명한 녹색의 convex형 집락을 형성하였다. 1.6% 한천이 첨가된 brain heart infusion agar에서 유주하지 않았다. 일부 균주들은 Kligler iron agar (KIA) 배지에서 오래 배양되었을 경우, H₂S를 소량 생산하였다. Indole, methyl red, Simmon's citrate, lysine, ornithine decarboxylase양성이고 D-glucose, mannitol, maltose, trehalose, cellobiose에서 산을 생성하였지만 L-arabinose에서는 일부균주가 산을 생성하지 못하였다. Voges-Proskauer, arginine dihydrolase 음성이었다. 분리균들은 7%의 NaCl이 첨가된 배지에서 전 균주가 성장되었지만 10%가 첨가된 배지에서는 성장되지 못하였다.

항균제 시험을 실시한 14균주 중 AM 14균주, TE 1균주, GM 2균주, K 3균주, D 1균주가 내성을 보였고 나머지 약제들에 대해서는 감수성을 나타내었다.

*V. alginolyticus*는 TCBS agar에서 크고 불투명한 점액상의 노란색 집락을 형성하였고 1.6% 한천이 첨가된 BHI agar에서 유주하였다. Indole, Voges-Proskauer, Simmon's citrate, lysine, ornithine decarboxylase 양성이었고, D-glucose, sucrose, mannitol, trehalose, cellobiose에서 산을 생성하였고 기타 당들에서는 산을 생성하지 못하였다. Methyl red, arginine dihydrolase 음성 이었다. 분리균들은 10% 염이 첨가된 BHI broth배지에서 성장하였고 NaCl이 첨가되지 않은 배지에서는 자라지를 못하였다.

Table 4. Biochemical results of the genera *Vibrio*, *Listonella* and *Edwardsiella* isolated from ascitic olive flour

	<i>V. harveyi</i> (32 strains)	<i>V. parpahaemolyticus</i> (23 strains)	<i>V. alginolyticus</i> (10 strains)	<i>V. carcariae</i> (2 strains)	<i>V. metschnikovii</i> (5 Strains)	<i>L. damsela</i> (7 strains)
H ₂ S**	100*	70	0	0	0	0
Inodole	100	100	100	100	0	0
Methyl-red	100	96	70	100	60	100
Voges-Proskauer	0	0	100	0	100	0
Simmon's citrate lysine	93	83	100	100	100	0
decarboxylase	100	100	100	100	100	0
Arginine dihydrolase	100	0	0	0	0	100
Ornithine decarboxylase	70	78	60	0	20	0
motility	100	100	100	100	100	100
glucose-acid	100	100	100	100	100	100
glucose-gas	0	0	0	0	0	100
lactose fermentation	0	0	0	0	0	0
sucrose fermentation	100	0	100	100	100	40
D-mannitol fermentation	100	100	100	100	100	0
Dulcitol fermentation	0	0	0	0	0	0

Table 4. Biochemical results of the genera *Vibrio*, *Listonella* and *Edwardsiella* isolated from ascitic olive flound

	<i>V. harveyi</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. carcariae</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>L. damsela</i>
Salicine fermentation	0	0	0	0	0	0
Adonitol fermentation	0	0	0	0	0	0
myo-Inositol fermentation	0	0	0	0	0	0
D-Sorbitol fermentation	0	0	0	0	0	0
L-arabinose fermentation	0	26	0	0	0	0
Raffinose fermentation	0	0	0	0	0	0
Rhamnose fermentation	0	0	0	0	0	0
D-Xylose fermentation	0	0	0	0	0	0
Trehalose fermentation	100	100	100	100	100	100
Cellobiose fermentation	100	100	100	100	100	100
Growth 0% NaCl	0	0	0	0	0	0
Growth 3% NaCl	100	100	100	100	100	100

(continued)

Table 4. Biochemical results of the genera *Vibrio*, *Listonella* and *Edwardsiella* isolated from ascitic olive flound

	<i>V. harveyi</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. carcariae</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>L. damsela</i>
Growth 5% NaCl	100	100	100	100	100	100
Growth 7% NaCl	100	100	100	100	100	100
Growth 10% NaCl	0	0	100	100	0	0
Swarming	0	0	100	100	0	0

* The number gives the percent positive after 48 h of incubation at 30°C.

**Some strains of *V. parahemolyticus* produced H₂S in KIA after long incubation (>1 week).

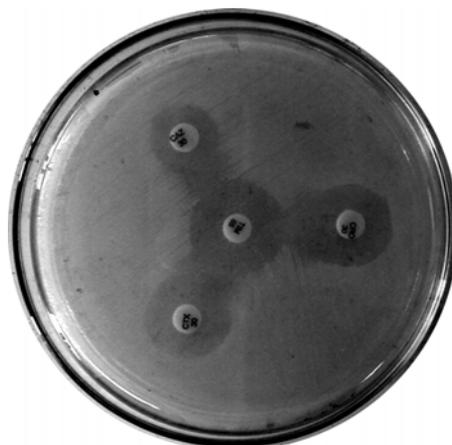
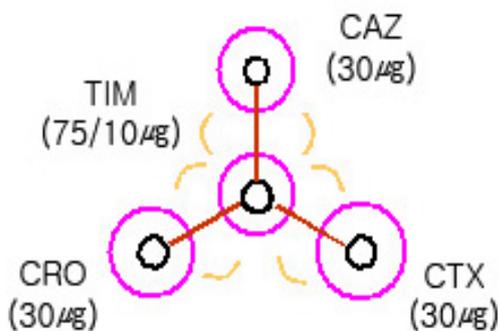
– Not tested.

*V. carcariae*는 TCBS agar에서 크고 불투명한 점액상의 노란색 집락을 형성하였고 1.6% 한천이 첨가된 BHI agar에서 유주하였다. Indole, Simmon's citrate, lysine, ornithine decarboxylase 양성하였고, D-glucose, sucrose, mannitol, trehalose, cellobiose에서 산을 생성하였고 기타 당들에서는 산을 생성하지 못하였다. Voges-Proskauer, arginine dihydrolase 음성이었다. 분리균들은 10% 염이 첨가된 BHI broth배지에서 성장하였고 NaCl이 첨가되지 않은 배지에서는 자라지를 못하였다. 집락형태나 그 밖의 생화학적 실험결과가 *V. alginolyticus*와 매우 유사한 결과를 얻었다.

*V. metschenikovii*는 TCBS agar상에서 노란색 집락을 형성하였고 1.6% 한천이 첨가된 BHI agar에서 유주를 하지 못하였다. Methyl-red, Voges-Proskauer, Simmon's citrate lysine decarboxylase 양성하였고, D-glucose, sucrose, mannitol, trehalose, cellobiose에서 산을 생성하였고 기타 당들에서는 산을 생성하지 못하였다. Indole, arginine dihydrolase는 모두 음성이었다고 ornithine decarboxylase는 대부분 음성이었다.

*L. damsela*는 TCBS agar상에서 노란색 집락을 형성하였고 1.6% 한천이 첨가된 BHI agar에서 유주를 하지 못하였다. Methyl-red, Voges-Proskauer, arginine dihydrolase 양성하였고, D-glucose에서 durham관에 gas를 생성하였다. Indole, Simmon's citrate, lysine ornithine decarboxylase 등에서 음성반응이었고 trehalose와 cellobiose 당에서 산을 생성하였고 일부 균주가 sucrose 또는 mannitol에서 산을 생성하였다. 기타 당들에서는 산을 생성하지 못하였다.

장내세균인 *E. tarda*는 DSS agar상에서 48시간이 경과된 다음 주변이 투명하고 중앙부위에 흑색이 침착된 작은 집락을 형성하였다. KIA 배지에서 강력한 H₂S를 생성하였고 indole, methyl-red, lysine, ornithine decarboxylase 양성하였고 D-glucose에서 durham관에 gas를 생성하였다. Voges-Proskauer, Simmon's citrate, arginine dihydrolase 음성이었다고 당을 거의 이용하지 못하였으며 균주간의 생화학적 변이가 전혀 없이 단일한 시험결과가 나타났다. 10균주에 대하여 항균제 내성 검사 결과, NA 9균주, TE 9균주, CAZ 1균주, CF 1균주, CL 9균주, K 8균주가 내성을 나타내었다. 이들에 대한 extended β-lactamase 생성유무를 관찰한 결과 전 균주가 β-lactamase를 생성하지 못하였다.



CAZ : ceftazidime, CRO : cefriaxone
 CTX : cefotaxime, TIM : ticarcillin/clavulanate

Disk 사이간격 : 1.8cm

Synergy 효과

항생제 Disk

(나) 해부학적 결과

복수증 병어체를 외부적으로 관찰한 결과, 병어체는 중량 100g 미만의 어린 고기에서부터 출하직전의 1kg 이상의 성어체까지 다양하였으며, 대부분은 복수증 한가지 증세만 관찰되었지만 어떤 개체들은 피부나 꼬리부분에 출혈성 궤양증을 수반한 복합적 질병양상을 나타내기도 하였다. 어체를 부검한 결과, 복수액은 대부분 투명하였고, 일부 어체에서는 간이 노랗게 변색된 경우가 관찰되었다. 그러나 어떤 어체에서는 복수가 탁하였다. 많은 어체들이 복수가 심하여 복수의 압력 때문에 항문으로 장의 일부가 탈장되었다 (Fig. 3). 고정된 조직을 표본으로 만들어 조직관찰을 한 결과 간, 아가미, 신장, 장, 지라 등에서 세포조직내에 균집락이 관찰되었다 (Fig. 4).

(다) 인공접종실험결과

우점종으로 분리된 *V. harveyi*에 대한 세포주 병독시험을 실시한 결과는 다음과 같았다. 균 접종을 시키지 않고 순수하게 배양된 세포주는 배양 52시간 안에 세포배양용기의 전체 표면을 고르게 덮으면서 정상적인 성장을 하였다 (Fig. 4. A). 그리고 세균 *V. alginolyticus*와 본 실험 재료에서 분리된 marine birnavirus (MABV)를 접종한 균에서도 역시 세포주 병동성 (Cytopathic effect) 효과가 나타나지 않았다 (Fig. 4. B, C). 그러나 *V. harveyi*를 접종한 세포주는 자라지 못하고 세포들이 죽어서 혼탁액을 만들었다 (Fig. 4. C). 이 결과를 토대로 *V. harveyi*를 선택하여 어체 인공감염을 진행시켰다.



Fig. 3. Ascitic cultivated flounder with hernia

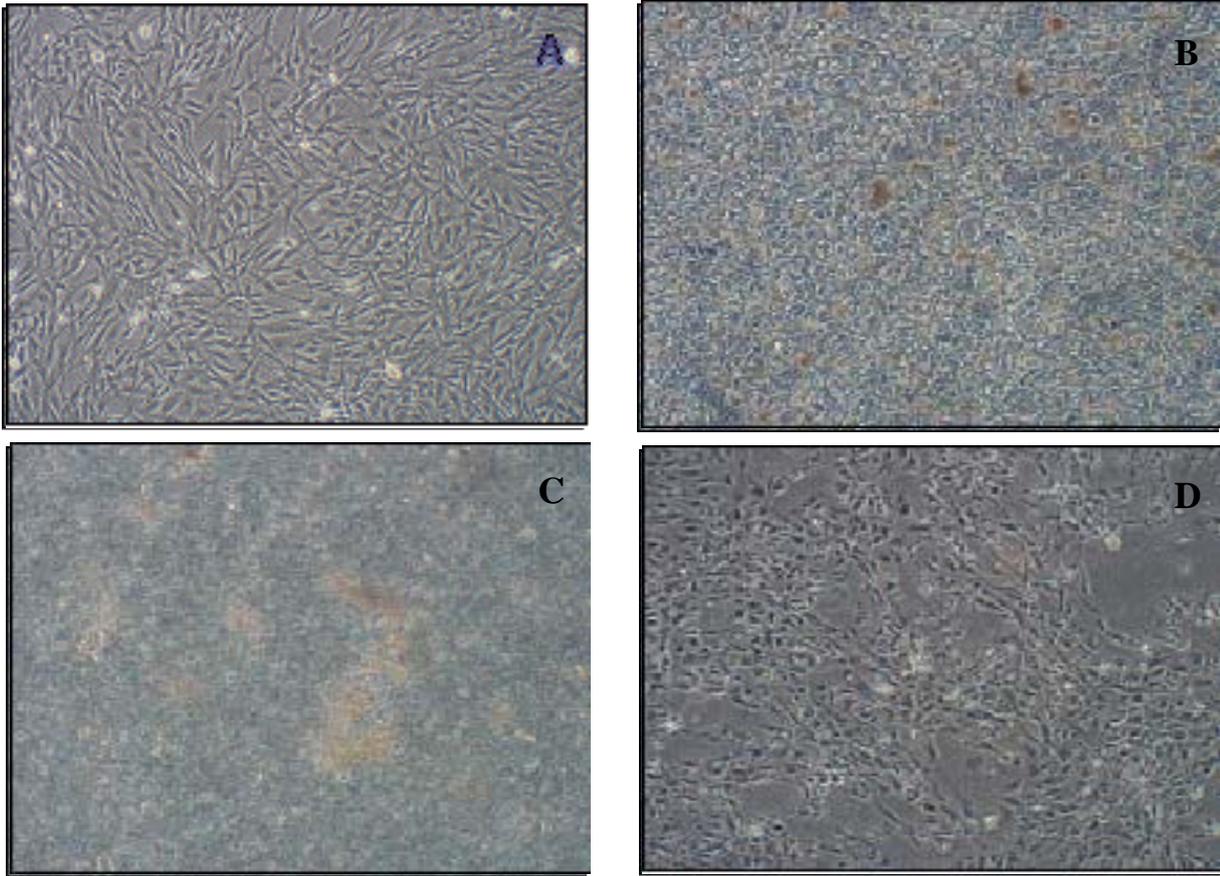


Fig. 4. Cell-line (RTG-2) Challenge Test, incubated time : 57 hours, X 40.
A) Control, B) Challenged by *V. alginolyticus* (RAA 35), C) Challenged by *V. harveyi* (RAA 6), D) Challenged by MABV(marine birnavirus).

인공감염시킨 어체에 대한 해부학적 소견은 근육, 피부, 신장, 아가미 등에 균체가 형성되어있어 세균에 의한 심한 병변이 관찰되었다 (Fig. 5).

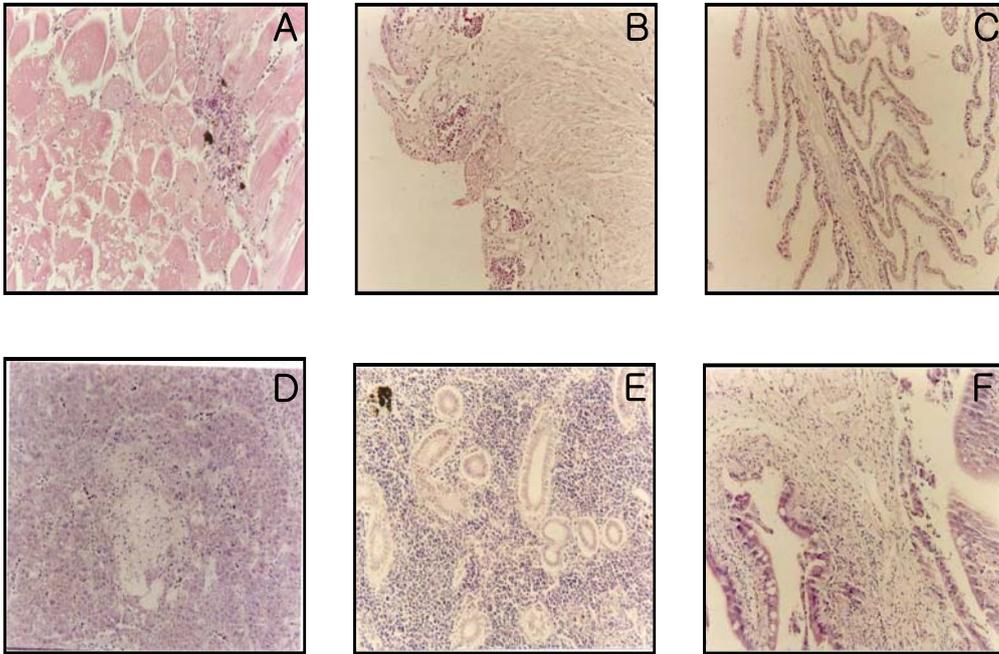


Fig. 5. Diseased Tissues

- A) Necrosis and inflammatory cells infiltration in the muscular layer of the skin with bacterial colonization.
- B) Necrosis and hemorrhages in epithelial layer of the stomach with bacterial colonization.
- C) Slough of the gill epithelium with multiple bacterial colonies between secondary lamellae
- D) Multifocal necrosis and mild congestions in liver. Hyaline degenerations of kidney tubules and necrosis of glomerulus.
- E) Myaline degenerations of kidney tubules and necrosis of glomerulus.
- F) Necrosis intestine

우점종으로 분리된 세균 *V. harveyi*와 이미 어병균으로 널리 알려진 *E. tarda* 및 MABV 복강 주사 및 *V. harveyi*와 *E. tarda*의 침지법에 의한 혼합 감염 실험은 다음과 같았다.

MABV 감염에 의한 폐사율과 MABV 감염된 넙치에 세균을 침지 감염시킨 후의 폐사율을 비교·분석하기 위해 실시되었다. 그 결과, MABV-F를 넙치의 복강에 접종한 실험구와 MABV-F 감염 후 *V. harveyi*와 *E. tarda*로 침지 감염 시킨 구를 모두 대조구와 비교시 뚜렷한 변화를 관찰할 수 없었다. 이에, 본 실험 조건에서 MABV-F는 폐사에 영향을 끼치지 않음을 확인할 수 있었다. 그러나 빈사상태 및 폐사개체를 대상으로 한 병원체 분리결과, MABV-F를 감염시킨 어류에서 MABV가 100% 분리되었다 (Table 5). MABV-F 감염에 의해 폐사된 어체는 복수를 형성하고 있었으며, 비장과 신장이 약간 비대 되어있었다.

Table 5. Expt 1. Mortality and isolated pathogen rate of flounder in immersion infection to *V. harveyi* and *E. tarda* after intraperitoneal injection of MABV

Group	Mortality (%)	No. of organ samples	
		positive/ total number tested for <i>V. harveyi</i> or <i>E. tarda</i>	positive/ total number tested for MABV virus.
A	10	NT	1/1 (100%)
B	30	0/1 (0%)	1/1 (100%)
C	0	-	-
F	20	NT	0/2 (0%)

NT: Not Tested

(라) MABV 복강주사 및 *V. harveyi*와 *E. tarda*의 복강 주사법에 의한 혼합 감염 실험

세균만을 접종한 실험구와 MABV에 감염된 넙치에 세균을 복강 주사로 혼합 감염시킨 후의 폐사율을 비교·분석하기 위해 실시되었다. MABV-F를 복강에 주사 후, 감염 27일째 *V. harveyi* ($1.2 \times 10^7/\text{ml}$)와 *E. tarda* ($1.84 \times 10^7/\text{ml}$)를 넙치의 복강에 접종한 결과, MABV와 세균을 혼합 감염시킨 시험구에서 각각 90%, 100%로 가장 높은 폐사율을 보였다. 그러나 *V. harveyi*와 *E. tarda*만을 감염시킨 시험구에서는 각각 70%의 폐사율로 혼합감염 실험구 보다는 낮은 폐사율을 보였으며, MABV만 접종한 시험구는 대조구와 유사한 결과를 보였다. 빈사상태 및 폐사개체를 대상으로 한 병원체 분리결과, MABV는 바이러스만을 접종한 실험구에서 100%, MABV와 *V. harveyi*의 혼합 실험구에서 50%, MABV와 *E. tarda*의 혼합 실험구에서 75%의 분리율을 보였으며, 세균은 모든 실험구에서 100% 분리되었다. 그리고 혼합감염에 의해 폐사된 어체는 복수를 형성하고 있었으며, 비장과 신장이 비대되어 있었을 뿐만 아니라 간의 울혈과 장의 출혈이 관찰되었다 (Table 6).

Table 6. Expt 2. Mortality and isolated pathogen rate of flounder in intraperitoneal infection to *V. harveyi* and *E. tarda* after intraperitoneal injection of MABV

Group	Mortality (%)	No. of organ samples positive/ total number tested for <i>V. harveyi</i> or <i>E. tarda</i>	No. of organ samples positive/ total number tested for MABV virus.
A	25	0/1 (0%)	1/1 (100%)
B	83	2/2 (100%)	1/2 (50%)
C	100	3/3 (100%)	3/4 (75%)
D	71	3/3 (100%)	0/3 (0%)
E	49.9	1/1 (100%)	0/1 (0%)
F	28	NT	0/1 (0%)

NT: Not Tested

(2) Virus 분리 및 동정 결과

(가) Marine birnavirus

넙치 성어로부터 분리한 MABV-F의 VP2와 NS 경계영역은 sequencing 되었다 (Fig. 6). MABV-F는 일본에서 분리된 다양한 MABV 분리주와 높은 유사성을 보였으며, 특히 넙치에서 분리한 MABV주에 대해 가장 높은 유사성을 관찰할 수 있었다. 그러나 일본에서 분리된 모든 MABV주들은 14번째 위치의 염기가 모두 C로 관찰되는 점에서 국내에서 분리된 MABV-F와 차이를 보였다.

MABV-F	GCGGCACCAC	TCATCGGAGC	CGCCGACCAA	TTCATCGGGG	ACCTGACCAA	50
KJFBV-0006	*****	***C*****	*****	*****	*****	50
KJFBV-0110	*****	***C*****	*****	*****	*****	50
KSHBG-0137	*****	***C*****	*****	*****	*****	50
KYTBV-9905	*****	***C*****	*****	*****A*	*****	50
KAJBG-0115	*****	***C*****	*****	*****A*	*****	50
KSAJBG-0165	*****	***C*****	*****	*****A*	*****	50
MABV-F	GACCAACGCA	GCCGGAGGCC	GCTACCTAAC	ACATGCAGCA	GGAGGACGCT	100
KJFBV-0006	*****	*****	*****	*****	*****	100
KJFBV-0110	*****	*****	*****	*****	*****	100
KSHBG-0137	*****	*****	*****	*****	*****	100
KYTBV-9905	*****	*****	*****	*****	*****	100
KAJBG-0115	*****	*****	*****	*****	*****C	100
KSAJBG-0165	*****	*****	*****	*****	*****	100
MABV-F	ACACTGACGT	AATGGACTCC	TGGGCCAGCG	GCAC		134
KJFBV-0006	*****	*****	*****	****		134
KJFBV-0110	*****	*****	*****	****		134
KSHBG-0137	***C*****	*****	*****	****		134
KYTBV-9905	*****	*****	*****	****		134
KAJBG-0115	*****	*****	*****T****	****		134
KSAJBG-0165	*****	*****	*****T****	****		134

Fig. 6. Multiple nucleotide sequence alignment of the nested PCR products (134 bp, I.e. 168 bp minus primer length) from various MABV strains. Sequences for the MABV-F strain are shown as a comparison. MABV origins: MABV-F (Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*), KJFBV-0006 (Japanese flounder), KJFBV-0110 (Japanese flounder), KSHBG-0137 (spotted halibut, *Verasper variegatus*), KYTBV-9905 (yellowtail, *Seriola quinqueradiata*), KAJBG-0115 (amberjack, *Seriola dumerilii*), KSAJBG-0165 (goldstriped amberjack, *Seriola lalandi*).

(나) Lymphocystis virus

Lymphocystis virus 감염은 피부에 특유한 스폰지형의 궤양이 형성되기 때문에 궤양의 형태를 보고 비교적 쉽게 감염 의심 병어체를 분리 시킬 수 있다 (Fig. 2). 이 병어체의 조직으로부터 PCR 검출결과, Lymphocystis virus 특이적 1,347bp DNA 단편이 분리되었다 (Fig. 7).

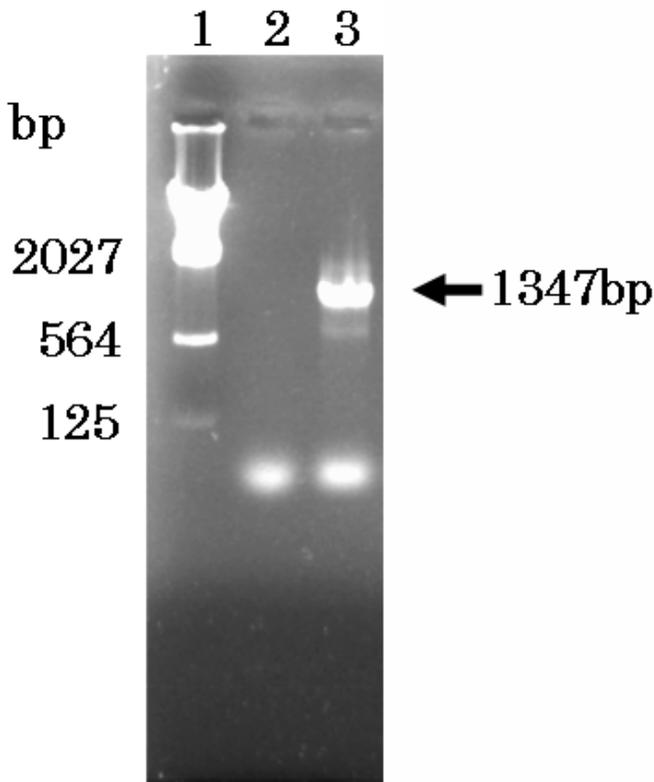


Fig. 7. Specificity of the PCR. Lanes; 1, molecular marker; 2, negative control without template; 3, *lymphocystis disease virus (LCDV)*.

(3) 분자생물학적 결과

현재까지 얻어진 결과는 표현형을 중심으로 우선 속 수준까지는 *Vibrio*로 완전히 동정을 하였다. 그러나 아직 종수준까지의 완전 동정이 안 된 5균주를 선발하여 16s rDNA를 뽑아 gene sequencing이 끝났다. 그러나 아직 읽지 못해서 좀더 실험을 진행하고 있는 부분(예로서 n)을 반복 실험하고 있고 이들에게서 얻어진 결과를 gene bank의 등록된 vibrio 서열과 비교 실험중이다.

V1

```
ATTGNACCAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGACTTAACTGAACCTTCGGGGAAC
GTAAAGGTCGTCGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGAAACGATGGCTAATACCGCATGAT
GCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGTAATGGCTCACCAAGGCGA
CGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAAT
GGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTGGTAGTGTAAATAGCA
CTATCATTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGG
```

GCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAG
AGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCCGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGAT
GCGAAAGCGTGGGAGCAANCAGGATTAGATGCCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGG
AGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGT
TTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTTTCAGAGATGAATTGGTGCCTTCGGGAACCTTGAGACAGGTGC
TGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTCAGCGAGTAATGTCGGGAA
CTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGTACACACGTGCTACAATGG
CGCATACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCAAAAAGTGCCTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGG
AATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGG*

V2

ATTGAANAGTTTGATCATGGCTATTGAAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGAG
TTATCTGAACCTTCGGGGAACGATAAACGGCGTCGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGATAACCATTGGAAA
CGATGGCTAATACCGCATGATGCCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGA
GGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACAGGTCAGACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGTGCGGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGG
AAGGTGGTAGTGTAAATAGCACTATCATTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGGC
AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTTGTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCNACCTCGGAATAGCATTGAA
ACTGGCAGACTANAGTACTGTAGAGGGGGTAAAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGAAGGATACCGGTGGCGAAGGCGNCCCC
CTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGAGCAANCAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTGGAGGTT
GTGGCCNTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGTCAAATGAATTGACGGGGCC
CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAAATTTCCAGAGATGGATTAGTGC
CTTCGGGAGCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTG
TTTGCCAGCGAGTAATGTCGGGAATCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGTCATCATGGCCCTTACGAGT
AGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCAAAAAGTGCCTGCTAGTCCGGATTGGAGTC
TGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACA
CCATGGGAGTGG*

v3

ATTGAAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGACTTAACTGAACCTTCGGGGAAG
TTAAGGGCGTCGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGATGTGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGATG
CCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCGAC
GATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACAGGTCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATG
GGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTGGTGTAGTTAATAGCTG
CATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGGGAGCGTTAATCGGAATTAAGTGG
CGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTTTAG
AGGGGGTAGATTTCAGGTGTAGGGGTGAAATGCGTAGAGATTTGAAGGGATAACCCGNGNAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGAT
GCGAAAGCGTGGGGAGCAANCAGGATTAGATACCNTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTTNGGGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTC
GGAGCTAACGCGTTAAGTAGANCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTG
GTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTTTCAGAGATGAATTGGTGCCTTCGGGAACCTTGAGACAGGT
GCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTCAGCGAGTAATGTCGGG
AACTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGCNCTACACACGTGCTACAAT

GGCGCATAAGAGGGCAGCGAGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTNNATGAAGTC
GGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGANTGG

V4

ATTGTNGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGACTTAACTGAACCTTCGGGGAACG
TTAAGGGCGTCGAGCGGGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTTGCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGATG
CCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTCGCGTCAGGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGCGAGGTAATGGCTCACCAAGGGCAG
GATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATG
GGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTAGTGTAGTTAATAGCTG
CATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGGGTGGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGG
CGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTTAGA
GGGGTAGAATTTAGGTGTAGCGTGAATGCCGTAGAGATCTGAAGGAATACCCGTGGCGAAGGGCGCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATG
CGAAAGCGTGGGAGCAAAAAGGATTAGATACCCTGGTGTAGTCCAGCCGTAACAGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTC
GGAGCTAACCGGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGCACTCAAACTGAAATGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTG
GTTAATTCGATGCAACCGGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAATTTTCAGAGATGAATGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGT
GCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTGTGGCCAGCGAGTAATGTGGG
AACTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGCGCATAAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTC
GGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGG*

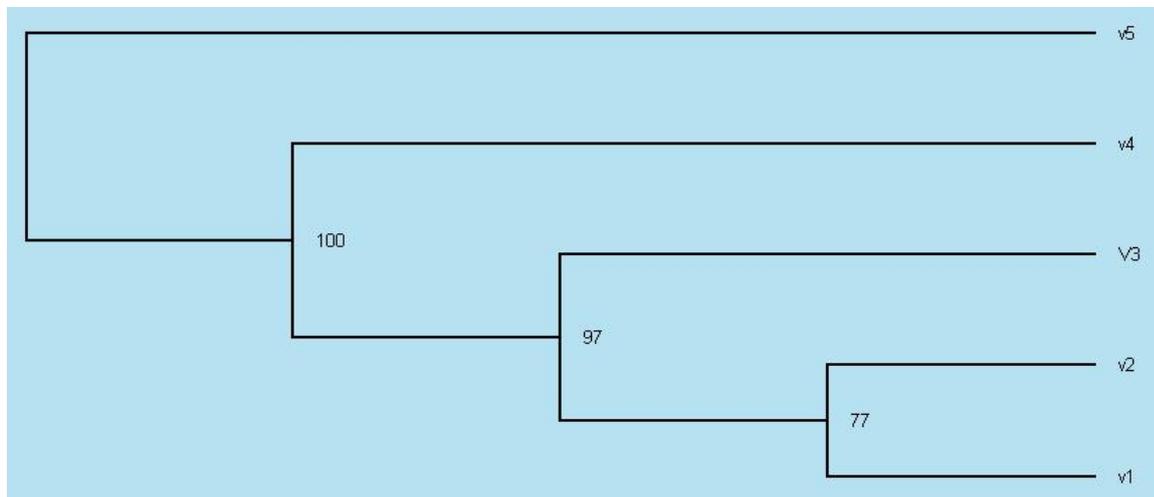
v5

ATTNTCNAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGACTTAACTGAACCTTCGGGGAACG
TTAAGGGCGTCGAGCGGGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGATG
CCTACGGGCCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCCTCTCGCGTCANGATATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGGGCAG
GATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATG
GGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTAGTGTAGTTAATAGCTG
CATTATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGTAATACGGAGGGTGGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGG
CGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTGAAACTGGCAGACTAAAGTACTGTAN
ANGGGGTAGAATTTAGGTGTACCGGTGAAATGCCGTANAGATCTGAAGGATACCGGNGCGAAGCNGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGAT
GCGAAAGCGTGGGAGCAAAAAGGATTAGATACCCTGGTGTAGTCCAGCCGTAACAGATGTCTACTTGGCGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCG
GAGCTAACCGGTTAAGTAGATCGCCTGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGCACTCAAACTGAAATGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTAATTCGATGCAACCGGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAATTTTCAGAGATGAATGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTG
CTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTGTGGCCAGCGAGTAATGTGGGA
ACTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATG
GCGCATAAGAGGGCAGCAAGCTAGCGATAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCG
GAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGG*

◆ Genetic distance (Kimura 2 parameter)

	v5	v4	v3	v1	v2
v5	-				
v4	0.0078	-			
V3	0.0172	0.0179	-		
v1	0.0128	0.0157	0.0186	-	
v2	0.0208	0.0251	0.0245	0.0128	-

◆ UPGMA Tree



number : bootstrap iteration

※ V1(RC78), V2(PAA48), V3(RC70), V4(PAA63), V5(D74)

3. 고찰

2002-2003년도 복수증 넙치의 각 장기와 복수로부터 분리된 균주들에 대한 고찰은 아래와 같다. 인위적인 균주선별의 쓸림현상을 방지하기 위하여 한 검체 당 한 균주만을 선별하였다.

표현형을 기초로 한 세균 분류는 인위 분류의 한계성 때문에 많은 어려움이 있고, 이러한 문제점을 극복하기 위하여 16 sRNA나 DNA 서열의 비교와 같은 분자 수준에서의 접근과 수리 통계분류방법 등이 모색되고 있지만 아직 만족할 수준에 이르지 못하고 있다.

복수증 넙치의 각 장기로부터 분리되어 종수준까지 동정된 세균속은 *Vibrio*속, *Listonella*속, 장내세균 *Edwardsiella* 3개 속이었다. 이중 *Edwardsiella* 속은 대표적으로 알려진 어류 병원성

장내세균으로 *E. tarda*, *E. ictaluri*, *E. hoshinae* 등 3개종이 보고되어있고¹⁹ 이들은 모두 해수 어뿐 아니라 담수어인 뱀장어양식에 큰 피해를 주며, 그중 *E. tarda*가 가장 병독성이 강하다. 국내 가물치 양식장에서도 분리되었으며 이들만 선별할 수 있는 선택성이 아주 강한 DSS agar 배지를 사용하였기 때문에 대부분의 일반 장내세균은 선별과정에서 배제 되었을 것이다. 2003년도 복수넙치로부터 집중적으로 분리되었다.

해양세균 vibrio는 아직까지도 속의 정의가 불안정한 상태로, 여러 차례에 걸쳐 다른 속들과 통합 혹은 분리가 이루어졌고, 종수준의 분류는 이보다 훨씬 복잡하여 1980년 세균이름의 승인된 목록 (Approved Lists of Bacterial Names) 이후에도 새로운 조합(new combination)과 신종이 계속 추가되고 있다. 이러한 분류학적 혼란을 정비하기위하여 일본 오사카에서 개최된 비브리오 분류위원회에서(International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of *Vibrionaceae*)는 비브리오과(*Vibrionaceae*)에 속해있던 *Aeromonas*속을 과(*Aeromonadaceae*)로 독립시켜 비브리오과의 정의를 재정립하였고, *V. alginolyticus*의 아종 문제를 정비하였다.

배지조건과, 영양, 환경등 주어진 인위적인 인자들 때문에 자연계에서 서식하고 있는 특정속의 세균을 완벽하게 분리하기는 쉽지 않고 더구나 indole을 비롯한 몇 가지 생화학적인 반응들은 실험결과가 분명하지가 않거나 오래 계대배양하면 성상이 변하는 경우가 자주 있기 때문에 특히 해양성 세균분리에 어려운 점이 있다.

해수 양식장의 특성상 *Vibrio*속의 세균이 우점으로 분리되었고, 그 중에서도 *V. harveyi*가 우점종이었다. 2002년도 병어체로부터 다수 분리가 이루어졌고 2003년에도 비교적 고르게 병어체로부터 분리되었다. 균주분리는 신선하게 배양된 암실에서 강하게 발광되는 균주를 선별하였다. 검체로부터 초기 분리된 균주는 TCBS, 0.4% agar가 첨가된 BHI 배지에서 매우 강한 형광발색이 있지만 계대배양을 계속하면 발광능이 곧 소실되어졌다. 생화학적 성상의 변이주가 거의 없으며 기준주와 일치되었다. 발광 현상으로 *V. harveyi*는 이미 1936년 Harvey에 의해 *Acromobacter Harveyi*로 알려진 세균이었지만²⁰ 인체나 어류에 병원균으로 보고된 일이 없었다.

*V. alginolyticus*는 Sakazaki에 의해 1968년 *V. parahaemolyticus* biotype 2를 새로운 종으로 승격시킨 것으로, 해안에서 흔히 분리된다고 보고되고 있지만, *V. parahaemolyticus*만큼 잦은 빈도로 분리되지는 않는다. 생화학 동정에서 Voges-Proskauer 양성인 점이 이와 매우 유사한 생화학적 성상을 가진 *V. carcariae*와 구분하는 중요한 시험이다. 기타 동정에서의 문제점 등은 전보에서 상세하게 언급하였다.¹³

*V. carcariae*는 Grimes 등이 수족관에서 병으로 죽은 상어로부터 분리한 균으로 여러 성상 특히 1.6 퍼센트 BHI agar에서 유주하는 성상 등이 *V. alginolyticus*와 매우 유사하고 간혹 인체에 설사와 같은 가벼운 기회감염을 일으키나 인체 병원균으로 크게 중요시되고 있지는 않다.

*V. parahaemolyticus*는 사람에게 식중독이나 기회 감염균을 일으키는 병원균이다. *Pasteurella*속, *Pseudomonas*속 *Beneckeae*속을 거쳐 *Beneckeae*속이 *Vibrio*속으로 통합되면서 오늘에 이르고 있다. 국내에서 분리되는 균주들은 arabinose에서 산을 생성하는 경우가 많이 있고 sucrose를 비롯한 여러 당을 발효시키지 않았다. 생화학적 성상이 Fujino 등의 원기재와 거의 변화가 없이 일

치가 되었으며 Fujino 등에서는 KIA상에서 H₂S를 발생시키지 않는 것으로 보고되고 있지만, 일부 균주에서는 KIA에서 일주일 이상 배양시간이 오래 경과되면 H₂S를 약하게 생성하였다. 국내에서는 H₂S를 발생하는 균주들이 해산물 등 자연환경과 환자들로부터 자주 분리되고 있다. 국내에서, 해산물이나 해수로부터 분리되는 대부분의 균주들은 용혈능을 나타내지 않았지만 임상 가검물로부터 분리된 균주들은 강한 β-용혈능을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다.¹³

*V. metschnikovii*는 oxidase 음성인 점이 다른 vibro들과 다른 점이다. Lee 등²¹이 1978년 기재를 개정함으로써 오늘에 이르며, *V. cholerae* biovar *proteus*로 알려져 왔던 균이었다. 흔히 바다에서 분리되는 균으로 보고되어있지만 국내에서는 잘 분리되지 않았다. Lee 등의 원기재에서 indole, lysine decarboxylase, arginine dihydrolase 등 여러 생화학적 결과가 균주 간에 서로 다르고, Farmer²²에서도 lysine의 반응이 서로 달라서 동정에 많은 어려움이 있었지만, 본 연구에서는 Farmer의 기준을 따라 indole 음성반응, lysine decarboxylase 양성반응을 나타내는 균주를 *V. metschnikovii*로 동정하였다.

*Listonella damsela*는 균이 기재될 당시는 *Vibrio*속에 속해 있었지만 그 후 현재로 분류학적 위치가 변경된 속으로, 복수증이나 출혈성 궤양을 일으키는 대표적인 어병원균 중 하나로 보고되고 있다. 그러나 국내에서는 복수증 병어체로부터는 높은 빈도로 분리되지는 않고 있으며, 겨울철 양식넙치의 등 부분에서 자주 발생하는 출혈성 궤양부위에서 집중적으로 분리되어 보고된 바가 있다.²³

항균제 감수성 조사를 위한 약제의 선별은 양식장에서 많이 사용하고 있는 tetracycline 계열의 약제(tetracycline, doxycycline)와 ampicilline gentamicin, kanamycine 등과 제 3세대 항균제인 ceftriaxone 1종을 선별하였다. 또한 균주 선별은 통계적인 유의성을 가질 수 있는 *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*에 대한 다약제내성시험을 하였고, 비록 분리된 숫자는 10여 균주에 불과하지만 기존의 양식 어류의 대표적인 병원균으로 알려진 장내세균속 *E. tarda*에 대한 약제 검사는 15종으로 하였고 이들에게 extended β-lactamase 생성균주의 존재유무를 조사할 목적으로 제 3세대 cepha 계열 항균제 내성 검사와 double disk synergy 검사결과를 실시하였으나 양성균주는 한 균주도 나오지 않았다. 그밖에 *Vibrio* 세균들에게는 거의 약효가 없는 AM이 *E. tarda*에게는 아직도 효과가 잘 나타나는 점이 특이 하였다.

감염어의 신장, 비장 및 장으로부터 어류의 병원성 바이러스로 알려져 있는 marine birnavirus (MABV)가 분리되어졌다.

MABV는 다양한 병원성을 가진 것으로 보고되었다. MABV는 최초 분리 숙주에 병원성을 나타낼 뿐만 아니라 숙주 이외의 다른 종에 대해서도 병원성을 유발한다. 그리고 몇몇 분리주는 낮은 병원성을 가지고 있다. 특히 이러한 병원성은 주변환경, 즉 양식장 수조에서의 어류의 밀도, 수온, 항원의 농도 그리고 각종 스트레스 인자들에 의해 변화된다고 보고되어 있다.²⁴

최근 연구는 대량 폐사된 넙치 성어로부터 분리한 MABV-F를 대상으로 당 년생 넙치에 다양한 감염실험을 실시하여 병원성을 조사하였다. 그 결과 MABV-F만을 감염시킨 실험구에서는 대조구와 비교시 폐사율의 변화가 없어 병원성이 없음이 확인되었다. 이러한 결과는 Pakingking Jr. 등²⁵이 치어기의 넙치를 대상으로 한 aquabirnavirus의 감염 실험에서도 확인되어, MABV는 일반적인 방법에 의한 감염실험에서 병원력이 나타나지 않음을 확인하였다. 그러

나 빈사상태나 폐사된 개체에서 MABV가 분리되므로, MABV-F가 당 년생 넙치에 있어 폐사의 직접적인 원인을 제공하지 않으나 바이러스가 감염되어 존재하는 것을 시사하였다.

MABV-F를 감염시킨 후, *V. harveyi*와 *E. tarda*로 침지 감염시킨 결과, MABV-F만 감염시킨 실험구와 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 이상의 결과, 실험에 사용된 세균의 침지 농도는 넙치를 폐사시키지 않으며, MABV의 병의 발현에 특이한 연관성을 보이지 않았음을 확인 할 수 있었다. 이에 반해 MABV-F를 감염시킨 후, *V. harveyi*와 *E. tarda*로 복강 감염시킨 결과, *V. harveyi*와 *E. tarda*만을 복강에 감염시킨 실험구보다 높은 폐사율을 보였다. 이러한 결과는 Pakingking Jr. 등²⁵이 MABV와 *E. tarda* 또는 *Streptococcus iniae*을 대상으로 한 혼합 감염 실험에서도 유사한 결과가 입증되었다. 그러나 MABV 감염 후 3주째, *E. tarda* 또는 *S. iniae*를 감염시킨 실험구는 세균만을 감염시킨 실험구와 유사한 폐사율을 보였다고 보고하였다. 이러한 이유는 초기 MABV 감염단계에 있어 면역 활성화에 의해 세균의 활성을 저해시키기 때문 이라고 보고하였다. 최근 연구에서 MABV-F 감염후 27일째, 세균의 복합감염을 실시하였다. 그러나 Pakingking Jr. 등²⁵의 결과와는 달리, 세균의 단독 감염 실험구 보다 높은 폐사율을 보인 이유는 각종 환경적 스트레스 인자들이 MABV 감염에서 폐사율을 상승시킨다는 연구에서와 같이¹⁶, 본 연구에서도 영양 및 세균과의 혼합 감염등에 의한 스트레스 인자들이 폐사율을 상승시킨 것으로 추정된다.

병원체 분리 결과에 있어서 MABV-F는 *V. harveyi*의 혼합감염에서는 50%, *E. tarda*의 혼합 감염에서는 75%만이 분리되었다. 이와 같은 바이러스의 검출의 감소는 Pakingking Jr. 등²⁵과 Bowden 등²⁶의 감염실험에서도 관찰되었다. 이는 MABV를 넙치의 복강에 주사한 후 27일 경과 후 세균의 감염실험을 실시하였기 때문에 그 기간동안 어체는 바이러스의 활성을 억제시킨 것으로 추정된다.

MABV는 잠복감염의 형태로 세포내에 존재가 가능하기 때문에 양식산 넙치는 MABV 질병 발생에 항상 노출되어 있다고 할 수 있다. 양식 현장에서는 복수증 질병을 예방하고 그 피해를 최소화하기 위해서 스트레스를 최소화 시켜야 할 것으로 추정되며, 차후 다양한 환경 스트레스 인자들을 대상으로 한 병원성을 연구가 수행되어야 할 것이다. 아울러 본 조사에서 분리되어진 세균류들과 혼합감염 등의 과정을 거치면서 감염증으로 표현되어진 것인지, 또는 1차 감염체는 전혀 다른 원인체이고, 균천이 과정(microbial succession)을 통하여 다른 균이 재감염 된 것인지에 대하여서도 앞으로의 추가연구가 필요한 것으로 사료된다.

제2절 해양균류로부터 생물활성 해양천연물질의 개발과 유효이용

1. 연구개발 수행 내용

가. 해양 균류 숙주재료의 채집

거제도 소재 양식장 및 부경대학교 수산과학 연구소 넙치양식장 주변 수역에서 해양균류의 공생, 기생, 부생 숙주생물 (해조, 해초) 및 재료 (유목, 해사)를 채집하였다.

나. 균류의 분리

숙주재료를 무균 하에서 agar 평판배지 (SWS+agar, YPG+agar) 상에 놓고, 배양한 후, 현미경하에서 순수 균사 (hyphae)를 채취하거나, 배지상의 균사를 계대 배양하여 300 종의 해양균류를 순수 분리하였다.

다. 균류의 보존 및 database

Agar배지에서 배양한 균사체를 10% glycerol이 첨가된 YPM배지에 혼탁시켜 -75°C 에서 보관하고, MFA001 - MFA300 라고 칭한 300 종의 해양균류를 database화 하였다.

라. 균류의 1차 배양 (10 mL), 추출 및 표준시료조제

분리한 300종의 해양균류를 각각 YPM배지 (0.2 % yeast extract, 0.2 % peptone, 0.4 % mannitol, 100 % seawater) (10 mL)에서 $27-29^{\circ}\text{C}$, 15일간 배양한 후, 배양액에 같은 양의 아세톤 (10 mL)을 가하여 추출한 다음, 탈지면 여과하여 300종의 아세톤 추출물 (001ae-300ae)을 조제하였다. 이들 300종의 아세톤 추출물을 표준시료로 라디칼 (DPPH) 소거활성 및 tyrosinase 억제활성을 검색하였다.

마. 효능검색

(1) 라디칼 (DPPH) 소거활성²⁷

(가) 시료의 조제: 각각의 아세톤추출물 (130 μL) 및 엑스 일정량을 취하여 EtOH (혹은 MeOH, DMSO 등) (2 mL)에 녹여 20 mg/mL로 조제한 후, 이것을 단계별로 희석하여 1000 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ 및 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 조절하였다.

(나) DPPH scavenging assay: 위에서 조제한 각 시료(130 μl)를 96-well microtiter tray에 취한 다음, 여기에 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.2)(100 mL) DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) (5-50 mg)을 용해시킨 용액(10 μL)을 각 well에 가하였다. 1

분간 진탕한 후 분광광도계(microplate reader)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료자체의 색깔이나 용매등의 영향을 보정하기 위한 대조군과 비교하여 흡광도 차를 조사하여, 평균 차이율과 IC₅₀ (µg/mL)값을 계산하였다.

(2) 자외선-A 차단활성²⁸

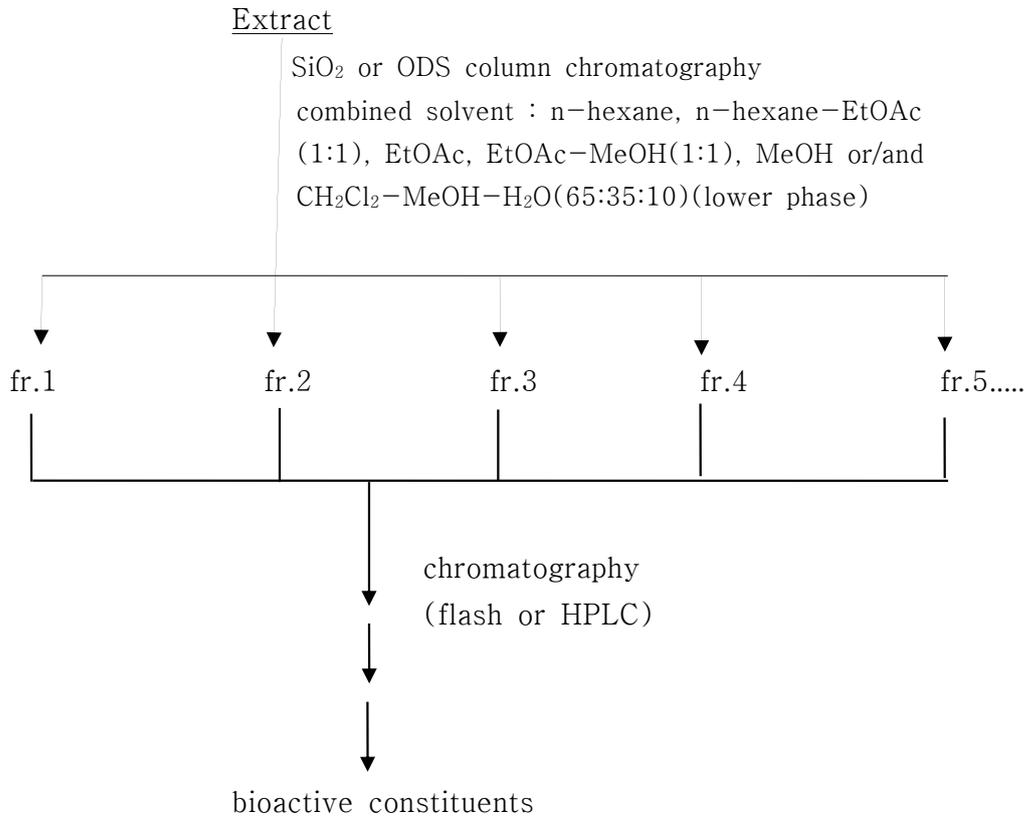
아세톤추출물 (MFA000ae) (100 µL)을 MeOH (900 µL)에 녹여 조제한 각 시료(160 µL) 및 내부표준물질로서 %Abs가 1.00이 넘지않는 농도 (0.1 mg/mL MeOH)의 oxybenzone (160 µL) 을 96-well microtiter tray에 취한 다음, 분광광도계(microplate reader)를 이용하여 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료자체의 색깔이나 용매 등의 영향을 보정하기 위한 대조군과 비교하고 흡광도 차를 조사하여 ED₅₀ (µg/mL)값을 계산하였다.

마. 연구대상 균주의 도출

해양미생물 시료를 대상으로 라디칼 소거활성 및 자외선-A 차단 활성을 검색하여, 라디칼소거작용의 2균주 (MFA27, 212) 및 자외선-A 차단 작용의 1균주 (MFA212)를 연구대상 균주로, 그리고, 이들 균주로부터 조제된 시료를 대상으로 생물활성을 측정하여 5종의 DPPH 라디칼 소거활성 시료 (27B, 212B) 및 1종의 자외선-A 차단 작용 시료 (212B)를 연구대상 시료로 선정하였다.

(1) 2차 대사성분의 분획 개요.

해양균류의 추출엑스 (000M, 000B)를 적당한 용매에 용해시킨 용액을 순상 flash column (SiO₂) [용매계: *n*-hexane, *n*-hexane-EtOAc (1:1), EtOAc, EtOAc-MeOH (1:1), CH₂Cl₂-MeOH-H₂O (65:35:10) (lower phase) 혹은 MeOH] 혹은 역상 flash column (ODS) [용매계: H₂O-MeOH (100%-0%), MeOH-CH₂Cl₂ (100%-0%)] 에 주입하고 용매의 극성순으로 순차적으로 용출시켜, 각 성분의 TLC pattern에 따라 여러 획 분 (fr.1, fr.2, fr.3...)으로 분획하였다. 이어, 각 획 분의 생물활성을 지표로 하여, 활성이 큰 획 분을 적당한 종류의 chromatography (순상 및 역상 flash chromatography, LC, HPLC)를 사용하여, 그 유효성분을 분리 정제하였다 (Scheme 1).



Scheme 1. Fractionation and purification of the bioactive constituents from the marine-derived fungus.

(2) 해양균류 MFA027의 2차 대사성분의 분리.

MFA027의 배양액 엑스 (27B) (1.0 g)을 SiO₂ column에 주입한 다음, n-hexane-EtOAc (100%→0%) 용매를 순차적으로 용출시켜 27B1 - B6의 6 분획을 얻었다. 이들 분획을 대상으로 DPPH 소거활성을 조사한 결과, 27B5 에서 강한 소거활성이 관찰되어, 활성을 지표로 27B5 (340 mg)를 recycling HPLC (JAI-gel, W-252, MeOH)로 2회 연속 분리정제하여 27B5rH4.1 (0.5 mg), 4.2 (0.9 mg), 4.3 (7.8 mg), 4.4 (1.2 mg)을 얻었다.

한편, 27B6 (96 mg)을 SiO₂ column (CH₂Cl : MeOH = 20 : 1)에 이어, HPLC (YMC ODS-A, MeOH)로 분리정제하여 두 종류의 알칼로이드, N-acetyltryptamine (27B6.2H3) (**1**, 3.5 mg) 및 oxaline (27B6.2H4) (**2**, 1.2 mg)을 얻었다.

N-Acetyltryptamine (**1**) : Yellowish oil; IR (neat) ν_{\max} 3400 (NH), 1638 (amide), 1384, 744 cm^{-1} ; UV (MeOH) λ_{\max} ($\log \epsilon$) 222 (4.0), 283 (2.3) nm; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.14 (1H, br s, H-1), 7.04 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2), 7.60 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-4), 7.13 (1H, dd, $J = 8.0, 8.0$ Hz, H-5), 7.21 (1H, dd, $J = 8.0, 8.0$ Hz, H-6), 7.38 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-7), 2.98 (2H, t, $J = 6.5$ Hz, H-10), 3.60 (2H, dt, $J = 6.5, 6.0$ Hz, H-11), 5.53 (1H, br. s, H-12), 1.92 (3H, s, H-14); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 122.0 (d, C-2), 113.1 (s, C-3), 118.7 (d, C-4), 119.5 (d, C-5), 122.2 (d, C-6), 111.2 (d, C-7), 136.4 (s, C-8), 127.3 (s, C-9), 25.3 (t, C-10), 39.8 (t, C-11), 170.0 (s, C-13), 23.4 (q, C-14); LREIMS m/z 202 $[\text{M}]^+$ (rel. int., 7), 154 (47), 143 (62), 130 (58), 86 (18), 70 (100); HREIMS m/z 202.1060 (calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$, 202.1106).

Oxaline (**2**): yellow oil; IR (neat) ν_{\max} 3186 (NH), 3089, 3013, 1702 (δ -lactam), 1632 (amide) cm^{-1} ; UV (MeOH) λ_{\max} 208 (4.4), 228 (4.0), 284 (3.6), 344 (4.0), 360 (4.0) nm; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} 7.58 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-4), 7.09 (1H, dd, $J = 7.6, 7.5$ Hz, H-5), 7.29 (1H, dd, $J = 7.6, 7.5$ Hz, H-6), 6.98 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-7), 5.13 (1H, s, H-8), 12.88 (1H, br. s, 14-NH), 8.37 (1H, s, H-15), 7.58 (1H, br. s, H-18), 7.23 (1H, br. s, H-20), 6.11 (1H, br. s, H-22), 5.10 (1H, br. d, $J = 18.3$ Hz, H-23a), 5.06 (1H, br. d, $J = 14.0$ Hz, H-23b), 1.25 (3H, s, H_3 -24), 1.32 (3H, s, H_3 -25), 3.64 (3H, s, H_3 -26), 3.73 (3H, s, H_3 -27); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) δ_{C} 101.3 (C-2), 52.4 (C-3), 146.4 (C-3a), 124.7 (C-4), 123.4 (C-5), 128.5 (C-6), 112.1 (C-7), 146.5 (C-7a), 106.8 (C-8), 125.9 (C-9), 157.4 (C-10), 122.8 (C-12), 165.7 (C-13), 110.0 (C-15), 126.2 (C-16), 136.8 (C-18), 134.6 (C-20), 42.4 (C-21), 142.6 (C-22), 114.1 (C-23), 24.1 (C-24), 23.7 (C-25), 55.7 (C-26), 65.2 (C-27); LRFABMS m/z 448 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (rel. int., 100), 379 (34), 154 (12), 136 (23); HRFABMS m/z 448.1985 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_4$, 448.5015).

(3) 해양균류 MFA212의 2차 대사성분의 분리.

배양액 엑스 (212B) (600 mg)을 silica gel column에 주입한 다음, *n*-hexane-EtOAc (100%→0%) 용매를 순차적으로 용출시켜 212B1 - 212B5 의 5 분획을 얻었다. 이 분획을 대상으로 DPPH 소거활성을 조사한 결과, 212B3에서 강한 소거활성이 관찰되어, 이 분획을 HPLC [YMC Co., ODS-A, EtOAc-MeOH (100%→10%)]로 분리정제하여, alkaloid 212B13 (**3**) (22 mg) 및 echinulin (**4**) (10 mg)을 얻었다.

Dihydroxyisoechinulin A (**3**) : Colorless oil; $[\alpha]_{\text{D}} -47^\circ$ (c 0.4, CHCl_3); IR (neat) ν_{\max} 3358, 3262, 3085, 1673, 1629, 1425, 1381, 1323, 1242, 1160, 1024, 1000, 902, 756 cm^{-1} ; UV (MeOH) λ_{\max} ($\log \epsilon$) 209 (3.9), 226 (3.9), 289 (3.4), 340 (3.5) nm; CD (MeOH) ($\Delta\epsilon$) 212 (-6.6),

239 (+3.2), 266 (+1.7), 284 (+1.6), 341 (-1.1) nm; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 10.91 (1H, s, H-1), 7.02 (1H, br, s, H-4), 6.98 (1H, dd, $J = 8.2, 1.3$ Hz H-6), 7.29 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-7), 6.87 (1H, s H-8), 8.36 (1H, d, $J = 1.9$ Hz H-11), 4.10 (1H, qd, $J = 6.5, 1.9$ Hz H-12), 8.51 (1H, s, H-14), 6.06 (1H, dd, $J = 17.0, 10.5$ Hz, H-16), 5.01 (1H, d, $J = 17.0$ Hz, H-17), 5.03 (1H, d, $J = 10.5$ Hz, H-17), 2.36 (1H, dd, $J = 13.5, 10.0$ Hz, H-18), 2.93 (1H, d, $J = 13.5$ Hz, H-18), 3.27 (1H, m, H-19), 1.09 (3H, s, H-21), 1.06 (3H, s, H-22), 1.46 (3H, s, H-23), 1.45 (3H, s, H-24), 1.39 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-25), 4.11 (1H, s, 19-OH), 4.16 (1H, s, 20-OH); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 144.0 (s, C-2), 103.1 (s, C-3), 126.2 (s, C-3a), 119.2 (d, C-4), 132.3 (s, C-5), 123.0 (s, C-6), 111.1 (d, C-7), 133.9 (s, C-7a) 110.8 (d, C-8), 124.8 (s, C-9), 160.0 (s, C-10), 51.0 (d, C-12), 166.6 (s, C-13), 39.2 (s, C-15), 145.4 (d, C-16), 111.6 (t, C-17), 38.0 (t, C-18), 80.0 (d, C-19), 72.0 (s, C-20) 26.5 (q, C-21), 24.7 (q, C-22), 27.6 (q, C-23), 27.7 (q, C-24), 20.3 (q, C-25); LREIMS m/z 425 $[\text{M}]^+$ (72), 407 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$ (1), 382 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_3\text{H}_7]^+$ (1), 367 $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_6\text{O}]^+$ (13), 356 $[\text{M}-\text{C}_5\text{H}_9]^+$ (42), 336 $[\text{M}-\text{C}_4\text{H}_9\text{O}_2]^+$ (47), 298 $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_6\text{O}]^+$ (100), 268 $[\text{M}-\text{C}_5\text{H}_8]^+$ (81), 194 (41), 69 $[\text{C}_5\text{H}_9]^+$ (17), 59 $[\text{C}_3\text{H}_7\text{O}]^+$ (51); HREIMS m/z 425.2320 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4$, 425.2315).

Echinulin (4): White needle; Mp 242-243°; $[\alpha]_{\text{D}} -24^\circ$ (c 0.5, CHCl_3); UV (EtOH) λ_{max} (ϵ) 230 (39810), 279 (9549), 286 (9120) nm; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.04 (1H, s, 1-NH), 7.13 (1H, s, H-4), 6.81 (1H, s, H-6), 3.18 (1H, dd, $J = 13.2, 3.1$ Hz, H-10), 3.65 (1H, dd, $J = 14.8, 3.7$ Hz, H-10), 4.41 (1H, d, $J = 11.1$ Hz, H-11), 5.98 (1H, s, 13-NH), 4.09 (1H, q, $J = 6.9$ Hz, H-14), 5.66 (1H, s, 16-NH), 1.54 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H_3 -17), 1.50 (3H, s, H_3 -19), 1.50 (3H, s, H_3 -20), 6.10 (1H, dd, $J = 10.7, 6.6$ Hz, H-21), 5.14 (1H, s, H-22), 5.16 (1H, d, $J = 6.6$ Hz, H-22), 3.53 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H_2 -23), 5.41 (1H, t, $J = 7.3$ Hz, H-24), 1.74 (3H, s, H_3 -26), 1.74 (3H, s, H_3 -27), 3.38 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H_2 -28), 5.35 (1H, t, $J = 7.0$ Hz, H-29), 1.80 (3H, s, H_3 -31), 1.86 (3H, s, H_3 -32); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 141.1 (s, C-2), 104.5 (s, C-3), 121.5 (d, C-4), 130.4 (s, C-5), 114.5 (d, C-6), 124.4 (s, C-7), 131.8 (s, C-8), 130.4 (s, C-9), 29.9 (t, C-10), 55.2 (d, C-11), 167.4 (s, C-12), 50.4 (d, C-14), 167.8 (s, C-15), 20.2 (q, C-17), 38.9 (s, C-18), 27.9 (q, C-19), 27.9 (q, C-20), 145.9 (d, C-21), 111.2 (t, C-22), 30.4 (t, C-23), 122.3 (d, C-24), 130.4 (s, C-25), 25.6 (q, C-26), 17.7 (q, C-27), 34.3 (t, C-28), 123.2 (d, C-29), 131.9 (s, C-30), 25.6 (q, C-31), 17.7 (q, C-32); LREIMS m/z 461 $[\text{M}]^+$ (8), 335 (27), 334 (100), 319 (2), 279 (2), 266 (1), 264 (6), 234 (6), 194 (11), 180 (4), 99 (29), 85 (2), 69 (14); HREIMS m/z 461.3042 $[\text{M}]^+$ (calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_2$).

2. 결과

가. 생물활성 해양미생물 자원의 개발

해수중이나 해안의 목재, 해조, 해초 및 망그로브 등의 다양한 재료를 기질로 하여, 공생, 기생, 혹은 부생적으로 서식하고 있는 균류를 해양균류라 칭하며, 지금까지 약 600종의 해양균류가 알려져 있다.¹

300종의 해양 균류를 분리하여 저장하고, database화 하였으며, 생물활성을 검색한 결과, 2종의 아세톤엑스 (27ae, 212ae)에서 라디칼 소거활성이, 그리고, 1종의 아세톤엑스 (212ae)에서 자외선-A 차단활성이 관찰되어 (Table 7), 연구대상 시료로 선정하였다.

Table 7. Radical scavenging and ultraviolet-A protecting activity from the marine-derived fungus

Extract of active strain	DPPH scavenging activity		UV-A protecting activity	
	%Inhibition	IC ₅₀ (μg/mL)	%Absorption	ED ₅₀ (μg/mL)
027ae	65			
M		100<		
B		9.1		
212ae	63		100<	
M		6.6		180
B		23.8		91
L-ascorbic acid ¹		5.0		
oxybenzone ¹			100	80

¹positive control

나. 해양균류의 생물활성 성분의 분자구조

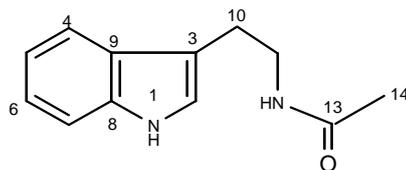
(1) 해양균류 MFA27의 2차 대사성분

(가) 27B6.2H3 (1)²⁹

27B6.2H3 (*N*-acetyltryptamine) (1)은 갈색의 유상 액체로서, HR-FABMS 및 ¹³C NMR로부터 C₁₂H₁₄N₂O 의 분자조성이 관찰되었으며, IR 스펙트럼에서 amine (3400 cm⁻¹) 및 amide (1638 cm⁻¹) 유래의 signal이 관찰되었다. 그리고, ¹H NMR 및 ¹³C NMR의 상세한 검토결과, indol 및 ethylamine acetate의 존재가 추정되었으며 (Table 8), UV data [222 (log ε 4.0), 28

3 (2.3) nm] 및 MS fragment m/z 143 $[M-CH_3CONH_2]^+$ 와 잘 일치하였다. 각 치환기의 치환 위치는 DEPT, COSY, TOCSY, HMQC 및 HMBC의 상세한 검토에 의해 결정되었다. 즉, H MBC 실험에서, H-4 와 C-3; H₂-10과 C-2, C-3, C-9의 H-C long range coupling이, 그리고, TOCSY 실험에서, H-2 와 H-1, H₂-10; H₂-10과 H-2, H₂-11, H-12의 H-H long range coupling이 관찰되었다.

이상의 data로부터 27B6.2H3의 구조는 2-(3-indolyl)ethylamine acetate (1)로 판명되었다.



1

Table 8. ¹H (δ , mult, J) and ¹³C (δ , mult) NMR data of N_b-acetyltryptamine^a

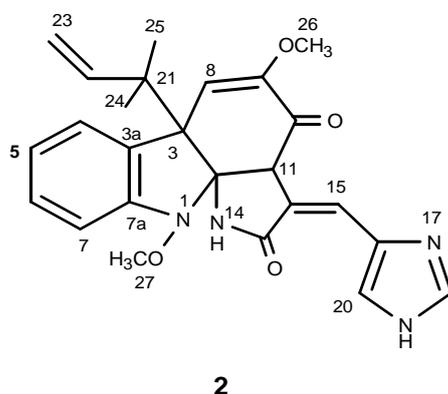
C#	δ_H		δ_C	HMBC (H to C)
1	8.14 (br,s)			
2	7.04 (d, 2.2)		122.0 (d)	8, 9
3			113.1 (s)	
4	7.60 (d, 8.0)		118.7 (d)	9
5	7.13 (dd, 8.0 8.0)		119.5 (d)	7, 9
6	7.21 (dd, 8.0 8.0)		122.2 (d)	4, 8
7	7.38 (d, 8.0)		111.2 (d)	5, 9
8			136.4 (s)	
9			127.3 (s)	
10	2.98 (t, 6.5)		25.3 (t)	2, 3, 9, 11
11	3.60 (dt, 6.5, 6.0)		39.8 (t)	3, 10, 13
12	5.53 (br, s)			
13			170.0 (s)	
14	1.92 (s)		23.4 (q)	11, 13

a Recorded in CDCl₃ at 400MHz (1H) and 100MHz (13C).

(나) 27B6.2H4 (2)^{29,30}

27B6.2H4 (oxaline) (2)는 황색의 유상 액체로서, HR-FABMS 및 ¹³C NMR로부터 C₂₄H₂₆N₅O₄의 분자조성이 관찰되었으며, IR 스펙트럼에서 amine (3186 cm⁻¹), δ-lactam (1702cm⁻¹) 및 amide (1632 cm⁻¹) 유래의 signal이 관찰되었다. 그리고, ¹H NMR 및 ¹³C NMR의 상세한 검토결과, 2개의 methoxyl, 1,2-substituted benzene, reversed isoprenyl, 2개의 carbonyl, 3개의 1,1,2-substituted double bond 등의 존재가 추정되었으며 (Table 9), 각 치환기의 치환위치는 DEPT, COSY, HMQC 및 HMBC의 상세한 검토에 의해 결정되었다.

이상의 data로부터 27B6.2H4의 구조는 oxaline (2)로 판명되었다.



2

Table 9. ¹H and ¹³C NMR Data for 143M3PH5 (2)^a

C#	δ_{H} (mult., J) ^b	δ_{C}	Carbon#	δ_{H} (mult., J) ^b	δ_{C}
2		101.3 (s) ^c	14-NH	10.00 (br. s)	
3		52.4 (s)	15	6.45 (s)	110.0 (d)
3a		146.4 (s)	16		126.2 (s)
4	7.59 (d, 7.6)	124.7 (d)	17-NH	6.01 (br. s)	
5	7.09 (t, 7.6, 7.5)	123.4 (d)	18	7.59 (d, 7.6)	136.8 (d)
6	7.29 (m)	128.5 (d)	20	7.29 (m)	134.6 (d)
7	6.98 (d, 7.6)	112.1 (d)	21		42.4 (s)
7a		146.5 (s)	22	7.59 (dd, 10.8, 10.6)	142.6 (d)
8	5.13 (s)	106.8 (d)	23	5.06 (d, 12.3)	114.1 (d)
9		125.9 (s)	24	1.25 (s)	24.1 (q)
10		157.4 (s)	25	1.32 (s)	23.7 (q)
12		122.8 (s)	26	3.64 (s)	55.7 (q)
13		165.7 (s)	27	3.73 (s)	65.2 (q)

^aRecorded in CDCl₃ at 400 MHz (¹H) and 100 MHz (¹³C).

^bShown with clearly assignable signals.

^cMultiplicities determined by DEPT spectrum.

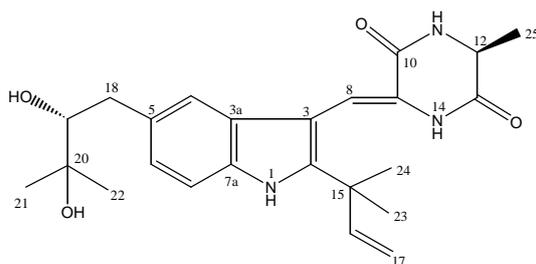
(2) 해양균류 MFA212의 2차 대사성분

(가) 212B13 (3)³¹

212B13 (19,20-dihydroxyisoechinulin A) (3)은 무색의 유상 액체로서, HR-FABMS 및 ¹³C NMR로부터 C₂₄H₃₁N₃O₄의 분자조성이 판명되었으며, IR 스펙트럼에서 hydroxyl 과 amine (3358, 3262 cm⁻¹) 및 amide (1673, 1629 cm⁻¹) 유래의 signal이 관찰되었다. ¹H NMR 및 ¹³C NMR의 상세한 검토결과, methyl substuted diketopiperazine, trisubstituted indole, isopentenyl, dihydroxyisopentanyl 및 trisubstituted double bond의 존재가 추정되었으며(Table 10), a mide 및 conjugated indole chromophore는 UV data [222 (log ε 4.0), 283 (2.3) nm]에 의해 다시 한번 확인되었다. 각 작용기의 위치는 DEPT, COSY, NOESY, HMQC 및 HMBC의 상세한 검토에 의해 결정되었다. 즉, HMBC 실험에서, H-4 와 C-18; H-6 와 C-18; H-8 와 C-2, C-3a, C-10; H-16 와 C-2; H-18 와 C-4, C-6, C-19; H-19과 C-5의 H-C long range coupling이 관찰되어, 화합물3의 평면구조가 결정되었다.

부제탄소 C-12 및 C-19의 절대입체배치는 $J_{H11-H12}$ (1.9 Hz)과 Marfey법 및 Horeau 법에 의해 각각 12*S* 및 19*R* 배치로 결정되었다. 한편, C-8/C-9의 2중결합의 geometry는 H-8과 H₃-23/24의 NOE correlation과 α,β-unsaturated ketone 구조에서 carbonyl group에 의한 β-vinyl proton의 deshielding effect (δ 6.87, H-8)에 의해 (*Z*)-configuration으로 추정되었다.

이상의 data로부터 212B13의 전 화학구조는 19,20-dihydroxyisoechinulin A (3)로 판명되었다.



3

Table 10. NMR Spectral Data for Dihydroxyisoechinulin A^a

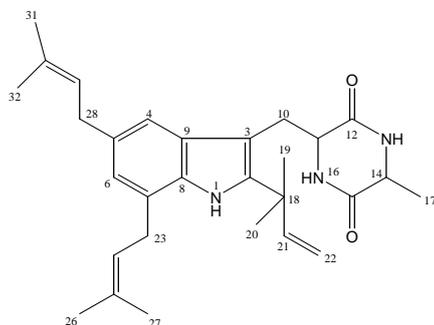
Carbon#	δ_H (mult., J)	δ_C	Carbon#	δ_H (mult., J)	δ_C
1	10.91 (s)		15		51.0 (d)
2		144.0 (s)	16	6.06 (dd, 17.0, 10.5)	145.4 (d)
3		103.1 (s)	17	5.01 (d, 17.0)	111.6 (t)
3a		126.2 (s)		5.03 (d, 10.5)	
4	7.02 (br. s)	119.2 (d)	18	2.36 (dd, 13.5, 10.0)	38.0 (t)
5		132.3 (s)		2.93 (d, 13.5)	
6	6.98 (dd, 8.2, 1.3)	123.0 (s)	19	3.27 (m)	80.0 (d)
7	7.29 (d, 8.2)	111.1 (d)	20		72.0 (s)
7a		133.9 (s)	21	1.09 (s) ^b	26.5 (q) ^e
8	6.87 (s)	110.8 (d)	22	1.06 (s) ^b	24.7 (q) ^e
9		124.8 (s)	23	1.46 (s) ^c	27.6 (q) ^e
10		160.0 (s)	24	1.45 (s) ^c	27.7 (q) ^e
11	8.36 (d, 1.9)		25	1.39 (d, 6.5)	20.3 (q)
12	4.10 (dq, 6.5, 1.9)	51.0 (d)	19-OH	4.11 (s) ^d	
13		166.6 (s)	20-OH	4.16 (s) ^d	
14	8.51 (s)				

^a Recorded in CDCl₃ at 400 MHz (¹H) and 100 MHz (¹³C).

^{b-e} Exchangable.

(나) Echinulin (4)³²

Echinulin (4)는 황색의 유상 액체로서, HR-FABMS 및 ¹³C NMR로부터 C₂₄H₂₆N₅O₄의 분자조성이 관찰되었으며, IR 스펙트럼에서 amine (3186 cm⁻¹), δ -lactam (1702cm⁻¹) 및 amide (1632 cm⁻¹) 유래의 signal이 관찰되었다. 그리고, ¹H NMR 및 ¹³C NMR의 상세한 검토결과, 2개의 methoxyl, 1,2-substituted benzene, reversed isoprenyl, 2개의 carbonyl, 3개의 1,1,2-substituted double bond 등의 존재가 추정되었으며 (Table 11), 각 치환기의 치환위치는 DEPT, COSY, HMQC 및 HMBC의 상세한 검토에 의해 echinulin (4)의 구조를 동정하였다.



4

Table 11. NMR Spectral Data for Echinulin^a

Carbon#	δ_{H} (mult., <i>J</i>)	δ_{C}	Carbon#	δ_{H} (mult., <i>J</i>)	δ_{C}
1-NH	8.04 (s)		17	1.54 (d, 6.9)	20.2 (q)
2		141.1 (s)	18		38.9 (s)
3		104.5 (s)	19	1.50 (s)	27.9 (q)
4	7.13 (s)	121.5 (d)	20	1.50 (s)	27.9 (q)
5		130.4 (s)	21	6.10 (dd, 10.7, 6.6)	145.9 (d)
6	6.81 (s)	114.5 (d)	22	5.14 (s)	111.2 (t)
7		124.4 (s)		5.16 (d, 6.6)	
8		131.8 (s)	23	3.53 (d, 7.2)	30.4 (t)
9		130.4 (s)	24	5.41 (t, 7.3)	122.3 (d)
10	3.18 (dd, 13.2, 3.1)	29.9 (t)	25		130.4 (s)
	3.65 (dd, 14.8, 3.7)		26	1.74 (s)	25.6 (q)
11	4.41 (d, 11.1)	55.2 (d)	27	1.74 (s)	17.7 (q)
12		167.4 (s)	28	3.38 (d, 7.2)	34.3 (t)
13-NH	5.98 (s)		29	5.35 (t, 7.0)	123.2 (d)
14	4.09 (q, 6.9)	50.4 (d)	30		131.9 (s)
15		167.8 (s)	31	1.80 (s)	25.6 (q)
16-NH	5.66 (s)		32	1.80 (s)	17.7 (q)

^aRecorded in CDCl₃ at 400 MHz (¹H) and 100 MHz (¹³C).

다. 생물활성

Dihydroxyisoechinulin A (**3**)은 천연 항산화제인 vitamin C (IC₅₀ = 10.0 μM)와 동일한 라디칼 (DPPH) 소거능이 관찰되었으며, 또한 현재 자외선 차단제로 사용되고 있는 oxybenzone (IC₅₀ = 350 μM) 보다 강한 자외선-A 차단작용이 관찰되어, 항산화제 혹은 항노화 신약 선도물질로서의 응용에 많은 흥미가 기대된다 (Table 12).

Table 12. Radical scavenging and Ultraviolet-A (UV-A) protecting activity of dihydroxyisoechinulin A (**3**)

Compound	Bioactivity (IC ₅₀ : μM)	
	DPPH scavenging	UV-A protecting
dihydroxyisoechinulin A	10	130
ascorbic acid*	10	
oxybenzone*		350

*Positive control

제3절 해조류로부터 생물활성 해양천연물질의 개발과 유효이용

1. 연구개발 수행 내용

가. 시료의 채집

거제도 소재 넙치양식장 주변 수역에서 채집하였다.

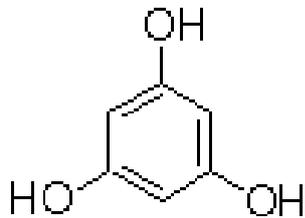
나. 추출 및 분획

곰피는 동결건조 후 마쇄하여 얻은 분말 3 kg을 메탄올 10 ℓ를 넣고 70 °C에서 3h 으
로 3회 반복하여 환류냉각추출한 후 여지(와트만사, 미국)로 감압 여과한 다음, 여과 추출물은
진공회전농축기로 40 °C에서 메탄올을 제거한 후 추출된 잔사로서 곰피 MeOH 추출물 700 g
을 수득하였다.

다. 화합물의 분리 및 이화학적 성상³³

곰피 MeOH 추출물 700 g을 hexane, dichloromethane, ethyl acetate, butanol, water
순으로 분획하여 ethyl acetate 가용 추출물 99.59 g을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피를 수행하
여 phlorotannin 화합물을 분리하였다. 각각의 화합물을 NMR 및 MS 등과 같은 각종 분석기
기로 분석한 결과는 하기와 같다.

(1) 화합물 5 : phloroglucinol

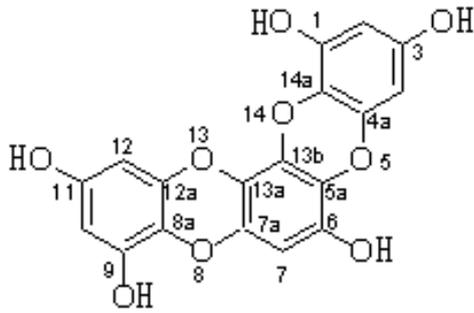


물질의 성상: 흰색 분말.

물질의 분자식: C₆H₆O₃.

EI-MS : m/z (R. int): 126(100) [M⁺]. IR (KBr) cm⁻¹: 3481, 1617, 1499, 1419. ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): 5.78(3H, s). ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD): 160.9, 96.3.

(2) 화합물 6 : eckstolonol

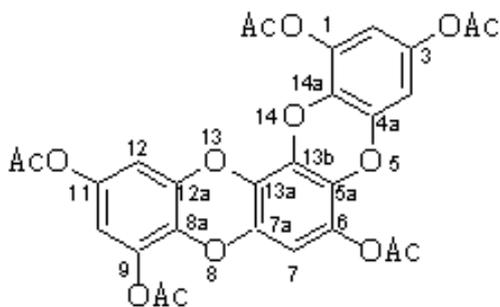


물질의 성상: 미흰색 분말.

물질의 분자식: C₁₈H₁₀O₉.

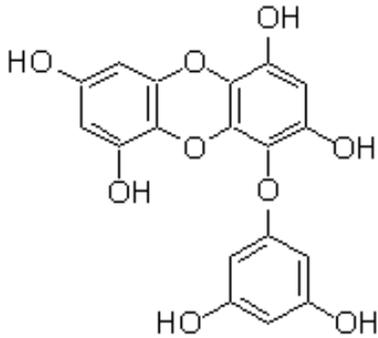
HRFAB-MS: Found, m/z 370.0324 [M]⁺, Calcd for C₁₈H₁₀O₉, m/z 370.0325. IR (KBr) cm⁻¹: 3243, 1635, 1518, 1494, 1396, 1281, 1243, 1207, 1154, 1118, 1089, 1012, 810. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 9.77(C1-OH), 9.64(C9-OH), 9.60 (C6-OH), 9.27(C3-OH), 9.26(C11-OH), 6.10(1H, s, H-7), 6.04(1H, d, $J=2.81$ Hz, H-2), 6.01(1H, d, $J=2.66$ Hz, H-10), 5.84(1H, d, $J=2.66$ Hz, H-4), and 5.82(1H, d, $J=2.66$ Hz, H-12). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): 153.3(C-3), 153.0(C-11), 146.1(C-1), 146.0(C-9), 142.1(C-4a), 141.7(C-12a), 140.1(C-6), 137.2(C-7a), 131.6(C-13b), 125.9(C-5a), 122.7(C-8a), 122.5(C-13a), 122.3(C-14a), 98.8(C-2, 10), 97.6(C-7), 과 93.9(C-4, 12).

(3) 화합물 **6a** : eckstolonol pentaacetate



IR (KBr) cm⁻¹: 1769, 1506, 1477, 1371, 1193, 1079, 1021, 885. EI-MS m/z (R. int.): 580(M⁺, 21), 538(45), 496(47), 454(72), 412(52), 370(100), 341(30). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃ + DMSO-*d*₆): 1.59(3H, s), 1.61(3H, s), 1.64(3H, s), 1.65(3H, s), 1.73(3H, s), 5.80(1H, s), 5.96(1H, d, $J=2.62$ Hz), 5.97(1H, d, $J=2.62$ Hz), 6.00(1H, d, $J=2.62$ Hz), 6.02(1H, d, $J=2.62$ Hz).

(4) 화합물 7 : eckol



물질의 성상: 무정형 분말.

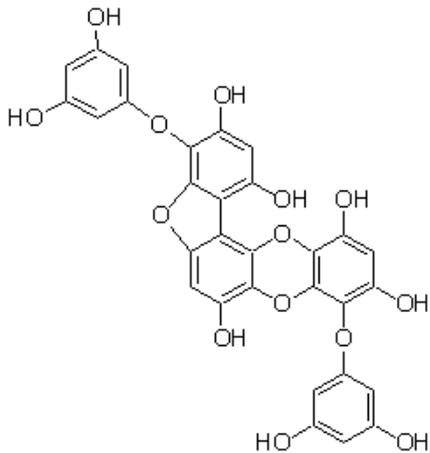
물질의 분자식: $C_{18}H_{12}O_9$.

positive FAB-MS m/z : 372 $[M]^+$.

1H -NMR(400 MHz, CD_3OD): 5.93(3H, s), 5.94(2H, s), 6.13(1H, s).

^{13}C -NMR (100 MHz, CD_3OD): 162.4, 160.7, 150.0, 147.7, 147.6, 144.7, 143.8, 139.0, 126.1, 125.3, 125.1, 100.3, 99.9, 98.2, 96.3, 95.9.

(5) 화합물 8 : phlorofucofuroeckol A



물질의 성상: 무정형 분말.

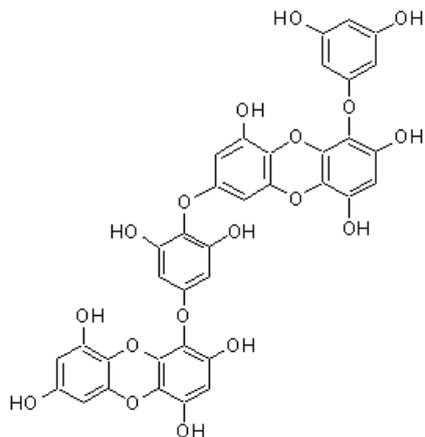
물질의 분자식: $C_{30}H_{18}O_{14}$.

positive FAB-MS m/z : 602 $[M]^+$.

1H -NMR (400 MHz, CD_3OD): 6.63(1H, s), 6.40(1H, s), 6.26(1H, s), 5.97(2H, d, $J=2.08$ Hz), 5.94(1H, t, $J=1.88$ Hz), 5.92(1H, t, $J=1.98$ Hz), 5.88(2H, d, $J=2.08$ Hz). ^{13}C -NMR(100 MHz, CD_3OD): 162.67, 162.64, 161.00, 160.97, 153.99, 152.50, 151.96, 149.07, 149.03, 146.74, 144.71, 139.19, 136.15, 128.89, 125.86, 125.56, 123.17, 106.15, 106.11, 100.78, 100.22, 98.60, 98.48, 97.03,

96.24, 96.21.

(6) 화합물 9 : dieckol



물질의 성상: 무정형 분말.

물질의 분자식: C₃₆H₂₁O₁₈

FAB-MS m/z : 742 [M]⁺. ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD): 6.15(1H, s), 6.13(1H, s), 6.09(2H, s), 6.06(1H, d, $J=2.85$ Hz), 6.05(1H, d, $J=2.85$ Hz), 5.98(1H, d, $J=2.76$ Hz), 5.95(1H, d, $J=2.76$ Hz), 5.92(3H, s). ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD): 162.67, 160.95, 158.61, 156.81, 155.33, 153.19, 148.14, 148.09, 147.92, 147.71, 145.10, 144.95, 144.20, 144.10, 139.44, 139.27, 127.28, 127.00, 126.46, 126.41, 125.67, 125.45, 125.38, 100.67, 100.56, 100.30, 100.19, 98.47, 97.02, 96.65, 96.57, 96.17.

라. 생물활성

(1) DPPH 라디칼 소거능 측정 (DPPH radical scavenging assay)³⁴

곰피 추출물로부터 분리한 플라로탄닌류 화합물의 항산화 활성을 알아보기 위해 DPPH 라디칼 소거능을 하기와 같은 실험방법 으로 측정하였다.

먼저, 각 농도별 화합물 (1.25~320 $\mu\text{g/ml}$)을 메탄올에 녹여 160 μl 씩 취하여 1.5×10^{-4} M 의 DPPH 메탄올 용액 40 μl 와 잘 혼합한 후, 이 반응 혼합액을 실온에서 30분간 방치한 후, microplate reader spectrophotometer (VERSAmix)로 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군과 비교하여 자유 라디칼 소거활성을 백분율로 나타내었고, 50 % 저해 농도(IC₅₀)를 계산하였다. 측정치는 3회 반복 실험의 평균값으로 하여, 그 결과를 나타내었다.

(2) 티로시나제 저해 효과 측정³⁵

곰피 조추출물 및 각 용매 분획물의 티로시나제 저해 효과는 L-티로신을 기질로 하여 노 등³⁵의 방법을 약간 변형하여 측정하였다.

먼저 1 mM L-티로신(자센 치미카사), 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5) 및 증류수를 10:10:9의 비율로 혼합한 반응 혼합액 170 μ l에 곰피 조추출물(메탄올 추출물) 및 각 용매 분획물 10 μ l와 버섯 티로시나제수용액 (1000 units/ml)을 20 μ l를 첨가하여 최종적으로 반응액이 200 μ l가 되도록 96-well microplate에 넣었다. 이 반응액을 25 °C에서 30분간 배양한 후 microplate reader (Versa max)에서 490 nm의 파장으로 dopachrome 생성량을 측정하였다. 이 효소의 활성단위 (U)는 위에서 언급한 조건 하에서 분당 1 μ mole의 dopachrome을 생성하는 효소의 양으로 정하였다. 티로시나제 저해활성 %는 하기의 식으로 구하였다. 하기 방정식에서 시료의 흡광도(Asamp.)는 저해제를 넣었을 때의 490 nm에서의 흡광도, 표준 흡광도(Astd.)는 저해제를 넣지 않았을 때의 490 nm에서의 흡광도 및 대조군 흡광도(Actrl.)는 저해제를 넣었고 효소를 넣지 않았을 때의 490 nm에서의 흡광도이며, 490 nm에서 dopachrome의 흡광계수는 3.3×10^3 이다. 저해 활성은 농도-저해 곡선의 내삽법에 의해 얻어진 3개 수치의 50 % 저해 농도의 평균으로 나타내었다. 한편 대조군으로는 kojic acid (시그마 사)을 사용하였다. % 저해율 = $1 - (\text{시료의 흡광도} - \text{대조군 흡광도}) / \text{표준 흡광도} \times 100$

2. 결과 및 고찰^{33,34}

곰피 MeOH 추출물과 그 분획물 중에서 DPPH radical 소거활성과 tyrosinase 저해 활성이 가장 뛰어난 EtOAc 가용성 분획물을 SiO₂ column chromatography를 하여 phloroglucinol과 eckol, phlorofucofuroeckol A, dieckol을 분리하였으며 이들의 구조는 MS 그리고 ¹H 과 ¹³C NMR data와 문헌치를 비교하여 결정하였다. 이들은 곰피에서는 처음으로 보고되는 성분이다. 화합물 2는 연한 회색의 무정형 분말이며, positive FAB mass spectrum에서는 m/z 370 분자이온 peak가, negative FAB mass spectrum에서는 m/z 369에서 의사 분자이온 peak가 나타났고, HR FAB mass spectrum에서 m/z 370.0324 (m/z 370.0325 Calcd for C₁₈H₁₀O₉)에서 분자이온 peak가 나타났으며, 불포화도는 14로 나타났다. 화합물 6의 ¹³C-NMR spectrum에서는 5개의 non-substituted carbon, 그리고 13개의 산소가 결합된 방향족 탄소가 나타났고, ¹H-NMR spectrum에서는 5 개의 특징적인 aromatic proton에 해당하는 signal, 즉 δ 6.04 (1H, J=2.7 Hz)과 5.82 (1H, J=2.7 Hz), 그리고 δ 6.01 (1H, J=2.7 Hz)과 5.84 (1H, J=2.7 Hz)에서 2개의 AB system, 그리고 δ 6.10 (1H)에서 하나의 singlet, 뿐만 아니라 δ 9.77, 9.64, 9.60, 9.27과 9.26에서 5개의 phenolic hydroxyl proton signal이 나타났다. 이들 NMR spectra의 양상이 *Ecklonia kurome*에서 분리된 eckol (7) 과 매우 비슷하며 이는 화합물 6이 3 개의 phloroglucinol 단위로 구성되었음을 말해준다. 단지, 화합물 6 과 7의 차이점은 1H-NMR spectrum에서 전자가 하나의 phenolic hydroxyl proton과 하나의 aromatic proton이 적다는 것이며, 이것은 화합물 7의 C-2와 C-2' 사이에 aryl ether linkage가 하나 추가된 구조임을 의미한다. 이는 하나의 새로운 oxygen bearing carbon signal (δ 122.7, C-8a)과 acetylation에 의해 형성된 pentaacetate (6a)의 1H NMR에서 5개의

acetyl기에 기인하는 singlet이 나타났고, 화합물 **6a**의 EI mass spectrum에서 acetyl 기가 순차적으로 떨어져 나가는 각각의 fragmentation이 m/z 580 (M^+ , R. int.; 21), 538(45), 496(47), 454(72), 412(52)에서 나타나고, m/z 370에서 원래의 화합물의 분자량에 해당하는 peak이 나타남으로써 이러한 사실을 뒷받침 해주고 있다. 화합물 **6**의 HMQC, HMBC 그리고 NOESY spectra에 의해서 모든 proton과 carbon의 signal을 명확하게 결정하였다. HMBC spectrum에서, δ 9.77와 C-1 (δ 146.1), C-2 (δ 98.8), C-14a (δ 122.3) 간의 cross peak, 그리고 δ 9.27와 C-2 (δ 98.9), C-3 (δ 153.3), C-4 (δ 93.9) 간의 각각의 cross peak가 보임으로써, C-1과 C-3에 hydroxyl group이 각각 존재함을 가리킨다. 마찬가지로, δ 9.26과 C-10 (δ 98.8), C-11 (δ 153.0), C-12 (δ 93.9)간의 cross peak, δ 9.64와 C-8a (δ 122.7), C-9 (δ 146.0), C-10 (δ 98.8)간의 cross peak가 C-11와 C-9에 각각 hydroxyl groups이 있음을 나타내었다. 또한, δ 9.60와 C-5a (δ 125.9), C-6 (δ 140.1), C-7 (δ 97.6)간의 cross peak는 C-6에 hydroxyl group이 있음을 확인할 수 있었다. 화합물 **6**은 방향족 수소에 대한 자기 이방성 효과가 없고 이 화합물의 비선광도가 '0'으로 나타났으며, ^1H NMR spectrum에서 H-2와 H-10, 그리고 H-4와 H-12사이의 화학 이동치가 같았으므로 이 화합물의 입체구조는 평면구조로 결정하였다. 그러므로 화합물 **6**은 5,8,13,14-tetraoxa-pentaphene-1,3,6,9,11-pentaol로 결정하였고 신물질로서 eckstonol (**6**)로 명명하였다.

곰피 추출물로부터 분리한 phlorotannin류의 화합물들의 항산화효과는 Table 13에서 알 수 있는 것처럼, DPPH 라디칼을 효과적으로 저해하였는데, 각각의 IC_{50} 치는 phloroglucinol 이 956.9 μM , eckstonol이 8.8 μM , eckol 11.5 μM , phlorofuroeckol이 4.7 μM 및 dieckol이 6.2 μM 이었다. 또한 양성대조군인 L-ascorbic acid의 IC_{50} 치는 10.3 μM 을 나타내었다. Phloroglucinol을 제외한 모든 phlorotannin류에서 강력한 radical 저해활성을 나타내었다. 대체 적으로 또한 곰피 조추출물 및 각 용매 분획물의 티로시나제의 저해효과는 Table 14에서 나타 낸 바와 같이 ethyl acetate 가용성 분획에서 Ic_{50} 치가 67.02 $\mu\text{g/ml}$ 로 두드러진 활성을 나타내었다. 곰피의 EtOAc 분획물에서 분리한 5가지 플로로탄닌류 화합물의 티로시나제 저해 활성을 Table 15에 나타내었다. Table15에서 알 수 있는 것처럼, 5가지 플로로탄닌류 화합물인 phloroglucinol (화합물 **5**), eckstonol (화합물 **6**), eckol (화합물 **7**), phlorofucofuroeckol A (화합물 **8**) 및 dieckol (화합물 **9**)은 티로시나제 활성을 효과적으로 저해함을 알 수 있었다.

Table 13. DPPH radical scavenging activity of phlorotannins

compounds	IC ₅₀ $\mu\text{g/ml}$ (μM)
phloroglucinol (5)	120.6 (956.9)
eckstolonol (6)	3.3 (8.8)
eckol (7)	4.3 (11.5)
phlorofucoeckol A (8)	2.8 (4.7)
dieckol (9)	4.6 (6.2)
L-ascorbic acid	1.8 (10.3)

Table 14. Tyrosinase inhibitory activity of the MeOH extract and its solvent soluble fraction of *Ecklonia stolonifera*

samples	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
MeOH extract	354.02
<i>n</i> -hexane fraction	>500
dichloromethane	183.41
ethyl acetate fraction	67.02
butanol fraction	>500
water fraction	>500
kojic acid	4.57

Table 15. Tyrosinase inhibitory activity of phlorotannins

compounds	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) (μM)
phloroglucinol (5)	92.8 (736.6)
eckstolonol (6)	126.3 (341.4)
eckol (7)	33.2 (89.3)
phlorofucoeckol A (8)	177.3 (295.4)
dieckol (9)	2.2 (2.9)
kojic acid	6.3 (44.5)

제4장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도

제1절 목표달성도

연차별 연구개발 목표	연구목표의 달성도	
	1차년도	2차년도
1차년도: 1. 균주의 분리, 동정, 인공접종, 보존 및 database화 2. 표준시료의 조제 및 1차 효능검색 (라디칼 제거, 미백 효능) 3. 연구대상 균주의 도출 2차년도: 1. 양식생물과 미생물과의 생리학적 상관관계 (공생, 기생, 부생, 성장, 질병) * 인공접종(병독성 강한 균주 선별) * 병독성 발현 특이 유전인자 탐색 2. 신속 동정법 개발과 방제 3. 양식생물의 성장과 질병에 미치는 미생물의 영향과 그 대책 4. 물질의 분리정제 및 효능검색 5. 신물질의 구조결정 및 유용물질 개발	달성 달성 달성	달성 달성 달성 달성 달성

제2절 연구성과

	학술지 게재		학회발표		학위논문		산업재산권	
	국제	국내	국제	국내	박사	석사	등록	출원
제1세부과제 (책임자 : 손병화)	1	1	2	2				
제2세부과제 (책임자 : 최재수)	1	1		2	1			2
제3세부과제 (책임자 : 이훈구)		1		1		1		
제4세부과제 (책임자 :)								
합 계	2	3	2	5	1	1		2

1. 학술지 게재

가. SCI 등재 전문학술지 (Impact Factor:)

(1) Li, Y., Li, X. F., Kim, D. S., Choi, H. D. and Son, B. W.

Indolyl alkaloid derivatives, *N_b*-acetyltryptamine and oxaline from a marine-derived fungus.
Arch. Pharm. Res. **26**(1): 21-23 (2003). (IF: 0.73)

(2) Hye Sook Kang, Hae Young Chung, Jee Hyung Jung, Byeng Wha Son, and Jae Sue Choi

A new phlorotannin from the brown alga *Ecklonia stolonifera*.
Chem. Pharm. Bull., 51(8), 1012-1014 (2003). (IF: 1.113)

(3) Hye Sook Kang, Hae Young Chung, Ji Young Kim, Byeng Wha Son, Hyun Ah Jung and Jae Sue Choi,

Inhibitory phlorotannins from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on total reactive oxygen species (ROS) generation.

Arch. Pharm. Res., 27(2), 194-198 (2004). (IF: 0.73)

(4) Yong Li, Xifeng Li, Jung Sook Kang, Hong Dae Choi, and Byeng Wha Son,

New radical scavenging and ultraviolet-A protecting prenylated dioxopiperazine alkaloid

related to isoechinulin A from a marine isolate of the fungus *Aspergillus*.
J. Antibiotics, 57(5), 337-340 (2004). (IF: 1.347)

나. SCI 비등재 전문학술지

(1) 이훈구, 손병화, 오명주,
2002-2003년도 복수증 양식산 넙치로부터 동정된 매생물상.
Kor. J. Microbiol. 40(2), 133-138 (2004).

2. 학회발표

가. 국제학회

(1) Byeng Wha Son

Invited Lecture of "Chemistry of marine microorganisms: developing a new fine chemical resource" Proceedings of KSP-JSP-CCTCNM Joint Seminar 2002, p. 41-49. August 6-8, 2002, Hotel Lotte, Daejeon, Korea.

(2) XiFeng Li, 최홍대, 노정래, 손병화

Bioactive secondary metabolites from a marine-derived fungus (MFA898). Proceedings of 2003 Annual Meeting & International Symposium of the KMB. Microbial functional genomics & its application. p. 268 (2003). (Hotel Tirol, Muju, June 24-26, 2003).

나. 국내학회

(1) Kang, Hye Sook; Chung, Hae Young; Jung, Jee Hyung; Son, Byeng Wha;
Choi, Jae Sue

A new phlorotannin from the brown alga *Ecklonia stolonifera*. Proceedings of the Pharmaceutical Society of Korea, Vol. 1, pp. 265-266 (Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Korea, Yeungnam Univ., Gyeongsan, 17-18. 04, 2003).

(2) Lee, H. K.; Lee, J. H.; Bai, S. C.; Choi, S. M.; Son, B. W.; Oh, M. J.;
Lee, S.

Vibrios isolated from haemorrhagic ulcer and ascite olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Proceedings of 2003 International meeting of the Microbiological Society of Korea, p. 184 (Kangwon National University, Chunchon, May 02-03, 2003).

(3) Yong Li, 손병화, 최홍대

Indolyl alkaloid derivative Nb-acetyltryptamine from a marine-derived fungus (MFA936),
The 92nd National Meeting of the Korean Chemical Society, Program and Abstracts, p. 483
(BEXCO, Busan, 16-17. 10, 2003).

(4) 강혜숙, 윤나영, 정미정, 손병화, 정해영, 최재수
식용 갈조류 곰피에서 분리한 phlorotannin의 total ROS 저해활성, 2003년도 추계
한국수산학회 학술대회 발표요지집, pp. 63-64, 03. 10. 17. 2003. 여수대학교.

(5) Yong Li, XiFeng Li, Fukun Li, 윤금자, 손병화
Chemical structure of tryptamine acetate from the marine-derived fungus *Penicillium* sp.
제34회 한국생약학회 정기총회 및 학술대회 초록집 p. 65, 2003. 12. 5, 강원대학교, 춘천.

3. 산업재산권

가. 명칭: 티로시나제 저해활성을 지닌 곰피 추출물 또는 그로부터 분리한 플로로탄닌류를
함유하는 조성물 {Composition comprising phlorotannins or the extract of *Ecklonia*
stolonifera Okamura having tyrosinase inhibitory activity}.

발명자: 최재수, 강혜숙, 손병화

특허 제 호

특허권자(출원인): 대한민국 (부경대학교 총장)

출원일: 2003. 05. 06

출원번호: 10-2003-0028736

등록일:

나. 명칭: 항산화 활성을 지닌 곰피 추출물로부터 분리한 플로로탄닌류를 함유하는 조성물
{Composition comprising phlorotannins isolated from the extract of *Ecklonia stolonifera*
Okamura having anti-oxidative activity}.

발명자: 최재수, 강혜숙, 손병화, 정지형, 정해영

특허 제 호

특허권자(출원인): 대한민국 (부경대학교 총장)

출원일: 2003. 05. 06

출원번호: 10-2003-0028737

등록일:

제3절 대외 기여도

1. 학술적 측면

- 가. 전문인력양성과 과학논문의 증대
- 나. 분자구조해석에 대한 연구능력함양
- 다. 고부가성 신물질개발을 위한 화학적 생물학적 연구기반 구축
- 라. 바이오 산업의 핵심기술인 신물질 개발

2. 산업적, 경제적 측면

- 가. 신기능성 물질을 생산하는 해양자원 개발
- 나. 어병의 간편한 진단 및 치료로 양식어민 소득 증대
- 다. 고부가성 정밀화학소재 개발을 위한 기반 구축

제5장 연구개발결과의 활용계획

제1절 성과 활용 실적

1. 항산화 및 피부 미백용 화장품 제품화를 위한 상담 진행 중
2. 양식어류에 대한 질병진단 및 방제
 - 가. 거제 해바라기 수산
 - 항균제 내성시험 5 회
 - 항균제 투여 및 약제선정 3 회
 - 복수 원인 균 통보 3 회
 - 나. 거제 거성 수산
 - 항균제 내성시험 3 회
 - 항균제 약제선정 2 회 통보
 - 복수 증 원인 균 통보 2 회

제2절 성과 활용 계획

1. 어병의 신속진단 및 치료
 - 가. *V. harveyi*의 형광발색을 이용한 균주 신속 동정에 활용
 - 나. *V. harveyi*의 분리빈도를 측정함으로, 양식넙치의 복수증 질병예보제 활용
2. 지표물질의 대량생산 및 2차 생물활성 검색
3. 노화억제제 및 피부 미백제 개발을 위한 새로운 선도물질 혹은 후보물질로의 개발.

제3절 기대효과

1. 자원의 개발, 보존 및 응용
2. 어병의 간편한 진단 및 통제
 - 가. 넙치 복수증 예보제 가능
3. 고부가성 정밀화학 소재 (의약품, 화장품)의 선도물질 개발

제6장 참고문헌

1. 김춘상, 조상현. 1991. 넙치 종묘 양산 시험, 수산진흥원 사업보고 90. 61
2. 차용백, 양한준, 최상덕, 조재권. 1997. 남해안 양식산 농어, *Lateoabrax japonicus* 치어에서 분리한 병원성 *Staphylococcus epideomidis*에 관한 연구. 한국어병학회지 10 : 1-14.
3. Whand. E. C., P. Helle, and R. Higgins. 2000. Infections of *Edwardsiella tarda* among brook trout in Quebec. *Journal of Aquatic animal Health* 12 : 74-77.
4. 한 · 고, 1992. 유전자원으로서 생물다양성과 산업적 전망: 유전공학적 이용자원으로서의 가능성. 생물과학 심포지움 13: 35-54.
5. Yajima, H., Shioiri, T., and Ohizumi, Y. (eds.), Marine Resources for Drug Discovery (I, II), Hirokawa Publishing Co. Tokyo, Japan (1992).
6. Andersen, R. J. and Williams, D. E. (2000) Pharmaceuticals from the sea. *In* Hester, R. E. and Harrison, R. M. (ed.), Chemistry in the marine environment, pp. 55-79, Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK.
7. 박민식, 생물산업 시장 동향, 한국바이오 산업 및 투자 동향, 생물산업, 15(1), 10-11 (2002).
8. Fenical, W. (1993) Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. *Chem. Rev.* **93**(3): 1673-1683 and references therein.
9. " *Sponges in Time and Space, Proceedings 4th International Porifera Conference*", 1994.
10. Marine biodiversity and the medicine cabinet. the status of new drugs from marine organisms. *Oceanography* **1996**, 9, 23 and references cited therein.
11. " *International Symposium on Natural Products Research, Proceedings of the Third Symposium on Pharmaceutical Sciences* " College of Pharmacy, Seoul National University, 2000, 73-82.
12. *Fundamentals of the Fungi; 3rd ed.*, Prentice-Hall, Inc.: New Jersey, U.S.A., 1990; p. 495-529.
13. Lee, H.K., and S.S. Lee. 1997. Identification of the vibrios isolaton from the shrimp (*Crangon affinis*) in estuary of Nakdong River in Korea. *J. Korean Soc. Microbiol.* 32, 529-537.
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1998. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 4th ed. Pennsylvania: NCCLS; M7-A4. 771 East Lancaster Avenue, Villanova, Pennsylvania 19085, USA.
15. Becton Dickinson. Becton Dickinson Microbiology System. Becton Dickinson Company Cockeysville, MD 21030 USA.
16. Suzuki, S., N. Hosono, and R. Kusuda. 1997. Detection of aquatic birnavirus gene from marine fish using a combination of reverse transcription and nested PCR. *J.*

Mar. Biotechnol. 5, 205–209.

17. Oh, M.J., S.J. Jung, Y.J. Kim, H.R. Kim, T.S. Jung, and I.K. Yeo. 2000. The Screening of Marine Birnavirus (MABV) infected in Brood Stocks of Flounder, *Paralichthys olivaceus*. J. Fish Pathol., 13, 53–59.
18. Isshiki, T., T. Nagano, K. Kanehira, and S. Suzuki. 2004. Distribution of marine birnavirus in cultured marine fish species from Kagawa Prefecture, Japan. J. Fish Dis., 27, 89–98.
19. Skerman, V.B.D., V. MacGowan, and P.H.A. Sneath. 1989. Approved lists of bacterial names. American Society for Microbiology, Washington D.C., U.S.A.
20. Johnson, F.H., and I.V. Shunk. 1936. An interesting new species of luminous bacteria. J. Bacteriol. 31, 585–592.
21. Lee, J.V., T.J. Donovan, and A.L. Furniss. 1978. Characterization, taxonomy, and emended description of *Vibrio metschenikovii*. Int. J. Syst. Bacteriol. 28, 99–111.
22. Farmer, J.J. III and F.W. Hickman–Brenner. 1992. The genera *Vibrio* and *Photobacterium*. p. 2952–3011. In A. Balows (ed), The Prokaryotes, 2nd ed. Springer–Verlag, New York, New York.
23. Lee H.K., H.J. Kim, and I. Kim. 1991. Isolation of vibrio species from cultured flounders (*Paralichthys olivaceus*) with ulcers and ascites in the southern coast of Korea during the winter season. Kor. J. Microbiol. 29, 319–328.
24. Suzuki, S., T. Nakata, M. Kamakura, M. Yoshimoto, Y. Furukawa, Y. Yamashita, and R. Kusuda. 1997. Isolation of birnavirus from agemaki (jack knife clam) *Sinonovacula constricta* and survey of the virus using PCR technique. Fisheries Science, 63. 563–566.
25. Pakingking Jr., R., R. Takano, T. Nishizawa, K. Mori, Y. Iida, M. Arimoto, and K. Muroga. 2003. Experimental coinfection with aquabirnavirus and viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), *Edwardsiella tarda* or *Streptococcus iniae* in Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. Fish Pathol. 38, 15–21.
26. Bowden, T.J., K. Lockhart, D. A. Smail, and A. E. Ellis. 2003. Experimental challenge of post-smolts with IPNV: mortalities do not depend on population density. J. Fish Dis., 26, 309–312.
27. 최진석, 이원갑, 손병화, 김동수, 최홍대, 최재수, 정지형, 임광식, 최원철 (2000) 해양미세조류의 라디칼 소거활성 검색. *생약학회지* 31(2): 252–255.
28. Lee, Sang Mi; Li, Xifeng; Jiang, Hualiang; Cheng, Jia Gao; Seong, Seeyearl; Choi, Hong Dae; Son, Byeng Wha; Terreusinone, a novel UV–A protecting dipyrroloquinone from the marine algicolous fungus *Aspergillus terreus*. *Tetrahedron Lett.*, 44(42), 7707–7710 (2003).
29. Li, Y., Li, X. F., Kim, D. S., Choi, H. D. and Son, B. W. (2003) Indolyl alkaloid derivatives, *N*₆-acetyltryptamine and oxaline from a marine-derived fungus. *Arch. Pharm. Res.* 26(1): 21–23.

30. Nagel, D. W., Pachler, K. G. R., Steyn, P. S., Vleggaar, R., and Wessels, P. L. (1976) The chemistry and ¹³C NMR assignments of oxaline, a novel alkaloid from *Penicillium oxalicum*. *Tetrahedron* **32**: 2625-2631.
31. Yong Li, Xifeng Li, Jung Sook Kang, Hong Dae Choi, and Byeng Wha Son, New radical scavenging and ultraviolet-A protecting prenylated dioxopiperazine alkaloid related to isoechinulin A from a marine isolate of the fungus *Aspergillus*. *J. Antibiotics*, *57*(5), 337-340 (2004).
32. J. Buckingham, F. M. MacDonald, H. M. Bradley (Eds.), Dictionary of Natural Products. Vol. 4. p. 1983, Chapman & Hall, London, 1994, and references cited therein.
33. Hye Sook Kang, Hae Young Chung, Jee Hyung Jung, Byeng Wha Son, and Jae Sue Choi. A new phlorotannin from the brown alga *Ecklonia stolonifera*. *Chem. Pharm. Bull.*, *51*(8), 1012-1014 (2003).
34. Hye Sook Kang, Hae Young Chung, Ji Young Kim, Byeng Wha Son, Hyun Ah Jung and Jae Sue Choi, Inhibitory phlorotannins from the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* on total reactive oxygen species (ROS) generation. *Arch. Pharm. Res.*, *27*(2), 194-198 (2004).
35. No, J. K.; Soung, D. Y.; Kim, Y. J.; Shim, K. H.; Jun, Y. S.; Rhee, S. H.; Yokozawa, T.; Chung, H. Y. Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Science* **1999**, *65*, PL 241-246.

주 의

1. 이 보고서는 해양수산부에서 시행한 “해양한국발전프로그램 (KSGP)연구개발사업”의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 해양수산부에서 시행한 “해양한국발전프로그램(KSGP)연구개발사업”의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.