



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공학석사 학위논문

*Amphidinium carterae*의 대량배양을

통한 항공광이성 물질 추출



2014년 2월

부경대학교 대학원

의생명융합공학협동과정

김종석

공학석사 학위논문

*Amphidinium carterae*의 대량배양을
통한 항곰팡이성 물질 추출

지도교수 김창훈

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함

2014년 2월

부경대학교 대학원

의생명융합공학협동과정

김종석

김종석의 공학석사 학위논문을 인준함.

2014년 2월



주 심 부 학사 이학박사 강 성 민 (인)

위 원 이학박사 김 현 우 (인)

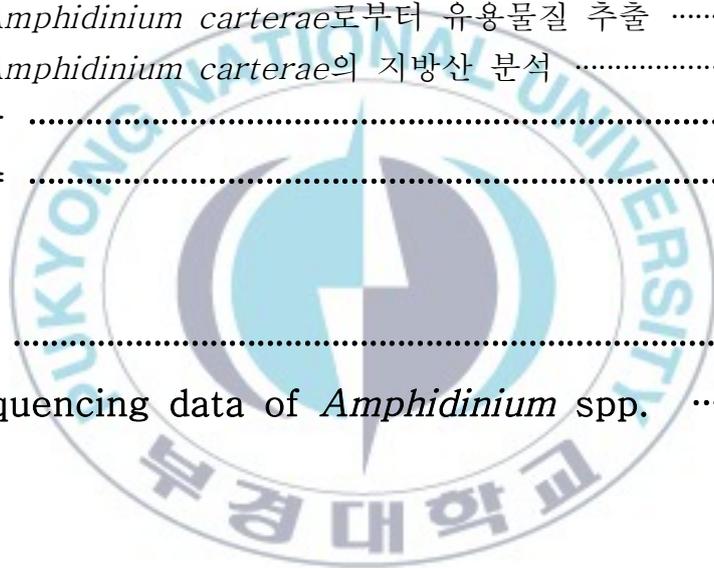
위 원 농학박사 김 창 훈 (인)

목 차

List of figures	iii
List of tables	v
Abstract	vi

1. 서 론	1
2. 재료 및 방법	3
2. 1. <i>Amphidinium carterae</i> 의 배양조건 확립	3
2. 1. 1. 미세조류	3
2. 1. 2. 배지 선정	4
2. 1. 3. 최적 배양 온도와 염분	6
2. 2. <i>Amphidinium carterae</i> 의 분자생물학적 동정	7
2. 2. 1. Genomic DNA 추출	7
2. 2. 2. PCR 반응	8
2. 2. 3. 염기서열 정보 정렬 및 계통수 작성	11
2. 3. <i>Amphidinium carterae</i> 의 대량 배양	12
2. 3. 1. 수류발생형 수조 배양법을 통한 대량 배양 ..	12
2. 4. <i>Amphidinium carterae</i> 의 분석시료 확보	13
2. 5. <i>Amphidinium carterae</i> 로부터 유용물질 추출	14
2. 5. 1. 추출 방법	14
2. 5. 2. 정제 방법	16
2. 6. <i>Amphidinium carterae</i> 의 지방산 분석	18

3. 결 과	19
3. 1. 배양조건 확립	19
3. 1. 1. 배지에 따른 성장률	19
3. 1. 2. 배양 온도 및 염분에 따른 성장률	21
3. 1. 3. Strain별 성장 그래프	24
3. 2. 분자생물학적 동정	26
3. 3. <i>Amphidinium carterae</i> 의 대량 배양	30
3. 4. <i>Amphidinium carterae</i> 의 분석시료 확보 및 활성화도 비교	32
3. 5. <i>Amphidinium carterae</i> 로부터 유용물질 추출	34
3. 6. <i>Amphidinium carterae</i> 의 지방산 분석	37
4. 고 찰	40
5. 요 약	43
참고문헌	45
DNA sequencing data of <i>Amphidinium</i> spp.	50



List of figures

Fig. 1. Culture steps of *Amphidinium carterae*.

Fig. 2. Diagram of extraction steps.

Fig. 3. Diagram of purification steps.

Fig. 4. Growth profiles of *Amphidinium* spp. in the various culture medium.

Fig. 5. Growth profiles of *Amphidinium* spp. in the various culture temperature.

Fig. 6. Growth profiles of *Amphidinium* spp. in the various culture salinity.

Fig. 7. Growth profiles of *Amphidinium* spp.

Fig. 8. Genomic DNA electrophoresis of *Amphidinium* strains.

Fig. 9. LSU rDNA PCR result using LSU D1R and LSU D3B primer combination.

Fig. 10. Dendrogram of *Amphidinium* spp.

Fig. 11. *Amphidinium carterae* growth curve on 20 L culture volume (① lag or induction phase ② exponential phase ③ stationary phase ④ death phase).

Fig. 12. *Amphidinium carterae* growth curve on 500 L culture volume (① lag or induction phase ② exponential phase ③ stationary phase ④ death phase).

Fig. 13. Concentration of *A. carterae*.

Fig. 14. Sample of *A. carterae*.

Fig. 15. Antifungal activity of *Amphidinium* spp.

Fig. 16. Antifungal test through ODS-Q3 Column.

Fig. 17. Antifungal test through LH-20 Column.

Fig. 18. RPAQUEOUS Column result.

Fig. 19. Fatty acid analysis of *Amphidinium carterae* (GC).

Fig. 20-43. *Amphidinium* spp. sequencing data.

List of tables

Table 1. *Amphidinium* strain culture information from KMMCC

Table 2. Composition of the f/2 medium

Table 3. Composition of the KW21

Table 4. Composition of the complex fertilizer

Table 5. Gentic analysis information and PCR primer information

Table 6. PCR information for gene analysis.

Table 7. LSU rRNA primer information and PCR result of *Amphidinium* strains

Table 8. Amount of sample by culture volume of *Amphidinium carterae*

Table 9. Comparison of antifungal substances volume of *Amphidinium carterae*

Table 10. Compare antifungal activity of *Amphidinium* spp.

Table 11. Fatty acid analysis of *Amphidinium carterae*

Extraction of antifungal substances through
the mass culture of *Amphidinium carterae*

Jong Souk Kim

Department of Interdisciplinary Program of Biomedical Engineering,

The Graduate School,

Pukyong National University

Abstract

Marine dinoflagellates produce diverse bioactive compounds in which amphidinols, antifungal and hemolytic compounds are known as natural products from the genus *Amphidinium*. This study was conducted to separate and purify the amphidinols (natural anti-fungal substrates) in marine microalgae *Amphidinium carterae*.

A. carterae strain was grown unialgally in f/2 medium and the culture processes were separated by the preservation (stock culture), the middle culture (15 L) and the mass culture (over 300 L) systems of Fisheries Science & Technology Center, Pukyong National University. When the cell density in mass culture reached to peak at 100×10^4 cells/mL, it was harvested by the auto-filtration (using Synopex membrane filter) system.

The concentrated cells were extracted and separated into the first antifungal substance with MeOH, CHCl₃, and BuOH treatment methods, separately. And then it was separated by 60 %, 85 %, 100 % MeOH using the ODS-Q3 column, and purified it by using a Sephadex LH-20 column. Finally, the fractions having antifungal activities were chromatographed on a RPAQUEOUS column by the HPLC system.

During the above purification procedures, antifungal activities were tested by a paper disk method against *Aspergillus niger*. In these processes, antifungal activities appeared at first in the elute of 85% MeOH extract on the ODS-Q3 column and showed clear responses on the elutes of large peaks of LH-20 column.

These results mean that amphidinols showing antifungal activities are produced from *A. carterae* strain of Korea and the more detailed researches should be anticipated on the structural analyses and applications to the biological and medical sciences.



1. 서 론

해양미세조류는 현재 지구상에서 존재하는 생물들 중 그 종류가 아주 다양하며 화학적, 영양학적, 의학적으로 이용가치가 아주 다양하다. 이러한 해양미세조류를 이용하기 위해서는 대량배양이 기본이 되어야 한다. 해양미세조류의 종류에 따라 대량배양이 가능여부가 결정되기도 하고, 대량배양이 가능하다고 하여도 배양 방법과 공급하는 영양원에 따라서 배양의 성공과 실패의 여부가 결정된다.

이러한 해양미세조류 중에서도 서로 다른 운동을 하는 두 개의 편모를 가지고 독립영양, 혼합영양, 섭식영양, 기생, 공생 등의 다양한 생활사를 가지고 때로는 적조를 일으키기도 하는 외편모조류(dinoflagellates)는 다양한 천연 신소재의 보고로 가장 주목받는 해양 자원중의 하나이다.

현재까지 외편모조류로부터 분리 보고된 물질로 amphidinols, ciguatoxins, maitotoxin, brevetoxin, okadaic acid 과 saxitoxins 등이 있다(Yasumoto and Murata, 1993). 이들은 항진균제 및 항암제 그리고 AIDS 관련 질병치료에 적용하는 연구가 진행되고 있고 있다.

현재 미세조류를 이용한 생리활성물질을 개발 중인 미국에서는 Shimizu 교수팀(University of Rhode Island)에 의해 외편모조류를 이용한 신물질 개발에 대한 연구가 진행되고 있으며, 약 150여종의 적조생물에 대한 생리활성물질 생성 여부를 소규모 배양을 통하여 확인한 바 있다. 몇 가지 신물질은 항암, 항진균효과를 지니고 있어 동물실험을 진행하고 있다. 일본에서는 Kobayashi 교수팀(호카이도 대학)과 Yasumoto 교수팀(동북대학)을 중심으로 적조생물인 *Amphidinium* 종들에 대한 연구가 매우 활발하게 진행되고 있으며, 다수의 강력한 항암 물질들과 각종 독성물질들이 규명되었으며, 특허도 확보되어 있다.

Amphidinium spp. 로부터 분리된 Amphidinols은 기존 항진균제와는 전혀 다른 작용기전을 갖는 항진진균 활성으로 주목받고 있는데 (Ishibashi and Kobayashi, 1997; Murata et al., 1999; Paul et al., 1995, 1996, 1997; Satake et al., 1991), 아직까지 Amphidinols의 산업화에 성공한 보고는 없으며, 산업화의 필수 요건으로 대량생산이 필요하다. 따라서 현재 화학합성을 위한 연구와 함께 Amphidinols 생산 조류, *Amphidinium* spp.의 대량 배양에 대한 연구가 주로 이루어지고 있다.

Amphidinium 속을 포함한 와편모조류는 최근 영양증식면에서 섭식 영양성(mixotrophic)의 특징을 보이는 것으로 알려지고 있으며 (Taylor, 2004), 생물 또는 소립자를 포식하는 등 다양한 섭식구조와 방법을 나타내고 있는 점으로부터 다양한 증식요인과 환경조건을 고려한 배양기술의 확보가 필요할 것이다.

따라서 본 연구는 *Amphidinium carterae*의 대량배양의 가능성 여부의 확인과 대량 배양 방법의 확립 및 Amphidinols과 같은 유용 물질 추출을 통한 천연물질을 효율적으로 다량 추출할 수 있는 방법을 연구하였다.

2. 재료 및 방법

2. 1. *Amphidinium carterae*의 배양조건 확립

2. 1. 1. 미세조류

본 연구에서 사용된 *Amphidinium*은 한국 해양 미세조류 은행 (KMMCC)에서 분양 받은 5종의 *Amphidinium*과 기존 실험실에서 보존중인 *Amphidinium carterae*이다. KMMCC에서 분양 받은 5종은 해수산 *Amphidinium* 속인 *A. carterae* 2종, *Amphidinium* 속 3 종이며, 실험실에서 보유하고 있던 *Amphidinium carterae*와 Table. 1을 참고하여 원종을 유지하였다.

Table 1. *Amphidinium* strain culture information from KMMCC

Species	KMMCC NO.	Culture Information			
		Media	Temp. °C	Light (lux)	Salinity (‰)
<i>Amphidinium carterae</i>	551	f/2	20	3,000	30
<i>Amphidinium carterae</i>	550	f/2	20	3,000	30
<i>Amphidinium</i> spp.	553	f/2	20	3,000	30
<i>Amphidinium</i> spp.	578	f/2	20	3,000	30
<i>Amphidinium</i> spp.	1506	f/2	20	3,000	30

2. 1. 2 배지 선정

성공적인 대량 배양을 위해서는 가장 먼저 *Amphidinium*이 영양원으로 가장 잘 이용할 수 있는 배지를 선정 하여야 한다. 배지 선정을 위해 배양 기간은 7일, 배양 온도는 20℃, 조도 3000 lux, 광주기는 14(L) : 10(D)으로 하였으며, 초기 접종 밀도는 3×10^4 cells/mL로 하였다. 사용된 배지는 f/2 배지와 KW21, 복합비료 3가지이며, 각 종류별로 배지를 1 L flask에 500 mL씩 넣어 Autoclave로 멸균 처리하여 사용 하였다. 성장의 측정은 Hemacytometer를 이용하여 광학현미경을 통해 직접 계수하는 방법을 사용하였다.



Table 2. Composition of the f/2 medium

Component	Stock	Quantity used (1 L)
NaNO ₃	75 g/L	1 mL
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	5 g/L	1 mL
NaH ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	30 g/L	1 mL
Trace metal sol.	–	1 mL
Vitamin sol.	–	0.5 mL
For 1L stock		For 1L medium

Table 3. Composition of the KW21

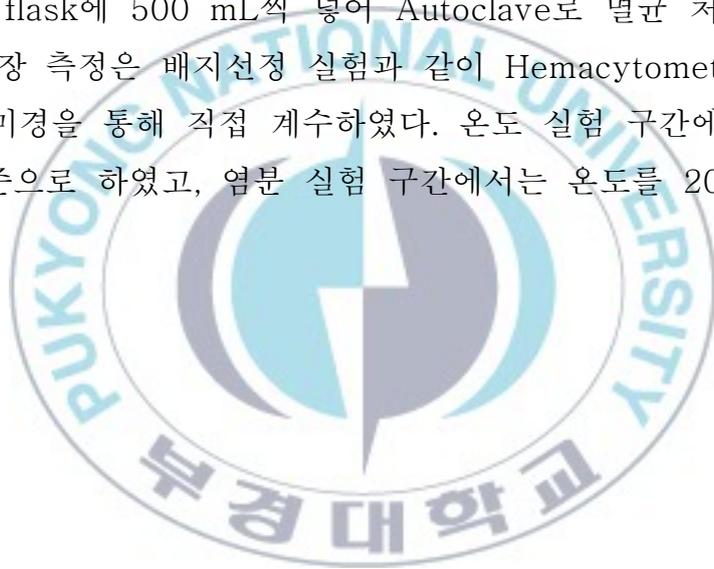
Component	Stock
Nitrogen (N)	49 g/L
Phosphoric acid (P)	0.4 g/L
Other	
Vitamin mixture	B1, B12, Biotin
Boron, Manganese, Iron, Zinc, Cobalt, EDTA, Amino acid complex	

Table 4. Composition of the complex fertilizer

Component	Quantity
N	21 %
P	17 %
K	17 %

2. 1. 3. 최적 배양 온도와 염분

Amphidinium strain 배양의 배지 선정 실험의 결과를 바탕으로 최적 성장 배지인 f/2배지를 이용하여, 최적 배양 온도와 염분을 알기 위해 실험을 진행하였다. 온도에 따른 성장 실험의 경우 실험 온도 구간을 15℃, 20℃, 25℃, 30℃로 하였다. 염분에 따른 성장 실험의 경우 염분 구간을 15 ‰, 20 ‰, 25 ‰, 33 ‰로 하였다. 그 외의 배양 조건은 배양 기간은 7일, 조도 3000 lux, 광주기는 14(L) : 10(D), 초기 접종 밀도 3×10^4 cells/mL로 모두 동일하게 하였다. 실험구의 배지는 각각 1 L flask에 500 mL씩 넣어 Autoclave로 멸균 처리하여 사용하였다. 성장 측정은 배지선정 실험과 같이 Hemacytometer를 이용하여 광학현미경을 통해 직접 계수하였다. 온도 실험 구간에서의 염분은 33 ‰ 기준으로 하였고, 염분 실험 구간에서는 온도를 20℃ 기준으로 하였다.



2. 2. *Amphidinium carterae*의 분자생물학적 동정

본 연구에서 사용된 미세조류 *Amphidinium carterae*의 KMMCC로부터 분양 받은 *Amphidinium* 5strain에 대한 정확한 분자계통학적 위치를 파악하기 위해 (주)엔엘피에 분석의뢰 하였다.

2. 2. 1. Genomic DNA 추출

- ① 여분의 수분을 제거하기 위해 4,000 rpm, 10 분 동안 원심한다.
- ② 상등액을 제거하고 Pellet 을 1.5 mL 튜브에 옮겨담은 후 배양액을 완전히 제거하기 위해 8,000 rpm, 5 분 동안 원심한다.
- ③ 상층액을 제거하고 Pellet 만 남긴 뒤 Extraction solution (0.8 M LiCl, 0.6% SDS, 10 mM EDTA, 0.2% PVPP; pH 9.0; Hong et al. 2005) 500 μ L, β -Mercaptoethanol 20 μ L, Proteinase K (Bioneer, Korea) (20 mg/mL) 10 μ L을 넣는다.
- ④ Heating block 에서 55 $^{\circ}$ C, 10 분 동안 반응시키면서 약 3 분에 한 번씩 섞어준다.
- ⑤ 냉장고 (4 $^{\circ}$ C)에서 1 시간 동안 반응시키면서 일정한 간격으로 섞어 준다.
- ⑥ 세포 파쇄물을 제거하기 위해 8,000 rpm, 5분간 원심한 후, 상층액 400 μ L을 새로운 튜브로 옮긴다.
- ⑦ Genomic DNA 를 침전시키기 위해 3 M Sodium acetate (pH 5.2) 40 μ L와 100% Cold ethanol 800 μ L를 넣고, 12,000 rpm, 10 분 동안 원심한다.
- ⑧ 상층액을 제거하고 70% Ethanol 700 μ L을 넣고 위아래로 조심스럽게 섞어 DNA fiber 가 생기는지 확인한 후, 12,000 rpm, 5 분 동안 원심한다.
- ⑨ 상층액을 제거하고 간단히 원심한 후, 남아 있는 Ethanol 을 피펫을

이용하여 완전히 제거한다.

⑩ 실온에서 10 분간 뚜껑을 열어서 Ethanol 을 완전히 건조시킨다.

⑪ TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0) 50 μ L 와 RNase (4 mg/mL) 2.5 μ L을 넣은 후, 37°C, 30분 동안 반응시킨다.

⑫ 1 kb DNA Molecular marker 1 μ L와 추출한 Genomic DNA 1 μ L를 Loading dye 1-5 μ L와 잘 섞은 후, 1% Agarose gel에 50 V으로 60분간 전기영동한다.

⑬ GelDoc (Bio-Rad, USA)를 이용하여 Genomic DNA를 확인한다.

⑭ NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA)를 이용하여 Genomic DNA의 농도를 측정한다.

⑮ NanoDrop 으로 측정된 농도를 참조하여 Genomic DNA 의 최종 농도가 50 ng/ μ L이 되도록 TE buffer 를 이용하여 희석한다. -20°C 에서 보관한다.

2. 2. 2. PCR 반응

① -20°C에 보관중인 20 μ L 용량의 AccuPower PCR PreMix (Bioneer, Korea)에서 튜브를 IsoFreeze PCR Tube Rack (Bioneer)에 꽂는다.

② 튜브에 희석된 Genomic DNA 1 μ L, 5 pmol Primer 각 1 μ L, DEPC-Water 17 μ L를 차례로 넣는다. 본 실험에서 사용된 Primer 조합은 Table. 5와 같다.

③ 탭핑하여 잘 섞고 간단히 원심한 후, 반응 전까지 IsoFreeze PCR Tube Rack 에 꽂아둔다.

④ PCR 기계 (T100™ Thermal Cycler, Bio-Rad, USA)에 Table. 6과 같이 PCR 조건을 설정하였다.

- ⑤ “Run” 아이콘을 눌러 Lid 와 반응 Rack 의 온도가 95℃로 올라갈 때까지 기다린 후, “Pause” 아이콘을 눌러 반응을 일시 정지시킨다.
- ⑥ PCR 기계에 튜브를 꽂고 “Resume” 아이콘을 눌러 반응을 진행시킨다.
- ⑦ PCR 반응이 종료되면 1% Agarose gel 에서 전기영동을 실시하여 PCR 증폭산물의 유무, 정확한 증폭산물의 크기, 증폭산물의 양 등을 GelDoc 를 이용하여 확인하여 PCR 반응의 성공 여부를 판단한다.
- ⑧ AccuPrep PCR Purification Kit (Bioneer)를 이용하여 PCR 증폭산물을 정제한다.
- ⑨ 1% Agarose gel 에서 전기영동하여 정제된 PCR 증폭산물을 최종 확인하고 GelDoc 을 이용해 이미지를 촬영한다.

Table 5. Genetic analysis information and PCR primer information

Species	Target Region	Primer Combination
<i>Amphidinium carterae</i>	LSU rDNA	LSU D1R-SU D3B
		LSU D1R-8S-1483R
<i>Amphidinium</i> KMMCC-550	LSU rDNA	LSU D1R-SU D3B
		LSU D1R-8S-1483R
<i>Amphidinium</i> KMMCC-551	LSU rDNA	LSU D1R-SU D3B
		LSU D1R-8S-1483R
<i>Amphidinium</i> KMMCC-553	LSU rDNA	LSU D1R-SU D3B
		LSU D1R-8S-1483R
<i>Amphidinium</i> KMMCC-578	LSU rDNA	LSU D1R-SU D3B
		LSU D1R-8S-1483R
<i>Amphidinium</i> KMMCC-1506	LSU rDNA	LSU D1R-SU D3B
		LSU D1R-8S-1483R

Table 6. PCR information for gene analysis

	Temperature	Time	Cycle
Initial denaturation	95°C	3 min	1
Cycling	94°C	30 s	35
	55°C	2 min	
	72°C	2 min	
Final elongation	72°C	7 min	1
Storage	4°C	∞	



2. 2. 3. 염기서열 정보 정렬 및 계통수 작성

염기서열 정보 정렬 및 계통수를 작성하기 위해 분석된 염기서열 정보를 Macrogen Online Sequencing Order System에서 내려받아 Biological Sequence Alignment Editor (BioEdit) v7.2 프로그램 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)을 이용하여 각 Strain의 염기서열 정보의 Contig를 만들었다. NCBI BLAST Search (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)를 이용하여 등록된 종과 유사도를 비교하였다. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) v5.2 프로그램 (<http://www.megasoftware.net/>)을 이용하여 계통수를 작성하였다.



2. 3. *Amphidinium carterae*의 대량 배양

2. 3. 1. 수류발생형 수조 배양법을 통한 대량 배양

Amphidinium strain 배양조건 확립 실험의 결과를 바탕으로 F/2배지를 이용하여 *Amphidinium* strain을 배양하였다. 배양 규모는 원종 strain → Cell culture flask (30 mL) → Culture flask (100 mL) → Culture flask (500 mL) → 수류발생형 수조 (20 L) → 수류 발생형 수조 (500 L)로 순차적인 배양 규모 증가를 수행하였다(그림 12). 규모가 큰 수조로 갈수록 배양된 원종의 양을 늘려 접종하였다.

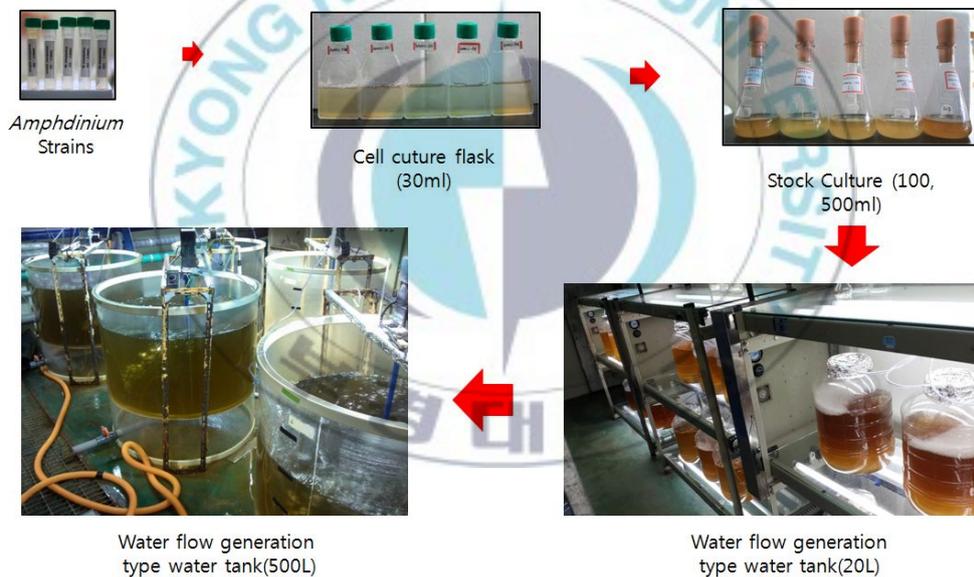


Fig. 1. Culture steps of *Amphidinium carterae*.

2. 4. *Amphidinium carterae*의 분석시료 확보

20L 규모 이상으로 배양된 *Amphidinium carterae*를 한외여과막장치(Synopex membrane filter)를 이용하여 1차 농축을 한 후 원심분리기(Hanil MF600, 1800 rpm, 20 min)를 이용하여 최종적으로 농축하였다.

대수 성장기의 *Amphidinium carterae*를 농축 하였고, 수확 당시 밀도는 평균 187×10^4 cells/mL이었다. 1차 농축과정에서 한외여과막 장치를 이용하여 *Amphidinium carterae*의 배양액을 1/20로 농축하게된다. 그 후 원심분리기를 이용하여 해수를 제거하고 *Amphidinium carterae*의 분석시료를 확보하였다.



2. 5. *Amphidinium carterae*로부터 유용물질 추출

2. 5. 1. 추출 방법

① MeOH 추출

분석시료 100 g 당 HPLC용 MeOH(HPLC grade, J.T Baker) 2 L 를 이용하여 용해 한 후 Ultra sonification (SONOREX SUPER - RK106, Bandelin)으로 60분 동안 추출하였다. 추출 후 Filter paper(TY2-110, ADVANTEC)를 이용하여 Residue를 걸러 냈다. 걸러 낸 Residue는 MeOH 1 L를 이용하여 용해 한 후 Ultra sonification으로 60분 동안 추출하였다. 추출 후 Filter paper를 이용하여 Residue를 1회 더 걸러냈다. 최종적으로 MeOH 추출물은 진공감압농축기(Rotavapor R-114, BUCHI)를 이용하여 MeOH을 제거하였다.

② CHCl₃ 추출

MeOH extraction 과정을 거친 분석 시료는 40 % MeOH 200 mL 에 용해 한 후 CHCl₃(HPLC grade, J.T Baker) 200 mL와 1:1로 반응 시킨다. 그 후 40 % MeOH과 CHCl₃을 분획시키기 1 L 분별 깔때기를 사용하여 2시간 이상 방치하였다. 1차 분획 후 40 % MeOH는 1 회 더 CHCl₃ 100 mL에 반응 시킨 후 분별 깔때기를 이용하여 분획 하였다. 마지막으로 40 % MeOH층은 진공감압농축기를 이용하여 MeOH과 H₂O를 제거하였다.

③ BuOH 추출

CHCl₃ extraction 과정을 거친 분석 시료는 BuOH(HPLC grade, J.T Baker) 100 mL에 용해 한 후 Water(HPLC grade, J.T Baker) 100 mL를 1:1로 반응 시켰다. 그 후 BuOH과 Water를 분획시키기 위해 500 mL 분별 깔때기를 사용하여 2시간 이상 방치 하였다. 1차 분획 후 Water층은 1회 더 BuOH 80 mL에 반응 시킨 후 분별 깔때기를 이용하여 분획 하였다. 마지막으로 BuOH층은 진공감압농축기를 이용하여 BuOH과 H₂O를 제거하였다.

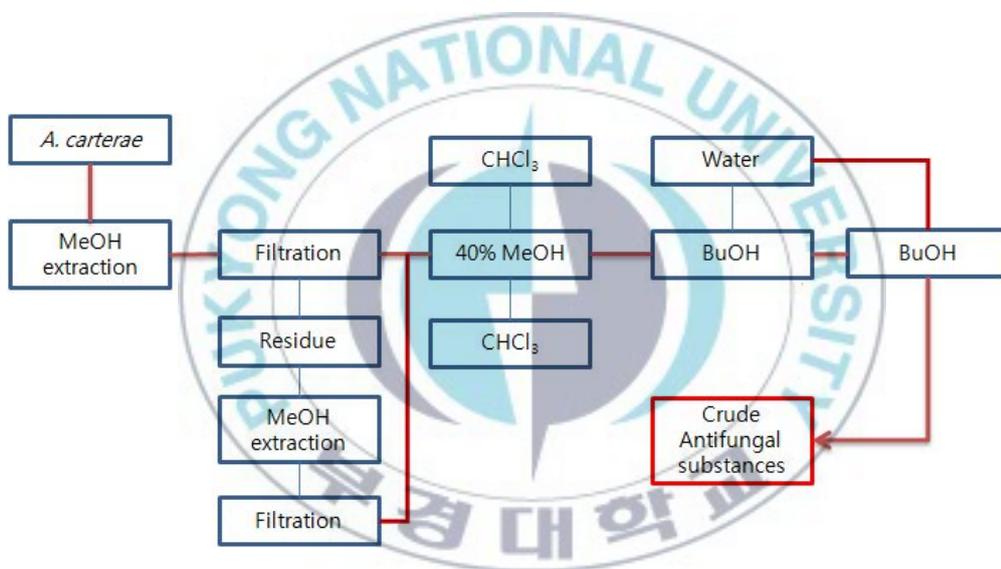


Fig. 2. Diagram of extraction steps.

2. 5. 2. 정제 방법

① ODS-Q3 column processes

BuOH extraction 과정을 거친 분석 시료는 ODS-Q3 column(1 × 25 cm)을 이용하여 MeOH(HPLC grade) 용매 농도에 따라 정제 하였다. MeOH 용매 각각의 농도는 60 %, 85 %, 100 %이며, 먼저 100 % MeOH를 이용하여 ODS-Q3 column을 1시간 동안 씻어 내렸다. 그 후 ODS-Q3 column에 60% MeOH를 100 mL 흘려 주어 ODS-Q3 column을 60 % MeOH로 환원 시켰다. ODS-Q3 column에 시료를 주입하고 60 %, 85 %, 100 % MeOH 50 mL 씩 흘려주어 각각의 Sample을 채집 하였다. 마지막으로 각각의 Sample은 Paper disk Method를 이용하여 항곰팡이성을 확인하였다. 여기서 Paper disk Method에 사용된 곰팡이는 *Aspergillus niger*를 사용하였다.

② LH-20 column processes

ODS-Q3 column을 통해 항곰팡이성이 확인 된 분석 시료를 LH-20 column(1×50 cm)을 이용하여 정제하였다. 먼저 LH-20 column을 100 % MeOH를 이용하여 1시간 동안 씻어내렸다. 그 후 LH-20 column에 시료를 주입하고 270 nm의 파장으로 100 % MeOH(HPLC grade)를 0.4 mL/min로 흘려주어 각각의 Sample을 2 mL씩 채집 하였다. 각각의 Sample은 ODS-Q3 column processes와 마찬가지로 Paper disk Method를 이용하여 항곰팡이성을 확인하여 항곰팡이성이 존재하는 구간만을 선별하여 진공감압농축기를 이용하여 농축하였다.

③ RPAQUEOUS column treatment

LH-20 column을 통해 항곰팡이성이 확인된 분석 시료를 RPAQUEOUS column(1×25 cm)을 이용하여 정제하였다. 먼저 RPAQUEOUS column을 100 % MeOH를 이용하여 1시간 동안 씻어 내린다. RPAQUEOUS column에 시료를 주입하고 40℃, 270 nm의 파장으로 75% MeOH를 1.0 mL/min로 흘려주어 각 peak별로 Sample을 채집 하였다. 마지막으로 각각의 Sample은 Paper disk Method를 이용하여 항곰팡이성을 확인하여 최종적으로 순수한 물질을 정제하였다.

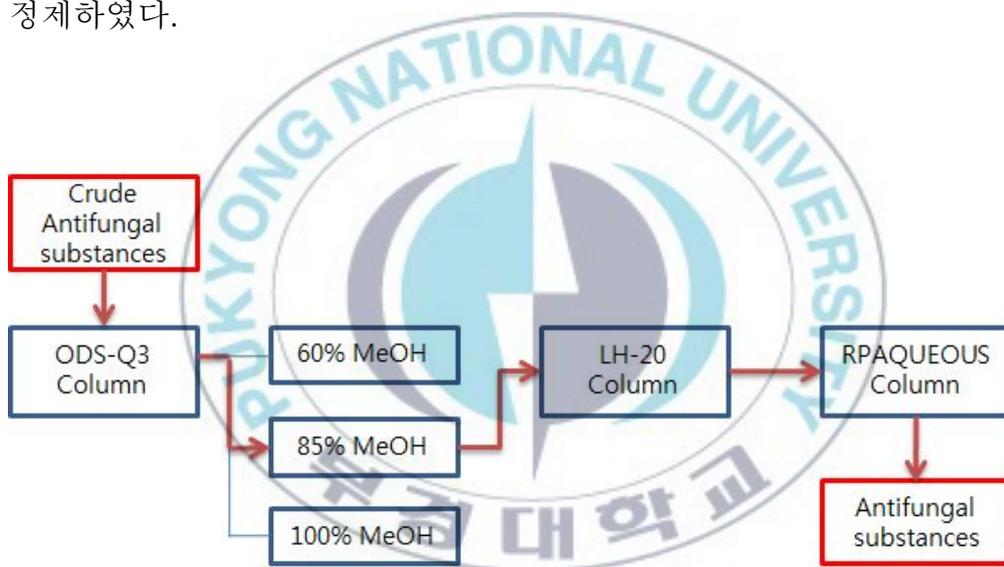


Fig. 3. Diagram of purification steps.

2. 6. *Amphidinium carterae*의 지방산 분석

지방산을 분석하기 위해 부경대학교 사료영양연구소에 분석의뢰 하였다. 시료 20 g에 클로로포름(2):메탄올(1) 혼합액 80 mL을 첨가한 후 혼합하였다. 그 후 냉장고 0~10℃에서 12시간 방치(암실)시킨 뒤 추출액을 분액여두로 옮기고 DW 50 mL을 넣어 균질 후 용매 층을 농축수기에 옮겨 40℃에서 감압농축하였다. 지방 25 mg을 유리튜브로 옮겨 담고 0.5 N 메탄올성 수산화나트륨을 1.5 mL를 가하고 질소충진하였다. 그 후 100℃에서 5분간 가온하고 냉각 후 14% BF₃ 2 mL를 첨가 후 혼합하여 100℃ 30분 가온하였다. 30℃로 냉각 후 헥산용액 1 mL을 첨가 후 질소충진 후 혼합하였다. 이 후 포화 염화나트륨용액 5 mL을 가하여 질소충진 후 방치하였다. 마지막으로 수층으로부터 분리된 헥산층을 무수황산나트륨으로 탈수하여 시험용액으로 사용하였다.

사용된 기기는 GC-FID <thermo/USA>이며 sp-2560(SUPELCO, 100 m×0.25 mm×0.2 μm) column을 사용하였다. 주입부 온도는 260℃이고 오븐 온도는 140℃에서 5분간 유지 후 3℃/min의 비율로 240℃까지 온도를 상승시키고 40분간 유지하였다. 검출기온도는 260℃이며, 유량은 질소 1.00 mL/min였다. F.A.M.E. Mix C4-C24 100 mg, Neat(SUPELCO) - 18919-1AMP를 STANDARD로 사용하였다.

3. 결과

3. 1. 배양조건 확립

3. 1. 1. 배지에 따른 성장률

Amphidinium spp.의 배지 별 성장률 비교하여 보면 f/2배지를 이용한 경우 5개의 strain에서 일일 성장률이 평균 0.41로 가장 높은 수치를 보였고, KW21배지는 일일 성장률이 평균 0.38로 f/2배지와 비교하여 낮은 수치를 보였다. 복합비료 배지는 f/2배지와 KW21배지보다 낮은 일일 성장률 평균값을 보였다.

KMMCC-553의 경우 f/2배지와 KW21배지의 성장률이 비슷하였다. 소규모 배양의 경우 일부 종에 따라 차이가 조금 있지만 F/2배지에서 배양할 때 가장 효율적이라 판단되며, 배양의 규모가 커질 경우 f/2배지의 대체 방안으로 KW21, 복합비료도 충분히 사용 가능할 것이라 판단된다.

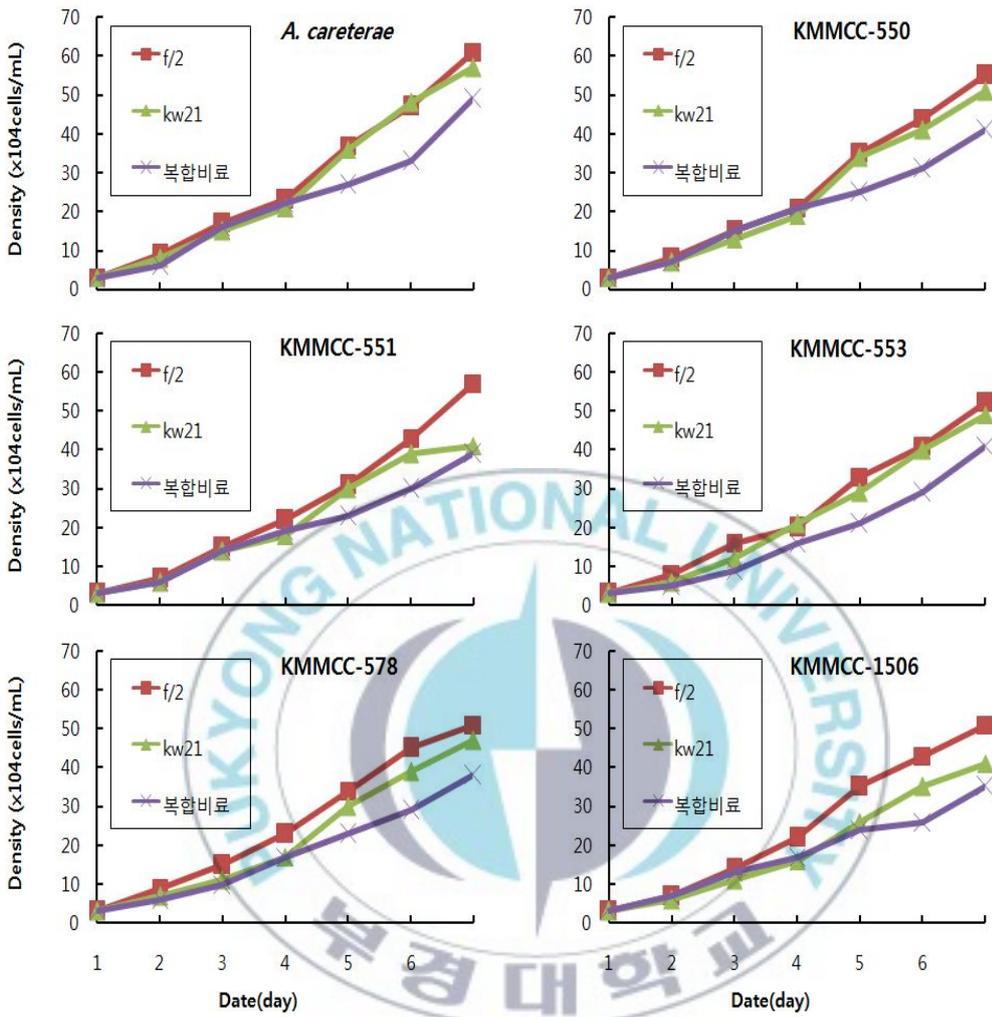


Fig. 4. Growth profiles of *Amphidinium* spp. in the various culture medium.

3. 1. 2. 배양 온도 및 염분에 따른 성장률

Amphidinium spp.의 온도 별 성장률을 비교하여 보면 25℃에서 성장이 가장 빠르고, 저온인 15℃에서는 성장이 정체된 모습을 확인 할 수 있었다. 30℃의 경우는 저온에 비하여 약간의 성장이 있었지만 고온에서의 지속적인 배양은 불가능한 것으로 보여진다. 20℃와 25℃에서 *Amphidinium* spp.의 대수기의 차이가 나는 것을 확인할 수 있었으며, KMMCC-550, KMMCC-553, KMMCC-1506의 경우 5일째에 가장 큰 폭의 성장률을 보였으며, KMMCC-551의 경우는 6일째 가장 큰 폭으로 성장하였다. *Amphidinium* spp.의 적온은 20~25℃임을 알 수 있다.

Amphidinium spp.의 염분별 성장률을 비교하여 보면 15‰에서 성장이 가장 느렸으며 33 ‰에서 성장이 가장 높았다. *Amphidinium* spp.은 자연 해수의 염분농도에서 가장 최적의 성장을 하며 저염분으로 갈수록 성장에 좋지 않은 영향을 주는 것을 확인하였다.

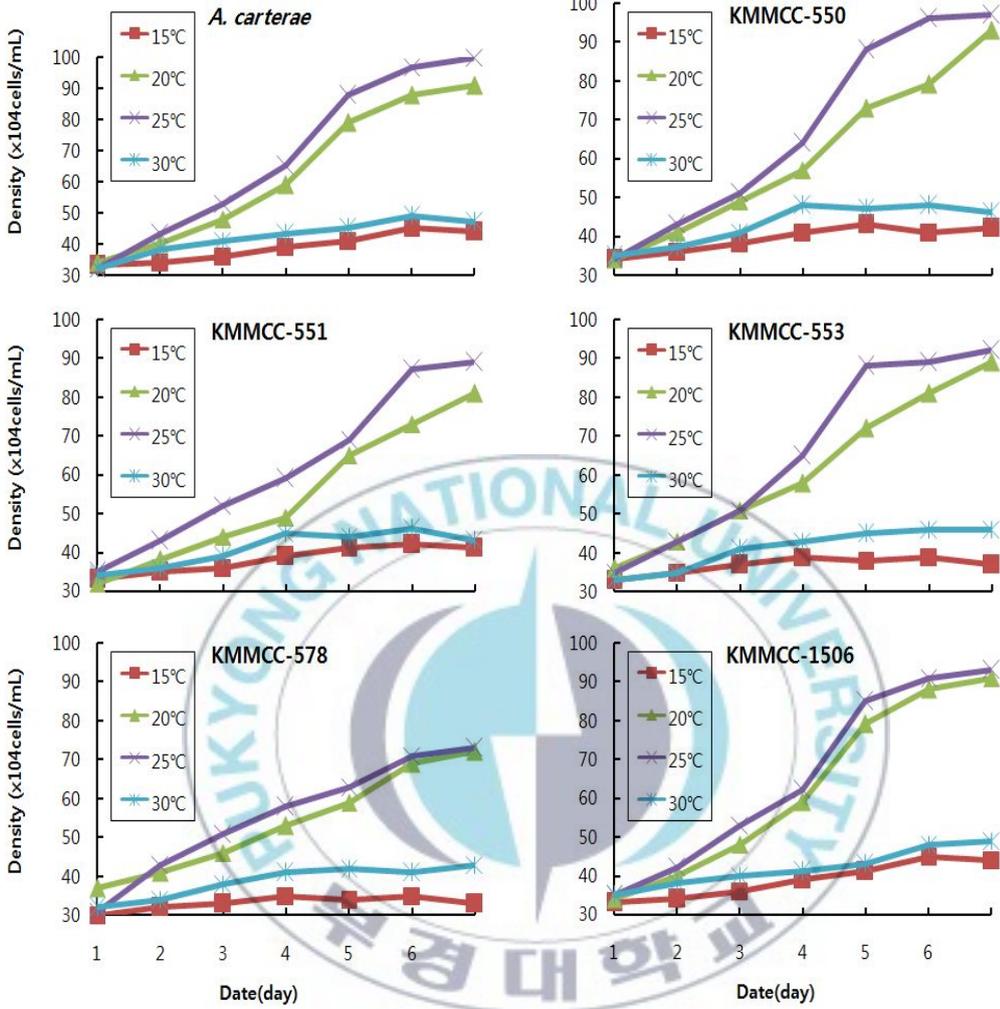


Fig. 5. Growth profiles of *Amphidinium* spp. in the various culture temperature.

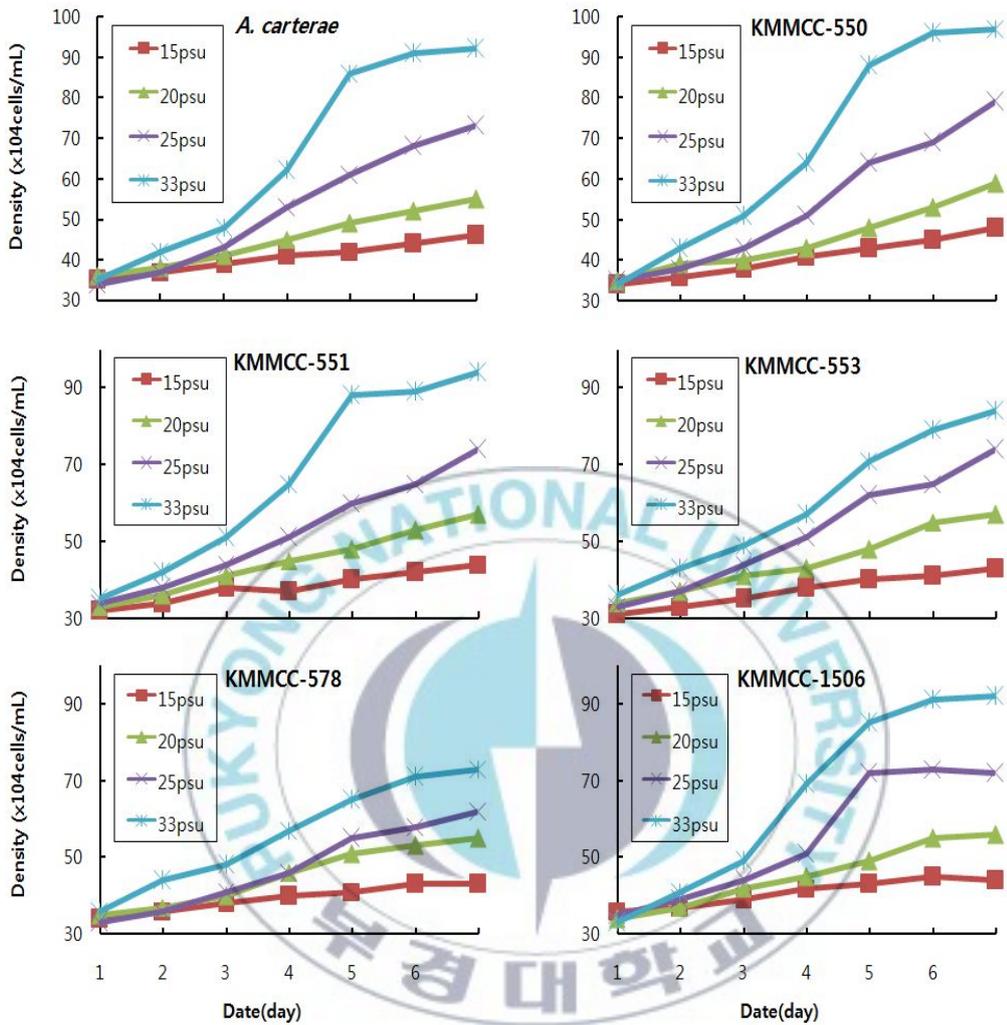
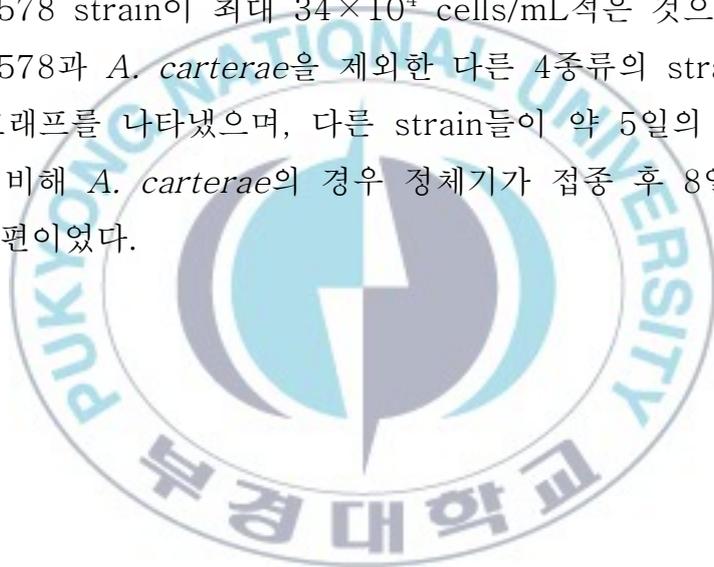


Fig. 6. Growth profiles of *Amphidinium* spp. in the various culture salinity.

3. 1. 3. Strain별 성장 그래프

각 *Amphidinium* strain들은 약 3일~8일 사이에 대수기 (Exponential phase)를 가지는 것으로 나타났고, 8일 ~ 12일 사이에 가장 높은 밀도를 나타내면서 정체기 (Stationary phase)를 나타내었다.

각 strain들의 성장 특성을 살펴보면 초기 접종량이 상대적으로 적긴 하지만 KMMCC-578 strain이 비교적 낮은 밀도를 나타냈으며, 비교적 높은 밀도를 나타낸 *A. carterae*와 비교하면 접종 후 10일 경과 시 KMMCC-578 strain이 최대 34×10^4 cells/mL 적은 것으로 나타났다. KMMCC-578과 *A. carterae*를 제외한 다른 4종류의 strain들은 비슷한 성장 그래프를 나타냈으며, 다른 strain들이 약 5일의 정체기를 가지는 것에 비해 *A. carterae*의 경우 정체기가 접종 후 8일~10일의 3일로 짧은 편이었다.



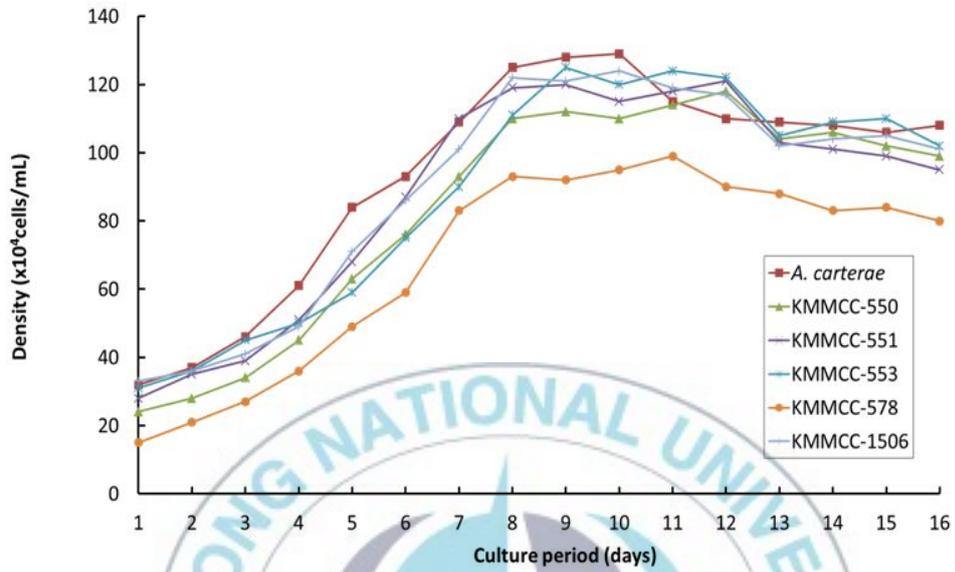


Fig. 7. Growth profiles of *Amphidinium* spp.

3. 2. 분자생물학적 동정

Amphidinium 6 개 Strains 를 LSU D1R 과 LSU D3B 의 Primer 조합을 이용하여 LSU rDNA 영역을 PCR 증폭하였다. 그 결과 *Amphidinium* 6 개 Strains 에도 모두 성공적으로 PCR 증폭이 이루어진 것으로 확인되었다.

LSU D1R 과 LSU D3B 의 Primer 조합에 의해 PCR 증폭된 *A. carterae* 의 염기서열은 총 807 bp 가 분석되었고 NCBI 에서 BLAST Search 를 실시한 결과, *A. carterae* SM10 (GenBank acc. no. AY460579), CCMP124 (AY460584)와 100 % 유사도를 보였다. LSU D1R 과 28S-1483R 의 Primer 조합에 의해 PCR 증폭된 나머지 *Amphidinium* 5 개 Strains 의 염기서열은 총 1268 bp 가 분석되었고 이들 모두 100% 유사도를 보였다.

분석된 *Amphidinium* 6 개 Strains 는 모두 *Amphidinium carterae* 와 함께 100 %의 Bootstrapping value 를 가지며 함께 분기하였다. 따라서 분석된 모든 *Amphidinium* Strains 는 *A. carterae* 로 밝혀졌다.



Fig. 8. Genomic DNA electrophoresis of *Amphidinium* strains.

Table 7. LSU rRNA primer information and PCR result of *Amphidinium* strains

No.	Strain No.	LSU D1R-LSU D3B	LSU D1R-8S-1483R
1	<i>Amphidinium carterae</i>	○	×
2	<i>Amphidinium</i> KMMCC-550	○	○
3	<i>Amphidinium</i> KMMCC-551	○	○
4	<i>Amphidinium</i> KMMCC-553	○	○
5	<i>Amphidinium</i> KMMCC-578	○	○
6	<i>Amphidinium</i> KMMCC-1506	○	○

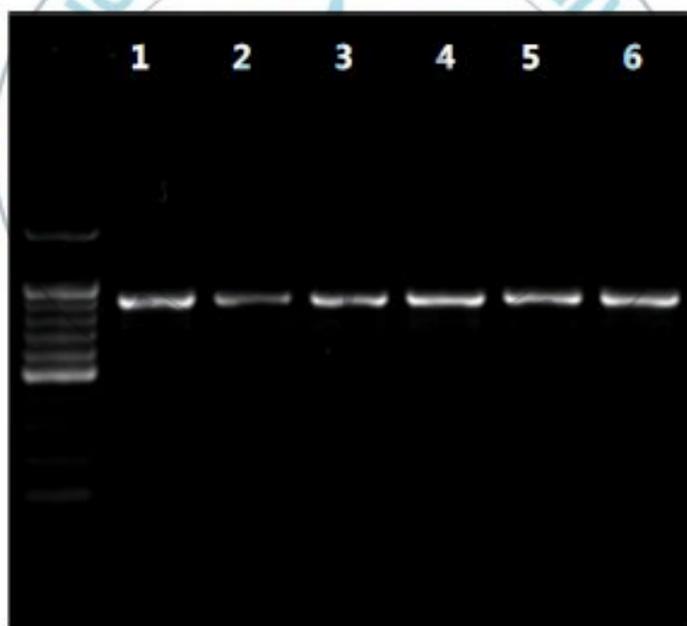


Fig. 9. LSU rDNA PCR result using LSU D1R and LSU D3B primer combination.

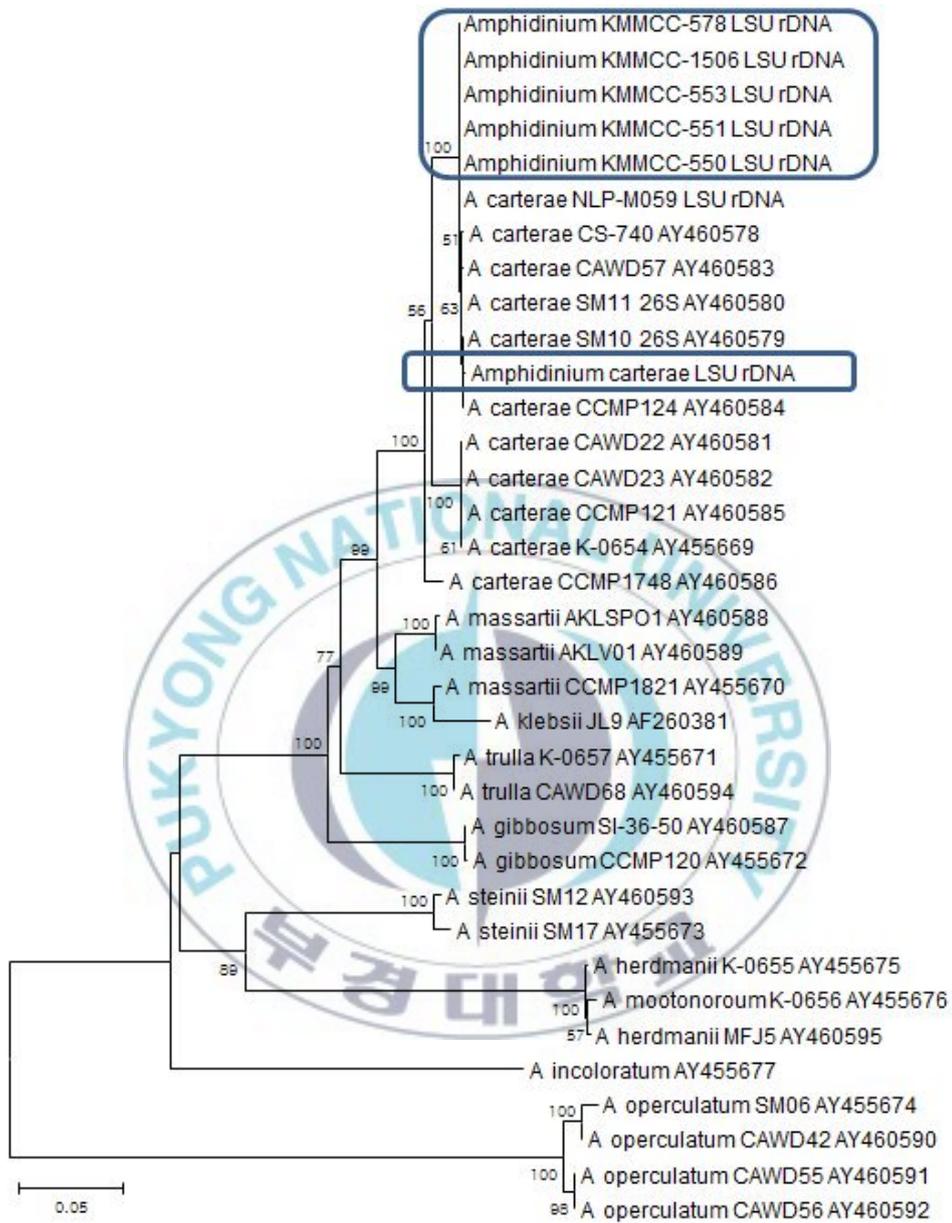


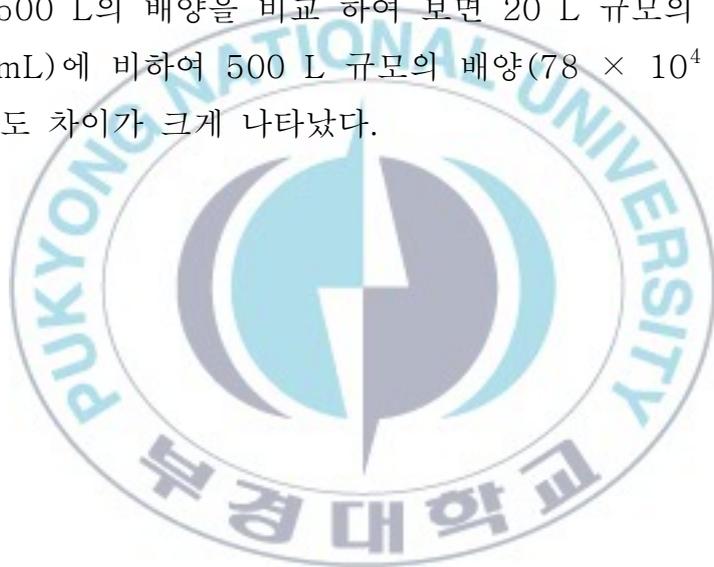
Fig. 10. Dendrogram of *Amphidinium* spp.

3. 3. *Amphidinium carterae*의 대량 배양

순차적 계대 배양 증진을 통해 원종에서 500 L 접종 까지 5주의 시간이 필요하였다. 20 L 규모 배양의 경우 초기 밀도는 50×10^4 cells/mL였고 최종적으로 187×10^4 cells/mL의 최대 밀도를 보였다. 14일간 배양을 기준으로 하여 0.70의 일간 성장률을 보였다.

500 L 규모 배양의 경우 초기 밀도는 15×10^4 cells/mL였고, 최종적으로 78×10^4 cells/mL의 최대 밀도를 보였다. 14일간 배양을 기준으로 하여 0.51의 일간 성장률을 보였다.

20 L와 500 L의 배양을 비교 하여 보면 20 L 규모의 배양(187×10^4 cells/mL)에 비하여 500 L 규모의 배양(78×10^4 cells/mL)에서 최종 밀도 차이가 크게 나타났다.



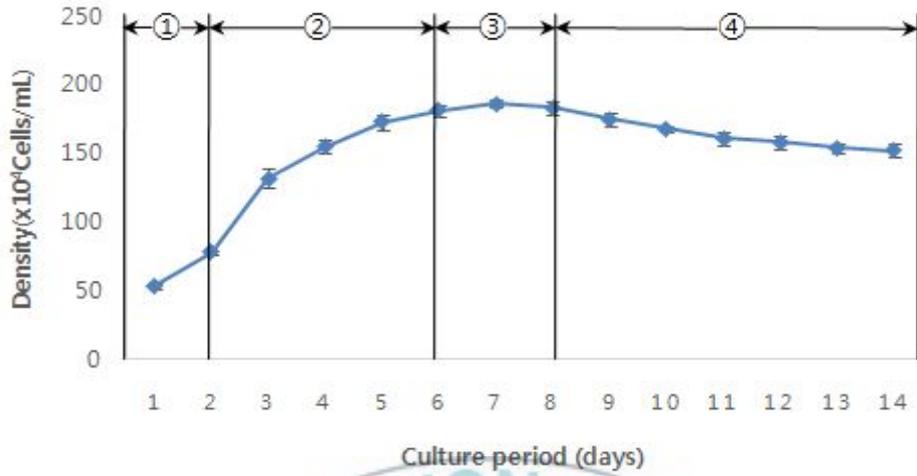


Fig. 11. *Amphidinium carterae* growth curve on 20 L culture volumn (① lag or induction phase ② exponential phase ③ stationary phase ④ death phase).

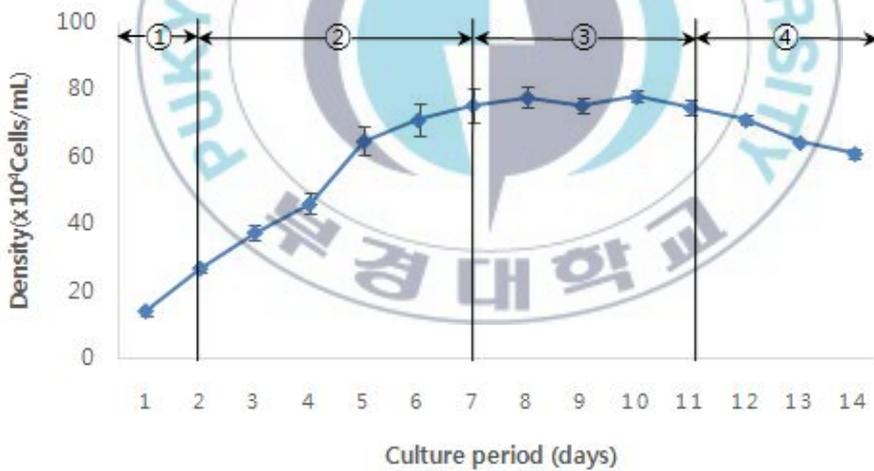


Fig. 12. *Amphidinium carterae* growth curve on 500 L culture volumn (① lag or induction phase ② exponential phase ③ stationary phase ④ death phase).

3. 4. *Amphidinium carterae*의 분석시료 확보 및 활성도 비교

한외여과막 장치를 이용하여 *Amphidinium carterae* 를 농축 한 결과 100 L의 배양액을 최대 5 L까지 농축 할 수 있었다. 그 후 수확 밀도 180×10^4 cells/mL이상일 때 원심 분리를 이용하여 최종적으로 해수를 제거하게 되면 1.08 ± 0.08 g/L의 분석 시료를 확보 할 수 있었다. 따라서 100 L당 약 100 g의 *Amphidinium carterae*의 분석 시료를 확보할 수 있었다.

Table 8. Amount of sample by culture volume of *Amphidinium carterae*

Culture(L)	112	60	96	112	112	192	192
<i>Amphidinium</i> wet weight(g)	110	29	101	121	105	221	229

Table 9. Compare antifungal activity of *Amphidinium* spp.

	<i>A. carterae</i>	KMMCC -550	KMMCC -551	KMMCC -553	KMMCC -578	KMMCC -1506
ODS-Q3(g)	0.1325	0.1224	0.1289	0.1167	0.1287	0.1089
Antifungal activity	++	++	++	++	+	+



Fig. 13. Concentration of *A. carterae*.



Fig. 14. Sample of *A. carterae*.

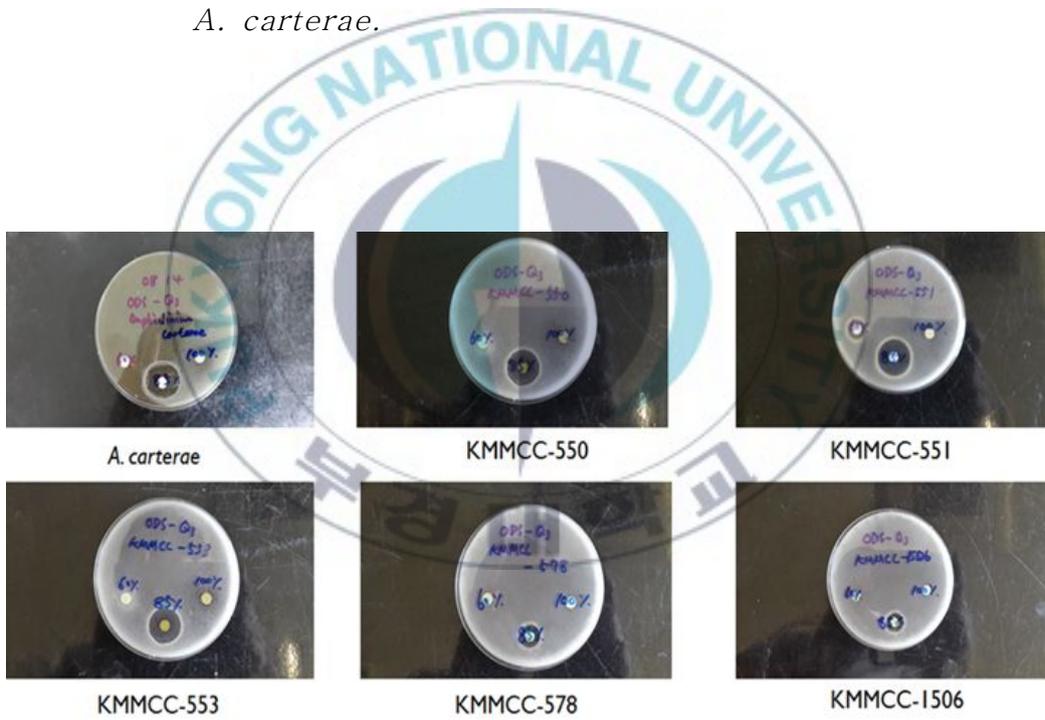


Fig. 15. Antifungal activity of *Amphidinium* spp.

3. 5. Amphidinium carterae로부터 유용물질 추출

ODS-Q3 column processes 결과 60 % MeOH 부분과 100% MeOH 부분에서는 항곰팡이성 활성이 나타나지 않았고 85% MeOH 부분에서 항곰팡이성 활성이 나타났다.

LH-20 column processes 결과 3~7번째 sample에서 항곰팡이성 활성을 확인 할 수 있었고 그 외 나머지 부분에서는 확인 할 수 없었다. 항곰팡이성 활성은 시료의 주입양에 따라 활성도의 크기나 sample의 수에 변화가 있었고, 실험에서 항곰팡이성 활성을 보이는 sample은 10번째 이전의 앞쪽에서 획득할 수 있었다.

RPAQUEOUS column treatment 결과 시간에 따라 아주 많은 종류의 peak가 관찰 되었다. 가장 큰 두 개의 peak에서 항곰팡이성 활성이 관찰 되었다. 그 외의 peak에서는 항곰팡이성 활성이 관찰 되지 않았다.

LH-20 column정제 과정에서는 2.0737 mg/L의 crude한 Amphidinol 물질을 얻을 수 있었고, RPAQUEOUS column정제 과정을 통해 0.2655 mg/L(두 종류의 항곰팡이성 물질)의 순수한 항곰팡이성 물질을 얻을 수 있었다.



Fig. 16. Antifungal test through ODS-Q3 Column.

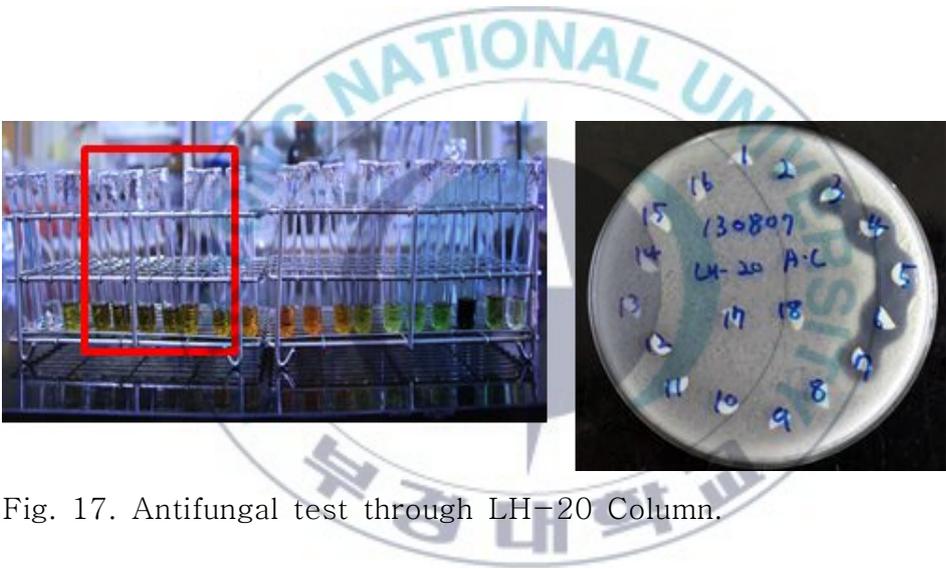


Fig. 17. Antifungal test through LH-20 Column.

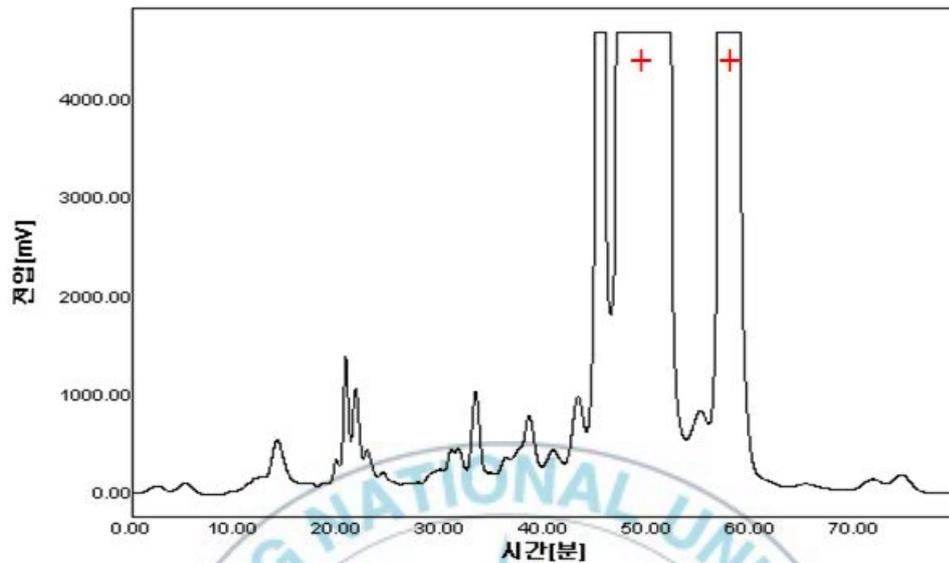


Fig. 18. RPAQUEOUS Column result(+: antifungal activity).

Table 10. Comparison of antifungal substances volume of *Amphidinium carterae*

Culture (L)	<i>Amphidinium</i> wet weight (g)	LH-20 (mg)	RPAQUEOUS (mg)
112	110	154.7	1: 21.4 2: 4.7
60	29	35.2	
96	101	100.6	
112	121	124.3	
112	105	937.0	
192	221	232.3	
192	229	232.5	1: 44.3 2: 10.3

3. 6. *Amphidinium carterae*의 지방산 분석

*Amphidinium carterae*의 지방산 분석 결과 23가지의 지방산 성분이 분석 되었으며, 그 중 Butric acid와 Palmitic acid, Behenic acid가 가장 많이 함유 되어 있었다. Butric acid의 경우 22.15%, Palmitic acid의 경우 22.50%, Behenic acid가 13.26% 였다. 그 외 cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid 17.38%, cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid 13.91% 로 많은 양을 함유 하고 있었다.



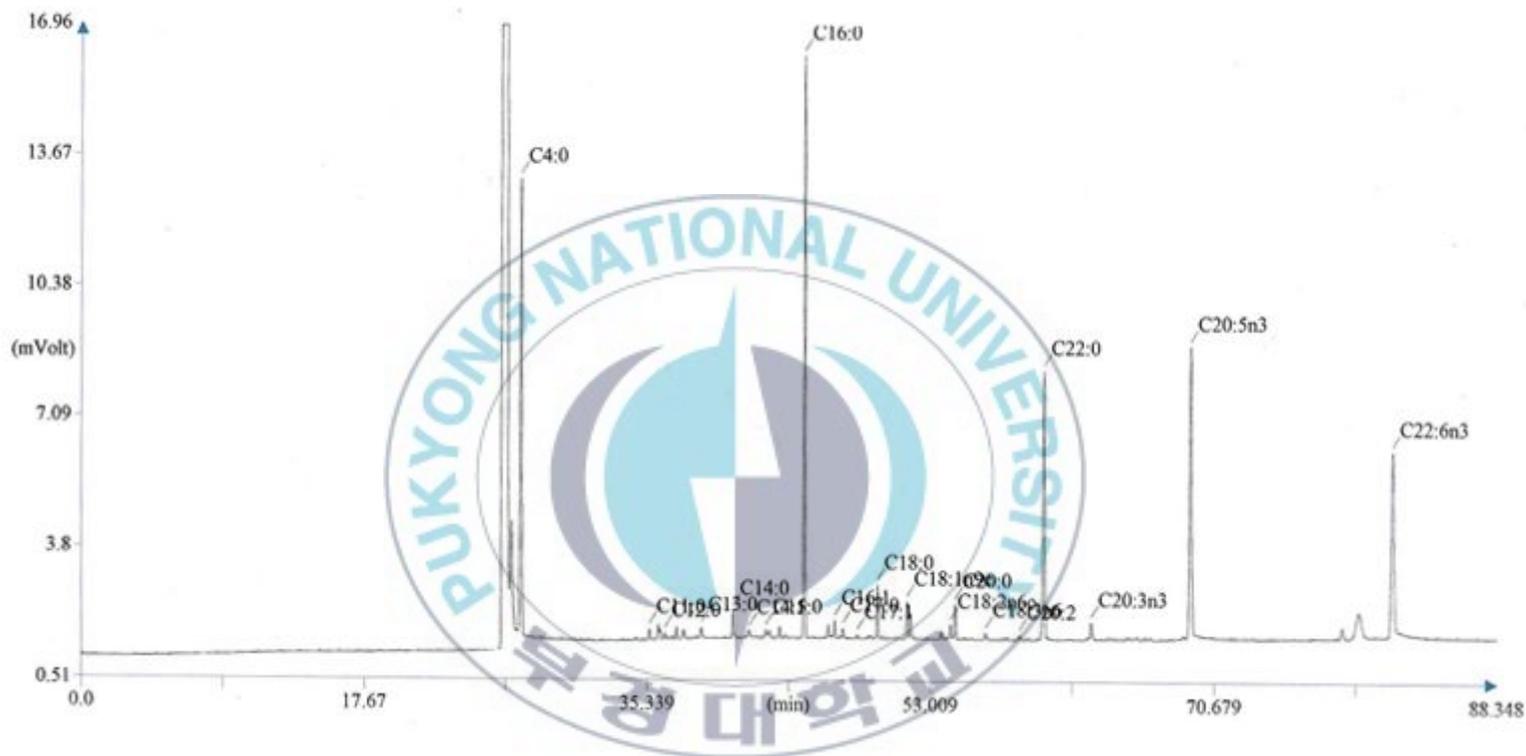


Fig. 19. Fatty acid analysis of *Amphidinium carterae*(GC).

Table 11. Fatty acid analysis of *Amphidinium carterae*

Analysis	AVG.	S.D
ButyricacidC _{4:0}	22.15	0.84
UndecanoicacidC _{11:0}	0.31	0.05
LauricacidC _{12:0}	0.15	0.02
TridecanoicacidC _{13:0}	0.46	0.02
MyristicacidC _{14:0}	1.02	0.14
MyristoleicacidC _{14:1}	0.46	0.09
PentadecanoicacidC _{15:0}	0.29	0.01
cis-10-PentadecenoicacidC _{15:1}	0.00	0.00
PalmiticacidC _{16:0}	22.50	0.47
PalmitoleicacidC _{16:1}	0.68	0.04
MargaricacidC _{17:0}	0.36	0.01
MargaroleicacidC _{17:1}	0.13	0.01
StearicacidC _{18:0}	1.96	0.10
OleicacidC _{18:1n9c}	1.47	0.05
LinoleicacidC _{18:2n6c}	0.63	0.01
ArachidicacidC _{20:0}	1.50	0.01
γ-LinolenicacidC _{18:3n6,9,12c}	0.29	0.02
LinolenicacidC _{18:3n9,12,15c}	0.10	0.15
cis-11,14-EicosadienoicAcidC _{20:2}	0.10	0.14
BehenicacidC _{22:0}	13.26	0.38
cis-11,14,17-EicosatrienoicacidC _{20:3n3}	0.83	0.01
cis-13,16-Docosadienoic acid C _{22:2}	0.07	0.09
cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoicacid (EPA)C _{20:5n3}	17.38	0.07
cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid (DHA) C _{22:6n3}	13.91	0.33
TOTAL (%)	100.00	

4. 고 찰

현재 해양미세조류에 관한 관심이 증가되고 있는데, 그 중 가장 주목 받고 있는 분야는 미세조류를 이용한 바이오 디젤이다. 그 다음으로 미세조류를 이용한 생리활성물질에 관한 연구가 미국과 일본에서 주로 진행되고 있으며 그 중 *Amphidinium*종으로부터 Amphidinol과 Amphidinolide가 이해 해당된다.

Amphidinol과 Amphidinolide로 주목 받고 있는 *Amphidinium*에 관해 본 연구에서 *Amphidinium carterae*라는 한 종을 대상으로 조그만 Flask 규모의 배양에서부터 20 L, 500 L까지 대량배양연구를 수행하였다. 해양 미세조류 은행으로부터 분양 받은 *Amphidinium* 속인 3종이 똑같은 *A. carterae*로 결정되어 다양한 *Amphidinium* spp.의 배양에 대한 연구를 수행할 수는 없었다.

Amphidinium spp.의 대량 배양시 f/2배지의 대체 방안으로 KW21과 복합비료 또한 충분히 가능하다고 생각된다. *Amphidinium* spp.의 경우 다른 일반적인 미세조류의 배양과 비슷한 조건인 20~ 25°C, 33‰에서 성장이 가능함을 알 수 있었다. 소규모 Flask배양의 경우 20L의 수류 발생형 수조에서의 일일 성장률 0.70과 비교하여 일일 성장률이 0.41로 많이 낮았다. 그리고 약 3일 ~ 8일 사이에 대수기(Exponential phase)를 가지는 것으로 나타났고, 8일 ~ 12일 사이에 가장 높은 밀도를 나타내면서 정체기(Stationary phase)를 이는 20 L 규모 배양이나 500 L 규모 배양과 동일하게 나타났다. 그러므로 계대 배양이나 분석 시료 확보를 위한 샘플링 시기는 약 7일이 경과하였을 때인 대수기에 하는 것이 좋다고 판단된다.

같은 *A. carterae*로 분자생물학적으로 밝혀졌지만 기존에 서식했던 장소가 다르기 때문에 각 *Amphidinium* strain 마다 성장 추이가 달랐

고 20 L 규모 이상 대량 배양시 *A. carterae*와 KMMCC-1506을 제외하고 제대로 된 밀도를 얻지 못하여 배양에 실패 하였다.

*A. carterae*의 분석시료를 확보 하는데 있어 많은 어려움이 있었다. 초기에 제대로 된 농축 시스템이 설비가 되지 않아 대형 원심분리기를 사용하였는데 농축 효율이 너무 좋지 않았다. 이 후 한외여과막 시스템 도입으로 분석시료를 확보하는데 있어 효율이 증가하였다. 20 L 규모에서 최대 밀도로 배양 되었을 경우(187×10^4 cells/mL) 1 L당 약 1 g의 분석 시료를 확보 할 수 있었다. 비록 500 L 규모 배양의 경우 최대 밀도(78×10^4 cells/mL)는 많이 낮지만 분석 시료를 확보 하는데 있어 대량 농축 시스템 설비가 된다면 충분히 배양할 가치가 있다고 판단된다.

유용물질을 추출에 관한 결과를 보면 ODS-Q3 column 과정에서는 85% MeOH에 항곰팡이성 물질이 용해되어 분리 되었고, LH-20 column 과정에서는 column을 통과한 초기 분리 물질에서 항곰팡이성 물질이 분리 되었다. 반복되는 실험 중에 ODS-Q3 column 과정이나 LH-20 column 과정에서 항곰팡이성을 가지고 있는 각 sample 마다 발색이 매번 달랐다. 이는 초기 추출과정이나 추출하는 분석 시료의 양에 따라 조금씩 발색이 바뀌지 않을까 생각된다. 최종적으로 RPAQUEOUS column을 통해 0.2655 mg/L를 얻을 수 있었는데, 이는 120 L의 배양된 *A. carterae*로부터 Amphidinol 7을 분리하여 0.1733 mg/L를 추출한 결과(Reiko Echigoya et al., 2003)와 비교하면 0.0921 mg/L 많은 수준이며, 440L의 배양된 *A. klebsii*로부터 전체 Amphidinol 0.1011 mg/L를 추출한 결과(Gopal K. Paul et al., 1995)보다 0.1643 mg/L 많은 훨씬 높은 수준이다.

본 연구에서 *Amphidinium carterae*의 20 L 규모와 500 L 규모의 대량배양에 성공하였고, 대량 배양을 통해 항곰팡이성을 가지는 물질을

순수 분리 하였다. 현재까지 *Amphidinium* spp.로부터 항곰팡이성을 가지고 있는 물질은 Amphidinol로 확인 되어 지고 있는데, 본 연구에서 분리한 물질이 Amphidinol이라고 확신 할 수는 없지만 후에 MS와 NMR 분석을 통해 구조를 밝혀내야 할 것이다.



5. 요약

해양미세조류 중 와편모조류(dinoflagellates)로부터 분리 보고된 물질이 항진균제 및 항암제 그리고 AIDS와 관련된 질병치료에 적용하는 연구가 진행 중에 있다. 이는 와편모조류가 다양한 천연 신소재의 보고로 가장 주목받는 해양자원 중의 하나로 볼 수 있다.

본 연구에서는 와편모 조류중 하나인 *Amphidinium carterae*를 대상으로 실험을 진행 하였다. 국가지정 연구소 소재 은행인 해양 미세조류은행(KMMCC)에서 보유하고 있는 해수산 *Amphidinium* 속인 *A. carterae* 2strain과 *Amphidinium* 속 3 strain으로 총 5개의 strain을 분양 받았다. 확보한 *Amphidinium* strain들을 Genomic DNA 추출과 LSU rDNA 영역의 pcr 반응 수행 후 염기서열 정보 분석한 결과 모두 *Amphidinium carterae*로 확인되었다.

Amphidinium 의 최적 배양조건 확립을 위해 최적 배양배지, 배양온도, 배양배지의 염분도를 조사하였다. 일일성장률은 f/2 배지를 사용한 실험구간에서 평균 0.41로 KW21 배지의 0.38 그리고 복합비료의 0.36보다 높게 나타났다. 배양 온도는 20~25℃에서 성장이 가장 빨랐다. 염분도는 33 psu에서 가장 높은 성장률을 나타내었다. 따라서 *Amphidinium* 의 최적 배양을 위해 20~25℃, 33 psu 그리고 f/2배지 조건을 유지하였다. 확립된 배양조건하에 각 strain 별 성장 그래프를 작성한 결과 가장 안정된 성장을 보인 종은 *A. carterae* 로 120×10^4 cells/mL 의 최대 밀도를 나타내었다.

많은 양의 분석 시료를 얻기 위해 대량배양 시스템 구축이 필수적인 요소이다. 고밀도 대량 배양을 위해 수류 발생형 수조를 사용 하여 배양하였다. 20 L 규모에서의 최대 밀도 187×10^4 cells/mL, 일간 성장률은 0.70 이었고, 500 L 규모에서는 75×10^4 cells/mL, 일간 성장

률은 0.51 이었다.

20L 규모에서 대수 성장기의 *Amphidinium carterae* 한외여과막장치를 이용하여 100 L를 5 L로 만들었다(1차 농축). 1차 농축된 시료를 원심분리(1800rpm, 20min)하여 최종적으로 1.08 ± 0.08 g/L 분석시료를 확보 할 수 있었다.

MeOH과 CHCl₃, BuOH을 이용하여 *Amphidinium*으로부터 분리하고자 하는 Amphidinol을 1차적으로 추출하였다. 60 %, 85 %, 100 %의 MeOH을 용매로 하여 ODS-Q3 column을 이용하여 분리하였고, Sephadex LH-20 column을 사용하여 정제했다. 마지막으로 항곰팡이성이 있는 분획을 RPAQUEOUS column을 사용하여 HPLC하였다. 정제 과정동안 항곰팡이성의 활성은 *Aspergillus niger* 곰팡이를 사용해 paper disk 방법으로 확인하였다.

*Amphidinium carterae*로부터 추출된 물질이 정확히 무엇인지 규명하기 위해 연구가 더 이루어 져야 할 것으로 판단되고, *A. carterae* 뿐만 아니라 다른 *Amphidinium* spp.에 관한 배양방법의 확립과 다른 추출물질에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다.

참 고 문 헌

Alejandro M.S. Mayer, et. al. (2009), Marine pharmacology in 2005-.6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action, ELSEVIER, Biochimica et Biophysica Acta 1790, 283-308

Antonio H. Daranas, Manuel Norte, Jose J. Fernandez (2001), Toxic marine microalgae, ELSEVIER, Toxicon 39: 1101-1132

Elisabete Barbarino, Sergio O. Lourenco (2005), An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro- and microalgae, Springer, Journal of Applied Phycology 17: 447-460

Gopal K. Paul, et. al. (1995), Isolation and Chemical Structure of Amphidinol 2, a Potent Hemolytic Compound from Marine Dinoflagellate *Amphidinium klebsii*, Pergamon, Tetrahedron Letters, Vol. 36, No. 35, pp. 6279-6282

Gopal K. Paul, et. al. (1995), Isolation and Chemical Structure

of Amphidinol 2, a Potent Hemolytic Compound from Marine Dinoflagellate *Amphidinium klebsii*, Pergamon, Tetrahedron Letters, Vol. 36, No. 35, pp. 6279–6282

Gopal K. Paul, et. al. (1996), Structure and membrane perturbation of amphidinol 3: strong antifungal metabolites produced by dinoflagellate, *Amphidinium klebsii*. In: Ysumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Eds.), Harmful and Toxic Algal Blooms, Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, pp. 503–506.

Gopal K. Paul, et. al. (1997), Chemical structures of amphidinols 5 and 6 isolated from marine dinoflagellate *Amphidinium klebsii* and their cholesterol-dependent membrane disruption. Springer. J Mar Biotechnol 5: 124–128

Houdai, T., Matsuoka, S., Murata, M., Satake, M., Ota, S., Oshima, Y., Rhodes, L., (2001). Acetate labeling patterns of dinoflagellate polyketides, amphidinol 2, 3 and 4. Tetrahedron 57: 5551–5555.

Ishibashi, M., Kobayashi, J., (1997). Amphidinolides: unique macrolide from marine dinoflagellates. Heterocycles 44: 543–572.

Jun'ichi Kobayashi and Masashi Tsuda (2004), Amphidinolides,

bioactive macrolides from symbiotic marine dinoflagellates, NPR, Nat. Prod. Rep., 21: 77–93

Kazuto Washida, et. al. (2006), Karatungiolis A and B, two novel antimicrobial polyol compounds, from the symbiotic marine dinoflagellate *Amphidinium* spp., Science direct, Tetrahedron Letters 47: 2521-2525

Loeblich III, A.R., (1975). A seawater medium for dinoflagellates and the nutrition of *Cachonia niei*. J. Phycol. 11: 80-86.

Marten Fl Jrgensen, Shauna Murray, Niels Daugbjerg (2004), *Amphidinium* REVISITED. I. REDEFINITION OF *Amphidinium* (DINOPHYCEAE) BASED ON CLADISTIC AND MOLECULAR PHYLOGENETIC ANALYSES, J. Phycol. 40: 351-365

Michio Murata, et. al. (1999), Absolute Configuration of Amphidinol 3, the First Complete Structure Determination from Amphidinol Homologues: Application of a New Configuration Analysis Based on Carbon–Hydrogen Spin–Coupling Constants, J. Am. Chem. Soc. 121: 870–871

Nagy Morsy, et. al. (2005), Isolation and structure elucidation of a new amphidinol with a truncated polyhydroxyl

chain from *Amphidinium klebsii*, Science direct, Tetrahedron 61: 8606-8610

Nagy Morsy, et. al. (2006), Structures of new amphidinols with truncated polyhydroxyl chain and their membrane-permeabilizing activities, Science direct, Bioorganic & Medicinal Chemistry 14: 6548-6554

Reiko Echigoya, et. al. (2005), The structures of five new antifungal and hemolytic amphidinol analogs from *Amphidinium carterae* collected in New Zealand, Science direct, Harmful Algae 4: 383-389

Ryan M. Van Wagoner, et. al. (2008), Isolation and characterization of karlotoxin 1, a new amphipathic toxin from *Karlodinium veneficum*, ELSEVIER, Tetrahedron Letters 49 6457-6461

Shin-Jong Huang, et. al. (2009), Carteraol E, a potent polyhydroxyl ichthyotoxin from the dinoflagellate *Amphidinium carterae*, ELSEVIER, Tetrahedron Letters 50: 2512-2515

Toshihiro Houdai, et. al. (2005), Hairpin conformation of amphidinols possibly accounting for potent membrane permeabilizing activities, Science direct, Tetrahedron

61: 2795–2802

Toshiyasu Inuzuka, et. al. (2012), Amdigenol A, a long carbon–backbone polyol compound, produced by the marine dinoflagellate *Amphidinium* spp. ELSEVIER, Tetrahedron Letters 53: 239–242

Xiao–Chun Huang, et. al. (2004), Lingshuiols A and B, two new polyhydroxy compounds from the Chinese marine dinoflagellate *Amphidinium* spp., Science direct, Tetrahedron Letters 45: 5501–5504

Xiao–Chun Huang, et. al. (2004), Lingshuiol, a novel polyhydroxyl compound with strongly cytotoxic activity from the marine dinoflagellate *Amphidinium* spp., Science direct, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 14: 3117–3120

Yanhui Meng, et. al. (2010), Structure and Biosynthesis of Amphidinol 17, a Hemolytic Compound from *Amphidinium carterae*, J. Nat. Prod. 73: 409–415

Yasumoto, T., Murata, M., (1993). Marine toxins. Chem. Rev. 93: 1897–1909.

DNA sequencing data of *Amphidinium* spp.

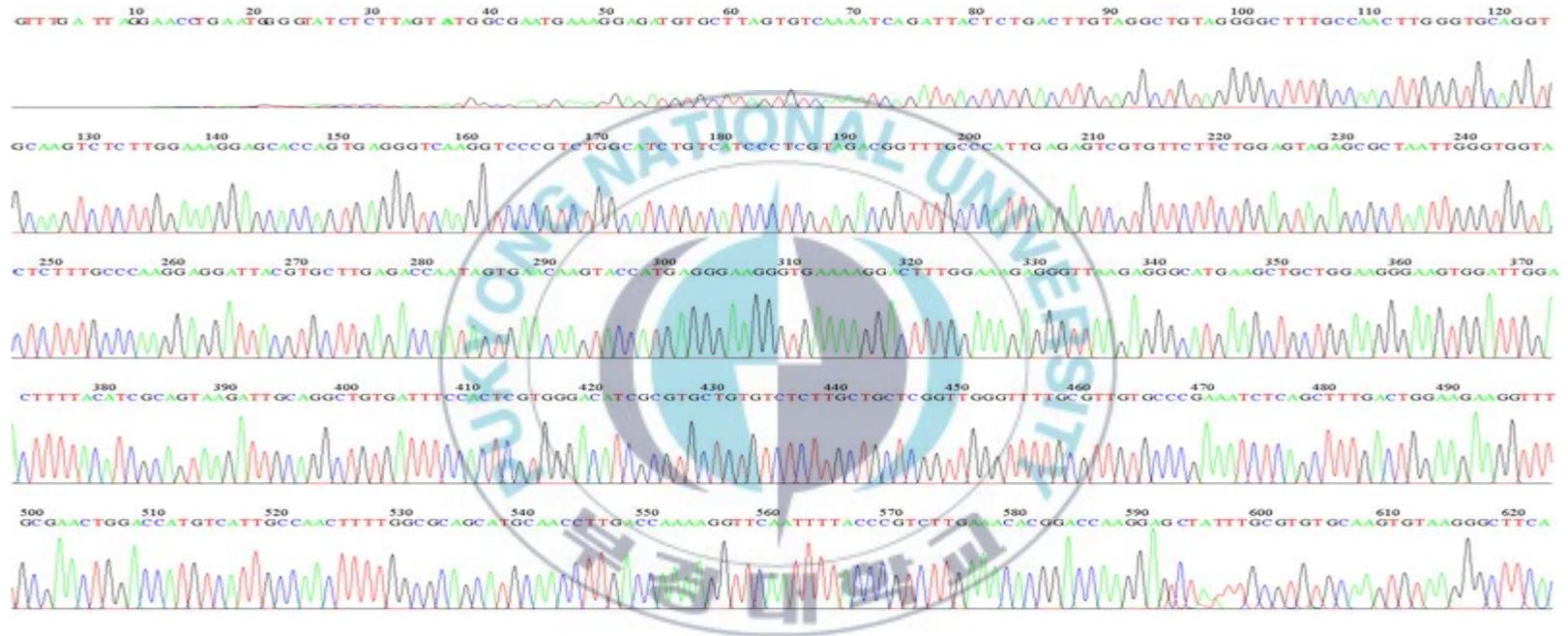


Fig. 20. *A. carterae* LSU D1R Sequence Data-1.

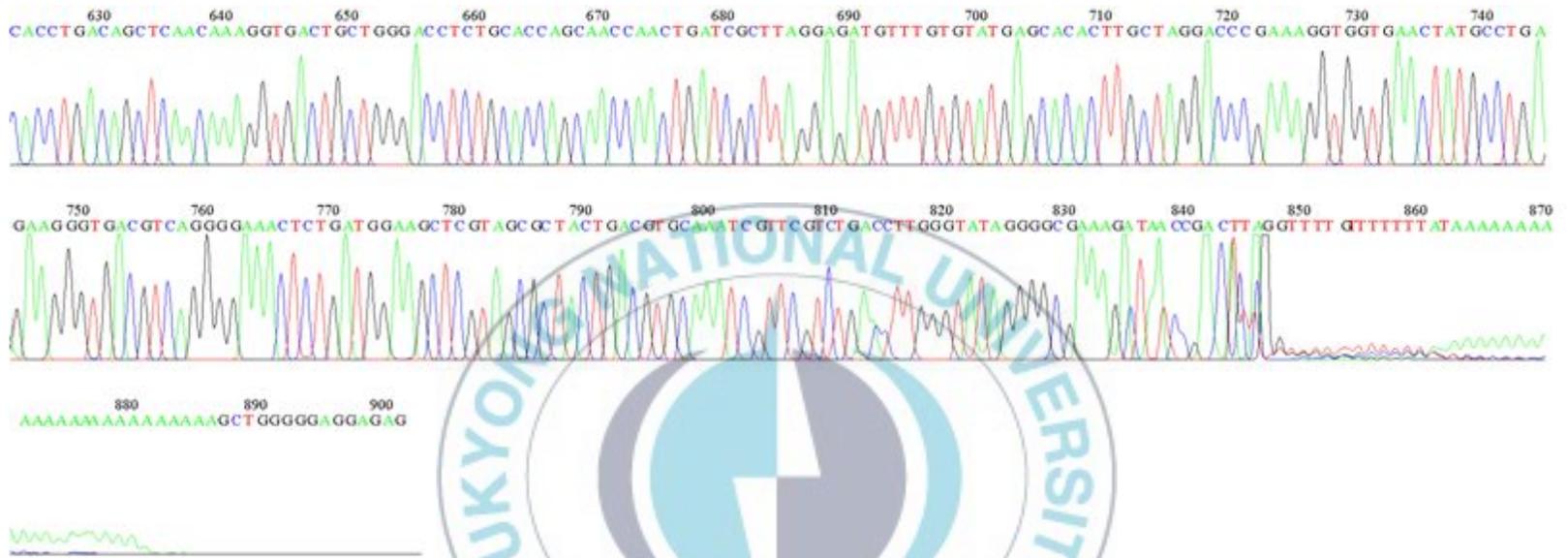


Fig. 21. *A. carterae* LSU D1R Sequence Data-2.

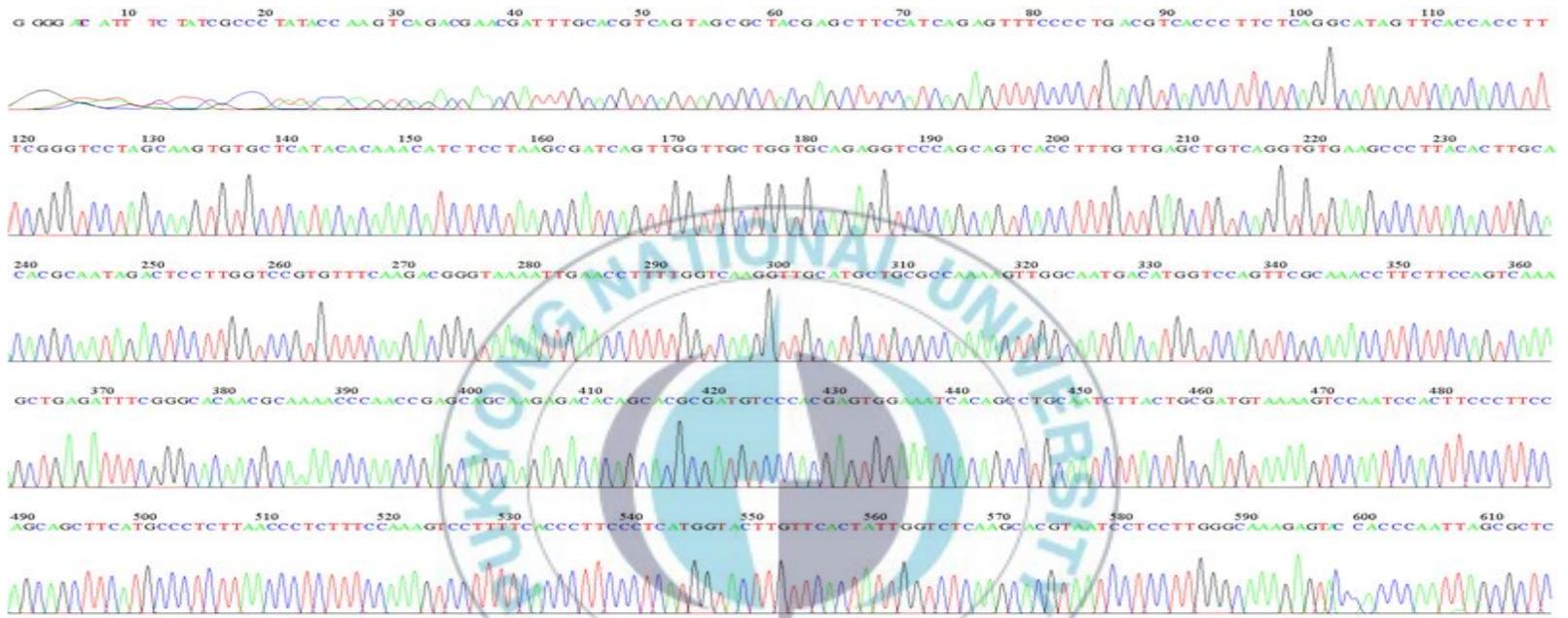


Fig. 22. *A. carterae* LSU D3B Sequence Data-1.

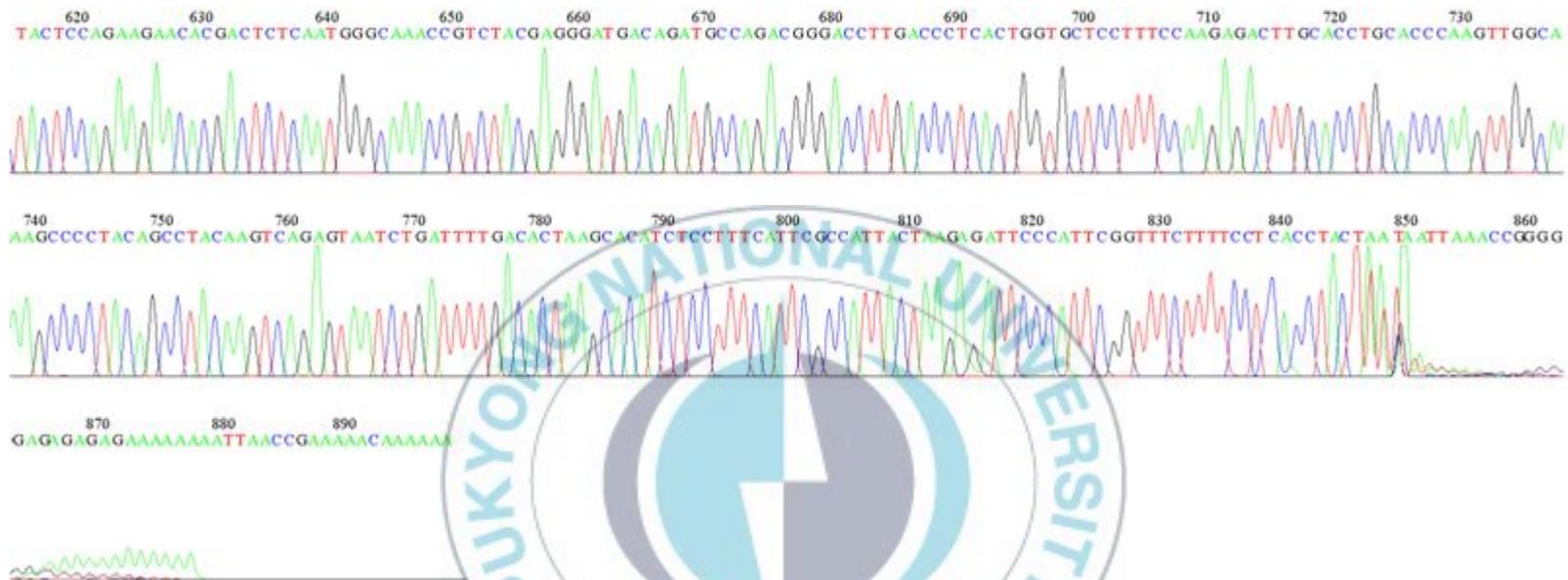


Fig. 23. *A. carterae* LSU D3B Sequence Data-2.



Fig. 24. KMMCC-550 LSU D1R Sequence Data-1.

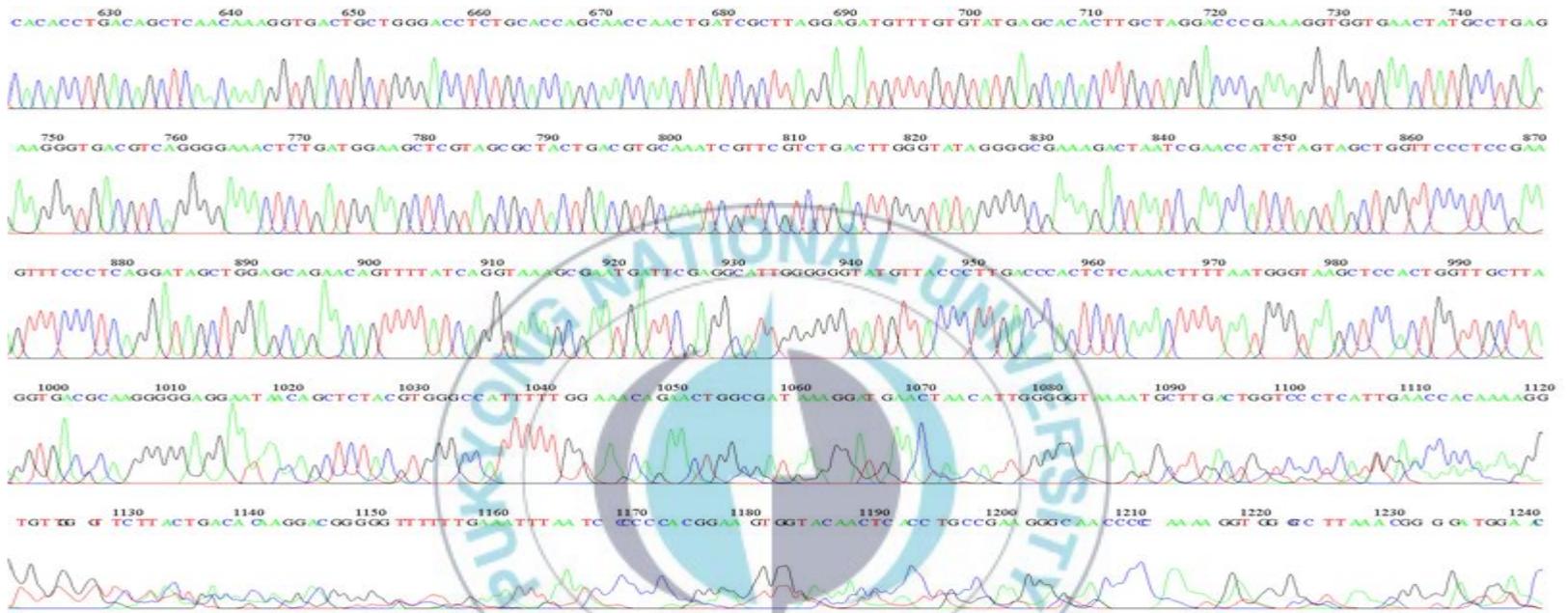


Fig. 25. KMMCC-550 LSU D1R Sequence Data-2.



Fig. 26. KMMCC-550 1483R Sequence Data-1.

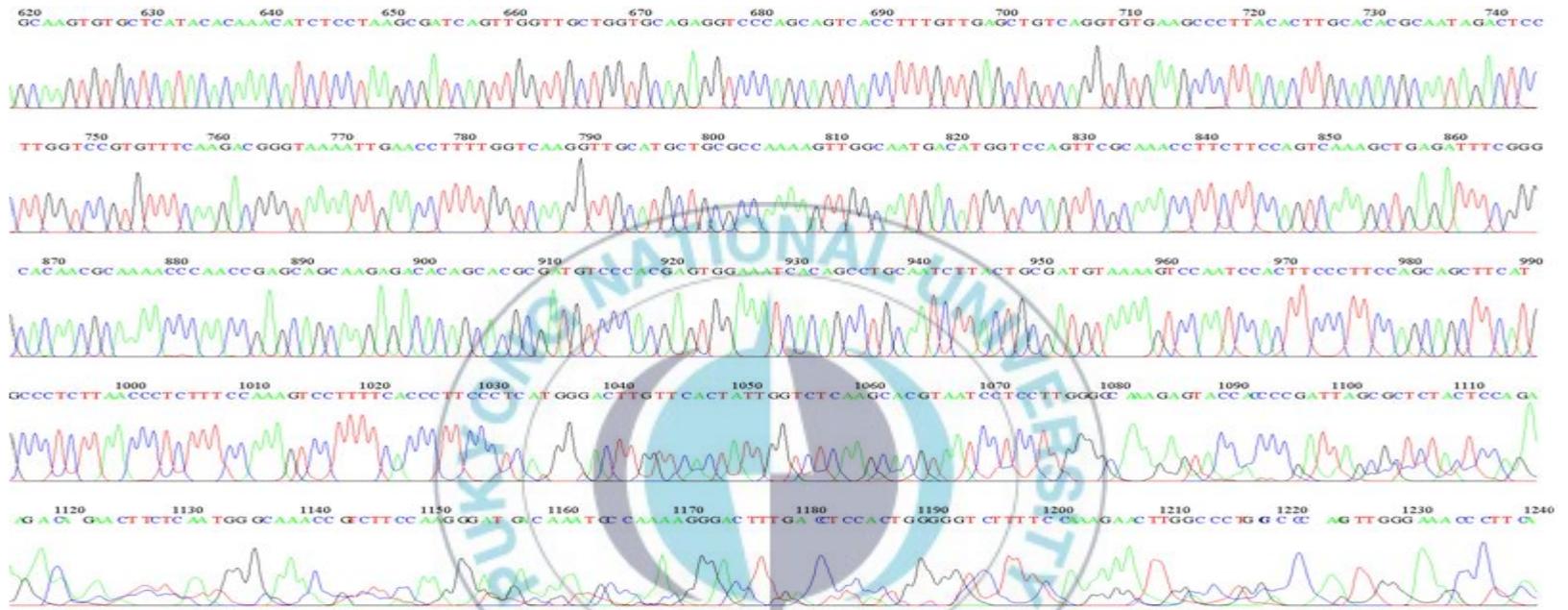


Fig. 27. KMMCC-550 1483R Sequence Data-2.

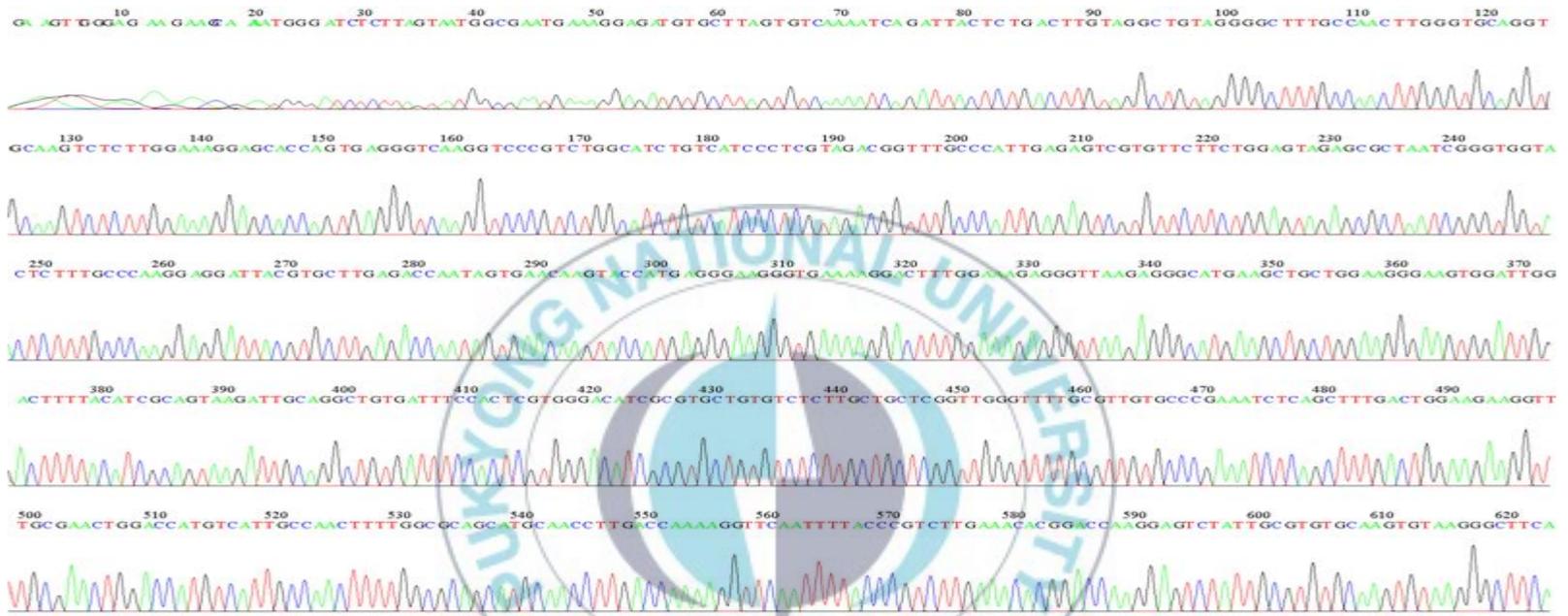


Fig. 28. KMMCC-551 LSU D1R Sequence Data-1.

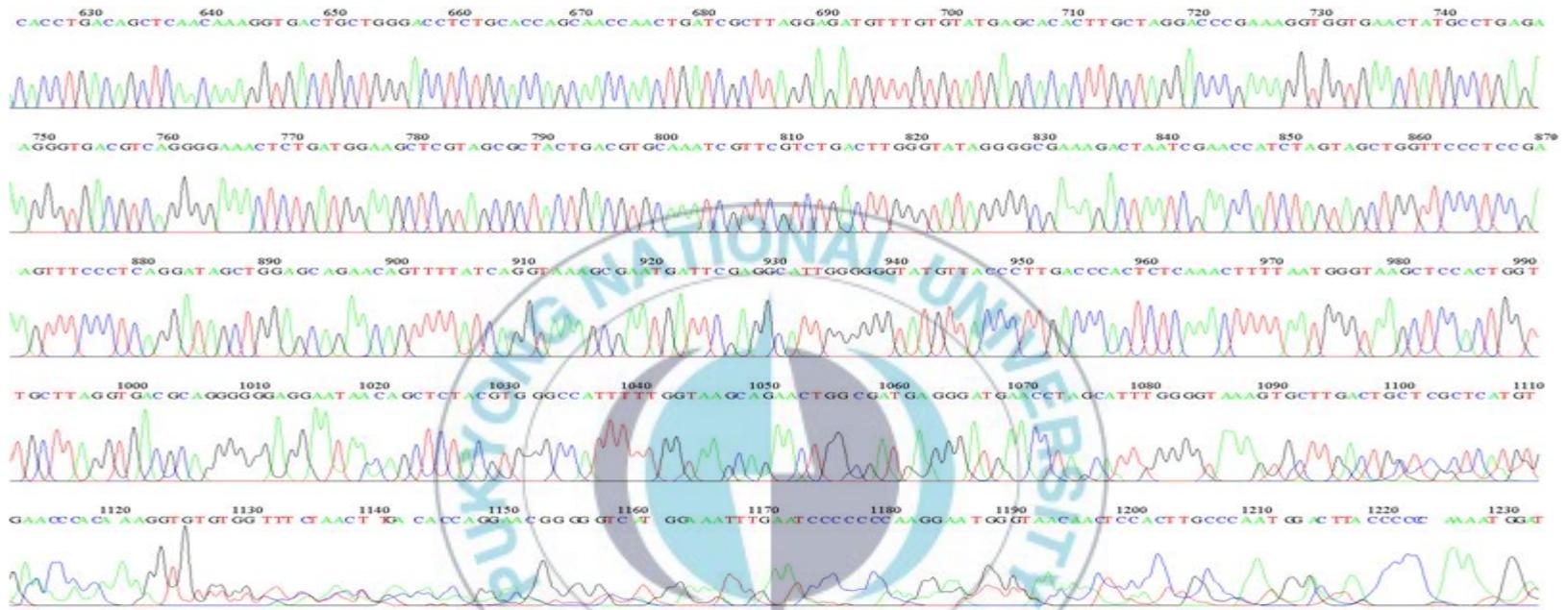


Fig. 29. KMMCC-551 LSU D1R Sequence Data-2.



Fig. 30. KMMCC-551 1483R Sequence Data-1.

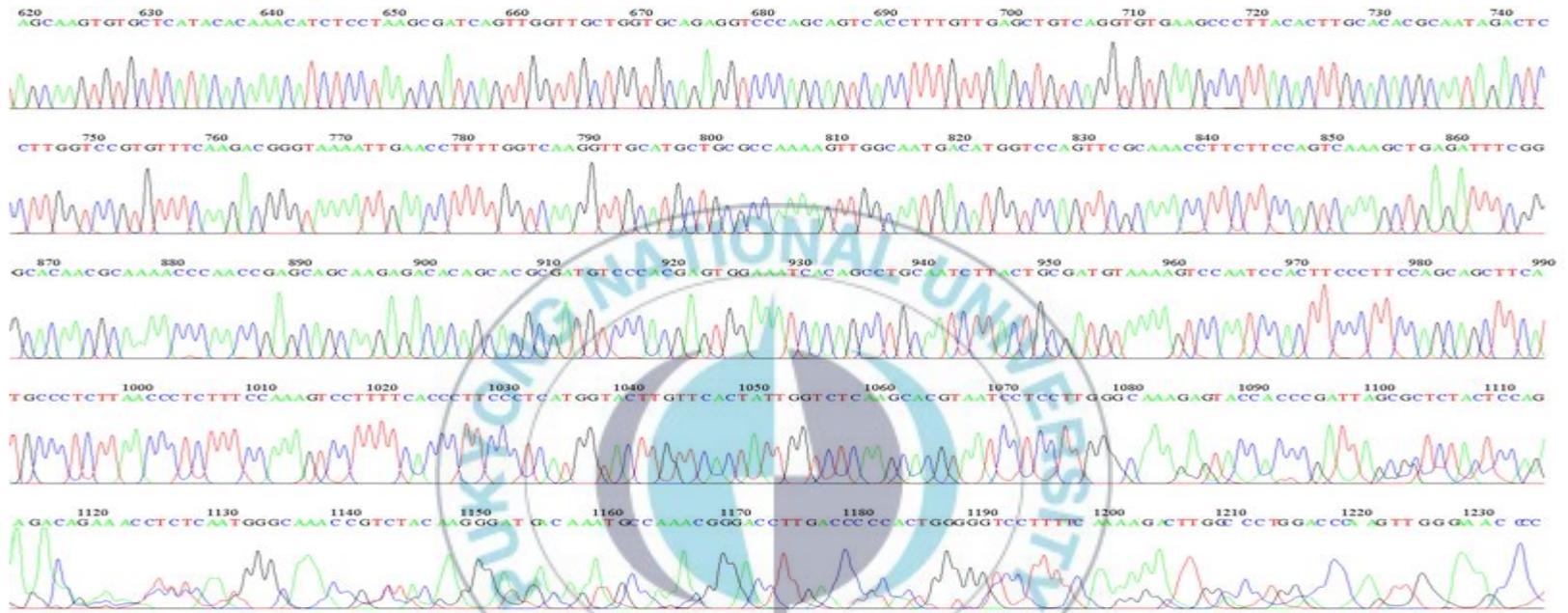


Fig. 31. KMMCC-551 1483R Sequence Data-2.



Fig. 32. KMMCC-553 LSU D1R Sequence Data-1.



Fig. 33. KMMCC-553 LSU D1R Sequence Data-2.



Fig. 34. KMMCC-553 1483R Sequence Data-1.

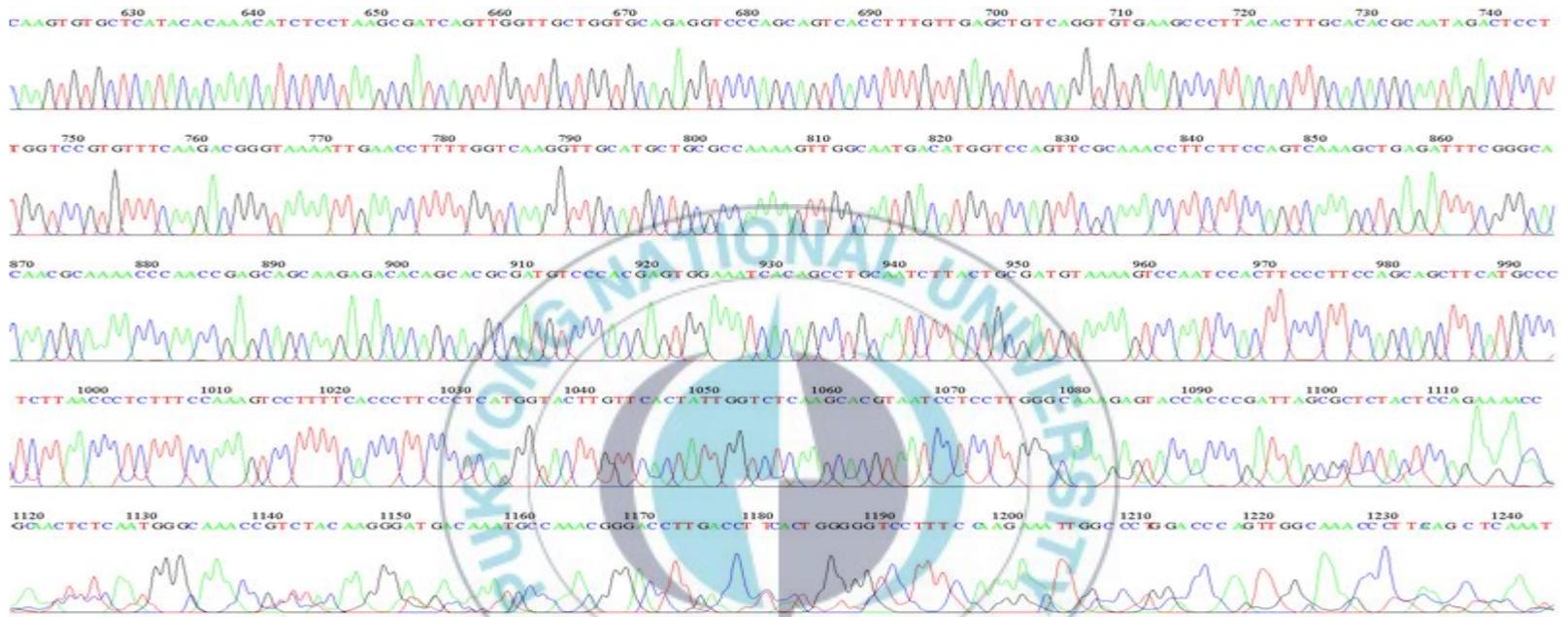


Fig. 35. KMMCC-553 1483R Sequence Data-2.

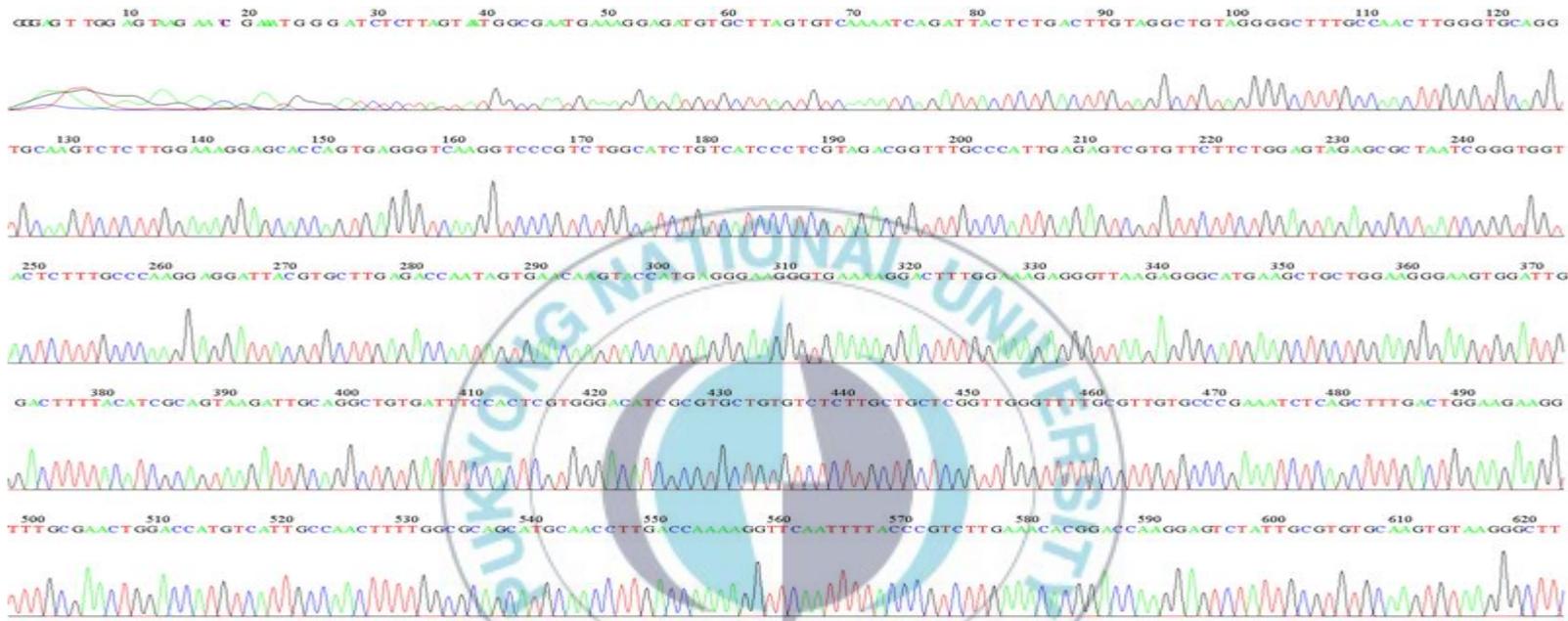


Fig. 36. KMMCC-578 LSU D1R Sequence Data-1.

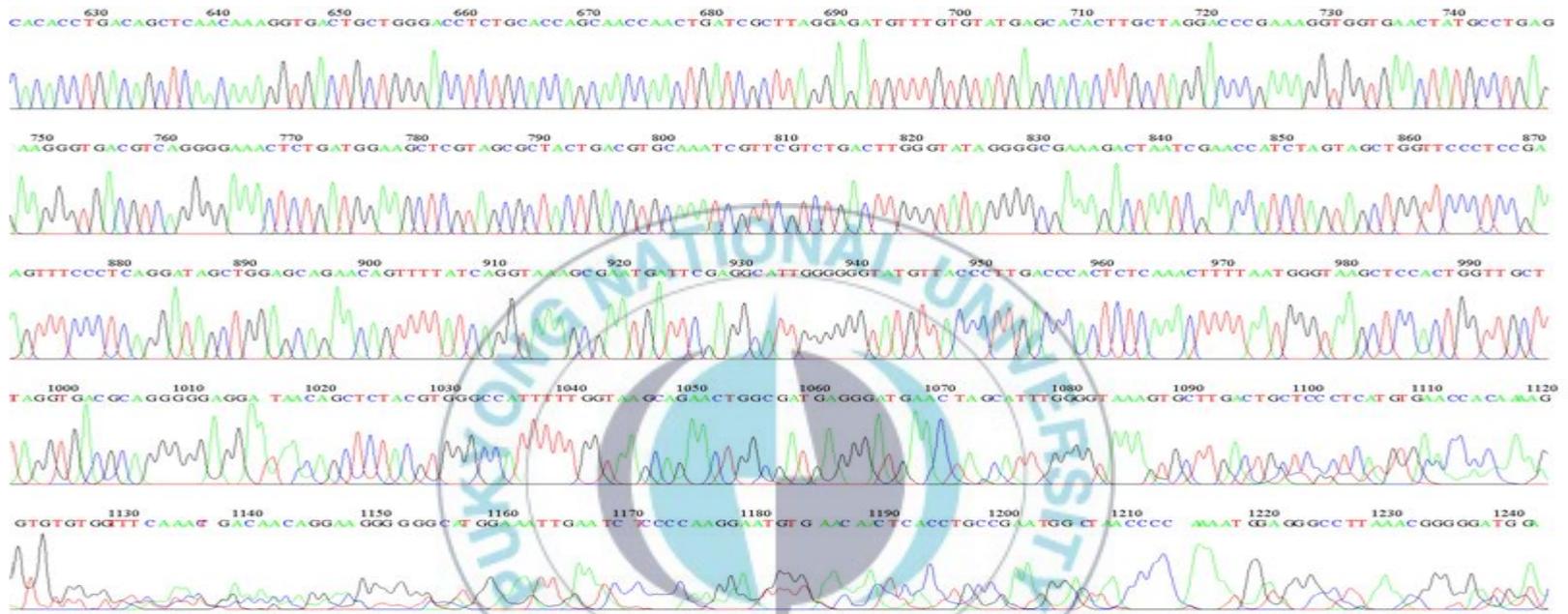


Fig. 37. KMMCC-578 LSU D1R Sequence Data-2.

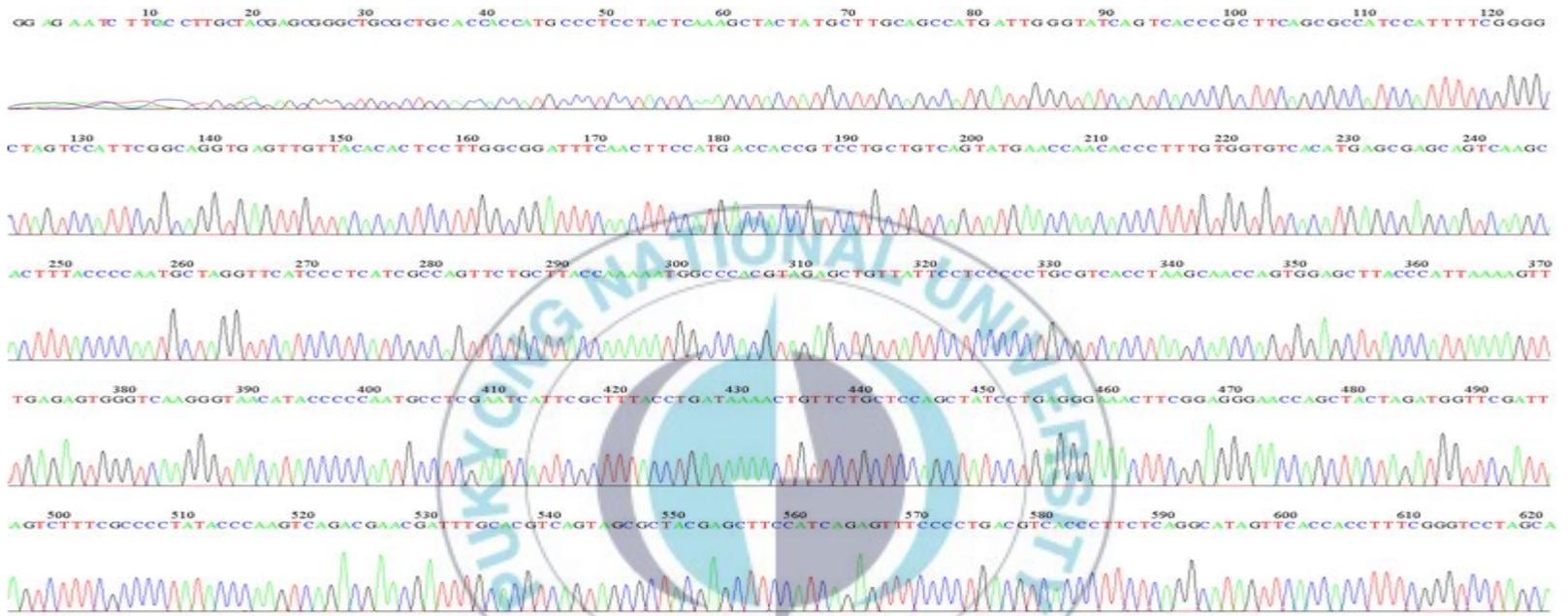


Fig. 38. KMMCC-578 1483R Sequence Data-1.

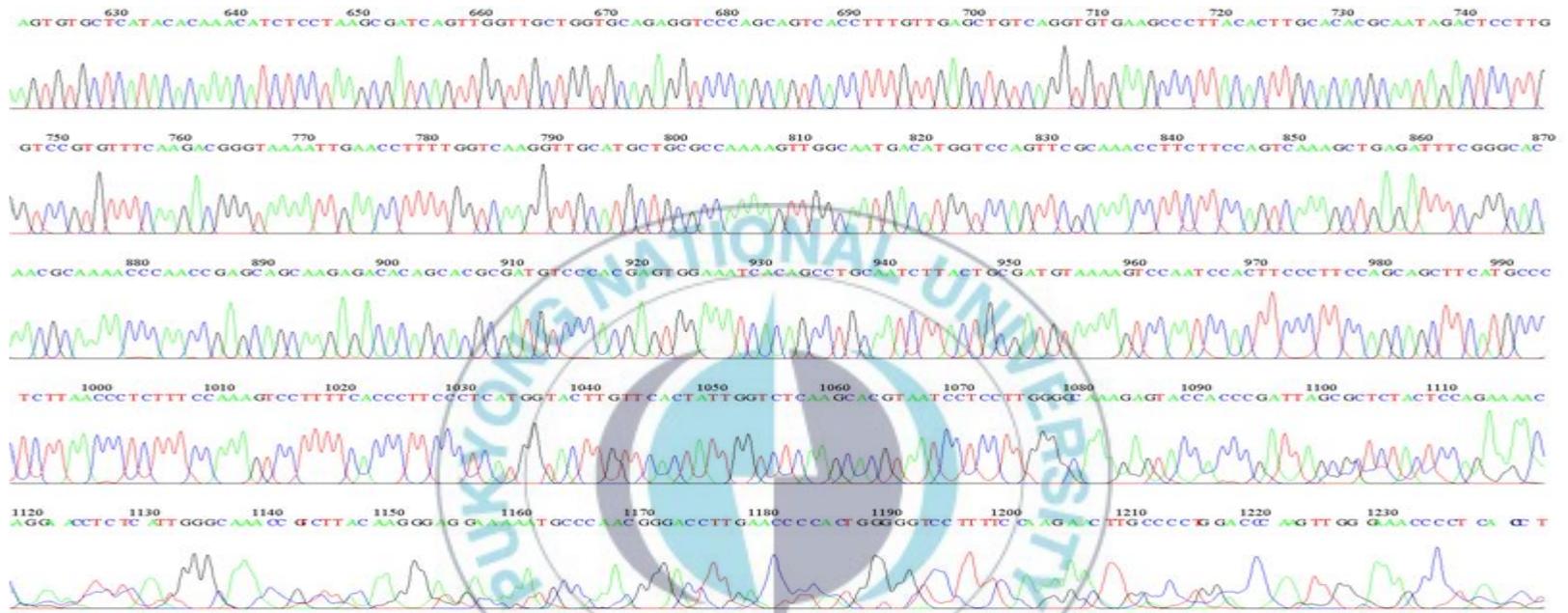


Fig. 39. KMMCC-578 1483R Sequence Data-2.

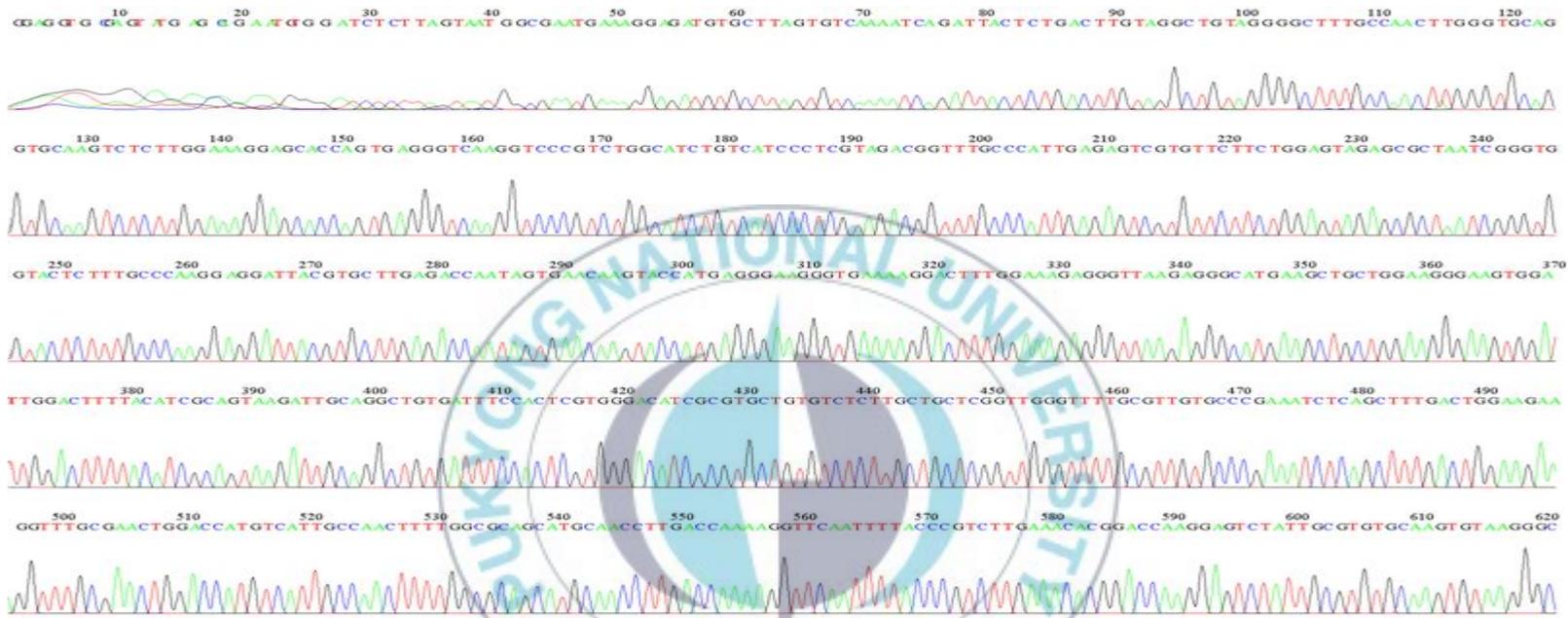


Fig. 40. KMMCC-1506 LSU D1R Sequence Data-1.

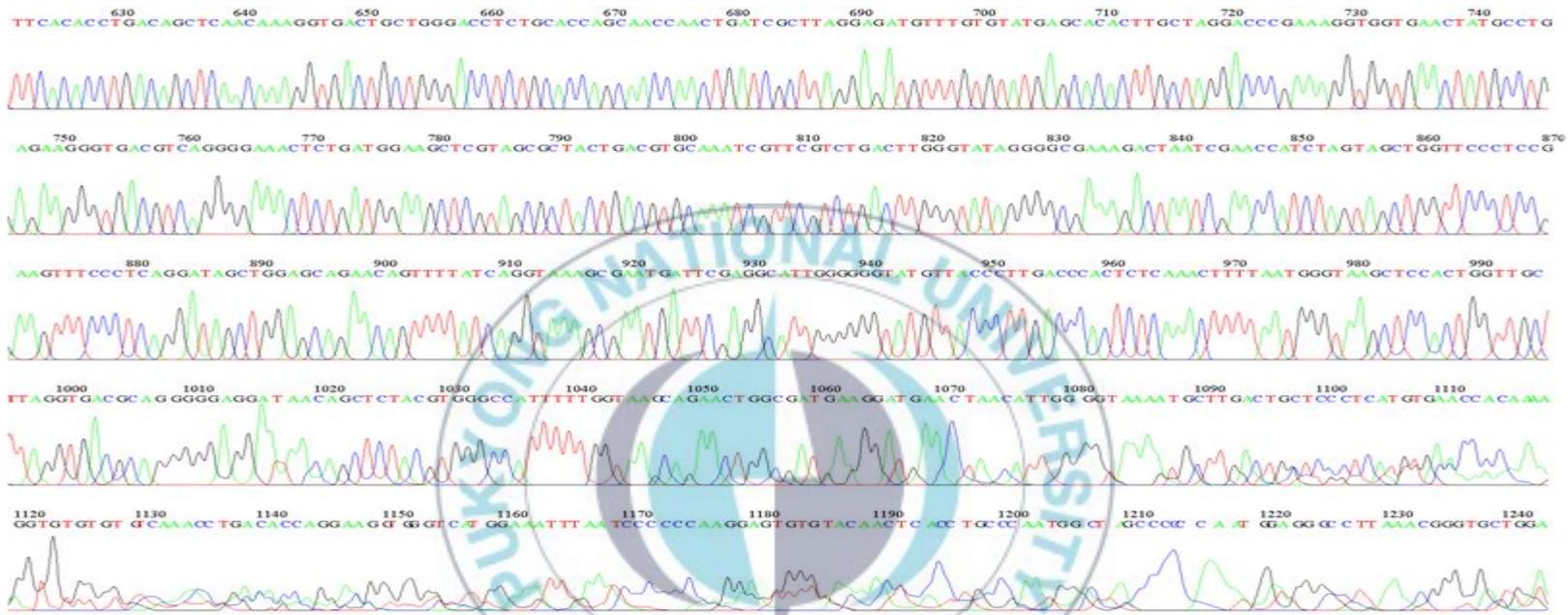


Fig. 41. KMMCC-1506 LSU D1R Sequence Data-2.



Fig. 42. KMMCC-1506 1483R Sequence Data-1.

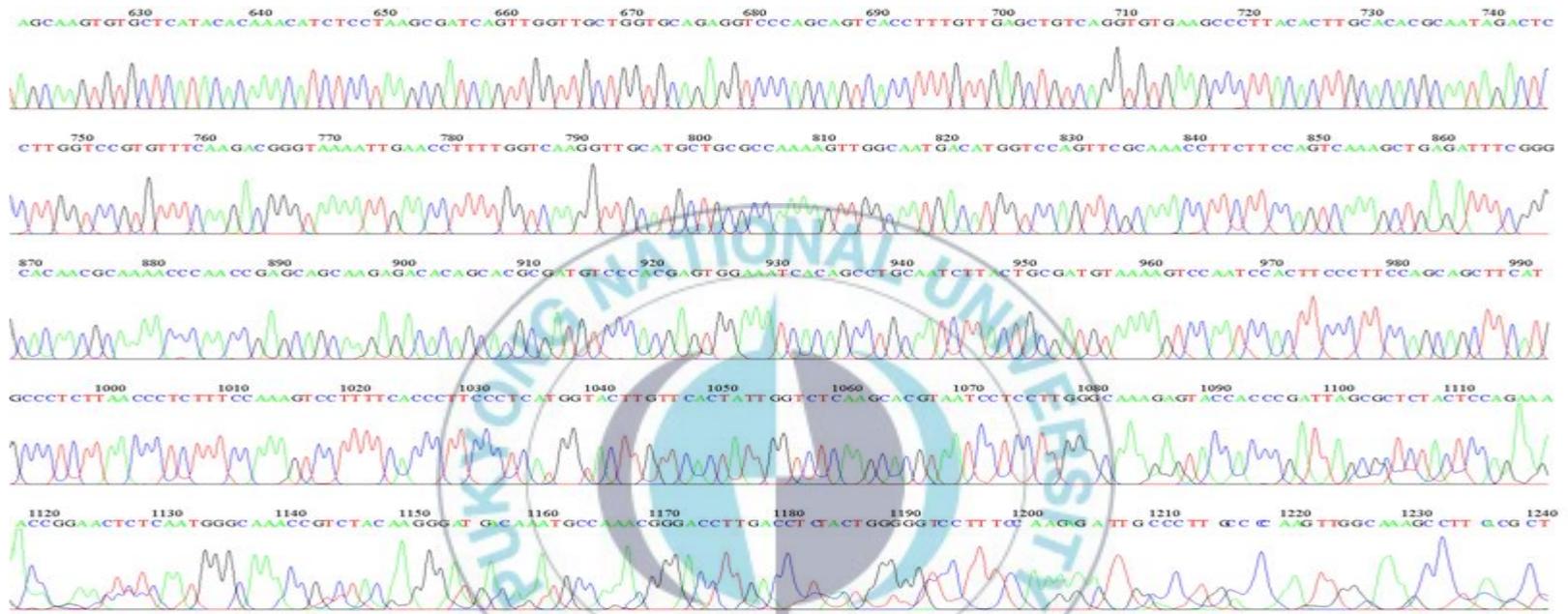


Fig. 43. KMMCC-1506 1483R Sequence Data-2.

감사의 글

이 논문을 쓰게 되게까지 부족하고 모자란 저를 많은 조언과 가르침을 주신 김창훈 교수님께 가장 먼저 감사의 말씀을 드립니다. 그리고 제가 연구하는 실험을 진행할 수 있게 지도 해주시고 가르침을 주신 이종수 교수님, 논문 수정에 도움을 주시고 격려해 주신 강성민 교수님, 김현우 교수님 감사드립니다.

실험실 생활을 하는 동안 고성에서 많은 지도와 사랑됨을 가르쳐 주신 김지일 선배님, 윤창호 부장님, 하승진 주사님, 센터에서 항상 고생하는 지홍이 감사합니다. 그리고 실험과 논문에 조언과 가르침을 주신 경훈이 형, 내 실험을 가장 많이 도와주고 고생한 재구, 항상 조용히 도와주던 성균이, 병권이, 여러 가지로 도움을 준 민정이, 실험실에서 고생한 승룡이, 은지, 민주 감사합니다. 그리고 저에게 격려와 힘이 되어주신 지효 형, 정수 형 경미 누나 감사합니다. 같이 대학원에 진학하고 수업을 듣고 힘이 되어준 12학번 동기 병수, 동욱이, 준형이, 승한이, 초원이 감사합니다.

대학원 진학해서 정신적으로 많은 힘을 주고 도움을 준 언제 철들지 모를 나의 친구 용호, 정훈, 애 키운다고 고생하는 진아 고맙다. 나에게 형같이 얘기해 주는 지영아 고맙고 대학원 진학 축하한다. 그리고 밀양가서 자주 못 보지만 연락 할 때마다 나를 즐겁게 해준 병현아 고맙다.

마지막으로 항상 신경 써주신 부모님, 물질적으로 큰 도움을 준 우리 큰 누나, 집에서 항상 먹을 걸 챙겨주는 우리 작은 누나, 그리고 항상 격려해 주신 가족들에게 감사합니다.

이 논문은 미래해양기술개발사업의 “해양미세조류 배양을 이용한 암피디놀(Amphidinol) 생산 및 이를 이용한 마이코플라즈마 키트 개발 (Project No. D11111112H390000140)” 과제의 도움을 받아 진행되었습니다.