

理學碩士 學位論文

해양균류 *Penicillium* sp.가 생산하는 생물활성
Quinone 및 Diketopiperazine류의 화학구조

指導教授 孫 炳 華

이 論文을 理學碩士 學位論文으로 提出함



釜慶大學校 大學院

化 學 科

金 正 澈

<목차>

Abstract	1
I. 서론	3
II. 실험	6
1. 기기 및 시약	6
(1) 기기	6
(2) 시약	6
2. 해양균류 <i>Penicillium</i> sp. 의 분리 및 동정	7
(1) 분리	7
1) MFA577	7
2) MFA143	7
(2) 동정	8
3. 해양균류의 배양	8
(1) MFA577	8
(2) MFA143	8
4. 해양균류의 수확 및 추출	9
(1) MFA577	9
(2) MFA143	9
5. 해양균류의 2차 대사성분의 분리 정제 및 분광학적 분석	9
(1) MFA577 대사성분의 분리 정제 및 분광학적 분석	9
1) 577M3.1 및 3.2	9
2) 577M2PH7	10
(2) MFA143 대사성분의 분리 정제 및 분광학적 분석	12
1) 143B3P3.4	12
2) 143M3PH5	14
6. 자유라디칼 소거활성	16
(1) 시료의 조제	16
(2) 활성측정	16
1) DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거활성	16
2) Peroxynitrite 소거 활성	16
3) 활성산소종 (Reactive oxygen speices, ROS) 의 생성억제작용	17
(3) IC ₅₀ [(μ g/mL) or (μ M/mL)] 값의 결정	17
III. 결과 및 고찰	20
1. 해양균류 MFA 577 대사성분의 화학구조	20
(1) 577M3.2의 화학구조	20
(2) 577M3.1의 화학구조	33

(3) 577M2PH7의 화학구조	39
2. 해양진균 MFA143 대사성분의 화학구조	51
(1) 143B3P3.4의 화학구조	51
(2) 143M3PH5의 화학구조	63
3. 생물 활성	75
(1) 577M3.2의 자유 라디칼 소거활성	75
(2) 143B3P3.4의 자유 라디칼 소거활성	75
IV. 결론	77
V. 참고문헌	78

Chemical structures of the bioactive quinones and diketopiperazines produced by the marine-derived fungus of the genus *Penicillium*

Jung Chul Kim

*Department of Chemistry, Graduate School
Pukyong National University*

Abstract

Marine life more comprise many more species than does terrestrial, so that one can expect to find a variety of chemically interesting marine-derived metabolites which are also bioactive.

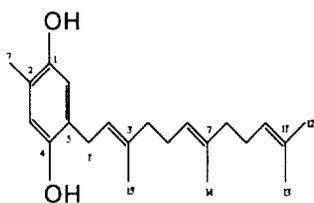
In recent years many marine natural products have been evaluated pharmacologically. Since these substances are chemically diverse, much attention also have been paid to their chemistry.

As part of our search for new biologically active marine natural products from the marine organisms, I have investigated the metabolites of the marine-derived fungus of the genus *Penicillium* and isolated quinone derivatives named 577M3.1 and 577M3.2, diketopiperazine derivatives named 577M2PH7 and 143M3PH5 and formaldehyde derivatives named 143B3P3.4. Their structures were elucidated as 577M3.1, 577M3.2, 577M2PH7,

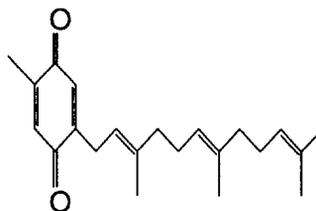
143M3PH5 and 143B3P3.4 by physicochemical evidence, respectively.

Formaldehyde, 143B3P3.4 and prenylated quinone, 577M3.2 showed

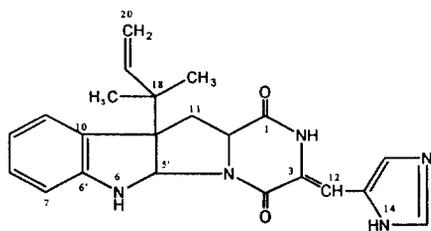
1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity with IC_{50} values of [4.1 mg/mL (10 μ M)] and [4.5 mg/mL (12 μ M)], respectively, which are more potent than L-ascorbic acid being used as standard [IC_{50} = 5 mg/mL (28.4 μ M)].



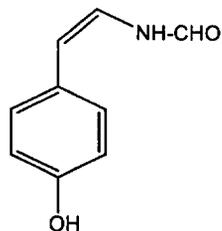
577M3.2



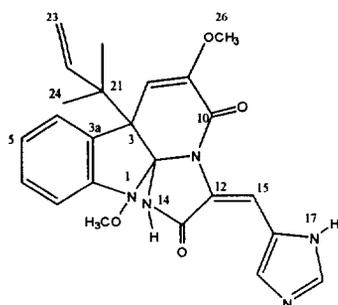
577M3.1



577M2PH7



143B3P3.4



143M3PH5

I. 서론

해양은 지구표면의 약 71 %를 차지하고 있으며 평균 수심 4,000 m, 염분 35 ‰, 온도는 연 평균 5 °C 이하의 특성을 가진다. 이러한 특이적 서식환경에서 살아가기 위해서 독특한 방어 기작을 갖고 있는 종류가 많기 때문에 그 적용 결과로 생성된 생리활성 물질들은 인류에게 유익한 물질들을 만들어 낼 수 있는 단서를 제공 해 줄 수 있고, 그 종류 또한 풍부하여 지구상의 전 동물종의 약 80 % (30문 50만종)이 해양에 서식하고 있다. 이러한 관점에서 해양 천연물 화학은 유전 공학과 더불어 신물질 개발의 핵심분야로서 크게 각광을 받고 있다.¹

이들 천연유기물로부터 고 부가가치의 신물질이나 유용물질을 개발하는 일은 새로운 기능의 소재를 개발하거나 신 의약품을 개발하는데 필수적인 과정이라고 할 수 있다. 실제로 현재 시판되고 있는 의약품의 절반 가까이가 천연물이거나 천연물에 기초한 유도체 인 것으로 알려져 있다. 육상생물에 유래한 천연물에 대한 연구는 꽤 오랜 역사를 가지고 있어 그 소재가 빈곤해지기 시작하고 있는 시점에서 새로운 해양천연물에 대한 기대가 커지고 있다는 점은 중요하다.

해양생물에서 유래한 천연물은 독특한 구조와 강력한 생리활성으로 유명한 물질들이 많은데 그 예로서 1969년 카리브해의 산호의 일종 (plexaura)에서 다양한 생리활성을 갖는 prostaglandin A^{2,3} 와 그 유도체들이 발견되었고, 또 다른 산호류에서 발견된 pseudopterosin^{4,5}은 소염제로 개발되었다. lophotoxin^{6,7}이라 불리는 물질은 신경계의 아세틸 콜린 수용체의 구조 연구와 최근 들어 관심이 높아진 알츠하이머 병의 연구용 시약으로 이용되고 있다.

그 중 해양 미생물의 특수한 기능에 주목하여 이들 미생물을 분리하고 그 기능을 해명하는 것은 순수한 학문적인 측면에서 뿐 만 아니라 산업적인 측면

에서도 중요하다. 특히, 진균과 박테리아는 생물학, 화학, 의·약학 및 생물공학 분야의 발전에 많은 공헌을 하였다. 즉, 1929년 페니실린의 발견 이래, 박테리아나 곰팡이에 대한 연구가 활발히 수행되어, 이들 미생물로부터 특이한 화학구조와 다양한 종류의 생물활성을 발현하는 많은 종류의 화합물이 발견되었다. 지난 60 여년 동안 미생물로부터 3만~5만종의 천연물이 발견되었으며, 이들 화합물 중 1만종 이상에서 생물활성이 관찰되었고, 그중 8000종 이상이 항균작용과 항 종양작용을 나타내었다. 나아가, 오늘날 100여 종류의 화합물이 임상적으로 항생제, 항종양제 및 농약으로서 이용되고 있다.⁸ 특히, 미생물로부터 분리된 이들 2차 대사산물들은 임상적으로 대단히 중요하기 때문에, 이들 화합물을 대량으로 합성하고 분자수준에서 그 생물활성을 이해하기 위하여 전 세계적으로 많은 화학연구 program이 전개되고 있다. 오늘날까지, 연간 90억불 이상의 연구비를 투자하여 토양 미생물로부터 의약품을 개발하고자 하는 연구가 제약산업분야에서 활발히 진행되어, FK-506 이나 esperamycin계 화합물이 발견되었다.⁸ FK-506은 포유류의 면역기능 mechanism을 연구하는데 중요한 probe로서 이용되고 있을 뿐 만 아니라, 임상적으로 면역조절제로서 이용되고 있으며, esperamycin계 화합물은 암 치료의 새로운 지평선을 개척하는데 크게 기여하고 있다.

또한 물질의 분리 및 구조 결정 등 유기 화학적 측면에 있어서 해양 천연물에 대한 일반적인 접근방법은 육상의 천연물과 유사하나 몇 가지의 난점이 있다. 즉 이들의 대부분은 생체 내에서의 함량이 낮으며 시료의 채집도 제한되어 있어서 다량의 천연물을 확보하는 것이 매우 어렵다. 또한 일반적인 실험 조건에서 물질이 불안정하여 분리 혹은 구조결정 과정에서 분해되거나 구조적으로 변환되는 경우가 매우 많다. 신 물질의 전 합성이나 산업적 개발을 위하여 입체구조의 규명에 대한 필요성이 증가하는 현실에서 해양 천연물의 효과적인 구조결정을 위해서는 NMR 분석기술이 필수적으로 요구된다.⁹

그리고 화학자들은 배양한 미생물로부터 생리작용을 나타내는 대사산물을 분리하여 분자구조를 결정하고, 구조와 반응성 및 구조-활성 상관을 조사하여 분자레벨에서 이들 화합물의 기능과 특성을 이해하고, 정밀화학, 생의학 및 생물기능 화합물로의 개발연구에 매진하고 있다. 나아가, 생물 공학적 기술수준의 향상에 힘입어 이들 2차 대사산물을 산업적으로 이용하려는 연구도 활발히 수행되어, 많은 분야에서 폭넓게 이용되고 있다.

최근 Merck사 연구팀에서 5만종이상의 화합물을 실험한 결과 아프리카 콩고 밀림지역에서 곰팡이 일종으로부터 당뇨병 치료에 효과를 나타내는 신물질을 추출하는데 성공을 하였다. 이는 quinone계 화합물로서 인슐린과는 달리 단백질이 아니므로 소화액에 저항력을 가져 경구 투여가 가능할 것으로 기대되고 현재 임상실험중에 있다.¹⁰ 또한 해양생물에서 분리한 moritoside라는 quinone류의 화합물은 현재 약품으로 사용되고 있는 물질이다.¹³ 이러한 생물활성 외에도 새로운 구조를 가진 quinone류의 화합물도 보고되어지고 있다.¹¹⁻¹⁵ 또한 diketopiperazine류의 화합물 역시 생리 활성을 나타낼 뿐만 아니라 새로운 구조를 가진 화합물들이 보고되어 지고 있다.^{16,17}

이에 본 연구는 해양균류 *Penicillium* sp. 가 생산하는 2차 대사산물로부터 신기능성 화합물을 분리하여 식품, 의약, 정밀화학분야에 유용한 신 물질 개발을 위한 기초자료를 확립하기 위해 라디칼 소거 활성 시험을 통하여 활성을 나타내는 MFA577, MFA143을 분리/정제를 하여 물리·화학적 성질, 분광학적 분석 자료로부터 그 화학구조를 결정하고 라디칼 소거활성을 검색하였다.

II. 실험

1. 기기 및 시약

(1) 기기

Column chromatography (이하 CC 라 함)의 흡착제는 silica gel 60 (Merck, 70-230 mesh), ODS-A (YMC GEL ODS-A, YMC, 150 μ m)를 사용하였고, 박층 chromatography (이하 TLC라 함)는 silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, aluminium sheets, 20 cm \times 20 cm)를 사용하였으며, spot는 1 % Ce(SO₄) / 10 % H₂SO₄를 분무하고 가열 시 발색으로 검출하였다.

Electron impact mass spectrum (이하 EIMS 라 함)은 Shimadzu사의 GCMS-OP5050A, Jeol사의 JMS-400, fast atom bombardment mass spectrum (이하 FABMS 라 함)은 Jeol사의 JMS-HX110/110A, ultraviolet visible spectrum (이하 UV 라 함)은 Varian Cary IC을 사용하여 측정하였으며, infrared spectrum (이하 IR이라 함)은 Perkin Elmer FT-IR 2000을 사용하여 측정하였다. 수소 핵자기 공명 spectrum (400 MHz) (이하 ¹H NMR 이라 함), 탄소 핵자기 공명 spectrum (100 MHz) (이하 ¹³C NMR 이라 함) 는 Jeol사 JNM-ECP 400을 사용하여 측정하였다.

(2) 시약

NMR용매는 DMSO-*d*₆ (Cambridge Isotope Laboratories, Inc, deuterium degree 99.9%) 및 CDCl₃ (Aldrich, deuterium degree 99.8%)를 사용하였다. 일반용매는 CH₂Cl₂, *n*-hexane, MeOH, EtOAc, acetone (덕산화학, 99.5 %)를 사용하였다. 시약 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH, Sigma, 90 %) 및 배지용 시약은 soytone (Acuamedia), soluble starch (Duksan), agar powder

(덱산화학), D-mannitol (Sigma, 98 %), yeast extract (Acuamedia), peptone (Acuamedia), D-(+)-glucose (Yakuri), glycerol (Sigma, 99 %), penicillin G (Sigma)를 사용하였다.

2. 해양균류 *Penicillium* sp. 의 분리 및 동정

(1) 분리

1) MFA577

본 실험에 사용한 해양균류 (MFA577)은 경남 통영시 비진도 (2000년 2월)에서 채집한 노끈을 멸균수로 씻고, 무균하에서 agar 배지 (YPG+agar 이하 agar 배지)에 접종, 배양하여 순수 균사(hyphae)를 채취한 후 agar 배지에 4회에 걸쳐 계대 배양하여 해양 진균 MFA577을 순수 분리하여 실험에 사용하였다. 순수 분리한 균주 *Penicillium chrysogenum* 은 10 % glycerol이 첨가된 YPM배지에 혼탁시켜 -75 °C에서 보관하였다.

2) MFA143

본 실험에 사용한 해양균류 (MFA143) 골매마을 (1999년 8월)에서 채집한 두갈래 분홍치를 멸균수로 씻고, 무균하에서 agar 배지 (YPG+agar 이하 agar 배지)에 접종, 배양하여 순수 균사 (hyphae)를 채취한 후 agar 배지에 4회에 걸쳐 계대 배양하여 해양 진균 MFA143을 순수 분리하여 실험에 사용하였다. 순수 분리한 균주 *Penicillium* sp.는 10 % glycerol이 첨가된 YPM배지에 혼탁시켜 -75 °C에서 보관하였다.

(2) 동정

MFA577, MFA143를 사면 agar 배지에 28 °C에서 3일간 배양 후 한국 미생물 보존센터 (Korea Culture Center of Microorganisms, KCCM, 서울)에 분석을 의뢰하였다. 이 두 균주의 whole cell fatty acid composition을 분석을 한 결과 모두 *Penicillium chrysogenum* 및 *Penicillium* sp.로 동정 하였다.

3. 해양균류의 배양

(1) MFA577

Deepfreezer에 보관된 균주를 꺼내어 agar 배지에 접종 후 28 - 29 °C에서 5일을 배양한 후 그 colony 일부를 10 mL YPM (0.4 % manitol, 0.2 % yeast extract, 0.2 % peptone, 20 % seawater)에 접종을 하여 28 - 29 °C에서 4일간 배양 후 1 L SWS 배지 (0.1 % soytone, 1 % soluble starch, 20 % seawater)에 접종하고, 온도는 28 - 29 °C, 습도는 60 %, 15일간 배양하였다. 이어, 그 배양액을 같은 조건에서 SWS 배지로 5, 10, 20 L 순으로 계대 배양을 하였다.

(2) MFA143

Deepfreezer에 보관된 균주를 꺼내어 agar 배지에 접종 후 28 - 29 °C에서 4일을 배양한 후 그 colony 일부를 10 mL YPM (0.4 % manitol, 0.2 % yeast extract, 0.2 % peptone, 20 % seawater)에 접종을 하여 28 - 29 °C에서 3일간 배양 후 1 L SWS 배지 (0.1 % soytone, 1 % soluble starch, 20 % seawater)에 접종하고, 온도는 28 - 29 °C, 습도는 60 %, 30일간 배양하였다. 이어, 그 배양액을 같은 조건에서 SWS 배지로 5, 10, 20 L 순으로 계대 배양을 하였다.

4. 해양균류의 수확 및 추출

(1) MFA577

위와 같은 방법으로 대량 배양된 (20 L) 균주를 가아제 여과하여 균사체 (mycelium)와 배양액 (broth)으로 분리하였다. 균사체는 동결건조 후 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1)에 침적 시켜 24시간 추출 (3회) 후 추출액을 갑압여과 하여, 균사체 추출엑스 (577M)를 얻었다. 배양액은 EtOAc로 추출하여 (2회) 배양액 엑스 (577B)를 얻었다.

(2) MFA143

MFA577과 동일한 방법을 이용하여 균사체 엑스 (143M) 및 배양액 엑스 (143B)를 얻었다.

5. 해양균류의 2차 대사성분의 분리 정제 및 분광학적 분석

(1) MFA577 대사성분의 분리 정제 및 분광학적 분석

1) 577M3.1 및 3.2

MFA577 acetone 추출액을 대상으로 자유 라디칼 소거활성 실험 결과 활성 (% inhibition : 61)이 관찰 되어, 위에서 언급한 방법으로 배양을 하여 얻은 MFA577의 균사체 엑스 577M (1.1 g), (DPPH IC_{50} = 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 ODS-A column (1.5 cm I.D.×20 cm Length, YMC GEL ODS-A, YMC, 150 μm)에 주입하고 $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 용매계 (100 %~0 %)로 분획하여, 577M1 (36 mg), M2 (76 mg), M3 (110 mg), M4 (77 mg) 및 M5 (250 mg)를 얻었다. 이 중 활성을 나타낸 577M3 (110 mg), (DPPH IC_{50} = 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 다시 silica

gel column (1.5 cm I.D.×20 cm Length, silica gel 60, Merck, 70-230 mesh) 에 주입하고 *n*-hexane/EtOAc 용매계 (100 %~0 %) 을 이용하여, 577M3.1 (12 mg), 3.2 (28 mg), 3.3 (3 mg)으로 분획 후 577M3.1과 3.2를 다시 HPLC (ODS-A, MeOH, UV detector 254 nm)로 분리 정제하여 순수한 577M3.1 (7 mg) 과 577M3.2 (21 mg)을 얻었다.

577M3.1 : colorless solid ; LREIMS m/z 326 $[M]^+$, 311 (1), 283 (3), 257 (5), 241 (6), 215 (18), 202 (10), 189 (41), 175 (100), 161 (17), 147 (23), 137 (57), 121 (31), 105 (25) (Fig. 16) ; NMR data (Fig. 17, 18, Table 2)

577M3.2 : colorless solid ; UV (MeOH) 206 nm (ϵ 12,000), 294 nm (2,000) (Fig. 13) ; IR (KBr) 3459, 2919, 1631, 1427, 1386, 1186 cm^{-1} (Fig. 7) ; LREIMS m/z 328 $[M]^+$, 281 (30), 231 (31), 219 (25), 174 (100), 137 (52), 119 (28) ; HREIMS 328.2407 (calcd for 328.2402, $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_2$) (Fig. 6) ; NMR data (Fig. 8-12, Table 1)

2) 577M2PH7

577M2 (76 mg)는 CH_2Cl_2 (3 mL) 과 *n*-hexane (50 mL)을 이용하여 12시간 분별침전을 하여 상등액 577M2S (32 mg)와 침전물 577M2P (40 mg)로 분리 한 후 577M2P (40 mg)를 다시 HPLC (ODS-A, MeOH, UV detector 254 nm)로 분리 정제하여 순수한 577M2PH7 (7 mg)을 얻었다.

577M2PH7 : Brown oil ; UV (MeOH) 206 nm (ϵ 80,610), 238 nm (39,864), 324 nm (53,890) (Fig. 27) ; IR (neat) 3343, 3272, 2968, 2925, 2843, 2664, 2358, 2328, 1683, 1607, 1436, 1398, 1215, 1104 cm^{-1} (Fig. 21) ; LRFABMS m/z 390 $[M+H]^+$, 149 (62), 136 (27) ; HRFABMS 390.1921 (calcd for 390.1930, $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_2\text{N}_5$) (Fig. 20) ; NMR data (Fig. 22-26, Table 3).

Penicillium sp. (MFA577M, 1.1 g)

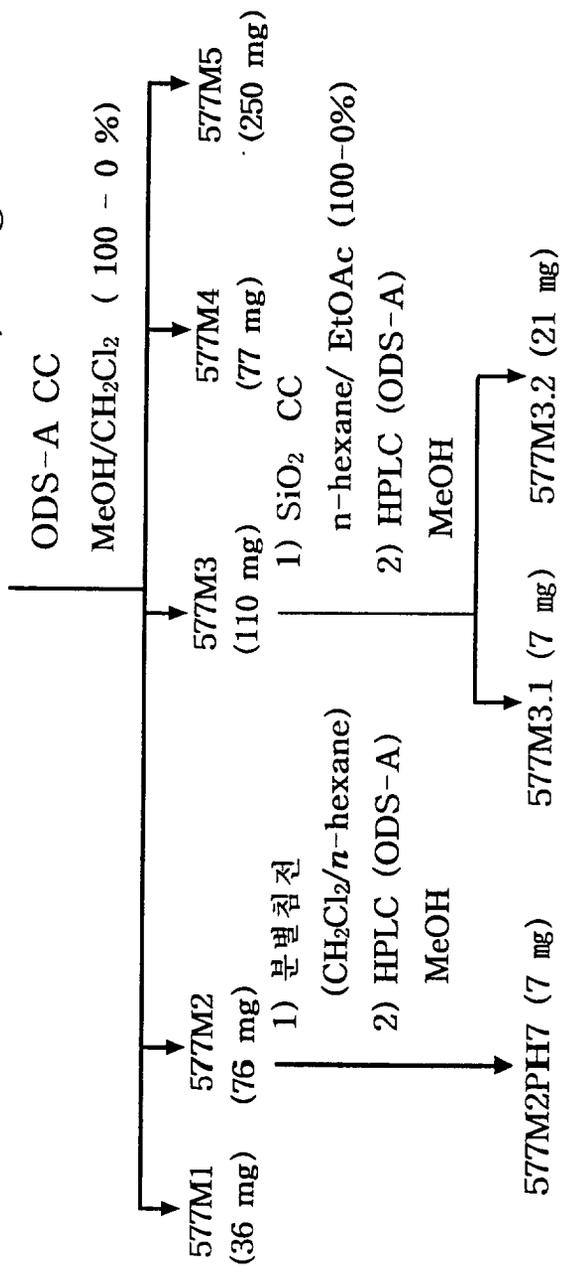


Fig. 1. Isolation of quinone and diketopiperazine from the marine-derived fungus.

(2) MFA143 대사성분의 분리 정제 및 분광학적 분석

1) 143B3P3.4

MFA143 acetone 추출액을 대상으로 자유 라디칼 소거활성 실험 결과 활성 (% inhibition : 51)이 관찰 되어 MFA577과 동일한 방법으로 배양을 하여 얻은 MFA143의 배양액 엑스 143B (1.7 g), (DPPH IC₅₀ = 31 µg/mL)를 silica gel column에 주입하고 *n*-hexane/EtOAc 용매계 (100 %~0 %)로 분획하여, 143B1 (300 mg), B2 (200 mg), B3 (200 mg), B4 (250 mg), B5 (250 mg)를 얻었다. 이 중 활성을 나타낸 143B3 (200 mg), (DPPH IC₅₀ = 12 µg/mL) 획분을 CH₂Cl₂ (2 mL) 과 *n*-hexane (50 mL)을 이용하여 12시간 분별침전을 하여 상등액 143B3S (66 mg)와 침전물 143B3P (135 mg)로 분리를 한 후 143B3P (135 mg)를 silica gel column에 주입하고 *n*-hexane/EtOAc 용매계 (100 %~0 %)로 분리하여, 143B3P1 (15 mg), P2 (28 mg), P3 (25 mg), P4 (18 mg), P5 (23 mg)로 분리하였다. 143B3P3 (25 mg)를 다시 HPLC (ODS-A, MeOH, UV detector 254 nm)로 분리 정제하여 순수한 143B3P3.4 (13 mg) 을 얻었다.

143B3P3.4 : Brown oil ; UV (MeOH) 202 nm (ϵ 5,137), 216 nm (4,556), 281 nm (5,587) (Fig. 37) ; IR (neat) 3294, 2927, 1657, 1488, 1390, 1242, 1108, 840 cm⁻¹ (Fig. 31) ; LREIMS *m/z* 163 [M]⁺, 150 (2), 134 (38), 118 (30), 107 (52), 105 (7), 77 (42), 67 (15), 51 (14) (Fig. 26) ; NMR data (Fig. 32, 33, 34, Table 4)

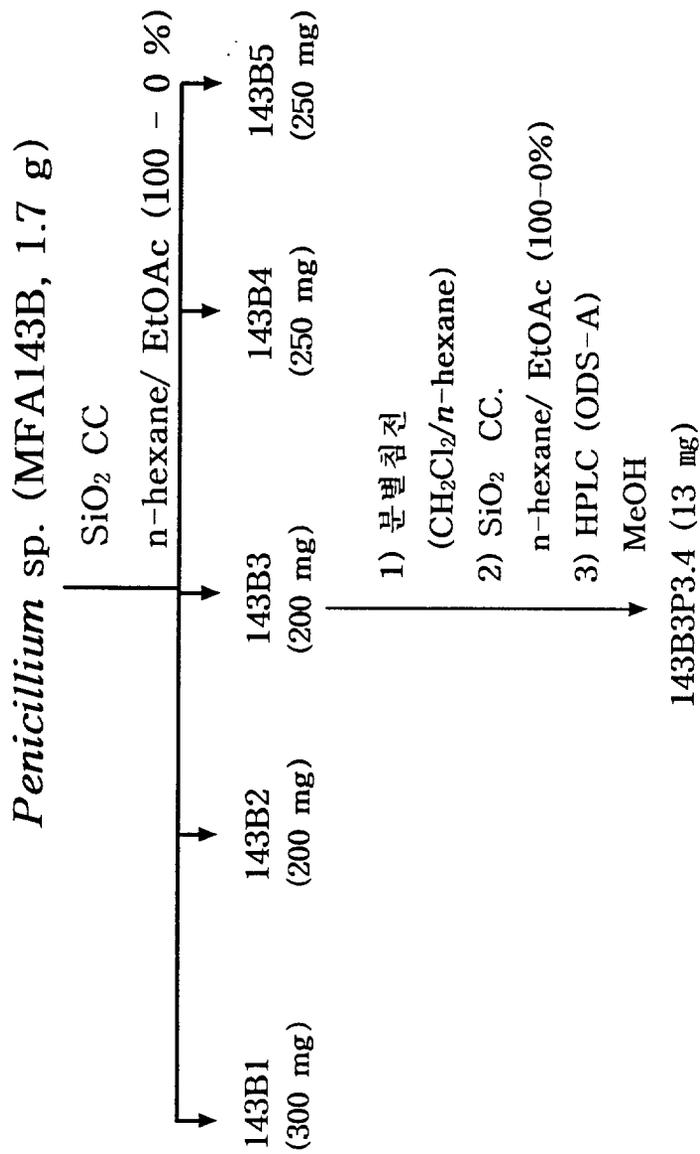


Fig. 2. Isolation of secondary metabolites from the marine-derived fungus.

2) 143M3PH5

MFA143의 균사체 엑스 143M (1.5 g)를 silica gel column에 주입하고 *n*-hexane/EtOAc 용매계 (100 %~0 %)로 분획하여, 143M1 (104 mg), M2 (17 mg), M3 (24 mg), M4 (30 mg), M5 (230 mg), M6 (250 mg)을 얻었다.

143M3 (24 mg)을 CH₂Cl₂ (3 mL) 과 *n*-hexane (50 mL)을 이용하여 분별침전을 하여 상등액 143M3S (4 mg)와 침전물 143M3P (19 mg)로 분리를 한 후 143M3P (19 mg)를 다시 HPLC (ODS-A, MeOH, UV detector 254 nm)로 분리 정제하여 순수한 143M3PH5 (11 mg)를 얻었다.

143M3PH5 : Yellow oil ; UV (MeOH) 208 nm (ϵ 26,715), 228 nm (11,082), 284 nm (4,412), 344 nm (11,697), 360 nm (10,256) (Fig. 47) ; IR (neat) 3186, 3089, 3013, 2936, 1702, 1632, 1460, 1401, 1316, 1353, 1246, 1108, 1010 cm⁻¹ (Fig. 41) ; LREIMS *m/z* 448 [M]⁺, 136 (23), 154 (12), 379 (34), 448 (100) ; HRFABMS 448.1985 (calcd for 448.5015, C₂₄H₂₆O₄N₅) (Fig. 40) NMR data (Fig. 42 ~ 46, Table 5)

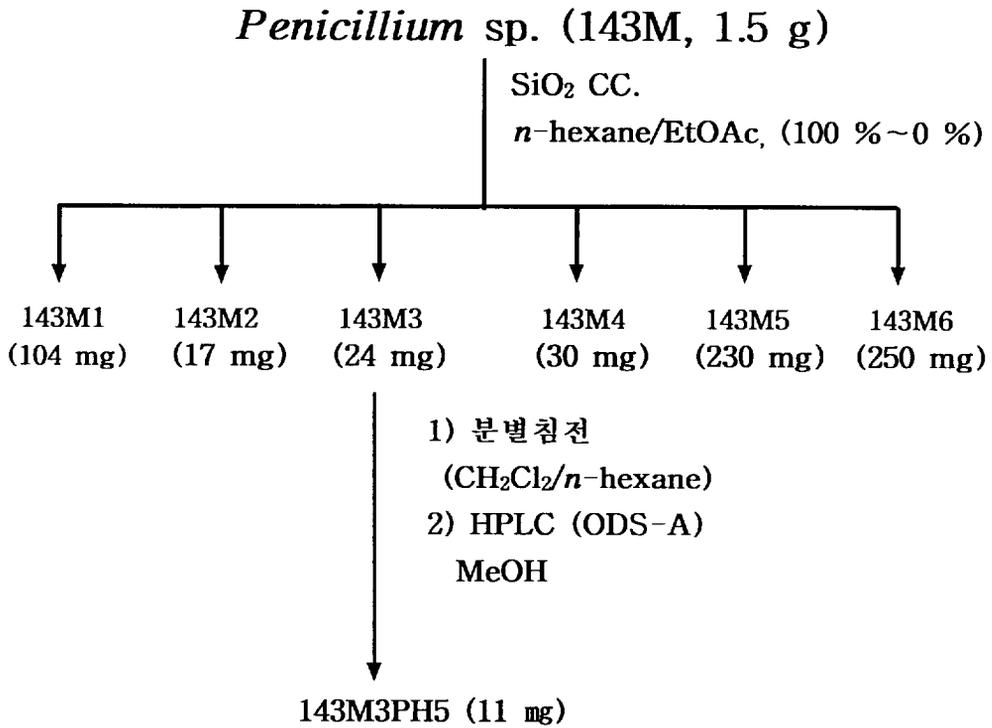


Fig. 3. Isolation of metabolites from the marine-derived fungus.

6. 자유라디칼 소거활성

(1) 시료의 조제

해양 미세조류의 엑스성분 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 추출물) 및 분리 정제하여 얻은 화합물 (1 mg)을 칭량하여 MeOH (1 mL)에 녹여 1 mg/mL 로 조제한 후, 이것을 단계별로 희석하여 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 조절하였다.

(2) 활성측정

1) DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거활성

일반적으로 이용되고 있는 DPPH test법¹⁸으로 실험하였다. 즉, 진균으로부터 얻은 시료 1 mg을 MeOH 1 mL에 녹여, 이것을 단계별로 희석하여 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 조절하였다.

이와 같이 조제한 시료용액 중 160 μl 를 취하여 96-well microtiter tray에 넣은 다음, 1.5×10^{-4} M DPPH 40 μl 을 가하였다. 또한 대조군은 시료 160 μl 와 MeOH 40 μl 을 각각의 well에 주입하여 조제하였다. 시료군과 대조군을 30분간 암소에 방치한 후 분광광도계 (microplate reader)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료군과 대조군의 평균 흡광도 차이를 이용하여 IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 값을 계산하였다.

2) Peroxynitrite 소거 활성

Fig. 4에서 나타낸 바와 같이, 1.5 mL glass cuvette에 100 μM diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA) 와 5 μM dihydrorho-damine 123 (DHR123)을 함유한 100 mM phosphate buffer (pH 7.4) 반응 혼합물의 전체 용량을 1 mL로 하여, 37°C에서 1분간 반응시킨 후, 반응 혼합물에 각각의 시료

를 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가하였다. 한편 peroxynitrite 생성저해 활성을 측정하기 위해서는 200 μM SIN-1을 첨가하였고, 직접적인 peroxynitrite 소거활성을 측정하기 위하여 합성 peroxynitrite를 5 μM 첨가하였다. 그 반응혼합물을 microplate fluorescence reader (FL500, Bio-Tex instrument)로 여기 파장 480 nm, 측정 파장 525 nm에서 측정하여¹⁹ DHR123의 산화저해율로 나타내었다.²⁰

3) 활성산소종 (Reactive oxygen speices, ROS) 의 생성억제작용²¹

Fig. 5에 나타낸 바와 같이, 한편, 이 때 사용한 stock solution은 99.9%의 에탄올에 용해한 12.5 mM DCFDA와 3차 증류수에 용해한 600 U/mL esterase를 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에 저장하여 두고 사용하였으며, 실험시, 10 μM DCFDA와 6 U/mL esterase를 혼합하여 조제된 DCFH 용액을 22 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20분간 배양한 후 사용 전까지 암소에서 냉동 보관하였다. 간세포주 (AC₂F)를 6시간 동안 serum free media에 배양한 후 phosphate buffer (pH 7.4)로써 희석시킨 후, 12.8 μM DCFDA 와 여러 농도의 시료액을 가하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 배양시켰다. 이것을 0~4 $^{\circ}\text{C}$ 의 저온에서 8분간 원심분리 (12,500 \times g) 시킨 후, 상층액을 취하여 여기 파장 460 nm, 측정 파장 530 nm의 조건에서 30분간의 형광변화를 측정하였다.

(3) IC₅₀[($\mu\text{g}/\text{mL}$) or ($\mu\text{M}/\text{mL}$)] 값의 결정

IC₅₀ 값은 대조군에 비해 흡광도를 50 % 감소시키는데 필요한 시료의 농도로서 Finney의 probit analysis²²법을 이용하여, corrected % difference (y) 대 log concentration (x) 의 linear regression 관계식을 구한 다음, y = 50 %일 때의 값을 구하고, 이 값의 antilog치를 취하여 IC₅₀ 값을 계산하였다.

Diethylenetriaminepentaacetic acid(DTPA) 100 μ M

↓

Dihydrorhodamine 123, 5 μ M

↓

Incubation at 37°C for 1 min

↓

Sample

↓

SIN-1 200 μ M or peroxynitrite 5 μ M

↓

Measurement of fluorescence intensity

λ_{Ex} at 480 nm

λ_{Em} at 525 nm

Fig. 4. Measurement of peroxynitrite scavenging activity.

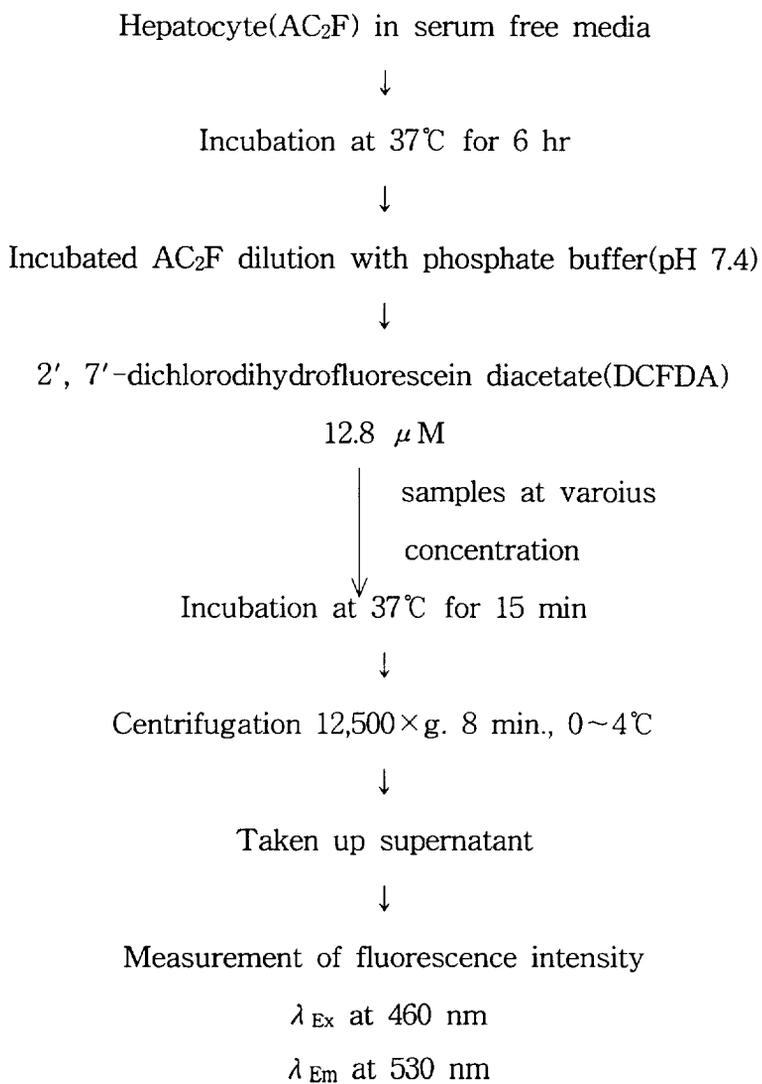


Fig. 5. Assay of ROS generation by DCF.

III. 결과 및 고찰

1. 해양균류 MFA 577 대사성분의 화학구조

(1) 577M3.2의 화학구조

577M3.2는 무색의 고체로서, ^{13}C NMR과 저분해능 및 고분해능 EI 질량분석스펙트럼 (LR- and HR-EIMS) 에서 $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_2$ 의 원소 조성이 관찰되었다 (Fig. 6). 577M3.2는 IR 스펙트럼에서 hydroxyl (3459 cm^{-1}), double bonds (1631 cm^{-1}) 유래의 peak가 관찰되었다 (Fig. 7). 그리고 ^1H , ^{13}C NMR, DEPT, HMBC, HMQC data에서 2,5-disubstituted hydroquinone, three trisubstituted double bonds, one aromatic methyl 및 four olefinic methyls signal이 관찰되었으며. (H-3/C-1, 4, 5, 7), (OH-4/C-3), (H-6/C-1, 2, 4, 5, 1'), (H-7/C-1~3), (H-1'/C-4~6, 2', 3'), (H-2'/C-1', 4', 15'), (H-4',5'/C-2'~8', 10', 11', 15'), (H-6'/C-4', 5', 8', 12'~14'), (H-8'/C-6', 7', 9', 14'), (H-9'/C-2'~8', 10', 11', 15), (H-10'/C-4', 5', 8', 12'~14'), (H-12'/10', 11', 13'), (H-13',14'/C-6'~8', 11', 12'), (H-15'/C-2'~4')의 correlation이 관찰되었고 (Fig. 8-12, Table 1), farnesyl unit는 sesquiterpene quinone,²⁴ grifolin²⁶의 data와 비교하여 추정하였다.

이상의 물리/화학적 data를 종합해 볼 때 577M3.2는 sesquiterpene quinone 류의 triprenylated hydroquinone의 화합물임이 추정되고, 이러한 추정은 577M3.2의 UV spectrum [206 nm (ϵ 12,000), 294 nm (2,000)]과 잘 일치하였고 (Fig. 13), 577M3.1의 data와 매우 유사함이 관찰 되었다.^{14,15,23,24,26}

이러한 물리/화학적 성질 및 분광학적 분석결과에 의해 577M3.2의 구조는 2-methyl-5-(3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatrienyl)-1,4-hydroquinone로 결정하였다 (Fig. 19).

577M3.2는 natural source에서 처음으로 분리하였으며, 그 origin을 명확히

하여, 이들 quinone류의 biogenesis에 대한 기초 자료로서 그 의의가 있다. 또한 이들 quinone류 및 그 유도체들은 동물, 식물 및 미생물 등에서 다양하게 분리되고 있으나, 해양진균에서 처음으로 분리되어, 고등동물 및 식물에서의 대사 생산에 균류 등의 미생물이 관여 할 수 있다는 하나의 예를 제공할 수 있다. 577M3.2의 라디칼 소거 활성능을 조사한 결과 vitamine C [$IC_{50} = 5$ mg/mL, (28.4 μ M)] 보다 더 강한 활성 [$IC_{50} = 4.5$ mg/mL, (12 μ M)] 을 나타내었으며 577M3.2와 유사한 구조를 가진 moritoside라는 화합물은 현재 의약품에 쓰이고 있다⁴.

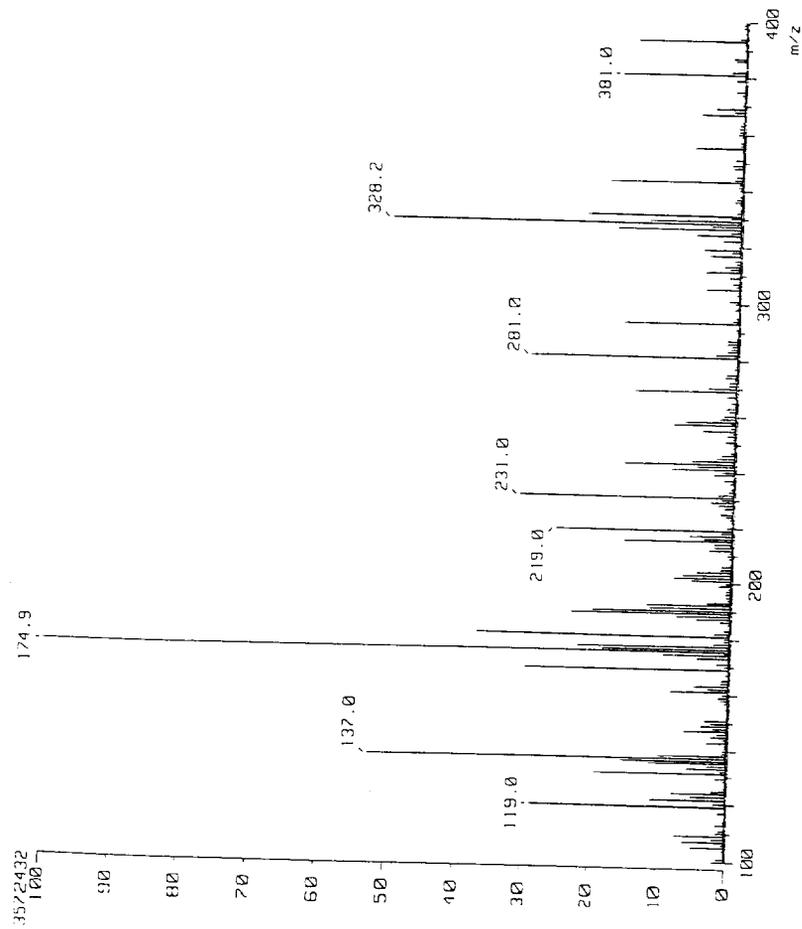


Fig. 6. EIMS spectrum of 577M3.2.

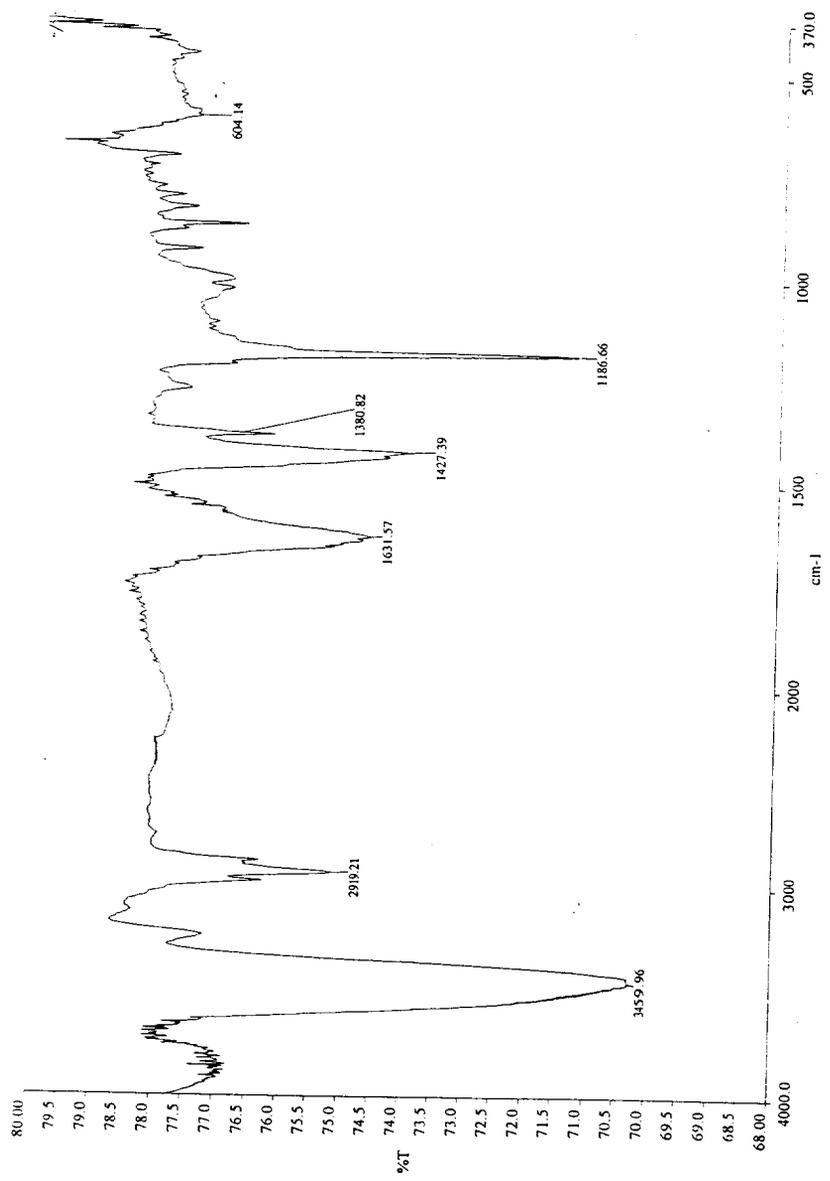


Fig. 7. IR spectrum (KBr) of 577M3.2.

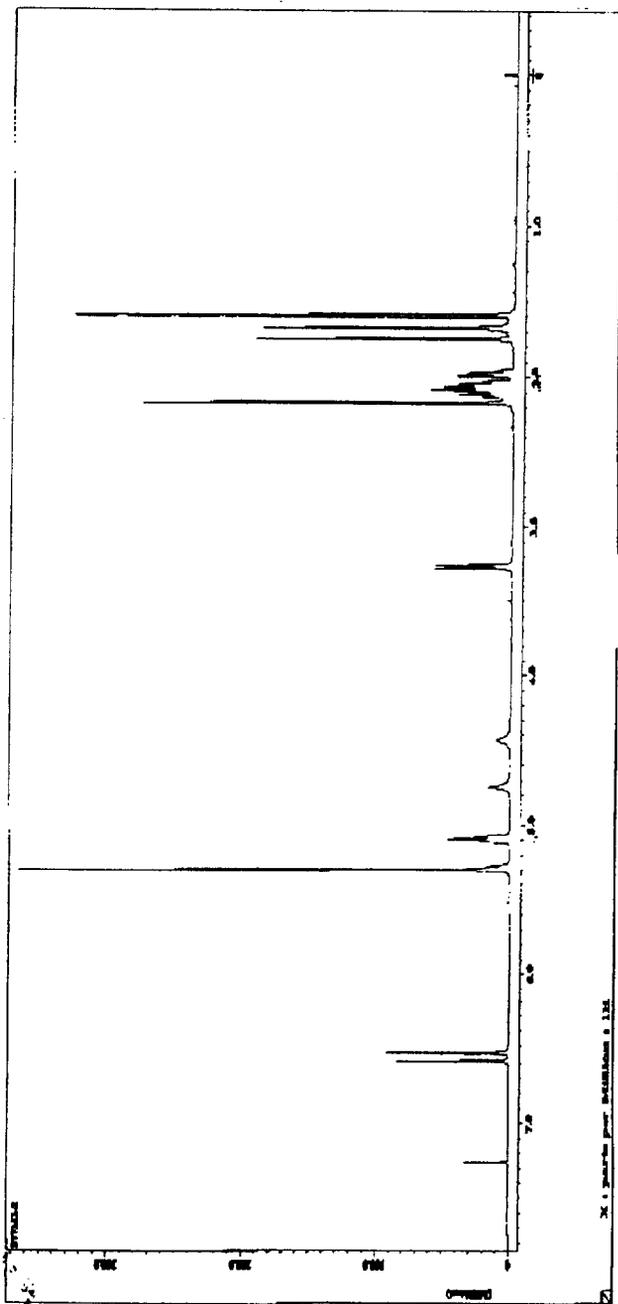


Fig. 8. ^1H -NMR spectrum(400MHz, CDCl_3) of 577M3.2

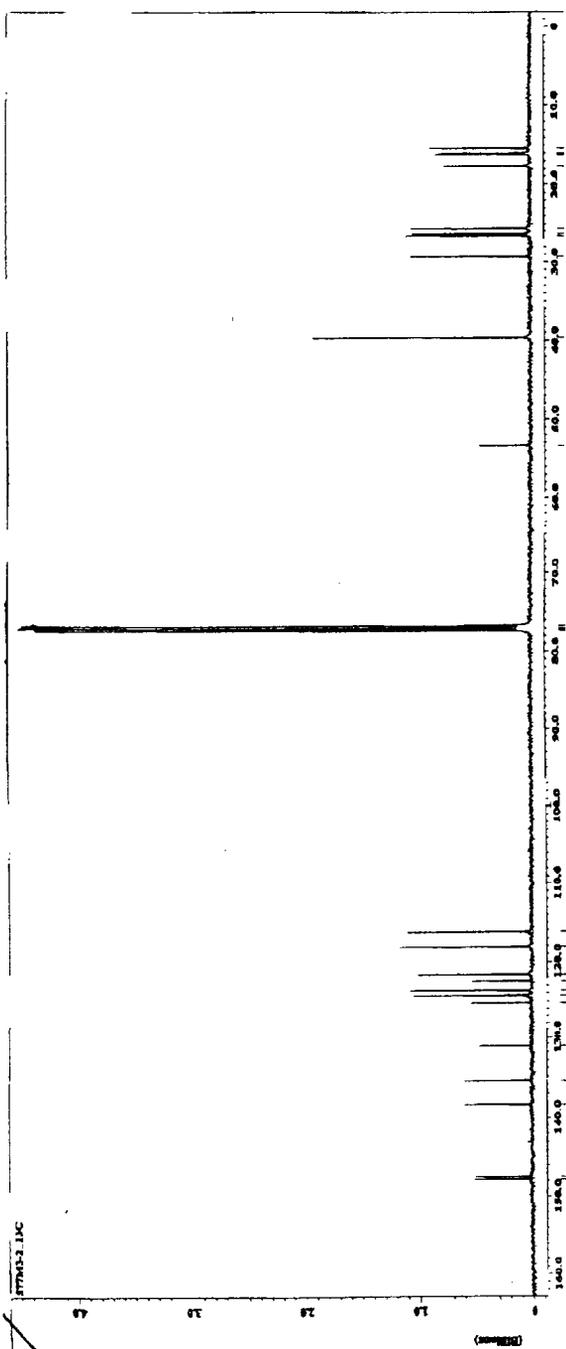


Fig. 9. ^{13}C -NMR spectrum(100MHz, CDCl_3) of 577M3.2

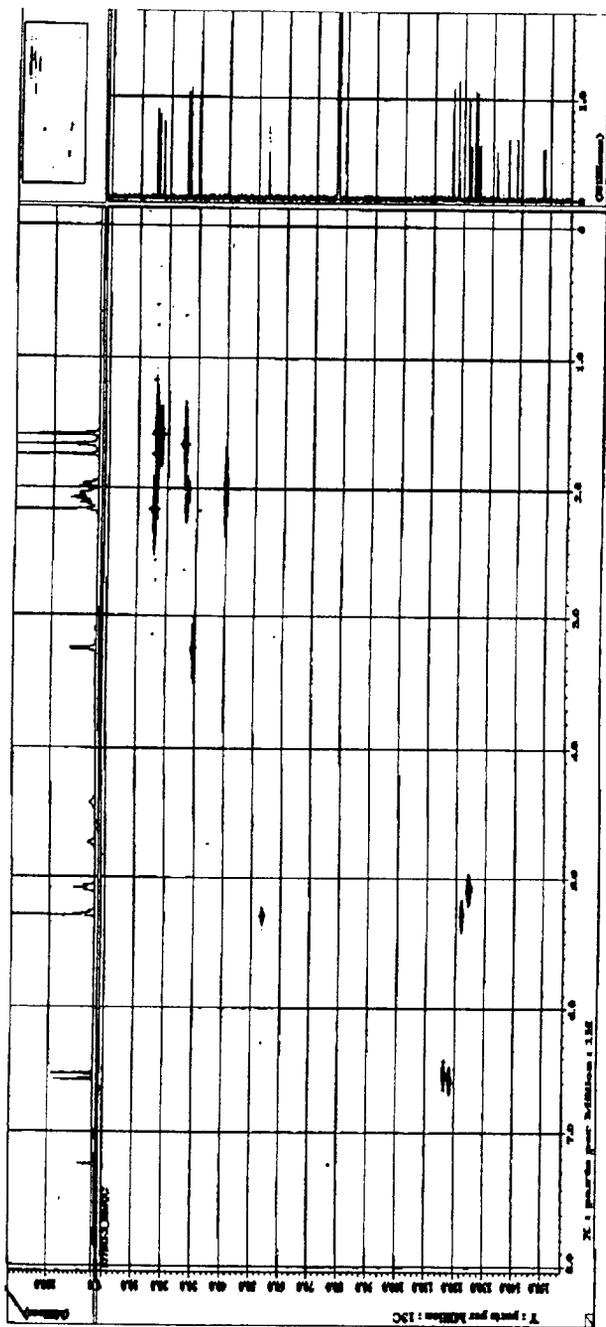


Fig. 11. HMQC spectrum(CDCl_3) of 577M3.2

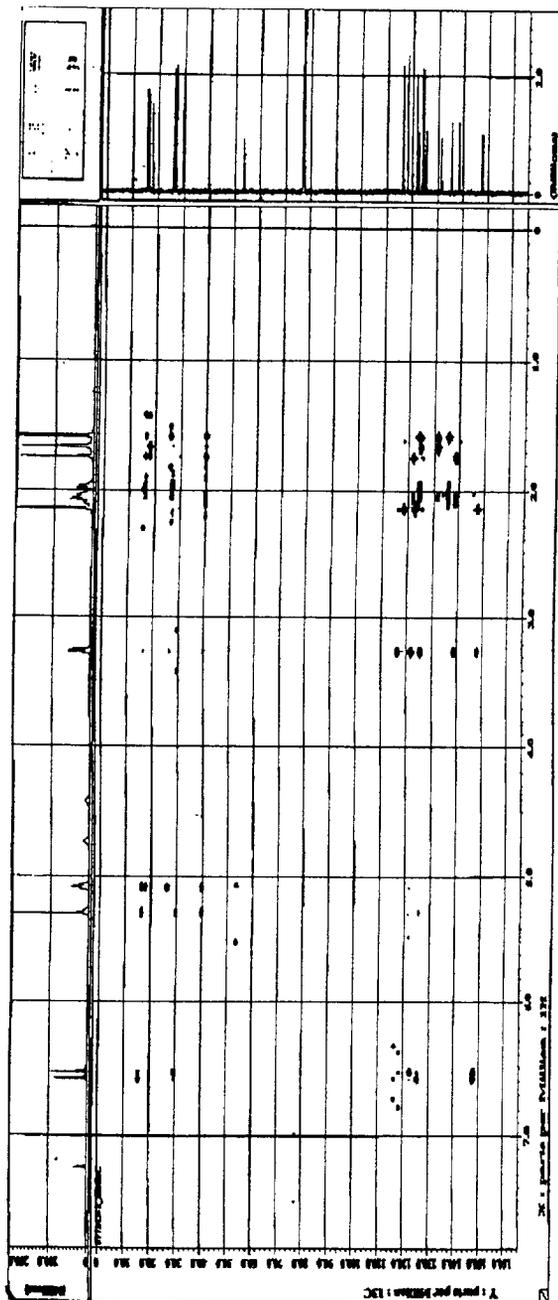


Fig. 12 HMBC spectrum(CDCl_3) of 577M3.2

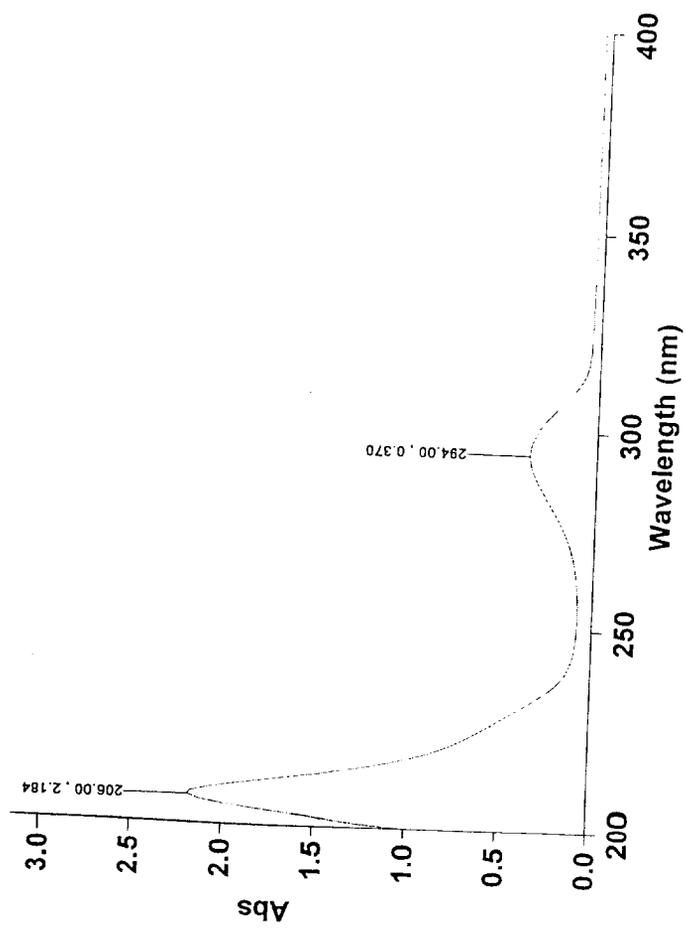


Fig. 13. UV/visible spectrum of 577M3.2.

Table 1. ^1H - and ^{13}C -NMR data for 577M3.2.

Carbon#	$\delta_{\text{H}}(\text{mult}, J(\text{Hz}))^2$	δ_{C}	Carbon#	$\delta_{\text{H}}(\text{mult}, J(\text{Hz}))^2$	δ_{C}
1		147.4(s) ³	4'	2.08(m)	39.7(t) ³
HO-1	4.43(br, s)		5'	20.8(m)	26.4(t)
2		122.5(s)	6'	5.09(dd, 7.0, 6.5)	123.7(d)
3	6.59(s)	118.1(d)	7'		135.5(s)
4		147.8(s)	8'	1.97(dd-like, 7.0, 8.0)	39.7(t)
HO-4	4.74(br, s)		9'	2.08(m)	26.7(t)
5		125.3(s)	10'	5.09(dd, 7.0, 6.5)	124.3(d)
6	6.54(s)	116.2(d)	11'		131.3(s)
7	2.17(s)	15.4(q)	12'	1.67(s)	25.7(q)
1'	3.27(d, 7.0)	29.3(t)	13'	1.59(s)	17.7(q)
2'	5.29(dd, 7.0, 6.2)	121.6(d)	14'	1.59(s)	16.0(q)
3'		138.3(s)	15'	1.75(s)	16.2(q)

¹Recorded in CDCl_3 at 400 MHz (^1H) and 100 MHz (^{13}C). Chemical shifts are relative to internal TMS ($\delta = 0$ ppm).

²Shown with clearly assignable signals.

³Multiplicities determined by DEPT spectrum.

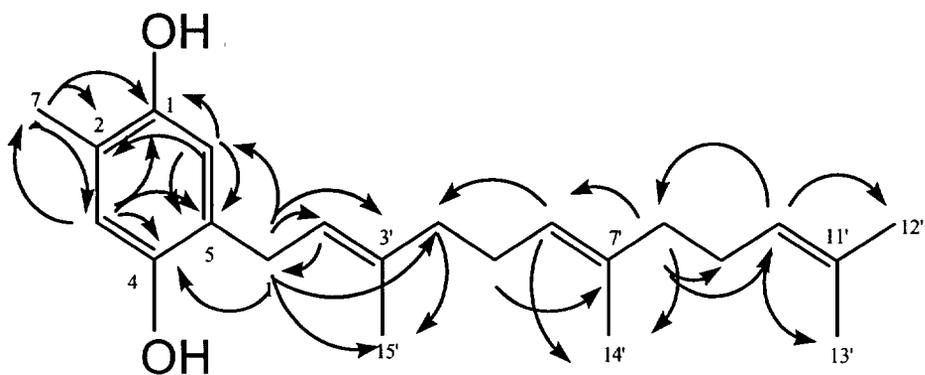


Fig. 14 . H-C long range correlations in HMBC for 577M3.2.

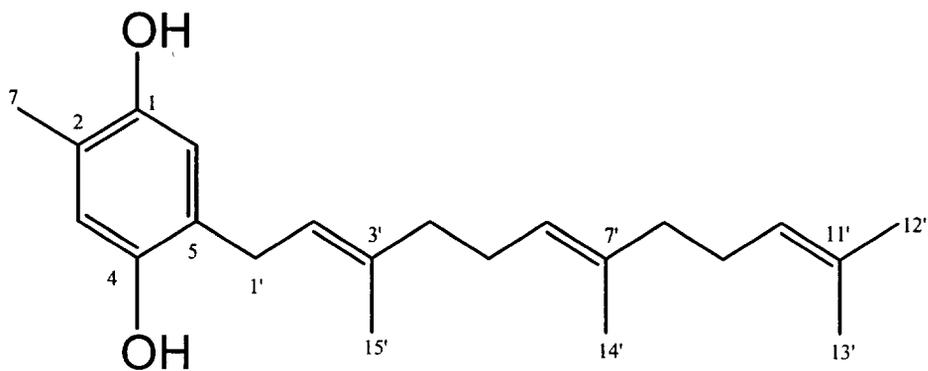


Fig. 15 . Chemical structure of 577M3.2.

(2) 577M3.1의 화학구조

577M3.1은 무색의 고체로서, 저분해능 EI 질량분석스펙트럼 (LR- EIMS)에서 분자량, 326 [M]⁺이 관찰되었다 (Fig. 16). 577M3.1은 ¹H, ¹³C NMR에서 aromatic 유래의 methylene, 3개의 olefinic methyls, ketone, polyene을 가진 quinone이라는 것이 추정되었다 (Fig. 17, 18, Table 2). 577M3.1의 ¹H, ¹³C NMR, MS, IR, 및 UV의 data를 sesquiterpene quinone의 data 와 비교 검토 결과^{23,24,25} 잘 일치하여, 그 화학구조를 5-farnesyl-2methyl-p-benzoquinone으로 동정 하였다 (Fig. 19).

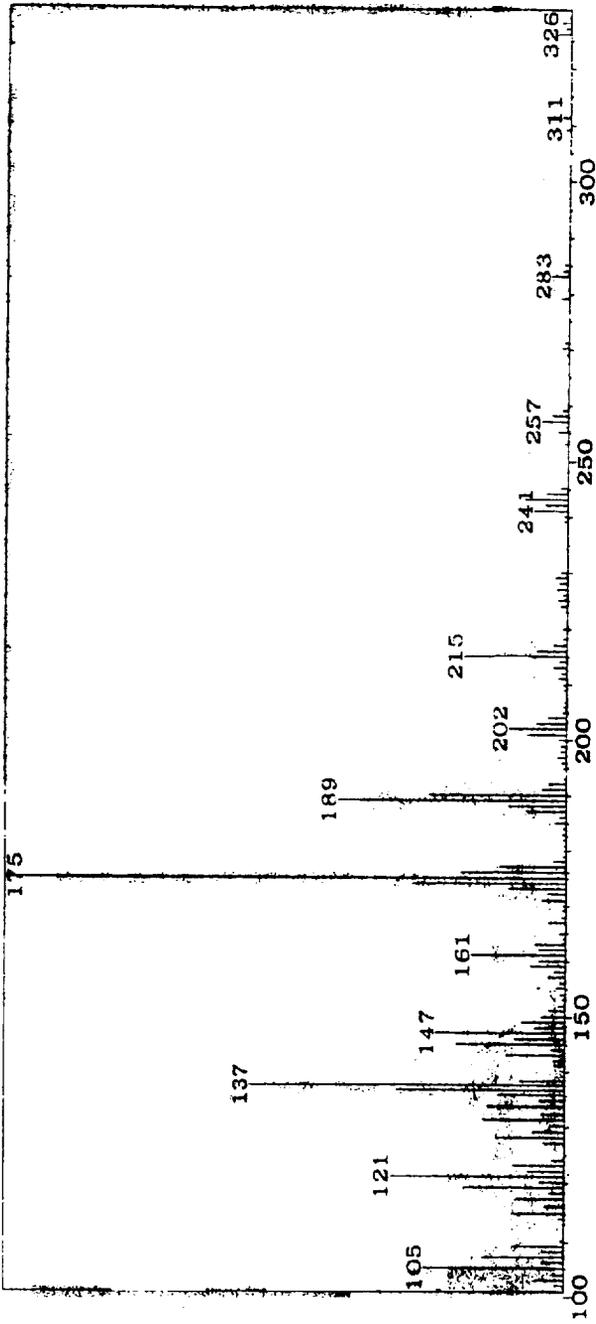


Fig. 16. EI MS spectrum of 577M3.1

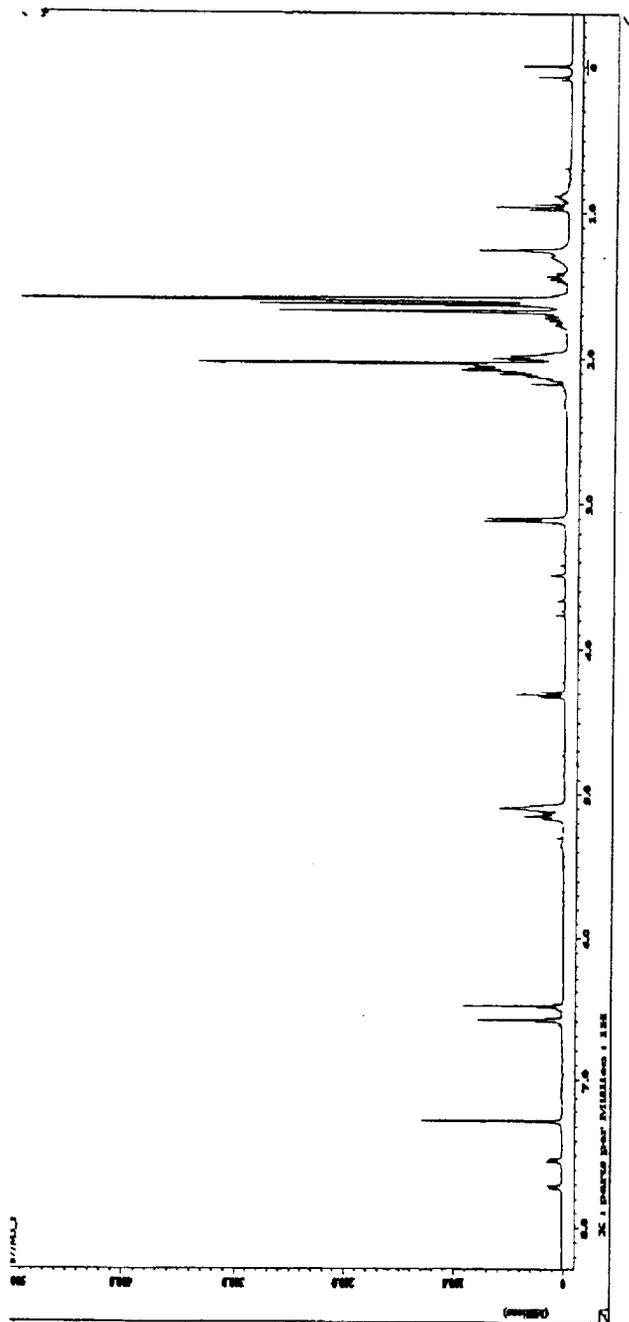


Fig. 17. $^1\text{H-NMR}$ spectrum (400MHz, CDCl_3) of 577M3.1

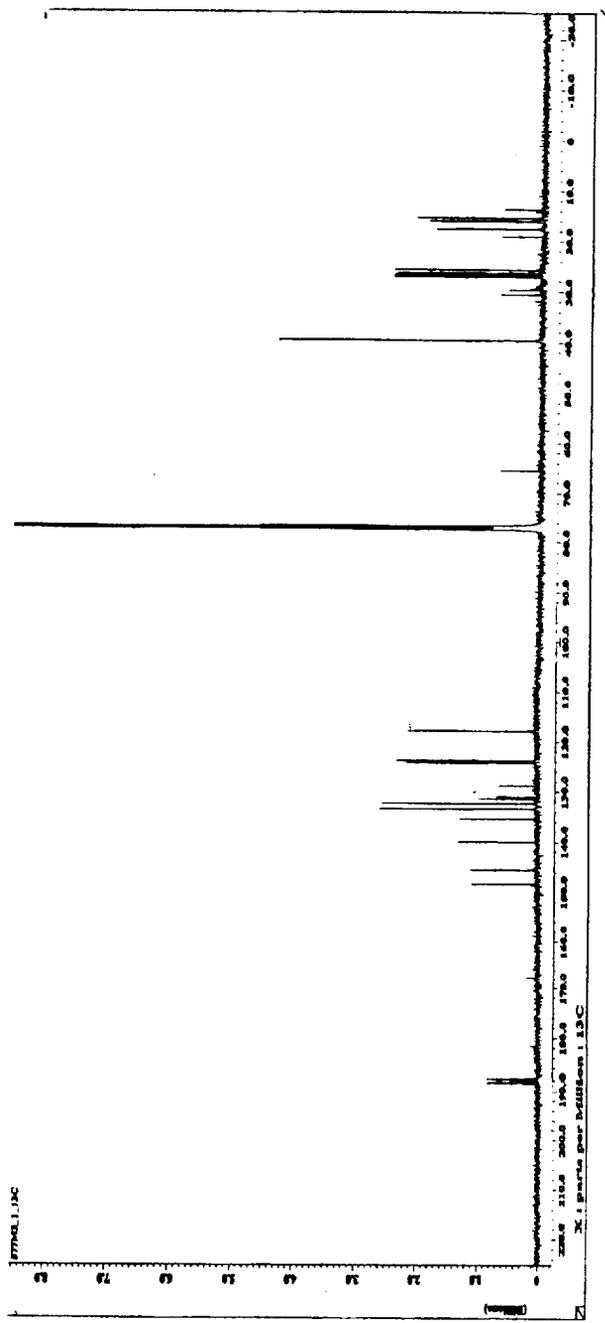


Fig. 18. ^{13}C -NMR spectrum(100MHz, CDCl_3) of 577M3.1

Table 2. ^1H and ^{13}C NMR data for 577M3.1.²⁵

Carbon#	δ_{H} (mult, J (Hz)) ²	δ_{C}	Carbon#	δ_{H} (mult, J (Hz)) ²	δ_{C}
1		188.4(s) ³	5'	1.98(m)	26.4 (t) ³
2		145.6(s)	6'	5.09(dd, 7.0, 6.5)	123.3 (d)
3	6.59(s)	132.3(d)	7'		135.4 (s)
4		187.9(s)	8'	1.97(dd-like, 7.0, 8.0)	39.6 (t)
5		148.4(s)	9'	1.98(m)	26.7 (t)
6	6.50(s)	133.5(d)	10'	5.09(dd, 7.0, 6.5)	124.3 (d)
7	2.05(s)	15.5(q)	11'		131.3 (q)
1'	3.11(d, 7.0)	27.1(t)	12'	1.62(s)	25.7 (q)
2'	5.15(dd, 7.0, 6.2)	117.9(d)	13'	1.60(s)	17.7 (q)
3'		139.9(s)	14'	1.60(s)	16.1 (q)
4'	1.98(m)	39.6(t)	15'	1.68(s)	16.0 (q)

¹Recorded in CDCl_3 at 400 MHz (^1H) and 100 MHz (^{13}C). Chemical shifts are relative to internal TMS ($\delta = 0$ ppm).

²Shown with clearly assignable signals.

³Multiplicities determined by DEPT spectrum.

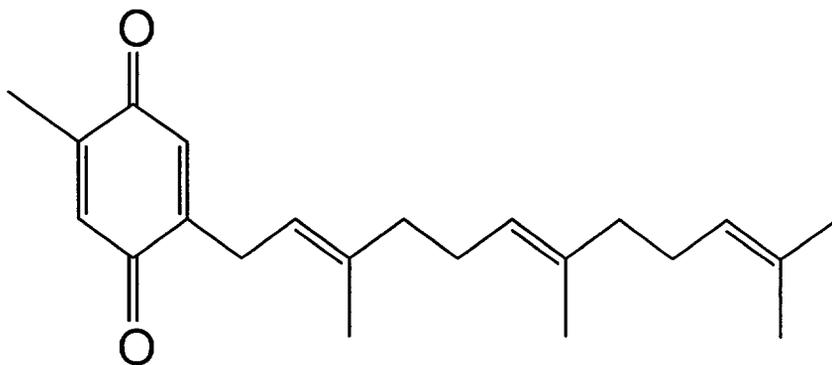


Fig. 19 . Chemical structure of 577M3.1.

(3) 577M2PH7의 화학구조

577M2PH7은 갈색의 오일로서 ^{13}C NMR, 저분해능 및 고분해능 FAB 질량 분석스펙트럼 (LR- and HR-FABMS)에서 $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_2\text{N}_5$ 의 원소 조성이 관찰되었다 (Fig. 20). 577M2PH7은 IR 스펙트럼에서 amine (3343 cm^{-1}), amide (1683 cm^{-1})의 존재가 추정되었다 (Fig. 21). 그리고 ^1H , ^{13}C NMR 스펙트럼에서 aromatic proton (δ_{H} 6.55, 6.53, 6.63, 6.04), 2개의 methyl (δ_{H} 0.93, 1.06), amide 유래의 proton (δ_{H} 10.00), amine 유래의 proton (δ_{H} 6.01), imidazole proton (δ_{H} 7.31, 7.73), exocyclic double bond (δ_{H} 6.04, 5.08)가 관찰 되었으며 (Fig. 22, 23), DEPT 스펙트럼에서 1차 탄소 ($-\text{CH}_3$)원자단이 2개, 2차 탄소 ($-\text{CH}_2$)원자단이 2개, 3차 탄소 ($-\text{CH}$)원자단이 10개, 4차 탄소 ($-\text{C}$)원자단이 7개 (Fig. 24), HMQC, HMBC 스펙트럼에서 (H-22/C-10b, 11a, 21, 18), (H-21/10b, 11a, 18, 22), (H-11/10b, 11a, 8), (H-11a/C-11, 1), (H-20/C-1, 18), (H-5a/C-6a, 8, 10b, 11a, 18), (H-12/C-6a, 8, 9), (H-9/C-8, 12), (H-10a/C-8, 10, 10b), (H-10/C-10b, 10a)의 correlation이 관찰되었다 (Fig. 25, 26, Table, 3). 이상의 물리/화학적 data를 종합해 볼 때 577M2PH7은 diketopiperazine류²⁷⁻³¹의 화합물이라고 추정되었고, 577M2PH7의 UV 스펙트럼 [206 nm (ϵ 80,610), 238 nm (39,864), 324 nm (53,890)]과 잘 일치하였다 (Fig. 27). 577M2PH7의 ^1H , ^{13}C NMR, MS, IR 및 UV data를 roquefortine의 data와 비교 검토한 결과 잘 일치하여, 그 화학구조를 roquefortine으로 동정다^{27 30} (Fig. 29).

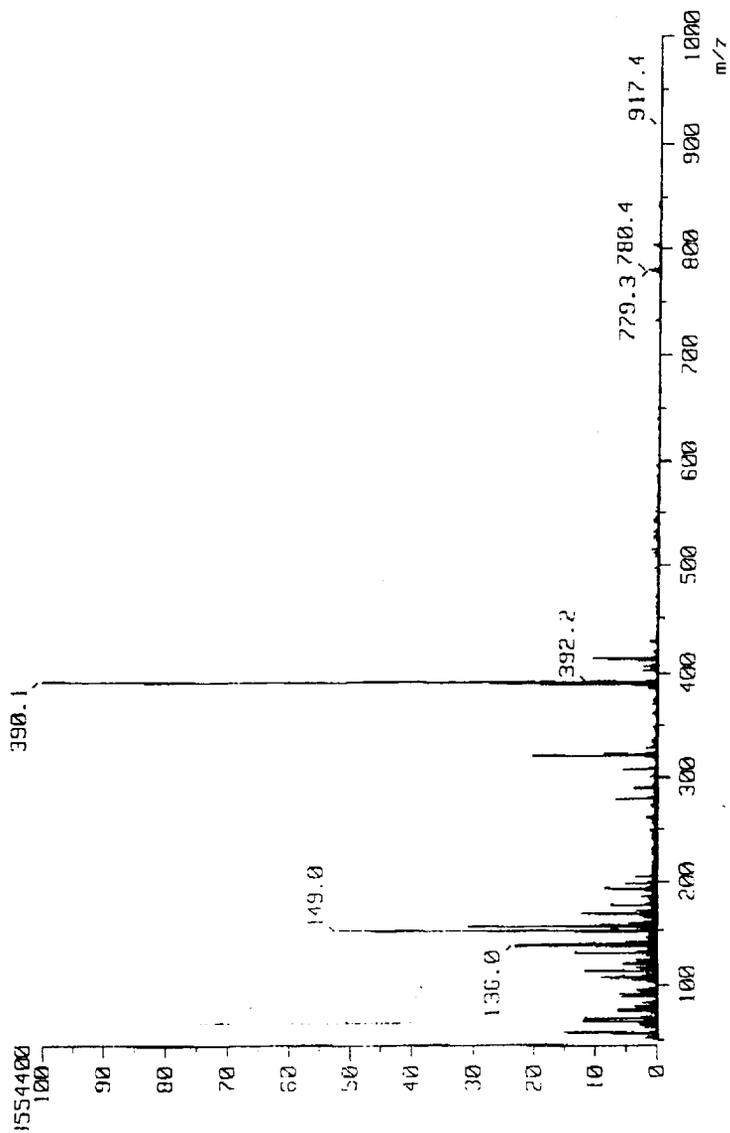


Fig. 20. FAB MS spectrum of 577M2PH7.

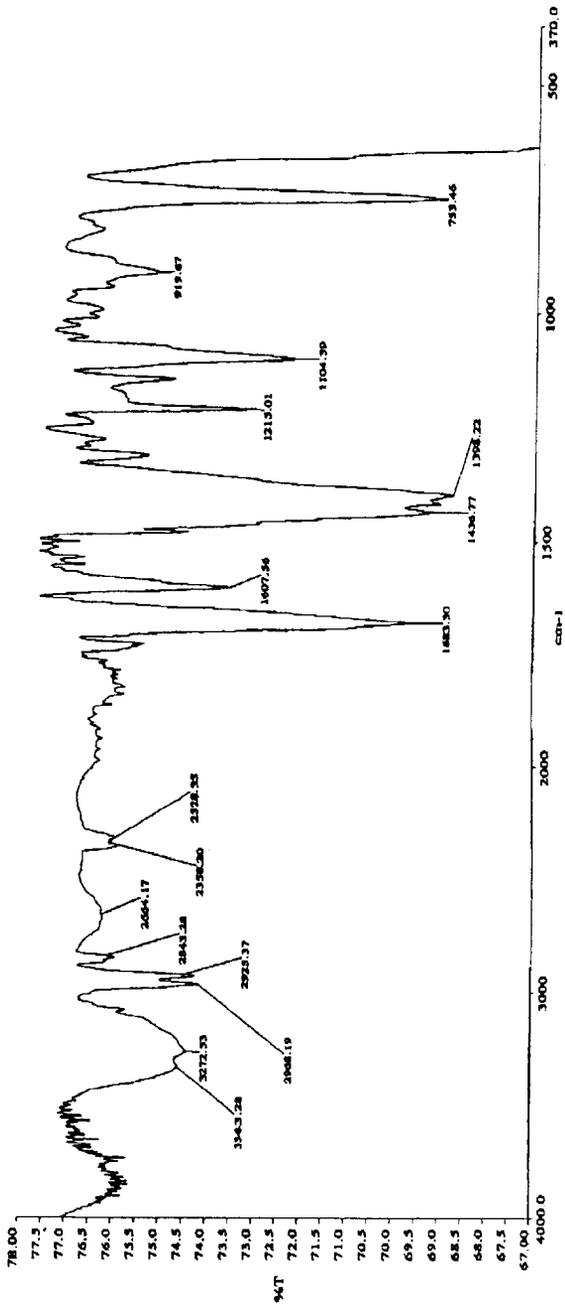


Fig. 21. IR spectrum(Neat) of 577M2PH7.

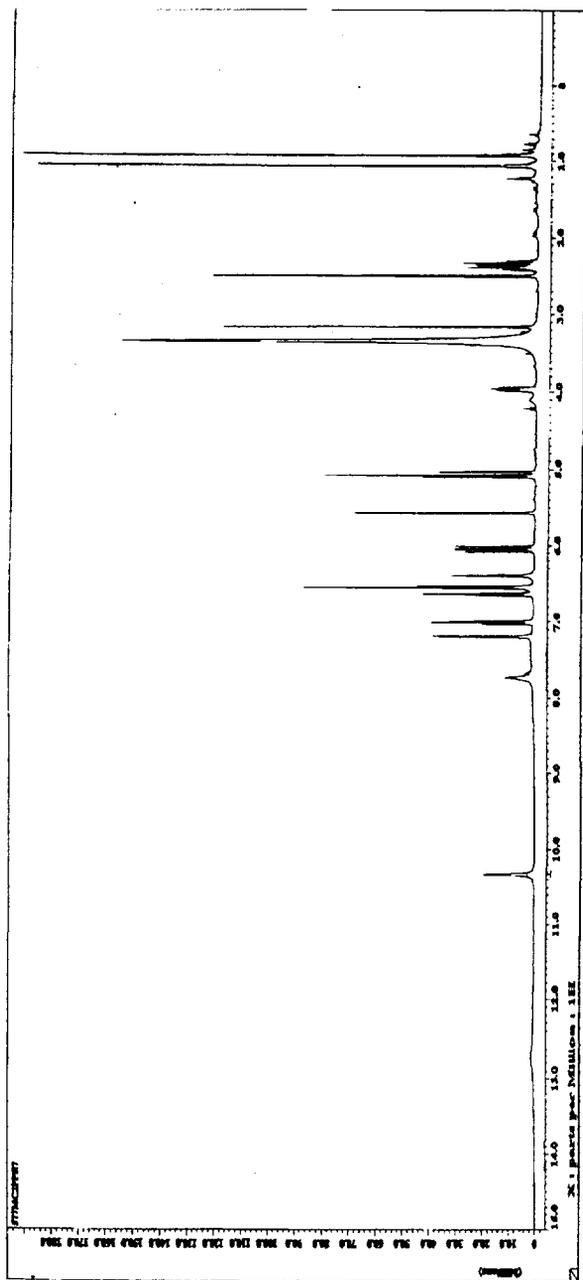


Fig. 22. $^1\text{H-NMR}$ spectrum(400MHz, DMSO) of 577M2PH7.

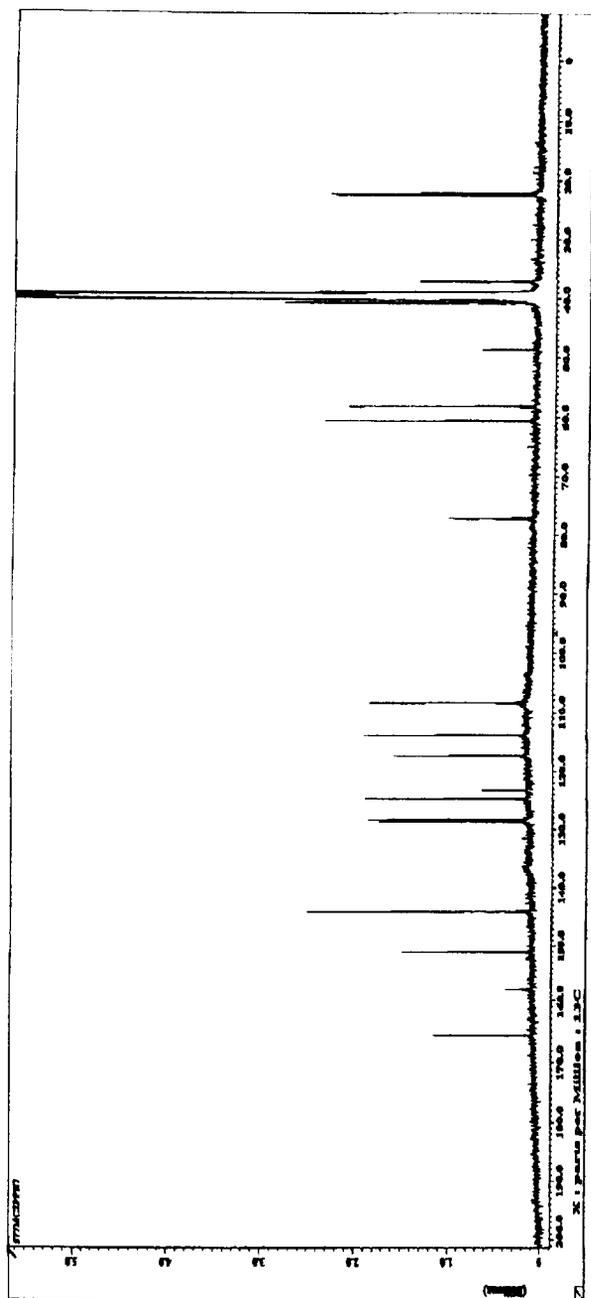


Fig. 23. ^{13}C -NMR spectrum(100MHz,DMSO) of 577M2PH7.

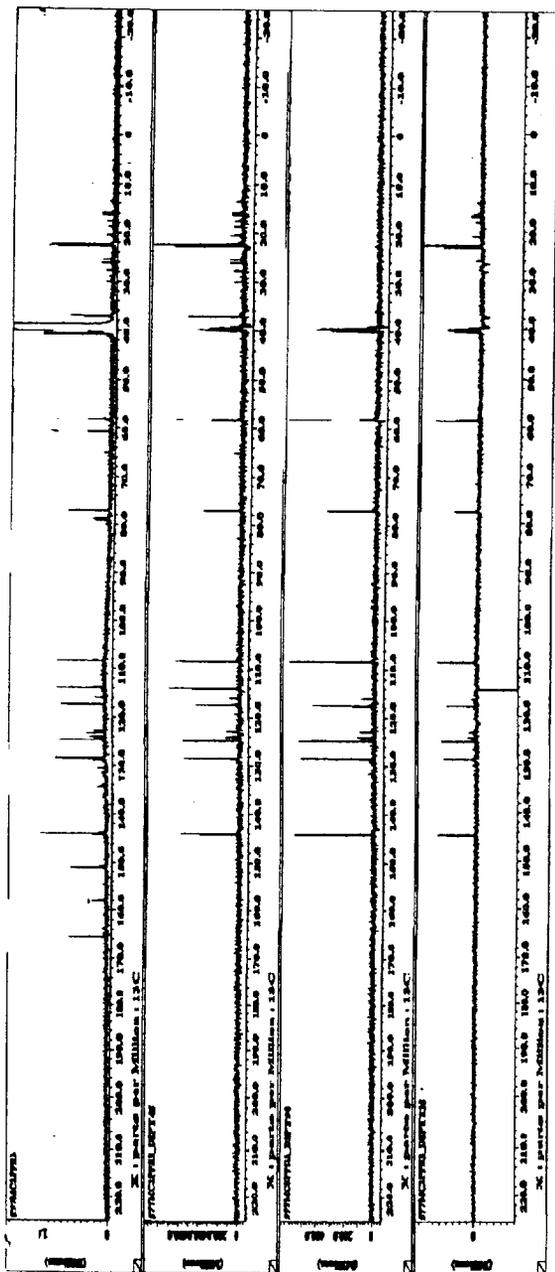


Fig. 24. DEPT spectrum(DMSO) of 577M2PH7.

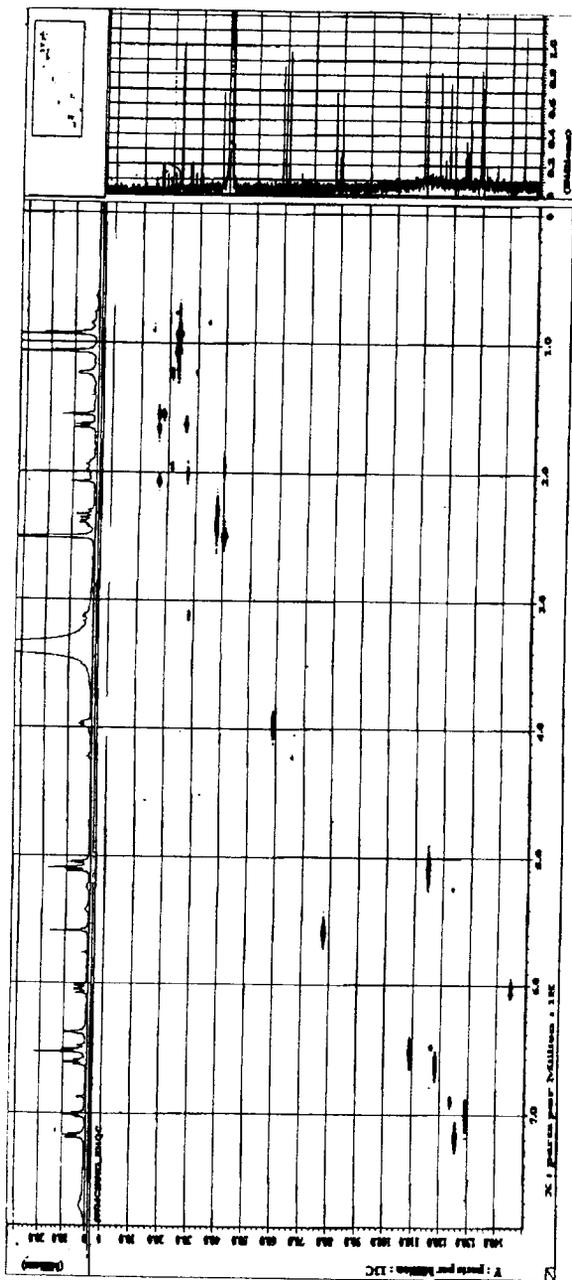


Fig. 25. HMQC spectrum(DMSO) of 577M2PH7.

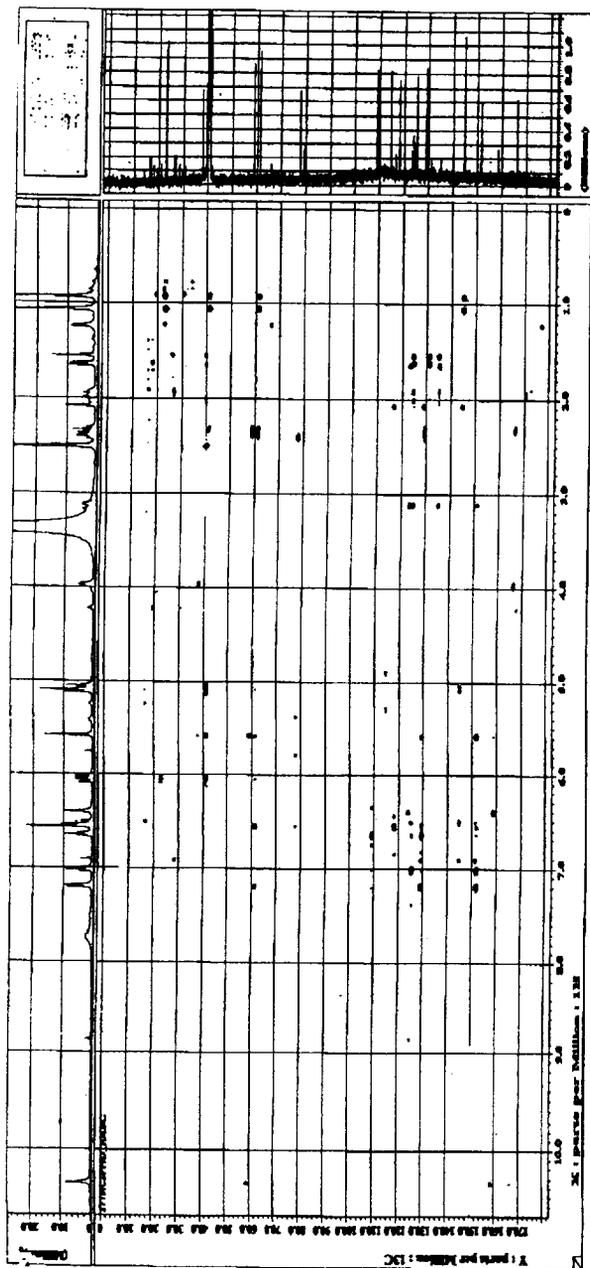


Fig. 26. HMBC spectrum (DMSO) of 577M2PH7.

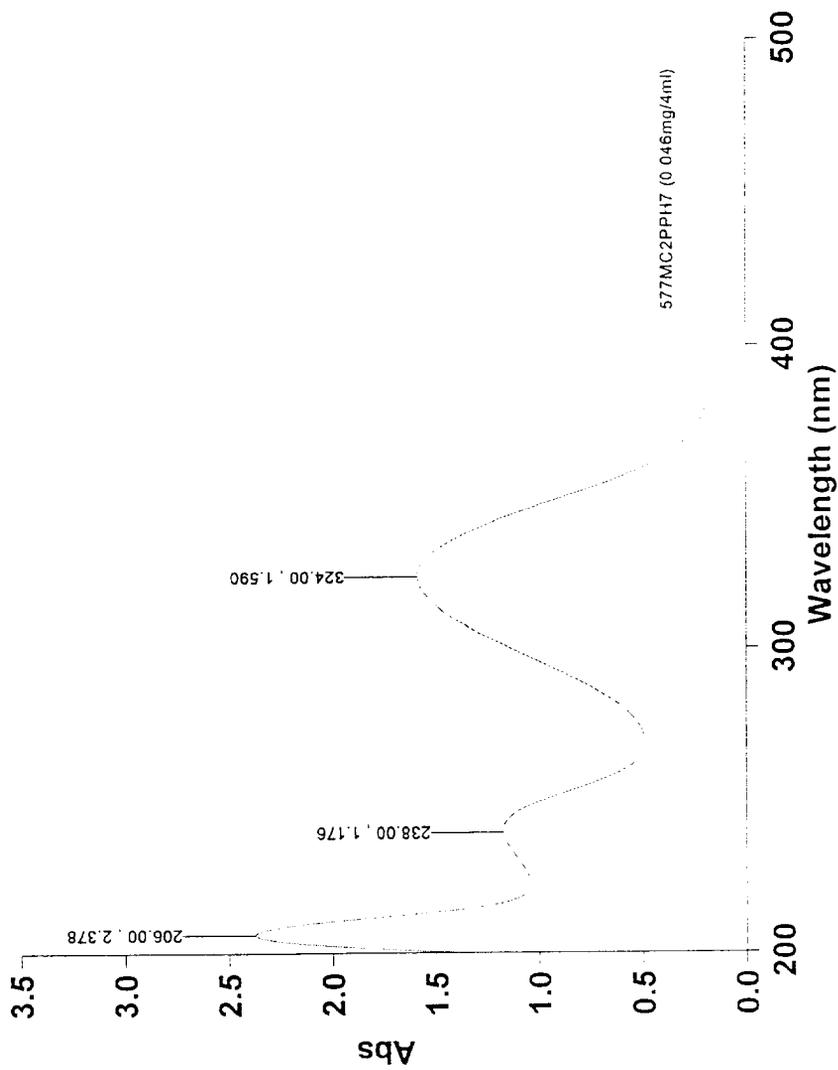


Fig. 27. UV/visible spectrum of 577M2PH7.

Table 3. ¹H- and ¹³C-NMR data for 577M2PH7.

Carbon#	δ_{H} (mult, J (Hz)) ²	δ_{C}	Carbon#	δ_{H} (mult, J (Hz)) ²	δ_{C}
1		166.9(s) ³	11	2.38 (t,12.3,6.1)	36.7(t) ³
NH-2	10.00 (s)		11a	3.97 (dd,11.2,11.1)	58.8(d)
3		122.0(s)	12	6.55 (s)	109.1(d)
4		159.4(s)	13		125.6(s)
5a	5.27 (s)	78.4(d)	NH-14	6.01 (s)	
NH-6	6.01 (s)		15	7.73 (s)	136.5(d)
6a		149.9(s)	17	7.31 (m)	134.3(d)
7	6.55 (s)	109.1(d)	18		40.0(s)
8	6.53 (dd,12.6,8.0)	128.4(d)	19	6.04 (dd,10.8,10.6)	144.1(d)
9	6.63 (t,7.3,7.5)	119.1(d)	20	5.08 (dd,12.3,2.1)	113.9(t)
10	6.04 (dd,10.8,10.6)	143.3(d)	21	0.93 (s)	22.5(q)
10a		129.1(s)	22	1.06 (s)	22.6(q)
10b		61.5(s)			

¹Recorded in DMSO at 400 MHz (¹H) and 100 MHz (¹³C). Chemical shifts are relative to internal DMSO ($\delta = 25.5$ ppm).

²Shown with clearly assignable signals.

³Multiplicities determined by DEPT spectrum.

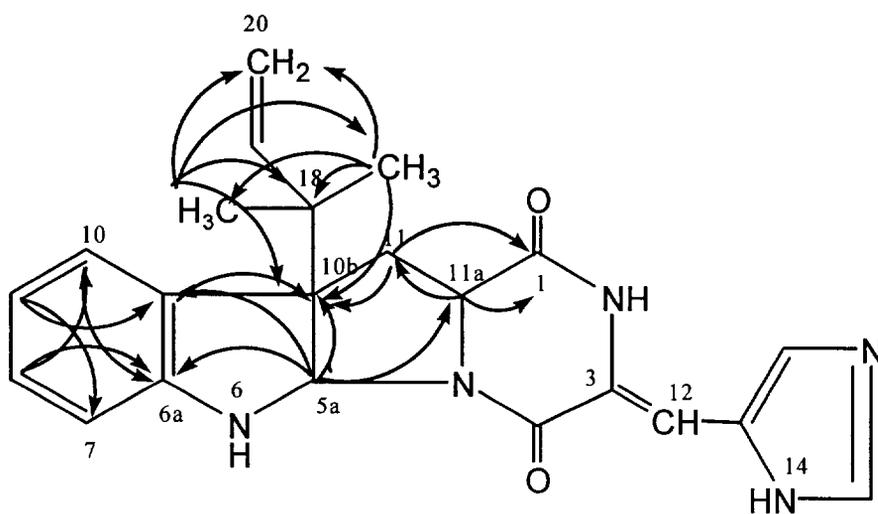


Fig. 28 . H-C long range correlations in HMBC for 577M2PH7.

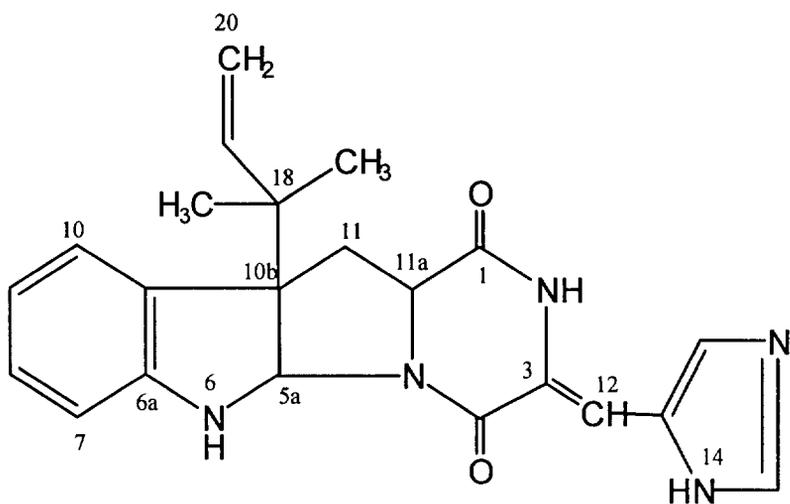


Fig. 29 . Chemical structure of 577M2PH7.

2. 해양진균 MFA143 대사성분의 화학구조

(1) 143B3P3.4의 화학구조

143B3P3.4는 갈색의 오일로서 ^{13}C NMR, 저분해능 EI 질량분석스펙트럼 (LR-EIMS)에서 $\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_2$ 의 원소 조성이 관찰되었다 (Fig. 30). 143B3P3.4은 IR 스펙트럼에서 hydroxyl (3294 cm^{-1}), amide (1657 cm^{-1})의 존재가 추정되었다 (Fig. 31). 그리고 ^1H , ^{13}C NMR spectrum에서 1,4-disubstitute된 olefinic proton ($\delta_{\text{H}} 7.19 \times 2, 6.76 \times 2$), N-formyl protin ($\delta_{\text{H}} 9.84$) (Fig. 32, 33), DEPT spectrum에서 3차 탄소 (-CH)원자단이 7개, 4차 탄소 (-C)원자단이 2개 (Fig. 34), HMBC, HMQC spectrum에서 (H-2, 6/C-3, 4, 5, 7), (H-3, 5/C-1, 2, 4, 6), (H-7/C-1, 2, 6, 8), (H-8/C-1, 7, 9), (H-9/C-8)의 correlation이 관찰되었다 (Fig. 35, 36, Table 4). 이러한 추정은 143B3P3.4의 UV spectrum [202 nm ($\epsilon 5,137$), 216 nm (4,556), 281 nm (5,587)]과 잘 일치하였다 (Fig. 37).

이상의 물리/화학적 성질 및 분광학적 분석결과에 의해 143B3P3.4의 구조는 N-[2-(4-Hydroxyphenyl)ethenyl]formamide라는 것이 판명이 되었다 (Fig. 39).

한편 143B3P3.4와 유사한 구조를 가진 화합물은 *Streptomyces amakusaensis*에서 분리한 Tuberin,³³ *Aspergillus fumigatus*에서 분리한 WF-5239³⁴가 보고되었다.

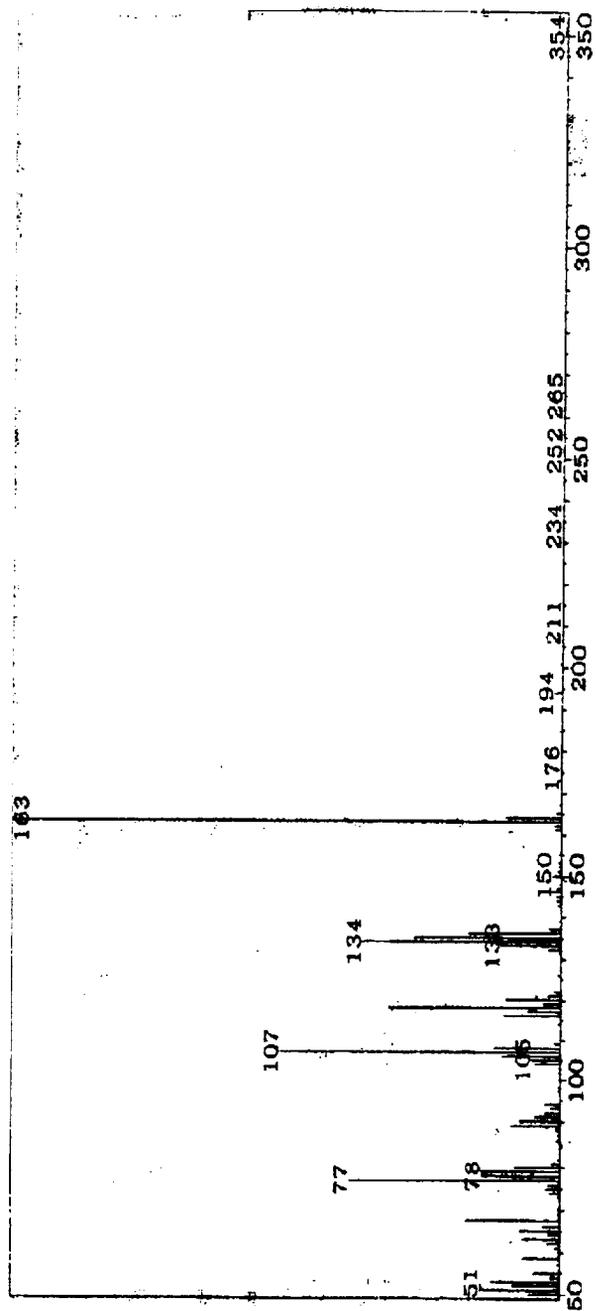


Fig. 30. EI MS spectrum of 143B3P3.4.

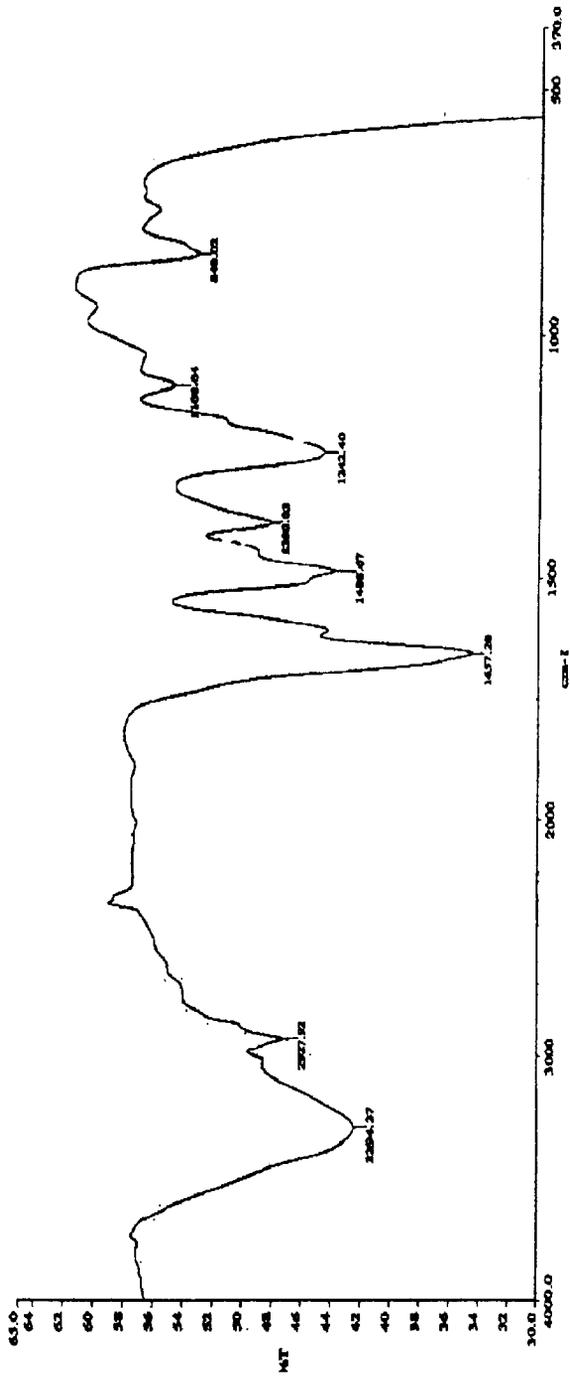


Fig. 31. IR spectrum(Neat) of 143B3P3.4.

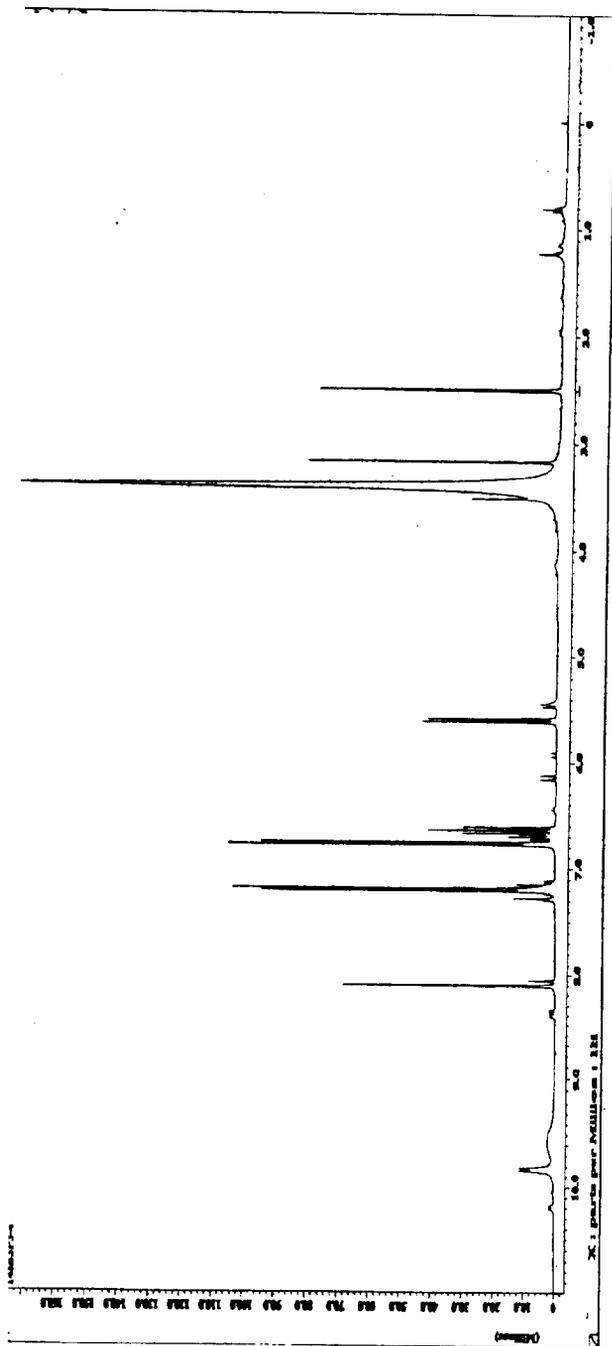


Fig. 32. $^1\text{H-NMR}$ spectrum(400MHz, DMSO) of 143B3P3.4.

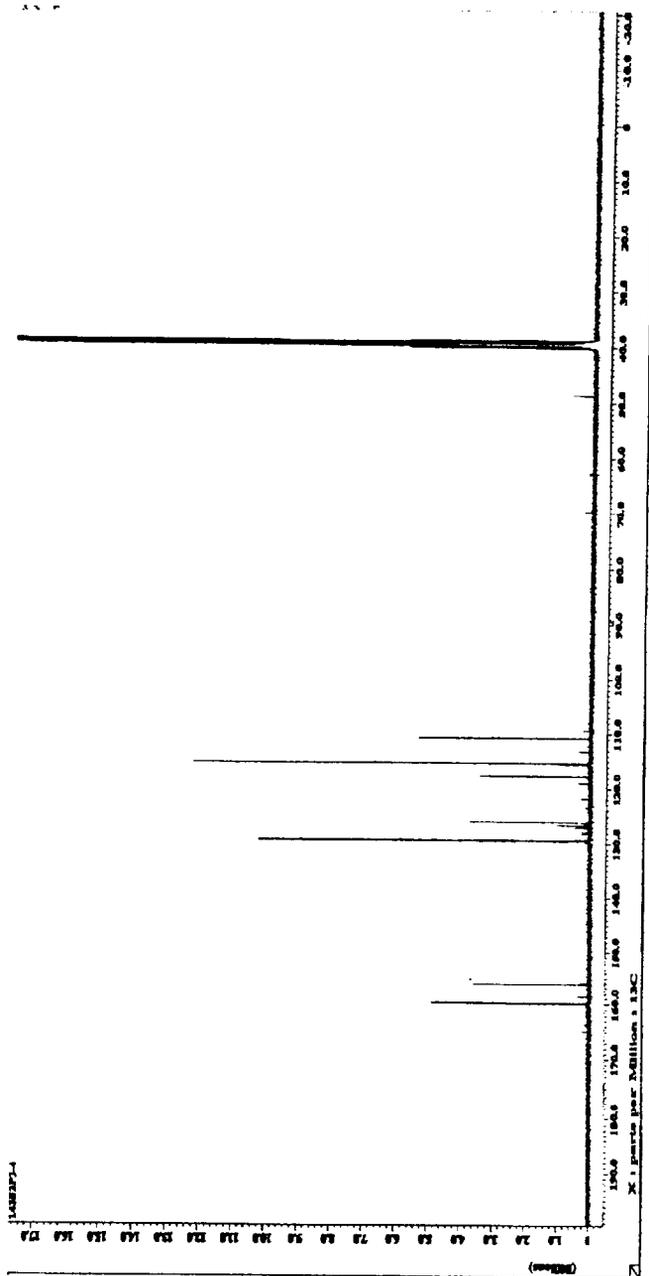


Fig. 33. ^{13}C -NMR spectrum (100MHz, DMSO) of 143B3P3.4.

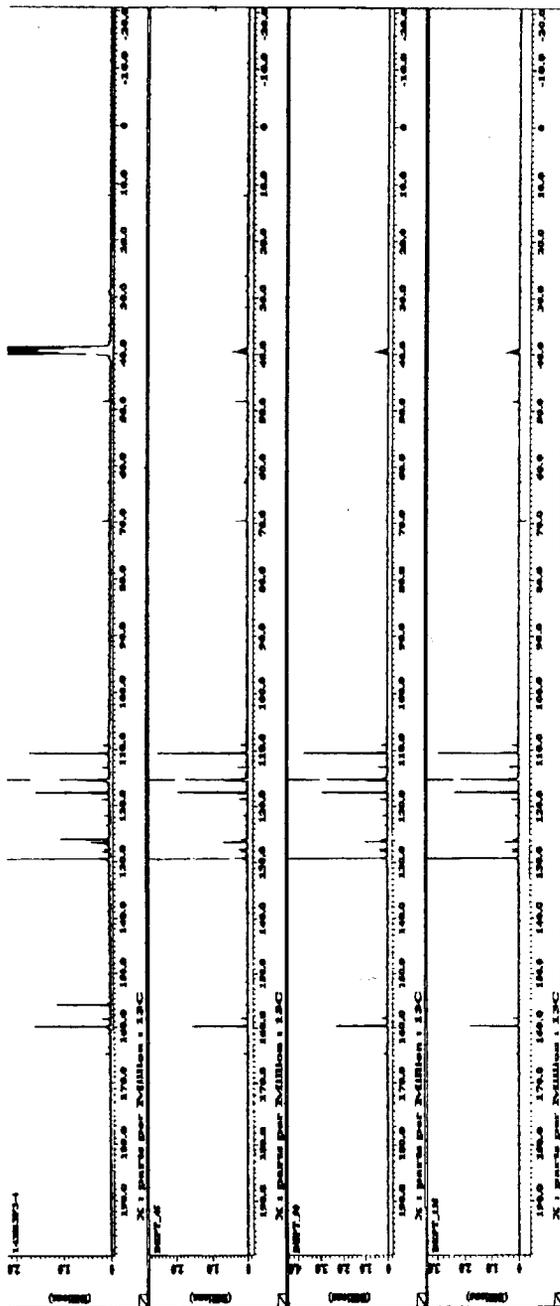


Fig. 34. DEPT spectrum(DMSO) of 143B3P3.4.

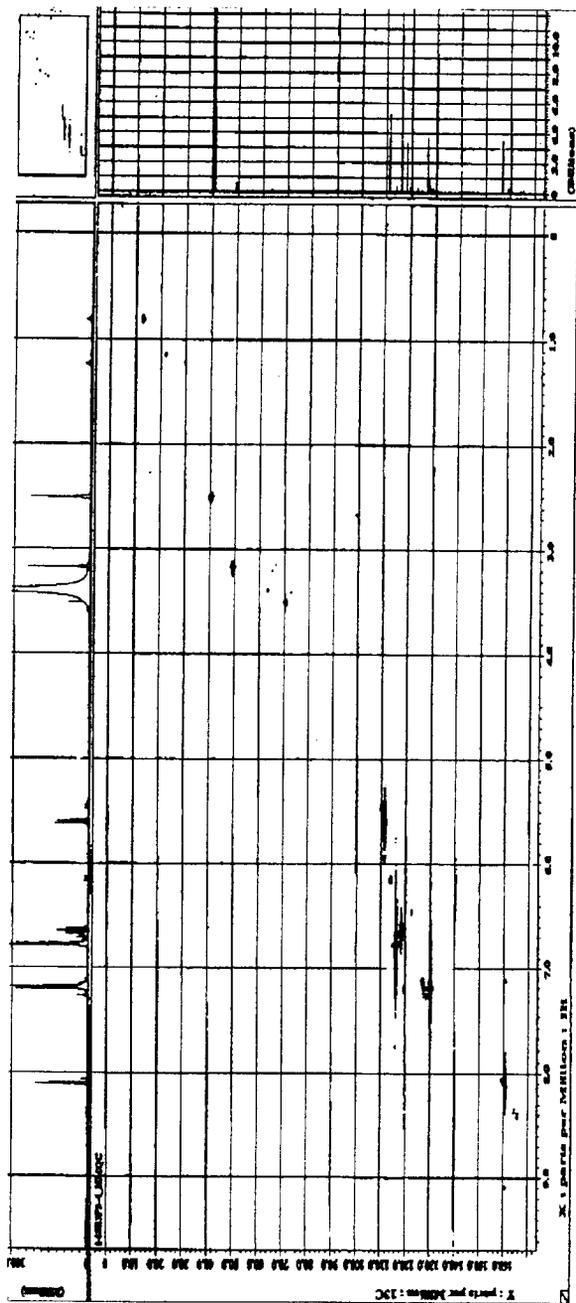


Fig. 35. HMQC spectrum(DMSO) of 143B3P3.4.

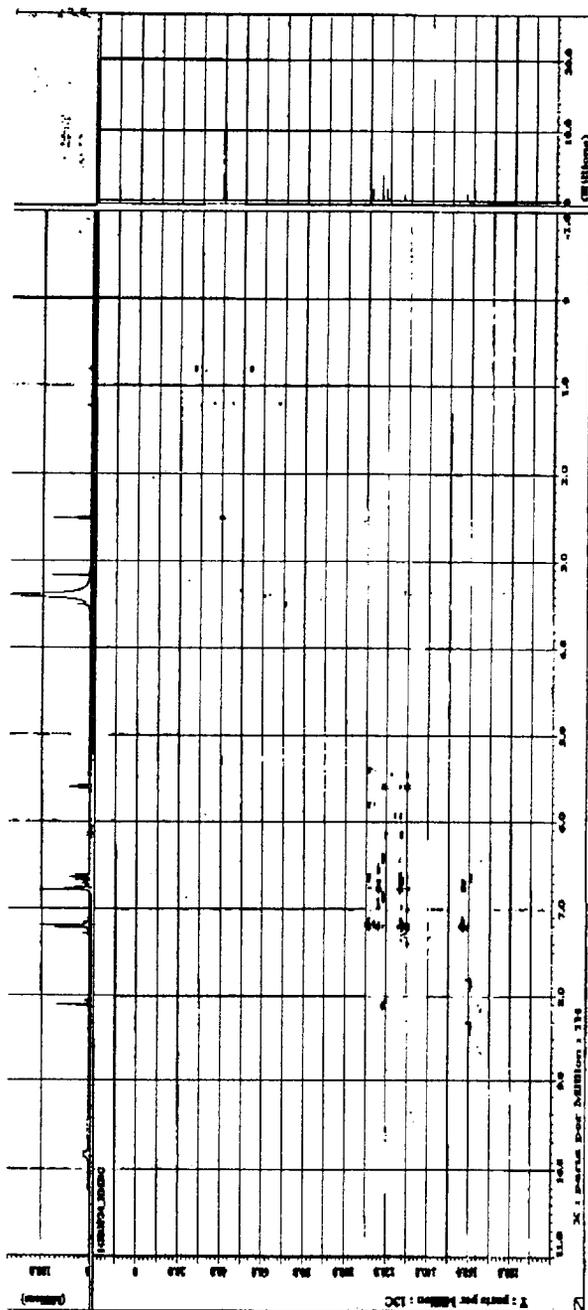


Fig. 36. HMBC spectrum(DMSO) of 143B3P3.4.

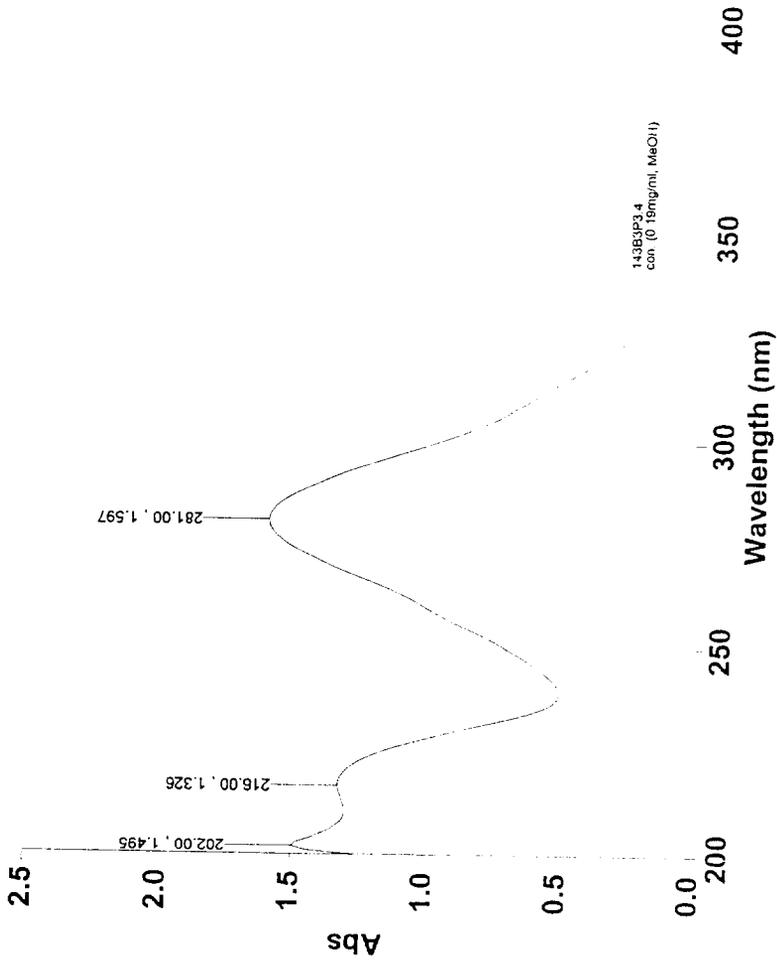


Fig. 37. UV/visible spectrum of 143B3P3.4.

Table 4. ^1H and ^{13}C NMR data for 143B3P3.4.³⁴

Carbon#	δ_{H} (mult, J (Hz)) ²	δ_{C}
1		156.2 (s)
2	7.19 (d, 8.5)	129.5 (d)
3	6.76 (d, 8.7)	115.3 (d)
4		126.0 (s)
5	6.76 (d, 8.7)	115.3 (d)
6	7.19 (d, 8.5)	129.5 (d)
7	5.61 (d, 9.8)	110.8 (d)
8	6.63 (t, 10.4, 10.7)	117.7 (d)
9	9.84 (s)	
10	9.81 (s)	159.9 (d)

¹Recorded in DMSO at 400 MHz (^1H) and 100 MHz (^{13}C). Chemical shifts are relative to internal DMSO ($\delta = 25.5$ ppm).

²Shown with clearly assignable signals.

³Multiplicities determined by DEPT spectrum.

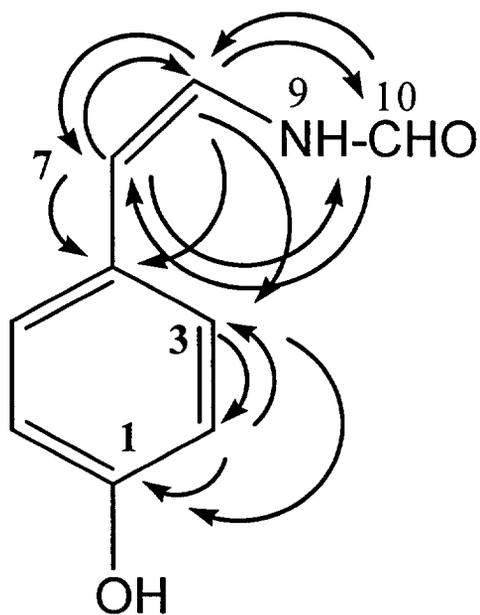


Fig. 38 . H-C long range correlations in HMBC 143B3P3.4.

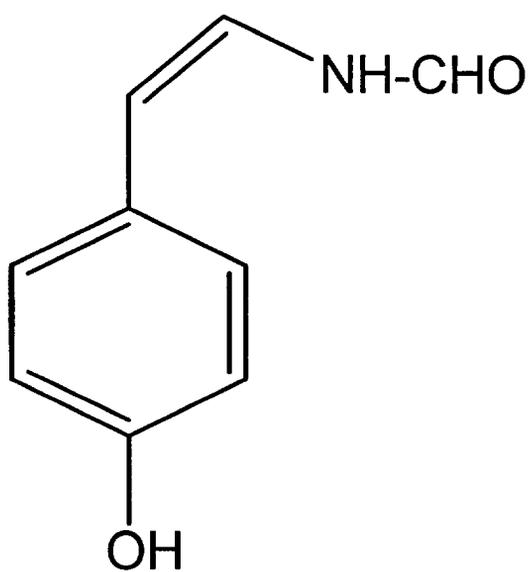


Fig. 39 . Chemical structure of 143B3P3.4.

(2) 143M3PH5의 화학구조

143M3PH5의 노란색의 오일로서 ^{13}C NMR, 저분해능 및 고분해능 FAB 질량분석스펙트럼 (LR- and HR-FABMS)에서 $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_4\text{N}_5$ 의 원소 조성이 관찰되었다 (Fig. 40). 143M3PH5의 IR 스펙트럼에서 amine (3186 cm^{-1}), amide (1632 cm^{-1})유래의 peak가 관찰되었다 (Fig. 41). 그리고 ^1H , ^{13}C NMR spectrum에서 exocyclic double bond (δ_{H} 6.18, 5.06), aromatic (δ_{H} 7.59, 7.09, 7.29, 6.98), methoxyl (δ_{H} 3.64), N-methoxyl (δ_{H} 3.73)을 확인 할 수 있었고 (Fig. 42, 43), DEPT spectrum에서는 1차 탄소 ($-\text{CH}_3$)원자단이 4개, 2차 탄소 ($-\text{CH}_2$)원자단이 1개, 3차 탄소 ($-\text{CH}$)원자단이 9개, 4차 탄소 ($-\text{C}$)원자단이 10개 (Fig. 44), HMQC, HMBC spectrum (H-4/C-3a, 5, 6, 7), (H-5/C-6, 7, 7a), (H-6/C-4, 7, 7a), (H-7/C-5, 6, 7, 7a), (H-8/C-2, 3), (H-15/C-16), (H-18/C-16), (H-23/C-21), (H-24/C-21)의 correlation이 관찰되었다 (Fig. 45, 46). 또한 diketopiperazine²⁷류의 화합물 data와 비교시 대부분 유사함이 관찰되었고, 이러한 추정은 143M3PH5의 UV spectrum [208 nm (ϵ 26,715), 228 nm (11,082), 284 nm (4,412), 344 nm (11,697), 360 nm (10,256)] 과 잘 일치하였다 (Fig. 47).

이상의 물리/화학적 성질 및 분광학적 분석결과에 의해 143M3PH5의 구조는 oxaline으로 구조가 결정되었다 (Fig. 49).

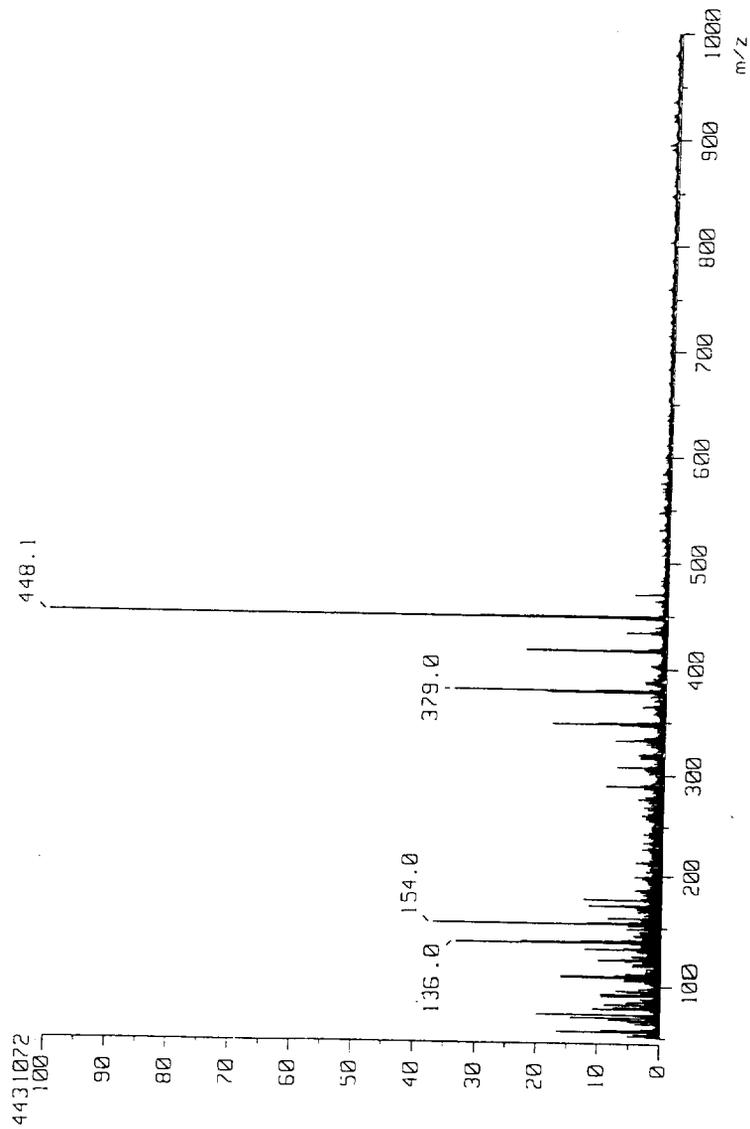


Fig. 40. FAB MS spectrum of 143M3PH5.

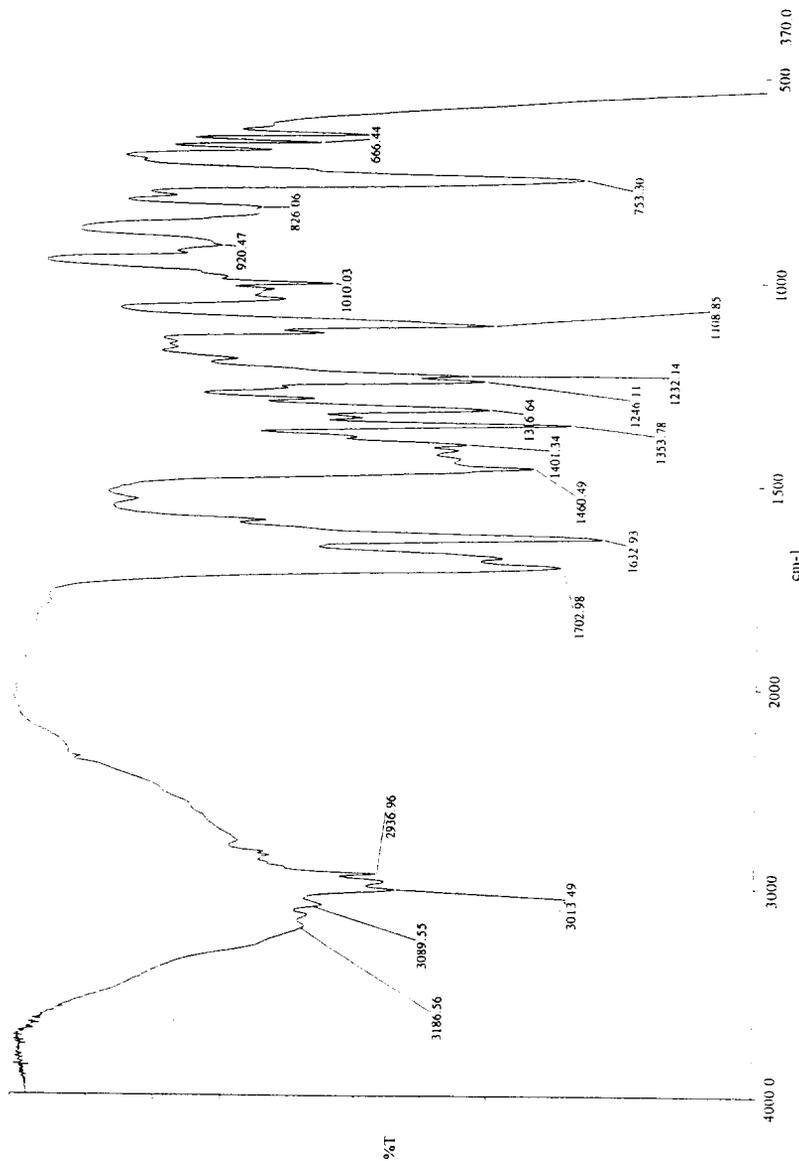


Fig. 41. IR spectrum(Neat) of 143M3PH5.

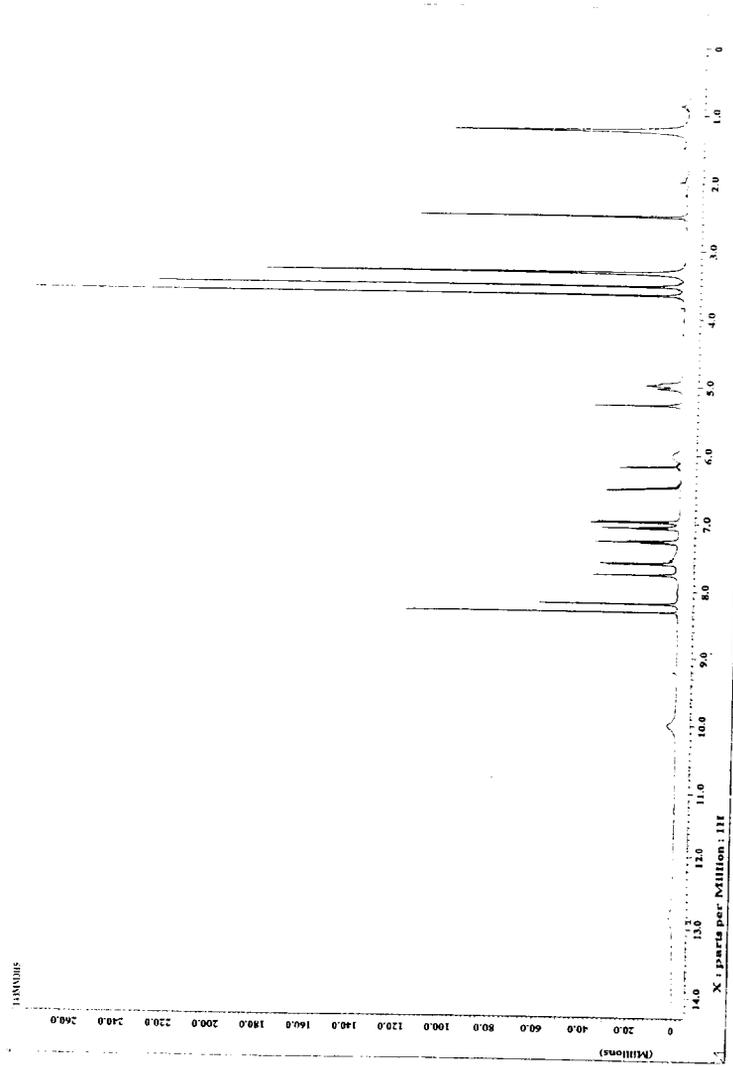


Fig. 42. $^1\text{H-NMR}$ spectrum (400MHz, CDCl_3) of 143M3PH5.

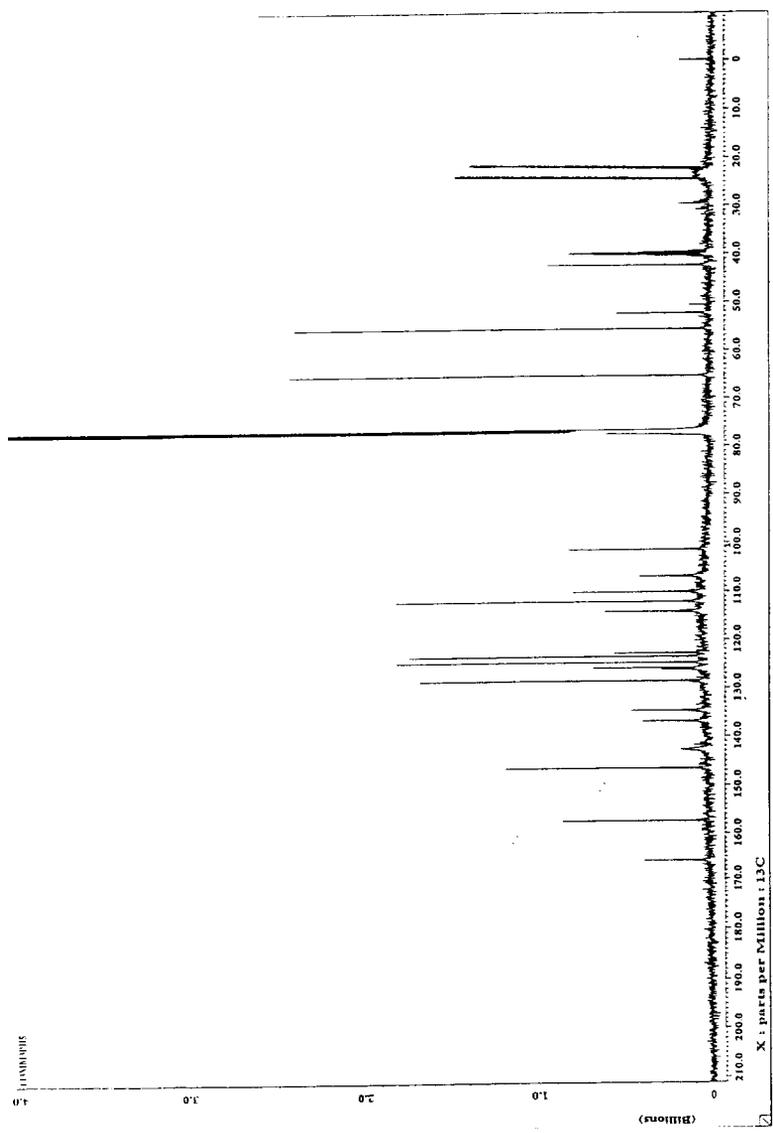


Fig. 43. ^{13}C -NMR spectrum (400MHz, CDCl_3) of 143M3PH5.

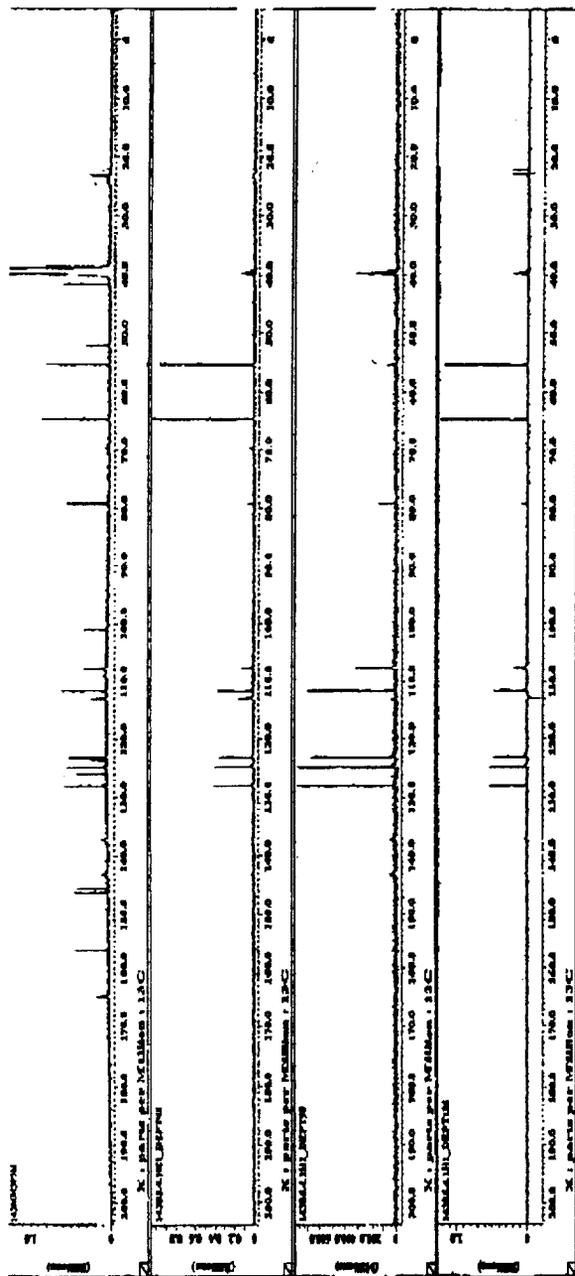


Fig. 44. DEPT spectrum (CDCl_3) of 143M3PH5.

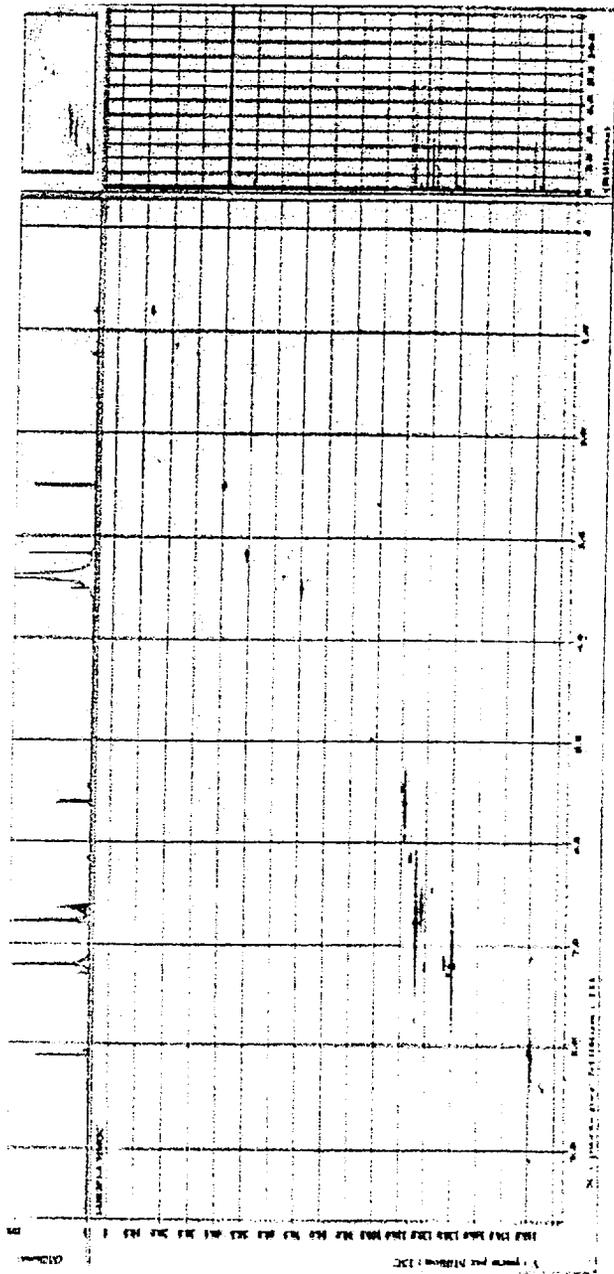


Fig. 45. HMQC spectrum (CDCl_3) of 143M3PH5.

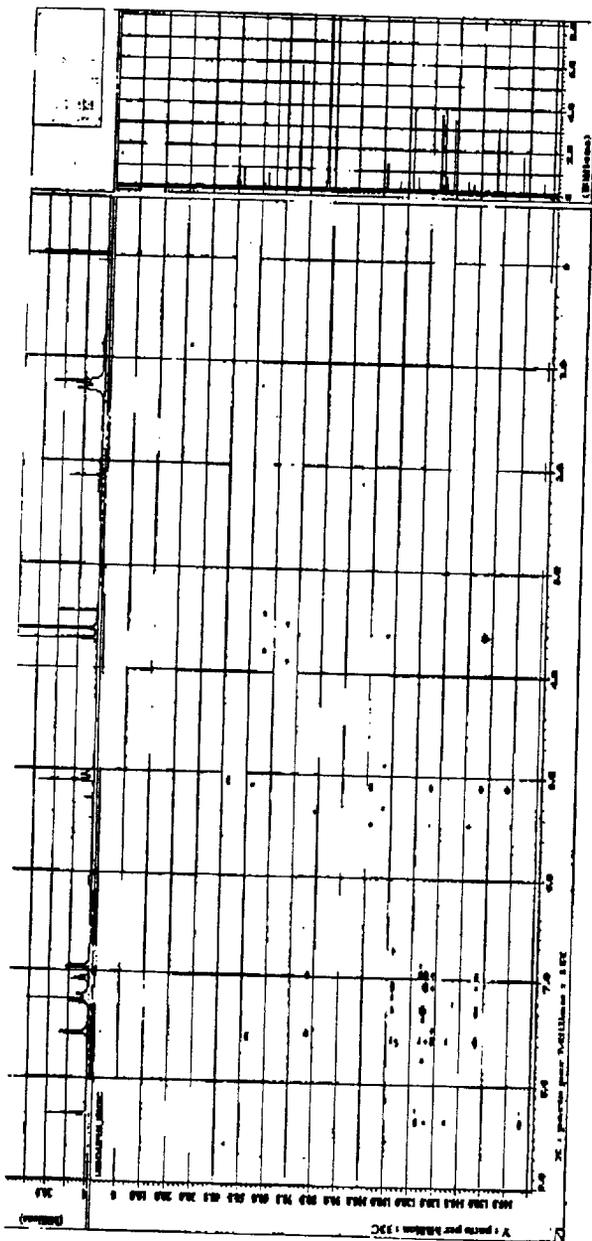


Fig. 46. HMBC spectrum (CDCl_3) of 143M3PH5.

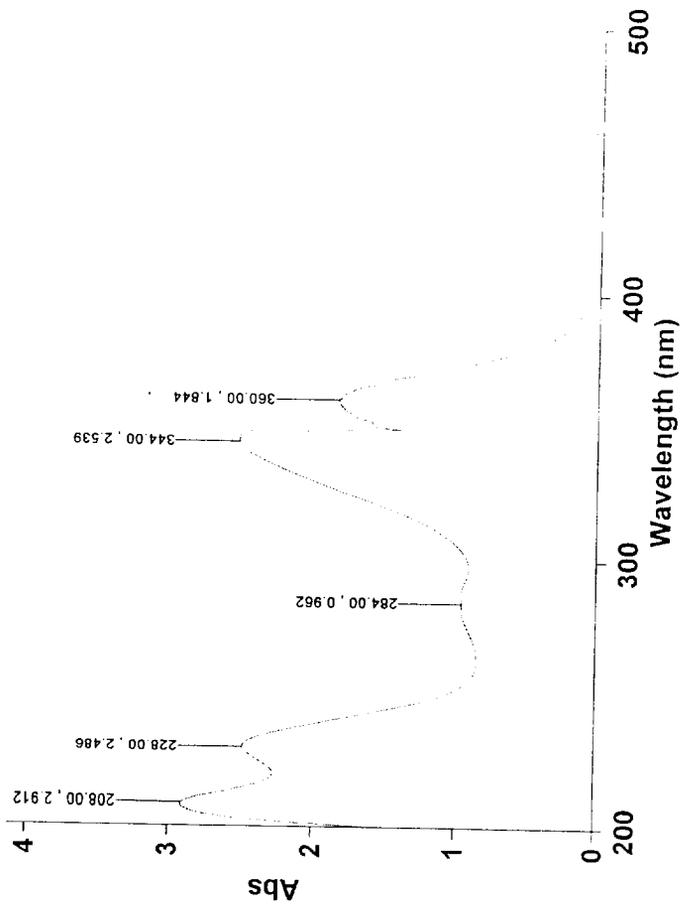


Fig. 47. UV/visible spectrum of 143M3PH5.

Table 5. ¹H- and ¹³C-NMR data for 143M3PH5.

Carbon#	$\delta_{\text{H}}(\text{mult}, J(\text{Hz}))^2$	δ_{C}	Carbon#	$\delta_{\text{H}}(\text{mult}, J(\text{Hz}))^2$	δ_{C}
2		101.3(s) ³	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, 7.5, 7.6)	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	6.18 (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)

¹Recorded in CDCl₃ at 400 MHz (¹H) and 100 MHz (¹³C). Chemical shifts are relative to internal TMS ($\delta = 0$ ppm).

²Shown with clearly assignable signals.

³Multiplicities determined by DEPT spectrum.

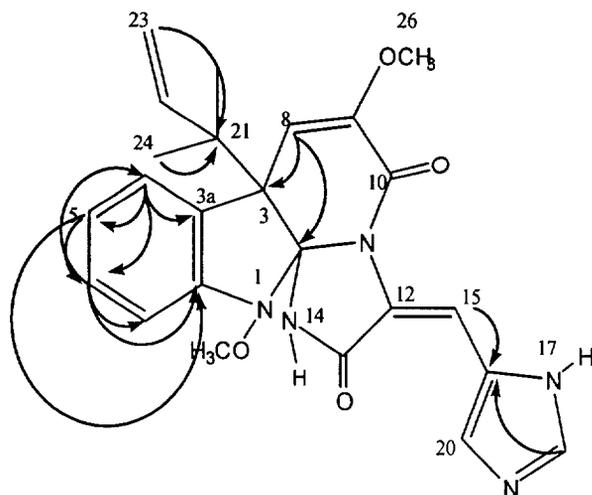


Fig. 48 . H-C long range correlations in HMBC 143M3PH5.

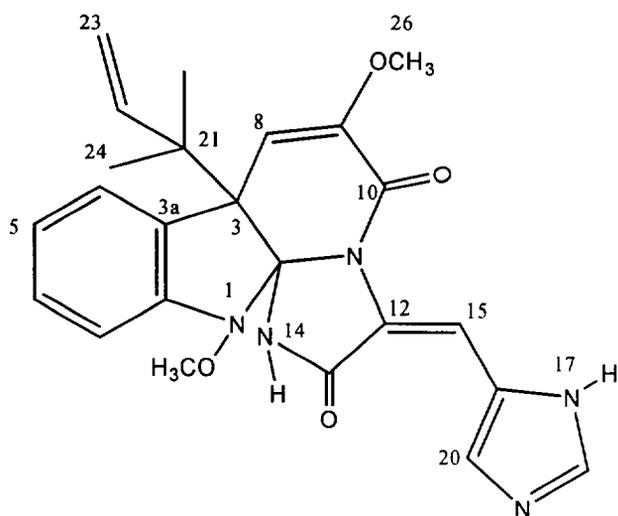


Fig. 49 . Chemical structure of 143M3PH5.

3. 생물 활성

(1) 577M3.2의 자유 라디칼 소거활성

해양 균류 가운데 자유 라디칼 소거활성이 높은 균주 MFA577 (% Inhibition = 61)의 균사체 엑스 577M3.2의 자유 라디칼 소거활성은 Table 6에서 보는 바와 같이 DPPH 소거활성은 L-ascorbic acid 보다 약 2배 정도의 활성을 나타내었고, \cdot NO 라디칼 소거활성은 cabosy-PTIO보다 약 3배 정도로 그 활성을 나타내었다.

(2) 143B3P3.4의 자유 라디칼 소거활성

해양 균류 가운데 자유 라디칼 소거활성이 높은 균주 MFA143 (% Inhibition = 49)의 배양액 엑스 143B3P3.4의 자유 라디칼 소거활성은 Table 6에서 보는 바와 같이 DPPH 소거활성은 L-ascorbic acid 보다 약 2배 정도의 활성을 나타내었다.

이상의 해양균류 *Penicillium chrysogenum* 및 *Penicillium* sp.로부터 분리된 577M3.2, 143B3P3.4의 라디칼 소거활성을 보면 의약 및 산업적으로 응용할수 있는 가능성이 있는 화합물이라고 생각된다.

Table 6. Radical scavenging activity of 577M3.2, 143B3P3.4.

		[IC ₅₀ : mg/mL (μ M)]			
Sample	Activity	DPPH	ONOO ⁻	· O ₂ ⁻	· NO
MFA577M3.2		4.5(12)	68.76	57.39	59.29
MFA143B3P3.4		4.1(10)			
L-ascorbic acid*		5(28)			
Penicillamine*			5.59		
Trolox*				11.45	
Cabosy-PTIO*					137.7

*Positive control

IV. 결론

1. 해양 균류를 대상으로 DPPH 소거활성을 검색한 결과, MFA577종에서 자유 라디칼 소거활성이 관찰되었으며, 그 중 활성을 나타낸 군사체 엑스 577M (DPPH $IC_{50} = 55 \mu\text{g/mL}$)를 대상으로 활성을 지표로 한 활성표적화 합물을 분리 정제하여 577M3.2, 577M3.1, 577M2PH7을 분리하였다. 그리고 MFA143 또한 자유 라디칼 소거 활성이 관찰되어 활성을 나타낸 배양액 엑스 143B (DPPH $IC_{50} = 31 \mu\text{g/mL}$)를 대상으로 활성을 지표로 하여 화합물을 분리 정제하여 143B3P3.4, 143M3PH5 분리하였다.
2. 위에서 분리한 577M3.1의 화학 구조는 물리/화학적 성질 및 분광학적 분석 결과에 의해 5-farnesyl-2-methyl-p-benzoquinone로 결정하였으며, 577M3.2의 화학 구조는 물리/화학적 성질 및 분광학적 분석 결과에 의해 2-methyl-5-(3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatrienyl)-1,4-hydroquinone로 구조를 결정하였으며, 577M2PH7의 화학구조는 물리/화학적 성질 및 분광학적 분석결과에 의해 roquefortine으로 결정하였다.
3. MFA143으로부터 분획한 143B3P3.4의 화학 구조는 물리/화학적 성질 및 분광학적 분석결과에 의해 N-[2-(4-Hydroxyphenyl) ethenyl] formamide로 결정하였으며, 143M3PH5의 화학구조는 물리/화학적 성질 및 분광학적 분석결과에 의해 oxaline으로 결정하였다.
4. 577M3.2와 143B3P3.4의 라디칼 소거능 결과 [$IC_{50} = 4.5 \text{ mg/mL}$, ($12 \mu\text{M}$)], [$IC_{50} = 4.1 \text{ mg/mL}$, ($10 \mu\text{M}$)], 유의성 있는 라디칼 소거활성을 나타내었다.

참고문헌

1. 해양연구소. 바다에 도전한다(해양개발의 현재와 미래); 해양과학총서: 1990; p 31.
2. Weber, D, J. High-pressure liquid chromatographic separation of 5,6-cis-and trans-prostaglandin A2, *J, Pharm, Sci.* **1990**, *66*(55), 744-748.
3. Morozowich, W. Separation of prostaglandin A2 and prostaglandin B2 by ion-exchange liquid chromatography, *J, Pharm, Sciences.* **1974**, *63*(5), 800-802.
4. Mayer, A ,M.; Jacobson, P, B.; Fenical, W.; Jacobs, R, S.; Glaser, K, B. Pharmacological characterization of the pseudopterosins: novel anti-inflammatory natural products Isolated from the Caribbean soft coral, *Pseudopterogorgia elisabethae*, *Life Sciences.* **1998**, *62*(26), PL401-407.
5. Look, S, A.; Fenical, W.; Jacobs, R, S.; Clardy, J. The pseudopterosins: anti-inflammatory and analgesic natural products from the sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **1986**, *83*(17), 6238-6240.
6. Fenical, W.; Okuda, R, K.; Bandurraga, M, M.; Culver, P.; Jacob, R, S. Lophotoxin: a novel neuromuscular toxin from Pacific sea whips of the genus *Lophogorgia*, *Science*, **1981**, *212*(4502), 1512-1514.
7. Abramson, S, N.; Culver, P., Kline, T.; Li, Y., Guest, P.; Gutman, L.; Taylor, P. Lophotoxin and related coral toxins covalently label the alpha-subunit of the nicotinic acetylcholine receptor, *J, Bio, Chem.* **1988**, *263*(34), 18568-18573.

8. Fenical, W. Chemical studies of marine bacteria developing a new resource. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1673-1683.
9. 신중현. 생명공학과 신물질 탐색., 1999; p 47-48
10. Bei, Z.; Gino, S.; Deborash, S.; Zhihua, L.; Yan, Z.; Inmaculada, R.; Dolores, V.; Maria, T, D.; Fernando, P.; Caroline, R.; Richard, L, K.; Xianzhi, M.; Patrick, G.; Jimmy, C.; Juleen, R, Z.; James, V, H.; Roy, G, S.; David, E, M. Discovery of a Small Molecule Insulin Mimetic with Antidiabetic Activity in Mice, *Science*. **1999**, *284*(886), 974-977.
11. Chiung, Y, M.; Fujita, T.; Nakagawa, M.; Nozaki, H.; Chen, G, Y.; Chen, Z, C.; Nakayama, M. A novel quinone antibiotic from *Malbranchea cinnamomea* TAIM 13T54. *J, Antibiot.* **1993**, *46*(12), 1819-1826.
12. Mocek, U.; Schultz, L.; Buchan, T.; Baek, C.; Fretto, L.; Nzerem, J.; Sehl, L.; Sinha, U. Isolation and structure elucidation of five new asterriquinones from *Aspergillus*, *Humicola* and *Botryotrichum* species, *J, Antibiot.* **1996**, *49*(9), 854-859.
13. Fusetani, N.; Yasukawa, K.; Matsunaga, S.; Hashimoto, K. Bioactive Marine MetabolitesXII. Moritoside, An Inhibitor of The Development of Starfish Embryo, from The Gorgonian *Eupleaura* sp, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 6449-6452.
14. F, Gomez, L.; Quuano, J, S.; Calderon., T, Rios. Terpenoid isolated from *Wigandia kunthii*. *Phytochemistry.* **1980**, *19*, 2202-2203.
15. Shin, J, H.; Seo, Y, W.; K,i Woong.; Cho, K, W. Euplexides A-E: Novel Farnesyhydroquinone Glycosides from the Gorgonian *Euplexaura anastomosans*, *J, Org, Chem.* **1999**, *64*, 1853-1858.

16. Funabashi, Y.; Horiguchi, T.; Iinuma, S.; Tanida, S.; Harada, S.
TAN-1496 A, C and E, diketopiperazine antibiotics with inhibitory activity against mammalian DNA topoisomerase I, *J, Antibiot.* **1994**, *47*, 1202.
17. Chu, M.; Truumees, I.; Rothofsky, M, L.; Patel, M, G.; Gentile, F.; Das, P, R.; Puar, M, S.; Lin, S, L. Inhibition of c-fos proto-oncogene induction by Sch 52900 and Sch 52901, novel diketopiperazine produced by *Gliocladium* sp, *J, Antibiot.* **1995**, *48*(12), 1440-1445.
18. Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* **1958**, *26*, 1199-1200.
19. Ischiropoulos, H.; Beckman, J.S. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free radical & Medicine.* **1994**, *16*(2), 149-156
20. Crow, J, P. Dichlorodihydro fluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite *in vivo* ; Implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. Nitric oxide. *Bio. Chem.* **1997**, *1*(2), 145-151.
21. Lebel, C, P.; Bondy, S, C. Sensitive and rapid quantitation of oxygen reactive species formation in rat synaptosome. *Neurochem. Int.* **1990**, *17*(3), 435-440.
22. Finney, D, J. Probit analysis, 3rd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, 1971.
23. Zechlin, L.; Wolf, M.; Steglich, W.; Anke, T. Cristatssaure, ein modifiziertes Farnesylphenol aus Fruchtkörpern von *Albatrellus cristatus*, *Liebigs. Chem.* **1981**, 2099-2105.
24. Bohlmann, F.; Zdero, C.; Suwita, A. Ein neues Sequiterpen-Chin aus

- Seseli-Arten. *Chem, Ber.* **1975**, *108*, 2818-2821.
25. John, C, C.; Nimalka, L.; Greg, J, S.; Ian V, A.; Jacques, N, E.; Sever, S.; Rymantas, K. Studies of Australian Soft Corals. III, A Novel Furanoquinol from *Sinularia lochmodes*. *Aust. J. chem.* **1978**, *31*, 157-162.
26. Ohta, S.; Nozaki, A.; Ohashi, N.; Matsukawa, M.; Okamoto, M. A Total Synthesis of Grifolin. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*(6), 2239-2243.
27. Scott, P, M.; Merrien, M, A.; Ponlonsky, J. Roquefortine and Isofumigaclavine A, Metabolites from *Penicillium roqueforti*. *Specialia.* **1976**, *32*(2), 140-142.
28. Utagawa, T.; Abe, M. Identification of Roquefortine C Produce by *Penicillium roqueforti*. *Agric. Biol. Chem.* **1977**, *41*(10), 2097-2098.
29. Ohmomo, S.; Ohashi, T.; Abe, M. On the Mechanism of the Formation of Indole Alkaloids in *Penicillium roqueforti*. *Agric. Biol. Chem.* **1979**, *43*(10), 2035-2038.
30. Ohmomo, S.; Oguma, K.; Ohashi, T.; Abe, M. Isolation of a New Indole Alkaloid, Roquefortine D, from the Cultures of *Penicillium roqueforti*. *Agric. Biol. Chem.* **1978**, *42*(12), 2387-2389.
31. Ohmomo, S.; Ohashi, T.; Abe, M. Isolation of Biogenetically Correlated Four Alkaloids from the Cultures of *Penicillium corymbiferum*. *Agric. Biol. Chem.* **1980**, *44*(8), 1929-1930.
32. Richard B, H.; Jonathan, M. Biosynthesis of Tuberin from Tyrosine and Glycine. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1983**, 1008-1010.
33. Richard B, H.; Jonathan, M. The Incorporation of C1 Unite in

- Biosynthesis of Tuberin and Xanthocillin. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1984**, 1474-1475.
34. Umehara, K.; Yoshida, K.; Okamoto, M.; Iwami, M.; Tanaka, H.; Kohsaka, M.; Imanaka, H. Studies on WF-5239, a New Potent Platelet Aggregation Inhibitor. *J. Antibiot.* **1984**, 471-474.
35. Nagel, D, W.; Pachler, K, G, R.; Steyn, P, S.; Vleggaar, R, L.; Wessels, P, L. The Chemistry and ^{13}C NMR Assignments of Oxline, A Novel Alkaloid from *Penicillium oxalicum*. *Tetrahedron.* **1976**, *32*, 2625-2631.

감사의 글

본 논문이 완성되기까지 부족한 저에게 세심한 배려와 끊임없는 사랑으로 지도해 주신 손병화 교수님께 진심으로 감사드리며, 이 논문을 심사하여 주시고 좋은 말씀과 보다 알찬 논문이 되도록 가르침을 주신 심현관 교수님과 김세권 교수님께 감사 드립니다. 그리고 문성훈 교수님, 이욱 교수님, 김영일 교수님께도 감사드립니다.

친동생처럼 저에게 많은 것을 가르쳐준 진석이형, 그리고 2년동안 함께 지낸 상미, 실험실에서 곰팡이 키우느라 고생하면서도 항상 웃음을 잃지 않았던 현진, 그리고 멀리 중국에서 타향살이를 하며 공부하시는 희봉형님과 이용, 그 동안 힘들 때마다 힘이 되어준 성진, 성태, 남규, 은희, 현욱, 석진, 성민, 승엽, 지창, 은수, 수석, 철중, 민철, 보현, 명호, 원숙, 성순, 상조, 민아, 미화, 민정 그리고 여러 대학원 동기와 선배들에게 감사의 마음을 전하고 싶습니다.

또한 저를 이 세상에 있게 해 주시고 제가 제일 존경하는 부모님, 큰 아버님과 큰 어미님, 그리고 서울 작은 아버님과 작은어머님, 고모와 고모부, 항상 아들처럼 신경 써 주시는 장모님과 장인어른, 멀리서나마 항상 신경써 주시는 성욱형님과 형수님께 머리 숙여 고마움을 전하고 싶습니다.

끝으로 이세상에서 가장 어여쁘고 마음씨 착한 아내 여진에게 고마움과 사랑을 전하며 이 논문을 드립니다.