

## 해양균류의 항균활성 검색

Yong Li · Xifeng Li · 손병화\* · 최홍대<sup>1</sup>

부경대학교 화학과, <sup>1</sup>동의대학교 화학과

### Screening of Antimicrobial Activity from the Marine-Derived Fungus

Yong Li, Xifeng Li, Byeng Wha Son\*, and Hong Dae Choi<sup>1</sup>

Department of Chemistry, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea and

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Donggeui University, Busan 614-714, Korea

**Abstract** – Acetone extracts of 301 strains of marine-derived fungus were tested for antimicrobial activity against three strains of bacteria. The bacteria consisted of three pathogens, *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *S. aureus*, and multidrug-resistant *S. aureus*. The acetone extracts of 10 strains (MFA117, MFA130, MFA134, MFA206, MFA217, MFA268, MFA277, MFA291, MFA292, MFA301) showed strong activity, inhibiting 100% of the bacterial growth. These antimicrobial active strains were cultured in SWS medium on a 1 L scale and the resulting broth and mycelium were extracted to afford mycelium extract (000M) and broth extract (000B), respectively. Antimicrobial activity for all extracts has been tested. As the results, the mycelium extract of one strain (217M) and the broth extracts of 9 strains (117B, 130B, 134B, 206B, 268B, 277B, 291B, 292B, 301B) exhibited relatively high levels of activity at minimal inhibitory concentration (MIC) values of 500–125 µg/mL range. Among them, the extracts, 277B, 291B, 292B and 301B showed the most significant antimicrobial activity with IC<sub>50</sub> values of 125 µg/mL.

**Key words** – Antimicrobial activity, marine-derived fungus, *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*

1929년 균류로부터 페니실린이 발견된 것을 계기로, 미생물에 대한 관심이 고조되고, 나아가 미생물을 대상으로 한 연구가 활발히 수행되어, 특이한 화학구조와 다양한 종류의 생물활성을 발현하는 많은 종류의 화합물이 발견되었다. 지난 70여년 동안 미생물로부터 5만종 이상의 천연화합물이 발견되었으며, 이중 약 8000종 이상의 화합물에서 항균작용과 항종양작용이 관찰되어, 그 중 100종 이상의 화합물이 임상적으로 항생제, 항종양제 및 농약으로 이용되고 있다.<sup>1)</sup>

오늘날 항생제의 빈번한 사용으로 단일약제 내성균 뿐만 아니라 다약제 내성균 (multidrug-resistant strain)의 증가는 감염성 질환치료에 있어 큰 문제점으로 대두되고 있다.<sup>2)</sup> 따라서, 내성 균주에 효능을 가진 새로운 항생제의 개발은 시급히 해결하여야 할 당면과제로서, 이를 위한 연구가 전 세계적으로 활발히 수행되고 있다.

특히, 해양균류는 육상균류와는 달리 해수중이라는 폐쇄

계의 특이한 환경(예: 높은 염의 농도, 수압 그리고 해수 중에 노출되어 있어 기타 병원미생물의 침입을 받기 쉬운 점 등)에서 서식하고 있어, 그 진화과정에 있어서 육상생물과는 극히 다른 대사계 혹은 생체방어계를 확립하였을 것으로 추정되며, 따라서 육상균류에서 볼 수 없는 특이한 화학구조를 가진 다양한 종류의 화합물을 대량생산할 것으로 기대된다.<sup>3)</sup>

이와 같은 관점에서, 해양생물로부터 생물활성물질의 화학적 연구의 일환으로서,<sup>4)</sup> 해양수주재료로부터 분리한 균류를 대상으로 methicillin 내성 및 다약제 (multidrug) 내성을 가진 황색포도상 구균에 대한 항균활성을 조사하였다.

#### 재료 및 방법

**균류의 분리** – 2002년 울산시 골매마을 및 제주 해안에 서 해초, 해초, 유목, 폐각 및 해사를 채집하여 멸균한 봉지에 담아 실험실로 운반한 후 -20°C에서 보관하면서 균류의

\*교신저자(E-mail) : sonbw@pknu.ac.kr  
(FAX) : 051-628-8147

분리에 이용하였다. Petri dish에 여지를 깔고, 여기에 채집한 숙주재료를 넣고, 멸균해수를 가하여 27-29°C에서 15-30일간 배양한 후 실체현미경하에서 자낭과로부터 자낭포자를 멸균침으로 분리하였다.

**균류의 1차 배양(10 mL scale), 추출 및 표준시료** - 분리한 균주를 각각 YPM배지 (10 mL) (0.2% yeast extract, 0.2% peptone, 0.4% mannitol, 100% seawater)에서 27-29°C, 15일간 배양한 후, 배양액에 같은 양의 아세톤 (10 mL)을 가하여 추출한 다음, 탈지면 여과하여 얻은 아세톤 추출물 (MFA000ae)을 표준시료로 이용하여 항균활성을 검색하였다.

**균류의 2차 배양, 수확 및 추출** - 아세톤추출물에서 시험균주의 성장을 억제하는 항균활성이 관찰된 균류를 YPG+F 배지 (0.5% yeast extract, 0.5% peptone, 1.0% glucose, 0.2% fish meal, 100% seawater)에서 27°C, 30 일간 1 L 규모로 배양한 후, 배양된 균사체를 가아제 여과하여 균사체 (mycelium)와 배양액 (broth)으로 분리하였다. 균사체는 동결건조 후 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (1:1)로 추출하고, 배양액은 EtOAc 로 추출하여, 균사체 엑스 (000M) 및 배양액 엑스 (000B)를 각각 얻었다.

**항균시험용 균주** - 항균시험용으로 사용한 황색포도상구균, *Staphylococcus aureus* ATCC29213, methicillin-내성 (methicillin-resistance) 황색포도상 구균, *Staphylococcus aureus* CCARM3167 및 다약제-내성 (multidrug-resistance) 황색포도상 구균, *Staphylococcus aureus* CCARM3089는 항생제내성균주은행에서 분양받아 사용하였으며, 항균대조약물은 oxacillin (Sigma Co.)을 사용하였다.

**항균시험용 균주의 배양** - 세균배양에는 Brain Heart Infusion (BHI)과 agar를 사용하였으며, 배지에 균을 이식하여 37°C 배양기에서 17시간 배양하였다.

**시료의 조제** - acetone 추출물 (1 mL)을 vial에 취한 다음 아세톤을 감압유거한 후 남은 잔류액을 시료로 사용하였으며, 균사체 추출물 (000M) 및 배양액 추출물 (000B)은 각 시료 (1 mg)를 20% DMSO (1 mL)에 용해시킨 후, 2배씩 단계적으로 희석하여 사용하였다.

그리고, 표준항생물질은 oxacillin (8 µg/mL)을 사용하였다.

**항균력 측정** - 각 추출물에 대한 항균력은 액체배지희석법<sup>5)</sup>을 이용하여 측정하였다. 시험관에 Mueller-Hinton 배지 (1 mL)를 취한 다음 멸균하고, 여기에 각각의 시료 (1 mL)를 가하고 시험 균주를 접종한 다음, 37°C에서 20시간 배양한 후, 육안으로 관찰하여 균의 발육정도를 표준물질, 대조군 및 공시험과 비교하였다. 그리고, 항균활성이 관찰된 시료를 대상으로 추출엑스 (1 mg/mL)를 2배씩 11단계 희석한 각 시료에 대해 일차 항균력 시험법과 같은 방법으로 항균

력을 검색하고, 육안으로 관찰하여 생육이 억제된 시료의 농도를 최소발육저지농도 (minimal inhibitory concentration, MIC)로 결정하였다.

**결과 및 고찰**

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.<sup>6)</sup>

울산의 골매 마을 및 제주도 해안에서 채집한 재료로부터 301종의 미 동정 균류를 분리하였다. 이들 균류를 해수로서 조제한 YPM 배지 (10 mL)에 접종하여 29°C에서 14 일간 배양 한 후, 같은 양의 acetone (10 mL)으로 추출하여 각 균류의 acetone 추출액을 얻었다. 이들 추출액을 시료로 포도상 구균 (*Staphylococcus aureus*), methicillin-내성 및 다약제-내성 포도상구균 (methicillin-resistant and multidrug-resistant *S. aureus*)에 대한 항균활성을 검색한 결과, 10개의 아세톤엑스 (117ae, 130ae, 134ae, 206ae, 217ae, 268ae, 277ae, 291ae, 292ae, 301ae)에서 3종의 병원성 세균의 성장이 완전히 억제되어, 전체 시료 중 3.3%의 시료가 강한 항균활성을 나타내었다 (Table I). 이들 항균활성이 관찰된 10개의 균주를 SWS배지에서 2차 배양 (1 L 규모)하여 얻은

**Table I.** Antimicrobial activity of acetone extract of the marine-derived fungus against drug-resistant bacteria

Sample	Activity	Antimicrobial activity		
		SA	MRSA	MDRSA
Acetone ext.				
MFA117ae	ng	ng	ng	ng
130ae	ng	ng	ng	ng
134ae	ng	ng	ng	ng
206ae	ng	ng	ng	ng
217ae	ng	ng	ng	ng
268ae	ng	ng	ng	ng
277ae	ng	ng	ng	ng
291ae	ng	ng	ng	ng
292ae	ng	ng	ng	ng
301ae	ng	ng	ng	ng
Standard				
oxacillin	ng	-	-	-

SA: *Staphylococcus aureus*  
 MRSA: Methicillin-resistant *S. aureus*  
 MDRSA: Multidrug-resistant *S. aureus*  
 ng: no growth at 1 mL  
 -: growth at 16 µg/mL

**Table II.** Antimicrobial activity of the fungal extracts against drug-resistant bacteria

Sample	Activity	Antimicrobial activity			MIC (IC <sub>50</sub> : µg/mL)
		SA	MRSA	MDRSA	
117M	-	-	-	-	
117B	ng	ng	ng	500	
130M	-	-	-	-	
130B	ng	ng	ng	500	
134M	-	-	-	-	
134B	ng	ng	ng	500	
206M	-	-	-	-	
206B	ng	ng	ng	250	
217M	ng	ng	ng	250	
217B	-	-	-	-	
268M	-	-	-	-	
268B	ng	ng	ng	500	
277M	-	-	-	-	
277B	ng	ng	ng	125	
291M	-	-	-	-	
291B	ng	ng	ng	125	
292M	-	-	-	-	
292B	ng	ng	ng	125	
301M	-	-	-	-	
301B	ng	ng	ng	125	
oxacillin*	ng	-	-	8	

ng: no growth at 1 mg/mL

-: growth at 1 mg/mL

\* at 16 µg/mL

각각의 균사체 엑스 (000M) 및 배양액 엑스 (000B)를 대상으로 일정 농도 (1 mg/mL)에서 3종의 병원성 세균에 대한 항균활성을 재 검색한 결과, 1개의 균사체 엑스 (217M) 및 9개의 배양액 엑스 (117B, 130B, 134B, 206B, 268B, 277B, 291B, 292B, 301B)가 3종의 병원성 세균의 성장을 완전히 억제하였다 (Table II). 이 결과로부터 해양숙주재료로부터 분리된 균류의 항균성 물질은 균사체 보다는 배양액에 많이 함유되어 있는 것으로 판명되었다. 나아가, 항균활성이 관찰된 시료의 항균활성을 정량적으로 검색하기 위하여 각 엑스를 순차적으로 2배씩 희석한 다음, 각각의 시료에 대한 약제내성세균의 성장을 억제하는 최소억제농도 (MIC)를 조

사하였다. 그 결과, 항균활성을 나타낸 시료에서 전체적으로 엑스단계에서 500-125 µg/mL 범위의 MIC 값이 관찰되었다. 그 중 매우 강한 항균활성은 277B, 291B, 292B 및 301B (MIC value: 125 µg/mL)에서 관찰되었으며, 그 다음으로 비교적 유의성 있는 항균활성이 206B 및 217M (MIC value: 250 µg/mL)에서 관찰되었다 (Table II). 이상의 결과로부터 해양숙주재료로부터 분리된 해양균류는 약제내성세균에 대한 항균활성성분의 화학적 연구의 대상시료로서 충분한 가치가 있다고 생각된다.

## 사 사

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R05-2002-000-00761-0)지원으로 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

## 인용문헌

1. Fenical, W. (1993) Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. *Chem. Rev.*, **93**(5): 1673-1683 and references therein.
2. Cueto, M., Jensen, P. R., Kauffman, C., Fenical, W., Lobkovsky, E. and Clardy, J. (2001) Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge. *J. Nat. Prod.*, **64**(11): 1444-1446 and references therein.
3. 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.
4. Li, Y., Li, X. F., Kim, D. S., Choi, H. D. and Son, B. W. (2003) Indolyl alkaloid derivatives, *N*<sub>6</sub>-acetyltryptamine and oxaline from a marine-derived fungus. *Arch. Pharm. Res.*, **26**(1): 21-23.
5. 한국화학연구소(1989) 신규 의약품 스크리닝 기술개발에 관한 연구, pp. 153-195, 과학기술처, 서울, 한국.
6. Tubaki, K. (1992) Marine Microorganism as Drug Resources. In Yajima, H., Shioiri, T., and Ohizumi, Y. (ed.), *Marine Resources for Drug Discovery*, pp. 313-334. Hirokawa Publishing Co. Tokyo, Japan.

(2003년 3월 27일 접수)