

참보라색우무에서 추출한 항균물질의 구조 및 특성

임치원 · 이종수* · 조영제**
 국립수산진흥원 위생가공연구실, *경상대학교 해양생물이용학부
 **부경대학교 식품생명공학부

Structures and some Properties of the Antimicrobial Compounds in the Red Alga, *Symphyclocladia latiuscula*

Chi-Won LIM, Jong-Soo LEE* and Young-Je CHO**

Sanitation and Processing Research Division, National Fisheries R&D Institute, Pusan 616-900, Korea

*Faculty of Marine Bioscience, Gyeongsang National University, Tongyeong, 650-160, Korea

**Dept. of Food Science & Technology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Three antimicrobial compounds (SL-1, SL-2 and SL-3) were isolated and identified from the marine red alga, *Symphyclocladia latiuscula*. In addition, their biological functionalities such as cytotoxicity and desmutagenic activity were investigated. From the cryophyllized *S. latiuscula*, SL-1, SL-2 and SL-3 were purified by solvent extractions and HPLC. SL-2 was crystallized in benzene-diethyl ether solvent. On the EI-MS spectra, it was found that they had three bromines in their structure which showed typical signal strength ratios at M^+ , $[M+2]^+$, $[M+4]^+$, $[M+6]^+$ (13 : 38 : 37 : 12). SL-1 was identified as 2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl alcohol ($C_7H_5Br_3O_3$, MW=374) by NMR and MS spectra. SL-2 was assigned as 2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl methyl ether ($C_8H_7Br_3O_3$, MW=388) and confirmed by X-ray crystallographic analysis. SL-3 was presumed as an isomer of SL-2. Methanol extract of the *S. latiuscula* showed antimicrobial activities against all strains tested (bacteria, 15 strains; yeasts, 17 strains; fungi, 4 strains), much or less. The strongest inhibition activity of the methanol extract was to the *Vibrio mimicus* (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and *V. vulnificus* (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). The mice injected intraperitoneally with 3 mg of SL-1 and 5 mg of SL-2 showed no acute toxicity response. SL-2 showed higher desmutagenic activity than SL-1 against PhIP and MeIQx.

Key words: Antimicrobial activity, *Symphyclocladia latiuscula*, 2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl alcohol, 2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl methyl ether

서 론

최근 들어 각종 해양생물로부터 유용한 생리활성을 가진 물질들이 발견되고 이들을 이용하려는 시도들이 행하여지고 있으나, 그동안 보고된 내용들의 대부분은 비식용의 균체명거나 해면류 등 특이한 해양 동물을 대상으로 하고 있다 (Kenneth et al., 1981; Azumi et al., 1990; Lee et al., 1991).

한편, 해조류들은 양적으로도 풍부하고 종류도 다양함에도 불구하고 주로 식품으로서 이용가치가 있는 일부의 종류들이 대량으로 양식되거나 이용되고 있다. 그러나, 해조류도 해양이라고 하는 특수한 환경에서 서식하고 있어 육상식물들과는 다른 여러 가지 생리활성물질이 존재하는 것이 보고되었으며, 그 중 지금까지 알려져 있는 해조류에 함유되어 있는 항균성물질로서는 브롬화합물, terpene류, 함황화합물, 지방족 화합물등 다양한 종류의 화합물들이 밝혀져 있다 (Kurata et al., 1977, 1980a, 1980b, 1983; Amico et al., 1980; Enoki et al., 1982). 이러한 화합물들은 주로 순수화학. 연구자들이 특이한 구조적 측면에서 연구를 진행한 것이 대부분 이어서 식품의 보존이나 응용의 측면에서 이용하려는 연구는 드물다. 그런데 최근에는 육상의 동식물에서 신소재를 개발하는데 한계에 이르게 되어 해양에서 유용물질을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나 국내에서의 해조류에서 항균성물질 개발을 위한 연구를 한 예는 많지 않으며 (Kim et al., 1994; Cho et al., 1994; Baik and Kang, 1986), 이들의 대부분은 아직 검색

단계에만 머무르고 있는 실정이다.

따라서, 연구자들은 우리나라 연근해에서 쉽게 채집 가능한 미식용 해조류들로부터 식품에 사용이 가능한 천연 보존료를 개발할 목적으로 항균성 물질을 검색하였으며, 그중 강한 항균활성을 나타낸 홍조의 참보라색우무를 대상으로 항균성 물질을 분리 정제하고, 이를 MS, proton과 carbon NMR 및 X선 결정 해석에 의하여 구조를 규명하였다. 또한, 참보라색우무의 조추출액을 이용하여 병원성 및 부패세균, 효모, 곰팡이에 대한 항균력을 조사하였으며, 정제된 항균물질의 마우스에 대한 급성독성 및 들연변이 원성 억제시험을 행하였다.

재료 및 방법

시 료

참보라색우무 (*Symphyclocladia latiuscula*, Fig. 1)는 1997년 4월에서 1998년 4월에 걸쳐 채취하여 이물질을 제거하고 담수로 세척하여 탈수 후 동결 건조한 다음 마쇄하여 -20 °C의 냉동고에 저장하였다가 사용하였다.

항균성 물질의 분리 정제

동결 건조한 참보라색우무 1kg에 메탄올 3배량 (v/w)을 가하여 ultra-trux로서 마쇄 추출 (24,000 rpm, 5 min)한 후 여과하였다

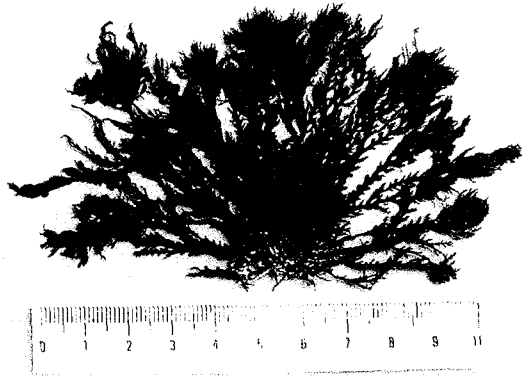


Fig. 1. Typical habit of the red alga *Symphyocladia latiuscula* (Harvey) Yamada.

(Fig. 2). 여과 후 잔사는 3배량의 메탄올을 가하여 다시 동일한 방법으로 2회 반복 추출, 여과하였다. 여과하여 얻은 여액을 합쳐 감압 농축하여 녹색의 조추출액 (28.7 g)을 얻었으며, 조추출액은 핵산으로 탈지한 후, 다시 디클로로메탄과 40% 메탄올로 분획하였다. 이 중 항균성이 있는 디클로로메탄 회분을 silica 칼럼에서 디클로로메탄-메탄올 혼합용매 (95:5)로 용출한 다음, 역상 칼럼, silica cartridge column으로 순차 정제하였으며 벤젠-디에틸에테르 (9:1) 혼합액 회분을 최종적으로 packed ODS 칼럼에서 65% acetonitrile을 흘려 항균성이 있는 3개의 물질 SL-1 (127.0 mg), SL-2 (135.0 mg) 및 SL-3 (27.7 mg)을 각각 분리 정제하였다.

한편, 1998년산 건조 시료 1.2 kg에 대하여는 아세톤으로 추출하여 1차 시료와 유사한 과정으로 추출하였다. 단, 정제과정 중 메탄올 대신에 acetonitrile을 이용하였다.

항균물질의 분리정제 과정 중 항균물질의 검정은 각 회분의 메탄올 희석 용액 일정량을 직경 0.8 mm의 paper disc에 흡수시킨 후 용매를 건조시킨 다음 *Aspergillus niger*의 포자를 포함한 YM 평판배지 표면에 얹어 30 °C에서 24시간 배양하여 생육저지환의 형성 여부를 monitoring하였다.

항균물질의 기기분석

UV 파장에서의 흡광도는 클로로포름 용매 중에서 UV spectrophotometer (Helion β UV-Visible Spectrometer, Unicam)를 이용하여 25 °C에서 측정하였으며, 적외선 흡수 spectrum은 KBr 분말로 정제를 만들어 FT-IR spectrophotometer (Perkin Elmer, spectrum 2000)에서 측정하였다. 질량분석은 electron impact mass spectrum (EI/MS)과 fast atom bombardment mass spectrum (FAB/MS)을 JMS-DX303HE mass spectrophotometer (JEOL)로 측정하였으며, FAB/MS의 경우 matrix는 MeOH에 Nitrobenzyl alcohol (NOBA)시약을 첨가하여 양이온 모드에서 행하였다. ^1H 및 ^{13}C 등 각종 핵자기공명분석 (nuclear magnetic resonance,

NMR) spectrum의 측정은 重acetone 용매중에서 500 MHz의 Varian unity Inova 500 spectrometer (Varian)로 측정하였다.

X선 결정 회절 분석

디에틸에테르와 벤젠 용액 중에서 결정화한 SL-2의 X선 회절 분석은 흑연으로 단색화한 Cu K α 선 ($\lambda=1.54178\text{\AA}$, absorption coefficient, $\mu=139.6\text{ cm}^{-1}$)을 이용한 Rigaku AFC5S diffractometer (Rigaku Co., Japan)로 측정하였으며 결정구조 해석은 중원자 Patterson method (Beurskens et al., 1992)와 Fourier 기법 (Beurskens et al., 1994)을 이용하였다.

참보라색우무 조추출액의 항균성 시험

참보라색우무의 메탄올 추출액의 각종 세균에 대한 최소발육 억제농도 (minimum inhibitory concentration, MIC)의 측정은 Müller hinton agar (Difco)배지에서 Lorian (1991)의 방법에 따라 액체배지 희석법 (Broth dilution method)으로 측정하였다. 효모 및 곰팡이는 YM agar (Difco)에서 생육저지 여부를 확인하였다.

마우스에 대한 독성시험

시료 일정량을 1% tween 60 용액에 현탁시키고 체중 19~20 g의 ICR계 수컷 마우스를 사용하여 복강에 주사하여 24시간 이내의 사망 여부를 조사하였다 (Yamamoto, 1982).

돌연변이원성 시험

시험돌연변이원성 시험은 Yahagi et al. (1977)의 방법에 따라 S-9 mix의 존재하에서 *S. typhimurium* TA98을 사용하여 실시하였으며 본 실험에 사용한 시료의 농도에서는 돌연변이원성을 나타내지 않았다. Positive control로서는 revertant 수가 직선적으로 증가하는 농도인 PhIP 1,200 ng/plate 및 MeIQx 40 ng/plate로 하였다.

결과 및 고찰

분리정제 중 항균물질의 거동

참보라색우무의 메탄올 추출액은 중성지질 등 비극성물질 제거를 위한 핵산과 80% 메탄올과의 액-액 분배에서 80% 메탄올에 항균활성이 나타나 극성기 등의 존재가 추정되었다. 또한 디클로로메탄과 40% 메탄올과의 분배에서 항균물질은 디클로로메탄중에 존재하여 무기염이나 수용성 성분이 아님을 알 수 있었다. 디클로로메탄 회분은 대부분의 불포화지방산과 동일 회분으로서 지방산들이 항균성을 나타내어 항균물질과 혼동되는 경우가 있어 곰팡이를 이용한 항균성을 검정한 결과에서도 강한 항균성을 나타내어 지방산이 아닌 물질로 판명되었다. Silica 칼럼에서는 디클로로포름보다 극성이 낮은 핵산이나 벤젠, 디클로로메탄 단독 용매에서는 전혀 용출되지 않았으며, 디클로로메탄에 메탄올을 첨가하거나, 벤젠에 디에틸에테르가 혼합된 용매로서 용출되었다. 한편

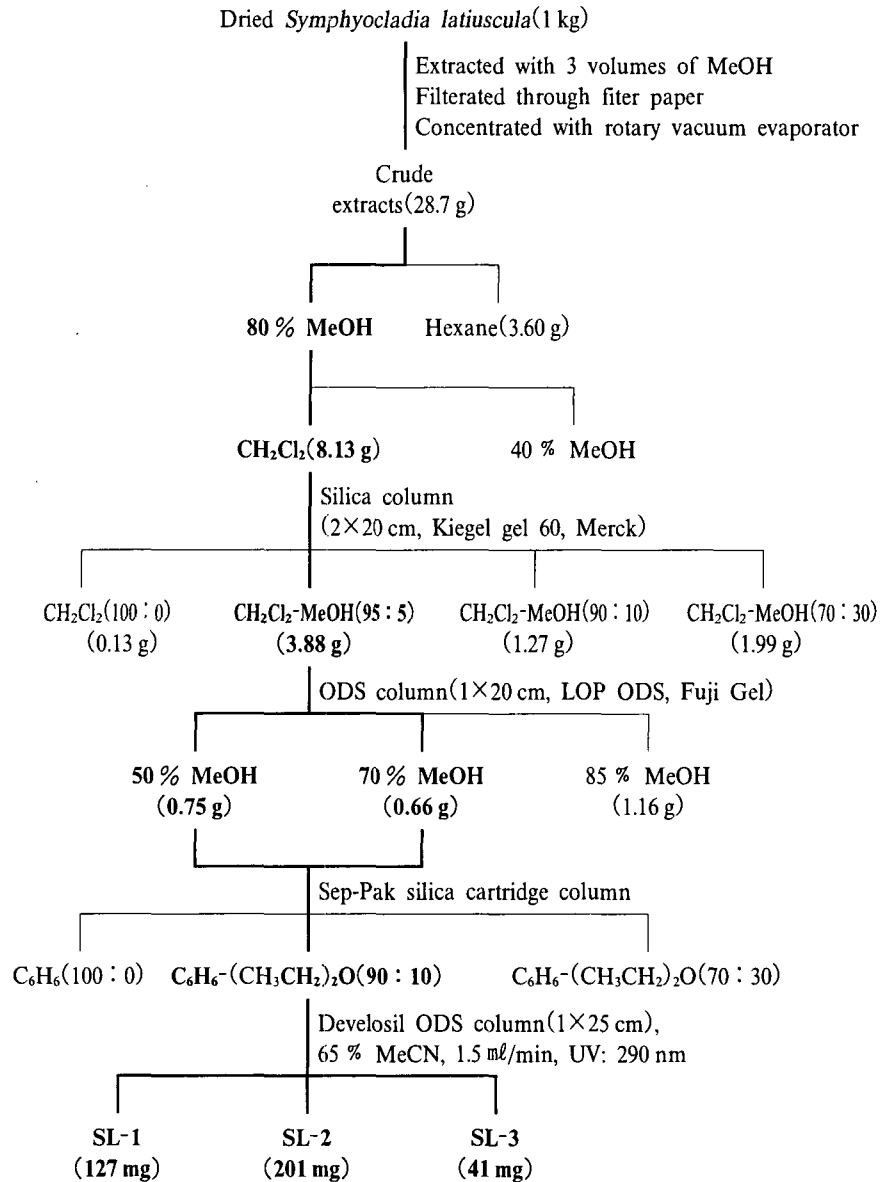


Fig. 2. Isolation and purification procedure of the antimicrobial compounds from the red alga, *Symphyocladia latiuscula*.

염기성 alumina 칼럼에서는 중성획분에 용출되어 물질 중에 carboxyl기 등의 산성관능기는 존재하지 않는 것으로 추정되었다.

정제된 항균물질의 성상

ODS 칼럼에서 최종적으로 분리 정제된 항균물질들 (SL-1, SL-2, SL-3)은 백색분말의 형태로 얻어졌으며, SL-2는 벤젠-디에틸 에테르의 1:1 혼합 용액 중에서 바늘상의 백색 결정으로 석출되었다. 두 성분 중에서는 특히, 성분 SL-2 및 SL-3이 성분 SL-1보다 용이하게 결정이 생성되었다. 이들 성분은 물이나 비극성의 헥산에는 불용이었으나 알콜 계통의 용매나 아세톤, 에테르에는 잘

녹았다. 그러나 메탄올 용액 중에서 자외선 조사시에는 쉽게 연한 보라색으로 착색되는 현상을 나타내었다.

항균물질의 구조

SL-1의 구조

SL-1은 클로로포름 용매 중에서 측정된 UV spectrum에서는 254 nm, 289 nm, 296 nm에서 각각 강한 흡수를 나타내었고, IR spectrum에서는 수산기 (OH)에 의한 흡수가 3,483 cm⁻¹에 관측되었으며, 방향족 다치환체의 흡수로 추정되는 peak가 1,000~1,500 cm⁻¹ 사이에 관측되었고, methylene (-CH₂)기의 흡수가

1,450 cm^{-1} 에 관측되어 이 물질은 공액 이중 결합을 가진 방향족 다치환체로 추정되었다. 또한 EI/MS spectrum 상에서 m/z 374, 376, 378, 380에 각각 M^+ , $(M+2)^+$, $(M+4)^+$, $(M+6)^+$ 로 추정되는 동위체 ion들의 peak가 13 : 38 : 37 : 12의 비로 관측되었다.

분자 중에 3개의 브롬이 존재할 때 MS spectrum 상에 분자량보다 2 mass unit씩 많은 독특한 동위체 peak들의 형태로서, 이 성분 중에는 브롬이 3개 존재하는 브롬 화합물로서 분자량은 374 ($\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_3\text{Br}_3$)로 추정되었다.

또한, 지방족 OH기의 존재 시에 흔히 나타나는 탈수 이온 ($M - \text{H}_2\text{O}$)에 상당하는 fragment 이온 peak들이 m/z 356, 358, 360, 362에 각각 관측되어 OH기의 존재를 알 수 있었으며, benzyl alcohol에서 특징적으로 나타나는 탈수 이온에서 m/z 28이 감소한 peak ($M - \text{H}_2\text{O} - \text{CO}$)가 m/z 328에 관측되어 benzyl alcohol의 유도체임이 추정되었다 (Fig. 3).

重 acetone 용매 중에서 측정된 proton NMR spectrum에서는 총 3개의 singlet signal ($\delta=4.19$ ppm, 5.00 ppm 및 8.80 ppm)이 2 : 1 : 2의 비로 관측되었으며 적분값으로 보아 proton은 총 5개가 독립적으로 존재하는 것으로 추정되었다. 한편, OH기 유래의 signal을 조사하기 위해 용매 중에 D_2O 를 첨가한 다음, 측정된 spectrum상에서는 4.19 ppm, 8.80 ppm의 signal들이 소실되었다. 따라서, 저자장측에 나타난 signal ($\delta=8.80$, s)은 화학적으로 등가인 2개의 OH기 ($\delta=8.80$ ppm, s)에 상당하며, 4.19 ppm의 singlet은 지방족의 OH기로 추정되었고, D_2O 용매로 치환하여도 소실하지 않는 5.00 ppm의 singlet signal은 2개의 수소에 상당하며 chemical shift 값으로 보아 methylene ($-\text{CH}_2-$) 수소에 추정되었다. 또한, $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY spectrum에서는 $\delta=4.19$ ppm의 OH기 수소와 $\delta=5.00$ ppm의 methylene기 수소의 contour가 나타나 이들이 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 로 연결되어 있음을 확인하였다.

SL-1은 ^{13}C NMR spectrum상에서 총 7개의 탄소 signal이 관

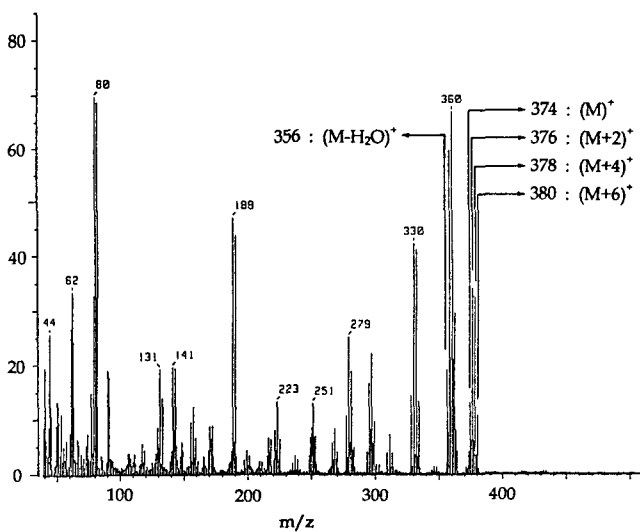


Fig. 3. EI/MS spectrum of the compound SL-1 isolated from *S. latiuscula*.

측되었으며, chemical shift값으로 보아 이중 67.4 ppm의 signal은 methylene 탄소에 추정되며, 나머지 6개는 100 ppm 이하의 저자장에 관측되어 이들은 벤젠환의 6개의 탄소에 추정되었다. Proton NMR과 MS의 data로부터 벤젠환의 탄소 중에는 3개의 브롬이 결합되고 2개에는 OH가, 그리고 한 개에는 CH_2OH 가 결합되어 있는 것으로 추정되었다.

한편, ^1H Detected Multiple Bonded Connectivity (HMBC) spectrum에서는 methylene기의 proton ($\delta=5.00$ ppm, s)이 114.1 ppm, 118.8 ppm, 133.5 ppm의 탄소와 각각 coupling하고 있는 것으로 나타나, 벤젠환의 1위의 탄소에 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 가 결합한 것으로 확인되었으며 (Fig. 4), 3개의 브롬 및 2개의 OH기의 결합 위치는 chemical shift 값으로부터 추정하였다.

이들 UV, IR, MS 및 NMR spectrum의 결과를 종합하여 수소 및 탄소를 assignment한 것과 Mori et al. (1983)이 합성한 2,3,6-tribromo-4,5-dimethoxybenzyl alcohol의 NMR 자료를 비교한 결과 (Table 1), 이들로부터 SL-1의 구조는 2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl alcohol로 결정하였다.

SL-2의 구조

SL-2는 클로로포름 용매 중에서 측정된 UV spectrum에서는 256 nm, 293 nm에서 각각 흡수 peak가 관측되었고, IR spectrum에서 SL-2는 SL-1과 유사하게 방향족 다치환체의 흡수로 추정되는 peak ($1,000\sim 1,500$ cm^{-1}) OH기 ($4,325$ cm^{-1}), CH_3 ($2,934$ cm^{-1}), methylene ($1,447$ cm^{-1}), OCH_3 기 ($1,076$ cm^{-1})의 흡수가 각각 관측되어, 이 물질은 SL-1과 유사한 골격 구조로 추정되었다.

EI/MS spectrum상에서 성분 SL-1과 유사하게 m/z 388, 390, 392, 394에 각각 M^+ , $(M+2)^+$, $(M+4)^+$, $(M+6)^+$ 에 상당하는 peak가 13 : 38 : 37 : 12의 비율로 관측되어 tribromo 화합물로서 분자량은 388 ($\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_3\text{Br}_3$)로 추정되었다. 그러나, fragment ion의 개별 패턴은 SL-1과 달리 31 mass unit 적은 m/z 357에 $[\text{M} - \text{OCH}_3]$ 이온의 peak가 나타나 methoxy기의 존재가 추정되었다.

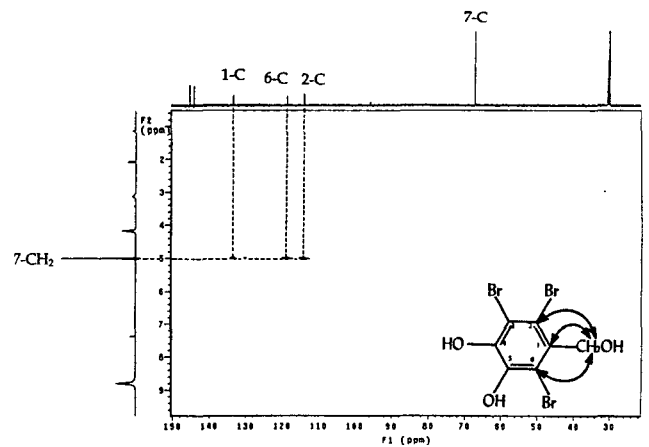


Fig. 4. HMBC spectrum of the compound SL-1 isolated from *S. latiuscula*.

Table 1. ¹H and ¹³C NMR assignment of SL-1 and SL-2

Position	SL-2	2,3,6-tribromo-4,5-dimethoxybenzyl alcohol*	Position	SL-2	2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl methyl ether*	2,3,6-tribromo-4,5-dimethoxybenzyl methyl ether**
¹ H	in (CD ₃) ₂ CO	in CDCl ₃	¹ H	in (CD ₃) ₂ CO		in CDCl ₃
4-OH	8.80, s	-	4-OH	8.80, s	-	3.90, s(4-OCH ₃)
5-OH	8.80, s	-	5-OH	8.80, s	-	3.90, s(5-OCH ₃)
7-CH ₂	5.00, s	not measured	7-CH ₂	4.80, s	4.79, s	4.88, s
7-OH	4.19, s	not measured	8-OCH ₃	3.39, s	3.39, s	3.50, s
¹³ C			¹³ C			
1-C	133.5	136.3	1-C	130.5	129.43	134.0
2-C	114.1	122.8	2-C	114.1	114.19	123.8
3-C	114.2	121.8	3-C	114.7	114.75	121.7
4-C	145.4	151.9	4-C	145.8	146.23	151.9
5-C	144.3	150.7	5-C	144.2	144.39	150.5
6-C	118.8	120.8	6-C	119.4	119.28	121.6
7-C	67.4	67.1	7-C	76.4	79.36	75.3
4-OCH ₃	-	60.8	8-OCH ₃	58.7	58.38	56.8
5-OCH ₃	-	60.8	4-OCH ₃	-	-	60.7
			5-OCH	-	-	60.7

* Park et al. (1999)

** Mori T. (1983)

proton NMR spectrum에서는 모두 3개의 독립된 singlet이 3 : 2 : 2의 비율로 관측되었으며, 적분값으로 볼 때 총 7개의 proton이 존재하는 것으로 확인되었으며, 용매 중에 D₂O를 첨가하여 측정된 proton NMR spectrum과 비교한 결과 8.80 ppm의 singlet이 소실하여 이 signal이 SL-1의 경우와 같이 화학적으로 등가인 두 개의 OH기에 의한 proton으로 추정되어 MS 및 IR spectrum의 결과와 일치하였다 (Fig. 5).

¹³C NMR spectrum에서는 총 8개의 signal이 관측되었으며, 58.7 ppm의 signal은 methylene 탄소로, 76.4 ppm의 signal은 methoxy 탄소(-OCH₃)로 귀속되었으며, 100 ppm 이하의 6개는 수소들 갖지 않은 벤젠환의 탄소들로 추정되었다 (Fig. 6).

¹H-¹H COSY spectrum에서는 수소들의 coupling은 관측되지 않았고, HMBC spectrum에서는 methylene기의 proton (δ=4.80 ppm, s)이 114.1 ppm, 119.4 ppm, 130.5 ppm의 탄소와 contour가 관측되어, methylene기는 SL-1과 같이 benzene환의 1위의 탄소에 결합하고 있는 것으로 추정하였으며, methoxy기의 proton (3.39 ppm)과도 contour가 나타나 이들의 부분 구조가 -CH₂OCH₃ (methoxymethylene)로 되어 있음이 확인되었다.

이들 데이터를 종합하여 벤젠환의 각 탄소 및 수소들의 chemical shift값을 귀속한 것과 Mori et al. (1983)이 합성한 2,3,6-tribromo-4,5-dimethoxybenzyl alcohol과 2,3,6-tribromo-4,5-dimethoxybenzyl ether의 NMR 자료 및 Park et al. (1999)이 보고한 데이터를 비교하여 본 결과 (Table 1), 이들로부터 SL-2의 구조는 Park et al. (1999)이 참보라색우무에서 추출한 향산화성물질인 2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl methyl ether와 동일한 물질임이 확인되었다.

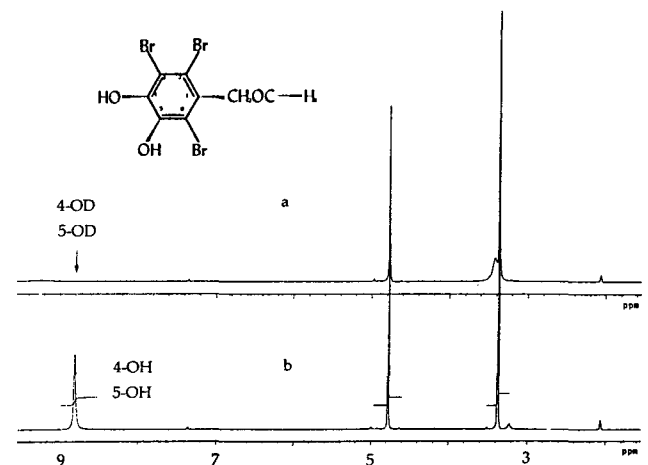


Fig. 5. Comparison of the ¹H NMR spectrum from SL-2 between a and b (a: (CD₃)₂CO+D₂O, b: (CD₃)₂CO).

X선 회절 분석에 의한 SL-2의 입체 구조

비교적 용이하게 결정이 생성된 SL-2에 대하여는 X선 회절 분석에 의한 결정 구조 해석을 시도하였다. EI/MS 및 결정 데이터는 Table 3과 같이 무색 프리즘형의 삼사정계 결정으로서, X선 분석 결과 총 2305 point 중 2078 point의 독립된 반사를 측정된 각 원자좌표, 결합거리, 결합각, Torsion angle 데이터 (데이터 생략)로부터 추정된 구조는 NMR spectrum으로부터 추정된 구조와 완전히 일치하였다 (Fig. 7).

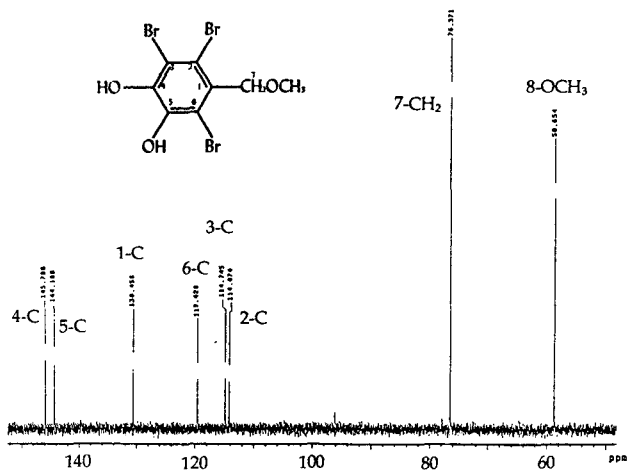


Fig. 6. ¹³C NMR spectrum of the compound SL-2 from *S. latiuscula*.

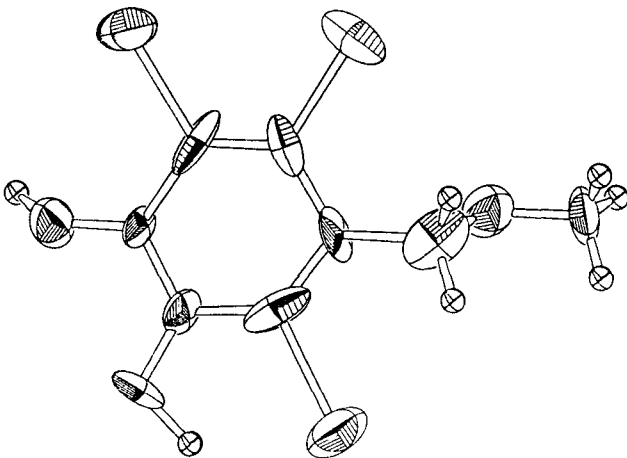


Fig. 7. Stereovision of SL-2 elucidated by X-ray refraction analysis. (2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl methyl ether)

SL-3의 구조

SL-3은 ODS column상에서 가장 뒤에 용출된 성분으로서 세 성분 중 극성이 가장 약한 성분으로서 MS spectrum에서는 SL-2와 동일하게 분자량 388의 tribromo화합물로서 추정되었다. 또한, proton NMR spectrum상에서도 8.82 ppm의 2개의 OH에 유래한 signal이 매우 약하게 관측 (broad singlet)된 것 이외에도 ¹³C NMR, HMBC 등 각종 NMR spectrum이 완전히 SL-2와 일치하였다.

한편, 정제하여 일주일 이상 보관 후 재 chromatograph한 결과 9할 이상이 SL-2와 동일한 위치에 용출하였다. 이상의 rechromatograph 형태와 MS와 NMR 상에서 SL-2와 구별되지 않는 점으로 미루어 이 성분은 SL-2의 어떠한 이성체로 추정되었다.

해조류 중 특히 홍조류들로부터는 항균성을 가진 여러 종류의

브롬화합물들이 *Rhodomelaceae*, *Polysiphonia*, *Rhodomela*, *Odomthalia*, *Symphocladia* 등에서 발견되었다 (Scheuer, 1973; Kurata et al., 1980a). 특히 Kurata et al. (1980b)은 일본산 *S. latiuscula*의 아세톤 추출물로부터 Bis (2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl) ether를 분리하였으며, 메탄올 추출물로부터는 2,3,6-tribromo-3,4-dihydroxybenzyl methyl ether를 분리하여 이들이 전구 물질로부터 추출 용매에 의한 인위적 화합물로 추정하였다. 이들은 또한 3,4-dimethoxy benzyl acetate를 출발물질로 하여 2,3,6-tribromo-4,5-dimethoxybenzyl alcohol, 2,3,6-tribromo-4,5-dimethoxybenzyl methyl ether 등의 tribromo 화합물을 합성하였다 (Kurata et al., 1983).

그러나 본 실험에서는 메탄올 추출물과 아세톤 추출물로부터 이랑체인 Bis (2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl) ether는 분리되지 않았고, 2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl alcohol은 홍조의 *P. lanosa*, *R. subfucosa*로부터 분리되어 TMSi 유도체에 의한 GLC에 의하여 구조가 확인되었으며 (Glombitza et al., 1974), *S. latiuscula*로부터 발견된 것은 처음이다.

또한 참보라색우무에서 강한 항균성물질을 분리정제한 결과 2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl methyl ether로 확인되어 (Park, 1999) 이러한 물질이 항균력 뿐만 아니라 강한 항산화능도 가지고 있는 것으로 나타났다.

한편 *Rhodomela larix*로부터 2,2',3,3'-tetrabromo-4,4',5,5'-tetrahydroxy-diphenyl methane과 2,2',3-tribromo-3',4,4',5-tetrahydroxy-6'-methoxy methyl diphenyl methane을 분리하였으며 (Kurata et al., 1977), *P. urceolata*로부터 3,3'-dibromo-4,4',5,5'-tetrahydroxy-bibenzyl, 3,5-dibromo-4-hydroxybenzyl alcohol, 3,5-dibromo-4-hydroxy-benzylaldehyde, 3-bromo-4,5-dihydroxybenzyl alcohol, 3-bromo-4,5-dihydroxy-benzyl aldehyde 및 이들의 methoxy와 ethoxy 유도체들이 발견되었다 (Kurata et al., 1980a).

각종 미생물에 대한 항균력 및 MIC

참보라색우무 메탄올추출액의 식중독 및 부패세균에 대한 MIC (Table 2)는 그람양성균인 *Bacillus subtilis* 및 *Listeria monocytogenes* 등은 70~1,250 µg/ml이고 그람음성균인 *Vibrio mimicus* 및 *Proteus vulgaricus* 등은 50~1,250 µg/ml로 나타나 그람양성균과 음성균의 세포벽의 구조적인 차이로 인하여 대체로 그람양성균의 항균력이 약하다고 Nakamura et al. (1991)이 보고한 결과와는 달리 그람양성 및 음성균에 대해서 거의 비슷한 항균력을 나타내어 두 가지 이상의 물질로 이루어져 항균활성을 나타낸다는 것을 추정할 수 있다. 한편 효모 및 곰팡이에 대해서는 MIC를 구하기 곤란하여 메탄올 추출액 일정량 (500 µg/disk)의 농도를 가하여 활성을 측정하여 본 결과 여러 가지 균주에 항균활성을 나타내었으나 효모는 *Candida* 속, *Saccharomyces* 속, *Zygosaccharomyces eideri*에 대해, 곰팡이는 *Aspergillus* 속에 대해서 특히 강한 항균활성을 나타내어 (Table 3), 연제품, 발효식품, 수산식품 뿐만 아니라 저온살균식품 등에도 이용 가능성이 시사되었다.

마우스 급성독성 및 돌연변이원성 억제능

Table 2. Minimum inhibitory concentration(MIC) of methanol extracts of *Symphyclocladia latiuscula* against different bacteria

Strains	MIC($\mu\text{g}/\text{ml}$)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 14593	70
<i>Bacillus stearothermophilus</i> var <i>calidolactic</i> ATCC 10149	250
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	500
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	1,250
<i>Sterptococcus epidermis</i> ATCC 12228	250
<i>Escherichia coli</i> ATCC 1129	500
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2,500
<i>Aeromonas hydrophila</i> 291-3 COC	500
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	250
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 6308	1,250
<i>Vibrio fluvialis</i> ATCC 33809	500
<i>Vibrio mimicus</i> ATCC 33653	50
<i>Vibrio vulnificus</i> ATCC 27562	50
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	500
<i>Vibrio anguillarum</i> YT-85805	1,250

Table 3. Antimicrobial activity of methanol extracts of *Symphyclocladia latiuscula* against yeasts and molds

Strains	Activity*
<i>Candida albicans</i> 17PL 76	++
<i>Candida boidinii</i> CBS 8106	+++
<i>Candida intermedia</i> CBS 572	+++
<i>Candida lipolytica</i>	++
<i>Candida oleophila</i> CBS 7034	+++
<i>Candida tropicalis</i> CBS 94	++
<i>Hansenula polymorpha</i> CBS 4732	+++
<i>Kluyveromyces fragillis</i> 561M	++
<i>Kluyveromyces fragillis lactoserum de dann</i>	++
<i>Pichia pastoris</i> CBS 2612	++
<i>Pyrenochaeta terrestris</i> ATCC 32327	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS 1200	+++
<i>Saccharomyces cerevisiae thermophilus</i>	++
<i>Saccharomyces delbrueckii</i> CBS 1146	+++
<i>Saccharomyces diastaticus</i> NCYC 361	+++
<i>Saccharomyces koreanus</i>	+++
<i>Zygosaccharomyces eidei</i> CBS 4575	+++
<i>Aspergillus oryzae</i> (Ahlbury) cohn	+++
<i>Aspergillus parasiticus</i> ATCC 20235	+++
<i>Aspergillus versicolor</i> ATCC 11489	++
<i>Penicillium funiculosum</i> ATCC 9644	++

*Diameter of zone of inhibition; -: not formed, +: below 0.9 cm, ++: 0.9 cm~1.3 cm, +++: above 1.4 cm

SL-1과 SL-2의 마우스에 대한 급성독성시험에서 SL-1의 경우 2 mg까지 투여하여도 투여 초기에 약간의 호흡곤란 증상 이외에는 특별한 증상이 없었고 SL-2는 4 mg 투여하면 약간의 쇼크를 나타내었으나 별다른 증상을 보이지 않았으며, 5 mg 투여하여도 시험된 마우스 5마리 중 한 마리만 사망하여 독성으로 인한 사망

보다는 개체차에 의한 사망으로 추정되어 실험농도에서는 마우스를 치사시키는 독성은 없었다.

돌연변이 유발물질인 MeIQx 및 PhIP에 대한 SL-1과 SL-2의 돌연변이원성 억제효과를 시험하여 본 결과 SL-1은 PhIP 및 MeIQx에 대해 200 μg 까지 첨가하여도 각각 17.7%, 17.8%의 낮은 돌연변이원성 억제효과를 나타낸 반면, SL-2의 경우 250 μg 이상 첨가하면 거의 돌연변이원성을 나타내지 않았다.

요 약

참보라색우무는 우리나라 연근해에서 쉽게 채취할 수 있는 미이용 해조류로서 해조류에서 새로운 천연항균성물질을 개발하기 위한 기초자료를 얻는 목적으로 항균성물질을 각종 칼럼을 통하여 분리정제하였으며, MS, NMR spectrum에 의하여 구조를 확인하였고, X선회절분석으로 결정구조를 해석하였다. 또한 이들 물질이 가지는 몇가지 특성을 조사하였다.

참보라색우무 670 g 중에서 최종적으로 세 개의 항균성물질(SL-1, SL-2, SL-3)이 각각 85 mg, 135 mg, 27.7 mg을 얻었다. SL-1 및 SL-2는 MS 및 NMR에 의하여 2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl alcohol (MW, 374), 2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl methyl ether (MW, 388)이었으며, 특히 SL-2를 벤젠-디에틸 에테르 용매중에서 결정화하여 X선 결정 해석에 의하여서도 구조가 확인되었다. 한편 SL-3는 SL-2와 MS 및 carbon NMR spectrum에서 잘 일치하였으나 proton NMR에서 signal의 패턴이 약간 달라 SL-2의 어떤 이성질체라고 추정되었다.

참보라색우무 항균성물질의 마우스에 대한 치사독성은 SL-1은 3 mg, SL-2는 5 mg까지는 별다른 영향을 미치지 않았으며, PhIP 및 MeIQx에 대한 돌연변이원성 억제효과는 SL-1은 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 17.8% 및 17.7%에 미치지 않았으나 SL-2는 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 높은 억제효과를 나타내어 새로운 보존료로서의 이용가능성을 제시하였다.

참 고 문 헌

- Amico, G., G. Oriente, M. Piatelli, C. Tringali, E. Fattorusso, S. Magno and L. Mayol. 1980. Diterpenes based on the dolabellane skeleton from *Dicyota dichotoma*. Tetrahedron, 36, 1409~1414.
- Azumi, K., M. Yoshimizu, S. Suzuki, Y. Ezura and H. Yokosawa. 1990. Inhibitory effect of halocycamine, an antimicrobial substance from ascidian hemocytes, on the growth of fish viruses and marine bacteria. Experientia, 46, 1066~1068.
- Azumi, K., H. Yokosawa and S. Ishii. 1990. Halocycamines: Novel antimicrobial tetrapeptide-like substances isolated from the hemocytes of the solitary ascidian *Halocynthia roretzi*. Biochemistry, 29, 159~165.
- Baik, S.E. and J.W. Kang. 1986. Antimicrobial activity of the volatile and lipid fractions of marine algae. Kor. J. Phycol., 1(1), 293~310.
- Beuchat, L.R. and D.A. Golden. 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. Food Technol., 43, 134~142.

- Beurskens, P.T., G. Admiraal, G. Beurskens, W.P. Bosman, S. Garcia-Granda, R.O. Gould, J.M.M. Smits and C. Smykalla. 1992. The DIRDIF program system, technical report of the crystallography laboratory, University of Nijmegen, The Netherlands.
- Beurskens, P.T., G. Admiraal, G. Beurskens, W.P. Bosman, R. de Gelder, R. Israel and J.M.M. Smits. 1994. The DIRDIF94 program system, technical report of the crystallography laboratory, University of Nijmegen, The Netherlands.
- Cho, S.Y., B.J. You, M.H. Chang, S.J. Lee, N.J. Sung and E.H. Lee. 1994. Screening for antimicrobial compounds in unused marine resources by the paper disk method. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 26(3), 261~265.
- Enoki, N., R. Ishida, S. Urano, M. Ochi, T. Tokoroyama and T. Matsumoto. 1982. New hydrozulenoid diterpenes from the marine alga *Dictyota dichotoma*, *Chem. Lett.*, 1749~1752.
- Glombitza, K.W., H. Stoffelen, U. Muawski, J. Bielaczek and H. Egg. 1974. *Planta Med.*, 25, 105.
- Kim, S.H., S.B. Lim, Y.H. Ko, C.K. Oh, M.C. Oh and C.S. Park. 1994. Extraction yields of *Hizikia fusiforme* by solvents and their antimicrobial effects. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 27(5), 462~468.
- Kenneth, L.R. Jr., B.G. James, G.H. Jr. Robert, E.R. Jarold, J.M. Patrick, B.S. Euret, A.S. Dale, L.K. Sandra. 1981. Didemnins; Antiviral and antitumor depsipeptides from a caribbean tunicate. *Science*, 212(22), 933~935.
- Kurata, K. and T. Amiya. 1977. Two new bromophenols from the red alga, *Rhodomela Jarix*. *Chem. Letters*, 1435~1438.
- Kurata, K. and T. Amiya. 1980a. A new bromophenol from red alga *Polysiphonia urcerolata*. *Bull. Chem. Soc. Jpn*, 53, 2020~2022.
- Kurata, K. and T. Amiya. 1980b. Bis(2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl) ether from the red alga, *Symphocladia latiuscula*. *Phytochemistry*, 19, 141~142.
- Kurata, K. and T. Amiya. 1983. A simple synthesis of methyl ethers of tribromophenols from the red alga *Symphocladia latiuscula*. *Chem. Pharm. Bull.*, 31, 1754~1756.
- Lee, J.S., I.S. Kim and S.K. Moon. 1991. Studied on the antibacterial, antifungal components on some Korean marine sponges. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 24(3), 193~202.
- Lee, J.S. and J.D. Choi. 1998. Identification of actinomycetes strain, MSA-1, originated from sponge, *Halichondria okadai*, and its antimicrobial component. *J. Korean Fish. Soc.*, 31(4), 516~522.
- Mori, T., H. Bando, Y. Kanaiwa, T. Amiya and K. Kurata. 1983. A simple synthesis of methyl ethers of tribromophenols from the red alga, *Symphocladia latiuscula*. *Chem. Pharm. Bull.*, 31(5), 1754~1756.
- Nakamura, S., A. Kato and K. Kobayashi. 1991. New antimicrobial characteristics of lysozyme-dextran conjugate. *J. Agri. Food Chem.*, 39, 647~650.
- Neiman, C. 1985. Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganism. *Bacteriol. Rev.*, 18, 147~154.
- Park, H.J., H.Y. Chung, J.K. and J.S. Choi. 1999. Antioxidant activity of 2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxy benzyl methyl ether from *Symphocladia latiuscula*. *J. Fish. Sci. Tech.* 2(1), 1~7.
- Sahika, E.A. and K. Mehmet. 1986. Sensitivity of some common food poisoning to thyme, mint and bay leaves. *Inter. J. Food Microbiol.*, 3, 349~352.
- Yahagi, T., M. Magao, Y. Seino, T. Matsushima, T. Sugimura and M. Okada. 1977. Mutagenecities of nitrosamines salmonella. *Mutation Res.*, 48, 121~130.
- Yasumoto, T. 1982. Method for the bioassay of diarrhetic shellfish toxin. *Food Sanitation Research*, 31, 515~522.

2000년 1월 15일 접수
2000년 7월 3일 수리