

홍조류 모로우붉은실(*Polysiphonia morrowii*)의 추출물과 이로부터 분리된 브로모페놀계 화합물의 *in vitro* 항균·항스쿠티카충 활성 및 구조-활성 상관성

강소영*† · 이상윤† · 최준호 · 정성주

전남대학교 수산생명의학과

In vitro Anti-bacterial and Anti-scuticociliate Activities of Extract and Bromophenols of the Marine Red Alga *Polysiphonia morrowii* with Structure-activity Relationships

So Young Kang*†, Sang-yun Lee†, Jun-ho Choi and Sung-Ju Jung

Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 550-749, Korea

Scuticociliates are regarded as serious pathogens in marine aquaculture worldwide. In Korea, they cause mass-mortalities in fish such as the commercially important olive flounder *Paralichthys olivaceus*. In particular, mixed infections of scuticociliates with pathogenic bacteria have been commonly reported. During efforts to identify natural marine-algae derived products that possess anti-bacterial and anti-scuticociliate properties, we found that an 80% methanolic extract of the red alga *Polysiphonia morrowii* Harvey exhibits both anti-scuticociliate activity against *Miamiensis avidus*, which is a major causative agent of scuticociliatosis, and anti-bacterial activities against fish pathogenic bacteria. Activity-guided fractionation and isolation of the 80% methanolic extract of *P. morrowii* yielded three bromophenols, which were identified as 3-bromo-4,5-dihydroxybenzyl methyl ether (1), 3-bromo-4,5-dihydroxybenzaldehyde (2) and urceolol (3) based on spectroscopic analyses. 3-bromo-4,5-dihydroxybenzyl methyl ether (1) showed the highest anti-bacterial and anti-scuticociliate activities, with a minimal inhibitory concentration (MIC) of 62.5 µg/mL (against *Vibrio anguillarum*) and minimal lethal concentration (MLC) of 62.5 ppm (in seawater). Investigations of the anti-bacterial and anti-scuticociliate activities of seventeen bromophenol derivatives, including the three isolated natural bromophenols, showed that the existence of an electron donating group or atom with a non-covalent electron pair at C₄ of the 2-bromophenol structure may be important in anti-scuticociliate activity. These findings suggest that the extract and bromophenol derivatives of *P. morrowii* may provide useful alternatives in aquaculture anti-scuticociliate therapies.

Key words: *Polysiphonia morrowii*, Anti-bacterial, Anti-scuticociliate, 3-bromo-4,5-dihydroxybenzylmethylether, Bromophenols

서론

스쿠티카충(scuticociliatosis)은 어류, 갑각류 및 연체동물에서 발생하는 Scuticociliatida목(order)에 속하는 조직섭이성(histophagous) 섬모충에 의한 감염증을 말하며, 근래 우리나라를 비롯하여 전세계적으로 해산양식에 크게 문제가 되는 기생충성 질병이다. 원인충인 스쿠티카충은 대부분의 섬모충과

는 달리 신장, 혈관 및 뇌조직까지 감염을 유발하여 높은 폐사율을 나타내며 우리나라에서는 특히 넙치양식장에 큰 경제적인 손실을 입히고 있다(Harikrishnan et al, 2010; Iglesias et al., 2002; Bae et al., 2009). 넙치 *Paralichthys olivaceus*에서 스쿠티카충을 일으키는 원인충으로 우리나라에서는 *Uronema marinum* (Jee et al., 2001), *Philasterides dicentrarchi* (Kim et al., 2004a), *Pseudocohnilemdus persalinus* (Kim et al., 2004b)

Article history;

Received 24 December 2013; Revised 4 February 2014; Accepted 7 February 2014

*Corresponding author: Tel: +82. 61. 659. 7176 Fax: +82. 61. 659. 7176

E-mail address: sykang1@chonnam.ac.kr

†Two authors equally contributed to this study.

Kor J Fish Aquat Sci 47(1) 045-051, February 2014

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2014.0045>

pISSN:0374-8111, eISSN:2287-8815

© The Korean Society of Fishereis and Aquatic Science. All rights reserved

Table 1. Anti-bacterial and anti-scudicociliate activities of *Polysiphonia morrowii* extract and its fractions

Samples	Anti-bacterial										Anti-scudicociliate	
	<i>Aeromonas salmonicida</i>		<i>Edwardsiella tarda</i>		<i>Vibrio anguillarum</i>		<i>Streptococcus iniae</i>		<i>Streptococcus parauberis</i>		Sea water	DMEM ¹
	Growth Inhibitory Zone (mm)										MLC ² (ppm)	
	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1		
80% MeOH extract	-	-	12	-	17	12	-	-	-	-	250	125
<i>n</i> -Hexane fr.	9	-	-	-	8	-	-	-	-	-	62.5	62.5
90% MeOH fr.	14	9	25	16	17	14	-	-	-	-	125	250
H ₂ O fr.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxytetracycline (30 µg/disc)	32		34		35		25		34		Not tested	
Norfloxacin (10 µg/disc)	30		50		41		15		28		Not tested	
Formalin	Not tested										31.3	62.5

¹Dulbecco's modified Eagle medium

²Minimal lethal concentraion

가 보고되었고, 이중 *Philasterides dicentrarchi*는 *Miamiensis avidus*와 동일종으로 보고된 바 있다(Jung et al., 2007). 또한 Jin et al. (2007)은 우리나라 넙치 양식의 50% 이상의 생산량을 차지하고 있는 제주도지역 넙치양식장의 경우, 2000년도 이후 지속적으로 스쿠티카충 발생률이 40% 전후로 나타났으며, 특히 이 중 70-80% 이상이 비브리오나 활주세균 등의 세균성질병과의 혼합감염으로 발생했다고 보고하였다.

현재 스쿠티카충에 대한 대책으로는 포르말린(37% 포르말데히드 수용액)이 유일하게 스쿠티카충 구제제로 승인되어 사용되고 있으나 사용농도가 100-200 ppm으로 높아 어체에 스트레스를 줄 수 있으며 최근 미국 독성학 프로그램 보고서(2011)에 의하면 포르말데히드는 1981년 보고서에서의 "reasonably anticipated to be a human carcinogen"에서 "known to be a human carcinogen"로 그 위험성이 격상되어 식품안전상의 문제도 대두되고 있는 현실이다. 현재까지 스쿠티카충 구제물질에 관한 연구로는 항생제, 기생충 구제제를 포함한 다양한 화학요법제 그리고 resveratrol과 같은 천연유래물질 등을 이용한 *in vitro* 항스쿠티카충 효과에 관한 보고가 있으나, *in vivo* 또는 현장실험에서의 효과는 거의 보고되어 있지 않다(Lamas et al., 2009; Harikrishnan et al., 2010).

따라서, 본 연구에서는 스쿠티카충의 주된 발병상황인 세균과의 혼합감염에도 효과적으로 대응할 수 있는 물질을 도출하기 위하여 항스쿠티카충 활성뿐만 아니라 항균활성도 동시에 갖는 물질을 천연물에서 도출하고자 활성검색을 실시하였다. 그 과정에서 홍조류인 모로우붉은실[*Polysiphonia morrowii* Harvey (Rhodomelaceae)]의 80% 메탄올 추출물이 *Miamiensis avidus*에 대한 항스쿠티카충 활성과 동시에 주요 그람음성세균

에 대한 항균활성도 갖는 것을 확인하였다. 선행된 연구(Kang et al., 2005; Kang et al., 2008; Kim et al., 2011)에서는 모로우붉은실 추출물과 분획물 수준에서의 항균활성이 보고되었으며, 주요 어병바이러스에 대한 항바이러스 활성이 보고되었고 항바이러스 활성물질로 2종의 브로모페놀계 화합물이 분리·보고된 바 있다. 그러나, 모로우붉은실의 항스쿠티카충 활성과 활성지향적인 분리에 따른 항스쿠티카충 활성물질 분리에 관한 연구는 처음 시도된 것이다. 뿐만 아니라, 분리된 브로모페놀계 화합물을 포함한 다양한 브로모페놀 유도체들을 이용하여 항스쿠티카충 활성의 구조-활성상관성을 알아보았다.

재료 및 방법

세균 및 스쿠티카충

그람음성균으로 *E. tarda* 표준균주 KCTC 12267 및 *V. anguillarum* 표준균주 KCTC 2711, *A. salmonicida* KCCM 40239를 사용하였고, 그람양성균으로는 *S. iniae*와 *S. parauberis* ST 12046을 사용하였다. 스쿠티카충은 스쿠티카충을 일으키는 주요 원인충의 하나인 *Miamiensis avidus* (YS2 strain) (Bae et al., 2009)을 어류주화세포 CHSE -214 세포에 접종 후 20℃에서 배양하여 사용하였다.

모로우붉은실의 추출물 및 분획물의 제조

본 연구에 사용된 모로우붉은실(*Polysiphonia morrowii* Harvey)은 2008년 4월 전남 여수시 돌산에서 채집하여 신중암 교수(전남대학교 해양기술학부)로부터 동정 받은 후 사용하였다. 채집한 모로우붉은실은 증류수로 충분히 세척하여 염분

Table 2. Anti-bacterial and anti-scudicociliate activities of isolated compounds 1, 2, 3 and synthetic bromophenol derivatives (4-17)

Compounds	Anti-bacterial			Anti-scudicociliate	
	<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>	Sea water	DMEM ¹
	MIC ² (µg/mL)			MLC ³ (ppm)	
3-Bromo-4,5-dihydroxybenzylmethylether (1)	250	125	62.5	62.5	125
3-Bromo-4,5-dihydroxybenzaldehyde (2)	62.5	125	500	500	250
urceolalol (3)		Not tested		>250	>250
2-Bromohydroquinone (4)	15.6	62.5	62.5	3.9	3.9
2,4-Dibromophenol (5)	62.5	62.5	125	15.6	125
2-Bromo-4-methoxyphenol (6)	500	500	500	62.5	500
4-Bromocatechol (7)	62.5	250	250	62.5	62.5
3,4,5-Trihydroxybenzaldehyde (8)	125	125	500	125	250
3-Bromo-4-hydroxybenzonitrile (9)	>1,000	250	125	250	>500
2-Bromo- <i>p</i> -cresol (10)	125	>1,000	500	250	250
3,4-Dihydroxybenzaldehyde (11)	62.5	250	1,000	500	500
<i>o</i> -Bromophenol (12)	>1,000	>1,000	500	500	500
3-Bromo-4-hydroxybenzaldehyde (13)	500	1,000	500	500	>500
3,5-Dibromo-4-hydroxybenzaldehyde (14)	250	1,000	125	500	>500
5-Bromovanillin (15)	500	>1,000	1,000	>500	>500
4-Bromoresorcinol (16)	250	1,000	1,000	>500	>500
3-Bromo-4-hydroxybenzoic acid hydrate (17)	>1,000	>1,000	> 1,000	>500	>500
Oxytetracycline	0.250	0.250	0.250	Not tested	
Norfloxacin	0.063	0.016	0.063	Not tested	
Flumequine	0.031	0.063	0.031	Not tested	
Formalin		Not tested		31.3	62.5

¹Dulbecco's modified Eagle medium

²Minimal inhibitory concentration

³Minimal lethal concentraion

을 제거하고, 동결건조 후 냉동(-20℃) 보관하였다. 그 표본은 본 연구실에 보관되어있다. 동결건조한 모로우붉은실(100 g)을 80% (v/v)메탄올 3 L로 3 h 동안 열탕(80℃) 추출하여 추출액을 모아 감압 농축하였다. 80% 메탄올 추출물(9.6 g)을 물에 현탁하여 메틸렌클로라이드(CH₂Cl₂)로 분획하였다. 감압 농축한CH₂Cl₂분획물(3.4 g)은 90% (v/v) 메탄올로 용해시켜 이를 다시 *n*-Hexane으로 분획하여 총 3가지의 분획물, *n*-Hexane (2.2 g), 90% 메탄올(1.1 g), Aqueous (6.1 g) 분획물을 얻었다 (Fig. 1).

활성물질의 분리 및 화학구조의 분석

모로우붉은실의 90% 메탄올 분획물(1.1 g)을 ODS column

chromatography (methanol:water=5:95~100:0)를 실시하여 9개의 소분획으로 나누었다. 그 중 소분획물 II (120 mg)를 Sephadex™ LH-20 column chromatography (100% methanol)을 실시하여 얻은 5개의 subfraction 중 2번 subfraction (70 mg)을 다시 Sephadex™ LH-20 column chromatography (methanol:acetone=1:9)로 실시하여 각각 Compound 1 (12 mg)과 Compound 2 (23 mg)를 얻었다. 소분획물 VI (150 mg)를 Sephadex™ LH-20 column chromatography (CH₂Cl₂:MeOH=1:9)을 실시하여 소분획물 VI-V를 얻었고, 이에 대한 HPLC 정제 과정을 거쳐 Compound 3 (3 mg)을 분리하였다(Fig. 1).

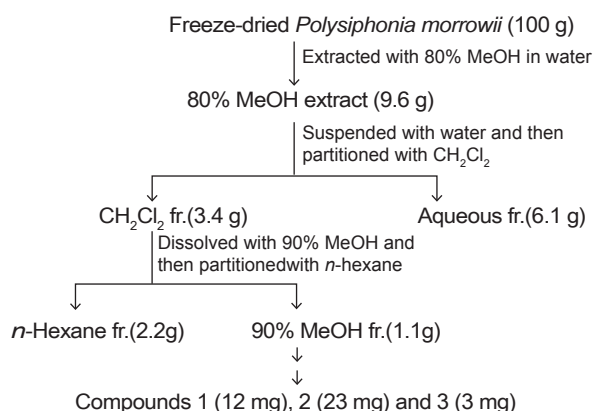


Fig. 1. Extraction, fractionation and isolation for *Polysiphonia morrowii*.

합성브로모페놀 유도체 및 항생제

본 연구에 사용된 14종의 합성브로모페놀 유도체는 Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. Oxytetracycline, norfloxacin, flumequine은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, USA) 제품을 사용하였다.

In vitro 항균활성

Disc-diffusion assay

시료를 75% 에탄올 수용액에 녹인 후 직경 6 mm 멸균 paper disc에 설정 농도로 흡착하여 실온에서 건조시켰다. 세균을 10^8 CFU/mL로 배양하고 BHI agar plate에 100 μ L씩 접종한 후 건조된 disc를 올리고, 24 h 동안 25°C에서 배양하여 disc를 포함한 growth inhibition zone의 직경을 측정하였다. Positive control로서는 norfloxacin (10 μ g/disc)과 oxytetracycline (30 μ g/disc) disc를 사용하였다(Kang et al., 2005).

Microdilution assay

화합물들은 희석용액에 대한 용해도를 높이기 위해 최소한의 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해하였으며(최종 농도 0.25% 이하), BHI broth 배지에 2배 농도 구배로 희석하여 세균증식에 미치는 영향을 측정하였다. 실험에 사용된 세균은 24 h 전에 배양하여 10^6 CFU/mL로 조정하였으며, 시료와 동량(1:1)으로 96-well microplate에서 혼합하여 20 h 25°C 인큐베이터에서 배양하였다. 세균의 증식을 억제하는 최소농도 [최소생장억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC)]를 육안으로 확인하고, 이를 재확인하기 위해 Langfield et al. (2004)의 방법으로 20 h 동안 배양된 96-well microplate에 0.2 mg/mL의 *p*-iodonitrotetrazolium violet (*p*-INT) 30 μ L를 넣고, 2 시간 동안 암조건에서 반응 후 최종적으로 MIC를 결정하였다(Kang et al., 2008).

In vitro 항스쿠티카충 활성

스쿠티카충 배양액을 500 \times g에서 5분간 원심분리하고 펠렛에 DMEM배지(또는 해수)를 넣어 충을 부유시켜 $5-7 \times 10^5$ mL로 충의 농도를 조절하였다. 모로우붉은실 시료 또는 화합물 시료를 DMSO (최종농도 0.5% 이하)에 녹인 후 DMEM배지(또는 해수)로 희석하고 이를 2배 농도구배로 96-well microplate에 90 μ L씩 넣었다. 여기에 충부유액을 한 well 당 10 μ L씩 넣고 20°C에서 20 h 동안 배양한 후 현미경으로 관찰하여 "100% lysed (충이 완전 터진 상태) 또는 not motile"이 관찰된 최소농도를 MLC (minimal lethal concentration)로 판단하였다(Iglesias et al., 2002).

세포독성(Cytotoxicity)

시료의 어류 주화세포에 대한 세포독성은 neutral red uptake assay (Kim et al., 2011)를 이용하였다. 어류 주화세포를 phenol red가 첨가되지 않은 DMEM으로 부유시킨 뒤, 96-well plate에 1×10^6 cell/mL로 100 μ L씩 seeding하여 20°C에서 24 h 동안 배양시킨 후, 시료를 농도 별로 처리한 뒤 20°C에서 48 h 동안 반응시켰다. 0.33% neutral red solution을 각 well당 3 μ L씩 분주하여 20°C에서 2 h 동안 반응시킨 뒤, 1% acetic acid in 50% 에탄올에 녹여 microplate reader (Spectra Max 340, Molecular Devices, USA)를 사용하여 흡광도(540 nm-690 nm)의 차이를 측정하였다.

결 과

모로우붉은실 추출물과 분획물의 in vitro 항균활성 및 항스쿠티카충 활성

모로우붉은실의 80% 메탄올 추출물 및 이의 분획물들의 주요 어병세균에 대한 항균활성을 Disk diffusion법을 이용하여 검색한 결과는 다음과 같다(Table 2). 80% 메탄올추출물로부터 얻은 분획물 중 90% 메탄올 분획물에서 그람음성균인 *A. salmonicida*, *E. tarda* 및 *V. anguillarum*에 대한 강한 억제 zone을 관찰할 수 있었고 그람양성균인 *S. iniae*와 *S. parauberis*에 대해서는 억제 zone이 관찰되지 않았다. 항스쿠티카충 활성은 여과해수 및 충이 배양된 배지(DMEM)에서 각각 시험되었다. 모로우붉은실의 80% 메탄올추출물은 배지조건에서는 125 ppm, 해수조건에서는 250 ppm의 MLC값을 보였다. 이의 분획물 중 *n*-hexane 분획물에서 62.5 ppm의 가장 높은 항스쿠티카충 활성을 보였고 90% 메탄올분획물에서는 해수조건에서 125 ppm, 배지조건에서는 250 ppm의 MLC를 나타내었다. Reference control로 사용된 포르말린의 경우 해수조건에서 31.3 ppm, 배지조건에서 62.5 ppm의 MLC를 보였다.

90% 메탄올 분획물로부터 활성물질의 분리 및 화학구조의 분석

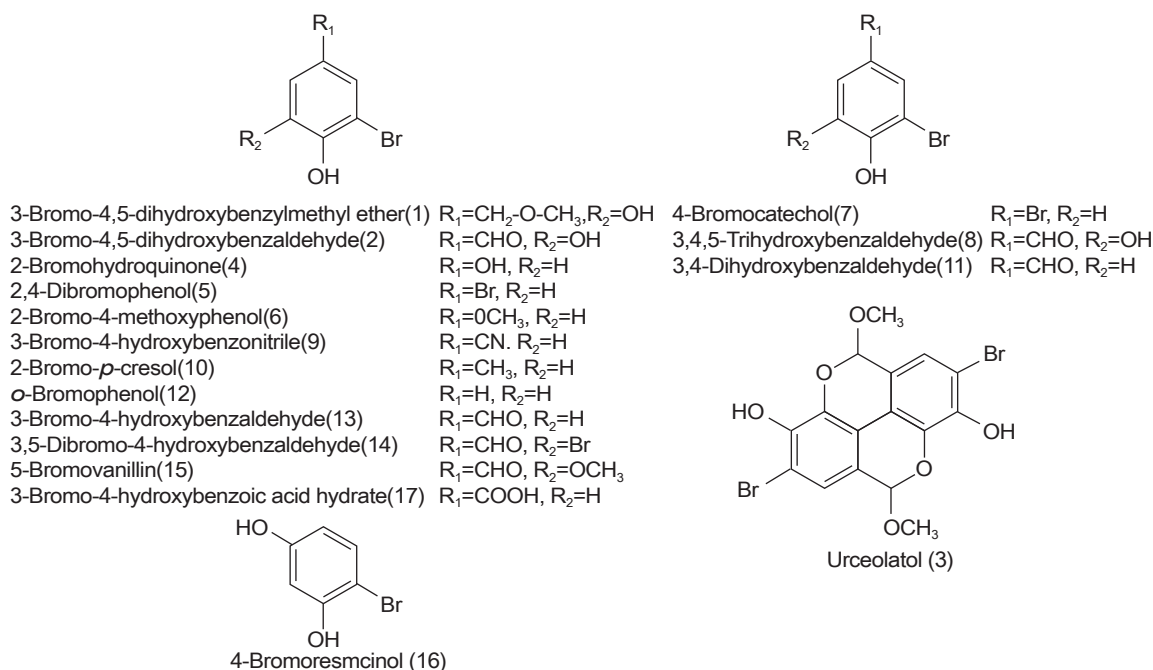


Fig. 2. Chemical structures of 17 bromophenol derivatives including isolated natural bromophenols (1-3).

90% 메탄올 분획물에 대한 reverse-phase silica gel 컬럼 크로마토그래피 및 Sephadex-LH 20 컬럼 크로마토그래피 등의 일련의 분리·정제과정을 실시하여 Compound 1, 2 그리고 3를 분리하였다. 분리된 화합물의 MS, NMR 등의 다양한 분광학적 분석법을 이용하여 그 화학구조를 규명한 결과 세 화합물은 모두 브로모페놀계 화합물로 Compound 1은 분자식 $C_8H_9O_3Br$ 을 갖는 3-bromo-4,5-dihydroxybenzylmethylether (1), Compound 2는 분자식 $C_7H_7O_3Br$ 을 갖는 3-bromo-4,5-dihydroxybenzaldehyde (2), Compound 3은 분자식 $C_{16}H_{12}O_6Br_2$ 을 갖는 Compound 1의 dimer 형태인 urceolator (3)로 동정되었다 (Kurihara et al., 1999; Han et al., 2005; Liu et al., 2006; Kim et al., 2011) (Fig. 2).

분리된 브로모페놀계 화합물 및 합성 브로모페놀 유도체들의 *in vitro* 항균 및 항스쿠티카충 활성

In vitro 항스쿠티카충 활성

90% MeOH 분획물로부터 분리된 화합물 3종에 대한 *in vitro* 항스쿠티카충 활성을 알아본 결과 (Table 2), 3-bromo-4,5-dihydroxybenzylmethylether (1)는 해수 및 배지조건에서 각각 62.5 ppm 및 125 ppm의 MLC를 나타내었다. 이에 비해 3-bromo-4,5-dihydroxybenzaldehyde (2)은 각각 500 ppm 및 250 ppm을 나타내었고, dimer 형태인 urceolator (3)는 250 ppm가 최고시험농도였으나 이 농도에서도 MLC가 확인되지 않았다.

이에, 브로모페놀 유도체들의 작용기 변화에 따른 항스쿠티카충 활성변동을 알아보기 위하여 14종의 합성브로모페놀 유도체를 이용하여 다양한 작용기의 변화에 따른 항스쿠티카충 활성변동을 알아보았다 (Table 2). 해수조건에서 17종의 브로모페놀 유도체 중 2-bromohydroquinone (4)이 3.9 ppm의 가장 낮은 MLC를 나타내며 가장 강한 항스쿠티카충 활성을 나타내었다. 그 뒤를 2,4-dibromophenol (5)가 이었으며 (MLC=15.6 ppm), 그 다음이 2-bromo-4-methoxyphenol (6) (MLC=62.5 ppm), 2-bromo-*p*-cresol (10) (MLC=250 ppm) 등의 순으로 나타났다. 포르말린은 31.3 ppm의 MLC를 나타내었다. 배지 조건에서도 해수조건에서와 비슷한 활성경향을 나타내었으나 2,4-dibromophenol (5)과 2-bromo-4-methoxyphenol (6)은 해수조건에 비해 MLC가 8배 증가하며 항스쿠티카충 활성이 급감하는 것으로 나타났다.

In vitro 항균 활성

17종의 브로모페놀유도체들을 그람음성세균인 *A. salmonicida*, *E. tarda* 및 *V. anguillarum*에 대하여 microdilution assay를 실시하여 항균 활성을 알아보았다 (분리된 urceolator (3)의 양이 충분하지 못하여 항균활성 시험은 실시하지 못하였다). 그 결과 3-bromo-4,5-dihydroxybenzylmethylether (1)은 *V. anguillarum*에서 가장 높은 항균활성 (MIC=62.5 µg/mL)을, 3-bromo-4,5-dihydroxybenzaldehyde (2)는 *A. salmonicida*에서 가장 높은 항균활성 (MIC=62.5 µg/mL)을 나타내었다. 17종의 유도체 중 2-bromohydroquinone (4)이 3가지 균종에 대하여

각각 MIC=15.6 µg/mL (against *A. salmonicida*), MIC=62.5 µg/mL (against *E. tarda*/ *V. anguillarum*)을 나타내며 가장 높은 항균활성을 나타내었다. 2,4-dibromophenol (5) 가 3가지 균종에 대하여 모두 62.5 µg/mL의 MIC를 나타내며 그 뒤를 이었다. 그러나, reference control로 사용된 항생제들과 비교해 볼 때 이들 브로모페놀 유도체들의 항균활성은 전반적으로 훨씬 낮음을 알 수 있었다.

고 찰

본 연구에서는 홍조류인 모로우붉은실의 80% 메탄올추출물이 스쿠티카충의 주요 원인충인 *Miamiensis avidus*에 대한 *in vitro* 항스쿠티카충 활성을 가질 뿐 만 아니라 동시에 주요 그람음성균에 대한 항균활성도 함께 보유함을 확인하였다. 이에, 활성지향적인 분리를 시도하여 활성분획물인 90% 메탄올 분획물을 도출하였고 이로부터 활성물질의 분리를 시도하여 브로모페놀계 화합물 3종을 분리하였다. 이 과정에서 *n*-hexane 분획물이 해수조건 및 배지조건 모두에서 62.5 ppm의 MLC 값을 보이며 항스쿠티카충 활성에서 90% 메탄올 분획물보다 2-4배 정도 우수한 효력을 나타내었으나, 항균활성을 전혀 나타내지 않았으며 90% 메탄올 분획물에 비하여 세포독성이 10배 이상 강하여(50% cytotoxic concentrations in CHSE-214 cell line: *n*-hexane fr. 132 ± 5 µg/mL; 90% 메탄올 fr.; $1,255 \pm 185$ µg/mL), 이러한 측면은 본 연구의 활성분획물로 선정하기에는 적합하지 않은 것으로 판단되었다. 본 연구에서 분리·동정된 화합물 3종은 모두 브로모페놀계 화합물로서 모로우붉은실이 속하는 빨간검둥이과(Rhodomelaceae)의 해산 홍조류들은 다양한 화학구조의 브로모페놀계 화합물을 고농도로 함유하고 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 브로모페놀계 화합물들의 알려진 생리활성으로는 nitrite 소거활성, α -glucosidase 저해활성, 항산화, 항균, feeding-deterrent, 항염증 활성 등 다양한 활성이 보고되어 있다(Wall et al., 1989; Wiemer et al., 1991; Kurata et al., 1997; Xu et al., 2003; Li et al., 2008). 이에 비해 본 연구에서 분리된 화합물들의 생리활성에 관한 보고는 많지 않다. 3-bromo-4,5-dihydroxybenzylmethylether (1)와 3-bromo-4,5-dihydroxybenzaldehyde (2)의 경우 어류병원성 바이러스인 infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) 및 infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)에 대한 항바이러스 활성이 보고되었으며(Kim et al., 2011), 몇몇 암세포주에 대한 세포독성과 DPPH radical 소거활성이 보고되어 있다(Shoeb et al., 2004; Han et al., 2005; Li et al., 2008). Urceolol (3)은 *Polysiphonia urceolata*에서 분리·보고된 후 현재까지 DPPH 라디칼 소거활성이 보고되어 있다(Liu et al., 2006; Li et al., 2008). 본 연구에서 분리된 3종의 화합물 중 3-bromo-4,5-dihydroxybenzylmethylether (1)은 항스쿠티카충 활성에서 해수조건에서 62.5 ppm의 MLC와 *V. anguillarum*에 대한 항균활성에서 같은 농도인 62.5 µg/mL의 MIC를 나타내었다. 우리나라

제주도 넙치양식장에서 발생하는 스쿠티카충의 70-80% 이상이 세균에 의한 혼합감염으로 발생하며 이중 40-50% 정도가 *Vibrio*에 의한 혼합감염이라는(Jin et al., 2007) 상황을 고려할 때 3-bromo-4,5-dihydroxybenzylmethylether (1)은 스쿠티카충의 구제와 동시에 *Vibrio*에 대한 항균활성을 기대할 수 있는 장점을 가지고 있는 것으로 판단된다. Reference control로 사용된 포르말린의 해수조건에서의 MLC가 31.3 ppm임을 감안하면 *in vitro*에서의 효력도 견줄만한 것으로 생각된다.

분리된 3종의 브로모페놀 유도체를 포함하여 17종의 브로모페놀 유도체의 작용기와 해수조건에서의 항스쿠티카충 활성을 비교하여 본 결과, 몇 가지 구조-활성 상관성을 발견할 수 있었다. i) 2-bromophenol (12) (MLC=500 ppm)의 구조를 기준으로 관찰하였을 때 4번 탄소(Fig. 2의 R₁)의 수소원자가 hydroxyl 기로 치환되거나(2-bromohydroquinone (4), MLC=3.9 ppm), bromine으로 치환되거나(2,4-dibromophenol (5), MLC=15.6 ppm), methoxyl기로 치환되거나(2-bromo-4-methoxyphenol (6), MLC=62.5) 또는 methyl 기(2-bromo-*p*-cresol (10), MLC=250 ppm)로 치환된 경우 항스쿠티카충 활성이 증가됨이 확인되었다. 이에 비하여 carboxyl기로 치환된 경우(3-bromo-4-hydroxybenzoic acid hydrate (17), MLC>500 ppm) 활성이 떨어짐이 확인되었다. 이는 2-bromophenol (12) 구조에서 4번 탄소에 전자공여기나 비공유 전자쌍을 갖는 원자의 결합이 항스쿠티카충 활성에 중요한 역할을 하고 있음을 보여주고 있는 결과로 판단된다. ii) 2-bromohydroquinone (4), 4-bromocatechol (7) 및 4-bromoresorcinol (16)의 활성 비교에서 브롬을 포함한 벤젠고리에서 두 hydroxyl기의 위치관계가 활성에 중요한 영향을 끼침을 알 수 있다. 즉, *para* (2-bromohydroquinone (4) (MLC=3.9 ppm)) 또는 *ortho* (4-bromocatechol (7) (MLC=62.5 ppm)) 위치로 존재할 때는 항스쿠티카충 활성이 높은 반면, *meta* (4-bromoresorcinol (16) (MLC>500 ppm)) 위치에서는 활성이 전혀 나타나지 않음을 알 수 있었다. iii) 3,4-dihydroxybenzaldehyde (11) (MLC=500 ppm) 구조의 R₂기에 브롬이 치환((3-bromo-4,5-dihydroxybenzaldehyde (2), MLC=500 ppm) 된다 하더라도 항스쿠티카충 활성을 증가시키지는 못함을 알 수 있었다. 이상의 경향은 배지조건에서의 항스쿠티카충 활성에서도 유사하게 관찰되었다. 반면, 항균활성의 경우에는 항스쿠티카충 활성에서 전반적으로 관찰되었던 2-bromophenol (12) 구조의 4번 탄소에서의 전자공여기나 비공유 전자쌍을 갖는 원자의 결합이 활성에 미치는 영향이 일관되게 관찰되지는 않았다. 그러나 2-bromohydroquinone (4), 4-bromocatechol (7) 및 4-bromoresorcinol (16)의 항균활성을 비교해 보면, 브롬을 함유한 벤젠고리에서 두 hydroxyl기의 위치관계의 중요성이 항균활성에도 적용됨을 알 수 있었다. 이상의 결과는 향후 항스쿠티카충 약물 개발 시 활성-구조의 최적화 단계에서 유용한 정보가 될 수 있을 것으로 생각된다. 비록 2-bromohydroquinone의 신장독성이 알려져 있긴 하나(Lau et

al., 1984) 2-bromohydroquinone 또는 이의 유도체들에 대한 면밀한 *in vitro/in vivo* 실험이 진행된다면 더욱 효력이 높은 항스쿠티카충 및 항균 물질의 개발이 가능할 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 2009년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업 지원을 받아 수행된 것임(NRF-2009-0076909).

References

- Bae MJ, Im EY, Kim HY and Jung SJ. 2009. The effect of temperature to scuticociliatida *Miamiensis avidus* proliferation, and to mortality of infected olive flounder *Paralichthys olivaceus*. J Fish Pathol 22, 97-105.
- Han L, Xu N, Shi J, Yan X and Zeng C. 2005. Isolation and pharmacological activities of bromophenols from *Rhodomela confervoides*. Chin J Ocean Limn 23, 226-229. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02894243>.
- Harikrishnan R, Balasundaram C and Heo MS. 2010. Scuticociliatosis and its recent prophylactic measures in aquaculture with special reference to South Korea Taxonomy, diversity and diagnosis of scuticociliatosis: Part I Control strategies of scuticociliatosis: Part II. Fish Shellfish Immunol 29, 15-31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2010.02.026>.
- Iglesias R, Parama A, Alvarez F, Leiro J and Sanmartin ML. 2002. Antiprotozoals effective in vitro against the scuticociliate fish pathogen *Philasterides dicentrarchi*. Dis Aqua Org 49, 191-197.
- Jee BY, Kim YC and Park MS. 2001. Morphology and biology of parasite responsible for scuticociliatosis of cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Dis Aquat Org 47, 49-55.
- Jin CN, Kang HS, Moon YG, Lee CH, Lee YD, Lee JH, Song CB and Heo MS. 2007. Scuticociliatosis in flounder farms of Jeju island. J Fish Pathol 20, 93-98.
- Jung SJ, Kitamura SI, Song JY and Oh MJ. 2007. *Miamiensis avidus* (Ciliophora: Scuticociliatida) causes systemic infection of olive flounder *Paralichthys olivaceus* and is a senior synonym of *Philasterides dicentrarchi*. Dis Aquat Org 73, 227-234.
- Kang SY, Kang JY, Kim SY, Kim DH and Oh MJ. 2008. Antimicrobial activities of alkyl gallates alone and in combination with antibiotics against the fish pathogenic bacteria *Edwardsiella tarda* and *Vibrio anguillarum*. J Kor Fish Soc 41, 188-192.
- Kang SY, Oh MJ and Shin JA. 2005. Antimicrobial activities of Korean marine algae against fish pathogenic bacteria. J Fish Pathol 18, 147-156.
- Kim SM, Cho JB, Kim SK, Nam YK and Kim KH. 2004a. Occurrence of Scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus* by *Philasterides dicentrarchi*. Dis Aquat Org 62, 233-238.
- Kim SM, Cho JB, Lee EH, Kwon SR, Kim SK, Nam YK and Kim KH. 2004b. *Pseudocohnilemdus persalinus* (Ciliophora: Scuticociliatida) is an additional species causing Scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Dis Aquat Org 62, 239-244.
- Kim SY, Kim SR, Oh MJ, Jung SJ and Kang SY. 2011. *In vitro* antiviral activity of red alga, *Polysiphonia morrowii* extract and its bromophenols against fish pathogenic infectious hematopoietic necrosis virus and infectious pancreatic necrosis virus. J Microbiol 49, 102-106.
- Kurata K, Taniguchi K, Takashima K, Hayashi I and Suzuki M. 1997. Feeding-deterrent bromophenols from *Odonthalia corymbifera*. Phytochemistry 45, 485-487.
- Kurihara H, Mitani T, Kawabata J and Takahashi K. 1999. Inhibitory potencies of bromophenols from Rhodomelaceae algae against α -glucosidase activity. Fish Sci 65, 300-303.
- Lamas J, Morais P, Arranz JA, Sanmartin ML, Orallo F and Leiro J. 2009. Resveratrol promotes an inhibitory effect on the turbid scuticociliate parasite *Philasterides dicentrarchi* by mechanisms related to cellular detoxification. Vet Parasitol 161, 307-315. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vet-par.2008.12.025>.
- Lau SS, Monks TJ and Gillette JR. 1984. Identification of 2-bromohydroquinone as a metabolite of bromobenzene and *o*-bromophenol: implications for bromobenzene-induced nephrotoxicity. J Pharmacol Exp Ther 230, 360-366.
- Li K, Li XM, Ji NY and Wang BG. 2008. Bromophenols from the marine red alga *Polysiphonia urceolata* with DPPH radical scavenging activity. J Nat Prod 71, 28-30. <http://dx.doi.org/10.1021/np070281p>.
- Liu QW, Tan CH, Zhang T, Zhang SJ, Han LJ, Fan X and Zhu DY. 2006. Urceolatol, a tetracyclic bromobenzaldehyde dimer from *Polysiphonia urceolata*. J Asian Nat Prod Res 8, 379-383. <http://dx.doi.org/10.1080/10286020500172269>.
- National Toxicology Program. 2011. Report on carcinogen 12th Edition. 195-204.
- Shoeb, NA, Bibby MC, Blunden G, Linley PA, Swaine DJ, Wheelhouse T, and Wright CW. 2004. In-vitro cytotoxic activities of the major bromophenols of the red alga *Polysiphonia lanosa* and some novel synthetic isomers. J Nat Prod 67, 1445-1449.
- Wall ME, Wani M C, Manikumar G, Taylor H, Hughes TJ, Gaetano K, Gerwick WH, McPhail AT, and McPhail DR. 1989. Plant antimutagenic agents, 7. Structure and antimutagenic properties of cymobarbatol and 4-isocymobarbatol, new cymopols from green alga (*Cymopolia barbata*). J Nat Prod 52, 1092-1099.
- Wiemer DF, Idler DD, and Fenical W. 1991. Vidalols A and B, new anti-inflammatory bromophenols from the Caribbean marine red alga *Vidalia obtusiloba*. Experientia 47, 851-853.
- Xu N, Fan X, Yan X, Li X, Niu R and Tseng CK. 2003. Antibacterial bromophenols from the marine red alga *Rhodomela confervoides*. Phytochemistry 62, 1221-1224.