

RESEARCH ARTICLE

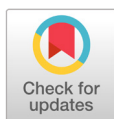
항균활성 보유 *Penicillium rubefaciens* NNIBRFG5039의 최적배양 조건

황혜진¹, 문혜연¹, 황병수², 남영호³, 정유진^{3,*}¹국립낙동강생물자원관 균류연구팀, ²국립낙동강생물자원관 동식물활용연구팀, ³국립낙동강생물자원관 환경미생물연구팀

Optimal Culture Conditions for *Penicillium rubefaciens* NNIBRFG5039 Possessing Antimicrobial Activity

Hye Jin Hwang¹, Hye Yeon Mun¹, Buyng Su Hwang², Young Ho Nam³, and Eu Jin Chung^{3,*}¹Fungi Research Team, Microbial Research Department, Nakdonggang National Institute of Biological Resources (NNIBR), Sangju 37242, Korea²Animal&Plant Utilization Team, Animal&Plant Research Department, Nakdonggang National Institute of Biological Resources (NNIBR), Sangju 37242, Korea³Environmental Microbiology Research Team, Microbial Research Department, Nakdonggang National Institute of Biological Resources (NNIBR), Sangju 37242, Korea

*Corresponding author: eujene@nnibr.re.kr

**OPEN ACCESS**pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249Kor. J. Mycol. 2020 March, 48(1): 15-27
<https://doi.org/10.4489/KJM.20200002>**Received:** January 08, 2020**Revised:** March 25, 2020**Accepted:** March 26, 2020

© 2020 THE KOREAN SOCIETY OF MYCOLOGY.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT

In screening for antimicrobial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) KCCM 40510 and *Bacillus cereus* KCTC 3624, NNIBRFG5039 was isolated from the air in Sangju-si, Gyeongsangbuk-do. Based on a high sequence similarity of the internal transcribed spacer (ITS) region, NNIBRFG5039 was determined to be closely related to *Penicillium rubefaciens* CBS 139145. The optimal media, initial pH, and temperature for mycelial growth and antimicrobial activity of *P. rubefaciens* NNIBRFG5039 were determined as follows: potato dextrose broth (PDB), pH 6.5, and 30°C, respectively. Under the optimal culture conditions, maximum mycelial growth (12.4 g L⁻¹) and antibacterial activity (7.5 mm zone of inhibition against MRSA KCCM 40510, and 5.0 mm zone of inhibition against *B. cereus* KCTC 3624) were observed in a 5 L stirred-tank fermenter. We also isolated the antimicrobial compound from an ethyl acetate fraction, and its chemical structure was identified as (S)-6-hydroxymellein (1) by ESI-MS, ¹H-NMR, and ¹³C-NMR. Consequently, the extract from *P. rubefaciens* NNIBRFG5039 may be used in functional materials for antimicrobial-related applications.

Keywords: Antimicrobial activity, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Penicillium rubefaciens*, (S)-6-hydroxymellein

서론

항생물질은 “미생물에 의해 생산되고, 다른 미생물의 발육을 억제하는 물질”로 정의되며, 이러한 물질로 만든 병원성 박테리아 감염의 치료 및 예방에 사용되는 약을 항생제라고 한다. 인류 최초의 항생제 penicillin은 1928년 영국의 A. Fleming이 *Penicillium notatum*으로부터 처음 발견되어 널리 사용되었으나, 1950년대 초 penicillin에 의하여 사멸되지 않는 *Staphylococcus* 군주가 출현하기 시작하였다[1]. 특히 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)는 그람양성균으로 원내 감염의 원인균이며, penicillin 뿐만 아니라, cephalosporin, carbapenem, monobactam 등 대다수의 항생제에 치료가 되지 않는 다제내성을 나타내는 것으로 보고되었다[2]. 최근 항생제 내성 및 다제내성 세균의 증가로 인해 다제내성균에 대하여 항균효과를 가지는 새로운 항생물질의 개발이 절실히 요구되고 있다.

미생물이 생산하는 대사산물은 화장품, 효소, 식품 및 의약품 산업 등 다양한 분야에서 상업적으로 이용되고 있으며[3], 현재도 여러 분야에서 미생물에서 생산하는 새로운 천연 물질의 개발을 위한 잠재적인 소재로서 이들의 탐색과 응용을 위한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다[4-6]. 본 연구에서 분리한 *Penicillium rubefaciens*와 같은 속인 *Penicillium* 속은 다양한 생리활성을 가지는 2차대사산물을 생산한다고 보고되었다[7]. 항생물질 penicillin외에도 항진균제 griseofulvin [8], 면역 억제제 mycophenolic acid [9], 콜레스테롤 저해제인 mevastatin/compactin [10-12] 등이 *Penicillium* 속으로부터 생산되는 대표적인 생리활성 물질이다. 최근에는 *Penicillium* 속에서 생산되는 항균활성 보유 물질로 *Escherichia coli*와 *Acinetobacter baumannii*에 항균활성을 나타내는 Mycophenolic acid 일종인 penicacid D가 *Penicillium* sp. SCSIO sof101균주로부터 보고되었고[13], MRSA, *E. coli*, *Candida albicans*에 항균활성을 가지는 purpuride D가 해양유래 균주인 *Penicillium* sp. ZZ1283로부터 분리 및 동정되었다[14]. 그러나, 본 연구에서 분리 및 동정된 항MRSA 활성을 나타내는 *Penicillium rubefaciens*에 대한 연구는 거의 보고되어 있지 않다.

본 연구에서는 항균활성을 보유한 *P. rubefaciens* NNIBRFG5039를 분리 및 동정하였고, 항균활성을 증진시킬 수 있는 최적 배양조건에 대한 탐색과 더불어, 배양여액으로부터 항균화합물을 분리하였다.

재료 및 방법

사용 균주

본 연구 수행을 위하여 모두 12종의 표적미생물을 사용하였고, 각 미생물들은 항생제내성균주은행(Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes, CCARM)으로부터 4종(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCARM 3089, 3090, 3091, 3095), 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)에서 2종(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* KCCM 40510, *Enterococcus faecalis* KCCM 11814), 생명자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에서 3종(*Bacillus cereus* KCTC 3624, *Escherichia coli* KCTC 2443, *Filobasidium neoformans* KCTC 7902), 농업유전자원정보센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에서 3종(*Saccharomyces cerevisiae* KACC 30068, *Candida albicans* KACC 7270, *Bacillus subtilis* KACC 10111)을 분양 받았다.

항균활성 측정

항균활성은 Murray 방법인 paper disc법으로 측정되었다[15]. 표적 미생물을 R2A broth 배지에 접종하여 30°C에서 24시간 액체배양 한 뒤, 배양액을 분광광도계를 이용하여 OD₆₀₀ 값 0.4-0.5로 희석 후 100 µL를 고체배지에 도말하였다. 각각의 배양조건에서 얻어진 배양여액을 필터(0.22 µm 크기)로 여과하여 400 µL를 종이지스크(paper disc)에 올려 무균상태에서 완전건조 후 표적미생물이 도말된 R2A 고체배지에 올린 다음 28°C에서 24시간 정지배양 후 억제환(inhibition zone)을 확인하였다.

항균 균류의 동정

항균활성 보유 균류의 생장 및 미세구조 등의 형태적 관찰을 위해 potato dextrose agar (PDA), Czapek yeast autolysate agar (CYA), creatine sucrose agar (CREA), yeast extract sucrose agar (YES) 배지에 25°C에서 10일 동안 배양하였다[16]. 분자계통학적 동정을 위해 PDA (BD Biosciences, East Rutherford, USA)에 배양하여 균사체를 수확하였다. 수확한 균사를 glass bead가 담긴 tube에 넣어 균질화시킨 후 NucleoSpin Plant II DNA extraction Kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA의 internal transcribed spacers (ITS) rDNA, beta-tubulin, calmodulin 유전자 부분을 증폭시키기 위해 각각 ITS1 및 ITS4, bt2a 및 bt2b, cmd5 및 cmd6 프라이머를 사용하여 PCR을 실시하였다[16]. DNA 염기서열 정렬 및 편집, 계통수 작성을 위해 MEGA 7 (<https://www.megasoftware.net>) [17]을 사용하였다.

효율적인 배양 조건 탐색

항균활성을 보유한 NNIBRFG5039 균주의 최적 배양조건을 알아보기 위해 배지, 온도, 초기 pH 별 균사체 생장 및 항균활성을 조사하였다. 각각의 배양 조건 별 항균활성을 비교하기 위해 2종의 표적미생물인 MRSA KCCM 40510과 *Bacillus cereus* KCTC 3624를 사용하였다. PDA에 배양한 NNIBRFG5039 균총 가장자리 부분에서 cork borer (직경 5 mm)를 사용하여 agar disc를 4조각 분리하고, 250 mL 삼각플라스크에 100 mL PDB 배지에 접종하여 150 rpm, 25°C로 4일간 진탕 배양한 것을 종균으로 사용하였다. 초기 배양 조건은 NNIBRFG5039 종균으로 1% (v/v)로 접종하여, 28°C, 150 rpm으로 7일간 배양하였다. 배지는 PDB (potato dextrose broth), YPDB (yeast extract peptone dextrose broth), YMB (yeast malt broth), MEB (malt extract broth), CDB (czapek-dox broth)의 상용화된 배지(BD Biosciences, East Rutherford, USA)를 사용하여 배지 종류별 균사체 생장 및 항균활성을 확인하였다. 배양 온도는 15, 20, 25, 30°C에서 온도 별로 배양하였으며, 초기 pH는 4, 5, 6, 6.5, 7, 8로 적정하여 각각의 최종 배양물의 균사체 생장 및 항균활성을 확인하였다. 위의 배양 조건을 바탕으로 5 L fermenter를 이용하여 가장 효율적으로 항균활성 물질을 생산할 수 있는 배양시간을 선정하였다.

항균활성 물질의 분리 및 구조 동정

배양여액으로부터 항균활성 후보 화합물을 분리하기 위해, NNIBRFG5039를 기본조건인 PDB 액체배지에 종균 배양액을 1% (v/v)로 접종하여, 28°C, 150 rpm으로 10일 동안 진탕 배양하였다. 균 사체가 제거된 배양액 10 L를 20 L 추출용기에 나누어 담아 5 L의 에틸아세트산(ethyl acetate)을 넣고 혼합하여 방치한 후 상등액을 취하는 방법으로 3회 추출하였다. 추출액은 0.45 µm 필터로 여과한 후 진공회전농축기를 이용하여 농축한 후 동결건조 하여 추출물 30 g을 얻었다. 추출물에 3차 증류수 500 mL를 넣어 잘 용해시킨 후, 2 L 분획 깔때기에 넣고 동일한 부피의 에틸아세트산(500 mL)를 넣어 에틸아세트산 분획을 얻었으며 약 2.4 g의 분획물을 얻을 수 있었다. 실험 과정에 사용된 용매, Thin layer chromatography (TLC) 및 column용 시약 등은 모두 특급시약을 사용하였다. 화합물 분리에는 Infinity 1260 II system (Agilent, Santa Clara, USA)을 사용하였다. 화합물 분리를 위한 HPLC 컬럼은 Luna C18(2) (5 µm, 21.2 mm × 250 mm; Phenomenex, Torrance, USA)를 사용하였다. 컬럼 크로마토그래피 충전제는 ODS-A (Merck, Darmstadt, Germany)를 사용하였으며, NMR 스펙트럼은 VARIAN 500 MHz 기기(VARIAN, Palo Alto, USA)로 methanol-d₄ 용매를 이용하여 측정하였다.

결과

항균 균류의 분리 및 동정

NNIBRFG5039 균주는 경북 상주시의 공기 중에서 분리되었으며, NNIBRFG5039 균주의 ITS rDNA 부분 염기서열을 NCBI에 등록된 염기서열과 비교하여 분석하였다. 그 결과, *P. rubefaciens* CBS 139145 (JX140896.1)와 100%의 상동성을 보였으며, Fig. 1에서와 같이 계통수 상에서도 *P. rubefaciens*와 같은 group에 속하는 것을 확인하였으며, 형태적으로도 유사하였다(Fig. 2).

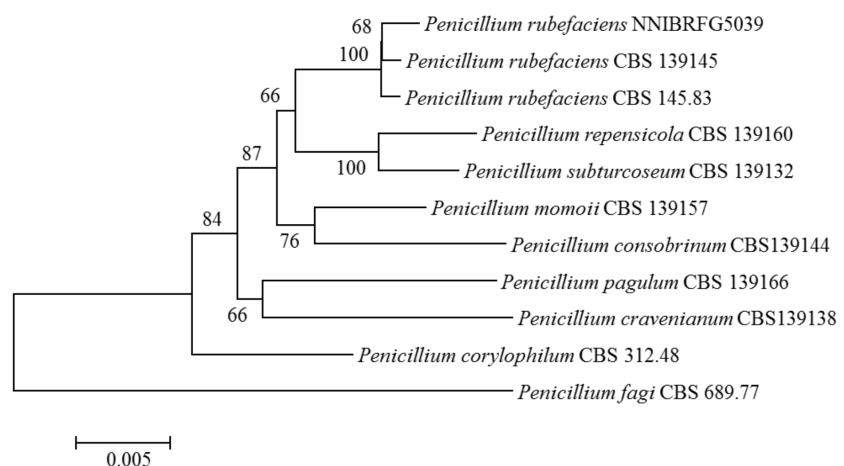


Fig. 1. Neighbor-joining phylogenetic tree based on ITS, beta-tubulin and calmodulin gene showing the position of *P. rubefaciens* NNIBRFG5039 and related fungal taxa. Numbers at branches are bootstrap values, derived only for the nodes supported by greater than 50% (1,000 replicates). The evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter model. Bar is 0.005 substitutions per site.

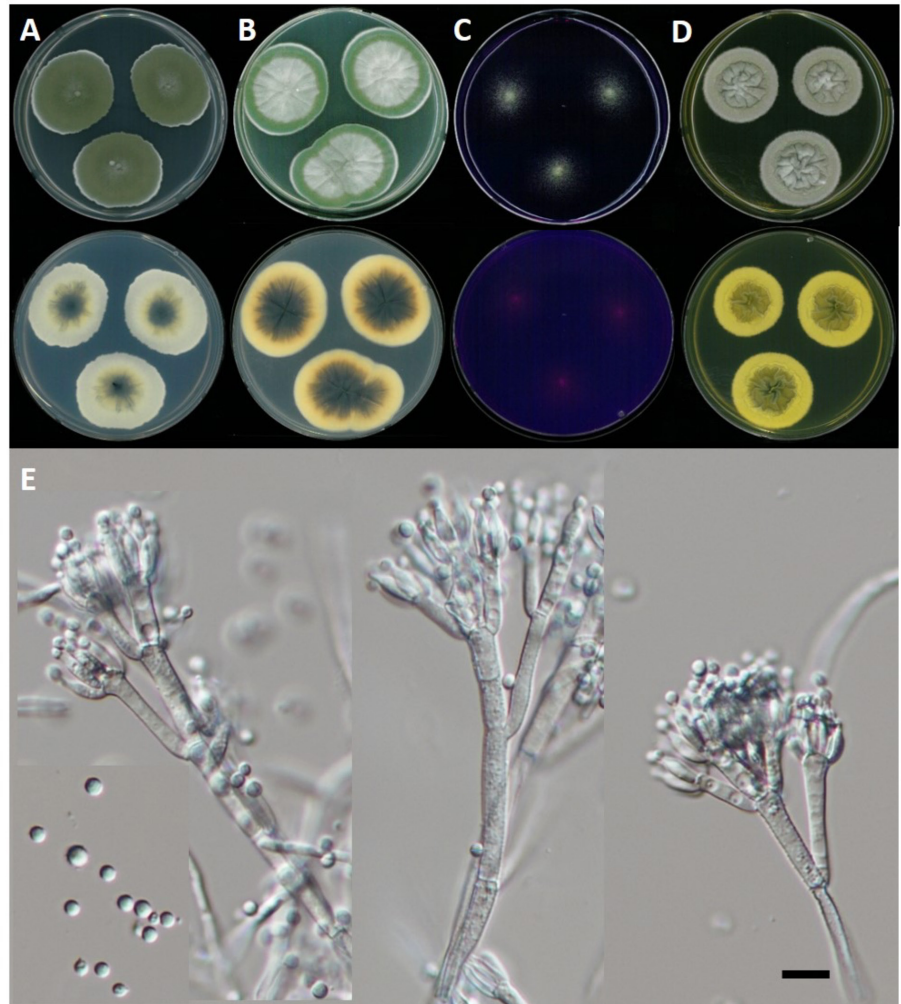


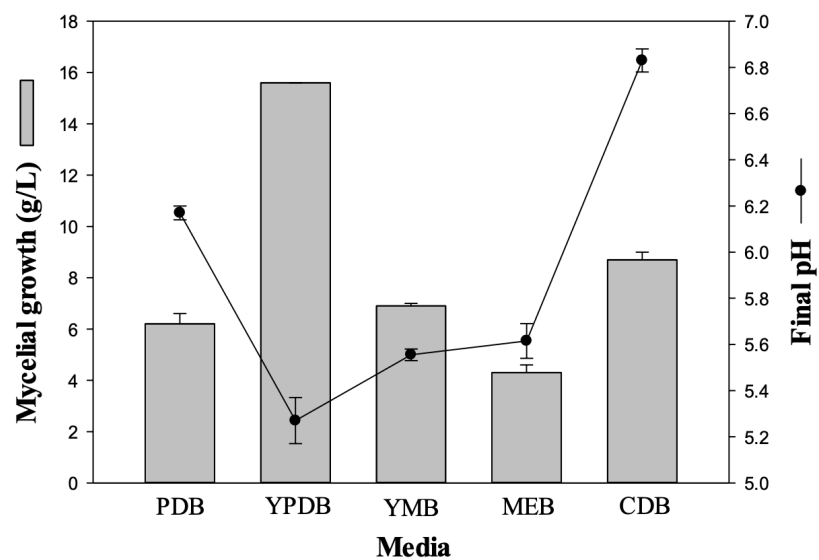
Fig. 2. *Penicillium rubefaciens* NNIBRFG5039. Colonies A, potato dextrose agar (PDA); B, Czapek yeast autolysate agar (CYA); C, creatine sucrose agar (CREA); D, yeast extract sucrose agar (YESA) at 25°C for 10 days; E, conidiophores and conidia on PDA.

최적 배양 조건 선발

항균활성 증진을 위한 배양배지 최적화를 위해 상용배지에 따른 균사체 건조 중량과 항균활성을 측정하였다(Fig. 3). 상용배지 YPDB에서 가장 높은 균사체 성장을 보였으나, 항균활성의 경우 PDB와 MEB에서만 활성이 관찰되었다. 따라서, *P. rubefaciens* NNIBRFG5039의 최적배지는 가장 높은 항균활성을 보이는 PDB배지로 선정하였고 이후 진행되는 온도, 초기 pH별 생장 및 활성 비교 실험은 PDB배지에서 배양하여 진행하였다.

최적 배지로 선정된 PDB 배지를 이용하여 온도 별 생장을 비교하기 위해 균사체 건조 중량과 항균활성을 측정하였다(Fig. 4). 균사체 생장은 15°C에서 가장 높았고 그 외 온도범위 20-30°C에서도 비교적 높은 균사체 성장을 보였으나, 항균활성의 경우 30°C에서만 활성이 나타남을 확인하였다. 따라서, 항균활성을 보이는 배양온도 30°C를 최적 배양온도로 선정하였다.

(A)



(B)

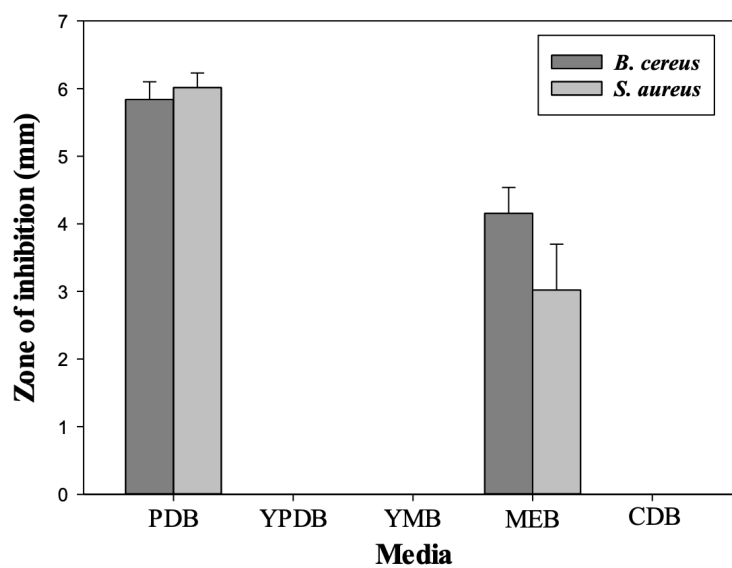


Fig. 3. Effect of commercial media on mycelial growth (A) and antimicrobial activities (B) of *P. rubefaciens* NNIBRFG5039. PDB, potato dextrose broth; YPDB, yeast extract peptone dextrose broth; YMB, yeast malt broth; MEB, malt extract broth; CDB, czapek-dox broth.

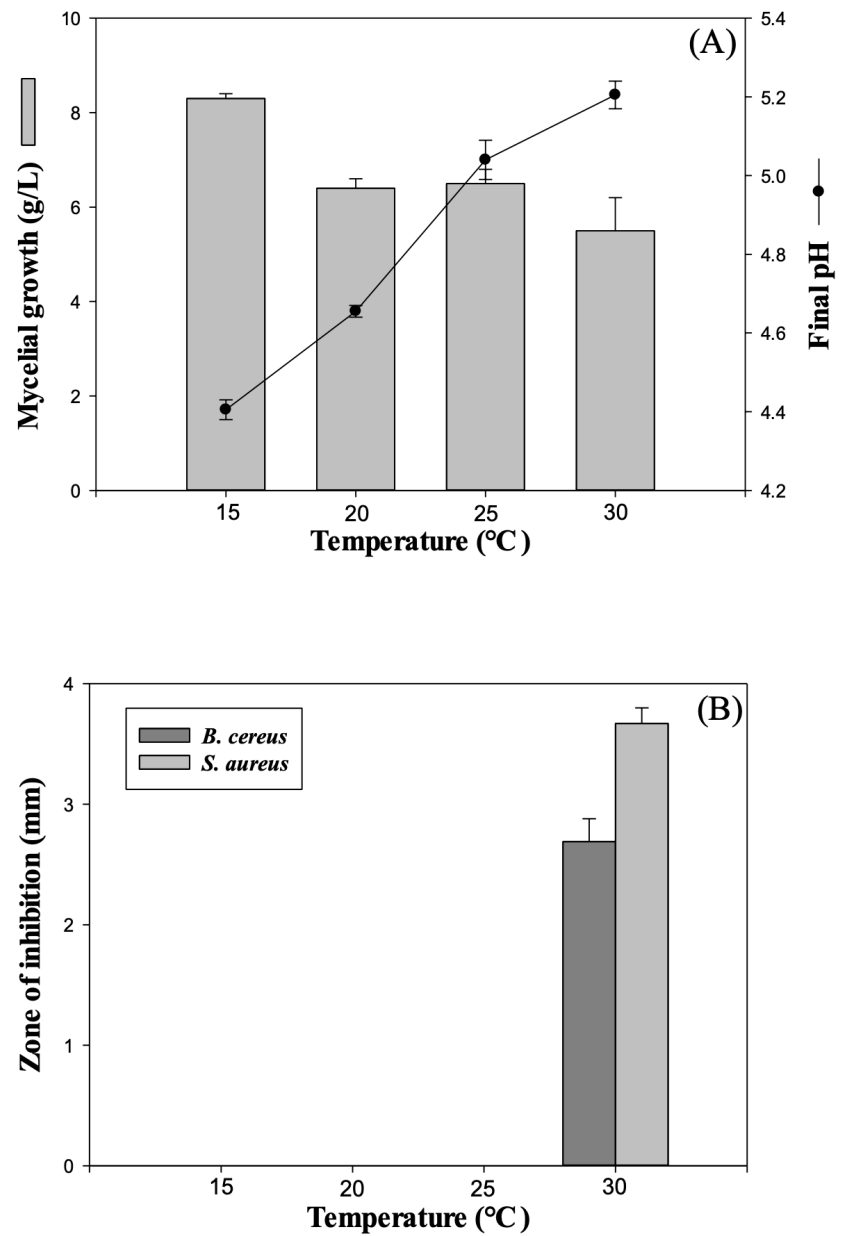


Fig. 4. Effect of culture temperature on (A) mycelial growth and (B) antimicrobial activities of *P. rubefaciens* NNIBRFG5039.

최적 배지로 선정된 PDB 배지와 최적 배양온도 30°C에서 초기 pH별 생육을 비교하기 위해 균사체 건조 중량과 항균활성을 측정하였다(Fig. 5). 균사체 생장은 초기 pH 별로 유의한 차이를 보이지 않았으나, 항균활성의 경우 pH 6.5 이상에서만 활성이 나타남을 확인하였다. 따라서, 상대적으로 가장 높은 항균활성을 보이는 초기 pH 6.5를 최적조건으로 선정하였다.

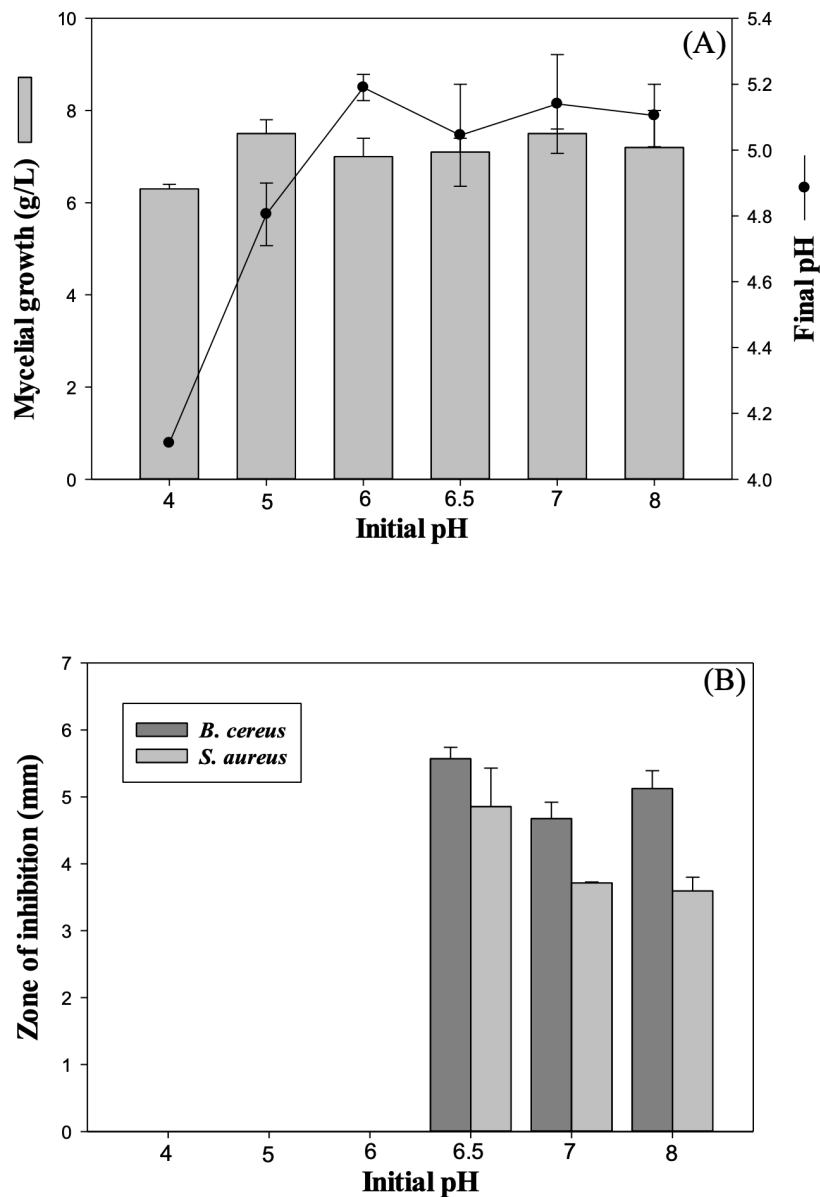


Fig. 5. Effect of initial pH on (A) mycelial growth and (B) antimicrobial activities of *P. rubefaciens* NNIBRFG5039.

최적조건하에서, 5 L fermenter를 이용하여 최적 배양시간을 확인하였다(Fig. 6). 선정된 flask 최적 배양조건하에서 5 L fermenter를 이용하여, 종균배양액 1% 접종, working volume 3 L, 통기량 1 vvm 및 교반속도 150 rpm으로 조절하여 10일간 배양을 실시하였다. 배양기간 동안 pH는 조절하지 않았으며, foam 형성을 억제하기 위해 배양기간 동안 상황에 따라 소포제를 첨가하였다. 최적조건하에서 5L fermenter를 이용하여 배양시간에 따른 균사체 생육 및 항균활성을 비교한 결과, 배양 5 일째 최대 균사체 생장 (12.4 g L^{-1})과 최대 항균활성(MRSA KCCM 40510에 대해 7.5 mm, *B. cereus* KCTC 3624에 대해 5.0 mm)이 관찰되었다. 따라서, 배양 5일을 최적 배양시간으로 선정하였다. *P. rubefaciens* NNIBRFG5039의 배양여액의 항균활성 스펙트럼을 조사한 결과, methicillin-resistant

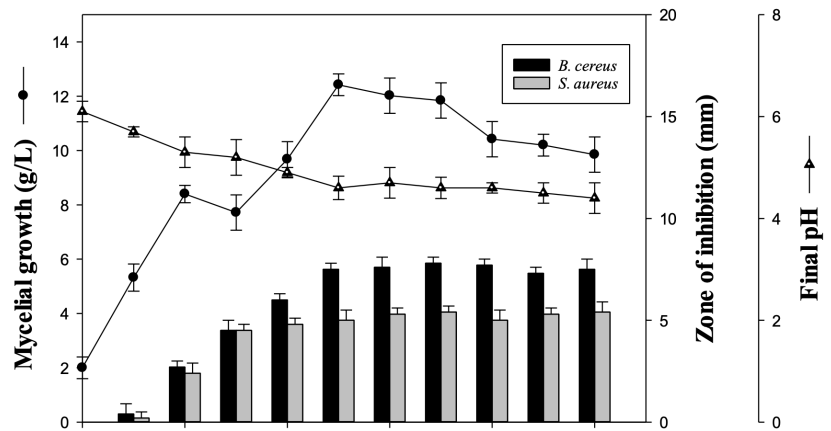


Fig. 6. Mycelial growth, final pH and antimicrobial activities of *P. rubefaciens* NNIBRFG5039 according to culture time by 5 L fermenter.

Staphylococcus aureus subsp. *aureus* CCARM 3089, 3090, 3091, 3095와 KCCM 40510, *Bacillus cereus* KCTC 3624, *Bacillus subtilis* KACC 10111, *Filobasidium neoformans* KCTC 7902, *Enterococcus faecalis* KCCM 11814에 대해서도 항균활성을 가지는 것을 확인하였다(Table 1).

Table 1. Inhibitory spectrum of *P. rubefaciens* NNIBRFG5039.

Test organism	Susceptibility
methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCARM 3089	+
methicillin-resistant <i>S.aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCARM 3090	+
methicillin-resistant <i>S.aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCARM 3091	+
methicillin-resistant <i>S.aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCARM 3095	+
methicillin-resistant <i>S.aureus</i> subsp. <i>aureus</i> KCCM 40510	+
<i>Bacillus cereus</i> KCTC 3624	+
<i>Bacillus subtilis</i> KACC 10111	+
<i>Escherichia coli</i> KCTC 2443	-
<i>Filobasidium neoformans</i> KCTC 7902	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KACC 30068	-
<i>Enterococcus faecalis</i> KCCM 11814	+
<i>Candida albicans</i> KACC 7270	-

항균활성 화합물의 분리 및 구조 동정

배양여액으로부터 얻은 Ethyl acetate 추출물에서 항균활성을 1차 확인하였고, Ethyl acetate 분획물(2.4 g)에서 지표성분을 분리하기 위해 먼저 컬럼 크로마토그래피를 실시하였다. Glass column (150×250 mm)에 ODS gel을 충전하여 시료를 로딩하고 water-methanol 혼합용매(9:1, 4:1, 3:2, 1:1, 2:3, 1:4, 0:10)의 극성에서 비극성으로 조건을 달리하여 250 mL씩 흘려주어 분리하였다. MPLC상에서 순차적으로 분리된 7개의 1차 분획층들 (Fr1-7) 중 생리활성 효능을 나타낸 Fr-4 (100 mg)를 선별하였다. Fr-4 분획은 Prep-HPLC (Agilent, Santa Clara, USA)와 UV 검출기(235 nm)를 사용하였고, 컬럼은 C18 (5 µm, 21.2 mm×250 mm), 이동상은 water (A)와 MeCN (B)에 0.1% 포름산을 첨가하였다. 분리 조건은 10%B (0분)~95%B (45분)의 기울기를 주었으며, 유량은 15 mL/분으로 머무름 시간 24분에 화합물 1 (10 mg)을 얻을 수 있었다. 화합물 1의 화학적 구조는 NMR 및 질량분석, 그리고 참고문헌[18]을 바탕으로 (S)-6-hydroxymellein (1)으로 결정되었다(Fig. 7).

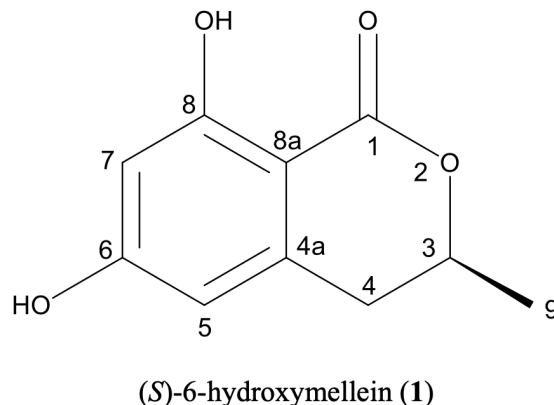


Fig. 7. Yellow amorphous powder. ^1H NMR (500 MHz, methanol- d_4) δ_{H} 6.21 (br s, 1H, H-5), 6.19 (br s, 1H, H-7), 4.65 (m, 1H, J =H-3), 2.90 (dd, 1H, J =16.3, 3.4 Hz, H-4b), 2.81 (dd, 1H, J =16.3, 11.2 Hz, H-4a), 1.45 (d, 3H, J =6.1 Hz, H-9); ^{13}C NMR (125 MHz, methanol- d_4) δ_{C} 171.7 (C-1), 166.2 (C-8), 165.6 (C-6), 143.5 (C-4a), 107.8 (C-5), 102.1 (C-7), 101.4 (C-8a), 77.2 (C-3), 35.5 (C-4), 20.9 (C-9); LC-ESIMS m/z 193.1 $[\text{M} - \text{H}]^-$, calcd for $(\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4)$ 194.0579.

고찰

본 연구에서는 MRSA KCCM 40510 및 *B. cereus* KCTC 3624에 항균활성을 가지는 *P. rubefaciens* NNIBRFG5039를 분리 동정하였으며, 항균활성 증대를 위한 효율적인 배양 조건을 선별하기 위해 일반적으로 사용되는 상용배지와 배양 조건들을 달리하여 배양여액의 항균활성을 비교하였다. 그 결과, *P. rubefaciens* NNIBRFG5039는 PDB 배지, 배양온도 30°C, 초기 pH 6.5로 배양하였을 때 항균활성이 가장 높게 나타나는 것을 확인하였으며, 균사체 생장이 최대가 되는 배양 조건과는 상이한 결과를 얻었다. 이는 미생물에 의한 2차 대사산물은 미생물의 생장에 직접 요구되는 물질은 아니기 때문에, 생산하고자 하는 2차 대사산물을 다량으로 생산할 수 있는 배양 조건의 탐색이 필요하다는 기존의 연구 결과와 일치한다[19-21].

전세계적으로 문제가 되고 있는 항생제 내성 및 다제내성 세균에 대해 항균효과를 가지는 다양한 미생물 유래 천연 항균물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[22-24]. 현재까지 *P. rubefaciens*의 항생제 내성균에 대한 항균활성에 관하여는 연구가 거의 진행되지 않았으며, 본 연구를 통하여 처음으로 *P. rubefaciens* NNIBRFG5039의 배양여액으로부터 항균활성 화합물 (S)-6-hydroxymellein (1)을 분리 · 동정하였다. 이 화합물은 *Aspergillus terreus*에 의해 생산되며 *Arabidopsis thaliana*(애기장대) 식물의 화분 형성을 억제하는 것으로 보고된바 있다[25]. 또한, 해양 균류 *Calcarisporium* sp. KF525로부터 분리된 항균화합물 calcarides의 전구체인 것으로 확인된 바 있다[26,27]. 최근, 이집트의 연구팀에 의해 식물(*Senecio flaus*)의 잎 내부에 내생하는 *Penicillium* 속 균주에서 6-hydroxymellein을 분리하였으며, 이는 *Penicillium* sp. 로부터 처음 보고된 결과이다 [28]. 하지만 본 연구에서 분리된 화합물과 비교해볼 때 4번 수소의 화학적 이동값(chemical shift) 이 차이가 있어 입체구조가 다른 광학 이성질체일 확률이 높아 이전에 분리된 6-hydroxymellein 화합물의 입체구조 규명이 필요하다. 한 예로, *Eupenicillium shearii*로부터 분리된 항균효능 화합물 eushearilide은 인간 병원체 *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton* spp., *Candida* spp. 등에 항균활성을 보이는 것이 확인되었으며[29], 최근에는 이러한 항균활성을 가지는 eushearilide의 입체이성질체인 23-demethyleushearilide를 인공적으로 합성하여 항균활성을 비교한 결과, 항생제 내성균 MRSA와 vancomycin-resistant enterococci (VRE)에도 뛰어난 항균활성이 나타나는 연구 결과가 보고되었다 [30]. 실제로, 제약 및 의약분야에서 임상적으로 사용되는 항생제는 미생물로부터 분리된 천연물 질이거나, 이들 물질을 선도물질로 사용하여 합성된 반합성 물질이 대부분이다[31].

본 연구에서 *P. rubefaciens* NNIBRFG5039의 최적 배양 조건과 항균범위를 본 논문을 통해 보고하였으며, 추후 *P. rubefaciens* NNIBRFG5039 배양여액에서 분리된 (S)-6-hydroxymellein (1)의 최소 억제 농도 결정 및 세포독성 실험 등의 추가적인 연구를 바탕으로 항생제로서의 개발 가능성을 확인하고자 한다.

적요

본 연구에서는 methicillin resistant *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (MRSA) KCCM 40510 및 *Bacillus cereus* KCTC 3624 균주에 대한 항균활성을 보유한 균류 *Penicillium rubefaciens* NNIBRFG5039를 경북 상주시 도남동 공기 중으로부터 분리 · 동정하였고, 배양조건에 따른 균사체 생육 및 항균활성을 비교하였다. 그 결과, *P. rubefaciens* NNIBRFG5039는 PDB 배지, 배양 온도 30°C, 초기 pH 6.5로 배양하였을 때 항균활성이 가장 높게 나타나는 것을 확인하였다. 최적조건하에서 5L fermenter를 이용하여 배양시간에 따른 균사체 건조중량 및 항균활성을 비교한 결과, 배양 5일째에 생장 및 항균활성이 가장 높았다. *P. rubefaciens* NNIBRFG5039의 배양여액의 항균활성 스펙트럼을 조사한 결과, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCARM 3089-3090-3091-3095와 KCCM 40510, *Bacillus cereus* KCTC 3624, *B. subtilis* KACC 10111, *Filobasidium neoformans* KCTC 7902, *Enterococcus faecalis* KCCM 11814에 대해서도 항균활성을 가지는 것을 확인하였다. 또한, *P. rubefaciens* NNIBRFG5039의 배양여액으로부터 항균활성 후보물질을 각종 크로마토그래피법으로 순수분리하고, NMR과 ESI-MS 등의 기기분석을 실시하여 구조를 (S)-6-hydroxymellein (1)으로 동정하였다.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the Nakdonggang National Institute of Biological Resources (NNIBR), funded by the Ministry of Environment (MOE) of the Republic of Korea (NNIBR201902109).

REFERENCES

1. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a *penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenza*. Bull World Health Organ 2001;79:780-90.
2. Yee C, Biek D, Karause K, Williams G. Ceftarolin: A cephalosporin with anti-MRSA activity. Clin Microbiol Newsl 2011;33:161-9.
3. Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK. Microbial metabolites in nutrition, healthcare and agriculture. 3 Biotech 2017;7:15.
4. Kim DY, Bae SM, Han SM, Lee JS. Screening of potent anti-dementia acetylcholinesterase inhibitor-containing edible mushroom *Pholiota adiposa* and the optimal extraction conditions for the acetylcholinesterase inhibitor. Kor J Mycol 2016;44:314-7.
5. Bae SM, Han SM, Lee JS. Screening of anti-inflammatory compound-producing wild yeasts and their microbiological characteristics. Kor J Mycol 2017;45:212-23.
6. Jung JH, Chang HC. *Bacillus polyfermenticus* CJ9, isolated from meju, showing antifungal and antibacterial activities. Korean J Microbiol Biotechnol 2009;37:340-9.
7. Grijseels S, Nielsen JC, Nielsen J, Larsen TO, Frisvad JC, Nielsen KF, Frandsen RJN, Workman M. Physiological characterization of secondary metabolite producing *Penicillium* cell factories. Fungal Biol Biotechnol 2017;4:8.
8. Oxford AE, Raistrick H, Simonart P. Studies in the biochemistry of micro-organisms: Griseofulvin, C₁₇H₁₇O₆Cl, a metabolic product of *Penicillium griseo-fulvum* Dierckx. Biochem J 1939;33:240-8.
9. Gosio B. Sperimentate su culture pure di bacilli del carbonchio dimostrano notevole potere antisettica. C R Accad Med Torino 1893;61:484.
10. Brown AG, Srna TC, King TJ, Hasenkamp R, Thompson RH. Crystal and molecular structure of compactin, a new antifungal metabolite from *Penicillium brevicompactum*. J Chem Soc Perkin 1 1976;11:1165-70.
11. Florey HW, Jennings MA, Gilliver K, Sanders AG. Mycophenolic acid-an antibiotic from *Penicillium brevicompactum* Dierckx. Lancet 1946;247:46-9.
12. Frisvad JC, Filtenborg O. *Terverticillate penicillia*: Chemotaxonomy and mycotoxin production. Mycologia 1989;81:837-61.
13. Song X, Tu R, Mei X, Wu S, Lan B, Zhang L, Luo X, Liu J, Luo M. A mycophenolic acid derivative from the fungus *Penicillium* sp. SCSIO sof101. Nat Prod Res 2019;13:1-7.
14. Kaleem S, Ge H, Yi W, Zhang Z, Wu B. Isolation, structural elucidation, and antimicrobial evaluation of the metabolites from a marine-derived fungus *Penicillium* sp. ZZ1283. Nat Prod Res 2019;23:1-9.
15. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Manual of clinical microbiology. 7th ed. Washington D.C.: ASM; 1999. p. 1527-39.
16. Visagie CM, Houbraken J, Frisvad JC, Hong SB, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert KA, Varga J, Yaguchi T, Samson RA. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. Stud Mycol 2014;78:343-71.

17. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 2016;33:1870-4.
18. Schlingmann G, Roll DM. Absolute stereochemistry of unusual biopolymers from Ascomycete culture LL-W1278: Examples that derivatives of (S)-6-hydroxymellein are also natural fungal metabolites. *Chirality* 2005;17:S48-51.
19. Go IH, Kim KJ, Kim YH. Optimal Conditions for the production of (+)-Jasmonic acid by *Diplodia gossypina* ATCC10936. *Kor J Microbiol* 2006;42:210-5.
19. Keller NP. Fungal secondary metabolism: Regulation, function and drug discovery. *Nat Rev Microbiol* 2019;17:167-80.
20. Gerke J, Braus GH. Manipulation of fungal development as source of novel secondary metabolites for biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014;98:8443-55.
21. Woo YJ, Jeong SY. Isolation and characterization of a marine bacterium, *Pseudomonas* sp. YJ-1 with anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* activity. *Korean J Environ Biol* 2017;35:694-705.
22. Cardozo VF, Oliveira AG, Nishio EK, Perugini MR, Andrade CG, Silveira WD, Durán N, Andrade G, Kobayashi RK, Nakazato G. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2013;12:12.
23. Gebreyohannes G, Nyerere A, Bii C, Berhe Sbhatu D. Determination of antimicrobial activity of extracts of indigenous wild mushrooms against pathogenic organisms. *Evid Based Complement Alternat Med* 2019;6212-673.
24. Shimada A, Kusano M, Takeuchi S, Fujioka S, Inokuchi T, Kimura Y. Aspterric acid and 6-hydroxymellein, inhibitors of pollen development in *Arabidopsis thaliana*, produced by *Aspergillus terreus*. *Z Naturforsch C J Biosci* 2002;57:459-64.
25. Xu L, Meng W, Cao C, Wang J, Shan W, Wang Q. Antibacterial and antifungal compounds from marine fungi. *Mar Drugs* 2015;13:3479-513.
26. Silber J, Ohlendorf B, Labes A, Erhard A, Imhoff JF. Calcarides A-E, antibacterial macrocyclic and linear polyesters from a *Calcarisporium* strain. *Mar Drugs* 2013;11:3309-23.
27. Elkhayat ES, Goda AM. Antifungal and cytotoxic constituents from the endophytic fungus *Penicillium* sp. *Bull Fac Pharm Cairo Univ* 2017;55:85-9.
28. Hosoe T, Fukushima K, Takizawa K, Itabashi T, Kawahara N, Vidotto V, Kawai K. A new antifungal macrolide, eushearilide, isolated from *Eupenicillium shearii*. *J Antibiot* 2006;59:597-600.
29. Tono T, Inohana T, Sato T, Noda Y, Ikeda M, Akutsu M, Murata T, Maekawa Y, Tanaka A, Seki R, et al. Total synthesis and antimicrobial evaluation of 23-demethyleushearilide and extensive antimicrobial evaluation of all synthetic stereoisomers of (16Z,20E)-Eushearilide and (16E,20E)-Eushearilide. *Molecules* 2019;24:3437.
30. Faver B, Hofbauer B, Hildering KS, Ryder NS. Comparison of in vitro activities of 17 antifungal drugs against a panel of 20 dermatophytes by using a microdilution assay. *J Clin Microbiol* 2003;41:4817-9.