항진균성 지의류 내생 곰팡이 및 항진균성 물질의 탐색

천다미¹ · 장다솜¹ · 김혜영¹ · 최갑성² · 최상기^{1*}

¹순천대학교 생물학과, ²순천대학교 식품공학과

Detection of Antifungal Endolichenic Fungi and Antifungal Compound

Da-Mi Cheon¹, Da Som Jang¹, Hye Young Kim¹, Kap Seong Choi², and Sang Ki Choi^{1*}

¹Department of Biological Sciences, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Republic of Korea

²Department of Food Science and Technology, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Republic of Korea

(Received March 20, 2013 / Accepted April 17, 2013)

To isolate a novel antifungal compound, we obtained 571 kinds of endolichenic fungi from Lichen Bioresources Center and examined their antifungal abilities. Four fungi *Stereocaulon* sp. (1429), *Stereocaulon* sp. (1430), *Cryptosporiopsis* sp. (0156), and *Graphis* sp. (1245) showed high antifungal activity against *Candida albicans* when they grew in both liquid and solid media. We extracted the culture supernatants of these fungi with chloroform and then ethyl acetate. The chloroform fraction exhibited the highest anti-fungal activities when those fractions were examined for the growth inhibition of *Candida albicans* with disc diffusion method. To see information for the inhibitor present in chloroform fraction we employed GC-MS for the fractions of *Stereocaulon* sp. (1429). We found that hexamethylcyclotrisiloxane, decanoic acid, hexadecanoic acid-methyl ester, 14-octadecenoic acid-methyl ester, and octadecenoic acid-methyl ester were present more in chloroform fraction than in ethylacetate fraction. This indicates that those compounds could be possible antifungal candidates since antifungal activity of chloroform extract was two times higher than that of ethyl acetate extract.

Keywords: *Stereocaulon* sp., antifungal, endolichenic fungi, hexadecanoic acid-methyl ester, 14-octadecenoic acid-methyl ester

지의류(Lichens)는 세계적으로 가장 널리 분포하는 진핵생물 중 하나로 “곰팡이와 광합성을 하는 공생체의 연합체이며, 특별한 구조를 지닌 지의체(Thallus)라는 안정된 성장체를 형성하는 것”이라고 정의된다. 지의류는 단독 생명체가 아니라 종속영양체인 곰팡이(fungi)와 광합성을 통해 먹이를 생산할 수 있는 독립영양체인 녹조류(green algae), 남조류(cyanobacteria) 또는 녹조와 남조 모두 공생 관계를 유지하고 있는 생명체이다.

최근 들어 지의류가 유용생물자원의 보고로 알려지면서 지의류로부터 다양한 생리활성물질 탐색 연구가 진행되고 있다. 지의류는 병원균의 점유와 감염을 막기 위해 보호 2차 대사산물을 만드는데 usnic acid, stictic acid, 그리고 vulpinic acid는 700가지 이상의 2차 화합물 중 일부이다. 지의류에서 생성되는 1차, 2차 대사산물은 약리적 작용이 뛰어난 것으로 알려지고 있으며, 대표적으로 usnic acid와 같은 탄닌 성분들은 항균작용이 매우 우수한 천연물질로 밝혀졌다. 또한 미국 농무부 농업연구소(ARS)는 최근 연구결과 usnic acid가 카로티노이드 합성을 억제함으로써 새로운 천연물 제초제로 이용 가능하다는 보고를 하였으며, 이러한 지의류 탄닌 성분들은 항히스타민, 항바이러스, 항

세균 활성도 높은 것으로 알려지고 있다. 이러한 화합물의 대부분은 지의류만이 가지고 있으며 주로 지의류 내생 곰팡이가 합성하는 것으로 알려지고 있다(Kamer *et al.*, 1995; John *et al.*, 2006; Ranković *et al.*, 2010).

본 연구는 지의류 내생 곰팡이가 분비한 2차대사산물의 항균 활성을 *Candida* sp.와 *Cryptococcus neoformans*의 진균을 대상으로 검증하였다. 이러한 진균들을 이용하여 지의류 내생 곰팡이의 항균활성 물질의 특성을 알아보고자 지의류 내생 곰팡이의 배양액을 분리하여 유기용매로 추출하고, GC-MS (gas chromatography-mass spectrometer)를 이용하여 새로운 천연 항생물질을 찾는 기초실험으로 토대를 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

균주의 분양 및 배양

순천대학교 지의류 은행(Lichen Bioresources Center)에서 571종의 지의류 내생곰팡이를 분양 받아 malt yeast extract agar (MYA : yeast extract 3 g, malt extract 3 g, glucose 10 g, peptone 5 g, agar 15 g) 배지에 지의류 내생곰팡이 조각을 올려 25°C incubator에서 1-5일 정도 배양하였고, 4°C에 보관하였다.

*For correspondence. E-mail: sangki@sunchon.ac.kr; Tel.: +82-61-750-3619; Fax: +82-61-750-3608

항진균성 지의류 내생 곰팡이의 선별

지의류 내생곰팡이를 배양시킨 MYA 배지에 *C. albicans*의 배양액(OD₆₀₀ 0.1)을 100 µl 분주하여 멸균된 면봉을 이용하여 골고루 도말하였다. 30°C incubator에서 24시간 배양 후 투명한 크기가 큰 지의류 내생곰팡이 12종을 선별하였고, 배지 조성에 따른 활성도 차이를 비교해보기 위해 선별된 12종을 EMM [potassium hydrogen phthalate 3 g/L, Na₂HPO₄ 2.2 g/L, NH₄Cl 5 g/L, glucose 20 g/L, 225 mg/L supplements (A.A), salts 20 ml (MgCl₂·6H₂O 52.5 g/L, CaCl₂·2H₂O 0.735 g/L, KCl 50 g/L, Na₂SO₄ 2 g/L), vitamins stock 1 ml (pantothenic acid 1 g/L, nicotinic acid 10 g/L, inositol 10 g/L, biotin 10 mg/L), minerals stock 0.1 ml (boric acid 5 g/L, MnSO₄ 4 g/L, ZnSO₄·7H₂O 4 g/L, FeCl₂·6H₂O 2 g/L, molybdic acid 0.4 g/L, KI 1 g/L, CuSO₄·5H₂O 0.4 g/L, citric acid 10 g/L, agar 18 g/L)] 배지에서도 동일한 방법으로 실험을 하여 항진균 활성을 알아보았다. 2차적으로 선정된 9종의 지의류 내생곰팡이 성장속도와 투명환의 크기를 비교하여 4개의 균주 선정하였다.

Disc diffusion method

지의류 내생곰팡이가 생성하는 항진균 물질의 활성을 액체배지에서도 알아보기 위해, 선정된 4종의 지의류 내생곰팡이의 조각을 MY 액체배지(yeast extract 3 g, malt extract 3 g, glucose 10 g, peptone 5 g, 멸균증류수 1 L)에 넣고 30°C shaking incubator에서 날짜별로 배양하여 각각의 배양액을 얻었다.

미리 배양한 *C. albicans*의 배양액(OD₆₀₀ 0.1)을 YpD 고체배지(500 ml 기준: yeast extract 5 g, peptone 10 g, dextrose 10 g,

agar 8 g)에 100 µl 분주한 후 멸균된 면봉을 이용하여 도말하였다. 그 위에 날짜별로 배양한 지의류 내생곰팡이의 배양액을 지름 6 mm 크기로 만든 paper disc (Whatman, Cat. No. 1002185)에 300 µl씩 분주하여 충분히 말린 후 올려놓고, 30°C incubator에서 24시간 배양하여 투명환의 크기를 비교·관찰하였다.

지의류 내생곰팡이의 용매 분획물에 따른 항진균 활성 측정

고체배지에서와 액체배지에서 공통적으로 활성이 있는 4종의 지의류 내생곰팡이를 선정하고, 배양액을 chloroform, ethyl acetate 용매 순으로 추출하여 분획별로 분리하였으며, 증착시킨 후 유기용매층 분획물을 용해 시키기 위해 농축 마지막 단계에 에탄올을 넣어 질소로 dry시키고 100% 에탄올 700 µl에 재용해시킨 다음, 300 µl 증류수를 가하였다. 분획물은 액체배지에서 항균활성을 조사하기 위하여 배지에 약 3% 첨가 시 곰팡이 성장에 영향이 없는 70% ethanol 용액에 녹여 실험에 사용하였다. Disc diffusion method를 이용하여 각 분획과 분리하고 남은 수층을 YpD 고체배지에서 *C. albicans*에 대한 항진균 활성도를 비교·측정하였다. 또한 액체배지에서의 항진균 활성을 측정하기 위해 RPMI 1640 (Sigma, USA) 배지를 test tube에 3 ml 넣고, 각각 *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. lusitanae*, *Cryptococcus neoformans* 균주를 접종하고 30°C shaking incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 각 균주의 배양액을 RPMI 배지로 OD₆₀₀ 0.01이 되도록 희석한 후 RPMI 배지가 100 µl씩 분주된 96-well plate에 10 µl씩 분주하였다. 그리고 선정된 4종의 지의류 내생곰팡이의 분획별 농축액인 chloroform 3 µl, ethyl acetate 6 µl씩을 첨가하였다. 30°C incubator에서 배양하며 12시간 단위로 ELISA reader

Fig. 1. Antifungal activities of endolichenic fungi on MYA medium.

를 이용하여 600 nm에서 성장정도를 측정하였다.

Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS)를 이용한 항진균활성 분석

최종적으로 2일 동안 배양한 *Stereocaulon* sp. (1429)과 3일 동안 배양한 *Stereocaulon* sp. (1430)의 chloroform 및 ethyl acetate 추출액을 100 mm polydimethylsiloxane (PDMS) fiber의 the headspace에 210°C에서 30 min 동안 stirring 없이 sample을 노출시킨다. 증기는 섬유에서 4분 동안 270°C 온도의 Varian Saturn 2000 GC/MS 기계에 주입하는 것을 열로 인해 흡수제를 제거하면서 흡착하였다. 모세관의 컬럼(5% phenylmethylsiloxane, 30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm film)을 사용하여 분석을 하였다. 10°C/min의 비율로 35°C (4 min)에서 270°C (30 min)로 온도프로그램으로 올렸다. Mass spectrometer는 아래의 상태인 170°C에서 onization energy, 70 eV; m/z range, 45–600; scan cycle time, 1 sec; transfer line 수행하였다. Peak 분석은 mass spectral interpretation와 standard libraries를 기초로 하였다.

결과 및 고찰

항진균성 지의류 내생 곰팡이의 선별

지의류 내생곰팡이를 배양한 MYA 배지와 EMM 배지에 *C. albicans*의 배양액(OD₆₀₀ 0.01)을 100 µl 분주·도말하여 배양한 결과 분양받은 571종 중 활성이 좋은 12종의 지의류 내생곰팡이를 1차적으로 선별하였다(Figs. 1 and 2). 이 결과 고체배지에서 지의류 내생곰팡이가 활성물질을 생성하여 진균인 *C. albicans*

의 성장을 저해한다는 것을 알 수 있었다. 전체적으로 EMM 배지에서 지의류 내생곰팡이의 성장이 MYA 배지에서보다 좋지 않았다. 또한 MYA 배지에서 활성이 좋은 12종의 지의류 내생곰팡이는 EMM 배지에서도 활성이 좋은 반면에, MYA 배지에서 활성이 좋지 않은 종들은 EMM 배지에서도 활성이 좋지 않게 나타났다. *Cryptosporiopsis diversispora*. (0156)과 *Graphis* sp. (1245)는 성장이 좋지 않음에도 불구하고 투명환이 크게 형성되었고, 반면에 *Pseudocyphellaria* sp. (1352)는 성장이 좋았으나 투명환의 크기가 앞의 두 균주에 비하여 작게 나타나는 것으로 보아 지의류 내생곰팡이의 성장과 생산하는 항진균 물질의 활성도가 비례하지 않다는 것을 알 수 있었다(Figs. 1 and 2).

지의류 내생곰팡이 배양액의 항진균활성

12종 곰팡이 중에서 선정된 4종의 지의류 내생곰팡이의 액체배지에서 생성하는 항진균 물질의 활성을 알아보기 위해 disc diffusion method를 이용하였다. 미리 배양한 *C. albicans*의 배양액(OD₆₀₀ 0.01)을 도말한 YpD 고체배지에 4종의 지의류 내생곰팡이의 날 짜별 배양액을 얻어 300 µl씩 분주하여 지름 6 mm 크기의 paper disc (Whatman, USA)를 올려놓고, 30°C incubator에서 24시간 배양하여 투명환의 크기를 관찰하였다. 그 결과 *Stereocaulon* sp. (1429)가 *C. albicans*에 대한 항진균 활성이 가장 좋았으며, 다음으로는 *Stereocaulon* sp. (1430), *Cryptosporiopsis* sp. (0156), *Graphis* sp. (1245) 순으로 활성이 좋게 나타났다(Fig. 3 and Table 1). 이 결과 지의류 내생 곰팡이가 고체배지 뿐만 아니라 액체배지에서도 항진균 활성 물질을 생성함을 알 수 있었다.

Fig. 2. Antifungal activities of endolichenic fungi on EMM medium.

Table 1. Antifungal activities of organic solvents-extract of culture filtrates

Strain	Incubation time (day)	Antifungal activities (cm)			
		Culture filtrate	Chloroform extract	Ethyl acetate extract	Residual fraction
<i>Cryptosporiopsis</i> sp. (0156)	5	0.1	0.7	0.2	-
<i>Graphis</i> sp. (1245)	3	0.1	0.6	0.3	-
<i>Stereocaulon</i> sp. (1429)	2	1.1	1.7	0.8	-
<i>Stereocaulon</i> sp. (1430)	2	0.4	1.0	0.2	-

지의류 내생 곰팡이의 용매 분획물에 따른 항진균 활성 측정

고체배지에서와 액체배지에서 공통적으로 활성이 좋은 지의류 내생 곰팡이 4종의 배양액을 chloroform, ethyl acetate 용매 순으로 추출하여 70% ethanol로 농축하였다. Disc diffusion method를 이용하여 각 추출물에 따른 고체배지(YpD)에서의 *C. albicans*

의 항진균 활성도를 측정한 결과 4종 모두 chloroform 추출물에서 높은 활성도를 보였다(Fig. 4). 이 결과 지의류 내생곰팡이 추출물 간의 항균 활성의 차이점이 추출에 사용되는 용매에 따라 다르다는 것을 알 수 있었다. 또한 추출하고 남은 수층에서는 항균 활성을 거의 볼 수 없었는데, 아마도 지의류 내생곰팡이의 항진

Fig. 3. Antifungal activities of culture filtrates of various endolichenic fungi.

Fig. 4. Antifungal activities of organic solvents-extract of culture filtrates.

균 활성 물질의 대부분이 불용성이거나 물에 대한 용해도가 낮기 때문이라고 추정된다. 또한 *Stereocaulon* sp. (1429, 1430)의 chloroform 추출물에서 모두 98% 이상의 높은 저해율을 보였고 *Stereocaulon* sp. (1429)의 ethyl acetate 추출물도 98% 이상의 활성을 나타내는 것이 많았다. *Cryptosporiopsis diversisporea* (0156), *Graphis* sp. (1245)의 chloroform 추출물 ethyl acetate 추출물은 저해율이 50% 이하인 것도 많이 있었지만, *Graphis* sp. (1245) chloroform 추출물은 80% 이상의 저해율을 보였다(Fig. 5). 이 결

과 4종의 지의류 내생곰팡이가 생성하는 항진균 활성 물질이 다르다고 추정되며, 저해하는 진균의 종도 다른 것을 알 수 있었다.

Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS)를 이용하여 성분 분리 및 분석

2일 동안 배양한 *Stereocaulon* sp. (1429) 배양액의 chloroform 및 ethyl acetate 추출액을 GC-MS를 이용하여 분석하였다. Table 2를 통해 chloroform 추출물에서 활성이 2배 정도 더 좋은 것

Fig. 5. Effects of chloroform-extracts and ethyl acetate-extracts for growth of *Candida* sp. and *C. neoformans*. X axis, culture time (h); Y axis, growth (OD_{600nm}).

Table 2. Sample EL1429 assignment of peaks in TIC chromatogram of Fig. 6

Chemicals	Retention time (min)	Peak area of chloroform (%) : Peak area of ethyl acetate (%)
★Cyclotrisiloxane-hexamethyl	7.745	1.260 : 0.880
★Decanol acid	17.383	0.650 : 0.300
★Hexadecanoic acid, methyl ester	23.696	18.300 : 4.920
★14-Octadecenoic acid-,methylester	25.419	4.920 : 2.840
★Octadecenoic acid-,methyl ester	25.624	0.750 : 0.250
★1H-Purin-6-amine,(2-fluorophenyl)methyl	26.812	3.090 : 0.650

을 기초로 두어 chloroform과 ethyl acetate의 peak area의 비율을 비교한 GC-MS의 분석결과를 볼 수 있다. 분석결과를 나열하면 hexamethylcyclotrisiloxane (1.260%/ 0.880%), decanoic acid (0.650%/ 0.300%), hexadecanoic acid, methyl ester (18.300%/ 4.920%), 14-octadecenoic acid, methyl ester (4.920%/ 2.840%), octadecenoic acid, methyl ester (0.750%/ 0.940%), 2-fluorophenyl-methyl-1H-Purin-6-amine (3.090%/ 0.650%)로 구성된다.

비율의 차이가 4배 정도로 가장 컸던 hexadecanoic acid 물질과 2배 정도의 차이를 보였던 cyclotrisiloxane, decanol acid는 이전의 다른 실험에서 항생제 물질로서 보고된 물질인 것으로 보아 항생제의 효과를 나타난 것으로 보인다(González *et al.*, 2001; Koc *et al.*, 2007; Gehan *et al.*, 2009; Hajji *et al.*, 2010; Hashem 2011). 다른 분석물질로 hexadecanoic acid-methyl ester, 14-octadecenoic acid-methyl ester, octadecenoic acid-methyl ester는 본 연구에서 새롭게 밝혀진 화합물로서 항진균 활성에 대한 연구가 요구된다.

적요

순천대학교 지의류 은행(Lichen Bioresources Center)에서 571종의 지의류 내생 곰팡이를 분양받아 *Candida albicans*에 대한 항진균 활성을 조사하여 4종을 선정하였다. 선정된 4종의 지의류 내생 곰팡이의 배양액 내에 존재하는 항진균 활성을 알아

보기 위해 disc diffusion method 방법을 이용한 결과 *Stereocaulon* sp. (1429,1430)가 *C. albicans*에 대한 항진균 활성이 가장 좋았으며, 다음으로는 *Graphis* sp. (1245), *Cryptosporiopsis diversispora* (0156) 순으로 활성이 좋게 나타났으며, 이들 지의류 내생곰팡이가 고체배지와 액체배지에서도 항진균 활성 물질을 생성하였다.

고체배지에서와 액체배지에서 공통적으로 활성이 있는 지의류 내생 곰팡이 배양액의 chloroform, ethyl acetate 용매 추출물의 *C. albicans*의 항진균 활성도를 측정한 결과 4종 모두 chloroform 추출물에서 높은 활성도를 나타냈다. *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida lusitanae*에 대한 항진균 활성은 *Stereocaulon* sp. (1429, 1430)의 chloroform 추출물에서 모두 98% 이상의 높은 저해율을 보였고 *Stereocaulon* sp. (1429) 배양액의 chloroform 추출액과 ethyl acetate 추출액을 GC/MS를 이용해 성분을 분석한 결과 hexadecanoic acid-methyl ester, 14-octadecenoic acid-methyl ester, octadecenoic acid-methyl ester가 새로운 항진균 물질일 가능성을 보여주었다.

감사의 말

이 논문은 2009년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 일반연구자지원사업(과제번호 2009-0072519)을 통해서 수행된 것입니다.

Fig. 6. Total ion chromatogram of the extracts of culture filtrate of EL1429 by GC/MS. Black line, chloroform extract; red line, ethylacetate extract. For the sake of clarity peaks that have same retention time of two samples are labeled by either stars or dots; see Table 2 for peak assignment.

참고문헌

- Gehan, M., Abou-Elela, Abd-Elnaby, H., Hassan Ibrahim, A.H., and Okbah, M.A. 2009. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *World Appl. Sci. J.* **7**, 872-880.
- González, del Val A., Platas, G., Basilio, A., Cabello, A., Gorrochategui, J., Suay, I., Vicente, F., Portillo, E., Jiménez, del Río M., Reina, G.G., and Peláez, F. 2001. Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from *Gran Canaria* (Canary Islands, Spain). *Int. Microbiol.* **4**, 35-40.
- Hajji, M., Jarraya, R., Lassoued, I., Masmoudi, O., Damak, M., and Nasri, M. 2010. GC/MS and LC/MS analysis and antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts from *Mirabilis jalapa* tubers. *Process Biochem.* **45**, 1486-1493.
- Hashem, M. 2011. Antifungal properties of crude extracts of five Egyptian medicinal plants against dermatophytes and emerging fungi. *Mycopathologia* **172**, 37-46.
- John, A.G.R., Steven, M.M., Kim, M., and Jason, Y.J.W. 2006. Determination of usnic acid in lichen toxic to elk by liquid chromatography with ultraviolet and tandem mass spectrometry detection. *J. Agric. Food Chemother.* **54**, 2484-2490.
- Kamer, P., Wincierz, U., Gruber, G., Tschakert, J., Voelter, W., and Mayer, H. 1995. Rational approach to fraction, isolation and characterization of polysaccharides from the lichen *Cetraria islandica*. *Drug Res.* **45**, 726-731.
- Koc, A.N., Silici, S., MutluSariguzel, F., and Sagdic, O. 2007. Antifungal activity of propolis in four different fruit juices. *Food Technol. Biotechnol.* **45**, 57-61.
- Ranković, B., Rankovic, D., and Maric, D. 2010. Antioxidant and antimicrobial activity of some lichen species. *Microbiology* **79**, 809-815.