

항진균성 물질을 생산하는 지의류 내생 곰팡이의 선별 및 특성

황현국 · 김이나 · 백근식 · 최상기*

순천대학교 생명산업과학대학 생물학과

Isolation and Characteristics of Endolichenic Fungi Producing Antifungal Compound

Hyun-Gook Hwang, Yi-Na Kim, Keun Sik Baik, and Sang Ki Choi*

Department of Biological Sciences, Sunchon National University, Jeonnam 540-742, Republic of Korea

(Received February 10, 2011 / Accepted March 28, 2011)

To isolate a novel antifungal compound, we obtained 107 kinds of endolichenic fungi from Lichen Bioresources Center and examined their antifungal capability. Two fungi EL123 and EL156 showed high antifungal activity against *Candida albicans* in both MYA and EMM media. Nucleotide sequence analysis and NCBI Blast analysis in ITS region including 5.8S rRNA revealed that EL123 has 95% homology with *Thielavia microspora* and EL156, 99% with *Cryptosporiopsis diversispora* which belong to Ascomycetes. It observed that EL156 formed a branched mycelium whereas EL123 formed a straight one. EL156 also produced the antifungal substance faster than EL123 when they grew on MY liquid medium.

Keywords: 5.8S rRNA, *Cryptosporiopsis diversispora*, *Thielavia microspora*, antifungal, endolichenic fungi

지의류는 세계의 식생 중 특이한 생물체로서 단세포 조류(algae, photobionts)와 곰팡이(fungi, mycobionts)의 공생체이며 세계적으로 400속의 20,000종이 분포하고 있다(4). 거의 대부분의 지의류 곰팡이는 자낭균류(ascomycetes)에 속한다. 지구상에 약 30,000종 정도의 자낭균류가 보고되고 있는데 이중에 약 반 정도가 지의류를 구성하는 자낭균으로 알려져 있다(6). 지의류 내생 곰팡이는 지의류의 지의체에 살고 있는 미생물로, 기주식물의 세포 공간에 살고 있는 내생 종과 비슷하다(1). 지의류에서 생성되는 여러 1차, 2차 대사산물들 중 usnic acid와 같은 탄닌 성분들은 항균작용이 매우 우수한 천연물질로 밝혀졌으며(7), 지의류 내생 곰팡이에서도 생리적 활성을 띠는 이차 대사 물질들이 보고되었다(3, 8). 따라서 다양한 생리활성을 지니면서도 신규성과 회귀성이 높은 물질들을 지의류에서 찾아낼 수 있는 가능성이 매우 높다.

지의류 곰팡이들을 명확하게 구별하기 위한 시도가 이루어지지 않았으나, 최근에 곰팡이의 동정 및 분류를 위한 분자생물학적 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 특히 5.8S rRNA를 포함하고 있는 internal transcribed spacer (ITS) 부분은 small subunit rRNA gene (SSU : 18S rRNA) 혹은 large subunit

rRNA gene (LSU : 26-28S rRNA)와 같은 다른 rRNA 부분보다 변이 정도가 높기 때문에 종 수준에서도 동정이 가능하며, 이에 대한 염기서열 분석이 곰팡이 동정 및 계통학적 연구에 주로 이용되고 있다(5).

지난 세기동안 위생, 수질, 그리고 항생제의 개선으로 인해 대부분의 질병이 치료되고 예방되어왔다. 그러나 면역력이 약한 환자에서 *Candida albicans* 등의 곰팡이 병원균에 의한 감염 비율은 대폭 증가하고 있다. 이러한 진균 감염을 치료하기 위한 다양한 종류의 항진균제 개발이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 새로운 항진균제를 개발할 목적으로 순천대학교 지의류 은행에서 분양받은 107종의 지의류 내생 곰팡이에서 항진균성 물질의 생성능력이 우수한 곰팡이를 선별하고 rDNA 염기서열에 기초한 동정을 하였다.

항진균 활성을 검사하기 위해 지의류 내생 곰팡이를 MYA (malt extract 3 g, yeast extract 3 g, glucose 10 g, peptone 5 g, agar 15 g) 배지에 접종하고 30°C에서 2일 배양한 후, 같은 배지 위에 *C. albicans* 배양액(OD 0.7-0.8)을 멸균된 면봉을 이용하여 골고루 도말한 후 배양하였다. 투명한 관찰되는 지의류 내생 곰팡이를 일차적으로 5종 선별하였고, 이들 곰팡이가 다른 영양조건에서도 항진균성 물질을 생산하는지를 알기 위해 EMM [potassium hydrogen phthalate 3 g, Na₂HPO₄ 2.2

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

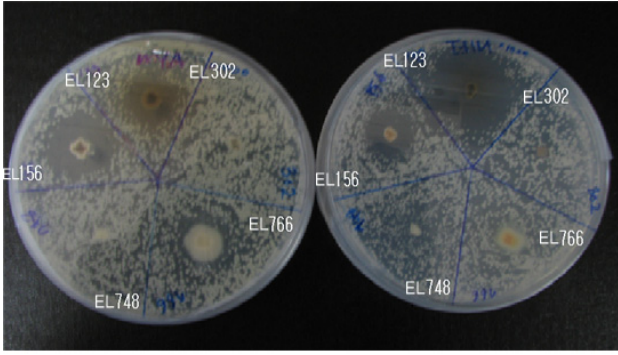


Fig. 1. Antifungal activities of endolichenic fungi on either MYA medium (left) or EMM medium (right) against *C. albicans*.

g, NH₄Cl 5 g, glucose 20 g, 225 mg/L supplements (A.A), salts 20 ml (MgCl₂ · 6H₂O 52.5 g, CaCl₂ · 2H₂O 0.735 g, KCl 50 g, Na₂SO₄ 2 g), vitamins stock. 1 ml (pantothenic acid 1 g, nicotinic acid 10 g, inositol 10 g, biotin 10 mg), minerals stock. 0.1 ml (boric acid 5 g, MnSO₄ 4 g, ZnSO₄ · 7H₂O 4 g, FeCl₂ · 6H₂O 2 g, molybdic acid 0.4 g, KI 1 g, CuSO₄ · 5H₂O 0.4 g, citric acid 10 g, agar 18 g)] 배지에서 동일한 방법으로 항진균 활성을 조사한 결과 2종(EL123, EL156)이 두 배지에서 공통적으로 우수한 활성을 보였다. MYA 배지에서 *C. albicans*의 성장을 저해하는 정도를 측정하였을 때 두 곰팡이 주변의 투명한 지름이 모두 약 15 mm 정도이었으며, EMM 배지에서는 EL123 주변의 투명한 지름이 약 25 mm 정도였다. EL123은 EMM 배지에서 항진균성 물질 생성 능력이 더 높았지만, EL156는 EMM 배지보다 MYA 배지에서 항진균성 물질 생성 능력이 더 우수하였다. 반면 EL748 혹은 EL766은 MYA 배지에서만 약한 항진균 활성을 나타냈다(Fig. 1).

최종적으로 선별한 두 종의 곰팡이의 형태적인 특성을 알아보기 위하여 이들을 위상차 현미경을 이용해 관찰하였다. EL123의 균사는 가지 친 형태이고, EL156은 직선형의 균사가

관찰되었다. 자세한 형태적인 특성은 고배율 현미경으로 좀 더 연구해야 할 것이다(자료 미제시).

곰팡이를 동정하기 위해서는 형태적 특징, 포자 특징 등을 관찰하여 동정하지만, 현재로서는 지의류 내생 곰팡이에 대한 연구 결과가 많이 부족한 상태이기 때문에 선별된 두 종의 동정에 어려움이 있다. 따라서 rDNA 염기서열에 기초하여 동정을 수행하였다.

두 균주의 genomic DNA를 추출하기 위하여 1.5 ml tube에 최종 선별된 지의류 내생 곰팡이와 STES buffer (0.5 M NaCl, 0.2 M Tris-Cl; pH 7.6, 0.01 M EDTA; pH 8.0, 1% SDS) 200 µl를 넣고, sample volume의 80%를 0.4 mm glass bead로 채웠다. 지의류 내생 곰팡이 세포벽을 파괴하기 위해 강하게 vortexing 30분 돌린 후, phenol : chloroform : isoamylalcohol (25:24:1)을 200 µl 첨가하고 혼합하였고, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 상층액에서 phenol을 세척하기 위해 chloroform : isoamylalcohol (24:1) 200 µl를 첨가하여 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하였고 sample의 상층액만 새로운 tube에 옮기고, 3 M sodium acetate를 sample total volume의 1/10과 EtOH 2 volume을 첨가하고 vortexing 시킨 후, 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 침전물을 70% EtOH 1 ml 첨가 후 washing 과정을 3회 반복하였다. Sample을 clean-bench 안에서 건조시킨 후, elution buffer (멸균증류수 1 ml + 10 µg/ml RNase A 20 µl) 200 µl를 넣어 50°C water bath에서 한 시간 동안 반응시켜 genomic DNA를 buffer에 녹였다. 분리된 곰팡이를 동정하고 계통학적 위치를 알아보기 위해, ITS (5.8S rRNA gene) 부위를 증폭하였다(Fig. 2). PCR 반응에 첨가된 primer는 ITS5 (5'-GCA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'), ITS4 (5'-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC-3')이었으며 추출한 genomic DNA를 template로 사용하였다(2). 해당 primer를 이용하여 95°C에서 5분, 94°C에서 30초, 50°C에서 1분, 72°C에서 1분(30 cycle), 72°C에서 7분 반응시켰다. 이 실험에서 예상되는 ITS DNA의 size는 약 645 bp 정도였는데, EL123의 경우에는 PCR 산물의 크기는 agarose gel 전기영동상에서 예상되는 값과 일치하였으나, EL156의 경우에는 900 bp 위치에 band가 관찰 되었다. 이들



Fig. 2. Phase contrast micrograph of the two endolichenic fungi (×400).

```

1   GTAACAAGGT CTCCGTTGGT GAACCAGCGG AGGGATCATT ACAGAGTTGC
51  AAAACTCCTA AACCATTTGT AACGTTACCT AAAACCGTTG CTTCGGCGGG
101 TAGCACCAACC CCGGTGCGCC CCCAATGGGG CCCCTAACGG GCGCCCGCCG
151 GAGGCCATA ACTCTTGT TTTTACGGC CTCTCTGAGT ACGTACTTGA
201 ATAAGTCAAA ACTTTCAACA ACGGATCTCT TGTTCTGGC ATCGATGAAG
251 AACGCAGCGA AATGCGATAA GTAATGTGAA TTGCAGAATT CAGTGAATCA
301 TCGAATCTTT GAACGCACAT TGCGCCGCC AGTATTCTGG CGGGCATGCC
351 TGTTGAGCG TCATTTCAAC CATCAAGCCC CAGGCTTGTG TTGGGGACCT
401 GCGGCCGCG CAGGCCCGA AAAGCAGTGG CGGGCTCGCT GTCACACCGA
451 GCGTAGTAGC AATCACCTCG CTCAGGGCGT GCTGCGGGT CCGGCCGTTA
501 AATGACCAAC GTACCCCAAG GTTGACCTCG GATCAGGTAG GAATACCCGC
551 TGAACCTAAG CATATC
    
```

Fig. 3. Nucleotide sequence of 5.8S rRNA of EL123.

PCR 산물의 염기서열을 결정하여, 다른 곰팡이의 염기서열과 BLAST를 이용하여 비교·분석한 결과, 약 384 bp 크기의 외래 DNA가 EL156 (accession number JF714251)의 ITS 부위에 삽입(염기서열 32-416)되어 있었다(Figs. 3 and 4).

PHYDIT 3.2 (Phylogenetic Editor)를 이용하여 phylogenetic tree를 작성하여 2종의 계통학적 위치를 파악하였다(Figs. 5 and 6). EL123 (JF714250)은 *Thielavia microspora*와 염기서열이 95%의 유사도를 보였으며, EL156 (JF714251)은 *Cryptosporiopsis diversispora*와 99%의 유사도를 보였다(자료 미제시). 또한, 2종 지의류 내생 곰팡이는 모두 자낭균류(ascmycetes)에 속하는 곰팡이였다. Phylogenetic tree의 위치상으로 볼 때 EL123은 신종 내생 곰팡이일 가능성이 있으므로 좀 더 연구가 필요하다.

지의류 내생 곰팡이가 생성하는 항진균성 물질의 활성을 액체배지에서 알아보기 위해, 지의류 내생 곰팡이를 MY 액체배지에 접종하여 30°C shaking incubator에서 배양하였으며 이를 원심분리한 후 얻어진 상층액을 항진균 검사시료로 사용하였다. *C. albicans*를 YpD 액체배지(yeast extract 10 g, peptone 20 g, dextrose 20 g)에 접종하여 30°C에서 하루 배양한 후 MYA 배지에 멸균된 면봉을 이용하여 도말하였다. Whatman filter paper disc에 2일 및 4일 배양한 곰팡이 배양액을 반복적

으로 20 µl씩 분주하고 건조하는 방식으로 최종 100 µl를 분주하였고, paper disc를 상기 MYA 고체배지에 올려놓고 30°C에서 배양하면서 투명 환의 생성여부와 환 크기를 관찰하였다(Fig. 7). EL123의 배양액의 항진균 활성을 비교했을 때, 2일 보다 4일 배양액의 항진균 활성이 우수한 것으로 관찰되었다. EL156의 배양액은 2일 배양액과 4일 배양액의 차이가 없는 것으로 보아 2일 배양에 항진균성 물질의 생성이 최대인 것으로 추정하였다. 투명환 주위에 형성되는 colony를 비교하였을 때, EL123의 투명환 내부에는 조그마한 colony들이 관찰되었지만, EL156의 투명환은 좁지만 어떠한 colony들도 관찰되지 않았다. 이 결과로 보았을 때, 두 곰팡이의 진균 성장을 저해하는 방법이 서로 다르다는 것을 시사한다. 현재 분리된 두 곰팡이의 배양액에서 항진균성 물질을 분리 중이며, 향후 분리되는 물질의 구조 및 항진균성 특성이 결정되어야 한다.

적요

새로운 항진균성물질을 분리할 목적으로 지의류은행에서 107종의 지의류 내생 곰팡이를 분양받아 이들의 항진균성 활성을 조사하였다. *Candida albicans*를 이용한 항진균 활성검사에서 2종류의 지의류 내생 곰팡이 EL123과 EL156을 최종적

```

1   GGAAGTAAAA GTCGTAACAA GGTCTCCGTA GAGCAGTGAT CTCTCTGCAG
51  CGAACTTGAG GAAGCCTTTG CACCCCTAAA GGGGGGGTTC TCGGCACTCT
101 AAATAAGGAG GTATGCAAGT GACGAAGCCT AGCGGCTAGA GTTGC AACAC
151 AATCGAATTG CGGGGAAGTT CTAAAGCCTC AGGGTACTAA CCTGCTGTAG
201 GGATGCAGTA GGGGCCTGTG TTAATCGCAC AGGGTACAGT AACAACCCCG
251 GAGGATCTAG CCACGTGCTA GAATGGACGA TCCGCAGCGA AGCCCCTCGA
301 CCAGGGGAAC GTTCACAGAC TAGGTGGTTG TGGGTAGGAG GGACTCCTGC
351 TTAAGATATA GTCGGGCCGCG CCGGAAACG TGCTGGGGAT TCGAAGAAC
401 GTAAACCGCT CCGTAGGTGAA CCTGCGGAG GGATCATTAC AGAGACTCTG
451 CCCTTTGGGT AGACCTCCAC CCTGTGTCG TTATACCTTT GTTGCTTTGG
501 CGGGCCGCGG GGCCCCGGCC TGCCCCTGG CTCCGGCTGG GCGCGCCCG
551 CCAGAGGACT CTAAAACCTGA ATGTTAGTG TCGTCTGAGT ACTATACAAT
601 AGTTAAAAC TCAACAACGG ATCTCTTGG TTCTGGCATC GATGAAGAAC
651 GCAGCGAAAT GCGATAAGTAA TGTGAATTG CAGAATTCAG TGAATCATCG
701 AATCTTTGAA CGCACATTGCG CCCCTTGGT ATTCCGGGGGG CATGCCCTGT
751 TCGAGCGTCA TTACACCCTCA AGCTCTGCT TGGTCTTGGGC GTAACCCGT
801 CCCCCTGTG CTTAAAATCA GTGGCGGCG GTGGCGGCTC TTAGCGTAG
851 TACATACTCT CGCTATAGACG CCCGGCGGA CGCTGGCCAGC AACCCCAA
901 TCTATCAAGG TTGACCTCGA TCAGGTAGG GATACCCGCTG AACTTAAGC
951 ATATCAATAA GCGGAGGA
    
```

Fig. 4. Nucleotide sequence of 5.8S rRNA of EL156.

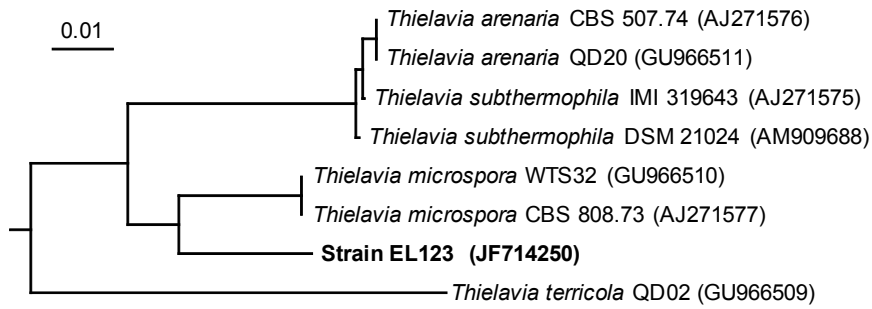


Fig. 5. Neighbour-joining tree (8) based on ITS-5.8S rDNA-ITS region sequences showing relationships between EL123 and some related species. Scale bar indicates 0.01 nucleotide substitution per nucleotide position. *Chaetomium globosum* (EU301640) was used as an outgroup (not shown).

으로 선별하였다. 이들은 MYA 배지와 EMM 배지에서 공통적으로 높은 곰팡이 성장저해능을 보였다. 지의류 내생 곰팡이의 5.8S rRNA를 포함하고 있는 internal transcribed spacer 부분을 PCR 증폭 후 nucleotide sequence 분석 및 NCBI Blast 분석 결과 EL123 (JF714250)은 *Thielavia microspora*와 염기서열이 95%의 유사도를 보였고, EL156 (JF714251)은 *Crypto-*

*sporiopsis diversispora*와 99%의 유사도를 보였으며, 2종 모두 자낭균류(ascmycetes)에 속하였다. 형태적 특성으로는 EL123은 가지 친 형태의 균사가 관찰되었고, EL156은 직선형의 균사가 관찰되었으며, EL156이 EL123보다 액체배양 중에 많은 양의 항진균성 물질을 생성하였다.

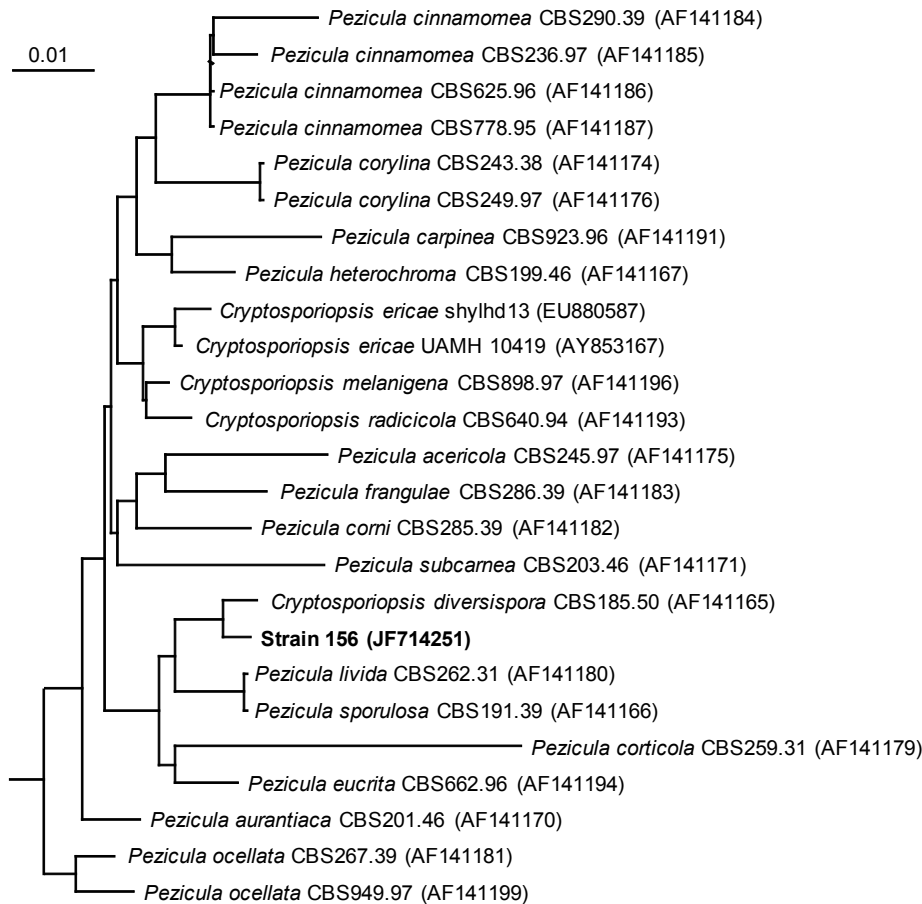


Fig. 6. Neighbour-joining tree (8) based on ITS-5.8S rDNA-ITS region sequences showing relationships between EL156 and some related species. Scale bar indicates 0.01 nucleotide substitution per nucleotide position. *Rhizopus arrhizus* IFO 4772T (AF543524) was used as an outgroup (not shown).

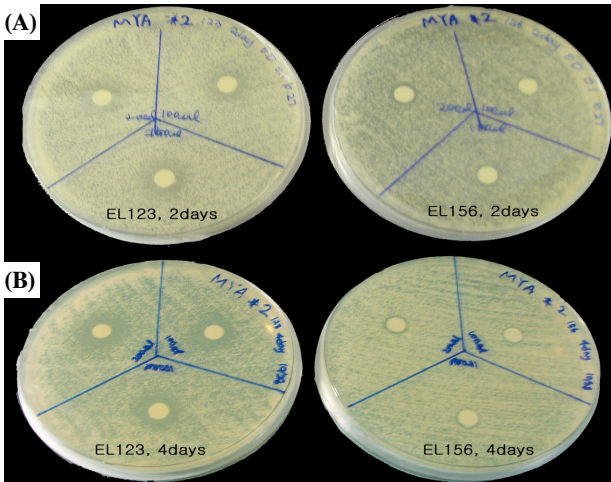


Fig. 7. Antifungal activities of fungal culture filtrates against *C. albicans*. (A) shows antifungal activities of 2 days culture filtrates of EL123 (left) and EL156 (right); (B) 4 days culture filtrates of EL123 (left) and EL156 (right).

감사의 말

이 논문은 2009년 한국연구재단의 일반연구지원사업의 지원을 받아 수행된 연구임(2009-0072519).

참고문헌

1. Arnold, A.E. 2007. Understanding the diversity of foliar fungal endophytes: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biol. Rev.* 21, 51-66.
2. Dams, E., L. Hendriks, Y. Van de Peer, J.M. Neefs, G. Smits, I. Vandenbempt, and R. De Wachter. 1988. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 16(Sup.), r87-r173.
3. Ding, G., Y. Li., S. Fu, S. Liu, J. Wei, and Y.J. Che. 2009. Ambuic acid and torreyanic acid derivatives from the endolichenic fungus *Pestalotiopsis* sp. *Nat. Prod.* 72, 182-186.
4. Dorn, R.I. and T.M. Oberlander. 1981. Microbial origin of desert varnish. *Science* 213, 1245-1247.
5. Gardes, M. and T.D. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2, 113-118.
6. Hale, M.E. 1983. *The Biology of Lichens*. 3rd ed. Contemporary Biology Series, Baltimore, USA.
7. Huneck, S. and I. Yoshimura. 1996. *Identification of Lichen Products*. Springer Verlag, Berlin, Germany.
8. Paranagama, P.A., E.M.K. Wijeratne, A.M. Burns, M.T. Marron, M.K. Gunatilaka, A.E. Arnold, and A.A.L. Gunatilaka. 2007. Heptaketides from *Corynespora* sp. inhabiting the Cavern Beard lichen, *Usnea cavernosa*: first report of metabolites of an endolichenic fungus. *J. Nat. Prod.* 70, 1700-1705.
9. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.