

내생균 *Arthrinium phaeospermum*이 생산하는 이차대사산물

하설규¹ · 심상희^{2*}

¹산동과학원 생물학연구소, ²덕성여자대학교 약학대학

Secondary Metabolites Produced by Endophytic Fungus, *Arthrinium phaeospermum*

Xuekui Xia¹ and Sang Hee Shim^{2*}

¹Key Biosensor Laboratory of Shandong Province, Biology Institute, Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, P. R. China

²College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 01369, Korea

Abstract – Endophytic fungi have yielded a variety of secondary metabolites so far. In the course of the project to find bio-active secondary metabolites from cultures of endophytic fungi, an isolate of *Arthrinium phaeospermum* (JS 0567) was selected for chemical investigation. A large scale culture of this strain in rice media was extracted with an organic solvent and the extract was subjected to a serious of chromatography, which led to six metabolites. Their chemical structures were elucidated as 2,3,6,8-tetrahydroxy-1-methylxanthone(1), 2,3,4,6,8-pentahydroxy-1-methylxanthone(2), 3,4,6,8-tetrahydroxy-1-methylxanthone(3), 3,6,8-trihydroxy-1-methylxanthone(4), 2,4,2',4',6'-pentahydroxy-6-methylbenzophenone(5), and 5,7-dihydroxy-3-methylphthalide(6) on the basis of spectroscopic data. To the best of our knowledge, this is the first study on the secondary metabolites from *Arthrinium phaeospermum*.

Key words – *Arthrinium phaeospermum*, Endophyte, Cultures, Xanthone

내생균(endophyte)이란 식물의 조직내에 살고 있으면서, 기주 식물(host plant)에 위해를 가하지 않는 미생물이라고 정의된다.¹⁾ 내생균(endophyte)이 식물 내에서 하는 역할 등 식물-내생균 상호관계(plant-endophyte interaction)에 관해서는 연구된 바가 많지 않고 현재도 연구 중이지만, 지금까지의 보고에 의하면, 내생균이 기주식물의 성장을 도와주고, 어떤 경우에는 기주 식물을 외부의 병충해로부터 보호해 준다는 연구 결과가 있다.²⁾ 실제로 내생균 또는 내생균이 생성하는 이차대사산물이 강한 항균 작용을 나타내는 경우가 많이 보고되었다.³⁻⁵⁾ 이러한 항균 작용 이외에도 내생균이 생산해내는 대사체들은 구조적 다양성을 가지고, 또한 여러 중요한 생리 활성을 나타내기 때문에 천연물 화학자들의 관심을 끌어들였다. 생리활성 대사체의 보고라는 측면에서의 내생균 연구에 있어, 그 기주식물의 선정이 중요시 되어왔다. 특히 식물이 생존하기 어려운 생태환경에

사는 식물의 경우 그 내생균이 무언가 중요한 역할을 할 것이라 여겨져 왔고, 실례로 베네수렐라 수생식물 *Rhyncholacis penicillata*의 경우 그 내생균(*Serratia marcescens*)이 강력한 항균작용을 나타내는 oocydin A를 생성함이 보고되었다.⁶⁾ 한편 호주에서 오랜시간 동안 상처치유의 목적으로 사용되어 온 “snakevine”이라 불리는 약용식물 “*Kennedia nigricans*”에서 분리된 내생균 *Streptomyces* NRRL30562 이 강한 항균물질 munumbicin을 생산함이 밝혀졌다.⁷⁾ 무엇보다도 생리활성 물질의 보고로써 내생균이 천연물 및 생물학자들의 큰 관심을 큰 획기적인 연구결과는, 1995년 Strobel group에서는 주목나무 수피에서 분리된 내생균 *Taxomyces andreanae*이 기주식물인 주목나무가 생산하는 항암물질 Taxol[®]을 생산함을 발견한 것이다.⁸⁾ 주목나무 내생균이 Taxol[®]을 생산하는 것은 관련 유전자가 식물에서 미생물로 이동했거나, 내생균의 유전자가 기주식물로 이동해서 두 생물종 모두 이 화합물을 생산한다고 추정하고 있다. 주목나무 내생균의 Taxol[®] 생산 이후, 다른 약용 식물들의 내생균이 생산하는 대사체에 대한 연구가 진행되어 왔다. 그 결과,

*교신저자(E-mail): sangheeshim@duksung.ac.kr
(Tel): +82-2-901-8774

항암제 etoposide, teniposide 등의 lead compound인 podophyllotoxin이 분리된 식물 *Podophyllum peltatum*의 내생균 *Phialocephala fortinii*이 그 기주식물과 똑같이 podophyllotoxin을 생산함이 규명되었다.⁹⁾ 또한 항암제 camphothecin을 생산하는 중국 식물 희수 *Camphotheca acuminata*의 내생균 *Fusarium solani*가 그 기주식물과 똑같이 camphothecin을 생산함이,¹⁰⁾ 항우울제 hypericin이 분리된 식물 *Hypericum perforatum*의 내생균 *Thielavia subthermophila* 역시 hypericin을 생산함이,¹¹⁾ 그리고 간장약 silymarin이 분리된 마리아영경귀 *Sylibum marianum*의 내생균 *Aspergillus iizukae* 역시 silymarin을 생산함이 보고되었다.¹²⁾

본 연구에서는 식물 내생균이 생산하는 생리활성물질 연구의 일환으로, 전남 순천의 늪지 지역에서 생존하는 수생 식물의 내생균이 기주식물에 미치는 영향을 연구하기 위하여, 그 내생균을 분리하고, 이들이 생산하는 이차대사산물을 규명하고자 본 연구를 실시하게 되었다. 본 연구에서는 갈대의 뿌리에서 분리된 내생균 *Arthrinium phaeospermum*을 배양하여, 그 배양물로부터 6종의 polyketide계 물질을 분리하여 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용된 균주 *Arthrinium phaeospermum*은 국립생물자원관에서 분양받아(부여번호 JS0567) 사용하였으며, 표본은 덕성여자대학교 약학대학 생약학 실험실에 보관 중이다.

기기 - TLC(Thin layer chromatography)의 결과 확인은 UV detector(Vilber Lourmat, France)을 이용한 254 nm와 365 nm 파장에서 관찰하였고 발색을 병행하여 확인하였다. 병원균 배지를 제조하기 위해 고압증기멸균기(JW Medical Corporation, CHS-AC 80)를 사용하여 고온, 고압에서 모든 생균과 포자를 멸균하였고 병원균의 배양을 위해 incubator를 사용하였다. 화합물의 분리, 정제 및 spectrum 양상 비교를 위해 사용한 HPLC(High performance liquid chromatography)는 Perkin Elmer series 200 liquid chromatography와 Agilent series 1200 HPLC system이다. 전자는 Vacuum degasser, binary pump, UV/VIS detector, Flom manual injector로 구성 되어 있으며 Totalchrom version 6.3 software를 사용하였다. 후자는 vacuum degasser, quaternary pump, diode array detector(DAD), manual injector, auto-sampler, thermo-statted column compartment로 갖추고 있으며 Agilent chemstation software를 사용하여 실험을 진행 하였다. 분리, 정제 및 spectrum 양상 비교를 위해 HPLC에 사용된 column은 Luna 5 μ C18(2) 100A column(250 \times 10.00 mm, Phenomenex)과 Luna 5 μ Phenyl-Hexyl column(250 \times 10.00 mm,

Phenomenex)이다. 단일 화합물의 구조를 규명하기 위해 이용한 NMR(Nuclear magnetic resonance) spectrum은 Varian VNS 600 spectrometer(¹H: 600 MHz, ¹³C: 150 MHz)와 Varian VNS 300 spectrometer(¹H: 300 MHz, ¹³C: 75 MHz) 그리고 Bruker DPX 300 spectrometer(¹H: 300 MHz, ¹³C: 75 MHz)를 사용하여 측정하였고, NMR chemical shift value는 part per million(ppm)단위로 나타내었다. Mass spectrometer로 Jeol JMS600을 사용하였다.

시약 - TLC plate는 Kiesel gel 60 F₂₅₄(precoated, Merck Art. 5715)을 사용하였고 결과 확인을 위해 발색시약으로 20% aqH₂SO₄를 사용하였다. Column chromatography용 고정상은 Kiesel gel 60(70-230 mesh, Merck Art. 7734)와 Sephadex LH-20(GE Healthcare, Sweden)를 사용하였다. Column chromatography용 유기용매는 시약용 1(OCI company Ltd., DC chemical CO. Ltd.)을 사용하였고, HPLC의 이동상으로는 HPLC grade의 water, methanol (Fisher Scientific Korea Ltd.)을 사용하였다. NMR 측정을 위하여 acetone-*d*₆, DMSO-*d*₆ 및 CD₃OD(Cambridge Isotope Laboratories, Inc.)를 사용하였다.

균주의 분리 및 배양 - 내생균주 JS0567은 전남 순천만 지역의 갈대의 뿌리에서 분리되었으며, ITS sequencing을 통하여 *Arthrinium phaeospermum*로 규명되었다. 먼저, 식물 조직을 0.5 \times 0.5 cm의 크기로 자른 후 자른 조직의 표면을 2% sodium hypochlorite와 70% ethanol로 1분동안 소독 시킨 다음, 증류수로 세척하였다. Malt extract agar(MEA, Difco)에 50 ppm kanamycin, 50 ppm chloramphenicol, 50 ppm Rose Bengal을 첨가하여 22 $^{\circ}$ C의 배양기에서 1주일 동안 배양하였다. 자란 균주를 potato dextrose agar(PDA, Difco)에 옮겨 25 $^{\circ}$ C의 배양기에서 1주일동안 배양한 후 잘 자란 균주는 대량배양에 사용하였고, 나머지는 20% glycerol에 넣어 질소 저장 탱크에서 보관하였다. 대량배양은 500ml Erlenmeyer flask에 80 g 현미와 120 g 증류수를 넣어 autoclave로 멸균한 후, 균주를 1.0 \times 1.0 cm의 크기로 자라 접종하여 상온에서 4주 동안 배양하였다.

추출 - 대량 배양한 Fernbach flask에 에칠아세테이트(EtOAc) 500 mL를 부어놓고 약수저로 배지를 조각화시켜 표면적을 넓힌 후 2시간 동안 sonication시켜 하루 동안 상온에 놓아둔다. 얻어진 추출액을 솜으로 여과하여 배지를 분리하고, 무수황산나트륨을 약수저로 4스푼 가량 넣어주어 수분을 제거한 뒤 여과장치를 이용해 무수황산나트륨을 걸러준 후 감압농축기로 농축하여 4.8 g의 추출물을 얻었다.

분리 및 정제 - 대량배양으로 얻어진 추출물에 대하여 실리콘 겔을 충전한 칼럼에 헥산(*n*-Hexane) 및 EtOAc 혼합용매로 비극성 용매부터 시작하여 극성을 높여 가며 기울기 용리시켜 열린 칼럼 크로마토그래피를 실시하여 총 6개의 분획을 얻었다(Fr. 1~Fr. 6). 얻어진 분획들 중 Fr. 4를

Sephadex LH-20을 충전한 칼럼에 메틸렌 클로라이드 (CH_2Cl_2)와 메타놀(MeOH)로의 1:1 혼합용매로 용리시켜 화합물 **1**(3.2 mg)과 **2**(4.5 mg)를 분리하였다. Fr. 5에 대하여 Sephadex LH-20을 충전한 칼럼에 CH_2Cl_2 와 MeOH로의 1:1 혼합용매로 용리시켜 20개의 소분획을 얻었고, 이 중 소분획 19에 대하여, Luna 5 μ C18(2) 100A column(250 \times 10.00 mm, Phenomenex)을 이용한 HPLC(Agilent 1260)로 정제하여 화합물 **3**(2.5 mg)과 **4**(3.5 mg)를 분리하였다. 이 때 분리조건은 유속 2.5 mL/min로, 처음 10분간 60% methanol로, 그 후 20분간 60% methanol에서 62% methanol로, 그 후 10분간 62% methanol에서 70% methanol로 한 후 10분간 70% methanol에서 100% methanol로 기울기 용리시켰다. 소분획 20번은 MeOH 용매로 재결정을 유도하여 화합물 **5**(11.3 mg)를 분리하였다. Fr. 6에 대하여 semi-preparative HPLC (Column, Luna 5 μ C18(2) 100A column 250 \times 10.00 mm, Phenomenex; 유속, 2.0 mL/min; 60% MeOH for 20 min, 60%-80% MeOH for 10 min)를 실시하여 화합물 **6**(2.1 mg)을 분리하였다.

2,3,6,8-Tetrahydroxy-1-methylxanthone(1) – pale yellow powder. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, acetone- d_6) δ : 13.32 (1H, s, 8-OH), 8.97 (3H, s, 2, 3, 6-OH), 6.78 (1H, s, H-4), 6.25 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-5), 6.14 (1H, d, $J=2.2$ Hz, H-7), 2.75 (3H, s, H-11); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, acetone- d_6) δ : 183.2 (C-9), 165.1 (C-6), 164.6 (C-8), 158.0 (C-10a), 153.2 (C-4a), 152.7 (C-3), 141.3 (C-2), 125.3 (C-1), 112.3 (C-1a), 103.8 (C-9a), 100.9 (C-4), 98.5 (C-7), 93.7 (C-5), 13.6 (C-11); (+)ESIMS m/z 275.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2,3,4,6,8-Pentahydroxy-1-methylxanthone(2) – pale yellow powder. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, acetone- d_6) δ : 13.61 (1H, s, 8-OH), 9.44 (1H, s, 6-OH), 9.12 (1H, s, 4-OH), 8.81 (1H, s, 3-OH), 7.75 (1H, s, 2-OH), 6.31 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-5), 6.16 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-7), 2.70 (3H, s, H-11); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, acetone- d_6) δ : 183.0 (C-9), 165.6 (C-8), 165.5 (C-6), 158.2 (C-10a), 142.6 (C-2), 118.1 (C-1a), 111.7 (C-1), 98.5 (C-7), 93.5 (C-5), 13.5 (C-11); (+)ESIMS m/z 291.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3,4,6,8-Tetrahydroxy-1-methylxanthone(3) – pale yellow powder. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 13.4 (1H, s, 8-OH), 6.63 (1H, s, H-2), 6.32 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-5), 6.13 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-7), 2.63 (1H, s, H₃-11); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6) δ : 181.8 (C-9), 164.4 (C-6), 163.2 (C-8), 156.4 (C-10a), 150.5 (C-3), 147.2 (C-4a), 131.0 (C-1), 130.4 (C-4), 115.3 (C-2), 111.2 (C-1a), 101.9 (C-9a), 97.6 (C-7), 93.2 (C-5), 22.3 (C-11); (+)ESIMS m/z 275.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

3,6,8-Trihydroxy-1-methylxanthone(4) – pale yellow pow-

der. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, acetone- d_6) δ : 13.42 (1H, s, 8-OH), 6.30 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-5), 6.16 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-7), 6.67 (2H, s, H-4), 6.66 (2H, s, H-2), 2.77 (3H, s, H₃-11); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, acetone- d_6) δ : 157.6 (C-8), 102.8 (C-9a), 98.3 (C-7), 165.9 (C-6), 93.6 (C-5), 164.9 (C-10a), 101.0 (C-4), 160.0 (C-4a), 164.1 (C-3), 117.1 (C-2), 143.4 (C-1), 111.3 (C-1a), 182.1 (C-9), 23.0 (C-11); (+)ESIMS m/z 259.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2,4,2',4',6'-Pentahydroxy-6-methylbenzophenone(5) – pale yellow powder. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 11.15 (2H, br s, 2',6'-OH), 9.21 (1H, s, 2-OH), 8.21 (2H, br s, 4,4'-OH), 6.28 (2H, br s, H-3,5), 5.90 (2H, br s, H-3',5'); EI-MS m/z 277.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

5,7-Dihydroxy-3-methylphthalide(6) – pale yellow powder. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ : 6.35 (2H, br s, H-4,6), 5.32 (1H, q, $J=6.7$ Hz, H-3), 1.57 (3H, s, H₃-8); (+)ESIMS m/z 181.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

결과 및 고찰

*Arthrinium phaeospermum*의 EtOAc 추출물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피로 분획한 후 재결정 및 분취용 HPLC를 실시하여 총 6종의 대사체들을 분리하였다(Fig. 1). 화합물 **1**의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ_{H} 13.32 및 8.97에서 broad singlet으로 나타나는 4개의 exchangeable proton의 존재를 확인할 수 있었다. 특히 δ_{H} 13.32 에서 나타나는 hydroxyl proton은 인접한 carbonyl group과 수소결합을 하여 저자장에서 나타남을 추정할 수 있었다. δ_{H} 6.25 및 6.14에서 각각 doublet($J=2.2$ Hz)으로 나타나는 signal을 확인하여 benzene ring에 meta coupling하고 있는 두 개의 proton을 확인하였고, δ_{H} 2.75에서 singlet으로 나타나는 하나의 sp^2 carbon에 결합한 methyl기의 존재를 확인할 수 있었다. 이 화합물의 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 δ_{C} 183.2의 ketone기를 포함하여 총 14개의 탄소를 확인할 수 있었다. 이로써 이 화합물이 진균류에서 많이 분리, 보고되는 xanthone 골격을 지니고 있음을 추정할 수 있었다. 특히 δ_{C} 165.1, 164.6,

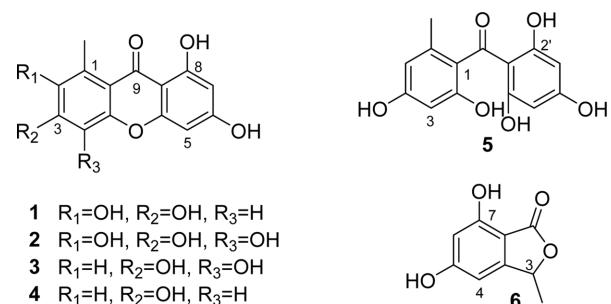


Fig. 1. Chemical structure of compounds 1-6.

158.0, 153.2, 152.7 및 141.3에서 oxygenated된 sp^2 탄소가 나타나, 이 화합물이 xanthone 골격에 hydroxyl 기가 4개 치환되어 있음을 추정할 수 있었고, 이는 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에 나타난 exchangeable proton의 개수와 잘 일치하였다. 이상의 data를 종합하고, 문헌과 비교하여 이 화합물을 해양 곰팡이 *Wardomyces anomalus*에서 분리 보고된 바 있는 2,3,6,8-tetrahydroxy-1-methylxanthone(=anomalin A)로 동정하였다.¹³⁻¹⁵⁾

화합물 2의 ^1H 및 ^{13}C NMR spectra는 화합물 1의 그것들과 유사하였다. δ_{H} 6.31 및 6.16에서 *meta* coupling($J = 2.1$ Hz)하는 두 개의 proton signal을 확인하였고, δ_{H} 2.70에서 sp^2 carbon에 결합한 한 개의 methyl기를 확인할 수 있었다. 화합물 1과의 차이점은 화합물 1에서는 4개의 exchangeable proton의 존재가 확인된 반면, 이 화합물에서는 5개가 확인되었고, 대신 화합물 1에서 singlet으로 나타났던 aromatic proton signal 하나가 사라졌다는 점이다. 이로써, 이 화합물은 화합물 1에서 hydroxyl group 하나가 더 치환된 구조임을 추정할 수 있었다. 이 화합물의 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 δ_{C} 183.0에서 xanthone의 ketone 기를 확인하였고, δ_{C} 98.5 및 93.5에서 *meta* coupling하고 있는 두 개의 aromatic methine carbon을 확인할 수 있었다. 이상의 data를 종합하고, 문헌과 비교하여 이 화합물을 해양 곰팡이 *Wardomyces anomalus*에서 분리 보고된 바 있는 2,3,4,6,8-pentahydroxy-1-methylxanthone(=anomalin B)으로 동정하였다.^{13,14)}

화합물 3의 ^1H 및 ^{13}C NMR spectra역시 화합물 1과 2의 그것들과 유사하여, xanthone계열의 물질임을 추정할 수 있었다. 이 화합물의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ_{H} 6.32 및 6.13에서 *meta* coupling하는 aromatic proton signal 두 개 이외에 δ_{H} 6.63에서 singlet으로 나타나는 aromatic methine proton의 존재를 확인하여 이 화합물은 화합물 1과 같이 xanthone 골격에 4개의 hydroxyl기가 치환된 xanthone 계열 화합물임을 확인할 수 있었다. 그러나, proton 및 carbon signal의 chemical shift가 1의 그것들과는 차이가 있었기에 치환된 hydroxyl 기의 위치가 다른 화합물임을 예상할 수 있었다. 이상의 data를 문헌과 비교하여 이 화합물을 진균류 *Penicillium raistrickii* 및 *Wardomyces anomalus*에서 분리 보고된 바 있는 3,4,6,8-tetrahydroxy-1-methylxanthone임을 확인할 수 있었다.^{13,16)}

화합물 4의 ^1H 및 ^{13}C NMR spectra역시 화합물 1-3과 유사하여, 역시 xanthone계열의 물질임을 추정할 수 있었다. δ_{H} 13.42에서 xanthone의 carbonyl group과 수소 결합하는 OH기를 확인할 수 있었고, δ_{H} 6.30 및 6.16에서 *meta* coupling ($J=1.8$ Hz)하는 두 개의 proton signal을 확인하였다. 화합물 1-3에서와는 달리 δ_{H} 6.67 및 6.66에서 broad한 singlet으로 나타나는 두 개의 aromatic proton signal을 확인

하여 methyl 기가 결합한 ring에는, methyl 기 이외에 하나의 OH만 존재하며, 두 개의 proton은 서로 거의 coupling하지 않았으므로, 서로 *meta* 위치에 존재함을 추정할 수 있었다. 이상의 데이터를 문헌과 비교하여 화합물 4를 진균류 *Lecanora reuteri* 및 *Penicillium patulum*에서 분리보고된 바 있는 3,6,8-trihydroxy-1-methylxanthone(=norlichexanthone)으로 동정하였다.¹⁷⁻¹⁸⁾

화합물 5의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ_{H} 11.15 (2H), 9.21 (1H) 및 8.21 (2H)에서 다섯 개의 exchangeable proton signal을 확인할 수 있었다. δ_{H} 5.91에서 broad하게 나타나는 두 개의 aromatic proton signal을, δ_{H} 6.28에서 역시 두 개의 aromatic proton signal을 확인하여, 이 화합물이 화합물 1-4와 같이 xanthone골격이 되기에는 sp^2 carbon에 결합한 치환기가 xanthone에 비해 두 개가 더 존재함을 확인할 수 있었다. 특히 δ_{H} 5.91에서 broad singlet으로 나타난 두 개의 proton signal들로 이 부분이 대칭구조임을 알 수 있어 이 화합물이 xanthone의 가운데 pyrone ring이 열린 benzophenone 골격임을 추정할 수 있었다. 이는 ESIMS spectrum으로 확인할 수 있었다. 이 화합물의 (+)ESI-MS spectrum에서 m/z 277에서 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 에 해당하는 pseudomolecular ion peak을 확인하여, 같은 치환기의 xanthone 골격인 화합물 4에 비하여 분자량 18이 더 크게 나타나, 이 화합물이 benzophenone 골격을 지님을 확인할 수 있었다. 이와 같은 data를 바탕으로 문헌과 비교하여 이 화합물을 lichen에서 분리보고된 바 있는 2,4,2',4',6'-pentahydroxy-6-methylbenzophenone으로 동정하였다.^{19,20)}

화합물 6의 (+)ESI-MS spectrum에서 m/z 181에서 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 에 해당하는 pseudomolecular ion peak을 확인하였다. $^1\text{H-NMR}$ spectrum의 δ_{H} 6.36 및 6.35에서 *meta* coupling하는 두 개의 aromatic proton을 확인할 수 있었다. 또한 δ_{H} 1.57에서 doublet으로 나타나는 secondary methyl기를, δ_{H} 5.32에서 quartet으로 나타나는 methine proton을 확인할 수 있었다. 이상의 data를 문헌과 비교하여 이 화합물이 mycophenolic acid의 생합성 중간체로 보고된 바 있는 5,7-dihydroxy-3-methylphthalide임을 확인할 수 있었다.²¹⁾

분리된 화합물들 중 xanthone 계열의 화합물인 1-4는 *Penicillium* sp.에서 종종 보고되며, 최근에 *Arthrinium* sp. 보고된 바가 있으며 이 외에도 해양에서 유래된 곰팡이 *Wardomyces anomalus*에서도 보고된 바가 있다.¹³⁻¹⁷⁾ 화합물 5는 lichen의 성분으로 보고된 바가 있고 griseofulvin 생합성의 중간체로도 알려져 있으며, 화합물 6은 mycophenolic acid의 생합성 중간체로 보고된 바 있다.²¹⁾ Xanthone계 화합물(1-4)들은 강한 항산화효과를 나타낼 뿐만 아니라, 항균 효과도 나타냄이 보고되었고,¹³⁾ 이 중 1과 4는 특히 protein kinase와 관련된 암세포종에 대하여 증식억제 효과가 강한 것으로 보고되었다.¹⁸⁾

결 론

순천만 늪지 지역에서 자생하는 갈대의 뿌리에서 내생균 *A. phaeospermum*를 분리하여 쌀배지에 대량으로 배양한 후, 배양물을 EtOAc로 추출, 그 추출물에서 6종의 화합물을 분리하였다. 분리된 화합물들은 spectral data를 바탕으로 각각 2,3,6,8-tetrahydroxy-1-methylxanthone(1), 2,3,4,6,8-pentahydroxy-1-methylxanthone(2), 3,4,6,8-tetrahydroxy-1-methylxanthone(3), 3,6,8-trihydroxy-1-methylxanthone(4), 2,4,2',4',6'-pentahydroxy-6-methylbenzophenone(5) 및 7-hydroxy-5-methoxy-3-methylisobenzofuranone(6)로 동정하였다. 내생균 *Arthrimum phaeospermum*이 생산하는 이차대사산물에 관해서는 본 연구에서 처음으로 이루어졌다. 분리된 화합물들이 알려진 물질들이라 하더라도, 몇 가지는 강한 항균작용이 보고되거나, 암세포 증식억제 작용이 보고된 바 있는 바, 내생균이 생산하는 이차대사산물 역시 잠재력 있는 천연자원이 될 수 있음을 알 수 있었다.

사 사

사용된 미생물 균주는 국립생물자원관 김순옥 박사님 연구팀에서 제공받았으며, 이에 감사를 표합니다. 본 결과물은 농림수산식품기술기획평가원의 고부가가치식품개발사업의 지원(과제번호 11600103), National Natural Science Foundation of China (No. 81202452) 및 NSFC-NRF 협력과제 (No. 81411140251)의 지원을 받아 연구되었습니다.

인용문헌

- Bacon, C. W. and White, J. F. (2000) *Microbial Endophytes*, Marcel Dekker, New York.
- Tan, R. X. and Zou, W. X. (2001) Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.* **18**: 448-459.
- Strobel, G. A., Miller, R. V., Miller, C., Condrón, M., Teplow, D. B. and Hess, W. M. (1999) Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. *Microbiology* **145**: 1919-1926.
- Walsh, T. A. (1992) Emerging targets in antibacterial and antifungal chemotherapy. In Sutcliffe, J. A. and Georgopadakou, N. H. (ed), 349-373, Chapman & Hall, London.
- Li, J. Y., Strobel, G. A., Harper, J. K., Lobkovsky, E. and Clardy, J. (2000) Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. *Org. Lett.* **2**: 767-770.
- Strobel, G. A., Li, J. Y., Sugawara, F., Koshino, H., Harper, J. and Hess, W. M. (1999) Oocycin A, a chlorinated macrocyclic lactone with potent anti-oomycete activity from *Serratia marcescens*. *Microbiology* **145**: 3557-3564.
- Castillo, U. F., Strobel, G. A., Ford, E. J., Hess, W. M., Porter, H., Jensen, J. B., Albert, H., Robison, R., Condrón, M. A., Teplow, D. B., Stevens, D. and Yaver, D. (2002) Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kemedia nigriscans*. *Microbiology* **148**: 2675-2685.
- Strobel, G. A., Stierle, A., Stierle, D. and Hess, W. M. (1993) *Taxomyces andreanae* a proposed new taxon for a bulbiliferous hyphomycete associated with Pacific yew. *Mycotaxon* **47**: 71-78.
- Eyberger, A. L., Dondapati, R. and Porter, J. R. (2006) Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. *J. Nat. Prod.* **69**: 1121-1124.
- Kusari, S., Zühlke, S. and Spiteller, M. (2009) An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. *J. Nat. Prod.* **72**: 2-7.
- Kusari, S., Lamshöft, M., Zühlke, S. and Spiteller, M. (2008) An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. *J. Nat. Prod.* **71**: 159-162.
- El-Elimat, T., Raja, H. A., Graf, T. N., Faeth, S. H., Cech, N. B. and Oberlies, N. H. (2014) Flavonolignans from *Aspergillus iizukae*, a fungal endophyte of milk thistle (*Silybum marianum*). *J. Nat. Prod.* **77**: 193-199.
- Abdel-Lateff, A., Klemke, C., König, G. M. and Wright, A. D. (2003) Two new xanthone derivatives from the algicolous marine fungus *Wardomyces anomalus*. *J. Nat. Prod.* **66**: 706-708.
- Wang, J., Xu, F., Wang, Z., Lu, X., Wan, J., Yang, B., Zhou, X., Zhang, T., Tu, Z. and Liu, Y. (2014) A new naphthalene glycoside from the sponge-derived fungus *Arthrimum* sp. ZSDS1-F3. *Nat. Prod. Res.* **28**: 1070-1074.
- Ebada, S. S., Schulz, B., Wray, V., Totzke, F., Kubbutat, M., Mueller, W., Hamacher, A., Kassack, M., Lin, W. and Proksch, P. (2011) Arthrinsins A-D: Novel diterpenoids and further constituents from the sponge derived fungus *Arthrimum* sp. *Bioorg. Med. Chem.* **19**: 4644-4651.
- Belofsky, G. N., Gloer, K. B., Gloer, J. B., Wicklow, D. T. and Dowd, P. F. (1998) New *p*-terphenyl and polyketide metabolites from the sclerotia of *Penicillium Raistrickii*. *J. Nat. Prod.* **61**: 1115-1119.
- Broadbent, D., Mabelis, R. P. and Spencer, H. (1975) 3,6,8-Trihydroxy-1-methylxanthone: an antibacterial metabolite from *Penicillium patulum*. *Phytochemistry* **4**: 2082-2083.
- Mutanyatta, J., Matapa, B. G., Shushub, D. D. and Abegaz, B. M. (2003) Homoisoflavonoids and xanthenes from the tubers of wild and *in vitro* regenerated *Ledebouria graminifolia* and cytotoxic activities of some of the homoisoflavonoids. *Phytochemistry* **62**: 797-804.
- Harris, C. M., Roberson, J. S. and Harris, T. M. (1976) Biosynthesis of Griseofulvin. *J. Am. Chem. Soc.* **98**: 5380-5386.
- Sundholm, E. G. (1978) Total synthesis of lichen xanthenes. *Tetrahedron* **34**: 577-586.
- Watanabe, M., Tsukazaki, M., Hamada, Y., Iwao, M. and Furukawa, S. (1989) An efficient synthesis of phthalides by Diels-Alder reaction of sulfur-substituted furanones with silyloxydienes: a formal synthesis of mycophenolic acid. *Chem. Pharm. Bull.* **37**: 2948-2951.

(2016. 8. 30 접수; 2016. 9. 21 심사; 2016. 9. 22 게재확정)