

Aspergillus candidus F1484 균주가 생산하는 항진균 화합물의 분리 및 특성

김성욱* · 이소영 · 김성규 · 손광희 · 김영국 · 문석식¹ · 복성해
한국과학기술연구원 생명공학연구소, ¹공주대학교 화학과

Isolation and Characterization of Antifungal Compound Produced by *Aspergillus candidus* F1484. Sung-Uk Kim*, So-Young Lee, Sung-Kyu Kim, Kwang-Hee Son, Young-Kook Kim, Surk-Sik Moon¹ and Song-Hae Bok. Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, P.O. Box 115, Yu Sung 305-600, Korea, ¹Department of Chemistry, Kong-Ju National University, Kong Ju 314-110, Korea - In the course of screening for the antifungal compounds against *Candida albicans*, an antifungal compound (F1480) was isolated from the culture broth of *Aspergillus candidus* F1484. Isolation and purification of compound F1484 were performed using ethyl acetate extraction, silica gel column chromatography, ODS column chromatography, and preparative HPLC. The structure of compound F1484 was determined by the spectroscopic analyses of EI-MS, ¹³C-, ¹H-NMR, DEPT, HMQC, and HMBC. This compound appeared to have a structure of antifungal agent, chloroflavonin. In addition to antifungal activities against the yeast phase of *Candida* species, compound F1484 showed cytotoxic effect against various human tumor cell lines.

의료기술의 많은 발전에도 불구하고 지난 20여년 동안 곰팡이 질환은 크게 증가하였고 특히 장기이식, 항암제의 장기 투여, AIDS 등에 의해 체내 면역기능이 저하되었거나 광범위 항생제 투여의 과도한 사용 또는 catheter나 보철 장치 등을 시술한 환자에게서 매우 빈번하게 발생되고 있다(1-5).

현재 침습성 캔디다증의 발병빈도는 가장 일반적인 혈액 배양물 가운데 네번째가 될 정도로 종전보다 10배나 증가되었고, 폐에서 많이 발병하는 침습성 *aspergillus*증(aspergillosis)의 경우에는 골수이식환자 사망의 가장 커다란 원인이 되고 있으며, 북미대륙이나 유럽에서는 AIDS 환자 대부분이 *Pneumocystis carinii*에 의한 폐렴에 의해 사망율이 매우 높다고 보고되고 있다. 이와 같은 기회감염에 의한 대부분의 곰팡이 질환은 통상적인 혈액 배양에 의해 진단하기가 어렵기 때문에 심각한 면역결핍증 환자의 치료시에도 경험에만 의존하여 치료하고 있는 실정이다(6).

침습성 내장 진균증의 치료는 세균의 화학요법에 비해 발전이 지연되어 항생제보다 항진균제의 숫자도 적고, 활성이 우수하고 독성이 적은 약제도 매우 미진하여 1950년대 후반에 발견된 amphotericin B 화합물이 많은 독성에도 불구하고 아직도 침습성 내장 진균증의 치료에 이용되고 있다(7, 8). 또한 기존 약제의 장기 투여에 따른 저항성 균주의 출현으로 기존 약제에 대한 저항성이 크게 증가하였으며, 인체에 비병원성 균주로 알려진 균주들도 면역결핍증 환자에게서 질병의 원인

균으로 검출되는 빈도가 증가 추세에 있는 데다, 병원성 진균류들은 배양하기도 어렵고 대부분이 유성생식을 하지 않아 질병을 일으키는 미생물에 대한 미생물학적이고 유전학적인 연구가 체계적으로 이루어지지 못하였다(4).

지금까지 항진균제로 많은 화합물들이 보고되었으나 대부분 독성이 강하여 극히 일부의 화합물만이 사용되고 있고 또한 지난 10여년동안 새로운 탐색방법들이 개선되어 새로운 항진균제들이 보고되고 있으나 아직도 독성이 적고 약효가 우수한 약제의 개발은 미흡한 실정이다(9).

이러한 추세에 따라 미생물의 발효액으로부터 새로운 항진균 활성을 나타내는 선도물질을 탐색하기 위하여 인체병원균인 *Candida albicans*를 대상으로 dimorphism 현상을 이용하여 항진균활성 물질을 탐색하였다. *Candida albicans*는 dimorphic 현상을 나타내는 전형적인 진균류로 효모형태에서는 virulence를 나타내지 않고 위상균사 형태일 때에만 virulence를 나타낸다고 알려져 있다(10). 그러나 기존에 보고된 상품화된 항진균제들의 대부분은 효모형태와 위상균사형태의 *C. albicans*에 모두 저해활성을 나타내는 데 착안하여 전번 보고(11)와는 정반대로 효모형태의 *C. albicans*에만 저해활성을 나타내는 항진균 활성물질을 탐색하고 활성물질의 생물학적 특성과 이화학적 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

*Corresponding author.

Key words: *C. albicans*, dimorphism, antifungal activity, cytotoxicity

Candida albicans 평판의 조제

효모형태의 *Candida albicans* 평판의 조제 Sabou-

raud agar 배지(12)를 멸균시킨 후 각 평판마다 25 ml씩 분주하여 배지를 굳힌 후 별도로 멸균하여 45°C로 유지시킨 Sabouraud agar 배지에 *C. albicans* ATCC 10231 균액을 일정량 접종하여 잘 혼합한 후 10 ml씩 중층하여 최종균의 농도가 10⁷ CFU/ml 되도록 평판을 조제하였다.

위상균사 형태를 유도하기 위한 *Candida albicans* 평판의 조제 *Candida albicans*의 virulence를 나타내는 위상균사 형태를 *in vitro* 상에서 *in vivo* 조건과 유사하도록 인위적으로 유도하였다. Sabouraud dextrose broth에 *C. albicans*를 37°C로 하룻밤 배양한 후 이 배양액 1.5 ml를 50 ml의 종균배지(Eagles Minimum Essential Medium 17.5 ml, foetal bovine serum 5 ml, NaHCO₃ 10 ml, molten agar 17.5 ml)에 첨가하고 이 혼합액 10 ml를 agar만으로 이루어진 base layer에 overlay 하여 평판을 조제하였다(13).

항진균 활성물질의 *in vitro* 역가 검정

효모형태와 위상균사형태의 *Candida albicans* 평판에 시험하고자 하는 발효액을 cup속에 200 µl씩 첨가하여 효모 형태의 평판은 30°C에서, 위상균사형태의 평판은 5% CO₂ 배양기에서 37°C로 각각 24시간 배양한 후 나타나는 생육저지환의 유무를 동시에 조사하였다.

구조분석 및 이화학적 특성조사

구조분석시 사용한 NMR은 CDCl₃을 용매로 하여 Varian Unity 500 spectrometer로 분석하였고 U.V. spectrum은 methanol을 용매로 하여 Shimazu UV-265 UV-Vis Spectrophotometer로 측정하였으며 EI-MS는 VG사의 VG70-VSEQ를 사용하였다. HPLC는 Perkin Elmer사의 Binary LC pump인 LC-95와 Phenomenex사의 ODS column(22.2×250 mm)을 이용하였고 Preparative HPLC는 Waters사의 Delta prep 4000을 사용하였으며, TLC 분석은 Merck사의 silica gel 60 F-254를 이용하였다.

최소발육저지농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)의 측정

각종 효모류들을 Sabouraud agar를 이용하여 한천 회석방법(14)으로 측정하였으며 각종 균액을 spot당 10⁴ CFU 이상되게 접종한 후 30°C에서 18~20시간 동안 배양하고 육안으로 관찰하여 균의 생육이 억제된 농도를 최소발육저지농도로 정하였다.

세포독성의 검정

인간의 종양 세포주인 A549(폐암 세포주), SKMEL-2(피부암 세포주), HCT-15(결장암 세포주), SKOV-3(자궁암 세포주), XF-498(뇌암 세포주) 세포주들을 10%의 foetal bovine serum이 함유된 RPMI 1640 배지를 이

용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 96 well titer plate의 각 well에 세포주를 1~2×10⁴/well 첨가하여 24시간 배양한 후 각 well의 배지를 제거하고 각 농도로 조제한 시료용액을 각각 200 µl씩 가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 배양후 차가운 10% TCA 용액으로 세포를 고정시키고 1% 초산에 용해한 0.4% sulforhodamine B(SRB)를 각 well당 1 ml씩 가하여 상온에서 30분동안 염색하고 1% acetic acid로 5회 세척하여 과량의 SRB를 제거하였다. 완전히 건조시킨 후 10 mM Tris 용액을 적당량 가하여 5분 정도 진행시킨 다음 microplate reader(Dynatech Model MR700)를 이용하여 520 nm와 690 nm에서 흡광도를 측정하였다. 비특이적인 흡광도에 의한 영향을 제거하기 위하여 520 nm에서의 흡광도에서 690 nm에서의 흡광도를 공제하였으며 ED₅₀ 값의 계산은 만약 T≥T_z일 경우에는 $\frac{T-T_z}{C-T_z} \times 100$, T<T_z일 경우에는 $\frac{T-T_z}{T_z} \times 100$ 으로 계산하였다(15, 16).

T_z : 약물을 가하여 배양 초기에 수집한 SRB 단백질의 양
C : 시료를 처리하지 않고 세포만 있던 well의 OD 값
T : 시료를 첨가한 well의 OD 값

결과 및 고찰

Aspergillus candidus F1484 균주가 생산하는 항진균 활성물질의 분리정제

토양에서 분리한 *A. candidus* F1484 균주가 생산하는 화합물 F1484의 분리는 발효액 2l에 동량의 ethyl acetate를 가하여 5시간 동안 교반한 후 2회 추출하고 에틸아세테이트 층을 모아 진공 농축하였다. 농축된 활성분획을 silica gel column chromatography를 이용하여 몇개의 분획으로 분리하고 활성이 있는 분획을 모아 ODS column chromatography를 행하였다. 크로마토그래피 후 활성이 있는 분획을 다시 모아 preparative HPLC를 하여 순수한 물질 4 mg을 분리하였다(Fig. 1).

항진균 활성물질 F1484 화합물의 구조결정

A. candidus F1484 균주의 배양액을 ethyl acetate로 추출하고 농축한 후 silica gel column chromatography, ODS column chromatography, TLC 및 HPLC로 정제하여 노란색 분말을 얻은 후 활성물질의 구조를 분석하기 위하여 UV, Mass spectroscopy를 이용하여 기기 분석을 행하였다. UV 흡광도를 측정하기 위하여 이 화합물을 methanol에 용해하여 측정한 결과 265 nm에서 최대 UV 흡광치를 나타내었다. 또한 이 화합물의

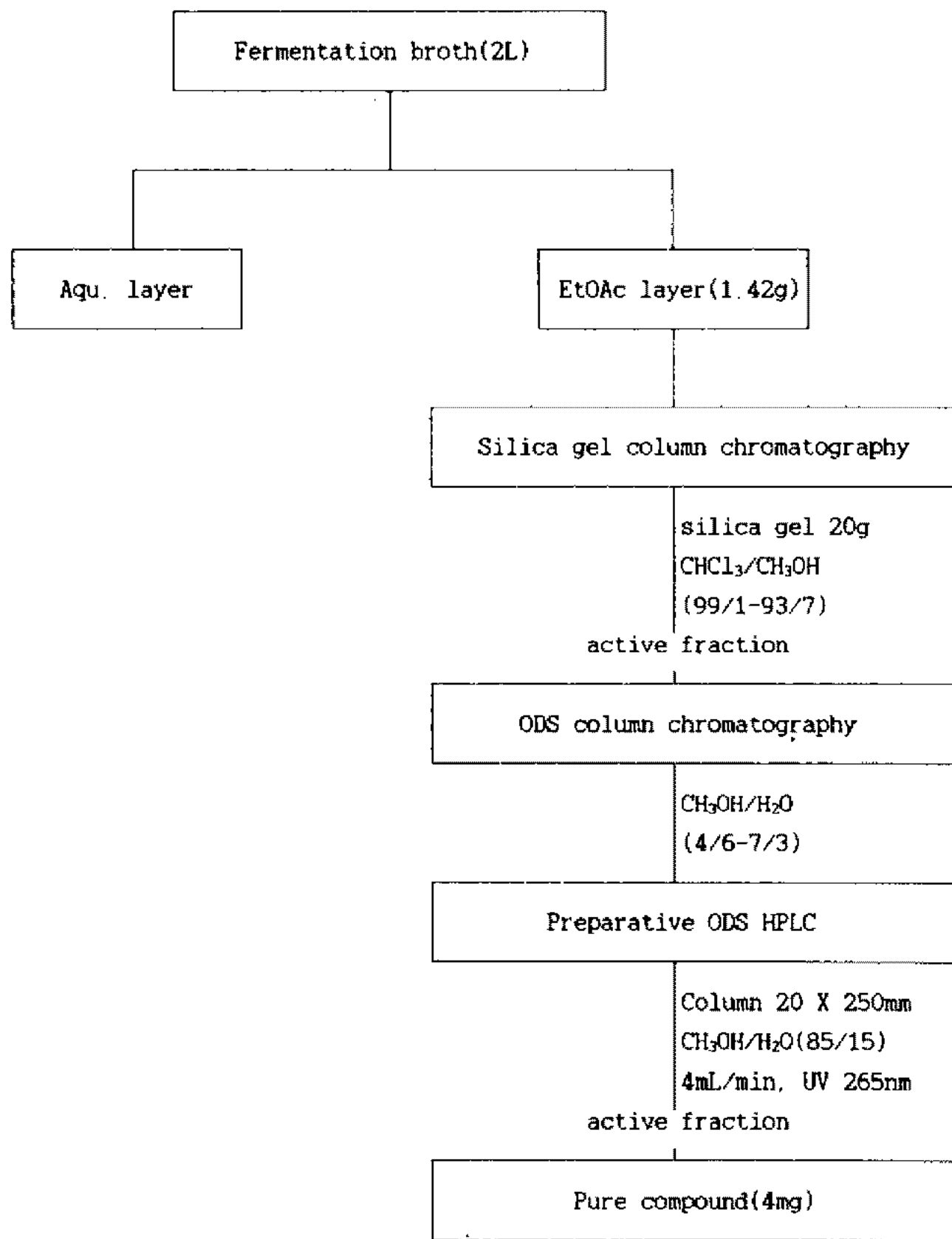


Fig. 1. Purification steps of compound F1484 produced by *Aspergillus candidus* F1484.

분자량을 high resolution mass spectrometry로 측정하고 결과 $[M^+]$ 가 379로 나타나 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, Heterocopy를 통해 화합물의 기본 골격을 확인한 후 HMQC와 HMBC를 통해 3차원 구조를 규명하였다.

먼저 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 $\sigma 12.88$, $\sigma 7.88$ singlet의 chemical shift와 split은 두개의 hydroxyl기의 양성자로 생각되나 aromatic한 carbonyl기의 영향으로 많이 downfield 되었다. 또한 $\sigma 3.86$, $\sigma 3.91$, $\sigma 3.96$ singlet의 chemical shift와 split은 aromatic 화합물의 3개의 methoxy기 peak라는 것을 알 수 있었으며 $\sigma 7.07$, $\sigma 7.58$, $\sigma 7.65$ doublet doublet peak 양상은 한 aromatic 화합물 내에 이웃한 세개의 양성자로 생각되었다(Fig. 2).

한편 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum으로부터 총 탄소수가 18개임을 확인하였고 $\sigma 56.45$, $\sigma 61.72$, $\sigma 62.17$ 에서 chemical shift를 나타내는 양상은 aromatic 화합물의 methoxy기 탄소로 생각되어지며 $\sigma 177.93$ 은 aromatic 화합물의 carbonyl 탄소라는 것을 알 수 있었다(Fig. 3).

DEPT spectrum으로부터 세개의 CH_3 탄소와 4개의 CH 탄소가 존재하는 것을 알 수 있었으나 CH_2 탄소는 존재하지 않았으며 4급 탄소는 11개가 존재한다는 것을 확인하였다(Fig. 4). $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ cosy spectrum에서는 세개의 CH_3 탄소가 methoxy기 양성자와 상관관계를 나타내었으며 4개의 CH 탄소는 singlet인 aromatic 화합물의 양성자와 상관관계를 나타내었다. 또한 HMQC spect-

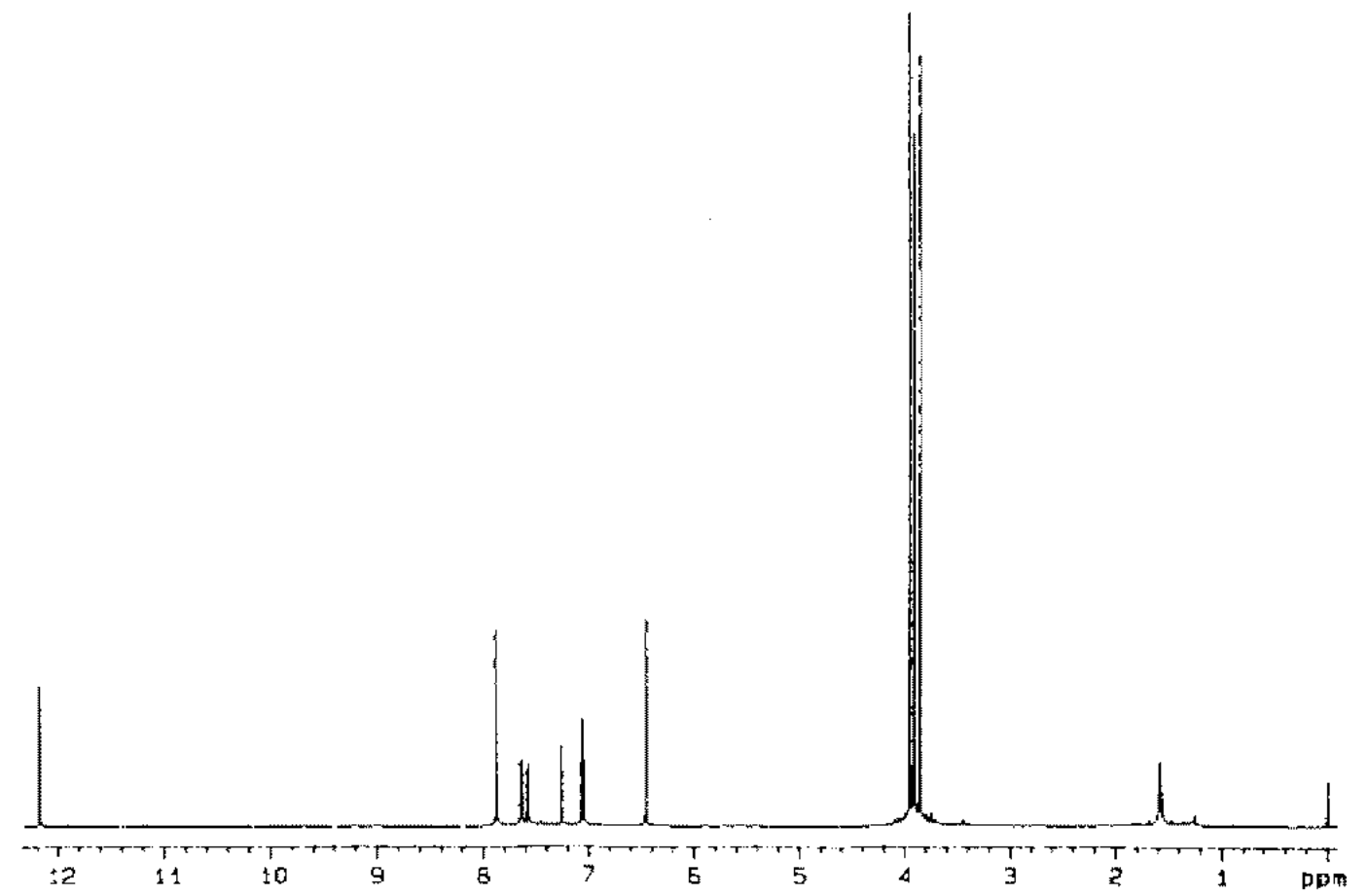


Fig. 2. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound F1484 in CDCl_3 .

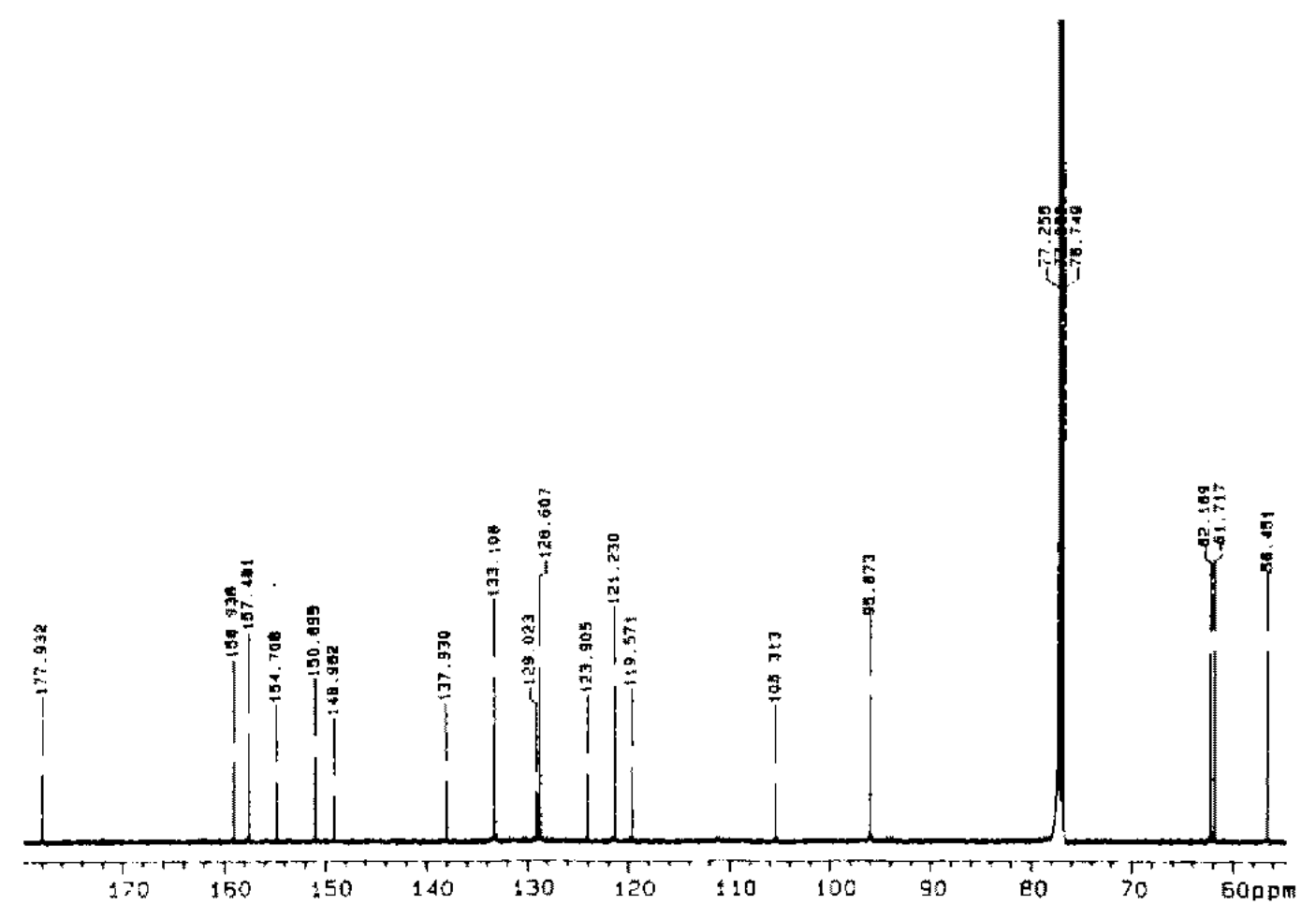


Fig. 3. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound F1484 in CDCl_3 .

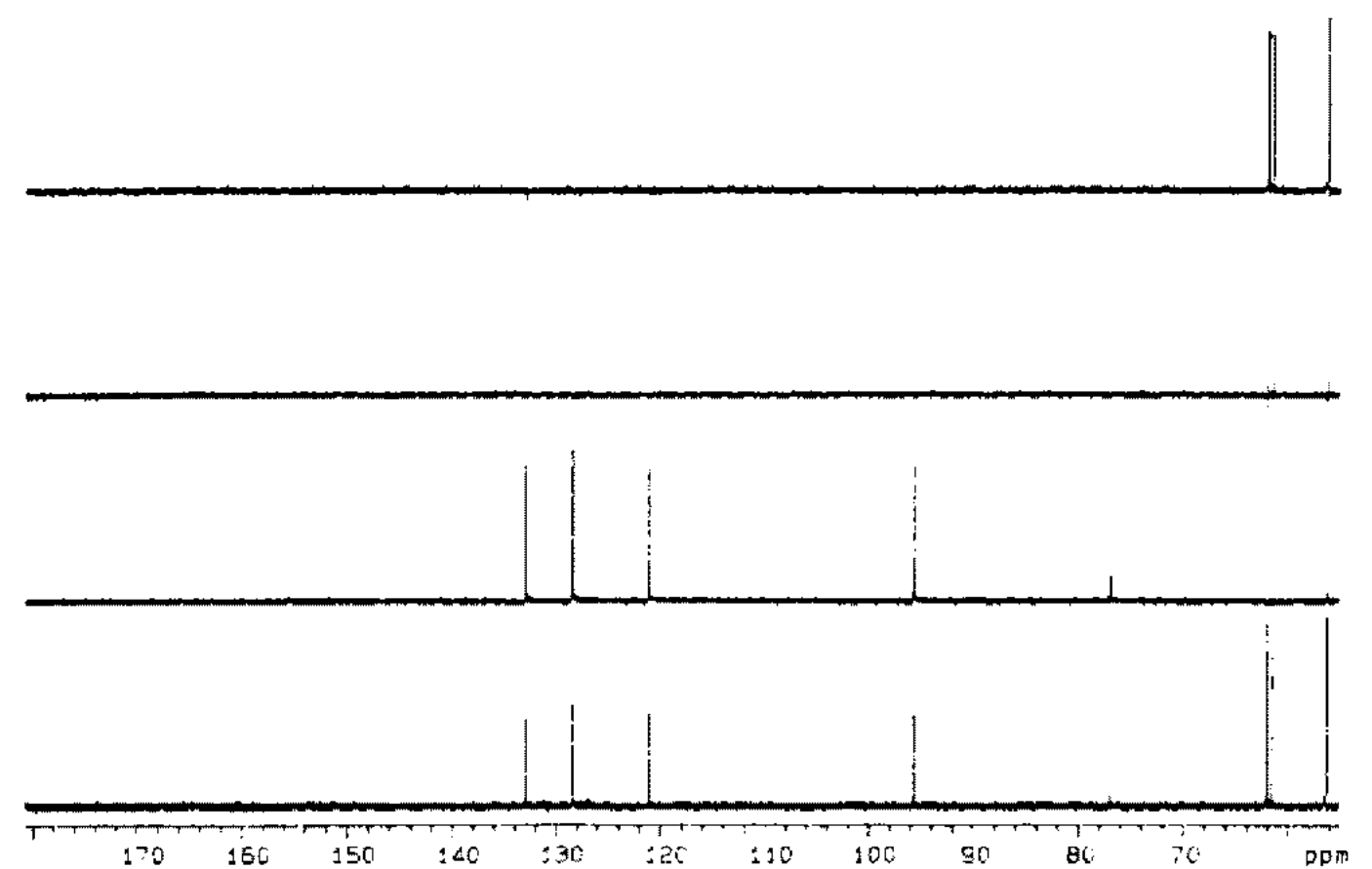
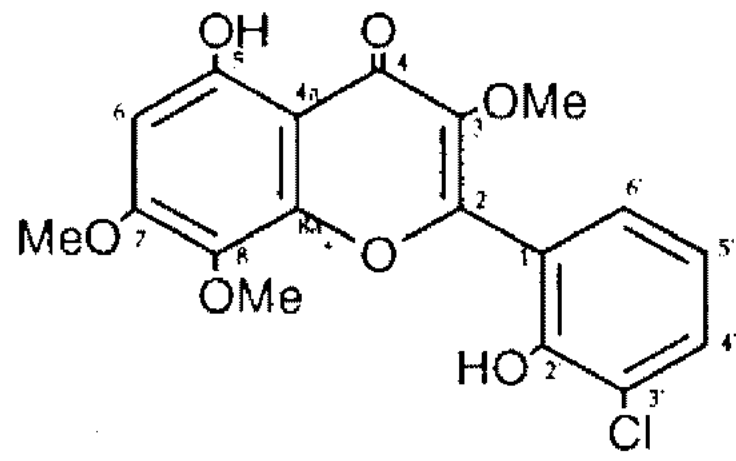


Fig. 4. DEPT spectrum of compound F1484.

um으로부터 chemical shift가 $\sigma 3.86$, $\sigma 3.91$, $\sigma 3.96$ 을 나타낸 양성자 peak들은 8,3,7-O-methoxy 탄소들과 상관관계를 나타내었으며 $\sigma 7.07$, $\sigma 7.58$, $\sigma 7.65$ 인 양성자 peak들은 5, 4', 6'-CH 탄소들과 상관관계를 나타내었다. HMBC spectrum으로부터는 C-601, C-4a, 5, 8과 상관관계를 나타내었고 C-4'은 C-2', 3', 6'과 C-6'은 C-4a,



No.	H	C-CDCl ₃	C(reference)-DMSO	HMBC(8Hz)
2		154.71	155.6	
3		137.93	139.4	
4		177.93	178.6	
4a		105.31	105.2	
5		157.48	156.6	
6	6.46s	95.87	95.8	4a, 5, 8
7		158.94	158.2	
8		129.02	128.4	
8a		148.98	148.8	
1'		119.57	119.9	
2'		150.90	151.0	
3'		123.91	121.7	
4	7.58 dd(7.8, 1.5)	133.11	132.1	2', 3', 6'
5'	7.07 dd(7.8, 7.8)	121.23	120.1	1', 3'
6'	7.65 dd(7.8, 1.5)	128.61	163.9	2', 4'
5-OH	12.18 s			4a, 5, 6
2'-OH	7.88 s			1'
3-OMe	3.91 s	62.17		3
7-OMe	3.96 s	56.45		7
8-OMe	3.86 s	61.72		8

s: singlet, dd: doublet doublet

Fig. 5. Structure and NMR assignment of compound F1484.

5, 6과 상관관계를 나타내어 탄소-탄소 연결을 통해 구조를 확인할 수 있었으나 이 화합물은 이미 발표된 chloroflavonin이라는 물질과 동일한 물질로 판명되었다 (Fig. 5)(17, 18).

활성물질의 물리화학적 성질 및 생물학적 활성

화합물 F1484는 노란색의 분말로써 chloroform이나 ethyl acetate에는 잘 용해되나 물이나 hexane등에는 거의 용해되지 않았으며 anisaldehyde에 의해 발색되었다. Silica gel TLC plate에서 chloroform과 methanol을 97:3으로 전개시켰을 때 이 화합물은 0.8의 Rf값을 나타내었다(Table 1).

화합물 F1484의 항진균 활성을 조사하기 위하여 *Candida* 4종과 *Saccharomyces* 및 *Cryptococcus* 각 1종을 대상으로 MIC를 측정된 결과 이 화합물은 *Candida krusei*를 제외한 나머지 피검균에서는 50~100 µg/ml의

Table 1. Physico-chemical properties of compound F1484.

Properties	F1484
Appearance	Yellow powder
EI ([M ⁺])	379
Molecular formula	C ₁₈ H ₁₅ ClO ₇
UV ^{Acetonitrile} _{µmax}	266, 346 nm
Color reaction	Sulfuric acid
Rf value ^a	0.8
Soluble in	CHCl ₃ , EtOAc
Insoluble in	Water, Hexane

^a: On the TLC plate (silica gel 60 F-254, Merck) Chloroform:Methanol=97:3

Table 2. The in vitro antifungal activity of compound F1484 against various yeast.

Test organisms	MIC (µg/ml)
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231 100
<i>Candida krusei</i>	ATCC 6258 >100
<i>Candida tropicalis</i>	ATCC 13803 50
<i>Candida lusitanae</i>	ATCC 42720 100
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NRRL Y-139 50
<i>Cryptococcus neoformans</i>	ATCC 36556 50

Table 3. Cytotoxicity of compound F1484 against human tumor cell lines in vitro.

Com- pound	ED ₅₀ (µg/ml)*				
	A549	SKOV-3	SKMEL-2	XF498	HCT15
F1484	6.2657	8.8933	9.2564	7.8868	9.8256

*ED₅₀ value of the compound against each cancer cell line, which is defined as the concentration that caused 50% inhibition of cell growth.

농도에서 항진균 활성을 나타내었으나 미약한 활성으로 인해 항진균제로 널리 이용되고 있지는 않은 실정이다 (Table 2).

한편 인체 종양 세포주인 A549, SKOV-3, SKMEL-2, XF498, HCT15에 대한 세포독성을 조사한 결과 F1484 화합물은 5종의 세포주 모두에 대해 강한 세포독성을 나타내었으며 각각의 ED₅₀는 6~10 µg/ml이었다(Table 3). 지금까지 항진균 활성을 가진 것으로 보고된 이 화합물이 인체 종양 세포주들에 세포독성을 나타낸다는 것은 본 연구에 의해 처음으로 밝혀졌으며 그 구조 내에 chloride가 결합된 독특한 구조를 나타내어 앞으로 생물전환을 통해 다른 화합물로 치환하여 그 구조와 활성간의 상관관계를 조사할 예정이다.

요 약

*Candida albicans*의 효모형태에 대해 활성을 나타내

는 항진균 물질의 탐색 중에 *Aspergillus candidus* F 1484 균주의 발효액으로부터 항진균 화합물 F1484를 단리하고 ethyl acetate 추출, silica gel column chromatography, ODS column chromatography 및 preparative HPLC를 행하여 분리정제하였다. F1484 화합물은 EI-MS, ^{13}C -, ^1H -NMR, DEPT, HMQC 및 HMBC에 의한 구조분석을 행한 결과 이 화합물은 항진균 물질인 chloroflavonin과 동일한 구조를 나타내었으며 효모형 태의 *Candida albicans*에 대한 항진균 활성뿐만 아니라 여러 종류의 인체 종양 세포주에 대해서도 세포독성을 나타내었다.

감사의 말

본 연구는 과학기술처에서 시행한 선도기술 개발사업에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- Greene, S.I. 1990. Treatment of fungal infections in the human immunodeficiency virus-infected individual. Pp. 237-246. In P.H. Jacobs and L. Nall (eds.), *Antifungal Drug Therapy*, Marcel Dekker, New York.
- 田中日青雄. 1987. 抗真菌抗生物質の screening. Pp. 16-24. In 大野雅三と大村智(eds.) 抗生物質 研究の 最先端. 東京化學同人, 東京.
- Amstrong, D. 1989. Problems in management of opportunistic fungal infections. *Rev. Infec. Dis.* **11**: 1591-1599.
- Sternberg, S. 1994. The emerging fungal threat. *Science* **266**: 1632-1634.
- Anaissie, E., G.P. Bodey, H. Kantarjian, J. Ro, S.E. Vartivarian, R. Hepfer, J. Hoy and K. Rolston. 1989. New spectrum of fungal infections in patients with cancer. *Rev. Inf. Dis.* **11**: 369-378.
- Georgopapadakou, N.H. and T.J. Walsh. 1994. Human Mycoses: Drugs and targets for emerging pathogens. *Science* **264**: 371-373.
- Clark, A.M. 1992. The need for new antifungal drugs. Pp. 1-19. In P.B. Fernandes (ed.), *New approaches for antifungal drugs*, Birkh user, Boston.
- Tanaka, Y. 1992. Antifungal agents. Pp. 31-44. In S. Omura (ed.), *The search for bioactive compounds from microorganisms*, Springer-Verlag, New York.
- Walsh, T.J. 1992. Invasive fungal infections: Problems and challenges for developing new antifungal compounds. Pp. 349-373. In J. Sutcliffe and N.H. Georgopapadakou (eds.), *Emerging targets in antibacterial and antifungal chemotherapy*, Chapman and Hall, New York.
- Tasohdjan, C.L. and P.J. Kozina. 1957. Laboratory and clinical studies on candidiasis in the newborn infant. *J. Pediatr.* **50**: 426-433.
- Kim, S.U., J.Y. Nam, B.M. Kwon, K.H. Son and S.H. Bok. 1995. Screening of antifungal compounds from microorganisms with preferential activity against the mycelial phase of *Candida albicans*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 170-177.
- Little, G.N. and M.A. Gordon. 1967. Survival of fungus cultures maintained under mineral oil for twelve years. *Mycologia* **59**: 733-756.
- Gullo, V., I. Gunnarsson, V. Hegde, A. Horan, D. Loeberberg, J. Marquez, M. Patel, M. Puar and J. Schwartz. 1991. A novel antifungal from an *Actinomaduriae* with preferential activity against the mycelial phase of *Candida albicans*. *J. Ind. Microbiol.* **8**: 65-68.
- Mcginis, M.R. and M.G. Rinaldi. 1986. Antifungal drugs: Mechanisms of action, drug resistance, susceptibility testing, and assays of activity in biological fluids. Pp. 243-260. In V. Lorian (ed.), *Antibiotics in laboratory medicine*, Williams & Wilkins, Baltimore.
- Skehan, P., R. Streng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J.T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney and M.R. Boyd. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**: 1107-1112.
- Ryu, S.Y., S.W. Choi, C.O. Lee and O.P. Zee. 1992. Anticancer activity of *Psoralea corylifolia*. *Arch. Pharm. Res.* **15**: 356-359.
- Bird, A.E. and A.C. Marshall. 1969. Structure of Chloroflavonin. *J. Chem. Soc. (C)*. 2418-2420.
- Burns, M.K., J.M. Coffin, I. Kurobane and L.C. Vining. 1979. Biosynthesis of chloroflavonin in *Aspergillus candidus*: A novel fungal route to flavonoids. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 426-427.

(Received 4 August 1996)