

칠면초 유래 내생균(*Arthrinium* sp. JS420)이 생산하는 이차대사산물 규명

최현규 · 심상희*
덕성여자대학교 약학대학

Secondary Metabolites Produced by an Endophytic Fungus *Arthrinium* sp. JS420 of Halophytic Plant *Suaeda japonica*

Hyun Gyu Choi and Sang Hee Shim*

Duksung IDC, Duksung Women's University, Seoul 01369, Korea

Abstract – Four polyketides, tyrosol (1), (3*R*,4*R*)-(-)-4-hydroxymellein (2), (3*R*,4*S*)-(-)-4-hydroxymellein (3), and 1-phenyl-1,2-ethanediol (4) were isolated from organic extracts of cultures of an endophytic fungus *Arthrinium* sp. (JS420) isolated from stem of a halophyte *Suaeda japonica* Makico. Chemical structures of the isolated compounds were elucidated by comparison of their spectral data such as NMR and ESIMS with reported literature values. Among the isolated compounds, 3 and 4 were isolated for the first time from this fungus.

Keywords – Polyketide, Endophyte, *Arthrinium* sp., *Suaeda japonica*

해안염습지란 내륙과 해양생태계의 전이지대로, 강과 바다의 부유성 유기물이 침전되는 하구에 주로 형성되며, 해수에 의해 발달된 지역으로 알려져 있다.¹⁾ 국내의 대표적인 해안염습지로는 순천만이 있다. 순천만은 상류로부터 유입되는 담수 및 남해에서 유입되는 해수에 의해 공급되는 부유유기물질의 특이성으로 인해 독특한 생태적 특징과 생물학적 다양성을 보이는 것으로 알려져 있다.^{2,3)} 순천만은 칠면초(*Suaeda japonica*), 나문재(*Suaeda asparagoids*), 해홍나물(*Suaeda maritima*), 통통마디(*Salicornia europaea*) 등의 다양한 종류의 염생식물이 자생하고 있으며, 칠면초가 더 넓은 영역에 분포하고 있다.⁴⁾

칠면초(*Suaeda japonica*)는 명아주과에 속하는 염생식물로, 만조 때에 침수되는 낮은 지대부터 건조한 지역까지 자라는 내염성이 강한 대표적인 호염성 식물이다.⁵⁾ 칠면초는 발생초기에 녹색을 띠나, 자라면서 붉은색이 강해지고 가을에는 붉어지는 특징이 있다. 이러한 염생식물은 염도가 높은 염습지에서 생육하며, 염분 농도가 높은 환경에서 견딜 수 있는 생리 기작이 있으며, 성장을 위해 이러한 환경을 필요로 한다고 알려져 있다.⁶⁾ 이런 염생식물류는 다양한 미생

물과 상호관계를 형성한다고 하며, 이러한 미생물은 염생식물의 내부 및 외부의 환경의 영향에 따라 식물의 생장이나, 외부 자극에 대한 저항성, 면역활성까지 영향을 끼친다고 알려져 있다.⁷⁾ 이와 같이, 식물내부의 조직내에서 살고 있으면서, 기주식물(host plant)에 피해를 가하지 않는 미생물을 내생균(endophyte)이라 정의한다.⁸⁾ 이러한 내생균은 기주식물의 생장에 영향을 끼치고, 외부의 자극에 대해 보호를 해준다는 연구결과가 있다.⁹⁾ 그러나 국내에서 내생균과 기주식물에 상호작용에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 특히 염습지에 자생하는 식물과 내생균류에 대한 연구 또한 거의 없다.

본 연구에서는 순천만의 특이한 생태특성이 기주식물과 내생균에 미치는 영향을 연구하기 위해서, 순천만에 자생하는 염생식물인 칠면초로부터 내생균을 분리하고, 이러한 내생균이 생산하는 이차대사산물을 규명하고자 본 연구를 실시하게 되었다. 칠면초는 염생식물일 뿐만 아니라, 해열작용이 뛰어나 예로부터 해열 목적으로 사용되기도 한 약용 식물이다. 본 연구에서는 칠면초로부터 *Arthrinium* sp.를 분리, 균주 동정 후 대량 배양을 하였고, 그 배양물을 유기용매로 추출하여 그 추출물로부터 4종의 방향성 천연물을 분리하였다.

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

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용된 내생균 *Arthrinium* sp. (JS420)는 국립생물자원관 김순옥 박사 팀에서 분양 받아 사용하였으며, 표본은 덕성여자대학교 약학대학 생약학 실험실에 보관하고 있다(표번호: DS-NPC-2016EN001).

시약 및 기기 - 선광도는 JASCO DIP 140 digital polarimeter로 측정하였다. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz)과 $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz) spectra는 Bruker DPX300 spectrometer로 측정하였고, tetramethylsilane(TMS)을 내부표준물질로 하였으며 chemical shifts는 δ (ppm)로 하였다. ESI-MS는 Agilent Technologies 6130 mass spectrometer로 측정하였다. Column chromatography는 silica gel 60(40~63 μ and/or 63~200 μ , Merck), Lichroprep RP-18(40~63 μ , Merck) 등을 사용하였다. HPLC는 Waters Millipore 600시스템을 사용하고, detector는 PDA 996을 사용하였다. Preparative HPLC에서 사용된 column은 Zorbax사의 SB-C18(21.2 mm \times 25 cm)이며, 이동상 용매로 HPLC 등급의 acetonitrile(ACN), H_2O 를 사용하였다. TLC는 Merck사의 DC Kieselgel 60 F_{254} 를 사용하였으며, TLC의 결과 확인은 Vilber Lumat 사의 UV detector를 사용하여, 254 nm와 365 nm 파장에서 관찰하였고, 10% 황산시액을 사용하여, 발색을 병행하여 확인하였다. 내생균의 배양을 위하여, 고압증기멸균기(JW Medical Corporation, CHS-AC 80)를 사용하여, 121°C, 1기압에서 15분간 멸균하였고, incubator로 정치배양하였다.

균주의 분리 및 배양 - 내생균주 JS420은 전남 순천만 지역의 염생식물인 칠면초(*Suaeda japonica*)에서 분리하였으며, ITS sequencing을 통하여 *Arthrinium* sp.로 규명하였다(유사성 98%). 내생균을 식물내부로부터 분리하기 위하여, 식물 조직을 0.5 \times 0.5 cm의 크기로 자른 후 자른 조직의 표면을 2% aqueous sodium hypochlorite와 70% ethanol로 1분 동안 소독시킨 다음, 증류수로 수회 세척하였다. Malt extract agar(MEA, Difco)에 50 ppm kanamycin, 50 ppm chloramphenicol, 50 ppm Rose Bengal을 첨가하여 22°C의 배양기에서 1주일 동안 배양하였다. 자란 균주를 potato dextrose agar(PDA, Difco)에 옮겨 25°C의 배양기에서 1주일 동안 배양한 후 충분히 자란 균주를 대량배양에 사용하였고, 나머지는 20% glycerol에 넣어 질소 저장 탱크에서 보관하였다. 대량배양(500 mL \times 5개)은 500 mL Erlenmeyer flask에 potato dextrose(PD, Difco)와 증류수를 넣어 autoclave로 멸균한 후, plate내에서 균주를 1.0 \times 1.0 cm의 크기로 잘라 접종하여 상온에서 4주 동안 정치배양하였다.

추출 및 분리 - 대량 배양한 PD 배양액을 동량의 에틸아세테이트(EtOAc)를 가하여, 색이 보이지 않을 때까지 수회 반복하여 추출하고, 추출물을 감압농축 하여 EtOAc 추출물로 하였다. 얻어진 EtOAc추출물 1.59 g을 silica gel을 사용

한 VLC(10 \times 8 cm)에 loading하고, 유출용매로 hexane과 acetone을 사용하여, 비극성 용매부터 극성을 높여 가며, 압력을 가한 상태로 기울기 용리시켜, 총 10개의 소분획을 얻었다. 얻어진 소분획 중 420FB(118.8 mg)을 preparative HPLC(Column, Zorbax SB-C18, 21.2 mm \times 25 cm)을 사용하여, 분리조건으로 유속 6 mL/min으로 처음 20분간 15% acetonitrile(ACN)으로, 그 후 60분간 15% ACN에서 35% ACN으로 기울기 용리시켜, 화합물 **1**(27.9 min, 20.8 mg) 및 화합물 **4**(24.2 min, 22.7 mg)을 분리하였다. 소분획 420FC(191.1 mg)을 preparative HPLC(Column: Zorbax SB-C18, 21.2 mm \times 25 cm, 유속, 6.0 mL/min; 13% ACN, 60분)하여 화합물 **2**(40.2 min, 12.2 mg)와 화합물 **3**(38.7 min, 9.7 mg)을 분리하였다.

Tyrosol (1) - white powder. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Methanol- d_4) δ : 7.01 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-2, 6), 6.68 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-3, 5), 3.66 (2H, t, $J=7.2$ Hz, H-8), 2.69 (2H, t, $J=7.2$ Hz, H-7). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, Methanol- d_4) δ : 156.7 (C-4), 131.1 (C-1), 130.8 (C-2, 6), 116.1 (C-3, 6), 64.6 (C-8), 39.4 (C-7); (+) ESI-MS m/z 139 [M+H] $^+$.

(3R,4R)-(-)-4-Hydroxymellein (2) - white powder. $[\alpha]_D^{25} = -25.4$ (c 0.25, Methanol); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Methanol- d_4) δ : 7.59 (1H, dd, $J=8.4, 7.5$ Hz, H-6), 7.09 (1H, dd, $J=7.5, 0.9$ Hz, H-5), 6.95 (1H, dd, $J=8.4, 1.1$ Hz, H-7), 4.42 - 4.65 (2H, m, H-3, 4), 1.48 (3H, d, $J=6.3$ Hz, CH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, Methanol- d_4) δ : 168.8 (C-1), 161.5 (C-8), 142.7 (C-10), 136.4 (C-6), 116.4 (C-5), 116.3 (C-7), 106.6 (C-9), 80.3 (C-3), 68.1 (C-4), 16.7 (C- CH_3); (+) ESI-MS m/z 217 [M+Na] $^+$, 195 [M+H] $^+$.

(3R,4S)-(-)-4-Hydroxymellein (3) - white powder. $[\alpha]_D^{25} = -12.4$ (c 0.15, Methanol); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Methanol- d_4) δ : 7.57 (1H, dd, $J=8.4, 7.4$ Hz, H-6), 7.01 - 6.96 (2H, m, H-5, 7), 4.73 (1H, td, $J=6.6, 2.1$ Hz, H-3), 4.57 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-4), 1.53 (3H, d, $J=6.6$ Hz, CH_3); (+) ESI-MS m/z 217 [M+Na] $^+$, 195 [M+H] $^+$.

1-Phenyl-1,2-ethanediol (4) - white powder. $[\alpha]_D^{25} = 0.0$ (c 0.1, Methanol); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Methanol- d_4) δ : 7.46 - 7.20 (5H, m, H-2, 3, 4, 5, and 6), 4.69 (1H, dd, $J=6.8, 5.3$ Hz, H-7), 3.54 - 3.66 (2H, m, H-8). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, Methanol- d_4) δ : 141.9 (C-1), 127.8 (C-3, 5), 127.1 (C-4), 125.9 (C-2, 6), 74.6 (C-7), 67.4 (C-8); (+) ESI-MS m/z 139 [M+H] $^+$.

결과 및 고찰

칠면초에서 분리한 내생균인 *Arthrinium* sp.의 EtOAc 추출물을 Vacuum Liquid Chromatography를 통하여 극성에

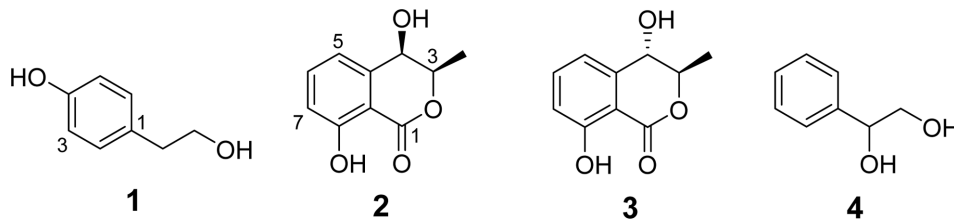


Fig. 1. Chemical structures of compounds 1-4.

따라 분획한 후, 분취용 HPLC를 사용하여 총 4종의 이차 대사산물을 분리하였다(Fig. 1). 화합물 1의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ_{H} 7.01 및 6.68에서 doublet($J = 8.5$ Hz, 각 2H)으로, 서로 *ortho* coupling 하는 aromatic signal을 통해 1,4-disubstituted benzene ring의 존재를 확인할 수 있었고, δ_{H} 3.65 및 2.69에서 두 개의 methylene기가 각각 triplet($J = 7.2$ Hz)으로 나타나 hydroxyethylene기가 존재함을 확인할 수 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 δ_{C} 156.7, 131.0, 130.8 및 116.1에서 benzene ring에 해당되는 sp^2 carbon들을 확인할 수 있었고, 특히 156.7에서 나타난 oxygenated sp^2 carbon signal로 인하여 이 화합물이 *p*-hydroxybenzene moiety를 지니고 있음을 유추할 수 있었다. 이 외에도 δ_{C} 64.6에서 oxygenated methylene 기와 δ_{C} 39.4의 하나의 methylene carbon을 확인하여 benzene ring의 *para*위치에 hydroxyl기 및 hydroxyethylene기가 결합된 4-hydroxybenzene ethanol로 추정하였다. 이상의 data를 문헌과 비교하여, 이 화합물을 *Arthrinium* sp.에서 분리·보고된 바 있는 tyrosol로 동정하였다.¹⁰⁾ 화합물 4의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 나타난 δ_{H} 7.35에서 aromatic proton에 해당되는 5개의 signal들, δ_{H} 3.61에서 나타난 하나의 oxygenated methylene proton 및 δ_{H} 4.69에서 나타난 하나의 oxygenated methine proton의 존재를 확인하여, 이 화합물이 화합물 1과 유사한 구조임을 유추할 수 있었다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 δ_{C} 141.9, 127.8 (2 \times CH), 127.1 및 125.9 (2 \times CH)에서 나타난 signal로 monosubstituted benzene ring의 존재를 확인할 수 있었다. δ_{C} 74.6 및 67.4에서 각각 oxygenated methine 및 methylene carbon을 확인하여 이 화합물이 화합물 1의 methylene에 OH기가 하나 더 치환된 화합물임을 예상할 수 있었고, 문헌과의 비교를 통하여, 1-phenyl-1,2-ethanediol(=styrene glycol)로 동정할 수 있었다.¹¹⁾ 4번 화합물은 chiral center가 존재하여 이 화합물의 절대 배열을 결정하고자 선광도를 측정하였다. 그러나 선광도값이 “0”으로 나타나 이 화합물이 racemic 혼합물임을 알 수 있었다.

화합물 2의 $^1\text{H-NMR}$ spectrum에서 δ_{H} 7.59 (dd, $J = 8.4, 7.5$ Hz), 7.09 (dd, $J = 7.5, 0.9$ Hz) 및 6.95 (dd, $J = 8.4, 1.1$ Hz)에서 세 개의 aromatic proton을 확인하여 1,2,3-trisubstituted benzene moiety의 존재를 확인할 수 있었다. 이 외에도 δ_{H} 4.57 및 4.42에서 multiplet으로 나타난 두 개의

oxygenated methine proton과 δ_{H} 1.48에서 doublet으로 나타난 secondary methyl기의 존재를 확인할 수 있었다. 이 화합물의 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum에서 6개의 aromatic carbons (161.5, 142.7, 136.4, 116.4, 116.3 및 106.6)와 하나의 ester carbon (168.7)을 포함하여 전부 10개의 탄소를 확인할 수 있었다. 이 외에도 δ_{C} 80.2와 68.1에서 두 개의 oxygenated methine carbons를, δ_{C} 16.7에서 하나의 methyl group을 확인할 수 있었다. δ_{C} 161.5에서 나타난 hydroxy기가 결합된 aromatic carbon, δ_{C} 168.7에서 나타난 ester carbon 및 secondary methyl 기의 존재로 이 화합물이 곰팡이 등 진균류에서 흔히 보고된 바 있는 mellein 계열의 물질이라 추정할 수 있었다. 이 화합물은 mellein과 비교하여 hydroxy기가 더 결합한 4-hydroxymellein으로 추정할 수 있었다. Hydroxy기가 결합한 탄소의 chemical shift 및 이 화합물의 선광도값을 문헌치와 비교하여, 이 화합물을 (3*R*,4*R*)-4-hydroxymellein로 동정하였다.^{10,12)}

화합물 3의 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum은 화합물 2의 그것들과 매우 유사하였다. δ_{H} 7.57, 7.00 및 6.97에서 나타난 aromatic signal과, δ_{H} 4.73와 4.57에서 나타난 oxygenated methylene signal, δ_{H} 1.53에서 나타난 secondary methyl기의 존재를 확인하여 이 화합물이 화합물 2와 유사한 구조를 지녔을 것으로 추정하였다. 이 화합물의 $^1\text{H-NMR}$ data 및 분자량으로 이 화합물이 hydroxymellein임을 추정할 수 있었으나, chemical shift 및 coupling pattern에서 미묘한 차이가 나타나서, 이 화합물이 화합물 2에 비하여 3번과 4번 탄소의 절대배열만 다른 화합물일 것으로 예상하였고, NMR 스펙트럼 및 선광도 값을 문헌치와 비교하여 이 화합물을 (3*R*,4*S*)-4-hydroxymellein으로 동정하였다.^{10,12)}

Mellein계 화합물은 *Aspergillus*, *Cryptosporiopsis*, *Hypoxylon*, *Microsphaeropsis*, *Pezicula*, *Phoma*, *Plectrophomella*, *Sporia*, *Xylaria* 등의 다양한 종이 생성하는 2차 대사산물로 알려져 있다.¹³⁾ 이러한 Mellein계 화합물 중, 화합물 2, 3은 식물병원균으로 알려진 *Alternaria brassicae*, *Aspergillus ochraceus*가 생산하는 이차대사산물로 이미 보고된 바 있다. (3*R*,4*R*)-4-hydroxymellein(2)는 어류병원균인 *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio harveyi*의 생성을 억제한다고 알려져 왔다.¹⁰⁾ 특히 *Aeromonas hydrophila*는 괴사성근막염을 일으키는 균주로 알려져 있다.¹⁴⁾ 또한 화

합물 1은 *Lasiodiplodia euphorbicola*, *L. hormozganensis*가 생산한다고 알려져 있으며, quorum sensing molecule로서 병원균인 *Candida albicans*의 생장과 형태를 조절하고, biofilm형성에도 관여한다고 보고되었다.¹⁵

결 론

국내의 해안염습지인 순천만에서 자생하는 칠면초에서 분리한 내생균인 *Arthrinium sp.*가 생산하는 이차대사산물을 규명하고자, 이 균을 대량 배양하고 EtOAc로 추출한 후 각종 chromatography법에 따라, 4종의 화합물을 분리하였다. 분리한 화합물은 spectral data를 바탕으로 문헌과 비교하여, 각각 tyrosol(1), (3R,4R)-(-)-4-hydroxymellein (2), (3R,4S)-(-)-4-hydroxymellein (3) 및 1-phenyl-1,2-ethanediol (4)로 동정하였다. 분리한 화합물 중 화합물 3과 4는 *Arthrinium sp.*에서는 처음으로 분리 보고되는 대사체였다. Tyrosol을 제외한 이 균주에서 분리된 화합물들의 생리활성 연구는 주로 항진균 활성에 초점이 맞추어 연구가 되어왔으며, 항균 이외의 다른 생리활성에 관한 연구나, 이러한 대사체들이 기주식물과 내생균 사이에서의 상호작용에 대한 연구는 전무한 실정므로, 화합물의 활성연구가 더욱 필요할 것으로 사료된다.

사 사

사용된 미생물 균주는 국립생물자원관 김순옥 박사님 연구팀에서 제공받았으며, 이에 감사를 표합니다. 본 연구는 덕성여자대학교 2016년도 교내연구비 지원을 받아 수행되었습니다.

인용문헌

- Chapman, V. J. (1974) Salt marshes and salt deserts of the world in Ecology of halophytes. Academic Press, New York.
- Jang, S. K. and Cheong, C. J. (2010) Characteristics of grain size and organic matters in the tidal flat sediments of the Suncheon Bay. *J. Kor. Soc. Mar. Environ. Eng.* **13**: 198-205.
- Kim, B. S., Oh, H. M., Kang, H., Park, S. and Chun, J. (2004) Remarkable bacterial diversity in the tidal flat sediment as revealed by 16S rDNA analysis. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 205-211.
- Shim, H. B., Cho, W. B. and Choi, B. H. (2009) Distribution of halophytes in coastal salt marsh and on sand dunes in Korea. *Korean J. Pl. Taxon.* **39**: 264-276.
- Lee, K. S., Gim, J. C., Son, S. M. and Lee, K. Y. (2011) Antioxidative effect of *Suaeda japonica* ethanol extract and solvent partitioned fractions. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **40**: 804-808.
- Yoon, Y. H., Yoon, H., Kang, S. M., Shin, J. H., Choo, Y. S., Lee, I. J., Lee, J. M. and Kim, J. G. (2012) Fungal diversity and plant growth promotion of endophytic fungi from six halophytes in Suncheon Bay. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 1549-1556.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M. and Franken, P. (2005) The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 13386-13391.
- 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.
- Cimmino, A., Cinelli, T., Masi, M., Reveglia, P., da Silva, M. A., Mugnai, L. and Evidente, A. (2017) Phytotoxic lipophylic metabolites produced by grapevine strains of *Lasiodiplodia* species in Brazil. *J. Agric. Food Chem.* **65**: 1102-1107.
- Freire, F., Seco, J. M., Quinoa, E. and Riguera, R. (2010) Chiral 1,2-diols: the assignment of their absolute configuration by NMR made easy. *Org. Lett.* **12**: 208-211.
- Cabras, A., Mannoni, M. A., Serra, S., Andolfi, A., Fiore, M. and Evidente, A. (2006) Occurrence, isolation and biological activity of phytotoxic metabolites produced *in vitro* by *Sphaeropsis sapinea*, pathogenic fungus of *Pinus radiata*. *Eur. J. Plant Pathol.* **115**: 187-193.
- Van Der Burg, B. B., Bronkhorst, M. W. G. A. and Pahlplatz, P. V. M. (2006) *Aeromonas hydrophila* necrotizing fasciitis. *JBJS Case Connector*, **6**: 1357-1360.
- Liu, Y., Li, X. M., Meng, L. H. and Wang, B. G. (2015) Polyketides from the marine mangrove-derived fungus *Aspergillus ochraceus* MA-15 and their activity against aquatic pathogenic bacteria. *Phytochem. Lett.* **12**: 232-236.
- Albuquerque, P. and Casadevall, A. (2012) Quorum sensing in fungi—a review. *Med. Mycol.* **50**: 337-345.

(2017. 2. 27 접수; 2017. 3. 14 심사; 2017. 3. 16 게재확정)