Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 27, No. 5, 354–358 (1999)

중급 지방산의 항진균 활성과 진균의 Plasma Membrane H^+-ATPase에 대한 저해작용

이상화 · 김창진*
생명공학연구소

Antifungal Activity of Medium-chain Saturated Fatty Acids and Their Inhibitory Activity to the Plasma Membrane H^+-ATPase of Fungi. Lee, Sang-Hwa and Chang-Jin Kim*. *Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O. Box 115, Yusong, Taejon 305-600, Korea* – In order to know the antifungal characteristics of saturated fatty acids having 6 to 12 carbons, their minimum inhibitory concentrations (MICs) and minimum fungicidal concentrations (MFCs) were estimated against *Saccharomyces cerevisiae*. Fatty acids from C_6 to C_{11} exhibited increasing activity with chain length, but C_{12} fatty acid did not show activity at all. In relation to antifungal modes of actions, fatty acids investigated showed on inhibitory activity toward the plasma membrane H^+-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. Their inhibitions to the glucose-induced acidification and ATP hydrolysis caused by the proton pump were found to be in common with antifungal activities. At the test concentration of 1 mM, hexanoic acid (C_6) showed the lowest inhibition of about 30%, while undecanoic acid (C_{11}) showed the strongest inhibition of over 90%. In addition, as seen with antifungal activity, the inhibitory activity of dodecanoic acid (C_{12}) was suddenly reduced to less than 50%.

Key words : fatty acid, antifungal activity, antifungal mode of action, plasma membrane H^+-ATPase, glucose-induced acidification, ATP hydrolysis

자연계에 널리 분포하고 있는 지방산은 인축 독성이 거의 없는 것으로 알려져 있으며, 이들의 염(비누)은 역사적으로 매우 일찍부터 세척제뿐 아니라 일반 소독제로서 사용되었다[5]. 지방산 중 undecenoic acid는 현대 의학에서 국부용 항진균제로 사용되고 있으며[1], 또한 유화제로서 개발된 글리세롤 지방산 에스테르인 monolaurin은 항균성 식품 보존제로 사용되고 있다[2].

현재 지방산의 항균 기작은 세포막 투과성 변화와 관련이 있는 것으로 제안되고 있으나[6, 11] 아직 자세히 규명되지 못하고 있다. 지금까지 알려진 지방산의 항균 작용은 penicillin과 같은 화학 요법제의 개발 이전에 주로 연구되었는데 이를 종합적으로 고찰한 Kabara의 보고[5]에 따르면, 지방산은 소수성 측쇄의 길이가 증가함에 따라 강화된 항균 활성을 나타낸다. 또한 국내에서 박 등[17, 18]은 식물 병원균에 대해 강한 항진균 활성을 나타내는 쇠비름 즙액으로부터 지방산 isobutyric acid(C_4), butyric acid(C_4), isovaleric acid(C_5), valeric acid(C_5), caproic acid(C_6)를 분리하여 활성 성분으로 동정하였으며 이들의 활성은 Kabara의 보고[5]에서처럼 소수성 측쇄의 길이가 증가함 따라 높아지는 것으로 보고하였다.

한편, 진균의 plasma membrane H^+-ATPase는 P-type의 필수 효소로서 세포내 수소 이온을 밖으로 배출함으로서 세포 내 pH를 조절하며 또한 영양분의 능동 수송을 위한 원동력인 proton 막구배를 형성시키는 것으로 알려져 있다[3, 13, 14]. 최근 Monk 등의 보고[15, 16]에 따르면, 위궤양 치료제인 omeprazol의 항진균 활성은 plasma membrane H^+-ATPase의 저해에 기인하며, 나아가 진균의 plasma membrane H^+-ATPase는 효과적인 항진균 target으로서 매우 유용할 것으로 전망하였다.

최근 C_6~C_{12} aliphatic(fatty) aldehyde의 항진균 활성과 작용 기구를 조사한 저자들의 연구 결과[8]에 따르면, aliphatic aldehyde들은 항진균 활성과 진균의 plasma membranc H^+-ATPase에 대한 저해 활성에 있어서 서로 일치하는 소수성 측쇄 의존 양상을 나타내었다. 이러한 배경 하에 본 연구에서는 궁극적으로 지방산의 항진균 기구를 규명하기 위해 중급(C_6~C_{12}) 포화 지방산의 항진균 활성과 진균의 plasma membrane H^+-ATPase에 대한 저해 활성을 조사하였다.

재료 및 방법

균주, 배지 및 배양

본 실험에 사용된 균주 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754는 American Type Culture Collection(Rockville, MD)로부터 분양받아 Sabouraud dextrose agar(SDA)(bactopep-

*Corresponding author
Tel. 82-42-860-4332, Fax. 82-42-860-4595
E-mail: changjin@mail.kribb.re.kr

tone 1%, dextrose 4%, bacto-agar 1.8%) 배지를 이용하여 30°C에서 계대 배양하였다. 또한 균주는 malt extract(ME)(BBL, Cockeysville, MD) 액체배지를 이용하여 30°C에서 24시간 동안 진탕 배양한 다음 신선 배지 상에서 5시간 더 배양하여 항진균 활성을 측정하기 위한 종균으로 사용하였다.

지방산 화합물 및 시약

본 실험에 사용된 포화 지방산 hexanoic acid(C_6), heptanoic acid(C_7), octanoic acid(C_8), nonanoic acid(C_9), decanoic acid(C_{10}), undecanoic acid(C_{11}), dodecanoic acid (C_{12})는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO)로부터 구입한 다음 dimethylsulfoxide 용매를 이용하여 순차적으로 2배 희석하였다. 또한 malachite green hydrochloride, EDTA, dithiothreitol, sodium ATP, lyticase는 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였다.

MIC 및 MFC 측정

화합물의 항진균 활성은 이전에 묘사된 macrodilution broth법[9]에 준하여 결정하였다. 즉, 화합물의 희석액을 ME 액체배지로 10배 희석한 다음 그 0.3 ml을 종균(1×10^5 CFU/ml)이 포함된 ME 액체 배지 2.7 ml와 혼합하여 30°C에서 48시간 동안 정치 배양하였다. MIC(minimum inhibitory concentration)는 육안상 균 생육이 없는 화합물의 최저 농도로 결정하였다. MFC(minimum fungicidal concentration)는 MIC를 결정한 후 균 생육이 없는 각 시험관으로부터 30 μl를 취하여 새로운 YPD(yeast extract 0.5%, polypeptone 0.5%, dextrose 1.0%) 액체 배지 3 ml에 가한 다음 30°C에서 48시간 동안 정치 배양하여 균 생육이 회복되지 않은 화합물의 최저 농도로 결정하였다. 모든 항진균 시험은 3회 반복하였다.

Glucose-induced acidification의 측정

Plasma membrane H^+-ATPase의 medium acidification에 대한 화합물의 저해 활성은 Haworth 법[4]을 기본으로 하여 조사하였다. *Saccharomyces cerevisiae* 균주를 YPD 액체 배지에 접종한 후 30°C에서 16시간 동안 진탕 배양한 다음 증류수로 2번 씻고 다시 증류수에 5×10^7 cells/ml 농도로 현탁하였다. 균 현탁액 2.7 ml과 화합물 희석액 30 μl를 혼합하여 30°C 항온 수조에서 5분간 전 반응시킨 후 20% glucose 용액 0.3 ml을 가하여 medium acidification을 유도한 다음 10분 후 반응액의 pH를 측정(pH meter; Orion, model 900A)하였다.

Plasma membrane H^+-ATPase의 분리

Plasma membrane H^+-ATPase는 이전에 묘사된 방법[8]을 이용하여 microsome 상태로 분리하였다. 즉 *Saccharomyces cerevisiae*를 YPD 액체 배지에 접종하여 30°C에서 16시간 동안 진탕 배양한 후 sorbitol buffer(10% sorbitol, 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0)로 두 번 씻은 다음 0.5 mM dithiothreitol과 lyticase를 포함하는 sorbitol buffer에 현탁하여 30°C에서 4시간 동안 반응시켜 spheroplast를 만들었다. 그리고 이들을 초음파(Branson 450 Sonifer, 1/2 horn) 파쇄한 후 원심분리(3,000×g, 5 min)하여 상등액을 회수한 다음 53,000×g에서 1시간 동안 원심분리하였다. Serrano 법[12]에 근거하여 침전물을 20% glycerol, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol을 포함한 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.2)에 현탁한 후 SW 25.1 rotor(Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA)를 이용하여 3시간 동안 discontinuous sucrose gradient(53.5%:43.5%=1:2)법으로 원심분리(53,000×g)하였다. Plasma membrane H^+-ATPase를 포함하는 microsome은 sucrose 용액의 농도 경계 부위에서 회수하였다. 단백질 농도는 Coomassie Plus Protein Assay 법(Pierce Co, Rockford, IL)으로 결정하였으며 bovine serum albumin을 표준 단백질로 사용하였다.

ATP hydrolysis 측정

Plasma membrane H^+-ATPase의 ATP hydrolysis에 대한 화합물의 저해 활성은 이전에 묘사된 방법[8]을 이용하여 조사하였다. 활성 microsome을 MET buffer(5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl buffer)에 현탁(13 μg protein/ml)하여 그 250 μl를 화합물 희석액 3 μl와 혼합하였다 이를 5분간 전 반응시킨 다음 12 mM ATP 용액 50 μl을 가하여 30°C에서 10분간 반응시킨 뒤 malachite green reagent법[7]으로 발색하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

항진균 활성

중급(C_6~C_{12}) 포화 지방산의 항진균 양상을 알아보기 위해 macrodilution broth 법[9]을 이용하여 *Saccharomyces cerevisiae*를 대상으로 minimum inhibitory concentration (MIC)와 minimum fungicidal concentration(MFC)를 측정하였다(Table 1). 그 결과 hexanoic acid(C_6)부터 undecanoic acid(C_{11})까지 지방산의 정균 농도(MIC)는 400 μg/ml부터 25 μg/ml까지 지속적으로 감소하였으며 또한 이들의 살균 농도(MFC)도 1600 μg/ml 이상부터 50 μg/ml까지 감소하였다. 그러나 undecanoic acid 보다 단 하나의 탄소수가 더 많은 dodecanoic acid(C_{12})는 1,600 μg/ml(7.99 mM)의 고 농도에서도 정균 및 살균 활성을 나타내지 못하였다. 따라서 포화 지방산의 항진균 활성은 다른 보고[5, 17]에서도 지적된 것처럼 소수성 측쇄의 길이에 의존하며 또한 aliphatic aldehyde 연구[8]에서 나타난 바와 같이 최고 활

Table 1. Antifungal activity of fatty acids against *Saccharomyces cerevisiae*

Fatty acid	MIC(μg/ml)	MFC(μg/ml)
Hexanoic acid(C_6)	400	>1600
Heptanoic acid(C_7)	200	1600
Octanoic acid(C_8)	100	400
Nonanoic acid(C_9)	100	200
Decanoic acid(C_{10})	50	100
Undecanoic acid(C_{11})	25	50
Dodecanoic acid(C_{12})	>1600	>1600

The antifungal activity of fatty acids was tested using the macrodilution broth method, as described in Materials and Methods.

성 직후 갑자기 사라지는 즉 'cut off' 현상을 나타내는 것으로 판단된다.

Medium acidification에 대한 저해 활성

진균의 plasma membrane H^+-ATPase에 대한 포화 지방산의 저해 효과를 알아보기 위해 glucose-induced acidification에 대한 저해 활성을 조사하였다. 그 결과 1 mM의 농도에서 hexanoic acid(C_6)는 34.2%의 가장 낮은 저해 활성을 나타내었으며 undecanoic acid(C_{11})은 93.6%의 가장 강한 저해 활성을 나타내었고 dodecanoic acid(C_{12})는 32.6%의 저해 활성을 나타내었다(Fig. 1). 즉 medium acidification에 대한 지방산의 저해 활성은 항균 활성과 마찬가지로 소수성 측쇄의 길이와 함께 증가하여 undecanoic

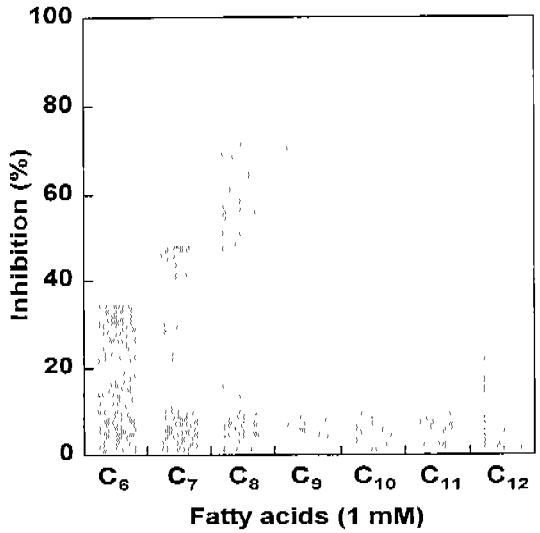

Fig. 1. The inhibitory effect of fatty acids: hexanoic acid (C_6), heptanoic acid (C_7), octanoic acid (C_8), nonanoic acid (C_9), decanoic acid (C_{10}), undecanoic acid (C_{11}), and dodecanoic acid (C12) to the medium acidification of *Saccharomyces cerevisiae*.
Acidification was induced by glucose (final concentration 2%) and investigated checking external pH. The inhibition (%) was calculated as follows: $(1-[H^+]_{inhibitor}/[H^+]_{inhibitor\ free})\times 100$.

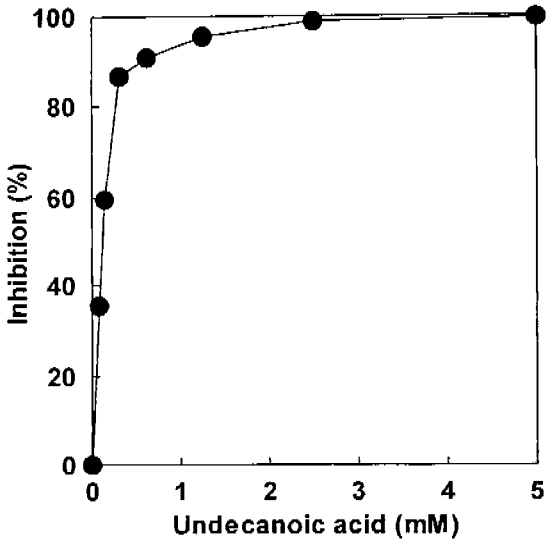

Fig. 2. The inhibitory activity of undecanoic acid to the medium acidification by the plasma membrane H^+-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*.
The inhibition (%) was calculated as follows: $(1-[H^+]_{inhibitor}/[H^+]_{inhibitor\ free})\times 100$.

acid(C_{11})에서 최고를 나타낸 다음 dodecanoic acid(C_{12})에서는 갑자기 크게 감소하였다. 한편, 포화 지방산 중 가장 강한 저해 활성을 나타낸 undecanoic acid(C_{11})를 이용하여 농도에 따른 저해 활성을 측정하였다. 그 결과 undecanoic acid는 농도 의존적 저해 효과를 나타내었으며 0.16 mM (29.1 μg/ml)과 0.63 mM(116.4 μg/ml)의 농도에서 각각 50%와 90% 이상의 저해 활성을 나타내었다(Fig. 2). 이러한 저해 농도는 동일 조건에서 측정된 해당 aldehyde[8] 및 omeprazole[15]의 각 저해 농도인 1.25 mM, 0.63 mM과 비교해 볼 때 큰 차이가 없는 것으로 생각된다.

ATP hydrolysis에 대한 저해 활성

진균의 plasma membrane H^+-ATPase에 대한 지방산의 저해 효과를 알아보기 위해 효소를 microsome 상으로 분리하여 ATP hydrolysis에 대한 저해 활성을 조사하였다. 그 결과 1 mM의 농도에서 hexanoic acid(C_6)는 35.1%의 저해 활성을 나타내었으며 undecanoic acid(C_{11})와 dodecanoic acid(C_{12})는 각각 91.6%와 47.7%의 저해 활성을 나타내었다(Fig. 3). 즉 ATP hydrolysis에 대한 지방산의 저해 활성은 항균 활성과 마찬가지로 소수성 측쇄의 길이와 함께 증가하여 undecanoic acid(C_{11})에서 최고를 나타낸 다음 dodecanoic acid(C_{12})에서는 갑자기 크게 감소하였다. 한편, 조사된 지방산 중 가장 강한 저해 활성을 나타낸 undecanoic acid(C_{11})를 이용하여 농도에 따른 저해 활성을 측정하였다. 그 결과 undecanoic acid는 plasma membrane H^+-ATPase의 ATP hydrolysis에 대해 농도 의존적 저해 효과를 나타내었으며 0.31 mM(58.2 μg/ml)과 1.25 mM

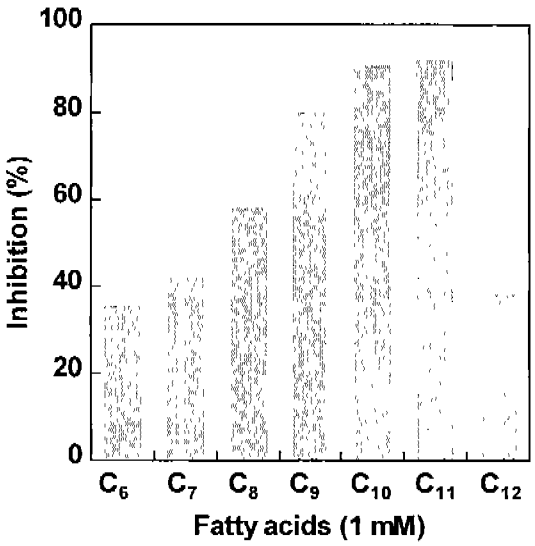

Fig. 3. The inhibitory effect of fatty acids: hexanoic acid (C_6), heptanoic acid (C_7), octanoic acid (C_8), nonanoic acid (C_9), decanoic acid (C_{10}), undecanoic acid (C_{11}), and dodecanoic acid (C_{12}) to the ATP hydrolysis by the plasma membrane H^+-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*.

The amount of enzyme (specific activity 8.9 μM/min/mg protein) was 0.029 units (M Pi/min), and the inhibition (%) was calculated as follows: $[1-(OD_{660\ nm})_{inhibitor}/(OD_{660\ nm})_{inhibitor\ free}]\times 100$.

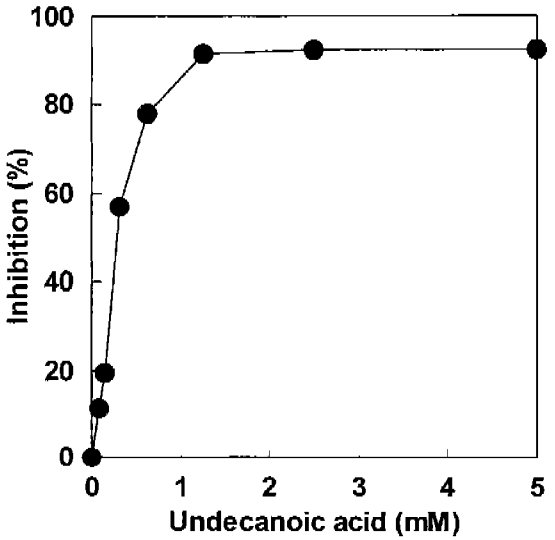

Fig. 4. The inhibitory activity of undecanoic acid to the ATP hydrolysis by the plasma membrane H^+-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*.

The amount of enzyme (specific activity 8.9 μM/min/mg protein) was 0.029 units (M Pi/min), and the inhibition (%) was calculated as follows: $[1-(OD_{660\ nm})_{inhibitor}/(OD_{660\ nm})_{inhibitor\ free}]\times 100$.

(232.8 μg/ml)의 농도에서 각각 50%와 90% 이상의 저해 활성을 나타내었다(Fig. 4). 이러한 저해 활성은 omeprazole [15]의 저해 활성과 비교해 볼 때 큰 차이가 없는 것으로 생각되며, 해당 aldehyde[8]에 비해서는 8배 더 강한 것으로 판단된다.

결론적으로, 탄소수 6부터 11까지의 포화 지방산은 항진균 작용과 진균의 plasma membrane H^+-ATPase에 대한 저해 작용에서 소수성 측쇄의 길이와 함께 증가하는 활성을 나타내었으며, 또한 탄소수가 12인 dodecanoic acid는 항진균 활성을 나타내지 못하였으며 그 저해 활성은 크게 감소하였다. 그런데, 천연물 polygodial과 plasma membrane H^+-ATPase의 저해제로 알려진 diethylstilbestrol를 이용하여 항진균 활성과 plasma membrane H^+-ATPase에 대한 저해 활성간의 관계를 조사한 전 연구 결과[10]에 따르면, 90% 이상의 최고 저해 활성 수준은 항진균 활성을 결정짓는 중요한 요소였다. 이 결과에 비추어 볼 때 plasma membrane H^+-ATPase에 대한 중급(C_6-C_{12}) 포화 지방산의 저해 양상은 항진균 양상과 차이가 없는 것으로 생각된다. 따라서 지방산의 plasma membrane H^+-ATPase에 대한 저해 효과는 이들의 항진균 기구로서 강하게 추측되며, 또한 이 저해는 막 전위에 영향을 주어 막 전위 의존성 세포 막 channel의 개폐 혼란을 야기할 수 있으므로 이는 현재 제안되고 있는 지방산의 항진균 기구 즉 막 투과성 변화[6, 11]를 설명할 수 있을 것으로 가정된다.

요 약

본 연구에서는 중급(C_6~C_{12}) 포화 지방산의 항진균 특성을 알아보기 위해 *Saccharomyces cerevisiae*을 대상으로 minimum inhibitory concentration(MIC)와 minimum fungicidal concentration(MFC)를 측정하였다. 그 결과 탄소수 6부터 11까지의 지방산은 소수성 측쇄의 길이와 함께 증가하는 항진균 활성을 나타내었으나 탄소수가 12인 지방산은 항진균 활성을 전혀 나타내지 못하였다. 한편 지방산의 항진균 기구와 관련하여 *Saccharomyces cerevisiae*의 plasma membrane H^+-ATPase에 대한 저해 효과를 조사하였다. 그 결과 proton pump의 glucose-induced acidification과 ATP hydrolysis에 대한 지방산의 저해는 항진균 활성과 비슷한 양상을 나타내었다. 즉 1 mM의 조사 농도에서 hexanoic acid(C_6)는 30% 수준의 가장 낮은 저해활성을 나타내었으며 undecanoic acid(C_{11})는 90% 이상의 가장 강한 저해 활성을 나타내었다. 또한 항진균 활성에서처럼 dodecanoic acid(C_{12})의 저해 활성은 갑자기 크게 감소하여 50% 미만의 낮은 저해 활성을 나타내었다.

REFERENCES

1. American hospital formulary service. 1998. Undecylenic acid and undecylenate salts, pp. 2898–2899. *AHFS 98 Drug Informatiuon II.* Med Watch, Rockvill, Maryland.
2. Bell, R. G. and M. DeLacy. 1987. The efficacy of nisin, sorbic acid, and monolaurin as preservatives in pasteurized

cured meat products. *Food Microbiol.* **4**: 277–283.
3. Eddy, A. A. 1982. Mechanisms of solute transport in selected eukaryotic microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* **23**: 1–78.
4. Haworth, R. S., E. J. Cragoe, Jr., and L. Fliegel. 1993. Amiloride and 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride inhibit medium acidification and glucose metabolism by the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochim. Biophys. Acta* **1145**: 266–272.
5. Kabara, J. J. 1993. Medium-chain fatty acids and esters. pp. 307–342. *In* P. M. Davidson and A. L. Branen (eds.), *Antimicrobials in Foods* (2nd). Marcel Dekker, Inc., New York.
6. Kodicek, E. and A. N. Worden. 1945. Effect of unsaturated fatty acids on *Lactobacillus helviticus* and other Gram-positive microorganisms. *Biochem. J.* **39**: 78–84.
7. Lanzetta, P. A., L. J. Alvarez, P. S. Reinach, and O. A. Candia. 1979. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal. Biochem.* **100**: 95–97.
8. Lee, J.-R., S.-H. Lee, I. Kubo, and S.-D. Hong. 1998. Antifungal activity of medium-chain (C_6-C_{13}) alkenals against, and their inhibitory effect on the plasma membrane H^+-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 197–202.
9. Lee, S.-H. and C.-J. Kim. 1999. Selective combination effect of anethole to the antifungal activities of miconazole and amphotericin *B. Yakhak Hoeji* **43**: 228–232.
10. Lee, S.-H. and C.-J. Kim. 1998. Inhibitory activity of polygodial to the plasma membrane H^+-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. KSAM Fall Meeting*, pp. 89–98. Seoul, Korea.
11. Lode, A. and T. A. Pedersen. 1970. Fatty acid induced leaking of organic compounds from *Boletus variegatus*. *Physiol. Plant* **23**: 715-727.
12. Malpartida, F. and R. Serrano. 1981. Phosphorylated intermediate of the ATPase from the plasma membrane of yeast. *Eur. J. Biochem.* **116**(2): 413–417.
13. Malpartida, F. and R. Serrano. 1981. Proton translocation catalysed by the purified yeast plasma membrane ATPase reconstituted in liposomes. *FEBS Lett.* **131**: 351–354.
14. McCusker, J. H., D. S. Perlin, and J. E. Haber. 1987. Pleiotrophic plasma membrane ATPase mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 4082–4088.
15. Monk, B. C., A. B. Mason, G. Abramochkin, J. E. Haber, D. Seto-Young, and D. S. Perlin. 1995. The yeast plasma membrane proton pumping ATPase is a viable antifungal target. I. Effects of the cysteine-modifying reagent omeprazole. *Biochim. Biophys. Acta* **1239**: 81–90.
16. Monk, B. C., A. B. Mason, T. B. Kardos, and D. S. Perlin. 1995. Targeting the fungal plasma membrane proton pump. *Acta Biochim. Pol.* **42**(4): 481–496.
17. Park, J. S., K. Kohmoto, and S. Nishimura. 1986. Antifungal properties of some short chain fatty acids against phytopathogenic fungi. *Kor. J. Plant Pathol.* **2**: 89–95.
18. Park, J. S., S. Nishimura, S. Marumo, and M. Katayama. 1986. Isolation and identification of antifungal fatty acids from the extract of common purslane (*Portulaca oleracea* L.). *Kor. J. Plant Pathol.* **2**: 82–88.

(Received May 27, 1999)