

식물 및 해양 미세 조류 추출물의 벼 도열병균, *Magnaporthe grisea*에 대한 항진균 효과

지희윤* · 조태은

건양대학교 의과대학 세포생물학 교실

Antifungal Activity of Plant and Marine Microalgae Extracts Against Rice Blast Fungus, *Magnaporthe grisea*

Hee Youn Chee* and Tae Eun Cho

Division of Cell Biology, Medical College, Konyang University, Non-san, Chungnam 320-711, Korea

(Received August 26, 2005)

ABSTRACT: Antifungal activity of the extracts of plants and marine microalgae against *Magnaporthe grisea* was investigated. Acetone extracts of pomegranate rind, leek seed, and maize husk demonstrated high antifungal activity against *M. grisea*. MIC (minimum inhibitory concentration) of acetone extracts of pomegranate rind, leek seed, and maize husk was 100 ng/ml, 50 µg/ml, and 100 µg/ml, respectively. Ethanol extract of *Amphiprora gigantea* showed antifungal activity against *M. grisea* with MIC of 100 µg/ml.

KEYWORDS: Antifungal activity, Microalgae, *Magnaporthe grisea*, Plant

벼 도열병은 *Magnaporthe grisea*에 의하여 발생하는 벼의 병해로서 전 세계 거의 모든 벼 재배지역에서 발생하며 벼에 발생하는 병해 중 가장 수량적 피해가 큰 것으로 알려져 있다(Leung and Taga, 1988). 현재까지 벼 도열병의 방제법은 주로 화학약제 처리법과 벼 도열병균에 대한 저항성 벼 품종을 재배하는 방법 등을 사용하고 있으나 화학약제의 사용은 환경오염 및 생태계 파괴 등의 문제들로 인하여 화학약제 사용에 대한 규제가 강화되고 있는 실정이며(Staub and Sozzi, 1984) 저항성 벼 품종의 사용은 저항성 벼 품종을 감염하는 새로운 *M. grisea* 생리형 균주의 출현 가능성으로 인하여 그 효과가 감소할 수 있는 문제점들이 있다. 따라서 이러한 문제점들을 극복하기 위해서는 생물적 분해가 가능한 친환경적이고 저항성 균주의 발생을 최소화시킬 수 있는 새로운 방제법의 개발이 필요한 실정이다. 이러한 방제 법에 대한 연구로는 Blasticidin과 Kasugamycin 등과 같은 미생물에서 유래되는 천연항생제를 이용하는 방제 연구가 이루어졌으며 *M. grisea* 균주에 대한 길항성 세균을 이용하는 생물학적 방제법에 대한 연구도 수행되었다(Kim *et al.*, 1997; Takeuchi *et al.*, 1958; Umezawa *et al.*, 1965). 그러나 미생물 유래 천연항생제는 독성 및 고비용의 생산성 문제가 있으며 길항성 세균을 이용한 생물학적 방제는 환경변화가 방제효과에 많은 영향을 미치는 문제점들을 가지고 있다.

최근에는 항진균 활성을 가지고 있는 물질을 식물 추출물에서 탐색하는 연구가 진행 되고 있는데 식물성 항진균 물질은 식물독성이 적을 뿐 만 아니라 환경오염이 적은 친환경적 물질이라는 장점이 있다(Lange *et al.*, 1993). Lapis and Dumancus(1978)는 *Helminthosporium oryzae*에 대한 식물 추출물의 항진균 효과를 보여주었으며 Tewari and Nayak(1991)은 Citrus 잎 추출물의 벼 도열병균에 대한 항 진균 활성에 관한 연구를 보고하였다. Amadioha (2001)는 neem 잎의 에탄올과 증류수 추출물 그리고 neem 종자의 오일 추출액이 벼 도열병균에 대한 생장 억제 효과를 가지고 있다고 보고하였다. 최근에는 해양 미세 조류들이 다양한 생리활성물질들을 가지고 있다는 연구결과가 보고되면서 해양 미세 조류로부터 새로운 항생물질 개발의 가능성에 대한 관심이 증대되고 있다(Woodruf, 1980). 따라서 본 연구에서는 여러 가지 식물추출물 및 해양 미세 조류 추출물의 *M. grisea*의 생장 억제효과를 측정하여 새로운 항진균 활성을 갖는 물질 탐색을 수행하였다.

M. grisea(KACC 40414) 균주는 농업과학기술원 유전자은행으로부터 분양받아 사용하였다. 항 진균 활성실험을 위하여 본 연구에서 사용한 식물들은 Table 1에 표시하였다. 식물시료들은 대전지역 한약방과 시장에서 구입하였으며, 해양 미세 조류는 *Amphiprora gigantea*(B106)와 *Navicula annexa*(B053)를 한국 미세 조류은행(부경대)에 의뢰하여 배양된 배양액을 공급받아 사용하였다. 식물시료들에 대한 추출은 각 시료들을 충분히 건조시킨

*Corresponding author <E-mail: hychee@konyang.ac.kr>

Table 1. List of plants used for antifungal activity test against *M. grisea*

Plant (Korea name)	Organic solvent	MIC ($\mu\text{g/ml}$) (minimum inhibitory concentration)
Pomegranate rind (석류껍질)	50% acetone	0.1
Pomegranate rind (석류껍질)	90% ethanol	0.5
Leek seed (부추씨)	50% acetone	50
Leek seed (부추씨)	90% ethanol	250
Walnut shell (호두껍질)	50% acetone	— ^a
Walnut shell (호두껍질)	90% ethanol	—
Chinese juniper (향나무)	50% acetone	—
Chinese juniper (향나무)	90% ethanol	—
Sowthistle (쑥바귀)	50% acetone	—
Sowthistle (쑥바귀)	90% ethanol	—
Solomon seal (등글레)	50% acetone	—
Solomon seal (등글레)	90% ethanol	—
Maize husk (옥수수 껍질)	50% acetone	100
Maize husk (옥수수 껍질)	90% ethanol	500
Parsely (파나리)	50% acetone	—
Parsely (파나리)	90% ethanol	—
Arrowroot (참)	50% acetone	—
Arrowroot (참)	90% ethanol	—

후에 분쇄기로 갈아서 분말형태로 제조하고 각 분말시료 10 g에 100 ml의 50% 아세톤용매와 90% 에탄올 용매를 각각 첨가하여 실온에서 150 rpm으로 24시간 진탕 추출하였다. 추출된 용액은 원심 분리하여 상층액을 수거하고 추출한 상층액을 감압 건조기를 사용하여 유기용매를 제거하고 남은 추출시료는 증류수에 현탁 하여 용해시켜 수거하였다. 해양 미세 조류는 공급받은 배양액을 원심 분리하여 조류세포들을 회수하고 동결건조기를 통하여 건조시킨 후 2 g의 미세 조류를 50 ml의 90% 에탄올에 첨가하여 실온에서 24시간 진탕 추출하였다. 추출된 시료 액은 감압 건조하여 유기용매를 제거하고 남은 추출액은 증류수에 현탁하여 0.45 μm 주사여과로 멸균시키고 냉장 보관하였다.

항 진균 정성 실험은 *M. grisea* 균주 포자들($1 \times 10^6/\text{ml}$)을 PDA(Potato dextrose agar) 배지에 도말 하고 지름 6 mm의 멸균된 Whatman paper disc를 시료 추출액에 침지시킨 후 배지 중앙부위에 놓고 26°C에서 5일간 배양한 후 paper disc 주변의 포자성장억제지역 형성의 유무를 관찰하였다. *M. grisea*에 대한 항 진균 정성실험에서는 석류껍질의 경우는 아세톤 및 에탄올 추출액 모두에서 항진균 활성을 나타내었으며 부추 씨와 옥수수껍질의 경우는 아세톤 추출물에서 높은 항진균활성을 나타내었고 에탄올 추출액에서는 낮은 항진균 활성을 보였다.

호두껍질 및 향나무, 쑥바귀, 등글레 등의 추출물들은 에탄올 및 아세톤 추출물 모두에서 항진균 활성을 나타내지 않았다. 미세 조류의 경우는 *Amphiprora gigantea*의 에탄올 추출액은 항진균 활성을 나타내었으나 *Navicula annexa*는 항진균활성을 나타내지 않았다. 최소성장억제 농도 측정

은 96 well plate에 malt extract 배지를 190 μl 첨가하고 적당한 비율로 희석시킨 시료 5 μl 와 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 의 *M. grisea* 포자 현탁액을 접종하고 26°C에서 72시간 배양한 후 포자발아를 통한 균체의 성장을 현미경으로 관찰하여 포자발아에 의한 균사체성장을 완전히 억제시킨 최소시료농도를 최소성장억제농도(minimum inhibitory concentration)로 정하였다. 각 시료에 대한 최소억제농도는 Table 1에 나타내었다. Rios *et al.*(1988)은 식물추출물의 경우 100 $\mu\text{g/ml}$ 이하에서 항진균활성을 나타내면 우수한 항진균력을 지닌 물질로 보고하였는데 본 연구에서의 결과를 보면 석류 껍질, 부추 씨, 옥수수껍질의 아세톤 추출액은 100 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 최소성장억제농도를 나타내어 상대적으로 높은 항진균 활성을 보였으며 특히 석류껍질 아세톤과 에탄올 추출액은 각각 100 ng/ml과 500 ng/ml의 최소억제농도를 나타내어 가장 높은 항진균력을 나타내었다. 석류껍질 추출액의 경우는 이미 세균과 진균에 대하여 항진균활성을 지니고 있다는 보고가 있으며 본 실험에서도 *M. grisea*에 대하여 강한 항진균활성을 나타내었다(Chulasiri, 1995). 옥수수껍질과 부추 씨 아세톤 추출액도 각각 100 $\mu\text{g/ml}$ 과 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 최소억제 농도를 나타내었다. 해양미세조류 *A. gigantea* 에탄올 추출액도 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 최소억제농도를 나타내어 우수한 항진균력을 나타내었다.

항진균 기작양상을 조사하기 위하여 항진균 억제력을 나타낸 96 well의 배양액을 잘 현탁한 후 배양액을 20 μl 취하여 새로운 malt extract broth 배지에 첨가하고 26°C에서 4일간 배양하고 *M. grisea* 포자의 발아 여부를 관찰하여 시료가 진균 성장 정지제(fungistatic)인가 살진균제(fungicidal)인가를 결정하였다. 석류껍질의 아세톤 및 에탄올 추출액과 부추 씨 및 옥수수껍질의 아세톤 추출액들을 처리한 배양액들은 새 PDA 배지에서 *M. grisea*의 포자가 발아하지 않았으므로 *M. grisea*에 대해서 살진균제 활성을 나타내었으며 부추씨와 옥수수껍질의 에탄올 추출액과 *A. gigantea*의 에탄올 추출액을 처리한 배양액은 새 PDA 배지에서 포자성장을 나타내었으므로 *M. grisea*에 대해서는 진균 성장저지제의 항진균 기작양상을 보였다(Fig. 1).

본 연구에서 석류껍질, 부추 씨, 옥수수껍질 등은 *M. grisea*에 대하여 우수한 항진균 활성을 나타내어 새로운 식물성 항진균 물질로서의 가능성을 보여주었다. 특히 석류껍질이나 옥수수 껍질 추출액들은 석류나 옥수수들의 식품가공 후 폐기되는 원료를 이용하는 것은 산업폐기물을 이용한다는 점과 원료구입이 비교적 용이하다는 장점이 있다고 사려된다. 해양 미세 조류 추출물의 항진균 효과는 주로 바이러스나 세균의 성장억제에 대한 연구가 이루어지고 있으며 항진균에 대한 연구는 미흡한 실정이다. Frankmolle *et al.*(1992)은 blue-green algae인 *Anabaena*의 cyclic peptide 성분의 항진균작용을 보고하였다. 해양 미세조류추출물은 본 연구에서 사용한 *Amphiprora* 추출

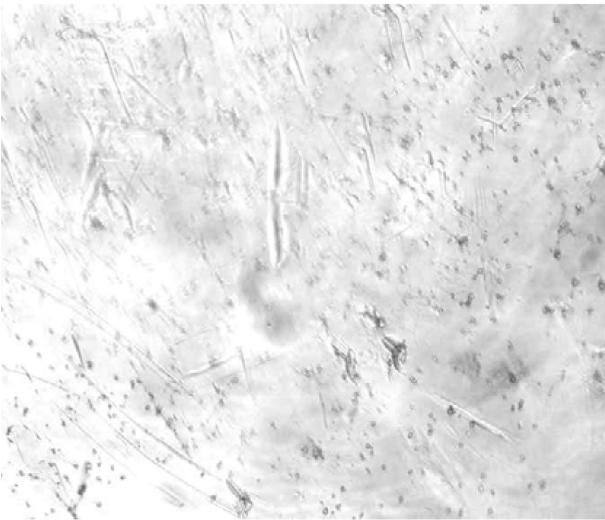
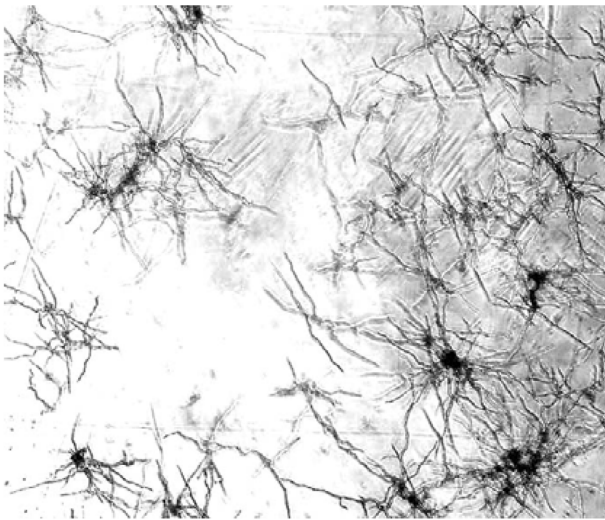


Fig. 1. Effects to the hyphal growth and spore germination of *Magnaporthe grisea* of ethanol extracts of mazie hust (a) and acetone extracts of promegranate rind (b). While ethanol extracts of mazie hust did not show any antifungal activity, acetone extracts of promegranate rind completely inhibited the spore germination of *M. grisea*.

액이 항 진균 활성을 보여주고 있으므로 다양한 해양미세조류들에 대한 항진균 물질 탐색을 통하여 새로운 항균 물질 개발도 가능하고, 특히 해양미세조류는 대량배양이 가능하다는 점이 미래의 새로운 항생물질 개발 재료로서의 가능성을 나타냈다.

적 요

식물과 해양미세조류 추출물의 *Magnaporthe grisea*에 대한 항진균 활성을 조사하였다. 석류껍질, 부추 씨, 옥수

수껍질의 아세톤 추출물은 *M. grisea*에 대하여 살진균제 양상의 높은 항 진균 활성을 나타내었다. 석류껍질, 부추 씨, 옥수수껍질 아세톤 추출물들의 *M. grisea*에 대한 최소 억제 농도는 각각 100 ng/ml, 50 µg/ml, and 100 µg/ml 이었다. *Amphiprora gigantea*의 에탄올 추출물은 100 µg/ml의 최소억제 농도로 *M. grisea*에 대한 항진균 활성을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 2004년도 충청북도 첨단산업연구개발과제 지원에 의한 연구로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Amadioha, A. C. 2000. Controlling rice blast *in vitro* and *in vivo* with extracts of *Azadirachta indica*. *Crop Protection* **19**: 287-290.
- Chulasiri, M., Thankerngpol, K. and Tamsiririrkul, R. 1995. A water soluble component with antimicrobial activity from promegranate rind. *Mahidol J. Pharm. Sci.* **22**: 107-112.
- Frankmole, W. 1992. Antifungal cyclic peptides from the terrestrial blue-green alga *Anabaena laxa*. Isolation and biological properties. *J. of Antibiotics*. **45**: 1451-1457.
- Kim, K. Y. and Kim, S. D. 1997. Biological control of *Pyricularia oryzae* blast spot with the antibiotic substances produced by *Bacillus* sp. KL-3. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 396-402.
- Lange, L., Breinholt, J., Rasmussen, F. W. and Nielsen, R. I. 1993. Microbial fungicides: the natural choice. *Pestic. Sci.* **39**: 155-160.
- Lapis, D. B. and Dumancus, E. E. 1978. Fungicidal activity of crude plant extracts on *Helminthosporium oryzae*. *Philippine Phytopathol.* **14**: 23-27.
- Leung, H. and Taga, M. 1988. *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia oryzae*), The blast fungus. pp. 175-188. In D. S. Ingram, D. H. Williams., *Advances in Pathology Genetic of Plant Pathogenic Fungi*. Academic Press Inc., U.K.
- Rios, J. L., Reico, M. C. and Villar, A. 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *J. of Ethnopharmacol.* **23**: 127-149.
- Staub, T. and Sozzi, D. 1984. Fungicide resistance: A continuing challenge. *Plant Dis.* **68**: 1026-1031.
- Takeuchi, S. K., Hirayama, K., Ueda, H., Sasaki, and H. Yonehara. 1958. Blasticidin S, a new antibiotic, kasugamycin. *J. Antibiotics* **11**: 1-5.
- Tewari, S. N. and Nayak, M. 1991. Activity of four-plant leaf extracts against three fungal pathogens of rice. *Tropical Agric. (Trinidad)* **68**: 373-375.
- Umezawa, H., Okami, Y., Hashimoto, T., Suhara, Y., Hamada, M. and Takeuchi, T. 1965. A new antibiotic, kasugamycin. *J. Antibiotics* **18**: 101-103.
- Woodruff, H. 1980. Natural products from microorganism. *Science* **208**: 1225-1229.