

식물 병원성진균에 대한 도꼬마리 추출물의 항 진균활성

박성민 · 정혁준 · 한선희¹ · 여수환² · 김용원³ · 안형근⁴ · 김현수 · 유대식*

계명대학교 미생물학과, ¹대구보건대학 안경광학과, ²계명대학교 전통미생물자원 개발 및 산업화 연구센터, ³계명문화대학 원예조경과, ⁴국립종자관리소

Received July 15, 2005 / Accepted August 19, 2005

Antifungal Activity of Extract from *Xanthium strumarium* L. Against Plant Pathogenous Fungi. Sung Min Park, Hyuck Jun Jung, Sun-Hee Han¹, Soo-Hwan Yeo², Young-Won Kim³, Hyung Geun Ahn⁴, Hyun-Soo Kim and Tae Shick Yu*. Department of Microbiology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea, ¹Department of Ophthalmic Optics, Daegu Health College, Taegu 702-722, Korea, ²Traditional Microorganism Resources Center, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea, ³Department of Horticulture and Landscape Architecture, Keimyung College, Taegu 704-701, Korea, ⁴National Seed Management Officer, Anyang 430-016, Korea – Antifungal activity of ether and ethylacetate extract from *Xanthium strumarium* L. were tested against 11 plant pathogens by agar diffusion method. Antifungal activity of the ether and ethylacetate extract showed strong antifungal activity against plant pathogenous fungi, i.e. *Phytophthora capsici*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Aspergillus niger*. The IC₅₀ of the ether extract against *Sclerotinia sclerotiorum* was determined 335 µg/ml. Antifungal activity of the ether extract from *Xanthium strumarium* L. showed Rf value=0.87 on TLC plate.

Key words – Antifungal activity, plant pathogens, *Xanthium strumarium* L.

최근 세계적으로 자생식물로부터 생리기능성 물질의 탐색이 활발히 이루어지고 있다. 자생식물로부터 얻어지는 물질은 일반적으로 독성이 없든지 매우 약하여 의약품으로 사용이 쉬운 장점이 있다. 그러나 자생식물은 항균성, 항 세균성, 항 진균성 등의 특성도 나타내고 있다. 즉, 황백[9]과 오미자[5]는 광범위한 항균성을 나타내며, 달맞이꽃의 꽃, 석류의 과피, 사방오리나무의 미성숙과와 물오리나무의 미성숙과 등의 열수 추출물은 광범위한 항균 spectrum을 나타내고 있다[7]. 특히, 초피로부터 추출물[4]과 심황으로부터 분리한 phenol 화합물[8]은 항암효과가 인정되어 자생식물의 의학적 효용성이 고조되고 있다.

한국 산야에서 잘 자생하는 도꼬마리(*Xanthium strumarium* L.)는 국내에서 자원이 풍부하고 민간요법에서 창이라고 부르기도 하며, 감기, 두통, 류머티스, 관절염, 해열 및 발한 등 여러 종류의 질병에 민간요법으로 사용되고 있다[10].

이처럼 도꼬마리는 다양한 약리효과를 나타내는 물질의 존재가 예상되어, 본인 등[1,2,3]은 한국산 도꼬마리로부터 새로운 항균 및 항암효과를 가지는 ether 추출물에 대하여 실험한 결과, ether 추출물이 *Mycobacterium phlei*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*와 *Enterobacter aerogenes*에 대하여 높은 항균활성을 나타냈으나, 진균인 *Aspergillus fumigatus*와 *Hansenula anomala*에 대하여는 전혀 항균활성을 나타내지 않았다[2]. 더욱이, 도꼬마리의 ether 추출물과 ethyl acetate 추출

물은 높은 면역증강효과를 나타내기도 했다[3]. 따라서 본 연구에서는 도꼬마리의 ether 및 ethyl acetate 추출물이 식물 병원성 진균에 대한 항 진균활성에 대하여 조사한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시료의 조제

본 실험에 사용한 도꼬마리(*Xanthium strumarium* L.)는 경상남도와 경상북도 지역에서 자생하는 식물을 채취하여 음건하여 사용했다. 도꼬마리의 추출물의 조제는 1 kg의 잎과 열매를 조분쇄하여 10 L의 물에 넣어 끓여 필요한 양으로 농축하면서 열수 추출을 3회 반복했다. 열수 추출물을 evaporator (EYELA Co. Japan)로 농축한 추출물을 유기용매인 ether와 ethyl acetate로 각각 분별 추출했다[2].

시험병원성 진균 및 사용배지

본 실험에 사용한 식물 병원성 진균은 *Phytophthora capsici* (고추 역병균), *Sclerotinia sclerotiorum* (수박 균핵병균), *Fusarium* sp. (콩 시들음병균), *Phythium* sp. (강낭콩 마름병), *Botryosphaeria clothidea* (배 겹무늬병균), *Fusarium oxysporium* (고구마 밀씩음병균), *Cercospora* sp. (고추 갈색점무늬병균), *Colletotrichum liliacearum* (액운동탄저병균), *Glomerella cingulata* (포도 탄저병 및 부패병균), *Aspergillus niger* (사과 부패병균)와 *Glomerella* sp. (고추 탄저병균)를 경북농업기술원으로부터 분양 받아 사용했다.

시험균주의 생육배지는 potato dextrose (PD) 배지 (20%

*Corresponding author

Tel : +82-53-580-5252, Fax : +82-53-580-5164

E-mail : tsyu@kmu.ac.kr

infusion from potato, 2% Bacto dextrose, pH=5.6±0.2, Difco. Co., USA)와 potato dextrose agar (PDA 배지 (20% infusion from potato, 2% Bacto dextrose, 1.5% Bacto agar, pH=5.6±0.2, Difco. Co., USA)를 구입하여 사용했다.

항진균 활성 측정

식물병원성 진균에 대한 ether와 ethyl acetate 추출물의 항진균활성은 agar diffusion법으로 측정했다. 즉, petri dish에 배양된 시험균주를 0.5 mm의 4각형으로 배지와 함께 취하여 PDA 평판배지위에 disc 접촉하여 24시간 배양한 후, 시험균주의 주위에 도꼬마리의 ether와 ethyl acetate 추출물을 각각 300 µg/20 µl가 첨가된 건조한 paper disc (Φ ; 6 mm, Whatman Co.)를 각 시험균주 위에 올려놓고 30℃에서 48시간 정치 배양했다. 항진균활성의 측정은 paper disc주위의 clear zone의 생성 유무와 inhibitory zone (clear zone)의 크기 (mm)를 측정하여 항진균활성으로 나타냈다.

IC₅₀ 측정

항진균 활성의 정도는 IC₅₀ (Inhibitory concentration values, i.e. drug concentration required to inhibit viability by 50%)으로 나타냈으며, 그 측정법은 Lyu의 방법[6]에 준했다. 즉, IC₅₀은 *S. sclerotiorum*의 생육을 50% 저해시키는 도꼬마리의 ether 추출물의 농도로 표시된다. PDA 배지에서 충분히 배양된 *S. sclerotiorum*의 0.5 mm의 4각형으로 배지와 함께 취하여 PD 액체배지 100 ml 와 ethyl acetate에 무균적으로 접종하고, 30℃에서 5일간 진탕 배양시켰다. 액체배지에서 배양된 진균을 원심분리로 취하여 105℃에서 항량이 될 때까지 건조시켜 중량 (mg)을 측정했다.

PD 액체배지에 도꼬마리의 ether 추출물의 농도를 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml 500 µg/ml 800 µg/ml로 첨가하여 시험균주의 생육을 측정했다.

TLC에 의한 항진균 물질 분리

항진균물질의 분리는 Thin-layer chromatography (TLC)

를 이용하여 분리했다. 즉, TLC (Silica gel 60F₂₅₄, Merck) plate상에 ethyl acetate 추출물(50 µl/µg) 1 µl를 spot하여 실온에서 상승법으로 전개하여 건조한 후, 254 nm의 자외선 파장에서 조사하여 분석하였다. 전개용매로 methylene chloride 와 methanol을 각각 94 : 6으로 혼합하여 사용하였다.

결과 및 고찰

Ether추출물의 항진균활성

도꼬마리로부터 항진균활성물질은 ether와 ethyl acetate로 추출하여 식물에 대하여 병원성을 나타내는 11종류의 진균에 대하여 항진균활성을 측정한 결과를 Table 1에 나타내었다.

Table 1에 나타난 바와 같이, 도꼬마리의 ether와 ethyl acetate추출물은 고추 역병균인 *P. capsici*와 수박 균핵병을 일으키는 *S. sclerotiorum*과 사과 부패병을 일으키는 *A. niger*에 대하여 높은 항진균활성을 나타내었다. 그리고 고구마 밀싹음병을 일으키는 *F. oxysporium*과 고추 갈색점무늬병균인 *Cercospora* sp.에 대하여도 항진균활성을 나타내었다. 그러나 실험에 사용한 위의 5균주를 제외한 6균주에 대하여 전혀 항진균활성을 나타내지 않았으며, 실험에 사용한 농도인 300 µg/20 µl보다 2배 높은 농도인 600 µg/20 µl를 사용했을 때에도 항진균활성은 나타내지 않았다. 도꼬마리의 추출물은 ethyl acetate 추출물보다 ether 추출물이 높은 항진균활성을 나타내었다. 도꼬마리의 ether 추출물은 진균인 *A. fumigatus*에 대하여는 항진균활성을 나타내지 않았으나[2], 본 연구에서는 같은 속(genus)인 *A. niger*에 대하여는 항진균활성을 나타내어 위의 결과와 상반된 결과를 얻었다. 이는 같은 속인 *Aspergillus*에 속하는 종 (species)이라도 종에 따라 다른 항진균활성을 나타낸다고 할 수 있음을 나타냈다.

***Sclerotinia sclerotiorum*에 대한 IC₅₀**

*S. sclerotiorum*에 대하여 높은 항진균활성을 나타내는 ether

Table 1. Antifungal spectrum against plant pathogens by ether and ethyl acetate extracts from *Xanthium strumarium* L.

Pathogenic strains	Inhibitory zone (Φ ; 6 mm)	
	ether	ethyl acetate
<i>Phytophthora capsici</i> (고추 역병균)	12.5	10.2
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (수박 균핵병균)	10.5	8.4
<i>Fusarium</i> sp. (콩 시들음병균)	-	-
<i>Phythium</i> sp. (강낭콩 마름병)	-	-
<i>Botryosphaeria clothidea</i> (배 겹무늬병균)	-	-
<i>Fusarium oxysporium</i> (고구마 밀싹음병균)	8.2	7.4
<i>Cercospora</i> sp. (고추 갈색점무늬병균)	9.7	7.5
<i>Colletotrichum liiacearum</i> (액운동탄저병균)	-	-
<i>Glomerella cingulata</i> (포도 탄저병 및 부패병균)	-	-
<i>Glomerella</i> sp. (고추 탄저병균)	-	-
<i>Aspergillus niger</i> (사과 부패병균)	13.3	10.0

추출물의 IC₅₀은 ether 추출물의 농도를 다르게 첨가한 PD 액체배지에서 배양한 시험균의 균체량을 측정하고 Lyu의 방법[6]에 따라 IC₅₀을 계산했다.

*S. sclerotiorum*의 생육은 도꼬마리를 첨가하지 않은 배지에서 생육할 때 132 mg의 균체를 얻었으나, 100 µg/ml 도꼬마리 ether 추출물이 첨가된 배지에서는 125 mg의 균체를 얻어 약 5.3%의 생육이 억제되었다. 그리고 300 µg/ml의 도꼬마리 ether 추출물이 첨가된 배지에서는 79.4 mg의 균체를 얻어 약 40%의 생육이 억제되고, 400 µg/ml이 첨가된 배지에서는 55.8 mg의 균체를 얻어 57.7%의 생육이 억제되어 도꼬마리의 ether 추출물의 농도에 비례하여 *S. sclerotiorum*의 생육이 억제됨을 알 수 있었다. *S. sclerotiorum*에 대한 도꼬마리의 ether 추출물의 IC₅₀은 Fig. 1에 나타난 바와 같이, 도꼬마리 ether 추출물의 *S. sclerotiorum*에 대한 IC₅₀은 335 µg/ml

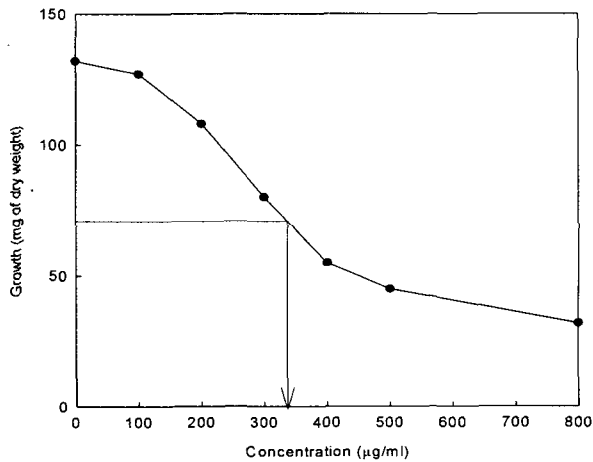


Fig. 1. Effect of concentration of ether extract from *Xanthium strumarium* L. on growth of *Sclerotinia sclerotiorum*.

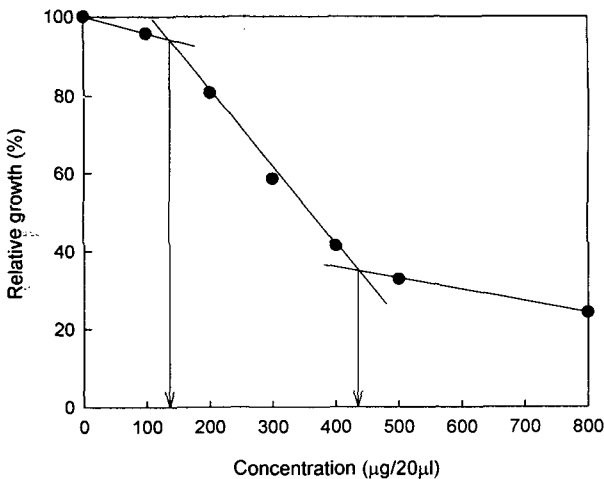


Fig. 2. Effect of concentration of ether extract from *Xanthium strumarium* L. on growth (%) of *Sclerotinia sclerotiorum*.

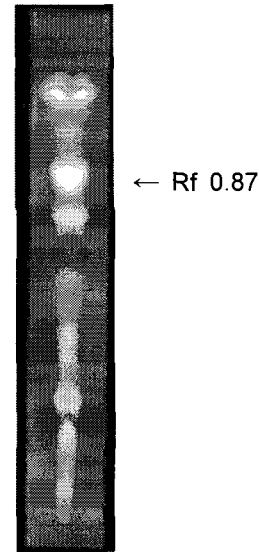


Fig. 3. Thin-layer chromatography of the ether extract from *Xanthium strumarium* L.

로 계산되었다. Ether 추출물의 *S. sclerotiorum*에 대한 항진균활성은 Fig. 2에 나타난 바와 같이, 146 µg/ml의 농도까지는 항진균활성은 거의 나타내지 않으나, 147 µg/ml부터 항진균활성을 나타내기 시작하여 426 µg/ml의 농도까지 농도의 증가에 비례적으로 항진균활성을 나타냈다. 그러나 426 µg/ml 이상의 ether 추출물의 농도에서는 농도의 증가에 영향을 받지 않았으며, 426 µg/ml 이상의 농도에서 약 65%의 *S. sclerotiorum*의 생육을 억제시켰다.

TLC에 의한 항진균물질 확인

도꼬마리의 ether 추출농축액을 TLC plate위에 얹고 전개한 결과, Fig. 3에 나타난 바와 같이 8개의 밴드를 확인할 수 있었다. 각각의 밴드를 회수하여 methanol에 녹인 후, 다시 감압 농축하여 항진균활성을 확인한 결과 Rf 값이 0.87과 0.74를 나타내는 밴드에서만 항진균활성을 나타내었고, Rf 값이 0.87밴드에서 강한 항진균활성이 나타났으며 Rf 값이 0.74의 밴드는 항진균활성을 나타내었지만 항진균활성을 상대적으로 낮게 나타내었다.

요약

도꼬마리의 ether 및 ethyl acetate 추출물이 식물병원성 진균에 대한 항진균활성을 측정 한 결과, ether와 ethyl acetate 추출물은 *P. capsici*, *S. sclerotiorum*과 *A. niger*에 높은 항진균활성을 나타내었다. 또한 *S. sclerotiorum*에 대한 ether 추출물 도꼬마리의 IC₅₀은 335 µg/ml로 계산되었다. TLC plate상에서 Rf 값이 0.87밴드에서 강한 항진균활성을 나타냈다.

감사의 글

본 연구는 농림부·농림기술관리센터의 농림기술개발연구과제의 연구비 및 계명대학교 전통미생물자원 및 산업화 연구센터의 지원에 의해 수행된 결과의 일부이며, 연구비 지원에 감사합니다.

참고 문헌

1. Kim, H. S. and J. O. Shin. 1997. Isolation and antimicrobial activity of *Xanthium strumarium* L extract. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 183-188.
2. Kim, H. S., T. S. Yu, I. S. Lee, Y. W. Kim, and S. H. Yeo. 2003. Screening of the antimicrobial and antitumor activity of *Xanthium strumarium* L extract. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **18**, 55-61.
3. Kim, H. S., I. S. Lee, S. W. Yeo, L. S. Seong, and T. S. Yu. 2003. Isolation and characterization of antitumor agents from *Xanthium strumarium* L. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **18**, 324-328.
4. Kim, S. H. and K. Y. Park. 1993. Inhibitory effects of chinese pepper on the mutagenicity and the growth of MG-63 human osteosarcoma cells. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 628-634.
5. Lee, S. H. and Y. S. Lim. 1998. Antimicrobial effect of *Schizandra chinensis* extract on pathogenic microorganism. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **27**, 239-243.
6. Lyu, S. Y., W. B. Park, K. H. Choi, and W. H. Kim. 2001. Involvement of caspase-3 in apoptosis induced by *Viscum album* var. *coloratum* agglutinin in HL-6 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 534-541.
7. Min, S. K., Y. K. Park, J. H. Park, S. H. Jin, and K. W. Kim. 2004. Screening of antibacterial activity from hot water extracts of indigenous plants. *J. Life Science.* **14**, 951-962.
8. Nagabhushan, M. and S. V. Bhide. 1992. Curcumin as an inhibitor of cancer. *J. Am. Coll. Nutr.* **11**, 192-198.
9. Park, W. Y., D. S. Chang, and H. R. Cho. 1992. Screening of antimicrobial activity for medicinal herb extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **21**, 91-87.
10. Yook, C. S. 1990. Coloured medicinal plants of Korea. p.553, Academy Press, Seoul.