

## 식물병원균 *Bipolaris sorokiniana*로부터 제초활성 물질의 분리 및 구조결정

임치환

### Isolation and Structure Determination of Phytotoxins from a Phytopathogenic Fungus *Bipolaris sorokiniana*

Chi-Hwan Lim

#### ABSTRACT

Two phytotoxic compounds, 3-methoxybenzoic acid (MBA) and 3-hydroxy benzoic acid methyl ester (HBAME), were purified and structurally characterized by instrumental analyses from a culture of a phytopathogenic fungus, *Bipolaris sorokiniana*. During the isolation procedure, the toxic components were monitored by the assay using rice (*Echinochloa crusgalli*) and Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*). These compounds had a molecular formula of  $C_8H_8O_3$  and inhibited the root growth of the plant seedlings over 90% at a level of 1000 ppm. This is the first report of herbicidal activity of MBA and HBAME purified from *B. sorokiniana*.

#### 서 론

오늘날 사용되고 있는 대부분의 농약은 유기합성제로서 환경오염, 맹독성, 약제저항성 유발 등

농업생태계에 많은 문제점을 야기시키고 있다. 또한, 1997년 농약회사인 Monsanto사가 유기합성 농약의 생산을 중단한다고 선언한 이후 환경 보호와 생태계 보전에 관한 Green Round 협상이 국제적

---

이 논문은 2001년도 충남대학교 자체연구비의 지원에 의하여 연구되었음.

충남대학교 농업생명과학대학 농화학과 (Dept. of Agricultural Chemistry, Chungnam Nat'l Univ., Daejeon 305-764, Korea) E-mail:chlim@cnu.ac.kr, Tel:042-821-6734

관심사가 되면서 과도한 농약의 남용은 심각한 문제로 대두되고 있다. 이를 대체하여 식물병해충 및 잡초 방제에 이용될 수 있는 무공해 천연물 농약(natural biocide)의 개발은 국제적 경쟁이 치열한 핵심 분야의 하나로 등장하고 있다. 천연물을 이용한 농약개발의 연구는 미생물 그 자체를 이용하는 방법과 2차 대사 산물을 이용하는 방법이 있다. 전자는 mycoherbicide라 부르며 주로 미국에서 전개되어 지고 있고 이미 Dervine 과 Collegs가 실용화되어 있다(3,4). 그러나 미생물을 직접 야외에 살포함에 따른 안전성에 대한 과학적, 생리적 반발과 이들이 완효성이라는 문제점 때문에, 이들 미생물들이 생산하는 식물 독소를 이용하려는 연구가 진행되고 있다. *Streptomyces* 속의 방선균으로부터 분리 정제한 ainsomycin을 모델로 한 NK-049와 *Streptomyces hygroscopicus*의 생산물인 Bialafos를 성공 예로 들 수 있다.

따라서 농약활성 갖는 천연생리활성물질(8-12,14)과 이들을 model 화합물로한 합성 화학적인 수법, 生合理的인 분자설계 (biorational design) 그리고 분자 probe (molecular probe)를 이용한 새로운 작용 부위에 대한 연구가 요망되어진다. 이러한 천연생리활성물질은 새로운 농약 개발을 위한 선도 화합물(active lead compound)로 이용할 수 있다. 천연생리활성물질의 특징을 들면 첫째, 일반적으로 화학합성으로는 쉽게 얻을 수 없는 다양한 구조를 갖고 있으며 둘째, 병원균의 숙주 특이성(host specificity)과 같은 작용 선택성이 기대되어지며, 셋째 자연계에 있어서 쉽게 분해되는 것이 많아 환경에 負荷가 적을 것으로 예상된다. 이런 특징을 살려, 이들 구조를 화학수식에 의해 활성발현의 양식과 선택성을 최적한 화합물로 변환시킬 수 있다면 높은 농약활성과 선택성 및 환경에 대해 안전성을 겸비한 우수한 약제의 개발이 기대되어 진다.

본 연구에서 사용한 공시균은 국내산 벼(*Oryza sativa*)종자로부터 표준습지법(13)을 통해 분리하였으며 분생포자와 분생자경의 형태 및 포자발아패턴으로 보아 분류학상 Dematiaceous Hyphomycete에 속하는 *Bipolaris sorokiniana*로 동정되었으며 본 균의 배양액으로부터 2종의 식물독소를 분리·정제하여 화학구조를 구명하였기에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시균 및 생물검정 식물

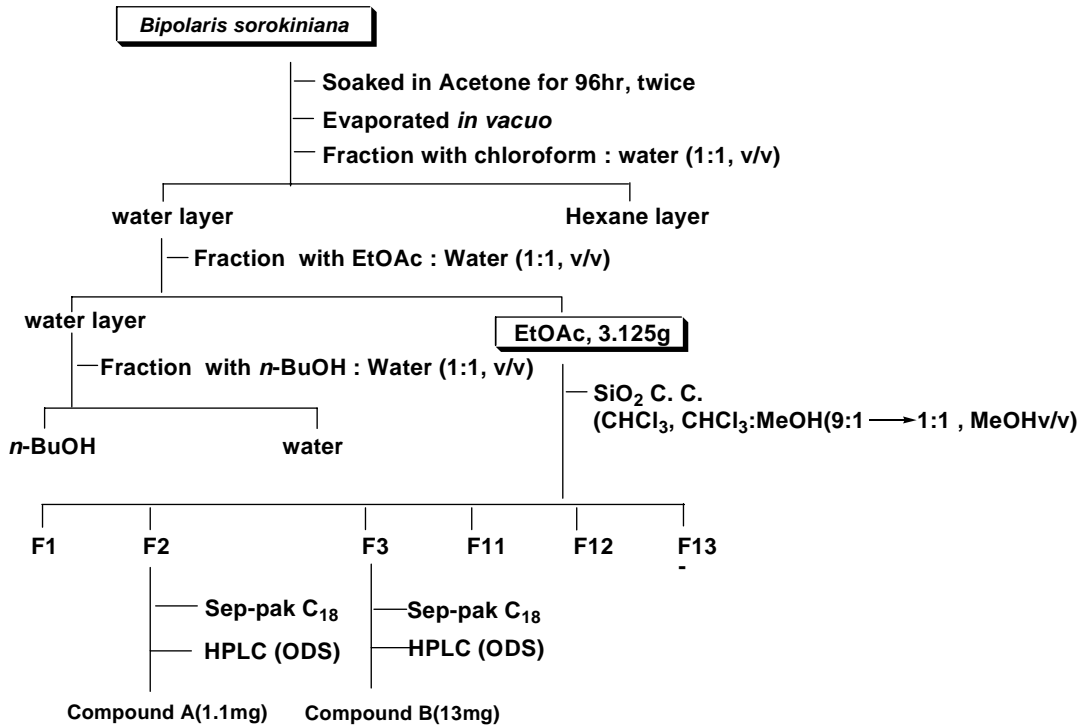
공시균을 PDA(potato dextrose agar)배지에 접종시켜 2주일간 incubator(27°C, 습도 70%, 암실)에서 배양하였다. 실험에 사용된 논피(*Echinochloa crusgalli*)는 충남대학교 부속농장에서 채집하였고 이탈리아인 라이그라스(*Lolium multitorum*)는 Takii 종묘회사(Kyoto, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

### 2. 시약

중자소독제는 스포탁 유제(한국 삼공(주)), Tween 20은 Tokyo Kasei사의 제품을 사용하였다. HPLC 용매로 사용한 chloroform, EtOAc, MeOH, 그리고 *n*-BuOH 등은 국내 삼진순약 제품(Ep.)을 정제하여 사용하였다. NMR용매로 사용한 CHCl<sub>3</sub>는 Aldrich chemical제품을, silica gel(70~230mesh) 및 TLC plate(20×20cm)는 Merck사의 Kieselgel 60 F254 제품을 사용하였다.

### 3. 기기

HPLC는 JASCO 모델(일본)의 LC900 시리즈를 사용하였으며 NMR spectrometer는 Varian사의 Bruker DMX 600(600MHz)을 사용하였고, 내부표준물질은 tetramethyl silane(TMS)을 사용하였으



Scheme 1. The purification procedure of herbicidal active compounds (A and B) from *Bipolaris sorokiniana*.

며, chemical shift는 ppm( $\delta$ )으로 나타내었다. EI-MS spectrometer는 Micromass autospec spectrometer를 사용하여 70eV에서 측정하였다. 또한 감압 농축기는 EYELA A-3s(EYELA Tokyo Rikaikai Co. Ltd., 일본)를 사용하였다.

#### 4. 제초활성 검정

2개월 이상 저온(4°C) 처리된 논피 및 라이그라스 종자를 증류수 100ml에 종자소독제인 수포탁액제 50 $\mu$ l를 희석 한 후, 약 24시간 동안 침지시켰다(2). 종자를 수세하여 petri dish에 여지(3M paper)를 깔고 증류수를 첨가한 다음 incubator (25°C, 상대습도 70%, 4200Lux)에서 약 3일간 생

장시켰다. 각각의 petri-dish에 여지(3M paper, 지름 9cm)를 깔고 균배양액의 조추출물을 1ml씩 분주하고 실온에서 건조시킨 후, 0.5% Tween 20 수용액을 petri dish 당 6ml씩 넣었을 때, 최종농도가 1000ppm이 되도록 넣었다.

발아된 잡초종자의 뿌리 길이가 약 5mm정도 균일하게 자란 종자만을 골라서 petri dish당 9립씩 옮겨 incubator에서 성장시켰다. 1주일이 지난 후, 무처리구 대비 추출물 처리구에 대한 검정 식물의 뿌리길이를 측정하여 다음 식에 의하여 저해율을 계산하였다.

$$\text{저해율}(\%) = \left(1 - \frac{\text{추출물처리구}(\text{mm})}{\text{무처리구}(\text{mm})}\right) \times 100$$

## 5. 제초 활성 물질의 분리

공시균 *B. sorokiniana*를 PDA배지(500매)에 접종하여 incubator(27°C, 14일, 습도 70%, 암실)에서 배양하였다. 배양된 균을 acetone에 96시간씩 2회 침지한 후 여과하여 여액을 진공농축 하였다. 농축된 추출물을 극성에 따라 hexane, ethyl acetate (EtOAc), BuOH, H<sub>2</sub>O로 분획하고 유근(幼根)신장저해활성 검정을 실시하였다. 활성검정결과 EtOAc층에서 강한 제초활성을 나타내어 EtOAc층을 이용하여 활성물질의 분리를 실시하였다. 즉 EtOAc층(3.13g)을 silica gel(150g) column(4×45 cm)에 packing하여 CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>: MeOH=9:1→1:1, MeOH(v/v)순으로 용출시켜 13개의 조분획층(F1~F13)을 얻었다. 이 중에서 활성이 높은 F-2(0.355g)층과 F-3(0.38g)을 Sep-pak C18(MeOH→CHCl<sub>3</sub>)을 이용하여 분획하고 활성검정을 통하여 선별된 MeOH층을 HPLC(column: Develosil ODS-10-20, 20×250 mm, mobile phase: MeOH:H<sub>2</sub>O=80:20, detection UV 254nm)를 이용하여 화합물 A(1.1mg)와 화합물 B(13mg)를 분리하였다.

**화합물 A:** needles: EI-MS m/z:152(M<sup>+</sup>), 136, 121, 107, 93, 74, 65, 43; <sup>1</sup>H-NMR(600MHz, CDCl<sub>3</sub>) 3.93(3H, s), 5.15(1H, br, OH) 7.05(1H, dd, J=8.04, 1.98 Hz), 7.32(1H, t, J=7.92, Hz), 7.52(1H, dd, J=1.68, 1.56 Hz), 7.61(1H, d, J=7.74 Hz); <sup>13</sup>C-NMR(150MHz, CDCl<sub>3</sub>) 52.35, 116.34, 120.33, 121.86, 129.72, 131.32, 155.91, 167.35

**화합물 B:** needles: EI-MS m/z:152(M<sup>+</sup>) 136, 121, 107, 93, 74, 65, 43; <sup>1</sup>H-NMR(600MHz, CDCl<sub>3</sub>) 3.92(3H, s), 5.23(1H, br, OH) 7.07(1H, dd, J=8.04, 1.98 Hz), 7.31(1H, t, J=7.92, Hz),

7.59(1H, s), 7.60(1H, m); <sup>13</sup>C-NMR(150MHz, CDCl<sub>3</sub>) 52.25, 116.26, 120.12, 122.06, 129.73, 131.60, 155.64, 166.89

## 결과 및 고찰

### 1. 제초활성

*B. sorokiniana*의 각 용매 분획층을 이용하여 논피와 라이그라스의 유근신장저해활성을 실시한 결과 라이그라스보다는 논피에 대하여 강한 활성을 나타냈으며, 이 중에서 EtOAc층이 논피에 대하여 가장 큰 활성을 보였다(Fig. 1). EtOAc층으로부터 활성물질을 분리하기 위하여 silica gel column 크로마토그래피를 이용하여 13개 조분획층으로 나누어 논피에 대하여 활성검정을 실시한 결과 F2와 F3층에서 각각 98.7 및 89.4%로 높게 나타났다(Table 1).

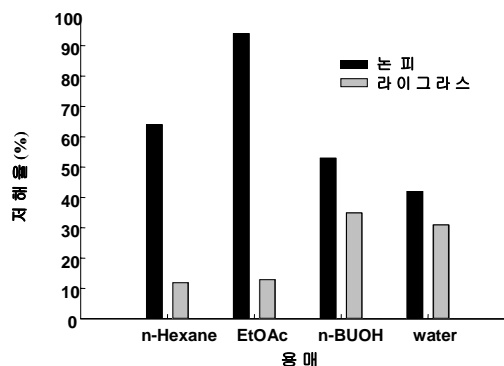


Fig. 1. Inhibition of the root growth of rice plants (*Echinochloa crusgalli*) and Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) by the each solvent fraction at a concentration of 1000ppm.

Table 1. Inhibition of the root growth of rice (*Echinochloa crusgalli*) by the each EtOAc fraction at a concentration of 1000ppm.

Fraction	Rice	Fraction	Rice
1	++	7	+
2	+++	8	++
3	+++	9	++
4	+	10	++
5	++	11	+
6	+	12	+
		13	++

The inhibitory activity was evaluated by comparing the root length to that of the control. +++ , above 91%; ++, 90-60%; +, below 60%.

### 제초활성 물질의 구조 결정

#### Compound A

이 화합물에 대한 EI-MS 측정결과 분자 이온 peak( $M^+$ )가 m/z 152에서 관찰되어 분자량이 152임을 알았다(Fig. 2).  $^1H$ -NMR spectrum(600MHz,  $CDCl_3$ )을 측정한 결과 7.61(1H, d, 7.74), 7.52(1H, dd, 2.34, 1.68), 7.32(1H, t, 7.92, 7.86), 7.05(1H, dd, 8.04, 1.98)ppm에서 각각 1H분의 aromatic doublet proton이 관찰되었다(Fig. 3 A). 그리고 결합상수로부터 이들 proton은 1,3-disubstituted benzene에 기인하는 것임을 알았다. 또한 5.15ppm에서 한 개의 OH기와 3.93ppm에서 methoxy group의 peak가 관찰되었다.  $^{13}C$ -NMR spectrum(150MHz,  $CDCl_3$ ) 측정한 결과 8개의 carbon signal이 확인되었다(Fig. 4). 167.4ppm에서 ester의 carbonyl group의 peak가, 52.4ppm에서 methoxy group의 peak가 관찰되었다. 이들 결과를 근거로 본 화합물을 분자식이  $C_8H_8O_3$ 인 3-methoxybenzoic acid로

결정하였다.

#### Compound B

Compound B의 EI-MS spectrum,  $^1H$  NMR spectrum(Fig. 3B)과  $^{13}C$ -NMR spectrum을 분석한 결과 Compound A의 spectra과 유사하여 두 화합물의 화학구조가 비슷할 것으로 예상되었다. 다

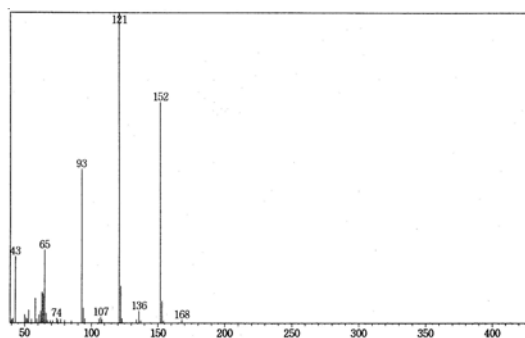


Fig. 2. EI-MS spectrum of Compound A (70eV)

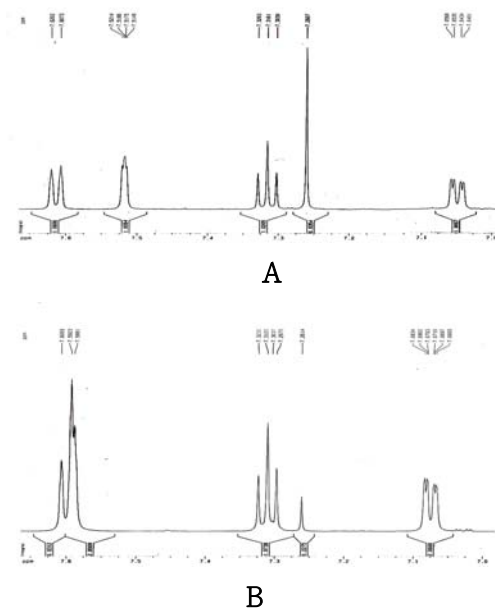


Fig. 3.  $^1H$ -NMR spectrum of compound A and B ( $CDCl_3$ , 600MHz)

## 적 요

식물병원균 *Bipolaris sorokiniana* 배양 추출물로 부터 이탈리아 라이그라스 및 논피의 유근신장을 억제하는 활성물질을 분리·정제하여 각종 기기분석을 통하여 화학구조를 결정하였다. 이들 화합물 들은 분자식이  $C_8H_8O_3$ 인 benzenoid 화합물인 3-methoxybenzoic acid와 3-hydroxy benzoic acid methyl ester로 숙주식물의 유근신장을 1000ppm에서 90% 이상 저해하였다. 이들 화합물은 식물체의 잎과 줄기에서 분리되어 항균활성 및 항류마티스 활성이 있음이 보고된바 있으나 *B. sorokiniana*로부터 분리되어 제조활성에 관하여 보고하기는 본 논문이 처음이다.

## 인용문헌

1. Büyüktimkin, N., S. Imre, and R.H. Thomson, 1981. An anthraquinone from the roots of *Digitalis davisiana*. *Phytochemistry*, 20, 2441.
2. Copeland, L.O. 1978. In *Rules for testing seeds*. Association of official seed analysts, Lansing, Michigan, U.S.A.
3. Duke, S.O. 1984. *Abstr. Int. Chem. Congr. Pacific Basin Sci.*, American Chemical Society, Washington DC, 02 A01.
4. Grove, J.F., and M. Pople, 1979. Metabolic products of *Fusarium larvarum*: The fusarenntins and the absolute configuration of monoceras. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 2048-2051
5. Imre, S., S. Sar, and R.H. Thomson, 1976. Anthraquinones in *Digitalis* species,

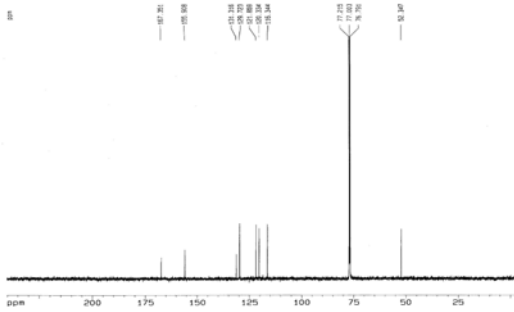


Fig. 4.  $^{13}C$ -NMR spectrum of compound A ( $CDCl_3$ , 150MHz)

만  $^1H$ -NMR spectrum에서 Compound A의 7.61, 7.52ppm signal이 7.59ppm에 겹쳐 관찰된 것으로 보아 Compound B는 Compound A의 methyl ester group의 methyl group이 4번 위치의 OH기와 위치가 바뀐 3-hydroxy benzoic acid methyl ester로 결정하였다.

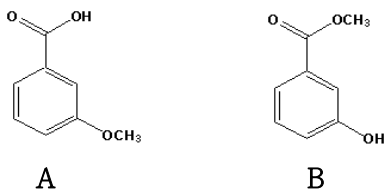


Fig. 5. Chemical structure of herbicidal active compounds(A and B) isolated from a phytopathogenic fungus, *Bipolaris sorokiniana*.

구조 규명된 MBA 및 HBAME 화합물은 몇몇 식물체의 잎과 줄기에서 분리되어 항균활성 및 항류마티스 활성이 있음이 보고(1, 5-6)된바 있으나 식물병원균의 일종인 *B. sorokiniana*로부터는 처음 분리되었으며 또한 이들의 제조활성에 관하여 보고되기는 본 논문이 처음이다. 앞으로 다양한 활성에 관한 지속적인 연구를 수행하고자 한다.

- Phytochemistry 15:317-320.
6. Kazni, M.H. 1994 An anthraquinone derivative from *Cassia italica*. *Phytochemistry* 36: 761-763.
  7. Kenfield, D., G. Bunkers, G.A. Strobel, and F. Sugawara, 1988. *Weed Tech.*, 2:519.
  8. Lim, C.H. 1996. Structure elucidation of sesquiterpenoid from pathogenic fungus *Bipolaris cynodontis*. *Anal. Science & Technol.* 9:107-111.
  9. Lim, C.H. 1996. Structure elucidation of new cochlioquinol derivatives from pathogenic fungus *Bipolaris cynodontis*. *Anal. Science & Technol.* 9:112-117.
  10. Lim, C.H., H. Miyagawa, T. Ueno, H. Takenaka, and N.D. Sung, 1996. Siccanol: sesterterpene isolated from pathogenic fungus *Drechslera siccans*. *Agric. Chem. Biotechnol.* 39:241-244.
  11. Lim, C.H., H. Miyagawa, M. Akamatsu, Y. Nakagawa, and T. Ueno, 1998. Structures and biological activities of phytotoxins produced by the plant pathogenic fungus *Bipolaris cynodontis* cynA. *J. Pesti. Sci.* 23:281-288.
  12. Lim, C.H., H. Miyagawa, T. Tsurushima, T. Ueno, and M. Sato, 1996. Cochlioquinol: A new cochlioquinone derivative produced by the plant pathogenic fungus *Bipolaris cynodontis*. *Biosci. Biotech. Biochem* 60:724-725.
  13. Neergaard, P. 1972. International and national cooperation in seed health testing and certification. *Proceedings of the International Seed Testing Association*, 37:117-138
  14. Scheffer, R.P., J.M. Daly, and B.J. Deverall, 1983. In *Toxins and plant pathogenesis*, pp.1-40, Academic press, New York.