

## Naphthoquinone류 화합물 흡수에 의한 페튜니아 배양세포내의 Phytoalexin 유도

김명조 · 박상수\*

생명공학연구소 식물생화학 Research Unit

**초록** : 식물배양세포에서 유용 phytoalexin의 생산여부를 검토하기 위하여 페튜니아 배양세포주에 5종의 naphthoquinone류 화합물을 첨가하였을 때 유도되는 항미생물활성을 조사하였다. 처리한 naphthoquinone류 화합물 중 토양 방선균으로부터 페튜니아 세포생장억제물질로 분리한 2,5,7-trihydroxy-3-(5'-hydroxyhexyl)-1,4-naphthoquinone (3-OH NQ)이 48시간 이내에 90% 이상 효율적으로 배양세포내로 흡수되었다. 3-OH NQ를 처리한 페튜니아 켈러스 추출물은 *Aspergillus candidus*의 포자발아를 강하게 억제하였다(MIC: 32 µg/ml). 3-OH NQ를 처리한 페튜니아 배양세포로부터 2종의 항미생물 활성물질 4,2',4',β-tetrahydroxychalcone과 4',7-dihydroxyflavone을 분리하였다. 주로 유도되는 phytoalexin인 4,2',4',β-tetrahydroxychalcone은 *A. candidus*의 포자발아를 강하게 억제하였다(MIC: 16 µg/ml). (1997년 4월 3일 접수, 1997년 5월 6일 수리)

### 서 론

식물은 외부로부터 병충해 등의 생물학적 스트레스를 받으면 생체방어물질을 유도한다. 특히 식물배양세포는 제어된 환경에서 배양할 수 있을 뿐 아니라 비교적 높은 스트레스조건에서 배양되기 때문에 항스트레스와 관련된 물질을 많이 생산하리라 간주된다. 또한 배양세포는 식물체에 비해 병충해에 대한 기주특이성이 낮으며 병충해감염 등에 대한 감수성이 높고 반응이 민감하기 때문에 배양세포계를 이용하여 생체방어물질의 유도 및 방어기구에 관한 정보를 얻을 수 있다.<sup>1)</sup> 기생균이 식물체내에 침입하였을 때, 숙주인 식물세포에 의해 합성 또는 활성화 되는 항균성물질을 phytoalexin이라 하며, 이러한 물질은 숙주세포의 죽음에 의해 유도되는 경우가 많다.<sup>2-4)</sup> 배양세포에 elicitor를 처리하여 유용 2차대사산물의 유도와 생합성경로 규명에 관한 연구가 이루어지고 있다.<sup>5,6)</sup> 저자들은 배양세포가 지닌 이러한 특성에 착안하여 다양한 배양세포주를 대상으로 항산화물질의 활성을 조사하여 peroxidase, superoxide dismutase, catalase를 다량생산하는 세포주를 선발하여 대상물질의 대량생산과 항산화기구에 관한 연구를 수행하고 있으며,<sup>7-11)</sup> 토양방선균으로부터 페튜니아 켈러스 생장억제물질로 naphthoquinone류 화합물을 분리한 바 있다.<sup>12)</sup>

본 연구에서는 elicitor로서 페튜니아 자신의 켈러스 생장억제활성을 나타낸 화합물을 포함하여 5종의 naphthoquinone류 화합물을 페튜니아 배양세포에 처리하였을 때 유도되는 phytoalexin을 분리하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 세포배양

페튜니아 잎절편으로부터 얻어진 켈러스 세포주<sup>12)</sup>를 3% sucrose와 0.2% Gelite가 포함된 MS 반고체배지<sup>13)</sup> 4 ml를 함유한 유리시험관(직경 25 mm)에서 25°C 암조건으로 배양하였다. 계대배양은 4주 간격으로 실시하였다. 액체배양은 MS배지(2 ml)에 생체중 0.5 g의 페튜니아 켈러스를 접종하고 25°C 암조건에서 진탕배양(100 rpm)하였다.

#### Naphthoquinone류 화합물의 흡수력

배양세포에 처리한 화합물은 Kim 등<sup>12)</sup>이 토양방선균으로부터 분리한 2,5,7-trihydroxy-3-(5'-hydroxyhexyl)-1,4-naphthoquinone (3-OH NQ으로 약함)과 Sigma사로부터 구입한 1,4-naphthoquinone (NQ), 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (2-OH NQ), 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone (juglone), shikonin 등 4종이다.

페튜니아 켈러스를 naphthoquinone류 화합물(200 µg/ml)을 포함한 MS 반고체배지에서 6일간 배양하여, 켈러스를 제거하고 배지를 2 ml 메탄올로 2회 추출한 후 아세톤으로 2차 추출하였다. 추출액을 감압농축하여 얻은 농축액을 10 ml 메탄올로 용해하여 사용하였다. 액체배양조건에서 naphthoquinone류 화합물처리 MS배지에 각 화합물(200 µg/ml)을 첨가하여 실시하였다. 배양 6일 후 배양액 0.5 ml에 메탄올을 첨가하여 5 ml되게 하여 기질의 흡수력을 조사하였다. 처리한 화합물의 세포에 의한 흡수력은 흡수되지 않고 남은 기질의 양을 측정하는 방법으로 각 화합물의 UV 최대 흡수파장으로부터 구한 정량곡선으로부터 구하였다.

찾는말 : antimicrobial activity, spore germination inhibitor, 3-OH NQ, THC, DHF

\*연락처

### 활성물질의 분리 및 구조해석

새롭게 유도되는 항박테리아성 화합물을 분리하기 위하여 3-OH HQ (5 mg)를 포함한 MS액체배지 100 ml를 500 ml 삼각 flask에 분주하고 가압멸균 후, 생체중 10 g의 캘러스를 첨가하고 25°C 암상태에서 48시간 진탕배양(100 rpm)하였다. 배양액을 Whatman filter paper를 이용하여 캘러스와 배양액을 분리하였다. 분리된 캘러스를 아세톤과 메탄올(1:1) 혼합액에 침적한 후, 초음파세척기를 이용해서 15분간 3회 추출하였다. 추출액을 농축하여 얻어진 농축액(2.68 g)을 에칠아세테이트와 *n*-부탄올로 용매분획 하였다. 각각의 분획을 TLC와 HPLC로 분석하여 무처리구의 캘러스의 추출액과 성분을 비교한 후, 새로이 유도되는 물질을 silica gel 및 ODS column chromatography를 이용하여 화합물 1과 화합물 2를 각각 103.2 mg과 20.7 mg을 분리하였다.

### 활성물질의 항미생물 활성시험

박테리아에 대한 항균시험은 피검균으로 *Bacillus subtilis*와 *Escherichia coli*를 이용하였다. 피검균을 NBSY배지 10 ml를 직경 25 mm 시험관에 접종하여 27°C에서 24시간 현탁배양하여 얻은 배양액을 NBSY배지에 100배 희석하여 항박테리아시험에 사용하였다. 시료를 96 well micro assay plate의 제 1번째구에 넣고 조제된 균체현탁액을 분주하여 2배씩 희석하여 사용하였다. 이것을 27°C에서 24시간 암조건에서 배양하면서 박테리아의 증식을 육안으로 관찰하였다. 항박테리아 활성은 박테리아의 생육을 억제하는 최저농도인 최소억제농도(MIC, minimum inhibitory concentration)를 구하였다.<sup>14)</sup>

곰팡이에 대한 포자발아 억제시험은 피검균으로 *Aspergillus candidus*와 *Cladosporium herbarum*을 이용하였다. 균체를 PSM 한천사면배지에서 30°C에서 1주일 배양하여 포자를 형성시킨 후, 포자발아 억제시험용 배지를 소량 넣고 유리봉으로 사면을 가볍게 긁어 균사상으로부터 포자를 이탈시켰다. 가제를 이용하여 여과후 포자현탁액을 포자발아저해시험용배지에 50 ml로 만든 후 포자발아억제시험에 이용하였다. 시료를 96 well micro assay plate의 제 1번째구에 넣고 조제된 균체현탁액을 분주해서 2배씩 희석하여 사용하였다. 이것을 27°C에서 24시간 암조건에서 배양하면서 발아 및 생육상황을 현미경을 이용하여 최소억제농도(MIC)를 조사하였다.<sup>14)</sup>

### 결과 및 고찰

#### 페튜니아 캘러스의 naphthoquinone류 화합물 흡수율

페튜니아 캘러스의 naphthoquinone류 화합물 흡수율은 매우 다양하였다. 고체배양에서 토양 방선균유래 캘러스 억제활성물질인 3-OH NQ는 약 69%로 가장 높은 흡수율을 나타내었으며, juglone이 약 45%, 2-OH NQ가 40%, NQ가 20%였고 shikonin은 거의 흡수되지 않았다(Fig. 1). 액체배양에서 화합물의 흡수효과는 3-OH NQ가 처리후 48시간에

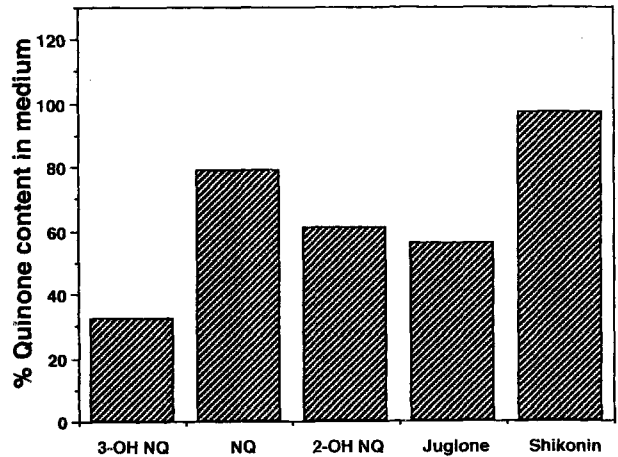


Fig. 1. Differential uptake rate of naphthoquinones in callus cultures of petunia. 3-OH NQ, NQ, and 2-OH NQ represent for 2,5,7-trihydroxy-3-(5'-hydroxyhexyl)-1,4-naphthoquinone, 1,4-naphthoquinone, and 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone, respectively. The values of Y axis indicate the % quinone content in medium which was not absorbed by the cells. Data are means of three re-

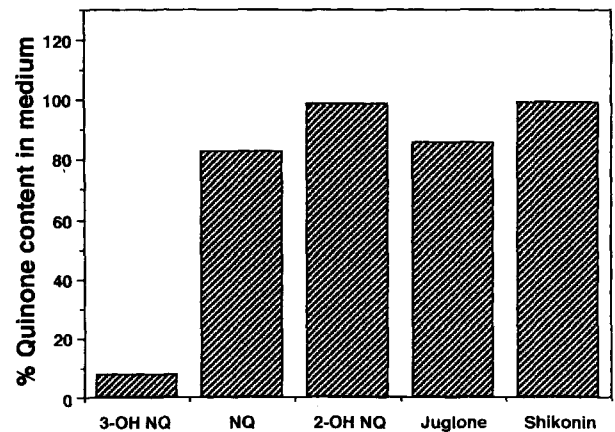


Fig. 2. Differential uptake rate of naphthoquinones in suspension cultures of petunia. 3-OH NQ, NQ, and 2-OH NQ represent for 2,5,7-trihydroxy-3-(5'-hydroxyhexyl)-1,4-naphthoquinone, 1,4-naphthoquinone, and 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone, respectively. The values of Y axis indicate the % quinone content in medium which was not absorbed by the cells. Data are means of three replicates.

90% 이상의 흡수율을 보였으나, 다른 naphthoquinone류 화합물은 고체배양의 경우보다 오히려 흡수율이 낮았다(Fig. 2). 페튜니아 캘러스는 3-OH NQ를 특이적으로 높게 흡수하였다.

#### 활성물질의 분리 및 항미생물 활성

3-OH NQ를 처리한 페튜니아 캘러스를 아세톤과 메탄올의 혼합액으로 추출하여 각종 생리활성시험에 공시하여 Table 1과 같은 결과를 얻었다. *Bacillus subtilis*와 *Escherichia coli*의 박테리아에 대한 활성은 3-OH NQ 화합물, 3-OH NQ가 처리된 세포 및 무처리 세포의 추출물 모두에서 없었다. 그러나 *Aspergillus candidus*와 *Cladosporium herbarum*의 곰팡이에 대하여는 처리구에서 강한 포자발아 억제활성 특히 *A. candidus*에 대하여 현저한 억제활성(32

Table 1. Antimicrobial activity of two phytoalexins (4,2',4' $\beta$ -tetrahydroxychalcone, THC and 4',7-dihydroxyflavone, DHF) induced from petunia cells treated with 2,5,7-trihydroxy-3-(5'-hydroxyhexyl)-1,4-naphthoquinone (3-OH NQ) as well as methanol extracts of cells treated with or without 3-OH NQ. Data are means of three replicates.

Test organism	Antimicrobial activity (MIC*: $\mu\text{g/ml}$ )				
	THC	DHF	3-OH NQ	Methanol extracts	
				Control	3-OH NQ
<i>Bacillus subtilis</i>	1000	500	500	1000	500
<i>Escherichia coli</i>	500	250	1000	500	250
<i>Aspergillus candidus</i>	16	125	500	250	32
<i>Cladosporium herbarum</i>	125	125	500	500	65

\*The MIC values against bacteria and fungi were determined by the serial 2-fold dilution method.<sup>14)</sup> The growth of the bacteria was evaluated by the degree of turbidity of the culture with the naked eye, and the spore germination of fungi was examined under a microscope.

$\mu\text{g/ml}$ )을 나타내었다. 3-OH NQ를 흡수한 페튜니아 켈러스에서 항곰팡이성 물질이 새롭게 유도되는 것이 시사되고 추출액을 HPLC로 분석한 결과, 대조구에서는 검출되지 않는 2개의 새로운 물질(retention time 11.3분과 12.6분)이 유도되었음이 확인되었다(Fig. 3). 또한 TLC (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>) 분석에서도 벤젠과 아세톤(7:3)의 혼합액으로 화합물을 전개한 결과, R<sub>f</sub> 0.42 (화합물 1)와 R<sub>f</sub> 0.54 (화합물 2)의 새로운 spot를 확인할 수 있었다(결과 미제시). 5 mg 3-OH NQ를 첨가하여 배양한 현탁배양세포로부터 silica gel 및 ODS column chromatography를 이용하여 두 화합물(화합물 1과 화합물 2)를 각각 103.2 mg과 20.7 mg을 분리하였다.

**활성물질의 물리화학적 성질 및 구조해석**

화합물 1은 mass spectra에 의하여 분자이온 peak m/z 272를 나타내었으며 자외선 흡수스펙트럼에서 1610~1585 cm<sup>-1</sup>와 3380 cm<sup>-1</sup>의 흡수로 카르보닐기와 수산기가 존재함이 시사되었다. <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼에서  $\delta$ 7.01 (2H, d, J=8.8 Hz) 및  $\delta$ 7.90 (2H, d, J=8.8 Hz)의 proton signal은 ortho coupling하고 있는 벤젠환상의 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>와 귀속되었으며  $\delta$ 6.31 (1H, d, J=2.3 Hz)은 벤젠환에서 meta coupling하고있는 2개의 수산기의 존재가 시사되어 본 화합물을 4,2',4' $\beta$ -tetrahydroxychalcone (이하 THC로 약함, Fig. 4A)으로 결정하였다. THC는 박테리아에는 활성이 거의 없었으나, 공시한 곰팡이 특히 *Aspergillus candidus*의 포자발아에 강한 억제활성(MIC: 16  $\mu\text{g/ml}$ )을 나타내었다(Table 1). 이 화합물은 콩과식물인 *Glycyrrhiza echinata* 배양세포로부터 분리된 바 있으나, 항곰팡이활성에 대해서는 보고된 바 없다.<sup>15)</sup> THC의 물리화학적 성질은 다음과 같다. Molecular formula: C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>; EI-MS m/z (rel. int.): 272 (M<sup>+</sup>), 156 (M<sup>+</sup>-18), 136 (M<sup>+</sup>-136), 120 (M<sup>+</sup>-152); UV  $\lambda$  max (MeOH) nm( $\epsilon$ ): 272 (11600), 382 (4000), 395 (3600), 382 (3350), 460 (2450); IR  $\nu$  max(KBr) cm<sup>-1</sup>: 3380, 1630, 1610-1585, 836, 786; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, acetone-d<sub>6</sub>):  $\delta$ 8.00 (1H, d, J=8.4 Hz), 7.90 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.01

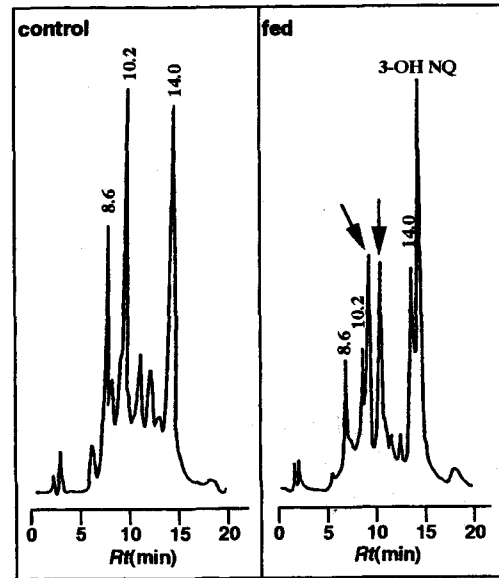


Fig. 3. HPLC profiles of methanol extracts after feeding with or without 2,5,7-trihydroxy-3-(5'-hydroxyhexyl)-1,4-naphthoquinone (3-OH NQ, 200  $\mu\text{g/l}$ ) in the suspension cultures of petunia for 48 hr. Two arrows indicate compounds accumulated after feeding with 3-OH NQ. The methanol extracts were loaded onto an Inertsil ODS (4.6 $\times$ 250 mm, GL Science, Tokyo) eluting with a linear gradient of 30% to 90% methanol for 30 min at a flow rate of 0.8 ml/min. The compounds were detected at 254 nm.

(2H, d, J=8.8 Hz), 7.00 (1H, s), 6.44(1H, dd, J=2.3, 8.8 Hz), 6.31(1H, d, J=2.3 Hz).

화합물 2는 질량분석 spectra로부터 분자량 m/z 254를 나타내었으며 자외선 흡수스펙트럼에서 수산기(3450 cm<sup>-1</sup>), 카르보닐기 및 방향족(1640~1620 cm<sup>-1</sup>)이 존재함이 시사되었다. <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼에서 화합물 1과 같은 패턴으로 저자장영역(6 ppm 이하)에서 signal이 관측되는 것으로 flavonoid계 화합물로 추정되었으며 isoflavon의 3번 탄소위치에 특징적인 singlet peak ( $\delta$ 6.58)와  $\delta$ 7.02 및  $\delta$ 7.91에 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>계(J=8.9 Hz)로 확인된 것으로 hydroxyphenyl기의 존재를 확인할 수 있었다. 또한 가장 저자장에 위치한  $\delta$ 7.95의 doublet peak (J=8.9 Hz)는 카르보닐의 페리위치에 귀속되고  $\delta$ 6.95 (dd, J=8.6, 2.3 Hz)와 ortho coupling (J=8.6)하고 있는 것으로 본 화합물은 4',7-dihydroxyflavone (이하 DHF로 약함, Fig. 4B)으로 결정하였다. DHF는 박테리아 증식에 약간 활성이 있었으나 공시한 곰팡이 *Aspergillus candidus*와 *Cladosporium herbarum*의 포자발아에 억제활성(MIC: 125  $\mu\text{g/ml}$ )을 나타내었다(Table 1). 이 화합물은 백합과 식물인 *Dracaena cinnabari* 등에서 분리된 바 있으나 항곰팡이활성에 대한 보고는 없다.<sup>16)</sup> DHF의 물리화학적 성질은 다음과 같다. Molecular formula: C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub>; EI-MS m/z (rel. int.): 254 (M<sup>+</sup>); UV  $\lambda$  max (MeOH) nm( $\epsilon$ ): 230, 310, 326; IR  $\nu$  max (KBr) cm<sup>-1</sup>: 3450, 1640~1620, 1395, 1260; <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, acetone-d<sub>6</sub>):  $\delta$ 7.95 (1H, d, J=8.6 Hz), 7.91 (2H, d, J=8.9 Hz), 7.02 (2H, d, J=8.9 Hz), 7.03 (1H, d, J=2.3 Hz), 6.95 (1H, dd, J=8.6, 2.3 Hz), 6.58

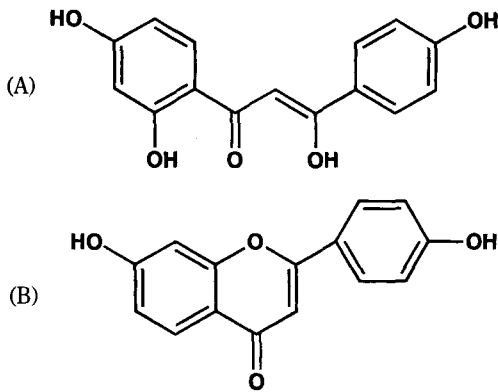


Fig. 4. Chemical structures of two phytoalexins (4,2',4'β-tetrahydroxychalcone, THC and 4',7-dihydroxyflavone, DHF) induced from petunia cells treated with 2,5,7-trihydroxy-3-(5'-hydroxyhexyl)-1,4-naphthoquinone (3-OH NQ).

(1H, s).

토양 방선균 9602 균주로부터 분리한 페튜니아 캘러스 생장억제활성물질을 포함하여 5종의 naphthoquinone류를 페튜니아 배양세포에 처리한 결과, 특히 분리한 배양세포 생장억제물질 3-OH NQ는 페튜니아 배양세포에 의해서 효율적으로 흡수되었다. 3-OH NQ를 처리한 캘러스는 대조구 캘러스에서 거의 생산되지 않는 THC와 DHF가 축적됨이 확인되었다. 이들 화합물은 항미생물활성 특히 항곰팡이 활성이 강하였으며, 이들 두 화합물이 지닌 항곰팡이활성에 관한 보고는 없다. 두 화합물은 알팔파의 발아에 거의 영향을 주지 않았다(결과 미제시). 본 연구에서 페튜니아 배양세포에 elicitor로 3-OH NQ를 처리하였을 때 보통의 세포 배양에서 얻을 수 없는 phytoalexin을 유도하는 것이 확인되었다. 이와 같은 현상은 다양한 elicitor에 대하여 배양세포들이 생체방어물질로 유용한 phytoalexin을 효율적으로 유도할 수 있음이 시사되어 식물배양세포는 새로운 유용물질의 탐색에 좋은 연구재료로 이용되고 있다.

## 참 고 문 헌

- Heller, W. and T. Kuhl (1985) Elicitor induction of a microsomal 5-O-(4-coumaroyl) shikimate 3'-hydroxylase in parsley cell suspension cultures. *Arch. Biochem. Biophys.* **241**, 453-460.
- Barz, W., W. Bless, G. Berger-Pappendorf, W. Gunia, O. Mackenbrock, D. E. Meier, C. H. Otto and E. Super (1990) Phytoalexins as part of induced defense reaction in plants: their elicitation, function, and metabolism. In *Bioactive Compounds From Plants*, C. F. van Sumere and P. J. Leen, pp. 140-156, Chichester: Wiley.
- Paxton, J. D. (1981) Phytoalexins - a working redefinition. *Phytopathol. Z.* **101**, 106-109.
- Kobayashi, A. (1995) A new strategy for production of novel secondary metabolites in plant tissue culture. In *International Symposium on Functional Biomaterials*. pp. 191-208. Seoul National University.
- Gustine, D. L. (1987) Induction of medicarpin biosynthesis in ladino clover callus by p-chloromercuribenzoic acid is reversed by dithiothreitol. *Plant Physiol.* **84**, 3-6.
- Tai, A., E. Ohsawa, K. Kawazu and A. Kobayashi (1996) A minimum essential structure of LN-3 elicitor activity in bean cotyledons. *Z. Naturforsch.* **51c**, 15-19.
- Kim, S. K., S. S. Kwak, K. H. Jung, S. R. Min, I. H. Park and J. R. Liu (1994) Selection of plant cell lines for high yields of peroxidase. *Korean Biochem. J.* **27**, 132-137.
- You, S. H., S. W. Kim, S. H. Kim, J. R. Liu and S. S. Kwak (1996) Selection and isoenzyme analysis of plant cell lines for high yields of superoxide dismutase. *Korean J. Plant Tissue Culture* **23**, 103-106.
- Jang, M. S., G. H. Huh, S. W. Kim, I. H. Park, J. R. Liu and S. S. Kwak (1996) Comparison of catalase and other antioxidant enzyme activities in various plant cell lines. *Korean J. Plant Tissue Culture* **23**, 157-160.
- Kwak, S. S., S. K. Kim, M. S. Lee, I. H. Park and J. R. Liu (1995) Acidic peroxidases from suspension-culture of sweet potato. *Phytochemistry* **39**, 981-984.
- Huh, G. H., S. J. Lee, Y. S. Bae, J. R. Liu and S. S. Kwak (1997) Molecular cloning and characterization of anionic and neutral peroxidase cDNAs from sweet potato suspension-cultured cells and their differential expression in response to stress. *Mol. Gen. Genet.* (in press).
- Kim, M. J., E. H. Kim and S. S. Kwak (1997) Isolation of a petunia cell growth inhibitor from *Streptomyces* sp. 9602. *Korean J. Plant Tissue Culture* **24**, (in press)
- Murashige, T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* **15**, 473-497.
- Kobayashi, A., Y. Koguchi, H. Kanzaki, S. I. Kajiyama and K. Kawazu (1994) Production of a new type of bioactive phenolic compound. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 133-134.
- Ayabe, S. I., M. Kobayashi, M. Hikichi, K. Matsumoto and T. Furuya (1980) Flavonoids from the cultured cells of *Glycyrrhiza echinata*. *Phytochemistry* **19**, 2179-2183.
- Masaoud, M., H. Ripperger, A. Porzel and G. Adam (1995) Flavonoids of dragon's blood from *Dracaena cinnabari*. *Phytochemistry* **38**, 745-749.

---

**Induction of Phytoalexins by Uptake of Naphthoquinones in Cell Cultures of Petunia**

Myong-Jo Kim and Sang-Soo Kwak\* (*Plant Biochemistry Research Unit, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea*)

**Abstract** : To induce the phytoalexins in plant cell culture systems, we surveyed the antimicrobial activity following the feeding of five naphthoquinones in cell cultures of petunia. Among naphthoquinones treated, 2,5,7-trihydroxy-3-(5'-hydroxyhexyl)-1,4-naphthoquinone (3-OH NQ) was most efficiently absorbed into the cells within 48 hr. The crude extracts of cells treated with 3-OH NQ showed a strong inhibition activity on spore germination of *Aspergillus candidus* (MIC: 32 µg/ml), whereas the untreated cells showed no activity. The two active compounds, 4,2',4',β-tetrahydroxychalcone and 4',7-dihydroxyflavone, were isolated from petunia cells treated with 3-OH NQ. The major phytoalexin, 4,2',4',β-tetrahydroxychalcone, inhibited strongly the spore germination of *A. candidus* (MIC: 16 µg/ml).

---

**Key words** : antimicrobial activity, spore germination inhibitor, 3-OH NQ, THC, DHF

\*Corresponding author